



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

FACULTAD DE CIENCIAS  
Grado en Química

## MEMORIA DEL TRABAJO FIN DE GRADO

*Nanosensores plasmónicos en la detección colorimétrica  
de algunas bases pirimidínicas y derivados*

*Plasmonic nanosensors in the colorimetric detection of  
some pyrimidine bases and derivatives*

*Nanosensores plasmónicos na detección colorimétrica  
dalgunhas bases pirimidínicas e derivados*

Directora: EMILIA IGLESIAS MARTÍNEZ

**OSCAR GÓMEZ VARELA**

Curso: 2015/16 – Convocatoria:



## Facultade de Ciencias



Emilia Iglesias Martínez, catedrática de universidade, pertencente o departamento de Química Física e Enxenaría Química I (area de Química Física) da Universidade da Coruña

FAI CONSTAR

Que a presente memoria de traballo de fin de grao en Química titulada: “*Nanosensores plasmónicos na detección colorimétrica dalgunhas bases pirimidínicas e derivados*” presentada polo graduado en Química don **Oscar Gómez Varela** ten sido realizada baixo a miña dirección, e considerando que cumpre tódalas condicións esixidas autorizo a súa presentación ante o tribunal correspondente.

Co gallo de que obre os efectos oportunos, asino a presente o 21 de xullo do 2016.

Asdo. Emilia Iglesias Martínez



## Abreviaturas

AuNPs	.....	nanopartículas de oro
C	.....	citosina
Cys	.....	cisteína
Hcys	.....	homocisteína
nm	.....	nanómetro
nM	.....	nanomolar
SPR	.....	surface plasmon resonance
TU	.....	tiourea
2-TU	.....	2-tiouracilo
4-TU	.....	4-tiouracilo
U	.....	uracilo
Ur	.....	urea
PEN	.....	penicilamina
NAC	.....	N-acetilpenicilamina
CTABr	.....	bromuro de cetiltrimetilamonio
TEM	.....	microscopía de transmisión electrónica



# INDICE

ABREVIATURAS.....	5
Resumen.....	9
Resumo.....	10
Summary .....	11
Objetivos .....	13
1. Introducción .....	17
1.1. Métodos colorimétricos basados en la agregación de NPs de Au .....	18
1.2. Síntesis de nanopartículas de oro (NPs de Au) .....	21
1.3. Características de las bases pirimidínicas. ....	23
2. Parte experimental.....	29
2.1. Síntesis de nanopartículas de oro .....	30
2.2. Caracterización de las AuNPs .....	30
2.3. Cálculo de concentración .....	33
3. Resultados y discusión .....	37
3.1. Interacción con nanopartículas de Au.....	38
3.1.1. Urea y Tiourea .....	38
3.1.2. Uracilo, 2-tiouracilo y 4-tiuracilo.....	41
3.2. Estudio de la citosina.....	48
4. Conclusiones.....	53
4. Conclusións .....	54
4. Conclusions .....	55



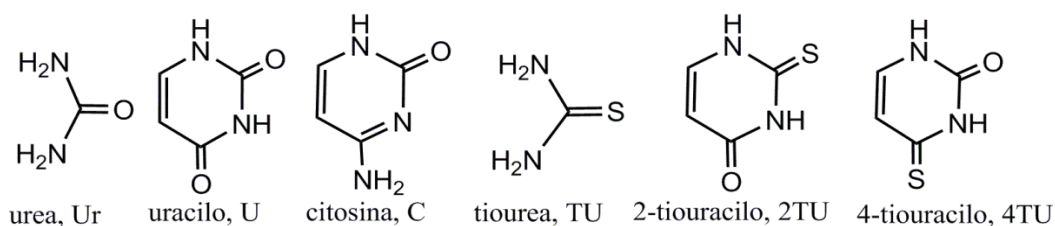


## Resumen

Los estudios en Nanotecnología han experimentado un crecimiento enorme en los últimos años. Con ello, se han desarrollado nuevos métodos de detección colorimétrica basados en biosensores. El fundamento de la mayoría de estos métodos está en el uso de disoluciones acuosas coloidales de nanopartículas de oro (Au NPs), de diversos tamaños, pero siempre en la escala del nm. Los hidrosoles de Au monodispersos de tamaños inferiores a 20 nm, presentan una intensa banda de absorción centrada en 520 nm, es decir, son de color rojo rubí; mientras que si las nanopartículas se asocian originando agregados coloidales de mayor tamaño, la banda de absorción se desplaza a  $\lambda > 650$  nm, siendo, por tanto, la disolución de color azul. El cambio de color es fácilmente visible y tiene su origen en la respuesta a la interacción de moléculas de interés biológico con la superficie de las NPs de Au. Si comparamos con la superficie plana del Au macroscópico, las nanopartículas de Au esféricas permiten, por una parte, aumentar enormemente la velocidad de interacción con moléculas orgánicas; por otra parte, la superficie curva de las nanopartículas puede acomodar a su alrededor un mayor número de moléculas, y finalmente, la contaminación superficial es prácticamente nula. En definitiva, la respuesta es mucho más intensa, y se produce en tiempos más cortos y no hay saturación del adsorbente.

En este trabajo se han optimizado las condiciones para la detección colorimétrica de algunas bases pirimidínicas mediante el uso de nanopartículas de oro. El método se ha aplicado a la detección de uracilo (U) y de sus derivados, 2-tiouracilo (2-TU) y 4-tiouracilo (4-TU), y de citosina (C); los resultados se comparan con los observados para compuestos simples de estructura funcional similar, como es el caso de la urea y de la tiourea (TU). Las estructuras moleculares de estos compuestos se muestran en el esquema 1. Las NPs de Au utilizadas se han sintetizado y caracterizado como parte de este trabajo. La técnica de seguimiento de la adsorción de las bases indicadas en el Esquema 1 con las NPs de Au ha sido la espectroscopía UV-vis.

Los resultados obtenidos se explican en base a un mecanismo de interacción entre el adsorbato y la superficie de las Au NPs, analizando las propiedades ácido-base de aquél, así como, su orientación en la superficie. Se determinan los límites de detección colorimétrica, para los casos de interacción positiva. En algunos casos, como con la citosina, ha sido posible seguir la cinética del proceso de quimisorción. Por último, se realiza el estudio de la mayor afinidad de las bases estudiadas por la superficie de las NPs de Au.



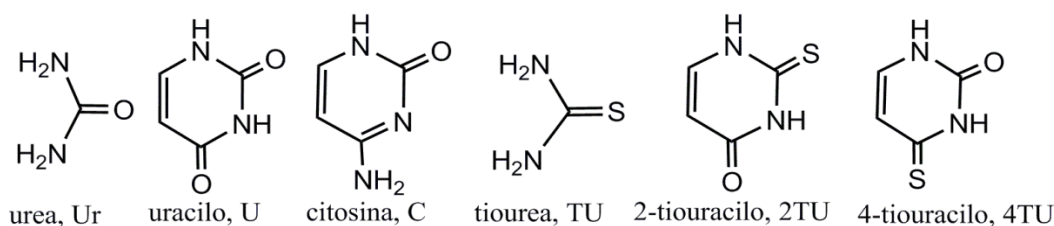
**Esquema 1.** Estructuras moleculares de los compuestos estudiados

## Resumo

Os estudos en Nanotecnoloxía experimentaron un gran crecemento nestes últimos anos. Desenvolvaronse novos métodos de detección colorimétrica basados nos biosensores. O fundamento da maioría destes métodos está no uso de disolucións acuosas coloidais de nanopartículas de ouro (Au NPs), de diversos tamaños, pero sempre na escala do nm. Os hidrosóis de Au monodispersos de tamaños inferiores a 20 nm, presentan unha intensa banda de absorción centrada en 520 nm, é dicir, son de cor vermello rubí; mentres que as nanopartículas asociáanse orixinando agregados coloidais de maior tamaño, a banda de absorción desplazase a  $\lambda > 650$  nm, sendo, polo tanto, a disolución de cor azul. O cambio da cor é facilmente visible e ten a súa orixen na resposta á interacción de moléculas de interese biolóxico coa superficie das NPs de Au. Se o comparásemos coa superficie plana do Au macroscópico, as nanopartículas de Au esféricas permiten, por unha parte, aumentar enormemente a velocidade de interacción con moléculas orgánicas; por outra parte, a superficie curva das nanopartículas pode acomodarse en torno a un maior número de moléculas, e finalmente, a contaminación superficial é practicamente nula. En definitiva, a resposta é moito mais intensa, e prodúcese en tempos mais cortos e non hai saturación do adsorbente.

Neste traballo optimizáronse as condicións para a detección colorimétrica dalgunhas bases pirimidínicas mediante o uso de nanopartículas de ouro. O método aplícase á detección de uracilo (U) e dos seus derivados, 2-tiouracilo (2-TU) e 4-tiouracilo (4-TU), e citosina (C); os resultados comparanse cos observados para compostos mais simples de estrutura funcional semellante, como é o caso da urea e da tiourea (TU). As estruturas moleculares destes compostos móstranse no esquema 1. Las NPs de Au utilizadas sintetizáronse e caracterizáronse como parte deste traballo. A técnica de seguemento da adsorción das bases indicadas no Esquema 1 coas NPs de Au foi a espectroscopía UV-vis.

Os resultados obtidos explícanse en base a un mecanismo de interacción entre adsorbato e a superficie das AuNPs, analizando as propiedades ácido-base, así como, su orientación na superficie. Determínanse os límites de detección colorimétrica, para os casos de interacción positiva. Nalgúns casos, como coa citosina, foi posible seguir a cinética do proceso de quimisorción. Por último, realízase o estudo da maior afinidade das bases estudadas pola superficie das NPs de Au.



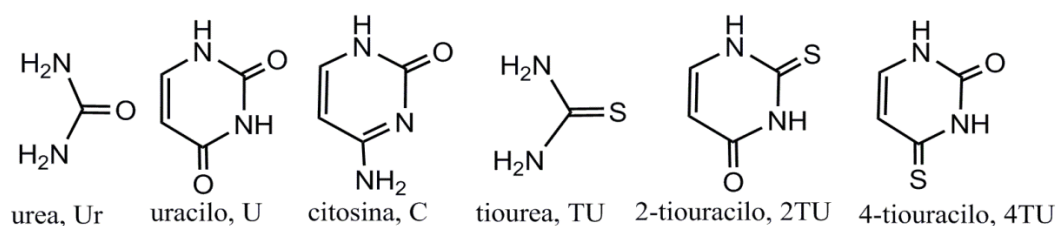
**Esquema 1.** Estruturas moleculares dos compostos estudados

## Summary

Studies in nanotechnology has experienced an enormous growth in recent years. This has led to the development of new methods of colorimetric detection based on biosensors. The foundation of most of these methods is on the usage aqueous solutions of colloidal gold nanoparticles (AuNPs) of different sizes, but always in the nm scale. Monodisperse gold hydrosols lower than 20 nm sizes, have an intense absorption band centered at 520 nm, that is to say, are ruby red; whereas if the nanoparticles are associated causing colloidal aggregates larger, the absorption band shifts to > 650nm, being therefore the solution blue. The color change is easily visible and originates in response to the interaction of biological molecules with the surface of AuNPs. Comparing with the flat surface of macroscopic gold, gold spherical nanoparticles allow, on the one hand, greatly speed of interaction with organic molecules; moreover, the curved surface of the nanoparticles can accommodate around a greater number of molecules, and finally, the surface contamination is negligible. In short, the answer is much more intense and produce in shorter times and no saturation of the adsorbent.

In this work we have optimized the conditions for colorimetric detection of some pyrimidine bases by using gold nanoparticles. The method has been applied to the detection of uracil (U) and its derivatives, 2-thiouracil (2-TU) and 4-thiouracil (4-TU), and cytosine (C); the results are compared with those observed for single compounds of similar functional structure, such as urea and thiourea (TU). The molecular structures of these compounds are shown in scheme 1. The AuNPs used are as been synthesized and characterized part of this work. Siguimiento technique adsorption of the bases shown in Scheme 1 with AuNPs has been UV-vis spectroscopy.

The results obtained are explained based on a mechanism of interaction between the adsorbate and the surface of AuNPs analyzing the acid-base properties of that and its orientation on the surface. The limits of colorimetric detection are determined for the cases of positive interaction. In some cases, such as cytosine, it has been possible to follow the kinetics of chemisorption process. Finally, the study of higher affinity bases studied by the surface of AuNPs is performed.



**Scheme 1.** Molecular structures of the compounds studied



## Objetivos

Los objetivos principales de este trabajo son:

- La optimización de un método colorimétrico basado en el uso de nanosensores plasmónicos para la detección de moléculas orgánicas de interés biológico.
- Propuesta de un mecanismo de interacción nanosensor-molécula orgánica que explique los cambios observados en determinadas propiedades químico-físicas.
- Extrapolación de comportamientos y/o resultados a sistemas de similar estructura.



## **1. INTRODUCCIÓN**

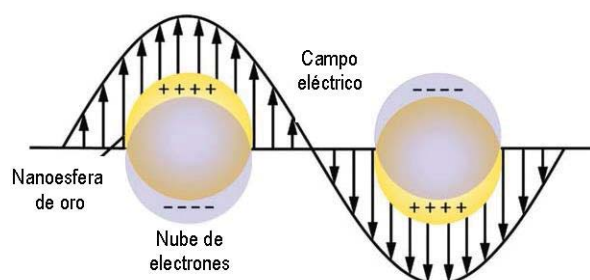
---





# 1. Introducción

Las NPs de Au de tamaño inferior a 20 nm presentan una intensa banda de absorción centrada en 520 nm.<sup>1,2</sup> El origen de esta banda está en la oscilación colectiva de los electrones libres de la banda de conducción en la superficie del metal como consecuencia de la resonancia con el campo electromagnético de la luz incidente. Se trata de una banda de absorción altamente isotrópica denominada “*banda de resonancia plasmónica*” –del inglés *surface plasmon resonance (SPR) band*–. Las características de la SPR banda depende, primero del tamaño y forma de las NPs, y, segundo de la constante dieléctrica producida por el medio que las rodea o las especies adsorbidas.



**Figura 1.** Oscilación colectiva de los electrones de la superficie de Au NPs en respuesta a un campo eléctrico externo: origen de LSPR (*localized surface plasmon resonance*)

La alta sensibilidad de las disoluciones coloidales de Au a los cambios producidos en ambos parámetros, ha encontrado múltiples aplicaciones, no sólo como biosensores, sino también en tratamientos y diagnósticos biomédicos diversos.<sup>3,4</sup>

Dentro del primer tipo de sensores se encuentran moléculas cuya presencia provoca la agregación de las NPs de Au, lo que da lugar a un visible cambio de color desde el rojo ( $\lambda \sim 520$  nm, nanopartículas dispersas) hasta el azul ( $\lambda > 650$  nm, agregados de NPs). Es un método de análisis sencillo, de bajo coste, utiliza disoluciones homogéneas, normalmente acuosas, y la instrumentación requerida es básica: un simple espectrofotómetro UV-Vis o el método visual. Tiene como inconveniente que las NPs de Au dispersas en disolución pueden sufrir agregación por perturbaciones externas, como cambios en la fuerza iónica, en el pH o la temperatura.

