



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Trabajo de Tesis Doctoral

ESTUDIO SOBRE LA MODIFICACIÓN DE
NANOPARTÍCULAS METÁLICAS PARA
EL DESARROLLO DE SENSORES
FLUORESCENTES FOTOMODULABLES

JULIO CÉSAR AZCÁRATE

Director: MARIANO H. FONTICELLI
Codirector: ELIZABETH JARES-ERIJMAN

2014



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Trabajo de Tesis Doctoral

ESTUDIO SOBRE LA MODIFICACIÓN DE
NANOPARTÍCULAS METÁLICAS PARA
EL DESARROLLO DE SENSORES
FLUORESCENTES FOTOMODULABLES

JULIO CÉSAR AZCÁRATE

Director: MARIANO H. FONTICELLI
Codirector: ELIZABETH JARES-ERIJMAN

2014

El presente trabajo se llevó a cabo en el Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA) del Departamento de Química de la Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección del Prof. Dr. Mariano H. Fonticelli y en el Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires bajo la co-dirección de la Dra. Elizabeth Jares-Erijman. El mismo se presenta a consideración de las autoridades de la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP para acceder al grado académico de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas.

Miembros del Jurado:

Dr. Marcelo Ceolín

Dra. Lia Pietrasanta

Dr. Fernando Stefani

Fecha de la disertación oral: Martes 26 de agosto de 2014, INIFTA, La Plata.

Lic. Julio César Azcárate

e-mail: jcazcarate@inifta.unlp.edu.ar



Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0)

A mi familia

A Ceci

Agradecimientos

I get by with a little help from my friends.

— John Lennon y Paul McCartney

The Beatles

Este trabajo de 5 años y en un temática interdisciplinaria no hubiera sido posible de realizar sin la ayuda y colaboración de mucha gente. Quisiera agradecer a todas aquellas personas que fueron importantes en el desarrollo de esta tesis.

En primer lugar quisiera expresar mi agradecimiento a Mariano Fonticelli y Elizabeth Jares-Erijman, mis directores de tesis. A Mariano además de agradecerle su minuciosa lectura de esta tesis, le agradezco la paciencia durante estos años y el coraje de abordar nuevos temas de investigación. Siempre ha estado pendiente de atender nuestras sugerencias para mejorar el laboratorio, y personalmente valoro mucho ese esfuerzo. Quiero destacar su honestidad, que aplicada a la investigación científica es una marca que se manifiesta en la calidad de su trabajo.

Es muy difícil poder expresar el profundo agradecimiento que tengo hacia Eli. Desde el primer momento que entre en su laboratorio me brindo contención, apoyo y sobre todo confianza. Su espíritu incansable, inteligencia y la pasión por su trabajo sin duda eran la fuerza impulsora para buscar siempre la excelencia en la investigación científica. Fue muy inspirador trabajar a su lado. Más allá de lo académico, Eli fue una gran persona. Siempre nos trató a todos sus estudiantes con mucho afecto; recuerdo como se preocupaba por mis viajes diarios de La Plata a Buenos Aires. La puerta de su oficina siempre estaba abierta, Ella con una sonrisa y siempre dispuesta darte una mano, un consejo y desde luego planificar y discutir experimentos. Hasta último momento nos ayudó, aconsejó y se preocupó cada uno de sus estudiantes pudiera finalizar sus tesis en su ausencia. Tras su partida dejó un huella en cada uno de los que tuvimos la fortuna de conocerla.

A todos los integrantes del grupo Nanoscopias y Fisicoquímica de Superficies de INIFTA. A Roberto Salvarezza por sus consejos, apoyo y aliento. En especial quisiera agradecer a Gastón Corthey, Alejandra Floridia y Aldo Rubert por todas las charlas que fueron tan valiosas para esta tesis. A Gastón, no solo por haberme alentado a realizar la tesis en este grupo y por las imágenes TEM, sino en general por toda la ayuda desinteresada que siempre me brindó. A Alejandra, le agradezco muchas de las imágenes TEM y medidas de electroquímica, tanto como las largas charlas de “catarsis”. A Aldo, le agradezco la buena predisposición para ayudarnos a mejorar el laboratorio, siempre con mucho mate e infinidad de temas para charlar. A Guillermo Benitez y Aldo Rubert por tantos experimentos de XPS y por la ayuda en la interpretación de

los resultados. A Germán Kürten, María Ángela Álvarez Manso, Lorena Picone, Celeste Dalfovo, Matías Calderón, Evangelina Pensa, Emiliano Cortés, Antonieta Daza Millone, Constanza Flores, Laura Arnal, Alejandro Ramirez, Carolina Díaz, Cecilia Dos Santos Claros, Florencia Álvarez, Julie Maya Girón, Emilia Alberdi, Flavia Lobo Maza, María Ana Huergo, Alejandro Miñan, Diego Pissinis, Pía Quiroga, Marcos Madrid, Federico Castez, Barbara Blum, Doris Grumelli, Patricia Schilardi, Carolina Vericat y María Elena Vela, por la buena onda, la ayuda desinteresada, y tantos buenos momentos llenos de risas y anécdotas.

Agustín Picco, miembro externo y anexo al grupo (porque es un buen tipo), quiero agradecerle la ayuda desinteresada y el intercambio de ideas que nutrieron mi trabajo.

A mis compañeros del laboratorio de la Dra. Elizabeth Jares del Departamento de Química Orgánica en la Facultad de ciencias Exactas y Naturales de la UBA. Especialmente quiero agradecer a Sebastián Días, Jonathan Fahuerbach y Guillermo Menendez. A Sebas le agradezco profundamente toda su ayuda no sólo por guiarme en mis primeros días en un laboratorio nuevo, si no principalmente por estar siempre pendiente del avance de mi trabajo y por gran generosidad. A Joni, le agradezco la ayuda con la síntesis de varios compuestos, por engancharse con mis experimentos y darme una mano siempre. A Guille quiero agradecerle su constante ayuda ¡en todo!, siempre dispuesto a dar una mano. Fue muy bueno discutir ideas y experimentos con los tres, pero sin duda mejor fueron todos los almuerzos compartidos. También deseo agradecer la ayuda de Carla Spagnuolo, Maria Etchehon, Federico Coluccio, Federico Fuentes, Florencia Gillanders, Martín Toscani, Jimena Martinez, Lucia Barcos, Valeria Edelsztejn, Jimena Giudice, Jessica Pellegrotti y Francisco Guaimas.

Al Dr. Thomas Jovin, la Dra. Lia Pietrasante y el Dr. Fernando Stefani, por toda su ayuda y contención para continuar con el trabajo del grupo de la Dra. Jares.

Quiero agradecer al Dr. Thomas Jovin por recibirme en su grupo en el Instituto Max Planck de Biofísica en Göttingen, Alemania. El trabajo realizado durante este periodo fue muy valioso y estimulante. Además, quiero agradecer a Tom, su esposa Donna Arndt-Jovin, y a todo el grupo, Sebastián Días, Luciana Giordano, Lisandro Falomir, Florencia Gillanders, Luis Oliveira, Elisa Turriani, Anthony, de Vries, Volodymyr Shvadchak, Raghu Palankar y Anja Marquardt, por hacer mas agradable aun mi estadía. En especial a Sebas, Romina, Luciana, Santiago y Lisandro por los paseos y momentos compartidos.

A la Dra. Eugenia Zelaya del Centro Atómico Bariloche por las imágenes TEM y por hacer que nuestras estadías sean muy agradables.

A todo el personal del INIFTA, y en especial a Coco Formoso, Jorge Massarutti, Ana y Diego Celi todo su ayuda durante estos años.

A mis compañeros de Orgánica por todos los años compartidos de docencia. En particular, quiero expresar mi agradecimiento a Patricia Allegretti, Mercedes Schiavoni y Danila Ruiz, por permitirme crecer como docente.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Agencia Nacional de Promoción Científica y Técnica (ANPCyT), Universidad Nacional de La Plata (UNLP) y Departamento de Química de la Facultad de Ciencias Exactas, UNLP por el financiamiento para realizar esta tesis y las estadías de investigación en otros laboratorios. En particular al programa PRH-74

(CONICET-ANPCyT), gracias el cual se puedo realizar esta tesis interdisciplinaria en distintos laboratorios, así también como asistir a cursos de formación en Argentina y el extranjero. El éxito de este programa se debe en gran medida al arduo trabajo de coordinación realizado por la Dra. Laura Steren y La Dra. Lia Pietrasanta.

Al Laboratorio Nacional de Luz Sincrotron (LNLS) del Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), Campinas, San Pablo, Brasil, por facilitarnos realizar experimentos de XPS en las líneas TGM, SGM y PGM en varias ocasiones.

A mi amigo (y socio) Gastón Ferrara por tantas charlas que nutrieron esta tesis, pero principalmente por su continua apoyo y aliento.

Hace muchos años tuve la fortuna de conocer una persona que sin duda me ayudo a encontrar mi vocación. Quiero agradecer a mi profesor de la escuela secundaria y luego amigo, Daniel Grubich, por haber apoyado y fomentado todas las ideas locas con las que participamos en tantas ferias de ciencia. Su pasión y dedicación por la docencia, están a la altura de su humildad y generosidad.

A mis amigos de la facu, Valeria, Cecilia, Vanesa, Carito, Luciano y Sergio por tantos buenos momentos compartidos todos estos años.

Sergio, "Gringo", quiero agradecerte tu insistencia, paciencia y apoyo que sin duda fueron de gran ayuda para finalizar mi carrera. Gracias amigo!

A los Patrault, la familia de mi novia, por haberme recibido e integrado a la familia y por la continua demostración de cariño.

Quiero agradecer a toda mi familia, y en especial a mi mamá Elba, a mi hermana Cecilia y a mi abuela María. Gracias a su apoyo, aliento, y infinito esfuerzo he podido concretar muchos de mis sueños. Gracias!!!

Por último, quiero agradecer a Ceci, mi novia, por todo su amor. No solo es mi compañera, es la persona que me mantiene con los pies en la tierra, y al mismo tiempo me deja soñar y me alienta a seguir adelante cuando pienso que no es posible. Su compañía y apoyo fueron indispensables para poder terminar de escribir esta tesis!!!

Julio

La Plata, Agosto de 2014.

Resumen

Las nanopartículas (NPs) de metales nobles presentan gran interés tanto por sus propiedades básicas como por la amplia variedad de aplicaciones en las que se utilizan activamente. Para obtener NPs estables y evitar su aglomeración, es necesario utilizar agentes estabilizantes durante la síntesis. Estas moléculas se adsorben sobre la superficie de las nanopartículas y evitan que estas interactúen directamente con las partículas vecinas. Si bien existen diversas moléculas que pueden ser utilizadas para este fin, las únicas nanopartículas metálicas que son estables a lo largo del tiempo, que pueden ser obtenidas en forma de polvos, lavadas, y utilizadas como si fueran un compuesto químico tradicional, son las nanopartículas protegidas por tioles. La gran estabilidad de estas partículas está dada por la alta energía del enlace que se forma entre el azufre del grupo tiol y el metal. Resulta, entonces, particularmente interesante estudiar la interfase entre la superficie metálica y las moléculas adsorbidas, para así diseñar diferentes vías de obtención de nanopartículas recubiertas con diferentes tioles.

Por otro lado, las sondas fluorescentes permiten una amplia variedad de aplicaciones, desde la detección de un determinado analito a la cuantificación de una propiedad fisicoquímica del medio –como la polaridad, fuerza iónica, campo eléctrico local, etc.–, hasta la marcación de biomoléculas. El desarrollo de la microscopia de fluorescencia y las técnicas de superresolución han expandido los límites de detección permitiendo estudiar sistemas y procesos complejos; por ejemplo, la dinámica intracelular de proteínas. Por esto, es de particular interés desarrollar sondas fluorescentes multiparamétricas, que permitan la detección de varias propiedades a la vez. Asimismo, la posibilidad de modular la emisión de fluorescencia permite diferenciar las señales del ruido de fondo, aumentando los límites de detección.

En este trabajo se presenta un estudio sobre la síntesis y caracterización de NPs de oro (AuNPs) protegidas por tioles, para su utilización en sensores fluorescentes multiparamétricos y fotomodulables, basados en ensamblados supramoleculares a escala nanométrica. Estos sistemas complejos están formados por AuNPs cuya función principal es ser el soporte central sobre el cual se autoensamblan polímeros anfifílicos funcionalizados. Las especies que modifican a los polímeros son fluoróforos de la familia de las 3-hidroxicromonas (3HC) y compuestos fotocromáticos de la familia de los heterodiariltenos. Las sondas fluorescentes empleadas, 3HC, presentan como característica principal una emisión dual (a dos longitudes de onda) producto de una transferencia protónica intramolecular en el estado excitado (*excited state intramolecular proton transfer*, ESIPT). Un único estado basal genera por transferencia protónica dos estados excitados (normal N* y tautómero T*) cuya estabilización depende fuertemente de la polaridad del medio. La relación de intensidad de

cada banda, I_{N^*}/I_{T^*} , es una medida de la polaridad del medio y no depende de la concentración de fluoróforo, lo que permite su utilización en sistemas complejos donde no es posible controlar esta variable (por ejemplo, en un medio biológico o incluso en estudios intracelulares). Por su parte, los compuestos fotocromicos pueden ser fotoconvertidos en dos isómeros con diferentes espectros de absorción. Si el espectro de absorción de uno de los isómeros se solapa con el espectro de emisión del fluoróforo, y ambas moléculas se encuentran a una distancia adecuada, es posible modular la emisión del fluoróforo mediante transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET).

Los polímeros anfifílicos utilizados para formar los ensamblados, fueron preparados a partir de reacciones de adición de moléculas de dodecilamina, sondas fluorescentes y/o fotocromicos a los grupos anhídrido de poli-*alt*-isobutilenanhídrido maleico (PMA). El PMA reacciona mediante sus grupos anhídrido con los grupos amina de las moléculas adicionadas, formando uniones amida y dejando libre grupos carboxilato. Las cadenas de dodecilamina le confieren al polímero el entorno hidrofóbico y los grupos carboxilato pertenecen a la parte hidrofílica. Los ensamblados formados por AuNPs y polímeros anfifílicos modificados por moléculas fotoactivas presentan un tamaño cercano a los 10 nm y constan de tres zonas bien diferenciadas: (i) un carozo metálico, (ii) una coraza hidrofóbica, formada por las cadenas alquílicas de los tioles en la superficie metálica y las cadenas alquílicas del polímero y (iii) en la parte más externa, una zona hidrofílica dada por los grupos carboxilato del polímero. Esto permite que todo el ensamblado sea soluble o dispersable en medio acuoso, pero que las moléculas fotocromicas puedan ser alojadas en la zona hidrofóbica necesaria para que sean estables y modulen reversiblemente la emisión de los fluoróforos.

En primer lugar, se estudiaron diferentes métodos de síntesis de AuNPs, lo que permitió controlar el tamaño y composición de las mismas. Los métodos ensayados consistieron en síntesis química por vía húmeda donde los precursores metálicos fueron reducidos en presencia de los tioles (método de dos fases de Brust-Schiffrin), o en presencia de agentes protectores más débiles (hidroximetilfosfinas o sales de amonio cuaternarias). Por la reacción de Brust-Schiffrin es posible obtener AuNPs recubiertas por tioles con una estrecha distribución de tamaños que varían entre 2 y 5 nm, dependiendo de la relación Au:tiole empleada en la síntesis (se sintetizaron AuNPs protegidas con dodecanotiol de 2, 3 y 4 nm de diámetro promedio). Los otros métodos de síntesis se obtuvieron AuNPs de 1 a 2 nm e hidrosolubles –protegidas con trihidroximetilfosfina– y de 5 a 6 nm e hidrofóbicas –cubiertas con sales de amonio cuaternario. Estos agentes protectores débiles permiten realizar reacciones de intercambio de grupos protectores (o ligandos), ampliando las alternativas de modificación de la superficie de las AuNPs preformadas. Se ensayaron reacciones de intercambio de ligandos para modificar las AuNPs con diferentes tioles: dodecanotiol (DDT), ácido 11-mercaptoundecanoico (MUA), ácido tiomálico (TMA), ácido *p*-mercaptobenzoico (MBA) y ácido 3-mercaptopropanoico (MPA). Se encontró una diferencia importante en la composición superficial de las AuNPs protegidas con TMA (AuNPs@TMA) respecto a las demás AuNPs obtenidas por reacciones de intercambio. Estudios exhaustivos mediante espectroscopia de fotoelectrones generados por rayos X (XPS, fuente de rayos X convencional y con radiación de luz sincrotrón) demostraron que las AuNPs@TMA presentan una cantidad significativa de azufre atómico coadsorbido en la superficie metálica. Asimismo, se propone aquí que el origen de este

adsorbato radica en la ruptura de la unión C–S durante el proceso de adsorción.

Es importante destacar que las propiedades ópticas de los sistemas formados por AuNPs dependen del tamaño de estas, y de la forma de los núcleos metálicos. Además, el tipo de agente protector modifica la longitud de onda y la intensidad de los picos (o máximos) característicos de la resonancia de plasmones en los espectros de absorción, en los que se manifiestan picos característicos de resonancia de plasmones. Puesto que los procesos que interesan en este trabajo –fotoconversión y emisión–, pueden estar acoplados con la resonancia de plasmones superficiales, es preciso conocer y controlar las propiedades de las AuNPs. Esto permite asegurar el correcto funcionamiento de los sensores. Por ello, las AuNPs han sido caracterizadas por espectroscopias FT-IR y UV-Visible, Microscopia de Transmisión de Electrones (TEM y de alta resolución, HRTEM) y espectroscopia de fotoelectrones generados por rayos X (XPS, fuente de rayos X convencional y con radiación de luz sincrotrón).

Antes de la preparación de los polímeros anfífilicos, se sintetizaron y caracterizaron las sondas fluorescentes y el fotocromico. Se utilizaron dos fluoróforos, 6-amino-2-(2-furil)-3-hidroxicromona (FC) y 6-amino-2-(4'-(dietilamino)fenil)-3-hidroxicromona (FE), sobre los que se estudiaron sus comportamientos frente a cambios en la polaridad del medio. Esto permite interpretar su posterior funcionamiento en el ensamblado. Por otro lado, se sintetizó 1,2-bis(2-metilbenzo[b]tiofen-3-il)perfluorociclopenteno como fotocromico base, el que se funcionalizó con un grupo nitro, posteriormente reducido a grupo amina (un total de 5 pasos de síntesis). Se prepararon polímeros anfífilicos con diferente composición de dodecilamina, fluoróforo y/o fotocromico. Los ensamblados fueron preparados con estos polímeros y AuNPs de 2, 3 y 4 nm protegidas con dodecanotiol y fueron disueltos en una solución amortiguadora (buffer) de pH alcalino, y purificados mediante electroforesis en gel de agarosa o cromatografía de exclusión por tamaños.

En la etapa final, se estudio el cambio en los espectros de emisión de fluorescencia de las sondas FE y FC en ensamblados sobre AuNPs, frente a cambios de polaridad del medio con agregados sucesivos de un cosolvente (i-propanol, etanol, acetonitrilo o tetrahidrofurano). Se observó que para agregados inferiores a $\sim 20\%$ en volumen de cosolvente se tiene una respuesta monótona creciente de la relación I_{N^*} / I_{T^*} . Por otra parte, frente a mayores agregados se observa una variación errática de este cociente. Esto indica que los ensamblados pueden sufrir cambios conformacionales importantes al cambiar la composición del medio, generando cambios significativos en la polaridad y fuerza iónica del entorno local de la sonda fluorescente. Los ensamblados modificados con fotocromico y una sonda fluorescente permitieron modular la señal de emisión de la banda T^* del fluoróforo. Asimismo, a partir de espectroscopia de fluorescencia en estado estacionario y resuelto en el tiempo, que las sondas fluorescentes se encuentran en diferentes posiciones respecto de la superficie del ensamblado. Se propone que la estructura de los ensamblados depende del tamaño de la molécula, la composición del polímero y el tamaño de las AuNPs. Los polímeros que contienen una gran concentración de fluoróforos y fotocromicos forman ensamblados menos estables que aquellos con menor proporción de grupos funcionales.

Los resultados presentados en este trabajo resultan interesantes para comprender los mecanismos que gobiernan estos sistemas para poder mejorarlos y lograr futuras aplicaciones. Los ensamblados pueden ser útiles en diversas aplicaciones, dependiendo de las moléculas utilizadas

para funcionalizar el polímero, así como del tipo de NP sobre la cual este es soportado. Los resultados presentados, contribuyen con el desarrollo de ensamblados más robustos y versátiles para su aplicación en sistemas complejos.

Abstract

Noble metal nanoparticles (NPs) are of great interest both for its basic properties and for the wide variety of applications where they are actively used. To obtain stable NPs and prevent their agglomeration, stabilizing agents must be used during the synthesis. These species are adsorbed on the surface of the nanoparticles and prevent the direct interaction among metallic cores directly interact with neighboring particles. Although several molecules can be used for this purpose, only thiolate-protected nanoparticles are stable over time, may be obtained as powders, are able to be washed, and be used as if they were traditional chemical compounds. The outstanding stability of the particles is given by the high metal-sulfur bond-energy. Therefore, it is of particular interest to study the interface between the metal surface and the adsorbed molecules. This is necessary in order to design new synthesis strategies and to improve the existing methods.

Furthermore, fluorescent probes allow a wide variety of applications, from a given analyte detection or the quantification of a physicochemical property of the medium (e.g. polarity, ionic strength, local electric field), to the labeling of biomolecules. The development of the fluorescence microscopy techniques has allowed the expansion of detection limits, and helped to study complex systems and processes; for example, intracellular protein dynamics. Therefore, it is of particular interest to develop multiparameter fluorescent probes, allowing the detection of multiple properties at once. Also, the possibility of modulating the fluorescence emission allow to differentiate the background noise from signals, which is associated with an increase of detection limits.

This thesis presents a study on the synthesis and characterization of gold NPs (AuNPs) protected by thiols, for their use in multiparametric and photoswitchable fluorescent sensors based on supramolecular assemblies at the nanoscale. The AuNPs fulfill the main function to be the central support on which functionalized amphiphilic polymers self-assemble. The polymers are modified by fluorophores moieties (3-hydroxycromones, 3HC) and photochromic moieties (heterodiarilenes). The fluorescent probes used, 3HC, shown a dual emission band (two wavelengths) as the main feature, due to an excited state intramolecular proton transfer (ESIPT). For these molecules, a single ground state generate two excited states by proton transfer (N^* normal and T^* tautomer), whose stability depends strongly on the polarity of the medium. The ratio of the intensity of bands is a measure of the polarity of the medium and does not depend on the concentration of fluorophore, enabling their use in complex systems where it is not possible to control this variable (for example, in a biological medium or even in intracellular studies). Photochromic compounds can be photoswitched between two isomers with different absorption spectra. If the absorption spectra of one isomer overlaps the emission spectra of the fluorophore, and if both molecules are at

a proper distance, it is possible to modulate the emission of the fluorophore by Förster resonance energy transfer (FRET). The amphiphilic polymers used to make assemblies were prepared from addition reactions of dodecylamine molecules, fluorescent probes and/or photochromic molecules with anhydride groups of poly-*alt*-isobuthylen maleic anhydride (PMA) given amide bonds. Dodecylamine chains confer the hydrophobic environment and the carboxylate groups gives the hydrophilic part. These assemblies have a size close to 10 nm and consists of three distinct parts: (i) a metallic core, (ii) a hydrophobic shell formed by the alkyl chains of thiols on AuNPs and the alkyl chains of polymer, and (iii) an outermost hydrophilic zone, given by the carboxylate groups of the polymer. This allows the entire assembly to be soluble or dispersible in aqueous medium, while the photochromic molecules can be accommodated in the hydrophobic area required to be stable and able to photoswitch the emission of the fluorophore.

First, various methods of AuNPs synthesis were studied, which allowed to control the size and composition thereof. The tested methods consisted of wet chemical synthesis wherein the metal precursors were reduced in the presence of thiols (two phases method of Brust-Schiffrin), or in the presence of weaker protective agents (hidroximetilenfosfinas or quaternary ammonium salts). Thiolate covered AuNPs from 2 a 5 nm in size, which exhibit a narrow size distribution, can be obtained using the method by the Brust-Schiffrin. Its mean size depends on the Au:thiol ratio employed in the synthesis (dodecanethiol protected AuNPs of 2, 3 y 4 nm average diameter were prepared). The other strategies lead to water soluble AuNPs, 1 a 2 nm in size –protected with tris(hydroxymethyl)phosphine– or hydrophobic ones, 5 to 6 nm in size –covered with quaternary ammonium salts. These weak protective agents allow exchange reactions of the protecting groups, which expand the alternatives to modify the surface of preformed AuNPs. Thus, ligand exchange reactions were tested for modifying AuNPs with different thiols: dodecanethiol (DDT), 11-mercaptopundecanoic acid (MUA), thiomalic acid (TMA), *p*-mercaptopbenzoic acid (MBA) and 3-mercaptopropionic acid (MPA). A significant difference was found in the surface composition of the AuNPs-TMA in comparison with AuNPs obtained by exchange reactions with other ligands. The AuNPs-TMA have a significant amount of atomic sulfur as co-adsorbed of thiomalate. It is proposed that its origin lies in the breakdown of the bond C–S along the adsorption process.

At this point, it is worth to recall that optical properties of the system formed by AuNPs depend on the size and shape of metallic cores. Furthermore, the protective agent modifies the characteristic wavelengths and intensities of the absorption spectra, which is mainly featured in the plasmon peak. Since the processes of interest in this work –emission and photoswitch– may be coupled to the surface plasmon resonance, we must understand and control the properties of the AuNPs. This helps to control the proper functioning of the sensors. Therefore, AuNPs were characterized by FT-IR and UV-Vis spectroscopies, Transmission Electron Microscopy (TEM and high-resolution HRTEM) and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS by conventional x-ray source and synchrotron radiation).

In order to prepare modified amphiphilic polymers, we previously prepared photochromic compounds and fluorescent probes. Two fluorophores were prepared, 6-amino-2-[4-(diethylamino)phenyl]-3-hydroxychromone (FE) and 6-amino-2-(2-furyl)-3-hydroxychromone (FC), which were studied along with changes in the polarity of the medium. This knowledge were useful to

interpret how they behave when assembled in the polymer, and to get insight into the structure of these complex systems. On the other hand, the compound 1,2-bis (2-benzo[b]thiophen-3-yl)-perfluorocyclopentene was synthesized as the basic photochromic unit. Afterwards, it was functionalized with a nitro group, and then reduced to amine group (a total of five synthesis steps). Amphiphilic polymers were prepared with different composition of dodecylamine, fluorophore and/or photochromic. The assemblies were prepared with these polymers and dodecanethiol protected AuNPs of 2, 3 y 4 nm in size. Then, they were dissolved in an alkaline pH buffer, and purified by agarose gel electrophoresis or size exclusion chromatography.

In the final stage, the change in the fluorescence emission spectra of the probes FC and FE assembled on AuNPs as a consequence of the polarity changes of the medium were studied. The measurements have been done by successive additions of a cosolvent (i-propanol, ethanol, acetonitrile and tetrahydrofuran) on water dispersions of the assemblies. It was observed a increasing monotonic response of the ratio I_{N^*} / I_{T^*} for solvent additions lower than ~ 20 % in volume. Moreover, for larger cosolvents proportions erratic variation of this ratio is observed. This indicates that the assemblies may suffer substantial conformational changes by modifying the composition of the medium, which causes significant changes in the polarity, ionic strength and local electric field of the environment close to fluorescent probe. Noticeably, the assemblies modified by photochromic compounds and fluorescent probes allowed photoswitchable emission of the T^* band of the fluorophores. It is also proposed that, based on steady state and time-resolved fluorescence spectroscopy, that fluorescent probes have different orientations with respect to the the surface of the assembly. It is proposed that the structure of the assembly depends on the size of the molecule, the polymer composition and the size of AuNPs. The polymers containing a high concentration of fluorophores and photochromic species form less stable assemblies than those with lowest proportion of functional groups.

The results presented in this thesis are of interest to understand the mechanisms that govern these systems to improve and build future applications. The assemblies may be useful in various fields of applications, depending on the molecules used to functionalize the polymer and on the type of NP. The results presented contribute to the development of more robust and versatile for use in complex systems assemblies.

Índice general

1	Introducción	1
1.1	Lugar de trabajo y trabajo en colaboración	4
1.2	Estructura y contenidos	4
	Referencias	5
I	Métodos	7
2	Métodos experimentales y teóricos	9
2.1	Voltamperometría cíclica	9
2.1.1	Cálculo del área real de un electrodo	10
2.2	Espectroscopia de fotoelectrones generados por rayos X (XPS)	10
2.2.1	Principios básicos	11
2.2.2	Disposición experimental	15
2.2.3	Análisis de los resultados	18
2.3	Distribución de tamaños de las nanopartículas	22
2.4	Cálculos de Frecuencias Vibracionales	23
2.5	Espectroscopia ultravioleta-visible (UV-Vis)	23
2.6	Espectroscopia de Fluorescencia en estado estacionario y resuelta en el tiempo	24
2.6.1	Principios básicos	24
2.6.2	FRET	26
2.7	Irradiación - Fotoconversión	29
	Referencias	29
3	Detalles experimentales	33
3.1	Materiales	33
3.1.1	Agua	33
3.1.2	Limpieza del material	33
3.1.3	Reactivos generales	34
3.1.4	Síntesis de H _{Au} Cl ₄	34
3.2	Síntesis de nanopartículas de Au cubiertas con dodecanotiol	35
3.2.1	Nanopartículas de Au@SC ₁₂ de $\langle D \rangle = 3,9 \pm 0,6$ nm	35
3.2.2	Nanopartículas de Au@SC ₁₂ de $\langle D \rangle = 3,0 \pm 0,9$ nm	35

3.2.3	Nanopartículas de Au@SC ₁₂ de $\langle D \rangle = 2,5 \pm 0,6$ nm	35
3.2.4	Nanopartículas de Au@TOABr de $\langle D \rangle = 5,6$ nm	36
3.2.5	Nanopartículas de Au@THP	36
3.2.6	Intercambio de Ligandos en las Nanopartículas	36
3.3	Síntesis de Compuestos Orgánicos	37
3.3.1	Fotocrómicos	37
3.3.2	Sondas ESIPT	39
3.3.3	Polímero Anfifílico Fotomodulable	40
3.4	Ensamblados de NPs y Polímero Anfifílico	41
	Referencias	42
II	Nanopartículas y Ensamblados Supramoleculares	45
4	Nanopartículas de Au recubiertas por tioles	47
4.1	Introducción	47
4.1.1	Monocapas Autoensambladas de tioles sobre Au(111).	48
4.1.2	Nanopartículas y <i>clusteres</i> de Au - Interfase Au-tiol	50
4.2	AuNPs - Brust-Schiffrin de dos fases	56
4.3	Reacciones de intercambio de ligandos.	62
4.3.1	Clivaje de la unión C-S en el sistema autoensamblado Au-TMA	69
4.4	Discusión y conclusiones parciales	75
	Referencias	76
5	Ensamblados de Polímeros Anfifílicos y Nanopartículas como Sondas Multiparamétricas	85
5.1	Introducción	85
5.1.1	Sondas ratiométricas de polaridad - ESIPT	85
5.1.2	Ensamblados supramoleculares de polímeros anfifílicos y nanopartículas	90
5.2	Caracterización de las sondas ESIPT	92
5.2.1	Sonda FE, control	92
5.2.2	Sonda FC, control	97
5.3	AuNP@PMA-1FE-75NC ₁₂ y ensayos de purificación	99
5.3.1	Ensayos de sensado de polaridad con AuNP@PMA-1FE-75NC ₁₂	101
5.4	Ensamblados AuNP@PMA-2FC-75NC ₁₂	104
5.4.1	Ensayos de polaridad - Ensamblados - FC	104
5.5	Discusión y Conclusiones Parciales	106
	Referencias	110
6	Sondas Nanométricas Fotomodulables	113
6.1	Introducción	113
6.1.1	Compuestos fotocrómicos	115
6.1.2	Transferencia de Energía de Energía de Förster fotocrómica (pcFRET)	119

6.2	Caracterización de Polímeros Anfifílicos Fotomodulables	120
6.3	Caracterización de Ensamblados de Polímeros Fotomodulables y Nanopartículas .	126
6.3.1	Caracterización por Fluorescencia Resuelta en el Tiempo.	129
6.4	Composición de los polímeros y calidad de los ensamblados.	131
6.5	Discusión y Conclusiones Parciales	134
	Referencias	136
III	Parte Final	141
7	Conclusiones Finales y Perspectivas	143
	Lista de Publicaciones	147

Capítulo 1

Introducción

Las nanopartículas (NPs) metálicas son conocidas desde la antigüedad y existen informes sobre sus propiedades y usos desde el siglo XVII [1]. No obstante, la conferencia de M. Faraday de 1857 [2] donde disertó acerca del oro coloidal generado por reducción de sales de Au, es considerada un hito en la historia de las NPs. En 1988 J. M. Thomas reveló, mediante microscopía electrónica, que las muestras producidas utilizando un protocolo similar contienen NPs de Au (AuNPs) con tamaños entre 3 y 30 nm [3]. Casi un siglo después de la conferencia de Faraday, J. Turkevich publicó el método de síntesis de AuNPs protegidas por citrato [4], que ha sido utilizado extensamente. Incluso en la actualidad, es motivo de interés el estudio del mecanismo mediante el cual estas partículas son producidas [5]. La investigación de la composición y estructura de las NPs es interesante tanto para poder comprender mejor la variación de distintos fenómenos físicos por la restricción del tamaño a la escala nanométrica como así también por la gran variedad de aplicaciones que estas poseen en campos tan diversos como el tratamiento médico [6], diagnóstico en química clínica [7, 8], catálisis [9-11] y fabricación de sensores [12] y/o biosensores [13]. Aunque el área de aplicación de las NPs es muy amplia, importantes aspectos que involucran a estos materiales se encuentran aún lejos de ser comprendidos y controlados.

Para obtener NPs estables y evitar su aglomeración, es necesario utilizar agentes estabilizantes durante la síntesis. Existe gran variedad de moléculas que pueden ser usadas con este fin como el citado ejemplo del citrato, polímeros como polivinilpirrolidona (PVP), fosfinas, aminas primarias y sales de amonio cuaternarias. Sin embargo, uno de los únicos tipos de NPs metálicas cuya distribución de tamaños es estrecha, son estables a lo largo del tiempo y pueden ser obtenidas en forma de polvo, lavadas, y utilizadas como si se tratase de un compuesto químico tradicional, son las NPs cubiertas por tioles. Estas NPs tomaron gran relevancia desde la publicación de los métodos de Brust-Schiffrin para la síntesis de AuNPs cubiertas por tioles hidrofóbicos [14] o hidrofílicos [15] y fue extendido luego a otros metales y diferentes tioles. La utilización de estos métodos se ha extendido a una amplia variedad de metales y tioles. La alta energía del enlace entre el azufre y el metal confiere a estas NPs una gran estabilidad. Por otro lado, la elección del grupo terminal del tiol utilizado, abre la posibilidad de modificar estas partículas con diversos compuestos mediante enlaces covalentes y controlar muchas de sus propiedades.

Las NPs metálicas protegidas por tioles son los análogos tridimensionales a las SAMs de tioles

sobre superficies metálicas planas. Por lo tanto, es muy interesante el estudio en conjunto de estos dos sistemas ya que los resultados que se obtienen en ambos casos son complementarios y permiten realizar una aproximación unificada al problema. Ciertas técnicas son útiles para el estudio de NPs pero no lo son para superficies planas y viceversa. Por ejemplo, el estudio de NPs mediante espectroscopía de fotoelectrones generados por rayos X (XPS) generará una señal con una contribución superficial mucho mayor que en una superficie plana, lo que facilitaría el análisis de la interfase metal-adsorbato, si no se cuenta con una fuente de luz sincrotrón para disminuir la energía de los fotones incidentes. Por otro lado, sólo recientemente fue posible realizar cálculos teóricos en el marco de la teoría del funcional de densidad (DFT) sobre NPs con algunos cientos de átomos [16] y este sigue siendo un problema de un alto costo computacional. Sin embargo, el estudio de superficies metálicas extendidas es de un costo mucho menor ya que se genera un sistema periódico formado por pocos átomos.

La microscopia de fluorescencia ha sido una herramienta de gran importancia en el estudio de sistemas biológicos. Con el desarrollo tecnológico se han creado variantes de este tipo de microscopia que han empujado los límites de detección aumentando ampliamente la magnificación. Desde el principio de la década del 80' al contar con láseres cada vez más accesible se desarrolló el microscopio confocal, el cual permite obtener imágenes de alta resolución con selectividad espacial, gracias a que logra enfocar un delgado espesor de la muestra disminuyendo la fluorescencia de fondo que esta fuera de foco. A partir de la década del 90', gracias a las cámaras CCD cada vez más rápidas, a los piezoeléctricos precisos y al desarrollo de software avanzado, se han desarrollado otras técnicas de microscopia de super resolución como STED (*Stimulated Emission Depletion Microscopy*), SOFI (*Superresolution Optical Fluctuation Imaging*), y STORM (*Stochastic Optical Reconstruction Microscopy*), que permiten tomar imágenes ópticas muy por debajo del límite de difracción de la luz llegando a observar moléculas únicas.

El diseño y síntesis de nuevos fluoróforos ha permitido ampliar el número y tipo de analito que se pueden estudiar. Es de particular interés la utilización de diferentes NPs de semiconductores –los llamados *Quantum Dots*, QDs– en experimentos de microscopia de fluorescencia, dado su brillo, su estrecha banda de emisión y su resistencia a la fatiga (muy importante para las microscopias de super resolución, donde se necesitan alta potencia del haz incidente y largos tiempos de exposición). Sin embargo, estas NPs al igual que una molécula fluorescente, presentan “parpadeo” (*blinking*) [17] el cual es desfavorable en experimentos de seguimiento de moléculas únicas. En las últimas décadas, los QDs, han sido utilizados como marcadores en experimentos de microscopia de moléculas únicas [18] y para construir sensores fluorescentes [19]. Una estrategia para evitar el parpadeo se basa en la utilización de muchas moléculas de fluoróforo juntas, por ejemplo en un polímero. La gran diferencia entre QDs y nanopartículas de polímeros fluorescentes, es que los QDs se comportan como una unidad cuántica simple y parpadea, pero las partículas de polímero que contienen múltiples emisores en cada partícula, en promedio no parpadean, aunque los fluoróforos individualmente sí lo hacen. Esta característica de no parpadeo es muy útil en marcado y seguimiento individual de biomoléculas en una célula viva sin perder ninguna acción biológica [18].

En esta tesis se estudiaron distintas alternativas de modificación de la superficie de nano-

partículas con el objetivo de desarrollar sensores fluorescentes fotomodulables a escala nanométrica. La nanopartícula metálica actúa en un principio como soporte sobre la cual se unen moléculas de fluoróforos, y fotocromicos que permiten modular la emisión de luz [20]. La modulación de la señal de emisión permite aumentar la relación señal-ruido mediante detección óptica por lock-in (OLID) [21]. Se estudiaron las síntesis de AuNPs recubiertas por alcanotioles mediante el método de Brust-Schiffrin en dos fases, como también AuNPs protegidas por ligandos débiles los cuales pueden ser intercambiados por tioles. También se estudio el recubrimiento de las NPs con un polímero anfifílico funcionalizado con fluoróforos y fotocromicos, formando ensamblados supramoleculares. Esta estrategia permite unir varias moléculas que cumplen diferentes funciones en un tamaño de unos pocos nanómetros. Al mismo tiempo, estos ensamblados supramoleculares presentan una estructura genérica que permite ser preparados con distinto tipo de NPs para aprovechar sus propiedades, en áreas tan diversas como plasmónica con Au, Ag o Cu NPs, magnetismo con Fe_3O_4 o CoPt y fluorescencia de los QDs [22]. También se pueden emplear distintos tipos de fluoróforos tanto como marcados o como sensores [23-25].

Este trabajo de tesis interdisciplinario fue desarrollado en dos grupos de investigación. Por un lado, en un grupo dedicado históricamente a la electroquímica y fisicoquímica de superficies extendidas, y por otro lado, en un grupo dedicado a la síntesis de orgánica de sondas fluorescentes y compuestos fotocromicos, para su uso en microscopia de fluorescencia como herramienta de estudio de sistemas biológicos complejos. Esto requirió, en la parte inicial del trabajo, la evaluación de diferentes rutas de síntesis de NPs metálicas, varias de las cuales no se comentan en detalle en esta tesis ya sea porque no aportan datos relevantes a la discusión o bien por tratarse de protocolos que no han funcionado satisfactoriamente. Asimismo, se avanzó en la caracterización de estos sistemas, haciendo particular énfasis en los efectos adversos que las técnicas de medida producen en las muestras. En prácticamente todos los métodos experimentales utilizados hemos observado que el sistema de medida afecta, de alguna manera, a la medida que se está realizando. Por ejemplo, la microscopía electrónica es una técnica que históricamente se ha utilizado en gran medida para el estudio de muestras masivas (en general en metalurgia) y los daños producidos sobre estas muestras son conocidos. Sin embargo, al utilizar esta técnica para el estudio de sistemas con tamaños nanométricos, donde la superficie adquiere gran importancia, aparecen nuevos tipos de daños que limitan el estudio de estos sistemas. Otro ejemplo lo constituyen las técnicas que involucran la irradiación de la muestra con rayos X. Debido a la gran sensibilidad de las moléculas orgánicas, que son objeto de nuestro estudio, es necesario minimizar la dosis de rayos X para disminuir el daño. Durante todos los experimentos que detallamos en esta tesis, hemos tenido especial atención en utilizar condiciones de medida que minimizaran estos daños. En los casos en que esto no fue posible, se intentó elucidar qué tipo de daño se estaba produciendo para realizar el análisis de los resultados teniendo en cuenta estos efectos o bien descartar los datos que hayan sido afectados por los mismos. Es oportuno destacar que la purificación de los sistemas nanoparticulados no es una tarea trivial, y muchas veces se puede incurrir en errores de interpretación de las propiedades de estos sistemas por no contar con un adecuado método de purificación. Estos efectos se aprecian mas claramente en los ensamblados supramoleculares, donde las estructuras son complejas y su estabilidad depende de varios factores que pueden ser

afectado durante su estudio.

1.1 Lugar de trabajo y trabajo en colaboración

La mayor parte de los resultados presentados en esta tesis han sido obtenidos en el Laboratorio de Nanoscopías y Físicoquímica de Superficies del Instituto de Investigaciones Físicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA) y en el Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires. Sin embargo, una parte importante de ellos son producto del trabajo en colaboración con diferentes grupos de investigación y de estadías en diferentes laboratorios. En todos los casos se participó activamente en el análisis de los resultados.

Las medidas de XPS con fuente de Mg K α fueron realizadas en el Nanoscopías del INIFTA y con radiación de luz sincrotrón fueron realizadas en el Laboratório Nacional do Luz Síncrotron (LNLS), Campinas, Brasil.

Las preparación de algunos ensamblados supramoleculares fotomodulable y la determinación de sus espectros de fluorescencia resueltos en el tiempo fueron realizados en el Laboratorio de Dinámica Celular del Instituto Max Planck de Bio-Físicoquímica en Gotinga, Alemania.

1.2 Estructura y contenidos

Este informe se divide en dos partes. La primera, **Métodos**, está compuesta por dos capítulos. En el **Capítulo 2** se realiza una breve descripción de los métodos experimentales y teóricos que se utilizaron. En el **Capítulo 3**, se describen los detalles experimentales de las diferentes rutas de síntesis para obtener AuNPs, y la síntesis de las sondas fluorescentes y las moléculas fotocromáticas, así también como la preparación de diferentes polímeros anfífilicos con los que se formaron los autoensablados supramoleculares con las NPs y la purificación de estos.

La segunda parte, **Nanopartículas y Ensamblados Supramoleculares** consta de tres capítulos donde se discuten los resultados obtenidos con los diferentes componentes que forman los sensores fotomodulables basados en AuNPs. En el **Capítulo 4** se discuten los aspectos generales de los dos métodos de síntesis de NPs cubiertas con tioles utilizados: el métodos de Brust-Schiffrin dos fases y las reacciones de intercambio de ligandos. Se presentan los lineamientos generales de estos métodos y además se discuten los resultados de espectroscopias UV-Vis, XPS y HRTEM obtenidos para estas NPs. En el caso de AuNPs protegidas con tioles mediante reacciones de intercambio de ligandos se detallan experimentos acerca de su composición respecto de la estructura de las moléculas que las recubren. El **Capítulo 5** trata las características mas importantes de los fluoróforos que actúan como sondas de polaridad en los ensamblados supramoleculares. Se describe el comportamiento de las sondas libres, los polímeros anfífilicos y finalmente su comportamiento como sensor. Se presta especial atención a los cambios estructurales que sufren los ensamblados como para poder interpretar adecuadamente su respuesta frente a cambios de polaridad, pH y fuerza iónica del medio. En el **Capítulo 6** se describe la preparación y caracterización de sensores de polaridad fotomodulables.

En la **Parte final** se presentan las conclusiones generales del trabajo y perspectivas (**Capítulo 7**).

Las **Referencias Bibliográficas** se presenta al final de cada capítulo en una lista enumerada por orden de aparición de las citas en el texto.

Referencias

- (1) Daniel, M. C. y Astruc, D. "Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology" *Chem. Rev* **2004**, *104*, 293-346.
- (2) Faraday, M. "The Bakerian Lecture: Experimental Relations of Gold (and Other Metals) to Light" *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* **1857**, *147*, 145-181.
- (3) Thomas, J. M. "Colloidal metals: past, present and future" *Pure and Applied Chemistry* **1988**, *60*, 1517-1528.
- (4) Turkevich, J.; Stevenson, P. C. e Hillier, J. "A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold" *Discussions of the Faraday Society* **1951**, *11*, 55-75.
- (5) Polte, J.; Ahner, T. T.; Delissen, F.; Sokolov, S.; Emmerling, F.; Thünemann, A. F. y Kraehnert, R. "Mechanism of Gold Nanoparticle Formation in the Classical Citrate Synthesis Method Derived from Coupled In Situ XANES and SAXS Evaluation" *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132*, 1296-1301.
- (6) Boisselier, E. y Astruc, D. "Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity" *Chemical Society Reviews* **2009**, *38*, 1759.
- (7) Azzazy, H. M. "Nanodiagnostics: A New Frontier for Clinical Laboratory Medicine" *Clinical Chemistry* **2006**, *52*, 1238-1246.
- (8) Peng, G.; Tisch, U.; Adams, O.; Hakim, M.; Shehada, N.; Broza, Y. Y.; Billan, S.; Abdah-Bortnyak, R.; Kuten, A. y Haick, H. "Diagnosing lung cancer in exhaled breath using gold nanoparticles" *Nature Nanotechnology* **2009**, *4*, 669-673.
- (9) Haruta, M.; Kobayashi, T.; Sano, H. y Yamada, N. "Novel gold catalysts for the oxidation of carbon monoxide at a temperature far below 0.DEG.C." *Chemistry Letters* **1987**, 405-408.
- (10) Wieckowski, A.; Savinova, E. R. y Vayenas, C. G., *Catalysis and Electrocatalysis at Nanoparticle Surfaces*; CRC Press: 2003; 986 págs.
- (11) Lopez-Acevedo, O.; Kacprzak, K. A.; Akola, J. y Häkkinen, H. "Quantum size effects in ambient CO oxidation catalysed by ligand-protected gold clusters" *Nature Chemistry* **2010**, *2*, 329-334.
- (12) Ibañez, F. J. y Zamborini, F. P. "Chemiresistive Sensing with Chemically Modified Metal and Alloy Nanoparticles" *Small* **2012**, *8*, 174-202.
- (13) Saha, K.; Agasti, S. S.; Kim, C.; Li, X. y Rotello, V. M. "Gold Nanoparticles in Chemical and Biological Sensing" *Chemical Reviews* **2012**, *112*, 2739-2779.

- (14) Brust, M.; Walker, M.; Bethell, D.; Schiffrin, D. J. y Whyman, R. "Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase liquid-liquid system" *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1994**, 1994, 801-802.
- (15) Brust, M.; Fink, J.; Bethell, D.; Schiffrin, D. J. y Kiely, C. "Synthesis and reactions of functionalised gold nanoparticles" *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1995**, 1995, 1655-1656.
- (16) Walter, M.; Akola, J.; Lopez-Acevedo, O.; Jadzinsky, P. D.; Calero, G.; Ackerson, C. J.; Whetten, R. L.; Grönbeck, H. y Häkkinen, H. "A unified view of ligand-protected gold clusters as superatom complexes" *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2008**, 105, 9157.
- (17) Stefani, F. D.; Hoogenboom, J. P. y Barkai, E. "Beyond quantum jumps: blinking nanoscale light emitters" *Phys. Today* **2009**, 62, 34-39.
- (18) Demchenko, A. P., *Introduction to fluorescence sensing*; Springer: New York, 2009; 586 págs.
- (19) Roberti, M. J.; Morgan, M.; Menéndez, G.; Pietrasanta, L. I.; Jovin, T. M. y Jares-Erijman, E. A. "Quantum Dots As Ultrasensitive Nanoactuators and Sensors of Amyloid Aggregation in Live Cells" *Journal of the American Chemical Society* **2009**, 131, 8102-8107.
- (20) Giordano, L.; Jovin, T. M.; Irie, M. y Jares-Erijman, E. A. "Diheteroarylethenes as Thermally Stable Photoswitchable Acceptors in Photochromic Fluorescence Resonance Energy Transfer (pcFRET)" *Journal of the American Chemical Society* **2002**, 124, 7481-7489.
- (21) Marriott, G. y col. "Optical lock-in detection imaging microscopy for contrast-enhanced imaging in living cells" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2008**, 105, 17789-17794.
- (22) Pellegrino, T.; Manna, L.; Kudera, S.; Liedl, T.; Koktysh, D.; Rogach, A. L.; Keller, S.; Rädler, J.; Natile, G. y Parak, W. J. "Hydrophobic Nanocrystals Coated with an Amphiphilic Polymer Shell: A General Route to Water Soluble Nanocrystals" *Nano Letters* **2004**, 4, 703-707.
- (23) Fernández-Argüelles, M. T.; Yakovlev, A.; Sperling, R. A.; Luccardini, C.; Gaillard, S.; Sanz Medel, A.; Mallet, J.-M.; Brochon, J.-C.; Feltz, A.; Oheim, M. y Parak, W. J. "Synthesis and Characterization of Polymer-Coated Quantum Dots with Integrated Acceptor Dyes as FRET-Based Nanoprobes" *Nano Letters* **2007**, 7, 2613-2617.
- (24) Riedinger, A.; Zhang, F.; Dommershausen, F.; Röcker, C.; Brandholt, S.; Nienhaus, G. U.; Koert, U. y Parak, W. J. "Ratiometric Optical Sensing of Chloride Ions with Organic Fluorophore-Gold Nanoparticle Hybrids: A Systematic Study of Design Parameters and Surface Charge Effects" *Small* **2010**, 6, 2590-2597.
- (25) Díaz, S. A.; Menéndez, G. O.; Etchelon, M. H.; Giordano, L.; Jovin, T. M. y Jares-Erijman, E. A. "Photoswitchable Water-Soluble Quantum Dots: pcFRET Based on Amphiphilic Photochromic Polymer Coating" *ACS Nano* **2011**, 5, 2795-2805.

Parte I

Métodos

Capítulo 2

Métodos experimentales y teóricos

En este capítulo se presentarán brevemente las diferentes técnicas experimentales que hemos utilizado en este trabajo. Discutiremos con un grado mayor de detalle las técnicas y herramientas de cálculo más relevantes para esta tesis y en las que se trabajó activamente. En el caso de las técnicas de uso común o las que fueron llevadas a cabo mediante el trabajo en colaboración sólo enumeraremos las condiciones particulares de medida de los experimentos realizados y discutidos en esta tesis.

2.1 Voltamperometría cíclica

Los experimentos electroquímicos consisten en controlar ciertas variables de una celda electroquímica manteniéndolas constantes o bien variándolas en forma predeterminada mientras se observa cómo varían otras al aplicar cambios en las variables controladas. En la voltamperometría cíclica (*cyclic voltammetry*, CV) se utiliza una celda de tres electrodos: el electrodo de trabajo, el electrodo de referencia y el electrodo auxiliar (o contraelectrodo). Estos electrodos están conectados a los terminales de un potenciostato. Los potenciostatos utilizados para realizar experiencias de voltamperometría cíclica permiten aplicar una rampa de potencial (generalmente una onda triangular) entre el electrodo de trabajo y el electrodo de referencia. Es decir, controla el potencial del electrodo de trabajo referido al de referencia, utilizando una impedancia muy grande de manera tal que no circule corriente por el electrodo de referencia. La función que se aplica tiene la siguiente forma

$$E = E_i + vt \quad (2.1)$$

donde E es el potencial en el instante de tiempo t , E_i es el potencial inicial y v es la velocidad de barrido del potencial.

El barrido lineal se genera entre diferentes límites, los que se designan aquí como límite mayor de potencial, E_{may} , y límite menor, E_{men} . Los valores típicos de v van de 1×10^{-3} a 1 V s^{-1} . A medida que se modifica el potencial, se registra la corriente que circula entre el electrodo de trabajo y el auxiliar. Con los datos registrados por el potenciostato se crea un gráfico de densidad de corriente j ($j = i/A$) en función del potencial E denominado voltamperograma, donde A es

el área real del electrodo, calculada como se explica más adelante. En estos gráficos se observan diferentes procesos como los de transferencia de carga con especies electroactivas y los de carga de la denominada doble capa eléctrica. Un análisis detallado de esta técnica puede encontrarse en el texto de Bard y Faulkner [1].

En este trabajo se utilizó un potenciostato EG&G PAR Princeton Applied Research Modelo 362 con un adquisidor de datos WinPcChrom y un potenciostato de fabricación nacional marca TEQ, conectado directamente a una computadora mediante interfaz serial. El primero realiza todas las operaciones en forma analógica. Si bien por ello presenta la desventaja de necesitar un dispositivo de conversión analógica-digital para adquirir los voltamperogramas, tiene la ventaja de generar rampas de potencial continuas. En cambio, los potenciostatos cuyo funcionamiento se basa en generaciones de rampas por pasos finitos de potencial podrían generar rampas de calidad deficiente para experiencias en las que se realizan barridos a muy baja velocidad, tales como las experiencias de deposición a subpotenciales (*underpotential deposition*, UPD).

Al realizar experimentos electroquímicos es de especial importancia la limpieza del material utilizado, ya que cualquier sustancia extraña puede causar interferencias en las medidas debido a la alta sensibilidad de estas técnicas. Para asegurar la ausencia de contaminantes se lavó el material de vidrio con solución de permanganato de potasio en ebullición y luego con solución ácida de peróxido de hidrógeno o con solución "piraña"¹. Luego, los materiales fueron enjuagados varias veces con agua Milli-Q.

2.1.1 Cálculo del área real de un electrodo

El área aparente (geométrica) de un electrodo es una medida macroscópica que considera que la superficie del electrodo es totalmente lisa y que no existen huecos entre los átomos que la componen. Además, es posible calcular el área real de un electrodo, que tiene en cuenta todas las imperfecciones de la superficie. Es importante la medida del área real para poder luego calcular densidades de corriente (j).

El método de Michri et ál. [2] -que es ampliamente utilizado para el Au- consiste en realizar un voltamperograma en medio ácido eligiendo el E_{may} correspondiente al mínimo de Burshtein para formar así una monocapa de AuO. Luego, se analiza la carga involucrada en la reducción del AuO (proceso de 2 electrones). Considerando que el parámetro de red del Au masivo es 0,4080 nm [3], una superficie de Au(111) contiene $1,39 \times 10^{15}$ átomos cm^{-2} . Por lo tanto, la densidad de carga requerida para reducir una monocapa de AuO (q_{mono}) es $444 \mu\text{C cm}^{-2}$. El área real A se calcula como $A = q_{\text{exp}}/q_{\text{mono}}$, donde q_{exp} es la densidad de carga medida experimentalmente.

2.2 Espectroscopia de fotoelectrones generados por rayos X (XPS)

La espectroscopía de fotoelectrones generados por rayos X (*X-ray photoelectron spectroscopy*, XPS), llamada en sus inicios espectroscopía electrónica para análisis químico (*electron spectroscopy for chemical analysis*, ESCA), se basa en el efecto fotoeléctrico, descubierto en 1887 por H. R. Hertz y

¹Mezcla de H_2SO_4 y H_2O_2 . En la página 34 se describen los detalles de su preparación.

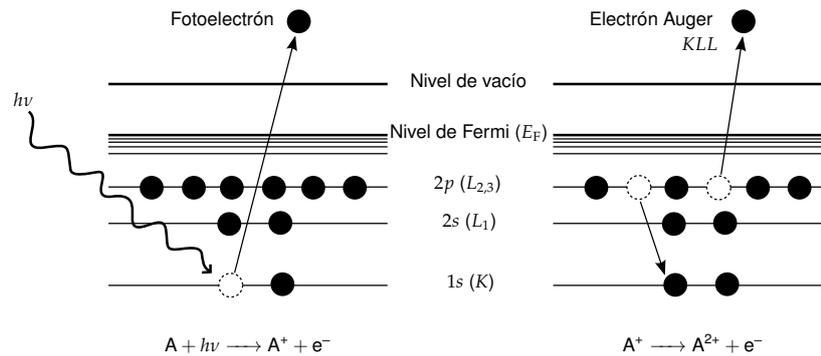


Figura 2.1 Esquema del proceso de fotoemisión y emisión Auger. Al generar un fotoelectrón se genera un hueco que puede ser llenado por un electrón de un nivel superior, lo que provoca la emisión de un segundo electrón llamado Auger.

cuyas bases teóricas fueron explicadas por A. Einstein en 1905. Sin embargo, recién en la década de 1960 se desarrolló su uso analítico, gracias a los trabajos pioneros del grupo de K. M. Siegbahn, quién obtuvo por ello el Premio Nobel de Física en 1981.

La capacidad de detectar diferencias en los estados químicos junto con la sensibilidad superficial ha hecho que esta técnica espectroscópica sea la más aplicada para el análisis general de superficies. Puede detectar todos los elementos, excepto el hidrógeno y el helio y las muestras pueden ser gaseosas, líquidas o sólidas. La profundidad de análisis de los materiales sólidos varía desde las 2 últimas capas atómicas hasta aproximadamente 10 capas. Es aplicable a materiales orgánicos, biológicos y poliméricos como así también metales, semiconductores y cerámicos. Es una técnica no destructiva aunque hay casos en los que el haz de rayos X puede dañar la muestra, sobre todo si ésta es orgánica como los tioles.

2.2.1 Principios básicos

Un fotón de una longitud de onda lo suficientemente baja (radiación X o γ) interacciona con un electrón de un nivel electrónico interno (*core*) o de la banda de valencia de un material y produce un electrón libre eyectado, llamado fotoelectrón (Fig. 2.1). La energía cinética E_K del fotoelectrón depende de la energía del fotón incidente $h\nu$ a través de la ecuación de Einstein para el efecto fotoeléctrico:

$$h\nu = E_B^V(k) + E_K \quad (2.2)$$

donde $E_B^V(k)$ es la energía de enlace (*binding energy*) o potencial de ionización del electrón en el nivel k -ésimo, referido al nivel del vacío [4]. Debido a que $h\nu$ se conoce, ya que es la energía de la fuente de rayos X, la medida de E_K determina $E_B^V(k)$. El hueco generado por la eyección del fotoelectrón puede ser llenado por un electrón de un nivel superior, lo que provoca la liberación de un segundo electrón, proceso que se conoce como emisión Auger (Fig. 2.1). Estos electrones también son detectados en el espectro de XPS y pueden ser identificados mediante la variación de la energía de los fotones incidentes. Si la energía cinética del pico no cambia al variar la energía incidente, se trata de un electrón Auger.

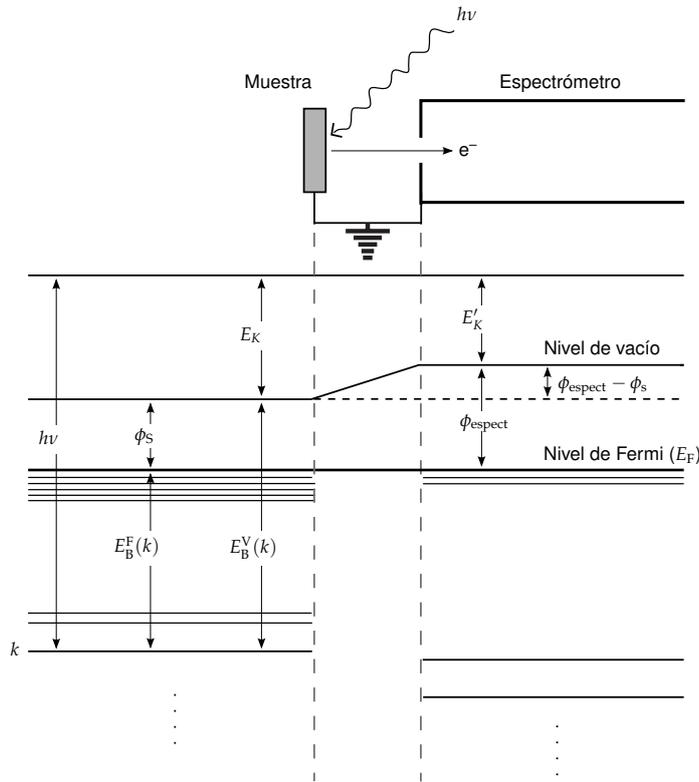


Figura 2.2 Diagrama de niveles de energía de una muestra metálica en equilibrio eléctrico con un espectrómetro. Los niveles electrónicos en la cercanías del nivel de Fermi (E_F) representan la porción llena de la banda de valencia en la muestra y el espectrómetro. Los niveles más profundos son los niveles internos. Un diagrama similar es aplicable a muestras semiconductoras o aislantes, con la única diferencia que E_F se ubica entre la porción llena de la banda de valencia y la banda de conducción vacía. Adaptado de ref. [4].

