



UNIVERSIDAD DE OVIEDO

MASTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA

“VITAMINAS B₁ y B₁₂ EN SUPLEMENTOS ALIMENTICIOS: DETERMINACIÓN ESPECTROSCÓPICA MEDIANTE EL USO DE NANOPARTÍCULAS Y CLÚSTERES DE ORO”

TRABAJO FIN DE MASTER

POR

ADRIÁN POSADA COBOS

JULIO, 2018



AGRADECIMIENTOS

A mi tutora Marta Elena Díaz, por su gran ayuda en la realización de este trabajo y por enseñarme todos los aspectos que desconocía de la química analítica. También quería destacar la paciencia que tuvo conmigo y su disponibilidad en todo momento.

A la Dra. Rosana Badía Laño, por su colaboración en la codirección de este trabajo y su apoyo durante la realización del mismo.

A Jorge, Cristian y Emilia; por orientarme en el laboratorio, ayudarme en toda duda que me surgía y por su entera disposición.

A mis padres, Armando y Alicia, por su cariño y por ayudarme a ser la persona que soy hoy, y a mis abuelos (Gabriel Jesús, María Teresa, María Eulalia y Enrique) por su cariño y compañía. También quiero agradecer al resto de mi familia, tíos y primos, el haber estado ahí.

Para terminar, quiero dedicar este trabajo a mi abuela, María Teresa Sánchez Peña, que falleció el 21 de abril de este año 2018. Descansa en paz, nunca te olvidaremos.

Indice

1	LISTA DE FIGURAS Y TABLAS.....	i
2	LISTA DE MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS.....	ii
3	SIMBOLOGÍA.....	iii
4	RESUMEN	1
5	INTRODUCCIÓN.....	2
5.1	LAS VITAMINAS.....	2
5.2	SITUACIÓN ACTUAL DE LA METODOLOGÍA A EMPLEAR.....	3
5.3	OBJETIVOS DE ESTE TRABAJO.....	4
6	CONSIDERACIONES TEÓRICAS.....	5
6.1	NANOPARTÍCULAS.....	5
6.1.1	Concepto.....	5
6.1.2	Historia.....	7
6.1.3	Preparación y estabilización de nanopartículas.....	8
6.1.4	Colorimetría	12
6.2	CLÚSTERES DE ORO.....	14
6.2.1	Concepto.....	14
6.2.2	Estructura de los clústers.....	15
6.2.3	Estructura de los clústeres funcionalizados.....	16
6.2.4	Métodos de síntesis y caracterización	17
6.2.5	Fotoluminiscencia	19
6.3	ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.....	21
7	METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	22
7.1	SÍNTESIS, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE ORO	22
7.1.1	Síntesis	22
7.1.2	Purificación	23
7.1.3	Caracterización.....	23
7.2	SÍNTESIS, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CLÚSTERES DE ORO...	24
7.2.1	Síntesis y purificación.....	24
7.2.2	Caracterización.....	24
7.3	CARACTERÍSTICAS ESPECTRALES DE LAS VITAMINAS B ₁ Y B ₁₂ E INFLUENCIA DEL pH.	24

7.4	ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ORO CON LAS VITAMINAS.....	25
7.5	ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE LOS CLÚSTERES DE ORO CON LAS VITAMINAS	25
7.5.1	Línea de calibrado para vitamina B ₁₂	26
7.6	DETERMINACIÓN DE VITAMINA B ₁₂ EN MUESTRAS REALES	26
7.6.1	Cápsulas de Trofalgon.....	27
7.6.2	Marnys Vitamina B12 líquida	27
7.6.3	Optovite B12 1000 µg.....	28
8	RESULTADOS	29
8.1	CARACTERIZACIÓN ESPECTRAL DE NANOPARTÍCULAS	29
8.2	CARACTERIZACIÓN DE CLÚSTERES	33
8.3	CARACTERÍSTICAS OPTICAS DE LAS VITAMINAS E INFLUENCIA DEL pH... 34	
8.4	ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ORO CON LAS VITAMINAS.....	37
8.5	EFEECTO DEL pH SOBRE LOS CLÚSTERES DE ORO.....	41
8.6	ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE LOS CLÚSTERES CON LAS VITAMINAS. 43	
8.7	APLICACIÓN DEL MÉTODO DESARROLLADO A LA DETERMINACIÓN DE VITAMINA B ₁₂ EN MUESTRAS REALES.....	47
8.7.1	Cápsulas de Trofalgon.....	47
8.7.2	Marnys Vitamina B ₁₂ líquida.....	50
8.7.3	Optovite B12 1000 µg.....	53
9	CONCLUSIONES	58
10	REFERENCIAS.....	59
11	ANEXO	66
11.1	UTILLAJE UTILIZADO EN LA PREPARACION DE NANOPARTICULAS Y CLUSTERES DE ORO.....	66
11.2	PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES REGULADORAS	70
11.3	GRÁFICAS OBTENIDAS EN EL ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE LOS CLÚSTERES CON LAS VITAMINAS B1 Y B12.....	71
11.4	COMPOSICION DECLARADA DE LAS MUESTRAS.....	76
11.5	ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE LOS CLÚSTERES DE ORO CON EL COLORANTE LASER DCM.....	78

1 LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Estructuras de las vitaminas B₁ y B₁₂.

Figura 2. Formas y tamaños de las AuNps vistos en el microscopio electrónico de transmisión (TEM).

Figura 3. Representación de las técnicas de síntesis de nanopartículas de oro top-down y bottom-up.

Figura 4. Esquema de los diferentes procesos de estabilización de nanopartículas coloidales: A) electrostática. B) estérica, y C) mecanismo electrostérico.

Figura 5. Influencia de la agregación de AuNps en las características espectrales de la suspensión.

Figura 6. A) Agregación de las AuNps a través de la interacción con el analito, con el resultado de un cambio de color; B) Dispersión de nanopartículas por rotura del entrecruzamiento y cambio de color.

Figura 7. Clústeres de oro de diferente forma y tamaño. Los subíndices indican el número de átomos. Obsérvese que hay clústeres con el mismo número de átomos pero diferente forma (Au₅₅: icosaedro y cubo-octaedro, Au₁₄₆: octaedro y decaedro, Au₁₄₇: icosaedro y cubo-octaedro).

Figura 8. Estructura general del clúster de oro ($[L_sAu_nX_m]^q$), donde se representa el núcleo con los átomos de oro, y la cáscara con los átomos de oro y los dos tipos de ligandos: X y L.

Figura 9. Esquema simplificado de síntesis de clústeres de oro empleando la técnica de tamizado (size-focusing).

Figura 10. Diagrama del origen de las dos bandas de luminiscencia de clústeres Au₂₈ según el modelo del estado sólido. La banda de alta energía se considera debida a una recombinación radiacional interbanda (banda-d/banda-sp) y la banda de baja energía a transiciones radiacionales intrabanda (banda-sp) a través del salto energético HOMO-LUMO.

Figura 11. Imágenes TEM de AuNps sintetizadas por el método de A) Turkevich B) síntesis verde.

Figura 12. Imágenes TEM de AuNps con geometría no esférica obtenidas por el método de Turkevich. En A puede apreciarse una AuNp con forma piramidal, mientras que en B parece apreciarse una AuNp poliédrica y otra en forma de racimo.

Figura 13. Histograma de frecuencia de los diámetros de las AuNps obtenidas por el método de Turkevich.

Figura 14. Histograma de frecuencia de los diámetros de las AuNps obtenidas por síntesis verde.

Figura 15. Espectro de absorbancia de las AuNps obtenidas por el método de Turkevich.

Figura 16. Espectro de absorbancia de las AuNps obtenidas por la síntesis verde.

Figura 17. Espectro de excitación (a) y emisión (b) de la disolución de GSH-AuNCs.

Figura 18. Espectro de absorción de la disolución de GSH-AuNCs.

Figura 19. Espectros de absorbancia de las vitaminas B₁ (A) y B₁₂ (B).

Figura 20. Efecto del pH sobre las características espectrales de la vitamina B₁: a) pH 3,5, b) pH 4,5, c) pH 5, d) pH 5,5, e) pH 6, f) pH 7 y g) pH 7,8.

Figura 21. Efecto del pH sobre el espectro de absorción de la vitamina B₁₂: a) pH 3,5, b) pH 4,5, c) pH 5, d) pH 5,5, e) pH 6, f) pH 7 y g) pH 7,9.

Figura 22. Influencia del pH sobre la absorción de la vitamina B₁₂ a 361nm.

Figura 23. Espectros de absorción de las mezclas de vitamina B₁ y concentraciones crecientes de AuNps: a) 0 M AuNps, b) $1,8 \times 10^{-11}$ M AuNps, c) $3,7 \times 10^{-11}$ M AuNps, d)

$5,5 \times 10^{-11}$ M AuNps, e) $7,4 \times 10^{-11}$ M AuNps, f) $9,2 \times 10^{-11}$ M AuNps, g) $1,1 \times 10^{-10}$ M AuNps. [Vitamina de 15 μ g/mL].

Figura 24. Absorbancia a 232 nm de las mezclas de vitamina B₁ y AuNps frente a la concentración de AuNps. La banda a 232 nm corresponde a la vitamina B₁

Figura 25. Absorbancia a 266 nm de las mezclas de vitamina B₁ y AuNps frente a la concentración de AuNps. La banda de absorbancia a 266 nm corresponde a la vitamina B₁.

Figura 26. Absorbancia a 532 nm de las mezclas de vitamina B₁ y AuNps frente a la concentración de AuNps. La banda a 532 nm corresponde a las AuNps.

Figura 27. Espectros de absorción de las mezclas de vitamina B₁₂ con concentraciones crecientes de AuNps: a) 0 M AuNps, b) $1,8 \times 10^{-11}$ M AuNps, c) $3,7 \times 10^{-11}$ M AuNps, d) $5,5 \times 10^{-11}$ M AuNps, e) $7,4 \times 10^{-11}$ M AuNps, f) $9,2 \times 10^{-11}$ M AuNps, g) $1,1 \times 10^{-10}$ M AuNps. [Vitamina de 15 μ g/mL].

Figura 28. Absorbancia a 361 nm de las mezclas de vitamina B₁₂ y AuNps frente a la concentración de AuNps. La banda a 361 nm corresponde a la vitamina B₁₂.

Figura 29. Absorbancia a 532 nm de las mezclas de vitamina B₁₂ y AuNps frente a la concentración de AuNps. La banda a 532 nm corresponde a las AuNps.

Figura 30. Efecto del pH sobre los espectros de emisión de los GSH-AuNCs: a) pH 3,5, b) pH 4,6, c) pH 5,6, d) pH 5,9, e) pH 6,9 y f) pH 7,7.

Figura 31. Intensidad de fluorescencia de los GSH-AuNCs a 614 nm en función del pH.

Figura 32. Espectros de emisión de 1,1 mL de GSH-AuNCs en ausencia (a) y presencia (b) de vitamina B₁. [Vitamina B₁ =15 μ g/mL]

Figura 33. Espectros de emisión de 1,1 mL de GSH-AuNCs en ausencia (a) y presencia (b) de vitamina B₁₂. [Vitamina B₁₂ =15 μ g/mL]

Figura 34. Espectros de emisión de fluorescencia de los GSH-AuNCs con concentraciones crecientes de vitamina: a) 0 $\mu\text{g/mL}$, b) 12 $\mu\text{g/mL}$, c) 24 $\mu\text{g/mL}$, d) 36 $\mu\text{g/mL}$, e) 48 $\mu\text{g/mL}$, f) 60 $\mu\text{g/mL}$.

Figura 35. Curva de calibrado externo para la determinación de vitamina B₁₂.

Figura 36. Espectro de emisión de los GSH-AuNCs (a) y espectro de absorbancia de la vitamina B₁₂ (b).

Figura 37. Línea de calibrado por adiciones estándar de la réplica 1 de Trofalgon.

Figura 38. Línea de calibrado por adiciones estándar de la réplica 2 de Trofalgon.

Figura 39. Línea de calibrado por adiciones estándar de la réplica 3 de Trofalgon.

Figura 40. Línea de calibrado por adiciones estándar de la muestra de Marnys Vitamina B₁₂ líquida.

Figura 41. Espectros de la disolución de GSH-AuNCs (curva azul) en ausencia de muestra y de la disolución de GSH-AuNCs en presencia de la muestra de Marnys Vitamina B₁₂ líquida (curva roja).

Figura 42. Línea de calibrado por adiciones estándar de la muestra de Optovite diluida 12,5 veces.

Figura 43. Línea de calibrado por adiciones estándar de la muestra de Optovite diluida 25 veces.

ANEXO I

Figura 1AI. Calentamiento a reflujo en baño de aceite durante la síntesis de las AuNps sobre placa calefactora.

Figura 2AI. Disolución de AuNps obtenida. Obsérvese el característico color rojo.

Figura 3AI. Purificación de las AuNps mediante el empleo de una membrana de diálisis.

Figura 4AI. Disolución de AuNps obtenida por síntesis verde (hojas de té). Esta mezcla presenta un color púrpura que la caracteriza.

Figura 5AI. Disolución de GSH-AuNCs con su típico color dorado.

Figura 6AI. Filtro de jeringa de 0,45 μm utilizado para la purificación de los GSH-AuNCs.

Figura 7AI. Disoluciones de AuNPs con concentraciones crecientes de vitamina B₁.

Figura 8AI. Disoluciones de GSH-AuNCs con concentraciones crecientes de vitamina B₁₂.

Figura 9AI. Espectros de emisión de 0,1 mL de GSH-AuNCs en ausencia y presencia de vitamina, a) y b).

Figura 10AI. Espectros de emisión de 0,3 mL de GSH-AuNCs en ausencia y presencia de vitamina B₁, a) y b).

Figura 11AI. Espectros de emisión de 0,5 mL de GSH-AuNCs en ausencia y presencia de vitamina B₁, a) y b).

Figura 12AI. Espectros de emisión de 0,7 mL de GSH-AuNCs en ausencia y presencia de vitamina B₁, a) y b).

Figura 13AI. Espectros de emisión de 0,9 mL de GSH-AuNCs en ausencia y presencia de vitamina B₁, a) y b).

Figura 14AI. Espectros de emisión de 0,1 mL de GSH-AuNCs en ausencia y presencia de vitamina B₁₂, a) y b).

Figura 15AI. Espectros de emisión de 0,3 mL de GSH-AuNCs en ausencia y presencia de vitamina B₁₂, a) y b).

Figura 16AI. Espectros de emisión de 0,5 mL de GSH-AuNCs en ausencia y presencia de vitamina B₁₂, a) y b).

Figura 17AI. Espectros de emisión de 0,7 mL de GSH-AuNCs en ausencia y presencia de vitamina B₁₂, a) y b).

Figura 18AI. Espectros de emisión de 0,9 mL de GSH-AuNCs en ausencia y presencia de vitamina B₁₂, a) y b).

ANEXO II

Figura 1AII. Estructura química del colorante láser DCM.

Figura 2AII. Espectro de absorción del colorante DCM.

Figura 3AII. Espectros de excitación y emisión del colorante DCM.

Figura 4AII. Espectros de emisión obtenidos de las mezclas con cantidades crecientes de GSH-AuNCs (ver datos en Tabla 1AII).

Figura 5AII. Espectros de emisión obtenidos de las mezclas con cantidades crecientes de colorante. Ver composición de las disoluciones en Tabla 1AII.

Figura 6AII. Espectro de emisión de los GSH-AuNCs (línea azul) y espectro de absorción del colorante DCM (línea roja).

Figura 7AII. Posible mecanismo de transferencia de carga entre el DCM y el GSH-AuNC.

Figura 8AII. Línea de calibrado para la determinación del colorante DCM.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Orden cronológico de los eventos relacionados con las AuNps.

Tabla 2. Métodos de síntesis de AuNps y ligandos superficiales empleados.

Tabla 3. Número total de átomos, de átomos superficiales y porcentaje de átomos superficiales para clústeres metálicos con diferentes tamaños, de acuerdo a la teoría de capa completa.

Tabla 4. Valores de fluorescencia obtenidos para cada concentración de vitamina B₁₂.

Tabla 5. Datos experimentales utilizados en la preparación de la línea de calibrado por adiciones estándar para la réplica 1 de Trofalgon.

Tabla 6. Datos experimentales utilizados en la preparación de la línea de calibrado por adiciones estándar para la réplica 2 de Trofalgon.

Tabla 7. Datos experimentales utilizados en la preparación de la línea de calibrado por adiciones estándar para la réplica 3 de Trofalgon.

Tabla 8. Datos experimentales utilizados en la preparación de la línea de calibrado por adiciones estándar para la muestra de Marnys Vitamina B₁₂ líquida.

Tabla 9. Datos experimentales utilizados en la preparación de la línea de calibrado por adiciones estándar para la muestra de Optovite diluida 12,5 veces.

Tabla 10. Datos experimentales utilizados en la preparación de la línea de calibrado por adiciones estándar para la muestra de Optovite diluida 25 veces.

Tabla 11. Resultados obtenidos en la determinación de vitamina B₁₂ en los diferentes suplementos.

ANEXO II

Tabla 1AII. Composición de las disoluciones preparadas para comprobar la interacción GSH-AuNCs-DCM. La concentración de la disolución de DCM = 2 µg/mL DCM.

Tabla 2AII: Datos para el calibrado de DCM.

2 LISTA DE MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

A) MATERIALES

- Matraces de 100 mL.
- Micropipeta de 1mL.
- Cucharilla.
- Membranas de diálisis (Sigma Aldrich).

- Jeringa con filtro de de 0.45 μm con membrana de difluoruro de polivinilideno.
- Matraces de 5 y 10 mL.

B) EQUIPOS

- Balanza analítica (Mettler AE163).
- Balanza analítica PG802S (Mettler Toledo).
- Placa calefactora (Heidolph Mr Hei-Tec).
- Microscopio electrónico de transmisión (TEM).
- Espectrofotómetro de absorción UV-Vis (Cary 60).
- Programa informático "Image J".
- Microscopio electrónico de transmisión de alta resolución (HR-TEM).
- Espectrofluorímetro (Cary Eclipse).
- pH-metro (Crison).
- Baño por ultrasonidos (P Selecta).

C) REACTIVOS

- Ácido tetracloroaurico trihidrato ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) (Sigma Aldrich).
- Citrato de sodio (Probis).
- Té negro (Twinings).
- L-glutati3n reducido (GSH) (Sigma Aldrich).
- Agua destilada.
- Vitamina B₁ (Sigma Aldrich).
- Vitamina B₁₂ (Fisher Scientific).
- Ácido acético glaci3r (Analar Normapur).

- Acetato de sodio trihidrato (Rectapur).
- Dihidrogenofosfato de sodio (Rectapur).
- Hidrogenofosfato de disodio (Mark 66A).
- Agua milli-Q (doblemente desionizada).
- Complementos alimenticios de vitamina B₁₂: “Trofalgon”, “Marnys Vitamina B12 líquida” y “Optovite B12 1000 µg”.

3 SIMBOLOGÍA

AuNps: Nanopartículas de oro.

GSH-AuNCs: Clústeres de oro funcionalizados con glutatión.

AuNCs: Clústeres de oro.

HPLC: Cromatografía de alta eficacia.

SEM: Microscopio electrónico de barrido.

TEM: Microscopio electrónico de transmisión.

ICP-MS: Espectrometría de masas acoplado inductivamente.

UV-Vis: Visible-Ultravioleta.

DLS: Dispersión dinámica de luz.

SPR: Plasmón superficial de resonancia.

CLA: Agregación por entrecruzamiento.

NCLA: Agregación sin entrecruzamiento.

NIR: Región espectral del infrarrojo cercano.

TOA: Cation tetraetilamonio.

SR: Tiolatos.

Hal: Halogenuros.

PR: Fosfinas.

Au_nSR_m: Clústeres tiolados.

PVP: Poly(N-vinil-2-pirrolidona).

HR-TEM: Microscopio electrónico de transmisión de alta resolución.

LMMTC: Ligando-metal-metal.

II-MUA: Ácido mercaptoundecanoico.

PEG: Polietilenglicol.

PAMAM: Dendrímeros de poliamidoamina.

L-DOPA: L-3,4-dihidroxifenilalanina.

BSA-AuNCs: Clústeres de oro funcionalizados con albúmina de suero bovino.

GSH: Glutati3n reducido.

FRET: Transferencia de energ3a entre fluorocromo.

4 RESUMEN

Las vitaminas son compuestos de naturaleza orgánica indispensables para el correcto desarrollo y funcionamiento del organismo. Por ello, la ausencia de las mismas puede provocar enfermedades como la enfermedad de beriberi (falta de vitamina B₁) o el escorbuto (vitamina C). En vista de la elevada importancia que tienen estas sustancias, es preciso encontrar métodos analíticos sensibles y selectivos para poder determinar la cantidad de vitaminas presente en un alimento, en un suplemento alimenticio o en un medicamento. En este trabajo se propone desarrollar métodos ópticos para vitaminas del grupo B (en concreto, B₁ y B₁₂) mediante el uso de nanopartículas de oro (AuNps) y clústeres de oro funcionalizados con glutatión (GSH-AuNCs). Las AuNps y los GSH-AuNCs son nanopartículas que, al interaccionar con las citadas vitaminas, pueden dar lugar a cambios espectrales (p.e. desplazamiento de bandas de absorción, desactivación de la intensidad de fluorescencia) que permitan evaluar la concentración de las mismas en muestras reales.

ABSTRACT

Vitamins are organic compounds that are essential for the correct growth and running of the organism and, therefore, the absence of these nutrients can produce diseases as Beriberi's illness (absence of vitamin B₁) or scurvy (vitamin C). Taking into account the key importance of a correct intake of vitamins, it is necessary the development of sensitive and selective analytical methods for their determination in foods, supplement foods and pharmaceuticals. In this project, we proposed the development of new analytical protocols to determine B vitamins (in particular, vitamins B₁ and B₁₂) using gold nanoparticles (AuNps) and glutathione-modified gold nanoclusters (GSH-AuNCs) is proposed. Upon interaction with the above mentioned vitamins, gold nanoparticles and nanoclusters may suffer spectral changes such as shift of the absorption band or a decrease of the fluorescence intensity. These changes may be useful for the determination of the vitamins in real samples.

5 INTRODUCCIÓN

5.1 LAS VITAMINAS

Las vitaminas pueden definirse como sustancias orgánicas esenciales para el crecimiento, el mantenimiento y el funcionamiento normal del cuerpo humano [1]. Todas las vitaminas, excepto las vitaminas D y K, tienen que ser obtenidas a partir de los alimentos al no poder sintetizarse en el metabolismo humano.

Las vitaminas B₁ (tiamina), B₆ (piridoxina) y B₁₂ forman parte de las denominadas vitaminas hidrosolubles y son obtenidas de manera externa a través de productos alimenticios [2] [3]. La vitamina B₁ se encuentra presente en alimentos como las semillas de girasol, el arroz, la coliflor, el hígado, el espárrago, la avena, el centeno y el huevo. Por otro lado, la vitamina B₁₂ existe en el hígado, el pescado, las almejas, la carne, la leche y los productos lácteos.

Las estructuras de las dos vitaminas que vamos a utilizar en este trabajo se ilustran en la Figura 1. La vitamina B₁ se caracteriza por tener un grupo azufre ("S") mientras que la vitamina B₁₂ presenta un grupo cianuro ("CN") [4]. Ambos grupos tienen una gran afinidad por el oro y es, por tanto, de esperar, que interactúen con las AuNps y/o los GSH-AuNCs.

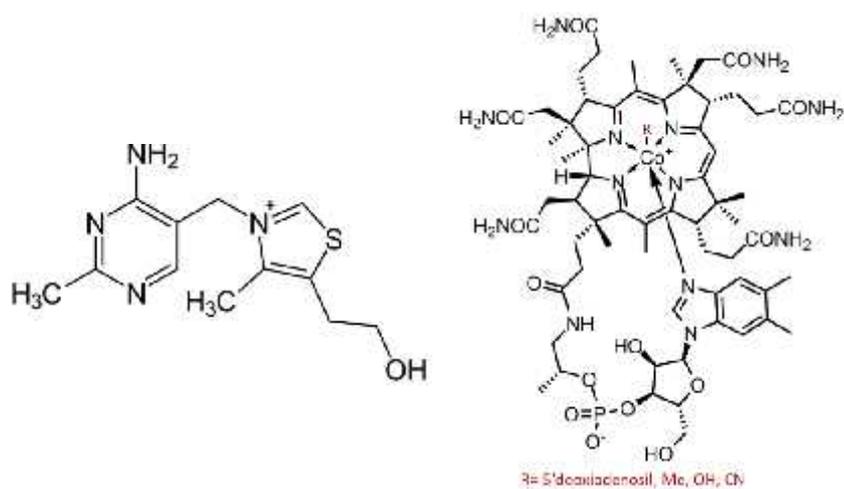


Figura 1. Estructuras de las vitaminas B₁ y B₁₂.

Se sabe que la vitamina B₁ facilita la conversión de los carbohidratos en glucosa, un combustible importante a nivel celular. La deficiencia de esta vitamina causa el síndrome de Korssakoffs, la enfermedad de beriberi y afecta al sistema nervioso periférico y al cardiovascular [1]. Asimismo, la vitamina B₁₂ actúa en el metabolismo proteico, en la formación de eritrocitos y en el mantenimiento del sistema nervioso central.

En vista de las funciones tan importantes que desempeñan estas vitaminas en el organismo, es necesario desarrollar un método analítico que permita determinar la cantidad de estas vitaminas en los alimentos.

Los métodos que se han utilizado tradicionalmente para llevar a cabo tal determinación son, fundamentalmente, la espectrofotometría derivada [5] y la cromatografía de alta eficacia (HPLC) [6], siendo el más usado este último.

En este trabajo se propone utilizar nanopartículas de oro (AuNps) y clústeres de oro funcionalizados con glutatión (GSH-AuNCs), como nuevos materiales, para la realización de la determinación analítica. A continuación describiremos brevemente el estado actual de la investigación en este campo.

5.2 SITUACIÓN ACTUAL DE LA METODOLOGÍA A EMPLEAR

Hoy en día, las AuNps han encontrado aplicaciones importantes en el ámbito de la biomedicina, en la preservación del medio ambiente y así como en procesos de la industria alimentaria. Ejemplos representativos de tales aplicaciones son los siguientes:

1) Biomedicina y biología: Tratamiento del cáncer, biosensores de proteínas y ácidos nucleicos, liberación controlada de medicamentos, inmunoensayos, determinación de la concentración de glucosa y detección de microorganismos [7], entre otros.

2) Medio ambiente: Purificación de aguas y detección de contaminantes, como por ejemplo pesticidas [8].

3) Industria alimentaria: Detección de nutrientes, marcadores, agentes microbianos (como por ejemplo *Salmonella* [9] y *Escherichia Coli* [10]) y productos medicinales. Una aplicación muy importante ha sido el uso de las nanopartículas de oro para detectar la presencia de melanina en leche cruda. También se han utilizado nanopartículas de oro para determinar la concentración de colesterol [11] y para aumentar el efecto antioxidante de la vitamina C [12].