Dentro del segundo tipo de sensores están aquellos ligandos que rodean las NPs de Au induciendo cambios en el índice de refracción o en la constante dieléctrica. Se generan partículas estables rodeadas de una capa de determinados adsorbatos. En los últimos años se ha intensificado mucho la actividad científica en este campo.<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup> H. Jans, Q. Huo, *Chem. Soc. Rev.*, **2012**, *41*, 2849-2866. “Gold nanoparticles enables biological and chemical detection and analysis”.

<sup>2</sup> N. Haiss, N. T. K. Thanh, J. Aveyard, D. J. Fernig, *Anal. Chem.*, **2007**, *79*, 4215-4221. “Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-Vis spectra”.

<sup>3</sup> L. A. Dykman, V. A. Rosatyrev, B. N. Khlebtsov, N. G. Khlebtsov, *Anal. Biochem.*, **2005**, *341*, 16-21. “A protein assay based on colloidal gold conjugates with trypsin”

<sup>4</sup> B. Sepúlveda, P. C. Angelomé, L. M. Lechuga, L. M. Liz-Marzán, *Nano Today*, **2009**, *4*, 244-251. “LSPR-based nanobiosensors”

### 1.1. Métodos colorimétricos basados en la agregación de NPs de Au

Los soles acuosos de nanopartículas de oro son ampliamente utilizados como sensores colorimétricos por dos razones fundamentales: 1) presentan coeficientes de absorción extremadamente altos, del orden de  $10^8 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , dependiendo del tamaño de las NPs, por lo que, concentraciones del orden de  $10^{-9} \text{ M}$  (nM) son suficientes para una respuesta adecuada en espectroscopía UV-Vis, y 2) la agregación de las NPs de Au inducida por determinadas moléculas biológicas va acompañada de un cambio de color –del rojo rubí al azul– de fácil visualización y cuantificación.

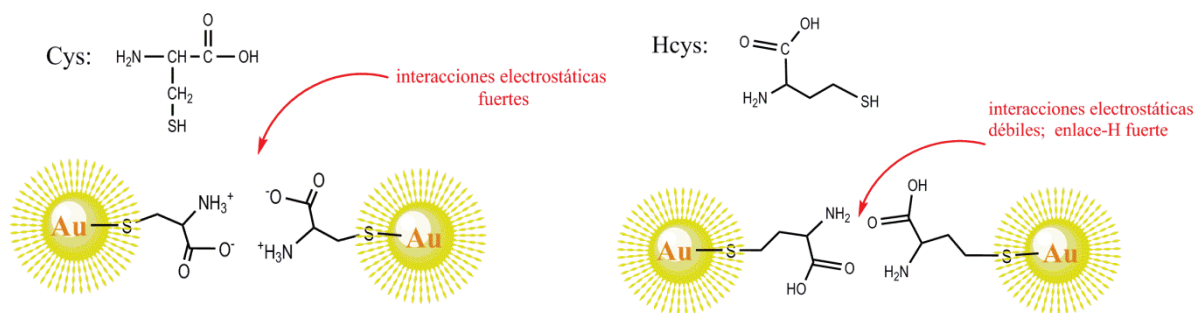
Las moléculas que contienen grupos tioles (-SH) o grupos amino (-NH<sub>2</sub> o >NH, ..) se adsorben a la superficie del Au formando enlaces químicos estables, es decir, siguen un proceso de quimisorción. Por tanto, las moléculas orgánicas con estos grupos funcionales es de esperar que se adsorban a las NPs de Au que son más reactivas que el Au macroscópico. Dependiendo de la estructura de estas moléculas adsorbidas, las NPs pueden autoagregarse originando partículas de mayor tamaño, cuyo proceso va acompañado de un cambio de color de la disolución coloidal, fácilmente visible. Algunos ejemplos bibliográficos se relatan a continuación.

La homocisteína (Hcys) es un amino ácido que contiene un grupo tiol. Se encuentra en el cuerpo humano, tanto en su forma reducida como en la oxidada y es un producto intermedio del metabolismo de la metionina a la cisteína. Concentraciones de Hcys en sangre superiores a  $15 \mu\text{M}$  da lugar a episodios de *hipercisteinemia* que llevan asociados enfermedades cardiovasculares, complicaciones en el embarazo, osteoporosis, defectos en conductos neuronales o la enfermedad del Alzheimer. De aquí la importancia de una determinación rápida y exacta de los niveles de Hcys en sangre. Un estudio reciente demuestra la adsorción rápida y cuantitativa de Hcys a la superficie de las NPs de Au formando enlaces -S-Au estables. El proceso va acompañado de la autoagregación de las NPs de Au, observable y cuantificable por espectroscopía UV-Vis: el máximo de absorción de la disolución acuosa de NPs de Au centrado en 520 nm se desplaza a longitudes de onda mayores de 650 nm. Es suficiente una concentración de [AuNPs]= 2.3 nM y de [Hcys]=  $9.2 \mu\text{M}$  para observar un aumento de absorbancia a 650 nm superior a 0.40 unidades de absorbancia en menos de 20 min. La velocidad del proceso se puede aumentar por la presencia de sales (NaCl), bajando ligeramente el pH o subiendo la temperatura. La causa del proceso de autoagregación de las NPs de Au está en las interacciones electrostáticas y el enlace-H de los grupos ácido y amino de la molécula de Hcys.<sup>5</sup> Un esquema orientativo del proceso se muestra en la Figura 2.

La cisteína (Cys) presenta un comportamiento similar, aunque la velocidad del proceso es casi dos órdenes de magnitud más lento que el observado con la Hcys.

---

<sup>5</sup> I-I. S. Lim, W. Ip, E. Crew, P. N. Njoki, D. Mott, Ch.-J., Zhong, Y. Pan, S. Zhou, *Langmuir*, **2007**, *23*, 826-833. “Homocysteine-mediated reactivity and assembly of gold nanoparticles”.



**Figura 2.** Representación esquemática de la asociación de dos NPs de Au provocada por cisteína (Cys) y homocisteína (Hcys) unidas a la superficie del Au.

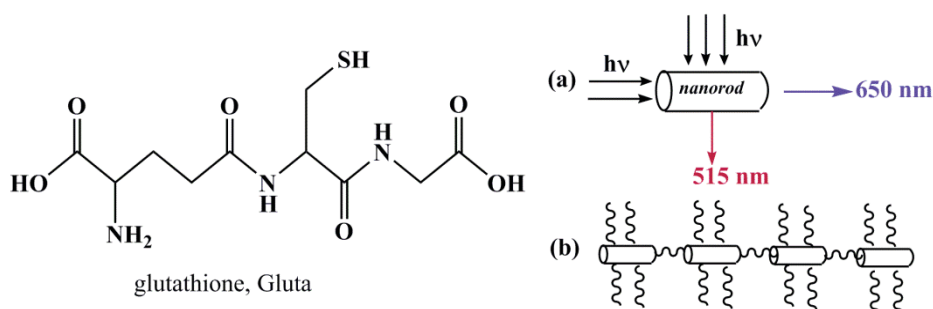
Así, una concentración de Cys 14  $\mu\text{M}$  produce el desplazamiento de la SPR banda de las nanopartículas en aproximadamente 600 min, mientras que con la misma concentración de Hcys y el mismo tipo de Au NPs ( $\odot$  13 nm) son suficientes 3 min para observar el cambio de color. Por el contrario, con glutathiona (Gluta), un tripéptido formado por ácido glutámico-cisteína-glicina ( $\gamma$ -Glu-Cys-Gly), se requieren concentraciones más altas  $\sim 1$  mM y la velocidad del proceso de autoagregación es 5-órdenes de magnitud inferior a la observada con Hcys.<sup>6</sup> En un estudio similar Li y Li<sup>7</sup> demuestran que la presencia de 1 mM de iones  $\text{Cu}^{+2}$  y concentraciones de Cys tan bajas como 10  $\mu\text{M}$  son suficiente para provocar el cambio de color de la disolución de Au NPs en menos de 20 min.<sup>7</sup>

La disminución de la concentración de Glutathiona en los fluidos intracelulares se cree que está directamente relacionada con el envejecimiento. La presencia de varios grupos funcionales en la misma molécula dificulta su detección mediante el uso de biosensores. Así en 2005, el grupo de Thomas<sup>8</sup> desarrolló un método de detección selectivo usando nanopartículas de oro en forma de cilindros, *nanorods*. Estas NPs presenta dos bandas de absorción: 515 nm ( $\epsilon=3.4 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) debida a la absorción de luz en la dirección transversal, y otra a 650 nm ( $\epsilon=5.8 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) atribuida a la absorción de luz en la dirección longitudinal. La intensidad de esta última banda disminuye drásticamente en presencia de cantidades de Cys o Gluta inferiores a 3  $\mu\text{M}$  (Cys) o 12  $\mu\text{M}$  (Gluta) mientras se forma otra banda centrada en 850 nm; al mismo tiempo aparece un punto isobéptico a 730 nm lo que sugiere la coexistencia de dos tipos de NPs. Cualquier otro amino ácido distinto de la Cys no afecta al proceso. Estas observaciones experimentales son consistentes con la agregación de las NPs de Au (*nanorods*) en la dirección longitudinal, exclusivamente, provocada por la atracción de las moléculas de Cys o Gluta adsorbidas a las NPs, Figura 3.<sup>8</sup>

<sup>6</sup> F. X. Zhang, L. Han, S. B. Israel, J. G. Daras, M. M. Maye, M. K. Ly, C. J. Zhong, *Analyst*, **2002**, *127*, 462-465. "Colorimetric detection of thiol-containing amino acids using gold nanoparticles".

<sup>7</sup> L. Li, B. Li, *Analyst*, **2009**, *134*, 1361-1365. "Sensitive and selective detection of cysteine using gold nanoparticles as colorimetric probes".

<sup>8</sup> P. K. Sudeep, S. T. Shibu Joseph, K. G. Thomas, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 6516-6517. "Sensitive detection of cysteine and glutathione using gold nanorods".



**Figura 3.** Estructura de la molécula de glutathione; (a) direcciones de absorción de luz de las NPs de Au con forma cilíndrica (nanorods) y (b) agregación longitudinal en presencia de Cys o de Gluta.

La penicilamina (PEN) y la N-acetilpenicilamina (NAC), dos amino ácidos derivados de la cysteina, inducen la agregación de NPs de Au dispersas en medio acuoso a valores de pH inferiores a 4. El proceso es completamente reversible al aumentar de nuevo el pH hasta aproximadamente 7, siendo posible su repetición mediante cambios (ácido-neutro) cíclicos del pH. La agregación se atribuye al enlace-H entre los grupos ácido de aminoácidos adsorbidos a diferentes nanopartículas. La valoración por calorimetría isotérmica (ITC) permite evaluar la superficie de NPs de Au recubierta por los grupos tiol de la PEN y NAC, siendo del 40 y 60%, respectivamente, es decir, inferior al recubrimiento con monocapa.<sup>9</sup>

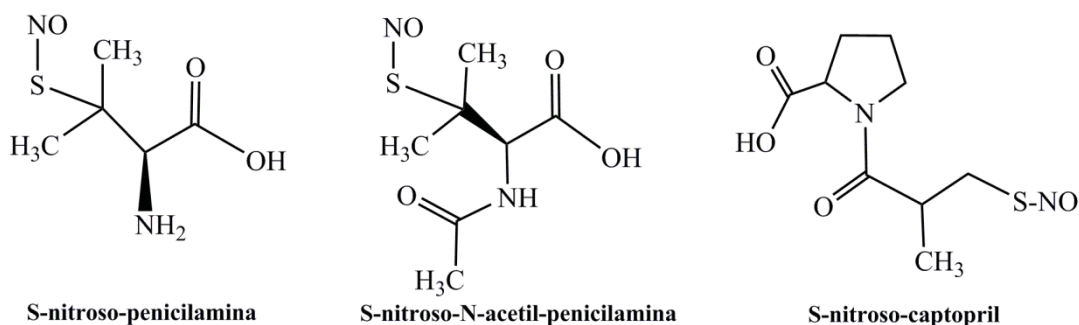
Por el contrario, los compuestos S-nitroso-derivados de PEN y NAC (Esquema 2) condicionan la autoagregación de NPs de Au a valores de pH fisiológico. En el proceso de adsorción de los S-nitroso-compuestos se libera de forma controlada y cuantitativa el NO (un neurotransmisor y dilatador de los vasos sanguíneos): en la quimisorción del tiol a la superficie de Au, primero se rompe el enlace –S-NO. La liberación de NO continúa hasta que se agota la superficie libre del metal, por lo que, en condiciones de exceso del S-nitroso-compuesto, la cantidad generada de NO aumenta con la concentración de Au NPs.<sup>10</sup>

Un comportamiento similar se ha observado en el estudio del efecto que produce la adición de S-nitroso-captopril y de captopril a disoluciones acuosas de NPs de Au. La presencia de pequeñas cantidades de iones  $Mn^{+2}$  produce un drástico aumento en la velocidad de proceso de agregación de las NPs, lo que va acompañado de un cambio de color del rojo al azul, en condiciones experimentales en las que los iones manganeso (II) por sí solos no producen agregación. El proceso sigue una cinética de primer orden, mientras que con captopril, es mucho más lento y en determinadas condiciones experimentales sigue se ajusta a un sistema de reacciones consecutivas.<sup>11</sup>

<sup>9</sup> P. Taladriz-Blanco, N. J. Buurma, L. Rodríguez-Lorenzo, J. Pérez-Juste, L. M. Liz-Marzán, P. Hervés, *J. Mater. Chem.*, **2011**, *21*, 16880-16887. "Reversible assembly of metal nanoparticles induced by penicillamine. Dynamic formation of SERS hot spots".

<sup>10</sup> P. Taladriz-Blanco, V. Pastoriza-Santos, J. Pérez-Juste, P. Hervés. *Langmuir*, **2013**, *29*, 8051-8061-8069. "Controllable nitric oxide release in the presence of gold nanoparticles."

<sup>11</sup> E. Iglesias, R. Prado-Gotor, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2015**, *17*, 644- 654. "Interaction of gold nanoparticles mediated by captopril and S-nitrosocaptopril: the effect of manganese ions in mild acid medium".



**Esquema 2.** Estructuras moleculares de los S-nitrosocompuestos derivados de la penicilamina, N-acetil-penicilamina y captopril.

