



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



MASTER UNIVERSITARIO EN
SENSORES PARA
APLICACIONES INDUSTRIALES

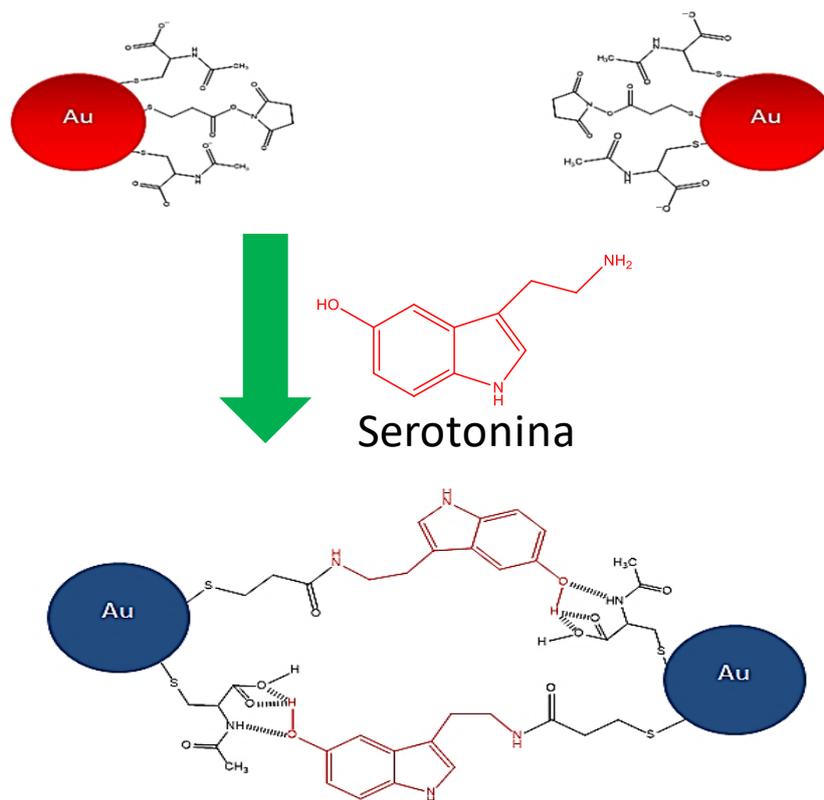


Escuela Técnica Superior de Ingeniería del Diseño

Máster Universitario en Sensores para Aplicaciones Industriales

TRABAJO FIN DE MÁSTER

DESARROLLO DE UN SENSOR QUÍMICO BASADO EN NANOPARTÍCULAS DE ORO PARA LA DETECCIÓN COLORIMÉTRICA DE SEROTONINA



Realizado por:
TANIA MARIEL GODOY REYES
CURSO 2016/2017

Directores:
Prof. Dr. RAMON MARTINEZ MAÑEZ
Prof. Dr. ANA MARIA COSTERO

ÍNDICE

ABSTRACT.....	3
1. INTRODUCCIÓN.....	4
1.1 Importancia biológica de la Serotonina (5-HT).....	4
1.2 Métodos de detección de serotonina (5-HT) desarrollados.....	5
1.2.1 Derivatización de serotonina con Bencilamina y 1,2 – difeniletildiamina (DPE) seguida por la columna de cromatografía líquida.....	6
1.2.2 Reacción de Hantzsch en el sistema serotonina-formaldehído acetilacetona.....	7
1.2.3 Formación de excímeros intermoleculares de aminas bioactivas con cloruro de 4- (1-pireno) butanoilo.....	7
1.2.4 Detección intermolecular FRET de triptófano y serotonina.....	8
1.3 Nanopartículas de oro (AuNPs).....	9
1.3.1 Una visión general.....	9
1.3.2 Propiedades de AuNPs.....	10
1.3.3 Síntesis y Funcionalización.....	11
1.3.3.1 Citrato y métodos relacionados de preparación de partículas.....	11
1.3.3.2 El método Brust-Schiffrin para AuNPs protegidas con tiol.....	12
1.3.3.3 Método de intercambio de ligandos.....	13
1.3.4 Sistemas sensores a partir de nanopartículas de oro.....	14
1.3.4.1 Detección de iones de metales alcalinos y alcalinotérreos.....	14
1.3.4.2 Detección de aniones.....	14
1.3.4.3 Detección de moléculas neutras.....	15
2. OBJETIVOS.....	16
3.DISEÑO DEL SISTEMA SENSOR.....	17
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	19

4.1 Síntesis de AuNPs.....	19
4.2 Funcionalización de AuNPs.....	20
4.3 Caracterización del sensor colorimétrico.....	20
4.3.1 Localización de la banda de resonancia del plasmón de superficie.....	20
4.3.2 Determinación del diámetro de AuNPs.....	21
4.3.3 Determinación de la concentración de AuNPs.....	23
4.4 Comportamiento óptico del sensor colorimétrico.....	25
4.4.1 En presencia de serotonina.....	25
4.4.1.1 UV-Vis.....	25
4.4.1.2 TEM.....	26
4.4.1.3 DLS.....	26
4.4.1.3 Z POTENCIAL.....	28
4.4.2 Evaluación de la selectividad del sensor.....	29
4.5 Caracterización de la respuesta cromogénica.....	31
4.5.1 UV-Vis.....	31
4.5.2 TEM.....	32
4.5.3 Determinación del límite de detección.....	33
5. PARTE EXPERIMENTAL.....	34
5.1 Procedimientos generales.....	34
5.2 Procedimiento experimental y síntesis del sensor colorimétrico.....	34
5.2.1 Síntesis de AuNPs.....	34
5.2.2 Purificación de AuNPs.....	34
5.2.3 Funcionalización de AuNPs.....	35
5.3 Preparación de disoluciones UV-Vis.....	35
6. CONCLUSIONES.....	36
7. REFERENCIAS.....	37

ABSTRACT

El presente trabajo final de máster se basa en el diseño, síntesis y evaluación de un sensor colorimétrico, basado en nanopartículas de oro, capaz de reconocer la presencia de serotonina. La serotonina es un neurotransmisor responsable de diversas funciones en el cuerpo como puede ser la regulación del estado de ánimo, la digestión o el sueño entre otras. Además, a diferentes concentraciones se encuentra vinculado con el desarrollo de patologías psiquiátricas y tumores carcinoides.

Se han estudiado los diferentes sistemas de detección de serotonina desarrollados hasta ahora que se citan en la introducción; además en ésta se describen de forma amplia las propiedades y aplicaciones de las nanopartículas de oro como sensores colorimétricos. El sensor colorimétrico diseñado consta de nanopartículas de oro cuya superficie se encuentra difuncionalizada por dos ligandos tiolados que reconocen selectivamente los grupos hidroxilo y amino de la serotonina, dichos ligandos son propionato de ditiobisuccinimidilo (DSP) y N-acetil-L-cisteína (NAC).

Se encontró mediante empleo de UV-Vis que en presencia de serotonina, la banda de absorción de plasmón de las nanopartículas se desplaza hacia longitudes de onda más altas como consecuencia de la agregación de las mismas. Este hecho fue comprobado por imágenes de TEM y espectros de DLS y potencial Z. Los estudios de selectividad demostraron que el sensor es capaz de reconocer la serotonina en presencia de otros neurotransmisores. En cuanto a la sensibilidad, se determinó que el sensor colorimétrico es capaz de detectar el analito en el rango de concentraciones nanomolares de manera fiable.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Importancia biológica de la serotonina

La serotonina (5-hidroxitriptamina o 5-HT) (Figura 1) es una monoamina que actúa como un neurotransmisor en el sistema nervioso central y periférico y que se sintetiza a partir del triptófano. La serotonina se encuentra principalmente en el tracto gastrointestinal, plaquetas sanguíneas y el sistema nervioso central de los animales, incluidos los humanos [1]. Aproximadamente el 95% de la serotonina total del cuerpo humano se encuentra en las células enterocromafines en el tracto GI, donde se utiliza para regular los movimientos intestinales [2].

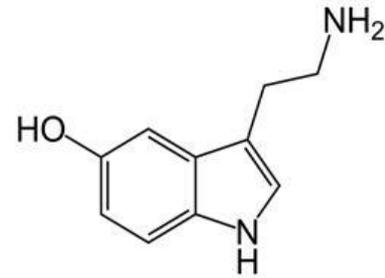


Fig.1 Estructura química de la Serotonina (5-HT)

Diferentes estudios han encontrado vínculos entre la serotonina y el metabolismo óseo, la producción de leche materna, la regeneración hepática y la división celular [3].

Al ser un neurotransmisor, la serotonina influye directa e indirectamente en la mayoría de las células del cerebro. Se considera que la serotonina puede afectar:

- **Función intestinal:** la mayor parte de la serotonina del cuerpo se encuentra en el tracto gastrointestinal donde regula la función y los movimientos intestinales. También contribuye a la reducción del apetito cuando comemos [4].
- **Estado de ánimo:** es bien conocida su función en el cerebro donde juega un papel importante en el estado de ánimo, la ansiedad y la felicidad. Drogas ilegales que alteran el ánimo, como el éxtasis o el LSD, producen un aumento masivo en los niveles de serotonina [5].
- **Coagulación:** interviene en los procesos de formación de los coágulos sanguíneos. Las plaquetas liberan serotonina en presencia de una herida, como consecuencia se produce una vasoconstricción (estrechamiento de pequeñas arterias, las arteriolas) reduciendo el flujo de sangre y contribuyendo a la formación de coágulos [6].
- **Náusea:** cuando se come algo que es tóxico o irritativo, el intestino aumenta la producción de serotonina para incrementar el tránsito intestinal y expulsar el irritante en forma de diarrea. Este aumento de los niveles sanguíneos de serotonina estimula el centro del vómito en el cerebro provocando náuseas [7].

- **Densidad ósea:** los estudios concluyen que niveles persistentemente altos de serotonina en el hueso pueden causar un aumento en la osteoporosis ^[8].
- **Sexualidad:** se ha comprobado que aquellas personas que toman medicación que aumenta la serotonina, presentan una reducción en la libido y función sexual ^[9].

El nivel normal de serotonina en sangre está en el rango de 528 ± 137 ng/mL y en el fluido cerebroespinal 93-902 pg/mL y 1.37-4.44 ng/mL ^[10]. Se ha demostrado que concentraciones de serotonina en sangre por debajo de los 101 a 283 ng/mL están directamente relacionadas con trastornos mentales como la esquizofrenia, la depresión, el autismo infantil y el trastorno obsesivo compulsivo ^[11].

Por otra parte concentraciones mayores de serotonina están ligadas al desarrollo del síndrome serotoninérgico que es un grupo de síntomas que pueden aparecer después del uso de ciertos medicamentos o fármacos serotoninérgicos ^[12]. Estos síntomas incluyen fiebre, agitación, aumento de reflejos, temblores, sudoración, pupilas dilatadas y diarrea ^[13]. La temperatura corporal puede aumentar a más de 41.1°C. Las complicaciones pueden incluir convulsiones y descomposición muscular extensa ^[14].

Algunos tumores carcinoides del intestino medio, cuya metástasis produce normalmente concentraciones sanguíneas de serotonina >1,000 ng/mL, pueden originar lo que se conoce como síndrome carcinoide. ^[15] Este síndrome se refiere a un conjunto de signos y síntomas como rubor, diarrea y, con menor frecuencia, insuficiencia cardíaca y broncoespasmo y que aparecen secundariamente al tumor carcinoide. ^[16]

1.2 Métodos de detección de serotonina desarrollados hasta el momento

Se han desarrollado métodos alternativos para la detección de serotonina tanto in vivo como e in vitro. Las estrategias empleadas son cromatografía líquida, electroforesis capilar, electrocromatografía capilar acoplada a la detección UV, inmunoensayo de flujo o la detección nativa de fluorescencia entre otras.

Sin embargo, existe una demanda creciente de nuevos métodos experimentales, ya que la elucidación de los metabolismos de los neurotransmisores y sus funciones, requieren una mejora adicional de las herramientas de análisis para superar las limitaciones de los métodos actuales. Por ejemplo, el método cromatográfico tiene un tiempo de operación largo. Por otra parte, la selectividad de los sensores electroquímicos puede verse obstaculizada por la presencia de otras moléculas con potenciales redox similares a los de la molécula diana, aunque pueden proporcionar respuestas de milisegundos con resolución micrométrica.

La fluorescencia intrínseca de la serotonina originada por el grupo indol, ha dado lugar al desarrollo de métodos de detección basados en esta fluorescencia, los cuales pueden ser valiosos para superar los puntos débiles de otras técnicas ya que poseen un tiempo de respuesta rápido, procedimientos sencillos y no destructivos. Los máximos de absorción y emisión de la serotonina se sitúan en 337 y 297 nm, respectivamente. Las propiedades espectroscópicas de la serotonina como la fluorescencia, el máximo de emisión y el tiempo de vida son dependientes del pH, consistentes con un valor de pKa de $10,4 \pm 0,2$. A valores de pH superiores a su pKa, la emisión de fluorescencia de la serotonina se extingue ^[17].

Varios dispositivos de detección de serotonina basados en la fluorescencia de la serotonina aparecen descritos en la bibliografía:

1.2.1 Derivatización de serotonina con bencilamina y 1,2 - difeniletildiamina (DPE) seguida por columna de cromatografía líquida ^[18].

La derivatización se inicia con bencilamina o difeniletildiamina (DPE) en medios básicos (pH 10.0), en presencia de hexacianoferrato (III) de potasio que desempeña un papel catalítico (**Figura 2**). Los restos de benzoxazol fluorescentes resultantes se separaran en una columna de fase inversa. Mediante este método, la serotonina se detecta con un límite de detección de 0.08 fmol por inyección de 20 μ l (12 pM en una solución estándar).