En realidad, la situación es algo más compleja. Si se conecta una muestra sólida al espectrómetro, como se muestra en la Fig. 2.2, los potenciales químicos de sus electrones –o sus niveles de Fermi (E_F)– se igualan. La función trabajo ϕ_s de un sólido se define como la energía de separación entre el nivel de vacío y el nivel de Fermi. En un caso como el de la Fig. 2.2, los respectivos niveles de vacío pueden no ser iguales. Por lo tanto, un fotoelectrón que sale de la muestra al llegar al espectrómetro sufre los efectos de un potencial de aceleración o retardo que es igual a $\phi_s - \phi_{\text{espect}}$, donde ϕ_s es la función trabajo de la muestra y ϕ_{espect} la del espectrómetro. Entonces, la energía cinética del fotoelectrón que se medirá será diferente a su energía cinética en la superficie de la muestra, disparidad que debe ser tomada en cuenta al calcular la energía de enlace. Si llamamos E_K a la energía cinética del fotoelectrón en la superficie de la muestra (como en la Ec. 2.2) y E'_K a la energía cinética del fotoelectrón dentro del espectrómetro, obtenemos

$$E_K = E'_K + \phi_{\text{espect}} - \phi_s \quad (2.3)$$

Reemplazando esta ecuación en la anterior, es posible medir las energías de enlace en un sólido

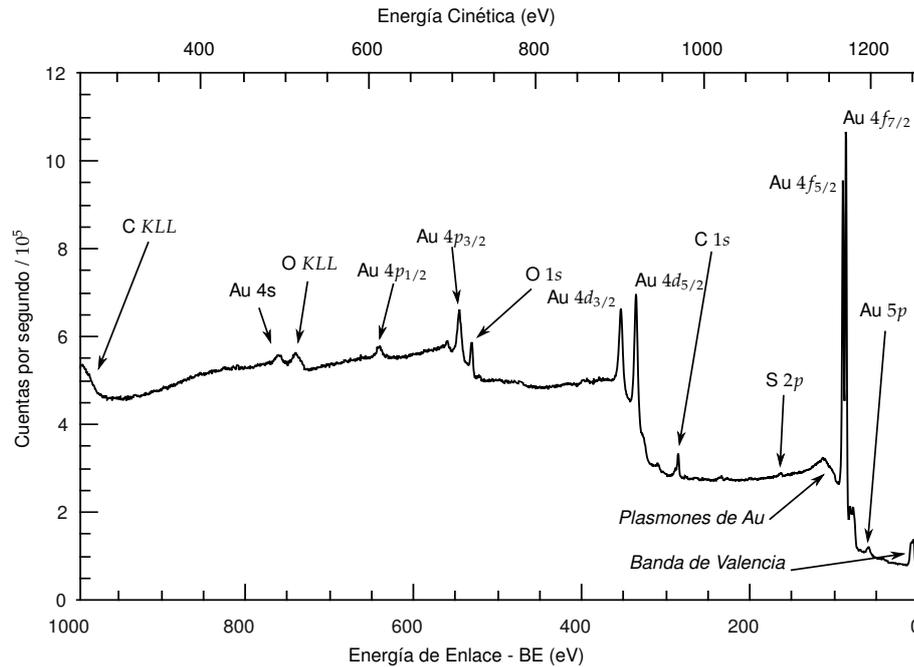


Figura 2.3 Espectro XPS de una SAM de dodecanotiol sobre Au tomado con una fuente de $MgK\alpha$ ($h\nu = 1253,6$ eV). Se nombran los principales picos que aparecen en el espectro.

metálico respecto a los niveles de Fermi del espectrómetro y de la muestra, que son equivalentes:

$$h\nu = E_B^F(k) + E'_K + \phi_{\text{espect}} \quad (2.4)$$

donde el superíndice F indica que la energía de enlace se mide referida al nivel de Fermi, $E_B^V(k) = E_B^F(k) + \phi_s$. Las energías de enlace informadas en este trabajo corresponden a E_B^F .

En la Fig. 2.3 se presenta un espectro XPS de una muestra de AuNPs protegidas con un tiol depositadas sobre un sustrato de C. El número de picos en el espectro corresponde al número de niveles de energía ocupados en los átomos cuyas energías de enlace son menores que la energía de los rayos X incidentes, $h\nu$, además de los picos Auger y de plasmones. Las intensidades de los picos dependen del número de átomos presentes y del valor de σ para el nivel estudiado, además de otros parámetros que se discutirán más adelante. Cada pico presenta un fondo aproximadamente constante en el lado de baja energía de enlace que se debe a la dispersión inelástica. Es decir, los fotoelectrones que producen los picos agudos sin pérdida notable de energía también pueden ser dispersados de forma inelástica en el proceso de escape del material, produciéndose dicho fondo [4]. Los espectros que abarcan todo el rango posible de energías permitidas por la fuente, permiten explorar químicamente la superficie de la muestra. Estos espectros poseen menos resolución pero no involucran mucho tiempo de análisis.

La determinación de $E_B^F(k)$ permite no sólo identificar los elementos presentes en la muestra sino también analizar el estado químico de ellos debido a que se genera un corrimiento en las energías de enlace de acuerdo al entorno, lo que se denomina corrimiento químico (*chemical shift*, CS). Este fenómeno fue indicado por primera vez por Siegbahn [5] y permite distinguir entre diferentes estados de oxidación de un elemento. Por ejemplo, en el litio metálico (Li^0) los

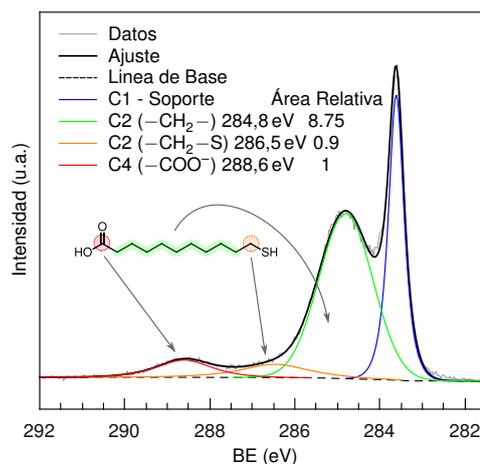


Figura 2.4 Espectro XPS de la región C 1s de una muestra de AuNPs recubiertas de ác. 11-mercaptoundecanoico. ($h\nu = 523$ eV)

electrones 2s se encuentran formando parte del sistema metálico. En el óxido de litio (Li_2O), sin embargo, los átomos de litio donan sus electrones 2s al oxígeno, quien obtiene una capa llena $2p^6$. Por esta razón, los electrones 1s del litio sufren los efectos de una carga coulombica mayor en el óxido de litio que en el metal. Por lo tanto, la energía de enlace del nivel 1s del Li es mayor en el Li_2O que en el Li metálico y se observa un corrimiento químico entre los dos compuestos [6]. Si bien esta aproximación es útil en muchos casos para interpretar los corrimientos químicos, en ciertas situaciones el análisis es menos intuitivo y más complejo como, por ejemplo, en el caso de Ag metálica y sus óxidos, en particular de las señales más intensas: Ag 3d. [7].

Más aún, es posible encontrar diferencias entre las energías de enlace correspondientes a los átomos de carbono de una cadena hidrocarbonada como la del ác. 11-mercaptoundecanoico (MUA). La figura 2.4 muestra el espectro XPS de la región C 1s de una muestra de AuNP recubiertas con MUA depositadas sobre un sustrato de carbono, donde se distingue la presencia de cuatro especies de carbono. La componente C1 corresponde al sustrato de carbono utilizado para soportar las AuNPs, y en orden creciente de BEs las componentes C2, C3 y C4 han sido asignadas a los átomos de carbono con diferentes estados de oxidación. C2 es la componente asignada a la señal proveniente de los grupos metileno de la cadena hidrocarbonada, mientras que C3 corresponde al grupo metileno unido directamente al átomo de S que presenta una mayor densidad de carga positiva. Por último, C4 ha sido asignado a la señal proveniente de los grupos carboxilato donde el carbono presenta un mayor estado de oxidación. Es importante notar que la relación de áreas de estas tres componente se corresponde con la relación estequiométrica de la molécula.

Es importante notar que las intensidades de los picos de los diferentes niveles energéticos no son iguales debido a que la probabilidad de fotoeyección desde cada nivel –medida por la sección eficaz de fotoionización, σ – es diferente. Esta probabilidad también varía para un nivel dado en diferentes átomos y depende de la energía de los rayos X utilizados (figura 2.5). Los valores de σ para los diferentes elementos y energías de fotones incidentes pueden encontrarse tabulados en las ref. [8-10].

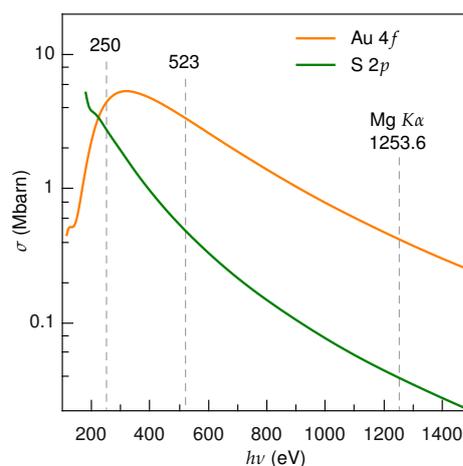


Figura 2.5 Coeficiente de fotoemisión o sección eficaz de fotoionización respecto de la energía del haz incidente de rayos X, para el nivel 4f del Au y 2p del S. Se indica con líneas de trazo vertical las energías utilizadas.

2.2.2 Disposición experimental

Los equipos de XPS constan de diferentes componentes. Se utiliza una cámara de ultra alto vacío (*ultra-high vacuum*, UHV) con presiones menores de 10^{-9} mbar para disminuir la cantidad de contaminantes superficiales y asegurar a los electrones eyectados un camino libre medio lo suficientemente grande como para alcanzar el analizador. La cámara está construida de acero inoxidable (no magnético) y posee ventanas de vidrio para poder observar su interior. A ella se acoplan diferentes elementos necesarios para el análisis superficial como la fuente de rayos X, el analizador de electrones, el cañón de iones, etc. En la Fig. 2.6 se muestran las cámaras utilizadas en este trabajo.

La fuente de rayos X puede consistir en un tubo de rayos X o radiación de luz sincrotrón. En el caso de un tubo estándar, la radiación proviene del bombardeo de Mg o Al con un cañón de electrones. Los huecos formados en las capas electrónicas internas de estos elementos son luego llenados por transiciones radiativas desde niveles más altos, lo que produce la emisión de rayos X. Este espectro de rayos X generados está dominado por un doblete intenso, no resuelto, $K\alpha_1 - K\alpha_2$. Adicionalmente, se producen líneas de rayos X menos intensas, denominadas satélites. Los satélites más intensos son los correspondientes a los picos $K\alpha_3$ y $K\alpha_4$. Para Mg –la fuente utilizada en todos los espectros tomados en INIFTA–, $K\alpha_3$ y $K\alpha_4$ se ubican a 8,4 eV y 10,2 eV por encima del pico de $K\alpha_{1,2}$, respectivamente. Las intensidades de los picos $K\alpha_3$ y $K\alpha_4$ son 8,0% y 4,1% del valor del pico $K\alpha_{1,2}$, respectivamente [11]. Estos satélites producen fotoelectrones con una energía cinética que excede a la de los producidos por el pico principal en los mismos valores señalados. De esta manera, en el espectro que se informa en función de la energía de enlace (calculada considerando $h\nu$ correspondiente al pico $K\alpha_{1,2}$) aparecen dos picos a menores energías de enlace que el pico principal y cuyas intensidades siguen los porcentajes señalados. La energía de los rayos X emitidos en el caso del Mg $K\alpha$ es de 1253,6 eV.²

²Por simplicidad, nos referiremos al pico $K\alpha_{1,2}$ emitido por Mg como Mg $K\alpha$

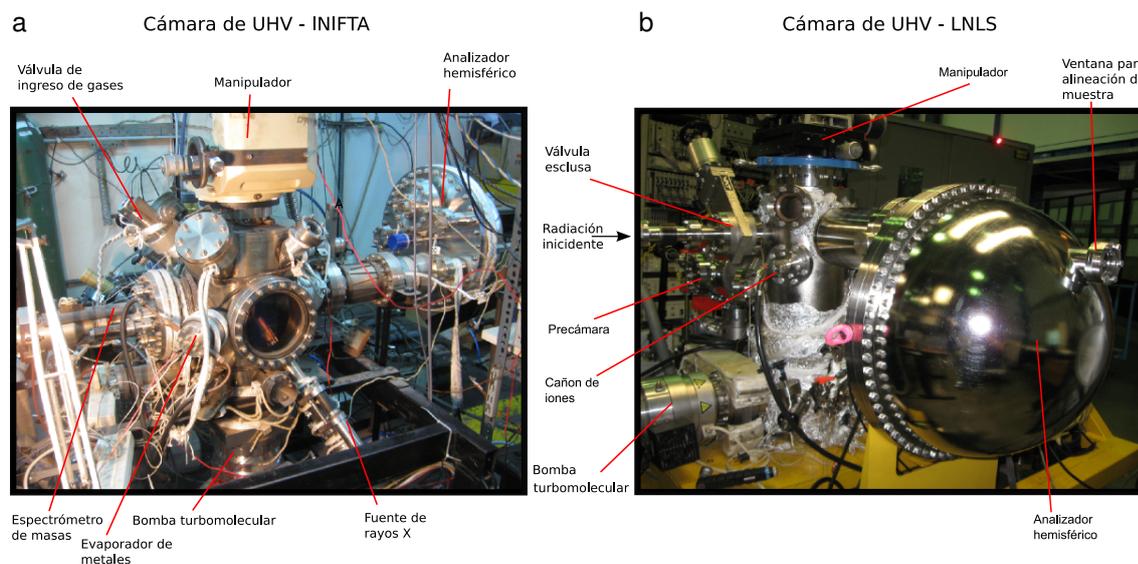


Figura 2.6 Fotografías de las cámaras de ultra alto vacío (UHV) utilizadas en los experimentos de XPS convencional y con radiación de luz sincrotrón.

Cuando se utiliza radiación de luz sincrotrón, los rayos X son generados por aceleración de electrones relativísticos dentro de un campo magnético. Existen básicamente 3 dispositivos para generar radiación en un sincrotrón: *bending magnets*, *undulators* y *wigglers*. [12] En las medidas realizadas en este trabajo se utilizó radiación generada por *undulators*, que es un arreglo periódico de dipolos magnéticos alternando su orientación a lo largo de la trayectoria de los electrones. Estos provocan una trayectoria oscilante (sinusoidal) en los electrones generándose radiación electromagnética. La radiación producida en un *undulator* es muy intensa y se concentra en estrechas bandas de energía en el espectro. También es colimada en el plano de oscilación de los electrones [13]. Lo interesante para las medidas de XPS –además del intenso flujo– es la posibilidad de variar la energía de los fotones incidentes. De esta manera es posible estudiar la composición de la muestra en función de la profundidad. Disminuyendo la energía de los rayos X se puede obtener información de las primeras capas atómicas sin interferencia de las capas más profundas, ya que se disminuye la energía cinética de los fotoelectrones generados y por lo tanto disminuye el camino libre medio de éstos en el material. Esto es, se aumenta la contribución a la señal debida a los átomos superficiales, en relación con la correspondiente a los átomos del resto del material.

La medida de la energía de los electrones eyectados se realiza mediante el análisis de su deflexión en campos eléctricos. El sistema de detección de los electrones está basado en la ganancia producida por multiplicadores de electrones, llamados *channeltrons*.

Las medidas de XPS realizadas en esta Tesis se llevaron a cabo en el INIFTA y en el Laboratório Nacional do Luz Síncrotron (LNLS), Campinas, Brasil. En el laboratorio se utilizó una fuente de Mg $K\alpha$ (XR50, Specs GmbH), con un flujo de 5×10^{12} fotones $s^{-1} cm^{-2}$ operando a 300 W y un área de análisis de 1 a $2 cm^2$; empleando un analizador hemisférico (PHOIBOS 100, Specs GmbH). La presión dentro de la cámara de UHV fue menor a 1×10^{-9} mbar. El ángulo entre la

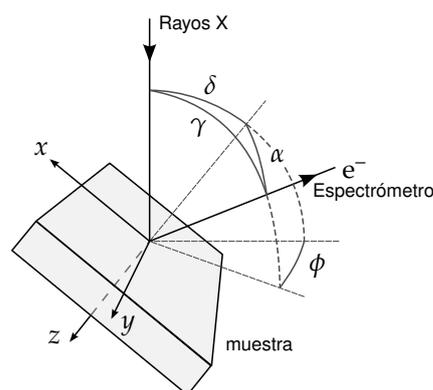


Figura 2.7 Esquema de la configuración geométrica de una análisis de XPS. Adaptado de la ref. [14]

fuelle de rayos X y el eje del analizador está fijado en $\gamma = 54^{\circ}44'$, denominado ángulo mágico (fig. 2.7). Los valores de sección eficaz de fotoionización están tabulados para esta geometría. Se realizó una calibración de la escala de energía de dos puntos utilizando Au evaporado (E_B de Au $4f_{7/2} = 84,00$ eV) y Cu (E_B de Cu $2p_{3/2} = 932,67$ eV).

En el caso de luz sincrotrón, las medidas se realizaron en la línea PGM del LNLS³, equipada con un *undulator* y un monocromador plano de rejillas de espaciado variable de las líneas, que permite variar la energía de los fotones incidentes de 192 a 1500 eV. En nuestros experimentos se empleó radiación de 250 eV y 523 eV con un flujo de 1×10^{14} y 2×10^{14} fotones $s^{-1} cm^{-2}$ respectivamente. La estación de trabajo consta de una cámara de UHV (presión de base: 1×10^{-8} mbar) donde se ubica un analizador hemisférico (PHOIBOS 150, Specs GmbH). El ángulo entre el haz de rayos X incidente y el eje del analizador es $\gamma = 90^{\circ}$ (fig. 2.7). La muestra se introduce a través de una precámara y se traslada a la cámara principal utilizando una barra de transferencia. La escala de energía se calibró ajustando nivel de Fermi, $E_F = 0$ para cada espectro.

Existen diferentes características y por lo tanto diferentes razones por las cuales es importante realizar medidas de XPS con una fuente de laboratorio o con radiación sincrotrón. En el caso de un equipo de laboratorio con fuente convencional de Mg o Al, sólo se dispone de dos energía del haz incidente (Mg $K\alpha$ 1253 eV y Al K 1486,7 eV). Estos ánodos emiten radiación X con un espectro característicos de cada elemento. Este haz incidente policromático disminuye la resolución espectral de los fotoelectrones. Nótese que la fuente utilizada en el INIFTA no tiene monocromador. Contrariamente, con radiación sincrotrón se mejora notablemente la monocromaticidad del haz incidente al mismo tiempo que es posible modificar la energía del mismo en un amplio rango y con un gran brillo. Sin embargo, hemos experimentado muchos problemas de estabilidad en la intensidad y la energía del haz de rayos X en algunas de las líneas del LNLS. Las medidas realizadas en la línea PGM han sido satisfactorias. Existen extensas bases de datos [11, 15] de compuestos y materiales.⁴ Asimismo, en el grupo de *Nanoscopias y Físicoquímica de Superficies* de INIFTA se cuenta con una amplia base de datos interna confeccionada durante varios años es-

³<http://lnls.cnpem.br/uvsoftx/planar-grating-monochromator-pgm/pgm/>

⁴Los factores de sensibilidad (RSF) listados en el software *CasaXPS* están tabulados usando fuentes convencionales de laboratorio.

tudiando sistemas autoensamblados de tioles sobre superficies metálicas (planas y en NPs). Es importante además considerar la presión basal a la que se puede trabajar en las diferentes cámaras de UHV. En ambos casos el vacío se logra mediante una bomba turbomolecular ubicada en la parte inferior de la cámara, que se encuentra conectada a un sistema de vacío previo evacuado por bombas mecánicas. La cámara de UHV de INIFTA opera a presión de 10^{-10} mbar, mientras que la cámara utilizada en el LNLS opera a una presión de 10^{-8} a 10^{-9} mbar. Esto en parte se debe a las características geométricas y también dado que la cámara del LNLS es multipropósito, se coloca en las diferentes líneas según lo requieran los experimentos, lo que aumenta las vías de contaminación. A esta presión de trabajo más alta se deposita rápidamente contaminantes sobre la muestra atenuando la señal, lo que genera una fuente de error adicional en la cuantificación de los componentes de la muestra.

2.2.3 Análisis de los resultados

Para la cuantificación de los espectros de XPS es preciso conocer, en principio, dos cantidades: la intensidad de los picos utilizados en el análisis –obtenida a partir de la integración de los picos luego de sustraer una línea de base lineal o tipo Shirley– y su sección eficaz de fotoionización, σ , comentada anteriormente. De esta forma se puede obtener la relación atómica entre los diferentes elementos que componen la muestra. Sin embargo, es necesario tener en cuenta también la atenuación que sufren las señales debido a la dispersión elástica e inelástica de los fotoelectrones.

Al generarse un fotoelectrón en un sólido, este debe atravesar las capas atómicas del material hasta llegar a la superficie. La intensidad I de la señal de fotoelectrones luego de atravesar una distancia x de la muestra, está dada por la ley de Lambert–Beer [16]:

$$I = I_0 \exp\left(-\frac{x}{\lambda \cos \alpha}\right) \quad (2.5)$$

donde I_0 es la intensidad de la señal sin atenuar, α es el ángulo de emisión –medido entre la dirección del electrón al salir del sólido y la normal a la superficie– y λ es el camino libre medio inelástico de los electrones, también llamado IMFP por las siglas del inglés *inelastic mean free path*.

Si consideramos un sólido semi infinito y lo dividimos en capas de espesor d (Fig. 2.8), la intensidad generada por este sólido –denominada I^∞ – estará dada por la suma de las intensidades

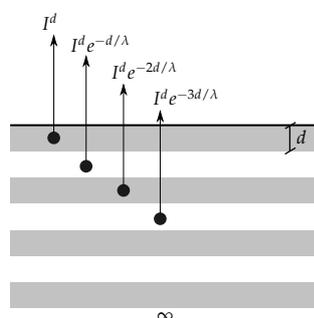


Figura 2.8 Esquema del proceso de atenuación de la intensidad de los fotoelectrones eyectados. Las intensidades corresponden a la contribución de cada capa de espesor d a la intensidad total del sólido semi infinito.

de cada capa de espesor d . La primera capa no sufre atenuación, y llamaremos I_d a la intensidad de los fotoelectrones generados en ella. Las siguientes capas sufrirán la atenuación de las capas superiores, por lo que podemos escribir la expresión para I^∞ como:⁵

$$I^\infty = I^d + I^d e^{-d/\lambda} + I^d e^{-2d/\lambda} + I^d e^{-3d/\lambda} + \dots \quad (2.6)$$

$$= I^d \left(1 + e^{-d/\lambda} + e^{-2d/\lambda} + e^{-3d/\lambda} + \dots \right) \quad (2.7)$$

$$= I^d \left(1 + e^{-d/\lambda} + (e^{-d/\lambda})^2 + (e^{-d/\lambda})^3 + \dots \right) \quad (2.8)$$

$$= I^d \sum_{i=0}^{\infty} (e^{-d/\lambda})^i \quad (2.9)$$

$$= I^d \left(\frac{1}{1 - e^{-d/\lambda}} \right) \quad (2.10)$$

donde se aplicó el desarrollo en serie $\sum_{i=0}^{\infty} x^i = \frac{1}{1-x}$ para $|x| < 1$, con $x = e^{-d/\lambda}$. Por lo tanto, la intensidad de los fotoelectrones producidos por una capa de espesor d estará dada por la siguiente expresión:

$$I^d = I^\infty \left[1 - \exp\left(-\frac{d}{\lambda}\right) \right] \quad (2.11)$$

Debido a que además las dispersiones inelásticas existen dispersiones elásticas que afectan a la señal medida, es apropiado utilizar una longitud de atenuación efectiva (*electron effective attenuation length*, EAL) en lugar del IMFP. Existen diversas definiciones de EALs y distintas formas de ser calculados que pueden encontrarse en el artículo de Jablonski y Powell [17] y en las referencias que allí se presentan. En este trabajo hemos utilizado la ecuación de Cumpson y Seah para calcular el EAL de electrones con una energía cinética E_K en un sólido de un elemento con número atómico Z [18, 19]:

$$\text{EAL [nm]} = 0,316a^{3/2} \left\{ \frac{E_K}{Z^{0,45}[\ln(E_K/27) + 3]} + 4 \right\} \quad (2.12)$$

donde a es el parámetro de red promedio (en nm) calculado como

$$a = 10^8 \left(\frac{A_w}{\rho N_{Av}} \right)^{1/3} \quad (2.13)$$

donde A_w es la masa atómica (en g), ρ es la densidad (en kg m^{-3}) y $N_{Av} = 6,022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ es el número de Avogadro. Para calcular el EAL en unidades de número de capas atómicas (MLs) sólo hay que dividir el valor calculado con la Ec. 2.12 por el valor de a . Los EALs calculados con esta ecuación son útiles para estimar el cubrimiento de un elemento sobre un metal utilizando ángulos de emisión α ente 0 a 63°. En adelante, utilizaremos el símbolo λ para referirnos a EAL en lugar de IMFP.

Con el fin de encontrar relaciones universales para estimar los EAL en diferentes materiales, Seah [20, 21] desarrolló varias expresiones generalizadas tanto para elementos sólidos y materiales orgánicos e inorgánicos. Para estimar los EAL de materiales orgánicos se han utilizado las

⁵Consideramos aquí un ángulo de emisión $\alpha = 0^\circ$ para simplificar las ecuaciones.

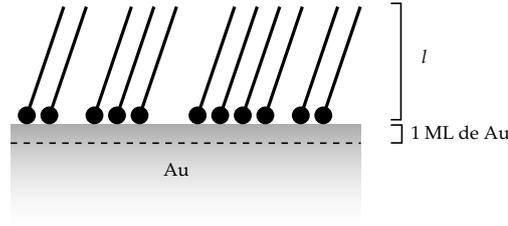


Figura 2.9 Representación de una SAM de tiol sobre Au. La línea trazo representa la monocapa de átomos de Au en la interfase RS-Au.

expresiones:

$$EAL_{\text{Mat.Org.}}[\text{nm}] = \frac{31}{(E_K)^2} + 0,087\sqrt{E_K}; \quad E_K < 100\text{eV} \quad (2.14)$$

$$EAL_{\text{Mat.Org.}}[\text{nm}] = 0,00837 \times (E_K)^{0,842}; \quad E_K > 100\text{eV} \quad (2.15)$$

donde E_K es la energía cinética de fotoelectrón que atraviesa el material orgánico.

La intensidad I de un pico de XPS para un sólido homogéneo i está dada por [14]:

$$I_i = JK\sigma_i L_i(\gamma) \times \int_{z=0}^{\infty} N_i \exp[-z/\lambda \cos \alpha] dz \quad (2.16)$$

donde J es el flujo de rayos X incidente de energía $h\nu$, K describe factores instrumentales, σ es la sección eficaz de fotoionización del elemento para sus electrones eyectados desde la subcapa nl que depende de la energía incidente, L es el factor de asimetría angular del elemento que depende del ángulo γ entre la fuente de rayos X y el eje del espectrómetro (Fig. 2.7), N_i es el número de átomos del elemento i y α es el ángulo entre la normal a la superficie y el espectrómetro⁶. El factor de asimetría angular L que describe la distribución de la densidad de fotoelectrones emitidos por rayos X no polarizados desde átomos o moléculas esta dado por:⁷

$$L(\gamma) = 1 + \frac{1}{2}\beta \left(\frac{3}{2} \sin^2 \gamma - 1 \right) \quad (2.17)$$

Aquí β es una constante de asimetría para una dada subcapa nl de un átomo para un fotón de rayos X de energía $h\nu$. Los valores de σ y β pueden encontrarse tabulados en las ref. [8-10].

Para el caso de monocapas autoensambladas de tioles sobre metales (y también sobre nanopartículas), se puede estimar el cubrimiento mediante medidas de XPS. Para esto, debemos considerar la situación donde una monocapa del tiol RS está depositado sobre un sólido homogéneo (p. ej. Au). Entonces el cubrimiento de RS sobre Au viene dado por la relación de los N_S átomos de S sobre $N_{Au}^{1\text{ML}}$ átomos de Au en la interface RS-Au.

$$\theta_S = \frac{N_S}{N_{Au}^{1\text{ML}}} \quad (2.18)$$

Se puede considerar que la contribución de una monocapa de Au está dada por

$$I_{Au}^{1\text{ML}} = JK\sigma_{Au} L_{Au} A N_{Au}^{1\text{ML}} \quad (2.19)$$

⁶en todas la mediciones se empleó $\alpha = 0$, por lo que $\cos \alpha = 1$

⁷La disposición experimental en la cámara de UHV de INIFTA tiene un ángulo $\gamma = 54,7^\circ$, llamado *ángulo mágico*, para el cual $\frac{3}{2} \sin^2 \gamma - 1 = 0$ y entonces $L = 1$. Para las medidas realizadas en el LNLS, $\gamma = 90^\circ$, el factor L debe ser considerado.

siendo A el área de la interfase y N_{Au} es la densidad superficial de átomos de Au. De la ecuación 2.11 se puede obtener la contribución de una monocapa a la señal total de un sólido, la cual se relaciona con la ecuación anterior como:

$$I_{Au}^{1ML} = I_{Au}^{\infty} \left[1 - \exp\left(-\frac{1}{\lambda_{Au}}\right) \right] = JK\sigma_{Au}L_{Au}AN_{Au}^{1ML} \quad (2.20)$$

La intensidad de un pico XPS de Au en una SAM, está atenuada por la capa orgánica depositada de espesor l . De esta manera se relaciona con I_{Au}^{∞} como

$$I_{Au}^{medida} = I_{Au}^{\infty} \exp\left(-\frac{l}{\lambda_{Org}(E_{Au})}\right) \quad (2.21)$$

De manera similar, se tiene una relación para la señal XPS del S en la SAM,

$$I_S = JK\sigma_S L_S AN_S \quad (2.22)$$

y como la señal de S también está atenuada por la capa orgánica, se tiene

$$I_S^{medida} = I_S \exp\left(-\frac{l}{\lambda_{Org}(E_S)}\right) \quad (2.23)$$

De estas ecuaciones se pueden despejar N_S y N_{Au} para obtener el cubrimiento del tiol sobre el Au.

$$\theta_S = \frac{N_S}{N_{Au}} = \frac{I_S^{medida} \sigma_{Au} L_{Au} \exp(-l/\lambda_{Org}(E_{Au}))}{I_{Au}^{medida} \sigma_S L_S \exp(-l/\lambda_{Org}(E_S)) [1 - \exp(-1/\lambda_{Au})]} \quad (2.24)$$

En los casos en los que los picos no se resuelven, generalmente por tratarse del mismo elemento en diferentes estados de oxidación, es posible realizar una descomposición de la señal en diferentes componentes, proceso denominado deconvolución. En este trabajo hemos utilizado el programa XPSPEAK 4.1 para realizar este análisis.

La deconvolución se realiza en los espectros tomados con alta resolución y es necesaria la medición de estándares con el mismo equipo para poder elegir los parámetros a introducir en las funciones utilizadas. Estas funciones consisten en un producto de funciones pseudo-voight con diferente proporción de gaussiana (G) y lorentziana (L). Primeramente se traza una línea de base en el espectro y luego se agregan los picos correspondientes. Los parámetros que se ajustan son: posición, intensidad, ancho a media altura y porcentaje gaussiana y lorentziana. Con este programa es posible elegir el tipo de pico que se está analizando (s , p , d , f) con lo cual las intensidades relativas de los dobletes son fijadas. Solamente se debe ingresar un valor para la separación entre los picos de los dobletes denominada separación $sp\acute{in}$ órbita (*spin-orbit splitting*, SOS).

Adicionalmente, la escala de energía de cada espectro se corrigió ajustando la posición del pico C 1s del carbono adventicio (284,8 eV) o ajustando el borde de Fermi (0 eV) en la banda de valencia, como se muestra en la figura 2.10a. De esta manera, las energía de enlace de los electrones están referidas al nivel de Fermi (E_B^F) como se muestra en la 2.4. En el caso del S 2p, la SOS entre los picos de S 2p_{3/2} y S 2p_{1/2}, se fijó en 1,18 eV, el porcentaje gaussiana y lorentziana se fijó en 50% y el ancho en 1,1 eV. En el Au 4f, la separación entre los picos de Au 4f_{5/2} y Au 4f_{7/2} fue fijada

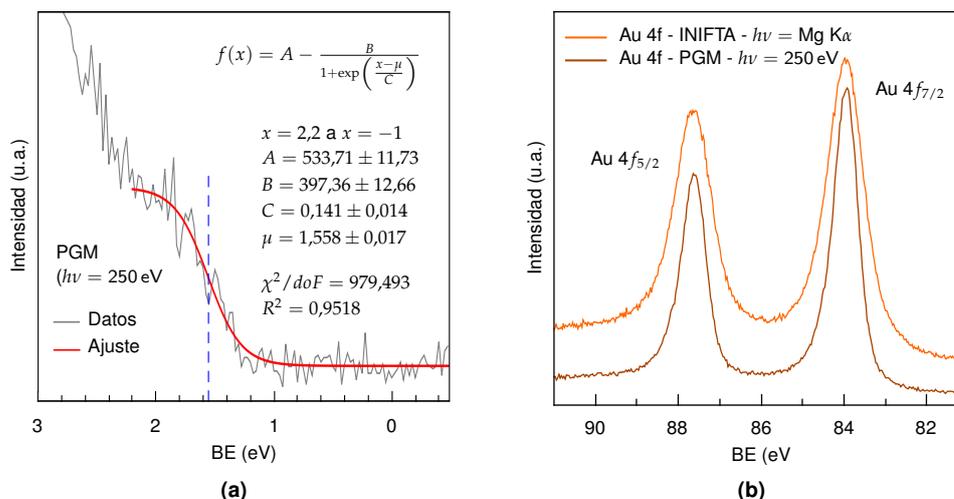


Figura 2.10 (a) Comparación de espectros XPS de alta resolución para la región Au 4f de una muestra de AuNPs@SC₁₂ de 4 nm tomados en INIFTA y en la línea PGM. (b) Ajuste del nivel de Fermi (origen de la escala de energía) en la región de banda de valencia, tomado en la línea PGM ($h\nu = 250$ eV)

en 3,65 eV y el ancho en 1 eV. Estos valores de ancho de pico son experimentales y propios del arreglo experimental de INIFTA. En las medidas realizadas en el LNLS se modificaron los valores de ancho de pico y proporción de gaussiana y lorentziana. La figura 2.10b presenta dos espectros de una misma muestra de AuNPs protegidas por dodecanotiol adquiridos en INIFTA y en la línea PGM. Puede apreciarse en la figura la diferencia en el ancho de pico a media altura, que es un buen indicativa de la mayor resolución alcanzada en el LNLS.

Las líneas de base empleadas para descontar los electrones con pérdida inelástica de energía (como se comentó al final de la sección 2.2.1) fueron generalmente del tipo *Shirley* [22], o lineal en algunos espectros de S que presentaban baja intensidad respecto del ruido.

2.3 Distribución de tamaños de las nanopartículas

Para la determinación del tamaño de las NPs se empleó microscopía de transmisión de electrones (*Transmission Electron Microscopy*, TEM) y dispersión de luz dinámica (*Dynamic Light Scattering*, DLS). Las distribuciones de tamaños de las NPs metálicas fueron realizadas mediante el análisis de las imágenes de TEM con los algoritmos disponibles en el programa de análisis de imágenes ImageJ [23]. Las imágenes TEM fueron tomadas por la Dra. Eugenia Zelaya, en el Centro Atómico Bariloche. Se ajustó el umbral de intensidad en cada imagen para que el algoritmo detecte las partículas y luego se consideraron sólo las partículas con diámetros entre 0 y 10 nm y una razón menor a 1,2 entre el diámetro mayor y el menor, para evitar contar 2 partículas juntas. En aquellos casos donde no se lograba un buen contraste en la imagen, el diámetro de las partículas fue determinado manualmente empleando el programa ImageJ. Al histograma obtenido se ajustó una

función de distribución log-normal (de 2 parámetros), de acuerdo a la ref. [24]. La ecuación utilizada fue la siguiente:

$$f(d) = \frac{1}{(2\pi)^{1/2}\sigma d} \exp \left\{ -\frac{[\ln(d) - \mu]^2}{2\sigma^2} \right\} \quad (2.25)$$

donde μ y σ son la media y la desviación estándar del logaritmo del diámetro d , respectivamente. La media aritmética del diámetro, $\langle D \rangle$, y su desviación estándar, $s.d.$, fueron calculadas como

$$\langle D \rangle = e^{\mu + \sigma^2/2} \quad s.d. = (e^{\sigma^2} - 1)^{1/2} e^{\mu + \sigma^2/2} \quad (2.26)$$

Para determinar el tamaño de los ensamblados de NPs y polímeros anfifílicos en solución acuosa se empleó DLS con un equipo Nano-ZS Zetasizer nanoseries (Malvern Instruments). Las soluciones fueron filtradas con filtros de tamaño de poro de 0,22 μm y la diluciones correspondientes para lograr una concentración óptima se hicieron con agua Milli-Q o con el buffer en que están disueltos los ensamblados. Este equipo utiliza un software para la adquisición de datos, que no permite exportar fácilmente los datos. Los gráficos reportados fueron digitalizados con el software *Engauge Digitizer*⁸ y ajustados con funciones log-normal.

2.4 Cálculos de Frecuencias Vibracionales

En el capítulo sección 4.3.1 se describe el uso de cálculos computacionales de frecuencias de estimamientos de enlaces C-S en diferentes moléculas para interpretar la ruptura de estos enlaces en la interfase Au-tiol. Para calcular las frecuencias vibracionales de algunos tioles se empleó un cálculo de teoría del funcional de densidad (*Density Functional Theory*, DFT) a nivel B3LYP empleando el conjunto de bases 6-31+G*. Se empleó el software Gabedit⁹ [25] como interfase gráfica para generar los archivos de entrada, ejecutar los programas de cálculo, y leer los archivos de salida con resultados. El procedimiento general consistió en optimizar la geometría de la molécula mediante un método semi-empírico con el software MOPAC2012¹⁰ [26] con el hamiltoniano PM6 [27] y luego reoptimizar la geometría y calcular las frecuencias mediante DFT empleando el software MPQC¹¹ [28, 29]

2.5 Espectroscopia ultravioleta-visible (UV-Vis)

Los espectros ultravioleta-visible (UV-Vis) fueron medidos con un espectrómetro Perkin Elmer Lambda 35, equipado con doble haz. Como referencia se utilizó hexano, tolueno o agua, dependiendo de la muestra medida.

⁸<http://digitizer.sourceforge.net>

⁹<http://gabedit.sourceforge.net/>

¹⁰<http://openmopac.net/>

¹¹<http://www.mpqc.org/>

2.6 Espectroscopía de Fluorescencia en estado estacionario y resuelta en el tiempo

Los espectros de fluorescencia fueron adquiridos a 20 °C en un espectrómetro Cary Eclipse (Varian) empleando cubetas Hellma® de 60 o 100 μL . Las medidas de tiempo de vida fueron realizadas en un espectrómetro Fluoro- Log-TCSPC (Horiba Jobin Yvon). La fuente de excitación fue un laser nanoLED N-320 (Horiba Scientific) que posee un ancho de pico $< 1,2 \text{ ns}$ con el monocromador de emisión ajustado a 400,540 nm con un convertidor tiempo-amplitud (TAC) con rango de 50 ns, un frecuencia de repetición del pulso de 1 MHz, y un valor de 2500 cuentas en el pico.

2.6.1 Principios básicos

La emisión de luz de una sustancia recibe el nombre general de *luminiscencia*, y ocurre desde estados electrónicamente excitados. La luminiscencia se divide formalmente en dos categorías –fluorescencia y fosforescencia– dependiendo de la naturaleza del estado excitado. En estados excitados singlete, el electrón en el orbital excitado está apareado (por spin opuesto) al segundo electrón en el orbital del estado basal. Consecuentemente, retorna al estado basal rápidamente por emisión de un fotón. Las velocidades de emisión de fluorescencia son típicamente 10^8 s^{-1} , de modo que los típicos tiempos de vida de fluorescencia están cercanos a los 10 ns ($10 \times 10^{-9} \text{ s}$). Sin embargo muchos fluoróforos presentan tiempos de vida del orden de los subnanosegundos.

La fosforescencia es la emisión de luz desde un estado excitado triplete, en el cual el electrón en el orbital excitado tiene la misma orientación de spin que el electrón en el estado basal. La transición al estado basal está prohibida y la velocidad de emisión es lenta ($10^3 \text{ a } 10^3 \text{ s}^{-1}$), tal que los tiempos de vida son típicamente de milisegundos a segundos. Las moléculas con átomos pesados como bromo o yodo suelen presentar fosforescencia, por permitir el cruce entre sistemas para lograr la inversión del spin. La fosforescencia usualmente no se observa en solución a temperatura ambiente, dado que existen muchos procesos de desactivación que compiten con la emisión, tal como decaimientos no radiativos o procesos de extinción (*quenching*).

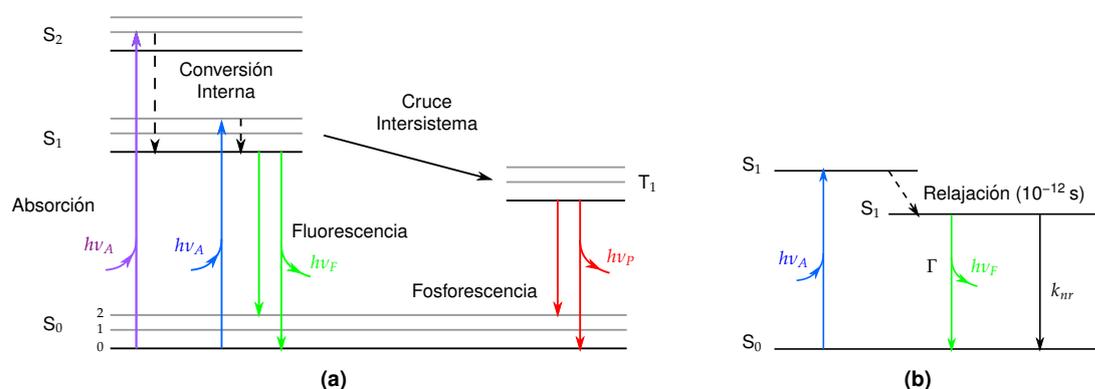


Figura 2.11 (a) Ejemplo de un diagrama de Jablonski, adaptado de la referencia [30], (b) diagrama de Jablonski simple donde solo se considera la fluorescencia.

Estos procesos de absorción y emisión de luz son generalmente representados mediante un diagrama de Jablonski, como el de la figura 2.11a. Estos diagramas, muestran que típicamente en fluorescencia la energía de emisión es un poco menor que la energía de absorción. A este fenómeno se lo denomina “corrimiento de Stokes (*Stokes Shift*) en honor a Sir. G. G. Stokes quien fué el primero en observarlo en 1852 en la Universidad de Cambirdge.

Ademas del espectro de emisión, el tiempo de vida de fluorescencia y el rendimiento cuántico son quizás las características más importantes de un fluoróforo. El rendimiento cuántico de fluorescencia está definido como el número de fotones emitidos relativo al número de fotones absorbidos. Sustancias con una un gran rendimiento cuántico, cercano a la unidad, tales como rhodaminas, muestran emisiones muy brillantes. El tiempo de vida es también importante, ya que determina el tiempo disponible para que el fluoróforo interactue con su ambiente, y proporcione información desde su emisión. El significado del rendimiento cuántico y del tiempo de vida se representan en el diagrama simplificado de la figura 2.11b, donde sólo se hace referencia a los procesos que están relacionados con retorno al estado basal. En particular se resalta la velocidad de emisión de fluorescencia (Γ) y su velocidad de decaimiento no radiativo (k_{nr}) hacia S_0 . Estos parámetros están relacionados con el rendimiento cuántico, Q , por

$$Q = \frac{\Gamma}{\Gamma + k_{nr}} \quad (2.27)$$

donde se puede ver que cuanto menor es el decaimiento no radiativo respecto de decaimiento de emisión de fluorescencia, $k_{nr} < \Gamma$, Q se acerca a la unidad. Notese que el rendimiento cuántico de fluorescencia es siempre menor a la unidad debido a las pérdidas de Stokes (origen del corrimiento de Stokes).

El tiempo de vida del estado excitado esta definido por el promedio de tiempo que las moléculas están en el estado excitado antes de retornar al estado basal. Para el diagrama simple de la figura 2.11b el tiempo de vida es

$$\tau = \frac{1}{\Gamma + k_{nr}} \quad (2.28)$$

El tiempo de vida de un fluoróforo en ausencia de procesos no radiativos es llamado tiempo de vida intrínseco o natural y esta dado por

$$\tau_n = \frac{1}{\Gamma} \quad (2.29)$$

y esta relacionado con el tiempo de vida y el rendimiento cuántico por

$$\tau_n = \tau/Q \quad (2.30)$$

Si bien la fluorescencia en estado estacionario es la forma mas ampliamente difundida de esta espectrometría, la fluorescencia resuelta en el tiempo aporta información complementaria a la primera que resulta de mucha utilidad. En la primera, la muestra es irradiada con una fuente de iluminación constante. En cambio, la muestra puede ser irradiada con un pulso de luz, donde el ancho del pulso es típicamente mas corto que el tiempo de decaimiento de la muestra. Este decaimiento de la intensidad es colectado con un sistema de detección de alta velocidad en la escala de tiempo de ns (o menor). En general si un fluoróforo presenta un decaimiento simple,

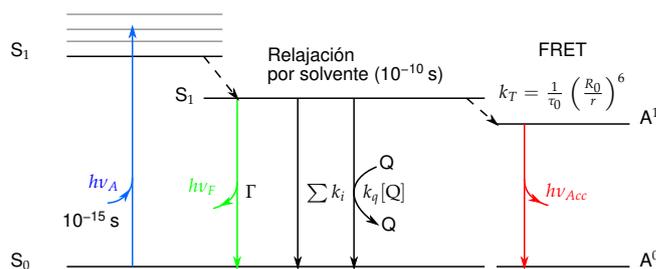


Figura 2.12 Diagrama de Jablonski con extinción por colisión (Q) o por transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET). El término $\sum k_i$ es usado para representar los caminos no radiativos por los que se alcanza el estado basal.

este puede describirse por

$$I(t) = I_0 e^{-t/\tau} \quad (2.31)$$

La señal de decaimiento obtenida, es una convolución del pulso de luz y el decaimiento de fluorescencia propio del fluoróforo. Por lo que se debe resolver la integral de convolución para poder realizar un ajuste adecuado de los datos.

$$N(t) = IRF(t) \otimes I(t) \quad (2.32)$$

donde N son los datos colectados, IRF es la función de respuesta del instrumento e I es la intensidad de fluorescencia dependiente del tiempo.

La intensidad de fluorescencia puede verse disminuida por una gran variedad de procesos. Esta disminución de la intensidad es llamada extinción o *quenching*. El *quenching* puede ocurrir por diferentes mecanismos. El *quenching* colisional ocurre cuando el fluoróforo en el estado excitado es desactivado luego del contacto con alguna otra molécula en solución, la cual es llamada extintor o *quencher*, como se ejemplifica en el diagrama de Jablonski modificado en la figura 2.12. En estos procesos las moléculas no son alteradas químicamente. La disminución de la intensidad por *quenching* colisional esta descrita por la ecuación de Stern-Volmer:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K[Q] = 1 + k_q \tau_0 [Q] \quad (2.33)$$

En esta ecuación, K es la constante de *quenching* de Stern-Volmer, k_q es la constante de *quenching* bimolecular, y $[Q]$ es la concentración del *quencher*. La constante K indica la sensibilidad del fluoróforo respecto a un determinado *quencher*.

2.6.2 FRET

El fenómeno de transferencia de energía no radiativa es muy común en la naturaleza. Por ejemplo, la fotosíntesis requiere la transferencia eficiente de energía desde la absorción de fotones por un complejo antena hacia el núcleo de producción de ATP. Esto permite a las células utilizar eficientemente un rango mayor del espectro que si se limita solo la absorción de la clorofila. La energía es transferida vía FRET, una transferencia de energía no trivial desde una molécula D^* electrónicamente excitada a una molécula aceptor A , a través del acoplamiento de los dos

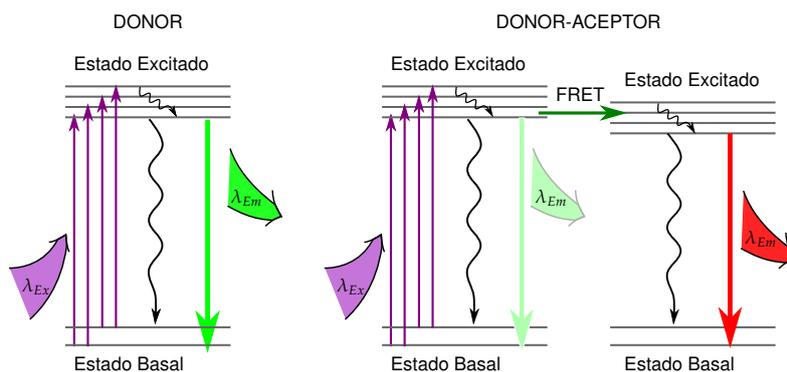


Figura 2.13 Diagrama de Jablonski de un donador que emite en forma independiente y de un sistema donador-aceptor con FRET

respectivos dipolos oscilantes. Las moléculas de aceptor pueden luego decaer al estado basal a través de vías radiativas o no radiativas. El tratamiento matemático riguroso fue mostrado por Theodor Förster en 1948 en Gotinga, Alemania, y es por esto que el fenómeno recibe el nombre de transferencia de energía de resonancia de Förster (o de fluorescencia), FRET -de sus siglas en ingles *Förster Resonance energy Transfer*.

Cuando el donador (D) es excitado por un fotón, puede revertir al estado basal a través de la emisión de un fotón, es decir, fluoresce. El tiempo de vida de fluorescencia depende de la disponibilidad del camino de decaimiento y el FRET adiciona otra posible vía de decaimiento por un proceso no-radiativo. El tiempo de vida de fluorescencia del donador es entonces más corto cuando experimenta FRET que cuando hay ausencia de un aceptor (A). La eficiencia de la transferencia de energía puede ser expresada y determinada como sigue [30]

$$E = 1 - \frac{I_{DA}}{I_D} \quad (2.34)$$

donde I_{DA} y I_D es la intensidad de fluorescencia del donador en presencia y ausencia del aceptor FRET. También, se puede determinar la eficiencia FRET mediante espectroscopia de fluorescencia resuelta en el tiempo:

$$E = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D} \quad (2.35)$$

donde E es la eficiencia de FRET, τ_{DA} es el tiempo de vida de fluorescencia del donador en presencia de la transferencia de energía y, τ_D es el tiempo de vida de fluorescencia sin transferencia de energía. Una segunda forma describir la eficiencia es en función de la distancia donos-aceptor, que puede ser expresada como:

$$E = \frac{1}{1 + (r_{DA}/R_0)^6} \quad (2.36)$$

donde r_{DA} es la distancia donador-aceptor, y R_0 es la distancia de Förster, la cual esta definida como la distancia $D-A$ a la cual $E = 0,5$. R_0 puede ser calculada por la siguiente ecuación:

$$R_0^6 = C_0 k^2 J n^{-4} Q_D \quad (2.37)$$

donde C_0 es una constante ($8,79 \times 10^{-5}$ si R_0 esta expresada en Å), k^2 es un factor de orientación de los dipolos, n es el índice de refracción promedio del medio en el cual la transferencia de energía

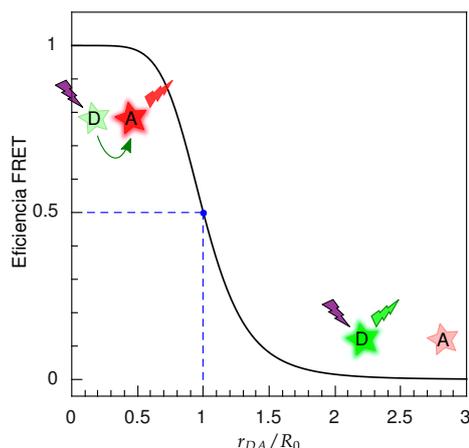


Figura 2.14 Eficiencia de FRET en función de la distancia donador-aceptor.

ocurre, Q_D es el rendimiento cuántico en ausencia de un aceptor, y J es el solapamiento espectral de la emisión del donador y la absorbancia del aceptor [30].

El factor de orientación juega un rol principal en la transferencia de energía, pero es difícil de conocer precisamente, excepto en entornos muy rígidos. Los valores de k^2 pueden ser entre 0-4, pero se suele asumir el valor $2/3$ en una situación de libre rotación y orientación al azar del par donador-aceptor. [30]

Al momento de seleccionar un par FRET es de fundamental importancia la integral de solapamiento J

$$J = \frac{\int_0^\infty I_D(\lambda)\epsilon_A(\lambda)\lambda^4 d\lambda}{\int_0^\infty I_D(\lambda)d\lambda} \quad (2.38)$$

donde $I_D(\lambda)$ es el espectro de fluorescencia del donador y $\epsilon_A(\lambda)$ es el coeficiente de extinción del aceptor.

En caso en que no todos los donadores cuentan con un aceptor (marcado incompleto), se obtienen una mayor intensidad de fluorescencia y por lo tanto, al determinar la eficiencia FRET (E) se comete un error por defecto. Al emplear estos valores para calcular la distancia donador-aceptor, r , se comete un error por exceso al obtener separaciones mayores a las reales. En caso de conocer la fracción de aceptor por cada donador (f_A), la eficiencia de transferencia de energía se calcula por

$$E = \left(1 - \frac{I_{DA}}{I_D}\right) \frac{1}{f_A} \quad (2.39)$$

La mayoría de los valores de R_0 están en el rango de los Angstroms (\AA), y como se puede ver de la ecuación 2.36, la eficiencia decae con la distancia donador-aceptor a la sexta potencia. Por esto la FRET es una herramienta extremadamente sensible para determinar distancias en el rango de los nanómetros, por lo que puede ser usada como una excelente “regla molecular”.

Por esto, el FRET ha sido ampliamente utilizado para estudiar diferentes sistemas complejos, como interacción entre proteína-nucleótido [31, 32], proteína-proteína [32, 33], plegamiento de proteínas [34, 35], entre otros.

2.7 Irradiación - Fotoconversión

Las muestras fueron irradiadas empleando una lámpara de arco de Hg (SUV-DC, Lumatec, Deisenhofen, Germany) y filtros (340 ± 10 nm y 545 ± 10 nm). Se emplearon cubetas Hellma® de $10 \text{ mm} \times 2 \text{ mm}$ o $3 \text{ mm} \times 3 \text{ mm}$ llenadas de manera que toda la muestra fuera irradiada para favorecer la homogeneidad. Las muestras fueron diluidas (absorbancia $< 0,1$ a 520 nm) para evitar efectos de filtro interno.

Referencias

- (1) Bard, A. J. y Faulkner, L. R., *Electrochemical methods: fundamentals and applications*; Wiley: New York, 2001.
- (2) Michri, A.; Pshchenichnikov, A. y Burshtein, R. "Determining the actual surface area of smooth gold electrodes" *Elektrokhimiya* **1972**, 8, 351-352.
- (3) Kittel, C.; Aguilar Peris, J. y Rubia Pacheco, J. d. l., *Introducción a la física del estado sólido*; Reverté: Barcelona, 1995.
- (4) Fadley, C. S., "Basic Concepts of X-ray Photoelectron Spectroscopy" en *Electron spectroscopy: theory, techniques and applications*, Brundle, C. R. y Baker, A. D., eds.; Academic Press: London, 1978; vol. 2.
- (5) Fadley, C. S. "Atomic-level characterization of materials with core- and valence-level photoemission: basic phenomena and future directions" *Surface and Interface Analysis* **2008**, 40, 1579-1605.
- (6) Hüfner, S., *Photoelectron Spectroscopy Principles and Applications*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2003.
- (7) Waterhouse, G. I. N.; Bowmaker, G. A. y Metson, J. B. "Oxidation of a polycrystalline silver foil by reaction with ozone" *Applied Surface Science* **2001**, 183, 191-204.
- (8) Yeh, J. y Lindau, I. "Atomic subshell photoionization cross sections and asymmetry parameters: $1 < Z < 103$ " *Atomic Data and Nuclear Data Tables* **1985**, 32, 1-155.
- (9) Yeh, J. "Atomic Calculation of Photoionization Cross-Sections and Asymmetry Parameters" *Gordon and Breach Science Publishers* **1993**.
- (10) Roberto Pugliese *Atomic Calculation of Photoionization Cross-Sections and Asymmetry Parameters developed by the scientific computing team of Elettra Sincrotrone Trieste*, <http://ulisse.elettra.trieste.it/services/elements/WebElements.html>.
- (11) Wagner, C. D., *Handbook of x-ray photoelectron spectroscopy: a reference book of standard data for use in x-ray photoelectron spectroscopy*; Physical Electronics Division, Perkin-Elmer Corp.: 1979; 208 págs.
- (12) Center for X-ray optics and advanced light source y Lawrence Berkeley National Library, *X-ray Data Booklet*; Lawrence Berkeley National Library: 2009; 161 págs.

- (13) Attwood, D. T., *Soft x-rays and extreme ultraviolet radiation: principles and applications*; Cambridge University Press: Cambridge ; New York, 2000; 470 págs.
- (14) Briggs, D. y Seah, M. P., *Practical surface analysis: by auger and x-ray photoelectron spectroscopy*. Wiley: Chichester, 1990.
- (15) Naumkin, A. V.; Kraut-Vass, A.; Powell, C. J. y Gaarenstroom, S. W., *NIST X-ray Photoelectron Spectroscopy Database*, 2012; book.
- (16) Watts, J. F., *An introduction to surface analysis by XPS and AES*; J. Wiley: Chichester, West Sussex, England ; New York, 2003; 212 págs.
- (17) Jablonski, A. y Powell, C. J. [“The electron attenuation length revisited”](#) *Surface Science Reports* **2002**, *47*, 33-91.
- (18) Cumpson, P. J. y Seah, M. P. [“Elastic Scattering Corrections in AES and XPS. II. Estimating Attenuation Lengths and Conditions Required for their Valid Use in Overlayer/Substrate Experiments”](#) *Surface and Interface Analysis* **1997**, *25*, 430-446.
- (19) Powell, C. y Jablonski, A. *NIST Electron Effective-Attenuation-Length Database*, versión 1.3, Gaithersburg, Maryland 20899 Technology, 2011.
- (20) Seah, M. P. y Dench, W. A. [“Quantitative electron spectroscopy of surfaces: A standard data base for electron inelastic mean free paths in solids”](#) *Surface and Interface Analysis* **1979**, *1*, 2-11.
- (21) Seah, M. P. [“Simple universal curve for the energy-dependent electron attenuation length for all materials: Simple, accurate, universal expression for attenuation lengths”](#) *Surface and Interface Analysis* **2012**, *44*, 1353-1359.
- (22) Shirley, D. A. [“High-Resolution X-Ray Photoemission Spectrum of the Valence Bands of Gold”](#) *Physical Review B* **1972**, *5*, 4709-4714.
- (23) Abràmoff, D. M. D.; Magalhães, D. P. J. y Ram, D. S. J. [“Image Processing with ImageJ”](#) *Biophotonics International* **2004**, *11*, 36-42.
- (24) Granqvist, C. G. y Buhrman, R. A. [“Ultrafine metal particles”](#) *Journal of Applied Physics* **1976**, *47*, 2200-2219.
- (25) Allouche, A.-R. [“Gabedit|A graphical user interface for computational chemistry softwares”](#) *Journal of Computational Chemistry* **2011**, *32*, 174-182.
- (26) James J. P. Stewart *MOPAC2012*, Colorado Springs, CO, USA, 2012.
- (27) Stewart, J. J. P. [“Optimization of parameters for semiempirical methods V: Modification of NDDO approximations and application to 70 elements”](#) *Journal of Molecular Modeling* **2007**, *13*, 1173-1213.
- (28) Janssen C. L.; Seidl E. T. y Colvin M. E., [“Object-Oriented Implementation of Parallel Ab Initio Programs”](#) en *Parallel Computing in Computational Chemistry*; ACS Symposium Series 592, vol. 592; American Chemical Society: 1995, págs. 47-61.

-
- (29) Curtis L Janssen; Ida B. Nielsen; Matt L. Leininger; Edward F. Valeev y Edward T. Seidl *The Massively Parallel Quantum Chemistry Program - MPQC*, versión 2.3.1, Livermore, CA, USA, 2004.
- (30) Lakowicz, J. R., *Principles of fluorescence spectroscopy*, 3rd ed; Springer: New York, 2006; 954 págs.
- (31) Blouin, S.; Craggs, T. D.; Lafontaine, D. A. y Penedo, J. C. "Functional studies of DNA-protein interactions using FRET techniques" *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* **2009**, 543, 475-502.
- (32) Lamichhane, R.; Solem, A.; Black, W. y Rueda, D. "Single-molecule FRET of protein-nucleic acid and protein-protein complexes: Surface passivation and immobilization" *Methods* **2010**, 52, 192-200.
- (33) Piston, D. W. y Kremers, G.-J. "Fluorescent protein FRET: the good, the bad and the ugly" *Trends in Biochemical Sciences* **2007**, 32, 407-414.
- (34) Royer, C. A. "Probing Protein Folding and Conformational Transitions with Fluorescence" *Chemical Reviews* **2006**, 106, 1769-1784.
- (35) Gambin, Y. y Deniz, A. A. "Multicolor single-molecule FRET to explore protein folding and binding" *Molecular BioSystems* **2010**, 6, 1540.

Capítulo 3

Detalles experimentales

En este capítulo se describen los detalles experimentales de todas las síntesis de NPs, sondas fluorescentes, compuestos fotocromicos, polímeros y ensamblados supramoleculares discutidos en este trabajo. Primeramente, detallaremos algunos aspectos relacionados con la limpieza del material y los reactivos generales utilizados. Para la mayoría de las reacciones se utilizaron los reactivos comerciales sin etapas de purificación extra. En los capítulos posteriores se discuten los resultados obtenidos con cada experimentos. El lector no interesado en el detalle experimental de cada síntesis o preparación puede saltar este capítulo.