## 1.2. Síntesis de nanopartículas de oro (NPs de Au)

Buena parte de las aplicaciones que, en los últimos 20 años, se han desarrollado para las disoluciones coloidales de oro, se debe a sus propiedades ópticas en la región visible del espectro y a la alta sensibilidad de las mismas a variaciones en el tamaño y la forma de las NPs, así como de la naturaleza del microentorno que las rodea. Es por ello, que la primera fase de la aplicación de estos sistemas coloidales, es decir, su preparación, es fundamental.

Existen diferentes rutas para la síntesis de NPs de Au, cada una de las cuales va a determinar las características del producto obtenido. En todos los casos, son necesarios un *reductor* y un *estabilizador* dispersos en el propio medio de síntesis. En cualquiera de estos métodos el material de partida es la sal de oro comercial:  $\text{HAuCl}_4$ , soluble en agua, en la que el  $\text{Au}^{+3}$  se ha de reducir a  $\text{Au}^0$ . El reductor más ampliamente utilizado es el citrato de sodio,  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$  o  $\text{Na}_3\text{-cit}$ , que, a su vez actúa de estabilizador de las nanopartículas que se forman. El método fue desarrollado por primera vez en 1951 por Turkevich<sup>12</sup> y posteriormente se ha revisado y perfeccionado.<sup>13-17</sup> Según el método de Turkevich la reducción de la sal de oro con citrato de sodio en disolución acuosa da lugar a una suspensión de nanopartículas de oro monodispersas de diferente tamaño, según sea la relación de concentraciones  $R = [\text{Au}^{+3}]/[\text{Na}_3\text{-cit}]$ . Variando R se obtienen nanopartículas de tamaños entre 5 y 150 nm, aproximadamente. Algunos de estos valores obtenidos por Frens se relacionan en la Tabla 1.

<sup>12</sup> J. Turkevich, P. C. Stevenson, J. Hillier, *Discuss. Faraday Soc.*, **1951**, *11*, 55-

<sup>13</sup> B. V. Enüstün, J. Turkevich, *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, *85*, 3317-3328. "Coagulation of colloidal gold"

<sup>14</sup> G. Frens, *Nature (London) Phys. Sci.*, **1973**, *241*, 20-22. "Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions"

<sup>15</sup> J. Kinling, M. Maier, B. Okenve, V. Kotaidis, H. Ballot, A. Plech, *J. Phys. Chem. B*, **2006**, *110*, 15700-15707. "Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited"

<sup>16</sup> C. Li, D. Li, G. Wan, W. Hou, *Nanoscale Res. Letters*, **2011**, *6*, 440-449. "Facile synthesis of concentrate gold nanoparticles with low size-distribution in water: temperature and pH controls."

<sup>17</sup> X. Ji, X. Song, J. Li, Y. Bai, W. Yang, X. Peng, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 13939-13948. "Size control of gold nanocrystals in citrate reduction: the third role of citrate."

**Tabla 1.** Datos indicativos de las concentraciones de Au<sup>+3</sup> y de citrato de sodio para variar R con el fin de preparar NPs de Au de diámetro, d, diferente.

[HAuCl <sub>4</sub> ]/mM	[Na <sub>3</sub> -cit]/mM	R	d/ nm	color
0.294	0.766	0.38	16	Rojo brillante
	0.575	0.51	24.5	Rojo
	0.383	0.77	41	Rojo
	0.230	1.28	71.5	Rojo oscuro
	0.161	1.83	97.5	Violeta
	0.123	2.39	147	violeta

La disolución acuosa de la sal de oro ha de estar a temperaturas próximas a la ebullición y en agitación constante. Se debe adicionar un pequeño volumen de la disolución de citrato de sodio para evitar gradientes de temperatura. Con ello se produce la formación de nanopartículas de oro esféricas casi monodispersas: menos del 10% de variación en los tamaños. Esta preparación por reducción térmica con citrato da lugar a una pequeña anisotropía en las NPs: alrededor de un 5% tienen forma de triángulo. Por otra parte, las moléculas de citrato forman una monocapa de carga negativa que rodea los nanocristales de Au (el potencial-Z medido es del orden de -40 mV), lo que impide la asociación entre nanopartículas y su consiguiente precipitación.

La preparación de disoluciones coloidales de oro también se puede conseguir por reducción de los iones Au<sup>+3</sup> con citrato sódico a temperatura ambiente, pero, en este caso es necesaria la irradiación con luz. Se obtienen resultados similares a los de la síntesis térmica si la disolución acuosa de ambos reactivos se irradia con luz de 366 nm (15 w de potencia y 1 mW/cm<sup>2</sup>) durante un tiempo que puede variar entre 2 y 120 min.

Otros métodos utilizan ácido ascórbico como reductor. El método se ha utilizado para la síntesis de NPs de Au en forma de cilindros de tamaño nanométrico. Para ello, los iones Au<sup>+3</sup> se complejan con un surfactante catiónico, como bromuro de cetiltrimetilamonio (CTABr); se requiere, además, el sembrado de NPs de Au que orientan el crecimiento cristalino hacia la formación de nanocilindros. La dispersión de tamaños en este caso es superior a la obtenida para NPs esféricas, así como la anisotropía de formas.

Las propiedades ópticas de las NPs de Au en disolución acuosa dependen del tamaño y forma de las mismas. Se han realizado varios estudios teóricos y experimentales con el fin de obtener correlaciones entre éstas dos características de las NPs y su correspondiente espectro UV-vis. Los resultados son de utilidad para calcular el tamaño y la concentración de las NPs de Au en disolución acuosa a partir del espectro UV-vis de forma directa. Además la concordancia entre resultados experimentales y los calculados teóricamente es muy buena. Así para el caso de NPs de Au esféricas de tamaños inferiores a 35 nm, el estudio de Haiss *et al.*<sup>18</sup> de 2007

<sup>18</sup> W.Haiss, N. T. K. Thanh, J. Aveyard, D. G. Fernig, *Anal.Chem.*, **2007**, 79, 4215-4221. "Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-vis spectra".



permite determinar el diámetro,  $d$ , de las NPs de Au partiendo del espectro UV-vis por aplicación de la ec. (1), en la que  $A_{SPR}$  es la absorbancia correspondiente al máximo de la banda de resonancia plasmónica (SRP band);  $A_{450}$  representa el valor de absorbancia a 450 nm y  $B_1=3.00$  y  $B_2=2.20$  o  $B_1=3.55$  y  $B_2=3.11$  según que estos parámetros ajustables se hayan obtenido de la correlación lineal que se observa entre  $A_{SPR}/A_{450}$  y el  $\ln(d/nm)$  –siendo  $d$  el diámetro de las NPs– determinado experimentalmente (imagen TEM) o calculado teóricamente (Teoría de Mie de 1908), respectivamente. La Tabla 2 recoge algunos resultados del estudio de Haiss.

$$d = \exp\left(B_1 \frac{A_{SPR}}{A_{450}} - B_2\right) \quad (1)$$

Del mismo modo si se conoce con precisión la concentración de la sal de oro ( $[Au]/mol \cdot L^{-1}$ ) utilizada en la síntesis de las NPs, se puede obtener el tamaño de las mismas aplicando la ec. (2) y el valor de la absorbancia en el máximo de la banda SPR.

En esta ecuación las constantes  $C_1$  y  $C_2$  se obtienen de la pendiente ( $C_1= -4.75$ ) y ordenada ( $C_2=0.314$ ) correspondientes a la línea recta que se obtiene al representar  $\ln(\epsilon_{SPR}$  en  $M^{-1}nm^{-1}$ ) frente al  $\ln(d/nm)$ .

$$d = \left(\frac{A_{SPR}(5.89 \times 10^{-6})}{[Au] \cdot \exp(C_1)}\right)^{1/C_2} \quad (2)$$

**Tabla 2.** Algunos resultados del estudio de Haiss que relacionan el diámetro ( $d$ ) de las NPs con el cociente de absorbancias  $A_{SPR}/A_{450}$  y el correspondiente coeficiente de extinción molar,  $\epsilon$ .

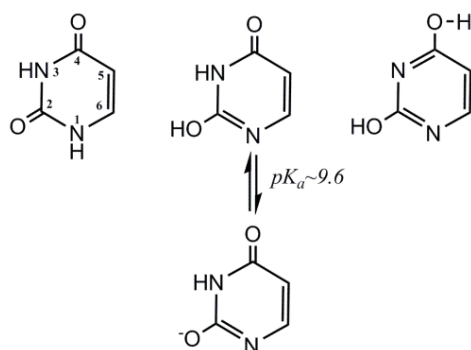
$d / nm$	$A_{SPR}/A_{450}$	$\epsilon$ (a 450 nm en $M^{-1}cm^{-1}$ )
10	1.50	$0.615 \times 10^8$
12	1.56	$1.09 \times 10^8$
14	1.61	$1.76 \times 10^8$
16	1.65	$2.67 \times 10^8$
18	1.69	$3.87 \times 10^8$
20	1.73	$5.41 \times 10^8$
25	1.80	$11.0 \times 10^8$

### 1.3. Características de las bases pirimidínicas.

En este estudio se analiza la interacción de algunas bases pirimidínicas con nanopartículas de oro con el objetivo de la optimización de métodos colorimétricos para su detección. El método se ha aplicado al uracilo (U) y de sus derivados, 2-tiouracilo (2-TU) y 4-tiouracilo (4-TU), y a la citosina (C); los resultados se comparan con los observados para compuestos simples de estructura funcional similar, como es el caso de la urea y de la tiourea (TU).

Tanto la urea como la TU son compuestos muy solubles en agua de carácter básico muy débil: únicamente se pueden protonar a valores de pH muy bajos. Así el  $pK_{BH}$  de la urea y TU protonadas son, respectivamente, 0.05 y -0.90. Del mismo modo, la forma protonada del uracilo (U) presenta un  $pK_{a1} < 0.5$ , es decir, sólo existe en condiciones fuertemente ácidas; la molécula neutra presenta dos formas tautoméricas y a pHs

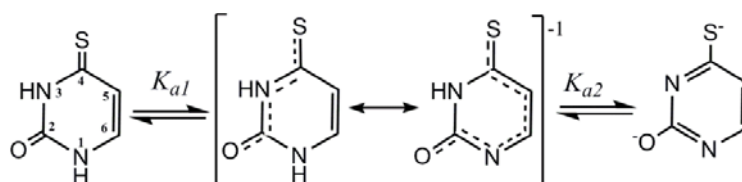
ligeramente básicos puede perder un protón del grupo C<sub>2</sub>OH (pK<sub>a2</sub>=9.6), mientras que la pérdida de un segundo protón no tendría lugar a valores de pH<13, Esquema 3.<sup>19</sup>



**Esquema 3** Formas tautoméricas del uracilo y equilibrio de ionización del protón C<sub>2</sub>OH.

Estudios teóricos estiman valores ligeramente diferentes y además concluyen que la pérdida del primer protón corresponde al N<sub>3</sub>H, pues el pK<sub>a</sub> calculado para este sitio (pK<sub>a1</sub>=9.34) es una unidad inferior al correspondiente a N<sub>1</sub>H (pK<sub>a2</sub>=10.47).<sup>20</sup>

El 2-tiouracilo (2-TU) y el 4-tiouracilo (4-TU) están presentes en pequeñas proporciones en el ARN. La sustitución del O por un S, por una parte, aumenta el carácter ácido del 2-TU y 4-TU con respecto al U y, por otra parte, provoca un desplazamiento de la banda de absorción hacia longitudes de onda mayores (blue-shift) al mismo tiempo que la hace más intensa. Como ocurría con el U, su derivado 4-TU posee dos protones ionizables, N<sub>1</sub>H y N<sub>3</sub>H, Esquema 4. El estudio de la variación del espectro UV-vis con el pH del medio permite determinar pK<sub>a1</sub>=8.00 y pK<sub>a2</sub>~12.8.<sup>21,22</sup>



**Esquema 4.** Estructuras del 4TU en forma neutra, monoaniónica y dianiónica.

El espectro UV-Vis del 2-tiouracilo en agua presenta una banda de absorción ancha entre 250 y 350 nm que se atribuye a la mezcla de dos bandas como consecuencia de la existencia de las dos formas tautoméricas: tiol y tiona. En disolución acuosa a valores de pH ácido o neutro, la forma predominante es la dicetona. En medio básico se ionizan los dos protones del grupo tiol e hidroxilo. Se han determinado dos valores de pK<sub>a</sub> como 7.75 y ~12.7, Esquema 5.

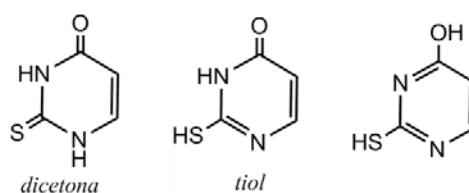
<sup>19</sup> R. M. Izatt, J. J. Christensen, J. H. Rytting, *Chem. Rev.*, **1971**, 71, 439-481. "Sites and thermodynamic quantities associated with proton and metal ion interactions with ribonucleic acid, deoxyribonucleic acid, and their constituent bases, nucleosides, and nucleotides".

<sup>20</sup> Y. H. Jang, L. C. Sowers, T. Çagin, W. A. Goddard, *J. Phys. Chem. A*, **2001**, 105, 274-280. "First principles calculation of pK<sub>a</sub> values for 5-substituted uracils"

<sup>21</sup> A. Psoda, Z. Kazimierzczuk, D. Shugar, *J. Am. Chem. Soc.*, **1974**, 96, 6832-6839. "Structure and tautomerism of the neutral and monoanionic forms of 4-thiouracil derivatives".

<sup>22</sup> A. Les, L. Adamowicz, *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, 112, 1504-1509. "Tautomerism of 2- and 4-thiouracil. *Ab Initio* theoretical study".





**Esquema 5.** Estructuras estables del 2TU en medio neutro y ácido.

En la estructura molecular de la citosina, el carbonilo  $C_4$  del uracilo se ha sustituido por un grupo amina primario. Este grupo se protona en medios no muy ácidos, por lo que la citosina puede existir como un catión. Así el valor de  $pK_a$  determinado para la forma protonada de la citosina es de 4.60. Algunos autores proponen que el sitio de protonación en lugar de ser el  $C_4NH_2$  sea el  $N_1HC_2O$ . Este equilibrio se puede observar en el espectro UV-vis al variar el pH de la disolución ya que la forma protonada absorbe a mayor longitud de onda. En medio alcalino fuerte, la citosina neutra puede perder un protón; este  $pK_{a2}$  se ha estimado  $\sim 12$ .<sup>19</sup>

Como conclusión de esta revisión se puede concluir que, con la excepción de la citosina, el resto de compuestos analizados en este estudio estarán como especies neutras si el medio de estudio es agua y el pH de trabajo se sitúa en el intervalo  $4 < pH < 7$ .