Respecto a los clústeres de oro (AuNCs), estos se caracterizan por presentar propiedades ópticas importantes para el desarrollo de métodos analíticos espectroscópicos así como otras propiedades físico-químicas, como por ejemplo la fotoluminiscencia, la actividad catalítica o el potencial redox [13]. Gracias a estas propiedades, los clústeres tienen muchas aplicaciones en el ámbito científico, como por ejemplo en bio-detección, bio-imagen, tratamiento de tumores, catálisis y fotocatalisis, celdas solares y foto-receptores [13, 14, 15].

En los últimos años se han publicado excelentes revisiones sobre el empleo de nanomateriales en el campo agro-alimentario [16, 17, 18].

5.3 OBJETIVOS DE ESTE TRABAJO

- Síntesis de nanopartículas de oro mediante el uso de citrato y vegetales (hojas de té) como agentes reductores.
- Caracterización físico-química de las nanopartículas de oro obtenidas.
- Síntesis y caracterización de clústeres de oro funcionalizados con glutatión.
- Estudio de la influencia del pH en las propiedades ópticas de las vitaminas B₁ y B₁₂.
- Estudio físico-químico y analítico de la interacción de las AuNps y los GSH-AuNCs con las vitaminas B₁ y B₁₂.
- Determinación de vitaminas B₁ y B₁₂ en muestras reales.

6 CONSIDERACIONES TEÓRICAS

6.1 NANOPARTÍCULAS

6.1.1 Concepto

Las nanopartículas son partículas que se caracterizan por presentar un diámetro inferior a 100 nm. Gracias a este pequeño tamaño, estos nanomateriales poseen propiedades diferentes a las del material macroscópico.

Las AuNps, a diferencia del oro macroscópico, presentan las siguientes propiedades [19]:

- **Propiedades ópticas únicas:** Las AuNps presentan una coloración particular gracias a los llamados *plasmones superficiales de resonancia* (SPR), oscilaciones de los electrones 6s de la banda de conducción de los átomos de oro. Los SPR se producen cuando estos electrones son excitados por un haz de luz cuya longitud de onda (λ) coincide con el diámetro de la partícula. Estas propiedades ópticas dependen de la forma y tamaño de las nanopartículas, presentando diferentes colores en disolución acuosa (marrón, naranja, rojo, azul, morado) a medida que el diámetro aumenta de 1 a 100 nm. En general, muestran una única banda de absorción en la región del visible del espectro electromagnético, entre 500 y 550 nm. Este fenómeno viene influenciado no sólo por el tamaño, sino también por el medio en el que se encuentren así como a la presencia de otras especies químicas en su entorno. Este último aspecto es muy interesante ya que influye decisivamente en sus aplicaciones, por ejemplo, para la detección de sustancias a muy baja concentración, pues estas alteran el ambiente dieléctrico local de las nanopartículas (*chemical sensing*).
- **Biocompatibilidad y baja citotoxicidad:** Las AuNPs sin funcionalizar presentan una baja citotoxicidad y una buena compatibilidad biológica. Gracias a ello, se pueden llevar a cabo métodos diagnósticos y terapias *in vivo* sin un elevado riesgo de que la partícula cause problemas al organismo [20].

- **Tamaño y forma variable:** Según el método empleado para sintetizar las AuNPs, se puede obtener una amplia variedad de nanopartículas con tamaños y formas diferentes. Las propiedades ópticas y funcionales varían en función de su tamaño y forma. En la Figura 2 puede apreciarse las distintas formas y tamaños que existen según la bibliografía existente [21].

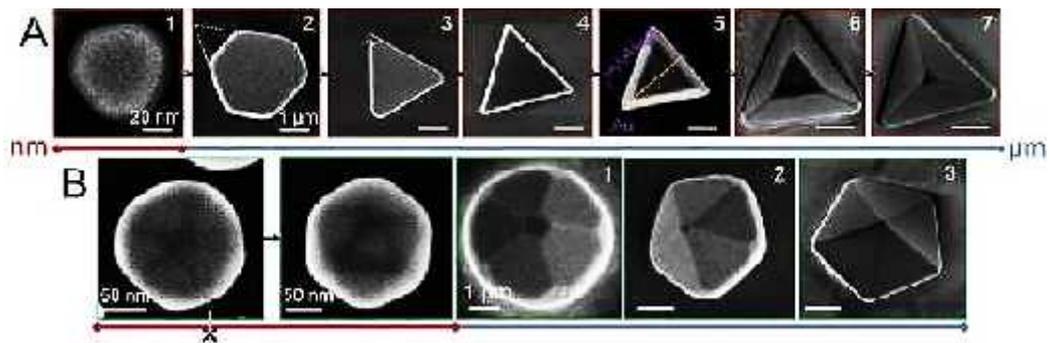


Figura 2. Formas y tamaños de las AuNps vistas en el microscopio electrónico de transmisión (TEM) [21].

- **Fácil síntesis:** La síntesis es relativamente sencilla y puede hacerse para tamaños comprendidos entre 1 y 150 nm. Una de las primeras síntesis, que en la actualidad sigue teniendo vigencia, fue desarrollada en 1951 por Turkevich y colaboradores [22]. En ella el tetracloroaurato de hidrógeno (HAuCl_4) se reduce en agua a ebullición por acción del ácido cítrico para dar lugar a nanopartículas esféricas de 20 nm de diámetro. La función del citrato es doble puesto que actúa como agente reductor y estabilizante.
- **Funcionalización sencilla:** La funcionalización consiste en modificar la superficie de la nanopartícula con determinados ligandos para que ésta adquiriera una función específica. Los átomos de oro presentes en la superficie de las AuNPs pueden retener otras moléculas mediante interacciones no covalentes o enlaces covalentes (gracias a los orbitales híbridos 5d-6s formados por los átomos de oro superficiales). Así, el enlace covalente “oro-azufre” es uno de los más estables que se conoce en este tipo de nanopartículas [23].

6.1.2 Historia

Las propiedades ópticas de los nanomateriales fueron ya utilizados en el siglo IV A.C. por los romanos en la denominada “Copa de Lycurgus”, aunque se desconocía que estos fenómenos eran producidos por las nanopartículas. No fue hasta mediados del siglo XIX, cuando se descubrió la causa de estos efectos ópticos gracias al trabajo de Michael Faraday, quién confirmó que los cambios de color detectados eran debidos a las AuNps y que, dependiendo de su tamaño, se observaba un color u otro.

Con este hallazgo fue posible desarrollar tecnologías para estudiar y determinar las propiedades morfológicas, físicas y químicas de las AuNps [24]. Todos los acontecimientos relacionados con el descubrimiento y uso de las nanopartículas se resumen en la Tabla 1 [24].

Tabla 1. Orden cronológico de los eventos relacionados con las AuNps [24].

	Autores	Logros
Siglo IV A.C.	Romanos	Copa de Lycurgus
Siglo XVII	Andreas Cassius	“Morado de Cassius” para la tinción del cristal.
1857	Faraday	Evaluación del cambio de color de las AuNPs
1902	Zsigmondy	Inención del ultra-microscopio
1908	Mie	Teoría de Mie: Explicación de la interacción de las nanopartículas con la radiación electromagnética.
1951-1973	Frens-Turkevich	Síntesis de AuNPs
1960	Feynman	Las NPs son mencionadas en una lectura en la que dijo; “Hay mucho espacio en el fondo”, refiriéndose a la nanoescala.
1971	Faulk y Taylor	Primer uso en tinción inmunoquímica

6.1.3 Preparación y estabilización de nanopartículas

6.1.3.1 Preparación

La preparación de las nanopartículas consta de tres pasos: síntesis, purificación y caracterización.

- Síntesis: De forma general, se puede simplificar diciendo que hay dos formas principales para sintetizar las nanopartículas de oro: el método de abajo a arriba (“bottom-up”) y el método de arriba abajo (“top-down”).

El método de abajo a arriba se basa en la creación de nanopartículas a partir de moléculas o átomos, mientras que el método de arriba a abajo las nanopartículas se construyen a partir de entidades mayores (Figura 3). La técnica más utilizada en la práctica es la de abajo a arriba, por lo que en este apartado nos centraremos en los métodos que se basan en dicha técnica.

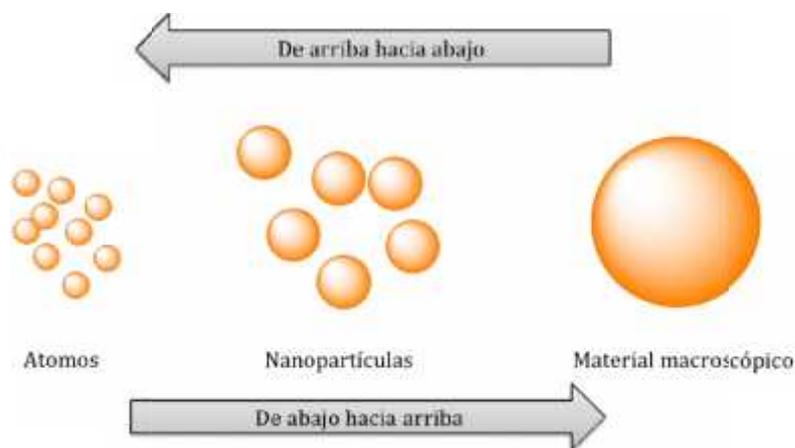


Figura 3. Representación de las técnicas de síntesis de nanopartículas de oro top-down y bottom-up.

Los métodos bottom-up pueden ser químicos, físicos y biológicos. Los métodos químicos se caracterizan por constar de dos pasos: 1) Reducción usando agentes reductores químicos como borohidruros, aminoboranos y formaldehído y 2) Estabilización con moléculas como citrato o ligandos tiolados. Estos métodos [25] han

sido muy útiles para la síntesis de nanopartículas, pero tienen el inconveniente de que implican el uso de reactivos y estabilizadores tóxicos, lo que los hace inadecuados para aplicaciones biológicas. Dentro de este grupo de métodos está el ya mencionado método de Turkevich, que consiste en utilizar citrato como agente reductor del Au^{3+} a Au^0 (empleando como material de partida la sal $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), que a la vez actúa como estabilizante de la disolución coloidal.

Entre los métodos físicos utilizan, en general, como material de partida la sal de oro $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ y llevan a cabo la reducción por diferentes vías: reducción fotoquímica por irradiación UV en presencia de glicina como estabilizador de las nanopartículas [26], radiación de microondas en presencia de citrato y un detergente [27]. En otros casos, como por ejemplo, por ablación láser de una lámina de oro metálico en una disolución de un detergente aniónico se consiguen sintetizar AuNps de 8 nm de diámetro [28].

Finalmente, en los métodos biológicos, también denominados como síntesis verde, se utilizan agentes reductores baratos, fáciles y ecológicos como por ejemplo aminoácidos, aminas aromáticas, glicerol, ácidos fenólicos y vegetales como el té [29]. En la Tabla 2 se recogen algunos de los métodos más utilizados para la síntesis de AuNps, tanto en medio acuoso como en medio orgánico [30].

Tabla 2. Métodos de síntesis de AuNps y ligandos superficiales empleados.

Tamaño (nm)	Método de síntesis	Ligando superficial
1-2	Reducción de HAuCl_4 por NaBH_4 en tolueno	Fosfina
1-5	Reducción de HAuCl_4 por NaBH_4 en tolueno	Alcanotiol
3-5	Reducción de HAuCl_4 por NaBH_4 en tolueno	Bromuro de tetraoctil amonio
10-150	Reducción de HAuCl_4 por citrato en agua	Citrato
50-200	Reducción de HAuCl_4 por hidroquinona en agua	Citrato

- **Purificación:** Tras sintetizar las AuNPs, es necesario purificarlas para eliminar todos aquellos componentes que puedan interferir en las medidas y/o que no hayan reaccionado. Algunos métodos de purificación que pueden utilizarse son la centrifugación, el intercambio iónico, la extracción con disolventes, la diálisis y la diafiltración [31].
- **Caracterización:** Una vez realizada la purificación, las nanopartículas de oro pueden ser caracterizadas mediante técnicas microscópicas (como microscopía electrónica de barrido o SEM y microscopía electrónica de transmisión o TEM), Plasma de inducción acoplado-espectrometría de masas (ICP-MS), espectroscopía Visible-Ultravioleta (UV-Vis), dispersión dinámica de luz (Dynamic Light Scattering o DLS), electroforesis en gel y test bio-funcional [32].

6.1.3.2 *Estabilización*

Es importante que las nanopartículas en suspensión no se agreguen, ya que ello conduciría a la desestabilización de la suspensión y dificultaría la detección de los analitos. En la práctica, la carga cero superficial de las AuNps favorece la agregación a través de fuerzas atractivas de Van der Waals. Para evitar este problema, las disoluciones de oro pueden estabilizarse con la introducción de moléculas que funcionalicen adecuadamente la superficie AuNps, ya sea a través de interacciones covalentes o electrostáticas. Como moléculas funcionalizadoras pueden utilizarse ácidos nucleicos, enzimas, receptores, lectinas, anticuerpos o superantígenos [24].

Existen dos tipos de funcionalización: electrostática y estérica [24]. La funcionalización electrostática tiene lugar mediante el empleo de reactivos que lleven carga como son grupos citrato, polielectrolitos, grupos carboxilo. Esto confiere una carga superficial similar a cada partícula (Figura 4A) lo que impide, por repulsiones electrostáticas, la agregación. La presencia de contraiones en el medio da lugar a la formación de una doble capa eléctrica que estabiliza la disolución coloidal frente a las fuerzas atractivas de Van der Waals y cuyo espesor viene gobernado por la fuerza iónica del medio. Es por ello, por lo que este tipo de estabilización/funcionalización electrostática es muy sensible a la concentración iónica de la disolución.

En el caso de la funcionalización/estabilización estérica (Figura 4B) los ligandos, adsorbidos o unidos a la superficie de las nanopartículas, forman una barrera física que, por impedimentos estéricos, evita la agregación de las mismas. A diferencia de la estabilización electrostática, que está determinada por la concentración iónica, la estabilización estérica depende únicamente del peso molecular y del grado de funcionalización superficial.

Es posible aun otra posible vía de funcionalización/estabilización: cuando se utilizan biomoléculas voluminosas (p.e. proteínas, péptidos, ácidos nucleicos) que poseen numerosas cargas para la funcionalización, tienen lugar ambos tipos de mecanismos, electrostático y estérico, lo que se conoce como efecto electrostérico (Figura 4C).

Hay diferentes tipos de moléculas que pueden ser utilizados como estabilizadores, por ejemplo, antibióticos, péptidos, ácidos nucleicos y proteínas que estén altamente cargadas y tengan propiedades poliméricas.

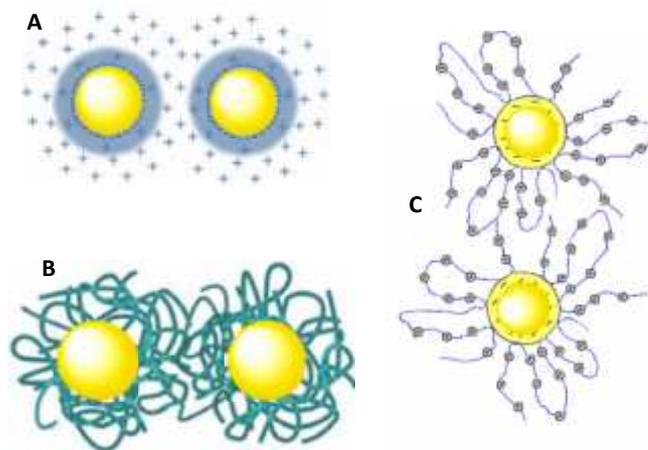


Figura 4. Esquema de los diferentes procesos de estabilización de nanopartículas coloidales: A) electrostática. B) estérica, y C) mecanismo electrostérico.

6.1.4 Colorimetría

Las AuNps han sido utilizadas desde el último siglo para el estudio del fluido cerebroespinal mediante la denominada “reacción Lange”, una reacción del oro que permite detectar si hay alguna infección en el sistema nervioso central. En el caso de que exista una patología, la disolución coloidal de oro cambia de color. Esta ha sido la primera aplicación en la que se han utilizado AuNps para la detección colorimétrica (biosensing).

La detección colorimétrica de las AuNps es posible gracias al fenómeno del plasmón superficial de resonancia (SPR) [24], ya comentado en el apartado 7.1.1. Debido a este fenómeno, la agregación de las nanopartículas puede dar lugar a cambios de color dependiendo del tamaño de las mismas, variando desde rosa hasta azul.

En la Figura 5 puede verse como el proceso de agregación de las AuNps, está caracterizada por un descenso del pico del plasmón a 520 nm (típica de las AuNps esféricas) y la aparición de un nuevo pico entre 600 y 700 nm, con cambios graduales de color de la disolución desde rojo a morado o azul dependiendo del grado de agregación [24].

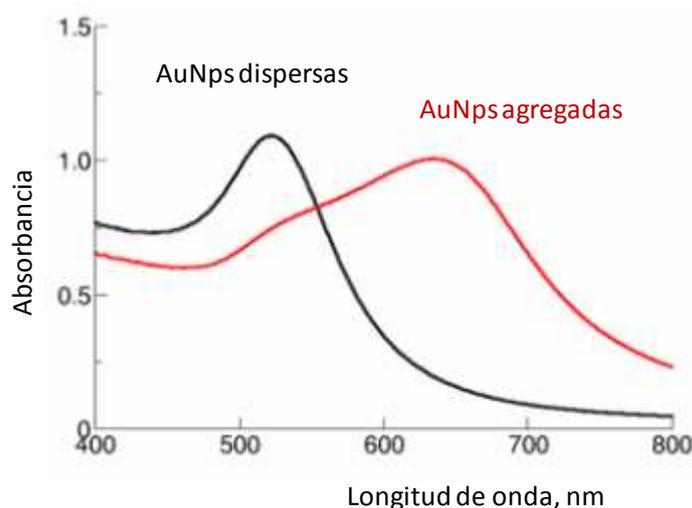


Figura 5. Influencia de la agregación de AuNps en las características espectrales de la suspensión.

Una vez estabilizada la suspensión de AuNps, ésta se puede utilizar en ensayos colorimétricos gracias a la modificación de la estabilidad de la suspensión por adición del analito, con el resultado de un cambio de color. El mecanismo general de esta interacción puede ser debido a la agregación por un entrecruzamiento mediatizado por el analito (Figura 6A), por desplazamiento del ligando estabilizador o por cambios en la morfología superficial de las AuNps debidos a una reacción química [24].

También es posible utilizar el proceso de dispersión de las AuNps en ensayos colorimétricos. En este caso, y en ausencia de analito, la agregación de las AuNps por entrecruzamiento provoca un cambio de color de rojo a azul. Sin embargo, cuando existe una pequeña cantidad de analito en el medio, las nanopartículas se dispersan, por rotura de los enlaces interpartículas, dando lugar a un cambio de color de azul a rojo (Figura 6B).

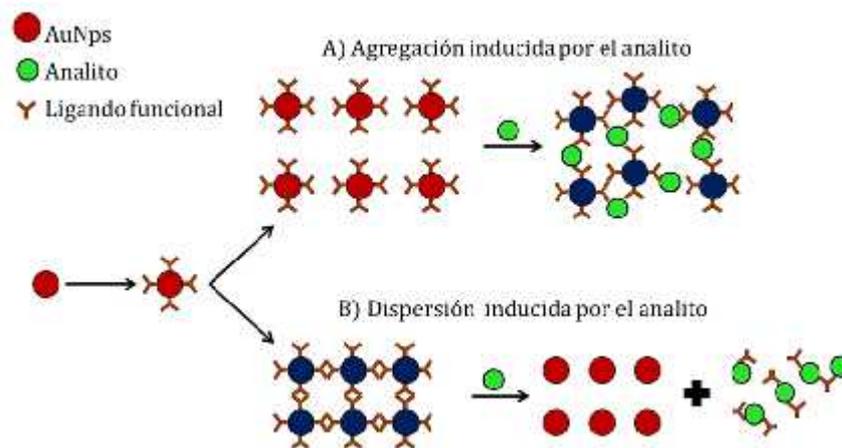


Figura 6. A) Agregación de las AuNps a través de la interacción con el analito, con el resultado de un cambio de color; B) Dispersión de nanopartículas por rotura del entrecruzamiento y cambio de color. Esta figura ha sido extraída del estudio de Priyadarshini [33].

Interesantes revisiones sobre el empleo de las AuNps en la determinación colorimétrica de analitos de interés clínico, medioambiental, toxicológico, alimentario, etc, se pueden encontrar en recientes revisiones bibliográficas [33, 34, 35, 36].

6.2 CLÚSTERES DE ORO

6.2.1 Concepto

El químico Frank Albert Cotton [37] empleó el término “clúster” para denominar compuestos con enlaces metal-metal, con un número de átomos suficiente como para definir una estructura poliédrica en tres dimensiones y con un tamaño menor de 5 nm.

Dentro de los clústeres se pueden considerar: a) clústeres grandes, de entre 20 y 100 átomos, y b) pequeños, de entre 2 y 20 átomos. Los primeros suelen tener una capa protectora de ligandos estabilizadores como fosfinas, tioles, proteínas, ADN, dendrímeros y polímeros. Por el contrario, los segundos no necesitan poseer ligandos para ser estables y todos los átomos que componen el clúster se hallan en su superficie. Ambos tipos de clústeres muestran niveles de energía discretos y un salto de banda inversamente proporcional al tamaño del clúster.

Un aspecto importante de los AuNCs es la posibilidad de determinar sus estructuras geométricas y, por ello, se puede obtener el grado de correlación entre las estructuras y las propiedades físicas de estos clústeres. Además, se ha comprobado que los AuNCs tienen una alta estabilidad tanto en estado sólido como en el medio líquido [38].

Debido al fuerte confinamiento cuántico de los electrones libres en los clústers, la densidad continua de estados típica de los metales se distorsiona en niveles discretos de energía. Esto supone que las propiedades ópticas y otras propiedades físico-químicas sean dependientes del tamaño y la forma. Los clusters de oro tiene una elevada relación superficie:volumen, lo que los hace susceptibles de ser modificados superficialmente. Esto ha dado lugar a un gran abanico de aplicaciones de los mismos en campos tan variados como la biodetección, biosensores, marcaje biológico, bioimagen, análisis espectroquímico, etc. [14].

6.2.2 Estructura de los clústers

Los clústeres de oro compactos se construyen por el empaquetamiento sucesivo de capas de átomos alrededor de un átomo de oro [39], de acuerdo a un empaquetamiento cúbico compacto (*cubic close-packed, ccp*) o de un empaquetamiento hexagonal compacto (*hexagonal close-packed, hcp*). En esta distribución, un átomo central está rodeado de una o más capas empaquetadas compactas, como se puede observar en la Figura 7.

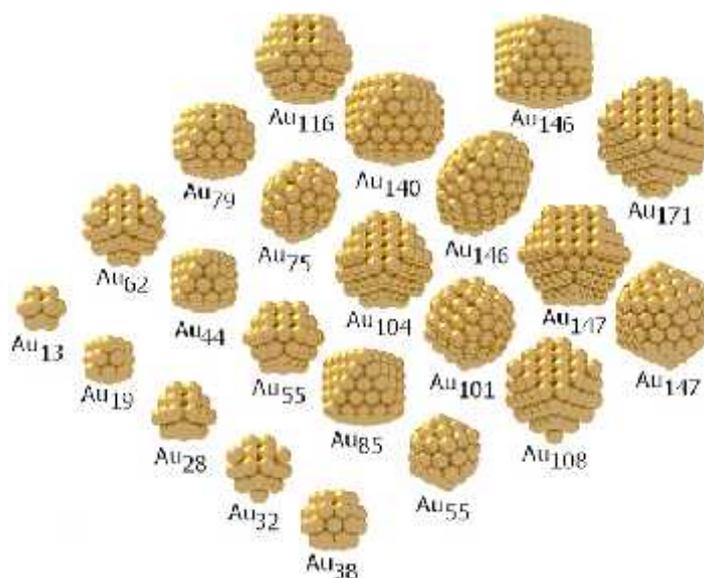


Figura 7. Clústeres de oro de diferente forma y tamaño. Los subíndices indican el número de átomos. Obsérvese que hay clústeres con el mismo número de átomos pero diferente forma (Au55: icosaedro y cubo-octaedro, Au 146: octaedro y decaedro, Au 147: icosaedro y cubo-octaedro) [40].

El número de átomos que componen los clústers determina su estabilidad y se conocen como “números mágicos estructurales”. En la Tabla se muestran algunos de estos números: a medida que el tamaño del cluster se reduce, el porcentaje de átomos superficiales aumenta, lo que supone una mayor importancia de los procesos superficiales (superficie del clúster más activa).

Tabla 3. Número total de átomos, de átomos superficiales y porcentaje de átomos superficiales para clústeres metálicos con diferentes tamaños, de acuerdo a la teoría de capa completa [41].

Nº de capas que rodean al átomo central	Diámetro (nm)	Nº total de átomos	Nº de átomos en superficie	% de átomos superficiales
1	0,864	13	12	92
2	1,440	55	42	76
3	2,016	147	92	63
4	2,592	309	162	52
5	3,168	561	252	45
6	3,744	923	362	39
7	4,320	1415	492	35

6.2.3 Estructura de los clústeres funcionalizados

La mayoría de los AuNCs utilizados en los ensayos analíticos poseen la denominada estructura “core±shell “(núcleo- superficie) (Figura 8) [42], en la que el núcleo del clúster contiene los átomos metálicos de oro y en la que la superficie está constituida por un número determinado de ligandos, como por ejemplo los tiolatos (SR), los selenolatos, los halogenuros (Hal) y las fosfinas (PR). Los clústeres que contienen los ligandos mencionados pueden describirse con la fórmula $[L_sAu_nX_m]^q$, donde q es la carga del clúster, X es un ligando electronegativo (como el SR o el Hal); y L es un ligando que se une débilmente al núcleo.

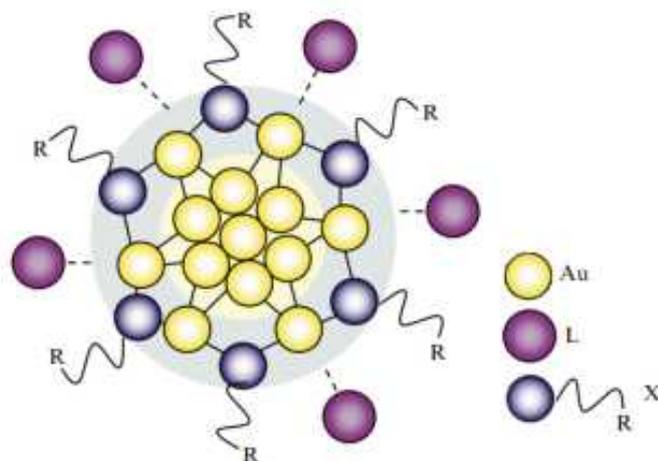


Figura 8. Estructura general de clúster de oro funcionalizado ($[L_sAu_nX_m]q$), donde se representa el núcleo con los átomos de oro, y la cáscara con los átomos de oro y los dos tipos de ligandos: X y L [42].

