



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO
POSGRADO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES
MATERIALES ELECTRÓNICOS

OPTIMIZACIÓN DE LA RESPUESTA PLASMÓNICA DE NANOPARTÍCULAS DE
ORO SINTETIZADAS POR ABLACIÓN LÁSER Y SU FUNCIONALIZACIÓN CON
ÁCIDO 3-MERCAPTOPROPIÓNICO

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRÍA EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES

PRESENTA:
JEAN YVES TOVAR SÁNCHEZ

TUTORA PRINCIPAL:

DRA. MARÍA BEATRIZ DE LA MORA MOJICA
INSTITUTO DE CIENCIAS APLICADAS Y TECNOLOGÍA

COMITÉ TUTOR:

DR. TUPAK GARCÍA FERNÁNDEZ
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO

DR. ALEJANDRO REYES CORONADO
FACULTAD DE CIENCIAS UNAM

CIUDAD DE MÉXICO, MÉXICO A MARZO DEL 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Contenido

Agradecimientos	7
Resumen y motivación del trabajo	8
Capítulo 1	9
1.1. Objetivos y propósito del trabajo.....	9
Introducción	10
1.2. Propiedades ópticas de las Au-NPs	11
1.1.1 Resonancia localizada de plasmón de superficie	12
1.1.2 Influencia de los parámetros en la respuesta de absorción	16
1.1.3 Síntesis de Au-NPs con láser	19
1.3. Ventajas y desventajas de la ALL.....	21
1.2.1 Tratamiento láser de las partículas	23
1.4. Centrifugación	28
1.5. Estabilidad del coloide.....	29
1.6. Funcionalización con ácido mercaptopropiónico (AMP)	34
1.7 Aplicaciones de Au-NPs con interés de sensado y sistemas biológicos	37
Capítulo 2	39
Metodología Experimental	39
2.1 Síntesis de los coloides de oro	39
2.2 Tratamiento láser	41
2.3 Funcionalización con AMP	41
2.4 Caracterización de los coloides de Au-NPs	42
Capítulo 3	44
Resultados y Análisis	44
3.1. Resultados de la síntesis por ALL	44
3.1.1 Propiedades ópticas de las Au-NPs sintetizadas por ALL.....	46
3.2. Cambio en la distribución de tamaños de coloides con tratamientos posteriores	52
3.2.1 Resultados del tratamiento láser	52

3.2.2 Resultados de la Centrifugación.....	55
3.3 Cambios en la respuesta óptica plasmónica de coloides	60
3.4. Respuesta óptica de Au-NPs funcionalizadas con AMP	66
Capítulo 4	71
Conclusiones	71
Trabajo a futuro	73
Bibliografía	74

Índice de Tablas y Figuras

Capítulo 1

Figura 1. 1 Representación esquemática de algunos nanomateriales según su clasificación.	11
Figura 1. 2 (a) Cálculos de energía superficial [2] y (b) de la temperatura de fusión como función del tamaño de la partícula. Imagen adaptada de [3].	12
Figura 1. 3 Relación de dispersión de un gas de electrones. Imagen adaptada de [4].	13
Figura 1. 4 Relación de dispersión de un plasmón de superficie en la interfase metal-dieléctrico Adaptada de [4].	14
Figura 1. 5 Esquema de la distribución de la carga eléctrica en la Au-Nps en presencia del campo incidente, si $D \ll \lambda$ el campo es uniforme dentro y si $D \leq \lambda$ el campo es heterogéneo. Adaptado de [5].	15
Figura 1. 6 (a) Absorbancia de coloides de Au-NP de varios tamaños y (b) el corrimiento de la longitud de onda del plasmón, como función del diámetro de las Au-NPs. Adaptada de [7].	17
Figura 1. 7. (a) Esquema cromático del espectro de absorbancia de nanopartículas esféricas en soluciones coloidales. (b) Soluciones coloidales de Au-NPs [13]; conforme se aumenta los tamaños de partículas de 5 a 100 nm, cambia la coloración del coloide, lo que refleja variaciones en la absorción de la luz en diferentes regiones del espectro.	18
Figura 1. 8. (a) Ilustración de la acumulación de carga para modos resonantes longitudinal y transversal. (b) Coeficientes de absorción calculados para nanobastones de oro con distintas proporciones entre sus ejes. (c) Espectros de absorción para varios arreglos de partículas esféricas de plata, donde se varía la geometría del aglomerado [4].	19
Figura 1. 9 Esquema representativo del proceso de ablación láser en líquidos.	20
Figura 1. 10 Secuencia del proceso de la ablación láser en líquidos. Inicia con la irradiación láser con la afluencia suficiente para crear la evaporación del material y la burbuja de cavitación. Al encontrar cierto equilibrio la burbuja crece hasta un máximo de tamaño, en el que el enfriamiento ocasiona su colapso. Las partículas se contienen en la burbuja de cavitación y salen eyectadas después de su implosión [24].	21
Figura 1. 11 Micrografía TEM y el histograma de la distribución de tamaño de Au-NPs sintetizados por ablación laser de femtosegundos en agua desionizada [8].	22
Figura 1. 12 Esquema representativo de las interacciones del láser con el blanco. Se tiene la región de la ablación láser (LAL) cercana a la superficie, la región donde se tiene la condición de afluencia para fragmentar las partículas (LFL) y la región con menor afluencia donde ocurre la fusión de partículas (LML). Esquema adaptado de [11].	23
Figura 1. 13. Comparación de los procesos de ablación láser con pulsos de nanosegundos y femtosegundos. (a) Micrografía SEM de una superficie ablacionada y (b) escala temporal de la dinámica de los procesos tras la absorción del pulso láser [55].	26
Figura 1. 14. (a) Fotografía de las Au-NPs separadas según su tamaño mediante centrifugación. (B) Espectros de absorbancia normalizados de las Au-NPs, se puede apreciar el corrimiento al rojo cuando se miden las partículas más grandes [51].	29

Figura 1. 15. (a) Esquema representativo de la solvatación de una Au-NPs en presencia del medio líquido polar. (b) La interacción electrostática se da entre la nueva partícula resultado del acoplamiento con el medio líquido.....	32
Figura 1. 16. (a) Espectros de intensidad de dispersión como función del radio hidrodinámico. (b) Tabla comparativa en el que inicialmente se tienen las mismas partículas de látex (100nm) y el tamaño medido varía significativamente al cambiar la fase líquida, aún para muestras con bajo índice de polidispersión. Figura tomada de [75].....	33
Figura 1. 17 Espectros sucesivos de cit-AuNPs medidos tras la adición de 5×10^{-6} mol dm ⁻³ de 2-mpy y 4-mpy en un intervalo de 120s [32].	35
Figura 1. 18 Esquema de la molécula del AMP.	36
Figura 1. 19. Corrimiento de la banda de luz esparcida al modificar el estado de hibridación de ADN con Au-NP.[78].	38

Tabla 1. Estudios que emplean la irradiación láser con femto, pico y nanosegundos para cambiar la morfología y tamaños de las Au-NPs.	27
Tabla 2. Estudios que emplean la centrifugación de los coloides para separar las Au-NPs en rangos de tamaño. Tabla adaptada de [67].	28

Capítulo 2

Figura 2. 1 Esquema representativo del arreglo de ALL.	40
Figura 2. 2 Esquema representativo del sistema de fragmentación láser. Las partículas fragmentadas cambian la coloración del coloide.	41
Figura 2. 3 Esquema representativo de una banda de absorbancia por LSPR. Se señalan los puntos del mínimo y máximo local (A y B), los correspondientes al 98% de la intensidad para calcular λ_{LSPR} (C y D) y los correspondientes al 50% de la intensidad para calcular Δ	43

Capítulo 3

Figura 3. 1 (a) Micrografía TEM de la geometría típica de Au-NPs obtenidas por ALL y (b) ejemplos de distintos coloides de Au-NPs esféricas y su variabilidad en la respuesta óptica.	44
Figura 3. 2 Histograma de tamaño de las Au-NPs obtenidas por ALL. Se presenta una de las micrografías analizadas.	45
Figura 3. 3 Micrografía de las Au-NPs sintetizadas por ablación láser. Se observa una gran dispersión de tamaños y su tendencia a formar cadenas lineales.....	46
Figura 3. 4 Espectros de absorbancia de las distintas condiciones de energía para la síntesis por ALL. Se observa un incremento en la absorbancia a 350 nm, la absorbancia máxima y en el pronunciamiento de la banda de absorbancia ocasionada por LSPR.	46
Figura 3. 5 Valores de la Absorbancia a 350nm (rojo), 750 nm (azul) y absorbancia máxima (negro) como función de la energía de ablación para la síntesis de los coloides.	47

Figura 3. 6 Espectros de absorbancia de los coloides de Au-NPs sintetizados con los mismos parámetros de ablación.	48
Figura 3. 7 Espectros de absorbancia de un mismo coloide medido en el mismo día en el que se sintetizó y su degradación de 1 a 31 días.....	49
Figura 3. 8 Efecto de la floculación tras pasar el tiempo en la actividad óptica del coloide. Se observa un corrimiento al rojo en de λ LSPR y una disminución del Abs LSPR en su totalidad.	50
Figura 3. 9 (a) Micrografía TEM de Au-NPs y (b) esquema de los modos resonantes del plasmón de superficie. Se puede apreciar que la variación en los tamaños de partícula y la floculación presentan modos resonantes distintos: el dipolar (flechas horizontales) en par.....	51
Figura 3. 10 Micrografías TEM de muestras irradiadas con 20 mJ con 10,000 pulsos y su Histograma obtenido al analizar los diámetros de las partículas esféricas. Se pueden observar la unión de partículas pequeñas, formando una estructura tipo coral.	52
Figura 3. 11 Micrografías TEM de muestras irradiadas con 40 mJ en el tratamiento de fragmentación láser y su Histograma obtenido al analizar los diámetros de las partículas esféricas.	53
Figura 3. 12 Micrografías TEM y su histograma de las partículas irradiadas con 60 mJ. Se observó la mayor disminución del tamaño promedio y la distribución de tamaños de todas las condiciones con tratamiento láser.....	54
Figura 3. 13 Coloides de Au-NPs observados antes y después del tratamiento láser con 60 mJ.	55
Figura 3. 14 Micrografía TEM de las muestras centrifugadas con 6000 RPM durante 10 minutos. Las partículas están muy dispersas, con tamaños menores a 60 nm. (b) Histograma obtenido al considerar 198 partículas de las micrografías. Se muestra un acercamiento con.....	56
Figura 3. 15 Diámetro promedio como función del tratamiento de las Au-NPs. Para cada condición se presenta la desviación estándar, que representa la anchura de la distribución.....	57
Figura 3. 16 Radio Hidrodinámico como función del tratamiento de las Au-NPs.....	58
Figura 3. 17 Espectros de absorbancia de coloides de Au-NPs sintetizados por ALL (negro) en comparación con aquellos sometidos a tratamiento láser con 20mJ (rojo), 40mJ (azul) y 60mJ (magenta). Para las condiciones de 20mJ y 40mJ se observa una menor intensidad de absorbancia en todas las regiones, lo que indica floculación.....	60
Figura 3. 18 Valores promedio de la longitud de onda como función del tratamiento de las Au-NPs.	61
Figura 3. 19 Comparación de la Absorbancia máxima (negro), a 350 nm (rojo) y a 750 nm (azul) como función del tratamiento de las Au-NPs sintetizadas por ALL.	62
Figura 3. 20 Efectos del tratamiento de fragmentación láser. La región del espectro de absorbancia por LSPR aumenta en intensidad máxima.	64
Figura 3. 21 Pot ζ de los coloides como función del tratamiento.	65
Figura 3. 22 Espectros de absorbancia de cit-AuNPs y su variación al cambiar la concentración de AMP.....	67
Figura 3. 23. Espectros de absorbancia para coloides de Au-NPs con distintas disoluciones de AMP. Se muestra el espectro de absorbancia de la dilución de AMP a 0.5 mM.....	68
Figura 3. 24 (a) Espectros de absorbancia de coloides funcionalizados con 0.5mM y 0.05mM de AMP agitados por más tiempo. Micrografías TEM para la concentración de 0.5mM (b) y 0.05mM (c).....	69

Agradecimientos

De antemano, a usted lector por permitirme ser parte de su interés.

A mi familia, por su incondicional apoyo, cálido afecto y enseñanzas que me acompañan desde mi primer aliento y los llevaré hasta el último. Su cariño es el principal motor en mi vida, y con este cariño va el mío hacia las personas que conozco y las cosas que hago.

A mi familia no sanguínea, a mis colegas, secuaces, hermanos y hermanas elegidos a lo largo de la vida. A aquellos amigos y amigas con los que conspiré para conquistar este mundo, un paso a la vez. A mi té favorito, por ser la musa del redescubrimiento de mi fascinación y entrega por las cosas que valen la pena.

A mi familia inesperada del Laboratorio de Fotofísica. Sus grandes aportaciones, charlas y discusiones se proyectaron más allá del aula y del laboratorio, de lo profesional a lo personal. Sin duda, uno de los mejores grupos a los que tuve la oportunidad de pertenecer, con la camaradería que abarca varias generaciones, nacionalidades y estilos de vida.

A todas las personas con las que conviví, discutí y crecí profesionalmente a lo largo de estos dos años. A los organizadores y asistentes de los eventos con los que me enriquecí y pude aportar un granito de arena con mi trabajo. A los participantes del CSI XLI, colegas e invitados, pues demostramos el inmenso alcance de un proyecto que inicia sólo con la voluntad.

Al Laboratorio Central de Microscopía (LCM) del Instituto de Física (IFUNAM). Al Fís. Roberto Hernández por su excelente trabajo en microscopía de transmisión electrónica (TEM). Al Laboratorio Universitario de Caracterización Espectroscópica (LUCE), CCADET, UNAM a la M. en C. Selene Islas y a la M. en C. Viridiana Estrada por la caracterización de las muestras mediante las Técnicas de espectroscopía UV-Vis, FTIR, DLS y Potencial ζ .

Finalmente agradezco el apoyo económico de la beca de maestría por parte del CONACyT, el apoyo financiero para el desarrollo de esta tesis de los proyectos CONACyT Ciencia básica A1-S-23112, A1-S-22695 y PAPIIT IG100418.

Resumen y motivación del trabajo

En este trabajo de tesis se realizó la síntesis de nanopartículas de oro mediante la técnica de ablación láser en líquidos. Esta técnica permite obtener las partículas con mayor pureza y en distintos medios líquidos, en este caso se realizó la ablación de un blanco de oro sumergido en agua deionizada. La radiación láser incidente tuvo una longitud de onda de 1064nm, 60 mJ por pulso, una tasa de repetición de 10Hz y se utilizaron 5000 pulsos. Estos parámetros se optimizaron previamente en la realización de la tesis de licenciatura [4] y se invita al lector a consultarla si se desea profundizar también en el modelo de Mie para determinar su respuesta de absorbancia. Con estas condiciones se obtuvieron nanopartículas esféricas puras con tamaño promedio de 47 nm y amplia distribución de tamaño.

Esta amplia distribución es característico del proceso de ablación láser, significa una de sus principales desventajas en comparación con otros métodos de síntesis y cuya primera solución es el enfoque principal de esta tesis.

Es importante estudiar las propiedades de las partículas en el coloide para estimar su estabilidad y poder determinar la viabilidad de usarse como sensor plasmónico de moléculas de interés. Para empezar este estudio, se caracterizaron las partículas mediante espectroscopía de absorción, dispersión dinámica y una estimación del potencial electrocinético en su superficie (potencial Zeta). Se obtuvieron espectros de absorción típicos de los coloides de oro, con un pico de intensidad cercano a 530 nm. Las medidas de tamaño obtenidas por dispersión dinámica son mayores que las observadas con microscopía debido principalmente al acoplamiento con el medio líquido cuando se analiza con dispersión dinámica, en contraste con las muestras al vacío al analizarlas en microscopía.

Para abordar el tema de la distribución de tamaños de las partículas en los coloides de oro, se le sometió a un tratamiento láser en líquido, con el fin de estudiar los parámetros de energía necesarios para fragmentarlas o fusionarlas. Hay una competencia entre ambos procesos: para energías menores domina la fusión, crecen las partículas y se promueve su sedimentación. Para la energía mayor de 60 mJ se obtuvo una reducción del promedio a 25 nm y se estableció la posibilidad de recuperar la actividad óptica del coloide al volver a suspender las partículas.

Se realizaron pruebas de centrifugación con el fin de compararlo con la fragmentación como métodos de selección de tamaño. Se obtuvo el menor promedio de partícula de 16 nm con la menor distribución de tamaño y concentración de todas las condiciones.

Finalmente se caracterizó la respuesta óptica de los coloides al añadir ácido mercaptopropiónico y se comparó la disminución de la intensidad máxima de absorción como función de la concentración. Se inició el estudio de viabilidad como sensor de este ácido tiolado, que en comparación con partículas obtenidas por métodos químicos se degradaron con 10 veces menos cantidad de AMP.

Capítulo 1

Las nanopartículas de oro tienen un gran interés actual, ya que las propiedades optoelectrónicas que presenta el oro al estar en tamaños nanométricos tienen muchas aplicaciones como sensores. Sin embargo, la aplicación final depende de muchos factores tanto de la síntesis de las partículas como del sistema que se desea estudiar.

En este capítulo se presentarán algunos conceptos básicos de los nanomateriales y características propias del oro como su resonancia de plasma y cómo esta se observa en los coloides. Después se discutirá a la ablación láser en líquidos como método efectivo de producir los coloides de oro y otros fenómenos que ocurren al interactuar el haz láser con las nanopartículas. Finalmente se presenta la utilidad de estas partículas con moléculas tioladas, donde la concentración y el tipo de carga eléctrica son factores importantes en los cambios espectroscópicos de estos coloides.

1.1. Objetivos y propósito del trabajo

Para empezar, se expondrán los objetivos de esta tesis y la hipótesis de la que partimos, con el fin de caracterizar las partículas sintetizadas y estudiar la viabilidad de las técnicas de fragmentación y centrifugación como métodos de selección de tamaño. Existe un compromiso entre la pureza de los coloides que ofrece la ablación láser en líquidos y la amplia distribución de tamaños que se obtiene, así como su degradación al tender a precipitarse. Para determinar los pasos a seguir se propuso el siguiente objetivo principal:

Objetivo General: Optimizar la banda de absorción óptica de Au-NPs sintetizadas por ablación láser en líquidos y elaborar una metodología para la selección de tamaños de partículas en coloides de oro.

Para cumplirlo, se establecieron los siguientes objetivos secundarios:

- Sintetizar coloides Au-NPs esféricas mediante la técnica de Ablación Láser en Líquidos.
- Estudiar los cambios en la distribución de tamaños tras someter los coloides a un posterior tratamiento de fragmentación láser o a un proceso de centrifugación.
- Caracterizar la señal de absorbancia de estos coloides ocasionada por LSPR mediante espectroscopía UV-Vis-NIR para las distintas condiciones.
- Caracterizar la morfología y distribución de tamaño de las partículas mediante microscopía TEM para las distintas condiciones.
- Caracterizar el proceso de funcionalización con AMP. Estudiar y comparar la diferencia en la interacción de los coloides con AMP.

Hipótesis: El desarrollo de una metodología mediante tratamiento láser con un láser pulsado en nanosegundos permitirá seleccionar la distribución de tamaños de las nanopartículas de oro obtenidas por ablación láser en líquidos. Esta selección mejorará la respuesta plasmónica y estabilidad del coloide favoreciendo su funcionalización con ácido mercaptopropiónico AMP.

Introducción

El interés por los nanomateriales ha incrementado exponencialmente en los últimos años, debido a sus múltiples aplicaciones en el desarrollo de sensores, catalizadores, activadores moleculares, tratamientos médicos, optoelectrónica, fotónica y metalúrgica [1-10], entre otras. Dada su gran importancia se han realizado numerosas investigaciones sobre el desarrollo de nuevas técnicas de síntesis y caracterización de sistemas nanométricos. Las propiedades únicas de este tipo de sistemas se deben a su relación de área superficial con su volumen, así como a efectos cuánticos que se presentan sólo en forma de nanomaterial [1, 2,3].

Las nanopartículas (NPs) de metales nobles como el oro, presentan propiedades optoelectrónicas de gran interés para su uso como sensores ópticos. Lo anterior se debe al fenómeno de plasmón de superficie localizada, que consiste en la oscilación colectiva de los electrones libres presentes en un metal, cuya resonancia tiene como consecuencia una o varias bandas de absorción características. Estas bandas son sensibles a cambios en el medio que rodea a dicha partícula, y con esta propiedad se pueden desarrollar sensores plasmónicos [4, 10]. Las frecuencias del plasmón de superficie suelen estar en el espectro visible de la radiación electromagnética, y en la sección 1.1.1 se discuten las diferencias entre el plasmón de bulto, de superficie y de superficie localizado.

Dentro de los diversos métodos de obtención de nanopartículas metálicas destacan los métodos físicos, ya sea por procesos de interacción materia-materia o radiación-materia; y los métodos químicos como la reducción de ácido cloroáurico ($HAuCl_4$). En particular, para las aplicaciones en sensores la implementación de las partículas de oro (Au-NPs) requiere de una adecuada funcionalización. La metodología utilizada para funcionalizar debe garantizar cierta estabilidad de la banda de absorción del coloide, ya que ésta puede modificarse por la aglomeración del coloide o por la amplia distribución de tamaños de las partículas. Los efectos de estos factores son de gran interés tanto en el estudio de los fenómenos ópticos, como el desarrollo de tecnología basada en ellos.

Entre los métodos físicos de síntesis de nanopartículas la ablación láser en líquidos sobresale por su sencilla implementación y por la pureza de las nanopartículas de oro obtenidas. Además, permite fabricar coloides en disolventes diversos con el mismo montaje experimental. Sin embargo, los coloides obtenidos exhiben una gran distribución de tamaños y tendencia a flocular, es decir baja estabilidad coloidal. Lo anterior dificulta la funcionalización de estos coloides para diferentes aplicaciones como catálisis y sensado. Debido a esto, es fundamental entender y establecer una metodología para disminuir la distribución de tamaño y mejorar la

estabilidad coloidal si se desea utilizar nanopartículas de oro sintetizadas por ablación láser en aplicaciones ópticas como sensores plasmónicos.

En esta sección, se describirán algunos conceptos básicos para entender la síntesis y aplicación de Au-NPs como sensores plasmónicos con base en el fenómeno de la Resonancia Localizada del Plasmón de Superficie (por sus siglas en inglés LSPR). Entender el fenómeno y estudiar sus parámetros permitirá acoplar de manera adecuada estos sistemas de Au-NPs coloidales con intermediarios químicos como los tioles, para su posterior uso como sensor.

1.2. Propiedades ópticas de las Au-NPs

Para que un material se considere *nano*, debe contar con al menos una dimensión que pertenezca a la escala nanométrica. Pokropivny y V. V. Skorokhod [1] proponen una clasificación según el número de dimensiones que se encuentran fuera de esta escala: 0-D para aquellos con todas sus dimensiones dentro de la escala (ej., nanopartículas esféricas); 1-D y 2-D donde se presentan una o dos dimensiones mayores a 100 nm respectivamente (ej. nanotubos y películas delgadas) y 3- D en los que el sistema completo puede sobrepasar la escala, pero sus componentes o granos son nanométricos. En la Figura 1. 1 se puede observar geometrías de algunos ejemplos de ellos:

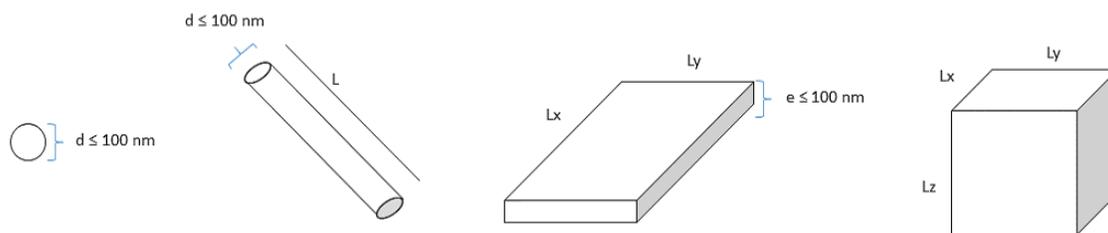


Figura 1. 1 Representación esquemática de algunos nanomateriales según su clasificación.

En particular, cuando se trata de oro, se ha estudiado que la relación entre el área de la superficie de la partícula y el volumen que ocupa es un parámetro que decrece exponencialmente conforme la partícula aumenta de tamaño (y el número de átomos que la componen) y modifica en gran medida sus propiedades fisicoquímicas, como su reactividad (cambia el número de coordinación), la energía superficial, la energía de enlace y la temperatura de fusión [2, 3]. En la Figura 1. 2 se pueden apreciar los cambios en la energía superficial (a) y en la temperatura de fusión (b) para partículas esféricas con diámetros menores a 40 nm.

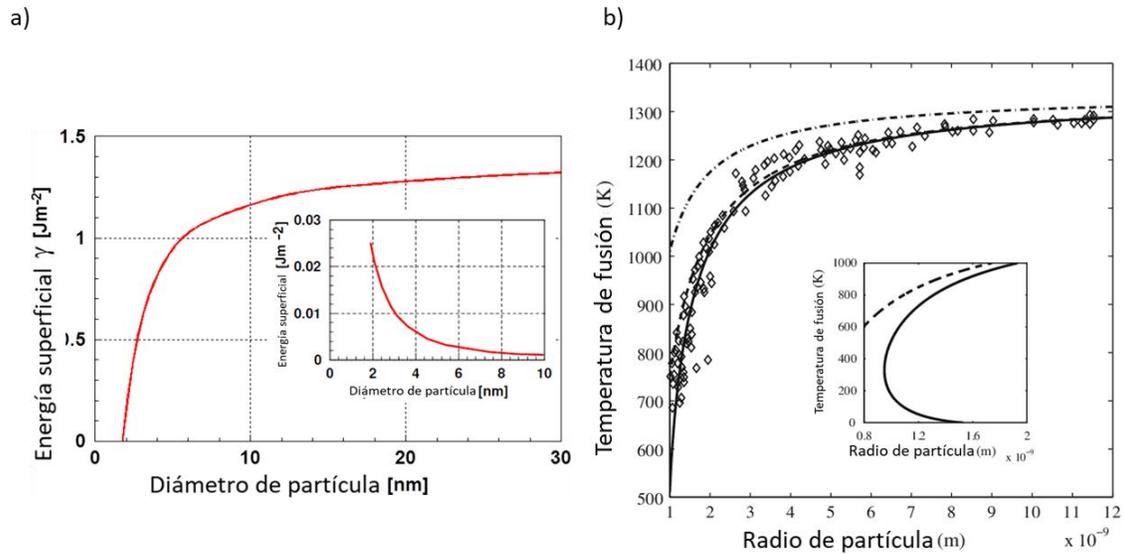


Figura 1. 2 (a) Cálculos de energía superficial [2] y (b) de la temperatura de fusión como función del tamaño de la partícula. Imagen adaptada de [3].

Al tener partículas menores a 100 nanómetros, el movimiento de los electrones presentes en las Au-NPs está confinado dentro de ellas, de tal manera que con la presencia de campos eléctricos incidentes se puede generar una oscilación resonante.

Como se verá a continuación, para Au-NPs suspendidas en líquidos, sus propiedades también dependen de las características del coloide. Un coloide se define como la mezcla entre una sustancia con partículas microscópicas (o de menor tamaño) solubles o insolubles, con otra sustancia en la que se encuentran suspendidas. Es importante poder identificar la fase dispersa, en este caso las Au-NPs, y la fase donde se suspenden, como el agua, etanol y mezclas con otros líquidos, pues así se distingue un coloide de una solución.