3.1 Materiales

3.1.1 Agua

El agua utilizada en todos los procesos mencionados en este trabajo es ultra pura Milli-Q (*Millipore*). Esta es generada mediante el tratamiento de agua previamente destilada utilizando filtros de distintos tipos y tamaños. El agua obtenida tiene una resistividad $\geq 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ a 25°C .

3.1.2 Limpieza del material

En todos los experimentos donde fue posible se utilizó material de vidrio para asegurar la limpieza del mismo. El material fue lavado antes de uso mediante alguno de los procedimientos siguientes, según su historia previa.

Permanganato de potasio

El permanganato de potasio (KMnO_4) es un agente oxidante fuerte. Permite eliminar la materia orgánica presente en el material utilizado. El material se lava llevando a ebullición solución saturada de KMnO_4 en medio básico. Luego, se enjuaga con solución ácida de H_2O_2 para eliminar los restos de MnO_2 . Finalmente, se enjuaga varias veces con agua Milli-Q.

Solución “piraña”

La solución “piraña” se utilizó para lavar el material de vidrio y ciertos sustratos metálicos. Esta es una solución fuertemente oxidante, compuesta por H_2SO_4 concentrado y H_2O_2 100 vol en una relación volumétrica de $\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}_2$ de 3:1. Se prepara antes de ser usada, agregando lentamente el ácido sobre el peróxido en baño de hielo. Esta solución ataca violentamente los materiales orgánicos, por lo que se debe manipular con extrema precaución.

Agua regia

El material que ha estado en contacto con NPs es lavado con agua regia, que consiste en una mezcla de HCl y HNO_3 concentrados en una relación volumétrica de $\text{HCl}:\text{HNO}_3 = 3:1$. El agua regia se prepara momentos antes de ser utilizada y debe ser manipulada bajo campana de extracción de gases. Esta solución disuelve los metales que se encuentren adheridos al material. Luego, se enjuaga con agua Milli-Q y se lava el material con KMnO_4 o solución “piraña” para eliminar los restos de materia orgánica.

3.1.3 Reactivos generales

Los tioles utilizados tanto en las síntesis de las nanopartículas como en la formación de las SAMs sobre superficies planas fueron empleados tal como fueron recibidos. Se utilizaron solventes de grado analítico o HPLC en todos los casos. Los precursores de los metales utilizados fueron en el caso de Au: HAuCl_4 (Aldrich, puriss) o sintetizado en el laboratorio como se explica a continuación.

3.1.4 Síntesis de HAuCl_4

La síntesis se realizó según Block.[1] Como fuente de Au se utilizó alambre de Au de 99,9% o 99,999%. Éste fue limpiado con etanol, en ultrasonido, para desprender contaminantes. Luego se sumergió en solución piraña por unos minutos y se enjuagó con agua Milli-Q. Se colocó aproximadamente 1 g de alambre de Au en 12,5 mL de agua regia de preparación reciente. Se dejó disolver durante una noche; el alambre se disolvió totalmente y la solución quedó color amarillo fuerte. Luego, se llevó a ebullición bajo campana, evaporándose el agua regia hasta alcanzar un volumen final de aproximadamente 2 mL. El color de la solución cambió a anaranjado. Se dejó enfriar durante unas horas y se agregó suficiente HCl concentrado para alcanzar el volumen inicial de líquido. Se calentó hasta ebullición la solución nuevamente hasta llegar a 2 mL. Este paso se repitió otras dos veces. Una vez que se alcanzó nuevamente el nivel de 2 mL, se continuó calentando hasta que el color de la solución pasó de anaranjado a rojo sangre. Se removió de la fuente de calentamiento y los cristales se disolvieron en 250 mL de agua Milli-Q. La solución obtenida resultó de coloración amarilla. Esta solución se mantuvo en heladera y se tomaron diferentes porciones de ella para cada síntesis. La concentración final de la solución preparada fue obtenida mediante espectroscopia de absorción atómica.

3.2 Síntesis de nanopartículas de Au cubiertas con dodecanotiol (Au@SC₁₂ NPs)

Este método se discute detalladamente en el Cap. 4. Las Au@SC₁₂ NPs fueron preparadas mediante el método bifásico de Brust-Schiffrin [2], siguiendo las modificaciones introducidas por Murray [3]. Las 3 muestras comentadas en el Cap. 4 tienen ciertas diferencias en su síntesis, por lo que se describe cada una por separado.

3.2.1 Nanopartículas de Au@SC₁₂ de $\langle D \rangle = 3,9 \pm 0,6$ nm

Esta síntesis se realizó a temperatura ambiente en un balón de vidrio. Se agregaron 0,4 mmol de HAuCl₄ a 40 mL de una solución 25 mM de TOABr (Aldrich, 99 %) en tolueno (relación molar TOABr: Au = 2,5:1). Se mezclaron las dos fases mediante agitación magnética vigorosa para favorecer la transferencia del HAuCl₄ a la fase orgánica. Una vez que esta fase tomó color anaranjado rojizo y la fase acuosa se volvió incolora, se descartó la última y se agregaron 0,13 mmol (32 μ L) de dodecanotiol (Aldrich, 97 %) en la fase orgánica utilizando una micro pipeta Hamilton (relación molar SC₁₂: Au = 1:3). El color de la solución no cambió considerablemente luego del agregado del tiol. Se continuó agitando esta solución por unos minutos y se agregaron 4 mmol de NaBH₄ desde una solución acuosa recién preparada (relación molar NaBH₄: Au = 10:1). La fase orgánica se tornó de un color marrón-rojizo muy oscuro y la mezcla de reacción se dejó en agitación por 3 h. Se descartó la fase acuosa proveniente de la solución de NaBH₄ y se redujo el volumen de la fase orgánica mediante evaporación rotatoria a ~ 30 °C. El sólido marrón oscuro obtenido se dispersó en etanol absoluto. Se sometió la mezcla a ultrasonido por unos 30 s para favorecer la dispersión de las AuNPs y disolver las impurezas (TOABr y las moléculas de tioles libres). Luego, se centrifugó la suspensión a $\sim 2000 \times g$ para decantar las NPs. Se desechó el sobrenadante y se agregó etanol nuevamente. Este proceso se repitió 4 veces en total. Finalmente, se secaron las partículas bajo corriente de nitrógeno. Las partículas preparadas se disolvieron en tolueno y se almacenaron a 4 °C hasta su uso.

3.2.2 Nanopartículas de Au@SC₁₂ de $\langle D \rangle = 3,0 \pm 0,9$ nm

Esta síntesis se realizó siguiendo el mismo protocolo que la anterior. Las cantidades utilizadas fueron 0,4 mmol de HAuCl₄, 25 mL de una solución 40 mM de TOABr en tolueno (relación molar TOABr: Au = 2,5:1), 0,8 mmol de dodecanotiol (relación molar SC₁₂: Au = 2:1) y 4 mmol de NaBH₄ (relación molar NaBH₄: Au = 10:1). La solución se volvió color amarillo pálido a los pocos minutos del agregado del tiol debido a la reducción de Au^{III} Au^I. El lavado y almacenamiento de las partículas se realizó de igual manera a la explicada más arriba.

3.2.3 Nanopartículas de Au@SC₁₂ de $\langle D \rangle = 2,5 \pm 0,6$ nm

La síntesis de estas NPs fue realizada a 0 °C, sumergiendo el balón donde se desarrolló la síntesis en un baño de hielo. El procedimiento es similar a los anteriores, utilizando las siguientes cantidades:

0,2 mmol de HAuCl_4 , 14,5 mL de una solución 34,3 mM de TOABr en tolueno (relación molar TOABr: Au = 2.5:1), 0,8 mmol de dodecanotiol (relación molar SC_{12} : Au = 4:1) y 2 mmol de NaBH_4 (relación molar NaBH_4 : Au = 10:1). El lavado de estas partículas fue similar al realizado en las anteriores síntesis.

3.2.4 Nanopartículas de Au@TOABr de $\langle D \rangle = 5,6 \text{ nm}$

Estas nanopartículas están protegidas la sal de amonio cuaternaria empleada como agente de transferencia de fase para al AuCl_4^- . En esta síntesis desarrollada en 1998 por el grupo de Schiffrin[4] no se emplean tioles. El procedimiento general para sintetizar estas AuNP es igual al descripto para las partículas protegidas con tioles, pero se omite el agregado de estos últimos.

En un balón de vidrio con agitación magnética se mezclaron 0,2 mmol de HAuCl_4 con 20 mL de una solución 40 mM de TOABr en tolueno. Una vez transferido todo el Au^{III} a la fase de tolueno se retiró la fase acuosa. Se agregaron 2 mmol de NaBH_4 disueltos en 5 mL como agente reductor. La solución color anaranjada de Au^{III} en tolueno se tornó de un color rojo muy oscuro (casi negro) indicando la formación de AuNP. Se dejó la mezcla en agitación a temperatura ambiente por 2 h para homogeneizar los tamaños. Se descartó la fase acuosa y se lavó la fase orgánica con agua y solución saturada de NaCl para evitar la formación de emulsiones. La solución de AuNP@TOABr en tolueno se guardaron refrigeradas a 4 °C. A la brevedad se las emplearon en reacciones de intercambio de ligandos.

3.2.5 Nanopartículas de Au@THP

Estas AuNP hidrosolubles han sido sintetizadas por Duff y col [5] en 1993, como una alternativa al método clásico de AuNP hidrosolubles protegidas con citrato desarrollado por Turkevich y col [6].

En un balón con agitación magnética a temperatura ambiente se mezclaron 45,5 mL de H_2O con 1,5 mL de una solución de 0,2 M de NaOH recién preparada. Se agrega 1 mL de una solución stock de THPC (1,2 mL de THPC al 80 %, comercial, en 100 mL de H_2O). Luego de 1 a 2 min se agrega 2 mL de HAuCl_4 25 mM (0,05 mmol). Luego de unos minutos se forma una solución color marrón. El tamaño de las AuNP@THP es de 1 a 2 nm, pero crecen con el paso del tiempo [5]. Por ello, las reacciones de intercambio de ligandos se realizan pocas horas después de la formación de las nanopartículas.

3.2.6 Intercambio de Ligandos en las Nanopartículas

Las reacciones de intercambio de ligandos se discuten en la sección 4.3. Allí se describen como se seleccionaron las condiciones adecuadas (principalmente relación Au:SR) para lograr el intercambio de grupos protectores sin modificar el tamaño de las NPs. La relación molar óptima de Au:SR fue de 2:1.

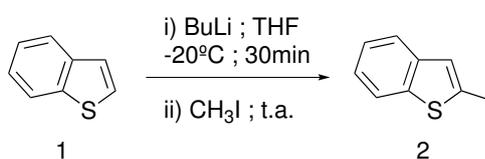
Las AuNP@TOABr y AuNP@THP recién preparadas se fraccionaron en diferentes alícuotas. Paralelamente, se preparó una solución concentrada (5 mg mL^{-1}) de los tioles en etanol absoluto. La cantidad de solución utilizada nunca superó el 5 % del volumen de solución de NPs. La

mezcla se dejó en agitación y en oscuridad toda la noche. Las NPs modificadas se separaron por centrifugación y se descartó el líquido sobrenadante. En los casos que fue posible se lavó con etanol (o metanol) para eliminar los restos de tiol no ligado a las AuNPs. Las NPs modificadas con tioles terminados en grupos carboxílicos, se redispersaron en solución de NaOH 0,1 M.

3.3 Síntesis de Compuestos Orgánicos

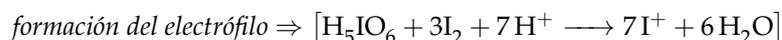
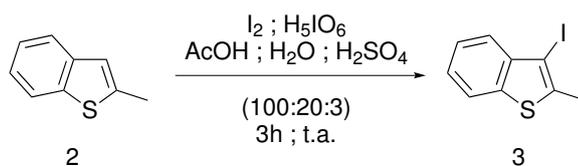
3.3.1 Fotocrómicos

Síntesis de 2-metilbenzo[b]tiofeno



En un balón de dos bocas de 100 mL adosado a un refrigerante a reflujo y una ampolla de compensación de presiones, se colocaron 3 g (22,3 mmol) de benzo[b]tiofeno (1) disueltos en 10 mL de THF anhidro. Se enfrió a -20°C y lentamente se agregaron 13,4 mL de *n*-BuLi 2 M en ciclohexano. Se lo dejó reaccionar 30 min con agitación magnética. Se agregaron 1,4 mL (400 mmol) de CH_3I lentamente, y se retiró el baño termostatzado y se dejó llegar a temperatura ambiente (t.a.). Se cortó la reacción con solución de HCl 1 M, se extrajo con acetato de etilo (AcOEt), se secó con Na_2SO_4 y se evaporó el solvente con evaporador rotativo.

Síntesis de 3-iodo-2-metilbenzo[b]tiofeno

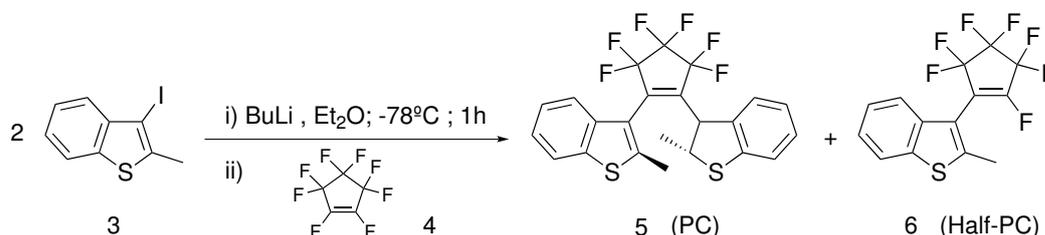


Se suspendieron 2,2 g (15,1 mmol) de 2-metilbenzo[b]tiofeno (2), 0,688 g (3,51 mmol) de H_5IO_6 , 1,88 g (7,4 mmol) de I_2 en 55 mL de una mezcla de AcOH/ H_2O / H_2SO_4 (100:20:3). Se dejó agitando energicamente por 3 h en la oscuridad, controlando periódicamente el avance de la reacción con TLC en hexano. Luego se volcó sobre una solución acuosa de NaHSO_4 (5%) y se neutralizó con solución acuosa de NaOH (3 M). Se obtuvo un precipitado amarillento que se filtró y recristalizó desde una mezcla de MeOH/ H_2O (9:1), obteniéndose el 3-iodo-2-metilbenzo[b]tiofeno (3) como un sólido blanco (3,76 g, 13,7 mmol, 91%).

Rf: 0,57 (ciclohexano); Pf: 48-49°C.

$^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) δ 2,60 (s, 3H, CH_3), 7,34 (t, 1H, H-6), 7,43 (t, 1H, H-5), 7,64 (d, 1H, H-4), 7,70 (d, 1H, H-7). [7]

Síntesis de 1,2-bis(3-(2-metilbenzo[b]tiofenil)) perfluorociclopenteno - "Fotocrómico Base"(PC)



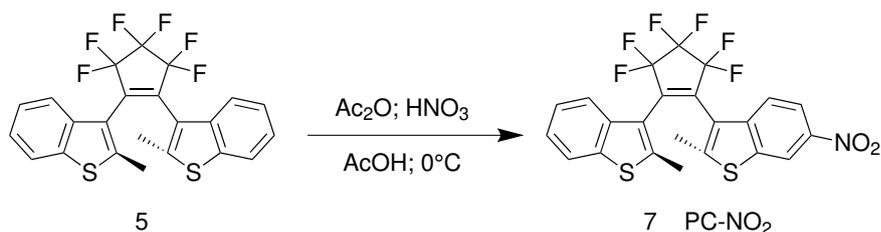
En un balón de 100 mL con agitación magnética y adosado a una ampolla de compensación, se agregaron 1,2 g (4,4 mmol) de 3-iodo-2-metilbenzo[b]tiofeno (3). Se enfrió en baño de acetona por debajo de los -78°C y se agregó 38 mL de THF anhidro. Luego se agregaron lentamente 3 mL (5 mmol) de *n*-Buli (1,67 M) en hexano y se dejó reaccionar por 1 h. Se agregó 0,3 mL (2,2 mmol) de C₅F₈ (4) y se dejó reaccionar por 1 h. Se sacó del baño termostatzado y se lo paso a un baño de agua y hielo hasta llegar a temperatura ambiente. Se cortó la reacción con solución de HCl 1 M, se extrajo con acetato de etilo (AcOEt), se secó con Na₂SO₄ y se evaporó el solvente con evaporador rotativo. Por TLC en ciclohexano se identifican tres compuestos (3, Rf:0,55 ; Half-PC, Rf:0,45 y PC, Rf:0,3). Se purificó mediante cromatografía en columna preparativa con silica como fase estacionaria y ciclohexano como solvente de elución hasta separar 3 y 5, luego se incrementó la polaridad de eluyente con AcOEt. Se obtuvieron 161,4 mg (0,34 mmol) de 6 con un rendimiento total del 15,7%. También se obtuvieron 20 mg del subproducto 5, que es el derivado de la reacción de un solo equivalente de 3 con un equivalente de 4.

PC: ¹H NMR (200MHz, CDCl₃) δ 2.1 (s, 6H, CH₃ ap), 2.48 (s, 3H, CH₃ p), 7.16-7.21 (dd, 2H, H-5/H-6 p), 7.28 (m, 2H, H-6 ap), 7.36 (m, 2H, H-5 ap), 7.57-7.63 (m, 2H, H-4/H-7 p), 7.66 (m, 4H, H-4/H-7 ap). Relación de 35:65 para los conformeros Paralelo (p) a antiparalelo (ap) conformers 35:65.[7]

Half-PC: ¹H NMR (200MHz, CDCl₃) δ 2.51 (s, 3H, CH₃), 7.34 (m, 1H, H-6), 7.42 (m, 1H, H-5), 7.47 (d, 1H, H-4), 7.82 (dd, 1H, H-7).[7]

Síntesis de 3-(3,3,4,4,5,5-hexafluoro-2-(2-metilbenzo[b]tiofen-3-il)ciclopent-1-en-1-il)-2-metil-6-nitrobenzo[b]tiofene - Nitro-PC

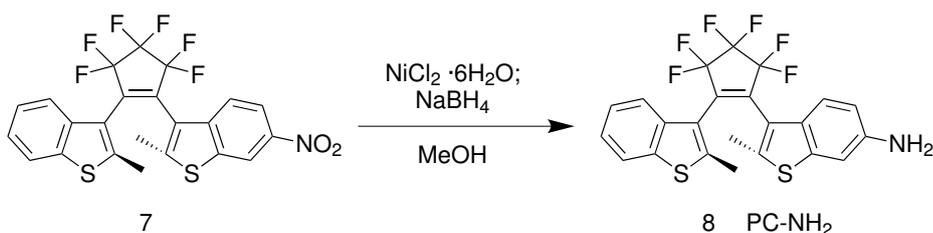
Ésta síntesis fue modificada respecto al procedimiento tradicional [8], ya que se empleó CH₂Cl₂ como cosolvente para aumentar la solubilidad del PC (6). En un balón de 5 mL se colocaron 189 mg (0,4 mmol) de 6, 1 mL de diclorometano (CH₂Cl₂) y 0,4 mL de ácido acético glacial en un baño de hielo con agitación vigorosa. Posteriormente se agregaron 0,04 mL (0,4 mmol) de anhídrido acético (Ac₂O) y 20 μL (0,4 mmol) de HNO₃ fumante. Se tapó y se dejó reaccionar en oscuridad. Se monitoreó con TLC (hexano:AcOEt, 9:1) y se fué agregando más Ac₂O y HNO₃ (en total, 6 veces las cantidades originales) y la reacción demoró 24 h. Se interrumpió la reacción agregando solución de NaOH concentrado hasta llegar a pH 7. Se agregó AcOEt para extraer el crudo de reacción, y la fase orgánica se lavo, se secó con Na₂SO₄ y se eliminó el solvente en evaporador rotatorio.



Se purificó mediante cromatografía en columna con una mezcla de hexano:AcOEt 99:1 y se recuperaron 111 mg (0,216 mg) de 7 (PC-NO₂; R_f=0,5; 9:1 Hex:AcOEt). Rendimiento 54%. También se obtiene el producto dinitrado (PC-(NO₂)₂), 13% (R_f= 0,32).

Si bien el rendimiento es un poco mejor que el de la síntesis tradicional (39% de PC-NO₂ y 46% de PC-(NO₂)₂), requiere mucho más trabajo y mayor tiempo de reacción.

Síntesis de 3-(3,3,4,4,5,5-hexafluoro-2-(2-metilbenzo[b]tiofen-3-il)ciclopent-1-en-1-il)-2-metil-6-aminobenzo[b]tiofene - Amino-PC

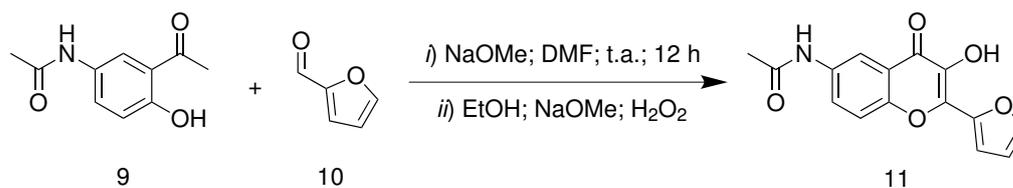


Se preparó una solución de 7 (105 mg; 0,2 mmol) en 23 mL metanol en un balón de 50 mL en baño de hielo con agitación magnética y protegido de la luz. Posteriormente se agregó el NiCl₂ · 6H₂O (390 mg; 1,6 mmol) y se dejó agitando hasta disolución. Finalmente se agregó el NaBH₄ (187,5 mg; 5 mmol) y se dejó destapado el balón para liberar el H₂ que se genera. Luego de 30 min se controló en avance de la reacción por TLC (Hex:AcOEt 9:1) comprobando que sólo estaba presente el producto de reacción. Se evaporó el metanol en evaporador rotatorio y se disolvió el crudo de reacción en AcOEt. Se filtró el sólido negro de la reducción del NiCl₂ y se lavó la fase orgánica. Se secó con Na₂SO₄ y se eliminó el solvente en evaporador rotatorio. Se obtuvieron 91,4 mg de un líquido aceitoso de color rosado que no se purificó, con un rendimiento de reacción del 94,5% (R_f=0,22). El compuesto 8 (PC-NH₂) se guardó a -18 °C y bajo atmósfera de Ar para evitar descomposición (principalmente oxidación).

3.3.2 Sondas ESIPT

Síntesis de 6-acetamido-2-(2-furanil)-3-hidroxicromona

En un balón limpio y seco de 2 L se colocaron 1,095 g (5,6 mmol) de 9 con 0,75 mL (6,8 mmol) de 10 y 5 mL de DMF. Se enfrió en baño de hielo y se agregó 1,23 g (23 mmol) de NaOMe agitando cuidadosamente evitando salpicar y cuidando que no aumente la temperatura. Se agregaron otros

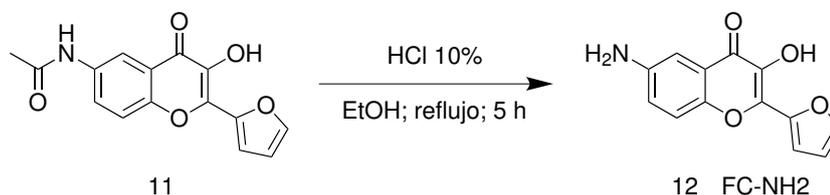


5 mL de DMF lavando las paredes del balón. La mezcla tomó un color rojizo-violáceo. Se dejó 2 h en baño de hielo y se dejó toda la noche a temperatura ambiente.

Al otro día se colocó un refrigerante seco a modo de reflujo y se agregaron 10 mL de etanol absoluto (EtOH), 6,13 mL (113 mmol) de NaOMe y se enfrió a 1-2°C. Se agregaron otros 5 mL de EtOH para lavar las paredes. Luego se agregaron 8 mL de H₂O₂ (100 vol) agitando bien y se calentó suavemente hasta ebullición por 2 min evitando proyecciones. Se volcó la muestra sobre unos 150 g de hielo picado. La mezcla se volvió al balón para recuperar lo que quedaba en las paredes y se vertió nuevamente al vaso. Se lavó en balón con pequeñas porciones de agua fría y se llevó a pH 6 con HCl en baño de hielo.

Se filtró el sólido, se agregaron 10 mL de 2-Butanol y se llevó a ebullición por 5 min. Se filtró en caliente y se evaporó el solvente (el sólido retenido contiene las impurezas). Se obtuvieron 321 mg de **11** (Rendimiento 22 %, Rf=0,38 en AcOEt), y 142 mg del sólido impuro.

Síntesis de 6-amino-2-(2-furanyl)-3-hidroxicromona - "FC"

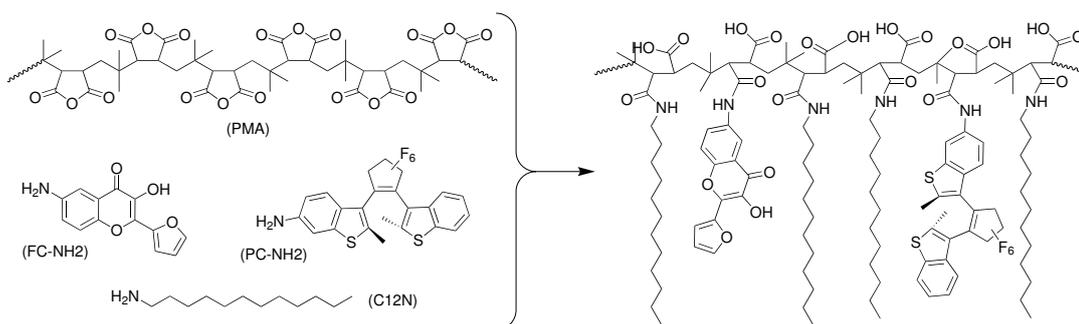


En un balón conectado a un refrigerante a reflujo se colocaron 142 mg de **11** (impuro) y se agregaron 5 mL de EtOH y 4 mL de HCl al 20 %, de manera que la concentración final de H⁺ fue ~10 %. Se dejó en reflujo por 5 h.

Se dejó enfriar la mezcla de reacción y se llevó a pH 7 con NaOH 10 M. Se evaporó en evaporador rotatorio y el sólido obtenido se resuspendió en H₂O y se filtró. El sólido se lavó con H₂O y Et₂O. Se secó en vacío obteniéndose 87 mg de crudo. Se purificó por cromatografía en columna de sílica con una mezcla de hexano:AcOEt de 75:25 como eluyente con 1 % de trietilamina. Luego de colectar el primer componente de la mezcla, se aumento gradualmente la polaridad con AcOEt y finalmente con MeOH. Se obtuvieron 54 mg (0,22 mmol) de **12**.

3.3.3 Polímero Anfifílico Fotomodulable

La reacción conjugación del poli-(isobutilen-*alt*- anhídrido maléico) (PMA, Aldrich #531278 (Mw) ~6,000, 12-200 mesh, 85 %) con PC-NH₂, FC-NH₂ (u otros fluoróforos) y dodecilamina mediante la formación de una unión amida, se realiza en una síntesis del tipo *one pot* [8, 9].



Se consideró que por cada 1 equivalente de PMA hay 40 equivalentes de anhídrido. En base a esa relación se calcularon las cantidades de PC, fluoróforo y dodecilamina para cada muestra de polímero anfifílico modificado. La nomenclatura utilizada denota la proporción de cada molécula en el polímero, por ejemplo, PMA-10PC-5FC-75NC₁₂ significa que el polímero contiene un 10 % de PC, un 5 % de FC y un 75 % de dodecilamina.

El procedimiento general para la reacción consistió en colocar en un balón periforme seco de unos 5 mL la masa apropiada de PMA (generalmente inferior a 100 mg), el PC y el fluoróforo se agregaron desde soluciones concentradas en CHCl₃ o THF anhidros. Se sometió a ultrasonido por 1 min y luego se dejó en agitación resguardado de la luz a una temperatura de 55 a 60 °C toda la noche. Al día siguiente se agrega la dodecilamina (en CHCl₃ o THF) y al cabo de 2 h se observa que la mezcla de reacción inicialmente turbia se clarificó. Una alternativa a este procedimiento, fue agregar junto con el PC y el fluoróforo una porción de la dodecilamina, y al otro día se agregó el porción restante. De esta manera, se intentó mejorar la solubilidad del polímero para favorecer la reacción con el PC y el fluoróforo.

Finalizada la reacción se evaporó el solvente y se purificó el polímero funcionalizado mediante cromatografía de exclusión por tamaños a escala preparativa, empleando Sephadex LH-20 (GE Healthcare Life Science) como fase estacionaria. Generalmente el eluyente fue CHCl₃, pero en ocasiones se empleó THF. La Sephadex LH-20 es menos denso que el CHCl₃ y flota al momento de realizar la cromatografía. Para evitar esto, se empleó un “tapón” de arena de mar (lavada con H₂SO₄ y calcinada).

La estequiometría de los polímeros se determinó mediante espectroscopia UV-Vis.

3.4 Ensamblados de NPs y Polímero Anfifílico

El procedimiento general de obtención de los ensamblados entre NPs y polímeros anfifílicos [8-11] consiste en poner en contacto las NP redispersas en CHCl₃ o THF con el polímero anfifílico en agitación suave a una temperatura de unos 40 °C por 3 h. Se evaporó lentamente el solvente (en un tiempo de 15 a 30 min a 40 °C y presión reducida). En los casos en que se empleó un agente entrecruzador (*Cross-Linker*, bis(6-aminoheptil)amina), éste fue agregado luego de las 3 h de ensamblado, previa disminución del volumen de solvente a un tercio y se dejó reaccionar por 1 h.

La relación de NP y polímero empleada fue de 70 a 100 monomero/nm². La superficie de las NP, se estimó considerando éstas de forma esféricas con un radio total igual a radio del carozo

metálico junto con el largo de las cadenas de dodecanotiol ($r_{total} = r_{metal} + 1,7$; [nm]).

Una vez seco el crudo de reacción, se resuspendió en buffer SBB a pH 9, 12 o en solución de NaOH 10 mM. La purificación se realizó por electroforesis o por cromatografía de exclusión por tamaño. La purificación por electroforesis se realizó en gel de 1% de Agarosa de 7×7 cm con un buffer TBE $1 \times$ (Tris/Borato/EDTA) aplicando una diferencia de potencial de 10 V cm^{-1} . Para recuperar las muestras del gel, se cortaron las fracciones correspondientes (con ayuda de un retroiluminador) y se colocaron dentro de tubos de membranas para diálisis de celulosa de 3,5 kDa junto con un volumen adecuado de buffer TBE $1 \times$. Generalmente se empleó el mismo volumen de siembra para evitar grandes diluciones.

La purificación por cromatografía de exclusión por tamaño a escala semipreparativa con una columna Superdex 200 (GE Healthcare Life Science) con un buffer SBB 50 mM pH 9 o TBE $1 \times$ en un sistema HPLC con detección UV-Vis. Se inyectaron de 20 a 50 μL (dependiendo de la concentración) comensando con un flujo de $50 \mu\text{L min}^{-1}$ por 3 min y luego de $20 \mu\text{L min}^{-1}$ con un tiempo promedio de elusión de 70 min. Los ensamblados fueron colectados aproximadamente a los 30 min de elusión.

Referencias

- (1) Block, B. P.; Bartkiewicz, S. A.; Moeller, T.; Chrisp, J. D.; Gentile, P. y Morgan, L. O., "Gold Powder and Potassium Tetrabromoaurate(III)" en *Inorganic Syntheses*, Bailar, J. C., ed.; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 1953; vol. 4, págs. 14-17.
- (2) Brust, M.; Walker, M.; Bethell, D.; Schiffrin, D. J. y Whyman, R. "Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase liquid-liquid system" *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1994**, 1994, 801-802.
- (3) Hostetler, M. J. y col. "Alkanethiolate Gold Cluster Molecules with Core Diameters from 1.5 to 5.2 nm: Core and Monolayer Properties as a Function of Core Size" *Langmuir* **1998**, *14*, 17-30.
- (4) Fink, J.; Kiely, C. J.; Bethell, D. y Schiffrin, D. J. "Self-Organization of Nanosized Gold Particles" *Chemistry of Materials* **1998**, *10*, 922-926.
- (5) Duff, D. G.; Baiker, A. y Edwards, P. P. "A new hydrosol of gold clusters. 1. Formation and particle size variation" *Langmuir* **1993**, *9*, 2301-2309.
- (6) Turkevich, J.; Stevenson, P. C. e Hillier, J. "A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold" *Discussions of the Faraday Society* **1951**, *11*, 55-75.
- (7) Giordano, L. *Síntesis de Diheteroariletanos fotocromicos y su Aplicación como Aceptores en Transferencia de Energía*, Tesis doct., Buenos Aires, Argentina: Universidad de Buenos Aires, 2004.
- (8) Diaz, S. A. *Water soluble photochromic fluorescent nanopobes based on diheteroarylethenes and polymer coated quantum dots*. Tesis doct., Georg-August-Universität, 2013.

-
- (9) Fernández-Argüelles, M. T.; Yakovlev, A.; Sperling, R. A.; Luccardini, C.; Gaillard, S.; Sanz Medel, A.; Mallet, J.-M.; Brochon, J.-C.; Feltz, A.; Oheim, M. y Parak, W. J. "Synthesis and Characterization of Polymer-Coated Quantum Dots with Integrated Acceptor Dyes as FRET-Based Nanoprobes" *Nano Letters* **2007**, *7*, 2613-2617.
- (10) Díaz, S. A.; Giordano, L.; Azcárate, J. C.; Jovin, T. M. y Jares-Erijman, E. A. "Quantum Dots as Templates for Self-Assembly of Photoswitchable Polymers: Small, Dual-Color Nanoparticles Capable of Facile Photomodulation" *Journal of the American Chemical Society* **2013**, *135*, 3208-3217.
- (11) Pellegrino, T.; Manna, L.; Kudera, S.; Liedl, T.; Koktysh, D.; Rogach, A. L.; Keller, S.; Rädler, J.; Natile, G. y Parak, W. J. "Hydrophobic Nanocrystals Coated with an Amphiphilic Polymer Shell: A General Route to Water Soluble Nanocrystals" *Nano Letters* **2004**, *4*, 703-707.

Parte II

Nanopartículas y Ensamblados Supramoleculares

Capítulo 4

Nanopartículas de Au recubiertas por tioles

4.1 Introducción

Las NPs metálicas cubiertas por tioles son uno de los tipos de NPs más amplia y detalladamente estudiados y discutidos en la literatura específica. Entre los metales estudiados, el Au es el más utilizado ya que se lo considera como modelo para comprender la estructura y composición de los sistemas tiol-metal. Este hecho se debe a la naturaleza inerte del Au que facilita tanto la obtención de superficies limpias bien definidas, como la comprensión del enlace S-metal. Sin embargo, esto no significa que todo lo que se estudie en el sistema Au-tiol pueda ser extrapolado a otros metales como Ag, Pd, Pt, Cu o Ni [1]. De hecho, se ha encontrado que el comportamiento de los tioles sobre estos metales puede ser muy diferente, lo que dificulta aún más la comprensión de estos sistemas en un marco general. Incluso, importantes aspectos del sistema modelo son motivo de discusión en el presente y, durante los años en que se desarrolló este trabajo, ha existido una importante cantidad de publicaciones que han propuesto nuevas interpretaciones de las propiedades observadas [2, 3] y los procesos de formación de estos sistemas [2, 4].

En este capítulo discutiremos brevemente las características generales de la interfase Au-tiol en diferentes sistemas para luego centrarnos en el estudio de las AuNPs protegidas por tioles. Discutiremos los diferentes métodos de síntesis de estas NPs como así también los resultados referidos a su composición química, estudiada mediante XPS, información complementaria obtenida por espectroscopia de absorción UV-Vis y mediante microscopía electrónica (TEM).

Es posible clasificar los sistemas Au-tiol en base al número de átomos que los componen y al estado químico de los mismos, como se muestra en la Fig. 4.1. En este esquema se observa que para un número de átomos muy grande, que corresponde a una superficie de Au plana, nos encontramos en el régimen correspondiente a SAMs de tiolatos sobre Au. Si reducimos el número de átomos entre aproximadamente 150 y unos miles de átomos (2 a 10 nm) estamos en presencia de las AuNPs cubiertas por tiolatos. Recientemente ha tenido mucha importancia el estudio de partículas compuestas por un número de átomos entre 13 y 150 aproximadamente (≤ 2 nm), que

reciben el nombre especial de *clusters*. Por último, con todos los átomos de Au en estado de oxidación +1, se encuentran los tiolatos de Au ($\text{Au}^{\text{I}}-\text{SR}$). Si bien el estado de oxidación de los átomos de Au en los demás sistemas requiere un análisis más detallado, desde los *clusters* hasta las SAMs de tiolatos sobre superficies planas existen –al menos algunos– átomos de Au metálico (Au^0).

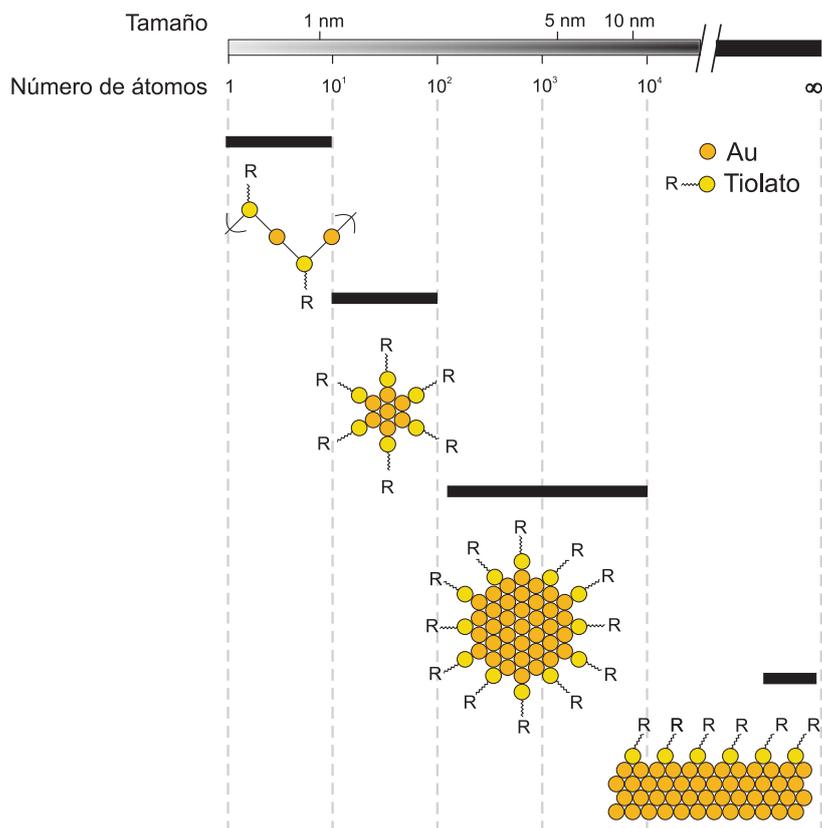


Figura 4.1 Esquema de los diferentes sistemas compuestos por la interfase Au–S, clasificados por la cantidad de átomos que los forman. Adaptado de ref. [5].

4.1.1 Monocapas Autoensambladas de tiolatos sobre Au(111).

En esta sección describiremos brevemente los aspectos más importantes de las SAMs de tiolatos sobre Au(111). El lector interesado puede dirigirse a las refs. [6, 7] donde este sistema se describe detalladamente.

Las SAMs de tiolatos sobre Au pueden ser preparadas fácilmente en el laboratorio mediante inmersión de un sustrato en una solución –generalmente en etanol– que contiene el tiol de interés. Las moléculas de tiol se adsorben sobre la superficie del metal y, gracias a las interacciones intermoleculares, forman estructuras altamente organizadas en la superficie del Au. Posteriormente, se lava la superficie con etanol reiteradas veces para eliminar las moléculas de tiol libre. También es posible crear estas estructuras en una cámara de ultra alto vacío mediante evaporación de un tiol en fase gaseosa. Mientras que la primera ruta tiene la ventaja de poder ser implementada en

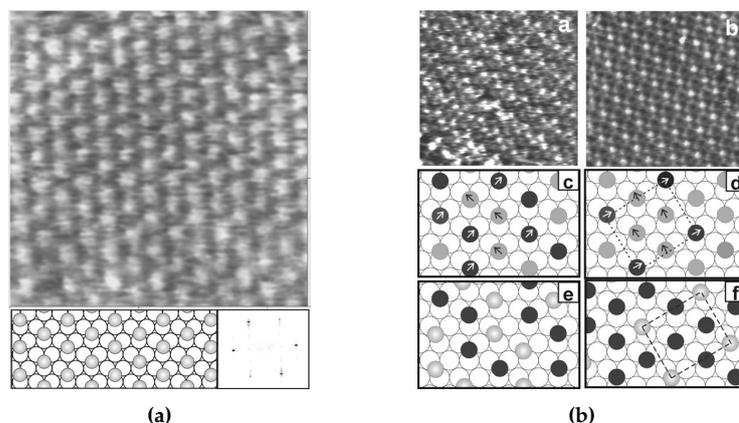


Figura 4.2 Imágenes de microscopía de barrido de efecto túnel (STM) de una SAM de alcanotiolatos sobre Au(111). **(a)** Red $(\sqrt{3} \times \sqrt{3})R30^\circ$ de hexanotiolato, **(b)** Red $c(4 \times 2)$ de hexanotiolato. Reproducido de la ref. [9] ©Royal Society of Chemistry 2005

cualquier laboratorio, la segunda permite el control preciso del estado de la superficie metálica antes de agregar el tiol y la ulterior caracterización mediante técnicas de análisis superficial sin necesidad de exponer la muestra a condiciones atmosféricas. La reacción formal de adsorción puede escribirse de la siguiente manera:



En la primera etapa, las moléculas de tioles (RSH) se fisiorben sobre la superficie de Au y luego pierden el átomo de H del grupo tiol, generando el radical tiilo (RS \cdot) para formar una unión tiolato (S–Au). Este es considerado un enlace covalente por su alta energía de unión ($\sim 200 \text{ kJ mol}^{-1}$) [8], la electronegatividad relativamente elevada del Au y la distribución de cargas de Bader estimada mediante DFT (citas Carro).

Estas moléculas se ordenan en redes del tipo $(\sqrt{3} \times \sqrt{3})R30^\circ$, (Fig. 4.2a) y $c(4 \times 2)$ (Fig. 4.2b) que pueden coexistir en la superficie, con un cubrimiento $\theta = 0,33$ en ambos casos. Cuando se trata de tioles cortos, este cubrimiento es, en general, menor. La presencia de la unión tiolato es evidente en el espectro de XPS de S $2p$ de estos sistemas [10], como el mostrado en la Fig. 4.3a. La señal de S $2p$ aparece en $\sim 162 \text{ eV}$, una energía de enlace menor que la correspondiente a S elemental (164 eV), hecho que marca un incremento de densidad de carga negativa sobre el átomo de S. Correspondientemente, se esperaría que la señal de Au $4f$ presentara un comportamiento inverso: mayores energías enlace por exceso de carga positiva en los átomos superficiales. Sin embargo, en las técnicas de XPS convencional, la profundidad del sustrato analizada conduce a que la contribución a la señal por parte de los átomos de Au en el seno del metal sea muy grande y no se observen cambios en la señal de Au $4f$. Diversos trabajos han abordado este estudio, incrementando la sensibilidad superficial de XPS mediante diferentes métodos. Sin embargo, han aparecido controversias relacionadas con la interpretación de estos resultados, aspecto que se discute más adelante en este capítulo. La Fig. 4.3b muestra un espectro de Au $4f$ de una SAM

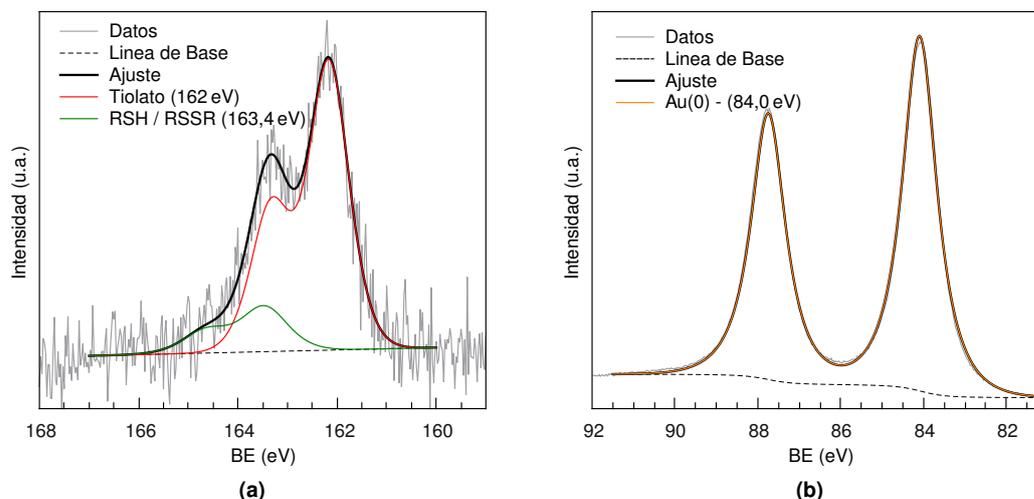


Figura 4.3 Espectros XPS de una SAM de dodecanotiolato sobre Au(111) tomados con fuente de Mg $K\alpha$. (a) Espectro de S 2p. (a) Espectro de Au 4f.

de dodecanotiolato sobre Au(111). La posición del pico $F_{7/2}$ es 84,0 eV y el ancho del mismo, 1,0 eV. En la señal de S 2p también puede aparecer una componente en ~ 163 eV, correspondiente a moléculas de tiol libre, como se observa en la Fig. 4.3a (el doblete $2p_{3/2}$ y $2p_{1/2}$ no está bien resuelto, y nos referiremos siempre a la posición $2p_{3/2}$). Esta señal desaparece si se continúa el lavado de la superficie y es más difícil de eliminar cuanto más larga sea la cadena hidrocarbonada del tiol debido al aumento de las fuerzas intermoleculares.

Durante mucho tiempo se describió la interfase tiol-Au(111) como una superficie de Au(111) sobre la que se adsorben las moléculas de tiol en huecos tetraédricos, posiciones puente o sitios intermedios sin causar reestructuración geométrica de la superficie metálica. Sin embargo, actualmente se conoce que la adsorción de tioles sobre Au produce una fuerte reconstrucción superficial del metal. Se han propuesto diferentes modelos para describir esta interfase, algunos de los cuales se basan en resultados obtenidos con *clusters* de Au, descritos más adelante. Varios de estos modelos proponen la presencia de especies del tipo RS–Au–SR (denominados *staples*), donde las moléculas de tiolato se encuentran unidas a adátomos de Au que se generan en el proceso de formación de la SAM [11, 12].

Desde las primeras imágenes STM tomadas de SAM ha estado en discusión el origen de los huecos (*pits*) encontrados en la superficie y su relación con la reconstrucción superficial. El lector interesado puede encontrar interesantes discusiones sobre este tema en las revisiones de Vericat y colaboradores [1, 7, 13].

4.1.2 Nanopartículas y *clusteres* de Au - Interfase Au-tiol

En el año 1994, M. Brust et ál. publicaron un método para la síntesis de AuNPs cubiertas por alcanotioles, conocido actualmente como método de Brust-Schiffrin de dos fases (BS-II) [14]. Luego, en el año 1995, fue publicada una variante de este método para la preparación de AuNPs

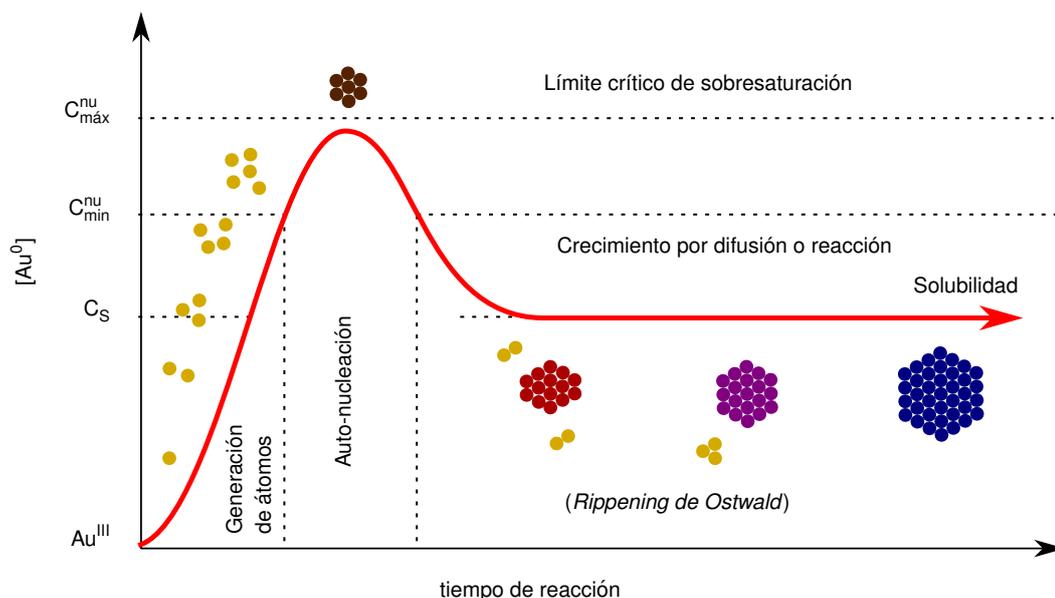


Figura 4.4 Diagrama de del proceso de nucleación y crecimiento de AuNPs en relación a la concentración de Au^0 y el tiempo de reacción.

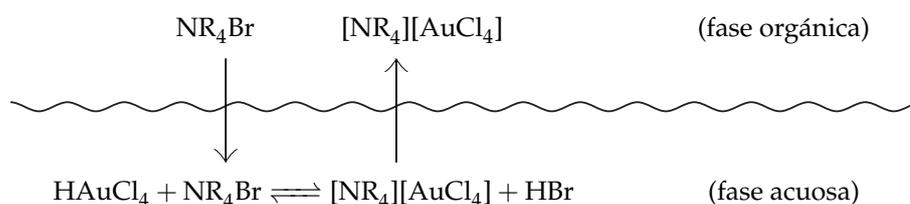
hidrofílicas, que se lleva a cabo en una sola fase de un solvente polar (en general metanol/agua) [15]. Este método de síntesis es conocido como método de Brust-Schiffrin de una fase (BS-I). Desde la publicación de estos métodos, han aparecido un sinnúmero de trabajos en los que se utilizaron estas rutas para la preparación de AuNPs y se han extendido también a otros metales como Ag [16], Cu [17], Pd [18] y Pt [19].

En principio, la formación de NPs en un medio líquido puede interpretarse mediante el modelo de nucleación y crecimiento de un cristal como se muestra en la figura 4.4. Por ejemplo, en la síntesis de AuNPs mediante el método de Turkevich [20] el $HAuCl_4$ es reducido por el citrato a $\sim 100^\circ C$, y luego de unos minutos de reacción la solución incolora (o amarillo pálido) cambia de color. Inicialmente se torna de un color violáceo que rápidamente pasa a rojo aumentando la intensidad al cabo de unos minutos. En ese caso, el crecimiento se detiene debido a la repulsión electrostática de la doble capa eléctrica de la superficie de la AuNP generada por las especie de citrato adsorbidas. Generalmente por este método se obtienen AuNPs de un tamaño mayor a los 10 nm con una considerable dispersión de tamaño. Otras síntesis utilizan citrato como agente protector, pero la reducción del $HAuCl_4$ se hace en frío empleando $NaBH_4$, con lo que se obtienen AuNP con un tamaño mayor a 3 nm que se pueden usar como "semillas" que crecen controladamente generando AuNPs de 5 a 40 nm con una distribución relativamente estrecha [21].

El éxito de los métodos de Brust y Schiffrin radica principalmente, en que permiten obtener NPs de tamaño menor a 5 nm con una distribución de tamaños razonablemente estrecha. El grupo de R. W. Murray ha perfeccionado el método de dos fases, BS-II y lo ha sistematizado para controlar el tamaño de las NPs obtenidas en base a diferentes parámetros variables en la síntesis, como la relación molar Au:tiol, la temperatura y la velocidad de agregado del agente reductor [2].

Este método consiste en la reducción de un precursor de Au, como ácido tetracloroáurico

(HAuCl_4),¹ mediante un reductor fuerte, que generalmente es borohidruro de sodio (NaBH_4), en presencia de tioles de carácter hidrofóbico, como los alcanotioles. La solución acuosa del precursor de Au se coloca en contacto con un solvente orgánico de baja polaridad (generalmente tolueno) donde se encuentra disuelta una sal de amonio cuaternaria (NR_4X), que puede ser bromuro de tetraoctilamonio (TOABr) u otra con diferente largo de cadena hidrocarbonada. El catión de esta sal actúa como agente de transferencia de fase, produciendo el transporte de los iones $[\text{AuCl}_4]^-$ desde la fase acuosa a la fase orgánica. Posteriormente, se descarta la fase acuosa y la fase orgánica puede ser lavada con agua Milli-Q para eliminar el HBr que pueda permanecer, proveniente de la fase acuosa. En el siguiente gráfico se esquematiza el proceso de transferencia de fase [22]:



Una vez que se obtiene el precursor metálico en la fase orgánica, se agrega el tiol que se usará para proteger a las NPs que se sintetizarán. Estas moléculas producen una reducción de las especies de Au^{III} a Au^{I} . Durante más de 15 años desde la publicación de este método de síntesis, era aceptado que el agregado de tioles producía la formación de especies poliméricas de $[\text{Au}^{\text{I}}-\text{SR}]_n$ de acuerdo a las siguientes reacciones [23]:²



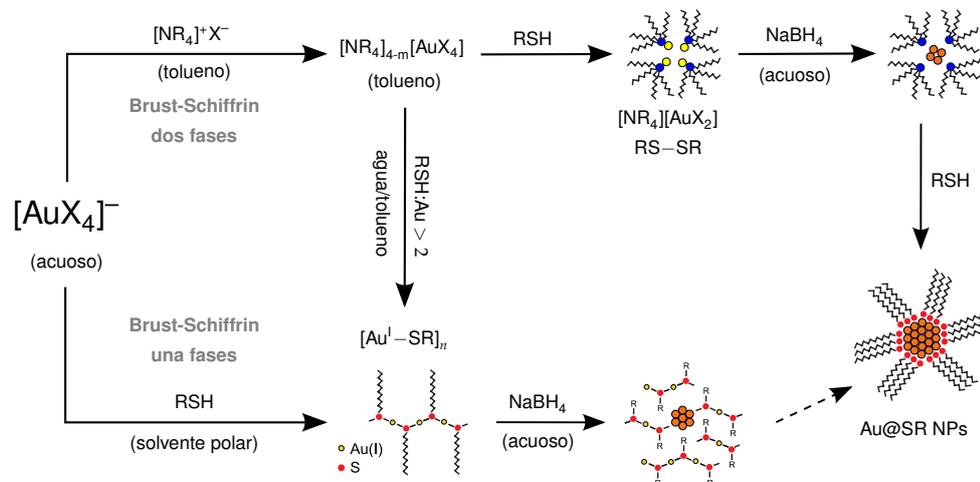
Sin embargo, experimentos recientes realizados por el grupo de R. B. Lennox [4], han demostrado que los precursores reales en la síntesis de NPs son pares iónicos de tetraalquilamonio y halogenuros de Au^{I} , en lugar de las especies poliméricas. Mediante medidas de espectroscopía UV-vis y de resonancia magnética nuclear protónica (^1H RMN) encontraron que la estequiometría de la reacción es la siguiente:



Posteriormente, el grupo de Y. J. Tong ha confirmado este hallazgo mediante experimentos de espectroscopía Raman y ha propuesto un mecanismo que indica que las especies de Au^{I} se encuentran en la fase orgánica encapsuladas dentro de las micelas inversas formadas por los cationes de tetraalquilamonio [17]. Además, estos autores encontraron que si no se quita la fase acuosa del medio de reacción antes del agregado del tiol y la relación molar $\text{RSH}:\text{Au} \geq 2$, entonces los intermediarios en la síntesis están compuestos por una mezcla de $[\text{NR}_4][\text{AuX}_4]$ y $[\text{Au}^{\text{I}}-\text{SR}]_n$ [24]. Condiciones similares fueron utilizadas por Whetten et ál. anteriormente, quienes

¹Como se explicó anteriormente, este método puede ser utilizado con distintos metales. Debido a que en este capítulo se utiliza Au, describiremos los detalles del método utilizando este metal.

²Debido a que los iones bromuro de la sal de amonio pueden ser intercambiados con cloruros en la esfera de coordinación del Au^{III} , los complejos de Au en la fase orgánica son llamados simplemente $[\text{AuX}_4]^-$.



Esquema 4.1 Esquema de los dos métodos de Brust-Schiffrin para síntesis de AuNPs. adaptado de la ref. [27]

propusieron un mecanismo como el dado por la Ec. 4.3 [25, 26]. Este comportamiento también fue comentado por Goulet y Lennox [4], quienes lo atribuyeron a la ruptura o la ausencia de los pares iónicos $[\text{NR}_4][\text{AuX}_4]$. Por lo tanto, el agua (y, como veremos más adelante, los solventes polares en general) juegan un rol importante en esta síntesis. El esquema 4.1 muestra un resumen de los mecanismos de reacción para ambos métodos desarrollados por Brust y Schiffrin.

Luego de la adición de tiol, el próximo paso es el agregado del reductor para producir las NPs. En general, se utiliza NaBH_4 en un gran exceso respecto al metal ($\text{NaBH}_4:\text{Au} \sim 10:1$). Este reactivo produce la reducción de las especies de Au^{I} a Au^0 , creándose así núcleos de Au metálico en el interior de las micelas inversas [17]. A medida que estos aglomerados crecen, protegidos por tetraalquilamonio, las moléculas de tiol (ahora en forma de RS-SR o mezcla de ambos si la relación molar $\text{RSH}:\text{Au} > 2$, también el BH_4^- puede reducir el RS-SR para dar RSH) se adsorben en la superficie de estos núcleos limitando su crecimiento como NPs, es decir, en el rango de algunos nanómetros, evitando su aglomeración con otras partículas. De esta forma, se producen AuNPs protegidas por tiolato (Au@SR NPs). Este proceso puede esquematizarse de la siguiente manera:



El método BS-I permite sintetizar AuNP recubierta por tioles hidrosolubles [28]. En este caso, se ha propuesto la formación de tiolatos de Au^{I} , los cuales pueden presentar inconvenientes en la reducción del metal debido a la estabilidad de estos complejos poliméricos. Por ejemplo, al intentar sintetizar AuNPs recubiertas por ácido tiomálico (TMA) no se logra reducir completamente los oligómeros de $[\text{Au}^{\text{I}}-\text{TMA}]_n$, y se obtienen nanopartículas formadas por un núcleo de Au^0 y una capa de tiolato de Au^{I} con una estructura del tipo carozo-coraza AuNP@Au(I)-TMA [29].

El grupo de Schiffrin también ha utilizado el método bifásico para sintetizar AuNP protegidas por TOABr, donde se agrega el reductor sin haber agregado un tiol, obteniendo partículas con un tamaño de 5 a 6 nm [30]. Justamente aquí el tamaño de la AuNP@TOAB esta controlado por la micela. Leff y colaboradores utilizaron un procedimiento similar en el cual adicionan en la

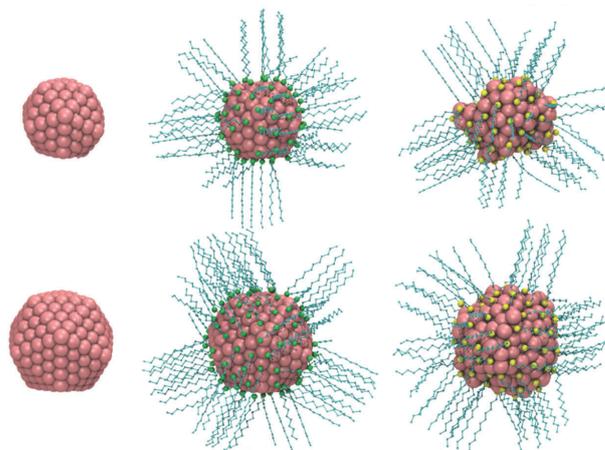


Figura 4.5 De izquierda a derecha, AuNPs sin agente protector, protegidas por dodecilamina y protegidas por dodecanotiol. La fuerza del enlace S-Au logra deformar la superficie de la AuNP. Adaptado de la ref. [33]. ©Royal Society of Chemistry.

reacción un exceso de de alquilaminas primarias (Au:amina es 1:11) con el cual obtienen AuNP de 3 a 4 nm donde se postula que las aminas realmente interaccionan con la superficie metálica [31]. Estas AuNPs presentan cierta inestabilidad y tiende a aumentar de tamaño o precipitar irreversiblemente, ya que el agente protector interacciona débilmente con la superficie de Au. En ese sentido, este tipo de AuNPs son muy útiles para practicar reacciones de intercambio de ligandos, por moléculas que se unan mas fuertemente a la superficie, como lo hacen por ejemplo los tioles [32].

La fuerte interacción con el Au de la superficie que presentan los tioles no solo se debe a la fuerte unión covalente Au-S, sino también a las fuerzas de Van der Waals entre las cadenas carbonadas. Los alcanotioles de cadena larga, presentan una fuerte interacción entre cadenas, similar a lo observado para superficies planas discutido anteriormente. El grupo del Dr. Mariscal en la Universidad de Córdoba ha desarrollado una metodología para simular la interacción de las cadenas alquílicas en la NPs, así también como los cambios estructurales que sufre el núcleo metálico [33]. La figura 4.5 muestra un ejemplo de las alteraciones que sufre una nanopartícula de Au protegida por alcanotioles en contraste con su análoga recubierta con alquilaminas que conserva su estructura cristalina. En este sentido, si en las reacciones de intercambio de ligandos se emplea un exceso de tioles, se puede disminuir considerablemente el tamaño de las NPs y se ha empleado como un método de obtención de clusters de Au [34].