6.2.4 Métodos de síntesis y caracterización

En la última década, se han publicado numerosas estrategias para la preparación de nanoclústeres de oro estables, solubles en agua, altamente fluorescentes y/o biocompatibles. Algunas de dichas vías son las siguientes:

-Decapado [13]: a partir de nanopartículas de oro más grandes se obtienen clústeres mediante el uso de compuestos tiolados como el ácido mercaptopropiónico. El decapado constituye una técnica *top-down* y ofrece la ventaja de obtener clústeres de oro muy pequeños y estables, siendo la vía de síntesis más utilizada.

-Reducción química [42]: esta es una técnica *bottom-up* y se basa en la reducción química de Au^{3+} en presencia de un ligando, como la seroalbúmina bovina (BSA), glutatión o mediante fotorreducción en presencia de polímeros tridentados de tipo tio-éter. Algunas proteínas pueden actuar como agente reductor y agente de recubrimiento, por lo que, en este caso, no se necesita ningún reductor adicional.

-Tamizado [43]: esta técnica consiste en la selección por tamaños mediante un control cinético apropiado de la reacción de reducción de un precursor (p.e. Au(I)-SR) con NaBH₄ lo que permite obtener clústeres de oro de baja polidispersión. En este método el control cinético de la reacción de reducción es clave. Los clústeres obtenidos se someten a condiciones extremas, por ejemplo, 80-90°C en presencia de un exceso de tiol, bajo las cuales los clústeres inestables se descomponen o se convierten en otros más estables.

En la Figura 9. se muestra un esquema de dicho proceso. Esta técnica permite obtener clústeres de oro con un control preciso de tamaño.

-Intercambio de ligandos [13]: se ha descrito la conversión de clústeres ya preparados en otros de mayor tamaño por intercambio de ligandos tiolados (p.e. Au₁₁ a Au₂₅ y Au₅₅ a Au₇₅).

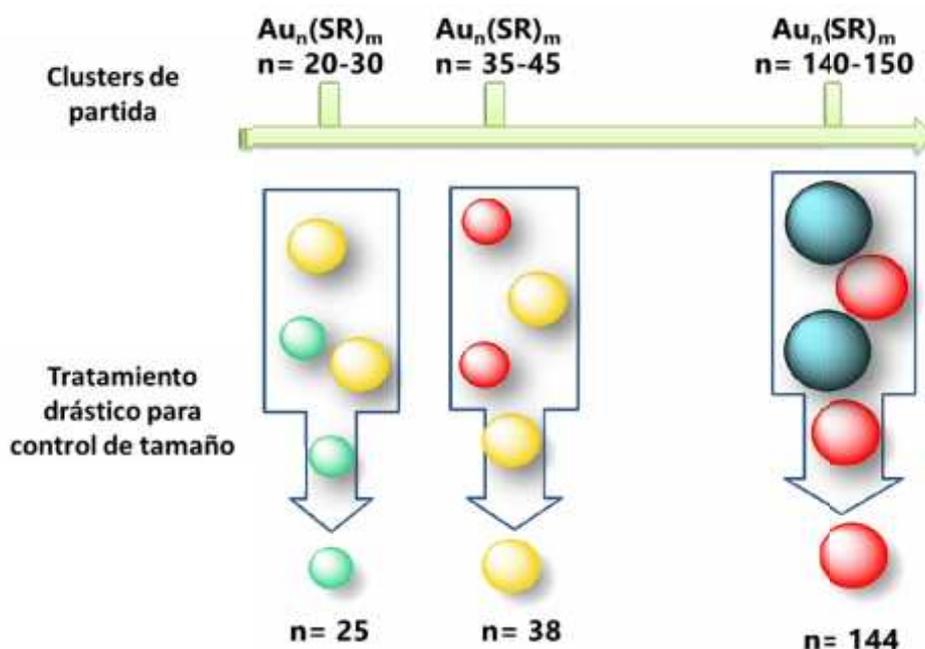


Figura 9. Esquema simplificado de síntesis de clústeres de oro empleando la técnica de tamizado (size-focusing). Adaptado de [43]

En general, existen varios parámetros experimentales que tienen una influencia importante en la obtención de clústeres de alta calidad, como el carácter fuerte o débil de la interacción entre el ligando y los iones metálicos, las condiciones de reducción y el tiempo de maduración.

Para tener control sobre el tamaño, la estructura, el estado de oxidación y las propiedades superficiales de los clústeres, es preciso tener en cuenta el tipo y la concentración de los ligandos, la concentración de la sal de oro, el tipo y la concentración de los agentes reductores, el pH de la disolución, la temperatura y el tiempo de reacción.

6.2.5 Fotoluminiscencia

A diferencia de las AuNps, los AuNCs no presentan la banda de plasmón superficial debido a que, como se señaló anteriormente, la estructura en bandas se rompe en niveles de energía discretos debido al fuerte confinamiento cuántico de los electrones en los clústers.

Sin embargo, los AuNCs, a diferencia de las AuNps, poseen fotoluminiscencia en la zona del UV/Vis/NIR, siendo su rendimiento cuántico muy variado (depende del tamaño y de la naturaleza de la funcionalización superficial).

Se ha observado en la práctica que los clústeres con un número pequeño de átomos emiten a una longitud de onda mayor y con un menor rendimiento cuántico que los clústeres más grandes. El mayor espaciado entre los orbitales HOMO y LUMO a medida que el tamaño del clúster disminuye se ha aducido como responsable de este fenómeno [44].

El tamaño de los clústeres suele oscilar entre 0.3 y 3 nm, y en ese intervalo el clúster posee un tamaño comparable a la longitud de onda de Fermi de un electrón. Asimismo, la fotoluminiscencia del clúster tiene su origen en los estados electrónicos discretos, y no en las bandas como en el caso de las nanopartículas [44].

Muchos autores han propuesto mecanismos para intentar explicar el origen de la fotoluminiscencia en estos nanomateriales. Por ejemplo, según Huang y Murray [45], la fotoluminiscencia es causada por las transiciones electrónicas interbanda, entre la banda-d y la banda sp de conducción a través del salto energético HOMO-LUMO (Figura 10 [44]).

Además del tamaño, los ligandos también son responsables de la fotoluminiscencia de los clústeres. Para el equipo de Huang, la fotoluminiscencia es el resultado de procesos de transferencia de energía ligando-metal e interacciones ligando-metal-metal (LMMTC). Cuando la capacidad de estos ligandos para donar electrones aumenta, la fluorescencia también se incrementa [14].

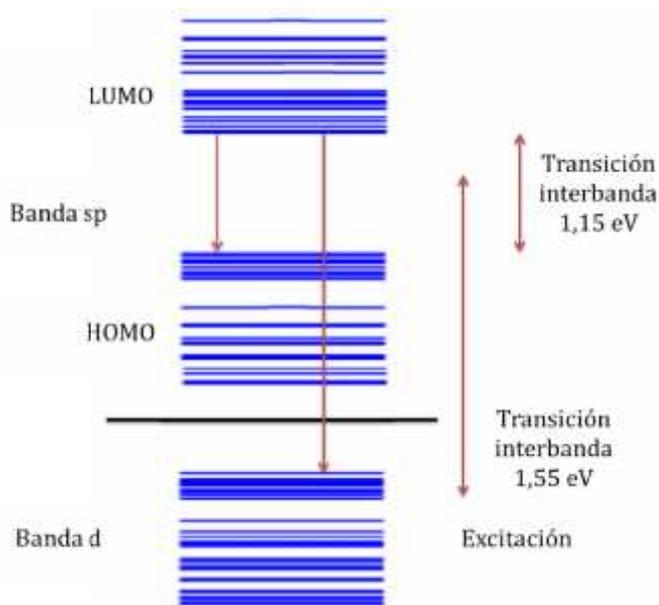


Figura 10. Diagrama del origen de las dos bandas de luminiscencia de clústeres Au₂₈ según el modelo del estado sólido. La banda de alta energía se considera debida a una recombinación radiacional interbanda (banda-d/banda-sp) y la banda de baja energía a transiciones radiacionales intrabanda (banda-sp) a través del salto energético HOMO-LUMO. Adaptada de [44].

En los últimos años, los AuNCs han despertado gran interés en el campo científico debido a sus inéditas propiedades electrónicas, ópticas y químicas. Son nanomateriales “a la carta” puesto que estas propiedades pueden ser moduladas en función de su tamaño, la naturaleza del ligando y el medio en el que se encuentren. Algunos de los

ligandos que pueden utilizarse para la síntesis de los AuNCs son el glutatión, la seroalbúmina bovina, la D-penicilamina, el N, N-dimetilformamida, el ácido mercaptoundecanoico (II-MUA), el polietilenglicol (PEG), los dendrímeros de poliamidoamina (PAMAM), la L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) y el ADN [14].

Además, presentan una emisión de fluorescencia con elevado rendimientos cuántico, tiempo de vida de fluorescencia largo, gran desplazamiento de Stokes, elevada foto-estabilidad, relación superficie-volumen elevada, baja toxicidad y bio-compatibilidad.

Estas propiedades han dado lugar a un incremento notable del número de trabajos dedicados a sus posibles aplicaciones, entre las que se encuentran la bio-imagen, la liberación de fármacos, la terapia fototérmica, el diagnóstico clínico, la catálisis, los biosensores, la optoelectrónica así como en la detección de nutrientes bio-activos y contaminantes en alimentos [46, 47].

6.3 ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

Como ya se ha explicado en el apartado 6.3, el objetivo principal de este trabajo es desarrollar métodos ópticos mediatizados por nanopartículas de oro, AuNps y AuNCs, para la determinación de las vitaminas B₁ y B₁₂. Salvo error u omisión, la revisión de la bibliografía ha demostrado que sólo se han publicado recientemente un par de trabajos en el que se emplean nanopartículas de oro funcionalizadas con sacarosa [1] y con un mercapto-pirimidin compuesto [48] para la determinación de vitamina B₁. Para la determinación de vitamina B₁₂ únicamente hemos podido constatar la existencia de otros dos trabajos, uno en el que se utilizaron AuNCs funcionalizados con albúmina de suero bovino [49] y otro un sistema microfluídico basado en la reacción del luminol y el nitrato de plata en presencia de nanopartículas de oro [50]. Por tanto, está claro que este es un campo prácticamente sin explorar, lo que nos ha llevado a plantear el presente proyecto.

7 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

7.1 SÍNTESIS, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE ORO

7.1.1 Síntesis

Las nanopartículas de oro (AuNps) han sido obtenidas utilizando el conocido método de Turkevich y la síntesis verde.

En el método de Turkevich, el Au^{3+} del ácido tetracloroaurico trihidrato ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) es reducido a oro elemental usando citrato de sodio como agente reductor. Se siguió el protocolo descrito en la bibliografía [51], con pequeñas modificaciones. Como primer paso, se prepararon 100 mL de una disolución de oro ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) al 0,005% y se llevaron a 130°C en una placa calefactora, con agitación a 300 rpm. Tras 15 min de calefacción, se añadieron 5mL de una disolución de citrato al 1% y se mantuvo la reacción durante 20 minutos, observándose un cambio notable de coloración del amarillo pálido al rojo. Finalmente, la solución se dejó a temperatura ambiente durante 1 día antes del post-tratamiento.

A diferencia del método anterior, la síntesis verde consistió en reducir el Au^{3+} del ácido tetracloroaurico ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) a oro elemental utilizando extractos de plantas como agentes reductores. En este proyecto se utilizaron hojas de té negro (Twinings) como agentes reductores, de acuerdo al protocolo descrito por Nune [52], con pequeñas modificaciones. Brevemente, se preparó una disolución de té añadiendo 1,7 g de hojas en 100 mL de agua destilada. Esta mezcla se calentó a 25°C durante 15 minutos en la placa calefactora, tras lo cual se añadieron 1,7 mL de una disolución de oro ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) 0,1M. Tras dejar reaccionar durante 20 minutos, se obtuvo una disolución de color púrpura que se filtró para eliminar los restos de té no solubilizados.

7.1.2 Purificación

Las disoluciones obtenidas de AuNps se dializaron empleando membranas de diálisis previamente hidratadas frente a agua, con el objeto de eliminar restos de reactivos. El agua se reemplazó periódicamente y tras 72 h de diálisis las disoluciones de AuNps se guardaron al abrigo de la luz.

7.1.3 Caracterización

Una vez purificadas las AuNps, se llevó a cabo la caracterización de las mismas para determinar su tamaño y concentración en la disolución. El tamaño se obtuvo a través de las imágenes TEM: se tomaron varias imágenes TEM y con ayuda del programa informático “Image J” se calculó el diámetro medio de las AuNps. Por otra parte, se registraron los espectros de absorción UV-Vis en el intervalo de 200 a 800 nm con el objeto de localizar la banda SPR. El coeficiente de extinción molar (ϵ) de la disolución se calculó con la Ecuación 1 [53], en la que k y a son constantes cuyo valor es 3,3211 y 10,8, respectivamente y D es el diámetro de la nanopartícula en cm:

$$\ln \epsilon = k \times \ln D + a \quad \text{Ecuación 1}$$

Una vez obtenido el valor del coeficiente de extinción molar y registrada la absorbancia a la longitud de onda de máxima absorción, se obtuvo la concentración molar de las disoluciones de AuNps, empleando una ecuación análoga a la de Lambert-Beer:

$$A = \epsilon \times c \times l \quad \text{Ecuación 2}$$

7.2 SÍNTESIS, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CLÚSTERES DE ORO

7.2.1 Síntesis y purificación

En este trabajo hemos abordado la síntesis clústeres de oro empleando glutatión, el cual juega un doble papel de reductor y ligando (GSH-AuNCs). La síntesis de estos clústeres se ha realizado de acuerdo con el procedimiento desarrollado en este laboratorio y descrito en la Tesis Doctoral de M.A. Escudero [44]. Se prepararon 30 mL de una disolución de oro ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) 2,5 mM y se calentaron a 32°C, con agitación a 300 rpm. A continuación, se añadieron 30 mL de una disolución de L-glutatión (GSH) 2,5 mM, dejando la mezcla reaccionar durante 36 horas, aproximadamente. Transcurrido este tiempo, se añadieron nuevamente 30 mL de la disolución de glutatión y se dejó reaccionar durante otras 6 horas. Finalmente, la disolución de los clústeres se purificó usando un filtro de jeringa de 0,45 μm con membrana de difluoruro de polivinilideno.

7.2.2 Caracterización

Los GSH-AuNCs se han caracterizado empleando espectrofotometría UV-Vis y Espectrofluorimetría, registrando los correspondientes espectros de absorción, excitación y emisión. No se han podido obtener las imágenes TEM de estos GSH-AuNCs debido estar fuera de servicio el equipo HR-TEM.

7.3 CARACTERÍSTICAS ESPECTRALES DE LAS VITAMINAS B₁ Y B₁₂ E INFLUENCIA DEL pH.

Con objeto de estudiar las características ópticas de las vitaminas, se registraron sus espectros de absorción UV-Vis en el intervalo comprendido entre 200 y 800 nm. Para ello, se preparó una disolución patrón de vitamina B₁ de 15 $\mu\text{g/mL}$ y otra de vitamina B₁₂ de 30 $\mu\text{g/mL}$. Para estudiar el efecto del pH en las características espectrales de las vitaminas se prepararon 7 disoluciones en matraces de 10 mL (contiendo cada uno 15 $\mu\text{g/mL}$ de vitamina B₁ o 30 $\mu\text{g/mL}$ de vitamina B₁₂) empleando diferentes reguladoras

en el intervalo comprendido entre 3,5-7: 3,5, 4,6, 4,9, 5,6, 5,9, 6,9 y 7,7. Los pHs desde 3,47 hasta 5,48 se consiguieron usando reguladora acetato 0,1 M (ácido acético/ acetato de sodio), mientras que el resto de pHs se establecieron utilizando reguladora fosfato 0,1 M (dihidrogenofosfato de sodio/ hidrogenofosfato de disodio). Tras 10 minutos de reposo, se registraron los espectros de las disoluciones entre 200 y 800 nm.

7.4 ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ORO CON LAS VITAMINAS

El estudio de la interacción de las AuNPs con las vitaminas B₁ y B₁₂ se abordó preparando 7 disoluciones para cada tipo de vitamina empleando concentraciones crecientes de nanopartículas y manteniendo constante la concentración de vitamina (15 µg/mL). Para el caso de la vitamina B₁, estas disoluciones se hicieron en matraces de 5 mL añadiendo 0,25 mL de vitamina y volúmenes variables de nanopartículas (0, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5 y 3 mL de una disolución de AuNps de $1,845 \times 10^{-10}$ M). Asimismo, se enrasó hasta volumen final con reguladora de fosfato de pH 6,9. Para la vitamina B₁₂, se operó de la misma forma utilizando matraces de 10 mL llevando a volumen final con reguladora fosfato de pH 5,9.

Todas estas disoluciones se dejaron a temperatura ambiente durante un tiempo de 20 minutos para asegurar la interacción entre las AuNps y las vitaminas, tras lo cual se registraron los espectros en el intervalo de longitud de 200- 800 nm.

7.5 ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE LOS CLÚSTERES DE ORO CON LAS VITAMINAS

Para abordar este estudio es importante elegir una reguladora adecuada ya que el pH puede influir en las características espectrales no sólo de las vitaminas, sino también de los GSH-AuNCs. Por ello, se prepararon disoluciones de GSH-AuNCs a distintos pHs: pH 3,5, 4,6, 4,9, 5,6, 5,9, 6,9 y 7,7. Todas estas disoluciones se hicieron en matraces de 5 mL añadiendo 0,5 mL de GSH-AuNCs y 2 mL de la correspondiente reguladora, enrasándose finalmente a 5 mL con agua milli-Q. Para conseguir los cuatro primeros pHs se utilizó el reguladora acetato 0,1 M, mientras que los pHs 5,9-7,7 se consiguieron

con reguladora fosfato 0,1M. Tras 10 minutos a temperatura ambiente, se registraron los espectros de emisión de estas mezclas empleando una longitud de onda de excitación de 370 nm y rendijas 10-10.

Una vez evaluado el efecto del pH, se procedió a estudiar la interacción de los GSH-AuNCs con las vitaminas B₁ y B₁₂. Para ello, se prepararon 6 pares de disoluciones para cada tipo de vitamina con volúmenes crecientes de GSH-AuNCs (0,1, 0,3, 0,5, 0,7, 0,9 y 1,1 mL), en presencia y ausencia de vitamina para poder comprobar el efecto de la misma sobre la fluorescencia de los GSH-AuNCs. Todas estas disoluciones se prepararon en matraces de 5 mL, añadiendo 15 µg/mL de vitamina, 2 mL de tampón fosfato 0,1 M pH 5,9 y los volúmenes mencionados de GSH-AuNCs. El enrase a volumen final se hizo con agua milli-Q. Estas mezclas se dejaron reaccionar a temperatura ambiente durante 20 minutos y, pasado ese tiempo, se registraron los espectros de emisión excitando a 370 nm con rendijas 20-20.

7.5.1 Línea de calibrado para vitamina B₁₂

En matraces de 5 mL se prepararon disoluciones con cantidades constantes de GSH-AuNCs (1 mL) y volúmenes crecientes de vitamina (0, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 y 1mL de una disolución patrón de 300 µg/mL), 2 mL de reguladora fosfato 0.1 M pH 5,9 llevando a volumen con agua milli-Q. Tras 20 minutos de reacción, se registraron los espectros de fluorescencia de las disoluciones usando una longitud de onda excitación de 370 nm y rendijas 20-20. La línea de calibrado se preparó representando la intensidad de fluorescencia a 614 nm vs concentración de vitamina B₁₂.

7.6 DETERMINACIÓN DE VITAMINA B₁₂ EN MUESTRAS REALES

Las muestras que se utilizaron para evaluar la aplicabilidad del método para la vitamina B₁₂ fueron cápsulas de “Trofalgon”, “Vitamina B₁₂ líquida (Marnys)” y el complemento alimenticio líquido “Optovite B12 1000 µg”. Estas muestras son recomendadas para combatir todas las enfermedades causadas por la ausencia de vitamina B₁₂.

7.6.1 Cápsulas de Trofalgon

Las cápsulas de Trofalgon son unos comprimidos constituidos por vitamina B₁₂ y lisozima, un enzima que protege frente a las infecciones. Las indicaciones del fabricante indican que cada cápsula contiene 1000 µg de vitamina B₁₂. Para poder determinar la concentración de vitamina en esta muestra, se siguieron los siguientes pasos:

1) Preparación de tres réplicas de muestra. Para ello, se disolvieron 0,3424, 0,3373 y 0,3334 gramos del contenido de las cápsulas en 25 mL de reguladora fosfato 0,1 M pH 5,9. A continuación, cada una de las tres réplicas se introdujo en un baño de ultrasonidos durante 15 minutos con el objeto de facilitar la disolución del sólido. Tras ese periodo, se filtró cada disolución a través de un disco de jeringa de 0,45 µm

2) La cuantificación de la vitamina en cada muestra se llevó a cabo por el método de las adiciones estándar. Para cada réplica, se prepararon 5 disoluciones conteniendo 1 mL de disolución de GSH-AuNCs), 1 mL de la disolución de muestra obtenida en el paso anterior, 2 mL de la reguladora fosfato 0,1 M pH 5,9 y volúmenes crecientes de patrón de vitamina B₁₂ (0, 0,1, 0,2, 0,3 y 0,4 mL de una disolución de 300 µg/mL). Se llevaron a volumen final con agua milli-Q, manteniéndolas a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se midió la fluorescencia de estas disoluciones a 610 nm con una excitación de 370 nm y con rendijas 20-20. Para cada réplica se representaron gráficamente los datos F-F₀ (donde F₀ es la fluorescencia de GSH-AuNCs en ausencia de vitamina y F la fluorescencia de las disoluciones conteniendo muestra + patrón de vitamina) de la frente a la raíz cuadrada de la concentración.

7.6.2 Marnys Vitamina B12 líquida

Esta muestra se dispensa en frascos de 30 mL e incluye una pipeta para que el paciente pueda tomar las dosis recomendadas. La concentración de vitamina indicada en el envase es de 5 µg/mL. Dado que esta muestra es líquida, no se llevó a cabo ningún pre-tratamiento previo de la misma.

Para determinar la cantidad de vitamina en esta muestra se llevó a cabo también el método de adiciones estándar. Para ello, en matraces de 5 mL se añadieron 1mL de

GSH-AuNCs, 2mL de tampón fosfato 0.1 M pH 5,9, 1 mL de la muestra original, volúmenes crecientes de patrón (0, 0,08, 0,16, 0,25 y 0,33 mL de una disolución de 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de vitamina B₁₂) y agua milli-Q hasta alcanzar un volumen final de 5 mL. Al igual que en el caso anterior, tras 20 minutos de reacción, se midió la fluorescencia de las disoluciones a 610 nm utilizando una excitación de 370 nm y rendijas 20-20. Se representó la relación F_0-F/F frente a la concentración de vitamina para la cuantificación.

7.6.3 Optovite B12 1000 μg

Optovite B12 es una solución inyectable que contiene vitamina B₁₂ y concentraciones bajas de cloruro sódico, presentando un color rojizo y transparente. Las soluciones se encuentran en ampollas de 2 mL y la concentración indicada en el paquete por ampolla es de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Dado el alto contenido en vitamina B₁₂ de esta muestra, se hicieron dos diluciones diferentes: 1:2,5 y 1:5 con agua milli-Q. Se llevó a cabo la determinación por adiciones estándar, para lo cual en matraces de 5 mL se añadieron para el caso de la dilución 1:2,5: 1mL de GSH-AuNCs, 2 mL de reguladora fosfato 0,1 M pH 5.9, 1mL de muestra diluida y volúmenes crecientes de patrón (0, 0,2, 0,4, 0,6 y 0,8 mL de una disolución de 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de vitamina B₁₂), enrasando finalmente a 5 mL con agua Milli-Q.

Para la muestra diluida 1:5: 1mL de GSH-AuNCs, 2 mL de reguladora fosfato 0,1 M pH 5.9, 1mL de muestra diluida y volúmenes crecientes de patrón (0, 0,1, 0,2, 0,3 y 0,4 mL de una disolución de 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de vitamina B₁₂) enrasando finalmente a 5 mL con agua Milli-Q.

Tras 20 minutos de reacción, se midió la fluorescencia a 610 nm utilizando una excitación de 370 nm y rendijas 20-20. Se representó la relación F_0-F/F frente a la concentración de vitamina para la cuantificación.

8 RESULTADOS

8.1 CARACTERIZACIÓN ESPECTRAL DE NANOPARTÍCULAS

Las imágenes TEM de las AuNps sintetizadas se muestra en la Figura 11. Se puede observar que tanto las obtenidas por el método de Turkevich (Figura 11A), como las obtenidas por síntesis verde (Figura 11B) son aproximadamente esféricas y dispersas, no observándose aglomerados de las mismas. Se observa gran uniformidad de las mismas, aunque siempre se pueden observar algunas otras geometrías, aunque en estos dos casos en particular, muy escasas (Figura 11).

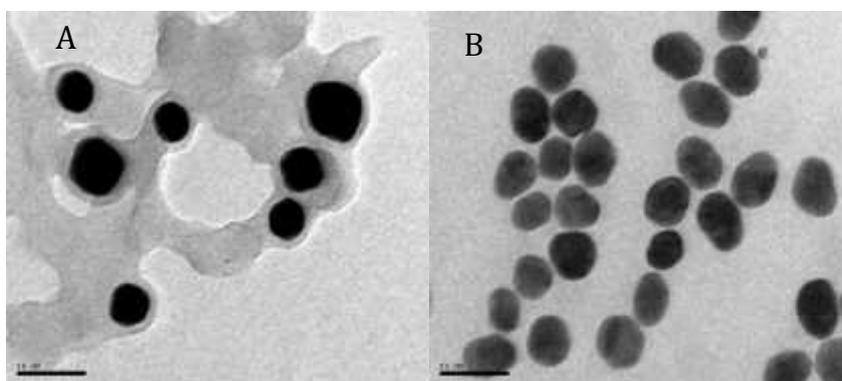


Figura 11. Imágenes TEM de AuNps sintetizadas por el método de A) Turkevich B) síntesis verde.

En general, se han conseguido nanopartículas esféricas y muy uniformes, aunque también se han sintetizado algunas nanopartículas con distintas formas (Figura 12), como por ejemplo con forma de pirámide y con conformación icosaédrica.