1.1.1 Resonancia localizada de plasmón de superficie

Cuando se irradia un metal con un campo electromagnético con frecuencia ω , la presencia de electrones libres en el material permite la oscilación de ellos. De acuerdo con el modelo de Drude [4], en el que se trata al sistema como un oscilador armónico forzado, se asume que la nube electrónica negativa presente puede desplazarse libremente en la red de núcleos atómicos cargado positivamente, y dichos electrones oscilan a la frecuencia de la radiación incidente. Si se excita a la frecuencia adecuada, estos electrones se pueden mover colectivamente en cierta dirección, lo cual genera un momento eléctrico dipolar por los centros de cargas negativas y positivas de los átomos que se desplazan entre sí. Esto genera una fuerza de restauración y se forma un oscilador entre los electrones y la radiación incidente. El cuanto de la oscilación colectiva de los electrones es llamado plasmón (o plasmón de bulto) y la frecuencia de plasmón en un material en bulto se describe en la ecuación (1):

$$\omega_b^2 = \frac{Ne^2}{\epsilon_0 m} \quad (1)$$

donde ω_p es la frecuencia de plasma asociada al material de función dieléctrica ϵ_0 con densidad N de electrones de masa m y carga eléctrica e .

En general, para los metales se tiene una fuerte absorción en bajas frecuencias, mientras que, para frecuencias altas, la función dieléctrica se puede aproximar con la ecuación (2):

$$\epsilon(\omega) = 1 - \frac{\omega_b^2}{\omega^2} \quad (2)$$

Y con ello, se puede obtener la relación de dispersión descrita en la ecuación (3)

$$\omega(k) = \sqrt{\omega_b^2 + k^2/c^2} \quad (3)$$

Al graficar esta relación de dispersión como se muestra en la Figura 1. 3, podemos observar la región en frecuencias en la que no se puede propagar el plasmón, ya que la radiación se absorbe, y también observamos cómo se diferencia de la frecuencia de la radiación electromagnética en vacío.

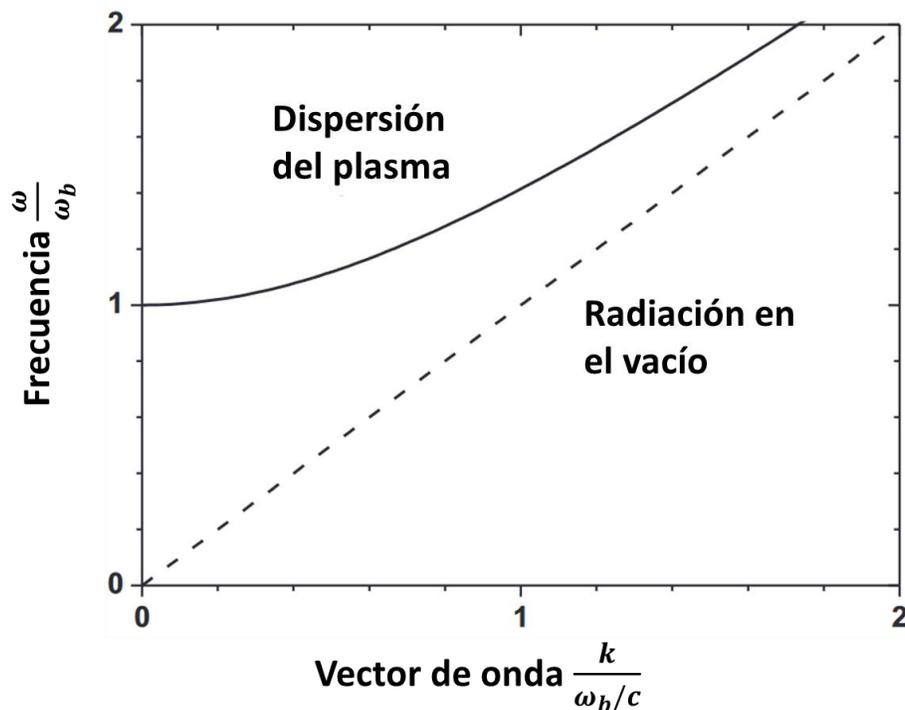


Figura 1. 3 Relación de dispersión de un gas de electrones. Imagen adaptada de [4].

En la mayoría de los metales, la frecuencia de plasma está en el ultravioleta, entre 5 y 15 eV [4].

Si ahora consideramos la interfase entre un material dieléctrico y un metal, junto con radiación electromagnética incidente, tenemos un sistema compuesto de la onda electromagnética en el medio dieléctrico y un plasma de oscilación electrónica en el metal, en el cual ambos modos

tienen un carácter evanescente (decae exponencialmente). Entonces el plasma se propaga a lo largo de la superficie dieléctrico-metal, y se tienen los plasmones de superficie [4,5] (también llamados polaritones de plasmón de superficie).

En este caso, la frecuencia del plasmón de superficie se describe con la ecuación (4) y depende de la parte real de la función dieléctrica del metal ε'_1 y se asume un medio dieléctrico con pérdidas no significativas (absorción nula) con función dieléctrica real ε_2 :

$$\omega_s = \sqrt{\varepsilon'_1 \varepsilon_2 / \varepsilon'_1 + \varepsilon_2} \omega \quad (4)$$

En el caso de materiales 2D como películas delgadas de espesor d , para frecuencias altas con vector de onda β , se tiene un caso contrario al plasmón de bulto, donde el plasmón se propaga principalmente a frecuencias bajas y la frecuencia del plasmón de superficie tiende al valor descrito en la ecuación (5):

$$\omega = \frac{\omega_s}{\sqrt{1 + \exp(-\beta d)}} \quad (5)$$

La gráfica de la relación de dispersión de los plasmones de superficie, en comparación con la radiación electromagnética en el vacío y en el medio dieléctrico se puede apreciar en la Figura 1. 4

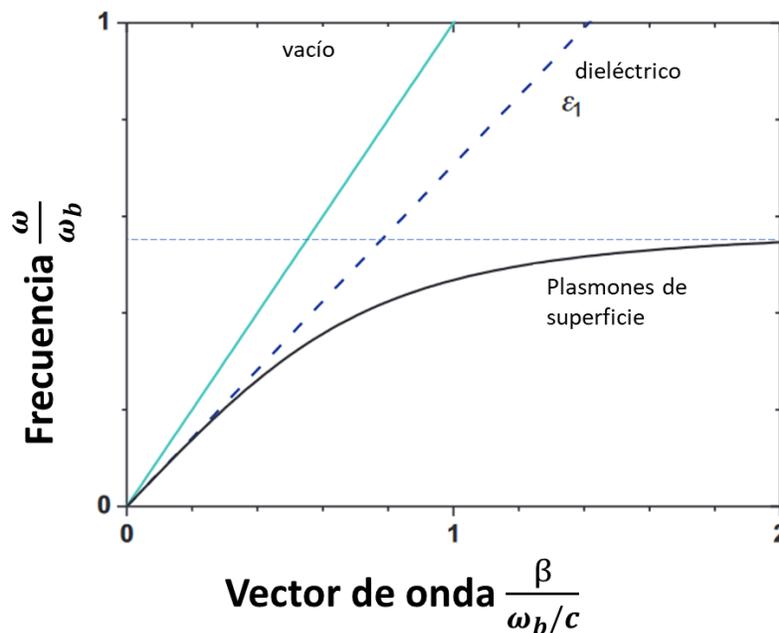


Figura 1. 4 Relación de dispersión de un plasmón de superficie en la interfase metal-dieléctrico Adaptada de [4].

Si el material metálico se encuentra en la nanoescala, de manera que la oscilación electrónica esté totalmente contenida en una nanopartícula, cuando la radiación electromagnética incide sobre una Au-NP, su nube electrónica se polariza como consecuencia del campo eléctrico incidente, perpendicular a la dirección de propagación del haz de luz, como se representa en la

Figura 1. 5. Por lo tanto, este campo oscilante puede producir una oscilación dipolar colectiva de las cargas en la Au-NP.

Se tiene como condición para la resonancia que el diámetro D de las nanopartículas sea considerablemente menor que la longitud de onda λ de la radiación incidente, $D \ll \lambda$ [5].

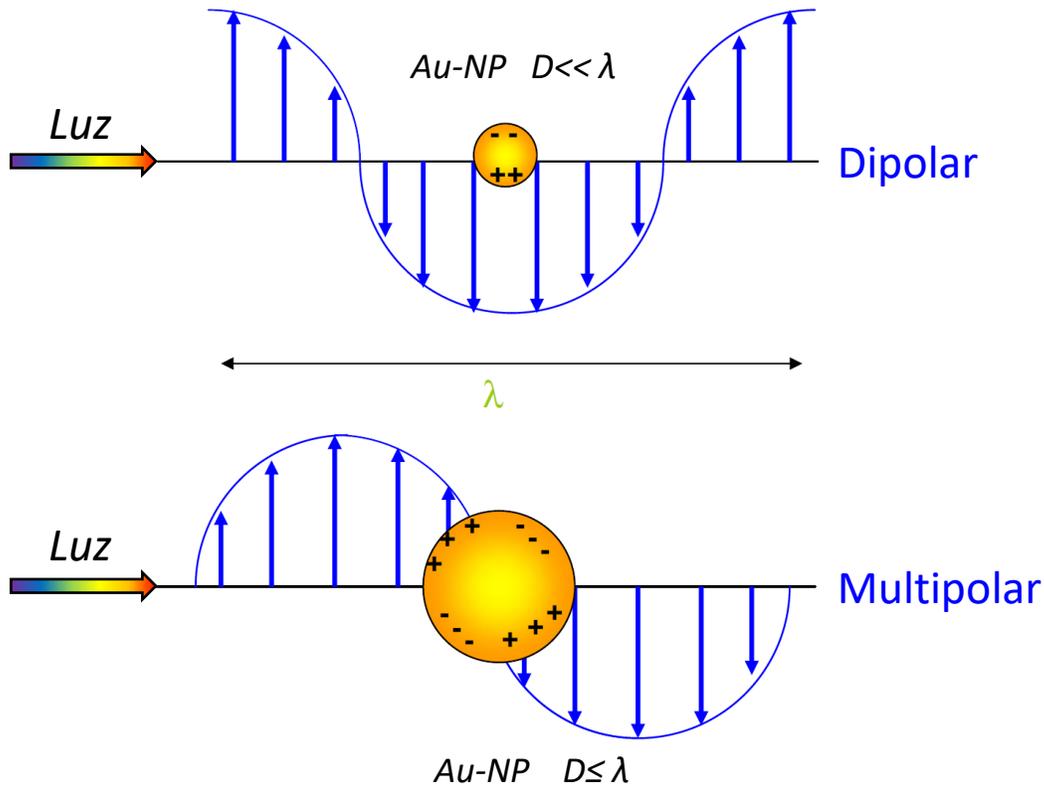


Figura 1. 5 Esquema de la distribución de la carga eléctrica en la Au-NPs en presencia del campo incidente, si $D \ll \lambda$ el campo es uniforme dentro y si $D \leq \lambda$ el campo es heterogéneo. Adaptado de [5].

Si la oscilación resonante está contenida en la nanoestructura del sistema, en la interfase nanopartícula-dieléctrico (por ejemplo, en la nanopartícula metálica rodeada de un medio líquido) se le llama resonancia de plasmón de superficie localizada (LSPR por sus siglas en inglés). Estas oscilaciones se vuelven más complejas conforme la partícula aumenta de tamaño, ya que aumenta la probabilidad de que el campo dentro de la partícula cambie de fase, lo que genera la presencia de dipolos de mayor orden dentro de la misma partícula.

Una ventaja de la geometría isotrópica de las Au-NPs esféricas es el reducido número de grados de libertad en los que la LSPR puede resultar. La incidencia de la onda electromagnética es la que determina el modo de oscilación de los electrones, pero esta condición se debilita conforme el sistema aumenta de tamaño. Para partículas con $D \leq \lambda$ aumenta la probabilidad de que la partícula esté inmersa en distintas fases de la misma onda, lo que genera un campo heterogéneo en su superficie, como se observa en la Figura 1. 5. Esto modifica la nube

electrónica según la posición del nodo respecto a la partícula, lo que complica la superposición de los campos, y con ello la respuesta óptica total del sistema.

Si se considera un sistema nanométrico con Au-NPs esféricas de diámetro $D < 40 \text{ nm}$, se puede usar satisfactoriamente la teoría de Mie (1908) como una solución exacta a las ecuaciones de Maxwell que describen el campo electromagnético que interactúa con pequeñas esferas de un material [5,6], cuya función dieléctrica ϵ se aproxima a su valor en bulto. Se aplican condiciones a la frontera y mediante expansiones de las series de los campos involucrados, se puede obtener la sección eficaz de extinción de las oscilaciones multipolar (absorción y esparcimiento), como se describe en las ecuaciones (6-9):

$$\sigma_{ext} = \frac{2\pi}{|k|^2} \sum_{L=1}^{\infty} (2L+1) \text{Re} (a_L + b_L) \quad (6)$$

$$\sigma_{ext} = \frac{2\pi}{|k|^2} \sum_{L=1}^{\infty} (2L+1) \text{Re} ([a_L^2 + b_L^2]), \quad (7)$$

$$a_L = \frac{m\psi_L(mx)\psi'_L(x) - \psi'_L(mx)\psi_L(x)}{m\psi_L(mx)\eta'_L(x) - \psi'_L(mx)\eta_L(x)} \quad (8)$$

$$b_L = \frac{\psi_L(mx)\psi'_L(x) - m\psi'_L(mx)\psi_L(x)}{\psi_L(mx)\eta'_L(x) - m\psi'_L(mx)\eta_L(x)} \quad (9)$$

n y n_m : índices de refracción complejo de la partícula e índice de refracción real del medio.

k : vector de onda de la radiación incidente.

r : radio de la partícula, $r = 2D$.

ψ_L y η_L : las funciones cilíndricas Ricatti-Bessel.

donde $m = \frac{n}{n_m}$ es el índice de refracción relativo y $x = |k|r$ el parámetro de tamaño.

La superposición de todos los dipolos presentes genera el perfil característico del espectro de absorbancia, por lo que cambia la anchura a media altura (FWHM por sus siglas en inglés), la longitud de onda y la altura del pico de mayor absorción.

Como se puede apreciar en los coeficientes de extinción de la teoría de Mie, la estimación de la longitud de onda central e intensidad de la banda de absorción por LSPR no es trivial; es compleja la predicción del espectro de absorbancia ante cambios en el índice de refracción o función dieléctrica del material. Además, depende fuertemente de las condiciones mismas del coloide como la floculación, distribución de tamaños de partículas y concentración de partículas. Existen modelos que predicen el comportamiento de las partículas con mayor precisión, que se basan en la teoría de Mie, y si se tiene interés en el desarrollo del modelo base se recomienda acudir al apéndice A de la tesis de licenciatura [6].

1.1.2 Influencia de los parámetros en la respuesta de absorción

Para partículas que cumple la condición $D \ll \lambda$ (al menos $D < \lambda/10$), sólo la oscilación dipolar contribuye de manera significativa al coeficiente de extinción y se pueden despreciar las contribuciones de mayor orden [5, 6, 7, 10, 11]. Además, el ancho de banda del plasmón de

superficie, relacionado con su espectro de absorbancia, disminuye conforme aumenta su tamaño.

En espectrometría, el parámetro que se mide directamente de la muestra es la transmitancia T y mediante un ajuste con la Ley de Beer-Lambert, la absorbancia A mediante la ecuación (10):

$$\frac{I_1}{I_0} = T = 10^{-\alpha l} = 10^{-A} \quad (10)$$

en la cual I_0 e I_1 son las intensidades absoluta y relativa de la radiación al atravesar una columna de líquido de espesor l y coeficiente de absorción α . Los equipos de medición de absorbancia podrán tener correcciones específicas adicionales por la óptica propia del sistema (espejos, geometría, lámparas y detectores) pero la mayoría se basan en este modelo.

La absorbancia la podemos definir como un símil de la extinción de la radiación electromagnética ya que al atravesar el material las pérdidas de intensidad se pueden deber a los fenómenos de absorción y de esparcimiento, pero en las medidas espectrométricas los equipos no suelen diferenciarlas ya que sólo se mide la intensidad total recibida al pasar por la muestra. Es importante mencionar la diferencia entre el fenómeno de absorción y el parámetro medido que es la absorbancia, ya que los espectros que se presentarán en adelante son el resultado de la envolvente del fenómeno de absorción por LSPR y esparcimiento por dipolos de orden mayor a 1.

En la Figura 1. 6 se puede observar que, para partículas con diámetros mayores, el pico de absorción se ensancha (a) y se observa a mayores longitudes de onda (b). A un mayor tamaño de nanopartícula, las distintas oscilaciones presentes dentro de la partícula cobran mayor presencia y pueden producirse multipolos, la oscilación adquiere mayor complejidad y el perfil de absorción se modifica.

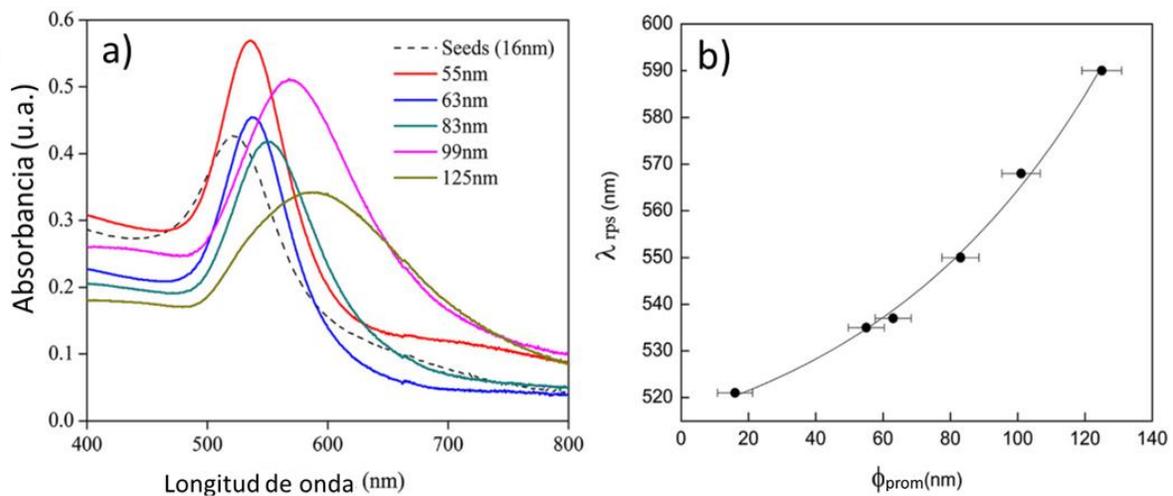


Figura 1. 6 (a) Absorbancia de coloides de Au-NP de varios tamaños y (b) el corrimiento de la longitud de onda del plasmón, como función del diámetro de las Au-NPs. Adaptada de [7].

Como consecuencia del fenómeno de LSPR, se tienen espectros de absorbancia característicos de sistemas con estas partículas, los cuales dependerán del medio que rodea a las partículas, su tamaño y el material que las conforma, así como su geometría.

En una dispersión coloidal de Au-NPs esféricas en líquidos poco absorbentes (como agua, etanol, etc.), la LSPR genera una fuerte absorción de la luz en la zona visible verde del espectro electromagnético $\lambda = 500 - 600 \text{ nm}$ como se muestra en la **Figura 1. 7. a**. Por lo tanto, los coloides reflejan luz con $\lambda \approx 650 \text{ nm}$, lo que le otorga un rango de color intenso de rojo a lila a la disolución, como se observa en la **Figura 1. 7iError! No se encuentra el origen de la referencia.** **Figura 1. 7iError! No se encuentra el origen de la referencia..b**.

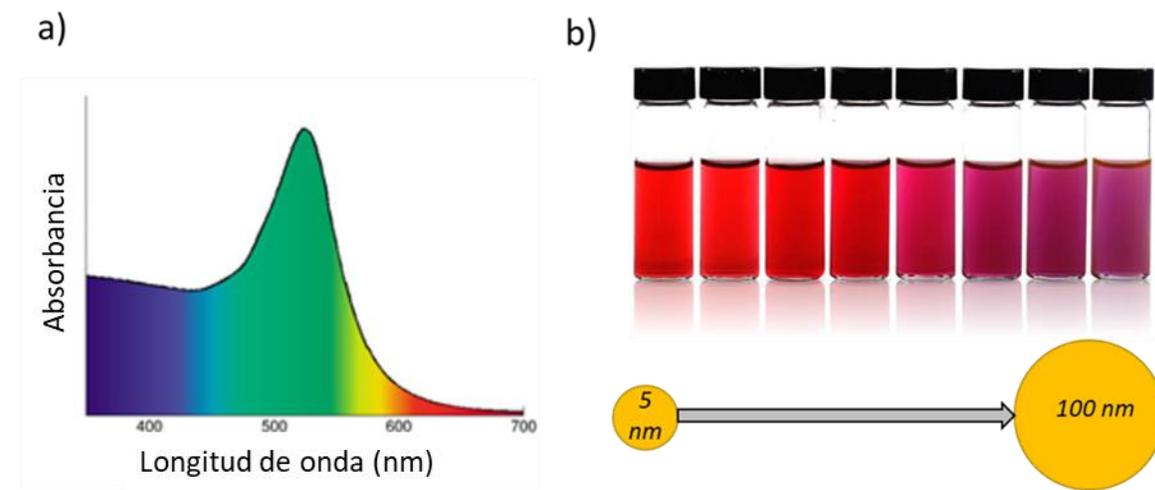


Figura 1. 7. (a) Esquema cromático del espectro de absorbancia de nanopartículas esféricas en soluciones coloidales. (b) Soluciones coloidales de Au-NPs [13]; conforme se aumenta los tamaños de partículas de 5 a 100 nm, cambia la coloración del coloide, lo que refleja variaciones en la absorción de la luz en diferentes regiones del espectro.

En términos generales, se puede sintonizar la longitud de onda de máxima absorbancia, y la magnitud de la absorbancia, al modificar el medio líquido, composición de las partículas y su estructura mesoscópica. Esta capacidad de modificar la respuesta óptica de los coloides en presencia de sustancias externas es el motor principal con el que se desarrollan sensores plasmónicos, como se mencionará en la sección 1.5.

Si las Au-NPs no presentan una geometría isotrópica, también podrá presentar resonancias en otras longitudes de onda. Por ejemplo, para Au-NPs 1D, como los nanobastones presentados en la **Figura 1. 8. a**, se tienen dos ejes principales y se observan dos bandas de absorción asociadas al eje transversal y al eje longitudinal. La oscilación presente al eje transversal es similar a la exhibida por las nanopartículas esféricas con absorción máxima en longitudes de onda menores, y la banda de la oscilación transversal presenta un segundo máximo a longitudes de onda.

Ya sea por la estructura de cada partícula, y por el arreglo mesoscópico en el que se encuentren, la respuesta óptica se verá modificada con distintas regiones de máximos locales de absorción, como se muestra en la **Figura 1. 8.b y c**.

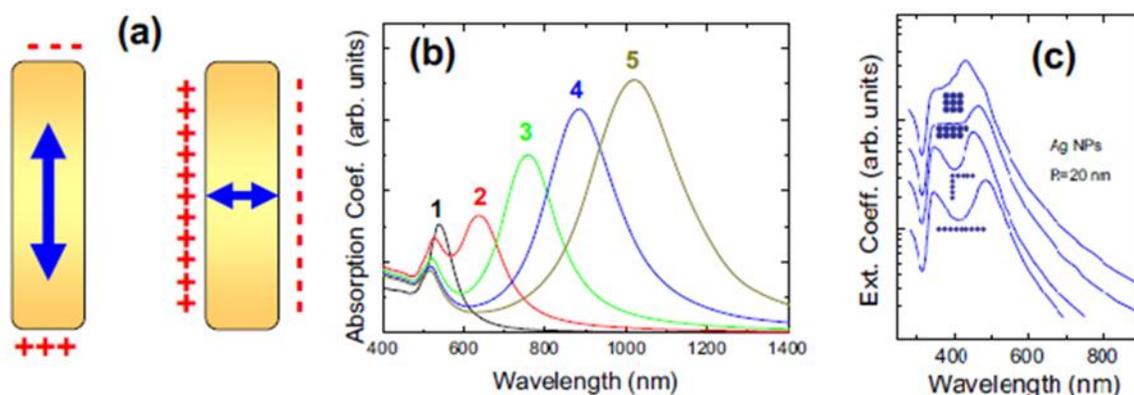


Figura 1. 8. (a) Ilustración de la acumulación de carga para modos resonantes longitudinal y transversal. (b) Coeficientes de absorción calculados para nanobastones de oro con distintas proporciones entre sus ejes. (c) Espectros de absorción para varios arreglos de partículas esféricas de plata, donde se varía la geometría del aglomerado [4].

1.1.3 Síntesis de Au-NPs con láser

El desarrollo de la nanotecnología junto con la motivación por el uso de métodos verdes capaces de producir materiales con mayor pureza y menores residuos ha ocasionado la integración de métodos de síntesis que involucren luz, como motor principal de los mecanismos de síntesis. La síntesis de nanopartículas con láser ha sido de gran interés debido a sus extensas aplicaciones en celdas solares, catálisis, óptica y biomedicina [15-19].

Estos métodos con luz ofrecen la versatilidad de sintetizar las partículas en diferentes sustratos tanto sólidos como líquidos y permite manipularlos con mayor facilidad para la modificación de las NPs (como la fragmentación láser en líquidos o la irradiación de películas delgadas). Esta versatilidad es una de las principales ventajas que se tienen con estos métodos.

La ablación láser es un fenómeno que ocurre cuando un blanco sólido y macroscópico es irradiado por un haz láser con una afluencia mayor al umbral de ablación del material, lo que provoca su evaporación y la eyección de diferentes especies como átomos, moléculas y cúmulos fuera del material (top-down). Estas especies viajan rápidamente en el medio que contenía al blanco irradiado, y entre sus colisiones y aglomeración se van formando las nanopartículas de diversos tamaños (bottom-up). Este proceso se esquematiza en la Figura 1. 9 y se describe a continuación.

Al irradiar un blanco con una afluencia (energía por unidad de área) mayor a su umbral de ablación se produce un plasma frente a la superficie del material irradiado, el cual es característico del sistema según la composición química del blanco, del medio que le rodea, longitud de onda y afluencia del láser incidente, entre otros [15-25]. En particular, para el oro

en bulto [22] se ha reportado un umbral de ablación de 0.5 J/cm^2 si se irradia con un láser Nd:YAG a 1064 nm y 10 ns , similar al que se usó para las síntesis de los coloides en el desarrollo de esta tesis.

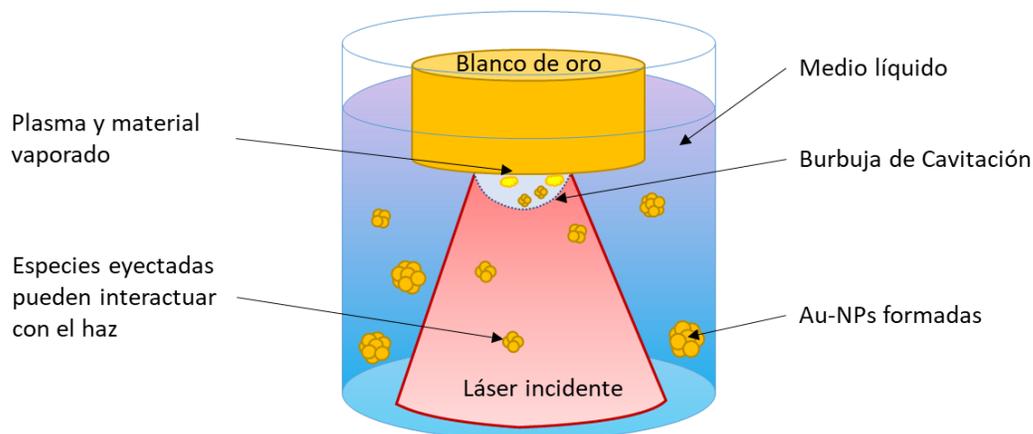


Figura 1. 9 Esquema representativo del proceso de ablación láser en líquidos.