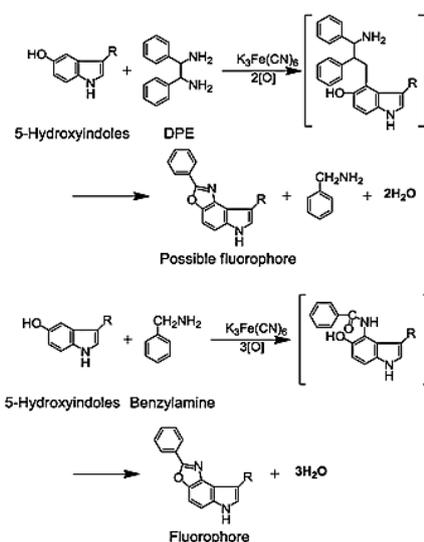


Fig.2 Procedimiento de derivatización de 5-HT

1.2.2 Reacción de Hantzsch en el sistema serotonina-formaldehído-acetilacetona^[19]

En una solución tampón de pH 5.80 (NaAc-HAc), la serotonina puede reaccionar con el sistema formaldehído-acetilacetona, generando un nuevo compuesto con fluorescencia amarilla-verde a 533 nm. El límite de detección para la serotonina con este método es de 2.08×10^{-7} mol L⁻¹. Los mecanismos subyacentes a la mejora de la fluorescencia en el sistema de serotonina-formaldehído-acetilacetona siguen la reacción de Hantzsch (**Figura 3**), donde la serotonina reacciona con acetilacetona-formaldehído, a la que seguidamente, se añade un nuevo complejo ternario dando lugar a un marcado aumento de fluorescencia de acetilacetona-formaldehído a $\lambda = 533$ nm. Se observó un aumento de la intensidad de fluorescencia con respecto a la concentración de la 5-HT recién formada. Este método no es muy selectivo en presencia de otras aminas por lo que se tienen que aplicar varios procesos de extracción para mejorar la selectividad.

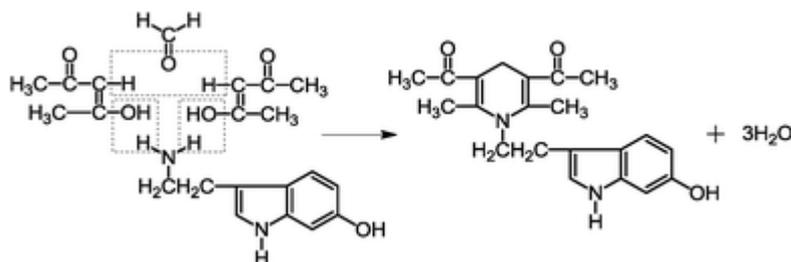


Fig.3 Reacción de Hantzsch en el sistema serotonina-formaldehído-acetilacetona

1.2.3 Formación de excímeros intramoleculares de aminas bioactivas con cloruro de 4-(1-pireno)-butanoilo^[20]

Este método detecta tanto catecolaminas como indolaminas mediante la formación de un excímero fluorescente dipireno que desplaza la fluorescencia de 360–420 nm a 440–520 nm al derivatizar cloruro de 4-(1-pireno)-butanoilo (PBC). Este compuesto reacciona con el grupo amino e hidroxilo de los índoles y catecolaminas y el producto se separa mediante cromatografía líquida de fase inversa (**Figura 4**).

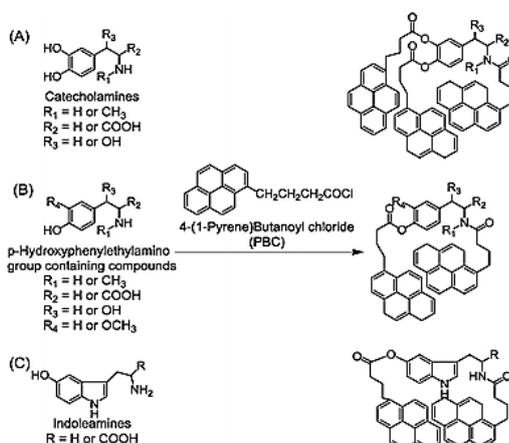


Fig.4 Formación del excímero fluorescente mediante la derivatización de bioaminas, A) catecolaminas B) grupo p-hidroxifenilamino conteniendo los compuestos e C) indolaminas.

1.2.4 Detección intermolecular FRET de triptófano y serotonina ^[21].

Una aproximación diferente se basa en la derivatización del grupo amino de la serotonina con un fluoróforo, seguida de aislamiento por cromatografía líquida (**Figura 5**). El FRET se produce a partir de los restos fluorescentes nativos (donante) al fluoróforo (aceptor) empleado en el proceso de derivatización. Se han usado numerosos reactivos fluorescentes y de ellos, el o-ftalaldehído (OPA) es el más eficiente para generar el FRET.

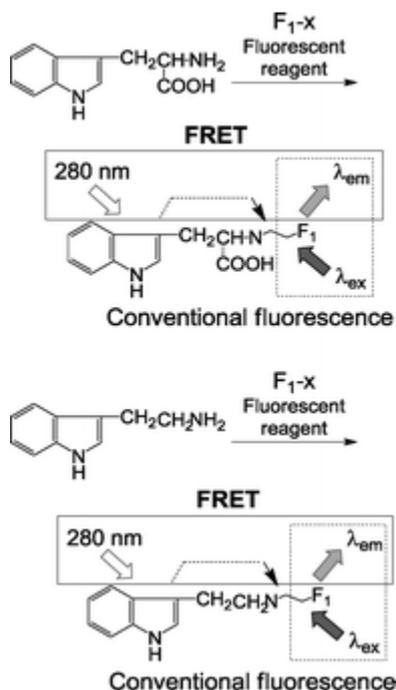


Fig.5 Detección intermolecular FRET de triptófano y serotonina

1.3 Nanopartículas de oro (AuNPs)

1.3.1 Una visión general

Los nanomateriales presentan propiedades fisicoquímicas únicas, que pueden ser de gran utilidad para crear procesos de reconocimiento y transducción de sensores biológicos ^[22], así como mejorar la relación Señal/Ruido mediante la miniaturización de los elementos sensores ^[23]. Las nanopartículas de oro (AuNPs) poseen propiedades físicas y químicas que las hacen excelentes materiales para la fabricación de nuevos sensores (**Figura 6**) ^[24].

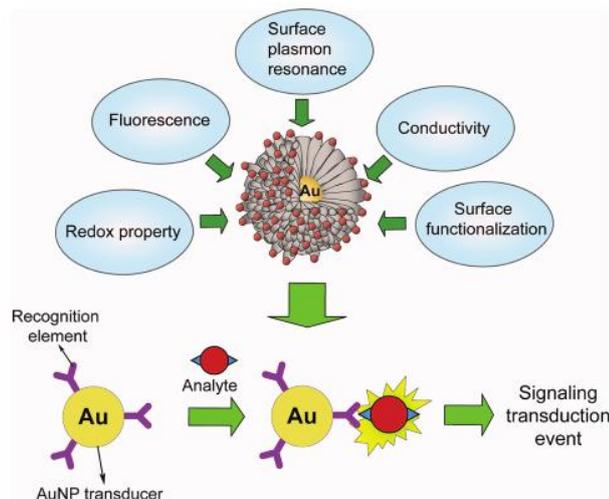


Fig.6 Propiedades físicas de las AuNPs y el fundamento del sistema de detección

Las AuNPs se pueden sintetizar de una manera sencilla, rápida y barata y además, poseen propiedades optoelectrónicas únicas. Por otra parte, poseen una relación superficie/volumen con excelente biocompatibilidad utilizando los ligandos apropiados ^[25]. Estas propiedades de las AuNPs pueden ser fácilmente ajustadas variando su tamaño, forma y superficie química. Por ejemplo, la unión entre el elemento de reconocimiento y el analito pueden alterar las propiedades fisicoquímicas de las AuNPs, tales como la banda de absorción de la resonancia de plasmón superficial, la conductividad, el comportamiento redox, etc., generando una señal de respuesta detectable. Finalmente, las AuNPs ofrecen una plataforma adecuada para la multifuncionalización con una elevada gama de ligandos orgánicos o biológicos para la unión selectiva y la detección de pequeñas moléculas y objetivos biológicos ^[26]. Cada uno de estos atributos de las AuNPs ha permitido a los investigadores desarrollar nuevas estrategias de detección con una mejor sensibilidad, estabilidad y selectividad. En la última década de investigación, la aparición de AuNPs como elemento sensorial ha permitido el desarrollo de innovadores sistemas para la detección de iones, moléculas pequeñas, proteínas, ácidos nucleicos, células malignas, etc., de una manera rápida y eficiente ^[27].

1.3.2 Propiedades de las nanoparticulas

Las AuNPs esféricas poseen propiedades útiles como las propiedades optoelectrónicas relacionadas con el tamaño y la forma,^[28] relación superficie-volumen grande, excelente biocompatibilidad y baja toxicidad^[29]. Estas propiedades hacen de las AuNPs una herramienta importante en bionanotecnología (Tabla 1).^[30]

Propiedades de AuNPs y su área de aplicación	
Propiedades	Área de aplicación
Actividad redox	Dispositivos electrónicos y sensores electroquímicos.
Espectroscopia Raman Amplificada en Superficie (SERS)	Sensores e imagen
Resonancia de plasmón superficial (SPR)	Sensores colorimétricos y terapia fototérmica.
Desactivación de fluorescencia	Fabricación de sensores y ciencia de los materiales.

Tabla 1. Propiedades de AuNPs y su área de aplicación

Las propiedades físicas importantes de las AuNPs incluyen la resonancia de plasmón superficial (SPR) y la capacidad de desactivar la fluorescencia. Las AuNPs esféricas exhiben una gama de colores (marrón, naranja, rojo y morado) en solución acuosa a medida que el tamaño del núcleo aumenta de 1 a 100 nm y muestran generalmente una banda de absorción de 500 a 550 nm en el UV.^[31] Esta banda de absorción surge de la oscilación colectiva de los electrones de conducción debido a la excitación resonante por los fotones incidentes (Figura 7) que se denomina "banda de plasmón superficial". Sin embargo, esta banda está ausente en nanopartículas pequeñas ($d < 2$ nm).

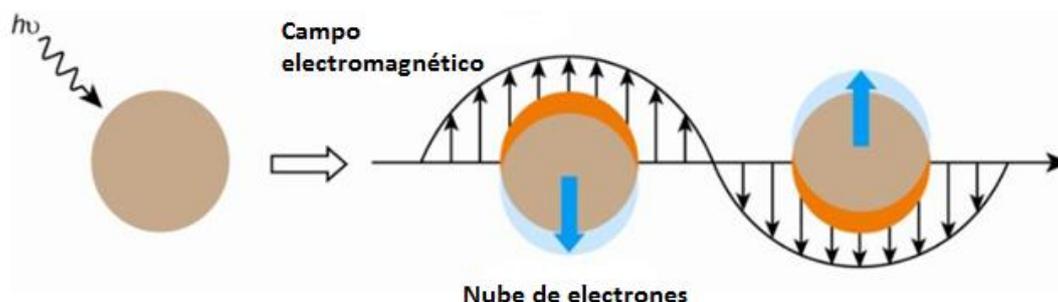


Fig.7 Representación esquemática de la oscilación de los electrones de AuNPs en el campo electromagnético de la luz incidente.

Este fenómeno de la banda de plasmón superficial está influenciado no sólo por el tamaño, sino también por la forma, el disolvente, la concentración, distribución espacial, las propiedades de la matriz que rodea las nanopartículas, la carga del núcleo, la

temperatura e incluso es sensible a la proximidad de otras nanopartículas^[32]. La agregación de nanopartículas da lugar a un significativo desplazamiento hacia el rojo de la frecuencia de SPR, de la banda de plasmón superficial generando un cambio en el color de la solución de rojo a azul debido al acoplamiento de plasmones superficiales entre partículas^[33]. Y es debido a este fenómeno que las AuNPs pueden ser utilizadas como sensores colorimétricos.

Para la aplicación de AuNPs en disolución, es importante determinar su concentración y para ello hay que determinar los correspondientes coeficientes de extinción de las AuNPs ya que varían dependiendo del tamaño y de los ligandos usados para su funcionalización.^[34] Para llevar a cabo esta determinación se utiliza la relación lineal (**Ecuación 1**) entre el logaritmo del coeficiente de extinción molar (ϵ) y diámetro del núcleo (d), que es independiente de los ligandos y disolventes:

$$\ln \epsilon = k \cdot \ln d + c \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde $K=3.32$ y $c= 10.8$ ($\lambda = 506\text{nm}$). Por lo tanto la concentración de las AuNPs puede deducirse fácilmente utilizando la Ley de Beer-Lambert una vez conociendo el diámetro de las nanopartículas mediante (TEM).

1.3.3 Síntesis y funcionalización

Durante las dos últimas décadas, se han desarrollado diferentes métodos para la síntesis de AuNPs, enfocándose en el control del tamaño, forma, solubilidad, estabilidad y funcionalización. Cabe señalar que el término coloide y clúster se utiliza con frecuencia de manera intercambiable; el primero generalmente se refiere a partículas con diámetros superiores a 10 nm, mientras que el último se refiere comúnmente a partículas^[35]. Los métodos más generalizados para generar AuNPs son:

1.3.3.1 Citrato y métodos relacionados de preparación de AuNPs

La síntesis científica del oro coloidal se remonta al trabajo de Michael Faraday en 1857, en el cual los hidrosoles de oro se prepararon por reducción de una solución acuosa de cloroaurato con fósforo disuelto en disulfuro de carbono. Más tarde, en 1951, Turkevich desarrolló un método para la síntesis de AuNPs, utilizando la reducción de citrato de HAuCl_4 en agua^[36]. En este método, el ácido cítrico actúa como agente reductor y estabilizador proporcionando a las AuNPs diámetros de 20 nm. Nuevos estudios realizados por G. Frens demuestran que se puede variar el tamaño de las AuNPs modificando la cantidad de sal de oro y citrato de sodio (**Figura 8**)^[37].