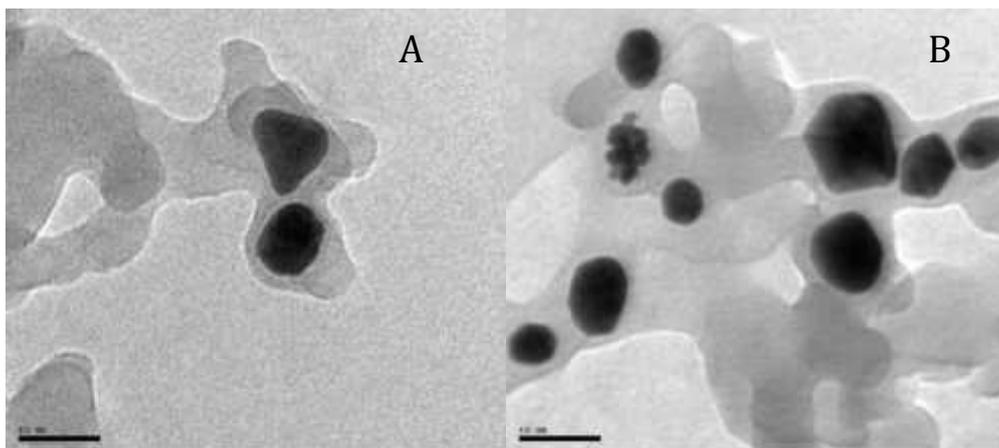


Figura 12. Imágenes TEM de AuNps con geometría no esférica obtenidas por el método de Turkevich. En A puede apreciarse una AuNp con forma piramidal, mientras que en B parece apreciarse una AuNp poliédrica y otra en forma de racimo.

En la Figura 13 se muestra el histograma de diámetros medidos para el caso de las AuNps obtenidas por Turkevich, donde los diámetros más frecuentes fueron 37, 27 y 45 nm. En el caso de las AuNps obtenidas por síntesis verde, los diámetros con mayor frecuencia fueron de 31 y 33 nm (Figura 15). Utilizando el programa informático “Image J”, se obtuvo un diámetro medio de $35,1 \pm 6,9$ nm para las nanopartículas sintetizadas por Turkevich, mientras que para las AuNps obtenidas por síntesis verde, el diámetro medio calculado fue de $31,7 \text{ nm} \pm 4,7\text{nm}$. Estos datos indican una mayor mono-dispersividad de las AuNps obtenidas por síntesis verde.

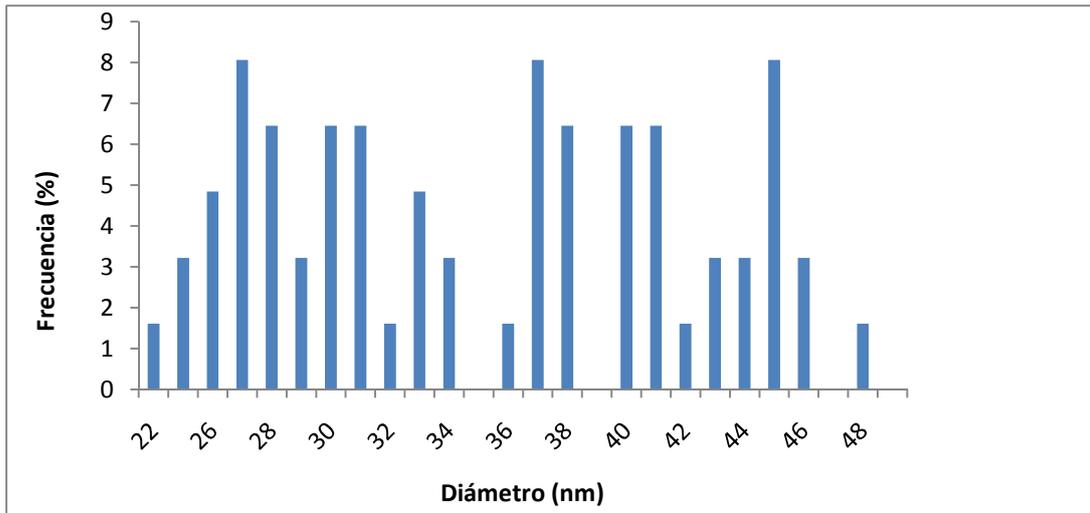


Figura 13. Histograma de frecuencia de los diámetros de las AuNps obtenidas por el método de Turkevich.

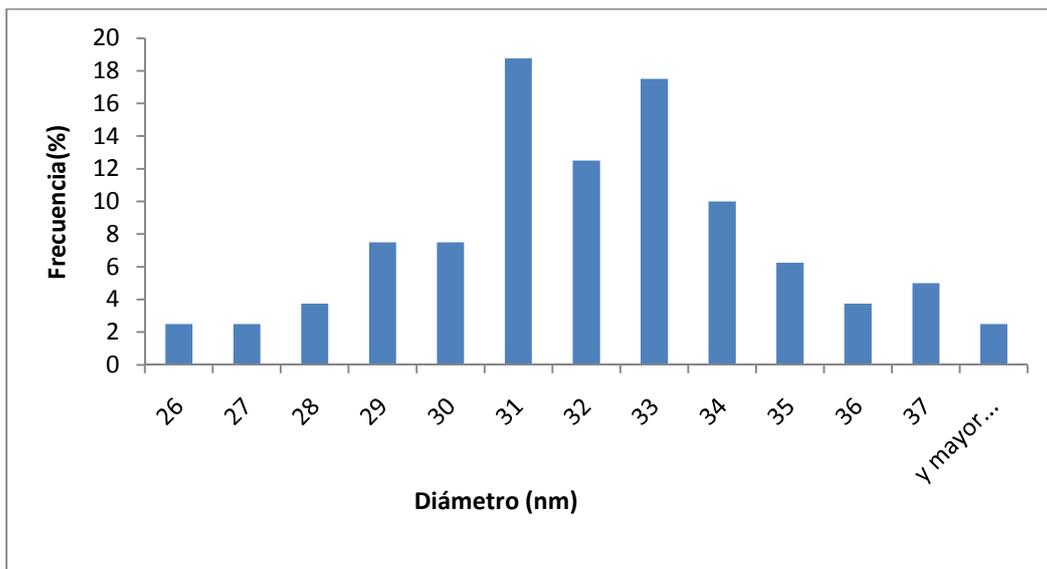


Figura 14. Histograma de frecuencia de los diámetros de las AuNps obtenidas por síntesis verde.

La disolución de las AuNps que se consiguió presentaba un color rojo claro, lo cual tiene sentido ya que las nanopartículas esféricas tienen el pico del SPR a una longitud de onda de alrededor de 520 nm, lo que da lugar a ese cambio de color [24].

Los espectros de absorbancia de las AuNps, muestran como el máximo de absorción del SPR aparece a 533 nm para el caso de las AuNps sintetizadas por Turkevich (Figura 15), mientras que se observa a 545 nm en la disolución de AuNps obtenidas por síntesis verde (Figura 16).

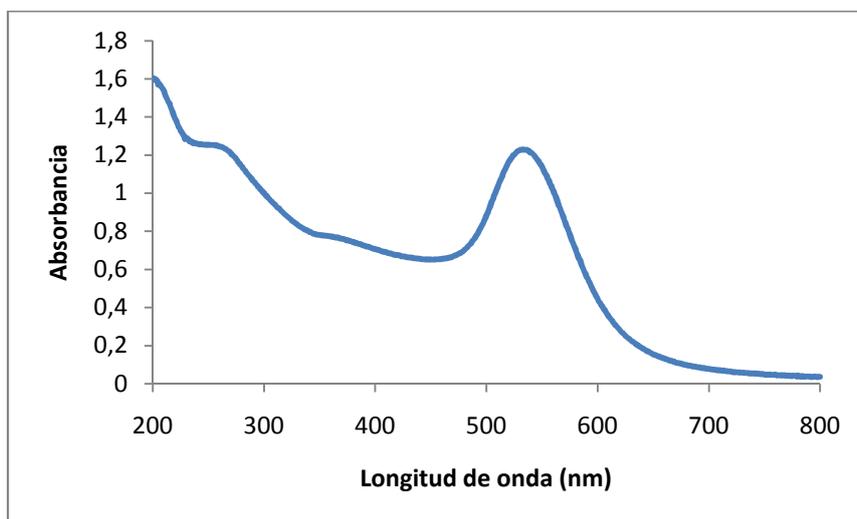


Figura 15. Espectro de absorbancia de las AuNps obtenidas por el método de Turkevich.

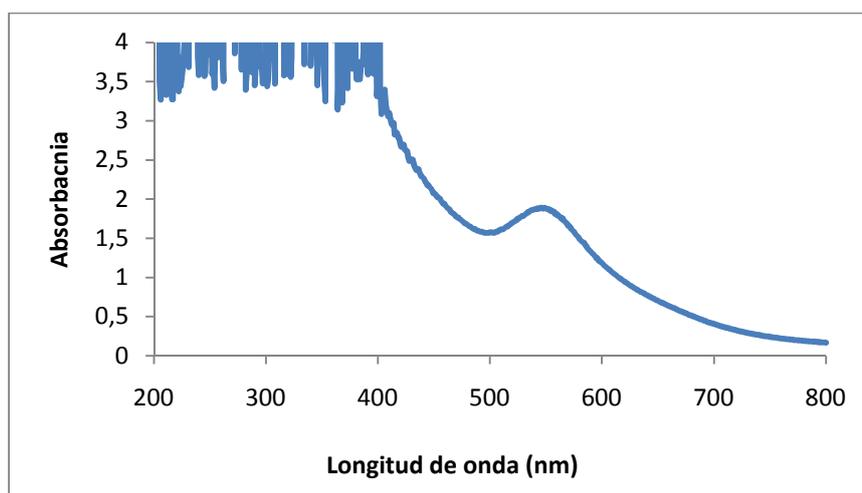


Figura 16. Espectro de absorbancia de las AuNps obtenidas por la síntesis verde.

Conociendo el diámetro medio de las nanopartículas y la absorbancia a la longitud de onda de máxima absorción, se ha podido calcular la concentración de AuNps con ayuda de las Ecuaciones 1 y 2. A partir de la Ecuación 1 y el diámetro medio de las AuNps determinado, se calculó un coeficiente de extinción molar de $6,66 \times 10^9$ y de $4,75 \times 10^9$ $M^{-1} \text{cm}^{-1}$ para la disolución de las AuNps sintetizadas por el método de Turkevich y por el método de la síntesis verde, respectivamente. Con este dato y la Ecuación 2, la concentración obtenida de la disolución de AuNps obtenida por el método de Turkevich resultó ser de $1,845 \times 10^{-10}$ M, mientras que la disolución de AuNps procedentes de la síntesis verde fue de $3,98 \times 10^{-10}$ M.

8.2 CARACTERIZACIÓN DE CLÚSTERES

Los GSH-AuNCs se han caracterizado registrando los espectros de absorción y fluorescencia. Como se puede observar en la Figura 17, la disolución de GSH-AuNCs presentaba un máximo de excitación a 394 nm y una banda de emisión con un máximo de intensidad a 610 nm. El espectro de absorción de esta disolución presenta una única banda de absorción con un máximo a 190 nm (Figura 18).

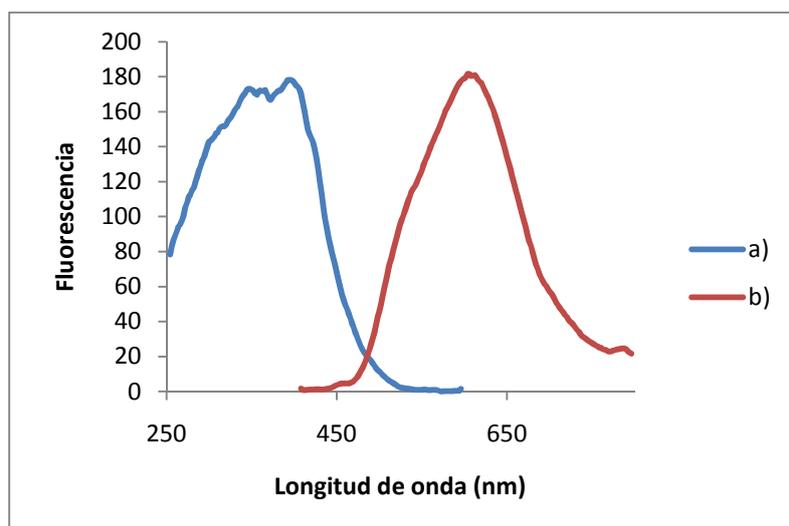


Figura 17. Espectro de excitación (a) y emisión (b) de la disolución de GSH-AuNCs.

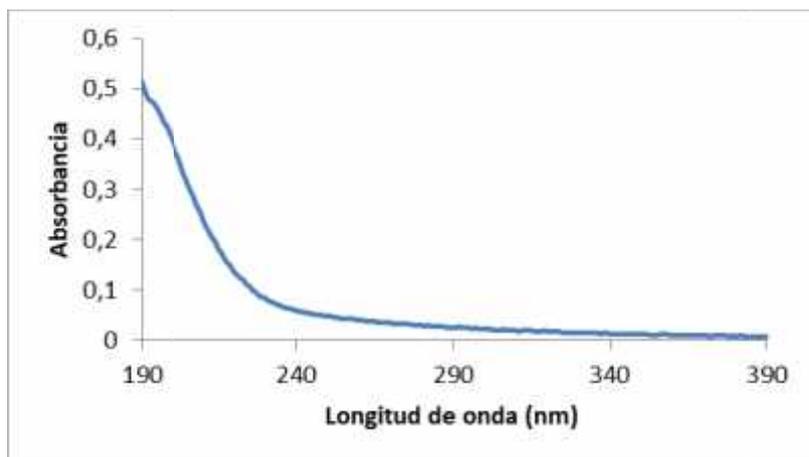


Figura 18. Espectro de absorción de la disolución de GSH-AuNCs.

8.3 CARACTERISTICAS OPTICAS DE LAS VITAMINAS E INFLUENCIA DEL pH.

Los espectros de absorción obtenidos para las vitaminas B₁ y B₁₂ se representan en las Figuras 19A y 19B, respectivamente. Como puede observarse, la vitamina B₁ presenta dos bandas estrechas de absorción con máximos a 238 y a 268 nm, mientras que la vitamina B₁₂ presenta tres bandas estrechas con máximos a 279, 361 y 551 nm. Ninguna de las dos vitaminas presenta fluorescencia en las condiciones de medida. La vitamina B₁ posee varios hetero-átomos anillo de pirimidina que junto con el libre giro del grupo tiazol favorecen procesos no-radiacionales. Por oxidación de la vitamina B₁ (p.e. con ferricianuro potásico) se cierran los anillos a través de un grupo amino formando una estructura (tiocromo) altamente fluorescente. Por su parte, la vitamina B₁₂ posee un ión Co³⁺ en su estructura, formando complejo con el anillo de corrina que no es fluorescente dado el paramagnetismo del ión.

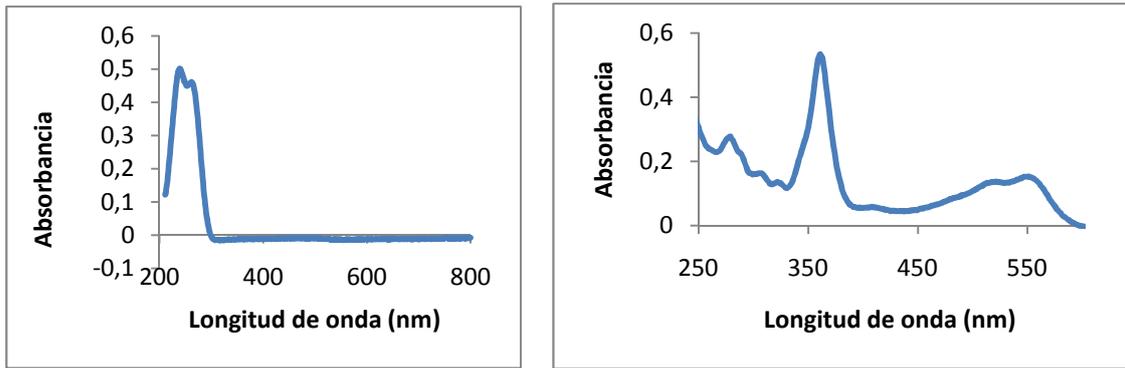


Figura 19. Espectros de absorbancia de las vitaminas B₁ (A) y B₁₂ (B).

El estudio de la influencia del pH sobre las características espectrales de las vitaminas (Figuras 20 y 21), puede apreciarse como la absorbancia de la vitamina B₁ decrece a medida que se aumenta el pH, diferenciándose claramente en el intervalo de pH 6-7,8 dos bandas de absorción con máximos a 235 y 274 nm. A la luz de estos resultados, en las experiencias siguientes se utilizó un pH = 6,9.

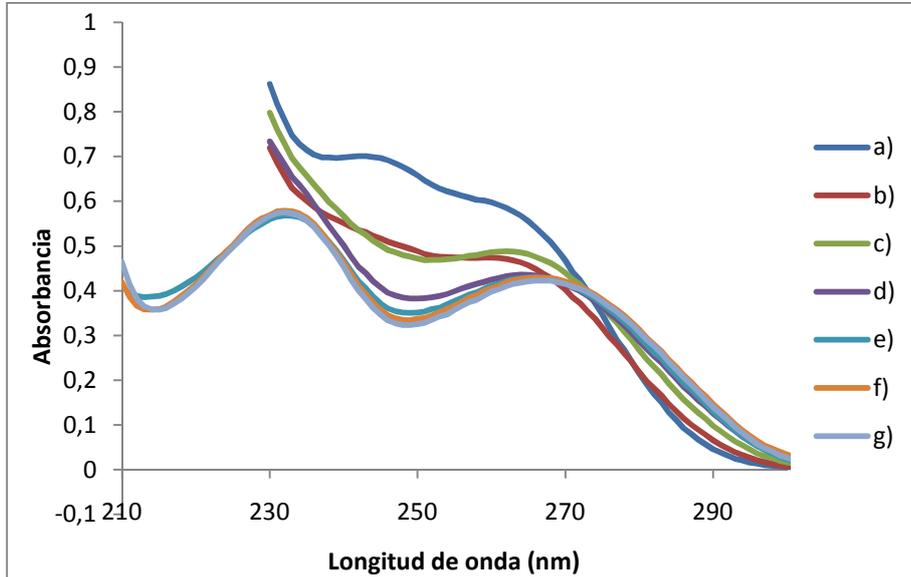


Figura 20. Efecto del pH sobre las características espectrales de la vitamina B₁: a) pH 3,5, b) pH 4,6, c) pH 4,9, d) pH 5,5, e) pH 5,9, f) pH 6,9 y g) pH 7,7.

El efecto del pH sobre las características espectrales de la vitamina B₁₂ fue marginal y sólo se observó un ligero aumento de la absorbancia con el aumento del pH (Figuras 21 y 22), resultado que concuerda con lo reportado en la bibliografía [54]. Para estudios posteriores se seleccionó un pH =6.

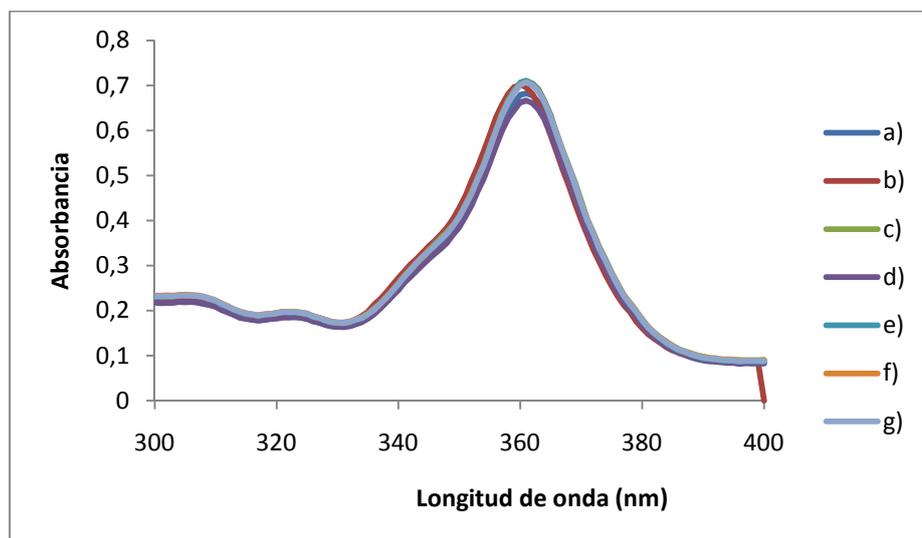


Figura 21. Efecto del pH sobre el espectro de absorción de la vitamina B₁₂: a) pH 3,5, b) pH 4,6, c) pH 4,9, d) pH 5,5, e) pH 5,9, f) pH 6,9 y g) pH 7,7.

La Figura 22 muestra la variación de absorbancia a 361 nm de la vitamina B₁₂ en función del pH: un ligero incremento a pH 4, para mantenerse después sensiblemente constante.

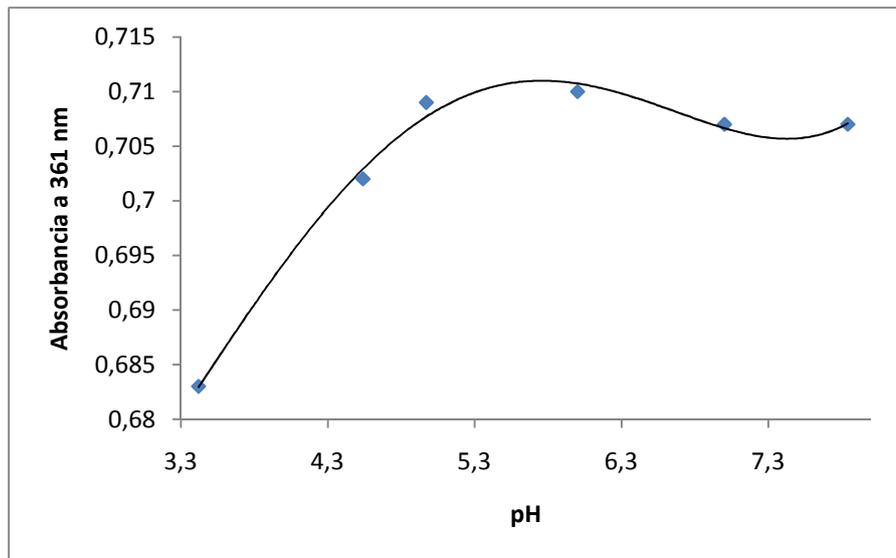


Figura 22. Influencia del pH sobre la absorción de la vitamina B₁₂ a 361nm.

8.4 ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ORO CON LAS VITAMINAS

Siguiendo el protocolo descrito en el apartado 7.4, se registraron los espectros de absorción de la mezcla de las AuNps con las vitaminas. En la Figura 23 se muestran los espectros de las mezclas de vitamina B₁ con diferentes concentraciones de AuNps: se observan los máximos de absorción característicos de la vitamina (232 y 266 nm, aproximadamente) y el máximo de SPR de las AuNps a 532 nm, en particular cuando su concentración es igual o superior a $9,2 \times 10^{-11} \text{M}$.

El aumento de la absorbancia en las bandas de la vitamina se justifica por la absorbancia creciente de las AuNps, como se muestra en las Figuras 24-26, para los máximos de la vitamina y las AuNps.

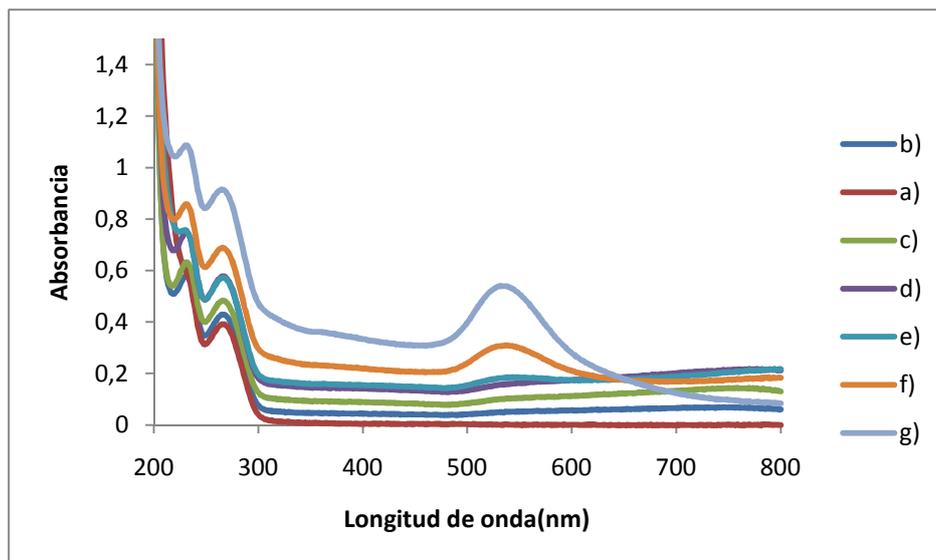


Figura 23. Espectros de absorción de las mezclas de vitamina B₁ y concentraciones crecientes de AuNps: a) 0 M AuNps, b) $1,8 \times 10^{-11}$ M AuNps, c) $3,7 \times 10^{-11}$ M AuNps, d) $5,5 \times 10^{-11}$ M AuNps, e) $7,4 \times 10^{-11}$ M AuNps, f) $9,2 \times 10^{-11}$ M AuNps, g) $1,1 \times 10^{-10}$ M AuNps. [Vitamina de 15 µg/mL].

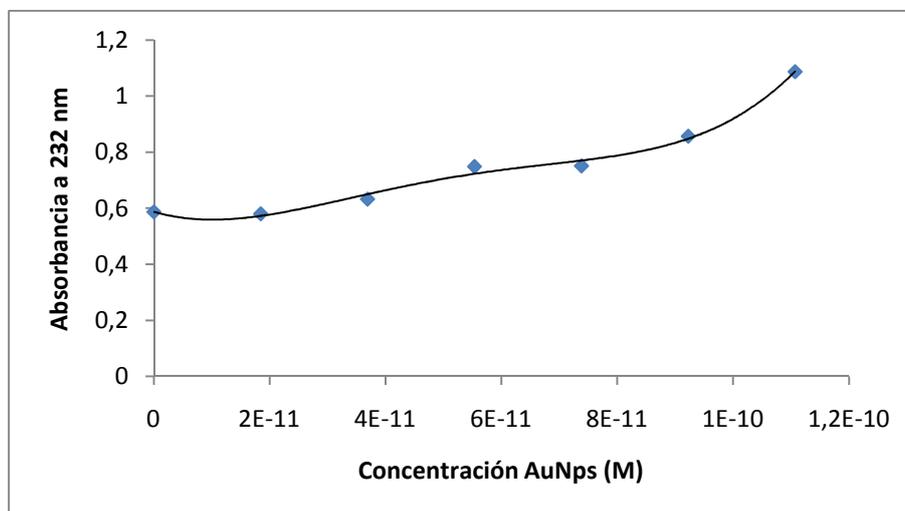


Figura 24. Absorbancia a 232 nm de las mezclas de vitamina B₁ y AuNps frente a la concentración de AuNps. La banda a 232 nm corresponde a la vitamina B₁.