Como se describe con detalle en el trabajo de Zhang et. al. [25], los numerosos procesos que ocurren durante la ablación láser en líquidos (ALL) pueden describirse en tres fases: la fase del plasma, la fase de la burbuja de cavitación y una última fase en la que las partículas son dispersadas y pueden interactuar con el medio líquido. De manera ilustrativa en la Figura 1. 10 se presenta una serie de micrográficas que exhiben la evolución de la burbuja de cavitación, según la etapa de la ablación en la que se encuentre.

En la “fase del plasma”, la irradiación incidente genera un plasma en la superficie del blanco, el cual está compuesto por especies altamente ionizadas con densidades cercanas a 10^{20} partículas/cm³ [26]. Este valor depende de las condiciones de la energía incidente, ya sean los parámetros del láser como la energía inicial y duración de pulso, o por las características ópticas del coloide que se forma, ya que la concentración de NPs aumenta conforme se desarrolla la síntesis y la presencia de las NPs modifican la interacción con los pulsos subsecuentes. Como el blanco se encuentra sumergido en un medio líquido, la expulsión de las especies eyectadas está restringida de manera significativa por el confinamiento del ambiente que le rodea.

Durante la “fase de gas”, como consecuencia de la transferencia de momento y energía, los plasmas presentan altas temperaturas (del orden de 10^4 K), lo que ocasiona cambios drásticos en la presión del medio líquido cercano, del orden de 1 GPa en un tiempo menor a 100 ns [15, 17, 20, 24]. El tiempo de vida del plasma va desde los nanosegundos [10^9 s] hasta los microsegundos [10^{-6}]. Después de este tiempo, el plasma ópticamente emisor desaparece [27].

Como consecuencia del incremento de temperatura y presión se genera una onda de choque y con ello, una burbuja de cavitación. Esta burbuja es propia del proceso de ablación láser en líquidos. Sus características como el radio máximo, tiempo e intensidad de la implosión,

dependen de las propiedades termodinámicas del medio líquido y del blanco irradiado, así como de los parámetros del haz incidente.

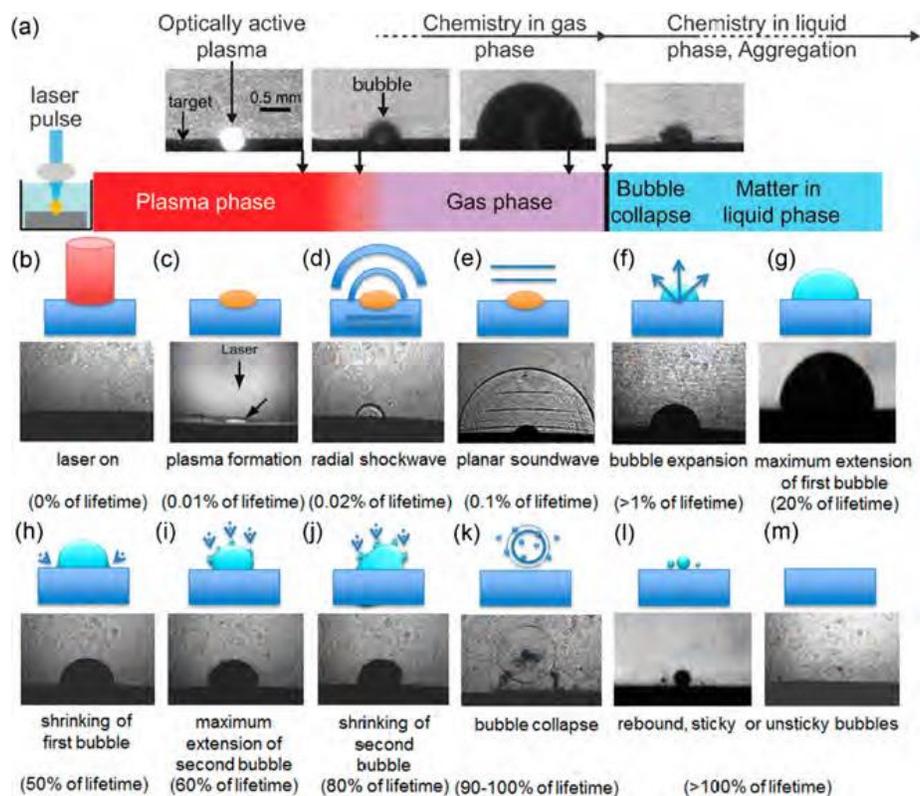


Figura 1. 10 Secuencia del proceso de la ablación láser en líquidos. Inicia con la irradiación láser con la afluencia suficiente para crear la evaporación del material y la burbuja de cavitación. Al encontrar cierto equilibrio la burbuja crece hasta un máximo de tamaño, en el que el enfriamiento ocasiona su colapso. Las partículas se contienen en la burbuja de cavitación y salen eyectadas después de su implosión [24].

1.3. Ventajas y desventajas de la ALL

Por lo general, los métodos químicos que se usan para la síntesis de los coloides de oro se basan en la reacción de un precursor o intercambio de ligandos, como el método de reducción de una sal de oro [7]. Si bien, estos métodos ofrecen alto control en la concentración de los coloides, la geometría y distribución de tamaño de las Au-NPs, también tienen la gran desventaja de tener la inevitable contaminación de los residuos de las reacciones, lo que altera el estado de agregación, genera señales ruidosas en sus estudios espectroscópicos, pueden ser citotóxicos y desactivar funciones específicas de los agentes funcionalizantes [8]. La presencia de estos contaminantes obliga a someter a los coloides sintetizados a varios procesos posteriores de purificación para eliminar el exceso de surfactantes y otras especies químicas, lo que hace más complejo el método de obtención de Au-NPs puras y funcionalizadas.

Una manera de prevenir los problemas de contaminación y toxicidad es el uso de nanopartículas "desnudas", libres de compuestos químicos ajenos a las Au-NPs y el medio conjugado, y con el método de ablación láser en líquidos (ALL) se pueden producir coloides de nanopartículas puras.

En comparación con la ablación láser en aire, la cual puede presentar complicaciones en la recolección de las nanopartículas y el riesgo latente por la reacción explosiva del láser con los gases presentes, la ablación láser en líquidos (ALL) es un método relativamente seguro de síntesis de Au-NPs, que permite la posterior implementación de procesos de fragmentación, fundición o funcionalización con el mismo arreglo óptico, y tiene la ventaja de confinar las Au-NPs en el medio líquido [10].

Así, el procesamiento láser en líquidos ofrece una manera sencilla de producir coloides de nanopartículas que se pueden transferir fácilmente a diferentes sustratos, a diferencia de otras técnicas de síntesis láser como el depósito por láser pulsado (por sus siglas en inglés PLD), donde las Au-NPs se sintetizan en posiciones fijas e inmóviles sobre un sustrato específico.

Entre las ventajas que ofrece este método se tiene una alta pureza de las nanopartículas sintetizadas, morfología esférica, facilidad de implementarlas en distintos disolventes, así como su posible funcionalización *in-situ*, sencillo arreglo óptico y bajo costo de los materiales utilizados. Sin embargo, cuenta con varias desventajas respecto a otros métodos, como la restricción a otro tipo de geometría de la NPs, menor concentración de coloides, menor control en la distribución de tamaños como se aprecia en la Figura 1. 11, menor estabilidad de los coloides sintetizados y el requerimiento de un arreglo óptico capaz de superar el umbral de cada material.

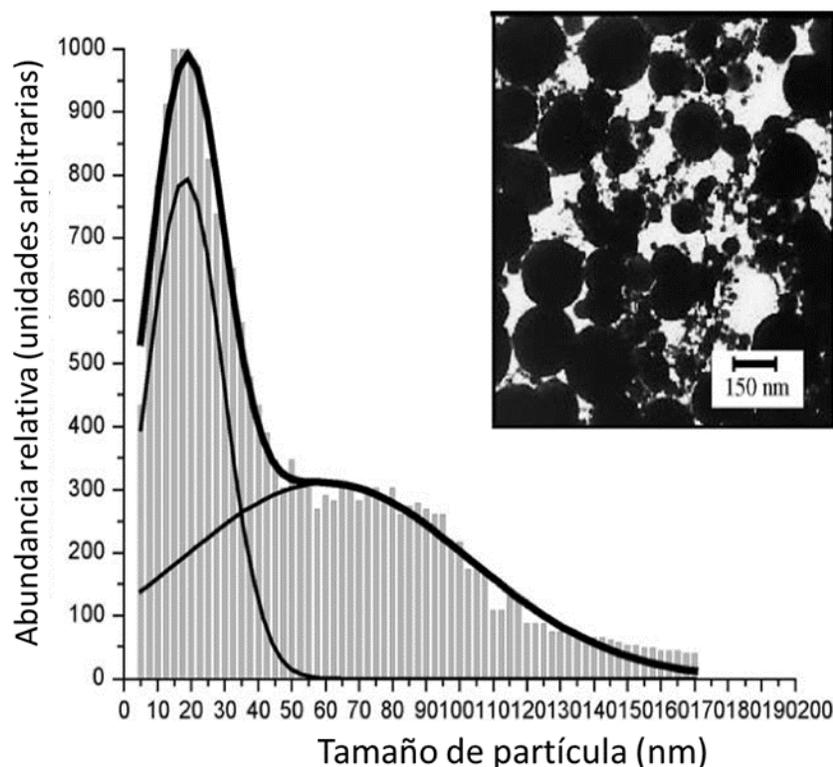


Figura 1. 11 Micrografía TEM y el histograma de la distribución de tamaño de Au-NPs sintetizados por ablación láser de femtosegundos en agua desionizada [8].

1.2.1 Tratamiento láser de las partículas

Como se mencionó en la sección anterior una de las desventajas principales del método de síntesis de ablación láser es la falta de control sobre su distribución de tamaño, la inestabilidad del coloide y su precipitación que genera una respuesta heterogénea de la respuesta plasmónica del sistema, así como de su reactividad.

Entre las técnicas de tratamiento de estos coloides para mejorar su distribución de tamaños, se tiene la técnica de fragmentación láser en líquidos (FLL), que junto con la técnica de fundición láser en líquidos (LML) permite modificar el tamaño de las partículas en un rango desde varias micras hasta 1 nm, donde las partículas de oro han sido las más estudiadas por su capacidad de modificar tamaños desde 400 hasta 4 nm [10]. A continuación, se explorará un poco acerca de los procesos ocurridos durante la interacción del haz con el material ablacionado, para los regímenes de nano, pico y femtosegundos.

Pueden ocurrir otras interacciones entre el material ablacionado y el haz incidente a cada pulso, que también dependen de la distancia focal de la lente. Con una distancia corta, el gradiente de afluencia cercano al volumen focal aumenta drásticamente dentro del volumen irradiado. Estos cambios de afluencia a lo largo del líquido con nanopartículas que se encuentre en el camino del haz, o fuera del volumen focal pueden provocar que se fundan o se agreguen en lugar de fragmentarse [10].

Por esta razón la eficiencia de la FLL depende fuertemente de la afluencia del láser, donde la máxima eficiencia ocurre apenas debajo del rompimiento óptico del líquido [21], ya que a partir de cierta afluencia la energía del láser se ocupa en la creación del plasma dentro del líquido. Se ha reportado mayor extracción de material si se coloca la superficie a un par de milímetros de la distancia focal [40,76] para evitar consumir energía en el rompimiento óptico del líquido. Las regiones de la ablación láser, fragmentación y fundición láser en líquidos como función de la afluencia se pueden observar en la Figura 1. 12.

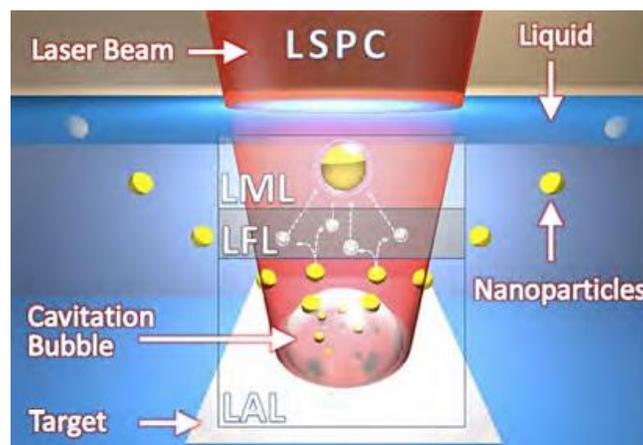


Figura 1. 12 Esquema representativo de las interacciones del láser con el blanco. Se tiene la región de la ablación láser (LAL) cercana a la superficie, la región donde se tiene la condición de afluencia para fragmentar las partículas (LFL) y la región con menor afluencia donde ocurre la fusión de partículas (LML). Esquema adaptado de [11].

Si se pudiese llegar a cierto equilibrio entre los procesos simultáneos de ablación, fragmentación y fusión de las partículas, la técnica de FLL ofrecería un método sencillo de recuperar la suspensión de coloides aglomerados, o bien crear partículas de menor tamaño a partir de partículas más grandes. En ambos casos, la técnica puede ayudar a modificar y disminuir tanto el tamaño promedio de partícula, como la dispersión de tamaños en el coloide.

En la fragmentación láser con pulsos de femtosegundos ocurre por el proceso de explosión de Coulomb [57], el cual consiste en la interacción de un campo eléctrico intenso proveniente del láser con los átomos de oro de las Au-NPs, lo que las ioniza en gran medida. Estos átomos de oro ionizados y cargados experimentan repulsión eléctrica de Coulomb, debido a la proximidad de las cargas iónicas positivas en la Au-NP. La repulsión se mantiene a lo largo de la duración del pulso láser hasta el punto donde las fuerzas repulsivas son mayores a las de cohesión y la partícula explota, lo que resulta en la generación de varios iones o cúmulos de la partícula original y se van formando partículas más pequeñas que la inicial. Cuando se irradia con pulsos de nanosegundos, el tiempo de duración del láser es lo suficientemente largo para que se dé lugar a la termalización de los electrones, lo que aumenta la temperatura de la red iónica hasta el punto de fusión en cierta parte de la superficie de la nanopartícula. Esta fusión debilita la cohesión de la partícula y permite su división en otras de menor tamaño hasta enfriarse sumergidos en un medio líquido y volverse a solidificar en con una geometría esférica.

La técnica de fragmentación láser utiliza un sistema experimental similar a los comúnmente usados para ALL en el que un láser pulsado incide en la muestra para irradiar zonas del líquido donde haya partículas suspendidas. Por ello es importante que se mantenga el líquido contenido en agitación, para promover que las partículas más grandes que normalmente se sedimentan, puedan volverse a suspender y aumente la probabilidad de interacción con el haz láser. De esta manera el número de partículas pequeñas aumenta, ya que se dividen los aglomerados de partículas y con pulsos de mayor energía se puedan fragmentar las partículas más grandes lo que crea nuevas partículas.

En la Figura 1. 13 se puede observar algunas de las diferencias en la ablación cuando se usan pulsos de nanosegundos y femtosegundos. El proceso de ablación es más preciso y limpio, se definen mejor los cráteres tras la extracción del material y es más eficiente por número de pulsos y fluencia del láser cuando se usan pulsos de femtosegundos.

Con el uso de láseres con pulsos de nanosegundos (10^{-9}), se tienen los fenómenos principales de deformación, fragmentación y ensamblado de las Au-NPs, en las que se pueden modificar la forma y superficie de partículas individuales [49], o bien la estructura mesoscópica en la que se arreglan. Por ejemplo, en el trabajo de González-Rubio et. al. (2016) [46] se presenta la comparación de radiación en nanobastones de oro (Au-NR) entre pulsos de femtosegundos y nanosegundos, donde los pulsos láser con femtosegundos con una longitud de onda de 800nm llevan a la deformación de los bastones a esferas, las cuales mantienen el mismo volumen inicial, mientras que pulsos de nanosegundos resultan principalmente en la fragmentación de los Au-NRs.

Al observar la Absorción Transitoria de partículas excitadas (electrones calientes), la cual es una técnica de medición en el rango de femtosegundos, se encuentran espectros de absorción que difieren de los espectros de partículas no excitadas (o de electrones fríos). Los electrones calientes se relajan mediante el acoplamiento electrón-fonón en un periodo de 2.5 ps, y la relajación fonón-fonón ocurre en periodos mayores a 50 ps [46]. En la Figura 1. **13!Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se muestra un esquema con la evolución temporal de la interacción del pulso láser con la partícula y se puede apreciar los fenómenos que gobiernan en cada escala de tiempo.

Se ha reportado que al usar pulsos en el rango de picosegundos se manifiestan cambios en la dinámica de los electrones de las Au-NPs [46] que puede llevar al “blanqueamiento” de los coloides. Es decir, se modifica la respuesta de los electrones de las Au-NPs, por lo que temporalmente se desaparece en fenómeno de LSPR en la región característica (500-600 nm) inmediatamente después de la excitación con el láser.

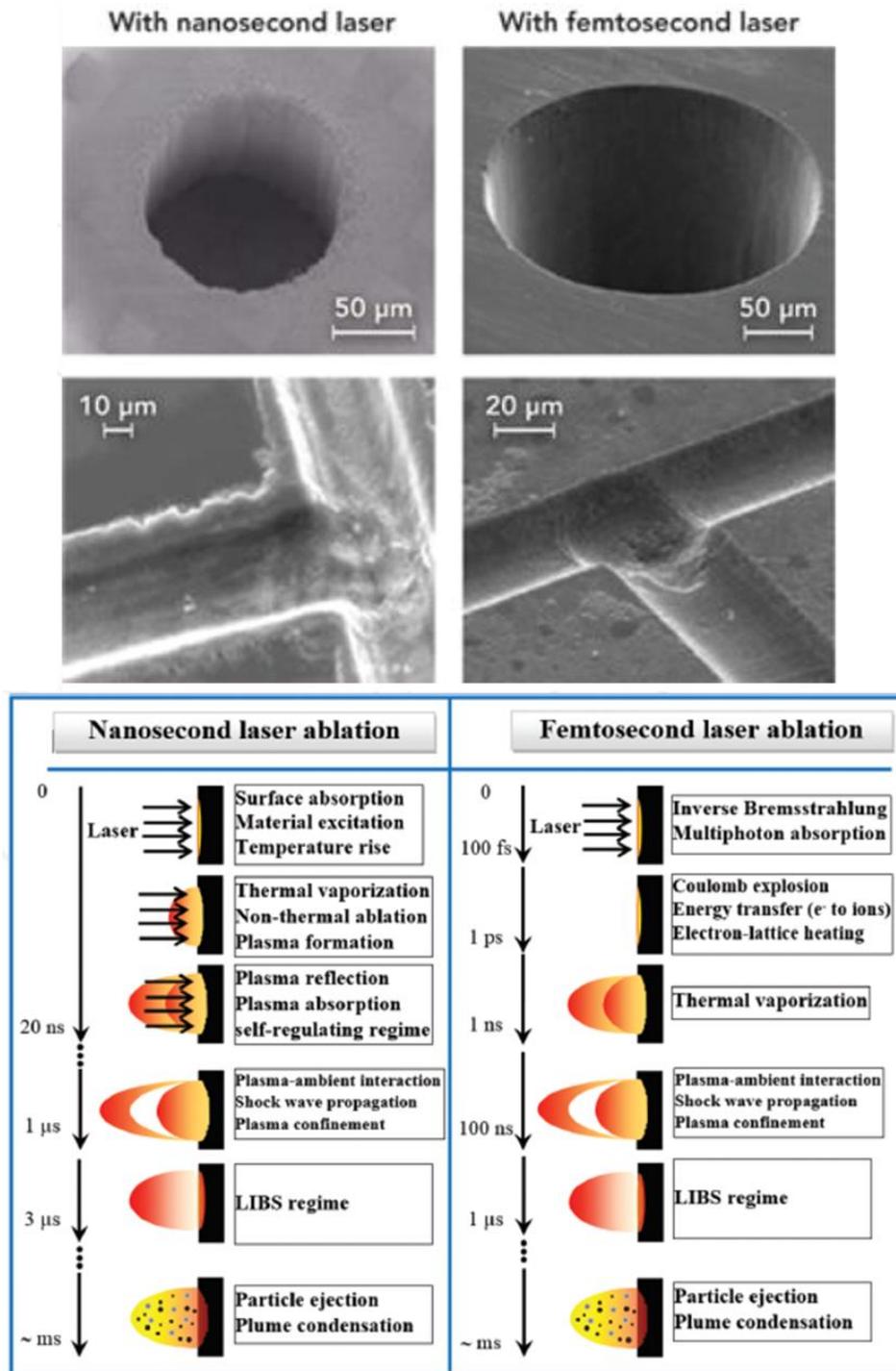


Figura 1. 13. Comparación de los procesos de ablación láser con pulsos de nanosegundos y femtosegundos. (a) Micrografía SEM de una superficie ablacionada y (b) escala temporal de la dinámica de los procesos tras la absorción del pulso láser [55].

Al usar pulsos de duración de femtosegundos, la absorción de la radiación ocurre en tiempos menores a los de relajación térmica de los electrones de las Au-NPs, por lo que la interacción electrón-fonón de la red cristalina es menor, los electrones “calientes” se enfrían rápidamente después del pulso láser, se genera una rápida evaporación del material y se tiene una transición

directa de sólido a vapor del material, lo que evita el proceso de fundición y aglomeración del material [54].

Por lo anterior, el uso de láseres de pulsos de femtosegundos es óptimo para el tratamiento de fragmentación de las Au-NPs, o de ablación láser en regiones mejor confinadas [54, 55].

Sin embargo, el acceso a un láser de pulsos ultrarrápidos (femto y picosegundos) puede estar limitado ya que los equipos que operan con estas características son considerablemente más costosos (90-500 mil dólares) que los láseres de nanosegundos (3-30 mil dólares). Si bien, la fragmentación láser con un láser de nanosegundos no es la condición óptima, se puede emplear el mismo sistema experimental para la ablación y fragmentación de las partículas. Esta es una de las ventajas que se plantean en esta tesis.

El estudio detallado de los procesos que se desarrollan desde la transformación del material en bulto, la absorción de la energía hasta los procesos de fragmentación del material para ser expulsados hacia el líquido y formar el coloide de Au-NPs son una serie de complejos y dinámicos procesos de gran interés que se encuentran fuera del enfoque de esta tesis y en la siguiente tabla se resumen algunos de ellos:

Tabla 1. Estudios que emplean la irradiación láser con femto, pico y nanosegundos para cambiar la morfología y tamaños de las Au-NPs.

Longitud de onda (nm)	Duración de pulso	Geometría	Energía	Tasa de repetición	Efecto	Referencia
800	femtosegundos (100 fs)	nanorods	J- 1mJ	1 kHz	Cambio a geometría esférica y fusión de las nanopartículas. Con altas energías puede haber fragmentación	63
800	femtosegundos (140 fs)	esféricas	500 J	1kHz	Reducción de tamaños	45
800	nanosegundos (7 ns)	nanorods	J-mJ	10Hz	Cambio a geometría esférica, fragmentación y en menor proporción fusión	63
580 y 600	femtosegundos (450 fs)	esféricas	600 nm(1 mJ) y 580 (0.2 mJ)	76 MHz	Desaparición de banda de absorción ("bleaching")	46, 47
532	nanosegundos	esféricas	400 mJ	10 Hz	Agregación de nanopartículas de tamaño pequeño (8 nm) en solución de dodecilsulfato	60
532	nanosegundos (5 ns)	esféricas	1J	10 Hz	Fragmentación de hojuelas de oro micrométricas para obtener nanopartículas	62
532	nanosegundos (7 ns)	nanorods	60 mJ	10 Hz	Cambio a geometría esférica, el plasmón se corre al azul.	63
532	nanosegundos (7 ns)	esféricas	2 J	2 KHz	Fragmentación de partículas pulso por pulso y se observa una distribución de tamaño definida.	58
532	nanosegundos (9 ns)	esféricas	1.6 J	100 Hz	Fragmentación de partículas menores a 13 nm para un pulso se observan dos distribuciones de tamaños	58
532	picosegundos (10 ps)	esféricas	0.03 J	80 KH	Fragmentación de partículas para un pulso con una distribución de tamaño definida similar a la observada con nanosegundos	58
532	picosegundos (20 ps)	esféricas	15 mJ	10 Hz	Fragmentación de nanopartículas en solución con poly(amidoamina) (PAMAM-G5) y apagado ("bleaching") de señal óptica	59
355	nanosegundos	esféricas	80 mJ	10 Hz	Fragmentación de nanopartículas y reducción de distribución de tamaños en soluciones acuosas con dodecilsulfato	60
355	nanosegundos (6 ns)	esféricas	120 mJ	-	Fragmentación de nanopartículas coloidales sobre un sustrato de vidrio umbral, fragmentación a partir de 150 mJ	61
355	picosegundos (15 ps)	esféricas	15 mJ	10 Hz	Fragmentación de nanopartículas en solución con poly(amidoamina) (PAMAM-G5) y apagado ("bleaching") de señal óptica	59

1.4. Centrifugación

La monodispersión del coloide es un factor de gran importancia en el uso de las Au-NPs para conjugarlas, ya que su estado de floculación nos refiere a la capacidad de poder interactuar con la luz o con funcionalizantes. Un método ideal de separación de tamaños debería ser rápido, efectivo y de bajo costo de implementación, que abarque rangos de tamaños de 1-250 nm mientras que ofrezca una resolución de tamaños suficiente.

La centrifugación es una técnica muy usada de separación de partículas en suspensiones de líquidos, donde se puede hacer una separación de las partículas mediante la obtención de un gradiente de tamaño de Au-NPs, como función del tiempo y velocidad de las revoluciones [51-53]. También se pueden separar los agregados, aunque la separación de coloides de metales nobles por gradiente de densidad es un tema de gran interés actual, ya que la mayoría se restringe a tamaños menores a 60 nm, o bien requiere el uso de ultracentrífugas (>200 000 g) y un aumento en el precio del costo de los equipos de 20 veces o más.

A continuación, se presenta una tabla donde se presentan el número de revoluciones por minuto (RPM) o la fuerza centrífuga relativa (fuerza G, por sus siglas en inglés RCF) que se necesita para separar partículas según su rango de tamaños. Si se conoce el radio del rotor, se puede calcular la equivalencia entre RPM y fuerza G mediante el producto descrito en la ecuación (11):

$$RCF(\text{fuerza } G) = 1.12 * \text{radio} * \left(\frac{\text{rpm}}{1000}\right)^2$$

Los valores de RPM, tiempo y número de ciclos que se necesitan dependen de las características del equipo (radio del rotor), del sistema coloidal y del método del que se obtuvieron las Au-NPs, así como de componentes externas con las que se funcionalizaron (ej. los residuos químicos de la reducción de la sal de oro).

Tabla 2. Estudios que emplean la centrifugación de los coloides para separar las Au-NPs en rangos de tamaño. Tabla adaptada de [67].

Tamaño de Au-NPs (nm)	Revoluciones	Tiempo	Referencia
55-65	3500 RPM	2 horas	69
45, 75 y 100	5500 G	15 minutos tres ciclos	72
30	16,800 G	30 min dos ciclos	72
24	6000 RPM	20 min	74
15.5	15,000 G	45 min	68
13.5	7,200 RPM	2 horas	70,71
13	13,200 RPM	30 min dos ciclos	68

Como se puede observar en la Figura 1. 14. a. después de someter los coloides a centrifugación, se puede separar las Au-NPs y después extraerlas por regiones de tamaño. Si se vuelven a suspender en un coloide y se miden los espectros de absorbancia por LSPR, se observa que son modificados al tener Au-NPs monodispersas de tamaños diferentes, como se observa en la Figura 1. 14.b. Se puede apreciar el corrimiento hacia el rojo y ensanchamiento de la banda de absorbancia cuando se tienen coloides con Au-NPs de mayor tamaño.