## **2. PARTE EXPERIMENTAL**

---



## 2. Parte experimental

**Reactivos.** Para llevar a cabo la síntesis de las nanopartículas de oro (AuNPs), se partía de la sal comercial de oro  $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , 99.99% w/w con un mínimo de 49.1% de Au de la firma Alfa Aesar y de citrato sódico,  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , de la máxima pureza disponible, también Alfa Aesar, como agente reductor y estabilizador de los clústeres de oro metálico formados.

Las bases de los ácidos nucleicos: citosina, uracilo y sus derivados 2-tiouracilo y 4-tiouracilo, eran productos comerciales Sigma, de la máxima pureza y se utilizaron sin purificación previa. Lo mismo ocurría con la urea y la tiourea, reactivos Merck.

El agua utilizada en la preparación de todas las disoluciones era bidestilada, la primera destilación se hacía sobre permanganato potásico con el objetivo de destruir la materia orgánica. La preparación de las disoluciones se realizó por pesada directa del producto comercial.

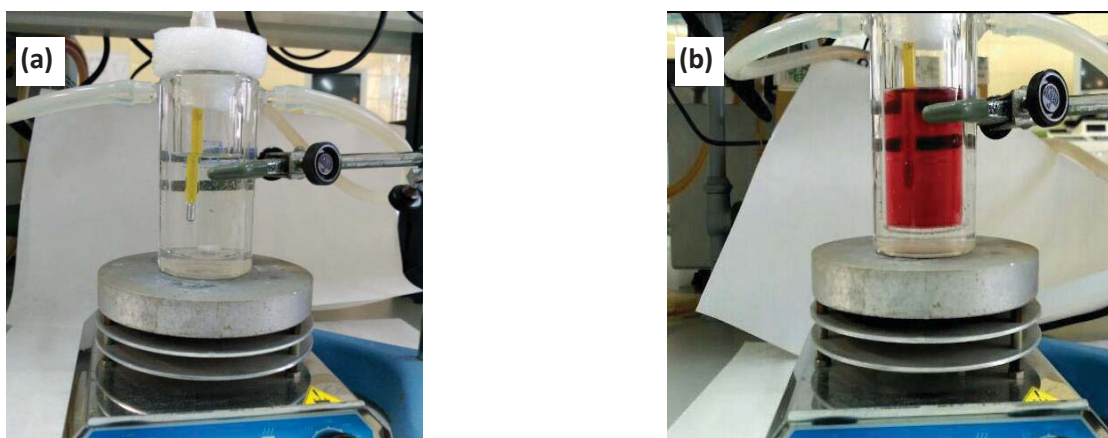
**Métodos.** La caracterización de las NPs de Au se llevó a cabo mediante microscopía de transmisión electrónica (TEM) y por espectroscopía UV-visible.

Las determinaciones TEM se realizaron en un microscopio electrónico JEOL JEM 1010 que funciona a un voltaje de aceleración de 100 kV, equipado y controlado con una cámara, utilizando un software de análisis. Las muestras se prepararon en rejillas de cobre sobre las que se dejaban caer unas gotas de la disolución correspondiente; el disolvente se dejaba evaporar a temperatura ambiente. Al irradiar la muestra con el haz de electrones, algunos son transmitidos, otros dispersados y otros dan lugar a distintos fenómenos como de emisión de luz, electrones secundarios o rayos X. La transmisión y la dispersión de los electrones se emplean para la formación de las imágenes de la muestra, la difracción de los electrones permite conocer la estructura cristalina de ella y la emisión de rayos X sirve para obtener información acerca de la composición elemental de la muestra.

Los espectros UV-vis se registraron en un espectrofotómetro de doble haz Konton-Uvikon equipado con un porta-cubetas múltiple y termostatizado por agua circulante proveniente de un termostado. Los espectros se recogieron en el intervalo de 200-800 nm. La preparación de las muestras se realizó en cubetas de cuarzo de 1 cm de paso de luz y 1.4 mL de capacidad. En los diferentes experimentos se diluyeron 0.30 mL de la disolución de NPs de Au en la cantidad de agua necesaria y el volumen requerido de la disolución de base para completar un volumen total de 1 mL.

## 2.1. Síntesis de nanopartículas de oro

El material usado en la síntesis de las nanopartículas de oro se lavaba con agua regia (HCl/HNO<sub>3</sub> 3:1) con el fin de evitar cualquier contaminación que pudiese servir de centro de nucleación de las nanopartículas. Se siguió el procedimiento de Turkevich y posteriores mejoras.<sup>12,13,15</sup> En concreto, 5 mL de la disolución acuosa de HAuCl<sub>4</sub> 2.79 mM se diluyeron en 50 mL de agua. La disolución resultante se calentó hasta temperaturas próximas a la ebullición, en cuyo momento se añadieron 1.4 mL de disolución de citrato sódico 0.038 M. La mezcla se mantuvo en agitación constante. Una vez transcurrida la reacción –aproximadamente a los 5 minutos después de la adicción del citrato– la disolución cambia de un color amarillo pálido a un color rojo intenso como se puede observar en las Figura 4. El cambio de color observado se debe a la formación de las nanopartículas de oro, las cuales se guardaban en el frigorífico.



**Figura 4.** (a) Imagen en la que se muestra la disolución de HAuCl<sub>4</sub> en agua y (b) unos minutos después de añadir la disolución de citrato sódico, es decir, cuando la reacción se considera finalizada.

## 2.2. Caracterización de las AuNPs

Para la realización de las imágenes de las NPs mediante microscopía de transmisión electrónica (TEM), fue necesaria la preparación de las muestras. Para ello, se dejaban caer unas gotas de la disolución correspondiente sobre las rejillas de cobre recubiertas de carbono. Una vez secas (evaporación a temperatura ambiente), se depositaban en el soporte hasta la realización de las medidas en los Servicios Generales de la UDC. Las imágenes TEM aportan información de la morfología de las nanopartículas, el grado de anisotropía y de su tamaño. En su mayoría, se han obtenido NPs aproximadamente esféricas, si bien, se encuentran algunas de forma triangular, según se puede observar en la Figura 5. La determinación del tamaño de las mismas se realizó sobre la medida de unas 200 NPs.

<sup>12</sup> J. Turkevich, P. C. Stevenson, J. Hillier, *Discuss. Faraday Soc.*, **1951**, *11*, 55-

<sup>13</sup> B. V. Enüstün, J. Turkevich, *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, *85*, 3317-3328. “Coagulation of colloidal gold”

<sup>15</sup> J. Kinling, M. Maier, B. Okenve, V. Kotaidis, H. Ballot, A. Plech, *J. Phys. Chem. B*, **2006**, *110*, 15700-15707. “Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited”

La Figura 6 representa la distribución de tamaños según el porcentaje de partículas y la distribución de tamaños, determinado por el diámetro,  $d$ , en nm. Como se puede observar en el diagrama de barras, el diámetro de las partículas oscila entre 13 y 22 nm. El análisis estadístico de los datos permite calcular el diámetro promedio y su desviación estándar, resultando ser de  $d = 18.02 \pm 2.90$  nm.

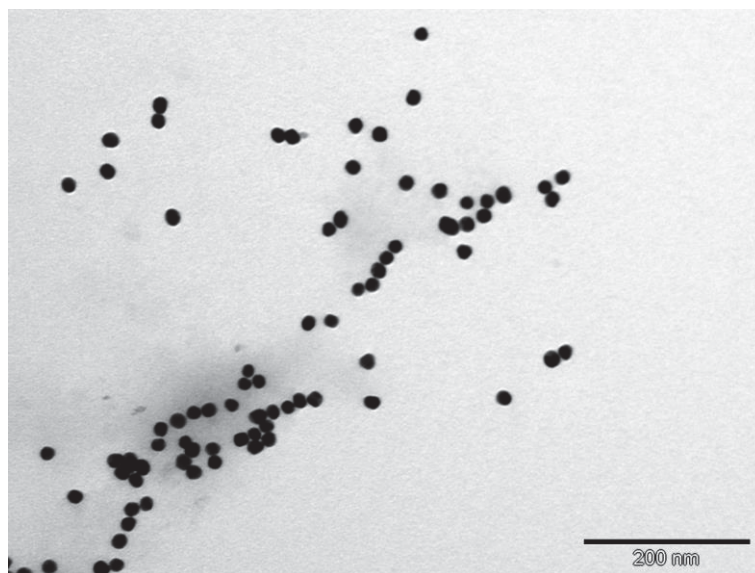


Figura 5. Fotografía de AuNPs obtenida a través del TEM.

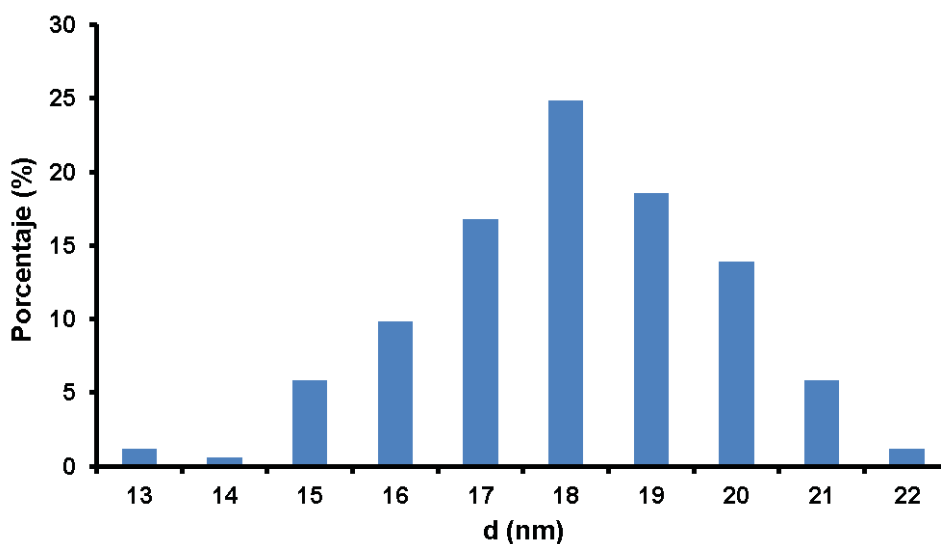


Figura 6. Diagrama de barras correspondiente a la distribución de tamaños de las NPs de Au sobre una muestra de casi 200 nanopartículas.

La Figura 7 muestra el espectro de absorción de la disolución coloidal de NPs de Au estabilizadas con citrato. Las moléculas de citrato forman una monocapa de carga negativa rodeando los clústeres de oro e impide su autoagregación por repulsión

electrostática. El potencial- $\zeta$  que se determina para NPs de este tamaño es del orden de -40 mV.

Se observa una banda a 520 nm característica de las NPs de Au debida a la oscilación colectiva de los electrones de la superficie del metal al resonar con la frecuencia de la luz que incide. En este espectro se realizaron 5 barridos a intervalos de 3 min y no se detectó diferencia alguna entre ellos, lo que indica que el sistema es estable.

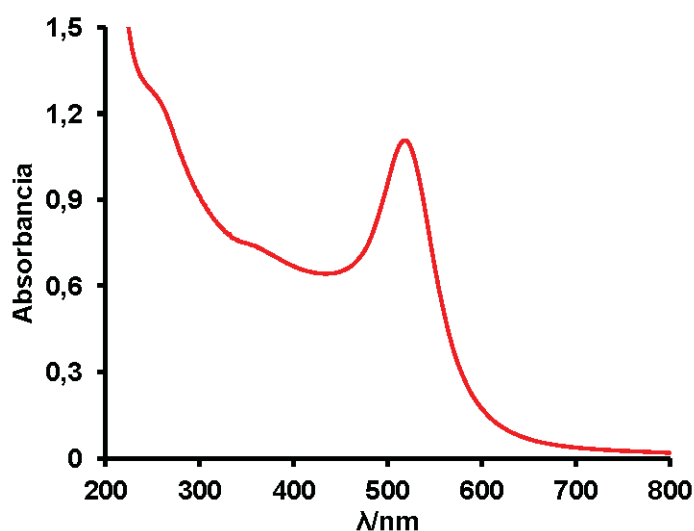


Figura 7. Espectro de absorción de AuNPs en agua tal y como se han obtenido en la síntesis.

El valor de absorbancia correspondiente al máximo,  $A_{520}=1.106$  y el valor a 450 nm ( $A_{450}=0.651$ ) está relacionado con el tamaño de las nanopartículas. En este caso el valor que resulta es de  $A_{520}/A_{450}=1.70$ . Comparando este dato con los relacionados en la Tabla 2 (ver Introducción) correspondiente al estudio de Haiss *et al.*<sup>18</sup>, este valor es el esperado para nanopartículas de 18 nm de diámetro, valor totalmente comparable con el obtenido experimentalmente de las imágenes TEM. El mismo estudio de Haiss relaciona el coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ) correspondiente a nanopartículas de Au de este tamaño como  $3.87 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Con este dato y el valor de absorbancia a 450 nm, podemos estimar la concentración de NPs de Au como  $[\text{AuNPs}] = A_{450}/\epsilon = 0.651/3.87 \times 10^8 = 1.68 \times 10^{-9} \text{ M}$ .

Partiendo de la Ecuación 1 (ver Introducción), considerando  $B_1=3.00$  y  $B_2=2.20$ , y los valores de absorbancia correspondientes al máximo de la SPR banda y a 450 nm se puede calcular el diámetro de las partículas, resultando ser  $d=18.21 \text{ nm}$ , comparable al determinado por medidas TEM.

Según la Ley de Lambert-Beer se calcula la concentración de las NPs de Au.

$$[\text{AuNPs}] = A_{450}/\epsilon \cdot b$$

$$[\text{AuNPs}] = 1.68 \text{ nM}$$



### 2.3. Cálculo de concentración

La concentración de NPs de Au se puede estimar partiendo del diámetro de las mismas y en la estructura cristalina de los nanocristales de Au. Así, teniendo en cuenta que el oro cristaliza en una estructura cúbica centrada en las caras (CCC) de lado  $l$ , empezaremos por relacionar el radio de un átomo de Au con la longitud de la celda cúbica. Como para una estructura ccc los átomos son tangentes en el sentido de la diagonal de las caras, obtenemos las relaciones de las ecs. 3 y 4.

$$d^2 = l^2 + l^2 \quad (3)$$

$$d = l \cdot \sqrt{2} = 4 \cdot R_{\text{Au}} \quad (4)$$

Considerando que el volumen de un átomo es el de una esfera y el volumen de la celda es el el volumen del cubo de lado  $l$ , se llega a la ec. 5.

$$V_{\text{át}} = \frac{4 \cdot \pi}{3 \cdot 4^3} \cdot l^3 \cdot 2 \cdot \sqrt{2} \quad (5)$$

Por otra parte, dado que en una celda ccc hay 4 átomos de Au (8 en vértices que contribuyen con  $1/8$  y 6 en la caras que contribuyen con  $1/2$ ), es fácil comprender que únicamente el 74% del volumen de la celda está ocupado,  $\%V_{\text{ocupado}} = 0.74$ .