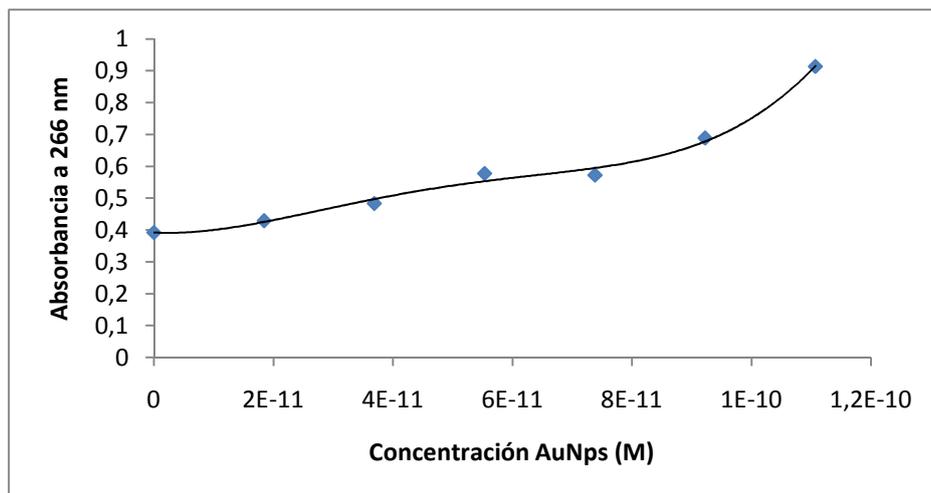


Figura 25. Absorbancia a 266 nm de las mezclas de vitamina B₁ y AuNps frente a la concentración de AuNps. La banda de absorción a 266 nm corresponde a la vitamina B₁.

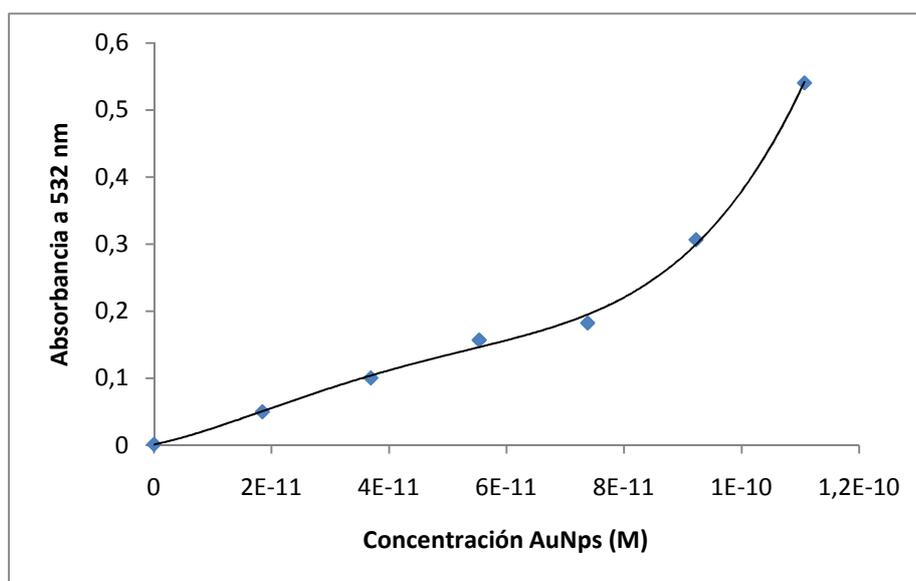


Figura 26. Absorbancia a 532 nm de las mezclas de vitamina B₁ y AuNps frente a la concentración de AuNps. La banda a 532 nm corresponde a las AuNps.

Un estudio similar realizado para la interacción de la vitamina B₁₂ con las AuNps, mostró un resultado análogo: no parece haber interacción entre las AuNps y la vitamina. Los resultados experimentales se recogen en las Figuras 27-29.

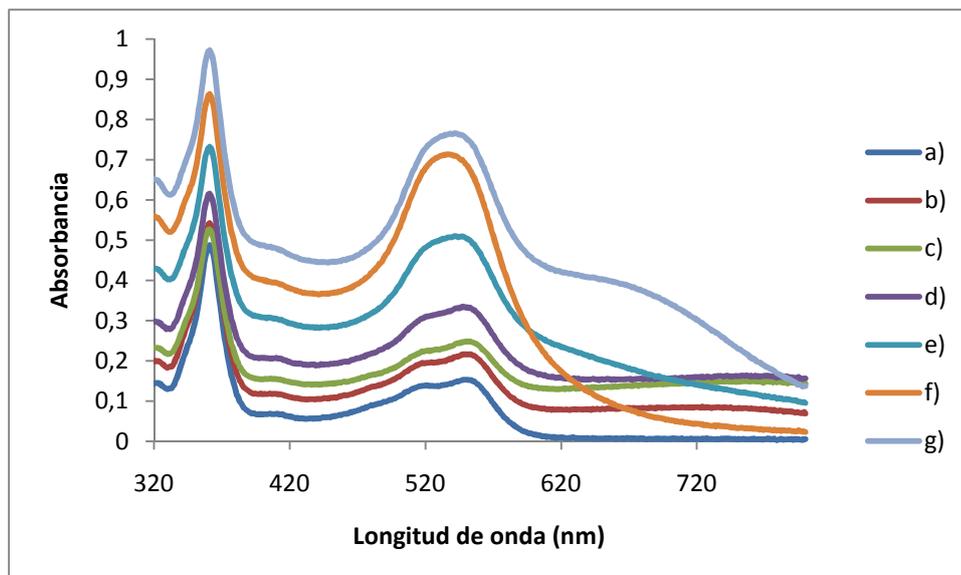


Figura 27. Espectros de absorción de las mezclas de vitamina B₁₂ con concentraciones crecientes de AuNps: a) 0 M AuNps, b) $1,8 \times 10^{-11}$ M AuNps, c) $3,7 \times 10^{-11}$ M AuNps, d) $5,5 \times 10^{-11}$ M AuNps, e) $7,4 \times 10^{-11}$ M AuNps, f) $9,2 \times 10^{-11}$ M AuNps, g) $1,1 \times 10^{-10}$ M AuNps. [Vitamina de 15 μ g/mL].

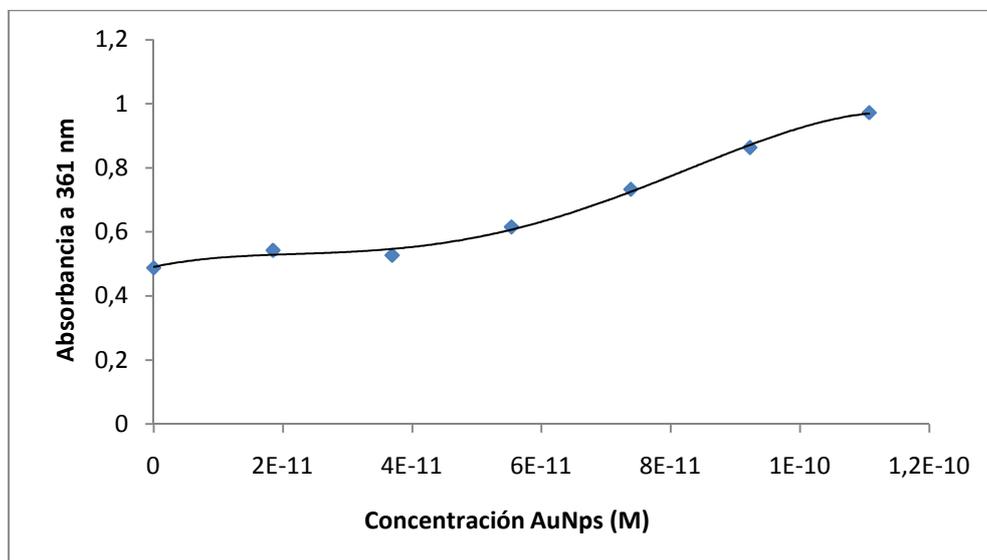


Figura 28. Absorbancia a 361 nm de las mezclas de vitamina B₁₂ y AuNps frente a la concentración de AuNps. La banda a 361 nm corresponde a la vitamina B₁₂.

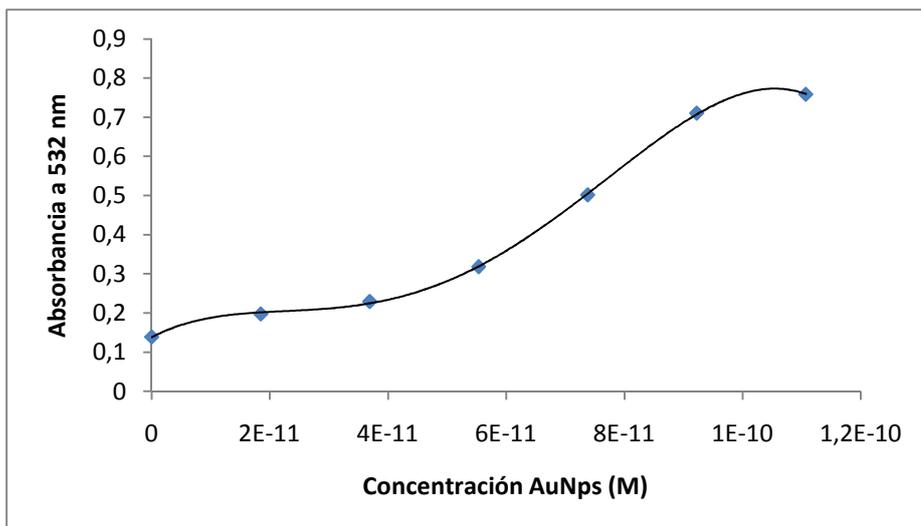


Figura 29. Absorbancia a 532 nm de las mezclas de vitamina B₁₂ y AuNps frente a la concentración de AuNps. La banda a 532 nm corresponde a las AuNps.

Una posible explicación por la que las AuNps no han interactuado con las vitaminas se atribuye a la presencia del citrato fuertemente unido a las AuNps, lo que puede impedir o dificultar la interacción del grupo S de la vitamina B₁ y del grupo cianuro de la vitamina B₁₂. Esta misma justificación aparece en el trabajo de Shrivias [1], donde utilizando también el citrato como agente reductor no observó interacción con la vitamina B₁. Dada la limitación de tiempo, no se ensayaron las AuNps obtenidas por síntesis verde. Es de esperar que estas AuNps interactúen eficazmente con las vitaminas, dado que no se utilizó citrato en la reducción, siendo en este caso los polifenoles presentes en el té los responsables de la reducción de la sal de oro. En futuros proyectos se abordará este estudio.

A continuación detallaremos los resultados obtenidos con los clústeres de oro.

8.5 EFECTO DEL pH SOBRE LOS CLÚSTERES DE ORO

La influencia del pH sobre el espectro de fluorescencia de los GSH-AuNCs se recoge en las Figuras 30 y 31. Como puede apreciarse, el pH no modifica significativamente las características espectrales de los GSH-AuNCs, observándose las dos bandas de emisión a 420 nm y 615 nm. La máxima fluorescencia se observa a pH 5,9. Para estudios posteriores se seleccionó este pH empleando una reguladora fosfato 0,1 M.

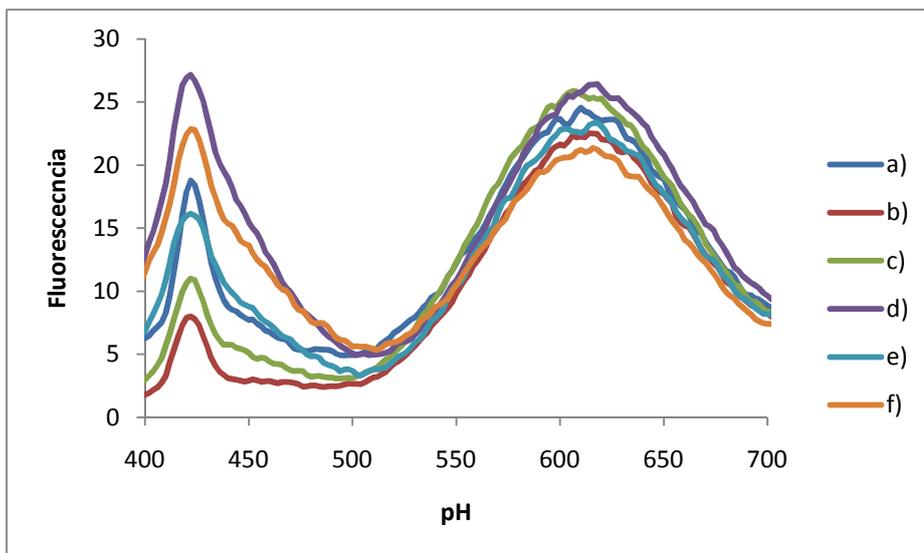


Figura 30. Efecto del pH sobre los espectros de emisión de los GSH-AuNCs: a) pH 3,5, b) pH 4,6, c) pH 5,6, d) pH 5,9, e) pH 6,9 y f) pH 7,7.

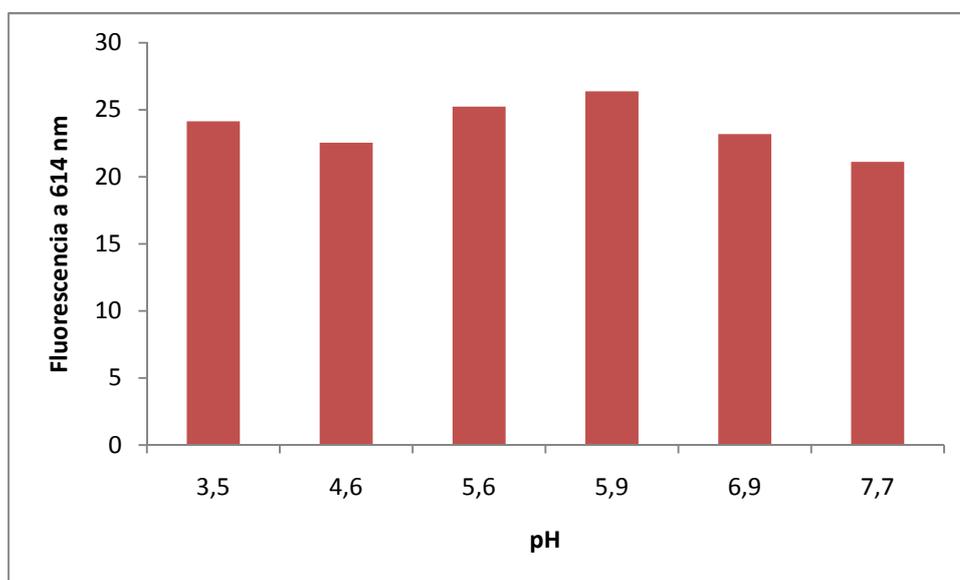


Figura 31. Intensidad de fluorescencia de los GSH-AuNCs a 614 nm en función del pH.

8.6 ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE LOS CLÚSTERES CON LAS VITAMINAS

Para evaluar la interacción de los GSH-AuNCs con la vitamina B₁, se siguió el protocolo descrito en el apartado 7.5. En la Figura 32 se muestra el espectro de emisión de los GSH-AuNCs en ausencia y en presencia de GSH-AuNCs y, como se puede comprobar, no hay evidencia de cambios espectrales que indiquen que haya tenido lugar algún tipo de interacción. En el Anexo se incluyen datos espectrales con concentraciones diferentes de GSH-AuNCs y vitamina B₁.

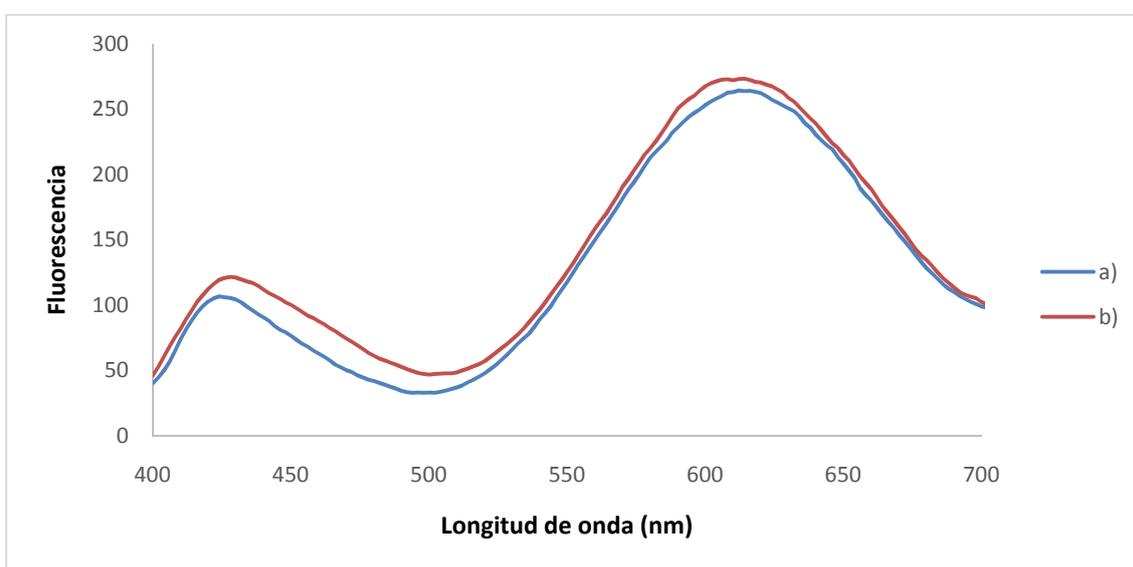


Figura 32. Espectros de emisión de 1,1 mL de GSH-AuNCs en ausencia (a) y presencia (b) de vitamina B₁. [Vitamina B₁ =15 µg/mL]

De forma análoga, para la vitamina B₁₂, se pudo comprobar que la presencia de la misma provoca la desactivación de la fluorescencia de los GSH-AuNCs (Figura 34), aunque no se observa ningún desplazamiento espectral. Esta inhibición de la fluorescencia indica que existe una interacción entre los GSH-AuNCs y la vitamina B₁₂. Este hecho también se ha observado en el estudio de Samari empleando BSA-AuNCs [49].

Como puede verse en la Figura 33, donde se empleó la mayor cantidad de GSH-AuNCs (1,1mL), la concentración de vitamina de 15 $\mu\text{g/mL}$ producía un quenching del 19,2% aproximadamente, ya que la fluorescencia a 614 nm, donde se localizan los picos, descendió desde 254,3 a 205,57, es decir, disminuyó 48,5 unidades de fluorescencia.

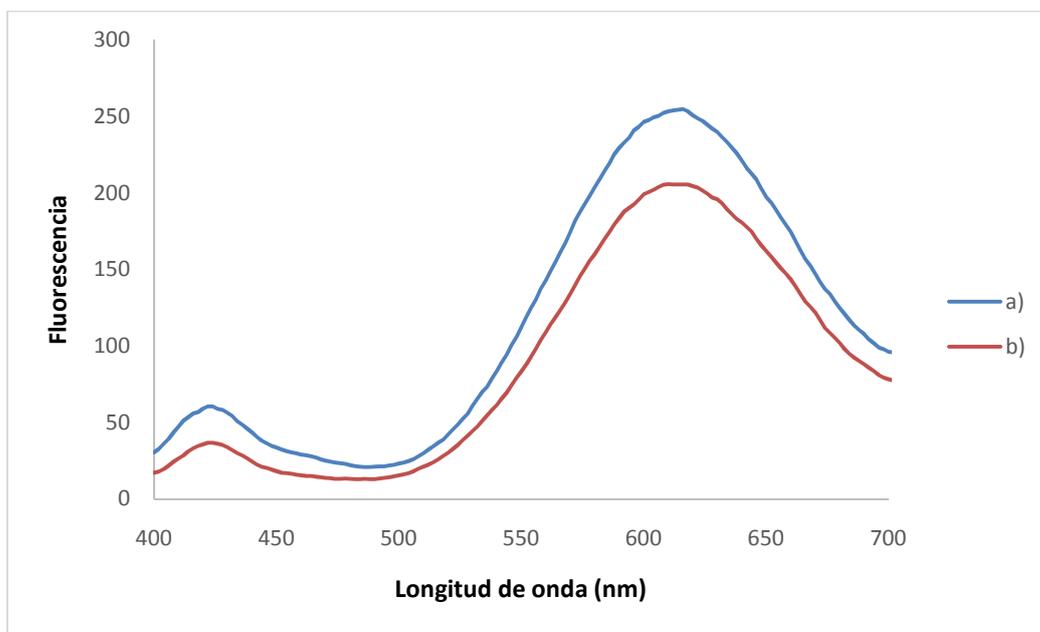


Figura 33. Espectros de emisión de 1,1 mL de GSH-AuNCs en ausencia (a) y presencia (b) de vitamina B₁₂. [Vitamina B₁₂ = 15 $\mu\text{g/mL}$]

La inhibición de la fluorescencia de los GSH-AuNCs se puede utilizar con fines analíticos para la determinación de la vitamina: se obtuvieron los espectros de emisión de las disoluciones en las que se aumentó de manera progresiva la cantidad de vitamina (Figura 34), observándose un decrecimiento gradual de la fluorescencia de la disolución de GSH-AuNCs.

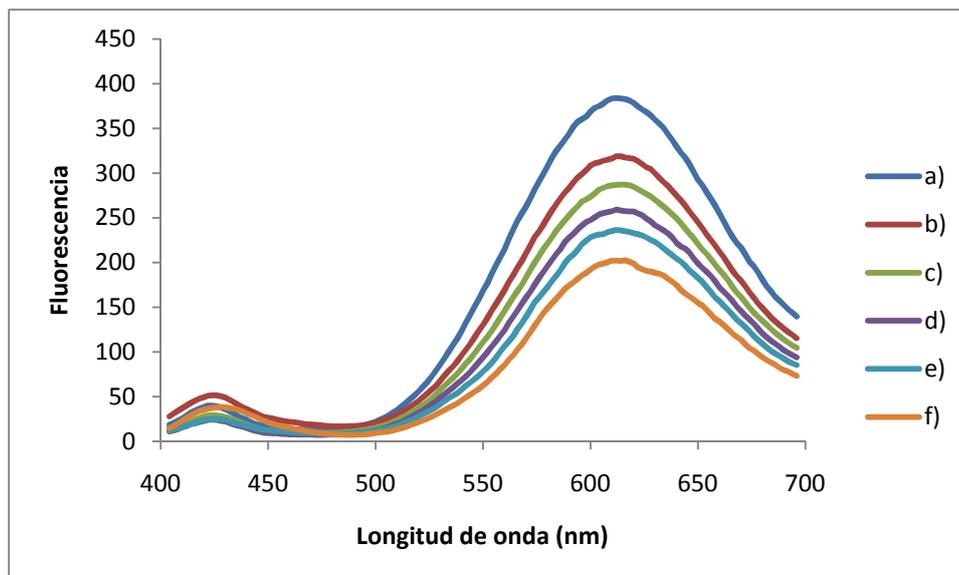


Figura 34. Espectros de emisión de fluorescencia de los GSH-AuNCs con concentraciones crecientes de vitamina: a) 0 $\mu\text{g/mL}$, b) 12 $\mu\text{g/mL}$, c) 24 $\mu\text{g/mL}$, d) 36 $\mu\text{g/mL}$, e) 48 $\mu\text{g/mL}$, f) 60 $\mu\text{g/mL}$.

En la Tabla 4 se recogen los datos de fluorescencia a 614 nm en función de la concentración de vitamina. A partir de estos resultados, se tomaron los valores de fluorescencia a 614 nm y se representó gráficamente la línea de calibrado $1/F$ vs concentración de vitamina B_{12} (Figura 35).

Tabla 4. Valores de fluorescencia obtenidos para cada concentración de vitamina B_{12} .

Concentración de vitamina B_{12} ($\mu\text{g/mL}$)	Fluorescencia (F) a 614 nm	$1/F$
0	383,4	0,0026
12	316,2	0,0032
24	286,3	0,0035
36	257,5	0,0039
48	235,1	0,0043
60	202,0	0,0050

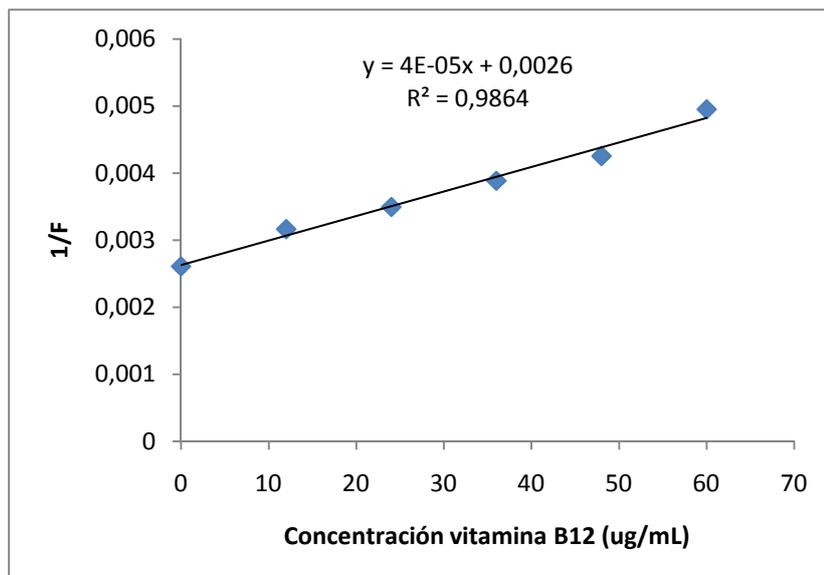


Figura 35. Curva de calibrado externo para la determinación de vitamina B₁₂.

Se determinaron los límites de detección y de cuantificación. El límite de detección (calculado como $L.D. = 3 \frac{B}{p}$, donde B es la desviación estándar del blanco y p la pendiente de la línea de calibrado) resultó ser de 7 $\mu\text{g/mL}$, mientras que el límite de cuantificación (calculado como $L.Q. = 10 \frac{B}{p}$) resultó ser de 23 $\mu\text{g/mL}$ vitamina B₁₂.

9.7. MECANISMO DE INHIBICION DE LA FLUORESCENCIA

Observando los espectros de absorción de la vitamina B₁₂ y el espectro de emisión de los GSH-AuNCs, se puede comprobar que existe un solapamiento espectral entre ambos, en la región de 540-590 nm (Figura 36). Este solapamiento sugiere que puede darse una transferencia de energía resonante (FRET) entre los GSH-AuNCs (que actúan como donores) y la vitamina B₁₂ (que actúa como aceptora, absorbiendo la radiación emitida por los GSH-AuNCs).