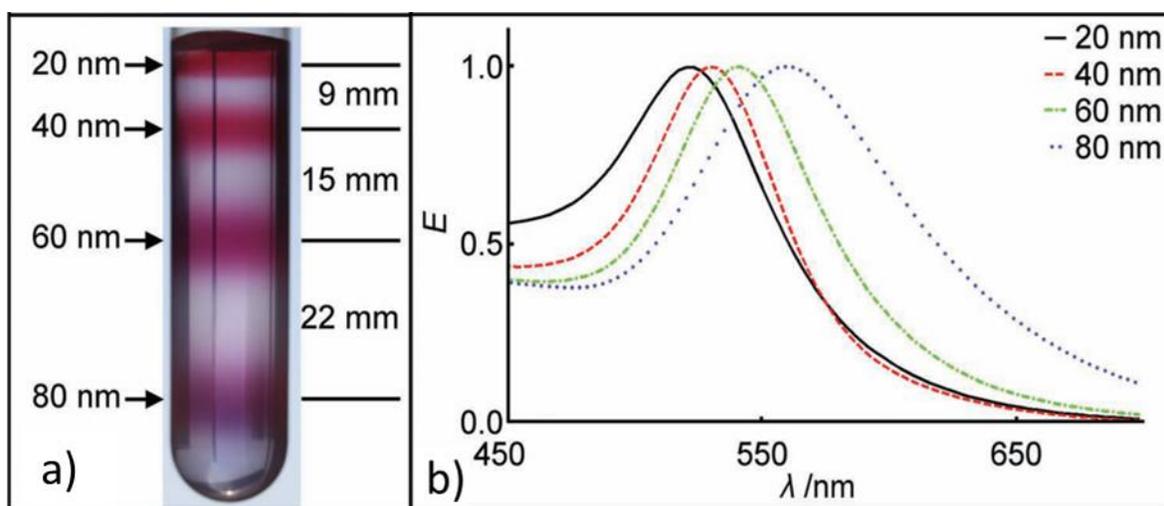


Figura 1. 14. (a) Fotografía de las Au-NPs separadas según su tamaño mediante centrifugación. (B) Espectros de absorbancia normalizados de las Au-NPs, se puede apreciar el corrimiento al rojo cuando se miden las partículas más grandes [51].

Algunas de las desventajas de esta técnica son que sólo se puede usar para volúmenes pequeños (1 – 2 ml) con baja concentración, puede ser complicado recuperar el material sedimentado y puede provocar la floculación posterior de las Au-NPs. Se definirá el concepto de *floc* en la siguiente sección.

Dadas las ventajas que ofrece esta técnica de separación en este trabajo se explorará el uso de la centrifugación con el objetivo de disminuir la distribución de tamaños dado que se obtienen coloides con relativa baja concentración de partículas.

1.5. Estabilidad del coloide

Como se ha mencionado anteriormente, el comportamiento de la respuesta óptica de las Au-NPs por LSPR depende también del estado en que se encuentren las partículas suspendidas, si están agrupadas por interacciones débiles, por unión o fusión de ellas o bien por interacción con el medio líquido.

Por esta razón, es útil introducir la nomenclatura propuesta en el trabajo de Weisbecker et. al. u Becker et. al. [30] donde se distinguen los términos de floculación, agregación y aglomeración: *aglomeración* refiere a la asociación débil (suelta) y reversible de las partículas, *agregación* refiere a la asociación irreversible y fuerte (cerrada), y *floculación* refiere a la inestabilidad de los coloides a partir de la creación de flocs. Un “floc” se define como cualquier asociación cercana de partículas primarias, aglomerados y agregados. La diferencia entre aglomerado y agregado radica en que el agregado es incapaz de separarse una vez formado, pero esta condición es ambigua y depende de muchos parámetros para cada sistema. En los sistemas coloidales, los procesos de aglomeración y agregación coexisten simultáneamente, por lo que es muy complicado distinguir entre estos estados al analizar cambios en las señales espectroscópicas como el ancho de la banda de absorción.

Debido a esto, la introducción del término “floculación” es de gran ayuda para referirnos a la estabilidad general del coloide. Y como “estabilidad” se entenderá a la capacidad del sistema de mantener su suspensión coloidal, en el que la fase de las nanopartículas siga dispersa en el volumen del líquido.

Es común el uso de surfactantes (sustancias que evitan la floculación de las partículas del coloide) para mejorar la estabilidad del coloide en el tiempo, pero en varios escenarios puede ser que el uso del surfactante conlleve varias desventajas, como que disminuya la reactividad de la partícula al reducir el área efectiva de éstas, pueda presentar una segunda banda de absorción que genera una señal mezclada con la absorbancia por LSPR y en ocasiones requiere de lavados posteriores para eliminarlo. Los criterios de uso y tipo de surfactante dependen de cada caso en que se quiera acoplar, donde se tiene que contemplar la reactividad del sistema Partícula-medio con el agente funcionalizante y en el desarrollo de esta tesis convino que las partículas se encuentren suspendidas sólo en agua para estudiar los efectos al variar el tratamiento al que se someten antes del cambio en la composición química que rodea a la partícula [51-55].

Para estimar la estabilidad de un coloide, hay que profundizar un poco en la interacción de las nanopartículas con el medio líquido en el que están sumergidas. Las Au-NPs sintetizadas por ALL presentan carga superficial, como consecuencia del violento y complejo proceso de ablación, ionización de la red de oro y la formación del plasma. La naturaleza exacta de la carga de las partículas sintetizadas por ablación láser es un tema de actual estudio, ya que en diferentes aproximaciones como la presentada en el trabajo de Zhang et. al. [25] se discute la oxidación parcial de las Au-NPs lo que le otorga un carácter negativo, mientras que en otros como el trabajo de [76] logran modificar y funcionalizar las partículas gracias a su carga positiva.

La repulsión electrostática entre las partículas es el principal factor que le otorga la estabilidad al coloide y depende de las características del líquido y de las partículas ya solvatadas (ya recubiertas del líquido). Al estar en contacto las Au-NPs inicialmente cargadas con las moléculas del líquido, se crea una capa alrededor de las partículas, y el producto final partícula-capa puede comportarse distinto a las partículas originales.

Este acoplamiento depende fuertemente de la polarizabilidad del medio líquido, y en casos como el agua la distribución de cargas es fácil de visualizar. Es por ello por lo que la modificación del pH del coloide también puede jugar un papel importante en la estabilidad coloidal [7]. A diferencia de un surfactante, este recubrimiento de las partículas no es lo suficientemente fuerte como para mantener la separación entre las partículas, pero juega un papel importante en la determinación de la carga superficial.

En la Figura 1. 15.a se puede observar un esquema en el que se muestra cómo se recubre una partícula con un tipo de carga (ej. "+") y cómo atrae el polo opuesto ("-") de las moléculas vecinas del líquido. Como resultado, se forma una primera capa o corona conocida como *corona rígida*. Esta capa consta de aquellas moléculas con gran afinidad con la partícula, de manera que el acoplamiento es fuerte y resistente, como los agentes funcionalizante de cadena corta, los residuos de citrato de sodio en la síntesis química, o polímeros con los que se acople la nanopartícula, disueltos en otro líquido como el agua. Hipotéticamente se considera como una nueva partícula cuya dinámica cambia a la de una nueva esfera entera que se mueve rígidamente con un radio R_H . A este radio se le conoce como *el Radio hidrodinámico* de la partícula y depende de muchos factores como el material de la partícula, su tamaño, su carga superficial, la polarizabilidad y carga de las moléculas vecinas del líquido, el pH, la concentración de partículas, la temperatura, entre otras. Predecir el radio hidrodinámico no es trivial, y cuando se obtiene su medición para cada una muestra, es para un sistema específico.

Las técnicas que utilizan este acoplamiento partícula cargada-medio líquido son la dispersión dinámica de luz (por sus siglas en inglés DLS) y el Potencial Zeta (Pot- ζ). El DLS permite estimar el R_H del sistema partícula-líquido, lo cual nos da una idea del tamaño de las partículas y lo compacto y fuerte que tenga su interacción con el medio líquido.

Los modelos de los equipos que miden tamaño de partícula por DLS generalmente consideran partículas dispersoras esféricas y monodispersas y se ajustan con datos empíricos como el índice de refracción del material de la fase dispersa, el índice de refracción y viscosidad de la fase líquida, y la absorbancia que tienen a la longitud de onda del láser con el que opera.

Su funcionamiento consiste básicamente en correlacionar los cambios de intensidad recibida de luz dispersada a un ángulo fijo (generalmente a 90° respecto a la incidencia), para intervalos de tiempo muy cortos. Según el movimiento aleatorio de las partículas en el líquido y la dispersión de la luz como función del tiempo, se ajusta la ecuación de Stokes-Einstein [75] para estimar el coeficiente de difusión D_t y con éste se puede deducir el radio hidrodinámico de la partícula hipotética que causaría dicha dispersión, mediante la ecuación (12):

$$D_t = \frac{k_b T}{6\pi\eta R_H} \quad (12)$$

donde D_t es el coeficiente de difusión, $k_b T$ refiere a la energía cinética de la partícula como función de su temperatura y η su viscosidad.

La segunda capa, llamada corona débil, se forma con interacciones más débiles entre la nanopartícula y elementos secundarios afines, como plasmas de las proteínas, biomoléculas, residuos químicos dentro del mismo líquido, extremos lejanos en moléculas de cadena larga, etc.

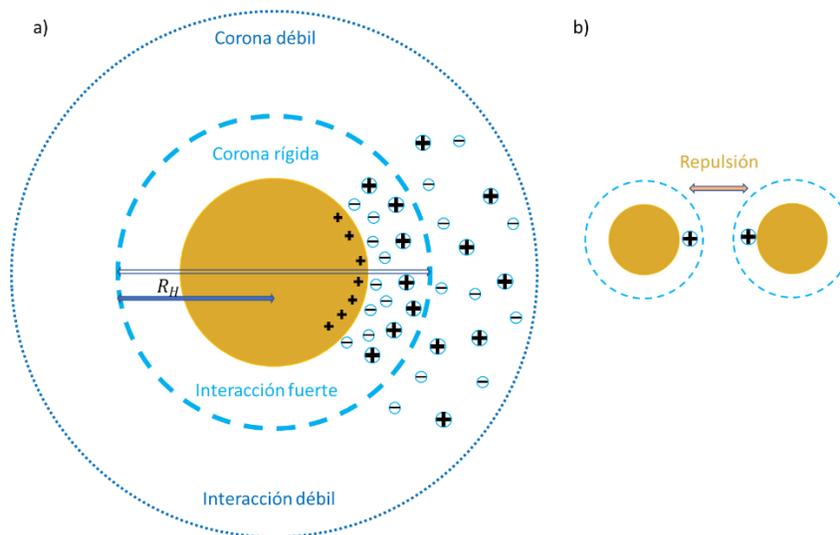


Figura 1. 15. (a) Esquema representativo de la solvatación de una Au-NPs en presencia del medio líquido polar. (b) La interacción electrostática se da entre la nueva partícula resultado del acoplamiento con el medio líquido.

Es muy importante tener presente que el DLS es una técnica veloz para estimar tamaño de partícula a costa de precisión; se debe tener bien caracterizado el sistema de las partículas con el líquido y comparar con otras técnicas de medición, ya que puede dar mediciones aparentemente contradictorias con otras técnicas de medición de tamaño de partícula (como la microscopía TEM), y se debe al tamaño de la corona, no al de la partícula.

En la Figura 1. 16 se presenta un ejemplo de estas diferencias del tamaño medido en DLS para el mismo conjunto de partículas de látex de 100nm promedio.

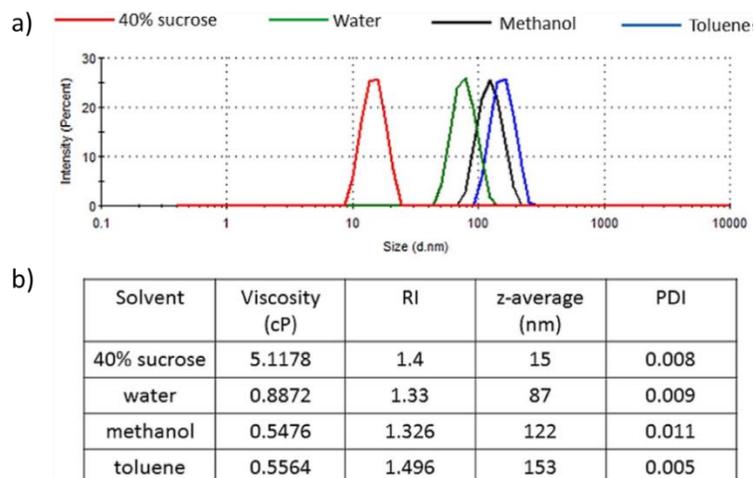


Figura 1. 16. (a) Espectros de intensidad de dispersión como función del radio hidrodinámico. (b) Tabla comparativa en la que inicialmente se tienen las mismas partículas de látex (100nm) y el tamaño medido varía significativamente al cambiar la fase líquida, aún para muestras con bajo índice de polidispersión. Figura tomada de [75].

Por otra parte, el Potencial Zeta estima un potencial electrocinético entre las partículas móviles electroforéticamente (el diámetro completo que se mueve junto con la partícula en presencia de un campo eléctrico), y la capa hipotética de la fase dispersante alrededor de la partícula. Se puede hacer un símil con la corona rígida y la débil descrita en la Figura 1. 15. En este caso, la primera capa, llamada capa de Stern, es aquella compuesta por los iones de carga opuesta a la carga de la superficie de la partícula. Esta capa tiene gran interacción y suele ser rígida y comprimida. A partir de ella, se genera una segunda capa de cargas mixtas consecuencia de la débil interacción electrostática con el resto del líquido, con cargas opuestas y cargas iguales al de la partícula, que se acoplan entre sí según el grosor de la capa de Stern. Esta segunda capa, tal como la corona débil, es más suelta y está menos enlazada con la partícula, por lo que se vuelve maleable y poco presente en la interacción eléctrica.

El potencial Zeta (Pot- ζ) es una técnica que mide la movilidad electroforética de las partículas mediante la dispersión de un haz láser, en presencia de un campo eléctrico conocido. Esta diferencia de potencial se sitúa entre el sistema de dos capas de la partícula, y la capa hipotética que la rodea, es decir aquella capa del líquido dispersante que no interactúa eléctricamente con la partícula. Como interpretación física, se tiene una estimación de la repulsión que experimentan entre las partículas solvatadas con su medio líquido. Tal como el DLS, el potencial Zeta es una veloz técnica de estimación del potencial electrocinético de las partículas, cuyas mediciones son de carácter relativo.

El signo del Pot- ζ varía según la carga de las partículas y si se tienen medidas con valores menores a -30mV y mayores a +30mV (Pot- ζ >|30|V) suele considerarse un coloide estable [53,75]. No obstante, la estabilidad es relativa a la respuesta de interés que presente el material de las NPs y el líquido que lo contenga, así como el recubrimiento que pueda tener y su estado de floculación. Esto quiere decir que en los trabajos donde se reportan 30mV de intensidad

como una medida de estabilidad coloidal, su sistema en particular es estable en el tiempo, se sedimenta a un ritmo lento, sus propiedades ópticas y de reactividad química cambian poco y se mantiene disperso. El umbral exacto varía según la composición de las partículas, la fuerza iónica, la concentración, el tamaño de ellas, el pH del medio líquido, la polarizabilidad y distribución de la nube eléctrica de las moléculas de la fase líquida, la temperatura y varios factores más [75]. Por el gran número de variables, se sugiere hacer una profunda caracterización de un sistema conocido en varios entornos, para determinar con mayor precisión los parámetros que afectan la medida, pues dos mismos valores de potencial Zeta pueden significar condiciones de fuerte estabilidad para un sistema e inestabilidad absoluta para otro [75]. La mayoría de los equipos miden la movilidad electroforética μ_e de las partículas mediante la ecuación (13) y después calculan el potencial Zeta a partir de la ecuación de Hückel (14):

$$\mu_e = \frac{V}{E} \quad (13)$$

$$\mu_e = \frac{\varepsilon_r \varepsilon_0 \zeta}{3\eta} \quad (14)$$

Para un coloide con viscosidad η y función dieléctrica ε_r , ε_0 es la permitividad en el vacío, V la velocidad promedio de las partículas cargadas y E el campo eléctrico aplicado. La velocidad de las partículas se mide mediante el corrimiento Doppler que presenta el esparcimiento de las partículas al incidir un láser continuo sobre ellas, sometidas a un campo eléctrico conocido.

En esta tesis se referirá la “estabilidad coloidal” a la capacidad de mantener las características de su espectro de absorción conforme pase el tiempo.

1.6. Funcionalización con ácido mercaptopropiónico (AMP)

En general, las diversas aplicaciones de las Au-NPs requieren de una funcionalización: un adecuado acoplamiento de las partículas con la molécula de interés. Debido a que la respuesta óptica de las Au-NPs es muy sensible a cambios en la composición química del coloide es fundamental buscar un adecuado acoplamiento entre el agente de funcionalización, el medio líquido y la nanopartícula. Si se utiliza la respuesta óptica o plasmónica de la Au-NPs se requiere además que esta funcionalización preserve la propiedad óptica de interés y no afecte además la estabilidad del coloide.

Dentro de las estrategias para funcionalizar Au-NPs en sistemas coloidales sobresale el uso de compuestos “tiolados”, las cuales son aquellas moléculas con un grupo funcional tiol (S-H), cuya interacción entre el radical S⁻ y la NP depende de la compleja dinámica del enlace S-Au [32].

La fuerza de las interacciones tiol-oro proveen las bases de diversos métodos robustos de funcionalización con un gran número de aplicaciones como la fabricación de monocapas auto ensambladas, la solvatación estable de las Au-NPs donde los tioles funcionan como surfactantes, la bioconjugación con proteínas y compuestos biológicos de gran interés, creación de nanoestructuras como corales, bastones, partículas envueltas y para la activación en catalizadores, entre muchas otras [32, 42, 43].

Aunque esta interacción tiol-oro y sus múltiples implicaciones han sido estudiadas en numerosas ocasiones [32-35, 38], los mecanismos que conllevan son de gran interés por el complejo comportamiento que se tiene al variar la molécula tiolada, ya que puede promover o retrasar la interacción S-Au según la carga de la molécula. Estos cambios se pueden encontrar en varios estudios en la literatura, como el trabajo de Toma et. al. [32] donde se comparan los espectros de absorbancia de coloides de Au-NPs rodeadas de citrato de sodio (cit-AuNPs), en presencia de dos moléculas similares, 2-mpy y 4-mpy, como se observa en los espectros de absorbancia de la figura 1.12. La posición del nitrógeno como sustituto de un carbono del anillo modifica la capacidad de resonancia del anillo total, por lo que ambas moléculas reaccionan de manera distinta, aunque el acoplamiento con la Au-NPs es el mismo, mediante el tiol.

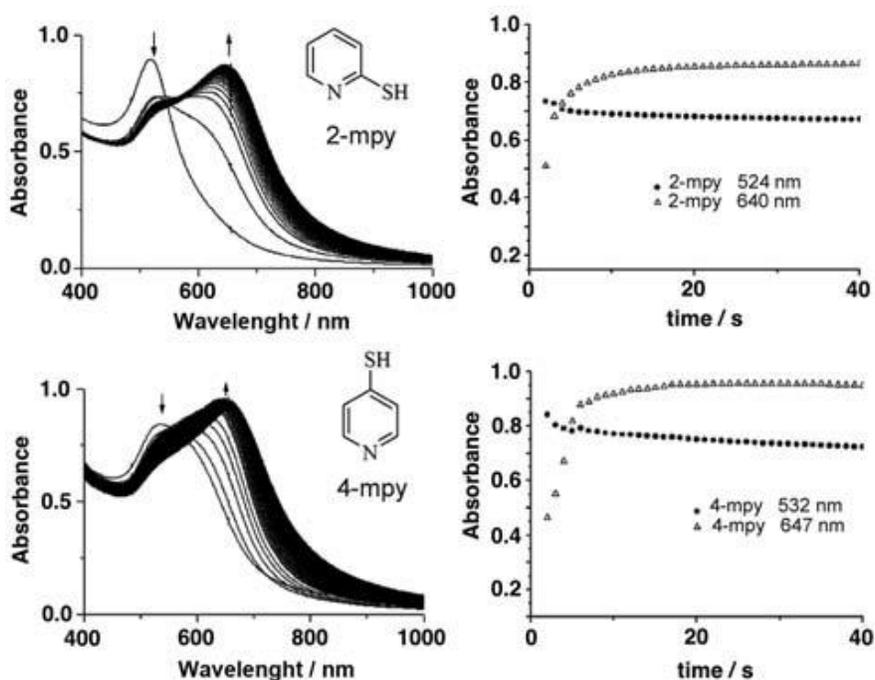


Figura 1. 17 Espectros sucesivos de cit-AuNPs medidos tras la adición de $5 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ de 2-mpy y 4-mpy en un intervalo de 120s [32].

Estos estudios evidencian la compleja dinámica de la interacción tiol-oro, aunque se trate del mismo grupo funcional S-H y del mismo enlace S-Au.

En particular, el ácido mercaptopropiónico (AMP), es una molécula tiolada de gran interés nuestro ya que actualmente se utiliza en nuestro grupo de trabajo como intermediario para el estudio de sustancias biológicas como la albúmina de suero bovino (por sus siglas en inglés BSA), la cual es una proteína usada en aplicaciones biológicas como en ensayos de Westernblot, medios de cultivo celular y es ideal para la mayoría de los experimentos estándar de biología molecular [42].

El AMP consta de una molécula corta, cuya estructura se presenta en la figura 1.13. Es un líquido transparente con una viscosidad similar a los aceites, que desprende un fuerte olor sulfuroso. Es soluble en agua, casi no presenta absorción óptica en la región del visible y tiene un índice de refracción de 1.49 a temperatura ambiente cercano al índice del agua, por lo que es conveniente para usarlo en disolución como el líquido para nuestros coloides de oro.

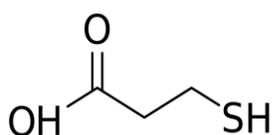


Figura 1. 18 Esquema de la molécula del AMP.

En estas secciones se ha presentado la importancia de las Au-NPs en diversas aplicaciones, las ventajas y desventajas del método de ablación láser para sinterizar Au-NPs y algunas propiedades de interés para aplicaciones en sistemas como los biológicos o biomédicos, por ejemplo, la estabilidad de los coloides y características de funcionalización con sistemas tiolados.

Para implementar de manera eficaz las Au-NPs generadas por ablación láser es indispensable un control adecuado de los tamaños que permita mejorar la estabilidad del coloide y facilitar la funcionalización, que como se comentó, depende del agente tiolado, pero también de las propiedades geométricas de las Au-NPs que determinan la química de la superficie. Si bien, ha habido grupos que han desarrollado trabajo de investigación sobre tratamiento láser para homogeneizar el tamaño de las nanopartículas, éste es escaso y se lleva a cabo con láseres de femtosegundos que son costosos. En este trabajo de investigación se propone estudiar métodos que permitan una selección de tamaños de nanopartícula mediante láseres pulsados en nanosegundos que son menos costosos y centrifugación. El efecto de la selección de tamaños en las propiedades de estabilidad, la respuesta plasmónica y la funcionalización con AMP, serán estudiados.

1.7 Aplicaciones de Au-NPs con interés de sensado y sistemas biológicos

Las Au-NPs funcionalizadas se pueden aplicar como marcadores para estudios microscópicos en células biológicas, así como para la detección de interacciones moleculares y biochips, métodos de contraste para técnicas de diagnóstico de enfermedades por imagen y aplicaciones fototérmicas.

Como un ejemplo del uso de Au-NPs como medios de contraste, Prashant et. al. [79] implementaron la teoría de Mie y el método de aproximación dipolar para calcular los coeficientes de absorción y esparcimiento, así como su respuesta óptica de Au-NPs esféricas, sistemas de Au-NPs recubiertas de silicio y nanobastones de oro. Se encontró que, al incrementar el tamaño de nanopartículas, para partículas mayores de 80 nm de diámetro, la magnitud de la luz esparcida por Au-NPs es 5 órdenes mayor que la emisión emitida por otros marcadores basados en colorantes fluorescentes.

En aplicaciones como biosensado, es común necesitar partículas funcionalizadas. Esta funcionalización implica modificaciones en las características fisicoquímicas y biológicas del material original al usar sustancias acopladas a la nanopartícula, para el desarrollo de una función específica. Los métodos más usados para obtener Au-NPs funcionalizadas son la adición de grupos funcionales a las NPs, como aminas, tioles y grupos carboxilos; el uso de disolventes tales como el polietilenglicol, generalmente acoplado al grupo tiol, así como el uso de biomoléculas más complejas como ARN, ADN, péptidos y anticuerpos.

Un ejemplo de lo anterior es el sensor desarrollado por Sönnichsen et. al. [78] en el que usan la respuesta óptica de las NPs para determinar la presencia de la hibridación de ADN, presentada en la Figura 1.15. A partir de la luz esparcida debida a la interacción con el plasmón de las NPs, al variar el entorno de acuerdo con el tipo de hibridación, se observa un corrimiento en la longitud de onda referida al máximo esparcimiento.

Previo a este análisis también se estudió el cambio en su respuesta óptica cuando se funcionalizan NPs de oro y plata con estreptavidina y en presencia de la biotina, al colocar el sistema entre dos de las NPs. Se puede observar en los espectros la Figura 1. 19 una notable diferencia entre las bandas iniciales debido a su acoplamiento en una región muy cercana, entre 500 y 650 nm. n este ejemplo las NPs de plata muestran un mayor corrimiento espectral (del orden de 100 nm) respecto a las del oro (del orden de 23nm).

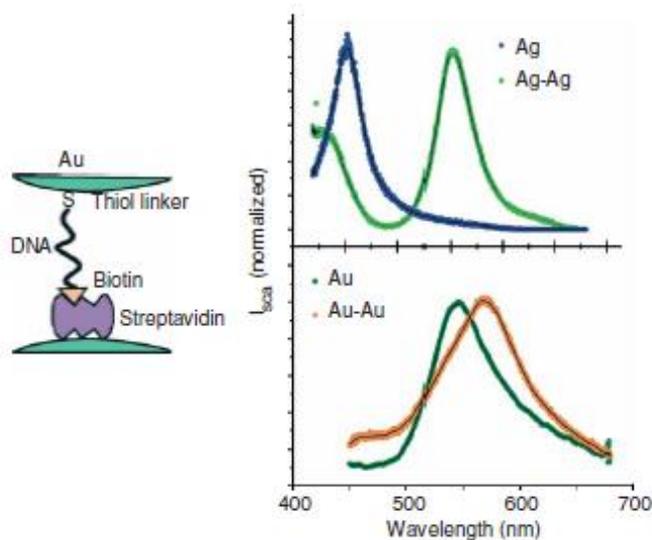


Figura 1. 19. Corrimiento de la banda de luz esparcida al modificar el estado de hibridación de ADN con Au-NP.[78].

Sin embargo, la plata presenta mayor reactividad química con las células, propiedad por la cual se puede usar como antibacterial. Además, el oro es químicamente más estable y por su afinidad es más fácil acoplarlo a este tipo de moléculas vía los grupos funcionales - SH, -NH₂ ó -CN.

En la siguiente sección se presentará la metodología seguida para la producción, caracterización y modificación de las partículas de oro. Se expondrán los parámetros y las características utilizadas de los equipos de síntesis, espectrometría, micrografía y medición de potencial zeta.

Capítulo 2

Metodología Experimental

Las potenciales aplicaciones de las Au-NPs como el de sensores ópticos, cuyo funcionamiento se basa en la absorbancia de coloides de oro por el fenómeno de LSPR, requiere la síntesis de coloides con buena reproducibilidad y actividad óptica estable a lo largo de los días. Sin embargo, la ALL es un método que involucra procesos físicos-rápidos y complejos, cuyas consecuencias desencadenan desventajas en las propiedades ópticas de los coloides, como se mencionó en la sección 1.2.

Por ello, el interés de esta tesis es desarrollar una metodología que reduzca la distribución de tamaños, mejore la estabilidad de la respuesta óptica al transcurrir el tiempo, y con ello se optimice el proceso de funcionalización de las Au-NPs.