La densidad del Au es de  $19.3 \text{ g/cm}^3$  y la masa molecular es  $197 \text{ g/mol}$ , por lo que en  $10^{-6} \text{ m}^3$  se obtiene  $5.90 \cdot 10^{22}$  átomos.

Como el porcentaje de volumen ocupado es 0.74 se puede expresar la siguiente igualdad:

$$0.74 \cdot 10^{-6} \text{ m}^3 = 5.90 \cdot 10^{22} \text{ át} \cdot \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot R^3$$

$$\mathbf{R = 144.2 \text{ pm}}$$

El radio teórico es  $R_{\text{covalente(Au)}} = 144 \text{ pm}$

A través de la síntesis de AuNPs se calcula la concentración de oro que es la siguiente:  $[\text{Au}] = 1.61 \cdot 10^{20} \text{ átAu/L}$ . El diámetro de las AuNPs es de  $18 \text{ nm}$  ( $R_{\text{NP}} = 9 \cdot 10^{-9} \text{ m}$ ) con lo cual se puede calcular el volumen de las nanoparticulas de la siguiente manera:

$$V_{\text{NP}} = \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot (R_{\text{NP}})^3 = \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot (9 \cdot 10^{-9} \text{ m})^3 = 3.05 \cdot 10^{-24} \text{ m}^3$$

$$V_{\text{át}} = \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot (R_{\text{Au}})^3 = \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot (144.2 \cdot 10^{-12} \text{ m})^3 = 1.26 \cdot 10^{-29} \text{ m}^3$$

$$V_{\text{real ocupado}} = 0.74 \cdot V_{\text{NP}} = 2.26 \cdot 10^{-24} \text{ m}^3$$

$$n^{\circ} \text{ átomos en NP} = \frac{V_{\text{real ocupado}}}{V_{\text{át}}} = 1.79 \cdot 10^5 \text{ átomos de Au}$$

Para calcular la concentración de AuNPs se realiza lo siguiente, se divide  $[\text{Au}]$  entre los átomos de Au/NP y este a su vez se divide entre NP/mol correspondiéndose al  $N_{\text{AV}}$  obteniendo así el valor de  $1.49 \cdot 10^{-9} \text{ mol/L}$

$$\boxed{[\text{AuNPs}] = 1.49 \text{ nM}}$$



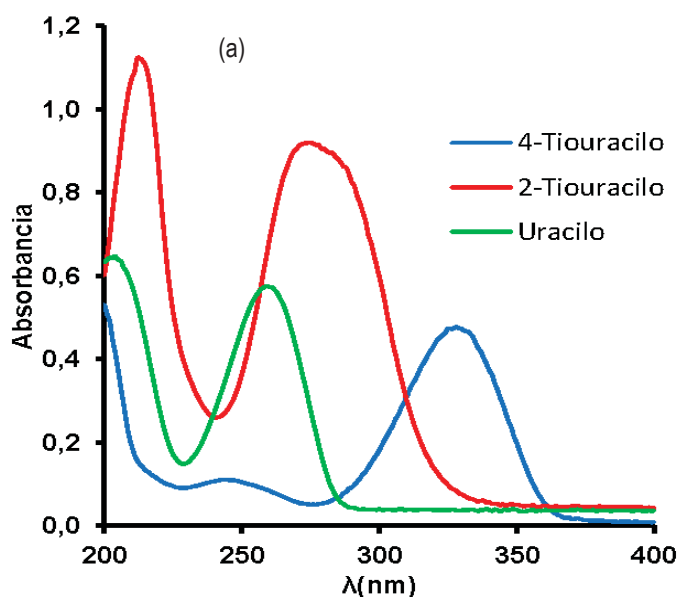
### **3. RESULTADOS Y DISCUSION**

---



### 3. Resultados y discusión

Previamente a los estudios en presencia de nanopartículas de oro, se analizó el comportamiento de las bases urea, tiourea, uracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo y citosina en agua. La Figura 8a muestra los correspondientes espectros. El uracilo presenta una banda de absorción a  $\lambda = 259 \text{ nm}$  ( $\epsilon \sim 8800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) debido a la transición electrónica  $\pi \rightarrow \pi^*$ . La sustitución de un  $>\text{C}=\text{O}$  por un  $>\text{C}=\text{S}$  produce un desplazamiento hacia el rojo de la banda de absorción; este es el comportamiento observado para el 2-TU y 4-TU. El 2-TU presenta dos intensas bandas de absorción entre 200-220 nm y entre 250-350 nm; ésta última es una banda ancha que sugiere la presencia de tautómeros del 2-TU: tiol tiona. Por el contrario, el 4-TU presenta una banda de absorción intensa a  $\lambda = 328 \text{ nm}$  ( $\epsilon \sim 18000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) debido también a la transición  $\pi \rightarrow \pi^*$ , mientras que la banda de absorción de la citosina aparece a  $\lambda = 268 \text{ nm}$  ( $\epsilon \sim 5600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Los espectros del U, 2-TU y 4-TU no cambian al añadir pequeñas cantidades de ácido acético, mientras que el espectro de la citosina se ve muy modificado, como indica la Figura 8b. El resultado es consecuencia que la protonación de la citosina en el N(3) del anillo aromático, cuyo  $\text{pK}_a$  ha sido determinado como 4.40. La conclusión de este análisis es que ninguna de estas especies interfiere con el espectro de absorción de las disoluciones coloidales de oro, que, como hemos visto, presentan una intensa banda de absorción a 520 nm ( $\epsilon \sim 3.87 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).



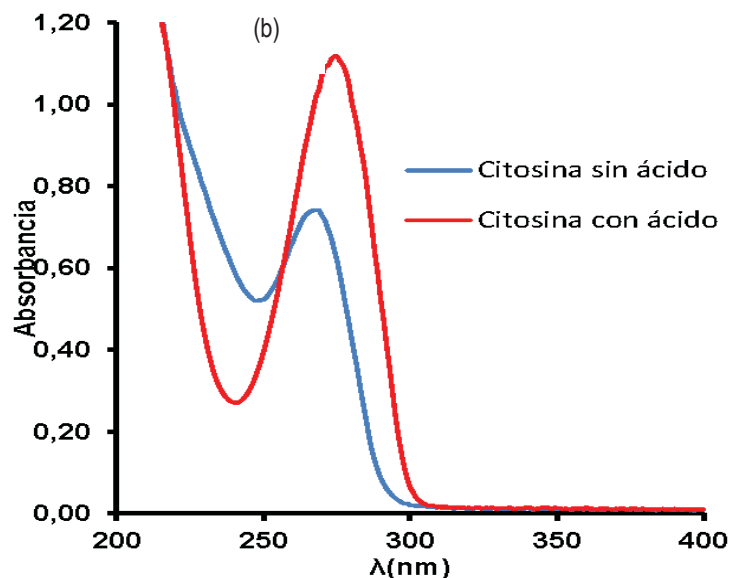


Figura 8. (a) Espectro de absorción UV-vis en disolución acuosa del Uracilo, 4-tiouracilo y 2-tiouracilo. (b) Espectro de absorción UV-vis de la Citosina,  $[C]= 133 \mu\text{M}$  (línea azul);  $[C]= 133 \mu\text{M}$  y  $[\text{AcH}]= 1.5 \text{ mM}$  (línea roja).

Las especies Urea y Tiourea no presentan absorción en el espectro de UV-vis en disolución acuosa.

### 3.1. Interacción con nanopartículas de Au

#### 3.1.1. Urea y Tiourea

La adición de urea a una disolución coloidal de Au no cambia el aspecto de la banda característica de las NPs de Au como se puede observar en la Figura 9. El registro durante 30 minutos no ha producido cambios significativos, por lo que podemos concluir que la urea no interacciona con las AuNPs.

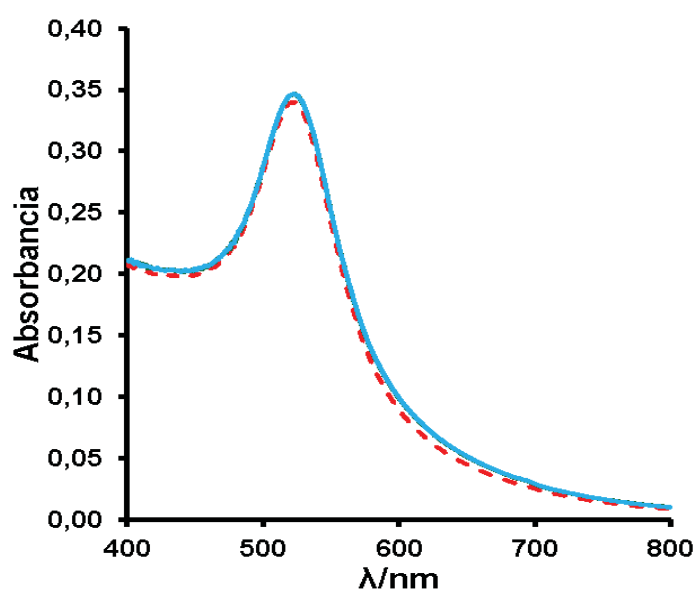
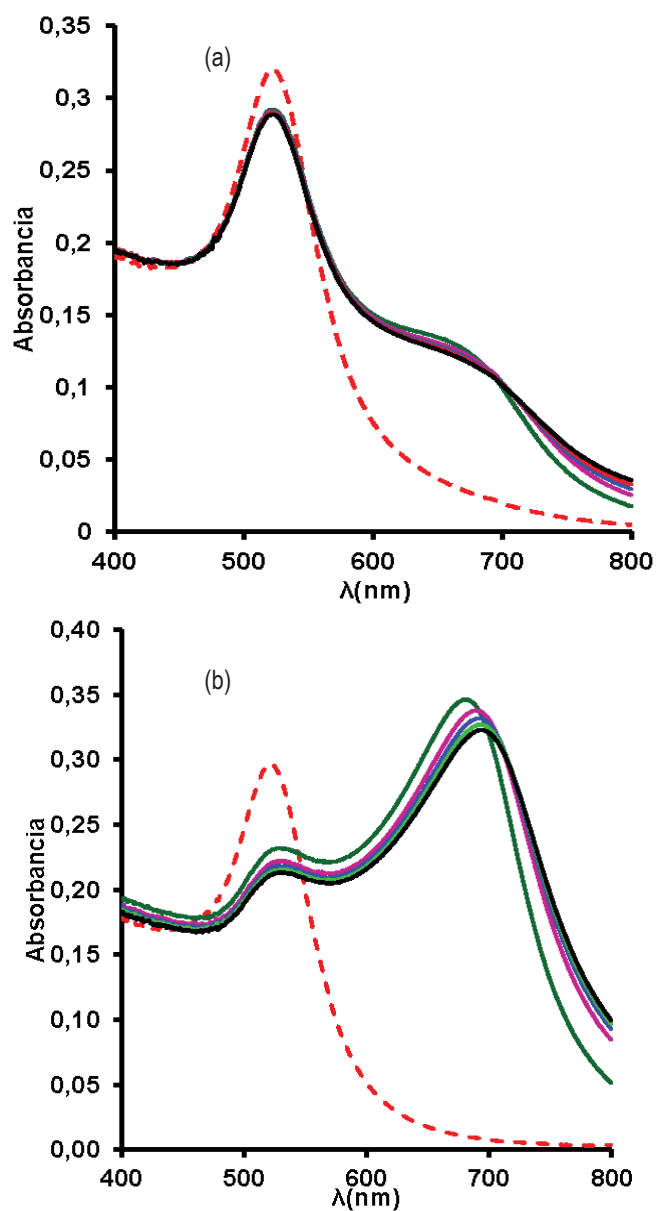


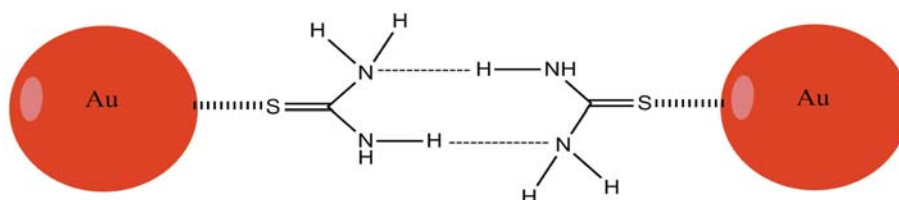
Figura 9. Espectro de absorción de AuNPs (---) en presencia de  $[U]=0.472 \text{ mM}$  cada 3 min (9 ciclos).

Por el contrario, la presencia de tiourea (TU) produce un fuerte desplazamiento de la banda de absorción plasmónica hacia el rojo, la Figura 10a corresponde a la presencia de  $[TU]=0.80 \mu\text{M}$  y el efecto es menos acusado que a concentraciones mayores de TU, como se observa en la Figura 10b: a una  $[TU]=0.21 \text{ mM}$  el desplazamiento es instantáneo.



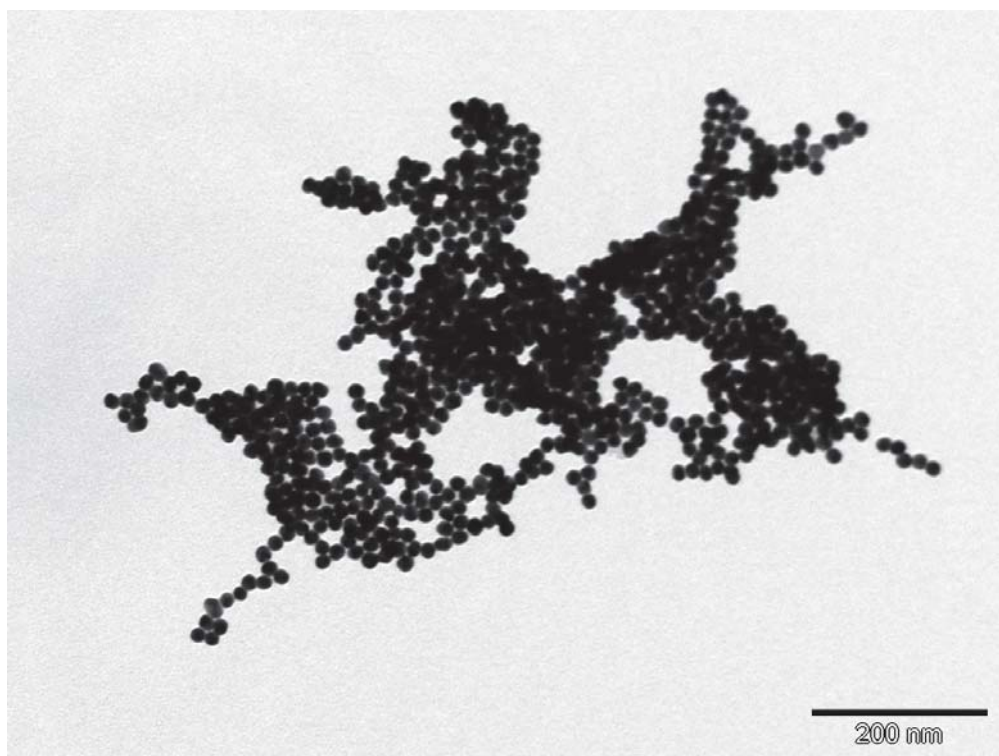
**Figura 10.** (a) Espectro de absorción de AuNPs (---) en presencia de  $[TU]=0.80 \mu\text{M}$  cada 3 min. (b) Espectro de absorción de AuNPs (---) en presencia de  $[TU]=0.21 \text{ mM}$  cada 3 min.