Este protocolo ha sido ampliamente empleado para preparar soluciones diluidas de AuNPs esféricas estables con diámetros de 10 a 20 nm, aunque AuNPs más grandes (por ejemplo, 100 nm) también se pueden preparar. Estas AuNPs estabilizadas con

citrato pueden sufrir agregaciones irreversibles durante los procesos de funcionalización con ligandos tiolados. Se han desarrollado varias estrategias para superar este problema, incluido el uso de un surfactante, Tween 20, antes de la modificación para evitar la agregación, o usar ácido tioctico como un intermedio mediante una funcionalización en dos etapas. [38].

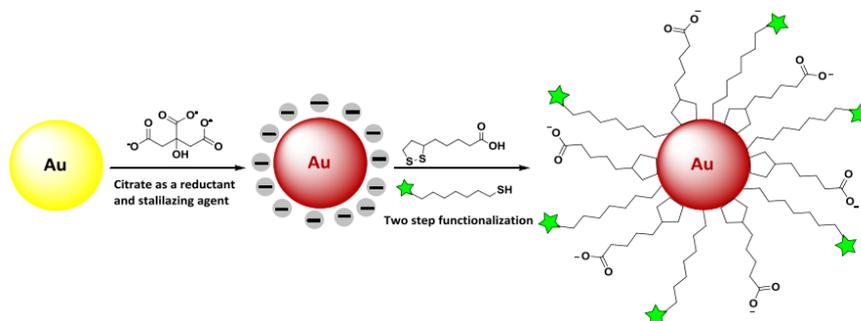


Fig.8 Representación de la síntesis de AuNPs por el método de Turkevich

1.3.3.2 El método Brust-Schiffrin para AuNPs protegidas con tioles

Después del intento inicial de Mulcaney de estabilizar las AuNPs con alcanotioles, Brust y Schiffrin lograron, en 1994, un importante avance en el campo de la síntesis de AuNPs. Estos autores publicaron una estrategia sintética de dos pasos, utilizando las fuertes interacciones tiol-oro para proteger las AuNPs con ligandos tiol. En este método, el AuCl_4 se transfiere de una fase acuosa usando tolueno y bromuro de tetraoctilamonio (TOAB) como surfactante, para luego reducirlo con sodio borohidruro (NaBH_4) en presencia de dodecanotiol [39]. Con la adición de NaBH_4 , se observa un rápido cambio en el color pasando del naranja al marrón oscuro en la fase orgánica. Las AuNPs se generan en tolueno con diámetros controlados en el intervalo de 1.55-5 nm. Este método de protección con grupos tiol confiere mayor estabilidad a las AuNPs debido a la fuerte interacción entre los enlaces tiol-oro permitiendo un fácil manejo, caracterización y funcionalización [40] (Figura 9).

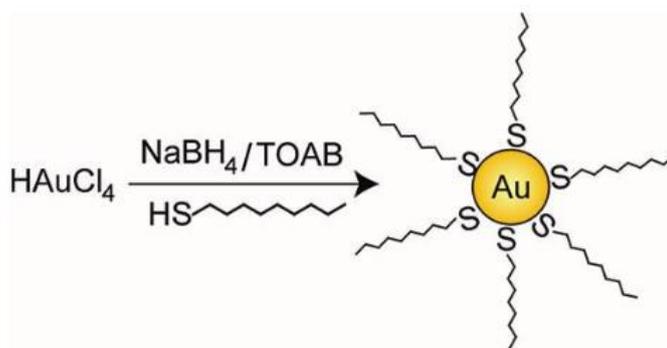


Fig.9 Método Brust-Schiffrin para la síntesis en dos fases de AuNPs por reducción de sales de oro en presencia de liqandos de tiol externos.

1.3.3.3 Método de intercambio de ligandos

Los citratos, tioles u otros ligandos adsorbidos por las AuNPs pueden ser desplazados por tioles a través de una reacción de intercambio de ligando dando lugar a AuNPs mono, di o polifuncionalizadas. Este método consiste en el desplazamiento de los ligandos anclados covalentemente a la superficie de las AuNPs por tioles externos, mediante un proceso de equilibrio químico.

La eficiencia de carga sobre la superficie de las AuNPs se controla a través del tiempo de reacción y la relación de concentración de los ligandos funcionales. Además, la introducción de dos o más ligandos funcionales durante la reacción de intercambio de ligandos puede proporcionar AuNPs protegidas con una monocapa de ligandos mezclados para aplicaciones sinérgicas. Las nuevas uniones de los ligandos a las nanopartículas pueden ser tanto no covalentes como covalentes siendo estas últimas las más utilizadas pues confieren mayor estabilidad a las AuNPs ^[41] (Figura 10).

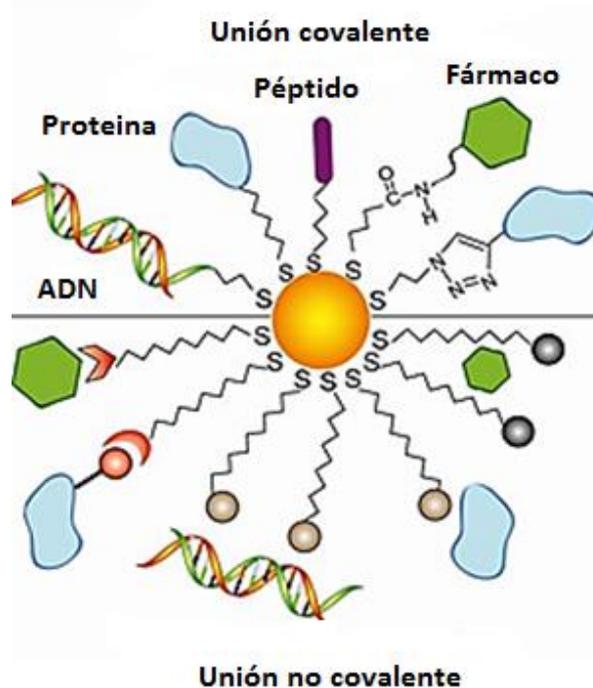


Fig.10 Estrategias de conjugación de AuNPs mediante conjugación covalente y no covalente.

1.3.4 Sistemas sensores a partir de nanoparticulas de oro

La agregación de AuNPs de tamaño apropiado ($d > 3.5 \text{ nm}$) induce la resonancia del plasmon de la superficie de las AuNPs, dando como resultado un cambio de color visible desde el rojo al azul a concentraciones nanomolares ^[42]. El cambio de color durante la agregación AuNPs (o redispersación de un agregado) proporciona una plataforma práctica para la detección colorimétrica de cualquier analito objetivo que desencadene directamente agregación o redispersión de las AuNPs ^[43]. Algunos ejemplos del uso de AuNPs funcionalizadas como sensores colorimétricos se describen a continuación:

1.3.4.1 Detección de iones de metales alcalinos y alcalinotérreos

La detección colorimétrica basada en AuNPs para iones metálicos generalmente requiere la incorporación de agentes quelantes sobre la superficie de las AuNPs. La presencia del ion analito induce la agregación de nanopartículas formando complejos entre partículas. Un buen ejemplo son, las AuNPs funcionalizadas con un éter 15-corona-5 para la detección colorimétrica de iones potasio (K^+). Este sensor mostró un reconocimiento micromolar y una respuesta colorimétrica hacia K^+ incluso en presencia de cationes fisiológicamente importantes, tales como Li^+ , Cs^+ , NH_4^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} y un exceso de Na^{2+} . La agregación de las AuNPs se debe a la formación de un complejo tipo sándwich entre éter 15-corona-5 y el ion potasio (K^+) (Figura 11) ^[44].

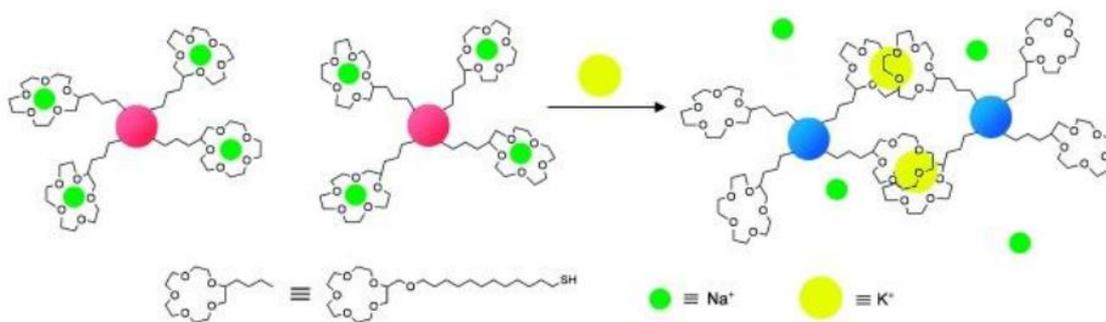


Fig.11 Representación esquemática de la detección colorimétrica de ion potasio (K^+)

1.3.4.2 Detección de aniones

El desarrollo de sistemas de detección de aniones ha requerido de cuantiosos esfuerzos debido a su relación carga/radio más baja que en el caso de los cationes, su sensibilidad a los cambios de pH, sus diversas geometrías y la afinidad de la unión dependiente del disolvente y la selectividad ^[45]. Entre los sistemas que se han logrado desarrollar se pueden mencionar el utilizado por Watanabe ^[46] en el cual las AuNPs se han funcionalizado con tioglucosa para detectar aniones fluoruro en un rango de

concentración relativamente estrecho (20-40 mM) en agua, con alta sensibilidad frente a otros aniones como ser Cl^- , Br^- , I^- , AcO^- y NO_3^- . (**Figura 12**)

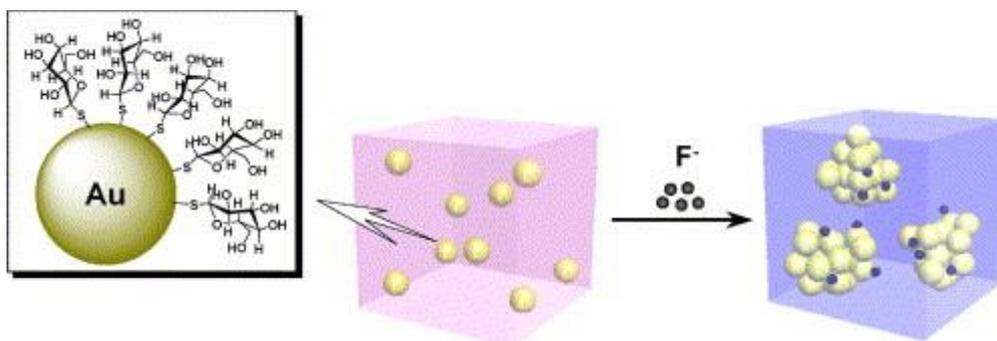


Fig.12 Representación esquemática de la detección colorimétrica de anión fluoruro (F^-)

1.3.4.3 Detección de moléculas neutras

Entre la variedad de sistemas desarrollados para la detección de moléculas neutras podemos mencionar la detección de 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) que es un ejemplo de explosivo nitroaromático. Las AuNPs se funcionalizaron con cisteamina, que se usó tanto como amina primaria como estabilizante para las AuNPs, para facilitar la interacción donador-aceptor entre TNT y cisteamina conduciendo a la agregación, y un cambio en el color de la suspensión a violeta. (**Figura 13**) Este simple método permite la detección de TNT de una manera práctica y sencilla sin la utilización de instrumentos costosos y con un límite de detección bastante significativo entre $5 \cdot 10^{-9}$ M a $5 \cdot 10^{-13}$ M [47].



Fig.13 Representación esquemática de la detección colorimétrica de TNT

2. OBJETIVOS

El presente proyecto de trabajo fin de máster tiene como objetivos:

- ❖ El diseño de un sensor capaz de detectar coloriméricamente la serotonina.
- ❖ Síntesis del sensor colorimétrico basado en AuNPs.
- ❖ Caracterización del sensor colorimétrico mediante la aplicación de diversas técnicas espectrométricas.
- ❖ Determinación de la selectividad y sensibilidad del sensor colorimétrico.

3. DISEÑO DEL SISTEMA SENSOR

Considerando que la serotonina es una hidroxindolamina, ya que contiene en su estructura un grupo hidroxilo y amino (**Figura 14**), para diseñar un sensor adecuado se consideró funcionalizar las nanopartículas con dos ligandos tiolados que reaccionaran o interaccionaran de manera independiente con los dos grupos funcionales presentes en el analito. Estas interacciones darían lugar a una agregación de las AuNPs ya que la serotonina quedaría anclada por ambos grupos funcionales a los ligandos utilizados aumentando con esto la proximidad de las AuNPs y con ello variando la resonancia de plasmón superficial. Esto haría que la absorción se produjera a longitudes de onda mayores, pasando de un color rojo al color azul.

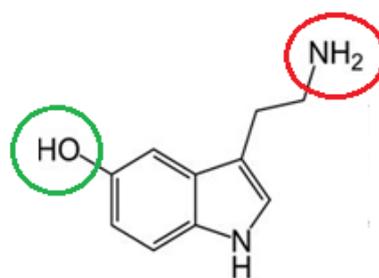


Fig.14 Grupos funcionales Amino (rojo) e Hidroxilo (verde)

Los ligandos que se consideraron para la detección de serotonina fueron los siguientes:

Propionato de ditiobisuccinimidilo (DSP): este compuesto contiene un reactivo ester de N-hidroxisuccinimida (NHS) al final de un espaciador de 8 carbonos. Dicho espaciador posee un enlace disulfuro escindible que permitiría poder funcionalizar las AuNPs mediante el método de intercambio de ligando dando lugar a un enlace covalente Au-S (**Figura 15**). Este compuesto ha sido ampliamente utilizado como un crosslinker ya que reacciona con aminas primarias a pH 7-9 para dar paso a la formación de enlaces amida estables, liberando la N-hidroxisuccinimida como grupo saliente^[48]. Además el DSP ya se había utilizado como ligando para la funcionalización de AuNPs en la detección de dopamina^[49], que al igual que la serotonina, contienen un grupo amino primario terminal.