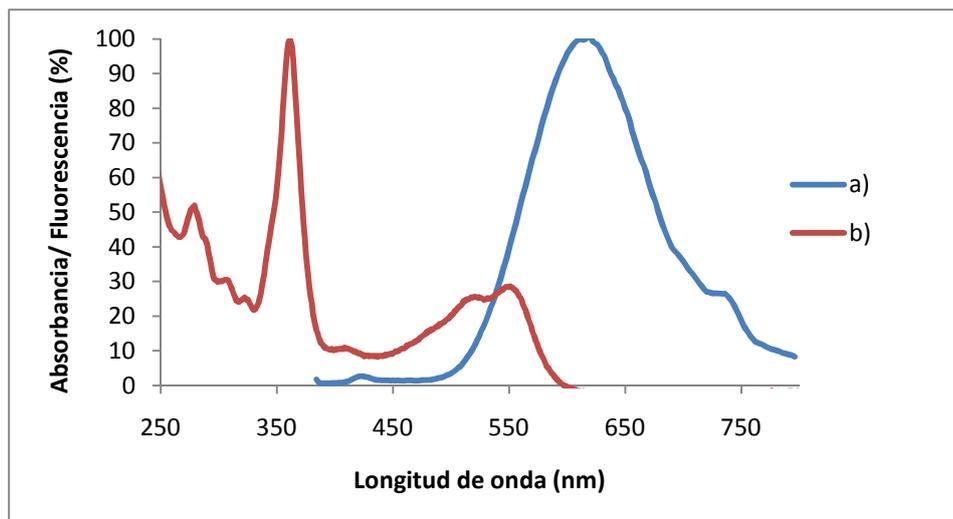


Figura 36. Espectro de emisión de los GSH-AuNCs (a) y espectro de absorción de la vitamina B₁₂ (b).

Esta transferencia de energía está favorecida por la proximidad entre la vitamina B₁₂ y los GSH-AuNCs a través de la interacción del grupo ciano, que en este caso no estaría impedida como en el caso de las AuNPs, ya que los GSH-AuNCs no poseen grupos citrato que repelería electrostáticamente a dichos grupos.

8.7 APLICACIÓN DEL MÉTODO DESARROLLADO A LA DETERMINACIÓN DE VITAMINA B₁₂ EN MUESTRAS REALES

8.7.1 Cápsulas de Trofalgon

La concentración de vitamina B₁₂ en la disolución 1 de la muestra, tras representar gráficamente los datos de fluorescencia medidos a 610 nm (Tabla 5) ($F_0 - F$ frente a la raíz cuadrada de la concentración de vitamina B₁₂ añadida, véase la Figura 37) resultó ser de 15,71 $\mu\text{g/mL}$. Para las otras dos réplicas, los valores obtenidos fueron de 12,81 y de 14,66 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Los datos experimentales obtenidos para las tres réplicas se recogen en las Tablas 5, 6 y 7 y los calibrados en las Figuras 37, 38 y 39.

Refiriendo estos datos a los especificados por el fabricante (1000 $\mu\text{g}/\text{cápsula}$), se obtuvo una media de $912,64 \pm 88,49 \mu\text{g}/\text{mL}$ de vitamina B₁₂, calculándose un error experimental del 8,74%.

Tabla 5. Datos experimentales utilizados en la preparación de la línea de calibrado por adiciones estándar para la réplica 1 de Trofalgon.

Concentración patrón vitamina ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Fluorescencia a 610 nm	Raíz cuadrada de la concentración	F-F ₀
0	398,7	0	130,7
6,4	328,3	2,5	60,3
12,8	272,7	3,6	4,7
19,2	256,0	4,4	-12,0
25,6	229,2	5,1	-38,8

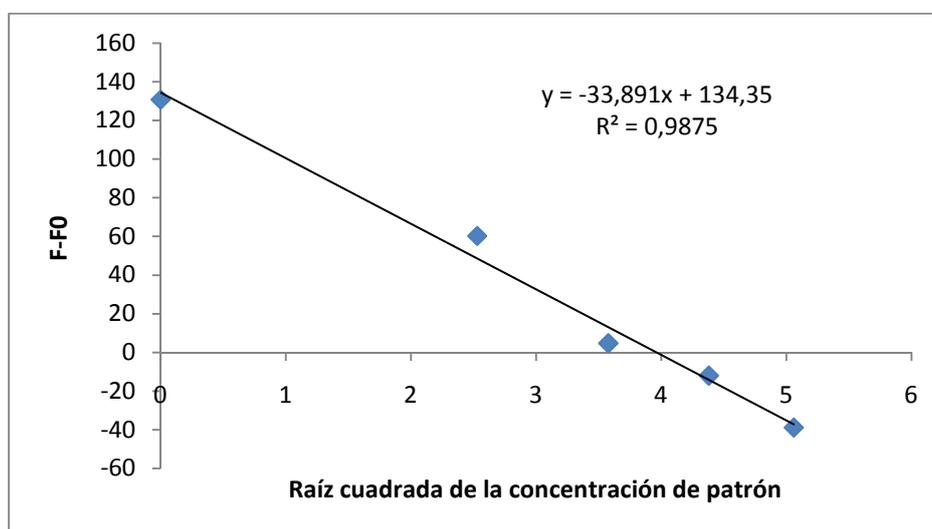


Figura 37. Línea de calibrado por adiciones estándar de la réplica 1 de Trofalgon.

Tabla 6. Datos experimentales utilizados en la preparación de la línea de calibrado por adiciones estándar para la réplica 2 de Trofalgon.

Concentración patrón vitamina ($\mu\text{g/mL}$)	Fluorescencia a 610 nm	Raíz cuadrada de la concentración	F-F ₀
0	337,5	0	69,5
6,4	307,5	2,5	39,5
12,8	265,9	3,6	-2,1
19,2	247,4	4,4	-20,6
25,6	232,7	5,1	-35,3

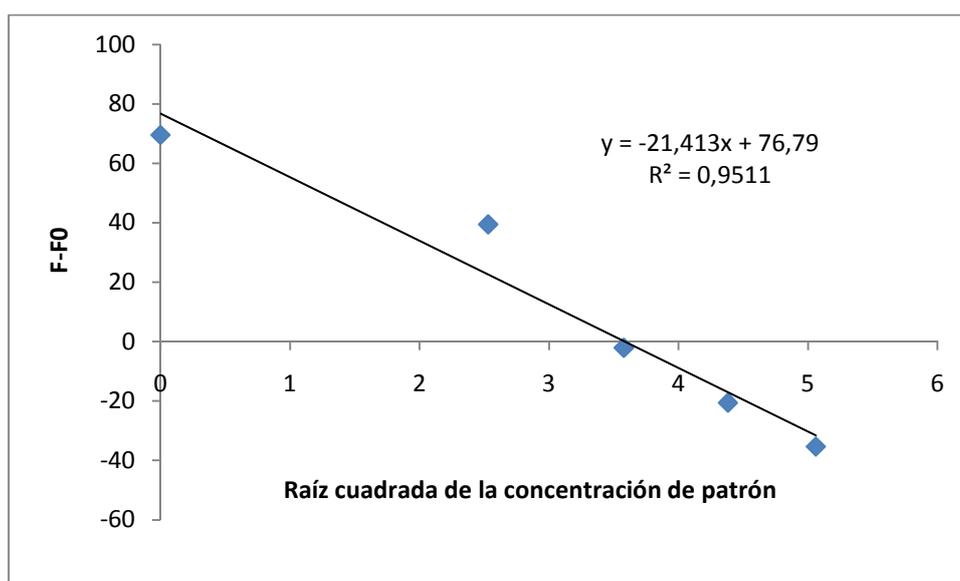


Figura 38. Línea de calibrado por adiciones estándar de la réplica 2 de Trofalgon.

Tabla 7. Datos experimentales utilizados en la preparación de la línea de calibrado por adiciones estándar para la réplica 3 de Trofalgon.

Concentración patrón vitamina($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Fluorescencia a 610 nm	Raíz cuadrada de la concentración	F-F ₀
0	375,7	0	107,7
6,4	316,0	2,5	48,0
12,8	291,1	3,6	23,1
19,2	249,4	4,4	-18,6
25,6	217,1	5,1	-50,9

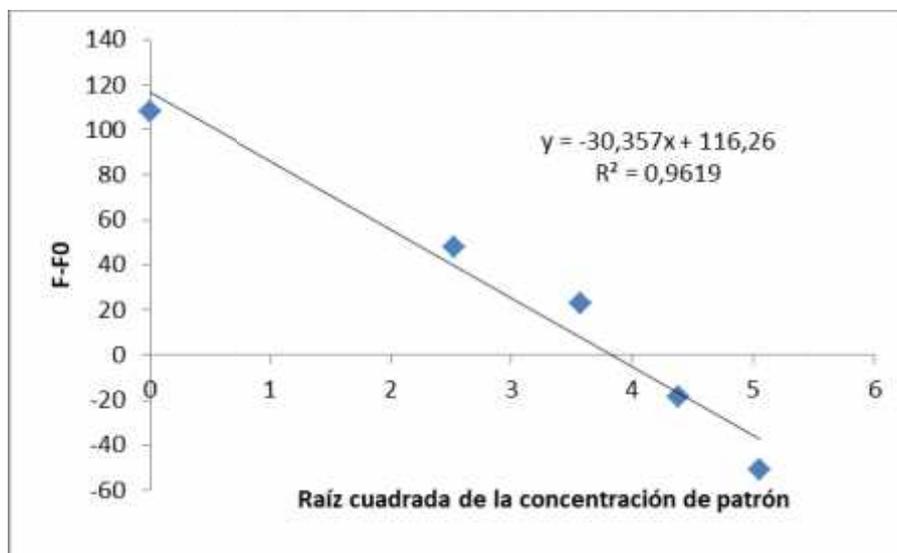


Figura 39. Línea de calibrado por adiciones estándar de la réplica 3 de Trofalgon.

8.7.2 Marnys Vitamina B₁₂ líquida

La determinación de la vitamina en esta muestra se llevó a cabo empleando el método de adiciones estándar, cuyos datos experimentales se recogen en la Tabla 8 y en la Figura 40. La línea de calibrado se preparó representando la relación $(F-F_0) / F_0$ vs concentración de vitamina B₁₂, encontrándose una concentración de 15,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de vitamina.

Comparando este dato con el reportado por el fabricante (5 µg/mL), el elevado error experimental obtenido (>200%) es inadmisibles. En el envase se especifica que el producto contiene, además de la vitamina B₁₂ otros ingredientes como fructosa, sorbato potásico, aroma y ácido cítrico. Entre ellos, es posible que la fructosa interactúe con los GSH-AuNCs provocando la desactivación de la fluorescencia y, por tanto, provocando un error por exceso en la determinación de la vitamina. De hecho, está reportado en la bibliografía la interacción de azúcares (p.e. glucosa) con clústeres de oro con una elevada afinidad, a través del oxígeno (rico en electrones) del grupo -OH del azúcar, el cual dona densidad electrónica a los orbitales metálicos del clúster, creando un enlace Au-O estable. Además, el clúster puede también jugar un papel como aceptor de protones y formar enlaces de H con el grupo hidroxilo del azúcar (Au.....H-O) [55]. Por otra parte, el sorbato potásico es una molécula fluorescente que cuando se excita a 380 nm presenta una banda de emisión a 485 nm [56, 57]. En la Figura 41, se puede observar, que excitando a 385 nm (longitud de onda de excitación de los GSH_AuNCs), aparece una banda ancha de fluorescencia a 475 nm, probablemente del sorbato potásico presente en la muestra. Esta banda de fluorescencia provoca un solapamiento con la banda de emisión de los GSH-AuNCs, interfiriendo notablemente en la señal de la muestra.

Por otra parte, el límite de detección de la técnica es superior a la cantidad de vitamina B₁₂ presente en la muestra. Es evidente, pues, que sería necesario llevar a cabo un estudio de la selectividad del método y clarificar cuál (o cuales) de los componentes de la muestra y qué mecanismos provocan la desactivación de la fluorescencia de los GSH-AuNCs para, finalmente, buscar alternativas para eliminar dichas interferencias. Asimismo, sería necesario llevar a cabo un proceso de pre-concentración de la muestra. En este sentido se podrían emplear cartuchos de extracción en fase sólida, lo que presentaría dos ventajas importantes: por un lado eliminaríamos las posibles interferencias y por otra parte, nos permitiría pre-concentrar la muestra. Este estudio requiere un volumen mayor de trabajo que el reportado en esta Memoria.

Tabla 8. Datos experimentales utilizados en la preparación de la línea de calibrado por adiciones estándar para la muestra de Marnys Vitamina B₁₂ líquida.

Concentración patrón vitamina B ₁₂ (µg/mL)	Fluorescencia a 610 nm	(F-F ₀)/F ₀
0	434,7	0,2
0,5	423,7	0,1
1	411,6	0,1
1,5	404,0	0,09
2	396,1	0,07

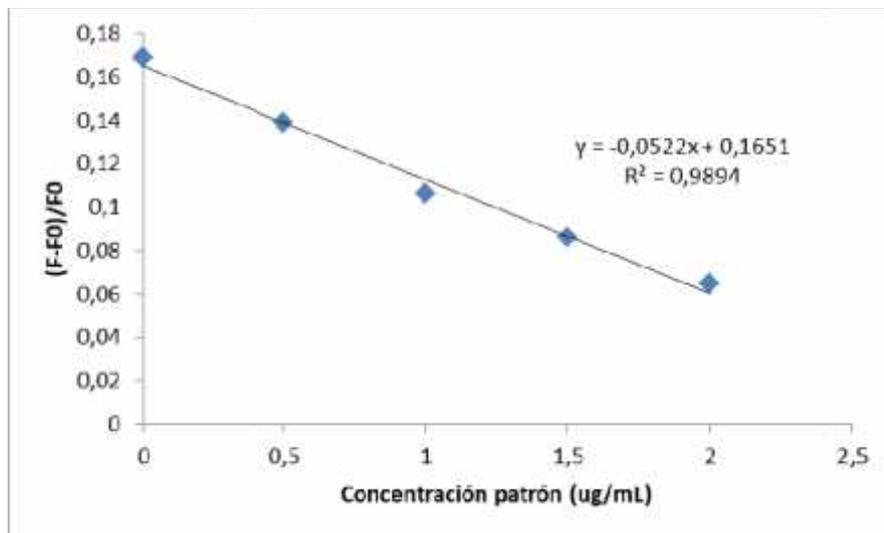


Figura 40. Línea de calibrado por adiciones estándar de la muestra de Marnys Vitamina B₁₂ líquida.

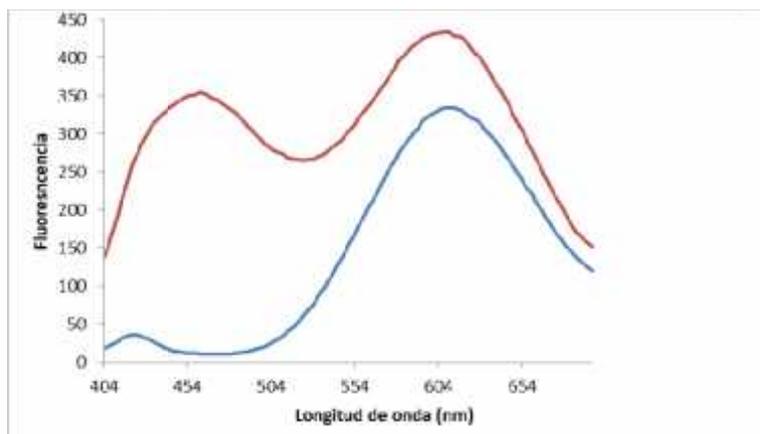


Figura 41. Espectros de la disolución de GSH-AuNCs (curva azul) en ausencia de muestra y de la disolución de GSH-AuNCs en presencia la muestra de Marnys Vitamina B₁₂ líquida (curva roja).

8.7.3 Optovite B12 1000 µg

Para esta muestra se construyeron dos curvas de calibrado por adiciones estándar, una para la muestra diluida 12,5 veces (1mL procedente de la dilución 1:2,5 llevado a 5 mL), y otra para la que la se diluyó 25 veces (1mL procedente de la dilución 1:5 llevado a 5 mL).

Para la muestra diluida 12,5 veces, se recogen los datos experimentales en la Tabla 9 y representados gráficamente, F_0-F/F frente a la concentración de vitamina B₁₂, en la Figura 42. El calibrado por adiciones estándar dio un resultado de 40,64 µg/mL de vitamina en la muestra diluida. Operando de igual forma para la muestra diluida 25 veces, la concentración resultó ser de 16,87 µg/mL. Los datos experimentales obtenidos para esta muestra se recogen en la Tabla 10 y la Figura 43.

Teniendo en cuenta las diluciones realizadas, se obtiene una concentración media de vitamina B₁₂ en el Optovite 464.9 ± 60.95 µg/mL, la cual comparada con la reportada por el fabricante en el envase (500 µg/mL) presenta un error aceptable del 7%.

Tabla 9. Datos experimentales utilizados en la preparación de la línea de calibrado por adiciones estándar para la muestra de Optovite diluida 12,5 veces.

Concentración patrón vitamina B ₁₂ (µg/mL)	Fluorescencia a 610 nm	(F ₀ -F)/F
0	205,2	0,6
12	188,1	0,8
24	166,2	1,0
36	158,4	1,1
48	140,8	1,4

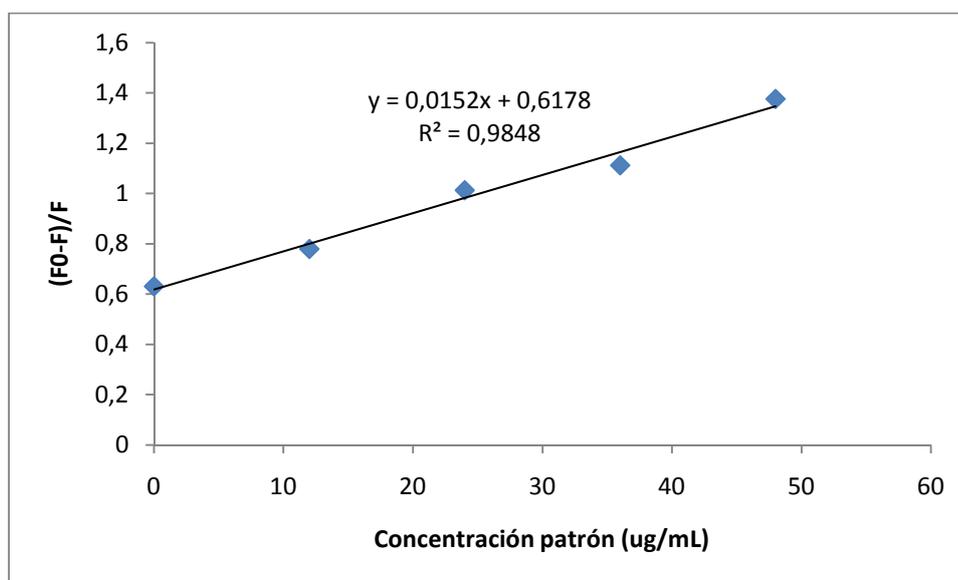


Figura 42. Línea de calibrado por adiciones estándar de la muestra de Optovite diluida 12,5 veces.

Tabla 10. Datos experimentales utilizados en la preparación de la línea de calibrado por adiciones estándar para la muestra de Optovite diluida 25 veces.

Concentración patrón vitamina B ₁₂ (µg/mL)	Fluorescencia a 610 nm	(F ₀ -F)/F
0	273,1	0,4
12	248,8	0,5
24	237,6	0,6
36	211,1	0,8
48	199,6	0,9

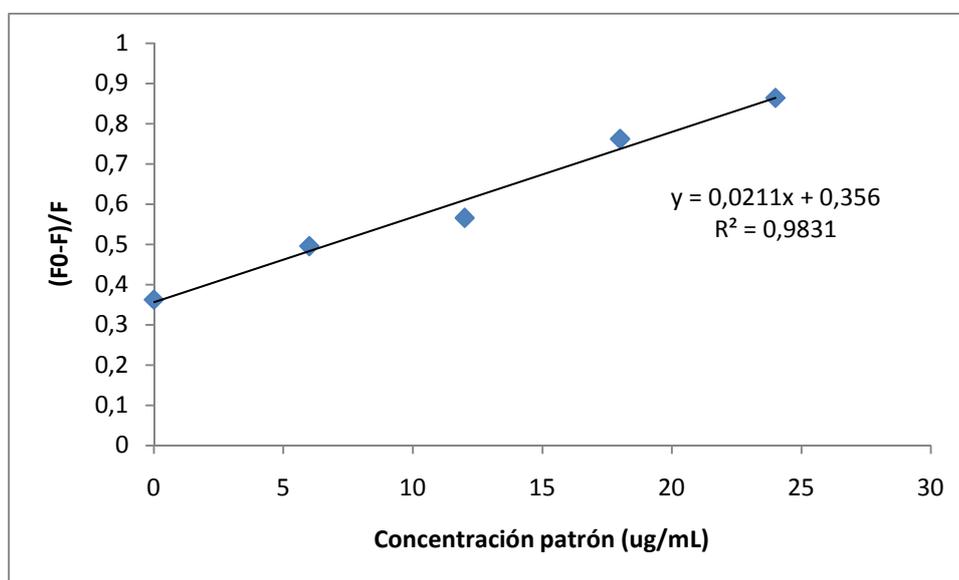


Figura 43. Línea de calibrado por adiciones estándar de la muestra de Optovite diluida 25 veces.

Resumiendo: Los resultados obtenidos en la determinación de vitamina B₁₂ empleando GSH-AuNCs en las tres muestras se resumen en la Tabla 11.

Tabla 11. Resultados obtenidos en la determinación de vitamina B₁₂ en los diferentes suplementos.

Muestra	Calibrado adiciones estandar	Concentración determinada	Concentración etiquetada por fabricante	Error relativo
Trofalgon	F-F ₀ vs raíz cuadrada de la concentración	912,64 µg/cápsula	1000 µg/cápsula	8.74%
Marnys Vitamina B12 líquida	(F-F ₀)/F ₀ vs concentración	15,81 µg/mL	5 µg/mL	N
Optovite 1000µg	(F ₀ -F)/F vs concentración	464,9 µg/mL	500 µg/mL	7%

La representación gráfica de la ecuación de Stern-Volmer para la desactivación de la fluorescencia de los GSH-NCs en presencia de vitamina B₁₂ se ha llevado a cabo representando de forma diferente los datos de fluorescencia y de concentración. La ecuación básica de Stern-Volmer para la desactivación dinámica de la fluorescencia (desactivación del estado excitado de los GSH-NCs) sería:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}[Q]$$

en la que F₀ es la fluorescencia de los GSH-NCs en ausencia de vitamina B₁₂, K_{SV} es la constante de Stern-Volmer y es una medida de la eficiencia de la desactivación; finalmente, [Q] es la concentración de agente desactivante, en este caso la vitamina B₁₂. La representación gráfica de F₀/F vs [Q] sería una línea recta, de cuya pendiente se obtiene el valor de K_{SV}. Asimismo, se puede definir una ecuación similar a la anterior para la desactivación estática, debida a la interacción de la vitamina B₁₂ con los GSH-AuNCs en el estado fundamental:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_q[Q]$$

En este caso, la constante de la ecuación, K_q, ya no es la constante de Stern-Volmer y su significado es el de una constante de asociación GSH-AuNCs-vitamina.

Existen varios factores que pueden participar en un proceso de desactivación de la fluorescencia. Algunos de ellos son los siguientes:

- a) La accesibilidad del desactivante a los centros de emisión de fluorescencia puede estar estéricamente limitada
- b) La especie fluorescente puede tener diferentes centros emisores con rendimientos cuánticos diferentes
- c) La especie desactivante no se encuentra en la “esfera de acción” de la especie luminiscente
- d) Se puede dar simultáneamente la desactivación estática y la dinámica
- e) Presencia en la muestra de más de un agente desactivante con mecanismos de acción diferentes

Por tanto, el proceso de desactivación de la fluorescencia es complejo y, además, depende del entorno de la especie fluorescente. Por ello, la representación gráfica de las anteriores ecuaciones no resulta siempre una línea recta y se pueden derivar ecuaciones que tengan en cuenta alguno de los anteriores factores [58] y llevar a cabo operaciones matemáticas para linealizar las gráficas. En nuestros estudios hemos buscado aquella representación que permitiese obtener una relación lineal entre la señal fluorescente de los GSH-AuNCs y la concentración de vitamina. La explicación sobre el tipo de representación para cada tipo de muestra analizada queda fuera del objeto de este trabajo, pero sería muy interesante abordar el estudio, en particular, porque las especies fluorescentes son GSH-AuNCs.

Analizando la muestra de “Optovite”, puede verse como la determinación de la cantidad de vitamina es mucho más exacta que en el resto de muestras, y esto es porque esta muestra solo contiene vitamina B₁₂. Sin embargo, Optovite contiene pequeñas cantidades de cloruro sódico (ver contenido en el punto 12.4 del anexo), y estas sales probablemente interfirieran en la fluorescencia emitida por los GSH-AuNCs, provocando que la determinación no fuera tan exacta como pudiera desearse.

9 CONCLUSIONES

- Se han sintetizado AuNps usando como agentes reductores citrato (método de Turkevich) y compuestos del té negro (síntesis verde) y clústeres de oro (GSH-AuNCs) empleando L-glutathione como ligando.
- Las AuNps se caracterizaron espectrofotométricamente (absorción UV-Vis) y morfológicamente por microscopía de transmisión electrónica (TEM), determinándose su diámetro, el coeficiente de extinción molar de las AuNps y calculando la concentración de las disoluciones obtenidas. Los GSH-AuNCs se caracterizaron fluorimétricamente, obteniéndose sus espectros de excitación y emisión, así como las longitudes de onda de máxima excitación y emisión.
- El estudio de la interacción de las AuNps (método de Turkevich) con las vitaminas B₁ y B₁₂ mostró que no había una interacción con potencial analítico para la determinación de las mismas, debido a la repulsión electrostática entre los grupos citrato y los grupos “S” (vitamina B₁) y “CN” (vitamina B₁₂), ricos en carga negativa.
- No se observó interacción con potencial analítico entre los GSH-AuNCs y la vitamina B₁, pero sí con la vitamina B₁₂, lo que permitió desarrollar un método fluorimétrico para la determinación de la misma en muestras reales.
- Se determinó con éxito la concentración de vitamina B₁₂ en las muestras de “Trofalgon” y “Optovite 1000 µg”, con un error menor del 10% en ambos casos. La composición de la muestra “Marnys Vitamina B12 líquida”, con excipientes y conservantes luminiscentes, requiere un tratamiento previo de eliminación de interferencias, por lo que no fue posible determinar el contenido en vitamina de la misma.