El efecto es debido a que la tiourea se une a la superficie de las nanopartículas de oro mediante enlaces covalentes  $-S-Au$  por la gran afinidad entre estos dos elementos, es decir, como consecuencia de la quimisorción de la TU, se producen agregados de nanopartículas. La TU adsorbida a las NPs por el átomo de azufre, deja los grupos amino expuestos al exterior y pueden formar enlaces de hidrógeno con los mismos grupos de otras moléculas de TU adsorbidas a partículas vecinas. El Esquema 6 ilustra lo que sucede.



**Esquema 6.** Representación esquemática de las interacciones entre nanopartículas provocadas por la adsorción de tiourea.

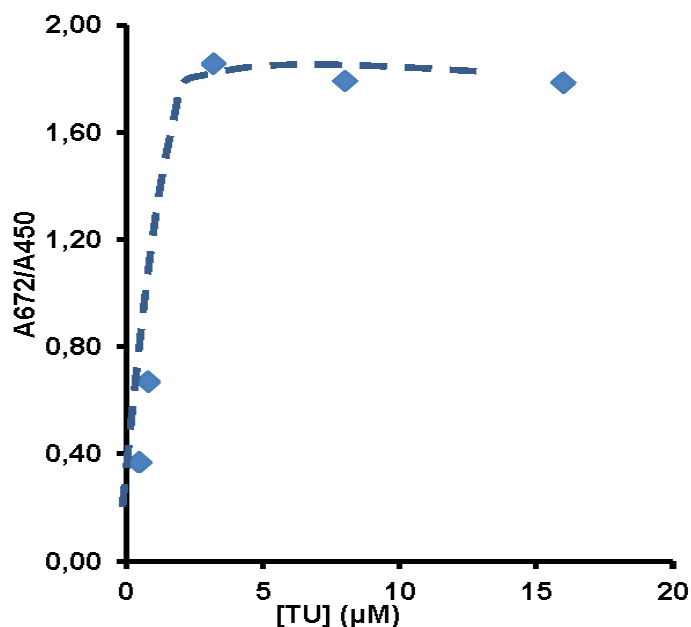
Una imagen de la disolución obtenida a través de la Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) confirma esta hipótesis. Así la Figura 11 muestra la correspondiente imagen a escala de 200 nm en la que se pueden observar los agregados de NPs de oro provocados por la red de enlaces de hidrógeno entre las moléculas de TU adsorbidas en la superficie de las NPs. Esta imagen es representativa de lo observado a lo largo de toda la muestra.



**Figura 11.** Fotografía de la agregación de NPs de Au en presencia de tiourea.



El efecto de la agregación de NPs de oro promovido por la TU, aumenta exponencialmente con la [TU]. La Figura 12 recoge el aumento del cociente de absorbancias determinadas a 672 y 450 nm en función de la [TU] para el caso particular de [AuNps]=0.50 nM. Se puede observar que cuando la [TU]~3 μM aproximadamente, se alcanza la saturación, es decir, se ha alcanzado el equilibrio entre las moléculas de TU quimisorbidas a las NPs de Au y en disolución.



**Figura 12.** Variación del cociente de absorbancias a 672 y 450 nm ( $A_{672}/A_{450}$ ) de los espectros de NPs de oro obtenidas a distintas concentraciones de tiourea, cuando la [AuNPs]=0.50 nM.

Esto implica una proporción de 5900 moléculas de TU por cada NP de oro.

En consonancia con las imágenes TEM, la superficie de una NP de oro esférica de diámetro 18.02 nm, se calcularía igual a:  $S_{NP}=4\pi(d/2)^2=1041 \text{ nm}^2$ . Por otra parte, teniendo en cuenta las dimensiones de la molécula de TU, podemos admitir que la superficie de una NP recubierta por una molécula de TU vendría dada por la superficie de un círculo de radio igual al radio de Van der Waals del S ( $r_{vdw}=0.18 \text{ nm}$ ) con lo que  $S_{TU}= 0.102 \text{ nm}^2$ . Con estos datos, para un recubrimiento completo de las NPs por moléculas de TU serían necesarias 10200 moléculas de TU. En otras palabras, sólo un 58% de la superficie de las NPs estaría recubierta por moléculas de TU, lo que corresponde a la cobertura inferior a una monocapa.

### 3.1.2. Uracilo, 2-tiouracilo y 4-tiuracilo

La adición del uracilo a una disolución coloidal de Au no cambia el aspecto de la banda característica de las NPs de Au como se puede observar en la Figura 13. El registro durante 30 minutos no ha producido cambios significativos, por lo que podemos concluir que el uracilo no interacciona con las AuNPs.

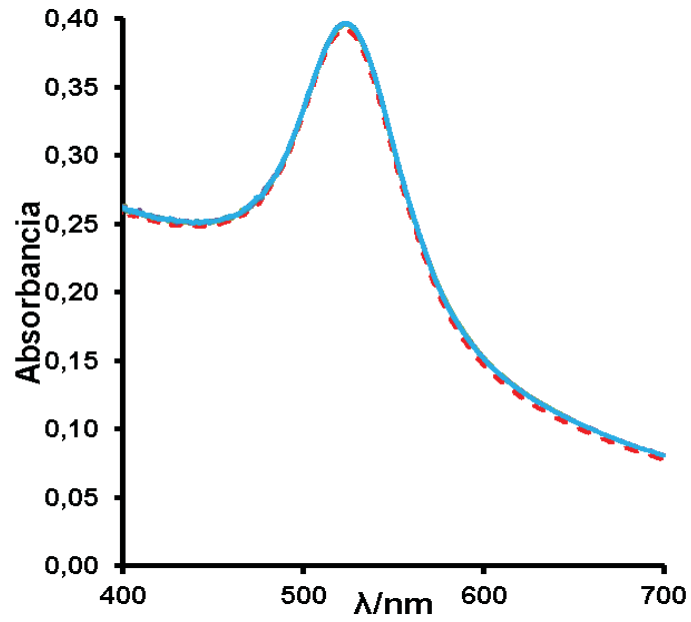


Figura 13. Espectro de absorción de AuNPs (---) y en presencia de [U]=196  $\mu$ M cada 3 min.

Por otro lado, la presencia del 2-tiouracilo (2-TU) produce un desplazamiento de la banda de absorción plasmónica hacia el rojo, la Figura 14 corresponde a la presencia de [2-TU]=87  $\mu$ M.

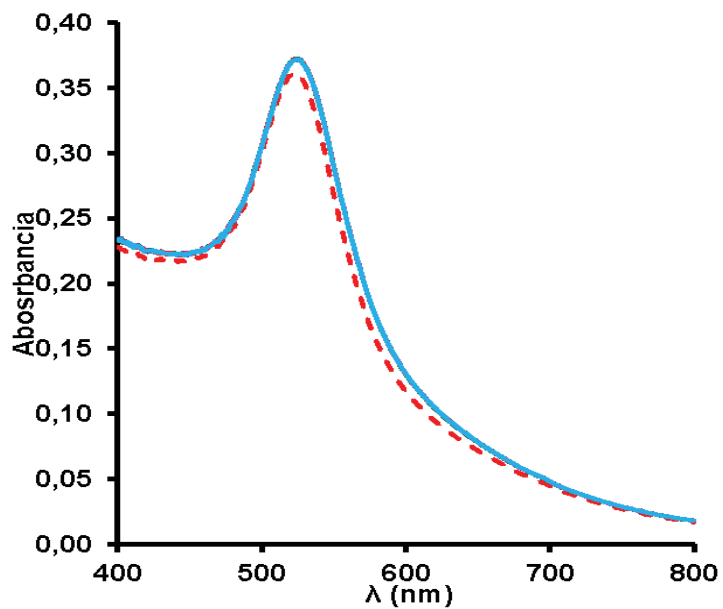
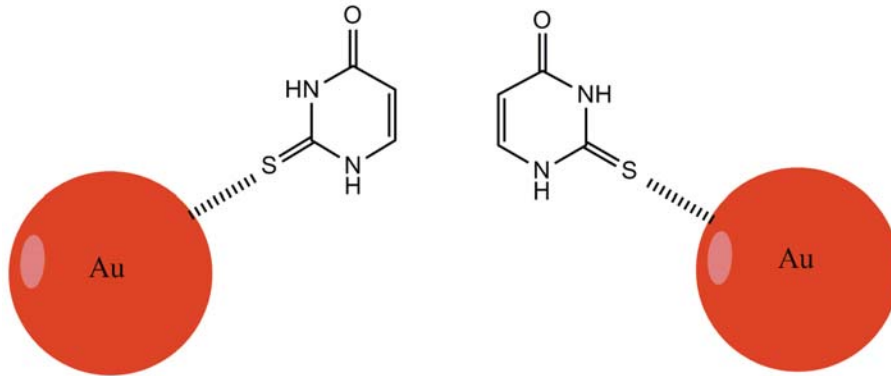


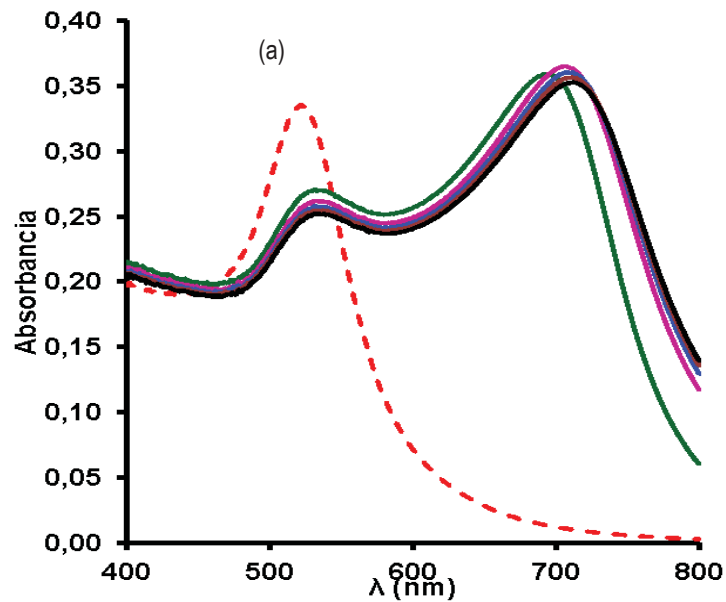
Figura 14. Espectro de absorción de AuNPs (---) en presencia de [2-TU]=87  $\mu$ M cada 3 min.

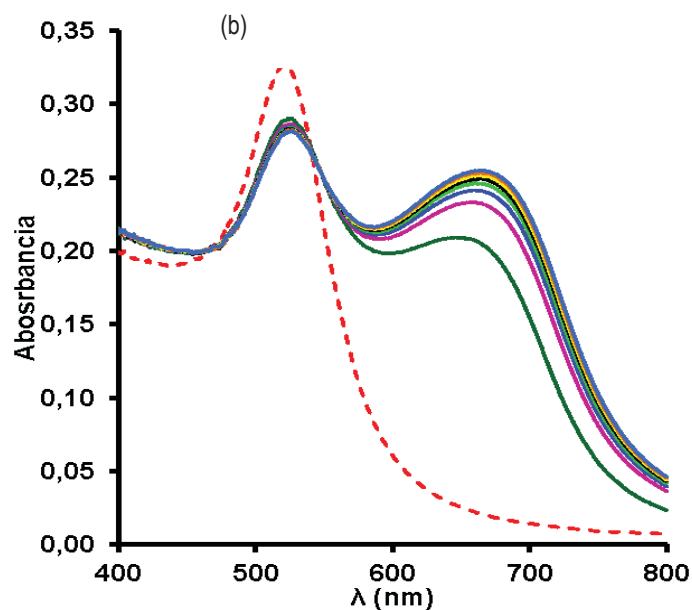
El 2-tiouracilo debido al grupo azufre que contiene en su estructura puede formar enlaces covalentes con las nanopartículas. Esta especie no forma enlaces de hidrogeno con otras moléculas vecinas, ya que no tiene grupos amino que estén poco impedidos. El Esquema 7 ilustra lo que sucede.



**Esquema 7.** Estructura esquemática de la adsorción de 2TU a las NPs de Au que resalta la imposibilidad de formación de enlaces-H entre nanopartículas..

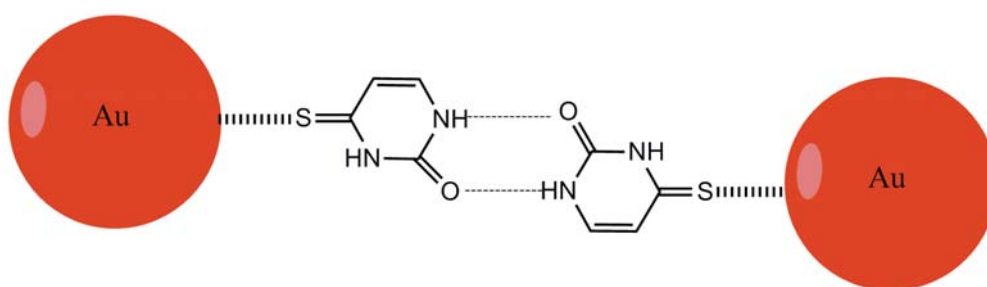
Por el contrario, la presencia del 4-tiouracilo (4-TU), produce un fuerte desplazamiento de la banda de absorción plasmónica hacia el rojo como se observa en la Figura 15a, para la situación experimental en la que la  $[4\text{-TU}] = 0.80 \mu\text{M}$ . El efecto es más acusado que a concentraciones menores de 4TU, como se observa en la Figura 15b correspondiendo a  $[4\text{-TU}] = 15.9 \mu\text{M}$ .