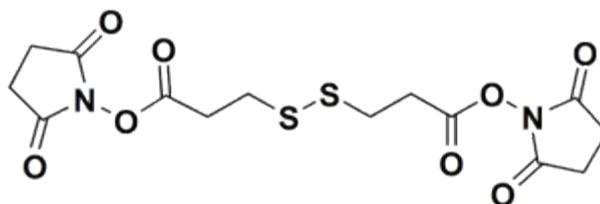


Fig.15 Estructura química de propionato de ditiobisuccinimidilo (DSP)

N-Acetil-L-cisteína (NAC): es una forma estable del aminoácido no esencial L-cisteína (**Figura 16**) que ya había sido empleado como ligando tiolado en la funcionalización de AuNPs para la detección de L-tirosina. Los grupos carboxilo, amino e hidroxilo de la L-tirosina interactuaban con NAC mediante enlaces de hidrógeno e interacciones electrostáticas produciendo de esta manera la agregación de las AuNPs ^[50]. Por lo tanto considerando que al igual que la L-tirosina la serotonina posee un grupo hidroxilo que podría interactuar con NAC, se optó por utilizar esta molécula como ligando ya que además serviría como estabilizador de las AuNPs.

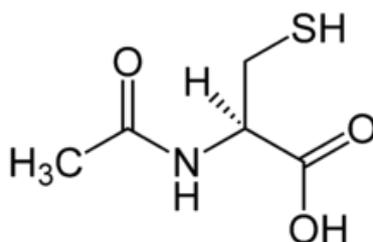


Fig.16 Estructura química de N-Acetil-L-cisteína (NAC)

Una vez seleccionados los ligandos, se decidió realizar una difuncionalización de las nanopartículas, en donde una sola AuNP llevara anclados ambos ligandos, de esta manera el proceso de síntesis se simplificaría al realizar una sola síntesis. Si se hubiera optado por monofuncionalizarlas con cada uno de los ligandos se tendrían que realizar dos síntesis, además de optimizar la síntesis la detección también es más práctica ya que solo se necesitaría la adición de una única disolución de AuNPs. En la (**Figura 17**) se puede ver el esquema de la doble funcionalización de las AuNPs agregadas y no agregadas.

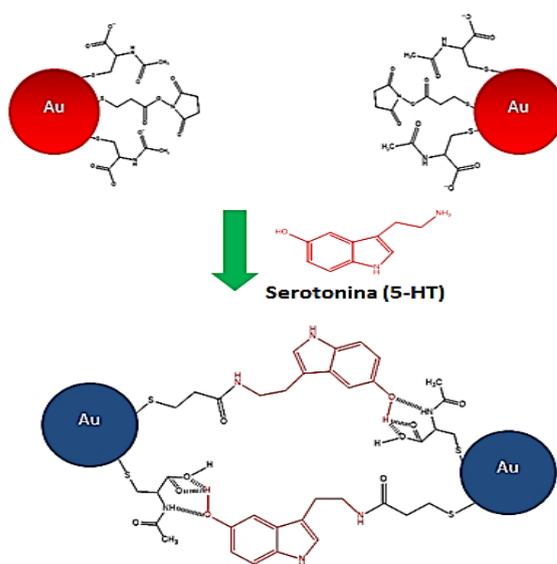


Fig.17 Esquema del diseño y funcionamiento del sensor

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Síntesis de AuNPs

Las AuNPs de aproximadamente 15nm de diámetro se sintetizaron utilizando el método de Turkevich-Frens con algunas modificaciones, empleando citrato como estabilizador y reductor.

La evolución de la reacción puede seguirse a simple vista debido al cambio de color que ésta experimenta (**Figura 18**). En un principio la solución de oro es de un color amarillo pálido (**A**), 5-20 segundos después de la adición del citrato la solución comienza a tornarse oscura (**B y C**), hasta tomar un color rojo vino el cual indica la formación de las AuNPs (**D**).

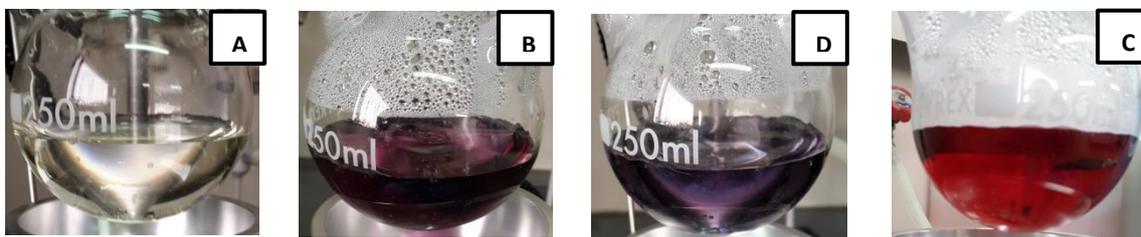


Fig.18 Evolución de la reacción de síntesis de AuNPs

El mecanismo propuesto para esta síntesis en donde los iones citrato actúan tanto como estabilizador y reductor es el siguiente:



El Au^{+3} en disolución acuosa se reduce a átomos de oro neutros tras la adición de citrato. La solución se sobresatura y el oro gradualmente comienza a precipitar en forma de partículas sub-manométricas produciéndose el oscurecimiento de la solución. Las partículas pequeñas se van agrupando para formar partículas más grandes. Luego, los iones citrato cubren la superficie de las partículas protegiéndolas de la agregación adicional gracias a la repulsión electrostática causada por los grupos carboxilo. Una vez que se forman las partículas, la solución toma el color rojo característico. El proceso se ilustra en la siguiente imagen ^[51] (**Figura 19**).

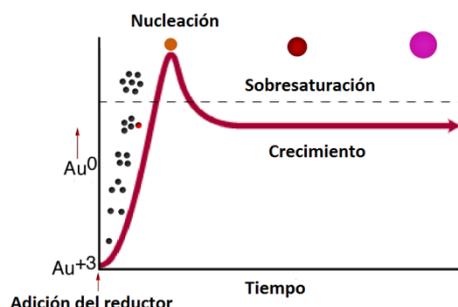


Fig.19 Diagrama del proceso de nucleación

4.2 Funcionalización de AuNPs

La modificación de la superficie de AuNPs se llevó a cabo mediante el método de intercambio de ligando, de manera que el DSP y NAC desplazan la monocapa de citrato de que recubre las AuNPs.

4.3 Caracterización del sensor colorimétrico

Una vez sintetizado el sensor colorimétrico se procedió a la caracterización del mismo para poder localizar la banda de plasmón de superficie mediante espectrofotometría de UV-Vis, así como para determinar el diámetro y la concentración de las AuNPs mediante TEM y el radio hidrodinámico mediante DLS y análisis de potencial Z.

4.3.1 Localización de la banda de resonancia del plasmón de superficie

Al incidir sobre una nanopartículas metálica una luz de una determinada longitud de onda, se puede producir un acoplamiento entre la frecuencia de la radiación incidente y la frecuencia de oscilación del plasma en la partícula y es esto lo que se conoce como resonancia de plasmón de superficie. Por ello, para poder localizar la longitud de onda a la cual se produce esa resonancia de plasmones de las AuNPs se realizó una espectrofotometría de UV-Vis (**Figura 20**). El espectro obtenido muestra el máximo de absorción a una longitud de onda de 521 nm que se encuentra dentro del rango del visible, siendo esto característico de AuNPs esféricas de entre 15-20 nm de diámetro, esto es debido a que a medida que el diámetro aumenta el máximo de absorción de la banda de plasmón de superficie se desplaza hacia longitudes de onda mayores.

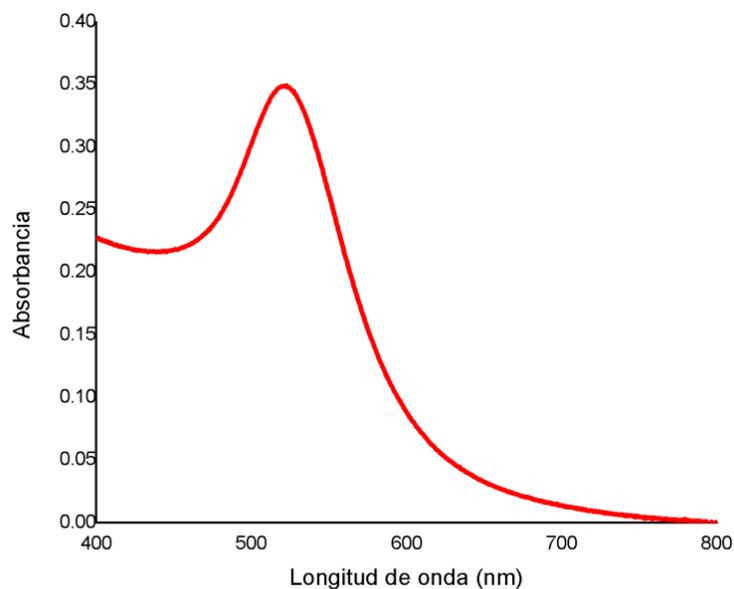


Fig.20 Espectro de absorción de la banda de resonancia de plamón superficial de las AuNPs

4.3.2 Determinación del diámetro de AuNPs

Para la determinación del diámetro de las AuNPs se aplicaron dos técnicas de análisis TEM para medir el tamaño de partícula y DLS para medir el radio hidrodinámico. (Figura 21)

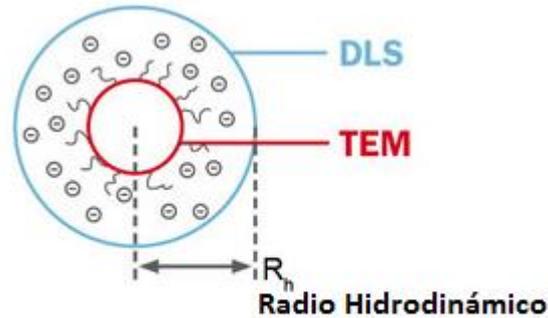


Fig.21 Esquema del diámetro medido de una nanopartículas mediante TEM y DLS.

La primera, el Microscopio Electrónico de Transmisión comúnmente denominado (TEM) por sus siglas en inglés, es un microscopio que utiliza un haz de electrones para visualizar un objeto debido a que la potencia amplificadora de un microscopio óptico está limitada por la longitud de onda de la luz visible. Mediante las imágenes obtenidas por este microscopio se puede observar la forma de las AuNPs y medir su diámetro. En la (Figura 22) se puede ver a un aumento de 40K, la distribución de las AuNPs y su forma esférica.

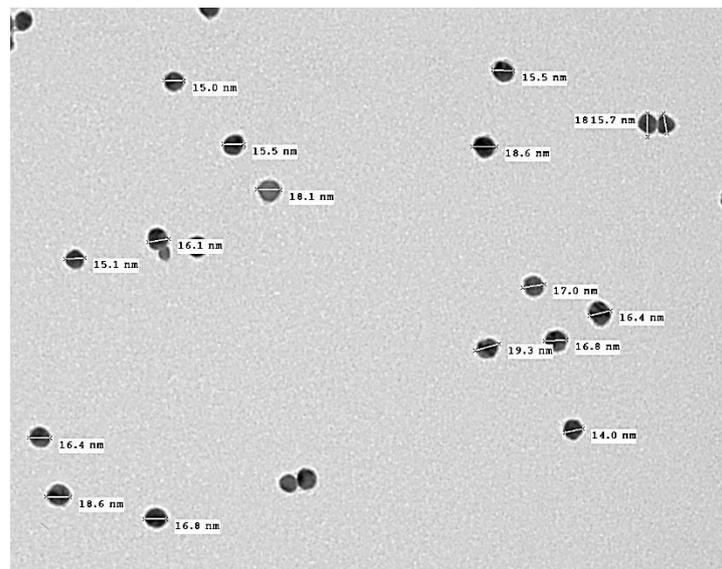


Fig.22 Imagen de TEM 40k de AuNPs para la determinación de su diámetro.

Utilizando imágenes de TEM de diferentes zonas se midió el diámetro de las AuNPs y se realizó un histograma (**Figura 23**) para poder establecer una distribución de tamaño, en donde se observa claramente que el tamaño con mayor frecuencia es el de 15 nm, con una media de 15.52 nm \pm 1.43 nm.