En la presente sección se describe la metodología experimental implementada para la síntesis de los coloides de Au-NPs, el tratamiento láser que se usó para la reducción de la distribución de tamaños de las Au-NPs y el procedimiento con el que se funcionalizaron los coloides con el agente químico tiolado. La síntesis de los coloides se realizó en el Laboratorio de Fotofísica del Instituto de Ciencias Aplicadas, UNAM.

Para fines prácticos en esta tesis, se entenderá “actividad óptica” de los coloides como la absorbancia óptica ocasionada por el fenómeno de LSPR, de manera que una mejora en esta actividad óptica referirá a un espectro con una absorbancia máxima mayor, un FWHM menor y una mayor reproducibilidad.

2.1 Síntesis de los coloides de oro

La síntesis de las Au-NPs se realizó mediante la técnica de ablación láser en líquidos (ALL) y se usó un arreglo óptico típico para dirigir y concentrar la luz en el blanco de oro, que consiste en un espejo para direccionar la luz láser y un lente planoconvexo. En la figura 2.1 se muestra de manera esquemática el montaje experimental.

El procedimiento consistió en la irradiación de un blanco de oro, sumergido en agua dentro de una cubeta de vidrio (Corning), con radiación infrarroja proveniente de un láser Nd: YAG Surelite Continuum I, cuya longitud de onda central es de $\lambda=1064$ nm, su duración de pulso fue de 7 ns, una energía desde 6 hasta 60 mJpulso⁻¹ y se irradió con una tasa de repetición de 10Hz con 5000 pulsos. Con esta energía de 60mJ se tiene una afluencia de $1.9 \frac{J}{cm^2}$, casi cuatro veces el umbral de ablación del oro.

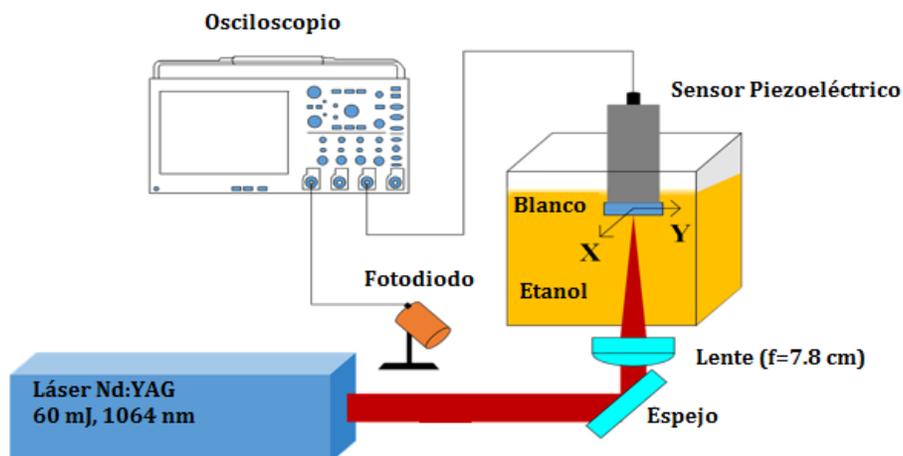


Figura 2. 1 Esquema representativo del arreglo de ALL.

Estos parámetros de irradiación se mantuvieron constantes para todas las síntesis. Otro parámetro importante es la distancia entre la lente y la superficie del blanco de oro; como se mencionó en la introducción [39], la eficiencia de ablación del material es mayor cuando se coloca el blanco un par de milímetros menor que la distancia a la que se encuentra el foco del sistema lente-cubeta-líquido-blanco. Se usó una lente de distancia focal de 60 mm, y se colocó el blanco a 57 mm y 56 mm de la lente. Este parámetro de la distancia blanco-lente se mantuvo constante durante la primera mitad de las síntesis, y se reajustó cuando la superficie del blanco se había modificado de manera significativa para la segunda mitad. El criterio para este ajuste se estableció a partir de la reproducibilidad de los espectros de absorbancia de los coloides sintetizados con los mismos parámetros.

El blanco usado fue un cilindro de oro de 6mm de diámetro y 6mm de altura que se adquirió de Sigma Aldrich, con una pureza de 99.99%. El blanco de oro se adhirió a un sensor piezoeléctrico tipo PZT (aleación de plomo, circonio y Titanio) para el posterior estudio de las señales fotoacústicas, y se montaron sobre una mesa con motores capaces de controlar su desplazamiento sobre un plano XY. La profundización del estudio de las señales fotoacústicas durante la ablación láser excede los límites de esta tesis, y sólo se usaron como referencia para monitorear el proceso.

Como se mencionó en el capítulo anterior, otro factor importante a considerar la superficie de ablación que cambia de pulso a pulso. Para disminuir la irregularidad de la superficie ablacionada entre pulsos, se desplazó el blanco de oro de forma simultánea a la síntesis, mediante dos motores micrométricos THOR-LABS. La ablación se realizó sobre una cuadrícula de 4 mm x 4 mm. Se hicieron barridos de 50 líneas por cuadrícula, con una tasa de irradiación de 10 Hz y un total de 5000 pulsos por coloide.

Después de la irradiación, se extrajeron los coloides con pipetas Pasteur de vidrio, y se depositaron en viales de vidrio color ámbar, para evitar su exposición a la luz ambiental.

2.2 Tratamiento láser

Como se ha mencionado, una desventaja que presenta la técnica de ALL es el bajo control del diámetro de las partículas sintetizadas, que se refleja en una amplia dispersión de tamaños en los coloides de oro. Para abordar este problema, se optó por someter a las nanopartículas a un proceso de fragmentación mediante irradiación láser. En el capítulo anterior se mencionó que la interacción de las nanopartículas con radiación de alta fluencia puede provocar cambios en su estructura, tales como fusión y fragmentación [11,12].

Para el tratamiento láser, se utilizó el mismo equipo que se usó en la ALL; se colocó una cubeta de vidrio rectangular con una ventana de cuarzo, como se presenta en la figura 2.2. La radiación incidió en el cuarzo, el cual presenta menor absorción del espectro infrarrojo que el vidrio. Sin enfocar el haz, se irradió el líquido con 10,000 pulsos. Los valores de energía por pulso fueron 20 mJ, 40 mJ y 60mJ.

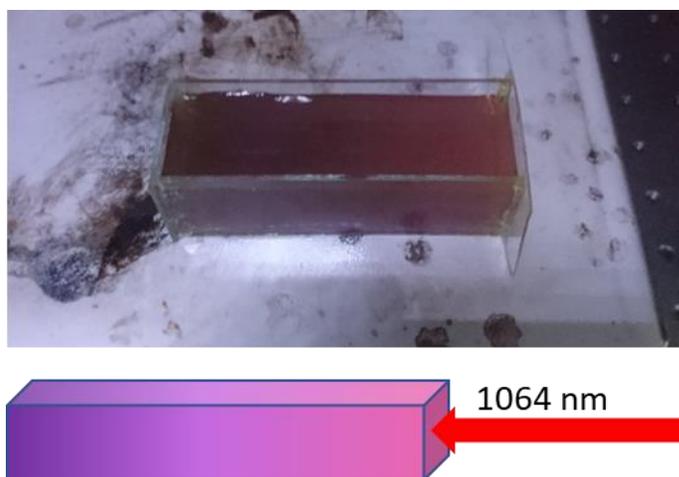


Figura 2. 2 Esquema representativo del sistema de fragmentación láser. Las partículas fragmentadas cambian la coloración del coloide.

2.3 Funcionalización con AMP

Como se mencionó anteriormente, la funcionalización del oro con los tioles mediante el enlace S-Au es ampliamente usada por su efectividad a pesar de que aún existen dudas sobre el mecanismo de enlace de los grupos tiol con diferentes tipos de nanopartículas de oro [32, 33].

En esta tesis se estudiaron concentraciones de AMP de 0.5mM y 0.05mM. Las disoluciones de AMP en agua desionizada se realizaron mediante goteo de una previa dilución de AMP concentrado (11.16 M). Este compuesto tiolado presentó baja estabilidad en agua en grandes

concentraciones, por lo que se almacenaron diluciones de 2mM para su posterior uso por coloide. Se mezclaron partes iguales de coloide de Au-NPs y de la dilución de AMP, y se mantuvieron en constante movimiento con un agitador magnético a temperatura ambiente durante por 20 minutos para cada coloide.

2.4 Caracterización de los coloides de Au-NPs

Los coloides obtenidos en cada uno de los pasos descritos anteriormente se caracterizaron con técnicas espectroscópicas y microscópicas.

Para determinar la morfología y distribución de tamaños de las Au-NPs, se obtuvieron imágenes con Microscopía de Barrido (SEM) y Microscopía de Transmisión de electrones (TEM) en el Laboratorio Central de Microscopía del Instituto de Física, UNAM. Las micrografías obtenidas se analizaron con el software ImageJ para realizar la estadística de diámetro promedio de las Au-NPs.

Para estudiar el tamaño de las agrupaciones de partículas en escala macroscópica, así como su estabilidad temporal, se utilizó la técnica de Dispersión dinámica de Luz (DLS) y se obtuvo su potencial electrostático superficial con la medida del Potencial Zeta (Pot- ζ). Estos análisis se realizaron con el equipo Zetasizer Nano SZ90 en el Laboratorio de Química del Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología, UNAM. Ambas técnicas nos permiten estudiar el estado de aglomeración de las partículas en el coloide, el cual está ligado a los espectros de absorbancia [41]. El equipo mide la dispersión Speckel y la absorbancia de radiación láser con longitud de onda $\lambda=633\text{nm}$.

Se utilizaron dos cubetas especiales para el Zetasizer: una celda de plástico para espectroscopía DLS y una celda electroforética con diodos de oro para el Potencial Zeta. Los parámetros ingresados en el software del equipo Zetasizer fueron los siguientes:

- 100 mediciones por estudio.
- Un mínimo de 3 estudios por muestra.
- $n=1.33$ como índice de refracción real del agua.
- Temperatura de 21°C de funcionamiento del equipo.
- Valores de absorbancia a 633 nm entre 0.2 y 0.4 (este valor se ajusta para cada coloide).

Para la medición de la actividad óptica de los coloides, se utilizó la técnica de Espectroscopía de Absorción Ultravioleta-visible-infrarrojo cercano (UV-vis-NIR) con el equipo Cary 5000, en el rango de 200nm – 1200 nm. Previo a cada análisis se agitó ligeramente el coloide con el fin de incluir parte de las partículas sedimentadas.

Se le dio seguimiento a su absorbancia a 350 nm y a 750 nm. Se ha reportado que una manera de estimar la concentración del coloide de oro es con la magnitud de la absorbancia a 350, pues se postula una proporción entre la cantidad de átomos de oro con transiciones interbanda que se presentan a esta longitud de onda [4,5]. El valor de 750 nm se tomó en esta tesis como una

referencia para estimar la cantidad de oro en forma de nanopartícula que se encuentra floculada y suspendida. De manera un incremento en la absorbancia del coloide en longitudes de onda del infrarrojo nos está indicando la agrupación de las Au-NPs en forma de cadenas que permiten la excitación de modos por LSPR de menor energía, similares a aquellos excitados en nanorods [4,5].

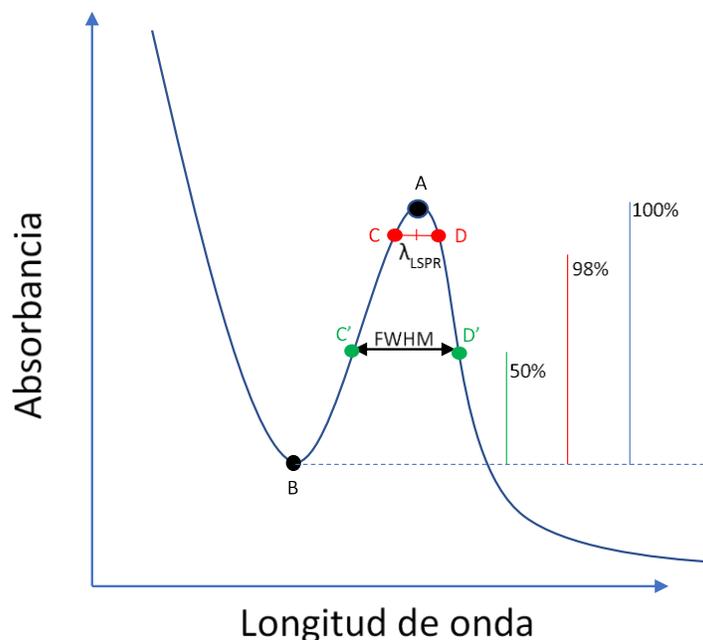


Figura 2. 3 Esquema representativo de una banda de absorción por LSPR. Se señalan los puntos del mínimo y máximo local (A y B), los correspondientes al 98% de la intensidad para calcular λ_{LSPR} (C y D) y los correspondientes al 50% de la intensidad para calcular Δ

El valor promedio de la longitud de onda de máxima absorción de la luz por LSPR (λ_{LSPR}), se obtuvo de los valores de absorbancia y longitud de onda del mínimo y máximo local del perfil característico del plasmón por LSPR (A y B), y se refirió como el 100% de la amplitud a la diferencia de los valores de absorbancia entre A y B, como se muestra en la figura 2.3. Se calculó el 98% de dicho valor, y se le asignó la variable λ_{LSPR} a la media de los valores de longitud de onda correspondiente al 98% de amplitud (C y D). De manera análoga, se calculó el valor del 50% de la diferencia de absorbancia del mínimo y máximo y se le asignó la variable $\Delta\lambda_{FWHM}$ a la diferencia entre los valores de la longitud de onda correspondiente al 50% de la amplitud (C' y D'). Las diferencias entre los coloides se determinaron con los cambios en los valores de λ_{LSPR} y $\Delta\lambda_{FWHM}$, y se compararon entre las siguientes condiciones: energía de fragmentación, concentraciones de AMP y estabilidad temporal.

Una vez expuesto la metodología experimental, en la siguiente sección se presentarán los resultados de los análisis espectroscópicos, microscópicos y de las propiedades de floculación de los coloides obtenidos.

Capítulo 3

Resultados y Análisis

3.1. Resultados de la síntesis por ALL

Se sintetizaron 83 coloides de nanopartículas de Au-NPs suspendidas en agua desionizada. Estos coloides exhibieron variaciones de colores entre lila-rojizo y morado, propios de los coloides de oro, los cuales presentan una alta pureza ya que los únicos dos materiales involucrados en su preparación son el blanco de oro y el medio líquido que es agua deionizada tridestilada. El color típico de los coloides de oro en agua y la morfología esférica de las partículas se exhiben en la Figura 3. 1.

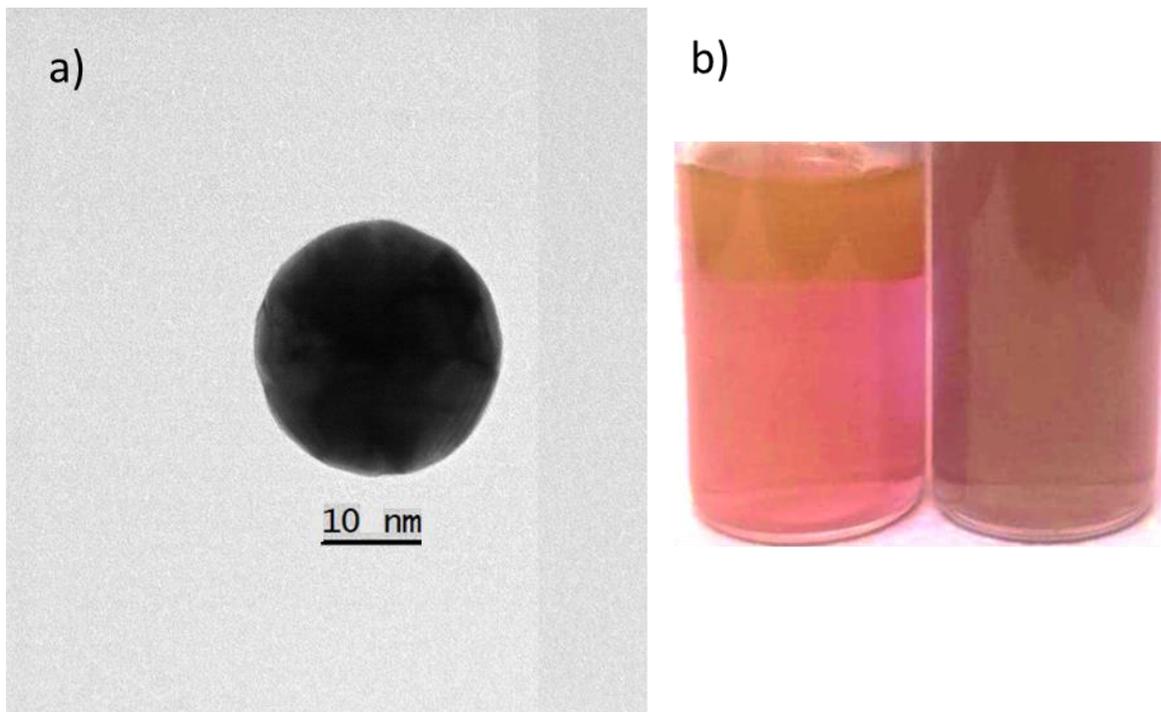


Figura 3. 1 (a) Micrografía TEM de la geometría típica de Au-NPs obtenidas por ALL y (b) ejemplos de distintos coloides de Au-NPs esféricas y su variabilidad en la respuesta óptica.

Se obtuvieron Au-NPs de tamaños menores a 250 nm, concentrándose alrededor de un diámetro promedio de $D = 47.1 \pm 2.1 \text{ nm}$ con una desviación estándar de $\sigma = 62.1 \text{ nm}$ para un total de 676 Au-NPs consideradas. Con este método se tiene un bajo control en la distribución de tamaños, lo que se observa en la micrografía y en el histograma de la Figura 3. 2 que representan las propiedades características de estos coloides.

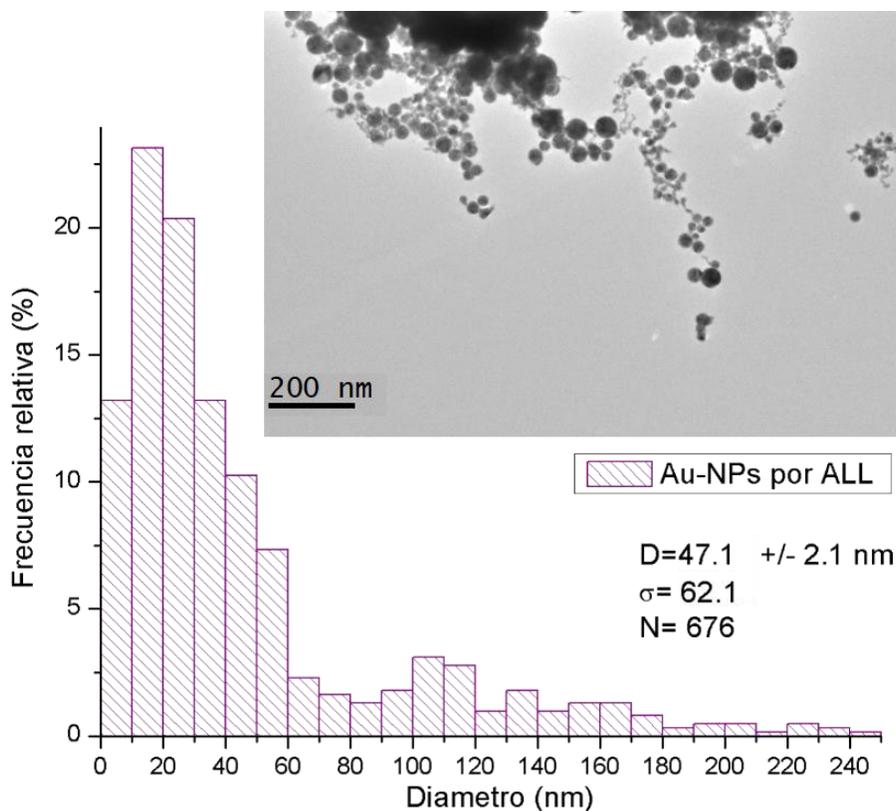


Figura 3. 2 Histograma de tamaño de las Au-NPs obtenidas por ALL. Se presenta una de las micrografías analizadas.

Aunque la mayoría de las partículas que se obtienen son esféricas, el movimiento browniano que se presenta en el líquido fomenta la colisión entre las partículas de manera que conforme pasa el tiempo se crean aglomerados sueltos y agregados más resistentes; tienen como consecuencia la floculación del coloide, lo que forma cadenas y agrupaciones de partículas que asemeja partículas de otras formas (ej. nanobastones). En la Figura 3. 3 se muestra otra micrografía TEM de las partículas en los coloides y se puede observar la gran dispersión de tamaños, además de la tendencia propia de formar cadenas lineales.

Estas características de la geometría y rango de tamaño son propias de la técnica de ALL al irradiar con un láser de 1064nm [9-21].

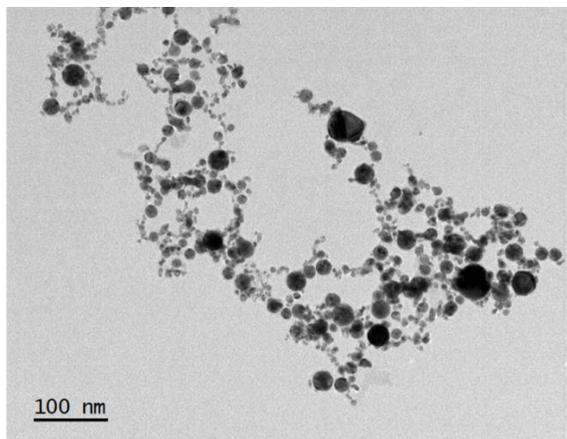


Figura 3. 3 Micrografía de las Au-NPs sintetizadas por ablación láser. Se observa una gran dispersión de tamaños y su tendencia a formar cadenas lineales.

3.1.1 Propiedades ópticas de las Au-NPs sintetizadas por ALL

Para los valores de energía de 6 mJ, 15mJ, 25 mJ, 35mJ y 60 mJ empleados en este análisis, tenemos un aumento significativo de la extracción de material además de tener mayor material en forma de nanopartícula. Esto se puede observar en el incremento de la absorbancia de los espectros presentados en la Figura 3. 4.

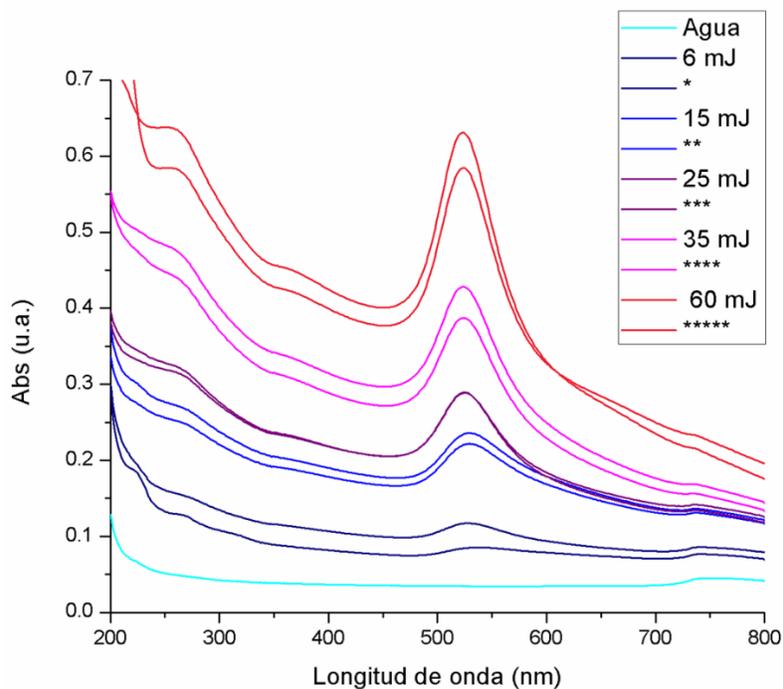


Figura 3. 4 Espectros de absorbancia de las distintas condiciones de energía para la síntesis por ALL. Se observa un incremento en la absorbancia a 350 nm, la absorbancia máxima y en el pronunciamiento de la banda de absorbancia ocasionada por LSPR.

En la Figura 3. 5 se presenta la comparación entre los valores de absorbancia a 350 nm (cantidad de oro en el coloide), a 750 nm (partículas floculadas suspendidas) y la absorbancia máxima (asociada al plasmón de superficie). La diferencia entre los tres valores aumenta conforme se incrementa la energía de los pulsos durante la ablación. Para 60mJ hay mayor proporción del oro extraído que se presenta como nanopartícula ópticamente excitada en forma de LSPR. En todos los casos tenemos un incremento de la absorbancia a 750 nm. Sin embargo, la proporción entre el material extraído (Abs a 350nm) y el material floculado suspendido excitable a longitudes de onda en el infrarrojo (750nm) es mayor cuando se tienen espectros con baja intensidad.

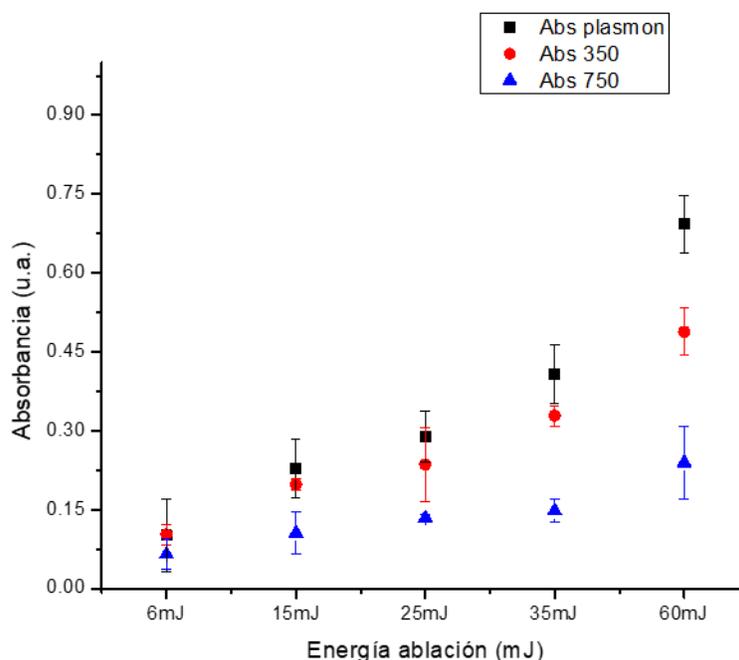


Figura 3. 5 Valores de la Absorbancia a 350nm (rojo), 750 nm (azul) y absorbancia máxima (negro) como función de la energía de ablación para la síntesis de los coloides.

En proporción, la cantidad de material floculado comparado con el extraído es mayor para 6, 15 y 25mJ que para aquellos coloides con 35 mJ y 60 mJ. Por ello, se obtuvo la mejor condición de ablación a 60 mJ para obtener los coloides de oro.

Por la tendencia que se exhibe en la Figura 3. 5 es de gran interés estudiar su comportamiento para energías mayores a 60mJ. No obstante, la afluencia es un factor de gran importancia a considerar ya que, si se rebasa este valor de 60mJ con el arreglo utilizado se puede dañar el vidrio de la cubeta. Hay un compromiso entre la capacidad de compactar el arreglo óptico y las energías máximas que se pueden utilizar pues se requiere la menor afluencia posible en las caras de la cubeta para evitar daño y fuga en la cubeta. Se plantea como trabajo a futuro estudiar otra geometría y dimensiones de la cubeta para la ablación láser con energías mayores a 60mJ por pulso.

Una vez establecido la energía de 60mJ como parámetro para la síntesis, se obtuvieron los siguientes coloides y sus espectros se presentan en la Figura 3. 6.