Mediante el control de las condiciones de síntesis y la separación de las partículas sintetizadas en base a su tamaño, los métodos de Brust-Schiffrin han sido utilizados para la preparación de *clusters* de Au. El grupo de T. Tsukuda ha sido pionero en este campo, sobre todo en la aplicación de espectrometría de masas para el estudio de la composición de los *clusters* [35].

En el año 2007 el grupo de R. Kornberg describió la estructura de un cristal formado por *clusters* de Au cubiertos por ácido *p*-mercaptobenzoico, a partir de medidas de difracción de rayos X (*X-ray diffraction*, XRD) [3]. Esto significó un gran avance en la comprensión de la estructura de

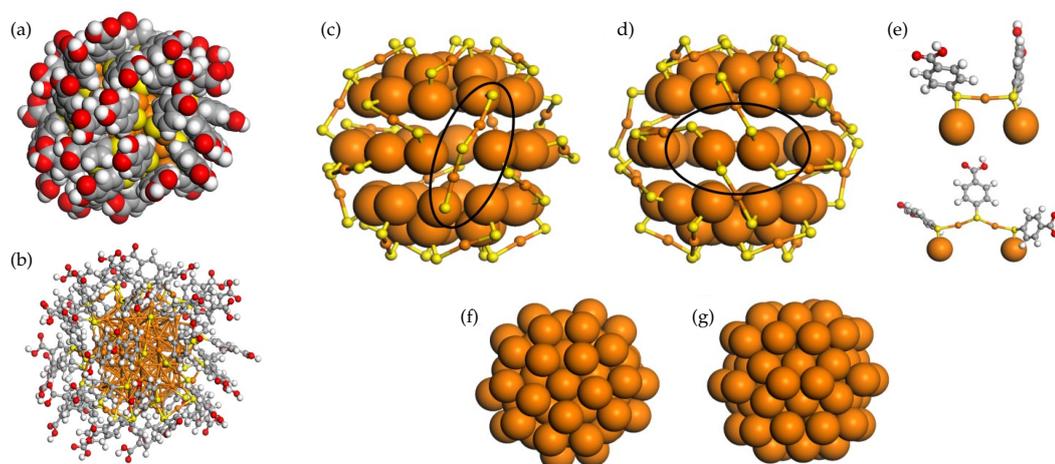


Figura 4.6 Estructura Carozo-Coraza (*core-shell*) del cluster $\text{Au}_{102}(\text{p-MBA})_{44}$. (a y b) muestran la estructura general del cluster. Au, naranja; S, amarillo; C, gris; O, rojo; H, blanco. (c y d) dos vistas de la estructura de 40 átomos en la superficie del núcleo Au_{79} , junto con la capa pasivada de $\text{Au}_{23}(\text{p-MBA})_{44}$. Los cationes de Au en la capa externa son descritos como esferas naranjas más pequeñas. Los “defectos de estructura” en la interfase carozo-coraza [dos átomos de Au con dos uniones Au-S, y una unidad más grande de $\text{RS}-(\text{AuSR})_2$] están resaltadas con una elipse. (e) esquema de la estructura de la capa protectora $\text{RS}-(\text{AuSR})_x$ con $x = 1$ o 2 unidades. Reciben el nombre de *staple motif*, “grampa” (f y g) dos vistas del carozo de Au_{79} , el cual tiene una simetría D_{5h} . Adaptado de la ref. [36]. © 2008 National Academy of Sciences.

estos sistemas. La fórmula de este *cluster* es $\text{Au}_{102}(\text{p-MBA})_{44}$ (Fig. 4.6a). Son preparados por el método de Brust-Schiffrin de una fase y consisten en un núcleo de 79 átomos Au formando un decaedro de Marks (Fig. 4.6 f y g), cubierto por dos tipos de estructuras similares a las encontradas en los tiolatos de Au^{I} : $\text{RS}-\text{Au}-\text{SR}$ y $\text{RS}-\text{Au}-\text{SR}-\text{Au}-\text{SR}$ “*staples*” (Fig. 4.6 c, d y e).

Este hecho dio lugar al desarrollo de una interpretación de la estabilidad de estos *clusters* por el grupo de H. Häkkinen [36], en base al modelo de superátomos, que compara a estos *clusters* con los elementos de la tabla periódica e indica que las estructuras estables son aquellas cuya capa electrónica se encuentra cerrada (en analogía a los gases nobles). Un aspecto interesante de los cálculos sobre estos *clusters* en el marco de DFT está referido al estado de oxidación de los átomos de Au. Si bien se ha propuesto que los 79 átomos del núcleo se encuentran en estado metálico –con carga neutra (Au^0)– y los 23 átomos restantes en estado oxidado (Au^{I}) [36], existe, en realidad, una distribución de carga en la partícula si se la analiza radialmente, que va desde una carga de Bader³ nula en el centro hasta +0,13 en la capa exterior [38].

Aunque el estudio de *clusters* metálicos es de larga data, las descripciones suponían anteriormente que la capa protectora de tiol sobre los *clusters* no ejercía una influencia notable en el núcleo metálico [39]. Garzón et ál. [40] cuestionaron esta aproximación e informaron resultados de cálculos

³El método de Bader descompone la densidad de carga electrónica del sistema en contribuciones individuales de cada átomo que compone el sistema [37]. Valores positivos indican pérdida de electrones y valores negativos indican ganancia de electrones.

los teóricos en los que se observa que una capa de tiol sobre un *cluster* de Au produce un desorden importante de los átomos del metal. Es decir, las moléculas de tiol no sólo cubren los núcleos de Au sino que cambian totalmente su estructura geométrica y electrónica. De este modo, al estudiar estos *clusters* hay que considerar tanto los átomos metálicos como las moléculas que los protegen. Esto se encuentra alineado a la reconstrucción superficial que ocurre en las SAMs de tiolatos sobre superficies planas de Au.

Otros *clusters* que han sido cristalizados y cuya estructura ha sido determinada son los que contienen $\text{Au}_{25}(\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{Ph})_{18}^-$ [41] y $\text{Au}_{38}(\text{SC}_2\text{H}_4\text{Ph})_{24}$ [42]. Es particularmente interesante que la estructura del *cluster* de $\text{Au}_{38}(\text{SR})_{24}$ fue predicha teóricamente [43], hecho que refuerza la importancia de los cálculos computacionales.

Si bien se considera que la estructura superficial de las AuNPs debe ser similar a la encontrada en los *clusters*, aún no existe evidencia directa que confirme este postulado. Un paso importante en esta dirección ha sido presentado recientemente por el grupo de R. Jin, quienes informaron la preparación de AuNPs con una composición controlada, cuya fórmula es $\text{Au}_{333}(\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{Ph})_{72}$ y su tamaño, 2,2 nm [44].

Por todo esto, se ha propuesto un modelo generalizado para la interfase Au-Tiol (tanto en NPs como en superficies planas) conocido como *Staple Motif*, el cual considera que las moléculas de tiol se encuentran unidas a los *adátomos* de Au en la superficie [8].

4.2 AuNPs obtenidas por el método de Brust-Schiffrin de dos fases

Se sintetizaron AuNPs de tres tamaños diferentes mediante el método de dos fases de Brust-Schiffrin empleando dodecanotiol (SC_{12}) como agente protector según lo descrito en la sección 3.2. Para las distintas síntesis se usó una relación Au:tiol de 3:1 y 2:1 a temperatura ambiente, y 1:4 a 0 °C. Se intentó también una síntesis con una relación Au:tiol de 1:5 a -78 °C para obtener AuNP de $\sim 1,5$ nm [2], pero se formó un sólido blanco insoluble en tolueno que no permitió continuar con la síntesis (se supone que se formó tiolate de Au, ya que estas especies son insoluble en tolueno).

La figura 4.7 muestra los espectros de absorción UV-Vis de estas AuNPs- SC_{12} en hexano. Presentan el espectro típico de dispersión de la luz producido por la NP mostrando el aumento de la absorbancia a bajas longitudes de onda. A ~ 520 nm presentan una banda de absorción del plasmón del Au (NP esféricas), la cual disminuye con el tamaño de la partícula.

En la figura 4.8 se muestra la distribución de tamaños e imágenes TEM y HRTEM de las AuNPs sintetizadas. Para simplificar la escritura, de ahora en adelante nombraremos a cada una de estas partículas por su tamaño aproximado 4, 3 y 2 nm.

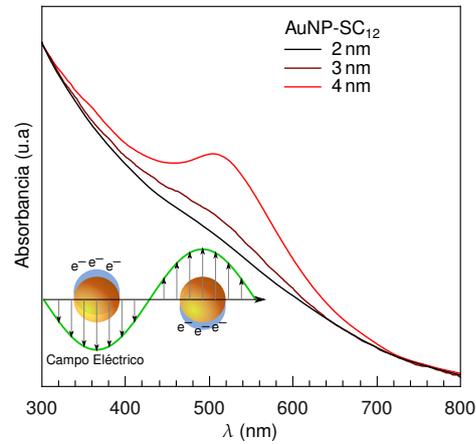


Figura 4.7 Espectros de absorción UV-Vis de nanopartículas de diferentes tamaños. La banda a ~ 520 nm corresponde a la absorción del plasmón de Au.

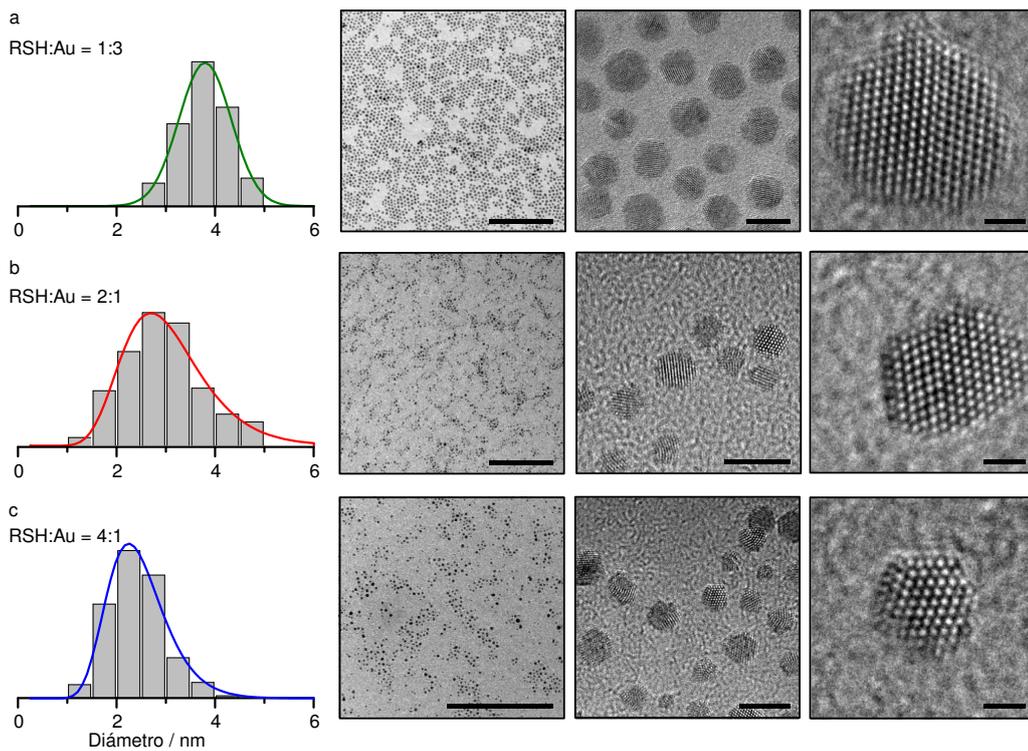


Figura 4.8 AuNPs protegidas con dodecanotiolato preparadas por el método bifásico de Brust-Schiffirin utilizando diferentes relaciones molares de tiol:Au. **(a)** Relación molar Au:tiol = 3:1, temperatura ambiente, $\langle D \rangle = 3,9 \pm 0,6$ nm. **(b)** Relación molar Au:tiol = 1:2, temperatura ambiente, $\langle D \rangle = 3,0 \pm 0,9$ nm. **(c)** Relación molar Au:tiol = 1:4, 0°C , $\langle D \rangle = 2,5 \pm 0,6$ nm. Las imágenes de TEM de baja resolución fueron tomadas con el microscopio Phillips CM 200 UT operado a 200 kV y las de HRTEM, con el microscopio OÅM operado a 300 kV. Escalas: imágenes a la izquierda: 100 nm, imágenes al centro: 5 nm, imágenes a la derecha: 1 nm.

Caracterización por XPS

La información obtenida mediante XPS es muy valiosa, porque se puede estimar la composición de la superficie de un material. De todos modos, los datos deben ser tratados con cuidado para no cometer errores de interpretación. Al igual que otras técnicas analíticas deben ser complementadas con información proveniente de otros métodos. Un error muy común en la interpretación de los espectros, radica en agregar una componente extra para mejorar el ajuste. Cuantas mas funciones se utilicen mejor será el ajuste, pero eso no implica que cada función represente una especie química que contribuye al espectro. Es muy importante disponer de una señal de referencia para recalibrar la escala de energía y así compensar efectos de carga eléctrica del material o inestabilidad de la fuente de rayos X –esto último ocurre frecuentemente con la radiación de luz sincrotrón. En este punto, el error mas común que se encuentra en la bibliografía donde se utiliza XPS para caracterizar NPs es, usar la señal de Au $4f_{7/2}$ de las AuNPs que se están analizando y asignarles el valor de 84,0 eV como referencia. En ese caso, se puede perder información muy valiosa de corrimiento de esa señal debido a estado de oxidación y efectos de estado final, entre otros. Es importante considerar que el acceso a realizar experimentos con luz sincrotrón no es inmediato y suele transcurrir cierto tiempo desde la preparación de las muestras y la caracterización por XPS, durante el cual las NPs pueden sufrir cambios (oxidación del tiol, formación de sulfuro, agregación irreversible de los núcleos metálicos, etc).

Por último, siempre se debe considerar la posibilidad de que ocurra daño por radiación durante el experimento, principalmente en la capa orgánica que recubre las NPs. Los espectros tomados con fuente de Mg $K\alpha$ necesitan largos tiempos de adquisición debido al bajo flujo de radiación, 5×10^{12} fotones $s^{-1} cm^{-2}$, y a que el factor de sensibilidad de Scofield para el S $2p$ es 10 veces menor que para el Au $4f$, por lo que son necesarios varios barridos en la escala de energía (scans) para adquirir datos suficientes y así aumentar la relación señal ruido. La sección de muestra irradiada

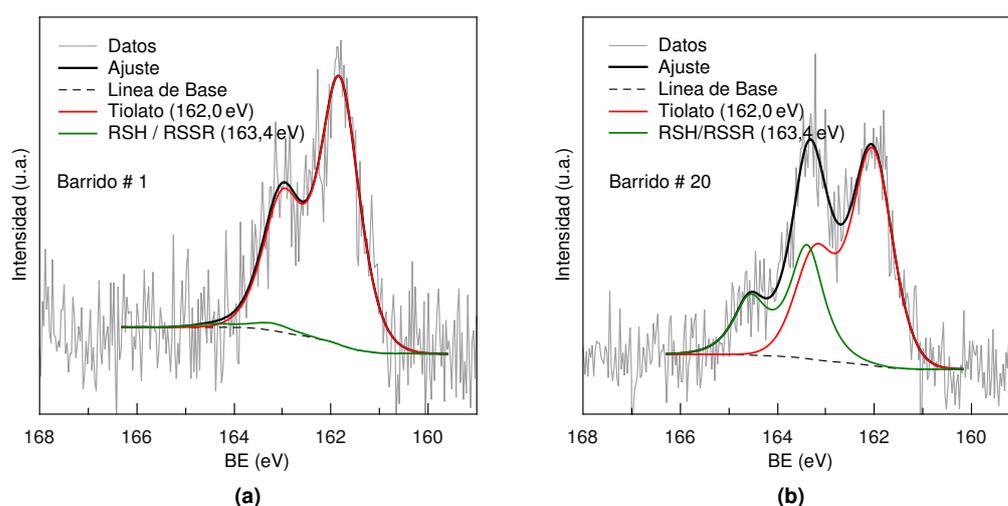


Figura 4.9 Daño por radiación en una muestra de AuNP@SC₁₂ de 4 nm utilizando rayos X de 523 eV en la línea PGM, para (a) un barrido y (b) luego de 20 barridos

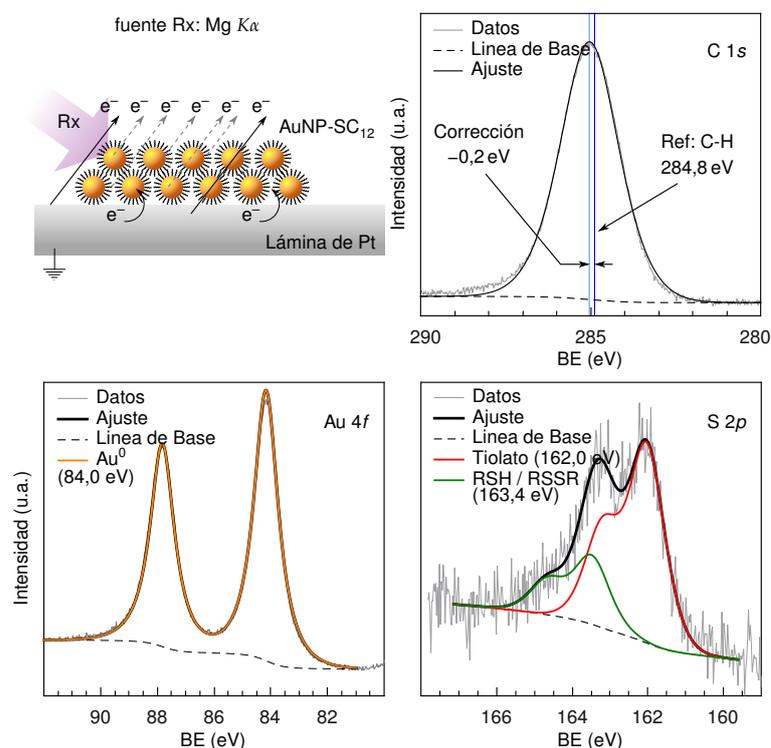


Figura 4.10 Esquema que representa las AuNPs soportadas sobre una lámina de Pt y al proceso de fotoemisión. Los espectros XPS de las regiones C 1s, Au 4f y S 2p tomados con fuente de Mg $K\alpha$, de una muestra de AuNP@SC₁₂ de $2,5 \pm 0,6$ nm depositada sobre una lámina de Pt.

es de forma elíptica de $\sim 1a2 \text{ cm}^2$ (dependiendo de la posición de la muestra a la fuente de Rx), por lo que generalmente se analiza toda la muestra. Por otro lado, en los experimentos realizados en el LNLS se tiene un flujo de 1×10^{14} y 2×10^{14} fotones $\text{s}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ a 250 y 523 eV, respectivamente, con una sección de irradiación de $0,12 \text{ mm} \times 0,8 \text{ mm}$. Cada medida consistió de un único barrido (~ 80 s) con el que se obtenía una muy buena relación señal ruido, no solo debido al alto flujo de fotones sino también a que aumenta la probabilidad de eyectar un electrón del nivel S 2p a baja energía de irradiación (ver fig. 2.5). Hemos tomado espectros de una misma región de la muestra a lo largo del tiempo, y como muestra la figura 4.9 se observa un incremento en la componente de 163,4 eV para la señal de S 2p luego de varios barridos.

La figura 4.10 muestra un buen ejemplo de corrección de la escala de energía por carga eléctrica de la muestra, utilizando el pico de C 1s como referencia. Si bien las AuNP@SC₁₂ fueron depositadas sobre una lámina de Pt para mejorar el contacto eléctrico y evitar así que las partículas se carguen positivamente, como consecuencia de la fotoemisión de electrones. Sin embargo, se observó un corrimiento de la escala de energía de 0,2 eV hacia mayores energías de enlace. Es interesante notar que los picos de Pt 4f se encontraban en las posiciones correctas, lo que indica que sólo se carga la muestra depositada sobre la lámina. Es posible que el dieléctrico formado por las capas de tioles no permita buen contacto eléctrico entre las AuNPs y el sustrato. Al corregir la escala de energía, los picos de Au 4f y S 2p presentan los mismos valores que se obtienen para

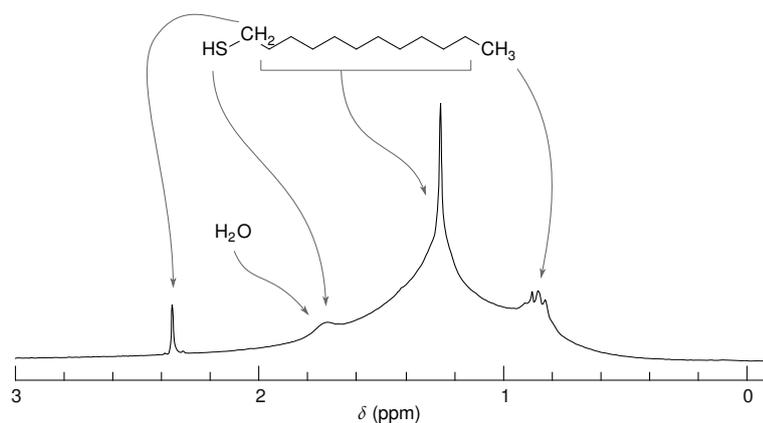


Figura 4.11 Espectro ^1H -RMN de AuNP@SC_{12} de 2 nm en CDCl_3 tomado en un espectrómetro Varian 200 MHz.

una SAM de dodecanotiol sobre Au(111). De esta manera, se observan pequeños cambios en la energía de enlace de cada componente al ajustar espectros de muestras que presentan los mismos constituyentes. Es importante notar que la región S $2p$ requirió dos componentes para ser ajustada. La componente centrada en 162,0 eV se corresponde con la señal asignada a un tiolato en una SAM sobre Au(111), mientras que la señal de 163,4 eV se interpreta como tiol libre (fisisorbido) o dialquildisulfuro. La componente de tiolato representa el 86 % de la señal y el tiol libre el 14 % restante.

El origen de la componente a mayor energía de enlace, en un principio fue asociada a deficiencias en la purificación, de manera similar a lo que ocurre con una SAM. Para SAMs sobre oro masivo, esta señal se elimina fácilmente enjuagando por más tiempo. En el caso de las AuNPs, esto no es tan fácil de realizar. Sucesivos lavados, no presentaron diferencias en la abundancia de esta componente. Debemos considerar, además, que este tiol fisisorbido puede estar intercalado entre las cadenas de tiol que se encuentra unido covalentemente a la superficie metálica. Como se observa en la figura 4.5, quedan muchos intersticios entre las cadenas alquílicas donde se pueden intercalar otras cadenas de dodecanotiol que no se une covalentemente a la superficie metálica. Por otro lado, hay que considerar la posibilidad que durante la caracterización por XPS, la componente de S $2p$ a 163,4 eV sea producto del daño causado por la radiación durante la adquisición del espectro. En un intento por determinar la presencia de tiol libre en las AuNPs@SC₁₂ se tomó un espectro de resonancia magnética nuclear de hidrógeno (^1H -RMN). La figura 4.11 muestra el espectro obtenido, donde se puede observar que la señal de δ_{SH} -proveniente solo del tiol libre- no se define (y por lo tanto no puede ser cuantificada) por estar montada sobre el pico muy ancho de $-\text{CH}_2-$. Asimismo, muy cercana al δ_{SH} se encuentra el posible pico de $\delta_{\text{H}_2\text{O}}$ (agua en CDCl_3), que no permite la adecuada cuantificación del tiol libre.

Continuando con la caracterización de las AuNPs, hemos intentado estimar por XPS la fracción de la superficie que se encuentra cubierta por dodecanotiolato. Para comprobar que la ecuación 2.24 daba resultados adecuados, se estimó el cubrimiento de una serie de SAMs de dodecanotiol sobre Au(111). En el arreglo experimental disponible en INIFTA, se determinó que una monocapa

Tabla 4.1 Estimación del cubrimiento superficial de dodecanotiol sobre Au plano y nanopartículas

Muestra	Fuente Rx	$h\nu$ (eV)	S/Au at ^a	Comp Tiolato (%)	θ_{RS}^{emp} ^b	θ_{RS}^{calc} ^c	dif (%)	
SAM	I	Mg $K\alpha$	1253.6	0.050	100	0.30	0.28	-5.01
	II	Mg $K\alpha$	1253.6	0.052	92	0.31	0.29	-5.01
	III	Mg $K\alpha$	1253.6	0.048	85	0.28	0.27	-5.01
	IV	Mg $K\alpha$	1253.6	0.059	100	0.35	0.33	-5.01
2nm		Mg $K\alpha$	1253.6	0.127	74		0.71	
		LNLS	523	0.545	81		1.90	
		LNLS	250	0.268	77		2.92	
3nm		Mg $K\alpha$	1253.6	0.307	89		1.72	
		LNLS	523	0.242	81		0.84	
		LNLS	250	0.131	82		1.43	
4nm	4 lav	Mg $K\alpha$	1253.6	0.154	79		0.86	
	8 lav	Mg $K\alpha$	1253.6	0.116	68		0.65	
	8 lav	LNLS	523	0.250	97		0.87	
	8 lav	LNLS	250	0.135	70		1.47	

^a Para las medidas realizadas en INIFTA $S/Au = \frac{I_S}{I_{Au}} \frac{RSF_{Au}}{RSF_S}$ y para las medidas realizadas en el LNLS $S/Au = \frac{I_S}{I_{Au}} \frac{\sigma_{Au} L_{Au}}{\sigma_S L_S}$.

^b Calculado empíricamente. En el arreglo experimental de INIFTA se ha determinado la relación $S/Au = 0,056 \equiv \theta = 0,33$.

^c Se calcula multiplicando la relación S/Au por los factores correspondientes a la atenuación de la señal según la ecuación 2.24.

autoensamblada de dodecanotiol sobre Au(111) conduce a una relación atómica S/Au igual a 0,056. Por otra parte, se espera que el cubrimiento de las SAMs de alcanotioles con baja densidad de defectos sea de $\theta_{SC_{12}} = 1/3$ [45]. La tabla 4.1 muestra los resultados para los cubrimientos empíricos y calculados para SAMs y AuNPs. Se puede observar que el cubrimiento calculado θ_{RS}^{calc} es muy similar a los valores determinados empíricamente.

Es de esperar que las AuNPs muestren un mayor cubrimiento superficial respecto de una SAM en el plano. Olmos-Asar y colaboradores [46] calcularon el cubrimiento para superficial de AuNPs de diferente tamaño y forma obteniendo valores de $\theta \approx 1$ para clusteres y $\theta \approx 0,4$ para partículas de ~ 4 nm. En este sentido, no disponemos –por el momento– en nuestro laboratorio de una relación empírica entre el cubrimiento superficial de AuNPs de distintos tamaños y su relación atómica S/Au determinado por XPS. Por esto, es importante hacer un esfuerzo en encontrar una relación para estimar el cubrimiento.

Cabe notar que en la actualidad se realizan considerables esfuerzos para estimar el espesor de las capas protectoras de las AuNPs, problema que se encuentra lejos de ser resuelto de manera

satisfactoria. Nótese que los trabajos más avanzados en esta materia [47] utilizan aproximaciones que no permiten ir más allá de estimaciones semicuantitativas [48].

La radiación de luz sincrotrón permite realizar experimentos de XPS modificando la energía de los rayos X del haz incidente. En la línea PGM del LNLS hemos utilizado radiación de 250 y 523 eV con la cual se obtiene información sólo de las primeras capas atómicas de la superficie del material. Asimismo, como se mostró en la figura 2.5 el coeficiente de fotoemisión del S aumenta a bajas energías del haz incidente, por lo que a 250 eV se tiene mayor sensibilidad. Los valores obtenidos para los cubrimientos de las AuNP@SC₁₂ en algunos casos son muy superiores a los esperados ($0,3 < \theta < 1$). Los errores mas importantes pueden provenir de diferentes fuentes:

- La ecuación 2.24 utilizada para estimar el cubrimiento superficial esta desarrollada considerando que el sistema es un sólido plano semi-infinito. Para el caso de las NPs se supone valido aproximar que a bajas energía sólo se están analizando las últimas capas de la superficie, y si el radio de la NP es mayor que el espesor muestreado, los electrones provienen de una “superficie plana”.
- Se supone que las NPs tienen una orientación al azar y por lo tanto la muestra es homogénea. Sin embargo, esto podría no ser cierto, ya que como se observa en la figura 4.5 las cadenas de tioles están orientadas respecto de las caras facetadas de las AuNPs. Además, las muestras de AuNPs que presentan una estrecha distribución de tamaños tienden a formar arreglos cristalinos (principalmente en 2D), con lo que la muestra podría presentar cierta anisotropía.
- Posiblemente la fuente de error mas importante provenga de la estimación de la atenuación que sufren los electrones por la capa orgánica de la superficie de las AuNPs. Los trabajos de Seah [49, 50] de donde se tomaron las ecuaciones 2.14 y 2.15, se intenta encontrar ajustes “universales” para todo material orgánico.

Laibinis y col. determinaron experimentalmente la longitud de atenuación de los electrones del Au 4f por las cadenas de una SAM de alcanotioles de distinto largo. [51] En ese trabajo emplearon una fuente de rayos X de cátodo de Al K α (1486,7 eV). Esta longitud de atenuación ha sido aplicada con éxito para describir SAMs de alcanotioles y α,β -alcanoditioles [52] con fuente de Mg K α . Esto es posible, dado que las fuentes de rayos X de laboratorio producen radiación de alta energía, y por lo tanto, la energía cinética de los electrones (tanto del S 2p como Au 4f) es alta. Cuando se utiliza radiación sincrotrón de baja energía los electrones eyectados tienen baja energía cinética. En estas condiciones la atenuación de los electrones es muy sensible a la naturaleza del material. Si la capa de alcanotioles que recubre las AuNPs tiene menor densidad que el promedio utilizado por Seah, [50] la atenuación calculada estaría sobrestimada (en mayor medida para el S), lo que da un mayor cubrimiento.

4.3 Reacciones de intercambio de ligandos.

Se exploró la alternativa de realizar reacciones de intercambio de ligandos sobre AuNPs preferidas por diferentes métodos, para luego modificarlas con diversos tioles sin alterar el tamaño

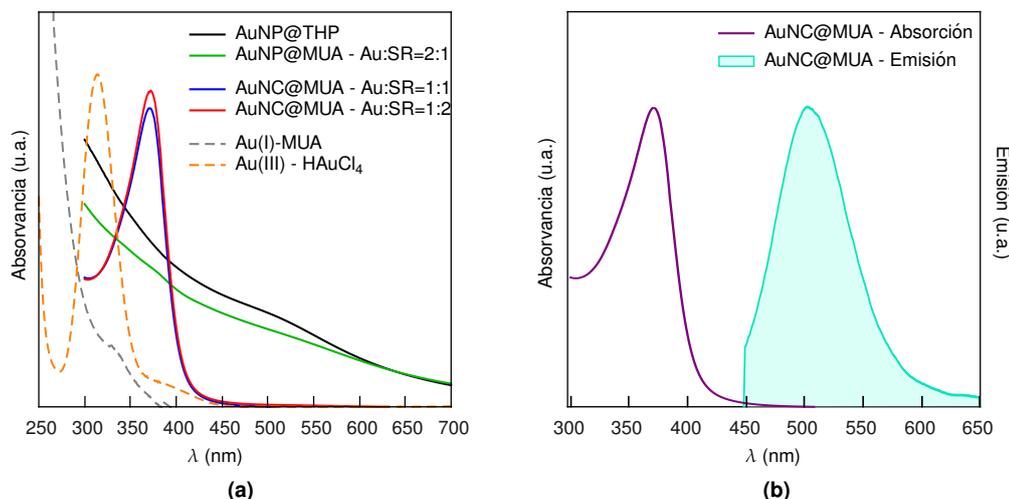
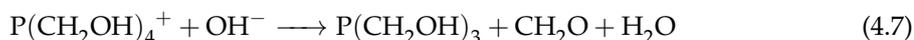


Figura 4.12 Formación de *clusters* de Au por “etching” en reacciones de intercambio. (a) espectros de absorción UV-Vis para AuNP@THP y sus reacciones de intercambio con 11-MUA para diferente relación molar Au:tiol, (b) espectro de absorción y emisión de fluorescencia de los *clusters* formados por un exceso de tiol.

del núcleo metálico. El método BS-II comentado anteriormente con la variante de no usar tioles durante la síntesis [30, 53] permite obtener AuNP@TOAB solubles en tolueno con un tamaño de 5 a 6 nm. En la sección 3.2.4 se describe detalladamente el protocolo seguido para obtener estas AuNP@TOAB.

Por otra lado, se sintetizaron AuNPs mediante el método desarrollado por Duff y colaboradores [54] que permite obtener partículas hidrosolubles protegidas con trihidroximetilfosfina (THP). Este método se desarrolló como alternativa al método de Turkevich, para obtener AuNPs hidrosolubles protegidas por un ligando neutro, como lo es la THP ($P(CH_2OH)_3$). Mediante este protocolo se pueden obtener AuNPs@THP muy pequeñas (1 a 2 nm), y los detalles experimentales de describen en la sección 3.2.5. La síntesis consiste en generar *in situ* el reductor, formaldehído (CH_2O), mediante la hidrólisis básica del cloruro de tetraquis hidroxmetileno fosfonio ($P(CH_2OH)_4^+Cl^-$)

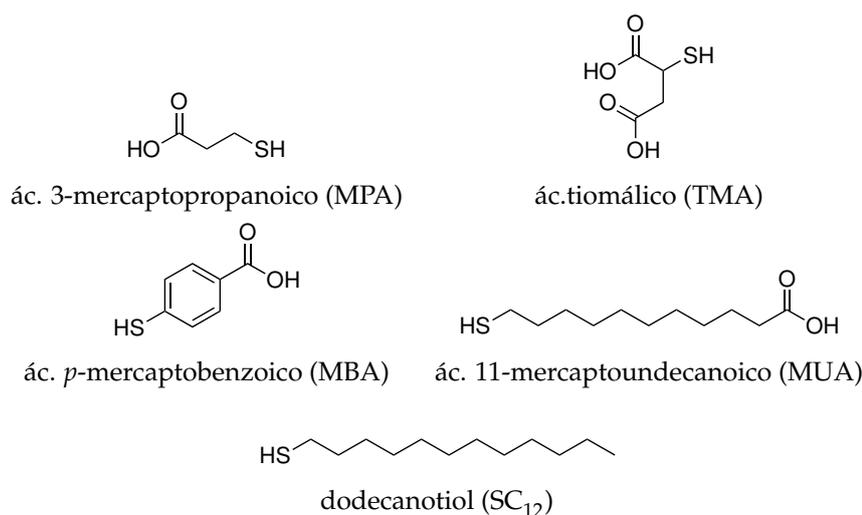


y posteriormente se agrega el precursor metálico ($HAuCl_4$) para obtener AuNP@THP. Estas partículas no son estables y con el tiempo aumentan de tamaño y finalmente precipitan irreversiblemente. Sin embargo, pueden ser utilizadas dentro unos minutos para reacciones de intercambio [55] o como semillas para crecer y generar otras nanoestructuras [56-58].

Para determinar las condiciones de reacción adecuadas para realizar un intercambio de ligandos, sea partir de una muestra de AuNP@THP, intercambiando THP por MUA, empleándose diferentes relaciones Au:tiol (2:1, 1:1 y 1:2). La figura 4.12a muestra los espectros de absorción UV-Vis para los productos de cada reacción de intercambio. La curva negra, muestra un espectro típico de AuNPs pequeñas, con una baja absorción plasmónica a 520 nm y aumento de la absorción a bajas longitudes de onda debidas a la dispersión de luz. Este espectro fue tomado a unos

pocos minutos de sintetizadas, ya que las AuNP@THP aumentan de tamaño con el tiempo, y consecuentemente aumenta su banda plasmónica (el color de la solución cambia de marrón a rojo luego de un día y finalmente violeta luego de tres días). [54] La muestra sobre la que se practicó intercambio de ligandos con una relación 2:1 de Au:tiol, presenta un espectro muy similar, el que no se modificó pasados 30 días, presentando la solución color marrón. Esto indica que el intercambio fue exitoso, ya que las AuNP no aumentaron de tamaño debido a que el nuevo ligando (MUA) que actúa como agente protector. Las diferencias que se observan se deben a que se modificó el dieléctrico alrededor de la AuNP. Al realizar el intercambio de ligandos con mayor cantidad de tiol, se observó que la solución cambió su color marrón inicial por un color amarillo pálido. El espectro de absorción UV-Vis muestra una banda estrecha a 360 nm y no presenta la forma típica de un espectro con dispersión de luz propia de NPs. Es importante notar, además, que se obtiene el mismo espectro para ambas relaciones Au:tiol. Estos resultados fueron interpretados considerando que el exceso de tiol produce una disminución de tamaños de las AuNPs, a través de un proceso de *etching*, conduciendo a agregados (clústeres) de unos pocos átomos [34]. En el mismo gráfico se muestran en línea de trazos los espectros de HAuCl₄ que es el precursor metálico en la síntesis de AuNPs y de un complejo de Au(I)-MUA, con lo que se confirma que este último compuesto no se forma en la reacción de intercambio con exceso de tiol. La figura 4.12b muestra el espectro de emisión de fluorescencia característico de clústeres de Au (AuNC@MUA) [59-61].

Además de estas reacciones de intercambio, se realizaron otras sobre las mismas AuNP@THP hidrosolubles y también sobre AuNP@TOABr solubles en tolueno. Como se comentó en la introducción de este capítulo, tanto las fosfinas como las sales de amonio cuaternario son ligandos que interactúan más débilmente que los tioles con las AuNP. Además, de la diferencia del medio (agua o tolueno) en que están disueltas las AuNP, éstas presentan diferente tamaño de carozo metálico. Sobre estos dos tipos de AuNPs se ensayaron reacciones de intercambio de ligando con diferentes tipos de tioles, en su mayoría con ácidos ω-mercaptocarboxílicos, como los listados a continuación:



Para las reacciones de intercambio se tomaron alícuotas de AuNP@THP y AuNP@TOAB recién preparadas y se las puso en contacto con los respectivos tioles disueltos en etanol para facilitar su rápida disolución en la mezcla de reacción. La relación Au:tiol en todos los casos fue 2:1

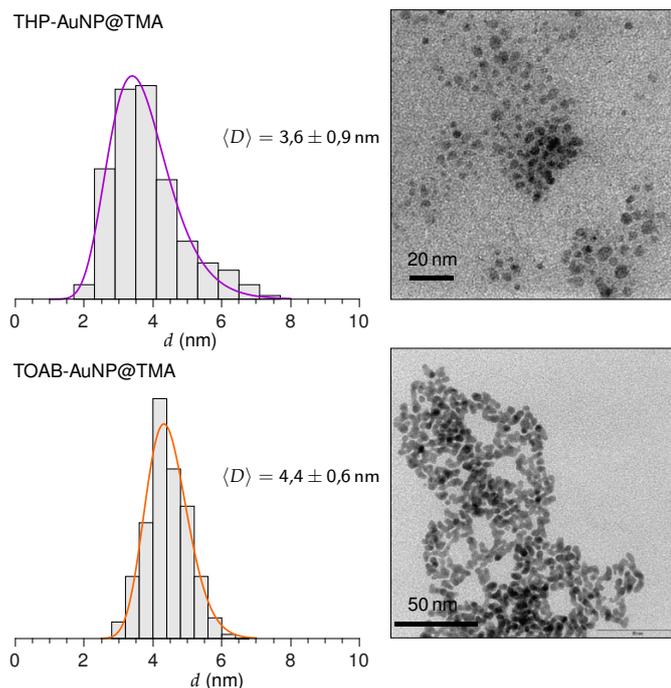


Figura 4.13 Imágenes TEM y distribución de tamaño de dos muestras de AuNP recubiertas de TMA obtenidas por intercambio de ligandos.

y se cuidó que el volumen de solución del tiol en etanol no supere el 5% del volumen de la solución de AuNPs para no modificar en mayor medida las propiedades de la solución (constante dieléctrica, densidad, pH). Se dejó en agitación y en oscuridad toda la noche para favorecer un intercambio total. A las nuevas partículas obtenidas, ahora las llamaremos THP-AuNP@tiol y TOAB-AuNP@tiol (ej. THP-AuNP@MUA) para indicar cual era el ligando inicial –THP o TOAB– y por cual se intercambió. Se observó que las TOAB-AuNP@tiol habían precipitado durante la reacción de intercambio en un lapso de 30 min a 6 h, cuando se usaron tioles con la función ácidos carboxílico. Mientras que las TOAB-AuNP@SC₁₂ son solubles en tolueno. El sólido precipitado fue lavado con una mezcla de tolueno y alcohol (9:1) y fueron precipitadas mediante centrifugación. Las TOAB-AuNP@TMA se solubilizaron directamente en agua, mientras que TOAB-AuNP@PMA y TOAB-AuNP@MUA necesitaron un medio básico para disolverse en agua (NaOH 0,01 M).

Dado que las imágenes TEM fueron tomadas en el Centro Atómico Bariloche, vale la pena resaltar algunos inconvenientes que surgen al disponer de un equipamiento al que no se tiene acceso inmediato. En algunos casos, las NPs fueron conservadas hasta cuatro meses antes de su caracterización por TEM. Por ello, fue fundamental verificar que no sufrían cambios significativos, a través del estudio de sus propiedades ópticas a lo largo del tiempo (espectroscopia UV-vis) Las AuNPs que se conservan en solución tienden a ser mas vulnerables a sufrir alteraciones (diferencias entre la temperatura de conservación y a las que se exponen durante el transporte, evaporación del solvente, etc.). La figura 4.13 muestra imágenes TEM y la correspondiente distribución de tamaños para dos muestras, THP-AuNP@TMA y TOAB-AuNP@TMA. En las imágenes se puede ver claramente que las TOAB-AuNP@TMA están un tanto mas aglomeradas que las THP-AuNP@TMA.

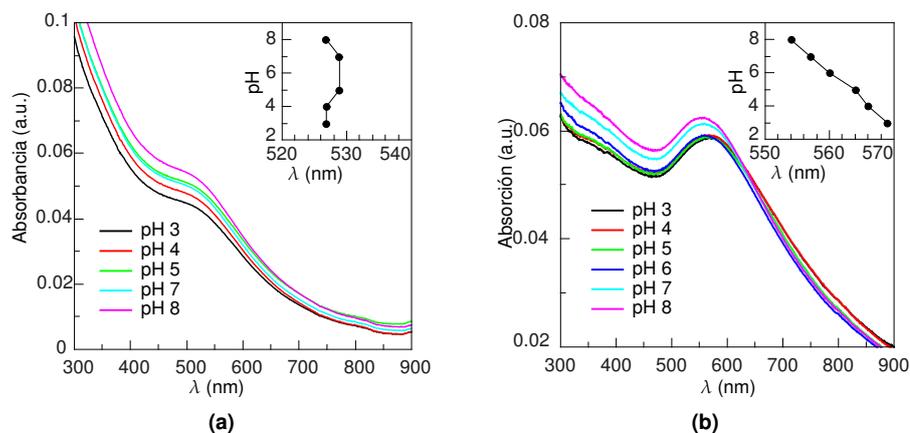


Figura 4.14 Espectros de absorción UV-Vis a diferentes pH de (a) THP-AuNP@TMA y (b) TOAB-AuNP@TMA. Los gráficos insertos muestran la variación de la posición del pico del plasmón a cada pH.

Dado que estas AuNPs están cargadas eléctricamente, pueden presentar cierto grado de aglomeramiento. Si bien este aglomeramiento puede deberse a evaporación parcial del solvente u otra causa que haya afectado la muestra, siempre se debe considerar el daño que pueden causar los electrones. En caso de contar con tioles de cadena corta y las NP se encuentran muy próximas unas de otras, el daño por radiación puede generar el aglomeramiento al momento de tomar las imágenes [29]. Por último, vale recordar que al analizar imágenes TEM para determinar la distribución de tamaños de las NPs siempre se debe tener en cuenta que se está realizando un estudio “local” de una porción de la muestra. Por lo tanto, los tamaños estimados deben ser tomados con cautela.

Por ésto, es importante recurrir a otros métodos que nos permitan obtener información global del sistema, como pueden ser, dispersión de luz dinámica o estática (DLS o SLS), dispersión de rayos X a bajo ángulo (SAXS), difracción de rayos X (DRX) o la espectroscopia de absorción UV-Vis. La figura 4.14 muestra espectros de absorción de las THP-AuNP@TMA y TOABr-AuNP@TMA, donde se observa que para las primas la banda de absorción plasmónica no está muy definida tal como lo está en las últimas. En primer momento esto sugiere que las THP-AuNP@TMA son más pequeñas que las TOABr-AuNP@TMA, ya que la intensidad y la posición del plasmón están directamente relacionadas con el tamaño del núcleo metálico. Sin embargo, la absorción del plasmón a ~ 560 nm sugiere que el tamaño de las TOAB-AuNP@TMA deberían ser mayor a los 60 nm [62] (suponiendo que ambas NPs tienen la misma composición química superficial). Estos valores no son consistentes con las imágenes TEM de la figura 4.13.

Dado que las NP recubiertas con TMA presentan solubilidad en un amplio rango de pH, son muy útiles para aplicaciones en sistemas biológicos incluso *in vivo* [63]. Se tomaron los espectros de absorción de las THP-AuNP@TMA y TOAB-AuNP@TMA en un rango de pH de 3 a 8 como se muestra en la figura 4.14. Las muestras inicialmente se encontraban a pH 8 y se agregó HCl 0,1 M para disminuir el pH. Si bien ambas muestras presentan un aumento en la absorción a bajos pH, no debe atribuirse importancia a ese comportamiento, ya que puede deberse a errores en la

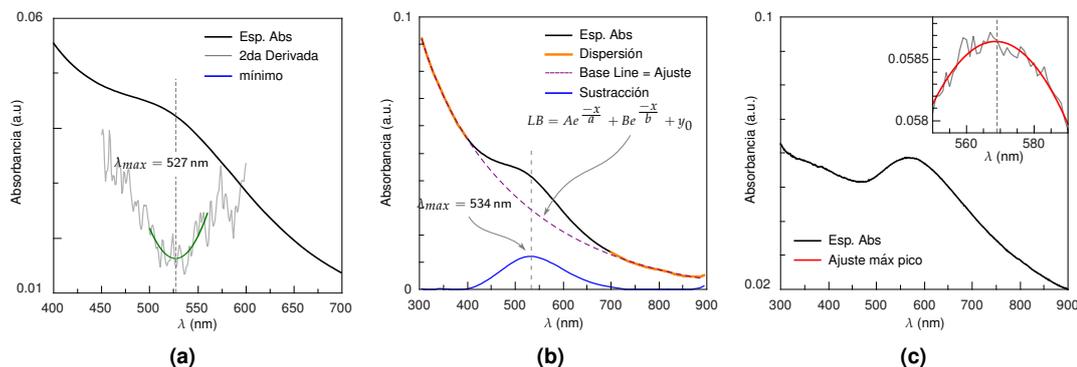


Figura 4.15 Los gráficos muestran la forma en que se determinaron las posiciones de los máximos del pico del plasmón a diferentes pH. **(a)** determinación de la derivada segunda para THP-AuNP@TMA, **(b)** estimación y sustracción de la línea de base para THP-AuNP@TMA y **(c)** determinación del máximo ajustando el pico con una parábola para las TOAB-AuNP@TMA.

corrección de los espectros debido a la dilución. Sin embargo, es importante notar los cambios en la posiciones de los picos del plasmón de las AuNPs. La figura 4.15 muestra la forma en que se determinó la posición del máximo de absorción para cada tipo de AuNP.

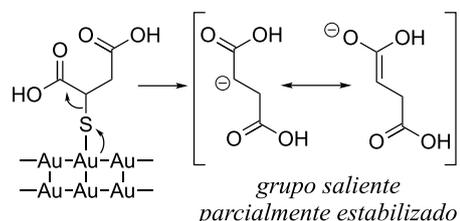
Se emplearon dos metodologías diferentes para determinar la posición del máximo. La derivada primera no permitió determinar el máximo ya que nunca cambia de signo (siempre menor a cero). Ajustando la derivada segunda con una parábola se puede determinar la posición de su mínimo, lo que permite estimar la posición de la banda del plasmón (fig. 4.15a). Por otro lado, se intentó sustraer la contribución de la dispersión (*scattering*) para obtener sólo la banda propia del pico del plasmón. Los intentos de emplear una dispersión del tipo Rayleigh (A/λ^4) o tipo Debye (B/λ^6), o una combinación de ellas, no llevaron a resultados satisfactorios. Por último, se empleó una función formada por una suma de dos funciones exponenciales, para ajustar los extremos del espectro alejado del plasmón y así estimar la contribución a la absorción debida a la dispersión (fig. 4.15b). Como era de esperar se obtienen resultados diferentes por cada método, pero no hay una tendencia de variación respecto a los cambios de pH en el caso de THP-AuNP@TMA. En cambio, para las TOAB-AuNP@TMA el pico asociado con plasmones superficiales está bien definido y es posible determinar directamente su posición, ajustando la zona cercana al máximo con una parábola.

Como un gráfico inserto en la figura 4.14, se muestra para cada tipo de AuNP la posición del máximo respecto al pH. Al modificar el pH cambia el número de cargas eléctricas de las moléculas en la superficie de la NP [64], y como es de esperar cambia el dieléctrico que la recubre. Esto afecta la distribución de cargas en el núcleo metálico y por lo tanto la posición e intensidad de la banda plasmónica, que se puede deducir directamente de las ecuaciones de Mie [26, 62]. Esto está de acuerdo con lo observado en el comportamiento de las TOAB-AuNP@TMA al mostrar corrimientos de la posición del plasmón al modificar el pH. Mientras que para las THP-AuNP@TMA no se evidencia el mismo comportamiento. Posiblemente esto se deba a las dificultades experimentales de estimar su posición y consecuente variación.

Un hecho notable es la gran diferencia en el valor del λ_{max} observado para estos dos conjuntos de AuNPs ($|\Delta\lambda_{max}| > 20$ nm), el cual no puede ser justificado interpretado como errores en la determinación de la posición del plasmón para las THP-AuNP@TMA. Tampoco puede justificarse por la diferencia de tamaño del núcleo metálico (en la fig. 4.7 se observa para AuNP@SC₁₂ de similar tamaño, que al variar el diámetro del núcleo varía la absorbancia y no la posición). Estos resultados sugieren que existe una gran diferencia en la composición (y por ende de sus propiedades) de la capa que recubre el núcleo metálico. Seguidamente, se discuten los resultados obtenidos mediante XPS al estudiar la composición de estas AuNPs, los que están de acuerdo con estas observaciones.

Estas AuNPs solubles en agua presentan un problema al momento de preparar las muestras para ser estudiadas mediante XPS. Como soporte hemos usado pastillas conductoras de Carbono (marca TED PELLA Inc.). Para poder contar con una cantidad apropiada de AuNPs, éstas se depositan por goteo sobre la superficie del sustrato y se debe evaporar el agua con corriente de N₂. Dado que las soluciones acuosas son alcalinas y tienen NaOH, las muestras deben lavarse con agua para eliminar los restos de Na⁺, el que aumentaría la señal de fondo en los espectros tomados con fuente de Mg K α . Asimismo, las soluciones acuosas de AuNPs deben estar suficientemente diluidas, de manera de tener un coloide estable, lo cual dificulta el deposito de una cantidad grande de material con la cual aumentar la relación señal ruido. Por esto, los espectros XPS tomados en INIFTA presentaban señales muy poco intensas y con mucho ruido, lo que dificultó el análisis.

Tanto las THP-AuNP@TMA como las TOAB-AuNP@TMA, a diferencia de las otras AuNPs, presentaron una cantidad apreciable de una componente de S con una BE ~ 161 eV, la cual suele estar asignada a S atómico adsorbido. Por tanto, hemos estudiado en detalle la composición estas AuNPs mediante XPS de alta resolución, empleando luz sincrotrón de diferentes energías. También se estudió la composición de la SAM de TMA sobre Au(111) mediante voltamperometría cíclica y XPS. Asimismo, se realizaron cálculos computacionales de las frecuencias de estiramiento de la unión C-S, como información complementaria para interpretar resultados y proponer un mecanismo de ruptura de esta unión. A modo de introducción, se postuló un mecanismo como el indicado en el esquema 4.2. A continuación se discuten en detalle los resultados obtenidos.



Esquema 4.2 Propuesta del mecanismo de clivaje de la unión C–S en la molécula de TMA sobre la superficie de Au metálico.

4.3.1 Clivaje de la unión C-S en el sistema autoensamblado Au-TMA

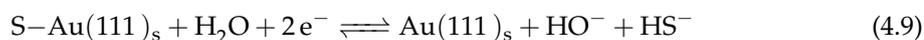
Adsorción de TMA en Au Plano

La estabilidad de las SAMs de tiolato así como su cubrimiento superficial se puede conocer por métodos electroquímicos. La figura 4.16a muestra las curvas de electrodesorción tomadas con electrodos Au recubiertos por de TMA y propanotiol (PT), donde el pico principal corresponde a la bien conocida reacción de electrodesorción reductiva [7].



la desorción masiva de la monocapa de TMA ocurre a $E < -0,6 \text{ V}$, con el potencial de pico localizado a $E_p = -0,7 \text{ V}$. Por otro lado, la desorción reductiva de PT ocurre masivamente a $E < -0,8 \text{ V}$ con $E_p = -0,83 \text{ V}$. La densidad de carga, q , involucrada en el pico de desorción reductiva de PT da información acerca del cubrimiento de tiolato. Para TMA ($q_{\text{TMA}} = 0,049 \pm 0,005 \text{ mC cm}^{-2}$) esta magnitud resulta menor que para propanotiol ($q_{\text{PT}} = 0,071 \text{ mC cm}^{-2}$). Considerando que $0,074 \text{ mC cm}^{-2}$ [65] es la carga esperada para una red $\text{Au}(111)-(\sqrt{3} \times \sqrt{3})R30^\circ\text{-PT}$ donde el cubrimiento superficial es $\theta_{\text{PT}} = 1/3$, para TMA resulta $\theta_{\text{PT}} = 0,22$. Esto es razonable ya que se espera que el TMA presente un menor cubrimiento que el PT como consecuencia del impedimento estérico. Es conveniente notar que no se observó readsorción de PT y TMA al revertir el potencial en dirección positiva, indicando que las especies desorbidas son solubles en solución alcalina.

El hecho de que el valor de E_p para PT es más negativo que para TMA es un signo de mayor estabilidad de la SAM de PT. Esto puede ser explicado considerando las interacciones repulsivas entre los grupos carboxilatos en solución alcalina, los cuales no son completamente neutralizados por los contraiones [66, 67]. También, la solvatación del anión tiolmalato puede ser más favorable que la del propanotiolato. Estos resultados indican la formación de monocapas de tiolato después de la exposición sobre superficies de Au limpio y soluciones de tiol. Por otro lado, para el caso de TMA se observa un pequeño pico a $-0,9 > E > -1,0 \text{ V}$, el cual es muy negativo para ser relacionado con la desorción de especies residuales de tiolato de un tiol de cadena corta. Alternativamente, se puede relacionar esto a una pequeña cantidad de sulfuro atómico, un posible coadsorbato en la adsorción del tiol [68]. Esto se comprobó por XPS (ver más adelante). La desorción de azufre atómico diluido toma lugar por una reacción electroquímica de dos electrones bien establecida [69].



La cantidad de carga relacionada con esta reacción fue $q_s = 0,010 \text{ mC cm}^{-2}$, la que se corresponde con un cubrimiento superficial de $\theta_{\text{PT}} = 0,02$.

Analisis XPS de la Adsorción de TMA sobre Au(111).

La naturaleza química de las especies de S en la superficie de las AuNPs se analizara a través de la deconvolución de esta señal, utilizándose la BE de $\text{S } 2p_{3/2}$ como característica de la presencia de una especie determinada. Para una SAM de alcanotiol sobre Au(111) la señal S $2p$ puede ser descompuesta en tres componentes: S1 y S2 cerca de 161 y 162 eV, respectivamente, y S3 a 163 a 164 eV [70]. La componente S1 está asociada con especies adsorbidas de azufre atómico

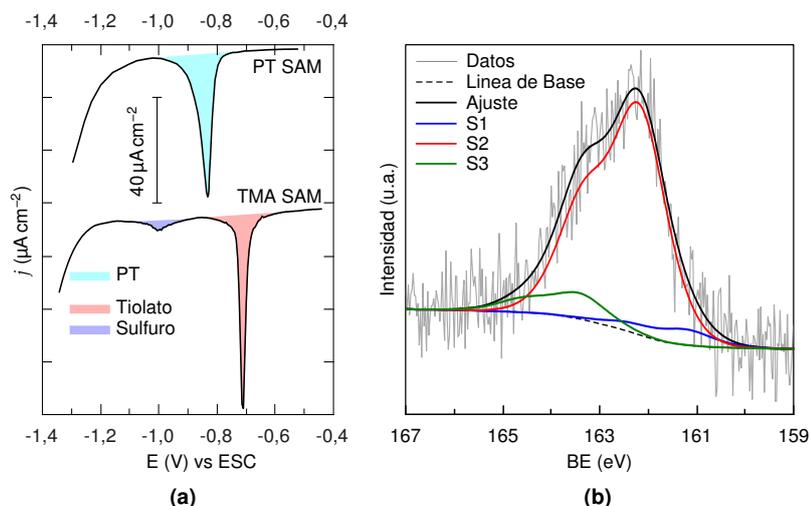


Figura 4.16 (a) Curvas de electro desorción para SAMs de propanotiol, PT, y ácido mercaptosuccínico, TMA. (b) Espectro XPS de la región S 2p de una SAM de TMA sobre Au(111).

[68, 71]. La componente S2 está relacionada al S químisorbido en la superficie del metal a través de un enlace tiolato, mientras la componente S3 ha sido asignada a tioles no unidos y especies de disulfuro [72-74]. En la figura 4.16b, la componente más abundante es la que corresponde al tiolato, mientras S1 representa $\sim 10\%$ del área bajo la curva de la componente S2. Para el arreglo experimental de INIFTA, la relación $S_{\text{tiolato}}/\text{Au}$ resulta en 0,056 para una SAM compacta de alcanotiol con un cubrimiento superficial de $\theta = 1/3$ [45]. De acuerdo con esto, una relación S/Au 0,0026 para S1 y 0,039 para S2 corresponden a $\theta_{S1} = 0,02$ y $\theta_{S2} = 0,23$. Estos resultados están en buen acuerdo con los cubrimientos determinados electroquímicamente, y refuerza lo expresado anteriormente respecto de la influencia de la naturaleza del tiol en la estructura de la SAM. De hecho, estudios recientes sobre la determinación de la densidad de ligandos en las AuNPs postula que los impedimentos estéricos son factores condicionantes del cubrimiento superficial [75, 76].

Analisis XPS de nanopartículas de Au modificadas con TMA

Las nanopartículas de oro modificadas con TMA (AuNP@TMA) fueron preparadas por reacciones de intercambio de ligandos (como se describió en la sección 4.3 y 3.2.6) para evitar la formación de Au(I)-TMA polimérico, el que recubre las AuNPs obtenidas con la síntesis tradicional de una fase [29]. La reacción de intercambio de ligandos tiene características en común con los procesos de formación de SAMs en superficies planas. Sin embargo, si la reacción de intercambio de ligandos es llevada a cabo en presencia de un gran exceso de tioles, los complejos Au(I)-tiolato podrían formarse debido a la degradación de los carozos metálicos (*etching*) [34]. El análisis de la señal de Au 4f obtenida con rayos X incidentes de 250 y 523 eV muestra que no hay cantidad significativa de especies de Au(I) (fig. 4.17a). En efecto, las BE de los picos Au 4f_{7/2} están centrados entre 83,88 a 83,99 eV, cerca de los valores encontrados para una SAM de dodecanotiol sobre Au masivo, y los fwhm son de 0,60 a 0,66 eV. Es importante notar que cuando la energía de los fotones incidentes

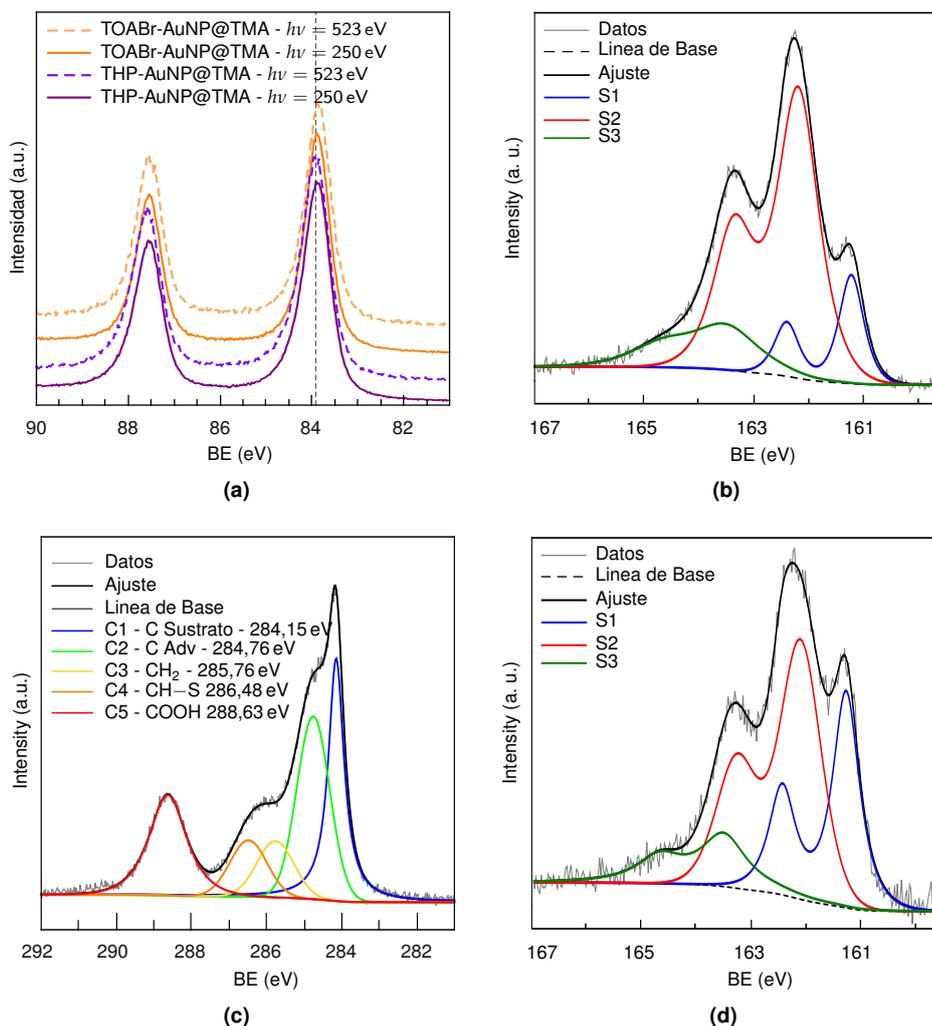


Figura 4.17 Espectros XPS de alta resolución, línea PGM en el LNLS. **(a)** Espectros de la región Au 4*f* tomados con diferente energía del haz incidente. La línea vertical indica a 83,92 eV la BE del Au en una SAM de dodecanotiol sobre Au(111). **(b)** y **(d)** son espectros de la región S 2*p* XPS de AuNPs protegidas por TMA, $h\nu = 250$ eV. **(b)** THP-AuNP@TMA (S1: BE = 161,21 eV, fwhm = 0,53 eV; S2: BE = 162,18 eV, fwhm = 0,88 eV; S3: BE = 163,4 eV). La cantidad relativa de S1 y S2 son 18,7% y 81,3%, respectivamente. **(d)** TOABr-AuNP@TMA (S1: BE = 161,24 eV, fwhm = 0,56 eV; S2: BE = 162,07 eV, fwhm = 0,90 eV; S3: BE = 163,4 eV). La cantidad relativa de S1 y S2 son 38,2% y 61,8%, respectivamente. **(c)** Espectro de la región C 1*s*.

es 250 eV, la profundidad analizada es alrededor de 1-2 capas atómicas de Au, mientras que para 523 eV entre dos y tres capas atómicas contribuyen a la señal XPS [77, 78]. Por lo tanto, a pesar de analizar la muestra a diferentes profundidades, no se encontró señal de las especies poliméricas de Au(I)-TMA con mayores BEs. Entonces el proceso de etching fué suprimido bajo las condiciones particulares de nuestra reacción de intercambio de ligandos (relación molar Au:TMA de 2:1).