10 REFERENCIAS

- [1] Shrivastava, K., Nirmalkar, N., Thakur, S.S., Deb, M.K., Shinde, S.S., Shankar, R. (2018). **Sucrose capped gold nanoparticles as a plasmonic chemical sensor based on Non-covalent interactions: Application for selective detection of vitamins B₁ and B₆ in brown and white rice food samples.** Food Chemistry, 250: 14–21.
- [2] Zafara-Goamez, A., Garballo, A., Morales, J. C., García-Ayuso, L. E. (2006). **Simultaneous determination of eight water-soluble vitamins in supplemented foods by liquid chromatography.** Journal of Agriculture and Food Chemistry, 54: 4531–4536.
- [3] Moreno, P., Salvado, V. J. (2000). **Determination of eight water- and fat-soluble vitamins in multi-vitamin pharmaceutical formulations by high-performance liquid chromatography.** Journal of Chromatography A, 870: 207–215.
- [4] Li, D., Zhang, T., Xu, C., Ji, B. (2011). **Effect of pH on the interaction of vitamin B₁₂ with bovine serum by spectroscopic approaches.** Spectrochimica Acta Part A, 83: 598-608.
- [5] Morelli, B. (1995). **Determination of a quaternary mixture of vitamins B₆, B₁, and B₁₂ and uridine 5'-triphosphate, by derivative spectrophotometry.** Journal of Pharmaceutical Sciences, 84 (1): 34-37.
- [6] Gauch, R., Leuenberger, U., Müller, U. (1992). **Determination of the water-soluble vitamins B₁, B₂, B₆ and B₁₂ in milk by HPLC.** Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung, 195: 312-315.
- [7] Majdalawieh, A., Kanan, M.C., El-Kadri, O., Kanan, S.M. (2014). **Recent Advances in Gold and Silver Nanoparticles: Synthesis and Applications.** Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 14 (7): 4757-4780.
- [8] Hashemi, F., Rastegarzadeh, S., Pourreza, N. (2017). **A combination of dispersive liquid-liquid microextraction and surface plasmon resonance sensing of gold nanoparticles for the determination of ziram pesticide.** Journal of Separation Science, 41 (5).

[9] Garrido-Maestu, A., Azinheiro, S., Carvalho, J., Abalde-Cela, S., Carbó-Argibay, E., Diéguez, L., Piotrowski, M., Kolen'ko, Y.V., Prado, M. (2017). **Combination of Microfluidic Loop-Mediated Isothermal Amplification with Gold Nanoparticles for Rapid Detection of Salmonella spp. in Food Samples.** *Frontiers in Microbiology*, 8: 2159.

[10] Güner, A., Çevik, E., enel, M., Alpsoy, L. (2017). **An electrochemical immunosensor for sensitive detection of Escherichia coli O157:H7 by using chitosan, MWCNT, polypyrrole with gold nanoparticles hybrid sensing platform.** *Food Chemistry*, 229: 358-365.

[11] Nirala, N.R., Saxena, P.S, Srivastava, A. (2018). **Colorimetric detection of cholesterol based on enzyme modified gold nanoparticles.** *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 190: 506–512.

[12] Razzaq, H., Saleemi, S. (2016). **Interaction of gold nanoparticles with free radicals and their role in enhancing the scavenging activity of ascorbic acid.** *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 161: 266-272.

[13] Kurashige, W., Niihori, Y., Sharma, S., Negishi, Y. (2016). **Precise synthesis, functionalization and application of thiolate-protected gold clusters.** *Coordination Chemistry Reviews*, 320-321: 238–250.

[14] Qu, X., Li, Y., Li, L., Liang, J., Liang, J. (2015). **Fluorescent Gold Nanoclusters: Synthesis and Recent Biological Application.** *Journal of Nanomaterials*, (6): 1-23.

[15] Kawasaki, H., Kumar, S., Li, G., Zeng, C., Kauffman, D.R., Yoshimoto, J., Iwasaki, Y., Jin, R. (2014). **Generation of Singlet Oxygen by Photoexcited Au₂₅(SR)₁₈ Clusters.** *Chemistry of Materials*, 26(9): 2777-2788.

[16] Granda, M., Valdés, C.A., García, J.A., Díaz, M.E. (2009). **Nanotechnology applications in foods.** *Microchimica Acta*, 16: 1-19.

- [17] He, X., Hwang, H.-M. (2016). **Nanotechnology in food science: Functionality, applicability, and safety assessment.** *Journal of Food and Drug Analysis*, 24: 671-681.
- [18] Jain, A., Ranjan, S., Dasgupta, N., Ramalingam, Ch. (2018). **Nanomaterials in food and agricultura: an overview of their safety concerns and regulatory issues.** *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58: 297-317.
- [19] Bueno, A. (2016). **Estudio de la conjugación de antifolatos a nanopartículas de oro** (Trabajo Fin de Grado). Universidad de las Islas Baleares.
- [20] Connor, E. E., Mwamuka, J., Gole, A., Murphy, C. J., Wyatt, M. D. (2005). **Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity.** *Small*, 1: 325–327.
- [21] Nanochemistry.cl, (2016). Laboratory of Inorganic Chemistry and Nanochemistry. Disponible en: <http://www.nanoquimica.cl/>.
- [22] 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.
- [23] Wang, L.S. (2010). **Covalent gold.** *Physical Chemistry Chemical Physics*, 12: 8694–8705.
- [24] Aldewachi, H., Chalati, T., Woodroffe, M.N., Bricklebank, N., Sharrack, B., Gardiner, P. (2017). **Gold Nanoparticle-Based Colorimetric Biosensors.** *Nanoscale*, 10: 18-33.
- [25] Herizchi, R., Abbasi E., Milani, M., Akbarzadeh, A. (2016). **Current methods for synthesis of gold nanoparticles.** *Artificial Cells Nanomed Biotechnology*, 44(2): 596-602.

- [26] Ganeshkumar, M., Sastry, TP., Sathish, M., Dinesh, M.G., Kannappan, S., Suguna, L. (2012). **Sun light mediated synthesis of gold nanoparticles as carrier for 6-mercaptopurine: Preparation, characterization and toxicity studies in zebrafish embryo model.** Material Research Bulletin, 47: 2113-2119.
- [27] Arshi, N., Ahmed, F., Kumar, S., Anwar, M.S., Lu, J., Koo, B.H., Lee, C.G. (2011). **Microwave assisted synthesis of gold nanoparticles and their antibacterial activity against Escherichia coli (E. coli).** Current Applied Physics, 11: 360-363.
- [28] Mafuné, F., Kohno, J., Takeda, Y., Kondow, T. (2002). **Full Physical Preparation of Size-Selected Gold Nanoparticles in Solution: Laser Ablation and Laser-Induced Size Control.** Journal of Physical Chemistry B, 106: 7575-7577.
- [29] Begum, N.A, Mondal, S., Basu, S., Laskar, R.A., Mandal, D. (2009). **Biogenic synthesis of Au and Ag nanoparticles using aqueous solutions of Black Tea leaf extracts.** Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 71: 113–118.
- [30] Zhang, Y., Chu, W., Foroushani, A.D., Wang, H., Li, D., Liu, J., Barrow, C.J., Wang, X., Yang, W. (2014). **New Gold Nanostructures for Sensor applications: a review.** Materials, 7: 5169-5201.
- [31] Balasubramanian, S.K., Yang, L., Yung, L. L., Ong, C., Ong, W., Yu, L.E (2010). **Characterization, purification, and stability of gold nanoparticles.** Biomaterials, 31 (34): 9023-9030.
- [32] Trading house Cytodiagnostics. Introduction to Gold Nanoparticle Characterization. Disponible en: <http://www.cytodiagnostics.com/store/pc/Introduction-to-Gold-NanoparticleCharacterization-d3.htm>.
- [33] Priyadarshini, E., Pradhan, N. (2017). **Gold nanoparticles as efficient sensors in colorimetric detection of toxic metal ions: a review.** Sensors and Actuators B, 238: 888-902.

- [34] He, S., Liu, D., Wang, Z., Cai, K., Jian, X. (2011). **Utilization of unmodified gold nanoparticles in colorimetric detection.** *Science China Physics, Mechanics and Astronomy*, 54: 1757.
- [35] Saha, K., Agasti, S.S, Kim, C., Li, X., Rotello, V.M. (2012). **Gold Nanoparticles in Chemical and Biological Sensing.** *Chemical Reviews.*, 112: 2739–2779.
- [36] Yazdian –Robati, R., Hedayati, N., Ramezani, M., Abnous, K., Taghdisi, S.M. (2018). **Colorimetric gold nanoparticles-based aptasensors.** *Nanomedicine Journal*, 5(1): 1-5.
- [37] Cotton, F.A. (1964). **Metal atom clusters in oxide systems.** *Inorganic Chemistry*, 3(9): 1217–1220.
- [38] Hakkinen, H. (2008). **Atomic and electronic structure of gold clusters: understanding flakes, cages and superatoms from simple concepts.** *Chemical Society Reviews*, 37: 1847-1859.
- [39] 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: 293-346.
- [40] Bernard, A.S. (2010). **Modelling of nanoparticles: Approaches to morphology and evolution.** *Reports on Progress in Physics*, 73(8): 86502.
- [41] Martin, T.P. (1996). **Shells of atoms.** *Physics Reports*, 273: 199-241.
- [42] Pichugina, D.A., Kuz'menko, N.E., Shestakov, A.F. (2015). **Ligand-protected gold clusters: the structure, synthesis and applications.** *Russian Chemical Reviews*, 84 (11): 1114-1144.
- [43] Jin, R., Qian, H., Wu, Z., Zhu, Y., Zhu, M., Mohanty, A., Garg, N. (2010). **Size Focusing: A Methodology for Synthesizing Atomically Precise Gold Nanoclusters.** *Journal of Physical Chemistry Letters*, 1: 2903–2910.

- [44] Escudero, M.A. (2016). **Nanopartículas y clústeres de oro: Interacciones con electrolitos, seroalbúminas, fibroblastos y biodistribución en ratones** (Tesis Doctoral). Universidad de Oviedo, Asturias.
- [45] Huang, T., Murray, R.W. (2001). **Luminiscence of water-soluble monolayer-protected gold clusters**. *Journal of Physical Chemistry B*, 105 (50): 12498-12502.
- [46] Zheng, Y., Lai, L., Liu, W., Jiang, H., Wang, X. (2017). **Recent advances in biomedical applications of fluorescent gold nanoclusters**. *Advances in Colloid and Interface Science*, 242: 1-16.
- [47] Li, C., Chen, H., Chen, B., Zhao, G. (2018). **Highly fluorescent gold nanoclusters stabilized by food proteins: From preparation to application in detection of food contaminants and bioactive nutrients**. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58: 689-699.
- [48] Shankara, S., John, S.A. (2015). **Sensitive and highly selective determination of vitamin B1 in the presence of other vitamin B complexes using functionalized gold nanoparticles as fluorophore**. *RSC Advances*, 5: 49920-49925.
- [49] Samari, F., Hemmateenejad, B., Rezaei, Z., Shamsipur, M. (2012). **A novel approach for rapid determination of vitamin B12 in pharmaceutical preparations using BSA-modified gold nanoclusters**. *Analytical Methods*, 4: 4155.
- [50] Kamruzzaman, M., Alam, A.M, Kim, K.M., Lee, S.H., Kim, Y.H, Kabir, A. N., Kim, G.M., Dang, T.D. (2012). **Chemiluminescence microfluidic system of gold nanoparticles enhanced luminol-silver nitrate for the determination of vitamin B12**. *Biomedicine Microdevices*, 15: 195–202.
- [51] Miranda-Andrades, J.R., Pérez-Gramatges, A., Pandoli, O., Romani, E.C., Aucelio, R.Q., Silva, A.R. (2017). **Spherical gold nanoparticles and gold nanorods for the determination of gentamicin**. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 172: 126-134.

- [52] Nune, S.K., Chanda, N., Shukla, R., Katti, K., Kulkarni, R.R, Thilakavathi, S., Mekapothula, S., Kannan, R., Katti, K.V. (2009). **Green Nanotechnology from Tea: phytochemicals in Tea as Building Blocks for Production of Biocompatible Gold Nanoparticles.** *Journal of Materials Chemistry*, 19 (19): 2912-2920.
- [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: 3–7.
- [54] Li, D., Zhang, T., Xu, C., Ji, B. (2011). **Effect of pH on the interaction of vitamin B12 with bovine seroalbumin by spectroscopic approaches.** *Spectrochimica Acta Part A*, 83: 598-608.
- [55] Jamshidi, Z., Farhangian, H., Aliakbar, Z. (2013). **Glucose Interaction with Au, Ag, and Cu Clusters:Theoretical Investigation.** *International Journal of Quantum Chemistry*, 113: 1062–1070.
- [56] Wang, S.T., Chen, D.Y., Wang, X.L., Wei, M., Wang, Z.F. (2015). **A New Method for the Determination of Potassium Sorbate Combining Fluorescence Spectra Method with PSO-BP Neural Network.** *Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi*, 35: 3549-3554.
- [57] Lubon Industry Co.,Ltd. (2014). **Potassium sorbate.** Blog Lubon Industry. Extraído de: <http://www.lubonchem.com/blog/?p=603> (acceso 4 Julio 2018).
- [58] Lakowicz, J.R. (2006). **Principles of Fluorescence Spectroscopy.** 3ª Edición, Springer, NewYork.
- [59] Mohamed, A.A. (2015). **Frontiers in Gold Chemistry.** *Inorganics*, 3 (3): 370-373.
- [60] Lei, Z., Zhang, J.Y., Guanab, Z.J., Wang, Q.M. (2017). **Intensely luminescent gold(I) phosphinopyridyl clusters: visualization of unsupported aurophilic interactions in solution.** *Chemical Communications*, 53 (79): 10902-10905.

ANEXO I

11.1 UTILLAJE UTILIZADO EN LA PREPARACION DE NANOPARTICULAS Y CLUSTERES DE ORO



Figura 1AI. Calentamiento a reflujo en baño de aceite durante la síntesis de las AuNps sobre placa calefactora.



Figura 2AI. Disolución de AuNps obtenida. Obsérvese el característico color rojo.



Figura 3AI. Purificación de las AuNps mediante el empleo de una membrana de diálisis.



Figura 4AI. Disolución de AuNps obtenida por síntesis verde (hojas de té). Esta mezcla presenta un color púrpura que la caracteriza.



Figura 5AI. Disolución de GSH-AuNCs con su típico color dorado.



Figura 6AI. Filtro de jeringa de 0,45 μm utilizado para la purificación de los GSH-AuNCs.



Figura 7AI. Disoluciones de AuNPs con concentraciones crecientes de vitamina B₁.



Figura 8AI. Disoluciones de GSH-AuNCs con concentraciones crecientes de vitamina B₁₂.

11.2 PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES REGULADORAS

- A) Tampón acetato 0,1 M de pH 3,5 (100 mL): 46,3 mL ácido acético 0,2 M + 3,7mL acetato de sodio 0,2M + 50 mL agua.
- B) Tampón acetato 0,1 M de pH 4,6 (100 mL): 25,5 mL ácido acético 0,2 M + 24,5mL acetato de sodio 0,2M + 50 mL agua.
- C) Tampón acetato 0,1 M de pH 5,0 (100 mL): 20 mL ácido acético 0,2 M + 30 mL acetato de sodio 0,2M + 50 mL agua.
- D) Tampón acetato 0,1 M de pH 5,6 (100 mL): 4,8 mL ácido acético 0,2 M + 45,2mL acetato de sodio 0,2M + 50 mL agua.
- E) Tampón fosfato 0,1 M de pH 5,9 (100 mL): Disolver 1,08 g de dihidrógenofosfato de sodio y 0,085 g de hidrógenofosfato de disodio en agua y ajustar a pH con sosa 0,01 M.
- F) Tampón fosfato 0,1 M de pH 6,9 (100 mL): Disolver 0,73 g de dihidrógenofosfato de sodio y 0,54 g de hidrógenofosfato de disodio en agua y ajustar a pH con sosa 0,01 M.
- G) Tampón fosfato 0,1 M de pH 7,7 (100 mL): Disolver 0,24 g de dihidrógenofosfato de sodio y 1,14 g de hidrógenofosfato de disodio en agua y ajustar a pH con sosa 0,01 M.

11.3 GRÁFICAS OBTENIDAS EN EL ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE LOS CLÚSTERES CON LAS VITAMINAS B1 Y B12

En este apartado se muestran los espectros de las disoluciones que contienen vitamina y cantidades crecientes de GSH-AuNCs (0,1, 0,3, 0,5, 0,7 y 0,9 mL). Los espectros para la vitamina B₁ se muestran en las figuras 9AI, 10AI, 11AI, 12 y 13AI; mientras que las de la vitamina B₁₂ están las figuras 14AI, 15AI, 16AI, 17AI y 18AI.

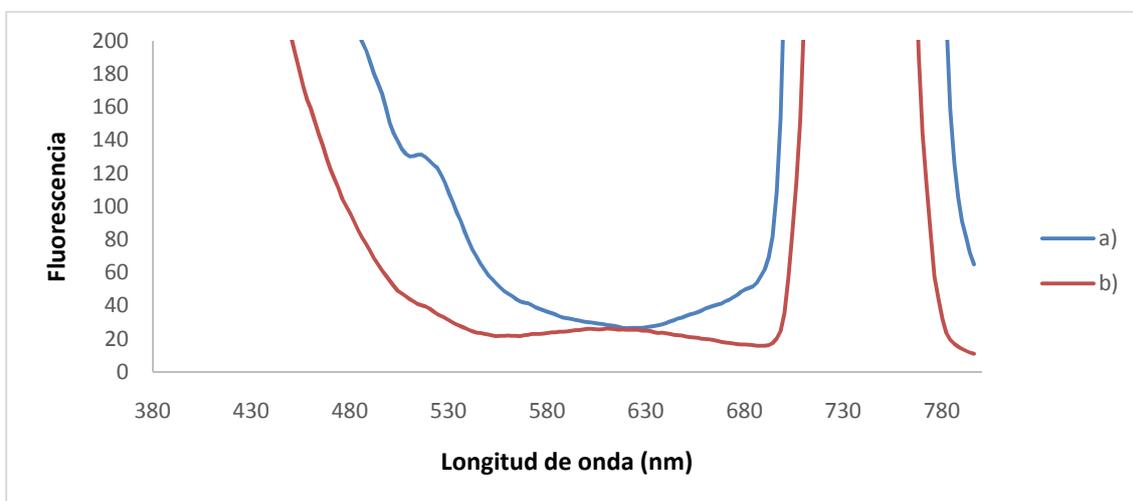


Figura 9AI. Espectros de emisión de 0,1 mL de GSH-AuNCs en ausencia y presencia de vitamina, a) y b).

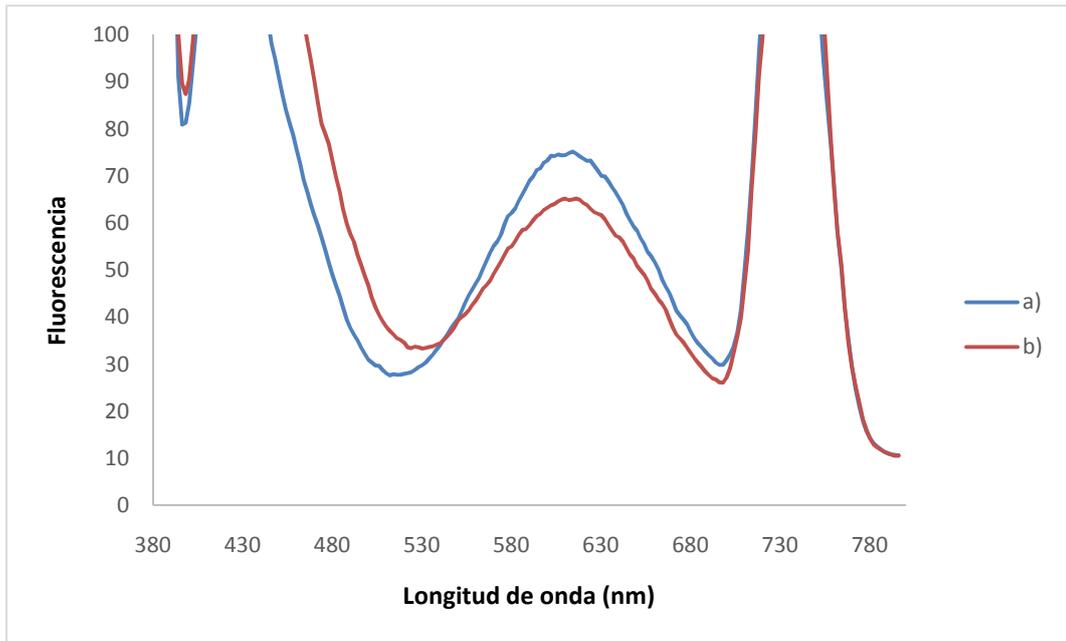


Figura 10AI. Espectros de emisión de 0,3 mL de GSH-AuNCs en ausencia y presencia de vitamina B₁, a) y b).

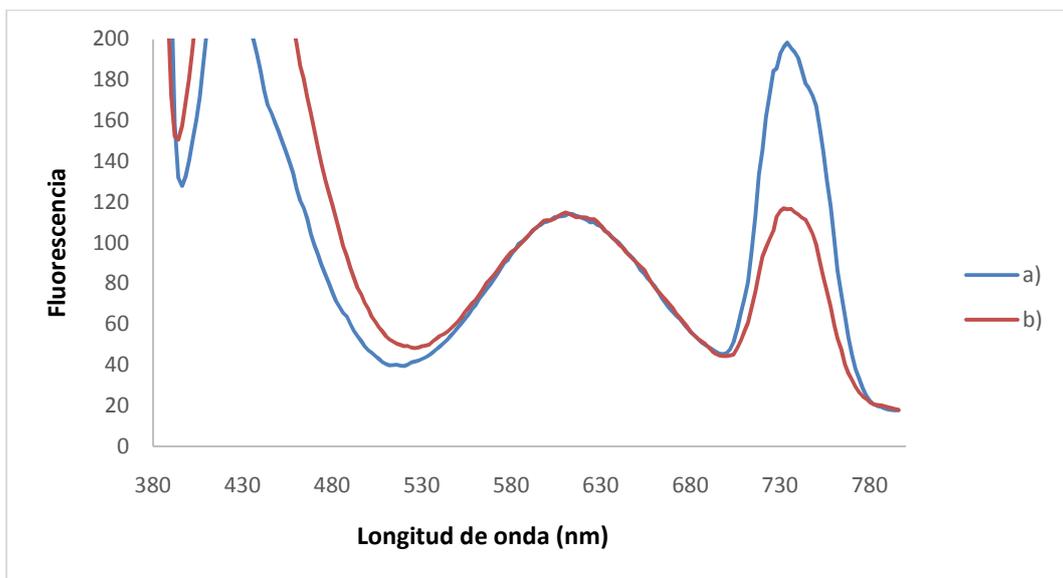


Figura 11AI. Espectros de emisión de 0,5 mL de GSH-AuNCs en ausencia y presencia de vitamina B₁, a) y b).

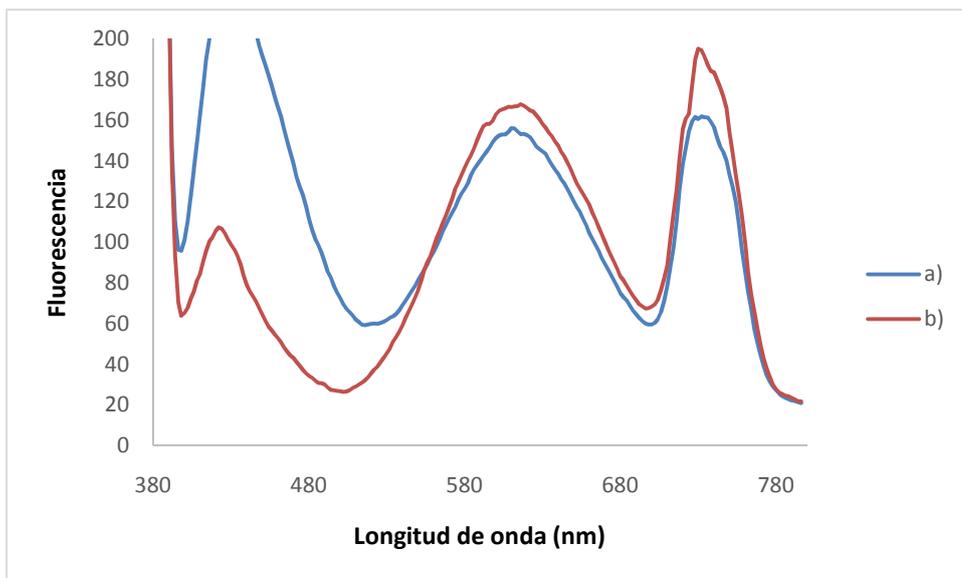


Figura 12AI. Espectros de emisión de 0,7 mL de GSH-AuNCs en ausencia y presencia de vitamina B₁, a) y b).

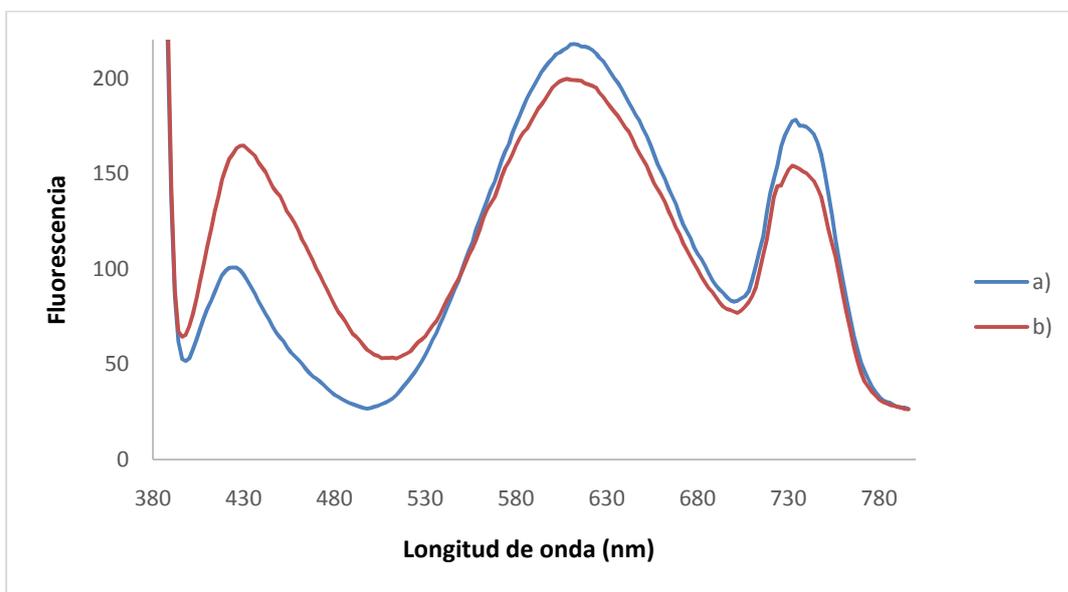


Figura 13AI. Espectros de emisión de 0,9 mL de GSH-AuNCs en ausencia y presencia de vitamina B₁, a) y b).