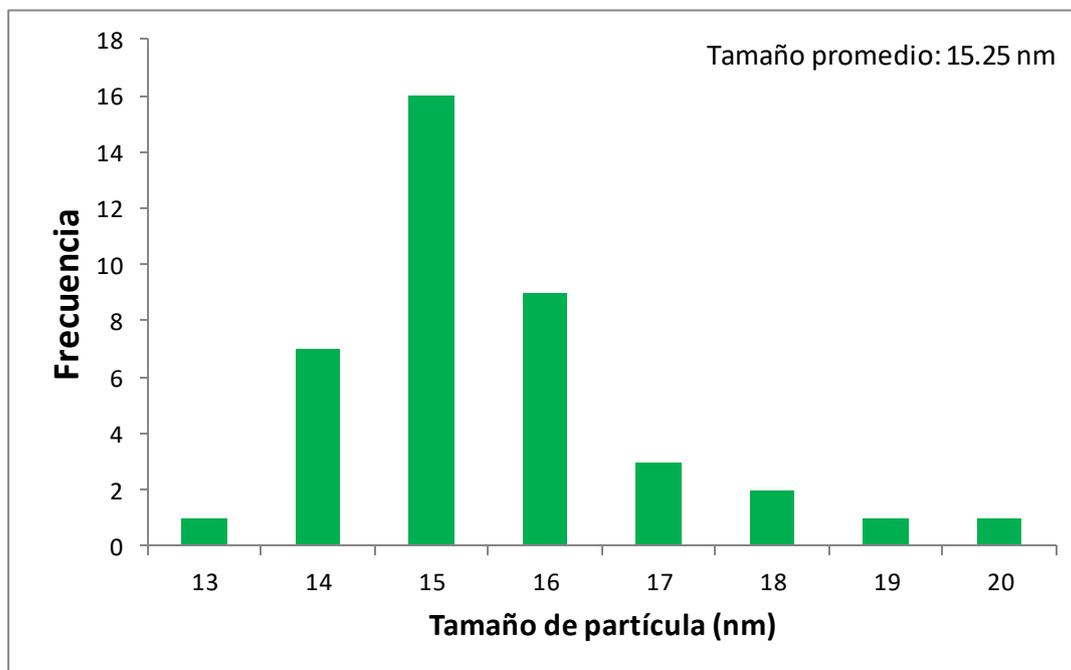


Fig.23 Histograma de distribución de tamaño de AuNPs mediante TEM

Cuando un medio líquido mueve una partícula dispersa, la mayoría de veces se adhiere una capa eléctrica dipolar a su superficie. Debido a que esta capa influye en el movimiento de la partícula, en la dispersión de luz dinámica (DLS), el diámetro medido de la partícula, se conoce como radio hidrodinámico por lo tanto la segunda técnica de análisis utilizada fue la Dispersión de Luz Dinámica, DLS por sus siglas en inglés. Esta es una técnica físico-química empleada para la determinación de la distribución de tamaños de partículas en suspensión. La luz láser al alcanzar las numerosas partículas que hay en una suspensión, se dispersa en todas las direcciones posibles. Si se separa una dirección, los haces de luz dispersados por distintas partículas interfieren entre sí y se obtiene una intensidad de dispersión determinada. Como consecuencia del movimiento browniano las posiciones relativas de las partículas varían constantemente entre sí, cosa que también provoca cambios en las condiciones de interferencia y en la propia intensidad de dispersión. Si las partículas se mueven rápidamente (partículas pequeñas), también se acelera la variación de la intensidad de dispersión. Por el contrario, las partículas lentas (grandes) llevan a variaciones más lentas ^[52].

En la siguiente (**Figura 24**) se puede observar la gráfica de distribución de tamaño por número de AuNPs mediante la cual se obtuvo que el tamaño del diámetro promedio de cada AuNPs era de $28 \text{ nm} \pm 5 \text{ nm}$

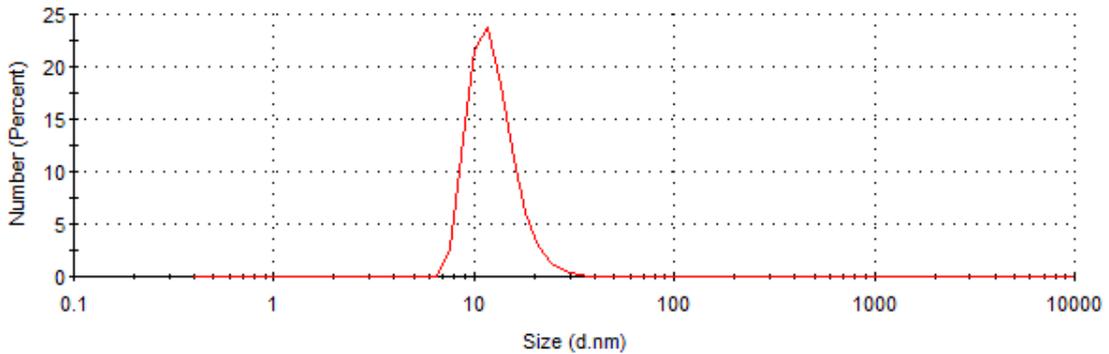


Fig.24 Gráfica de distribución de tamaño por número de AuNPs mediante DLS

El tamaño promedio obtenido por DLS es mayor que el obtenido por TEM y esto se debe a que el DLS es una técnica que evalúa la forma hidratada de la AuNP por consiguiente es de esperar que el diámetro obtenido sea mayor.

4.3.3 Determinación de la concentración de AuNPs

Liu y colaboradores ^[53] encontraron una relación lineal entre el logaritmo del coeficiente de extinción y el logaritmo del tamaño del diámetro de las nanopartículas (**Figura 25**). Este hallazgo también está de acuerdo con la teoría de Mie, así como un estudio informado por El-Sayed y su equipo ^[54].

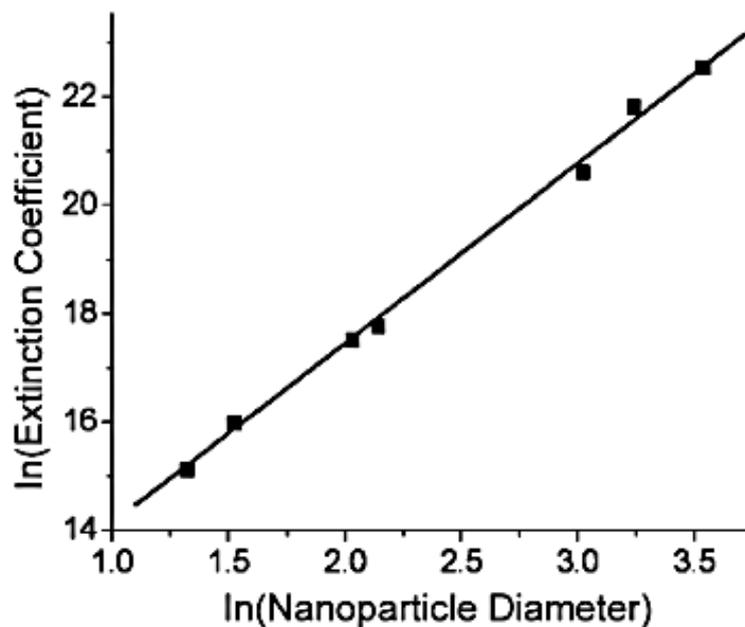


Fig.25. Curva de ajuste lineal el logaritmo del coeficiente de extinción y el logaritmo del tamaño del diámetro de las nanopartículas

Esta relación puede expresarse como

$$\ln \varepsilon = 3.3211 \ln D + 10.80505 \text{ (Ecuación 2)}$$

Donde ε es el coeficiente de extinción molar que se expresa en $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y D es el diámetro expresado en nm, por lo tanto si se conoce el diámetro de las AuNPs es posible calcular el coeficiente de extinción, por lo que considerando el diámetro estimado mediante TEM 15.52 nm y sustituyendo en **(Ecuación 2)** se obtuvo un coeficiente de extinción molar de $3.97 \times 10^8 M^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Una vez calculado el coeficiente de extinción molar y tomando en cuenta el máximo de absorbancia obtenido por UV-Vis de 0.3468, fue posible determinar la concentración de nanopartículas obtenida en esta síntesis. Lo que se hizo aplicando la ley de Lambert-Beer según la cual:

$$A = -\text{Log} \left(\frac{I_T}{I_0} \right) = \varepsilon \cdot C \cdot L \text{ (Ecuación 3)}$$

Dónde: A = al máximo de absorbancia

I_T = Intensidad de la luz transmitida

I_0 = Intensidad de la luz incidente

ε = Coeficiente de extinción molar $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$

C = Concentración de la muestra (M)

L = Longitud del paso óptico que contiene la muestra (cm)

Una vez introducidos los valores en la **(Ecuación 3)** se obtuvo una concentración de AuNPs de 8.74×10^{-10} M. Esto quiere decir que por litro de disolución hay 5.26×10^{14} AuNPs.

4.4 Comportamiento óptico del sensor colorimétrico

4.4.1 En presencia de serotonina

Para analizar el comportamiento óptico del sensor colorimétrico se utilizaron diferentes técnicas de análisis entre ellas UV-Vis, TEM, DLS, Potencial Z ya que cada una de ellas nos brindó información significativa sobre la interacción con el analito en cuestión.

4.4.1.1 UV-Vis

Mediante este espectro (**Figura 26**) podemos observar que, en presencia de 100 μM de serotonina (5-HT) se produce un desplazamiento de la banda de resonancia de plasmón hacia longitudes de onda mayores, desplazándose de 521 nm a 605 nm (cambiando de un color rojo vino a un azul pálido). Este hecho indica que la presencia de serotonina en el medio produce una agregación de las AuNPs, dando lugar a una variación en su banda de plasmón ya que uno de los factores que influye en su desplazamiento es la distancia entre nanoparticulas, pues cuanto más cercanas se encuentren mayores serán las interacciones que ejercen entre ellas.

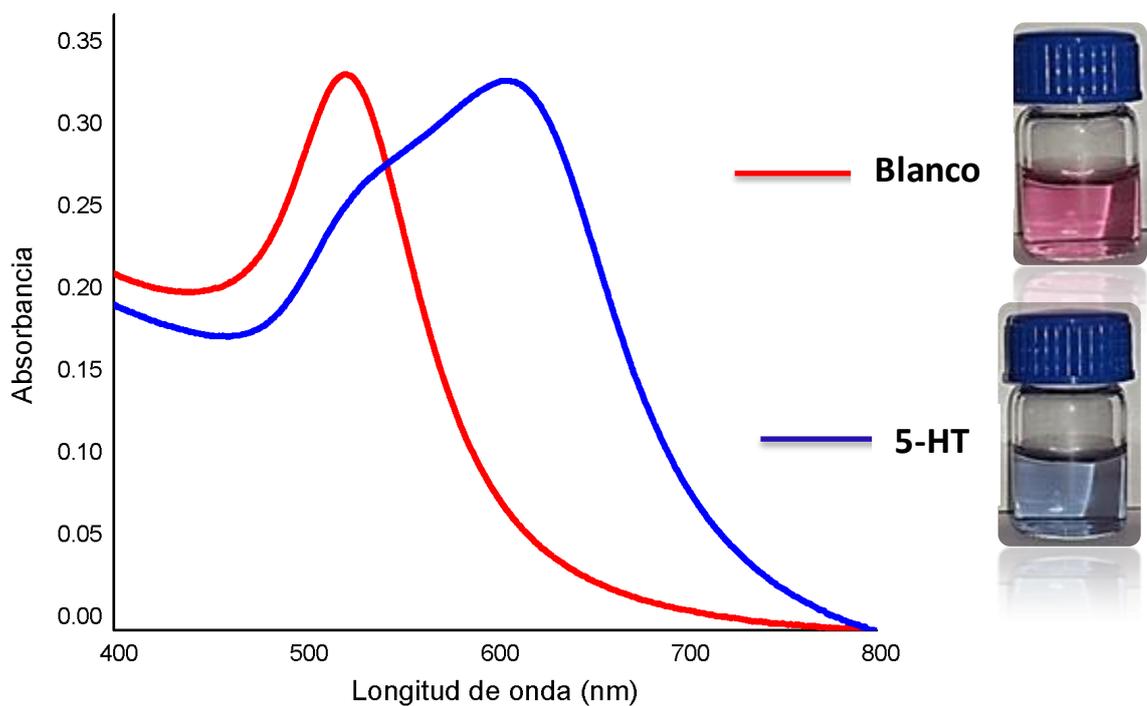


Fig.26. Espectro de absorción de la banda de plasmón en presencia de serotonina (azul) y en ausencia de serotonina (rojo)

4.4.1.2 TEM

Mediante imágenes de TEM a 40K podemos observar como varía la distribución de las nanopartículas en presencia de 100 μM de serotonina (5-HT). En la (**Figura 27**), en la imagen **A**) que no contiene serotonina se observan las AuNPs muy dispersas. En cambio en la imagen **B**) en presencia de serotonina se ve claramente las AuNPs formando agregados producto de la interacción y reacción con el analito.

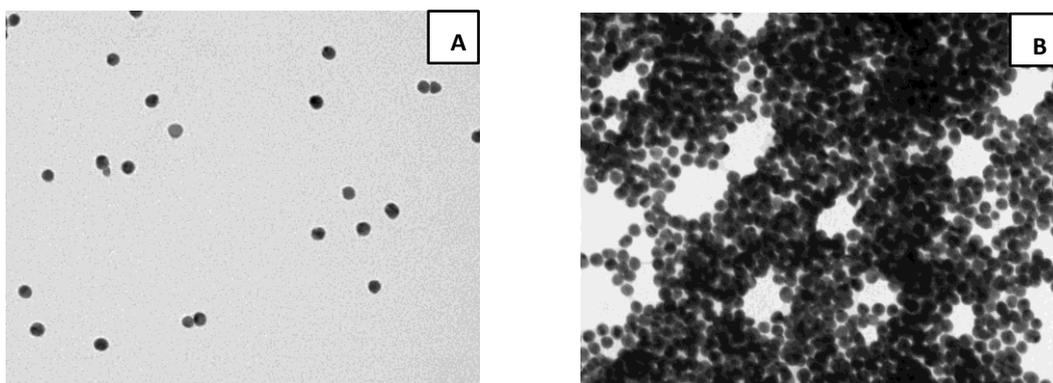


Fig.27. Imágenes de TEM 40k, A) sin serotonina y B) con serotonina

4.4.1.3 DLS

Mediante esta técnica se pudo evaluar la variación del diámetro del radio hidrodinámico entre las AuNPs sin serotonina y con serotonina, como se puede ver en la (**Figura 28**) en rojo el tamaño del radio hidrodinámico sin serotonina que es de 28.6 nm y en verde el radio hidrodinámico con serotonina que se ha incrementado hasta 572.3 nm y esto es debido a la formación de agregados.