Las figuras 4.17b y 4.17d muestran la región S 2*p* de las Au@TMA preparadas por reacciones

de intercambio de ligandos. Los espectros fueron ajustados con las tres componentes descritas anteriormente para la adsorción de un tiol sobre superficies planas. Estas partículas exhiben una mayor proporción de azufre atómico, en relación con el tiolato, que la observada sobre Au(111). Encontramos dos posibles explicaciones para el origen de estas especies. Se analizó si el azufre atómico se forma durante la adsorción de TMA o, alternativamente, este es producto del daño por radiación. En este sentido, Gonella y colaboradores [79] reportaron que largos tiempos de irradiación (junto con el aumento de la temperatura) de una SAM de ácido 3-mercaptopropionico sobre Au(111) conduce a la formación de la componente a 161 eV. Sin embargo, bajo nuestras condiciones experimentales la extensiva exposición a rayos X condujo al incremento de la señal S3, a expensas de las componentes S1 y S2, como se muestra en la figura 4.18a. La misma tendencia fue observada por Laiho y colaboradores [80] en estudios de daño por radiación en SAM de dodecanotiol sobre Au. Por esto, consideramos que las especies de azufre atómico se forman durante la adsorción de TMA y no como consecuencia del daño por radiación.

Es importante notar que para las las nanopartículas Au@Au(I)-TMA core@shell obtenidas por la síntesis tradicional de una fase [29] los valores de BE de sulfuro y tiolato son diferentes a los reportados en esta tesis debido a que estas especies están en diferentes entornos químicos. En ese caso, dado que una gran proporción de las especies de S están unidas a Au(I), se observan mayores BEs [10, 81]. Por el contrario, en las nanopartículas preparadas por reacción de intercambio de ligandos con una limitada cantidad de TMA se obtuvieron a BEs consistentes con especies de azufre adsorbidas sobre Au metálico.

El análisis de la señal de C 1s es útil para complementar la idea de que la señal S2 corresponde a tiomalato. La figura 4.17c muestra espectros XPS de alta resolución de la región C 1s de THP-AuNP@TMA ($h\nu = 523$ eV), la que fue ajustada con cinco componentes. El pico C5 fue asignado a grupos carboxílicos. La componente C4 está relacionada con el carbono (C–H) unido al azufre [79, 82], mientras C3 fue asociada con el grupo metileno (CH₂). Como se espera para el TMA, las relaciones C5:C4 y C5:C3 presentaron rresultaron cercanas a 2:1. Estos resultados muestran que las moléculas de TMA se adsorben como tiolato, aunque algunas moléculas intactas también están presentes, como se propuso en el análisis de la señal S 2p. En otras palabras, la fragmentación molecular no debería ser significativa durante la adquisición del espectro. Adicionalmente, el pico C5 fue usado para estimar la relación atómica COOH:S, considerando la contribución de S2 y S3. Para los dos tipos de partículas protegidas por TMA, la relación atómica COOH:S fue estimada considerando las áreas de pico, la sección eficaz de fotoionización de la subcapa atómica [83], el factor de asimetría angular [77], y la atenuación de la señal de S debida a los residuos de TMA [50, 51, 84]. Obtuvimos relaciones C5:(S2 + S3) de 1,5:1 para THP-AuN@TMA y 1,7:1 para TOABr-AuNP@TMA. Considerando que todos los modelos disponibles sobrestiman la atenuación de los electrones eyectados por las cadenas de carbono, estos resultados están de acuerdo con el valor esperado 2:1 para TMA y tiomalato. Sin embargo, si se tienen en cuenta las tres componentes de azufre, las relaciones C5:(S1 + S2 + S3) resultan en 1.3 y 1.1 para THP-AuNP@TMA y TOABr-AuNP@TMA, respectivamente. Entonces, estos resultados soportan la idea que la componente S1 corresponde a azufre atómico.

La razón por la que las AuNP presentan mayor proporción de azufre atómico que la SAM

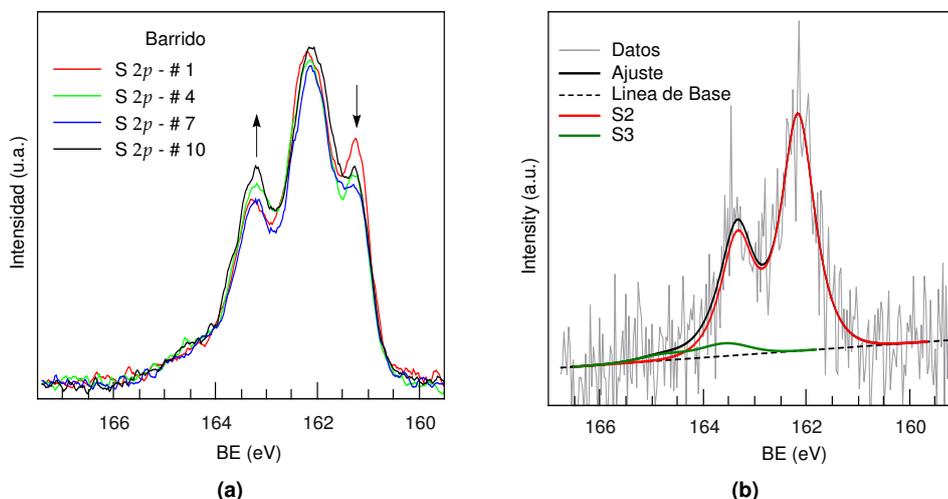


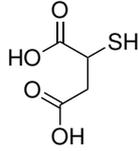
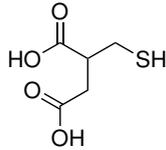
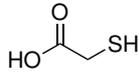
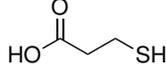
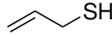
Figura 4.18 Espectros XPS de alta resolución con fuente de radiación sincrotrón. **(a)** Región S 2p de una muestra TOAB-AuNP@TMA a distinto tiempo de irradiación ($h\nu = 250$ eV). **(b)** Región S 2p de TOAB-AuNP@PMA ($h\nu = 523$ eV) donde no se tiene una señal a ~ 161 eV correspondiente a azufre atómico adsorbido a la superficie de la AuNP.

de TMA sobre oro plano podría deberse a la gran cantidad de defectos superficiales en las nanopartículas con un incremento en la actividad para la formación de S atómico en un proceso de clivaje heterogéneo [85]. Adicionalmente, la molécula de TMA parece ser propensa a experimentar escisión de la unión S–C en comparación con otros tioles. De hecho, las AuNPs protegidas con ácido 3-mercaptopropiónico -también preparadas por reacción de intercambio de ligandos- no muestran especies de azufre atómico como se observa en la figura 4.18b.

El clivaje de la unión C–S ha sido reportado para otros tioles sobre superficies planas o nanopartículas [74, 86, 87]. Al igual que el TMA, esos tioles tienen grupos atractores de electrones o dobles enlaces cerca de la unión C–S. La tendencia de los tioles a sufrir escisión de la unión C–S puede deberse a diferentes factores. La proximidad de los grupos carboxílicos afecta la fuerza del enlace C–S. Por esto, estimamos las frecuencias de los modos normales de vibración que implican la elongación de la unión C–S en diferentes moléculas. En la tabla 4.2 se muestran las frecuencias calculadas.

Para la elongación C–S en el ácido mercaptoacético, la frecuencia normal vibracional es menor que la calculada para el ácido 3-mercaptopropiónico. En el caso de la molécula de TMA (el grupo ácido carboxilato más cercano está en posición α respecto de la unión C–S), la frecuencia de estos modos vibracionales es menor que para el ácido 2-(mercapto metil)succínico (el grupo carboxilato más cercano está en posición β). Esta observación es soportada considerando que los grupos atractores de electrones en posición α resultarían en la formación de un mejor grupo saliente (con mayor deslocalización de la carga negativa). Adicionalmente, se ha propuesto una transferencia de carga electrónica significativa desde la superficie de las nanopartículas de oro a los átomos de azufre de los tioles, basado en datos de absorción de rayos X cercanas de la estructura de borde [88]. Teniendo en cuenta la discusión anterior, la estructura molecular del TMA y nuestros resul-

Tabla 4.2 Cálculo de frecuencias de vibración normal del enlace C-S del TMA y moléculas análogas, mediante cálculos B3LYP con el grupo de bases 6-31+G*.

	Tioles	$\nu(\text{cm}^{-1})$
I α		ác. tiomálico (ác. mercaptosuccínico) 1312,4
I β		ác. 2-(mercaptometil) succínico 1388,57
II α		ác. 2-mercaptoacético 1436,8
II β		ác. 3-mercaptopropiónico 1528,42
III α		2-propen-1-tiol 2875,33
III β		3-buten-1-tiol 2915,68

Las frecuencias corresponden a los modos normales de vibración donde se encuentra la mayor elongación del enlace C–S. Estos modos vibracionales, también involucran flexiones de los grupos carboxílicos. De cada par de compuestos, los numerados con la letra α tienen el grupo SH en posición α al grupo atractor de electrones (carboxilo o doble enlace) y los numerados con la letra β estén en posición β .

tados experimentales, proponemos un mecanismo de clivaje de la unión C–S donde (i) S atraen electrones desde la superficie de oro y (ii) el grupo saliente cargado negativamente está parcialmente estabilizado por resonancia electrónica con el grupo ácido carboxílico en posición α , como se muestra en el esquema 4.2.

Este mecanismo permitiría explicar, además, la mayor cantidad de azufre atómico en las TOABr-AuNP@TMA, en comparación con las THP-AuNP@TMA. Durante la reacción de intercambio de ligandos los cationes tetraoctilamonio presentes en la superficie de la nanopartículas pueden formar pares iónicos con el grupo salientes cargados negativamente. Esto puede minimizar la barrera de energía del proceso de clivaje.

La figura 4.19 ilustra la reacción de intercambio de ligandos THP y TOAB por TMA, donde ocurre el clivaje de la unión C-S de este tiol. Es de esperar que la formación de pares iónicos estabilice relativamente el grupo saliente con carga negativa. Si bien el agua es un muy buen solvente para estabilizar por solvatación al grupo saliente, la formación de pares iónicos neutralizan la carga eléctrica y favorece la ruptura de la unión C-S.

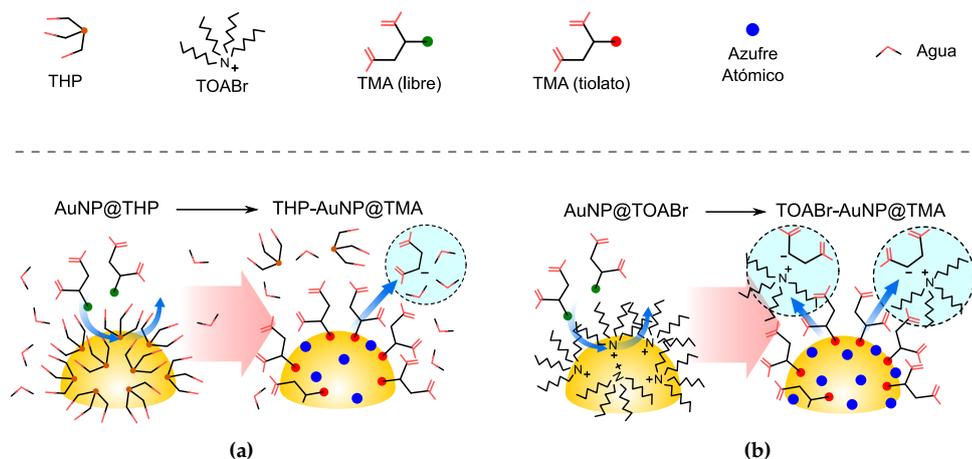


Figura 4.19 Diagrama que ilustra el clivaje de la unión C–S durante la adsorción de TMA sobre las AuNP. La posible formación de pares iónicos entre el grupo saliente negativamente cargado y los cationes de tetraoctilamonio disminuye la barrera energética de escisión del enlace, lo que conduce a una mayor cantidad de S atómico sobre la superficie metálica.

4.4 Discusión y conclusiones parciales

Los resultados descritos a lo largo de este capítulo son relevantes tanto para el desarrollo de un sensor fluorescente, como desde el punto de vista de los fundamentos. Se realizaron avances que permiten comprender con mayor profundidad las propiedades de las AuNPs sintetizadas y los procesos involucrados en su formación. Asimismo, se pusieron en relieve algunos inconvenientes relacionados con las técnicas utilizadas en la caracterización. Es destacable que algunos de estos aspectos –tales como las modificaciones sufridas por las nanopartículas por su interacción con electrones o rayos X– rara vez es considerada con el debido cuidado.

En primer lugar, se sintetizaron AuNPs recubiertas por dodecanotiol mediante el método de Brust-Schiffrin de dos fases. Se consiguió exitosamente controlar el tamaño –y su distribución– de las partículas obtenidas. Se avanzó en la determinación de la composición química de las AuNP@SC₁₂ mediante XPS, encontrándose que la señal de S 2*p* está compuesta por dos componente asignadas a las especies químicas tiolato y tiol libre. Sin embargo, no fue posible discernir sobre la naturaleza química de la señal comúnmente asignada a tioles libres, mediante RMN. Así, la componente de la región S 2*p* a mayor energía de enlace puede deberse a didodecildisulfuro o dodecanotiol. Por tanto, tampoco fue posible decidir si esta componente tiene alguna contribución debida a daño por radiación. Esto es cierto, aún cuando se extremaron las cuidados para minimizar las modificaciones de las muestras como consecuencia de su análisis mediante XPS. Cabe destacar que se realizan importantes esfuerzos para comprender la composición química de las AuNPs, y los resultados presentados en la literatura específica pueden ser contradictorios. Si bien la mayoría de los autores consideran que la componente asignada a tiol libre corresponde a un constituyente del sistema [47], los estudios con SAMs sobre sustratos masivos indican que esta señal proviene del daño por radiación [80]. En las medidas con luz sincrotrón hemos mostrado que el daño por radiación es considerable y conduce a un aumento de la componente de tiol libre.

Poder conocer la presencia o no de tiol libre en las AuNP, es de gran importancia para el desarrollo de los sensores fluorescentes basados en ensamblados supramoleculares entre las AuNP y polímeros anfífilos que se discuten en los capítulos siguientes.

En la parte final de este capítulo se describieron los resultados correspondientes a la preparación y caracterización de AuNPs obtenidas mediante intercambio de ligandos, las que resultan de gran utilidad porque permiten modificar la composición de las AuNPs preformadas. Si bien en nuestro caso empleamos tioles relativamente simples –sólo se ensayaron tioles con grupos ácido carboxílico-, sería posible emplear moléculas más complejas que no pueden estar presentes durante la reducción de las especies metálicas –Au(I) y/o Au(III). Asimismo, se expuso la generalidad de esta estrategia al ensayarla en diferentes medios (acuoso y no polar). En nuestro caso, las reacciones de intercambio empleando tioles con grupos carboxílicos fueron exitosas. En este sentido, las AuNP@TMA son muy interesantes ya que presentan solubilidad en un amplio rango de pH. Esto es muy importante si se pretende realizar reacciones de post-modificación de las NP con grupos carboxilato empleando carbodiimidas como activantes, ya que las últimas son incompatibles con medios básicos.

Mediante el estudio detallado de las AuNPs modificadas con TMA se encontró la presencia de cantidades significativas de azufre atómico como coadsorbato del tiomolato. Cabe mencionar que la correcta interpretación de los resultados correspondientes a AuNP@TMA requirió el estudio de SAMs formadas por adsorción de TMA sobre Au(111). Además, se propuso un mecanismo de ruptura de la unión C–S de la molécula de TMA durante la formación de la capa autoensamblada sobre la superficie metálica, que permitió explicar las diferencias encontradas en las reacciones de intercambio de ligandos de las AuNPs. Por último, se realizaron cálculos computacionales de las frecuencias vibracionales del TMA y moléculas análogas. Estos cálculos contribuyeron en la elaboración del modelo propuesto.

Referencias

- (1) Vericat, C.; Vela, M. E.; Corthey, G.; Pensa, E.; Cortés, E.; Fonticelli, M. H.; Ibañez, F.; Benitez, G. E.; Carro, P. y Salvarezza, R. C. [“Self-assembled monolayers of thiolates on metals: a review article on sulfur-metal chemistry and surface structures”](#) *RSC Advances* **2014**, *4*, 27730.
- (2) Hostetler, M. J. y col. [“Alkanethiolate Gold Cluster Molecules with Core Diameters from 1.5 to 5.2 nm: Core and Monolayer Properties as a Function of Core Size”](#) *Langmuir* **1998**, *14*, 17-30.
- (3) Jadzinsky, P. D.; Calero, G.; Ackerson, C. J.; Bushnell, D. A. y Kornberg, R. D. [“Structure of a Thiol Monolayer-Protected Gold Nanoparticle at 1.1 Å Resolution”](#) *Science* **2007**, *318*, 430-433.
- (4) Goulet, P. J. G. y Lennox, R. B. [“New Insights into Brust-Schiffrin Metal Nanoparticle Synthesis”](#) *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132*, 9582-9584.

- (5) Negishi, Y.; Nobusada, K. y Tsukuda, T. "Glutathione-Protected Gold Clusters Revisited: Bridging the Gap between Gold(I)-Thiolate Complexes and Thiolate-Protected Gold Nanocrystals" *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 5261-5270.
- (6) Love, J. C.; Estroff, L. A.; Kriebel, J. K.; Nuzzo, R. G. y Whitesides, G. M. "Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology" *Chemical Reviews* **2005**, *105*, 1103-1170.
- (7) Vericat, C.; Vela, M. E.; Benitez, G.; Carro, P. y Salvarezza, R. C. "Self-assembled monolayers of thiols and dithiols on gold: new challenges for a well-known system" *Chemical Society Reviews* **2010**, *39*, 1805-1834.
- (8) Häkkinen, H. "The gold-sulfur interface at the nanoscale" *Nature Chemistry* **2012**, *4*, 443-455.
- (9) Vericat, C.; Vela, M. E. y Salvarezza, R. C. "Self-assembled monolayers of alkanethiols on Au(111): surface structures, defects and dynamics" *Physical Chemistry Chemical Physics* **2005**, *7*, 3258.
- (10) Bourg, M.-C.; Badia, A. y Lennox, R. B. "Gold-Sulfur Bonding in 2D and 3D Self-Assembled Monolayers: XPS Characterization" *The Journal of Physical Chemistry B* **2000**, *104*, 6562-6567.
- (11) Maksymovych, P.; Sorescu, D. y Yates, J. "Gold-Adatom-Mediated Bonding in Self-Assembled Short-Chain Alkanethiolate Species on the Au(111) Surface" *Physical Review Letters* **2006**, *97*, 146103.
- (12) Cossaro, A.; Mazzarello, R.; Rousseau, R.; Casalis, L.; Verdini, A.; Kohlmeier, A.; Floreano, L.; Scandolo, S.; Morgante, A.; Klein, M. L. y Scoles, G. "X-ray Diffraction and Computation Yield the Structure of Alkanethiols on Gold(111)" *Science* **2008**, *321*, 943-946.
- (13) Pensa, E.; Cortés, E.; Corthey, G.; Carro, P.; Vericat, C.; Fonticelli, M. H.; Benítez, G.; Rubert, A. A. y Salvarezza, R. C. "The Chemistry of the Sulfur-Gold Interface: In Search of a Unified Model" *Accounts of Chemical Research* **2012**, *45*, 1183-1192.
- (14) Brust, M.; Walker, M.; Bethell, D.; Schiffrin, D. J. y Whyman, R. "Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase liquid-liquid system" *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1994**, 1994, 801-802.
- (15) Brust, M.; Fink, J.; Bethell, D.; Schiffrin, D. J. y Kiely, C. "Synthesis and reactions of functionalised gold nanoparticles" *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1995**, 1995, 1655-1656.
- (16) He, S.; Yao, J.; Jiang, P.; Shi, D.; Zhang, H.; Xie, S.; Pang, S. y Gao, H. "Formation of Silver Nanoparticles and Self-Assembled Two-Dimensional Ordered Superlattice" *Langmuir* **2001**, *17*, 1571-1575.
- (17) Li, Y.; Zaluzhna, O.; Xu, B.; Gao, Y.; Modest, J. M. y Tong, Y. J. "Mechanistic Insights into the Brust-Schiffrin Two-Phase Synthesis of Organo-chalcogenate-Protected Metal Nanoparticles" *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133*, 2092-2095.
- (18) Zamborini, F. P.; Gross, S. M. y Murray, R. W. "Synthesis, Characterization, Reactivity, and Electrochemistry of Palladium Monolayer Protected Clusters" *Langmuir* **2001**, *17*, 481-488.

- (19) Castro, E. G.; Salvatierra, R. V.; Schreiner, W. H.; Oliveira, M. M. y Zarbin, A. J. G. "Dodecanethiol-Stabilized Platinum Nanoparticles Obtained by a Two-Phase Method: Synthesis, Characterization, Mechanism of Formation, and Electrocatalytic Properties" *Chemistry of Materials* **2010**, *22*, 360-370.
- (20) Turkevich, J.; Stevenson, P. C. e Hillier, J. "A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold" *Discussions of the Faraday Society* **1951**, *11*, 55-75.
- (21) Jana, N. R.; Gearheart, L. y Murphy, C. J. "Seeding Growth for Size Control of 5–40 nm Diameter Gold Nanoparticles" *Langmuir* **2001**, *17*, 6782-6786.
- (22) Starks, C. M. "Phase-transfer catalysis. I. Heterogeneous reactions involving anion transfer by quaternary ammonium and phosphonium salts" *Journal of the American Chemical Society* **1971**, *93*, 195-199.
- (23) Templeton, A. C.; Wuelfing, W. P. y Murray, R. W. "Monolayer-Protected Cluster Molecules" *Accounts of Chemical Research* **2000**, *33*, 27-36.
- (24) Li, Y.; Zaluzhna, O. y Tong, Y. J. "Critical Role of Water and the Structure of Inverse Micelles in the Brust-Schiffrin Synthesis of Metal Nanoparticles" *Langmuir* **2011**, *27*, 7366-7370.
- (25) Schaaff, T. G.; Shafiqullin, M. N.; Khoury, J. T.; Vezmar, I.; Whetten, R. L.; Cullen, W. G.; Gutierrez-Wing, C.; Ascensio, J.; Jose-Yacamán, M. J. y col. "Isolation of smaller nanocrystal Au molecules: robust quantum effects in optical spectra" *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 7885-7891.
- (26) Alvarez, M.; Khoury, J.; Schaaff, T.; Shafiqullin, M.; Vezmar, I. y Whetten, R. "Critical sizes in the growth of Au clusters" *Chemical Physics Letters* **1997**, *266*, 91-98.
- (27) Azcárate, J. C.; Corthey, G.; Pensa, E.; Vericat, C.; Fonticelli, M. H.; Salvarezza, R. C. y Carro, P. "Understanding the Surface Chemistry of Thiolate-Protected Metallic Nanoparticles" *The Journal of Physical Chemistry Letters* **2013**, *4*, 3127-3138.
- (28) Ackerson, C. J.; Jadzinsky, P. D. y Kornberg, R. D. "Thiolate Ligands for Synthesis of Water-Soluble Gold Clusters" *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 6550-6551.
- (29) Corthey, G.; Giovanetti, L. J.; Ramallo-López, J. M.; Zelaya, E.; Rubert, A. A.; Benitez, G. A.; Requejo, F. G.; Fonticelli, M. H. y Salvarezza, R. C. "Synthesis and Characterization of Gold@Gold(I)-Thiomalate Core@Shell Nanoparticles" *ACS Nano* **2010**, *4*, 3413-3421.
- (30) Fink, J.; Kiely, C. J.; Bethell, D. y Schiffrin, D. J. "Self-Organization of Nanosized Gold Particles" *Chemistry of Materials* **1998**, *10*, 922-926.
- (31) Leff, D. V.; Brandt, L. y Heath, J. R. "Synthesis and Characterization of Hydrophobic, Organically-Soluble Gold Nanocrystals Functionalized with Primary Amines" *Langmuir* **1996**, *12*, 4723-4730.
- (32) Manna, A.; Chen, P.-L.; Akiyama, H.; Wei, T.-X.; Tamada, K. y Knoll, W. "Optimized Photoisomerization on Gold Nanoparticles Capped by Unsymmetrical Azobenzene Disulfides" *Chemistry of Materials* **2003**, *15*, 20-28.

- (33) Olmos-Asar, J. A.; Ludueña, M. y Mariscal, M. M. "Monolayer protected gold nanoparticles: the effect of the headgroup–Au interaction" *Physical Chemistry Chemical Physics* **2014**, *16*, 15979.
- (34) Toikkanen, O.; Ruiz, V.; Rönholm, G.; Kalkkinen, N.; Liljeroth, P. y Quinn, B. M. "Synthesis and Stability of Monolayer-Protected Au₃₈ Clusters" *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130*, 11049-11055.
- (35) Negishi, Y.; Takasugi, Y.; Sato, S.; Yao, H.; Kimura, K. y Tsukuda, T. "Magic-Numbered Au_n Clusters Protected by Glutathione Monolayers (*n* = 18, 21, 25, 28, 32, 39): Isolation and Spectroscopic Characterization" *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 6518-6519.
- (36) Walter, M.; Akola, J.; Lopez-Acevedo, O.; Jadzinsky, P. D.; Calero, G.; Ackerson, C. J.; Whetten, R. L.; Grönbeck, H. y Häkkinen, H. "A unified view of ligand-protected gold clusters as superatom complexes" *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2008**, *105*, 9157.
- (37) Bader, R. F. W., *Atoms in molecules: a quantum theory*; Clarendon Press: Oxford; New York, 1990.
- (38) Lopez-Acevedo, O.; Clayborne, P. A. y Häkkinen, H. "Electronic structure of gold, aluminum, and gallium superatom complexes" *Physical Review B* **2011**, *84*, 035434.
- (39) Häkkinen, H.; Barnett, R. N. y Landman, U. "Electronic Structure of Passivated Au₃₈(SCH₃)₂₄ Nanocrystal" *Physical Review Letters* **1999**, *82*, 3264-3267.
- (40) Garzón, I. L.; Rovira, C.; Michaelian, K.; Beltrán, M. R.; Ordejón, P.; Junquera, J.; Sánchez-Portal, D.; Artacho, E. y Soler, J. M. "Do Thiols Merely Passivate Gold Nanoclusters?" *Physical Review Letters* **2000**, *85*, 5250-5251.
- (41) Heaven, M. W.; Dass, A.; White, P. S.; Holt, K. M. y Murray, R. W. "Crystal Structure of the Gold Nanoparticle [N(C₈H₁₇)₄][Au₂₅(SCH₂CH₂Ph)₁₈]" *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130*, 3754-3755.
- (42) Qian, H.; Eckenhoff, W. T.; Zhu, Y.; Pintauer, T. y Jin, R. "Total Structure Determination of Thiolate-Protected Au₃₈ Nanoparticles" *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132*, 5883-7891.
- (43) Lopez-Acevedo, O.; Tsunoyama, H.; Tsukuda, T.; Häkkinen, H. y Aikens, C. M. "Chirality and Electronic Structure of the Thiolate-Protected Au₃₈ Nanocluster" *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132*, 8210-8218.
- (44) Qian, H.; Zhu, Y. y Jin, R. "Atomically precise gold nanocrystal molecules with surface plasmon resonance" *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2012**, *109*, 696-700.
- (45) Fischer, J. A.; Zoldan, V. C.; Benitez, G.; Rubert, A. A.; Ramirez, E. A.; Carro, P.; Salvarezza, R. C.; Pasa, A. A. y Vela, M. E. "Sulfidization of Au(111) from Thioacetic Acid: An Experimental and Theoretical Study" *Langmuir* **2012**, *28*, 15278-15285.
- (46) Olmos-Asar, J. A.; Rapallo, A. y Mariscal, M. M. "Development of a semiempirical potential for simulations of thiol–gold interfaces. Application to thiol-protected gold nanoparticles" *Physical Chemistry Chemical Physics* **2011**, *13*, 6500.

- (47) Battocchio, C.; Porcaro, F.; Mukherjee, S.; Magnano, E.; Nappini, S.; Fratoddi, I.; Quintiliani, M.; Russo, M. V. y Polzonetti, G. "Gold Nanoparticles Stabilized with Aromatic Thiols: Interaction at the Molecule–Metal Interface and Ligand Arrangement in the Molecular Shell Investigated by SR-XPS and NEXAFS" *The Journal of Physical Chemistry C* **2014**, *118*, 8159-8168.
- (48) Shard, A. G. "A Straightforward Method For Interpreting XPS Data From Core–Shell Nanoparticles" *The Journal of Physical Chemistry C* **2012**, *116*, 16806-16813.
- (49) Seah, M. P. y Dench, W. A. "Quantitative electron spectroscopy of surfaces: A standard data base for electron inelastic mean free paths in solids" *Surface and Interface Analysis* **1979**, *1*, 2-11.
- (50) Seah, M. P. "Simple universal curve for the energy-dependent electron attenuation length for all materials: Simple, accurate, universal expression for attenuation lengths" *Surface and Interface Analysis* **2012**, *44*, 1353-1359.
- (51) Laibinis, P. E.; Bain, C. D. y Whitesides, G. M. "Attenuation of photoelectrons in monolayers of n-alkanethiols adsorbed on copper, silver, and gold" *The Journal of Physical Chemistry* **1991**, *95*, 7017-7021.
- (52) Millone, M. A. D. y col. "Self-Assembly of Alkanedithiols on Au(111) from Solution: Effect of Chain Length and Self-Assembly Conditions" *Langmuir* **2009**, *25*, 12945-12953.
- (53) Thomas, K. G.; Zajicek, J. y Kamat, P. V. "Surface Binding Properties of Tetraoctylammonium Bromide-Capped Gold Nanoparticles" *Langmuir* **2002**, *18*, 3722-3727.
- (54) Duff, D. G.; Baiker, A. y Edwards, P. P. "A new hydrosol of gold clusters. 1. Formation and particle size variation" *Langmuir* **1993**, *9*, 2301-2309.
- (55) Sarathy, K. V.; Kulkarni, G. U. y Rao, C. N. R. "A novel method of preparing thiol-derivatised nanoparticles of gold, platinum and silver forming superstructures" *Chemical Communications* **1997**, *1997*, 537-538.
- (56) Yong, K.-T.; Sahoo, Y.; Swihart, M. T. y Prasad, P. N. "Synthesis and plasmonic properties of silver and gold nanoshells on polystyrene cores of different size and of gold–silver core–shell nanostructures" *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2006**, *290*, 89-105.
- (57) Kim, J.-H.; Chung, H.-W. y Lee, T. R. "Preparation and Characterization of Palladium Shells with Gold and Silica Cores" *Chemistry of Materials* **2006**, *18*, 4115-4120.
- (58) Kim, J.-H.; Bryan, W. W. y Randall Lee, T. "Preparation, Characterization, and Optical Properties of Gold, Silver, and Gold–Silver Alloy Nanoshells Having Silica Cores" *Langmuir* **2008**, *24*, 11147-11152.
- (59) Huang, C.-C.; Yang, Z.; Lee, K.-H. y Chang, H.-T. "Synthesis of Highly Fluorescent Gold Nanoparticles for Sensing Mercury(II)" *Angewandte Chemie International Edition* **2007**, *46*, 6824-6828.

- (60) Duan, H. y Nie, S. "Etching Colloidal Gold Nanocrystals with Hyperbranched and Multivalent Polymers: A New Route to Fluorescent and Water-Soluble Atomic Clusters" *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129*, 2412-2413.
- (61) Liu, X.; Li, C.; Xu, J.; Lv, J.; Zhu, M.; Guo, Y.; Cui, S.; Liu, H.; Wang, S. y Li, Y. "Surfactant-Free Synthesis and Functionalization of Highly Fluorescent Gold Quantum Dots" *The Journal of Physical Chemistry C* **2008**, *112*, 10778-10783.
- (62) Link, S. y El-Sayed, M. A. "Size and Temperature Dependence of the Plasmon Absorption of Colloidal Gold Nanoparticles" *The Journal of Physical Chemistry B* **1999**, *103*, 4212-4217.
- (63) Ying, E.; Li, D.; Guo, S.; Dong, S. y Wang, J. "Synthesis and Bio-Imaging Application of Highly Luminescent Mercaptosuccinic Acid-Coated CdTe Nanocrystals" *PLoS ONE* **2008**, *3*, e2222.
- (64) Wang, D.; Nap, R. J.; Lagzi, I.; Kowalczyk, B.; Han, S.; Grzybowski, B. A. y Szeleifer, I. "How and Why Nanoparticle's Curvature Regulates the Apparent pKa of the Coating Ligands" *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133*, 2192-2197.
- (65) Fonticelli, M.; Benitez, G.; Carro, P.; Azzaroni, O.; Salvarezza, R.; Gonzalez, S.; Torres, D. e Illas, F. "Effect of Ag Adatoms on High-Coverage Alkanethiolate Adsorption on Au(111)" *Journal of Physical Chemistry C* **2008**, *112*, 4557-4563.
- (66) Fonticelli, M.; Azzaroni, O.; Benítez, G.; Martins, M. E.; Carro, P. y Salvarezza, R. C. "Molecular Self-Assembly on Ultrathin Metallic Surfaces: Alkanethiolate Monolayers on Ag (111)-Au (111)" *The Journal of Physical Chemistry B* **2004**, *108*, 1898-1905.
- (67) Azzaroni, O.; Vela, M. E.; Martin, H.; Hernández Creus, A.; Andreasen, G. y Salvarezza, R. C. "Electrodesorption Kinetics and Molecular Interactions at Negatively Charged Self-Assembled Thiol Monolayers in Electrolyte Solutions" *Langmuir* **2001**, *17*, 6647-6654.
- (68) Ramírez, E. A.; Cortés, E.; Rubert, A. A.; Carro, P.; Benítez, G.; Vela, M. E. y Salvarezza, R. C. "Complex Surface Chemistry of 4-Mercaptopyridine Self-Assembled Monolayers on Au(111)" *Langmuir* **2012**, *28*, 6839-6847.
- (69) Vericat, C.; Andreasen, G.; Vela, M. E. y Salvarezza, R. C. "Dynamics of Potential-Dependent Transformations in Sulfur Adlayers on Au(111) Electrodes" *The Journal of Physical Chemistry B* **2000**, *104*, 302-307.
- (70) Vericat, C.; Vela, M. E.; Benitez, G. A.; Gago, J. A. M.; Torrelles, X. y Salvarezza, R. C. "Surface characterization of sulfur and alkanethiol self-assembled monolayers on Au(111)" *Journal of Physics: Condensed Matter* **2006**, *18*, R867.
- (71) Yang, Y. W. y Fan, L. J. "High-Resolution XPS Study of Decanethiol on Au(111): Single Sulfur-Gold Bonding Interaction" *Langmuir* **2002**, *18*, 1157-1164.
- (72) Heister, K.; Zharnikov, M.; Grunze, M.; Johansson, L. S. O. y Ulman, A. "Characterization of X-ray Induced Damage in Alkanethiolate Monolayers by High-Resolution Photoelectron Spectroscopy" *Langmuir* **2001**, *17*, 8-11.

- (73) Zhong, C.-J.; Brush, R. C.; Anderegg, J. y Porter, M. D. "Organosulfur Monolayers at Gold Surfaces: Reexamination of the Case for Sulfide Adsorption and Implications to the Formation of Monolayers from Thiols and Disulfides" *Langmuir* **1999**, *15*, 518-525.
- (74) Ishida, T.; Choi, N.; Mizutani, W.; Tokumoto, H.; Kojima, I.; Azehara, H.; Hokari, H.; Akiba, U. y Fujihira, M. "High-Resolution X-ray Photoelectron Spectra of Organosulfur Monolayers on Au(111): S(2p) Spectral Dependence on Molecular Species" *Langmuir* **1999**, *15*, 6799-6806.
- (75) Hayashi, T.; Wakamatsu, K.; Ito, E. y Hara, M. "Effect of Steric Hindrance on Desorption Processes of Alkanethiols on Au(111)" *The Journal of Physical Chemistry C* **2009**, *113*, 18795-18799.
- (76) Hinterwirth, H.; Kappel, S.; Waitz, T.; Prohaska, T.; Lindner, W. y Lämmerhofer, M. "Quantifying Thiol Ligand Density of Self-Assembled Monolayers on Gold Nanoparticles by Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry" *ACS Nano* **2013**, *7*, 1129-1136.
- (77) Briggs, D. y Seah, M. P., *Practical surface analysis: by auger and x-ray photoelectron spectroscopy*. Wiley: Chichester, 1990.
- (78) Cumpson, P. J. y Seah, M. P. "Elastic Scattering Corrections in AES and XPS. II. Estimating Attenuation Lengths and Conditions Required for their Valid Use in Overlayer/Substrate Experiments" *Surface and Interface Analysis* **1997**, *25*, 430-446.
- (79) Gonella, G.; Cavalleri, O.; Terreni, S.; Cvetko, D.; Floreano, L.; Morgante, A.; Canepa, M. y Rolandi, R. "High resolution X-ray photoelectron spectroscopy of 3-mercaptopropionic acid self-assembled films" *Surface Science* **2004**, *566-568, Part 1*, 638-643.
- (80) Laiho, T.; Leiro, J. y Lukkari, J. "XPS study of irradiation damage and different metal-sulfur bonds in dodecanethiol monolayers on gold and platinum surfaces" *Applied Surface Science* **2003**, *212-213*, 525-529.
- (81) Walton, R. "The x-ray photoelectron spectra of metal complexes of sulfur-containing ligands: sulfur 2p binding energies" *Coordination Chemistry Reviews* **1980**, *31*, 183-220.
- (82) Whelan, C. M.; Smyth, M. R. y Barnes, C. J. "HREELS, XPS, and Electrochemical Study of Benzenethiol Adsorption on Au(111)" *Langmuir* **1999**, *15*, 116-126.
- (83) Yeh, J. y Lindau, I. "Atomic subshell photoionization cross sections and asymmetry parameters: $1 < Z < 103$ " *Atomic Data and Nuclear Data Tables* **1985**, *32*, 1-155.
- (84) Snow, A. W.; Jernigan, G. G. y Ancona, M. G. "Packing density of HS(CH₂)_nCOOH self-assembled monolayers" *Analyst* **2011**, *136*, 4935-4949.
- (85) Janssens, T. V. W.; Clausen, B. S.; Hvolbæk, B.; Falsig, H.; Christensen, C. H.; Bligaard, T. y Nørskov, J. K. "Insights into the reactivity of supported Au nanoparticles: combining theory and experiments" *Topics in Catalysis* **2007**, *44*, 15-26.
- (86) Houmam, A.; Muhammad, H. y Koczur, K. M. "Rapid Formation of a Dense Sulfur Layer on Gold through Use of Triphenylmethane Sulfenyl Chloride as a Precursor" *Langmuir* **2012**, *28*, 16881-16889.
- (87) Battocchio, C. y col. "Silver Nanoparticles Stabilized with Thiols: A Close Look at the Local Chemistry and Chemical Structure" *The Journal of Physical Chemistry C* **2012**, *116*, 19571-19578.

- (88) Jiang, Y. y col. "Modifying the Atomic and Electronic Structures of Gold Nanocrystals via Changing the Chain Length of n-Alkanethiol Ligands" *The Journal of Physical Chemistry C* **2012**, *116*, 24999-25003.

Capítulo 5

Ensamblados de Polímeros Anfifílicos y Nanopartículas como Sondas Multiparamétricas

5.1 Introducción

La fluorescencia presenta ventajas sobre la absorción para detección de alta sensibilidad debido principalmente a la forma en que se realiza la medida. La absorbancia es medida como la diferencia entre la intensidad de luz que incide y la transmitida a través de la muestra. En fluorescencia la intensidad de luz es medida directamente, sin comparación con un haz de referencia. Esto permite que, en términos generales, los espectrofluorómetros convencionales puedan detectar concentraciones de 10^{-10} M sin mayores inconvenientes, mientras que para detectar concentraciones de 10^{-5} M por absorción se requiera de equipamientos de mayor complejidad.[1] Esta ventaja se debe principalmente a que en la medida de fluorescencia se tiene una radiación de fondo prácticamente nula, comparado con el brillo del haz de referencia en las medidas de absorbancia. Es relativamente fácil detectar bajos niveles de luz, y los impulsos electrónicos debidos a fotones únicos se pueden amplificar con más tubos fotomultiplicadores.

5.1.1 Sondas ratiométricas de polaridad - ESIPT

Los sensores fluorescentes –al igual que otros sensores– deben ser calibrados para determinar la concentración de un analito o una propiedad del medio. Esto resulta muy difícil de realizar en sistemas complejos y es realmente un desafío poder lograrlo en el interior de una célula. Se sugiere que este problema se puede resolver con éxito si pasamos del concepto actualmente dominante de modulación “ON-OFF” a un concepto más ventajoso de tipo “OR-OR” (Ó-Ó). Bajo una modulación ON-OFF el cambio de intensidad de la señal a una dada longitud de onda (un sólo canal), y para OR-OR se determina la variación de la intensidad entre dos longitudes de onda (dos canales). La solución prometedora de este problema radica en el uso de un solo indicador fluorescente que

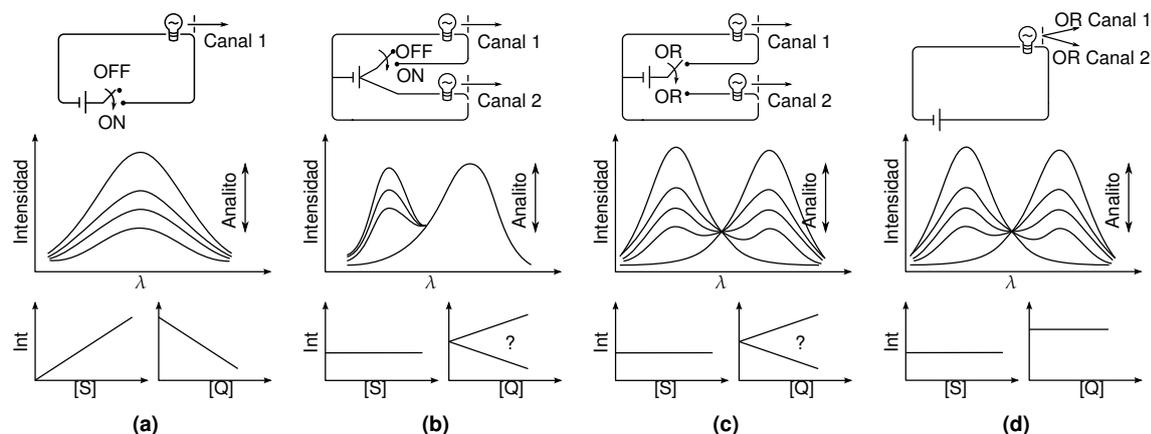


Figura 5.1 Adaptado de la ref [2].

exhibe alguna reacción rápida y reversible en estado excitado.[2] La figura 5.1 muestra cuatro esquemas que representan diferentes formas en las que pueden actuar los sensores fluorescentes. El lector interesado puede encontrar más información de las diferentes formas de uso de sondas fluorescentes en las referencias [2, 3]

En un típico sensor ON-OFF, el caso más simple, se mide la intensidad de la señal del sensor a una dada longitud de onda (fig 5.1a). En este, la unión con un analito debe proporcionar un cambio de la intensidad (y del rendimiento cuántico) con variaciones de su débil interacción no covalente con el entorno local. Estas interacciones pueden disminuir su intensidad por extinción, *quenching* (ON → OFF) o aumentando su intensidad removiendo el efecto de extinción (OFF → ON). El aumento de la fluorescencia es preferido ya que provee una mayor relación señal-ruido. Generalmente, en los espectrofluorímetros comunes la señal medida es comparada simultáneamente o secuencialmente con la señal proveniente de una muestra de referencia. Esta referencia podría ser la molécula sonda en solución a una dada concentración calibrada con adición de concentraciones dadas de analito, lo que difícilmente se logra para ensayos a micro escala.[2] Una solución al problema de la referencia podría ser la introducción en la molécula sonda (o en el soporte, la misma nanopartícula, etc) de un fluoróforo que puede ser fotoexcitado junto con la sonda y que emita luz a una longitud de onda diferente (fig 5.1b). Esto provee un segundo, e independiente, canal de información que podría servir como referencia. El problema que esto presenta es encontrar el par de fluoróforos que puedan ser excitados con una misma longitud de onda y solo uno de ellos responda al analito (ej. un QDs como referencia). Adicionalmente existe un problema mayor, dado por la degradación y el fotoblanqueo (*photobleaching*) de los fluoróforos en función del tiempo de irradiación. Este efecto es en general diferente para cada molécula y por lo tanto la relación entre las bandas de emisión de cada fluoróforo varía con el tiempo. Además de esto, es de esperar que la sensibilidad al efecto de extinción sea diferente para cada molécula y también interfiera en la medida. Por lo tanto, es necesario una calibración mas compleja.

Por otro lado, es interesante considerar la posibilidad de optimizar la calibración con dos señales medibles cuantitativamente, generadas por el sensor en ausencia y en presencia del analito:

modulación OR-OR (fig 5.1c). Esto podría lograrse de diferentes maneras. Los dos fluoróforos pueden interactuar, de tal manera que la unión con el analito (evento de sensado) produzca una redistribución de intensidades entre la dos formas emisivas. Esto puede lograrse mediante FRET, con el cual la fluorescencia puede ser modificada entre dos bandas de emisión pertenecientes al donador y al aceptor FRET. La otra posibilidad es crear el sistema en el cual la unión con el analito influye en la formación de excímeros (complejos entre moléculas del fluoróforo en estado basal y excitado). De todos modos, hasta aquí no habría mucha ventaja del sensado por relación de bandas tipo OR-OR sobre sensado con un fluoróforo de referencia (figuras 5.1b y 5.1c). En ambos casos se obtiene una relación de intensidades a dos longitudes de onda, λ_1 y λ_2 . La única diferencia es que en vez de tener un valor permanente de intensidad en el segundo canal (referencia a λ_2), esta aumenta o disminuye de manera inversa a lo que ocurre con los cambios en el primer canal (a λ_1). La modulación OR-OR entre dos bandas procedentes de un mismo fluoróforo o entre dos formas de un mismo fluoróforo pueden tener diferentes ventajas, tales como un fuerte cambio de color de emisión (o longitud de onda de emisión), facilitando la visualización. Sin embargo esta aproximación por si sola no provee una esencial mejora en el problema de la calibración. Las dos formas que emiten son formas diferentes del estado basal, y la transición entre ellas en el evento de sensado ocurre también en estado basal. Así, la respuesta en la excitación y emisión indica solamente la población relativa de estas formas. Por lo tanto, es de esperar también que ambas especies presenten diferente respuesta al fotoblanqueo o a efectos de extinción. Esto puede causar variaciones significativas en la relación de intensidades no relacionadas con la unión del analito.

Lo expuesto hasta aquí muestra que, para encontrar un mecanismo de sensado por fluorescencia que permita una calibración más eficiente –que incluya una compensación de todos los efectos de extinción no específicos–, se deberían cumplir los siguientes requisitos:

1. Presentar dos canales de información derivados de una sola molécula de fluoróforo
2. Estos canales de información deben estar fuertemente interconectados, de modo que las intensidades registradas tienen que cambiar proporcionalmente en respuesta a cualquier perturbación no relacionada con el analito. La relación entre ambos canales sólo debe depender de la interacción con el analito.

Esquemáticamente esto está representado en la figura 5.1d. El análisis de diferentes esquemas cinéticos muestra que la insensibilidad a diferentes efectos de extinción puede lograrse con fluoróforos que exhiben una rápida reacción reversible (comparado con la velocidad de emisión) entre estados excitados. En este mecanismo el equilibrio dinámico entre dos formas emisoras se establece en una escala de tiempo muy rápido después de la excitación y se mantiene durante la emisión. En la figura 5.2 se ejemplifica esto con una molécula de 3-hidoxicromona (3HC). Las 3HC presentan en el mismo anillo aromático (y por lo tanto en el mismo plano) en posiciones consecutivas grupos OH y C=O, donador y aceptor de hidrógeno respectivamente. La molécula en su forma normal N (un estado basal) puede ser promovida con λ_{ex} a su estado excitado N*, el cual puede relajar de forma radiativa (emitiendo con λ_{N^*}) o no radiativa. Asimismo, N* puede lograr un rápido equilibrio tautomérico mediante la transferencia protónica intramolecular en estado excitado (ESIPT, acrónimo del inglés *Excited State Intramolecular Proton Transfer*). Finalmente, T*

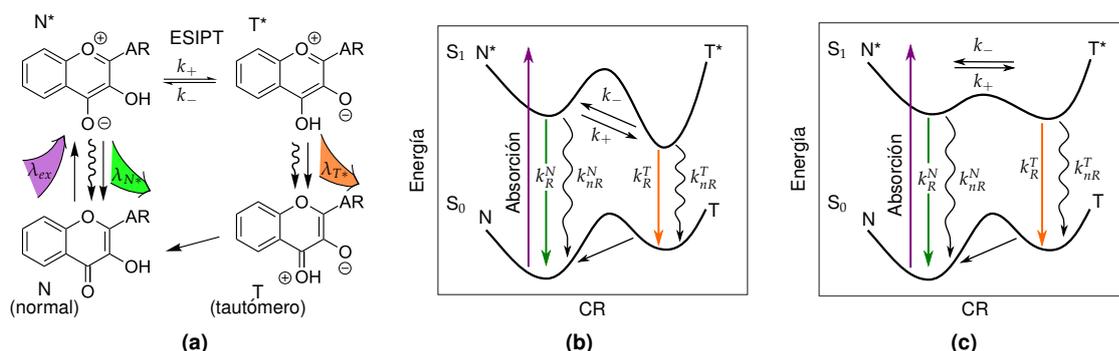


Figura 5.2 (a) Esquema fotoquímico de una 3-hidroxicromona, donde “AR” indica un sustituyente aromático. Representación esquemática de dos mecanismos de reacción ESIPT, para los cuales las dos bandas de similar intensidad pueden ser observadas en el espectro de emisión. (b) Una reacción lenta e irreversible se da cuando $k_- \rightarrow 0$ o $k_- \gg k_+$. Debido a la apreciable barrera, la reacción ocurre en una escala similar de tiempo a la emisión, tal que la emisión desde el estado excitado inicial N^* puede ser observado. (c) En el caso de una reacción rápida y reversible, la distribución de intensidades entre las dos bandas corresponde a la distribución de especies en estado excitado en equilibrio. Nótese que la coordenada de reacción (CR) esta simplificada, puede representar la suma multidimensional de caminos, incluyendo la coordenada del solvente. Adaptado ref [4]

puede relajarse de forma radiativa (emitiendo con λ_{T^*}) o no radiativa, para llegar a la forma T (el tautómero no excitado) que se convierte en N con un proceso irreversible. Si las velocidades de reacción del ESIPT identificadas con k_+ y k_- son mayores que la velocidad de decaimiento radiativo o no radiativo de ambas formas excitadas, cualquier factor que interfiera con la emisión de una de las formas produciendo su extinción lograría también la extinción simultáneamente de la otra forma y en igual proporción. Esto podría proveer una compensación dinámica de los efectos de la extinción, tal que la relación de intensidades permanezca inalterada. El evento de sensado en este caso debería estar acoplado con el cambio relativo de energías de los estados N^* y T^* , lo que debe causar la redistribución de las especies excitadas entre ellos y la correspondiente variación relativa de intensidades de las dos bandas.[2] Experimentalmente se observa un espectro de emisión de dos bandas bien definidas, presentan un gran corrimiento de Stokes (*Stokes shift*) y ambas bandas de emisión presentan el mismo espectro de excitación. Esto demuestra que la banda T^* se origina por el ESIPT y no por excitación directa de la forma T ya que esta se encuentra en cantidad despreciable respecto de la forma N. Las reacciones ESIPT ocurren muy rápido (del orden del picosegundo, ps)[5], por lo que la observación de N^* podría deberse a dos mecanismos:[4]

- *Cinético*: El equilibrio de la reacción ESIPT está desplazado hacia T^* (fig. 5.2b). Asimismo las formas N^* y T^* pueden estar separadas por una barrera energética. Entonces la forma N^* podría aparecer debido a la presencia de conformeros y, en ambientes próticos, debido a la competencia en la formación de puentes de hidrógeno intra e intermolecular (el ESIPT ocurre comúnmente por una vía intramolecular). Esto hace más lenta la reacción ESIPT, y la emisión

desde N^* ocurre en curso a su transición a la forma T^* .

- *Termodinámico*: En este caso la reacción ESIPT puede ser muy rápida (fig. 5.2c). Pero la reacción reversa es más rápida que la emisión, lo que permite establecer el equilibrio entre las formas N^* y T^* , tal que las dos emisiones pueden ser observadas con intensidades comparables. En este caso la distribución de intensidades entre las dos bandas esta determinada por la distribución de Boltzmann del las especies en sus estados excitados.

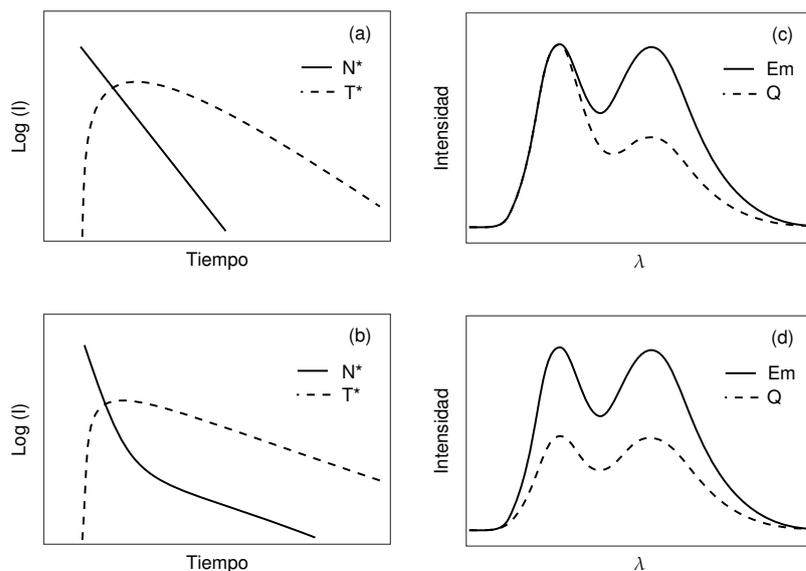


Figura 5.3 Manifestación de regímenes (a) cinético y (b) termodinámico del decaimiento de la fluorescencia resuelta en el tiempo, (c) y (d) espectros de emisión en estado estacionario, respectivamente. Em representa la emisión normal, y Q la emisión bajo los efectos de un agente extintor o “Quencher”. Adaptado de la ref [4]

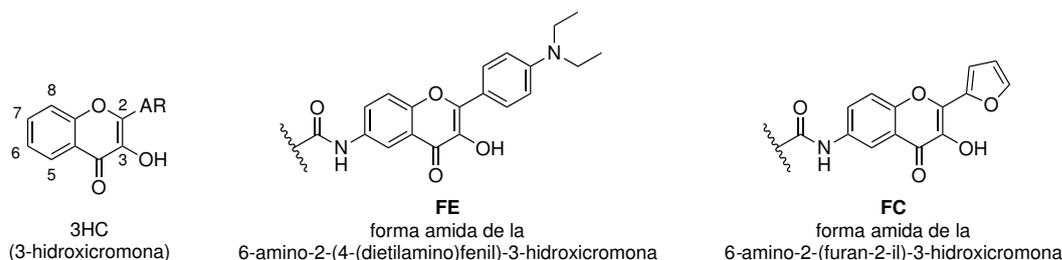
La diferencia entre estos casos se puede reconocer por espectroscopia de fluorescencia resuelta en el tiempo (fig. 5.3a y 5.3b). En el caso del mecanismo cinético la tasa de decaimiento de N^* se corresponde con la subida de T^* . Contrariamente, en el caso en que se establece rápidamente el equilibrio termodinámico, el decaimiento de fluorescencia son curvas en las que ambas bandas presentan dos componentes. Los componentes con tiempos característicos más cortos (decaimiento de N^* y aumento de T^*) reflejan la velocidad del ESIPT, mientras que los componentes de tiempos mas largos demuestran la despoblación de ambos estados unidos por el equilibrio dinámico. También se pueden utilizar extintores (*quenchers*) donde se podrían distinguir entre ambos mecanismos por medidas de fluorescencia de estado estacionario. En el caso termodinámico se espera una disminución en el rendimiento cuántico de ambas bandas indistintamente, mientras que en el caso cinético la banda T^* debería ser particularmente más sensible.[2]

La intensidad relativa de cada banda, se verá fuertemente afectada por la polaridad del medio en que se encuentra la molécula, dado que ambas formas presentan distinto momento dipolar. De manera general, en solventes de baja polaridad la banda T^* es más intensa que la banda N^* , mientras que en solventes polares la banda N^* será la de mayor intensidad. Dado que la relación

I_{N^*}/I_{T^*} depende de la polaridad del medio, estas moléculas presentan un gran interés como sondas de polaridad.

De los muchos compuestos con ESIPT, las 3HC presentan la ventaja de tener un esqueleto rígido impidiendo la formación de isómeros en el estado basal y excitado. Asimismo, esta característica contribuye a una mayor emisión de fluorescencia (mayor QY) en una amplia variedad de solventes, respecto a otros compuesto con ESIPT. La propiedades del grupo aromático (AR) en la posición 2 de la 3HC provocan fuertes modificaciones de las características espectrales. El empleo de grupos aromáticos dadores de electrones presentan una fuerte transferencia de carga hacia el grupo C=O, lo que incrementa el momento dipolar de la molécula en los estados basal y excitado, disminuye la velocidad del ESIPT, e incrementa la población del estado N^* (ergo, aumenta la intensidad de la banda N^*). Esta transferencia de carga se da principalmente en el estado excitado, y se la distingue como ESICT (acronimo del ingles, *Excited State Intramolecular Charge Transfer*).[4]

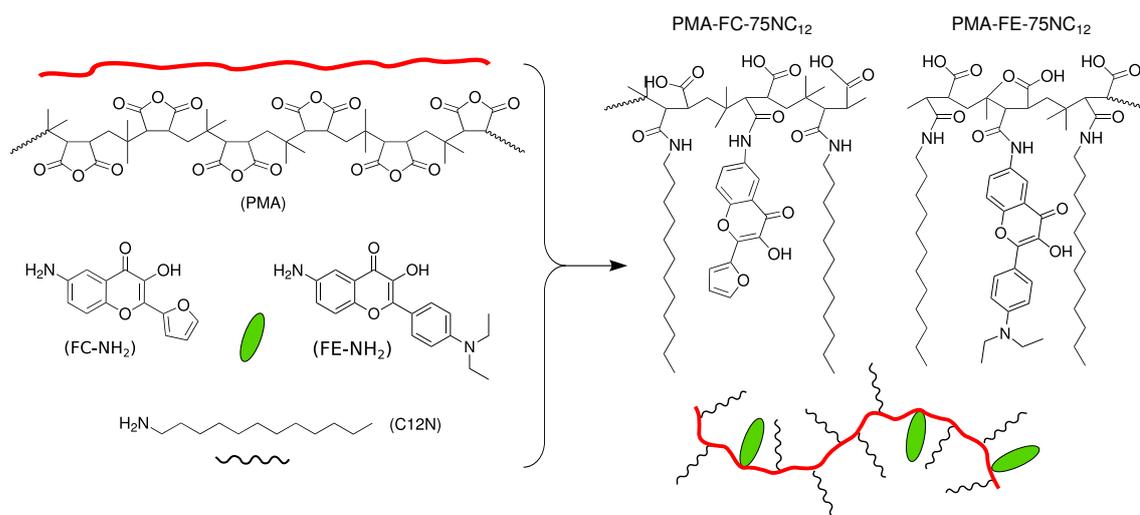
En este trabajo, se emplearon dos 3-hidroxicromonas como sondas ESIPT, FE y FC las cuales fueron unidas a un polímero por la formación de grupos amida en la posición 6:



En la sección 3.3.2 se describe en detalle la síntesis de la sonda FC. La sonda FE fue proporcionada por el Dr. Jonathan Fauerbach, del Laboratorio de la Dra. Jares. Estas sondas fueron sintetizadas con un grupo amino ($-NH_2$) en la posición 6 de la cromona, el cual se emplea como grupo nucleofílico (punto de anclaje) para conjugarlo con el polímero anfifílico como se describe en la próxima sección. Dado que estas moléculas se conjugan con el polímero mediante una unión amida (por reacción directa del grupo amino con la función anhídrido del polímero), se emplearon los precursores acetilados como referencia de la sonda libre para los ensayos de caracterización (si se emplea la forma amina del fluoróforo, presenta un espectro de emisión diferente al que se tiene en el polímero). Para identificar los respectivos compuestos, nombraremos FE y FC a las moléculas unidas al polímero, y AcFE y AcFC a las formas acetiladas empleadas como referencia de la sonda libre.