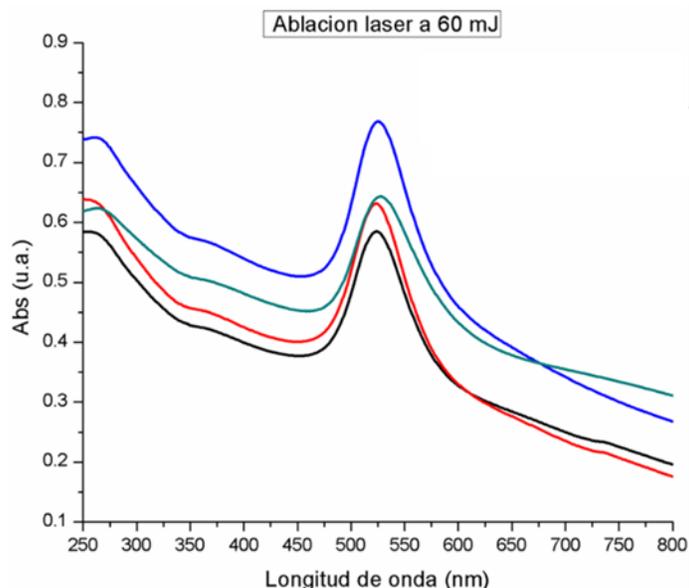


Figura 3. 6 Espectros de absorción de los coloides de Au-NPs sintetizados con los mismos parámetros de ablación.

La amplia distribución de tamaños de partícula y la creación de “flocs” que aceleran la degradación del coloide son factores muy importantes que afectan el espectro de absorción, donde la estabilidad temporal de la actividad óptica de las Au-NPs puede variar desde un par de minutos hasta varios meses. El color lila característico de los coloides como el que se observa en la Figura 3. 1.b se debe a la absorción óptica para longitudes de onda que se encuentran en el rango de 500-600 nm. Cuando se estudió su respuesta óptica en el espectrómetro, se obtuvieron los espectros de absorción típicos como los presentados en la Figura 3. 6. Las bandas de absorción presentan una longitud de onda central de $\lambda_{LSPR} = 527.0 \pm 3.8 \text{ nm}$ y una absorbancia máxima de $Abs_{LSPR} = 0.65 \pm 0.23 \text{ u. a.}$

Los corrimientos en la longitud de onda central y el valor de la absorbancia están relacionados con el tamaño y concentración de las partículas, así como de su distribución de tamaño. Además, la amplia distribución de tamaños afecta el ensanchamiento del espectro, como se mencionó en la sección 1.1.2.

En la Figura 3. 6 se exhiben las desventajas de la técnica de ALL en las variaciones de la respuesta óptica al utilizar los mismos parámetros de síntesis. Esto se refleja en las variaciones de los picos de absorción máxima de coloides de oro realizados en las mismas condiciones. Estas variaciones en la respuesta óptica muestran uno de los principales problemas que se tienen en la síntesis por ALL la baja reproducibilidad de la respuesta óptica, cuando se trata de obtener coloides con valores de λ_{LSPR} y Abs_{LSPR} con variación idealmente mínima.

Con el paso del tiempo, el proceso de floculación lleva a la precipitación de las partículas de forma que la actividad óptica de los coloides se degrada en cuestión de días. Se observaron corrimientos de hasta 100 nm después de 31 días, la banda del plasmón prácticamente se

había perdido, y el corrimiento de la longitud de onda central aumentaba cada vez más hacia valores mayores.

La variación de las características ópticas iniciales junto con el movimiento aleatorio de las Au-NPs en los coloides tiene como consecuencia muchas variaciones en los periodos de tiempo donde Abs_{LSPR} cambie menos al 10%. El tiempo en el que las Au-NPs floculaban al punto que $Abs_{LSPR} < 0.3 \text{ u. a.}$ varía de un día hasta un mes.

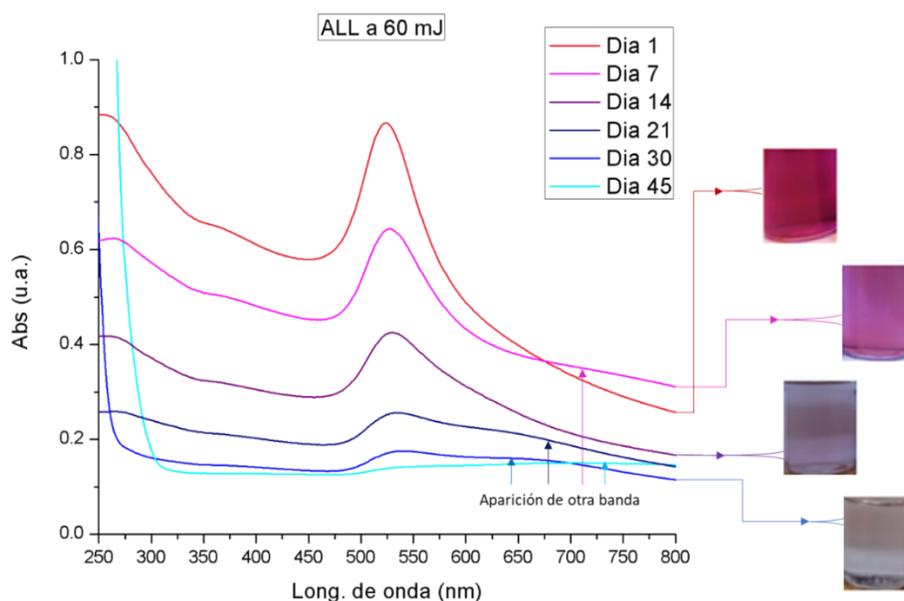


Figura 3. 7 Espectros de absorción de un mismo coloide medido en el mismo día en el que se sintetizó y su degradación de 1 a 31 días.

El arreglo de las nanopartículas también genera el ensanchamiento de la banda principal, la aparición de nuevas bandas y la competencia en la absorbancia máxima entre ellas. Esto se puede apreciar en la deformación del perfil característico de la banda de absorción en la Figura 3. 7, donde se observa un aumento de la absorbancia en longitudes de onda mayores a 600 nm , valores lejanos al valor de 530 nm donde el plasmón excitado por el modo principal (dipolar) presenta su pico de absorción.

Se puede observar una disminución importante en la absorbancia a 350 nm , lo cual se asocia totalmente a la floculación. Los coloides analizados no fueron modificados después de sintetizarse, por lo que la cantidad total de oro de cada muestra es la misma que su cantidad inicial.

Sin embargo, como consecuencia de la degradación del coloide, la floculación llega al punto en el que se sedimentan y se pierde su suspensión coloidal. Estos sedimentos de oro se agrupan en islas visibles macroscópicamente y se pierden su contribución a los espectros

de absorbancia. Una vez alcanzado este punto de degradación, es complicado volver a suspender el material y tratar de recuperar su estado coloidal sin la intervención de tratamientos térmicos o láser.

La disminución en los valores de Abs_{LSPR} y el corrimiento al rojo de λ_{LSPR} como consecuencia de la floculación se pueden observar a simple vista con la degradación del coloide, como se observa en las fotografías de la Figura 3. 7 y su efecto se presenta su tendencia en la Figura 3. 8.

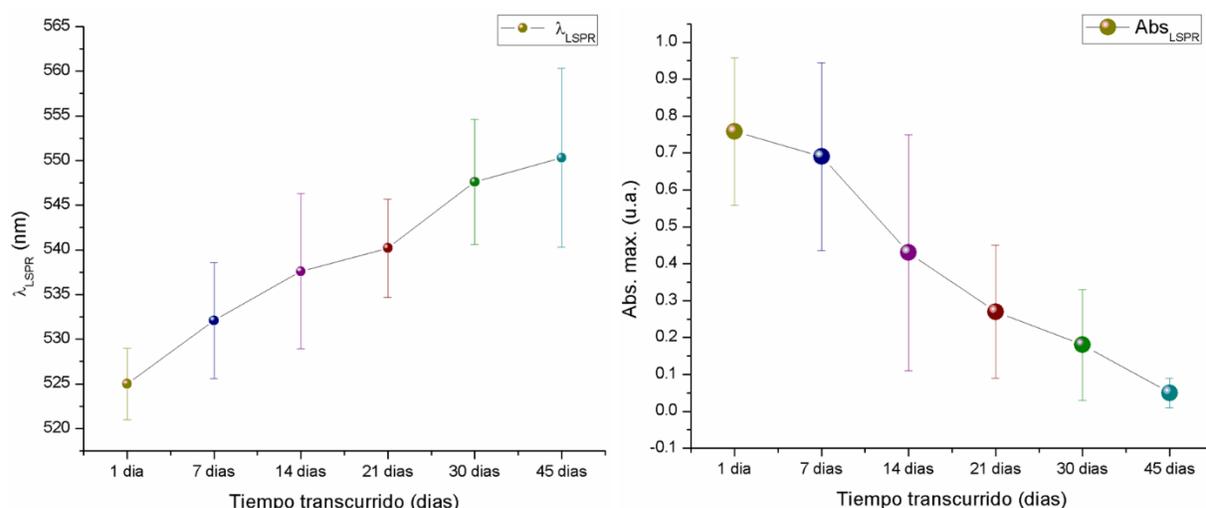


Figura 3. 8 Efecto de la floculación tras pasar el tiempo en la actividad óptica del coloide. Se observa un corrimiento al rojo en de λ_{LSPR} y una disminución del Abs_{LSPR} en su totalidad.

Se puede asociar el cambio del color con el estado de floculación donde las partículas tienden a formar cadenas lineales observadas en la Figura 3. 9.a y esto puede cambiar los modos en los que el plasmón de superficie se puede excitar.

Se ha reportado que la floculación de las Au-NPs permite estas interacciones de mayor orden dipolar [4,5,76], donde se tienen modos secundarios y con ello bandas de absorbancia en distintas posiciones, como se presentó en la Figura 1. 1. En la Figura 3. 9. se presenta: (a) una micrografía de las partículas sintetizadas y (b) un esquema que muestra cómo la agrupación de ellas puede generar distintas bandas de absorbancia.

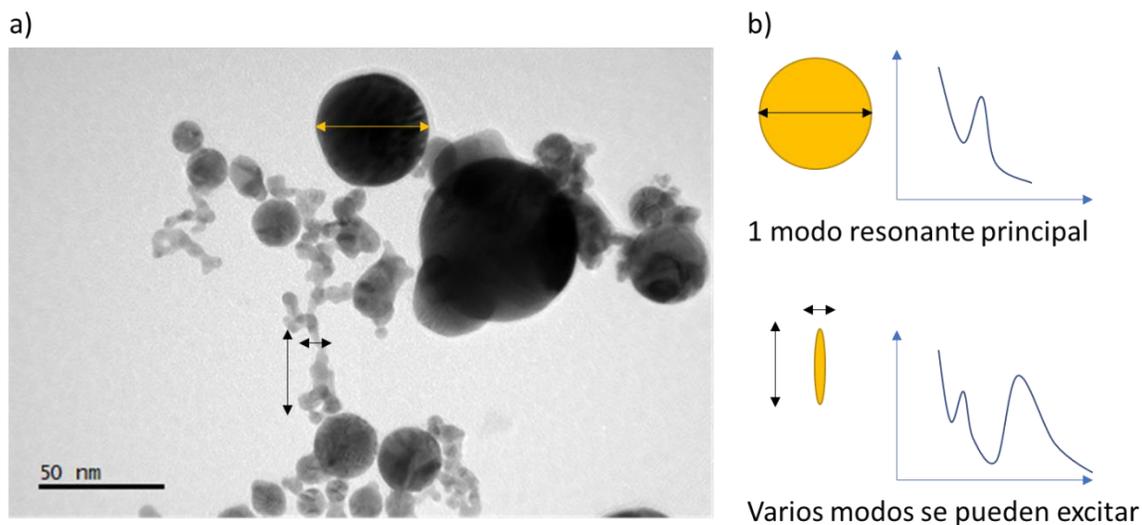


Figura 3. 9 (a) Micrografía TEM de Au-NPs y (b) esquema de los modos resonantes del plasmón de superficie. Se puede apreciar que la variación en los tamaños de partícula y la floculación presentan modos resonantes distintos: el dipolar (flechas horizontales) en par.

Cuando se midieron sus valores de Pot ζ inicial se obtuvieron valores de hasta -54.3 mV con un promedio de $-32 \pm 0.5 \text{ mV}$, encima del valor de referencia de -30 mV . No obstante, como se discutió con la Figura 3. 7 y la Figura 3. 8 se encontraron muchas variaciones en la estabilidad temporal de los coloides.

En la sección 1.5 se mencionó que el alto valor de Pot ζ se puede asociar a la alta concentración de material y buena suspensión inicial de las Au-NPs. La pureza de los coloides le puede otorgar mayor movilidad electroforética al carecer de residuos que obstruyan su movimiento o impidan su interacción con el campo eléctrico del equipo de medición, de manera que su alto valor de potencial Zeta no refleja estrictamente la estabilidad coloidal.

La optimización de los valores experimentales, el modelo teórico y la preparación de la muestra para una mejor medición son de gran interés y se pretenden abordar como trabajo a futuro. Se sugiere consultar con mayor detalle la teoría y el modelo descrito en [75].

El proceso de floculación y ensanchamiento de bandas se desarrolla conforme pasa el tiempo y es la principal causa de la baja reproducibilidad en los espectros de absorbancia de los coloides sintetizados al almacenarlos por largos periodos de tiempo. Como los dos factores importantes en la baja reproducibilidad de los espectros de absorbancia son la floculación y la amplia distribución de tamaños, varios de estos coloides se sometieron a procesos posteriores de fragmentación y centrifugación con el fin de recuperar la suspensión de las partículas y tener una selección de tamaño.

3.2. Cambio en la distribución de tamaños de coloides con tratamientos posteriores

Después de los análisis anteriores, 23 se reservaron para darle seguimiento a la floculación, mientras que el resto fue sometido a los tratamientos láser para energías de 20, 40 y 60 mJ y se obtuvieron los siguientes resultados. Se eligió el parámetro de 60 mJ como la energía mayor ya que presenta un valor de afluencia de $33.95 \pm 0.03 \frac{mJ}{cm^2}$ la cual está en el rango de $20 - 35 \frac{mJ}{cm^2}$ reportado en la literatura para fragmentación láser [10, 11], además de evitar daños en la cubeta donde se fragmentaron los coloides.

3.2.1 Resultados del tratamiento láser

De manera análoga a las Au-NPs presentadas en la Figura 3. 3, se hicieron histogramas para cada condición de energía de tratamiento láser con el fin de obtener el diámetro promedio y desviación estándar y se presentan en la Figura 3. 10 Figura 3. 9 para 20mJ, en la Figura 3. 11 para 40mJ y en la Figura 3. 12.

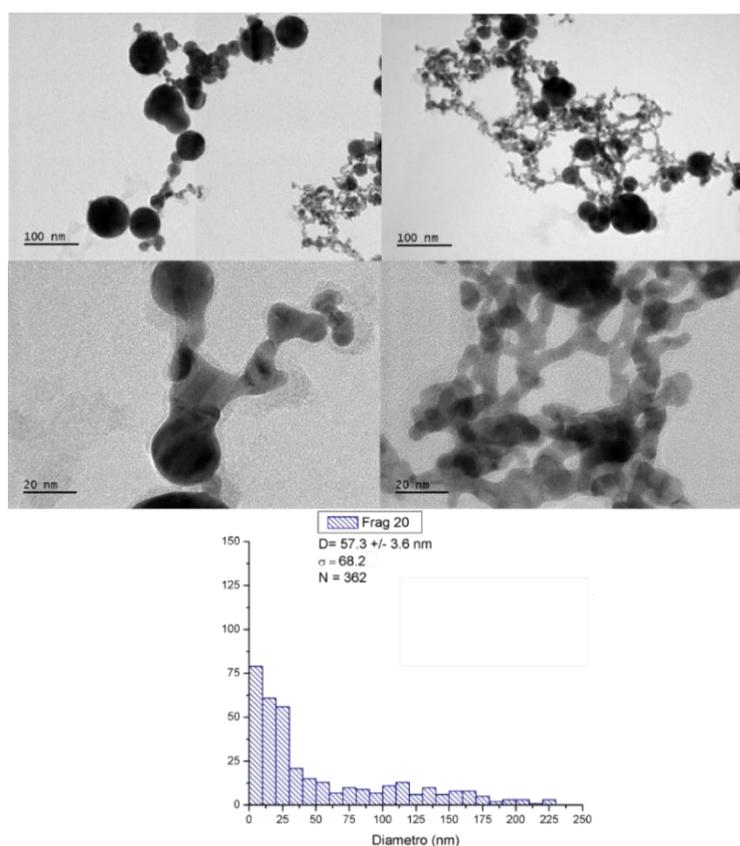


Figura 3. 10 Micrografías TEM de muestras irradiadas con 20 mJ con 10,000 pulsos y su Histograma obtenido al analizar los diámetros de las partículas esféricas. Se pueden observar la unión de partículas pequeñas, formando una estructura tipo coral.

Sin embargo, las partículas más grandes sí pueden ser fragmentadas ya que cuentan con una mayor superficie de interacción con el haz incidente. Como resultado principal se tuvo la evidente deformación de las partículas en estructuras tipo coral para las partículas más pequeñas. Se obtuvo un diámetro promedio de $D = 57.3 \pm 3.6 \text{ nm}$ con una desviación estándar de $\sigma = 68.2 \text{ nm}$, lo cual es un incremento de ambos valores respecto a los tamaños obtenidos para las partículas sin tratar.

Con esta energía por pulso, hay una competencia entre los procesos de FLL y MLL inclinada hacia la fusión de las pequeñas y creación de partículas más grandes, por lo que no se encontró útil para la reducción de tamaño de las partículas.

Estos fenómenos simultáneos de fusión y fragmentación también se pueden observar en la Figura 3. 12 para las muestras irradiadas con 40 mJ, con una afluencia de $22.63 \pm 0.03 \frac{\text{mJ}}{\text{cm}^2}$. En este caso se tiene mayor energía absorbida por pulso, por lo que es posible fragmentar partículas de mediano tamaño, mientras que las pequeñas presentan agregación de ellas.

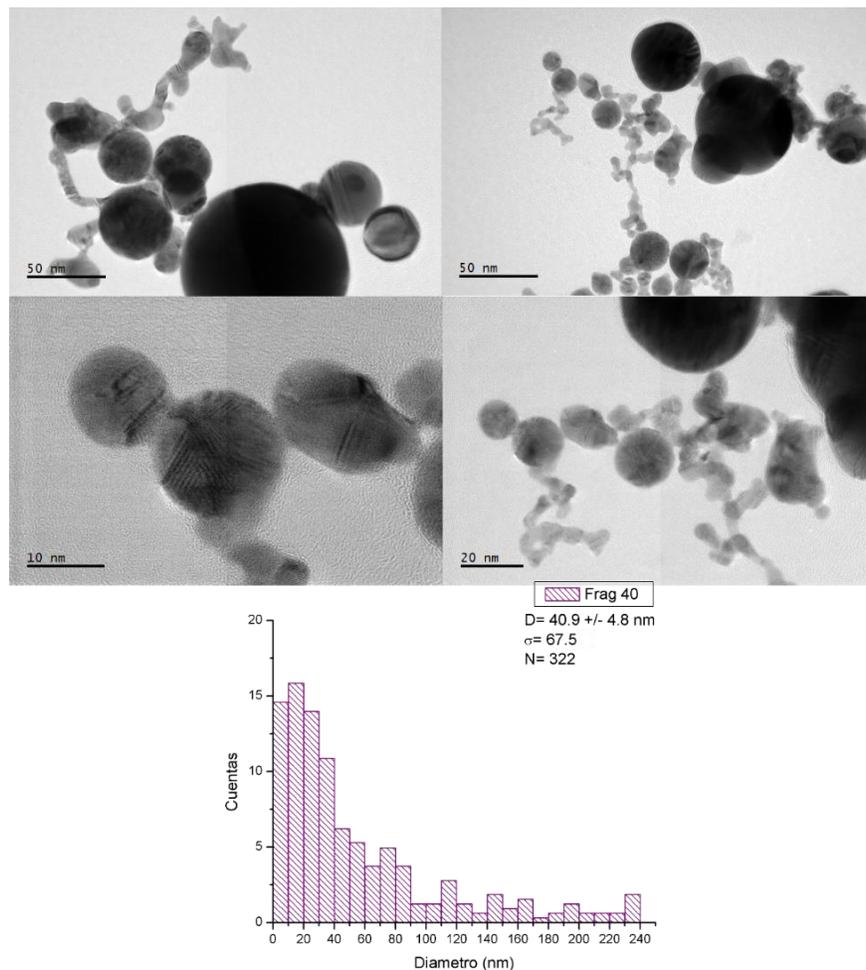


Figura 3. 11 Micrografías TEM de muestras irradiadas con 40 mJ en el tratamiento de fragmentación láser y su Histograma obtenido al analizar los diámetros de las partículas esféricas.

Se obtuvo un promedio de $D = 40.9 \pm 9.8 \text{ nm}$ con una desviación estándar de $\sigma = 67.5 \text{ nm}$, donde cabe destacar que el diámetro promedio sí disminuyó, pero la distribución se ensanchó, con una mayor desviación estándar respecto a las Au-NPs sin tratamiento.

Para las partículas irradiadas con 60 mJ se observó principalmente el fenómeno de fragmentación, donde se obtuvo un valor de $D = 25.7 \pm 3.1 \text{ nm}$ con una desviación estándar de $\sigma = 54.4 \text{ nm}$. Las partículas con un diámetro mayor a 130 nm se fragmentaron considerablemente, de manera que se observó un reducido número de ellas, menor al 2% de la frecuencia relativa del total de nanopartículas contabilizadas, como se observa en el histograma.

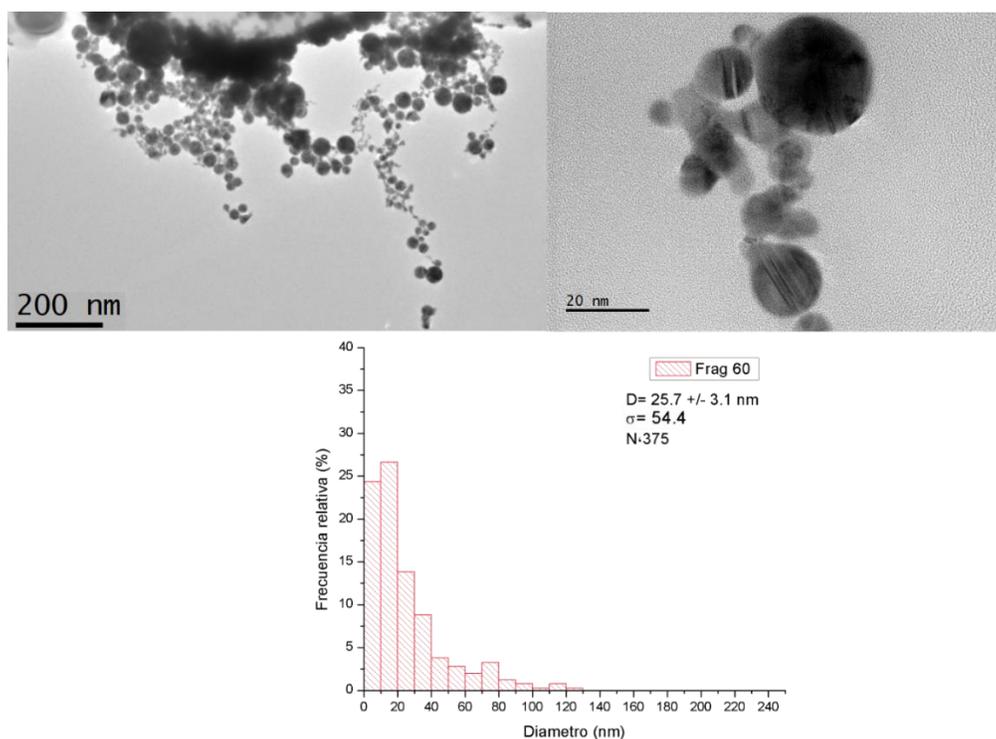


Figura 3. 12 Micrografías TEM y su histograma de las partículas irradiadas con 60 mJ. Se observó la mayor disminución del tamaño promedio y la distribución de tamaños de todas las condiciones con tratamiento láser.

Al compararla con los valores iniciales de $D = 47.1 \pm 2.1 \text{ nm}$ con una desviación estándar de $\sigma = 62.1 \text{ nm}$ para las muestras sin tratamiento láser, podemos observar que el tratamiento láser con 60 mJ y 10,000 pulsos ofrece un método para disminuir tanto el tamaño promedio como la dispersión de tamaño de las partículas sintetizadas por ALL. La distribución de tamaños sigue en grandes valores comparado con el promedio y esto se debe principalmente a complicaciones en la zona de interacción del láser con las partículas y en el flujo del líquido para la fragmentación. Se podría optimizar al añadir un flujo constante mediante una bomba peristáltica, de manera que las partículas más grandes se encuentren en constante interacción con el haz láser. De igual manera que con la síntesis de los coloides, las ventanas de la cubeta de fragmentación pueden dañarse al aumentar la afluencia mediante el enfoque del haz durante tantos pulsos. La optimización en el arreglo

experimental de la cubeta, el flujo constante del coloide y el material de las ventanas para poder enfocar el haz con el fin de mejorar la fragmentación es de gran interés y se propone como trabajo a futuro.

Como consecuencia de la fragmentación de agregados de Au-NPs se obtuvieron distribuciones de tamaño ligeramente más estrechas que junto con la fragmentación de los flocs lo que los coloides significan una importante mejoría al tener un método láser para reducir la dispersión de tamaños, volver a suspender y las partículas tener una mayor respuesta óptica. Mientras se tenga libre de contaminación el coloide, se puede recuperar la respuesta óptica después del paso del tiempo.

En la fotografía de la Figura 3. 13 se pueden observar los coloides antes y después del tratamiento láser con 60 mJ. Se observó un cambio notorio en el color que dispersan los coloides Au-NPs y una mejoría en la respuesta óptica de absorbancia.



Figura 3. 13 Coloides de Au-NPs observados antes y después del tratamiento láser con 60 mJ.

La comparación del tamaño promedio y los espectros de absorbancia entre los tratamientos posteriores a la síntesis se presenta al final de la siguiente sección, en las gráficas de la Figura 3. 15, Figura 3. 16 y Figura 3. 17

3.2.2 Resultados de la Centrifugación

Se ha reportado el uso de centrifugación para la separación de Au-NPs coloidales según el tamaño como función del número de revoluciones. Los valores particulares de revoluciones y tiempo varían para cada sistema, debido a la complejidad de la dinámica de las partículas dentro del líquido. Si nos guiamos con los valores de la tabla 1, se sugiere 6000 RPM [41] para separar partículas en un rango de 1-30 nm, que es el intervalo donde tenemos la mayor concentración de partículas de acuerdo con los histogramas obtenidos de la Figura 3. 10 Micrografías TEM de muestras irradiadas con 20 mJ con 10,000 pulsos y su Histograma obtenido al analizar los diámetros de las partículas esféricas. Se pueden observar la unión de partículas pequeñas, formando una estructura tipo coral. Figura 3. 10 a la Figura 3. 12.

Se centrifugaron las muestras con 6000 RPM durante 10 minutos. Para tiempos y número de revoluciones mayores se observó que la agrupación de las partículas quedaba demasiado adheridas a las paredes de la celda y entre sí. Aún con temperatura y agitación, fue complicado volver a suspenderlas y en todos los casos precipitaba rápidamente.

Se obtuvieron las micrografías TEM de las muestras centrifugadas que se observa en la Figura 3. 14 donde se observan Au-NPs muy dispersas y aisladas en comparación con las micrografías anteriores. Debido a la baja concentración de las partículas y su reducido tamaño, la obtención de su histograma fue más complicado que con las otras muestras.