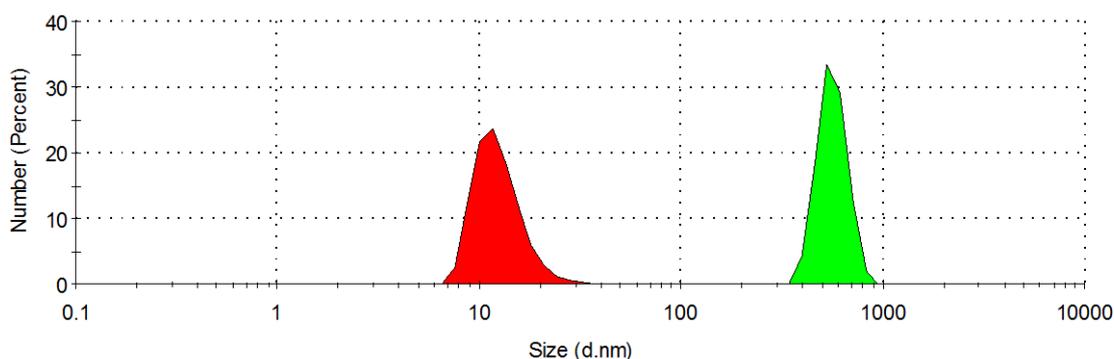


Fig.28. Radio hidrodinámico, sin serotonina (rojo) y con serotonina (verde)

Además el análisis por DLS nos permite obtener la función de autocorrelación que describe la velocidad con que cambia la señal de medida en la dispersión de luz dinámica. Para ello, solo se tiene que comparar la intensidad de la luz dispersa medida por el detector en un momento determinado y la intensidad medida poco después. Si la intensidad ha cambiado poco, significa que hay un nivel alto de autocorrelación, mientras que un cambio grande en la intensidad indica poca correlación. Además, las

comparaciones no se realizan solo con pequeños desfases de tiempo, sino también para varios intervalos de tiempo cada vez más grandes. Si todo este proceso se repite de manera continuada, se obtiene la función de autocorrelación, que, por medio de los procesos matemáticos adecuados, permite determinar el coeficiente de difusión y, en consecuencia, el tamaño de las partículas (**Figura 29**) ^[55].

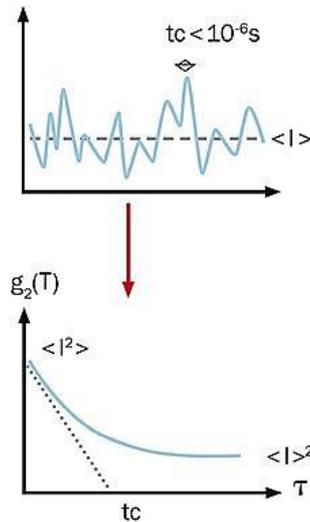


Fig.29. Esquema de gráfica de correlación mediante DLS

A medida que aumenta el diámetro de las AuNPs la velocidad con que cambia la señal de medida en la dispersión de luz dinámica disminuye, debido a que partículas más pequeñas se moverán con mayor velocidad que partículas más grandes. Esto se puede evidenciar en la siguiente gráfica de correlación (**Figura 30**) en la cual en rojo podemos ver que las AuNPs sin serotonina presentan un decaimiento en tiempos menores comparado con las AuNPs con serotonina en verde, cuyo tiempo de decaimiento es mayor. Esto es debido a la agregación de las AuNPs debido a la serotonina, lo que hace que el movimiento de las AuNPs sea cada vez más lento.

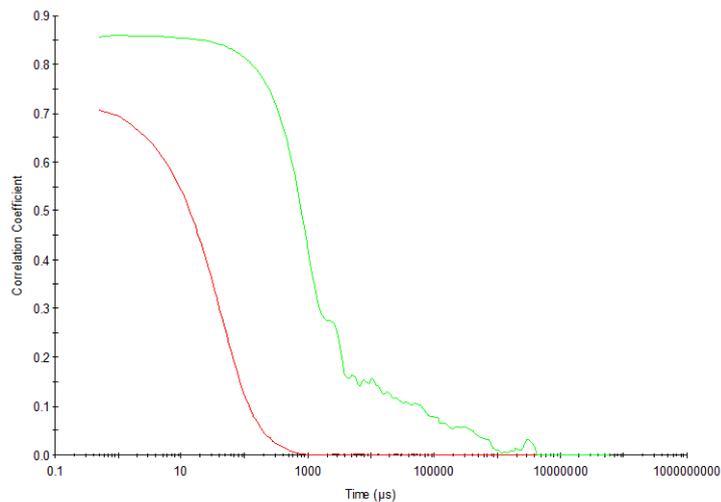


Fig.30. Gráfica de correlación mediante DLS, sin serotonina (rojo), con serotonina (verde)

4.4.1.4 Potencial Z

El potencial Z es una medida de la magnitud de la repulsión o atracción entre las partículas. Su medida proporciona una idea detallada de los mecanismos de dispersión y es la clave del control de dispersión electrostático, ya que es la diferencia de potencial entre el medio del grano y la doble capa unida a la nanopartícula. Cuando se aplica un campo eléctrico a partículas en suspensión, las partículas se mueven hacia un electrodo opuesto a su carga superficial. Para determinar su velocidad, las partículas se irradian con una luz láser y se detecta la luz difusa que emiten. Dado que la velocidad es proporcional a la cantidad de carga de las partículas, se puede estimar el potencial zeta.

En la **(Figura 31)** observamos las AuNPs sin serotonina que tienen un Potencial Z de -17.8 mV lo que indica que las AuNPs son estables. Ahora en **(Figura 32)** las AuNPs en presencia de serotonina el Potencial Z es de -6.14 mV esto sugiere que son menos estables en el medio dado que al formar agregados precipitan. Estos datos confirman una vez más que el agregamiento de las AuNPs se debe al reconocimiento de la serotonina.

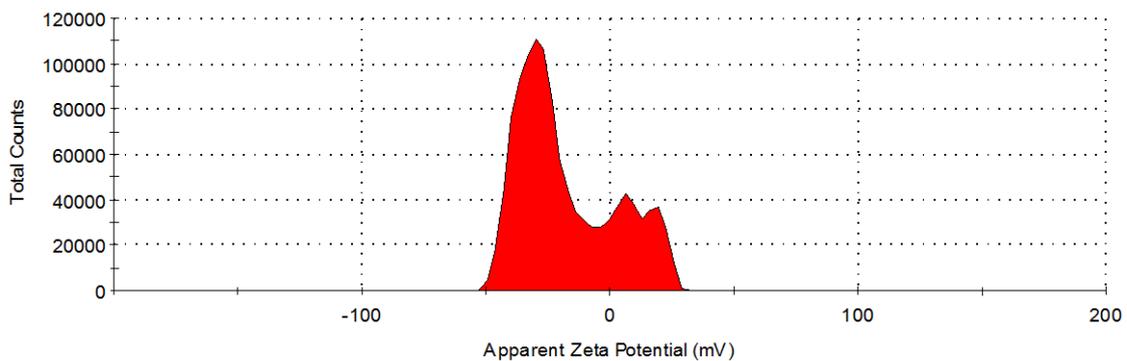


Fig.31. potencial Z de AuNPs sin serotonina

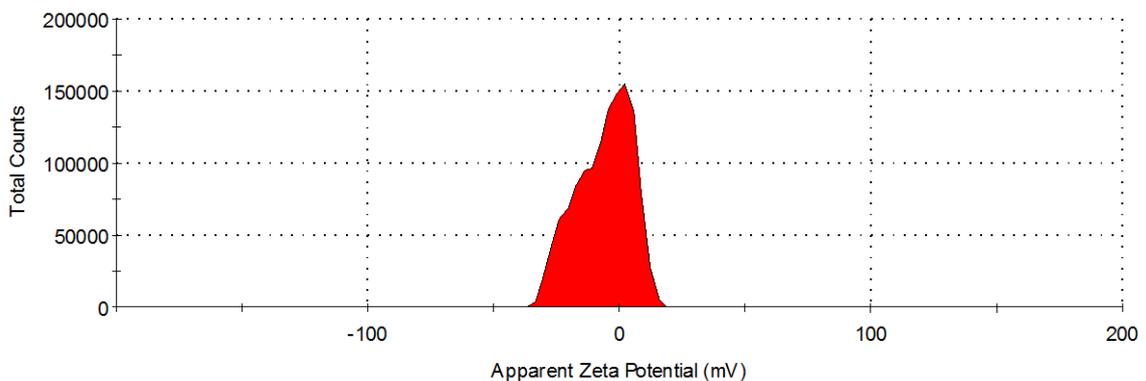


Fig.32. potencial Z de AuNPs con serotonina

4.4.2 Evaluación de la selectividad del sensor

Para confirmar la selectividad del sensor colorimétrico, se evaluó la respuesta del mismo en presencia de otros neurotransmisores análogos a la serotonina.

La selectividad se evaluó mediante UV-Vis con la intención de observar si la banda de resonancia de plasmón presentaba alguna modificación en presencia de 500 μM de los siguientes interferentes: dopamina (DA), epinefrina (Epy), norepinefrina (NE), L-tirosina (L-Tyr), ácido gamma-aminobutírico (GABA), ácido úrico (A.U), ácido oxálico (A.O), ácido aspártico (A.A) y ácido glutámico (A.G).

En el espectro de UV-Vis (**Figura 33**) se puede ver como la banda de absorción de resonancia de plasmón de las AuNPs no se desplaza en contraste con lo que ocurre en presencia de serotonina donde si se observa como la banda se desplaza hacia el rojo. Este cambio es notable a simple vista (**Figura 34**) en donde vemos como solo la disolución que contiene serotonina cambia del rojo vino a un azul pálido, en cambio las disoluciones de las otras moléculas permanecen de color rojo vino.

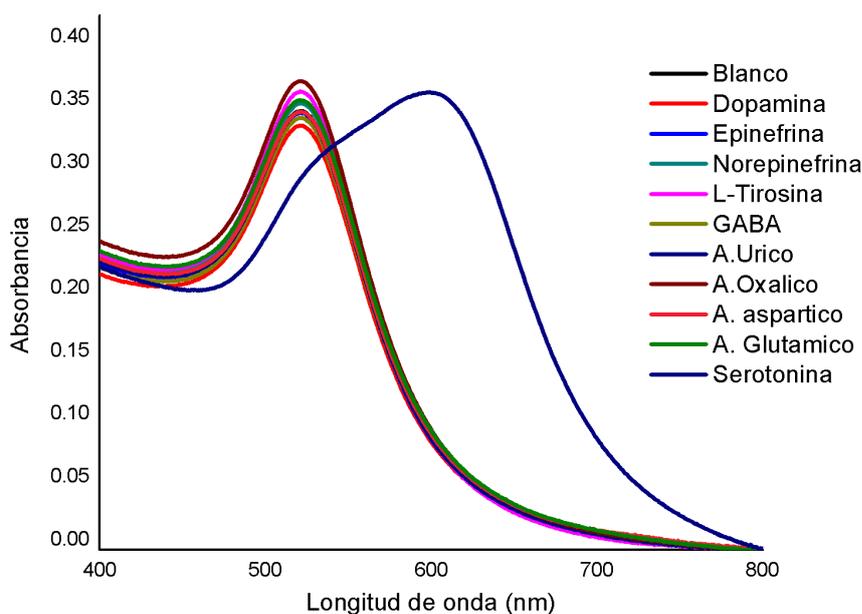


Fig.33. Espectro de absorción de la banda de plasmón de AuNPs en presencia de serotonina e interferentes.



Fig.34. Disoluciones de AuNPs con los diferentes interferentes 1) dopamina (DA), 2) epinefrina (Epy), 3) norepinefrina (NE), 4) L-tirosina (L-Tyr), 5) ácido gamma-aminobutírico (GABA), 6) ácido úrico (A.U), 7) ácido oxálico (A.O), 8) ácido aspártico (A.A), 9) serotonina (5-HT), 10) ácido glutámico (A.G) y 11) blanco.

En el gráfico (**Figura 35**) se representa la relación de intensidad de absorbancia A_{591}/A_{521} de cada uno de los interferentes y se observa que el valor es próximo a cero, en comparación con la significativa intensidad presentada por la serotonina, además se presenta la absorbancia de todos los interferentes juntos sin serotonina y con serotonina lo que permite observar que solo la adición de serotonina genera un cambio en la banda de absorción de plasmón, confirmando la selectividad del sensor diseñado.

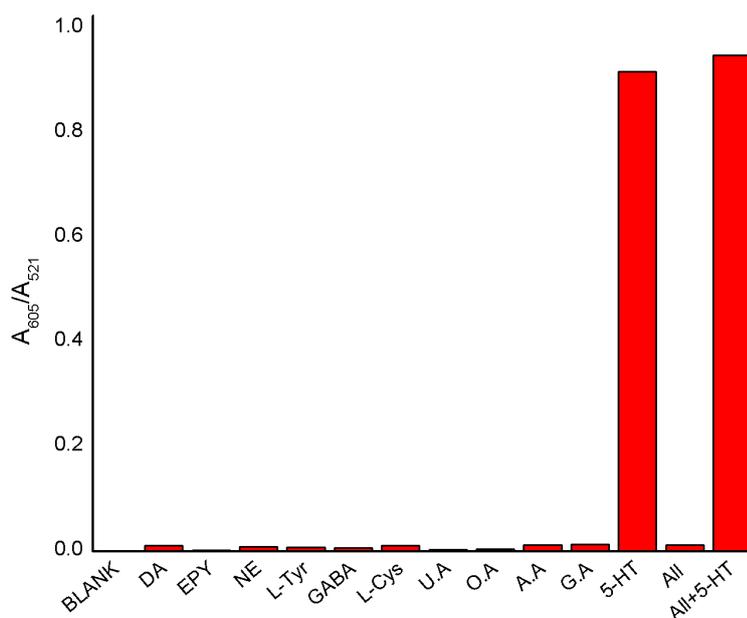


Fig.35. Gráfico de barras de la intensidad de absorbancia de AuNPs en presencia de los interferentes y la serotonina.

4.5 Caracterización de la respuesta cromogénica

Una vez comprobada la selectividad del sensor se decidió estudiar la sensibilidad de este. Para ello se monitorizaron los cambios en UV-Vis, confirmándolo mediante imágenes de TEM.