5.1.2 Ensamblados supramoleculares de polímeros anfifílicos y nanopartículas

El grupo del Dr. Parak en la Universidad de Marburg, Alemania, ha empleado este tipo de polímeros anfifílicos derivados del poli-anhídrido maléico (PMA), para modificar la superficie de diferentes tipos de nanopartículas, protegidas por largas cadenas alquílicas formando ensamblados supramoleculares. Esta estrategia permite modificar fácilmente las nanopartículas sin alterar su estabilidad (como sí ocurre con las reacciones de intercambio de ligandos).[6] El uso de poli-

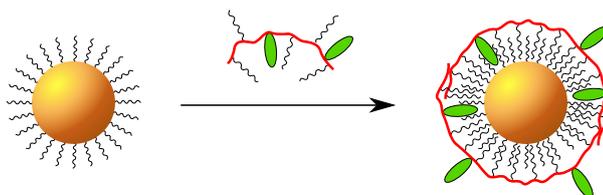


Esquema 5.1 Síntesis de un polímero anfifílico funcionalizado con las sondas ES IPT.

alt-isobutilen anhídrido maléico facilita la unión de moléculas antes o después de ser ensamblado con las NPs [7] permitiendo que dichas moléculas ocupen distintas posiciones respecto de la superficie. Mediante reacciones de acoplamiento activando los grupos carboxilato fue posible modificar los ensamblados con un número determinado de cadenas de poli-etilenglicol para mejorar la estabilidad en medios biológicos.[8]

Como se comentó en la introducción de esta tesis, el objetivo final de este trabajo está centrado en el estudio de la modificación de nanopartículas metálicas para el desarrollo de un sensor fotomodulable. En este capítulo se describe el estudio de polímeros funcionalizados con las sondas FE o FC y dodecilamina, los cuales son ensamblados con AuNPs de 3 y 4 nm de diámetro del carozo metálico.

La reacción de acoplamiento de las 3HC y la dodecilamina con el polímero ocurren mediante la formación de una unión amida entre los grupos amino de las moléculas que se adicionan y los grupos anhídridos de PMA. Como se describe en la sección 3.3.3 la síntesis ocurre en dos pasos consecutivos, donde reaccionan el PMA y la sonda fluorescente (FE-NH₂ o FC-NH₂) por 12 h a 60 °C en CHCl₃ como solvente. Luego se agrega la dodecilamina y se deja reaccionando unas 6 h. Dado que el PMA es insoluble en CHCl₃ se somete la mezcla de reacción a ultrasonido por 1 min para favorecer la reacción.



Esquema 5.2 Reacción de formación de los ensamblados supramoleculares de NPs y polímeros anfifílicos funcionalizados

Una vez purificado el polímero funcionalizado mediante cromatografía de exclusión por tamaño se preparan los ensamblados cómo se describe en la sección 3.4. El esquema 5.2 muestra como se puede interpretar la formación de los ensamblados del polímero con la AuNPs. En los ensamblados se pueden identificar tres zonas diferentes: el carozo metálico en el centro, una zona hidrofóbica formada por las cadenas de los alcanotioles y dodecilamina y, en el exterior, una zona hidrofílica dada por los grupos carboxilatos del PMA. Se ha reportado en la bibliografía que si la unión de los fluoróforos con el PMA se realiza antes de formar los ensamblados, estos quedan localizados en la zona hidrofóbica [7]. Esta interpretación es demasiado simple, y posiblemente no sea adecuada para interpretar los espectros de fluorescencia de la sonda ESIPT y el comportamiento de todo el sensor. A lo largo de este capítulo se describen estudios realizados que permitieron elaborar un modelo más amplio de la estructura de estos sistemas. En la sección 5.3 se describen los diferentes ensayos de purificación de los ensamblados. Este paso es fundamental para poder separar el polímero no ensamblado a la NP.

5.2 Caracterización de las sondas ESIPT

En la sección ?? se describe en detalle la síntesis de las moléculas utilizadas. Para poder interpretar el comportamiento de las sondas FE y FC en el polímero anfifílico y en los ensamblados con nanopartículas como sensores de polaridad, se caracterizó el comportamiento de las moléculas libres en solventes puros y mezcla binarias de diferente polaridad. Asimismo, se estudio el comportamiento de los ensamblados frente a cambios de pH y fuerza iónica. A continuación se detallan las características de cada una de las sondas de polaridad y se discute el comportamiento en diferentes condiciones.

5.2.1 Sonda FE, control

La sonda FE tiene en la posición 2 de la 3HC un grupo 4'-(N,N-dialquilamino)fenilo,¹ el cual actúa como un fuerte donador de electrones en el estado excitado (por efecto mesomérico o resonante). Las moléculas de este tipo, generalmente presentan un bajo rendimiento cuántico de fluorescencia (ϕ) en agua [9, 10] y otros solventes (como acetonitrilo, acetona, tetrahidrofurano y acetato de etilo) [11]. Más aun, la introducción de un grupo 4'-(N,N-dialquilamino)fenilo, incrementa la transferencia de carga en el estado excitado [12, 13] resultando en una dramática disminución de su fluorescencia en agua.[14, 15]

La sonda FE muestra una disminución en la separación de las bandas N* y T* con el aumento de la polaridad. La banda N* presenta un fuerte solvatocromismo positivo (efecto batocrómico, corrimiento hacia el rojo) con el aumento de la polaridad, principalmente con solventes próticos. Este corrimiento llega incluso a la superposición espectral de las bandas N* y T*. Efecto que ha sido interpretado considerando la existencia de un segundo estado basal que puede ser excitado, generando un espectro de emisión de tres bandas [16]. En las 3HC con grupos aromáticos fuertemente dadores de electrones se puede localizar una densidad de carga negativa sobre el grupo

¹Las cromonas que tienen un grupo fenilo como sustituyente en la posición 2, reciben el nombre de *flavonas*.

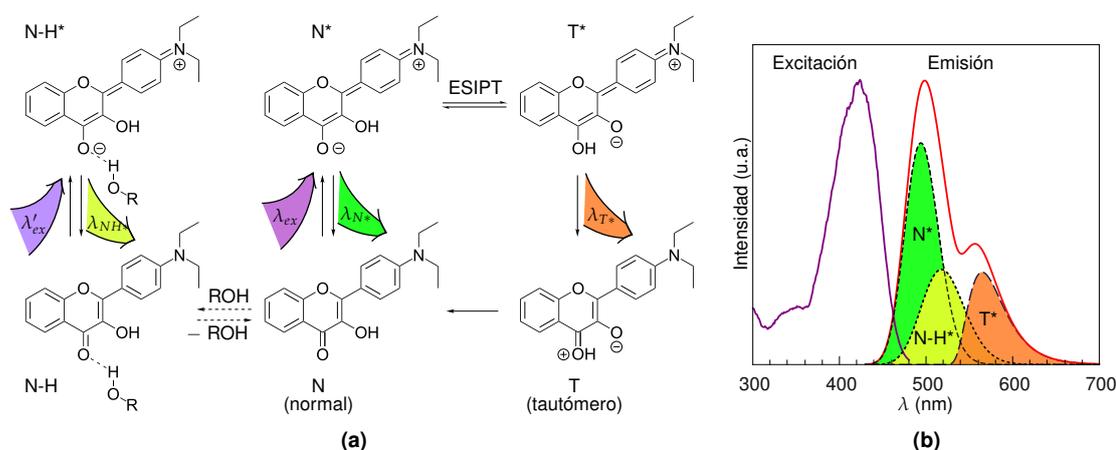


Figura 5.4 (a) Ejemplo del diagrama fotofísico del fenómeno ESIPT de una 3HC (adaptado de la ref [18]) (b) espectros de excitación y emisión correspondientes a la sonda AcFE en CHCl_3 con un 5% de *i*-PrOH. El espectro de emisión ha sido deconvolucionado con las correspondientes componentes.

$\text{C}=\text{O}$, lo que incrementa su carácter de aceptor de puente hidrógeno [17]. Esto favorece la interacción con un solvente prótico, mediando la formación de un puente hidrógeno intermolecular. Este nuevo aducto (molécula-solvente), que llamaremos N-H, puede ser excitado a un estado N-H* el cual decae emitiendo un fotón de energía $\lambda_{\text{N-H}^*}$, como se muestra en la figura 5.4. La presencia de la banda de emisión N-H*, se manifiesta mediante un corrimiento hacia el rojo, del pico a menores longitudes de onda. Por ello, tanto la posición como la magnitud de cada una de las tres bandas (N*, NH* y T*) se obtienen mediante una compleja deconvolución del espectro [18]. Es interesante resaltar que la magnitud de la banda N-H* es una medida del grado de interacción (o hidratación) que tiene la molécula sonda con un solvente prótico.

Se estudió el comportamiento de la sonda FE libre frente a cambios de polaridad del medio, determinando los espectro de emisión de fluorescencia. Se empleó la 6-acetamidaFE (AcFE) como molécula modelo, dado que para anclar esta sonda al polímero se se forman grupos amida. Se tomaron ~ 2 mg de AcFE y se disolvieron en 0,5 mL de dimetil sulfóxido DMSO. Luego, 1 μL de esta solución se agregó sobre 1 mL de agua H_2O o cloroformo (CHCl_3), logrando una dilución 1:1000, la cual por espectrometría de UV-Vis presentó una absorbancia de $\sim 0,1$ a 420 nm. La solución está entonces suficientemente diluida para evitar errores de interpretación por efectos de filtro interno. En la figura 5.5a se muestran algunos espectros de emisión de AcFE en CHCl_3 y luego de agregados aditivos de isopropanol (*i*-PrOH). Se puede observar que la intensidad total de la emisión de fluorescencia aumenta con la concentración de *i*-PrOH, lo que muestra que el rendimiento cuántico de fluorescencia de estas sondas depende fuertemente del medio.[11] La figura 5.5b muestra los espectros de fluorescencia de la sonda AcFE en H_2O con agregados de *i*-PrOH. Se observa que se pierde completamente la estructura de dos bandas características del fenómeno ESIPT. Además, se hace evidente el aumento de la fluorescencia con el agregado de *i*-PrOH en concordancia con lo observado para la sonda AcFE en CHCl_3 . Se verifica, entonces, el bajo rendimiento cuántico de fluorescencia en agua. [9, 10] Al mismo tiempo, no se observan las

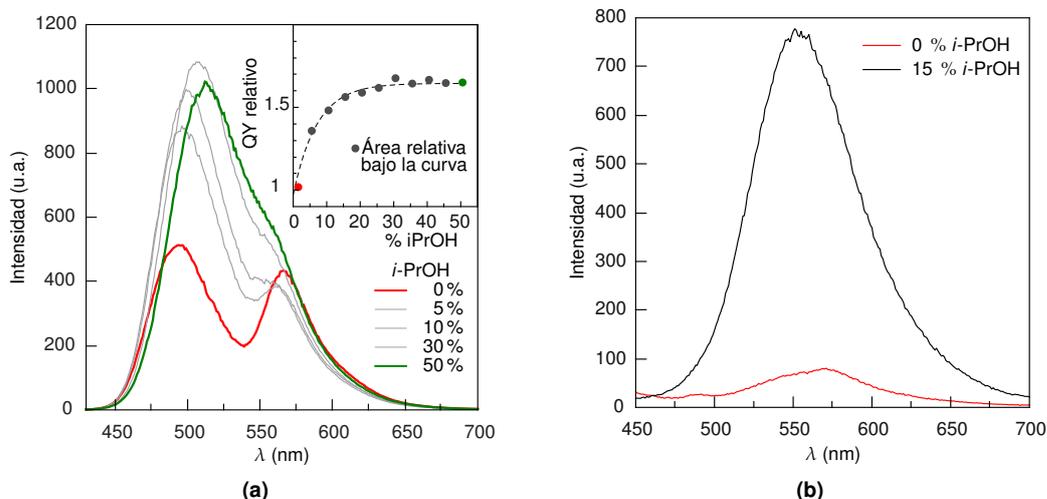


Figura 5.5 Comparación de los espectros de fluorescencia de la sonda AcFE libre en (a) clorofor- mo y (b) agua, frente a agregados de isopropanol

dos bandas N^* y T^* bien separadas.

Los espectros de emisión de la AcFE en CHCl_3 con agregados de *i*-PrOH, se deconvolucionaron con tres bandas de emisión (N^* , $N\text{-}H^*$ y T^*).[18]

Cada componente se ajustó con una función LogNormal asimétrica de 4 parámetros de Siano- Metzler [19]:

$$alogn(\bar{\nu}_0, H, \rho, I_0, \bar{\nu}) = I_0 \exp \left[- \left(\frac{\ln 2}{(\ln \rho)^2} \right) \left(\ln \left[\left(\frac{\bar{\nu} - \bar{\nu}_0}{H} \right) \left(\frac{\rho^2 - 1}{\rho} \right) + 1 \right] \right)^2 \right] \quad (5.1)$$

donde $\bar{\nu}_0$ es el número de onda en el máximo (I_0), H es el ancho a media altura, y ρ es la asimetría, definida como se muestra en la figura 5.6.

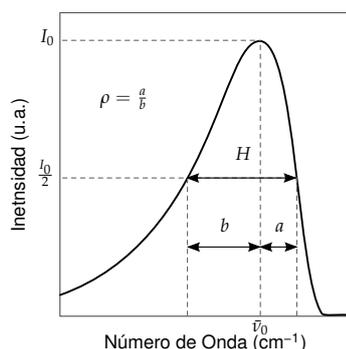


Figura 5.6 Representación de una función LogNormal de 4 parámetros. I_0 es la intensidad máxima, $\bar{\nu}_0$ es la posición del máximo, H es el ancho del pico a media altura, y ρ es el parámetro que define la asimetría de la curva.

Para el ajuste se utilizó el software *Fityk*² [20] el cual emplea una ecuación aproximada de la

²<http://fityk.nieto.pl/>

de Siano-Metzler dada por [21]:

$$\text{LogNormal}(\bar{\nu}_0, H, B, I_0, \bar{\nu}) = I_0 \exp \left[-\ln 2 \cdot \left(\frac{\ln [2B(\bar{\nu} - \bar{\nu}_0)/H + 1]}{B} \right)^2 \right] \quad (5.2)$$

Esta ecuación se obtiene reemplazando en la ecuación 5.1 la aproximación:

$$\left(\frac{\rho^2 - 1}{\rho} \right) \approx 2 \ln \rho \quad \Rightarrow \quad B = \ln \rho$$

De esta manera la asimetría (ρ) de la ecuación de Siano-Metzler se relaciona con el factor de forma B de la ecuación disponible en el software. En la ref. [18] se restringe la asimetría de las bandas de emisión dentro del rango $0,5 \leq \rho \leq 1$, lo que se corresponde con $-0,7 \leq B \leq 0$ para los ajustes realizados en esta tesis.

Para optimizar el ajuste se realizó un procedimiento como el siguiente:

1. Para 0 % *i*-PrOH, en primer lugar se emplean sólo dos picos, para ajustar el espectro y obtener las posiciones (ν_0) y la forma (b) aproximada.
2. Para 50 % *i*-PrOH, además de las dos componentes anteriores con ν_0 , b y H fijos. Se agrega una tercer componente y se optimiza el ajuste.
3. Estas tres componentes se emplean para ajustar un espectro de 25 % *i*-PrOH. Primero dejando libre solo la variable I_0 , y se repite el ajuste liberando H .
4. Con los valores obtenidos en el paso anterior, se ajustan todos los espectros de la serie, dejando libre sola las variables I_0 .
5. Finalmente se repiten los ajustes de todos los espectros liberando de una variable por vez ($I_0 \rightarrow \bar{\nu}_0 \rightarrow H \rightarrow b \rightarrow I_0 \dots$). Por último se realiza un ajuste liberando todas las variables.

La tabla 5.1 muestra los valores promedio hallados para ajustar los espectros de AcFE en CHCl_3 frente a agregados de *i*-PrOH, y la figura 5.7 muestra algunos espectros con sus tres componentes. Adicionalmente, la figura 5.8 muestra la relación de intensidades de cada componente.

Como era esperado, la intensidad de la banda N-H* aumenta frente al agregado de *i*-PrOH. En forma general para estas moléculas a medida que aumenta la polaridad del medio, se incrementa

Tabla 5.1 Resultado de los ajustes de espectros de emisión de la sonda AcFE. Se informan los parámetros que caracterizan a las señales. Valores de ajuste para las bandas N*, N-H* y T* para AcFE en cloroformo + *i*-PrOH

Componente	ν_0 (cm ⁻¹)	H (cm ⁻¹)	ρ	λ_0 (nm)	fwhm (nm)
N*	20325	1960	0.8	492	47
NH*	19342	2170	0.75	517	57
T*	17699	1340	0.65	565	42

Donde ν_0 , H y ρ indican la posición del máximos, el ancho a media altura y la asimetría de cada banda (componente), mientras que λ_0 es la longitud e onda del máximo de la banda expresada en nm y fwhm es el ancho a media altura.

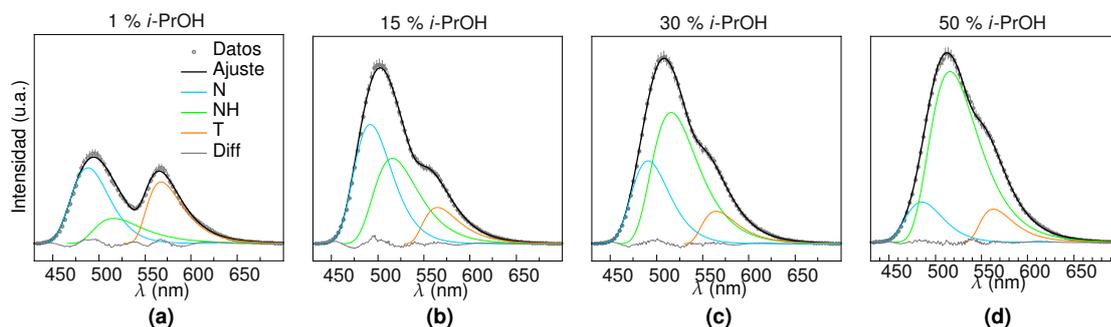


Figura 5.7 Ajuste de los espectros de AcFE en mezclas CHCl_3 -*i*-PrOH.

la intensidad de N^* y disminuye la de T^* , es decir aumenta la relación $I_{\text{N}^*}/I_{\text{T}^*}$. Lo correcto es relacionar las áreas de cada componente antes que altura máxima de cada pico, ya que las primeras se corresponden con el número de fotones emitidos. Sin embargo, aquí se obtuvo un resultado contradictorio como se muestra en la figura 5.8. La relación de intensidades $I_{\text{N}^*}/I_{\text{T}^*}$ presenta un aumento a bajas concentraciones de *i*-PrOH y luego disminuye a medida se que aumenta la polaridad del medio (puntos azules en fig 5.8b). Dado que en la primer banda ($\text{N}^* + \text{N-H}^*$) no se distinguen las dos componentes, posiblemente el algoritmo matemático empleado para realizar el ajuste conduce a un resultado erróneo para este sistema, donde la variación de la polaridad y la interacción por puente hidrógeno se encuentran fuertemente acopladas. El procedimiento de ajuste requirió fijar la posición de cada banda en los primeros pasos de la iteración. De no hacerlo, se obtiene un ajuste con una gran dispersión en los valores de cada parámetro para toda la serie de espectros. Sin bien al fijar la posición de cada pico no se considera el solvatochromismo intrínseco de estos compuestos, esto es necesario para lograr ajustes que describan razonablemente los datos experimentales en conjunto [13, 22].

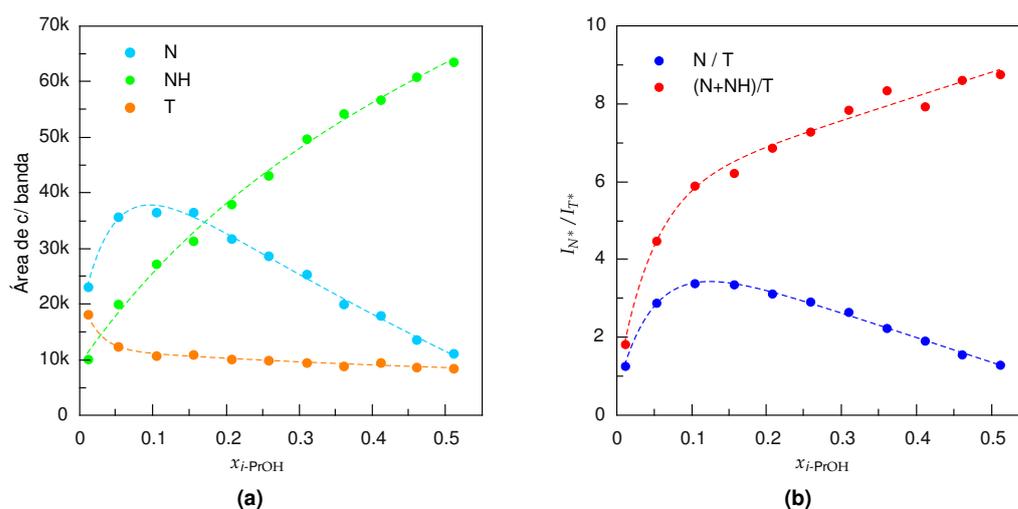


Figura 5.8 Relación de bandas

Frecuentemente se suele usar la ecuación de de Lippert-Mataga [1, 23], en la cual todos los

efectos de polarización, excepto la generación de campos reactivo, son tenidos en cuenta; además, se supone que los dipolos del estado basal y excitado (μ_g y μ_e) están orientados en la misma dirección. El modelo usa como parámetro el corrimiento de Stokes, el cual es la diferencia entre la posición del máximo de absorción y emisión en términos de escala de número de onda (en cm^{-1}). Describe cómo los efectos de los solventes, como función de n^2 y ϵ , pueden producir corrimientos relativos entre los espectros de absorción y fluorescencia:

$$\bar{\nu}_A - \bar{\nu}_F = \frac{2}{hc} \left(\frac{\epsilon - 1}{2\epsilon + 1} - \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1} \right) \frac{(\mu_e - \mu_g)^2}{a^3} + const = \frac{2}{hca^3} \Delta f(\epsilon, n) \Delta \mu^2 + const \quad (5.3)$$

Aquí c es la velocidad de la luz, h es la constante de Planck, y a es el radio de Onsager (radio de fluoróforo considerándolo esférico). En la ecuación 5.3, la diferencia entre los dos términos dentro del gran paréntesis está definido como $\Delta f(\epsilon, n)$;

$$\Delta f(\epsilon, n) = \frac{\epsilon - 1}{2\epsilon + 1} - \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1} \quad (5.4)$$

y es comúnmente llamada “polarizabilidad orientacional”. Se interpreta considerando que la contribución n^2 contempla la habilidad de los electrones perteneciente a los grupos polarizables en el entorno que es polarizado, en orden de estabilizar el momento dipolar. Mientras esta polarización es instantánea y ocurre durante la absorción, la consecuencia es que el espectro de absorción se esta desplazado hacia menores energías, disminuyendo el corrimiento de Stokes. En contraste, el término de la constante dieléctrica ϵ tiene en cuenta para los procesos de relajación, involucra los movimientos rotacionales y traslacionales de grupo de átomos o de toda la molécula. Este proceso lleva un tiempo significativo y resulta en el corrimiento del espectro de fluorescencia hacia bajas energías, aumentando el corrimiento de Stokes. Los valores de Δf calibrados para diferentes solventes apróticos puede ser usado para determinar valores de $\mu_g - \mu_e$, los cuales puede servir como una escala empírica para estimar la fuerza del ESICT.

Mas aún, la sonda FE ha sido ampliamente utilizada para determinar la hidratación de micelas,[24] polímeros, membranas lipídicas[16] y proteínas.[25] En los trabajos donde se determinó el grado de hidratación de las sondas, estas se encontraban en un único solvente (o en un medio de polaridad relativamente constante) el cual contenía pequeñas cantidades de agua la cual no afectaba la polaridad del mismo en gran medida. En cambio, en las experiencias descritas en este capítulo, la polaridad y la hidratación se modifican concomitantemente. Por ello, el algoritmo utilizado para el ajuste puede conducir a resultados sin sentido físico.

5.2.2 Sonda FC, control

La sonda FC es una 3HC que en la posición 2 tiene un grupo 2-furilo como sustituyente. Si bien el grupo furilo actúa como un donador de electrones en el estado excitado, no presenta una transferencia de carga tan intensa como en el caso de la sonda FE. Por esto mismo, la sonda FC no muestra un marcado efecto solvatocrómico en la primera banda del espectro de emisión de fluorescencia. Por ello, se considera que la banda N-H* es muy poco intensa o su contribución al espectro es prácticamente nula [17]. Esta menor transferencia de carga negativa hacia el grupo

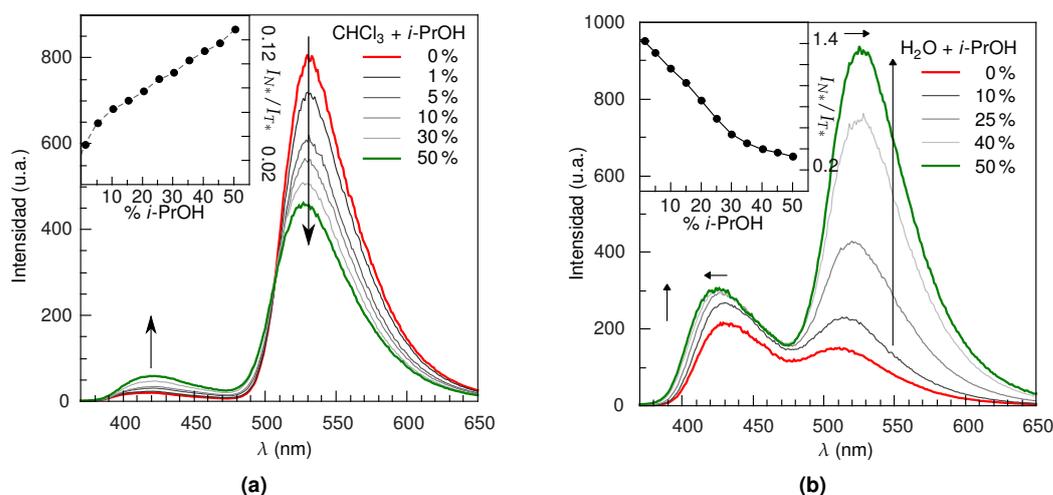


Figura 5.9 Sonda de control AcFC en (a) CHCl_3 con agregados de *i*-PrOH y (b) en H_2O con agregados de *i*-PrOH. La relación I_{N^*}/I_{T^*} para cada grupo de experimentos, se muestran como gráficos insertos.

C=O tiene un efecto importante. Incluso en agua presenta un mayor rendimiento cuántico de fluorescencia (QY en cloroformo 18,4% [26] y en agua 8,6%, relativo al valor en cloroformo).

Por lo tanto, el espectro de emisión puede ajustarse más fácilmente con sólo dos componentes, N^* y T^* . De manera similar a lo ensayado para la sonda AcFE se realizó para caracterizar el comportamiento de la sonda AcFC. Se tomaron ~ 2 mg de AcFC y se disolvieron en 0,5 mL de DMSO. Luego 1 μL de esta solución se agregó sobre 1 mL de H_2O o CHCl_3 , logrando una dilución 1:1000, la cual por espectrometría de UV-Vis presentó una absorbancia de $\sim 0,1$ a 354 nm.

La figura 5.9a muestra los espectros de emisión de la sonda de control AcFC en CHCl_3 con agregados de *i*-PrOH. Se puede observar el comportamiento esperado, donde disminuye apreciablemente la banda T^* dado el aumento de la polaridad del medio. Sin embargo la banda N^* no muestra un aumento muy marcado en su intensidad. Es por esto que se observa un marcado descenso del rendimiento cuántico.

A diferencia de lo observado para la sonda AcFE en agua (fig 5.5b) en la cual se pierde el fenómeno ESIPT, y el rendimiento cuántico de fluorescencia es extremadamente bajo, para la sonda AcFC la emisión dual presenta un rendimiento cuántico cercano al 8%. El rendimiento cuántico de fluorescencia aumenta considerablemente con el agregado de *i*-PrOH de manera similar a lo que ocurre con la sonda AcFE. Es importante notar que las bandas N^* y T^* manifiestan pequeños corrimientos en sus máximos en el sistema H_2O -*i*-PrOH.

A modo de resumen, se pueden destacar las características más importantes de ambas sondas frente a los cambios de polaridad del medio:

- El rendimiento cuántico de fluorescencia de ambas sondas disminuye drásticamente en agua, y aumenta drásticamente en alcohol.
- La sonda AcFC presente ESIPT incluso estando directamente en agua. Esto no se observa en

la sonda AcFE.

- La sonda AcFE, por tener un mayor ESICT, presenta un corrimiento batocrómico de la primer banda a medida que aumenta la polaridad del medio y la interacción de puente H. En cambio, la sonda AcFC presenta variaciones muy pequeñas en la posición de cada banda. Los corrimientos de la primer banda pueden interpretarse en el contexto de la ecuación 5.3.

5.3 AuNP@PMA-1FE-75NC₁₂ y ensayos de purificación

En la sección 3.4 se describen los detalles experimentales sobre cómo se prepararon los diferentes ensamblados. Algunos de ellos presentaron problemas al momento de caracterizarlos, por lo que se desconoce su verdadera composición. Sin embargo, fueron útiles en las primeras etapas de estudio de estos sistemas, para determinar comportamientos generales. Finalmente se logró caracterizar mejor una serie de polímeros con los cuales se realizaron las determinaciones cuantitativas. A modo general, se sabe que estos polímeros contienen una concentración de moléculas con las cuales fueron funcionalizados muy inferior a la esperada en relación con las cantidades de reactivos utilizados.

Se preparó un polímero con 1 % de FE-NH₂ y 75 % de dodecilamina, NC₁₂ y se lo ensambló con AuNP de 3 nm y 4 nm agregando el agente entrecruzador (como se describe en la sección 3.4). Con estos ensamblados (AuNP@PMA-1FE-75NC₁₂) se ensayaron diferentes técnicas de purificación. Se utilizaron como herramientas para la detección de los ensamblados, espectrometría UV-Vis y fluorescencia. En primer lugar se intentó purificar los ensamblados mediante precipitación selectiva, variando el pH del medio y velocidad de rotación de la centrífuga. No se encontraron condiciones satisfactorias para la purificación mediante este método. También, se ensayó la purificación mediante filtración en centrífuga con membrana de 100 kDa de tamaño de poro (filtros Amicon®), a 2200 rpm con rotor de 150 mm de diámetro (tolerancia del filtro < 1000 g). En realidad, este peso molecular está dado para proteínas (generalmente globulares). Se puede estimar el radio hidrodinámico de una proteína globular y relacionarlo con su peso molecular.[27] Se concluyó que este no es un método efectivo para la purificación de los ensamblados. Se pierde la señal de fluorescencia tanto en el filtrado como en la fracción retenida, indicando que posiblemente tanto los ensamblados con nanopartículas como el polímero libre han quedado adheridos a la membrana del filtro.

Por último se ensayó la purificación mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % en buffer TBE 1 × (Tris base 89 μM, ácido bórico 89 μM y EDTA di sódico 2 μM, pH 8,5), la cual resultó satisfactoria. En la figura 5.10 se muestra una imagen con luz día de un gel después de la electroelusión. Los ensamblados presentan una mayor migración que el polímero excedente no ensamblado a las NP. Esto posiblemente se debe al agregado del agente entrecruzador. El agente entrecruzador que se empleó para darle mayor estabilidad al ensamblado, también reacciona con el polímero excedente no ensamblado. Este polímero podría formar grandes agregados entrecruzados, presentando una menor migración en la electroforesis debido a una menor relación carga/radio.

Para recuperar las muestras purificadas del gel, se cortaron con bisturí las secciones correspondientes a cada fracción y se los dispuso cada una por separado dentro de un tubo de membrana

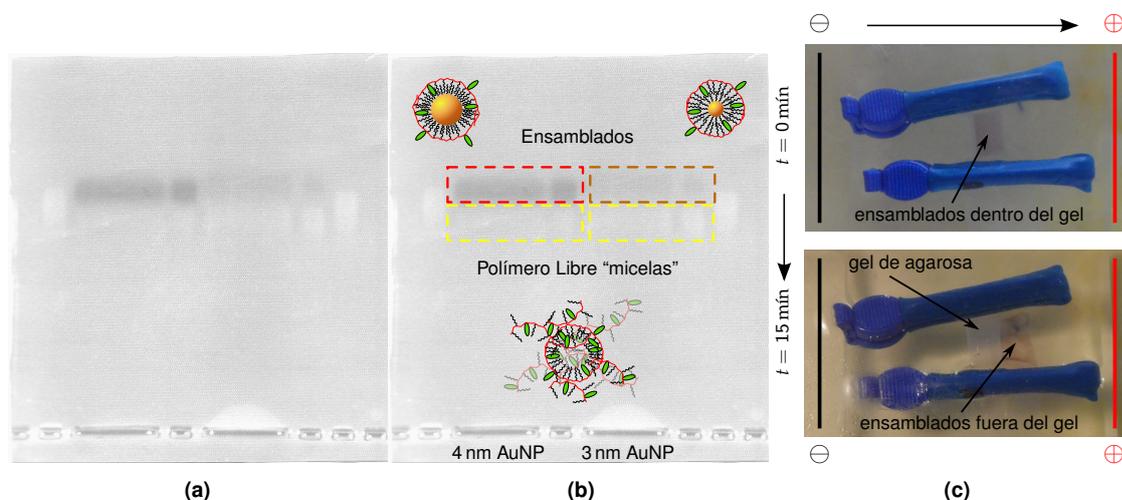


Figura 5.10 (a) Imagen de un gel de agarosa con los ensamblados y las micelas de polímero libre. (b) se muestra la misma imagen que en (a) marcando las fracciones de gel que contiene los ensamblados y el polímero excedente. (c) muestra el proceso de extracción de las muestras purificadas del gel de agarosa.

para diálisis de (MWCO 3,5 kDa) cerrado por los extremos, lleno con el mismo (u otro) buffer. Se colocó este tubo dentro de la celda de electroforesis donde se aplicó nuevamente una diferencia de potencial eléctrico y luego de unos minutos la muestra se encontraba fuera del gel, como se observa en la figura 5.10c. Se colectó con pipeta y se reservó. De esta manera se evita gran dilución, como ocurre con una diálisis. Dado que el procedimiento de purificación por electroforesis en gel de agarosa resultó satisfactorio, se abandonaron los intentos de purificación mediante filtración por centrifugación.

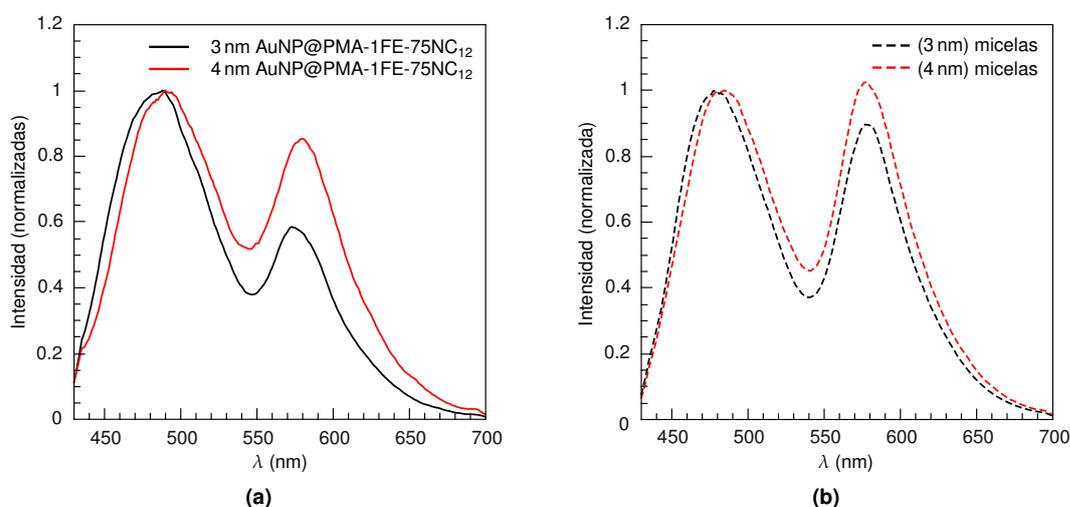


Figura 5.11 Comparación de los espectros de fluorescencia de los ensamblados y las micelas.

Al comparar los espectros de fluorescencia normalizados en la banda N* (figura 5.11), tanto para los ensamblados como para el polímero libre, se puede deducir que las sondas se encuentran en diferente entorno. La figura 5.11a muestra que los ensamblados sobre las AuNP de 4 nm presentan una banda T* de mayor intensidad respecto de la observada para las AuNPs de 3 nm. Esto indica que la sonda se encuentra menos expuesta a un entorno de mayor polaridad. Por otro lado, las micelas de polímero no ensamblado (la figura 5.11b) presentan una relación I_{N^*}/I_{T^*} menor que la de los ensamblados. Esto indica que la sonda FE se encuentra en un entorno de mayor polaridad en los ensamblados. En principio era de esperar que ambas muestras de micelas presentaran la misma relación I_{N^*}/I_{T^*} , ya que deberían tener la misma composición. Sin embargo, se puede notar una diferencia en la relación I_{N^*}/I_{T^*} , lo que indica que la sonda se encuentra en entornos algo diferentes. Esto podría indicar que el grado de entrecruzamiento, y por lo tanto la estructura de las micelas dependen fuertemente de la forma de preparación.

Los ensamblados se prepararon sobre AuNP de diferentes tamaños, utilizando la misma relación de unidades monoméricas de polímero por unidad de área (70 unidades de monómero por nm²). Esto condujo a que los potenciales químicos (AuNP y polímero) fueran diferentes en cada preparación, por lo que los ensamblados no estuvieran preparados en iguales condiciones. Asimismo, la estructura de SAMs de alcanotioles sobre las AuNP puede diferir para los distintos tamaños de carozos metálicos presentando diverso grado de orden y conducir a diferentes posiciones de la sonda fluorescente.

5.3.1 Ensayos de sensado de polaridad con AuNP@PMA-1FE-75NC₁₂

Se realizaron ensayos del comportamiento de los ensamblados AuNP@PMA-1FE-75NC₁₂ frente al agregado de un cosolvente. A una alícuota de los ensamblados purificados y suspendidos en buffer TBE 1x (pH 8,4) se hicieron agregados sucesivos de *i*-PrOH, midiendo en cada caso sus espectros de fluorescencia (ex @420 nm) luego de ser homogeneizada la muestra. En las figuras 5.12a y 5.12b se muestran los espectros de fluorescencia de la sonda FE en los ensamblados frente a agregados de *i*-PrOH. En estos casos, no fue posible realizar una deconvolución del espectro con las tres bandas comentadas antes, ya que la intensidad es significativa a bajas longitudes de onda. La intensidad del espectro no tiende a cero (0) como ocurre en la sonda libre. Esto se interpreta como un aumento de la dispersión de luz del haz de excitación, debida a la presencia de los ensamblados. Por lo tanto, no es posible diferenciar cuantitativamente entre las bandas N* y N-H*. Por ello, para la sonda FE, nos referiremos a la *primera banda* al designar a la suma de componentes N* y N-H*. En ambas muestras, se observa un corrimiento batocrómico de la primer banda respecto a los agregados del *i*-PrOH. Esto se puede interpretar como un aumento en la polaridad en el entorno de la sonda FE. Es interesante notar, que en ambos ensamblados los espectros de fluorescencia también sufren un comportamiento similar respecto a la intensidad. Para los primeros agregados de *i*-PrOH (~10% de *i*-PrOH) la intensidad total de fluorescencia disminuye y luego aumenta. Dado que la sonda FE presenta un rendimiento cuántico muy bajo en agua, se puede interpretar la disminución de la intensidad de fluorescencia en los primeros agregados de *i*-PrOH considerando que la sonda FE presenta una mayor interacción con H₂O. Asimismo, como se mostró antes, el aumento de la intensidad de fluorescencia se lo puede interpretar como una

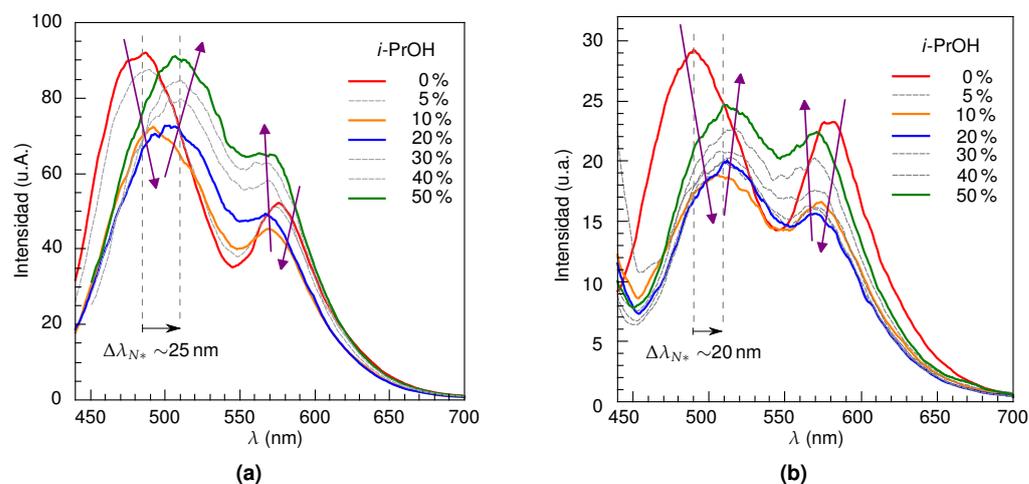


Figura 5.12 Espectros de fluorescencia de los ensamblados AuNP@PMA-1FE-75NC₁₂ en (a) AuNP de 3 nm, (b) AuNP de 4 nm, para agregados de diferentes cantidades de *i*-PrOH

mayor interacción con moléculas de *i*-PrOH.

Se modificó el pH del medio en que se encuentran los ensamblados, y se observó que la sonda FE presentaba una variación en la intensidad de ambas bandas. El buffer TBE 1x en que se encuentran los ensamblados tiene pH 8,4. Se agregó una solución de HCl 0,2 M hasta llegar a pH 7,4. La figura 5.13a muestra los espectros de fluorescencia de los ensamblados respecto al cambio de pH. Lo primero que se puede notar es una gran variación de la banda T*, sin presentarse cambios en la posición de los máximos. Asimismo, la intensidad total de fluorescencia disminuye a menor pH. Estos dos resultados pueden interpretarse como una mayor interacción de la sonda FE con agua. Es interesante notar a bajas longitudes de onda un aumento importante de la dispersión de luz. Esto podría indicar agregación de los ensamblados.

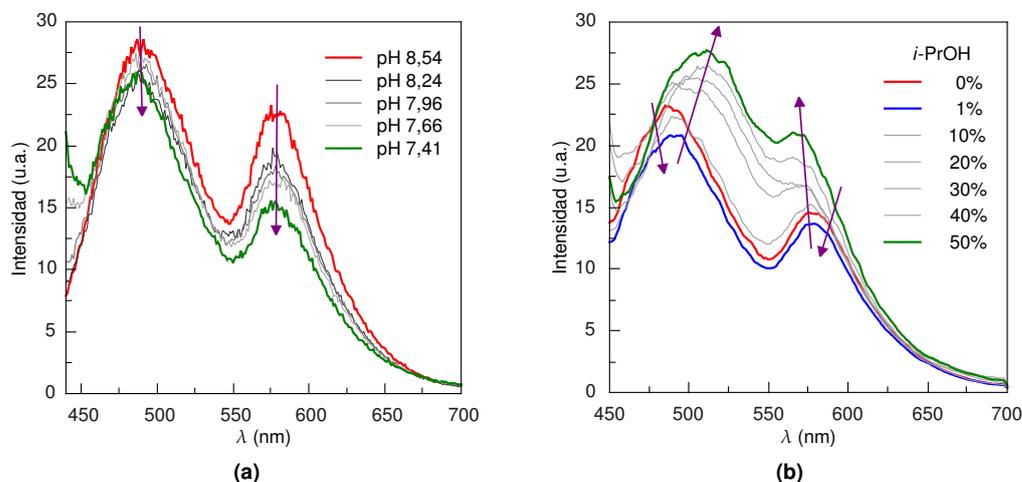


Figura 5.13 Ensamblados de 4nm y cambios de pH y agregados de *i*-PrOH.

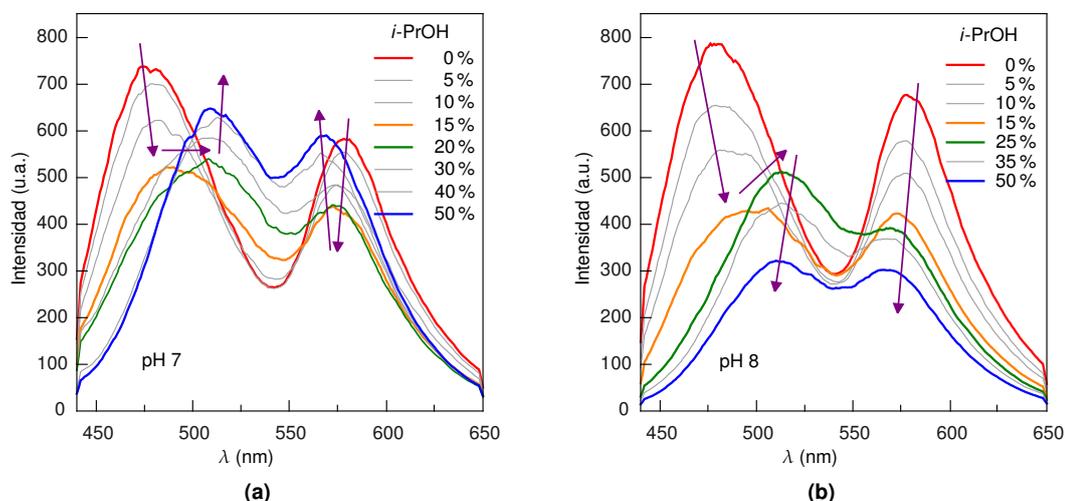


Figura 5.14 Micelas recuperadas del gel. Agregados de *i*-PrOH.

Por otro lado, al tomar los espectros de fluorescencia con agregados de *i*-PrOH a un pH 7,4 (fig. 5.13b), se observa un comportamiento algo diferente al encontrado a pH 8,4 (fig 5.12). Se observó un aumento continuo de la intensidad total de fluorescencia (principalmente en la primera banda, N* y N-H*).

Sin embargo, al ensayar los agregados de *i*-PrOH al polímero libre no ensamblado (micelas) se ve que la intensidad y posición de ambas bandas de emisión muestran un comportamiento mucho más errático respecto a lo encontrado para los ensamblados (fig. 5.14). Es interesante notar que entre 15 y 20 % ocurren cambios bruscos en la posición e intensidad, principalmente de la primer banda (N* y N-H*). Esto se puede interpretar como un cambio conformacional del polímero libre o la ruptura de las micelas poliméricas exponiendo al la sonda FE a diferentes entornos.

Considerando las variación de los espectros de fluorescencia de la sonda FE formando parte de los ensamblados y en los polímeros libres en el mismo buffer frente a los agregados de un cosolvente, es posible pensar que la sonda FE está expuesta a cambios (en algunos casos bruscos) en su entorno. Si bien desconocemos la posición promedio en la que se encuentra la sonda, se propone que a medida que se agrega *i*-PrOH la sonda se expone gradualmente a un entorno de mayor polaridad o de mayor interacción con H₂O y/o *i*-PrOH. Esto podría estar asociado a cambios en la doble capa eléctrica, como así también a cambios conformacionales de la sonda respecto a la superficie.

Se han reportado ensamblados de AuNPs con polímeros funcionalizados con la sonda FE.[28] En ese trabajo sólo se estudio la respuesta de la sonda FE frente a agregados de cosolvente para modificar la polaridad del medio. Sólo estudiaron el comportamiento de la sonda FE en un rango de 0 a 25 % de *i*-PrOH, y los autores consideraron modelos muy simples donde se supone que las sondas se encuentran en posiciones únicas (dentro o fuera de la capa hidrofóbica) y la interpretación de los resultados sólo recae en los cambios de polaridad del medio.

Dado que la sonda FE, presenta una banda N-H* tan intensa es difícil poder desacoplar las variaciones de polaridad del medio con la formación de puentes H entre el fluoróforo y el solvente,

ROH (H₂O o *i*-PrOH). Por ello, es interesante analizar lo que ocurre con una molécula con menor transferencia de carga y por lo tanto menos sensible a la formación de uniones H, como lo es la sonda FC.

5.4 Ensamblados AuNP@PMA-2FC-75NC₁₂

5.4.1 Ensayos de polaridad - Ensamblados - FC

Dado que la sonda FC no presenta una banda N-H* muy intensa (como se mostró en la sección 5.2.2), es interesante su empleo para observar los cambios en la relación I_{N^*}/I_{T^*} respecto a los cambios en la polaridad del medio. En este caso, se emplearon cuatro cosolventes para variar la polaridad del medio donde se encuentran los ensamblados. En la tabla 5.2 se listan los solventes utilizados con las propiedades fisicoquímicas relevantes como: constante dieléctrica, función de polaridad y los parámetros definidos por Catalán para la polaridad/polarizabilidad (SPP), basicidad (SB) y acidez (SA) de un solvente.

En la figura 5.15 se muestra la variación de la relación I_{N^*}/I_{T^*} respecto a la fracción molar de cosolventes agregados. En todos los casos, se observa un incremento en la relación I_{N^*}/I_{T^*} para los primeros agregados de cosolvente, y luego se observa una variación más errática. Dado que todos estos cosolventes presentan una menor polaridad que el agua, estos resultados pueden ser interpretados de manera similar a los observado con la sonda FE. El aumento de I_{N^*}/I_{T^*} puede interpretarse si consideramos la posibilidad que la sonda FC se encuentra expuesta al medio circundante. Dado que los espectros presentan una gran intensidad a bajas longitudes de onda, indicativo de una gran dispersión de luz, es difícil estimar la variación del rendimiento cuántico de FC en estos sistemas. Es interesante notar que el cambio del comportamiento monótono de I_{N^*}/I_{T^*} se observa para la misma concentración dentro de los diferentes tipos de solventes empleados (próticos y apróticos). Los dos alcoholes provocan una diferencia en la variación monótona en concentraciones de $x_{cosolvente} = 0,073$ y los dos solventes apróticos muestran un cambio en la tendencia con $x_{cosolvente} = 0,038$. A bajas concentraciones de cosolvente (por debajo de las x indicadas) se tiene una relación prácticamente lineal (I_{N^*}/I_{T^*}) vs. $x_{cosolvente}$. Asimismo, se puede

Tabla 5.2 Solventes empleados en los ensayos de polaridad y sus propiedades fisicoquímicas relevantes

Solvente		ϵ	Kirkwood $f(\epsilon)$	SPP	SB	SA
Agua (H ₂ O)	Prótico	80	0.49	0.962	0.025	1.062
Etanol (EtOH)	Prótico	24.5	0.47	0.853	0.658	0.400
Isopropanol (<i>i</i> -PrOH)	Prótico	17.9	0.46	0.848	0.830	0.283
Acetonitrilo (MeCN)	Aprótico	37.5	0.48	0.895	0.286	0.044
Tetrahidrofurano (THF)	Aprótico	7.58	0.41	0.838	0.591	0.000

Donde ϵ es la constante dieléctrica, $f = \frac{\epsilon-1}{2\epsilon+1}$ es la función de polaridad de Kirkwood. SPP, SB, y SA son los parámetros definidos por Catalán para la polaridad/polarizabilidad, basicidad y acidez de un solvente, respectivamente.

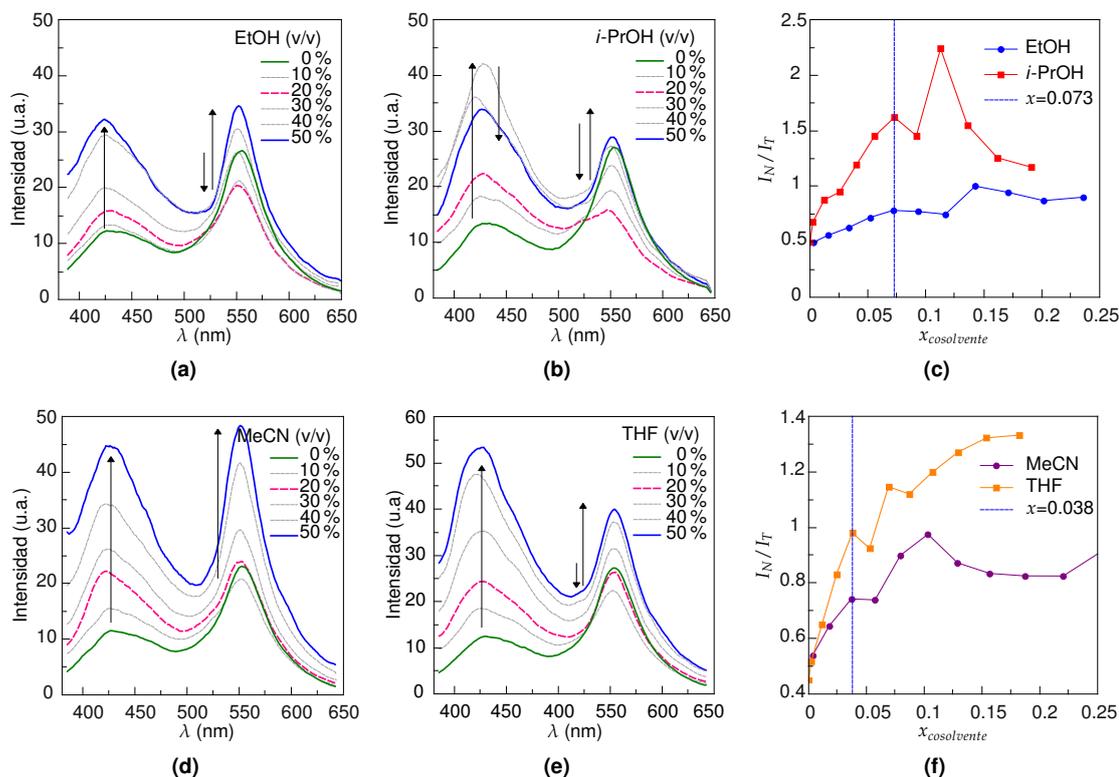


Figura 5.15 Espectros de emisión para ensamblados AuNP@PMA-2FC-75NC₁₂ en medio acuoso con sucesivos agregados de solventes (a) EtOH, (b) *i*-PrOH, (d) MeCN y (e) THF. En (c) se muestra la variación de la relación I_{N^*}/I_{T^*} para los espectros presentados en (a) y (b) para solventes próticos. (f) muestra la relación I_{N^*}/I_{T^*} de los espectros presentados en (d) y (e) para solventes apróticos.

notar que con EtOH y MeCN se tienen aumentos de I_{N^*}/I_{T^*} menos pronunciados que para *i*-PrOH y THF.

Además de los cambios de polaridad del medio, ocurre una dilución del sistema y una disminución en la fuerza iónica³ del buffer. Para intentar desacoplar estos efectos, se midieron los espectros de emisión de fluorescencia de los ensamblados respecto a la dilución con el mismo buffer de TBE 1x (fuerza iónica constante) y diluyendo el sistema con H₂O (disminución de la fuerza iónica). La figura 5.16 muestra los espectros y la relación de las bandas I_{N^*}/I_{T^*} respecto a los agregados de agua y buffer. Como era esperado, no se observaron variaciones en la relación I_{N^*}/I_{T^*} frente a la dilución con el buffer (círculos vacíos en la figura 5.16b). Sin embargo sí se observa un aumento de I_{N^*}/I_{T^*} respecto a la disminución de la fuerza iónica (círculos llenos en la figura 5.16b). Se puede observar en la serie de espectros mostrados en la figura 5.16a que la intensidad total de fluorescencia disminuye con los agregados de agua (disminución de la fuerza iónica). Esto podría explicarse si consideramos que al disminuir la fuerza iónica, aumenta la movilidad de las moléculas de agua en la capa de Stern. De esta manera la sonda FC se encontraría

³ $I = \frac{1}{2} \sum_i c_i z_i^2$ con c_i en molal y z la carga del ión

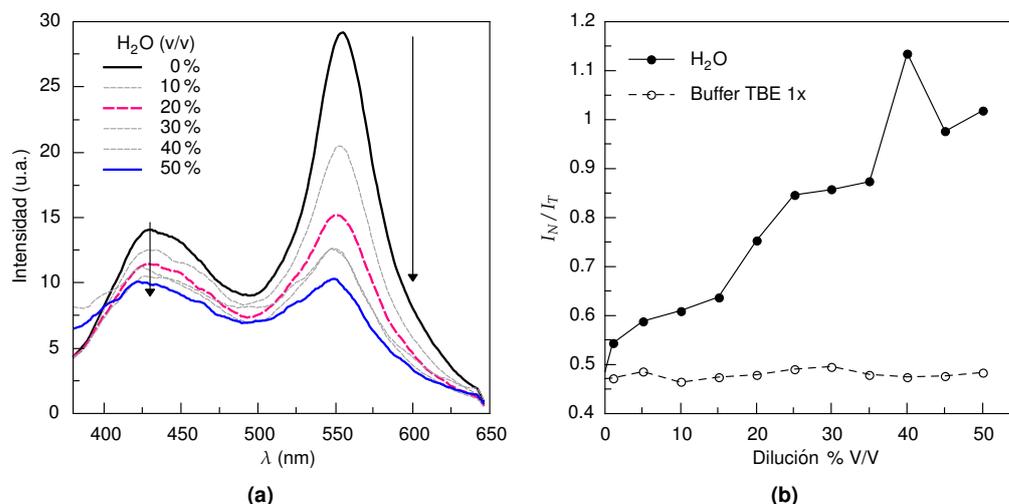


Figura 5.16 Sensado de la fuerza iónica. (a) muestra los espectros de emisión de la sonda FC en ensamblados con AuNPs frente a sucesivos agregados de agua, diluyendo el sistema y disminuyendo la fuerza iónica. (b) muestra la relación I_{N^*}/I_{T^*} para dilución con agua (círculos llenos) y dilución con el mismo buffer (círculos vacíos).

en un medio de mayor polaridad (mayor relación I_{N^*}/I_{T^*}) y con disminución del rendimiento cuántico de fluorescencia, dado que se incrementarían sus interacciones con agua. Además de esto, se sabe que las 3HC son sensibles al campo eléctrico local [29]. Por lo tanto, es de esperar que si se modifica la posición de la sonda respecto de los grupos carboxilatos del polímero o sus contraiones, varíe el campo eléctrico con una consecuente variación de la relación I_{N^*}/I_{T^*} .

5.5 Discusión y Conclusiones Parciales

En este punto es conveniente resumir los resultados obtenidos tanto para las sondas libres como para el comportamiento general de los ensamblados. En las secciones 5.2.1 y 5.2.2 se detallaron los resultados obtenidos de los espectros de fluorescencia de las sondas AcFE y AcFC en diferentes solventes y mezclas binarias de solventes. Las características más relevantes de estas sondas son:

- Ambas sondas tienen un bajo rendimiento cuántico de fluorescencia en agua.
- Ambas sondas presentan un mayor rendimiento cuántico de fluorescencia cuando se adiciona isopropanol.
- La sonda AcFE por presentar una gran transferencia de carga intramolecular en el estado excitado, tiene una mayor interacción con solventes próticos debido a la formación de un segundo estado basal N-H, el cual también emite radiación fluorescente. Esto se manifiesta en un corrimiento hacia mayores longitudes de onda de la primer banda del espectro a medida que aumenta la interacción de puente H. En solventes próticos se pierde el ESIPT.
- La sonda AcFC presenta una menor transferencia de carga intramolecular que la sonda AcFE

y esto se manifiesta en una menor interacción por puente H con los solventes. Asimismo no se observan grandes corrimientos en la posición de cada banda al variar la polaridad del medio o la posibilidad de formar puentes H.

- La relación de intensidades de cada banda es indicativa de la polaridad del medio. Cuando aumenta la polaridad del medio la relación I_{N^*}/I_{T^*} aumenta.
- La relación I_{N^*}/I_{T^*} puede depender de otros factores como por ejemplo el campo eléctrico local.

Al analizar los resultados obtenidos en los diferentes experimentos realizados con los ensamblados supramoleculares de AuNP y polímeros anfifílicos, lo primero que se puede notar es que el comportamiento de las sondas FE y FC es complejo. Las sondas son sensibles, además de la polaridad, a cambios de la fuerza iónica, pH y al campo eléctrico local. Esto requiere una exhaustiva caracterización antes de poder emplearlos como sensores y/o marcadores fluorescentes en sistemas complejos. Si bien las sondas en los ensamblados son sensibles a los sucesivos agregados de cosolventes, se pueden reconocer diferentes respuestas según transcurre la titulación.