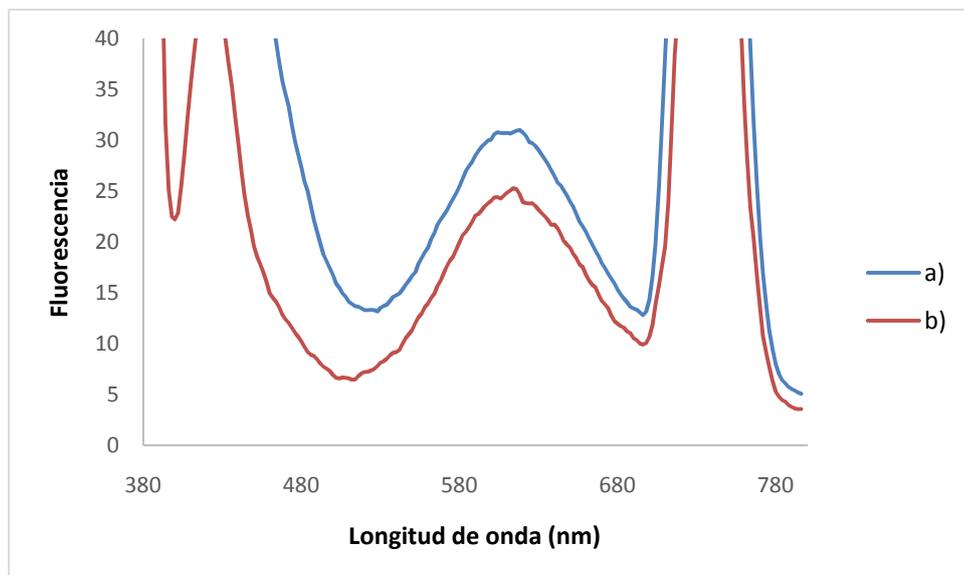


Figura 14AI. Espectros de emisión de 0,1 mL de GSH-AuNCs en ausencia y presencia de vitamina B₁₂, a) y b).

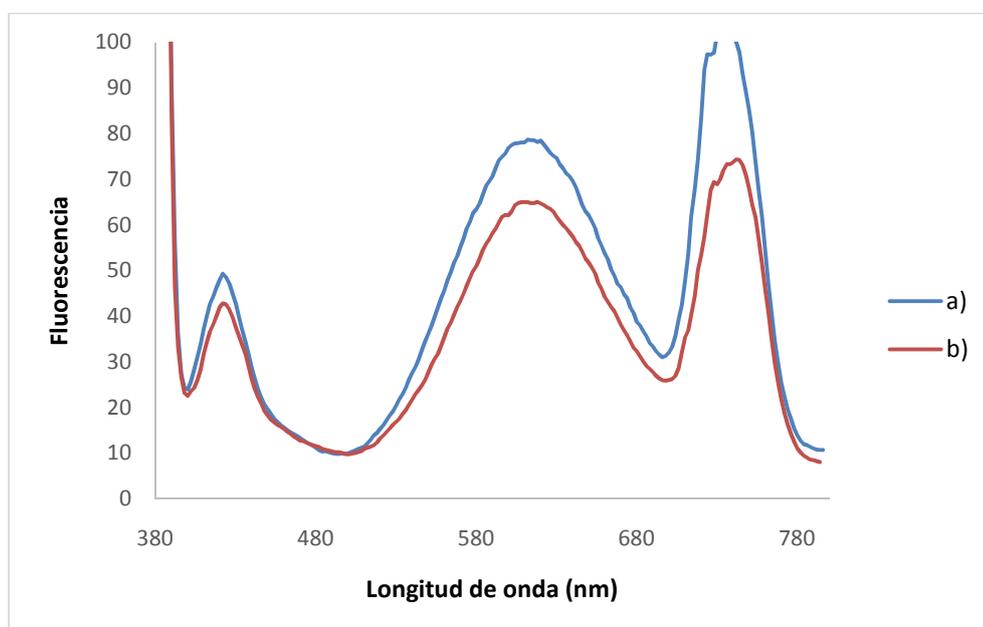


Figura 15AI. Espectros de emisión de 0,3 mL de GSH-AuNCs en ausencia y presencia de vitamina B₁₂, a) y b).

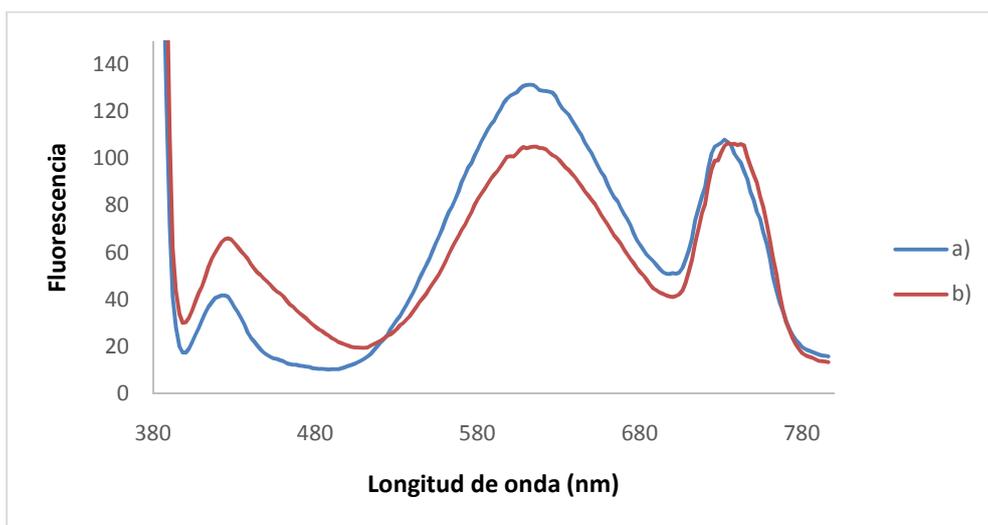


Figura 16AI. Espectros de emisión de 0,5 mL de GSH-AuNCs en ausencia y presencia de vitamina B₁₂, a) y b).

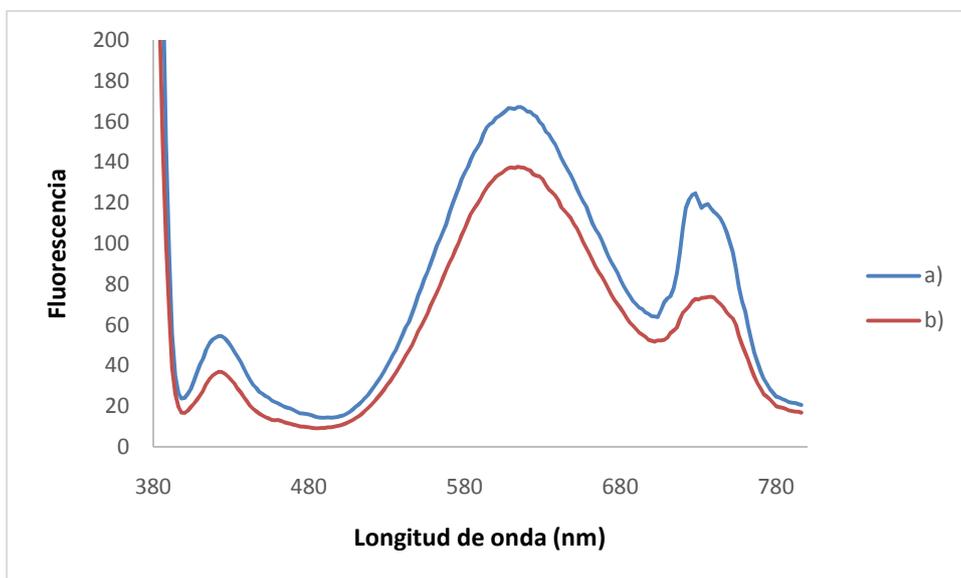


Figura 17AI. Espectros de emisión de 0,7 mL de GSH-AuNCs en ausencia y presencia de vitamina B₁₂, a) y b).

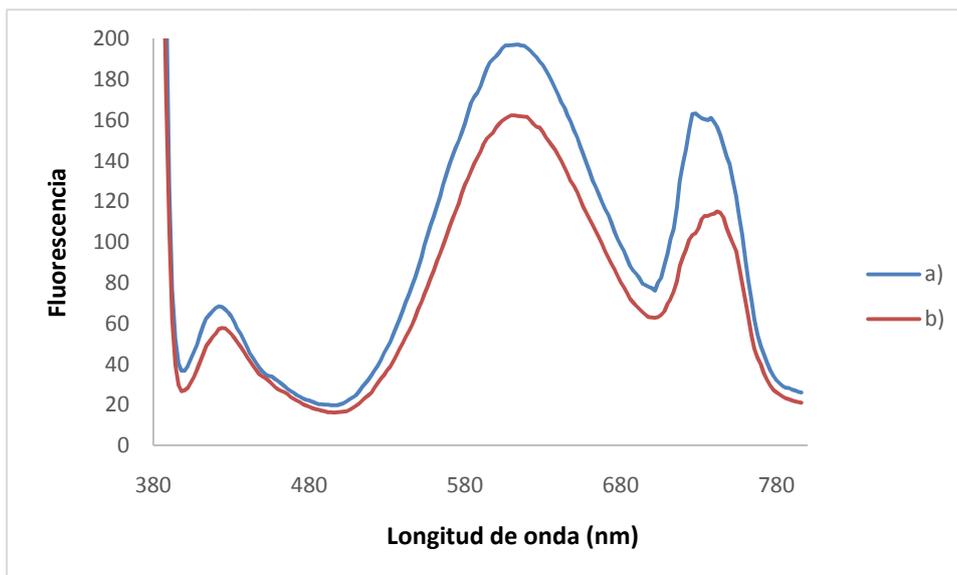


Figura 18AI. Espectros de emisión de 0,9 mL de GSH-AuNCs en ausencia y presencia de vitamina B₁₂, a) y b).

11.4 COMPOSICION DECLARADA DE LAS MUESTRAS

TROFALGON

Los principios activos son: Cianocobalamina (vitamina B12) y lisozima. Cada cápsula dura contiene 1.000 microgramos de vitamina B12 y 40 mg de lisozima hidrocloreuro.

Los demás componentes (excipientes) son: celulosa microcristalina, gelatina, dióxido de titanio, óxido férrico (E-172) y eritrosina (E-127).



MARNYS VITAMINA B12 LÍQUIDA

Carece de prospecto al no ser un medicamento como tal, sino un complemento alimenticio, por ello solo se indica el contenido a continuación: Agua desionizada, fructosa, Vitamina B12, sorbato potásico, aroma y ácido cítrico.



OPTOVITE® B₁₂

El principio activo es cianocobalamina. Cada ampolla contiene 1.000 microgramos de cianocobalamina. Los demás componentes son: cloruro de sodio y agua para preparaciones inyectables.



ANEXO II

EXPERIENCIAS PREVIAS REALIZADAS

11.5 ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE LOS CLÚSTERES DE ORO CON EL COLORANTE LASER DCM

Como prueba de concepto preliminar se llevó a cabo el estudio de la interacción de los GSH-AuNCs con el colorante láser DCM (4-(dicianometileno)-2-metil-6-(4-dimetilaminostiril)-4H-pirano), un compuesto químico que presenta dos anillos bencénicos y dos grupos cianuros en su estructura (Figura 1AII). Se eligió este compuesto modelo porque presenta dos grupos cianuro para su posible interacción con los GSH-AuNCs.

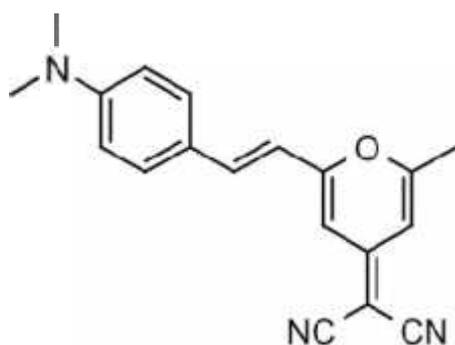


Figura 1AII. Estructura química del colorante láser DCM.

Se prepararon 50 mL de una disolución etanólica del colorante con una concentración de 2 $\mu\text{g/mL}$ DCM. Se registraron los espectros de absorción UV-Vis y fluorescencia de esta disolución. Como puede observarse (Figura 2AII), el colorante presenta una banda de absorción con un máximo de absorbancia a 467 nm. La banda de excitación muestra un máximo a 486 nm y una banda de emisión con máximo de intensidad a 605 nm (Figura 3AII).

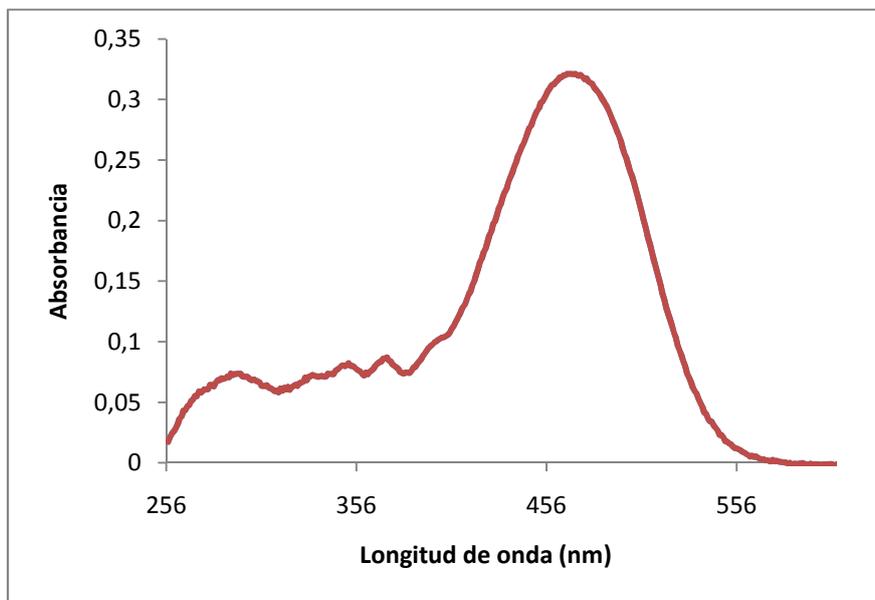


Figura 2AII. Espectro de absorción del colorante DCM.

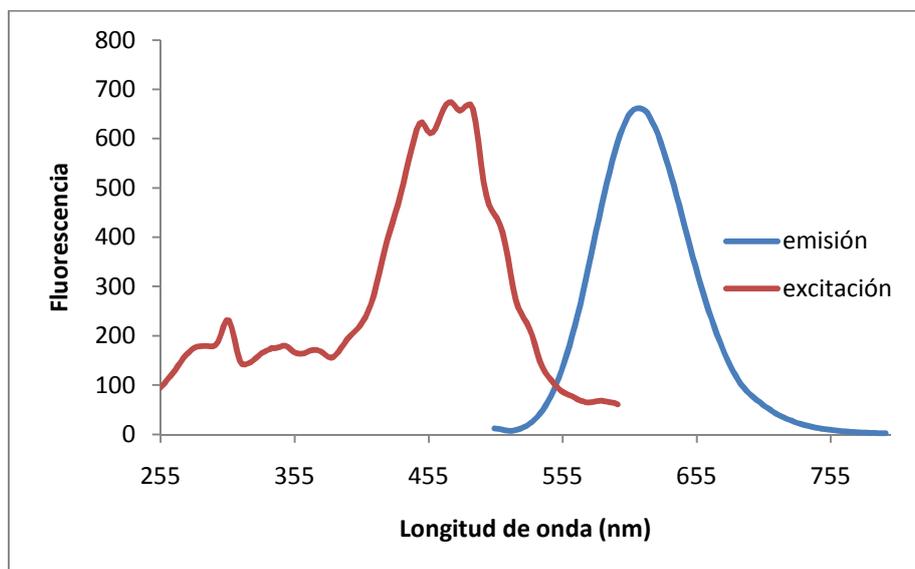


Figura 3AII. Espectros de excitación y emisión del colorante DCM.

A continuación, con objeto de evaluar la posible interacción entre el colorante y los GSH-AuNCs, se prepararon cuatro disoluciones (volumen final = 3 mL) conteniendo una cantidad fija del colorante y cantidades crecientes de GSH-AuNCs y otras cuatro (volumen final = 3 mL) con cantidades crecientes de colorante y una cantidad fija de GSH-AuNCs. Las cantidades utilizadas en estas disoluciones se recogen en la Tabla 1AII. Estas disoluciones se dejaron reaccionar durante 15 minutos, tras lo cual se registraron los espectros de emisión, empleando una longitud de onda de excitación de 345 nm con rendija de (10, 10) (Figuras 4AII y 5AII).

Tabla 1AII. Composición de las disoluciones preparadas para comprobar la interacción GSH-AuNCs-DCM. La concentración de la disolución de DCM = 2 µg/mL DCM.

Disoluciones con [DCM] constante			
Disolución	GSH-AuNCs, mL	DCM, mL	Agua, mL
1	0,5	0,4	2,1
2	1,0	0,4	1,6
3	1,5	0,4	1,1
4	2,0	0,4	0,6
Disoluciones con [GSH-AuNCs] constante			
1	1,5	0,2	1,3
2	1,5	0,4	1,1
3	1,5	0,6	0,9
4	1,5	0,8	0,7

Los resultados mostraron que la fluorescencia del sistema aumentaba a medida que aumentaba tanto la concentración de GSH-AuNCs como la de DCM.

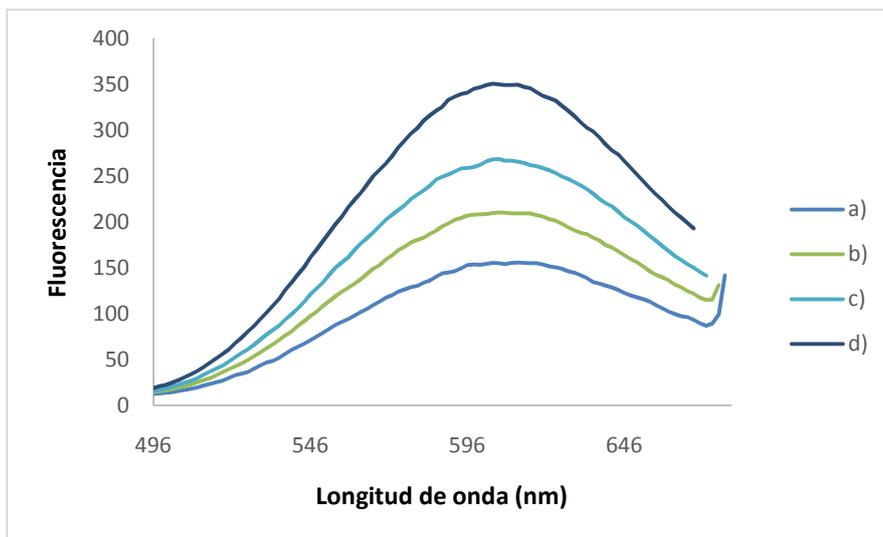


Figura 4AII. Espectros de emisión obtenidos de las mezclas con cantidades crecientes de GSH-AuNCs (ver datos en Tabla 1AII).

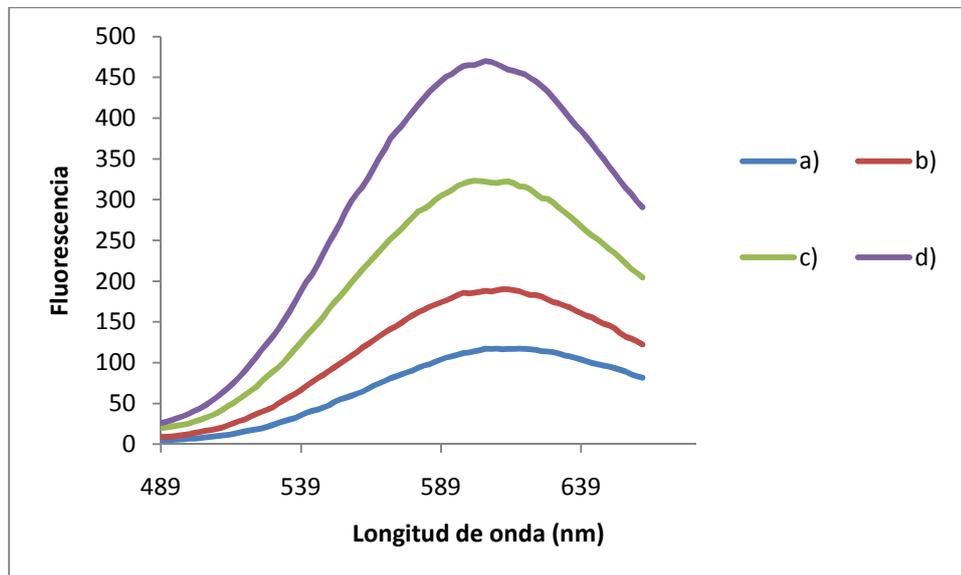


Figura 5AII. Espectros de emisión obtenidos de las mezclas con cantidades crecientes de colorante. Ver composición de las disoluciones en Tabla 1AII.

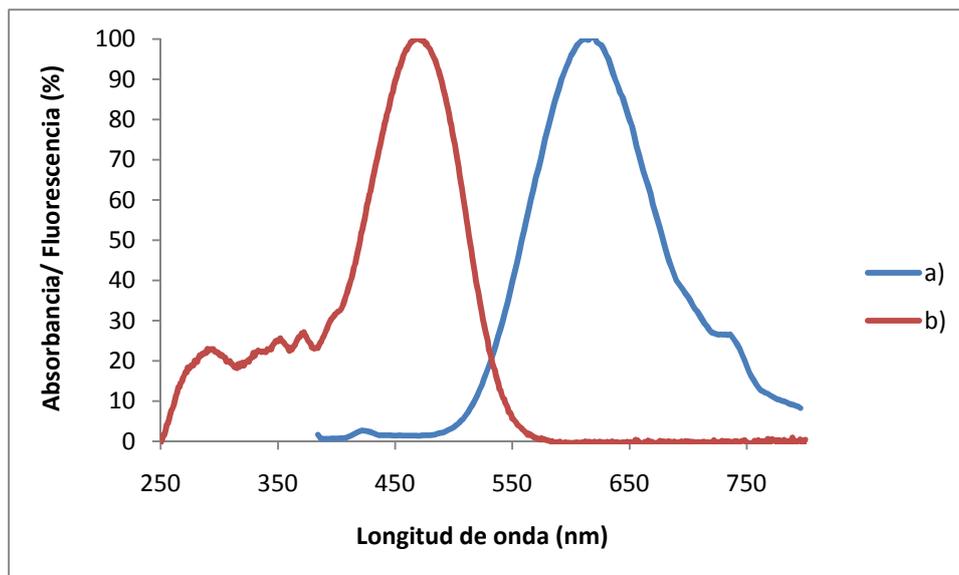


Figura 6AII. Espectro de emisión de los GSH-AuNCs (línea azul) y espectro de absorción del colorante DCM (línea roja).

A la luz de los espectros del colorante DCM y los GSH-AuNCs, no parece haber un solapamiento espectral que indique un posible proceso FRET de transferencia de energía resonante. Por tanto, el incremento de fluorescencia puede deberse a un proceso de transferencia de carga entre el DCM y los GSH-AuNCs. Se ha demostrado que los clústeres de oro obtenidos por reducción con glutatión, mantienen en su superficie Au^{I} , lo que los estabiliza [59,60]. Teniendo en cuenta este hecho, el posible mecanismo de transferencia de carga entre el DCM y los GSH-AuNCs, se puede explicar por la interacción entre los grupos $-\text{CN}$ del colorante y el Au^{I} , proximidad que favorece el proceso de transferencia de carga desde el DCM al GSH-AuNC (Figura 7AII).

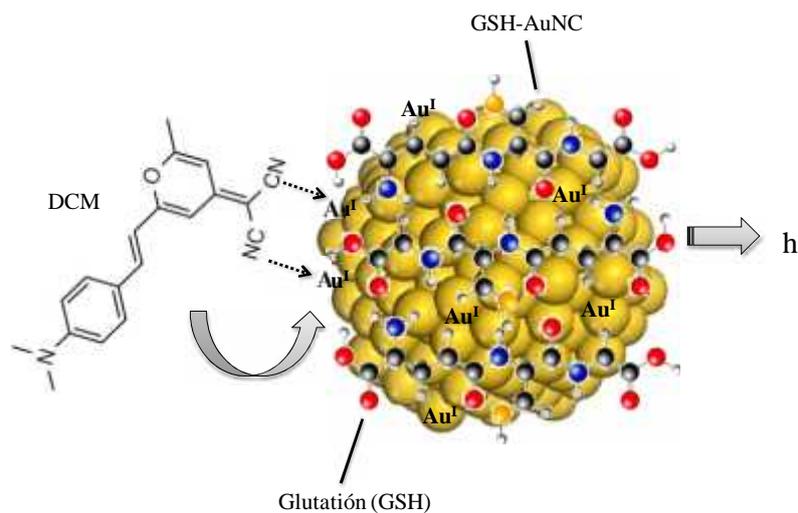


Figura 7AII. Posible mecanismo de transferencia de carga entre el DCM y el GSH-AuNC.

En la Tabla 2AII, se recogen los datos de fluorescencia obtenidos para las muestras anteriormente preparadas con concentraciones crecientes de DCM (ver composición de las mismas en Tabla 1AII). La representación gráfica de dichas intensidades en función de la concentración de DCM se muestra en la Figura 8AII.

Tabla 2AII: Datos para el calibrado de DCM.

Concentración DCM (ng/mL)	Fluorescencia
130	117,2
266,7	189,9
400	322,2
533,3	470,0

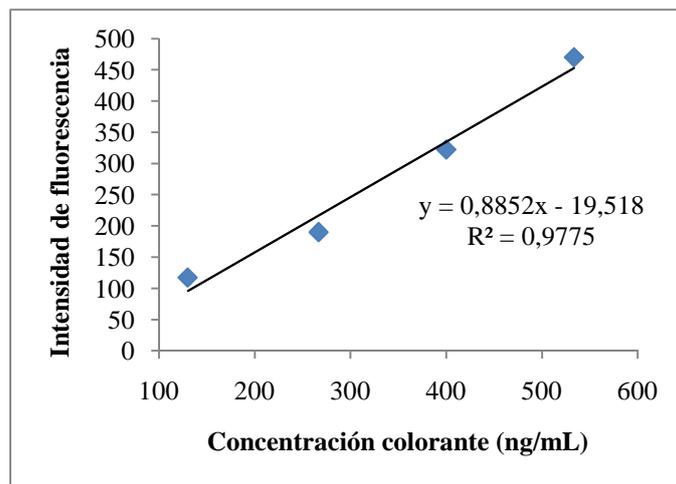


Figura 8AII. Línea de calibrado para la determinación del colorante DCM.