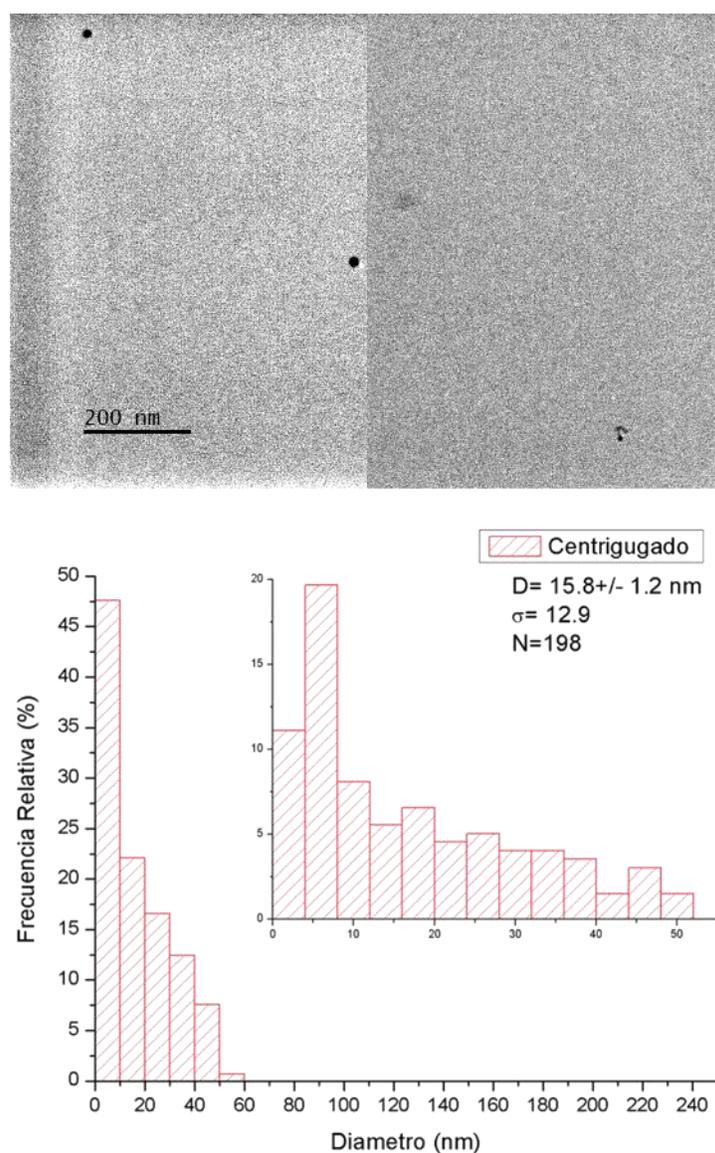


Figura 3. 14 Micrografía TEM de las muestras centrifugadas con 6000 RPM durante 10 minutos. Las partículas están muy dispersas, con tamaños menores a 60 nm. (b) Histograma obtenido al considerar 198 partículas de las micrografías. Se muestra un acercamiento con

Como en todos los coloides de Au-NPs se tiene la mayor parte de las partículas en el intervalo de 1-60 nm, el resultado tras el proceso de centrifugación era el mismo para cada condición. Se obtuvo un diámetro promedio de $D = 15.8 \pm 1.2$ nm y una desviación estándar de $\sigma = 12.9$ nm, que es considerablemente menor a los valores promedio de las condiciones

anteriores. En la figura 3.13 se resumen y comparan los valores de la distribución de tamaños según el tratamiento con el que se obtuvieron de las micrografías las partículas.

Para facilitar la comparación entre las muestras, se les llamará “ALL” a los coloides recién sintetizados por ablación láser en líquidos; “F 20”, “F 40” y “F 60” a los coloides a los que se les hizo el tratamiento láser con 20 mJ, 40 mJ y 60 mJ respectivamente; y “Cent” a los coloides que se les hizo centrifugación. Como la centrifugación es un método de selección de tamaño establecido, para los parámetros usados en estos estudios se consiguieron partículas menores a 60 nm y éstas estuvieron presentes en todos los coloides analizados. Por lo tanto, en los espectros finales no se distinguió si venían de una muestra u otra. El análisis de la distribución de tamaño se muestra a continuación.

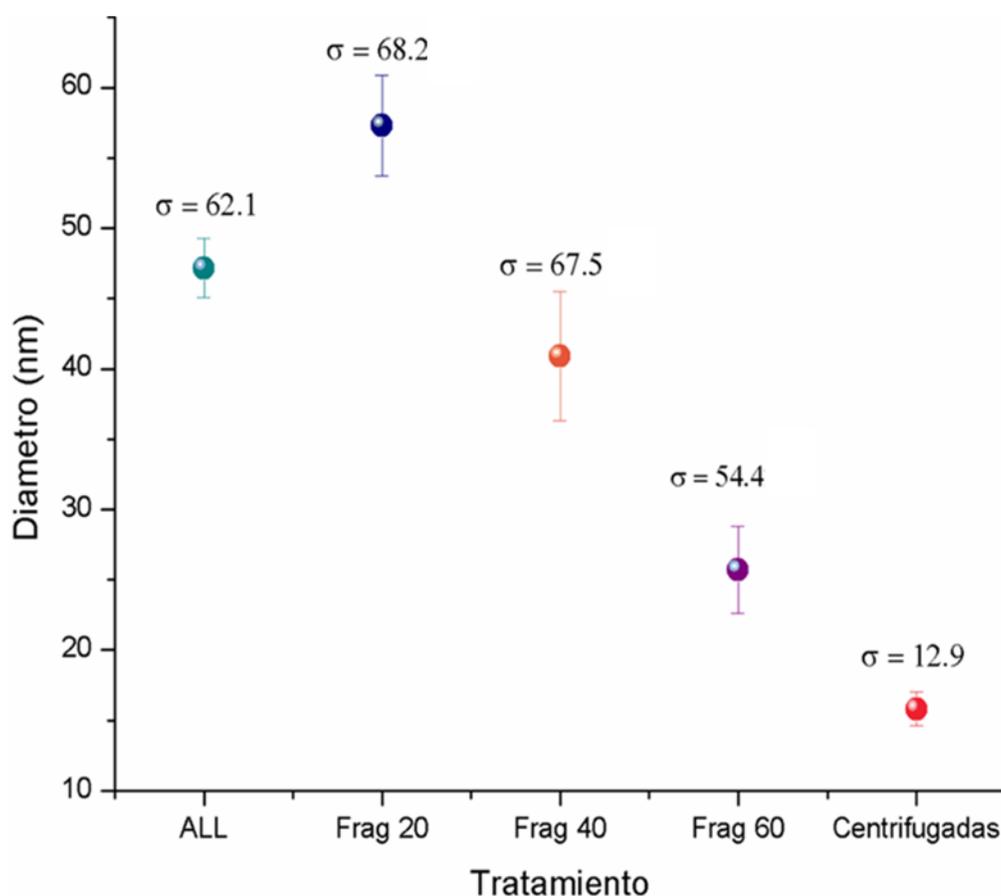


Figura 3. 15 Diámetro promedio como función del tratamiento de las Au-NPs. Para cada condición se presenta la desviación estándar, que representa la anchura de la distribución.

Esto muestra que la centrifugación ofrece un efectivo método de selección de tamaño, donde se tiene un compromiso entre el menor diámetro promedio y menor dispersión de tamaño con la baja concentración de los coloides de oro.

A continuación, se presentan los resultados de los valores del radio hidrodinámico que se obtuvieron mediante el análisis de DLS. Se puede observar la clara tendencia de aumento el tamaño para la condición de F 20 y disminución del promedio para F 40 y F 60. Este comportamiento es el mismo que el de la Figura 3. 15. Sin embargo, por la gran dispersión de tamaños que se tiene y por los parámetros no optimizados en las mediciones de DLS (como el pH, concentración, polarizabilidad, etc.) se tuvieron variaciones importantes en los datos de R_H .

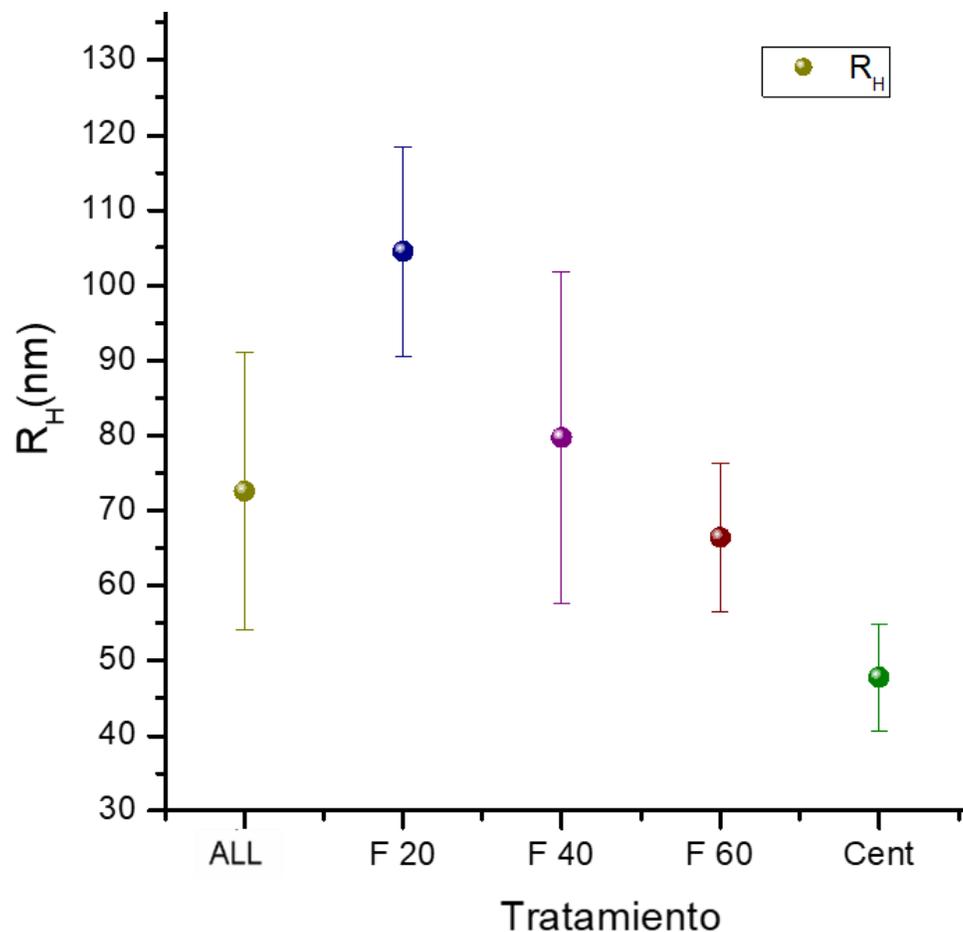


Figura 3. 16. Radio Hidrodinámico como función del tratamiento de las Au-NPs.

La principal diferencia entre los resultados de ambos análisis es la magnitud del tamaño de la partícula. Como se describió en la sección 1.5, la técnica de DLS depende de muchos factores fisicoquímicos de las partículas y del medio líquido.

El principal de ellos es la polarizabilidad de la molécula del agua, que al interactuar con la carga de las Au-NPs se orienta y se forma una primera capa de líquido en los alrededores de la partícula. Como la molécula del agua tiene su dipolo bien definido, se estimula la orientación de las moléculas y da lugar a la corona rígida.

Otra posible razón es que las partículas individuales sean de menor tamaño, como se observan en TEM, pero en forma coloidal se agrega en grupos con tamaño mayor. Como el equipo aproxima la dispersión dinámica proveniente de una esfera rígida, es posible que estos valores de tamaño (casi el doble que en TEM) correspondan a grupos más grandes de partículas, sin corresponder necesariamente a partículas rígidas.

La técnica de DLS considera a este acoplamiento Au-NPs y primera corona como una nueva partícula rígida, que según las mediciones para los coloides ALL midió $R_H = 73.2 \pm 15.1 \text{ nm}$.

Se observa una disminución del tamaño promedio y de la dispersión de valores al aumentar la energía del tratamiento láser, donde se obtuvo un mínimo de $R_H = 66.8 \pm 9.4 \text{ nm}$ para la condición F 60. En ambos análisis de TEM y DLS, se obtuvo el menor promedio de partícula para la centrifugación con un tamaño $D = 15.8 \pm 1.2 \text{ nm}$ en las micrografías y $R_H = 44.2 \pm 4.6 \text{ nm}$.

La disminución en el tamaño promedio, en el ancho de la distribución de tamaños, el evidente cambio en la coloración e intensidad del coloide al recuperar la suspensión de las Au-NPs y la simplicidad experimental con la que se llevó a cabo, es evidencia de que el posterior tratamiento de fragmentación láser con 60 mJ ofrece un método rápido que permite cierto control en el tamaño de las partículas así como la capacidad de recuperar la respuesta plasmónica de coloides floculados, los cuales son dos de las principales desventajas de la síntesis de NPs por la técnica de ALL

3.3 Cambios en la respuesta óptica plasmónica de coloides

En la Figura 3. 17. se muestran algunos espectros de absorbanza representativos de los coloides recién sintetizados y tras el tratamiento láser para 20, 40 y 60 mJ.

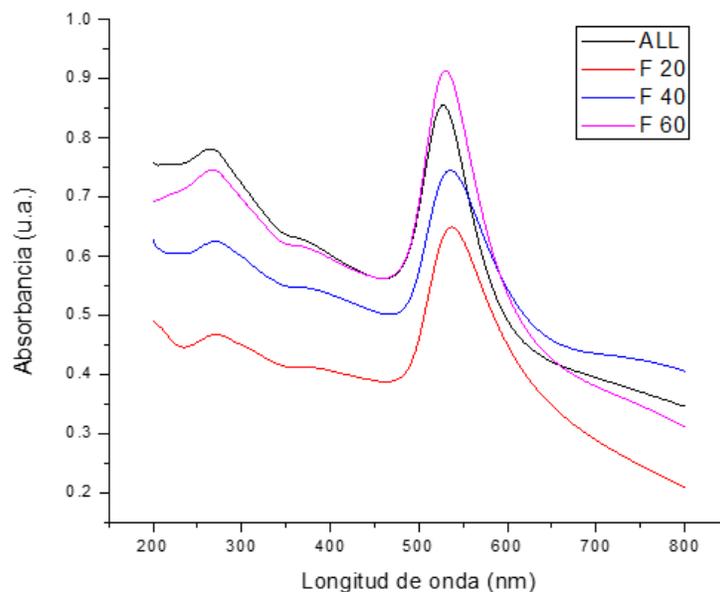


Figura 3. 17 Espectros de absorbanza de coloides de Au-NPs sintetizados por ALL (negro) en comparación con aquellos sometidos a tratamiento láser con 20mJ (rojo), 40mJ (azul) y 60mJ (magenta). Para las condiciones de 20mJ y 40mJ se observa una menor intensidad de absorbanza en todas las regiones, lo que indica floculación.

Se estudiaron los espectros de absorbanza de las muestras después el tratamiento de fragmentación láser y la centrifugación, y se obtuvieron los valores de Abs_{LSPR} y λ_{LSPR} para cada condición, según como se indicó en la subsección 2.4 y en la figura 2.4. Al medir su absorbanza se observa la mejoría en la respuesta óptica de los coloides, donde se tiene una mayor Abs_{LSPR} , un ancho ligeramente menor y el valor de λ_{LSPR} y se presenta a continuación en la Figura 3. 18

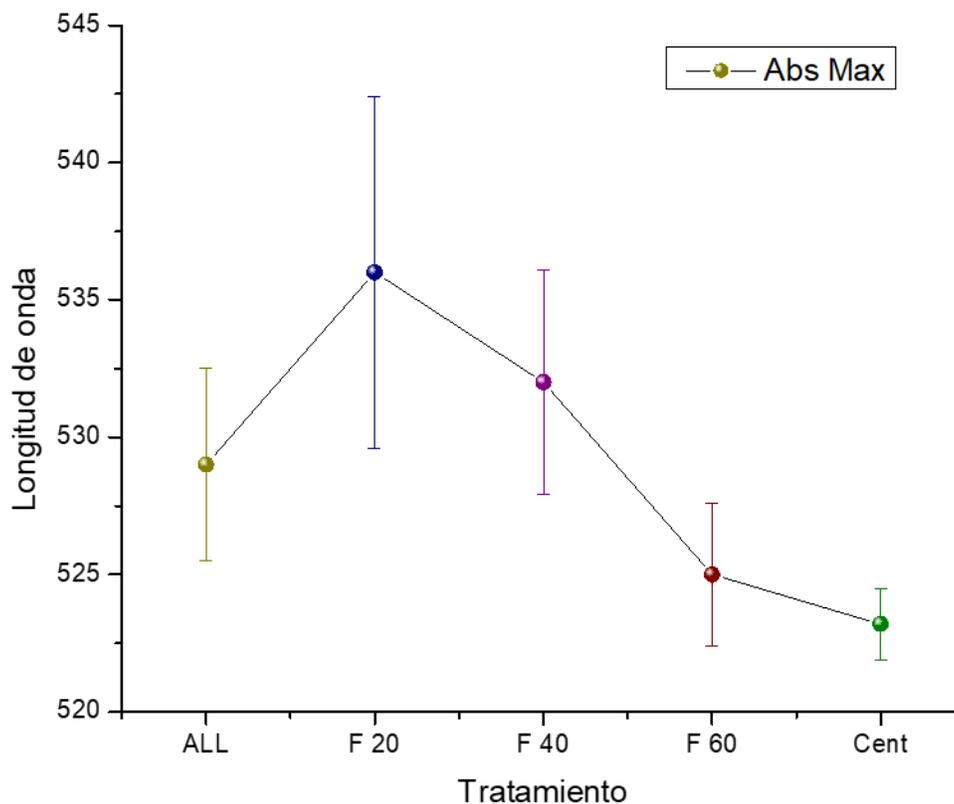


Figura 3. 18 Valores promedio de la longitud de onda como función del tratamiento de las Au-NPs.

Se observó un corrimiento al rojo para las condiciones F 20 y F 40 de $9.8 \pm 3.2 \text{ nm}$ y $5.3 \pm 2.9 \text{ nm}$ respectivamente, mientras que para F 60 y Cent la longitud de onda central se recorrió un $3.7 \pm 1.7 \text{ nm}$ y $5.0 \pm 1.4 \text{ nm}$ hacia longitudes de onda menores. Como se discutió en 1.1. y 1.1.2 un parámetro que influye mucho en la posición es el tamaño y material de las partículas, así como el medio líquido. De estos parámetros el único que se modificó fue el tamaño de partícula y corresponde con los cambios que se observaron en la Figura 3. 15. El incremento en la longitud de onda para F 20 y F 40 se debe a dos cuestiones: el incremento en el tamaño promedio y en la floculación.

El aumento en la longitud de onda corresponde con el aumento de tamaño promedio observado en la Figura 3. 16 y la Figura 3. 15, además de que se observó la modificación de las partículas a una estructura tipo coral que puede permitir la excitación de modos de menor energía, similares al caso de floculación por la degradación que se presentó en la Figura 3. 8.

Las longitudes de onda menor las obtuvimos para las muestras con promedio menor de tamaño, para los coloides F 60 y Cent. Este resultado es evidencia de que estas dos condiciones de tratamiento son efectivos para la reducción de tamaño promedio de las

partículas, muestran consistencia con los resultados observados en TEM y en DLS del análisis anterior.

La comparación de los valores a 350 nm, a 750 nm y la absorbancia máxima por LSPR y se presentan en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..**

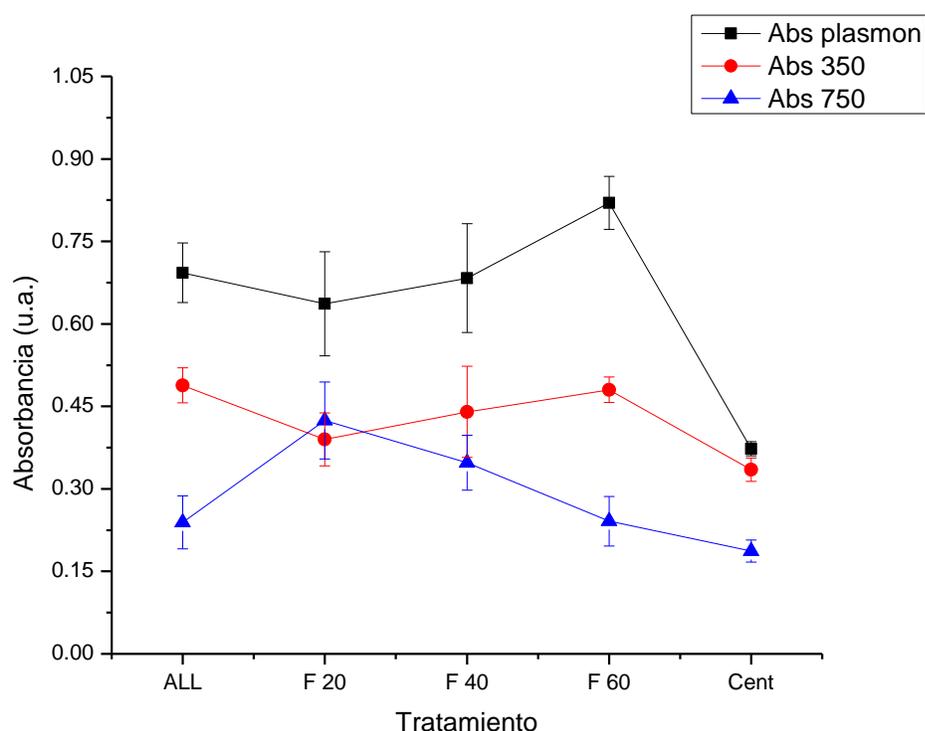


Figura 3. 19 Comparación de la Absorbancia máxima (negro), a 350 nm (rojo) y a 750 nm (azul) como función del tratamiento de las Au-NPs sintetizadas por ALL.

Se supondrá que se tiene la misma cantidad de oro total en ALL, F 20, F 40 y F 60 ya que todos los tratamientos parten de los coloides sintetizados por ablación láser. Puesto que no se añadió ni retiró coloide durante el tratamiento láser, podemos asumir que la cantidad inicial de oro de la condición ALL se conserva.

Se puede observar una tendencia similar entre la gráfica de la absorbancia máxima (negra) y la gráfica de la absorbancia a 350nm (roja). Respecto a los valores de los coloides ALL, el valor promedio disminuye ligeramente para la condición de F 20. La caída en ambas señales la podemos interpretar como una menor cantidad de oro suspendido en el coloide y menor cantidad de partícula excitada por LSPR. La caída de la señal a 350 nm nos da evidencia de que cierta parte del coloide se flocluló al punto de precipitarse y dejar de ser detectado en la suspensión.

Si comparamos estos cambios con la gráfica de absorbancia a 750 nm (azul) notamos un comportamiento contrario, donde se tiene un menor valor inicial para ALL y se incrementa la señal en el infrarrojo para F 20. La caída de las señales a 350 nm y máxima por LSPR, junto con el aumento de absorbancia en infrarrojo, corresponden a la floculación del coloide por los cambios de forma y tamaño de las partículas; al irradiarlas con 20 mJ se da principalmente el fenómeno de fusión, se crean las estructuras tipo coral y eventualmente se precipitan.

Los valores obtenidos para F 40 nos dan información de cómo el sistema está en un punto medio en el que compitieron los procesos de fusión y fragmentación láser. Se tienen señales similares que las ALL para 350 nm y para la absorbancia máxima por LSPR, mientras que se encontró una disminución de la señal a 750 nm respecto a F 20, pero es mayor que ALL.

Esto nos indica que la cantidad de oro suspendida es ligeramente mayor que para F 20, además de que se tiene mayor cantidad de material floculado y suspendido que absorbe a 750 nm. Este incremento en 750 nm viene de la coexistencia de los procesos de fusión y fragmentación al irradiar con 40 mJ; podemos ver que también se tiene modificación de las partículas e incrementó su tamaño, pero en este caso se mantiene la suspensión coloidal y la actividad óptica por LSPR.

Al comparar las señales de F 60 notamos que los valores a 350 nm y 750 nm son muy similares a la condición inicial de ALL. Sin embargo, cuando observamos la absorbancia máxima por LSPR vemos un incremento significativo.

Esto se puede observar desde la gráfica de la Figura 3. 17 y se hace énfasis en la Figura 3. 20 donde se observó que los espectros de los coloides antes y después del tratamiento láser con 60 mJ tienen al menos dos intersecciones, donde se observa la mayor diferencia en el rango de 500-600 nm, asociado a la LSPR.

Se encontró una caída pronunciada del espectro para longitudes de onda mayor a 650 nm en los coloides F 60. Sin embargo, estadísticamente la absorbancia a 750nm entre ALL y F 60.

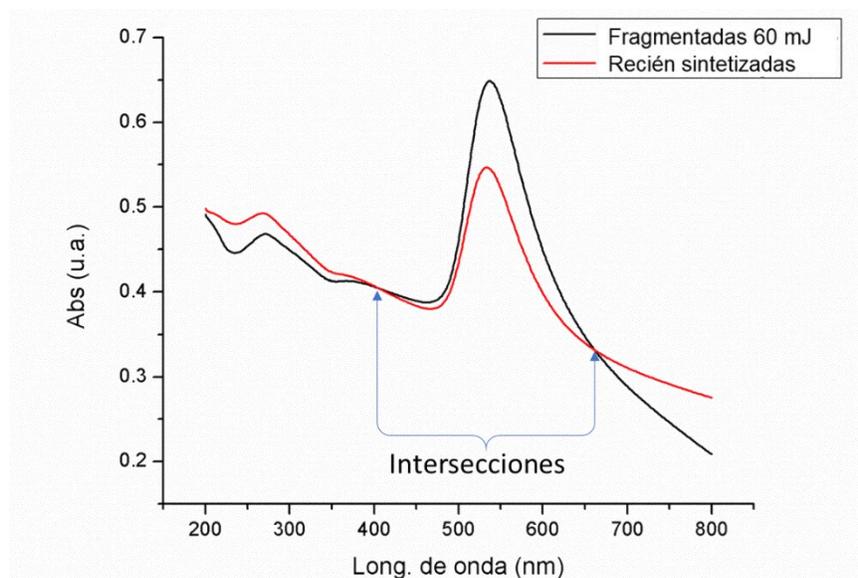


Figura 3. 20. Efectos del tratamiento de fragmentación láser. La región del espectro de absorción por LSPR aumenta en intensidad máxima.

El aumento en la absorción máxima del espectro para F 60 lo asociamos a una exitosa suspensión de las partículas en el coloide, donde tenemos mayor contribución a la banda de absorción de las Au-NPs como partículas monodispersas y una mejoría en la respuesta plasmónica del coloide.

Se encontraron nuevos parámetros de gran interés como la posición de estas intersecciones, el cambio de pendiente de las señales en zonas cercanas a las longitudes de onda de intersecciones, así como el área entre las curvas en un rango limitado entre estas intersecciones. Estos parámetros nos podrían ayudar a determinar la eficiencia de la fragmentación como técnica de volver a suspender las partículas y recuperar su contribución a la banda de absorción por LSPR, y se pretende profundizar su estudio como trabajo a futuro.

En todos los casos se observó una disminución en la intensidad de absorción para las partículas centrifugadas. Esto viene directamente de la disminución de la concentración del coloide al hacer una selección de tamaño y sólo quedarse con las partículas pequeñas.

La recolección de estas partículas está limitada a volúmenes pequeños de 0.3 ml comparado con los coloides originales de 15 ml, por lo que se implementó una cubeta espectroscópica adecuada para este tipo de muestras.

Con la centrifugación se obtuvo el menor promedio y dispersión de tamaño. Se obtuvo la menor intensidad de absorción en la señal y como se observó en la Figura 3. 18 se obtuvo también la menor longitud de onda central. La suspensión coloidal ya centrifugada tenía una tendencia a flocular con mayor rapidez que en los coloides ALL o F 60, por lo que se pretende hacer un estudio con algún surfactante para comparar los espectros de absorción con concentraciones equivalentes y estables.