Los espectros de fluorescencia de ambas sondas en los ensamblados presentan una intensidad no despreciable a bajas longitudes de onda, cerca de la longitud de onda de excitación. A diferencia de los que ocurre con las sondas libres donde la intensidad tiende a cero en esa zona del espectro, en los ensamblados existe una dispersión de luz intrínseca causada por el tamaño de ellos mismos. Hay que notar un gran incremento de esta dispersión de luz a medida que se adiciona cosolvente, lo que podría indicar agregación, coalescencia o cambios en la estructura del ensamblado. Esta sugerencia se apoya en que al disminuir el pH del medio, se observa también este incremento de la dispersión (fig 5.13a). Considerando que los ensamblados se estabilizan entre sí mediante repulsión electrostática de las cargas negativas en la superficie, al cambiar el pH o la constante dieléctrica del medio, se puede disminuir esta carga superficial con la consecuente pérdida de estabilidad coloidal. Los ácidos carboxílicos pueden presentar distinto pKa si se modifica el entorno en que se encuentren. Por ejemplo, presentan valores de pKa 4.8 como moléculas libres en solución o toman valores de pKa 10 en una SAM sobre oro plano. Se ha demostrado que la curvatura o tamaño de las nanopartículas decoradas en su exterior con grupos carboxílicos afecta los valores de pKa.[30]

Para los primeros agregados de cosolvente, la intensidad total de fluorescencia disminuye. Luego, para agregados posteriores la intensidad total de fluorescencia aumenta. Estos resultados podrían ser explicados considerando diferente grado de exposición de la sonda con el agua. Primeramente, a bajas concentraciones de cosolvente la sonda se expone gradualmente a un mayor contacto con agua, lo que hace que su rendimiento cuántico de fluorescencia sea menor. A medida que aumenta la cantidad de cosolvente, la sonda puede interactuar también con estas moléculas donde presenta una mayor rendimiento cuántico. Estos resultados se corresponden con el hecho que disminuya el rendimiento cuántico de FC a medida que disminuye la fuerza iónica. Dado que la relación I_{N^*}/I_{T^*} depende de muchos factores, el análisis del rendimiento cuántico de fluorescencia (intensidad total de fluorescencia) es útil para poder interpretar algunos efectos que parecen contradecir los resultados esperados. Todos los cosolventes empleados presentan

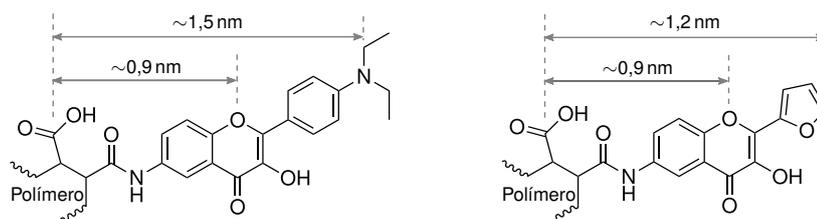


Figura 5.17 Dimensiones de las moléculas sonda en el polímero anfifílico

una menor polaridad que el agua, y por lo tanto el aumento de la relación I_{N^*}/I_{T^*} -principalmente para los primeros agregados de cosolvente- puede ser explicado considerando que la sonda encuentra expuesta a una mayor interacción con agua. Esto podría deberse a cambios conformacionales de la sonda respecto de la superficie del ensamblado, donde pasa de un entorno de menor polaridad (como en el interior de la zona hidrofóbica) a un entorno de mayor polaridad (exterior del ensamblado, en la zona hidrofílica). Sin embargo, también los cambios del campo eléctrico local podrían afectar la relación I_{N^*}/I_{T^*} . Un campo eléctrico intenso y opuesto al momento dipolar del estado N^* , podría estabilizarlo con la consecuente disminución del ESIPT y una mayor intensidad de emisión de la primer banda.[29]

La figura 5.17 muestra las distancias de los diferentes grupos en las 3HC respecto a los grupos carboxílicos del polímero, los que fueron estimados por medio de la optimización de la geometría mediante cálculos semi-empíricos (MOPAC2012 [31] utilizando el hamiltoniano PM7 [32]). Teniendo en cuenta que la longitud de una cadena de dodecilamina o docecanotiol es de aproximadamente 1,6 nm, y considerando que al formarse el auto-ensamblado supramolecular existe intercalado de las cadenas alquílicas, es de esperar que las sondas no puedan adoptar diferentes posiciones respecto de la superficie del ensamblado. Al comparar los espectros de emisión de las sondas FE y FC en los ensamblados y de sus análogos AcFE y AcFC libres (figura 5.18) se encuentran resultados que merecen ser discutidos en detalle. Los dos hechos más llamativos se dan en el corrimiento hacia el rojo que presentan las bandas N^* y T^* los ensamblados, y que principalmente en para la sonda FC, algunos espectros muestran un hombro en la banda T^* (indicado con una flecha en la fig 5.18b). Se puede observar claramente que en el espectro de la sonda FC en los ensamblados con un agregado de 25 % de *i*-PrOH, se presenta un hombro a unos ~ 525 nm. Si se observa en detalle los espectros de la figura 5.15, se puede notar este hombro o una meseta en la misma posición en los diferentes espectros al modificar la polaridad del medio. En principio, esto sugiere la posibilidad de contar con la sonda FC en dos poblaciones bien diferenciadas. Se descartó la contribución del anión de FC en la emisión de fluorescencia ya que para contribuir en el espectro de emisión éste debe ser excitado a mayor longitud de onda ($\lambda_{A^-}^{ex}$, 400 a 440 nm).[17] El hombro a 525 nm sugiere que una cantidad apreciable de la sonda puede encontrarse en un entorno de baja polaridad, ya que su posición coincide con la banda T^* de la sonda AcFC en cloroformo.

Respecto del apreciable corrimiento hacia el rojo que presentan ambas bandas, se requiere una discusión detallada. En la figura 5.9b, la diferencia entre las bandas N^* y T^* disminuye a medida que aumenta la polaridad del medio. La banda N^* experimenta un corrimiento batocrómico y la

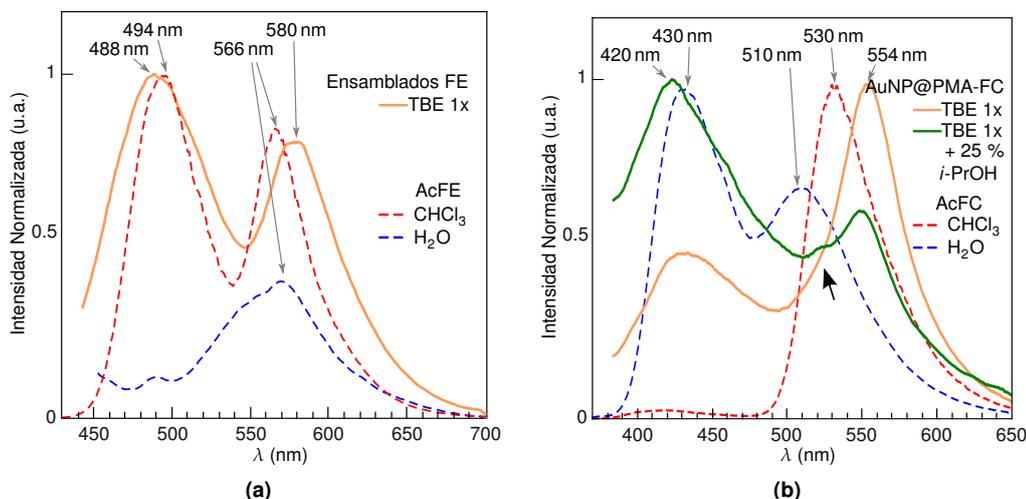


Figura 5.18 Comparación de los espectros de emisión de las sondas (a) FE y (b) FC en los ensamblados en buffer TBE 1x y sus análogos no ensamblados en agua y cloroformo

banda T^* hipsocrómico, al mismo tiempo que aumenta la relación I_{N^*}/I_{T^*} . En la figura 5.18b se puede apreciar que la posición de la banda N^* en los ensamblados coincide con la observada en H_2O . Ambas se encuentran desplazadas hacia el rojo respecto de la posición de N^* en cloroformo, como es esperado. Además, la banda T^* está desplazada hacia el azul respecto de lo que ocurre en $CHCl_3$. Sin embargo, la posición de la banda T^* en los ensamblados está francamente desplazada hacia el rojo ~ 44 nm respecto de lo que ocurre en agua. El corrimiento batocrómico de la banda T^* , también puede observarse en los ensamblados con la sonda FE. Esto puede relacionarse con lo observado por Das y colaboradores [24] empleando las 3HC como sondas de hidratación en micelas. En ese trabajo se ha mostrado que la banda T^* sufre un corrimiento al rojo en micelas de carga positiva. Las micelas se formaron en presencia de la sonda libre y los autores postulan que ésta se aloja principalmente en la capa de Stern; esto es, en la región exterior de las micelas. En otro trabajo, Klynchemko y Denchemko han demostrado que las 3HC son sensibles al campo eléctrico local [29], lo que se manifiesta como un corrimiento tanto en el espectro de absorción como en el de emisión. Una 3HC modificada con un grupo amonio (amina cuaternaria) cargado positivamente en la posición 6 del anillo de la cromona presenta un corrimiento hacia el rojo tanto en la banda de absorción como en las de emisión. En cambio, en la posición 4' del anillo fenilo (el cual está unido en la posición 2 de la cromona) presenta un comportamiento inverso, mostrando un corrimiento hacia el azul. El desplazamiento batocrómico de la 3HC modificada con un grupo amonio en la posición 6 localiza una carga positiva cerca del grupo $C=O$, el que presenta una densidad de carga negativa en el estado excitado N^* (ver fig. 5.2a). A diferencia del estado basal N , el estado T se caracteriza por tener una considerable separación de cargas, y esto debería tenerse en cuenta en el análisis del corrimiento de la banda T^* . La distribución de carga en el estado T produce una orientación del dipolo en el sentido del campo próximo a la carga, el cual debe aumentar la energía de este estado. Esto podría explicar el desplazamiento batocrómico de la banda T^* en esos derivados de 3HC. En el caso de los ensamblados, dada la baja concentración del fluoróforo en el

polímero anfifílico y debido a la dispersión de luz producida por las nanopartículas metálicas a bajas longitudes de onda, no es posible observar la banda de absorción de la sonda FC cerca de los 360 nm. A partir de la discusión anterior, pueden interpretarse los corrimientos al rojo en las bandas de emisión de la sonda FC si se considera que el grupo carbonilo de la 3HC se encuentra cerca de los contraiones (cationes) del ensamblado.

En el capítulo siguiente, se describe el desarrollo de un sensor fotomodulable basado en ensamblados de polímeros anfifílicos y nanopartículas. En ese caso, los polímeros anfifílicos además de un fluoróforo tienen además una molécula fotocromica que permite modular la señal de fluorescencia. Con esos polímeros se continuó el estudio de la estructura y estabilidad de los ensamblados.

Referencias

- (1) Lakowicz, J. R., *Principles of fluorescence spectroscopy*, 3rd ed; Springer: New York, 2006; 954 págs.
- (2) Demchenko, A. P. "The problem of self-calibration of fluorescence signal in microscale sensor systems" *Lab on a Chip* **2005**, 5, 1210-1223.
- (3) Demchenko, A. P., *Introduction to fluorescence sensing*; Springer: New York, 2009; 586 págs.
- (4) Demchenko, A. P.; Tang, K.-C. y Chou, P.-T. "Excited-state proton coupled charge transfer modulated by molecular structure and media polarization" *Chemical Society Reviews* **2013**, 42, 1379.
- (5) Schwartz, B. J.; Peteanu, L. A. y Harris, C. B. "Direct observation of fast proton transfer: femtosecond photophysics of 3-hydroxyflavone" *The Journal of Physical Chemistry* **1992**, 96, 3591-3598.
- (6) Pellegrino, T.; Manna, L.; Kudera, S.; Liedl, T.; Koktysh, D.; Rogach, A. L.; Keller, S.; Rädler, J.; Natile, G. y Parak, W. J. "Hydrophobic Nanocrystals Coated with an Amphiphilic Polymer Shell: A General Route to Water Soluble Nanocrystals" *Nano Letters* **2004**, 4, 703-707.
- (7) Fernández-Argüelles, M. T.; Yakovlev, A.; Sperling, R. A.; Luccardini, C.; Gaillard, S.; Sanz Medel, A.; Mallet, J.-M.; Brochon, J.-C.; Feltz, A.; Oheim, M. y Parak, W. J. "Synthesis and Characterization of Polymer-Coated Quantum Dots with Integrated Acceptor Dyes as FRET-Based Nanoprobes" *Nano Letters* **2007**, 7, 2613-2617.
- (8) Lin, C.-A. J.; Sperling, R. A.; Li, J. K.; Yang, T.-Y.; Li, P.-Y.; Zanella, M.; Chang, W. H. y Parak, W. J. "Design of an Amphiphilic Polymer for Nanoparticle Coating and Functionalization" *Small* **2008**, 4, 334-341.
- (9) McMorro, D. y Kasha, M. "Proton-transfer spectroscopy of 3-hydroxychromones. Extreme sensitivity to hydrogen-bonding perturbations" *Journal of the American Chemical Society* **1983**, 105, 5133-5134.
- (10) McMorro, D. y Kasha, M. "Intramolecular excited-state proton transfer in 3-hydroxyflavone. Hydrogen-bonding solvent perturbations" *The Journal of Physical Chemistry* **1984**, 88, 2235-2243.

- (11) Klymchenko, A. S.; Pivovarenko, V. G. y Demchenko, A. P. "Elimination of the Hydrogen Bonding Effect on the Solvatochromism of 3-Hydroxyflavones" *Journal of Physical Chemistry A* **2003**, *107*, 4211-4216.
- (12) Chou, P. T.; Martinez, M. L. y Clements, J. H. "Reversal of excitation behavior of proton-transfer vs. charge-transfer by dielectric perturbation of electronic manifolds" *The Journal of Physical Chemistry* **1993**, *97*, 2618-2622.
- (13) Ormson, S. M.; Brown, R. G.; Vollmer, F. y Rettig, W. "Switching between charge-and proton-transfer emission in the excited state of a substituted 3-hydroxyflavone" *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **1994**, *81*, 65-72.
- (14) Klymchenko, A. S.; Duportail, G.; Ozturk, T.; Pivovarenko, V. G.; Mély, Y. y Demchenko, A. P. "Novel Two-Band Ratiometric Fluorescence Probes with Different Location and Orientation in Phospholipid Membranes" *Chemistry & Biology* **2002**, *9*, 1199-1208.
- (15) Abràmoff, D. M. D.; Magalhães, D. P. J. y Ram, D. S. J. "Image Processing with ImageJ" *Biophotonics International* **2004**, *11*, 36-42.
- (16) Klymchenko, A. S.; Duportail, G.; Demchenko, A. P. y Mély, Y. "Bimodal distribution and fluorescence response of environment-sensitive probes in lipid bilayers" *Biophysical journal* **2004**, *86*, 2929-2941.
- (17) Klymchenko, A. S. y Demchenko, A. P. "3-Hydroxychromone dyes exhibiting excited-state intramolecular proton transfer in water with efficient two-band fluorescence" *New Journal of Chemistry* **2004**, *28*, 687.
- (18) Caarls, W.; Soledad Celej, M.; Demchenko, A. P. y Jovin, T. M. "Characterization of Coupled Ground State and Excited State Equilibria by Fluorescence Spectral Deconvolution" *Journal of Fluorescence* **2009**, *20*, 181-190.
- (19) Siano, D. B. y Metzler, D. E. "Band Shapes of the Electronic Spectra of Complex Molecules" *The Journal of Chemical Physics* **1969**, *51*, 1856.
- (20) Wojdyr, M. "Fityk : a general-purpose peak fitting program" *Journal of Applied Crystallography* **2010**, *43*, 1126-1128.
- (21) Bingemann, D. y Ernsting, N. P. "Femtosecond solvation dynamics determining the band shape of stimulated emission from a polar styryl dye" *The Journal of Chemical Physics* **1995**, *102*, 2691-2700.
- (22) Giordano, L.; Shvadchak, V. V.; Fauerbach, J. A.; Jares-Erijman, E. A. y Jovin, T. M. "Highly Solvatochromic 7-Aryl-3-hydroxychromones" *J. Phys. Chem. Lett.* **2012**, *3*, 1011-1016.
- (23) Mataga, N. y Kubota, T., *Molecular interactions and electronic spectra*; M. Dekker: 1970; 526 págs.
- (24) Das, R.; Duportail, G.; Richert, L.; Klymchenko, A. y Mély, Y. "Sensing Micelle Hydration by Proton-Transfer Dynamics of a 3-Hydroxychromone Dye: Role of the Surfactant Headgroup and Chain Length" *Langmuir* **2012**, *28*, 7147-7159.

- (25) Yushchenko, D. A.; Fauerbach, J. A.; Thirunavukkuarasu, S.; Jares-Erijman, E. A. y Jovin, T. M. [“Fluorescent Ratiometric MFC Probe Sensitive to Early Stages of alpha-Synuclein Aggregation”](#) *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132*, 7860-7861.
- (26) Fauerbach, J. A. *Caracterización de las etapas tempranas de la agregación de alfa-sinucleína in vitro mediante sondas fluorescentes ESIPT y microscopia de fuerza atómica*. Tesis doct., Buenos Aires, Argentina: Universidad de Buenos Aires, 2013.
- (27) Erickson, H. P. [“Size and Shape of Protein Molecules at the Nanometer Level Determined by Sedimentation, Gel Filtration, and Electron Microscopy”](#) *Biological Procedures Online* **2009**, *11*, 32-51.
- (28) Amin, F.; Yushchenko, D. A.; Montenegro, J. M. y Parak, W. J. [“Integration of Organic Fluorophores in the Surface of Polymer-Coated Colloidal Nanoparticles for Sensing the Local Polarity of the Environment”](#) *ChemPhysChem* **2012**, 1030-1035.
- (29) Klymchenko, A. S. y Demchenko, A. P. [“Electrochromic Modulation of Excited-State Intramolecular Proton Transfer: The New Principle in Design of Fluorescence Sensors”](#) *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124*, 12372-12379.
- (30) Wang, D.; Nap, R. J.; Lagzi, I.; Kowalczyk, B.; Han, S.; Grzybowski, B. A. y Szleifer, I. [“How and Why Nanoparticle's Curvature Regulates the Apparent pKa of the Coating Ligands”](#) *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133*, 2192-2197.
- (31) James J. P. Stewart *MOPAC2012*, Colorado Springs, CO, USA, 2012.
- (32) Stewart, J. J. P. [“Optimization of parameters for semiempirical methods V: Modification of NDDO approximations and application to 70 elements”](#) *Journal of Molecular Modeling* **2007**, *13*, 1173-1213.

Capítulo 6

Sondas Nanométricas Fotomodulables

6.1 Introducción

El desarrollo del microscopio óptico, especialmente el microscopio de fluorescencia, nos ha provisto de una herramienta para “ver” directamente la dinámica de interacción de proteínas, redes intracelulares y transporte de material en células vivas. Hay muchas estrategias para el etiquetado de biomoléculas con marcadores fluorescentes. Comúnmente se emplean como sondas, fluoróforos orgánicos unidos covalentemente, proteínas fluorescentes genéticamente codificadas y nanopartículas de semiconductores llamados puntos cuánticos (Quantum Dots, QDs). La baja resistencia al fotoblanqueo *-photobleaching-* hace que los fluoróforos orgánicos y las proteínas fluorescentes sean más vulnerables a la irradiación y no son adecuados para largos períodos de exposición, especialmente en niveles de moléculas únicas.

Uno de los principales problemas a resolver para aumentar la resolución, radica en aumentar la relación señal-ruido. En este sentido, la fluorescencia de fondo o la dispersión de luz limitan experimentalmente la detección de la luz emitida por un determinado fluoróforo. Muchas veces la dificultad de tomar imágenes de fluorescencia con células vivas recae en la baja concentración de fluoróforos y la alta fluorescencia de fondo (por ejemplo, de los triptofanos). El empleo de fluoróforos con alto rendimiento cuántico permiten obtener mejores imágenes de sistemas complejos. Las imágenes de fluorescencia a nivel de moléculas únicas en células vivas han logrado considerable éxito desde que las partículas fluorescentes tienden a lograr mayor tiempo de vida y son más brillantes que las moléculas fluorescentes. Tanto los QDs como los polímeros fluorescentes comparten estas propiedades [1].

En la sección 2.6.2 se detallaron los fundamentos de la FRET (*Föster Resonance Energy Transfer*), donde se describió cómo este fenómeno puede ser utilizado para determinar la distancia entre un donador y un aceptor en la escala de los angstrom (Å). El desarrollo de mejores sondas fluorescentes ha permitido realizar avances en la medida de FRET en moléculas únicas, smFRET (*single molecule FRET*). Con la smFRET se puede estudiar plegamiento o interacciones de proteínas individuales,

Tabla 6.1 Metodologías de imágenes con FRET más comunes

Nombre (Acrónimo)	Descripción	Referencia
Emisión Sensibilizada (SE)	Solo el donador es excitado, el cual transfiere energía al aceptor. Los cambios en la emisión del aceptor se correlaciona con FRET	[2, 3]
Microscopia FRET de relación de dos canales	Similar a SE, pero se mide todo el espectro de excitación y emisión. La relación de emisión donador-aceptor es medida en todas las condiciones. Esto permite la corrección del espectro por decoloración.	[3-5]
Microscopia de fotoblanqueo del aceptor (AP).	La intensidad del donador es medida antes y después del fotoblanqueo del aceptor. Incrementa la emisión del donador correlacionada con el FRET.	[6-8]
Imagen de Tiempos de Vida de Fluorescencia (FLIM)	Los tiempo de vida de fluorescencia del donador y/o aceptor son medidos. La ecuación 2.35 muestra cómo los tiempo de vida son afectados por el FRET. El FLIM supera las limitaciones de concentración y permite la determinación de la eficiencia de FRET y la fracción de componentes que interactúan.	[9-11]
Imagen de Anisotropía de Polarización	Se determina la anisotropía del donador y/o aceptor. Si ocurre FRET entre pares no alineados, la emisión se polariza de manera diferente a la del donador y aceptor independientemente.	[12]
Microscopia FRET Multi-Color	Permite una determinación menos costosa de las interacciones de múltiples componentes. Se basa en la detección de emisiones SE donde puede ocurrir FRET secuencial (D1 a D2 luego a D3), junto con FRET directo (D1 a D3 y D2 a D3). Se utiliza un software con algoritmo adecuados para deconvolucionar las señales y determinar las eficiencias corregidas.	[13-16]

proteína-nucleótidos, o sistemas proteína-proteína.[13]

El uso de FRET es de gran utilidad en microscopia, tanto en estado estacionario como resuelta en el tiempo. Jares-Erijman y Jovin [4] realizaron una revisión exhaustiva del uso de FRET en microscopia donde se agrupan nuevos desarrollos. La tabla 6.1 resume las técnicas más utilizadas.

El laboratorio de Marriott en la Universidad de Wisconsin, está a la vanguardia del desarrollo de sondas fotomodulables para imágenes y recientemente publicaron un trabajo con detección óptica mediante lock-in (*Optical Lock In Detection*, OLID) [17] de un par pcFRET de tetrametilrodamina (donador) y espiroaftoxazina (aceptor) dentro de células vivas. La microscopia OLID ha mostrado un mejor contraste mientras la tetrametilrodamina es una sonda validada para resolución de moléculas únicas, haciendo a este par muy prometedor.[18]

A continuación se describe el fenómeno de fotocromismo (pc) y su empleo en el desarrollo de sondas pcFRET.

6.1.1 Compuestos fotocromicos

Se puede definir al “fotocromismo” como la habilidad para producir cambios de color reversibles en un material o compuesto por su interacción con luz. De forma mas precisa, el *fotocromismo es una transformación reversible de una especie inducida en una o ambas direcciones por absorción de radiación electromagnética entre dos formas, A y B, con diferente espectro de absorción* [19]. En el caso más sencillo, el sistema está compuesto por dos especies, A y B, que se interconvierten entre sí reversiblemente por absorción de luz UV o visible:



El fotoisómero generado B puede ser termodinámicamente metaestable, y la reacción revertirá térmicamente (fotocromismo de tipo T), o bien puede ser estable y la reacción inversa se produce también por absorción de luz (fotocromismo de tipo P). También puede darse el caso en que la reversión sea térmica y fotoquímica. La mayoría de los sistemas fotocromicos involucran reacciones *unimoleculares* donde los compuestos en su forma A son incoloros o amarillo pálido y coloreados en su forma B (generalmente, rojos o azules). Los compuestos fotocromicos son aplicados en tecnología fotoóptica como así también en el diseño de dispositivos cuyas propiedades pueden ser moduladas por luz. Quizás el producto comercial más ampliamente difundido son las lentes fotocromicas o de transición. Son lentes de vidrio o plástico que contienen moléculas fotocromicas que reaccionan con la luz UV del ambiente oscureciéndose, pero retornan a una forma incolora cuando el estímulo se interrumpe. En esta aplicación se emplean fotocromicos térmicamente inestables en su forma coloreada. Los lentes modernos cambiaron las sales de plata usadas desde hace tiempo por moléculas orgánicas, tales como spironaftoxazinas, incorporadas en polímeros más livianos y confortables (fig. 6.1a). Otras aplicaciones de uso común son las indicadores de exposición a luz UV que se adquieren con la compra de protectores solares (fig.6.1b) y en la industria textil como tintas o telas que cambian de color al exponerse a diferentes niveles de iluminación [20].

Las reacciones que determinan los cambios estructurales que llevan de A a B pueden ser electrociclaciones, isomerizaciones en torno a un doble enlace (E-Z), rupturas de enlaces que implican aperturas de ciclos, migraciones de H, etc. Los isómeros A y B, en general difieren



Figura 6.1 (a) Lentes comerciales de Transitions Optical, Inc. que incorporan moléculas fotocromicas, (b) Tarjetas con indicador de radiación UV incorporada a protectores solares

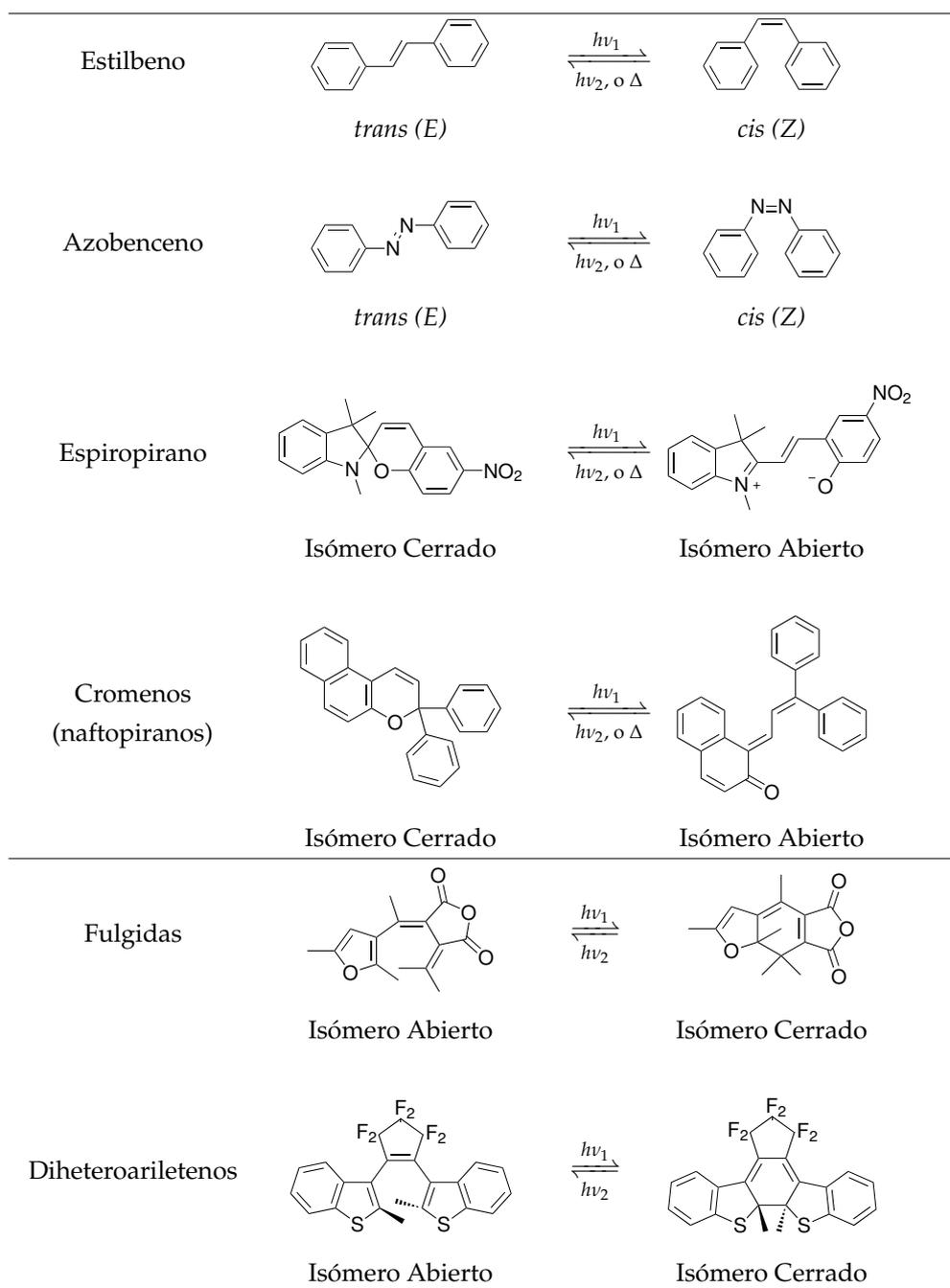


Figura 6.2 Familias de compuestos fotocromicos que reierten fotoquímicamente o térmicamente. Los dos últimos dos ejemplos corresponden a compuestos térmicamente estables, y por lo tanto sólo dan la reacción inversa fotoquímicamente (tipo P).

también en sus índices de refracción, constantes dieléctricas, potenciales de óxido-reducción y otras propiedades. La figura 6.2 muestran la familias de fotocromicos más utilizados y estudiados.

Las moléculas fotocromicas pueden ser clasificadas de acuerdo al tipo de transformaciones químicas involucradas en la reacción inducida por luz. Los cambios estructurales más relevantes

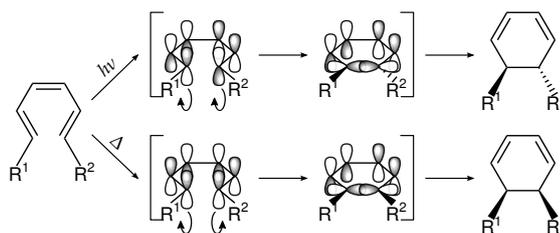


Figura 6.3 Reacción de ciclicación de un 1,3,5-hexatrieno y el mecanismo de reacción iniciada por luz (arriba) y térmicamente (abajo).

son isomerizaciones en torno a un doble enlace (*E-Z*) y electrociclaciones. Una isomerización *cis-trans* de alqueno, que involucra una rotación de 180° alrededor del doble enlace del alqueno, tiene lugar como parte del mecanismo de la visión en sus ojos mientras lee esta tesis. Los pigmentos visuales están compuestos por la proteína opsina y el 11-*cis*-retinal [21]. Este último sufre una isomerización *cis-trans* por absorción de luz. Este simple cambio en la forma de la molécula dispara una cascada de reacciones químicas, las cuales son finalmente convertidas en una señal eléctrica (impulso nervioso) que se propaga en el cerebro y nos permite ver.

De acuerdo con las reglas de Woodward-Hoffmann basadas en la simetría de los orbitales *p* para el 1,3,5-hexatrieno, el cierre del anillo inducido por luz se produce en el modo conrotatorio mientras que la apertura térmica ocurre vía el modo disrotatorio. Por lo que el cierre del anillo para la reacción fotoquímica genera una relación *trans* entre R^1 y R^2 (fig. 6.3). Si el cierre del anillo es promovido térmicamente, el proceso ocurre de modo disrotatoria y produce una disposición *cis* de R^1 y R^2 . [22, 23]

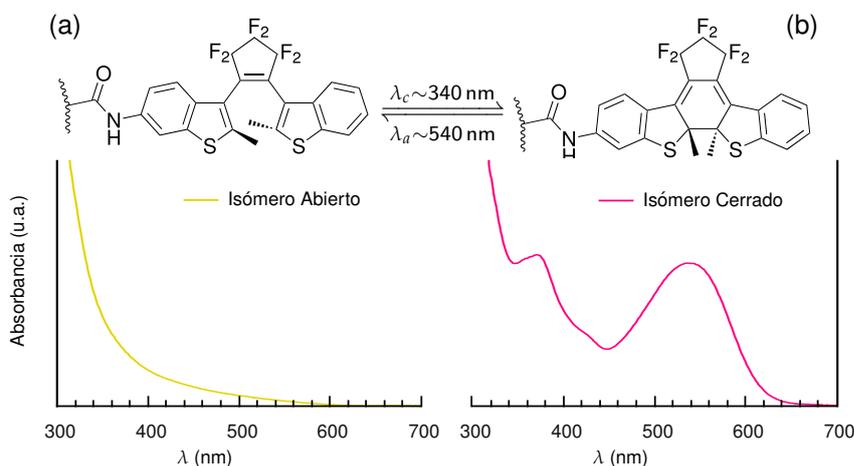


Figura 6.4 Espectros de absorción de las formas (a) abierta y (b) cerrada del DAE unido a un polímero anfifílico (PMA-2PC-75NC₁₂).

Al irradiar el diheteroarileno, isómero abierto (A), con luz UV se produce el cierre del anillo y se obtiene el isómero cerrado (B) (fig. 6.4). Al irradiar el sistema con luz visible retorna a la forma abierta. Las propiedades más importantes de estos compuestos son la elevada estabilidad térmica del isómero cerrado y la alta resistencia a las reacciones de fotodegradación denominadas “fatiga”

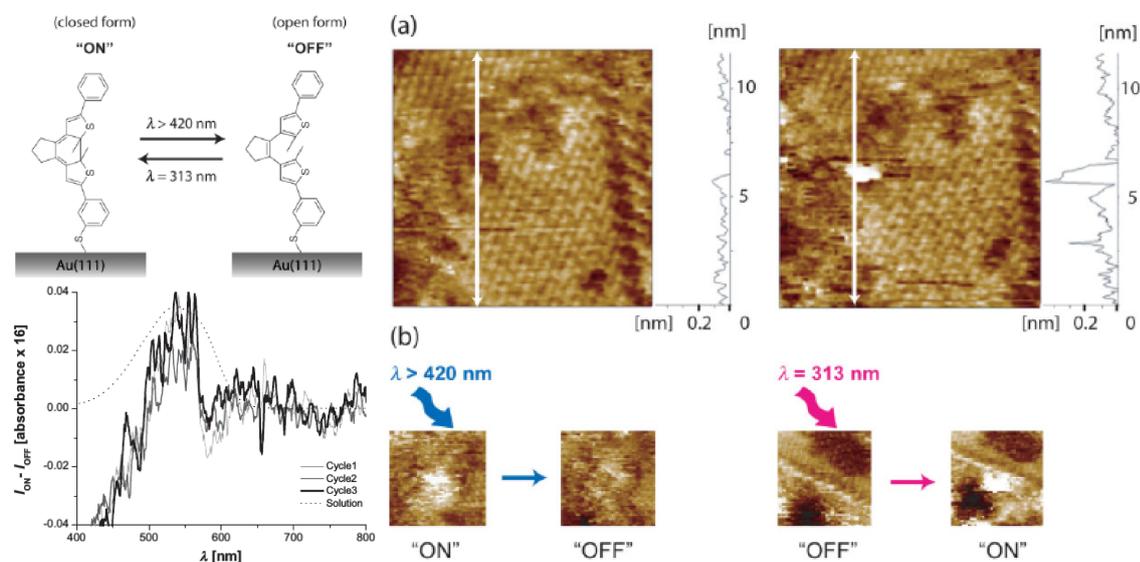


Figura 6.5 Moléculas de diarileteno unidas a una delgada superficies de Au(111) depositado sobre mica. Las imágenes de STM (a-b) muestran una densidad electrónica (punto mas claro, "ON") que puede ser fotomodulado al irradiar la muestra con luz UV y visible. Adaptado de la ref. [26] ©2006 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

(o bajo rendimiento cuántico de reacciones de fotodegradación) [24, 25].

Las moléculas fotocromicas han recibido mucho interés en el desarrollo de dispositivos optoelectrónicos fotomodulables con aplicaciones en interruptores para electrónica molecular [27-29], puertas lógicas [30], almacenamiento de datos de alta densidad [27, 31, 32], entre otras. En su empleo como interruptores de la conducción eléctrica a nivel molecular, representa un gran desafío incorporarlo en circuitos integrados. En este sentido, se han depositado moléculas fotocromicas sobre diferentes superficies [33]. La unión directa de diariletanos a superficies de oro, así también como nanopartículas de oro y plata, ha permitido estudiar las propiedades de estas moléculas como un sistema modelo para una junta electrónica y el control de la conductividad eléctrica mediante estímulos externos. En algunos casos, se reportó que la reversibilidad de la reacción de fotoconversión (principalmente en la ciclización) no ocurre [30, 34]. Resultados similares se mostraron sobre clusteres de oro [35] o nanopartículas de plata [36]. Estos trabajos experimentales y otros teóricos [37] sugieren que la superficie metálica produce un quenching del estado excitado de la forma abierta de la molécula impidiendo la reacción de ciclización. Sin embargo, se ha demostrado que estos fenómenos dependen fuertemente de la estructura de la molécula. Dependiendo del espaciador aromático que separa la molécula de la superficie de oro, se puede obtener una inducción uni- o bi-direccional de la reacción de fotoconversión [38]. Se han reportado varios sistemas basados en redes de nanopartículas recubiertas con fotocromicos, las cuales fueron dispuestas entre dos electrodos, y actuaban como interruptores fotomodulables de la conducción eléctrica [39, 40], demostrando que el sistema π es el responsable de esta conducción. El grupo de Feringa en la universidad de Groningen, Holanda, logró fotomodular la conducción eléctrica a través de una única molécula de heterodiariletanos sobre una superficie de oro [26], como se

muestra en la figura 6.5.

En este sentido, en los sistemas estudiados en esta tesis, las moléculas de fotocromico no se encuentran unidas directamente a la superficie metálica, sino que se ensamblan junto con el polímero anfifílico al que están covalentemente unidas. Los ensamblados de polímeros anfifílicos modificados con moléculas fotocromicas y fluorescentes permiten separar estas las moléculas ~ 1 nm de la superficie metálica. Mas adelante en este capítulo se muestra la reversibilidad de la reacción de fotoconversión en estos sistemas ensamblados.

6.1.2 Transferencia de Energía de Energía de Förster fotocromica (pcFRET)

En la sección 2.6.2 se comentaron las generalidades de la FRET. El primer artículo sobre FRET fotocromico (pcFRET) fue publicado por el grupo de la Dra. Elizabeth Jares-Erijman en 2002. En ese trabajo de Giordano y colaboradores [41] el PC es usado como aceptor FRET para el fluoróforo "Lucifer Yellow cadaverine" (LY), como muestra la figura 6.6.

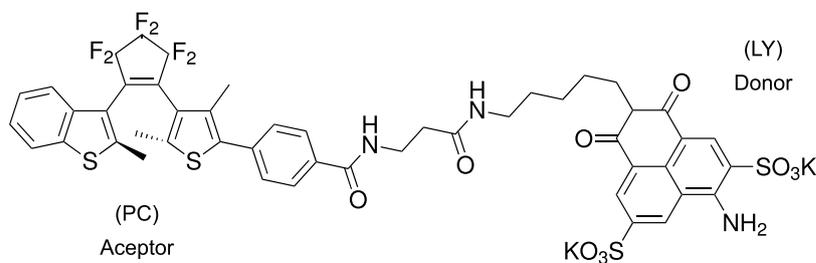


Figura 6.6 Par pcFRET de Lucifer Yellow Cadaverine como donador FRET y un heteroarileno que actúa como aceptor FRET. Adaptado de la ref. [41]

La innovación de pcFRET es que el cambio de la eficiencia FRET no se debe a cambios en la posición entre el aceptor y el donador (tanto r_{DA} y k^2 no cambian), se debe a cambios en la integral de solapamiento J . Como se explicó previamente, irradiando con luz UV se puede cambiar la estructura del isómero, modificando las propiedades del espectrales del aceptor y por lo tanto cambia la integral de solapamiento J de cero a un valor finito reversiblemente. Esto puede lograrse modificando la emisión de fluorescencia del donador y la absorbancia del aceptor. En la figura 6.7a se muestra la superposición espectral de emisión de la sonda FC y absorción del fotocromico.

La utilidad del pcFRET para sondas fotomodulable ha sido inmenso, en parte debido a la ventaja de tener el fotocromo y el donador como dos entidades independientes pero espacialmente cerca. Esto permite el uso de colorantes de rendimiento cuántico alto sin reducir su brillo. En este sentido el grupo de la Dra. Jares-Erijman ha desarrollado sondas fluorescentes fotomodulables mediante pcFRET, donde el aceptor es un heteroarileno y el donador una nanocrystal inorgánico (QDs)[42-44] o un fluoróforo orgánico [44], mediante la formación de un ensamblados de polímeros anfifílicos y NPs como los descritos en el capítulo anterior.

En este capítulo se describe el estudio de ensamblados de NPs con polímeros anfifílicos modificados con 3HC y DAE como donador y aceptor respectivamente en un par pcFRET, como prueba de concepto para una sonda fluorescente de polaridad fotomodulable como muestra el esquema de la figura 6.7b.

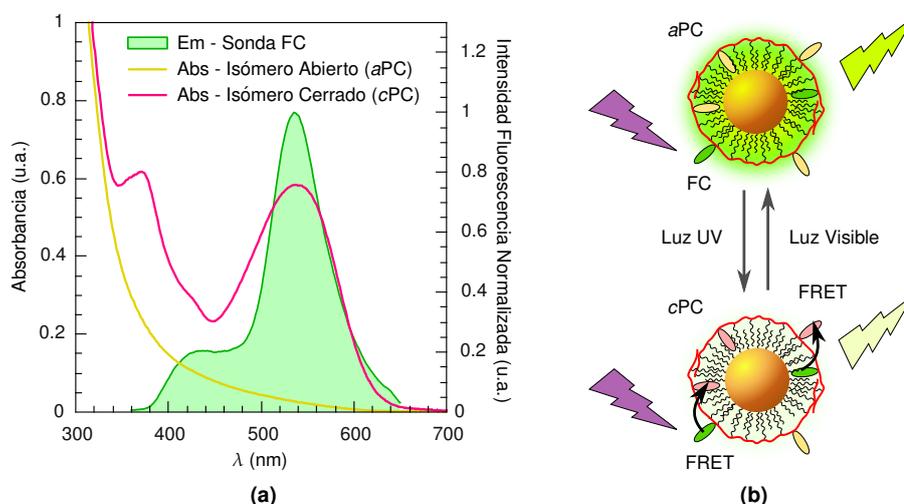


Figura 6.7 (a) Superposición de espectros de emisión de la sonda FC y de absorción del fotocromico abierto “aPC” y cerrado “cPC”. (b) Esquema del funcionamiento del sensor nanométrico fotomodulable

6.2 Caracterización de Polímeros Anfífilos Fotomodulables

Se prepararon cuatro polímeros con diferente concentración de sonda FC y fotocromico al momento de hacer la reacción de acoplamiento. Se empleó un 20 y 35 % de PC, un 5 y 10 % de FC y siempre un 75 % de dodecilamina para hacer las reacciones. Concluida la reacción de adición de FC–NH₂, de PC–NH₂ y dodecilamina, se purificó cada polímero mediante cromatografía de exclusión por tamaño con Sephadex LH-20 como fase estacionaria y cloroformo como eluyente. Se observó al purificar los polímeros que hay una cantidad importante de FC–NH₂ y de PC–NH₂ que no reaccionaron. Para determinar la composición de cada polímero se preparó una solución de 1 mg mL⁻¹ en cloroformo y se tomaron los espectros UV-Vis antes y después de irradiar con luz UV (340 nm hasta lograr el estado fotoestacionario). La figura 6.8 muestra los respectivos espectros UV-Vis. La banda a 540 nm permite determinar la concentración de PC ($\epsilon_{PC}(540 \text{ nm}) = 17\,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [45]). Nótese que sólo el isómero cerrado absorbe radiación a $\lambda = 540 \text{ nm}$.

Esta clase de polímeros se caracterizó mediante espectrometrías UV-Vis, de fluorescencia, ¹H-RMN y XPS, obteniéndose resultados aceptables con las dos primeras. Al final de esta sección se describe brevemente los inconvenientes que presentaron los dos últimos métodos en la caracterización de los polímeros funcionalizados.

Giordano [46] y Díaz [45] determinaron por ¹H-RMN que cuando se alcanza el estado fotoestacionario, excitando el PC a 340 nm para la reacción $aPC \rightleftharpoons cPC$, el grado de conversión es

$$\alpha_{PS} = \frac{cPC}{cPC + aPC} = 0,22 \quad (6.2)$$

lo que se cumple bien para el par donador-aceptor de LY-PC, donde el LY presenta una baja absorción a 340 nm, y por lo tanto es despreciable la señal de fluorescencia al ser excitado a esa longitud de onda. En nuestro caso, dado que el máximo de absorción del FC está muy cercano (350 a

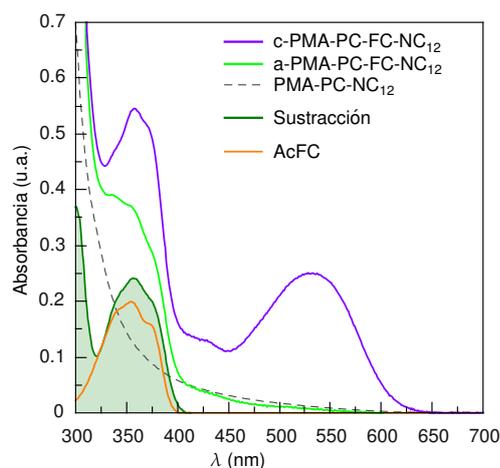


Figura 6.8 Espectros de absorción de PMA-PC-FC-NC₁₂ en cloroformo donde se observan las bandas de absorción de cada componente.

360 nm) es de esperar que se obtenga un menor grado de conversión, dado que la emisión del FC –principalmente en su banda T*– favorecería la reacción de apertura del anillo. Sin embargo, debemos tener en cuenta que el rendimiento cuántico del FC en CHCl₃ es 0.184 [47] y dado que la concentración de FC es baja (como se muestra mas adelante), es de esperar que el grado de fotoconversión sea ligeramente menor a 0,22. A partir de esta aproximación, es posible estimar por defecto la concentración de PC en el polímero.

El hombro que se observa a ~ 360 nm en el espectro del polímero sin irradiar corresponde a la banda de absorción de la sonda FC. Dado que en esa zona del espectro existen también contribuciones tanto de la dispersión de luz del polímero como la cola de una banda de absorción del PC en su forma abierta, se sustrajo esta contribución considerando el espectro de un polímero que contenía sólo PC (y dodedilamina). Se observa que la banda obtenida por esta sustracción, coincide muy bien en posición y en forma con la banda de absorción de la sonda AcFC en cloroformo. Se tomó un valor aproximado del coeficiente de extinción de la sonda FC ($\epsilon_{cFC}(540 \text{ nm}) = 36\,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). La estimación del coeficiente de extinción de la sonda FC puede presentar un error considerable, ya que el espectro de absorción presenta variación con la polaridad del solvente.

Se estimó el contenido de PC y FC a partir de las consideraciones enunciadas arriba, suponiendo que la adición de las cadenas de dodecilamina fue completa. Considerando que el PMA contiene una media de 40 unidades de monómero por cadena, se estimó el número de moléculas de PC y FC promedio por cadena de polímero. La tabla 6.2 muestra los valores estimados de masa molar, composición (% en moles) y número de moléculas de PC y FC por cadena de cada polímero preparado. Se puede observar que los valores obtenidos son muy diferentes a la estequiometría de la reacción, e incluso son similares entre todas las muestras de polímero. Los resultados muestran que la reacción de acoplamiento tiene bajo rendimiento. Una explicación posible se basa en la baja nucleofilicidad de las aminas aromáticas empleadas como grupo funcional para el anclaje del PC y la sonda fluorescente al polímero.

Considerando que aproximadamente el 22 % del PC unido al polímero se encuentra en la forma

Tabla 6.2 Composición estimada de polímeros anfifílicos modificados con PC y FC

PC-FC (% inicial) ^a	Mw (g mol ⁻¹)	% PC ^a (n° PC/cadena)	% FC ^a (n° FC/cadena)	Polímero activo (par D-A/cadena) ^b
I - 20-05	11 899	1,6 % - (0,64)	0,3 % - (0,12)	5 %
II - 20-10	11 940	1,9 % - (0,75)	0,2 % - (0,08)	4 %
III - 35-05	11 970	2,1 % - (0,83)	0,1 % - (0,05)	3 %
IV - 35-10	12 051	2,4 % - (0,97)	0,3 % - (0,12)	6 %

^a el % esta referido a la cantidad de monómeros (grupos anhídrido).

^b el % está referido al total de cadenas de polímero, calculado por estadística de Poisson.

cerrada en el estado fotoestacionario, la relación entre donor-aceptor FRET (cPC/FC) varía de 1 a 4 (lo que no coincide con las cantidades de reactivos al inicio de la reacción de adición). Esto es inconveniente, y es de esperar que muchas cadenas de polímero contengan sólo PC, sólo FC o ninguno de ellos. En cambio, para observar FRET es necesario que donor y aceptor se encuentren a corta distancia uno del otro. Para estimar cuál es la probabilidad de encontrar una cadena de polímero que contenga el par PC-FC, se puede resolver el problema con una distribución de Poisson ya que al tener baja concentración de PC y FC, es baja la probabilidad de que ambos se encuentren en una misma cadena. Se consideró como una primera aproximación que la presencia de cada una de estas moléculas es independiente de la presencia de la otra.

La distribución de Poisson es útil para describir la probabilidad de que ocurra un evento “raro” (poco probable) y esta dada por

$$f(\lambda; k) = \frac{\lambda^k e^{-\lambda}}{k!} \quad \forall \lambda \in \mathfrak{R}; \lambda > 0 \quad k \in \mathfrak{N} \quad (6.3)$$

donde k es el número de veces que se observa un evento; en este caso, la presencia de la molécula en un sitio, y λ es un parámetro que representa el número de veces que se espera encontrar la molécula. El parámetro λ esta relacionado con el valor esperado y la varianza ($\lambda = E(X) = Var(X)$), es decir $\lambda = media$ y en nuestro caso, será el número de moléculas promedio por cadena.

Tomando como ejemplo el caso del polímero IV, cada polímero tiene en promedio 40 unidades de monómero, el 2,4 % están ocupadas por PC y el 0,3 % ocupadas con FC. Entonces tendremos $0,24 \times 40 = 0,97 \sim 1$ unidad de monómero ocupada con PC ($\lambda = 1$) por cada cadena, en promedio y $0,03 \times 40 = 0,12$ unidades ocupadas por FC ($\lambda = 0,1$). La tabla 6.3 muestra la probabilidad de encontrar una cadena con ninguna molécula ($k = 0$), con una molécula ($k = 1$), dos moléculas ($k = 2$), etc.

Por lo tanto, la probabilidad de encontrar un par donor-aceptor en una cadena de polímero la podemos estimar esperando tener 1, 2, 3 o 4 PC con 1 o 2 FC, y tendríamos $0,62 \times 0,1 = 0,062$. Es decir que $\sim 6\%$ de las cadenas de polímero contienen un par donor-aceptor para pcFRET. En principio esto es un número mucho mas bajo del esperado. En la última columna de la tabla 6.2 se muestra la probabilidad (%) de encontrar una cadena de polímero con un par donor-aceptor con

Tabla 6.3 Ej. polímero IV. Cálculo de probabilidad de encontrar una cadena con un determinado número (#) de moléculas.

λ	$k = \#PC/\text{cadena (A)}$	Prob.	λ	$k = \#FC/\text{cadena (D)}$	Prob.
1	0	0.38	0.1	0	0.90
1	1	0.37	0.1	1	0.09
1	2	0.18	0.1	2	0.01
1	3	0.06	-		
1	4	0.01	-		
Prob. Total		0.62			0.1

1-4 PC y 1-2 FC.

Los intentos de caracterizar estos polímeros por $^1\text{H-RMN}$ no condujeron a resultados satisfactorios, debido no sólo a la baja concentración de cada molécula, sino también a la carencia de H con un desplazamiento químico característico. Por otra parte, se intentó cuantificar diferentes polímeros mediante XPS. Para ello, se sintetizó una 3-HC con un átomo de Br, elemento que sólo estaba presente en ésta molécula. Los átomos de F sólo están presentes en las moléculas de PC. Por último, la señal proveniente de los grupos carboxílicos y los N de las amidas, permitirían tener una relación atómica con la cual determinar la composición del polímero. Sin embargo, los experimentos no resultaron satisfactorios. En el caso del polímero con una 3-HC-Br, la señal Br $3d$ fue muy poco intensa y no pudo ser sustraída del ruido de fondo. Por otro lado, se observó que la relación F 1s respecto de S 2p propias del PC, era mucho menor que la esperada. Se determinó que la componente F 1s disminuía considerablemente con el tiempo de exposición a los rayos X.

Dado que los largos tiempos de adquisición necesarios en muestras con baja concentración de moléculas, hace inviable emplear XPS como técnica de caracterización de estos polímeros funcionalizados con PC y fluoróforos. Cabe destacar que si bien en los últimos tiempos se ha popularizado el empleo de XPS como técnica analítica, su utilización no es trivial y los resultados deben ser analizados cuidadosamente. En caso de contar con muestras orgánicas el daño causado por la radiación puede ser considerable y se le debe prestar especial atención.

Si bien estos sistemas complejos y con baja concentración son difíciles de caracterizar, la espectrometría UV-vis en combinación con fluorescencia nos han permitido estimar la composición de los polímeros preparados. Más adelante se describe la caracterización de los ensamblados de estos polímeros con nanopartículas.

Cinética de Fotoconversión y Eficiencia FRET

A fin de determinar la cinética de fotoconversión del PC en estos polímeros, se irradió una alícuota del polímero funcionalizado en cloroformo (1 mg mL^{-1}) con luz UV para ciclar la molécula, posteriormente, con luz visible para abrirla (340 ± 10 y 545 nm respectivamente) incrementando el tiempo de exposición. El experimento fue monitoreado adquiriendo los espectros de absorción UV-Vis y de emisión de fluorescencia de la sonda FC. La figura 6.9 muestra a modo de ejemplo,

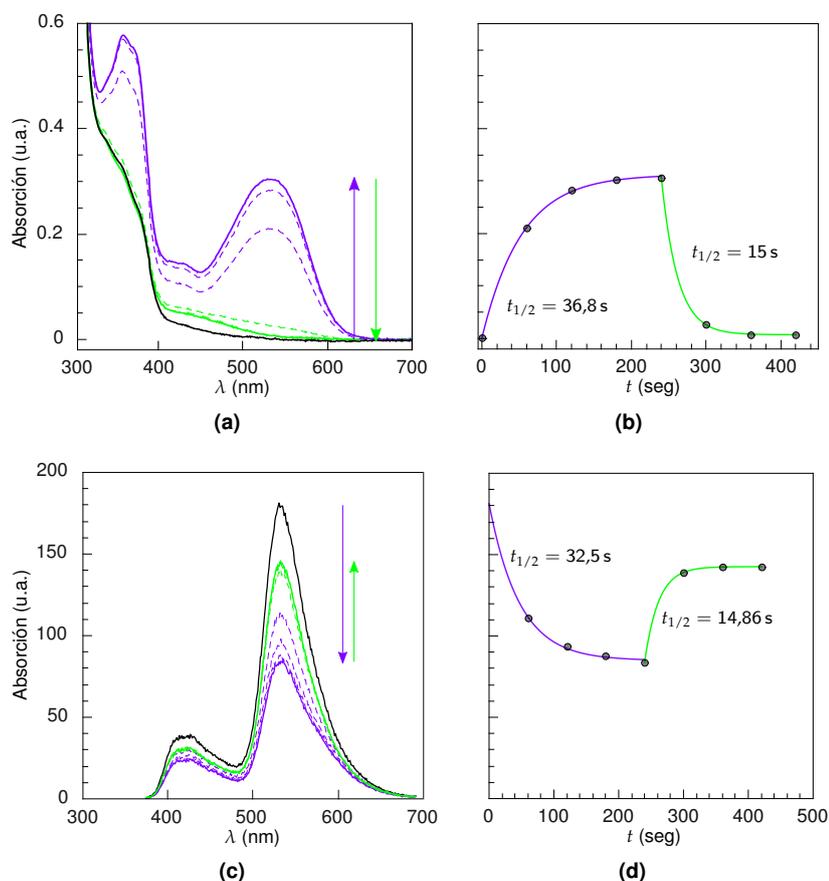


Figura 6.9 Cinética de fotoconversión de la muestra IV. Las figuras (a) y (c) muestran los espectros de absorción y emisión, respectivamente, para la reacción de ciclación (violeta) y apertura del anillo (verde). Las figuras (b) y (d) muestran los máximos de absorción y emisión a 540 nm, ajustados con una curva monoexponencial representando una ley de velocidad de primer orden.

los espectros de absorción y emisión de uno de los polímeros a distintos tiempos de irradiación con luz UV y visible. Se observó una disminución importante en la intensidad de fluorescencia, no recuperando el valor inicial luego de completar el ciclo de cerrado y apertura del anillo. Esto indica que la sonda FC sufre un proceso de fotobleaching (*photobleaching*) importante, con una pérdida de $\sim 20\%$ de la intensidad de fluorescencia luego del primer ciclo de fotoconversión del PC. Se supuso que la formación de la forma cerrada y su posterior apertura siguen ocurriendo a través de reacciones de primer orden, dado que se trata de una reacción de ciclación (intramolecular) [46]. Si bien los máximos de absorción y fluorescencia en función del tiempo pudieron ser ajustados por una función monoexponencial (primer orden), pero se contó con pocos puntos y considerando el fotobleaching observado, los valores de tiempo medio estimados no corresponden a procesos elementales. Asimismo, los tiempos encontrados tanto por absorción como por fluorescencia son similares. Es interesante notar que la reacción de ciclación es mucho más lenta que la reacción de apertura del anillo.

Tomando la relación de intensidades al inicio y al final del ciclo de cerrado y apertura del

Tabla 6.4 Caracterización del pcFRET para distintos polímeros en solución de cloroformo

Nombre	E	R_0 (nm)
20-10	0.294	3.8
35-05	0.303	3.7
35-10	0.343	3.6

PC, se encuentra que hay una disminución del 18,89 % (fig. 6.9). Cabe notar que el fotoblanqueo del fluoróforo solo ocurre cuando es irradiado con luz UV y que los dos efectos por los que disminuye la fluorescencia (FRET y fotoblanqueo) son independientes. Por lo tanto, si la señal de fluorescencia luego de irradiar la muestra con luz UV es I_{DA} , la señal correspondiente al donador en ausencia de PC, $I_D =$, debe considerarse como la intensidad de fluorescencia de la muestra luego de ser irradiada con luz visible, para poder descontar disminución de la señal debida al fotoblanqueo. Así entonces en primera instancia la eficiencia FRET está dada por

$$E = 1 - \frac{I_{DA}}{I_D} = 0,343 \quad (6.4)$$

La E suele ser utilizada para calcular la separación entre el donador y el aceptor, r_{D-A} a fin de obtener información estructural del sistema en estudio. El radio de Förster (R_0) calculado con la ecuación 2.37 para este polímero es 3,6 nm. Si la eficiencia del pcFRET (E) es 0,343 con la ecuación 2.36 se puede calcular que la distancia promedio (r) a la que se encuentran el PC y FC en el polímero en cloroformo es 4 nm. En nuestro caso, estos valores son sólo estimativos, ya que al desconocer el índice de refracción del medio (cercano) donde están las moléculas, este se estimó empleando $n = 1,4$ ($n_{\text{CHCl}_3} = 1,4459$ y $n_{\text{hexano}} = 1,375$). Asimismo, estos valores

Por lo descripto anteriormente respecto a la probabilidad de tener al azar cadenas de polímero con un par donador-aceptor FRET se puede estimar el “coeficiente de marcado”, es decir, la cantidad de donadores que tienen cerca a un aceptor. Considerando que ambas moléculas están distribuidas al azar y que la unión de una de ellas a la cadena del polímero es independiente de la presencia de la otra, se puede aproximar que si el 62 % de las cadenas del polímero se encuentran con 1 a 4 moléculas de PC, la misma proporción de las moléculas de FC tienen cerca uno o más PC. Sin embargo, como en el estado fotoestacionario aproximadamente el 22 % de las moléculas del PC (cPC) pueden actuar como aceptores FRET, la relación cPC:FC estará dada por $0,62 \times 0,22 = 0,14$. Es decir que sólo el 14 % de las moléculas de FC tendrán cerca una molécula de cPC para tener FRET. Esta muy baja relación cPC:FC no es consistente con la eficiencia FRET calculada (ecuación 6.4). Incluso al emplearla ecuación 2.39 para calcular la eficiencia en condiciones de baja relación A:D, al emplear el valor $f_A = 0,14$ se obtiene un valor de $E > 1$, lo que no tiene sentido físico. Esto implica que el valor de E calculado anteriormente no es correcto, y el error radica en la relación de intensidades I_{DA}/I_D . Debemos considerar un efecto de filtro interno entre la absorbancia del cPC en la zona de ~ 360 nm que podría contribuir a un error en la determinación de la eficiencia FRET. A modo descriptivo, la absorbancia del cPC a ~ 360 nm es similar a su absorbancia a ~ 540 nm ($Abs_{360}^{cPC} \approx 18\,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Considerando que la relación total de PC a FC es 10:1, y que en el estado fotoestacionario hay una relación 2:10 entre cPC:PC, tendremos una relación

2:1 entre cPC:FC. En este sentido, tendremos aproximadamente la misma absorbancia a 360 nm tanto del cPC como del FC ($Abs_{360}^{cPC} \times 2 \approx Abs_{360}^{FC}$). Por lo tanto, es de esperar que la disminución de la emisión del fluoróforo luego de irradiar con luz UV, no sólo se debe al fotoblanqueo sino también a la FRET, si no también a la absorción del cPC de la radiación de excitación del fluoróforo al momento de tomar su espectro de emisión con el espectrofluorómetro.