4.5.1 UV-Vis

Como se puede observar (**Figura 36**), la adición de cantidades crecientes de serotonina produjo un progresivo decaimiento de la banda de absorción de plasmón a 521 nm junto con un simultáneo crecimiento de una nueva banda de absorción de plasmón situada a 605 nm, el cambio gradual de color de las disoluciones de rojo a azul puede ser observado a simple vista (**Figura 37**) a concentraciones por debajo de los 25 μM .

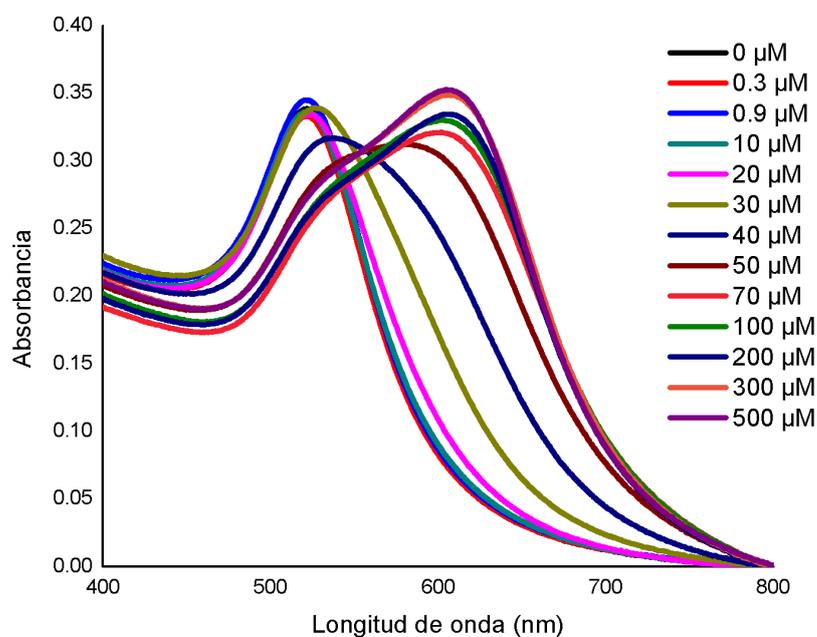


Fig.36. Espectro de absorción de AuNPs a diferentes concentraciones de serotonina.



Fig.37. Disoluciones de AuNPs en presencia de diferentes concentraciones de serotonina, 1) 0 μM , 2) 30 μM , 3) 40 μM , 4) 50 μM , 5) 70 μM , 6) 100 μM , 7) 200 μM 8) 300 μM 9) 500 μM

La variación de la relación de intensidad de absorbancia de AuNPs a 591 nm y 605 nm (A_{605}/A_{521}) frente a la concentración de serotonina (5-HT) se representa en la (Figura 38) donde se observa un significativo aumento de la relación (A_{605}/A_{521}) a medida que la cantidad de serotonina adicionada aumenta. Podemos ver que entre 20 μM y 70 μM el incremento es aún mayor y al llegar a concentraciones sobre los 70 μM la respuesta del sensor varía muy poco hasta llegar a saturarse.

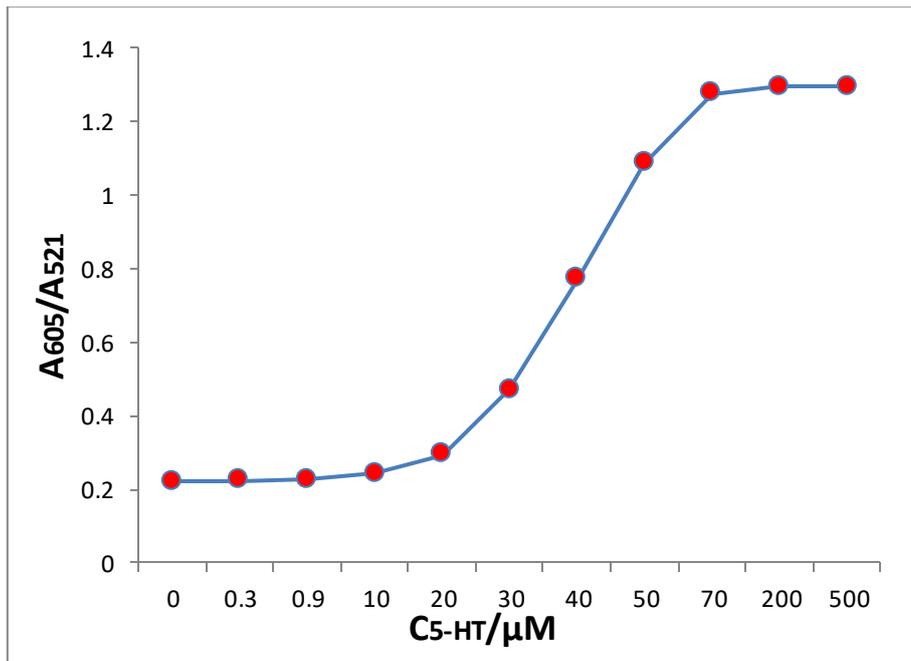


Fig.38. Variación de la relación de intensidad de absorbancia de AuNPs a 591 nm y 521 nm (A_{591}/A_{521}) frente a la concentración de serotonina (5-HT)

4.5.2 TEM

Imágenes de TEM a 25K confirman la agregación de AuNPs a medida que se adicionan cantidades crecientes de serotonina. Se observa como la formación de agregados son los responsables del cambio de color de la disolución de rojo-violeta-azul. (Figura 39)

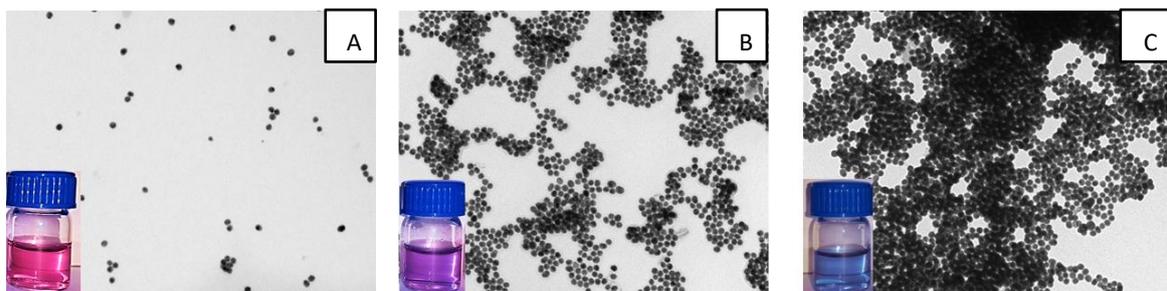


Fig.39 Imágenes de TEM 25K de AuNPs en presencia de A) 0 μM , B) 40 μM y C) 150 μM de serotonina.

4.5.3 Determinación del límite de detección

Una vez evidenciado el comportamiento óptico del sensor, se determinó la sensibilidad del mismo a través del cálculo del Límite de Detección (LOD), mediante el cual determinaremos la concentración mínima de serotonina que puede ser detectada con fiabilidad.

El LOD lo obtendremos de la relación de intensidad de absorbancia de AuNPs a 605 nm y 521 nm (A_{605}/A_{521}) frente a la concentración de serotonina (5-HT) (**Figura 40**). LOD fue calculado utilizando la (**Ecuación 4**), donde $K=3$; S_b es la derivación estándar del blanco que en nuestro caso fue (0.000795235) y m es la pendiente de la recta de calibración ^[56].

$$LOD = K \cdot \frac{S_b}{m} \quad (\text{Ecuación 4})$$

El límite de detección obtenido fue de 300 nM, lo cual nos indica que el sensor colorimétrico es capaz de detectar concentraciones por encima de 3×10^{-7} M.

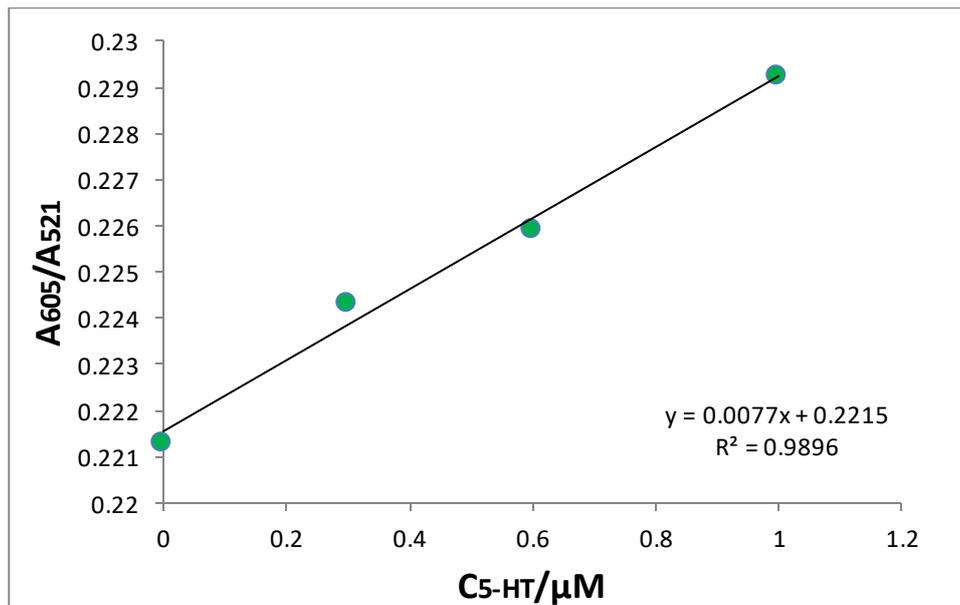


Fig.40 Relación lineal de la intensidad de absorción de AuNPs a 605 nm y 521 nm (A_{605}/A_{521}) frente a la concentración de serotonina (5-HT)

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1 Procedimientos generales

Todos los reactivos utilizados eran comercialmente accesibles y fueron usados sin purificación. Los espectros de absorción UV / Vis se registraron en una cubeta de cuarzo de 1 cm de longitud de paso óptico con un espectrofotómetro Shimadzu UV-2101PC. Todas las medidas se realizaron a 293 K (termostato). Se midieron los potenciales de Zeta y radio hidrodinámico con un Zetasizer Malvern ZS tres veces en 10-25 Ciclos. Las imágenes electrónicas se obtuvieron con un JEOL-1010 Microscopio electrónico de transmisión que funciona a 100 kV.

5.2 Procedimiento experimental y síntesis del sensor colorimétrico

5.2.1 Síntesis de AuNPs

Se pesaron 8.64 mg de ácido tetracloroáurico (III) (HAuCl_4) y se disolvieron en 95 mL de agua desionizada, (0.23mM). Se calentó a 100 °C y se llevó a reflujo en un matraz de fondo redondo de tres bocas de 250 ml bajo agitación magnética.

Al llegar al punto de ebullición se adiciona 20 mg de citrato de sodio, 13.61mM, disueltos en 5 mL de agua. Se deja agitando aproximadamente 15 minutos hasta que la disolución tenga un color rojo característico de las nanopartículas. Seguidamente se deja agitando por 1 hora a temperatura ambiente.

5.2.2 Purificación de AuNPs

Después de 1 hora en agitación a temperatura ambiente, se purificaron utilizando filtros de 200 μm para eliminar posibles agregados que se hayan formado durante el proceso de nucleación u otras impurezas. (**Figura 21**)



Fig.41 Purificación de AuNPs

5.2.3 Funcionalización de AuNPs

A temperatura ambiente se adicionan a 95 mL de AuNPs previamente preparadas a 190 μ L de una solución 2mM de propionato de ditiobisuccinimidilo (DSP) y N-Acetil-L-cisteína (NAC). La reacción se dejó agitando durante 1 hora.

Seguidamente las AuNPs se centrifugaron 10 min a 10999 rpm, se decantó el sobrenadante y se re-disolvieron en agua.

5.3 Preparación de disoluciones UV-Vis

Para los experimentos de espectroscopia se prepararon disoluciones de serotonina a diferentes concentraciones partiendo de una disolución a 1mM, estas disoluciones se prepararon en tampón Tris pH 7 a temperatura ambiente, seguidamente se adicionan 500 μ L de cada una de las disoluciones de serotonina a 500 μ L de AuNPs de manera individual, es decir por cada 500 μ L de AuNPs se agregaron 500 μ L de una disolución de serotonina de concentración conocida, quedando un volumen final de 1 mL. Tiempo de incubación de 3 minutos.

6. CONCLUSIONES

En el presente proyecto se ha diseñado, evaluado y sintetizado un nuevo sensor colorimétrico basado en el uso de nanopartículas de oro para la detección de serotonina un neurotransmisor encargado de la regulación de diversas funciones como el sueño, el estado de ánimo y vinculado con el desarrollo de patologías psiquiátricas y tumores carcinoides. Hasta el momento no se había desarrollado ningún método de detección colorimétrico que permitiera detectar selectivamente este neurotransmisor, por lo que aprovechando las propiedades ópticas de las nanopartículas de oro se diseñó un sensor difuncionalizando la superficie de las nanopartículas con DSP Y NAC ya que estos ligandos reconocen los grupos hidroxilo y amino de la serotonina respectivamente.

Una vez sintetizado el sensor se caracterizó por técnicas de, espectroscopía UV-visible, Dispersión Dinámica de Luz (DLS), microscopio electrónico de transmisión (TEM) y Potencial Z. Se encontró que en presencia de serotonina la banda de absorción de plasmón de las AuNPs se desplazaba de una longitud de onda de 521nm a una de 605nm, debido a la agregación de las mismas al interactuar con la serotonina. Esta variación produce el cambio del color rojo característico de las AuNPs a un color azul pálido. Esta agregación fue confirmada por imágenes de TEM en donde se observó cómo se producía la agregación de las AuNPs, comprobando por DLS el aumento de su radio hidrodinámico y la disminución del potencial Z. Se observó por UV-Vis y TEM que a medida que aumentaba la concentración de serotonina la agregación de las AuNPs era cada vez mayor.