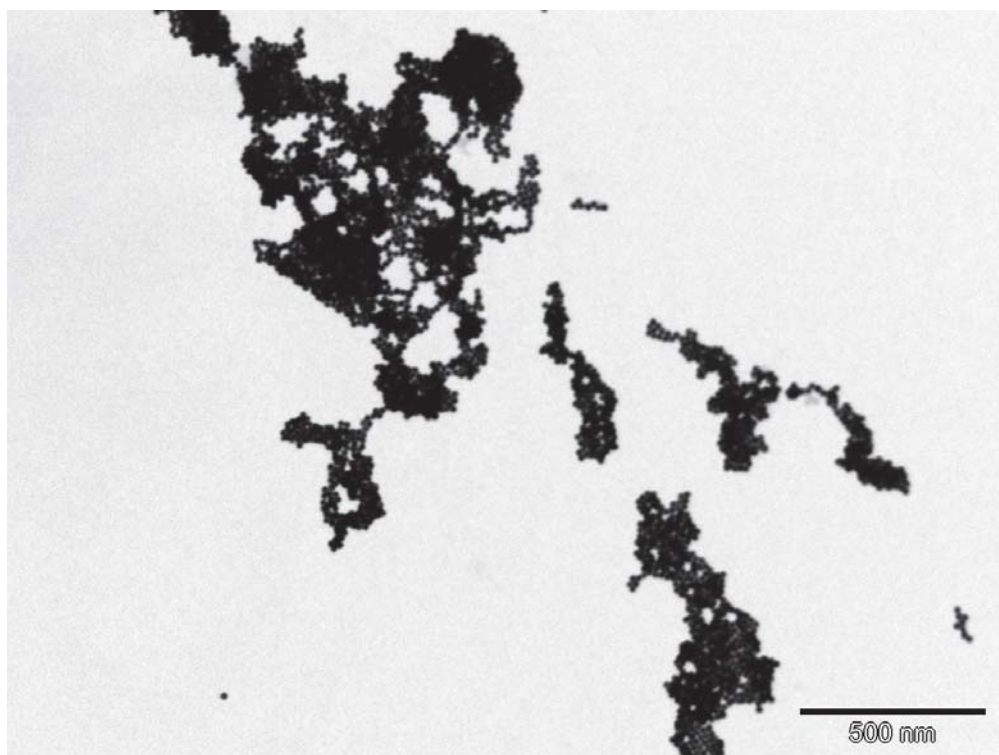
**Figura 15.** (a) Espectro de absorción de AuNPs (---) en presencia de [4-TU]=15.9  $\mu\text{M}$  cada 3 min. (b) Espectro de absorción de AuNPs (---) en presencia de [4-TU]=0.80  $\mu\text{M}$  cada 3 min.

Las observaciones experimentales se pueden explicar considerando que el 4-tiouracilo forma enlaces covalentes  $-\text{S}-\text{Au}$ , por lo que se adsorbe a la superficie de las nanopartículas de oro. El 4-TU adsorbido a las NPs por el átomo de azufre, deja los grupos amino y carboxílico libres. Ambos grupos son donantes y aceptores típicos de enlaces-H, respectivamente. Así la interacción de estos grupos de una NP de Au con los correspondientes de otra NP de Au, reduce la distancia entre NPs condicionando la autoagregación de las mismas. La formación de estos agregados produce un fuerte desplazamiento de la banda de absorción a longitudes de onda mayores, tal y como podemos observar en la Figura 8. En el Esquema 8 se puede observar este efecto.



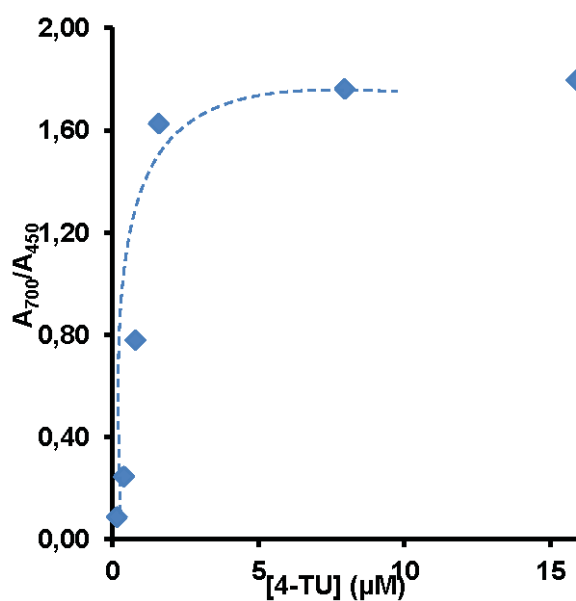
**Esquema 8.** Estructura de la formación de los enlaces de hidrógeno con las partículas vecinas 4-tiouracilo con las NPs de Au

A continuación en la Figura 16 se puede ver el efecto mencionado anteriormente, observando que existe una agregación entre las moléculas vecinas del 4-tiouracilo las cuales están unidas a las nanopartículas. Esta imagen es la que produce una mayor extensión de partículas agregadas de las especies observadas.



**Figura 16.** Fotografía de NPs de Au con el 4-tiouracilo agregado.

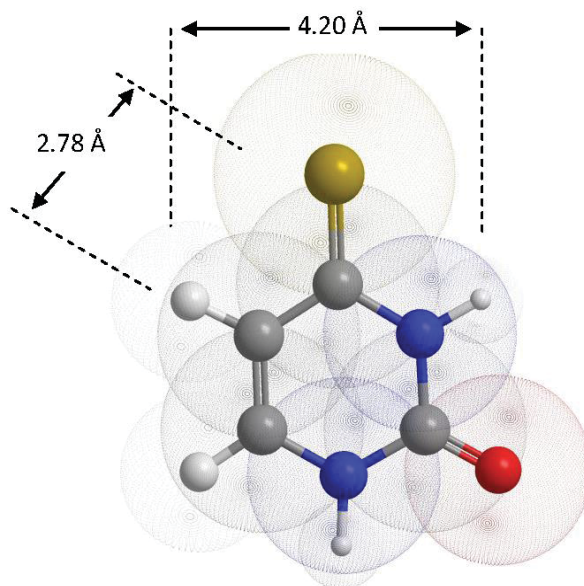
El efecto de la agregación de NPs de oro promovido por el 4-TU, aumenta exponencialmente con la [4-TU]. La Figura 17 recoge el aumento del cociente de absorbancias determinadas a 700 y 450 nm en función de la [4-TU] para el caso particular de [AuNps]=0.50 nM. Se puede observar que cuando la [4-TU]= 2.5  $\mu$ M aproximadamente, se alcanza la saturación, es decir, se ha alcanzado el equilibrio entre las moléculas de 4-TU quimisorbidas a las NPs de Au y en disolución.



**Figura 17.** Variación del cociente de absorbancias a 700 y 450 nm ( $A_{700}/A_{450}$ ) de los espectros de NPs de oro obtenidas a distintas concentraciones de 4-tiouracilo, cuando la [AuNPs]=0.50 nM.

Esto implica una proporción de 4960 moléculas de 4-TU por cada NP de oro.

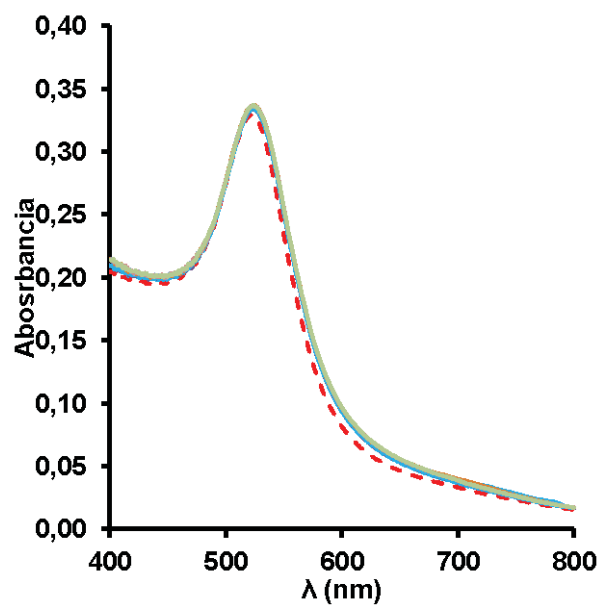
En consonancia con las imágenes TEM, la superficie de una NP de oro esférica de diámetro 18.02 nm, se calcularía igual a:  $S_{NP}=4\pi(d/2)^2=1041 \text{ nm}^2$ . Por otra parte, teniendo en mente las dimensiones de la molécula de 4-TU, que se puede calcular a través de la Figura 18.



**Figura 18.** Dimensiones de la molécula de 4-TU obtenidas de la estructura optimizada con Chem3D.

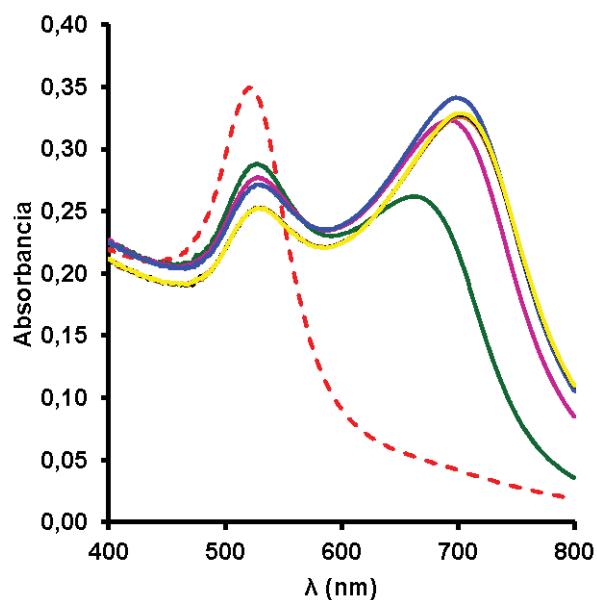
Sabiendo que la distancia entre los hidrógenos es de 0.42 nm, por lo tanto  $S_{4-TU}=\pi \cdot r^2=0.139 \text{ nm}^2$ . Con estos datos, para un recubrimiento completo de las NPs por moléculas de 4-TU serían necesarias 7489 moléculas de 4-TU. En otras palabras, sólo un 66% de la superficie de las NPs estaría recubierta por moléculas de 4-TU.

La Figura 19 muestra el espectro UV-vis correspondiente a la banda plasmónica de las NPs de Au (---) y después de añadir [2-TU]= 79  $\mu\text{M}$ . Como se había observado en la Figura 14, el máximo de absorción se desplaza a 523 nm al añadir 2-TU debido a la formación de NPs estables funcionalizadas con 2-TU. Si en este momento se añade [4-TU]= 36  $\mu\text{M}$  o en mayores concentraciones, no hay agregación de las NPs. Esto significa que el 4-TU no es capaz de desplazar a las moléculas de 2-TU absorbidas a la superficie de las NPs de oro.



**Figura 19.** Espectro de absorción de la disolución de AuNPs (---);(3,4,5) después de añadir 79  $\mu\text{M}$  de 2TU, registradas a intervalos de 3 min;(6,7,8) después de añadir 36  $\mu\text{M}$  de 4TU registradas en intervalos de 3 min.

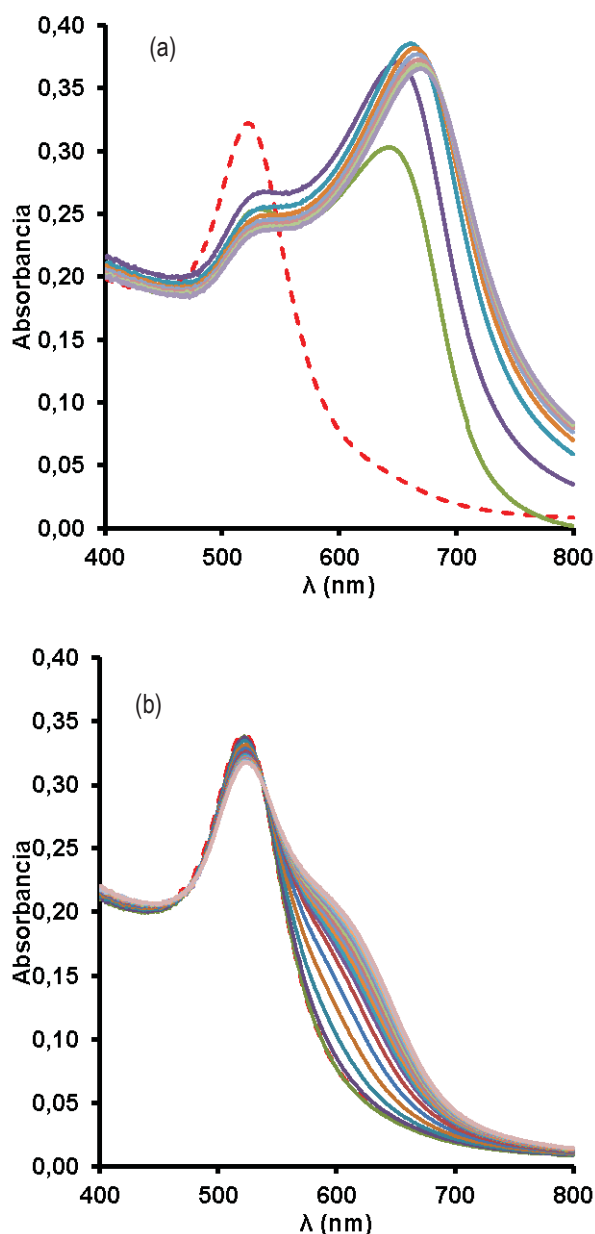
Si se añade primero el 4-TU se observa un fuerte desplazamiento a  $\lambda$  mayores, como se indica en la Figura 20, y tras la adición del 2-TU dejaría de producirse este desplazamiento bloqueando la reacción y manteniéndose constante.



**Figura 20.** Espectro de absorción de la disolución de AuNPs (---);(3,4,5) después de añadir 36  $\mu\text{M}$  de 4TU, registradas a intervalos de 3 min;(6,7,8) después de añadir 79  $\mu\text{M}$  de 2TU registradas en intervalos de 3 min.

### 3.2. Estudio de la citosina

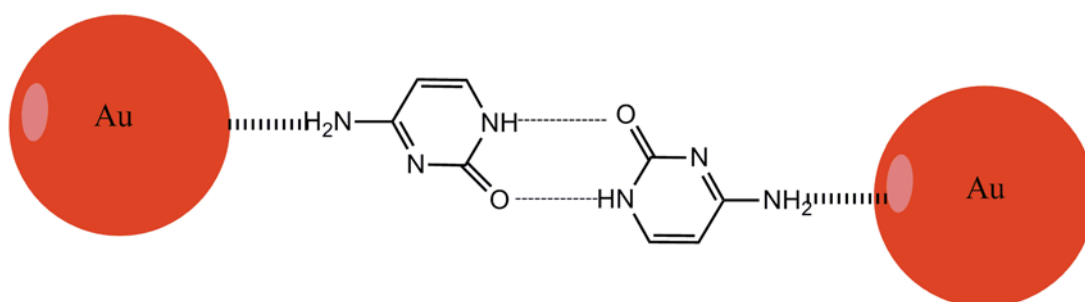
La adición de la citosina a una disolución coloidal de oro, cuando se trabaja con concentraciones más elevadas produce un fuerte desplazamiento como se observa en la Figura 21a. Sin embargo si se trabaja con concentraciones más bajas el desplazamiento transcurre muy lentamente como se observa en la Figura 21b.