Lo que se observó también, es que la relación I_{N^*}/I_{T^*} varía a medida que cambia la eficiencia del FRET. Aumenta la relación I_{N^*}/I_{T^*} de 0,213 hasta 0,28 cuando se logra el estado fotoestacionario, y vuelve a tomar el valor 0,213 cuando se elimina el FRET. La relación I_{N^*}/I_{T^*} no se ve afectada por el fotoblanqueo. Este proceso sólo debe provocar una disminución de la señal de fluorescencia. Dado que el PC como acceptor FRET se comporta como un extintor de la fluorescencia que afecta principalmente a la banda T*, la variación de la relación I_{N^*}/I_{T^*} en principio indicaría que el equilibrio del ESIPT para la sonda FC estaría dominado por un control cinético (ver sec. 5.1.1). Este resultado está de acuerdo con que esta sonda presenta un equilibrio ESIPT inusualmente lento. [48]

6.3 Caracterización de Ensamblados de Polímeros Fotomodulables y Nanopartículas

Se prepararon ensamblados de AuNP de 2 y 4 nm y PdNP de 3 nm con un PMA-PC-FC-NC₁₂ siguiendo el procedimiento general descrito en la sección 3.4 sin utilizar agente entrecruzador. Las PdNPs fueron provistas por Gaston Corthey del grupos de Nanoscopias y Fisicoquímicas de Superficies de INIFTA, y en la ref. [49] se describen los detalles de su preparación. Los ensamblados fueron purificados por cromatografía de exclusión por tamaños (CET) y también por electroforesis en gel de agarosa (EGA), usando en ambos casos buffer TBE 1x como eluyente y electrolito respectivamente. El equipo de HPLC que se utilizó dispone de un detector UV-Vis (540 nm). La figura 6.10a muestra la absorbancia de las distintas fracciones obtenidas en la CET, junto con la emisión de fluorescencia a 550 nm (emisión de la banda T* de FC). La absorción a 540 nm no solo es la que determina el HPLC, si no también es cercana a la absorción del plasmón de Au en las NP, mientras que a 287 nm existe una banda intensa propia de la absorción de los anillos aromáticos (presentes en PC y FC). Las fracciones n° 16 y 17 presentan la máxima absorción a 540 nm indicando la presencia de AuNP. Las fracciones posteriores presentan una mayor absorción a 287 nm respecto de 540 nm, indicando que hay una cantidad apreciable de polímero sin AuNP. Asimismo, la señal de fluorescencia es más intensa en estas últimas fracciones. Dado que las AuNP de 2 nm y las de PdNP no tienen absorción de plasmones, el HPLC no podía detectar su pasaje. Por lo que se colectaron fracciones en un rango similar en tiempos de elusión, y luego se caracterizó cada fracción por espectroscopia UV-Vis y de fluorescencia. Como en estos ensamblados no se utilizó agente entrecruzador, es de esperar que el polímero no ensamblado no forme grandes agregados poliméricos (como se mostró antes, sección 5.3). Además, hay que tener en cuenta que en estos métodos de purificación las muestras sufren dilución y en caso de existir micelas, si la concentración del polímero es menor que la concentración micelar crítica (CMC), estas sufrirían cambios. Recordando que en la CET las primeras fracciones son de aquellos componentes

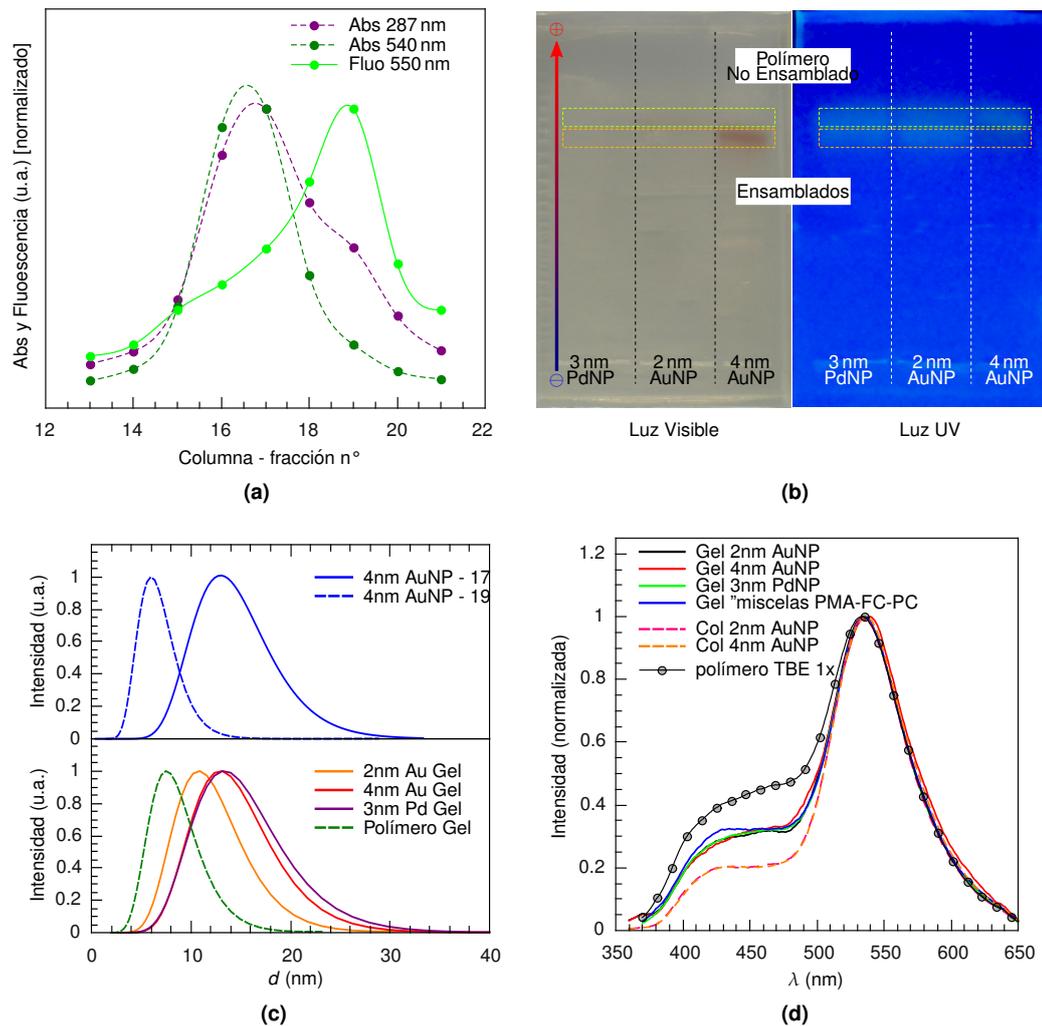


Figura 6.10 (a) máximos de absorción y fluorescencia para cada fracción obtenida por CET, (b) imágenes de un gel de agarosa con los ensamblados sin agente entrecruzados, (c) distribución de tamaños por DLS y (d) espectros de fluorescencia de FC en los ensamblados purificados por CET y EGA.

mas voluminosos, se puede deducir de los ensamblados presentan un tamaño mayor que el polímero libre no ensamblado puede –o no– estar formando pequeños aglomerados. Resultados similares se obtuvieron al purificar los ensamblados por EGA. Como se muestra en la figura 6.10b, las bandas correspondientes al polímero no ensamblado migran más que los ensamblados de NPs, a diferencia de lo que ocurría cuando se empleó agente entrecruzador (ver fig. 5.10).

Se determinó el tamaño de las diferentes fracciones obtenidas en la CET así cómo de las fracciones obtenidas por la EGA, mediante dispersión de luz dinámica (DLS). En la figura 6.10c se muestran los resultados obtenidos por DLS, donde se observa que el polímero libre forma ovillos o micelas de unos 6 a 8 nm y los ensamblados presentan un tamaño mayor de 10 nm. Los ensamblados de AuNP de 2 nm presentan por DLS un tamaño menor que el de los ensamblados

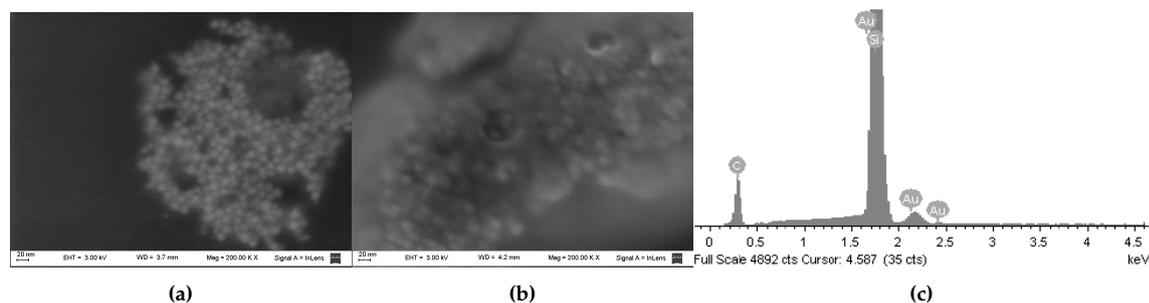


Figura 6.11 (a) y (b) muestran imágenes de microscopía SEM de una muestra de AuNP@PMA-PC-FC-NC₁₂ (c) espectro EDS con el que se determina la presencia de Au en la muestra. Imágenes tomadas en el Centro de Microscopía Avanzada de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad de Buenos Aires, con un microscopio de barrido de electrones modelo SUPRA™40 de Carl Zeiss con una columna GEMINI®FESEM

con AuNP de 4 nm y PdNP de 3 nm. Se intentó caracterizar una muestra en ensamblados con AuNP de 4 nm purificados por EGA mediante microscopía de barrido de electrones (SEM), como se muestra en la figura 6.11. Se puede observar en la figura 6.11a un cúmulo de esferas de un tamaño aproximado de 10 nm, donde el espectro EDS (*Energy-dispersive X-ray spectroscopy*) en la figura 6.11c muestra la presencia de Au en esos cúmulos. Sin embargo en otras zonas de la muestra fue muy difícil poder tomar imágenes similares dado que se observaban alteraciones del material a al aumentar el tiempo de exposición a la radiación de electrones, como se puede observar en la figura 6.11b.

En la figura 6.10d se comparan los espectros de fluorescencia de los ensamblados y micelas de polímero libre purificados por las dos técnicas, junto con una muestra de polímero sin ensamblar disuelto directamente en buffer TBE 1x. Primeramente se puede notar que las muestras purificadas por EGA, presentan una mayor relación I_{N^*} / I_{T^*} respecto de las muestras purificadas por CET, lo que indicaría una mayor exposición de la sonda FC a un entorno de mayor polaridad. Dado que se trata de los mismos ensamblados, purificados por métodos diferentes, el método de purificación modifica la estructura de los ensamblados. La EGA si bien es una técnica “suave” que permite separar proteínas, el campo eléctrico aplicado podría alterar la estructura de los ensamblados. Al mismo tiempo, el calor generado al aplicar altas diferencias de potencial (70 a 100 V, unos 10 V cm^{-1}) podría modificar la estructura de los ensamblados. Por otro lado, la fracción de polímero no ensamblado recuperado del gel de agarosa presenta la misma relación I_{N^*} / I_{T^*} que las NP ensambladas, purificadas por la misma técnica. Mas adelante se discutirán los resultados obtenidos en fluorescencia resuelta en el tiempo para poder interpretar las diferencias entre estas muestras. Al comparar estos espectros de fluorescencia con los de la misma sonda FC discutidos en la sección 5.4 se observan algunas diferencias. Los ensamblados AuNP@PMA-PC-FC-NC₁₂ presentan una menor relación I_{N^*} / I_{T^*} que los ensamblados AuNP@PMA-FC-NC₁₂ (0,2 y 0,5 respectivamente), al mismo tiempo la bandas N* no se encuentran tan definida.

La tabla 6.5 muestra los valores de eficiencia FRET para diferentes ensamblados y el polímero

Tabla 6.5 Eficiencia FRET para diferentes ensamblados de un mismo polímero.

Muestra	Purificación	E	I_{N^*}/I_{T^*}		
			Inicial	cPC	aPC
2nm AuNP@PMA-PC-FC-NC ₁₂	HPLC	0.299	0.218	0.25	0.19
4nm AuNP@PMA-PC-FC-NC ₁₂	HPLC	0.358	0.218	0.31	0.216
4nm AuNP@PMA-PC-FC-NC ₁₂	Gel	0.336	–	–	–
Polímero Libre	Gel	0.346	0.31	0.45	0.33

libre en solución acuosa. Si bien los efectos de fotoblanqueo, y filtro interno son similares, se puede obtener información útil respecto de estos ensamblados. Se puede notar que el valor calculado de eficiencia FRET de los ensamblados de AuNP de 2 nm es similar al encontrado para este mismo polímero en cloroforno (ver tabla 6.4). Sin embargo para los otras muestras se tienen eficiencias un poco mayores. Si bien se podría suponer que valores mas grandes de eficiencia indican mayor cercanía donador-aceptor, en estos casos es posible que se trate de errores experimentales, ya que como se mostró en la figura 6.10d no se observan diferencia en la relación I_{N^*}/I_{T^*} de las fracciones obtenidas por cada método de purificación.

6.3.1 Caracterización por Fluorescencia Resuelta en el Tiempo.

En trabajos anteriores se han interpretado los decaimientos de fluorescencia de ambas bandas, N^* y T^* , con una función biexponencial en la cual el tiempo corto corresponde a la transferencia de protón y un tiempo largo correspondiente al decaimiento de fluorescencia [50]. Se ha mostrado que la sonda 2-(2-furil)-3-hidroxicromona (molécula análoga a la sonda FC, pero sin el grupo amida en la posición 6) presenta una dinámica de transferencia de protón del orden de ~ 100 a 260 ps (~ 1000 veces mas lento que para FE) usando un conjunto de solventes de diferente naturaleza. [48]. Por otra parte, los tiempos mas largos (0,4 a 1,5 ns) están relacionados con el decaimiento de fluorescencia. Los tiempos de vida cortos para ambas bandas son prácticamente iguales ($\tau_1^{N^*} \approx \tau_1^{T^*}$) lo que indica que están relacionados al ESIPT y la amplitud $\alpha_1^{T^*}$ tiene signo negativo ya que los estados T^* se generan a partir de los estados N^* [48].

En nuestro caso, la sonda FC en requirió el uso de dos o tres exponenciales para la banda N^* y dos para la banda T^* , en los ajustes de decaimiento de fluorescencia. Este primer resultado puede interpretarse considerando que la sonda se encuentra en diferentes entornos o que el decaimiento no sigue la ley exponencial [51]. Esta última posibilidad se descartó ya que en la bibliografía se ha demostrado que el ajuste exponencial es adecuado [48, 50, 52]. Mientras tanto, la interpretación según la cual la sonda fluorescente se encuentra en diferentes entornos está soportada por lo resultados discutidos en la sección 5.5. Dado el ancho excesivo del pico ($\sim 1,2$ ns) del pulso de excitación no fue posible determinar los tiempos de vida relacionados con el ESIPT. Si la sonda se encuentra en diferentes posiciones respecto de la superficie del ensamblado estará afectada de diferente manera por un quencher. Por esto, se obtienen diferentes tiempos en los que la molécula puede permanecer en su estado excitado. Es de esperar que si la sonda se encuentra mas

expuesta al exterior del ensamblado, sufra un mayor número de colisiones que si se encuentra en el interior. De todos modos, muchos de los ajustes no fueron adecuados y presentaban valores de χ_R^2 muy alejados de la unidad. Esto dificulta el análisis cuantitativo y se deben tomar los valores de tiempo de vida (τ) con mucha cautela. En general, los valores de τ están en el rango de $\tau_1 < 1$ ns; $1,2$ ns $< \tau_2 < 3$ ns y 5 ns $< \tau_3 < 8$ ns. Considerando los valores de las amplitudes, se observó que la banda N* presentó sus tres valores muy similares, pero la banda T* mostró que α_2^{T*} y α_3^{T*} son los preponderantes. Por esto es de esperar que la componente de tiempo más corto presente un gran error. Nótese que la componente de tiempo más corto tendría asociados mayores errores relativos, ya los tiempos de vida son cercanos al límite de detección del equipo y al tiempo del ESIPT.

El Dr. Klymchenko¹ de la Universidad de Estrasburgo, Francia, es uno de los investigadores con más experiencia en el análisis de sondas fluorescentes ESIPT, con una amplia experiencia en con sondas fluorescentes ESIPT, principalmente 3HCs. En una comunicación personal, ha comentado que interpretar los resultados de fluorescencia resuelta en el tiempo empleando la sonda FC (unida con un grupo amida en la posición 6) presenta serias dificultades. Por ello, al investigar la interacción de péptidos y oligonucleótidos no ha incluido esa clase de experimentos en sus publicaciones [**zamotaiev' improved 2011, 53**], y sólo fueron presentados los resultados de fluorescencia en estado estacionario.

Al comparar los decaimientos de fluorescencia para las diferentes muestras se encuentran resultados importantes. La figura 6.12 muestra los decaimientos de fluorescencia de las bandas N* y T* para las muestras purificadas por EGA y CET, respectivamente. La diferencia que se encuentra es que los ensamblados sobre AuNP de 4 nm presentan un decaimiento más rápido en ambas bandas para las muestras purificadas por EGA. Al mismo tiempo se puede notar que no hay diferencias significativas en los tiempos de vida de los ensamblados de AuNP de 2 nm, PdNP de 3 nm y la muestra del polímero no ensamblado recuperado del gel de agarosa. Este último resultado está de acuerdo con lo sugerido a partir de los ensayos de fluorescencia en estado estacionario mostrado en la figura 6.10d. Esto es, la purificación por EGA no es suficiente para separar completamente los ensamblados de las micelas poliméricas.

Tampoco se observan diferencias significativas en los tiempos de vida en las muestras purificadas por CET, aunque es importante notar que los ensamblados sobre PdNP de 3 nm muestran un tiempo de decaimiento para la banda N* ligeramente menor que en los ensamblados sobre AuNPs. Sin embargo, al comparar los decaimientos de fluorescencia de cada ensamblado para ambos métodos de purificación se observan algunas diferencias. Los ensamblados sobre AuNP de 4 nm presentan decaimientos muy similares en la banda N*, pero la banda T* muestra un decaimiento más rápido en la muestra purificada por EGA. Los ensamblados de AuNP de 2 nm, PdNP de 3 nm muestran aproximadamente el mismo decaimiento en la banda T*, pero la banda N* muestra un decaimiento más rápido en las muestras purificadas por CET.

Viendo que esta información es difícil de interpretar considerando un mismo modelo para todos los ensamblados. Es importante considerar algunos resultados cualitativos que se muestran en la próxima sección, que ayudan a interpretar este tipo de ensamblados.

¹https://www.researchgate.net/profile/Andrey_Klymchenko

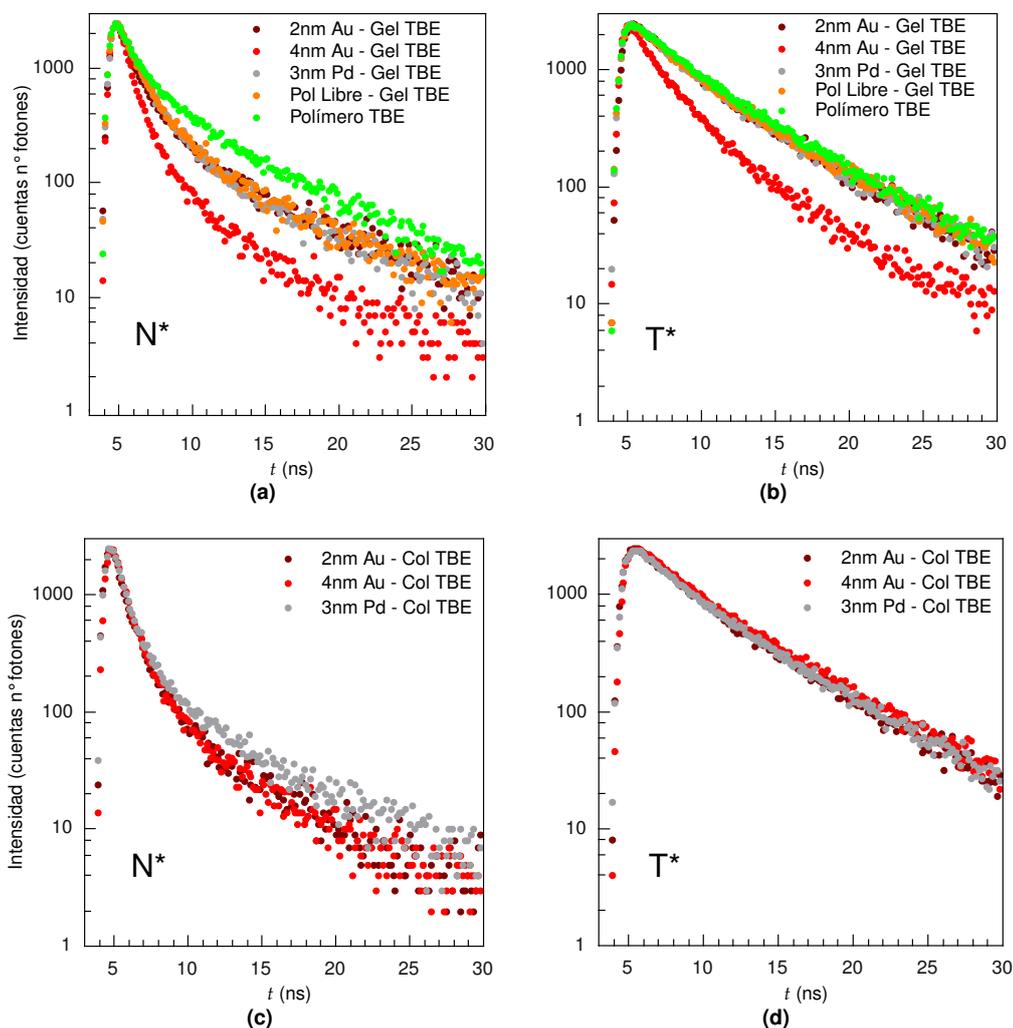


Figura 6.12 Decaimientos de fluorescencia de los ensamblados de PMA-PC-FC-NC₁₂ sobre NP de Au y Pd, purificados por (a, b) electroforesis en gel de agarosa (EGA) y (c, d) cromatografía de exclusión por tamaño (CE)

6.4 Efecto de los cambios de composición de los polímeros sobre la calidad de los ensamblados

La interacción entre las moléculas unidas al polímero puede afectar la posición que adquieran estas al formar los ensamblados. En los polímeros preparados con una gran cantidad de fotocromico ($\sim 6\%$) y menor cantidad de dodecilamina (50%) se formaron ensamblados que presentaron una relación $I_{N^*}/I_{T^*} = 1,7$, indicando que la sonda FC se encontraba expuesta a un medio de alta polaridad. En la figura 6.13 se muestra el espectro de emisión de la sonda FC en dos ensamblados con diferente proporción de moléculas voluminosas y cadenas alquílicas.

Es interesante considerar otros resultados cualitativos obtenidos al preparar los distintos ensamblados. Se puede notar que cuanto mayor es la cantidad de moléculas voluminosas unidas

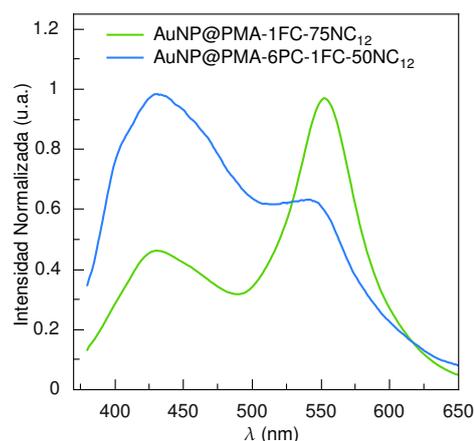


Figura 6.13 Espectros de emisión de dos polímeros ensamblados. La principal diferencia entre ellos radica en la composición de dodecilamina

al polímero, y menor la cantidad de cadenas de dodecilamina, es mayor la proporción de sondas fluorescentes expuestas al solvente. Asimismo, se observó que las suspensiones de los ensamblados con baja proporción de dodecilamina en solución alcalina presentaban un aspecto turbio, y se obstruían los filtros de $0,22\ \mu\text{m}$ y hasta los de $0,44\ \mu\text{m}$ de tamaño de poro. Mientras tanto, los ensamblados de NPs con polímero que sólo contenían cadenas de dodecilamina (PMA-75NC₁₂) se disolvían instantáneamente en solución alcalina. Se preparó un polímero que contenía moléculas de anilina en reemplazo de las cadenas de dodecilamina, y los ensamblados que se intentaron preparar con este polímero y AuNPs de 4 nm formaron suspensiones muy turbias en solución alcalina y nunca pudieron ser purificados. Aquellos ensamblados con menor cantidad de dodecilamina (ej. PMA-50NC₁₂) formaban ensamblados poco estables. Estos resultados sugieren que los polímeros menos sustituidos con moléculas voluminosas tienen una mayor probabilidad de formar ensamblados con las NPs. En un trabajo en colaboración con el Dr. Sebastian Díaz del grupo de Dinámica Celular dirigido por el Dr. Thomas Jovin en el Instituto Max Planck de biofísico-química de Göttingen, Alemania, se observó que los ensamblados de polímeros anfífilicos similares ensamblados sobre nanocristales semiconductores (quantum dots) presentaban mayor afinidad para formar ensamblados con cadenas de polímero poco sustituidas con grupos voluminosos [44]. Además, se determinó que esos ensamblados sufrían cambios similares a los mostrados en el capítulo 5 frente a agregados de cosolvente. Las moléculas de fotocromófico actúan como aceptores pcFRET de la fluorescencia del QD (emisión a 540 nm) en el centro del ensamblado. Esos ensamblados también contienen un fluoróforo Alexa650 (emisión 650 nm) como referencia, al cual llamaremos QD-PC-Alexa. La figura 6.14 muestra los espectros de absorción y emisión para sucesivos agregados de *i*-PrOH expresado en % de volumen [45]. Se observa que en todos los casos se presenta un cambio de comportamiento al rededor del 20 % de *i*-PrOH, concentración similar a la encontrada con los ensamblados que contenían la sonda FC. La figura 6.14b muestra los espectros de absorción de QD a 395 nm, PC a 540 nm y Alexa a 650 nm. La figura 6.14c muestra la disminución de la señal de emisión del QD en un ensamblado de referencia que sólo contenía cadenas de dodecilamina. Por último la figura 6.14d muestra la emisión de fluorescencia para el ensamblado QD-PC-Alexa,

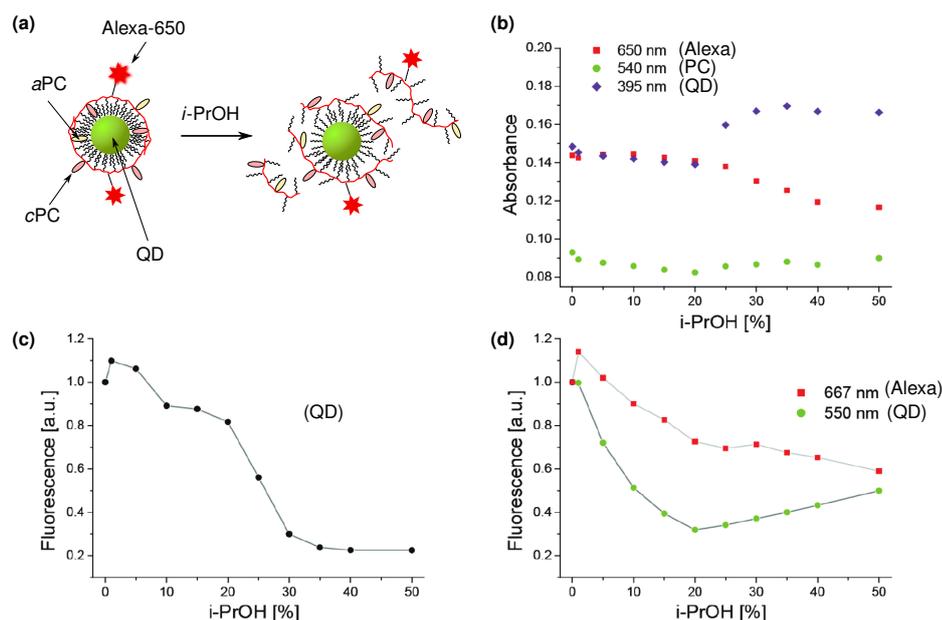


Figura 6.14 (a) Esquema de modificación de la estructura de los ensamblados QD-PC-Alexa con agregados de *i*-PrOH. (b,c,d) Muestran la absorción y emisión características de cada especie en este sistema, frente a sucesivos agregados de *i*-PrOH (% v/v). (b) Absorción, (c) emisión de un QD (540 nm) ensamblado con un polímero que sólo contiene dodedilamina, (c) emisión de los ensamblados QD-PC-Alexa. Adaptado de la ref. [45]

donde se observa una disminución de la emisión del QD y luego un aumento a $\sim 20\%$ v/v de *i*-PrOH. Estos resultados han sido interpretados considerando un hinchamiento (*swelling*) del ensamblado hasta llegar a desarmar el mismo separando el QD del polímero.

En la figura 6.15b se observa una estela rojiza en la parte posterior al avance de los ensamblados, lo que indica inestabilidad de los mismos. Dicha inestabilidad puede deberse a que las nanopartículas formaron ensamblados con diferente grado de cubrimiento de polímero, lo que da como resultado ensamblados con diferente relación carga-radio y la consecuente banda ancha en la migración por el gel. También se debe considerar la posibilidad de que los ensamblados sufran pérdida parcial de las cadenas del polímero a medida que transcurre el tiempo que son expuestos a la diferencia de potencial eléctrico durante la purificación. Si los polímeros se encuentran débilmente ensamblados con las NPs debido a una alta concentración de moléculas voluminosas se favorecerá la pérdida de las hebras cargadas, lo que también disminuye la relación carga-radio.

El grupo del Dr. Mariscal de la Universidad de Córdoba, ha desarrollado un potencial semi-empírico para simular computacionalmente la interfase oro-tiol, con el cual es posible considerar tioles de cadena larga. En la figura 6.16 se muestran imágenes simuladas de tres geometrías distintas del carozo metálico y de la estructura de los tioles que recubren las AuNP. Se puede notar que las cadenas de tioles sobre las caras facetadas de las AuNPs forman "racimos" empaquetados, de manera similar a lo que ocurre en una SAM, dejando grandes espacios entre las cadenas unidas a cada cara. Asimismo, como se describió en el capítulo 4 las AuNPs@SC₁₂ podrían presentar

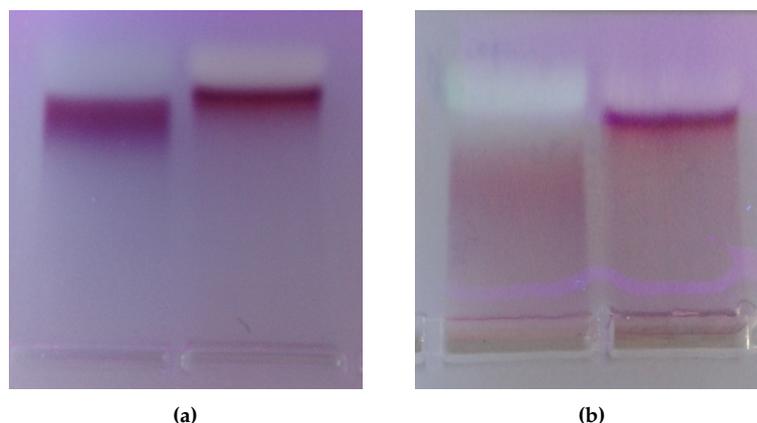


Figura 6.15 Imágenes de geles de agarosa en la purificación por electroforesis de ensamblados con polímero con (a) bajo número de moléculas voluminosas (ensamblados estables) y (b) mayor número de moléculas voluminosas (ensamblados poco estables).

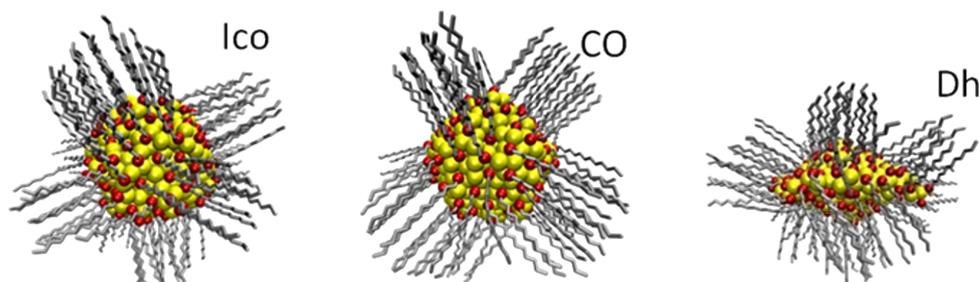


Figura 6.16 Estructura de la interfase Au-tiol para diferentes geometrías de AuNP. Reproducido de la ref [54] ©Royal Society of Chemistry 2011

cantidades importantes de tiol fisisorbido a la capa orgánica de las NPs, lo que podría interferir con la formación de los ensamblados.

Esta estructura es muy diferente a la capa de trialquilfosfinas u óxido de trialquilfosfina que recubren generalmente a los QDs. Es de esperar que estas moléculas por tener tres cadenas alquílicas unidas a un mismo átomo de P, que es el punto de anclaje a la superficie, formen un empaquetamiento menos compacto.

6.5 Discusión y Conclusiones Parciales

Con los resultados expuestos en el capítulo anterior (Cap. 5) se podía inferir que el rendimiento de la reacción de acoplamiento de las sondas fluorescentes al polímero anfifílico era bajo. Al comienzo de este capítulo se mostró que el rendimiento de esta reacción no sólo es bajo, sino también que no depende en forma simple de la cantidad de reactivos. En la tabla 6.2 se mostró que al duplicar la cantidad de FC durante la reacción no se tuvo un resultado muy diferente en la concentración de esta sonda en el polímero resultante. Algo similar se encontró respecto a la concentración

del PC. Poder mejorar la forma de anclaje de estas moléculas al polímero es un punto esencial para obtener polímeros y ensamblados mas homogéneos y con mayor concentración de moléculas funcionales. Asimismo, la composición del polímero es difícil de determinar, mas aún cuando la concentración relativa de cada componente. De hecho, la composición de los polímeros descritos en el capítulo anterior no se pudo determinar con precisión, debido a la baja concentración de las sondas fluorescentes. En las reacciones de acoplamiento se emplearon concentraciones de 1 a 2 % (respecto de los grupos anhídrido), por lo que suponemos que la concentración real de estas moléculas es unas 10 veces menor que las obtenidas en los polímeros descritos en éste capítulo.

El bajo rendimiento de la reacción de acoplamiento directo de las moléculas aromáticas funcionalizadas con un grupo amina y los grupo anhídridos del polímero, conduce a un sistema poco homogéneo. Considerando una distribución de Poisson se estimó que sólo el 6 % del polímero sintetizado contiene el par donador-aceptor requerido para tener pcFRET y modular la señal de emisión de la sonda fluorescente en los ensamblados.

Al final de éste capítulo se mostraron algunos resultados cualitativos de diferentes polímeros y ensamblados. Se mostró que la estabilidad de los ensamblados depende fuertemente de la forma de prepararlos y de la composición de los polímeros. La proporción de cadenas alquílicas es posiblemente la principal razón de estabilidad de los ensamblados. Desde luego, esto limita la cantidad de moléculas que se pueden unir al polímero por reacción directa con los grupos anhídridos.

Los resultados obtenidos respecto a la eficiencia FRET deben ser considerados con cautela. En principio, los valores de E parecen muy elevados considerando la baja probabilidad de tener un par pcFRET en la misma cadena de polímero, considerando una distribución al azar de las moléculas. Dado que la determinación de las intensidades podría estar afectada por considerable error, es de esperar no que haya mucha diferencia entre los valores obtenidos. De todos modos, también se debe tener en cuenta la posibilidad de que la unión de las moléculas al polímero no sea al azar, como se supuso al estimar la probabilidad de encontrar pares donador-aceptor. Puesto que las moléculas que se unen son aromáticas, es posible que las interacciones π - π intermoleculares induzcan adiciones de moléculas en posiciones cercanas y no al azar. La mayor cercanía entre las moléculas aumentaría la eficiencia FRET.

Si bien el análisis de los tiempos de vida es muy complejo, los resultados son consistentes con la idea de que las sondas se encuentran distribuidas en diferentes entornos. Mas aún, considerando que el tiempo medio de la reacción ESIPT para la sonda FC es ~ 100 ns en micelas aniónicas y que se encuentre muy cerca del límite de resolución en las experiencias realizadas, el análisis puede contener un error importante principalmente los tiempos de vida más cortos. Asimismo, en los casos que se necesitó emplear tres funciones exponenciales para ajustar los decaimientos de fluorescencia de la banda T^* , para los tiempos de vida más cortos ($\tau_1^{T^*} < 1$ ns) se encontró que las amplitudes son muy pequeñas ($\alpha_1^{T^*} < 0,1$) por lo cual no son consideradas en el análisis. Por esto, considerando que fueron necesarios dos tiempos para ajustar el decaimiento de fluorescencia de la banda T^* , es razonable considerar que la sonda FC se encuentra en posiciones diferentes. Nótese que estos resultados son consistentes con los obtenidos mediante fluorescencia en estado estacionario discutidos en el capítulo anterior.

Son muy importantes los resultados obtenidos respecto de la relación I_{N^*}/I_{T^*} con y sin pcFRET. Desafortunadamente dado que los decaimientos de fluorescencia son muy complejos de analizar y debido a los errores en la determinación de la eficiencia de FRET por esto estacionario no se pudo determinar el tiempo de vida relacionado con el decaimiento de fluorescencia por pcFRET (quenching). Por esto, debemos considerar dos posibles causas respecto a la variación de I_{N^*}/I_{T^*} . Lo primero a considerar se desprende de lo expuesto en la sección 5.1.1 y como se muestra en la figura 5.3a. En caso que la velocidad del quenching sea más rápida que la reacción ESIPT, existiría un dominio cinético del fenómeno y se podría observar una diferencia entre la relación I_{N^*}/I_{T^*} en presencia y ausencia de un extintor, similar a lo mostrado en la tabla 6.5. Esta interpretación no puede asegurarse dado que desconocemos el tiempo de vida relacionado con el pcFRET. La otra posibilidad, es considerar una vez más que la sonda se encuentra en diferentes posiciones (entornos). Las moléculas de la sonda que están expuesta al exterior (en contacto con el agua) contribuyan a la señal total de fluorescencia principalmente con la banda N^* que justamente no está tan afectada por el pcFRET, ya que la banda T^* es la que presenta un mejor solapamiento con la banda de absorción del cPC. En ese caso, las moléculas que se encuentran en un entorno de menor polaridad presentan un mejor solapamiento de espectral.

El sistema es muy complejo y por lo tanto, los resultados son muy difíciles de interpretar ya que la sonda estaría en diferentes posiciones y la señal de fluorescencia no se corresponde con un modelo simple. Es importante destacar que se pudo obtener mucha información que ayudó a tener una mayor comprensión de la estructura de este tipo de ensamblados. Estos ensamblados supramoleculares son muy versátiles y por lo tanto tienen mucho potencial para ser utilizados como sondas o como “actores” en experimentos con sistemas biológicos. La funcionalización posterior de los ensamblados mediante los grupos carboxilato, permitiría unir moléculas para reconocimiento específico (biotina, nucleótidos, anticuerpos, entre otros) y así expandir aun más su campo de aplicación.

Referencias

- (1) Demchenko, A. P., *Introduction to fluorescence sensing*; Springer: New York, 2009; 586 págs.
- (2) Sun, Y.; Wallrabe, H.; Seo, S.-A. y Periasamy, A. “FRET Microscopy in 2010: The Legacy of Theodor Förster on the 100th Anniversary of his Birth” *ChemPhysChem* **2011**, *12*, 462-474.
- (3) Ishikawa-Ankerhold, H. C.; Ankerhold, R. y Drummen, G. P. C. “Advanced Fluorescence Microscopy Techniques|FRAP, FLIP, FLAP, FRET and FLIM” *Molecules* **2012**, *17*, 4047-4132.
- (4) Jares-Erijman, E. A. y Jovin, T. M. “FRET imaging” *Nature Biotechnology* **2003**, *21*, 1387-1395.
- (5) Pietraszewska-Bogiel, A. y Gadella, T. “FRET microscopy: from principle to routine technology in cell biology: FRET MICROSCOPY” *Journal of Microscopy* **2011**, *241*, 111-118.
- (6) Gadella, T. W. y Jovin, T. M. “Oligomerization of epidermal growth factor receptors on A431 cells studied by time-resolved fluorescence imaging microscopy. A stereochemical model for tyrosine kinase receptor activation.” *The Journal of cell biology* **1995**, *129*, 1543-1558.

- (7) Van Munster, E. B.; Kremers, G. J.; Adjobo-Hermans, M. y Gadella, T. W. "Fluorescence resonance energy transfer (FRET) measurement by gradual acceptor photobleaching" *Journal of microscopy* **2005**, *218*, 253-262.
- (8) Wang, L.; Chen, T.; Qu, J. y Wei, X. "Photobleaching-Based Quantitative Analysis of Fluorescence Resonance Energy Transfer inside Single Living Cell" *Journal of Fluorescence* **2010**, *20*, 27-35.
- (9) Chen, Y.-C. y Clegg, R. M. "Fluorescence lifetime-resolved imaging" *Photosynthesis Research* **2009**, *102*, 143-155.
- (10) Padilla-Parra, S.; Audugé, N.; Coppey-Moisan, M. y Tramier, M. "Quantitative FRET Analysis by Fast Acquisition Time Domain FLIM at High Spatial Resolution in Living Cells" *Biophysical Journal* **2008**, *95*, 2976-2988.
- (11) Oida, T.; Sako, Y. y Kusumi, A. "Fluorescence lifetime imaging microscopy (flimscopy). Methodology development and application to studies of endosome fusion in single cells" *Biophysical Journal* **1993**, *64*, 676-685.
- (12) Lidke, D.; Nagy, P.; Barisas, B.; Heintzmann, R.; Post, J.; Lidke, K.; Clayton, A.; Arndt-Jovin, D. y Jovin, T. "Imaging molecular interactions in cells by dynamic and static fluorescence anisotropy (rFLIM and emFRET)" *Biochemical society transactions* **2003**, *31*, 1020-1027.
- (13) Michalet, X.; Weiss, S. y Jäger, M. "Single-Molecule Fluorescence Studies of Protein Folding and Conformational Dynamics" *Chemical Reviews* **2006**, *106*, 1785-1813.
- (14) Gambin, Y. y Deniz, A. A. "Multicolor single-molecule FRET to explore protein folding and binding" *Molecular BioSystems* **2010**, *6*, 1540.
- (15) Preus, S. y Wilhelmsson, L. M. "Advances in Quantitative FRET-Based Methods for Studying Nucleic Acids" *ChemBioChem* **2012**, *13*, 1990-2001.
- (16) Lam, J. C. F. y Li, Y. "Influence of Cleavage Site on Global Folding of an RNA-Cleaving DNazyme" *ChemBioChem* **2010**, *11*, 1710-1719.
- (17) Du, G.; Marriott, G. y Yan, Y. en *2010 4th International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering (iCBBE)*, 2010 4th International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering (iCBBE), 2010, págs. 1-5.
- (18) Marriott, G. y col. "Optical lock-in detection imaging microscopy for contrast-enhanced imaging in living cells" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2008**, *105*, 17789-17794.
- (19) Bouas-Laurent, H. y Dürr, H. "Organic photochromism (IUPAC technical report)" *Pure and Applied Chemistry* **2001**, *73*, 639-665.
- (20) Nigel Corns, S.; Partington, S. M. y Towns, A. D. "Industrial organic photochromic dyes" *Coloration Technology* **2009**, *125*, 249-261.
- (21) Shichida, Y. y Matsuyama, T. "Evolution of opsins and phototransduction" *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **2009**, *364*, 2881-2895.

- (22) Hoffmann, R. y Woodward, R. B. "Conservation of orbital symmetry" *Accounts of Chemical Research* **1968**, *1*, 17-22.
- (23) Streitwieser, A. y Heathcok, C. H., *Química orgánica*; McGraw-Hill: México, 1989.
- (24) Abe, S.; Uchida, K.; Yamazaki, I. e Irie, M. "Fatigue-Resistance Property of Diarylethene LB Films in Repeating Photochromic Reaction" *Langmuir* **1997**, *13*, 5504-5506.
- (25) Irie, M. "Photochromic diarylethenes for photonic devices" *Pure and Applied Chemistry* **2009**, *68*, 1367-1371.
- (26) Katsonis, N.; Kudernac, T.; Walko, M.; van der Molen, S. J.; van Wees, B. J. y Feringa, B. L. "Reversible Conductance Switching of Single Diarylethenes on a Gold Surface" *Advanced Materials* **2006**, *18*, 1397-1400.
- (27) Irie, M. "Diarylethenes for Memories and Switches" *Chemical Reviews* **2000**, *100*, 1685-1716.
- (28) Areephong, J.; Kudernac, T.; de Jong, J. J. D.; Carroll, G. T.; Pantorott, D.; Hjelm, J.; Browne, W. R. y Feringa, B. L. "On/Off Photoswitching of the Electropolymerizability of Terthiophenes" *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130*, 12850-12851.
- (29) Feringa, B. L. "The Art of Building Small: From Molecular Switches to Molecular Motors" *The Journal of Organic Chemistry* **2007**, *72*, 6635-6652.
- (30) Baron, R.; Onopriyenko, A.; Katz, E.; Lioubashevski, O.; Willner, I.; Wang, S. y Tian, H. "An electrochemical/photochemical information processing system using a monolayer-functionalized electrode" *Chemical Communications* **2006**, 2147.
- (31) Ashwell, G. J. "Photochromic memory devices" *Nature* **1990**, *347*, 617-617.
- (32) Feringa, B. L.; Jager, W. F. y de Lange, B. "Organic materials for reversible optical data storage" *Tetrahedron* **1993**, *49*, 8267-8310.
- (33) Katsonis, N.; Lubomska, M.; Pollard, M. M.; Feringa, B. L. y Rudolf, P. "Synthetic light-activated molecular switches and motors on surfaces" *Progress in Surface Science* **2007**, *82*, 407-434.
- (34) Dulić, D.; van der Molen, S.; Kudernac, T.; Jonkman, H.; de Jong, J.; Bowden, T.; van Esch, J.; Feringa, B. y van Wees, B. "One-Way Optoelectronic Switching of Photochromic Molecules on Gold" *Physical Review Letters* **2003**, *91*, DOI: 10.1103/PhysRevLett.91.207402.
- (35) Matsuda, K.; Ikeda, M. e Irie, M. "Photochromism of Diarylethene-capped Gold Nanoparticles" *Chemistry Letters* **2004**, *33*, 456-457.
- (36) Yamaguchi, H.; Matsuda, K. e Irie, M. "Excited-State Behavior of a Fluorescent and Photochromic Diarylethene on Silver Nanoparticles" *Journal of Physical Chemistry C* **2007**, *111*, 3853-3862.
- (37) Odell, A. y Delin, A. "Ab initio study of the electron transport in dithienylethene photochromic molecules attached to gold leads" *Journal of Physics: Conference Series* **2008**, *100*, 052061.

- (38) Kudernac, T.; van der Molen, S. J.; van Wees, B. J. y Feringa, B. L. "Uni- and bi-directional light-induced switching of diarylethenes on gold nanoparticles" *Chemical Communications* **2006**, 3597.
- (39) Matsuda, K.; Yamaguchi, H.; Sakano, T.; Ikeda, M.; Tanifuji, N. e Irie, M. "Conductance Photoswitching of Diarylethene–Gold Nanoparticle Network Induced by Photochromic Reaction" *Journal of Physical Chemistry C* **2008**, *112*, 17005-17010.
- (40) Van der Molen, S. J.; Liao, J.; Kudernac, T.; Agustsson, J. S.; Bernard, L.; Calame, M.; van Wees, B. J.; Feringa, B. L. y Schönenberger, C. "Light-Controlled Conductance Switching of Ordered Metal–Molecule–Metal Devices" *Nano Letters* **2009**, *9*, 76-80.
- (41) Giordano, L.; Jovin, T. M.; Irie, M. y Jares-Erijman, E. A. "Diheteroarylethenes as Thermally Stable Photoswitchable Acceptors in Photochromic Fluorescence Resonance Energy Transfer (pcFRET)" *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124*, 7481-7489.
- (42) Díaz, S. A.; Menéndez, G. O.; Etchelon, M. H.; Giordano, L.; Jovin, T. M. y Jares-Erijman, E. A. "Photoswitchable Water-Soluble Quantum Dots: pcFRET Based on Amphiphilic Photochromic Polymer Coating" *ACS Nano* **2011**, *5*, 2795-2805.
- (43) Díaz, S. A.; Giordano, L.; Jovin, T. M. y Jares-Erijman, E. A. "Modulation of a Photoswitchable Dual-Color Quantum Dot containing a Photochromic FRET Acceptor and an Internal Standard" *Nano Letters* **2012**, *12*, 3537-3544.
- (44) Díaz, S. A.; Giordano, L.; Azcárate, J. C.; Jovin, T. M. y Jares-Erijman, E. A. "Quantum Dots as Templates for Self-Assembly of Photoswitchable Polymers: Small, Dual-Color Nanoparticles Capable of Facile Photomodulation" *Journal of the American Chemical Society* **2013**, *135*, 3208-3217.
- (45) Diaz, S. A. *Water soluble photochromic fluorescent nanoprobes based on diheteroarylethenes and polymer coated quantum dots*. Tesis doct., Georg-August-Universität, 2013.
- (46) Giordano, L. *Síntesis de Diheteroariletanos fotocromicos y su Aplicación como Aceptores en Transferencia de Energía*, Tesis doct., Buenos Aires, Argentina: Universidad de Buenos Aires, 2004.
- (47) Fauerbach, J. A. *Caracterización de las etapas tempranas de la agregación de alfa-sinucleína in vitro mediante sondas fluorescentes ES IPT y microscopia de fuerza atómica*. Tesis doct., Buenos Aires, Argentina: Universidad de Buenos Aires, 2013.
- (48) Das, R.; Klymchenko, A. S.; Duportail, G. y Mély, Y. "Unusually slow proton transfer dynamics of a 3-hydroxychromone dye in protic solvents" *Photochemical & Photobiological Sciences* **2009**, *8*, 1583.
- (49) Corthey, G. *Estudio de interfases metal-tiol en superficies planas y nanopartículas*, Tesis, Facultad de Ciencias Exactas, 2012.
- (50) Shynkar, V. V.; Mély, Y.; Duportail, G.; Piémont, E.; Klymchenko, A. S. y Demchenko, A. P. "Picosecond Time-Resolved Fluorescence Studies Are Consistent with Reversible Excited-State Intramolecular Proton Transfer in 4'-(Dialkylamino)-3-hydroxyflavones" *The Journal of Physical Chemistry A* **2003**, *107*, 9522-9529.

- (51) Lakowicz, J. R., *Principles of fluorescence spectroscopy*, 3rd ed; Springer: New York, 2006; 954 págs.
- (52) Das, R.; Duportail, G.; Richert, L.; Klymchenko, A. y Mély, Y. [“Sensing Micelle Hydration by Proton-Transfer Dynamics of a 3-Hydroxychromone Dye: Role of the Surfactant Headgroup and Chain Length”](#) *Langmuir* **2012**, *28*, 7147-7159.
- (53) Shvadchak, V. V.; Klymchenko, A. S.; de Rocquigny, H. y Mely, Y. [“Sensing peptide-oligonucleotide interactions by a two-color fluorescence label: application to the HIV-1 nucleocapsid protein”](#) *Nucleic Acids Research* **2009**, *37*, e25-e25.
- (54) Olmos-Asar, J. A.; Rapallo, A. y Mariscal, M. M. [“Development of a semiempirical potential for simulations of thiol–gold interfaces. Application to thiol-protected gold nanoparticles”](#) *Physical Chemistry Chemical Physics* **2011**, *13*, 6500.

Parte III

Parte Final

Capítulo 7

Conclusiones Finales y Perspectivas

En esta tesis se ha estudiado la modificación de la superficie de nanopartículas de oro con el objetivo final de contribuir al desarrollo de un sensor fluorescente fotomodulable a escala nanométrica. Estos sensores están formados por dos partes esenciales: un centro metálico y una coraza orgánica. La nanopartícula de Au en el centro tiene un tamaño menor a 4 nm, sobre la que se ensambla un polímero anfifílico. Este último fue modificado con moléculas fluorescentes y fotocromáticas que actúan como sonda y fotomodulador, respectivamente. Estas dos partes, nanopartículas y polímero, se prepararon, purificaron y caracterizaron, para luego ser ensamblados, formándose así una sonda fluorescente fotomodulable.

En relación con la síntesis y caracterización de AuNPs, se prepararon partículas hidrofóbicas, recubiertas por dodecanotiol, mediante el método de dos fases de Brust-Schiffrin, e hidrofílicas, mediante reacciones de intercambio de ligandos.

El método de dos fases de Brust-Schiffrin resultó adecuado para controlar los tamaños de AuNPs recubiertas por dodecanotiol. Estas fueron caracterizadas por espectroscopia de absorción UV-Vis, XPS y TEM. Se encontró que estas AuNPs tienen distribuciones de tamaños estrechas, son extremadamente estables, pueden purificarse y manipularse en forma simple y segura. Por ello, se las eligió para ensayar la formación de ensamblados con polímeros anfifílicos. Por otra parte, se realizaron importantes avances en la caracterización del daño por radiación que sufren los agentes protectores de estas AuNPs cuando se estudian por XPS. El principal efecto encontrado es el incremento de la señal atribuida comúnmente a tiol libre o disulfuros. Con el fin de minimizar el daño por radiación, se realizaron medidas de XPS en condiciones muy disímiles, empleando fuentes de rayos X de laboratorio y luz de sincrotrón. Aunque no fue posible establecer una metodología general para evitar esta clase de daño, fue posible caracterizarlo. Asimismo, se concluyó que las AuNPs con las que se prepararon los ensamblados no presentan cantidad significativa de tiol libre. Si estas especies formaran parte de la capa protectora, en lugar de provenir exclusivamente de la irradiación con rayos X, esto representaría un inconveniente en la formación de los autoensamblados con las cadenas alquílicas de los polímeros anfifílicos.

Se realizaron con éxito reacciones de intercambio de ligandos sobre AuNPs recubiertas con moléculas que interactúan débilmente con la superficie metálica, utilizando diferentes tioles que se unen covalentemente con el Au. Se emplearon tioles con grupos carboxilatos que permiten obtener

AuNPs solubles en agua. Las reacciones de intercambio de ligandos representan una alternativa interesante a la síntesis de Brust-Schiffrin de una fase donde se emplean tioles hidrosolubles. En esas condiciones, algunos tioles –tal es el caso del TMA- forman tiolatos de Au(I) muy estables, los que no pueden ser reducidos completamente en las condiciones de reacción. El método de intercambio de ligandos, llevado adelante con un defecto estequiométrico de tiol en relación a la cantidad total de Au en las AuNPs, permitió obtener AuNP@TMA que no presentaban especies de tiolato de Au(I). Estas AuNP@TMA presentan la propiedad de ser solubles en soluciones acuosas en un amplio rango de pH, lo que las hace muy interesantes para aplicaciones en sistemas biológicos. Se determinó por XPS que estas AuNP@TMA presentaban una cantidad significativa de azufre atómico coadsorbido a la superficie de Au. Además, mediante un estudio exhaustivo del sistema Au-TMA, tanto en AuNPs como en SAMs formadas sobre Au(111), se determinó que el azufre atómico se origina durante el proceso de adsorción del tiol. Con el apoyo de cálculos teóricos, en los que se obtuvieron las frecuencias vibracionales de la unión C–S, se concluyó que la cercanía del grupo carboxilato a la función tiol favorece el clivaje de dicha unión. Más aún, se propuso un mecanismo de ruptura de este enlace, donde el grupo saliente con carga negativa se encuentra relativamente estabilizado por resonancia. Este mecanismo se sustenta, además, en la comparación entre resultados obtenidos para intercambios en fase acuosa (THPA-AuNP@TMA) y orgánica (TOAB-AuNP@TMA). Las partículas protegidas por TOAB, dispersas en tolueno, fueron modificadas con TMA y presentaron una mayor cantidad de azufre atómico respecto de las THPA-AuNP@TMA. Esto se explicó considerando que los cationes tetraoctilamonio (TOA) presentes en la superficie de la AuNP@TOAB precursoras, pueden formar pares iónicos con los grupos salientes aniónicos, favoreciendo el proceso de clivaje.

La síntesis y caracterización de polímeros modificados con fluoróforos y/o fotocromicos condujo a resultados interesantes. En primer lugar, estos polímeros presentaron baja concentración de especies ópticamente activas, en relación con las cantidades esperadas. Posiblemente la causa de ello haya sido la baja reactividad que pueden presentar las aminas aromáticas (grupos funcionales mediante los se unieron covalentemente los fluoróforos y fotocromicos), a pesar de contar con un polímero con grupos anhídrido. La química orgánica ofrece muchas herramientas para mejorar la funcionalización de los polímeros con fluoróforos y fotocromicos. Alternativas atractivas son la modificación de estas moléculas con espaciadores que presenten grupos más reactivos, como aminas alifáticas, o la polimerización de monómeros que contengan las moléculas funcionales. El otro aspecto interesante, es que es posible purificar los polímeros modificados y utilizarlos en la formación de ensamblados supramoleculares.

Uno de los aspectos relevantes es la purificación de los ensamblados. Se ensayaron múltiples técnicas de separación, resultando apropiadas sólo la cromatografía de exclusión por tamaños y la electroforesis en gel de agarosa. Las diferencias encontradas en los espectros de emisión de una muestra dada purificada por estos métodos muestran, por un lado, que estos sistemas pueden sufrir profundas alteraciones durante su fraccionamiento y, por otro, que debe tenerse sumo cuidado en la interpretación de los resultados.

Los ensamblados que contenían sólo la sonda fluorescente permitieron comprender los cambios que pueden sufrir estas estructuras supramoleculares frente a modificaciones de la polaridad,

fuerza iónica o pH del medio. Las 3HC como sondas ESIPT son muy sensibles a todos estos cambios y, puesto que éstos no siempre pueden ser desacoplados, se dificulta la interpretación de los resultados. Asimismo, los estudios del comportamiento de las sondas FE y FC en los ensamblados frente al agregado de cosolventes permitieron postular que estas moléculas pueden sufrir cambios en sus posiciones respecto de la superficie. Estos cambios de posición exponen bruscamente la sonda a diferentes medios y esto se manifiesta en las variaciones de sus espectros de emisión. Por otro lado, para la sonda FC los corrimientos de la banda T* hacia mayores longitudes de onda y de la banda N* hacia bajas longitudes de onda sugieren su localización en un entorno rígido, mientras que los cambios del rendimiento cuántico son indicativos de interacción con el medio circundante.

Al estudiar los decaimientos de fluorescencia resuelta en el tiempo, se encontró que los resultados no se pueden interpretar por un modelo simple para una sonda ESIPT. La necesidad de incorporar al ajuste múltiples decaimientos sugiere la posibilidad de contar con la sonda en diferentes entornos, lo que está en buen acuerdo con las conclusiones obtenidas para los espectros de fluorescencia en estado estacionario.

El estudio del desarrollo de un sensor de polaridad fluorescente y fotomodulable, es una interesante prueba de concepto con potencial aplicación en microscopia de fluorescencia. La sonda FC sufrió un proceso de fotoblanqueo considerable cuando se irradió el sistema para la reacción de ciclación del fotocromico. Esto puede solucionarse seleccionando un par pcFRET+ESIPT que presente mayor separación de la banda de absorción del donador y la longitud de onda a la que se irradia el PC. La obtención de mayores concentraciones de fluoróforo y altos rendimientos cuánticos, permitiría preparar un sensor de polaridad, fotomodulable sin parpadeo y con alto brillo. Si esto se lograra, se estaría frente a un sistema de potencial aplicación en microscopias de fluorescencia. En otras palabras, la idea que soportar un polímero funcionalizado con fluoróforos sobre NPs conjuga las bondades de ausencia de parpadeo de los polímeros fluorescentes, con el pequeño tamaño que se logra al formar los ensamblados.

Lista de Publicaciones

Los siguientes artículos publicados en revistas científicas internacionales surgieron del desarrollo de esta tesis doctoral.

- (1) Orive, A. G. y col. "Naked gold nanoparticles supported on HOPG: melanin functionalization and catalytic activity" *Nanoscale* **2011**, 3, 1708.
- (2) Azcárate, J. C.; Corthey, G.; Pensa, E.; Vericat, C.; Fonticelli, M. H.; Salvarezza, R. C. y Carro, P. "Understanding the Surface Chemistry of Thiolate-Protected Metallic Nanoparticles" *The Journal of Physical Chemistry Letters* **2013**, 4, 3127-3138.
- (3) Díaz, S. A.; Giordano, L.; Azcárate, J. C.; Jovin, T. M. y Jares-Erijman, E. A. "Quantum Dots as Templates for Self-Assembly of Photoswitchable Polymers: Small, Dual-Color Nanoparticles Capable of Facile Photomodulation" *Journal of the American Chemical Society* **2013**, 135, 3208-3217.
- (4) Azcárate, J. C.; Florida Addato, M. A.; Rubert, A.; Corthey, G.; Kürten Moreno, G. S.; Benítez, G.; Zelaya, E.; Salvarezza, R. C. y Fonticelli, M. H. "Surface Chemistry of Thiomalic Acid Adsorption on Planar Gold and Gold Nanoparticles" *Langmuir* **2014**, 30, 1820-1826.