La selectividad del sensor fue evaluada mediante UV-Vis utilizando otros neurotransmisores análogos, que no dieron lugar a agregación ya que la banda de absorción de plasmón no sufrió cambios significativos. Este hecho demostró que en un medio donde se encontrarán estos neurotransmisores el sensor podría reconocer la serotonina sin que estos interfirieran.

El nuevo sensor sintetizado presentó límites de detección en el orden de 300 nM. En conclusión, la sonda molecular presentó una alta selectividad, bajos límites de detección y una respuesta capaz de ser detectada a simple vista haciéndola apropiada para la detección colorimétrica de serotonina de una manera rápida, barata, efectiva y sencilla en medio acuoso.

Como futuras líneas de trabajo que abre este proyecto, habría que mencionar que sería muy interesante poder evaluar la respuesta del sensor en fluidos corporales para poder aplicarlo al diagnóstico de diversas patologías.

7. REFERENCIAS

- [1] Costa, M., Furness, J. B., Cuello, A. C., Verhofstad, A. A. J., Steinbusch, H. W. J., & Elde, R. P. (1982). *Neurons with 5-hydroxytryptamine-like immunoreactivity in the enteric nervous system: their visualization and reactions to drug treatment*. *Neuroscience*, 7(2), 351-363.
- [2] Barter, R., & Everson Pearse, A. G. (1955). *Mammalian enterochromaffin cells as the source of serotonin (5-hydroxytryptamine)*. *The Journal of Pathology*, 69(1), 25-31.
- [3] Lauder, J. M., & Krebs, H. (1978). *Serotonin as a differentiation signal in early neurogenesis*. *Developmental neuroscience*, 1(1), 15-30.
- [4] Racké, K., & Schwörer, H. (1991). *Regulation of serotonin release from the intestinal mucosa*. *Pharmacological research*, 23(1), 13-25.
- [5] Ruhe, H. G., Mason, N. S., & Schene, A. H. (2007). *Mood is indirectly related to serotonin, norepinephrine and dopamine levels in humans: a meta-analysis of monoamine depletion studies*. *Molecular Psychiatry*, 12(4), 331-331.
- [6] Saba, S. R., & Mason, R. G. (1974). *Studies of an activity from endothelial cells that inhibits platelet aggregation, serotonin release, and clot retraction*. *Thrombosis research*, 5(6), 747-757.
- [7] Levine, M. E., Chillas, J. C., Stern, R. M., & Knox, G. W. (2000). *The effects of serotonin (5-HT₃) receptor antagonists on gastric tachyarrhythmia and the symptoms of motion sickness*. *Aviation, space, and environmental medicine*, 71(11), 1111-1114.
- [8] Mödder, U. I., Achenbach, S. J., Amin, S., Riggs, B. L., Melton, L. J., & Khosla, S. (2010). *Relation of serum serotonin levels to bone density and structural parameters in women*. *Journal of bone and mineral research*, 25(2), 415-422.
- [9] Berger, M., Gray, J. A., & Roth, B. L. (2009). *The expanded biology of serotonin*. *Annual review of medicine*, 60, 355-366.
- [10] Celada, P., & Artigas, F. (1993). *Plasma 5-Hydroxyindoleacetic Acid as an Indicator of Monoamine Oxidase-A Inhibition in Rat Brain and Peripheral Tissues*. *Journal of neurochemistry*, 61(6), 2191-2198.
- [11] Steiner, M. (2011). *Serotonin, depression, and cardiovascular disease: sex-specific issues*. *Acta Physiologica*, 203(1), 253-258.

- [12] Boyer, E. W., & Shannon, M. (2005). *The serotonin syndrome*. New England Journal of Medicine, 352(11), 1112-1120.
- [13] Sternbach, H. (1991). *The serotonin syndrome*. Am J Psychiatry, 148(6), 705-713.
- [14] Borsini, F., Brambilla, A., Cesana, R., & Grippa, N. (2001). *Lack of interaction between flibanserin and antidepressants in inducing serotonergic syndrome in rats*. International Journal of Neuropsychopharmacology, 4(1), 9-15.
- [15] Feldman, J. M., & O'dorisio, T. M. (1986). *Role of neuropeptides and serotonin in the diagnosis of carcinoid tumors*. The American journal of medicine, 81(6), 41-48.
- [16] Feldman, J. (1986). *Urinary serotonin in the diagnosis of carcinoid tumors*. Clinical chemistry, 32(5), 840-844.
- [17] Pradhan, T., Jung, H. S., Jang, J. H., Kim, T. W., Kang, C., & Kim, J. S. (2014). *Chemical sensing of neurotransmitters*. Chemical Society Reviews, 43(13), 4684-4713.
- [18] Yoshitake, T., Fujino, K., Kehr, J., Ishida, J., Nohta, H., & Yamaguchi, M. (2003). *Simultaneous determination of norepinephrine, serotonin, and 5-hydroxyindole-3-acetic acid in microdialysis samples from rat brain by microbore column liquid chromatography with fluorescence detection following derivatization with benzylamine*. Analytical biochemistry, 312(2), 125-133.
- [19] Peng, Q., & Jiang, C. (2007). *A new spectrofluorimetric method for determination of trace amounts 5-hydroxytryptamine in human urine and serum*. Journal of Fluorescence, 17(3), 339-343.
- [20] Yoshida, H., Kido, F., Yoshitake, M., Todoroki, K., Nohta, H., & Yamaguchi, M. (2007). *Determination of catecholamines and indoleamines in human urine based on intramolecular excimer-forming derivatization and fluorescence detection*. Analytical sciences, 23(4), 485-488.
- [21] Yoshitake, M., Nohta, H., Yoshida, H., Yoshitake, T., Todoroki, K., & Yamaguchi, M. (2006). *Selective determination of native fluorescent bioamines through precolumn derivatization and liquid chromatography using intramolecular fluorescence resonance energy transfer detection*. Analytical chemistry, 78(3), 920-927.
- [22] Zheng, X., Liu, Q., Jing, C., Li, Y., Li, D., Luo, W. & Fan, C. (2011). *Catalytic gold nanoparticles for nanoplasmonic detection of DNA hybridization*. Angewandte Chemie, 123(50), 12200-12204.
- [23] Anker, J. N., Hall, W. P., Lyandres, O., Shah, N. C., Zhao, J., & Van Duyne, R. P. (2008). *Biosensing with plasmonic nanosensors*. Nature materials, 7(6), 442-453.

- [24] Boisselier, E., & Astruc, D. (2009). *Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity*. *Chemical society reviews*, 38(6), 1759-1782.
- [25] Daniel, M. C., & Astruc, D. (2004). *Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology*. *Chemical reviews*, 104(1), 293-346.
- [26] Daniel, M. C., & Astruc, D. (2004). *Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology*. *Chemical reviews*, 104(1), 293-346.
- [27] Saha, K., Agasti, S. S., Kim, C., Li, X., & Rotello, V. M. (2012). *Gold nanoparticles in chemical and biological sensing*. *Chemical reviews*, 112(5), 2739-2779.
- [28] Ahmed, S. R., Takemeura, K., Li, T. C., Kitamoto, N., Tanaka, T., Suzuki, T., & Park, E. Y. (2017). *Size-controlled preparation of peroxidase-like graphene-gold nanoparticle hybrids for the visible detection of norovirus-like particles*. *Biosensors and Bioelectronics*, 87, 558-565.
- [29] Dreaden, E. C., Alkilany, A. M., Huang, X., Murphy, C. J., & El-Sayed, M. A. (2012). *The golden age: gold nanoparticles for biomedicine*. *Chemical Society Reviews*, 41(7), 2740-2779.
- [30] Saha, K., Agasti, S. S., Kim, C., Li, X., & Rotello, V. M. (2012). *Gold nanoparticles in chemical and biological sensing*. *Chemical reviews*, 112(5), 2739-2779.
- [31] Templeton, A. C., Pietron, J. J., Murray, R. W., & Mulvaney, P. (2000). *Solvent refractive index and core charge influences on the surface plasmon absorbance of alkanethiolate monolayer-protected gold clusters*. *The Journal of Physical Chemistry B*, 104(3), 564-570.
- [32] Yeh, Y. C., Creran, B., & Rotello, V. M. (2012). *Gold nanoparticles: preparation, properties, and applications in bionanotechnology*. *Nanoscale*, 4(6), 1871-1880.
- [33] Su, K. H., Wei, Q. H., Zhang, X., Mock, J. J., Smith, D. R., & Schultz, S. (2003). *Interparticle coupling effects on plasmon resonances of nanogold particles*. *Nano letters*, 3(8), 1087-1090.
- [34] Link, S., Wang, Z. L., & El-Sayed, M. A. (1999). *Alloy formation of gold– silver nanoparticles and the dependence of the plasmon absorption on their composition*. *The Journal of Physical Chemistry B*, 103(18), 3529-3533.
- [35] Liu, X., Atwater, M., Wang, J., & Huo, Q. (2007). *Extinction coefficient of gold nanoparticles with different sizes and different capping ligands*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 58(1), 3-7.

- [36] Turkevich, J., Stevenson, P. C., & Hillier, J. (1951). *A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold*. *Discussions of the Faraday Society*, 11, 55-75.
- [37] Frens, G. (1973). *Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions*. *Nature*, 241(105), 20-22.
- [38] Lin, S. Y., Tsai, Y. T., Chen, C. C., Lin, C. M., & Chen, C. H. (2004). *Two-step functionalization of neutral and positively charged thiols onto citrate-stabilized Au nanoparticles*. *The Journal of Physical Chemistry B*, 108(7), 2134-2139.
- [39] Giersig, M., & Mulvaney, P. (1993). *Preparation of ordered colloid monolayers by electrophoretic deposition*. *Langmuir*, 9(12), 3408-3413.
- [40] Brust, M., Walker, M., Bethell, D., Schiffrin, D. J., & Whyman, R. (1994). *Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase liquid-liquid system*. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, (7), 801-802.
- [41] Lévy, R., Thanh, N. T., Doty, R. C., Hussain, I., Nichols, R. J., Schiffrin, D. J., ... & Fernig, D. G. (2004). *Rational and combinatorial design of peptide capping ligands for gold nanoparticles*. *Journal of the American Chemical Society*, 126(32), 10076-10084.
- [42] Srivastava, S., Frankamp, B. L., & Rotello, V. M. (2005). *Controlled plasmon resonance of gold nanoparticles self-assembled with PAMAM dendrimers*. *Chemistry of materials*, 17(3), 487-490.
- [43] Wen-Wen, c. h. e. n., Yong-Ming, G. U. O., zheng, W. S., xianyu, Y. L., Zhuo, W. A. N. G., & JIANG, X. Y. (2014). *Recent progress of colorimetric assays based on gold nanoparticles for biomolecules*. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 42(3), 307-314.
- [44] Lin, S. Y., Liu, S. W., Lin, C. M., & Chen, C. H. (2002). *Recognition of potassium ion in water by 15-crown-5 functionalized gold nanoparticles*. *Analytical chemistry*, 74(2), 330-335.
- [45] Beer, P. D., & Gale, P. A. (2001). *Anion recognition and sensing: the state of the art and future perspectives*. *Angewandte Chemie International Edition*, 40(3), 486-516.
- [46] Watanabe, S., Seguchi, H., Yoshida, K., Kifune, K., Tadaki, T., & Shiozaki, H. (2005). *Colorimetric detection of fluoride ion in an aqueous solution using a thioglucose-capped gold nanoparticle*. *Tetrahedron letters*, 46(51), 8827-8829.
- [47] Jiang, Y., Zhao, H., Zhu, N., Lin, Y., Yu, P., & Mao, L. (2008). *A simple assay for direct colorimetric visualization of trinitrotoluene at picomolar levels using gold nanoparticles*. *Angewandte Chemie*, 120(45), 8729-8732.
- [48] Katz, E. Y. (1990). *A chemically modified electrode capable of a spontaneous immobilization of amino compounds due to its functionalization with succinimidyl*

groups. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 291(1-2), 257-260.

[49] Kong, B., Zhu, A., Luo, Y., Tian, Y., Yu, Y., & Shi, G. (2011). *Sensitive and selective colorimetric visualization of cerebral dopamine based on double molecular recognition*. *Angewandte Chemie*, 123(8), 1877-1880.

[50] Su, H., Zheng, Q., & Li, H. (2012). *Colorimetric detection and separation of chiral tyrosine based on N-acetyl-L-cysteine modified gold nanoparticles*. *Journal of Materials Chemistry*, 22(14), 6546-6548.

[51] Balasubramanian, S. K., Yang, L., Yung, L. Y. L., Ong, C. N., Ong, W. Y., & Liya, E. Y. (2010). *Characterization, purification, and stability of gold nanoparticles*. *Biomaterials*, 31(34), 9023-9030.

[52] Goldberg, W. I. (1999). *Dynamic light scattering*. *American Journal of Physics*, 67(12), 1152-1160.

[53] Liu, X., Atwater, M., Wang, J., & Huo, Q. (2007). *Extinction coefficient of gold nanoparticles with different sizes and different capping ligands*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 58(1), 3-7.

[54] Link, S., & El-Sayed, M. A. (1999). *Spectral Properties and Relaxation Dynamics of Surface Plasmon Electronic Oscillations in Gold and Silver Nanodots and Nanorods*. *J. Phys. Chem. B*, 103, 8410-8426.

[55] Urban, C., & Schurtenberger, P. (1998). *Characterization of turbid colloidal suspensions using light scattering techniques combined with cross-correlation methods*. *Journal of colloid and interface science*, 207(1), 150-158.

[56] Thomsen, V., Schatzlein, D., & Mercurio, D. (2003). *Limits of detection in spectroscopy*. *Spectroscopy*, 18(12), 112-114.