**Figura 21.** (a) Espectro de absorción de AuNPs (---) en presencia de  $[C]=0.266$  mM cada 3 min. (b) Espectro de absorción de AuNPs (---) en presencia de  $[C]=5.32$   $\mu$ M cada 3 min.

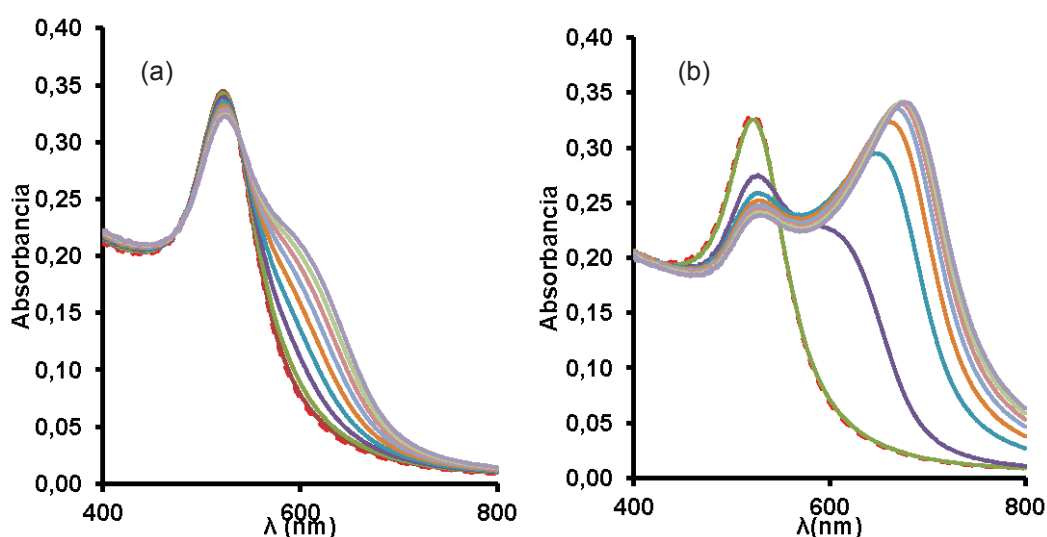
La citosina se une a la superficie de las nanopartículas de oro mediante enlaces covalentes  $-N-Au$ , produciendo agregados de nanopartículas. La citosina adsorbida a las NPs por el átomo de nitrógeno, deja los grupos amino libres pudiendo formar así enlaces de hidrógeno con otras moléculas de citosina adsorbidas a partículas vecinas. El Esquema 9 ilustra lo que sucede.





**Esquema 9.** Estructura de la formación de los enlaces de hidrógeno con las partículas vecinas de la citosina con las NPs de Au.

En el caso de la citosina también se ha realizado un estudio con la influencia del ácido acético, debido a que es la única especie que se protona de las citadas en el Esquema 1. Que se muestra en la Figura 22.



**Figura 22.** (a) Espectro de absorción de AuNPs (---) en presencia de [C]=133 μM cada 3 min. (b) Espectro de absorción de AuNPs (---); se adicionó [C]=133 μM (línea verde); se adicionó [ACh]=1.5 mM cada 3 min.

Como se puede observar en los espectros anteriores hay una variación en la banda de absorción plasmónica, cuando la disolución de citosina no tiene concentración de ácido acético la reacción transcurre más lentamente, ya que en el espectro “a” cambia muy lentamente la absorbancia a lo largo del tiempo. Sin embargo en el espectro “b” ese cambio es más pronunciado teniendo un mayor desplazamiento de la banda de absorción plasmónica. Este efecto se debe a que el ácido acético permite que la reacción ocurra con una mayor rapidez ya que se puede protonar los grupos carboxilatos pertenecientes al citrato.

En la Figura 23 se observa la cinética de evolución de la SPR, se realizaron medidas de absorbancia frente al tiempo ajustándose a la ecuación de velocidad de primer orden,  $A = A_{\infty} - (A_0 - A_{\infty}) \cdot \exp(-k_0 t)$  (3). La ecuación no es lineal, se tuvo que

linealizar a la siguiente ecuación  $\ln(A_{\infty}-A_t) = \ln(A_0-A_{\infty}) - k_0t$  (4), a partir de la pendiente de la ecuación de la recta se puede obtener el valor de la constante de velocidad. El valor de la constante de velocidad sin ácido acético  $k_0 = 6.80 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  y la constante de velocidad con ácido acético  $k_0 = 3.17 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ . Con lo que se puede concluir que la velocidad de la reacción es mayor con ácido acético que sin ácido acético.

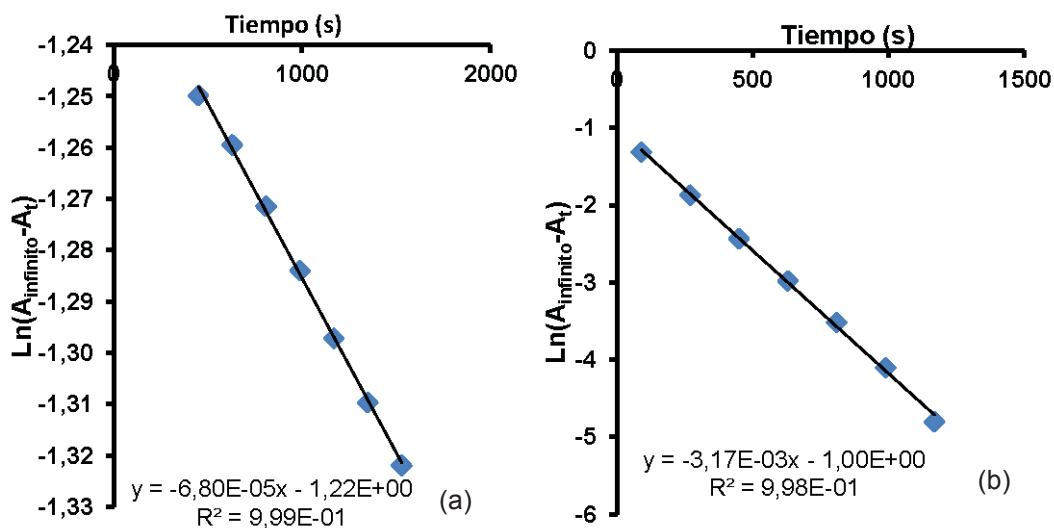


Figura 23. (a) Representación lineal del espectro que no contiene ácido acético. (b) Representación lineal del espectro que contiene ácido acético.

Al adicionar una concentración de ácido, en este caso se podrían protonar dos de las tres posiciones que tiene el citrato cuyos  $pK_a$  son:  $pK_{a1}=3.1$ ,  $pK_{a2}=4.8$  y  $pK_{a3}=6.4$  con lo que dos de ellos es muy probable que estén protonados.<sup>23</sup> También existe otra posibilidad que sería la protonación de la citosina ya que su  $pK_a=4.60$ .<sup>19</sup> Produciéndose así la disminución de la carga negativa del citrato y aumentando la carga positiva de la citosina, favoreciéndose la adición de la base pirimidínica con el citrato ya que existiría una menor repulsión de las cargas.

<sup>19</sup> R. M. Izatt, J. J. Christensen, J. H. Rytting, *Chem. Rev.*, **1971**, *71*, 439-481. "Sites and thermodynamic quantities associated with proton and metal ion interactions with ribonucleic acid, deoxyribonucleic acid, and their constituent bases, nucleosides, and nucleotides".

<sup>23</sup> E. Iglesias, R. Prado-Gotor, *Physical Chemistry Chemical Physics*, **2015**, *17*, 644, "Interaction of gold nanoparticles mediated by captopril and S-nitrosocaptopril: the effect of manganese ions in mild acid medium"

## **4. CONCLUSIONES**

---



## 4. Conclusiones

La detección de compuestos químicos y biológicos esenciales es de importancia primordial en áreas como la biomedicina, las ciencias forenses o para preservar el medio ambiente. El desarrollo de sensores eficientes requiere de la innovación tecnológica fundamentada en el conocimiento químico, biológico y de nuevos materiales. El proceso requiere a la optimización de características singulares como son el tiempo de respuesta, la relación señal-ruido, la selectividad y los límites de detección. Los resultados de este estudio permiten establecer como conclusión básica y general que:

- El cambio de color observado en la agregación de nanopartículas de oro en disolución acuosa como consecuencia de la interacción entre nanopartículas mediada (o promovida) por determinados compuestos, proporciona un método práctico, sencillo, asequible, de respuesta rápida y segura con límites de detección muy bajos para aquellos analitos que desencadenan o inician el proceso de agregación.

Los objetivos específicos de este estudio se pueden resumir como:

- Las disoluciones coloidales de nanopartículas de Au permiten distinguir la presencia de urea o tiourea en disolución acuosa a concentraciones del orden de  $10^{-6}$ M, mientras no se observa interacción alguna con urea, la tiourea rápidamente interacciona con las nanopartículas de oro originando un cambio de color del rojo al azul en unos pocos segundos.
- Las disoluciones coloidales de nanopartículas de oro permiten distinguir la presencia en agua de uracilo, 2-tiouracilo o 4-tiouracilo. Así, el uracilo no da respuesta alguna; la presencia de 2-tiouracilo en concentraciones del orden del  $\mu$ M genera nanopartículas de oro estables que absorben a 523 nm en lugar de a 520 nm (AuNPS estabilizadas con citrato); por el contrario, la presencia de 4-tiouracilo produce un notorio cambio de color del rojo al azul en pocos segundos.
- Las nanopartículas funcionalizadas con 2-tiouracilo no dan lugar a procesos de agregación incluso cuando a la disolución coloidal se añade tiourea o 4-tiouracilo, lo que indica que la adsorción de la TU o del 4-TU.
- La adsorción a las nanopartículas de oro no es exclusivo de los compuestos con S: así, la citosina se adsorbe a la superficie de Au de las nanopartículas provocando la autoagregación de las mismas. El proceso va acompañado de un cambio de color del rojo al azul, pero transcurre a menor velocidad que el observado con TU o 4-TU. Sin embargo, la presencia de pequeñas cantidades de ácido acético produce un notorio incremento en la velocidad de agregación que sigue de primer orden.

## 4. Conclusións

A detección dos compostos químicos e biolóxicos esenciais é de importancia primordial en áreas como a biomedicina, as ciencias forenses ou para preservar o medio ambiente. O desenvolvemento dos sensores eficientes require da innovación tecnolóxica fundamentada no coñecemento químico, biolóxico e de novos materiais. O proceso require da optimización das características singulares como son o tempo de resposta, a relación sinal-ruido, a selectividade e os límites de detección. Os resultados deste estudo permiten establecer como conclusión básica e xeral que:

- O cambio da cor observado na agregación das nanopartículas de ouro na disolución acuosa como consecuencia da interacción entre nanopartículas mediada (ou promovida) por determinados compostos, proporciona un método práctico, sinxelo, asequible, de resposta rápida e segura con límites de detección moi baixos para aqueles analitos que desencadean ou inician o proceso de agregación.

Os obxectivos específicos deste estudo pódense resumir como:

- As disolucións coloidais das nanopartículas de Au permiten distinguir a presenza da urea ou tiourea en disolución acuosas a concentracións de orde de  $10^{-6}$ M, mentras non se observa interacción algunha con urea, a tiourea rapidamente interacciona coas nanopartículas de ouro orixinando un cambio de cor do vermello ao azul nuns poucos segundos.
- As disolucións coloidais de nanopartículas de ouro permiten distinguir a presenza en auga de uracilo, 2-tiouracilo ou 4-tiouracilo. Así, o uracilo non da resposta algunha; a presenza de 2-tiouracilo en concentracións do orde de  $\mu$ M xenera nanopartículas de ouro estables que absorben a 523 nm en lugar de 520 nm (AuNPs estabilizadas con citrato); polo contrario, a presenza de 4-tiouracilo produce un notorio cambio de cor do vermello ao azul nuns poucos segundos.
- As nanopartículas funcionalizadas con 2-tiouracilo non da lugar a procesos de agregación incluso cando á disolución coloidal engádese tiourea ou 4-tiouracilo, o que indica que a adsorción do 2-TU é mais forte que a adsorción da TU ou do 4-TU.
- A adsorción das nanopartículas de ouro non é exclusivo dos compostos con S: así, a citosina adsorbese á superficie de Au das nanopartículas provocando a autoagregación das mesmas. O proceso va acompañado dun cambio de cor do vermello ao azul, pero transcurre a menor velocidade que o observado coa TU ou 4-TU. Sen embargo, a presenza de pequenas cantidades de ácido acético produce un notorio incremento da velocidade de agregación que segue cinéticas de primeiro orde.

## 4. Conclusions

The detection of essential chemicals and biological compounds is of paramount importance in areas such as biomedicine, forensic science or to preserve the environment. The development of efficient sensors requires technological innovation based on the chemical, biological and new materials knowledge. The process requires unique optimization characteristics such as response time, the signal to noise ratio, selectivity and detection limits. The results of this study allow us to establish as a basic and general conclusion:

- The color change observed in the aggregation of gold nanoparticles in aqueous solution as a result of the interaction between nanoparticles mediated (or promoted) by certain compounds, provides a practical, simple, affordable, rapid response and reliable method with detection limits very lower for those analytes that trigger or initiate the process of aggregation.

The specific objectives of this study can be summarized as:

- Colloidal solutions of Au nanoparticles distinguish the presence of urea or thiourea in aqueous solution at concentrations ranging from 10<sup>-6</sup>M solution, while it is not observed any interaction with urea, thiourea quickly interacts with the gold nanoparticles causing a color change from red to blue in a few seconds.
- Colloidal solutions of gold nanoparticles distinguish the presence of water uracil, 2-thiouracil or 4-thiouracil. Thus, uracil does not give an answer; the presence of 2-thiouracil in order  $\mu$ M concentrations of gold nanoparticles generates a blue color instead of 520nm (AuNPs stabilized with citrate); on the contrary, the presence of 4-thiouracil produces a noticeable color change from red to blue in seconds.
- The nanoparticles functionalized with 2-thiouracil do not lead to aggregation processes even when the colloidal solution or 4-thiouracil thiourea is added, indicating that the adsorption of the TU or 4-TU.
- Adsorption to gold nanoparticles is not exclusive of the compounds with S: thus cytosine adsorbs to the surface of Au nanoparticles causing autoaggregation thereof. The process is accompanied by a color change from red to blue, but runs at a slower rate than observed with TU or 4-TU. However, the presence of small amounts of acetic acid produced a marked increase in aggregation rate follows first order.