Para la comparación entre los valores del Pot- ζ hay que tener presente que los términos de estabilidad son relativos y dependen de cada sistema. Como se comentó en la sección 1.5, el uso de surfactantes puede ayudar a la estabilidad del coloide, pero se modifica principalmente el pH de la solución. Al cambiar el pH también cambia el medio líquido, el tamaño de la corona y la interacción que tiene con la partícula. Por lo tanto, es importante tener en cuenta que estabilizar los coloides de Au-NPs con surfactantes significa cambiar el sistema de las partículas, en las que se pierde pureza. En la Figura 3. 21

Se obtuvo un promedio de $Pot \zeta = -31.7 \pm 4.1 \text{ nm}$ para los coloides ALL. Se registró mucha variación para los coloides F 20 ya que la modificación de las Au-NPs en flocs de gran tamaño modificaba constantemente la medición de Pot- ζ . Para la condición F 40 se obtuvo una disminución respecto a ALL y F 20, pero todavía con una importante dispersión del valor promedio. Para la condición óptima de fragmentación a 60 mJ, se obtuvo el potencial más profundo de todas las condiciones estudiadas con un valor de $Pot \zeta = -34.7 \pm 1.7 \text{ nm}$. Finalmente, para las partículas centrifugadas se obtuvo $Pot \zeta = -22.9 \pm 2.3 \text{ nm}$ que corresponde al Pot- ζ de menor intensidad.

Es consistente la correspondencia entre el mínimo y máximo Pot- ζ con la resistencia a la floculación que se observaron en los coloides y la estabilidad coloidal que se observó en los estudios donde las partículas centrifugadas son las que tienen menor intensidad en Pot- ζ y tienden rápidamente a flocular. Sin embargo, las condiciones ALL, F 20, F 40 y F 60 se encuentran con un potencial que rebasa la referencia de -30mV y se observó floculación y precipitación de los coloides al cabo de un par de días.

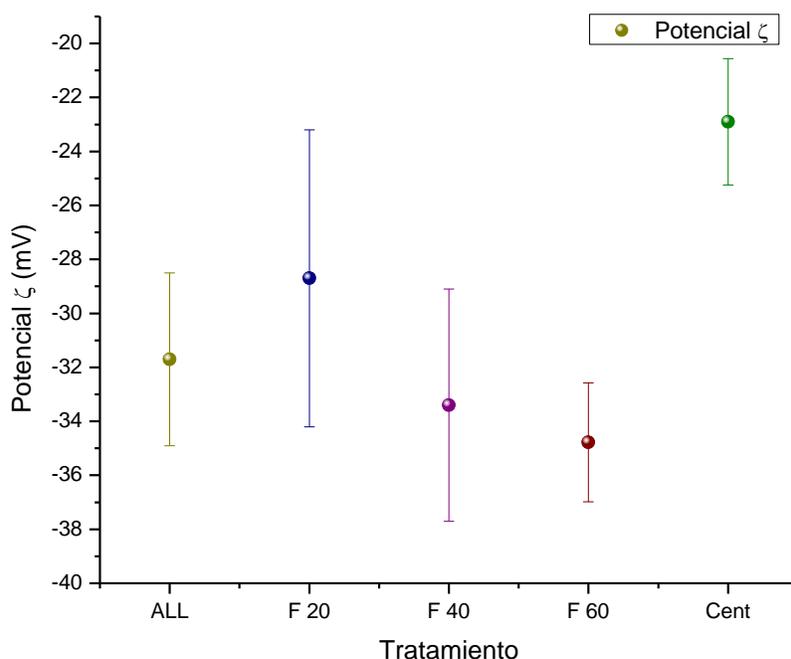


Figura 3. 21 Pot ζ de los coloides como función del tratamiento.

Este estudio se debe tratar como una introducción a la caracterización de los coloides sintetizados por ALL en agua deionizada para comprender con mayor profundidad la interacción superficial de las Au-NPs. Es de nuestro interés estudiar con mayor profundidad encontrar la concentración óptima de los coloides para que su resultado sea consistente con la degradación de la respuesta plasmónica para periodos más largos que un día y con la medida del índice de polidispersión que puede ser obtenido por DLS. Nos interesa estudiar cómo afecta la variación del pH en el Pot- ζ y en la estabilidad del coloide al variar la composición del medio líquido, por lo que se pretende abordar como trabajo a futuro.

Por ahora, este estudio nos indica que el Pot- ζ puede ser usado como una referencia de estabilidad coloidal en un periodo de tiempo menor a 24 horas.

3.4. Respuesta óptica de Au-NPs funcionalizadas con AMP

En la sección 1.5 se mencionó que los compuestos tiolados son ampliamente utilizados para la funcionalización debido a su gran afinidad por el oro. En particular, el ácido 3-mercaptopropiónico (AMP) ha sido utilizado con frecuencia para funcionalizar nanopartículas de oro con proteínas como la eritropoyetina [42] y la albúmina [43] mediante el enlace del azufre del tiol con el oro de la partícula. Para la funcionalización con AMP, la disponibilidad de área de la Au-NPs juega un papel fundamental en la interacción con el tiol (S-H) para llevar a cabo el enlace S-Au.

Como se mencionó en las ventajas de la técnica de ALL, se espera mayor reactividad de Au-NPs desnudas que las recubiertas por residuos, como es el citrato de sodio en las partículas sintetizadas por reducción de una sal de oro (cit-AuNPs) [6]. Para este estudio fueron funcionalizadas Au-NPs de coloides sintetizados por ALL y se compararon los cambios en su respuesta óptica con las cit-AuNPs.

Previo a este estudio, en el grupo de trabajo del laboratorio de Fotofísica del ICAT-UNAM se sintetizaron coloides de cit-AuNPs diluidos mediante síntesis química, con distintas concentraciones de AMP donde el valor de 0.5 mM presentó la menor modificación al espectro de absorbancia original, como se presenta en la Figura 3. 22. Con base en este resultado, se tomó la concentración de 0.5mM como una concentración de referencia para funcionalizar nuestras Au-NPs sintetizadas por ALL.

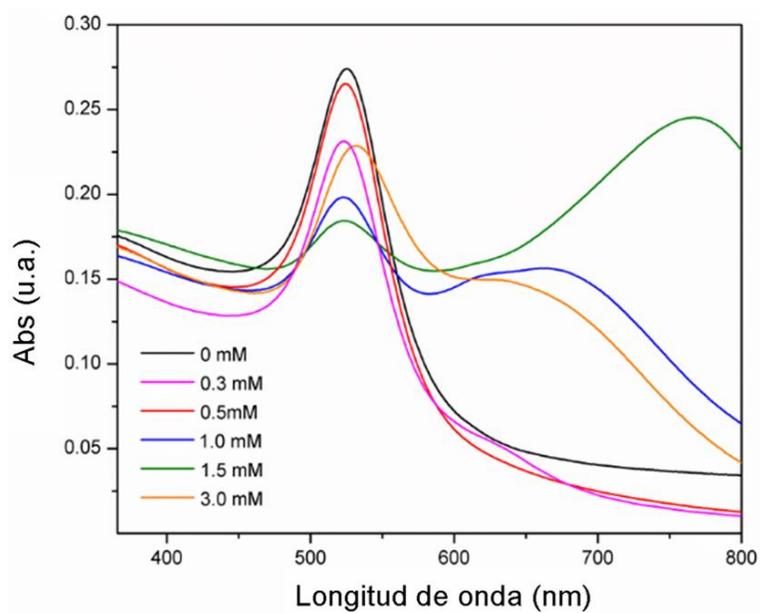


Figura 3. 22 Espectros de absorción de cit-AuNPs y su variación al cambiar la concentración de AMP.

Se midió la absorbancia de una dilución de AMP en agua a 0.5 mM para determinar la contribución a la señal de absorbancia y se presenta en la gráfica magenta de la Figura 3. 23, junto con los espectros de absorción de los coloides sintetizados por ALL funcionalizados con AMP. Se puede observar que hubo un significativo deterioro en la respuesta óptica del coloide obtenido por ALL; visualmente el coloide se observó sedimentado y perdió el color lila característico.

Dada la pérdida de la respuesta óptica de las Au-NPs con esas concentraciones de AMP se redujo 10 veces la concentración de AMP para observar los cambios en su señal plasmónica.

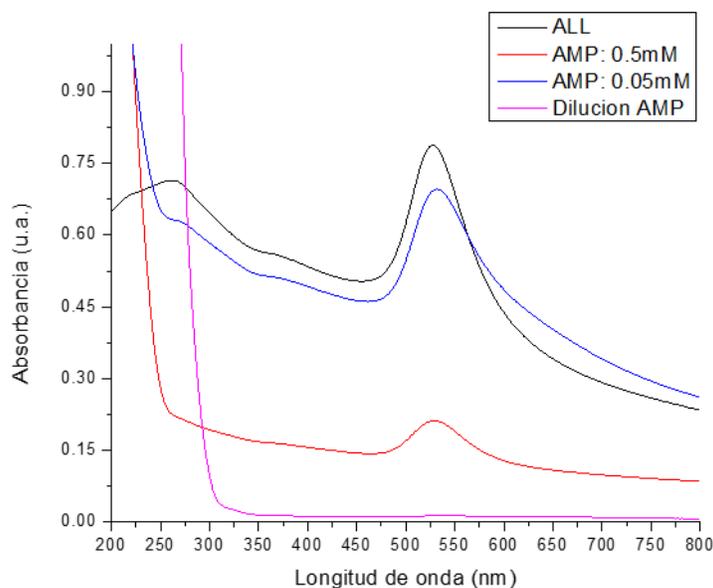


Figura 3. 23. Espectros de absorción para coloides de Au-NPs con distintas diluciones de AMP. Se muestra el espectro de absorción de la dilución de AMP a 0.5 mM.

A pesar de la diferencia en la concentración de los coloides donde la condición ALL tiene mayor cantidad de Au-NPs según su absorción a 350 nm, la abrupta degradación de la señal espectroscópica se presentó en las señales de los coloides ALL, aunque la proporción de átomos de oro para cada tiol fuese mayor que en el caso de las cit-AuNPs para la misma molaridad de AMP de 0.5 mM.

Este comportamiento se presentó consistentemente al variar la agitación de los coloides para mezclar adecuadamente el AMP en el coloide de oro, donde se observó que con mayor agitación el espectro resultante se degradaba con mayor rapidez. Un ejemplo de los espectros de absorción tras la agitación prolongada por 40 minutos se presenta en la Figura 3. 24.a.

Cuando se estudiaron micrografías TEM de las muestras AMP se observó una saturación de AMP alrededor de las partículas como la que se aprecia en la Figura 3. 24.b. Para la menor concentración estudiada de 0.05mM se observó una capa que cubre de manera continua al cúmulo de las Au-NPs. Esta capa no se había observado anteriormente en las micrografías de los coloides y la disminución de esta capa corresponde a la disminución de la concentración de AMP.

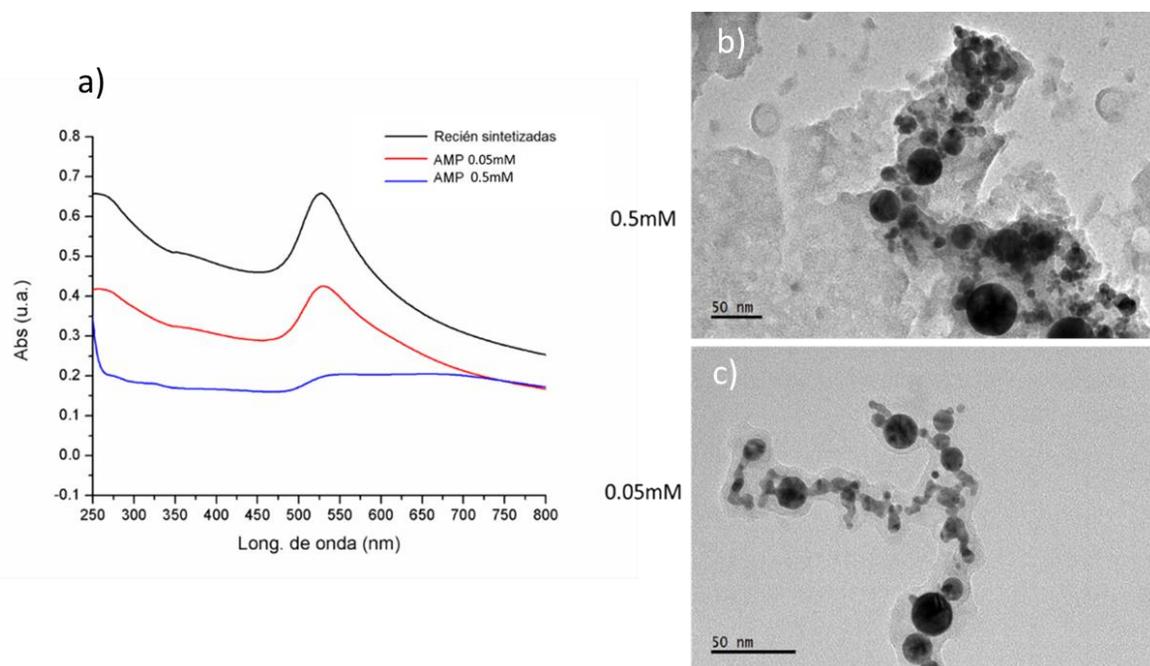


Figura 3. 24 (a) Espectros de absorbanza de coloides funcionalizados con 0.5mM y 0.05mM de AMP agitados por más tiempo. Micrografías TEM para la concentración de 0.5mM (b) y 0.05mM (c).

Se puede observar un fuerte compromiso entre la cantidad de AMP y la respuesta óptica del coloide, donde se tiene un ligero corrimiento de λ_{LSPR} con valor promedio $\Delta\lambda_{LSPR} = 27.0 \pm 7.6 \text{ nm}$ y una disminución de la absorbancia máxima de $\Delta Abs_{LSPR} = 0.17 \pm 0.05 \text{ u. a.}$ para las muestras funcionalizadas con 0.05 mM. Para la concentración de 0.5 mM se obtuvieron coloides que floculaban rápidamente, donde la actividad óptica por LSPR se perdía y sólo quedaba la absorbancia de los floccs más grandes. En estos casos no se puede determinar una longitud de onda central ni una absorbancia máxima con exactitud, pero se mostraron bandas de absorbancia entre 500-750 nm con intensidades menores al 15% de los coloides ALL.

Los resultados sugieren que la interacción de las partículas sintetizadas por ALL es mayor que con las cit-AuNPs obtenidas por un método químico. Esto se debe principalmente al nulo recubrimiento de las nanopartículas obtenidas por lo que tienen más sitios posibles de reacción. Además, la propia inestabilidad del coloide por movimiento browniano y débil repulsión electrostática entre sus partículas se acentúa al estar en contacto con el AMP, que por su afinidad química atrae los cúmulos de partículas, como se observó en la Figura 3. 24.b y Figura 3. 24.c y aumenta la rapidez de floculación.

La cantidad de AMP necesario para funcionalizar las partículas y además modificar lo menos posible (menos del 10% de la absorbancia máxima y corrimiento de λ_{LSPR}) es 10 veces menor para las Au-NPs sintetizadas por ALL que al estar recubiertas por residuos como las cit-Au-NPs.

Cuando se redujo la concentración a 0.05mM también se presentó floculación debida a la gran afinidad del oro por el azufre, pero la capa es más delgada y el coloide presenta una buena actividad óptica como la que se observa en la gráfica roja de la figura 3. 15.a.

Es notable el recubrimiento que se observaron en las microscopías, y estas Au-NPs recubiertas con AMP a su vez interactúan con las moléculas de agua del líquido, El resultado final de esta composición Au-NPs-AMP-agua, ocasionó dificultades en las mediciones de DLS y Pot- ζ . Hay que considerar la naturaleza ácida del AMP cuya presencia en el coloide cambia el pH y con ello el tamaño de la primera corona rígida. Se obtuvieron altos índices de polidispersión, por lo cual las mediciones obtenidas con el Zetasizer deben ser tratadas sólo cualitativamente.

Aunque se observó floculación de las Au-NPs al funcionalizarlas con AMP, el valor del Pot- ζ se conservó en valores cercanos a Pot $\zeta = -29 mV$ y el tamaño de partícula aumentó hasta un $R_H = 178 nm$. En comparación con la referencia de -30mV, observamos que el valor adecuado para determinar la estabilidad del coloide se debe volver a establecer para este nuevo sistema de las partículas recubiertas con AMP.

Para optimizar las condiciones de pH, concentración de Au-NPs y de AMP y así caracterizar cuantitvamente el Pot- ζ de las AU-NPs fragmentadas, centrifugadas y funcionalizadas se plantea como trabajo a futuro hacer otro estudio dedicado a estos parámetros, con el fin de correlacionar cambios en la respuesta óptica, con los valores numéricos de DLS y Pot- ζ y con lo observado en TEM.

En la siguiente sección se resumirán los resultados principales y se enlistarán las conclusiones a las que se llegaron.

Capítulo 4

Conclusiones

Con la metodología propuesta en este trabajo de tesis se realizó la síntesis de coloides de nanopartículas esféricas de oro mediante la técnica de ablación láser en líquidos. Estas partículas presentan una alta pureza ya que sólo involucran la interacción de un haz láser y un blanco de oro ablacionado y sumergido en agua deionizada.

Los coloides exhibieron una longitud de onda central de $\lambda_{LSPR} = 525.0 \pm 3.8 \text{ nm}$, un ancho $FWHM = 57 \pm 3 \text{ nm}$ una absorbancia máxima de $Abs_{LSPR} = 0.65 \pm 0.23 \text{ u.a.}$ Es el resultado de la superposición de varios espectros de partículas con diámetro promedio $D = 47.1 \pm 2.1 \text{ nm}$ y una alta desviación estándar de $\sigma = 62.1 \text{ nm}$.

Con el fin de reducir la dispersión de tamaños de las Au-NPs, los coloides fueron sometidos a dos tratamientos: el tratamiento láser con 20 mJ, 40 mJ y 60 mJ de energía por pulso y a centrifugación con 6000 RPM.

Con 20 mJ y 40 mJ se observó incremento en el tamaño promedio, bandas de absorción menos intensas, más anchas y con un corrimiento al rojo de λ_{LSPR} de $9.8 \pm 3.2 \text{ nm}$ y $5.3 \pm 2.9 \text{ nm}$ respectivamente. Para 60 mJ y Cent se observó un corrimiento al azul de $3.7 \pm 1.7 \text{ nm}$ y $5.0 \pm 1.4 \text{ nm}$ respectivamente.

Con 60 mJ se observó una mejora en la intensidad máxima a un valor de $Abs 0.78 \pm 0.33 \text{ u.a.}$ y un valor central $\lambda_{LSPR} = 525.6 \pm 2.5 \text{ nm}$. Presentó el ancho menor con un valor de $FWHM = 51 \pm 3 \text{ nm}$ y se pudo recuperar la suspensión de coloides floculadas.

Se logró reducir el tamaño promedio y distribución de tamaños al usar fragmentación con 60 mJ y con centrifugación. Los valores del diámetro promedio tras la fragmentación son $D = 25.7 \pm 3.1 \text{ nm}$ y $\sigma = 54.4 \text{ nm}$. Los valores del diámetro después de la centrifugación son $D = 15.8 \pm 1.2 \text{ nm}$ y $\sigma = 12.9 \text{ nm}$.

Los resultados de los estudios con la técnica de DLS resultan en tamaños mayores de partículas que las medidas con TEM. Esto se asocia principalmente a la complejidad del radio hidrodinámico y a la floculación de las partículas. Los valores de DLS nos sugieren que las partículas se estabilizan en flocs de tamaños de 80-120 nm, aunque las partículas tienen un promedio menor a 50 nm. Ambos resultados comparten el mismo comportamiento de aumento de tamaño para el tratamiento láser con 20 mJ y 40 mJ, mientras que se redujo para la fragmentación con 60 mJ y centrifugación.

Se observó una mayor floculación cuando se centrifugaba y menor floculación cuando se fragmentaba con 60 mJ. Además, someter los coloides a un tratamiento láser con 60 mJ ofrece la capacidad de volver a ser suspendidos cuando se floculen.

El aumento de la intensidad y reproducibilidad de la actividad óptica, así como en la estabilidad y la posibilidad de volver a suspender los coloides y recuperar sus propiedades ópticas logran optimizar al sistema de Au-NPs coloidales inicial.

Las Au-NPs sintetizadas por ALL exhiben una mayor interacción con el AMP respecto a las cit-AuNPs, donde la degradación de la actividad óptica, el corrimiento y disminución de la banda de absorción es considerablemente mayor al utilizar la misma concentración de 0.5mM. Esto se asocia principalmente al nulo recubrimiento de las partículas desnudas sintetizadas por láser, en comparación con el citrato de sodio presente en los coloides de oro sintetizados por reducción de una sal de oro.

Se obtuvo un umbral de concentración de 0.05mM como condición previa a perder la actividad óptica por floculación y tener una degradación del 10%. Este umbral corresponde a una concentración 10 veces menor que el estudiado para partículas sintetizadas por métodos químicos, y se puede optimizar con valores menores de concentración.

Trabajo a futuro

Se pretende optimizar el montaje experimental para la fragmentación mediante un flujo constante del coloide, modificar el material de las ventanas para poder enfocar el haz con el fin de reducir el área y aumentar la afluencia de fragmentación.

Se busca sistematizar el arreglo experimental para obtener las mediciones de absorbancia, transmitancia y concentración relativa del coloide de oro en tiempo real e “in-situ”, durante el proceso de ablación láser para tener más información sobre los procesos físicos involucrados durante la irradiación.

Para la medición de DLS y Pot- ζ se busca optimizar los valores experimentales, el modelo ajustado y la preparación de la muestra para una mejor medición. Nos interesa estudiar cómo afecta la variación del pH en el Pot- ζ y en la estabilidad del coloide al variar la composición del medio líquido por lo que se plantea estudiar los cambios en la floculación y reactividad de los coloides de ALL con otras moléculas tioladas, como el POSS-tiol y estudiar los cambios en la floculación al variar el pH de los coloides de Au-NPs.

Para los coloides sometidos a fragmentación láser, se plantea hacer un estudio de correlación entre las variaciones en las señales de absorbancia, el cambio de pendiente de las señales en zonas cercanas a las longitudes de onda de intersecciones y el área entre las curvas en un rango limitado entre las intersecciones de las señales antes y después de la irradiación, con el fin de correlacionar cambios en la respuesta óptica, con los valores numéricos de DLS y Pot- ζ y con lo observado en TEM.

Respecto a la centrifugación como método de separación, se busca optimizar los parámetros de centrifugación y hacer procesos sucesivos de centrifugación a diferentes RPM con el fin de extraer las partículas pequeñas en cada paso y reducir la floculación con las más grandes.

Así mismo se propone ampliar el rango de concentraciones estudiadas para encontrar la concentración óptima en la que se disponga de la mayor cantidad de AMP con la menor modificación de los coloides sintetizados por ablación láser en líquidos.

Finalmente se plantea usar los coloides funcionalizados para funcionalización de proteínas del tipo inmunoglobulinas de interés médico.

Bibliografía

- 1 V. V. Pokropivny y V. V. Skorokhod, Classification of nanostructures by dimensionality and concept of surface forms engineering in nanomaterial science, *Materials Science and Engineering C*, vol.27, no.5–8,990–993,2007.
- 2 Vollath D, Fischer FD, Holec D. Surface energy of nanoparticles - influence of particle size and structure. *Beilstein J Nanotechnol.* 2018; 9:2265–2276.
- 3 Font, Francesc y Myers, Tim, Spherically symmetric nanoparticle melting with a variable phase change temperature. *Journal of Nanoparticle Research.* 15. 1-13, 2013.
- 4 Tovar Sánchez Jean Yves (2018). Síntesis de nanopartículas de oro con POSS-tiol mediante ablación láser para aplicaciones biomédicas (Tesis de Licenciatura). Facultad de Ciencias, UNAM.
- 5 Garcia, M. A. Surface plasmons in metallic nanoparticles: Fundamentals and applications. *J. Phys. D. Appl. Phys.* 44, (2011).
- 6 López-Muñoz, G. A., Pescador-Rojas, J. A., Ortega-Lopez, J., Salazar, J. S. & Abraham Balderas-López, J. Thermal diffusivity measurement of spherical gold nanofluids of different sizes/concentrations. *Nanoscale Res. Lett.* 7, (2012).
- 7 Contreras-Trigo, B. et al. Slight pH fluctuations in the gold nanoparticle synthesis process influence the performance of the citrate reduction method. *Sensors (Switzerland)* 18, (2018).
- 8 Ojea-Jiménez, I., Puentes, V., Instability of Cationic Gold Nanoparticle Bioconjugates: The Role of Citrate Ions. *J. Am. Chem. Soc.* 2009, 131, 13320–13327.
- 9 Kabashin, Andrei & Meunier, Michel. (2006). Laser ablation-based synthesis of functionalized colloidal nanomaterials in biocompatible solutions. *Journal of Photochemistry and Photobiology A Chemistry.* 182. 330-334 (2016)
- 10 Lau, M.; Haxhijaj, I.; Wagener, P.; Intartaglia, R.; Brandi, F.; Nakamura, J.; Barcikowski, S. Ligand-Free Gold Atom Clusters Adsorbed on Graphene Nano Sheets Generated by Oxidative Laser Fragmentation in Water. *Chem. Phys. Lett.* 2014, 610–611, 256–260
- 11 Zhang, D., Gocke, B. & Barcikowski, S. Laser Synthesis and Processing of Colloids: Fundamentals and Applications. *Chem. Rev.* 117, 3990–4103 (2017).
- 12 Link, S., & El-sayed, M. A. (2000). International Reviews in Physical Chemistry Shape and size dependence of radiative, non-radiative and photothermal properties of gold nanocrystals. *International Reviews in Physical Chemistry*, 19(December 2012), 409–453.
- 13 Gold Colloid Size Distribution [Digital]. (2019). Tomada de <https://nanocomposix.com/pages/gold-colloid#target>.
- 14 Ibarra-Arán, J. C., Rodríguez-Martínez, D., Rodríguez-González, E., & González-Castillo, J. R. (2017). In vitro evaluation of bactericidal effect of silver and gold-silver nanoparticles coated with silicon dioxide on *Xanthomonas fragariae*, 2(49), 2683–2688. <https://doi.org/10.1557/adv.2017.528>
- 15 R.E. Russo, X.L. Mao, H.C. Liu, J.H. Yoo, S.S. Mao, Time-resolved plasma diagnostics and mass removal during single-pulse laser ablation, *Appl.Phys.* A69, S887–S894,1999.
- 16 Laser ablation [Digital]. <http://appliedspectra.com/technology/libs.html>.

- 17 H. Ushida, N. Takada, and K. Sasaki, Liquid-phase laser ablation, *J. Phys.Conf. Series*59, 563 ,2007.
- 18 N. Takada, A. Fujikawa y K. Sasaki, Control of Plasma and Cavitation Bubble in Liquid- Phase Laser Ablation Using Supersonic Waves, *Japanese Journal of Applied Physics*, Volume 50, Number12R.
- 19 Suslick, K.S. 2000. Sonochemistry. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*.
- 20 B E Noltingk and E a Neppiras, Cavitation produced by Ultrasonics, *Proceedings of the Physical Society Section B*, Volume63, Number9,1950.
- 21 Torrisi, L., Picciotto, A., Andó, L. Pulsed laser ablation of gold at 1064 nm and 532 nm, *Czech J. Phys.* (2004) 54 (Suppl3).
- 22 Garner Q, Molian P. Formation of Gold Microparticles by Ablation with Surface Plasmons, *Nanomaterials*. 2013;3(4):592-605.
- 23 Ebuka S. Arinze, Botong Qiu, Gabrielle Nyirjesy, and Susanna M. Thon, Plasmonic Nano- particle Enhancement of Solution-Processed Solar Cells: Practical Limits and Opportunities, *ACS Photonics*,2016,3(2), pp158–173.
- 24 M.A. Valverde-Alva, T. García-Fernández, M. Villagrán-Muniz C. Sánchez-Aké, R. Castaneda-Guzmán, E. Esparza-Alegría, C. F. Sánchez-Valdés, J. L. Sánchez Llamazares, C. E. Márquez Herrera, Synthesis of silver nanoparticles by laser ablation in ethanol: A pulsed photoacoustic study, *Applied Surface Science* 355 (2015) 341-349.
- 25 Dongshi Zhang, Bilal Gokce, y Stephan Barcikowski: Laser Synthesis and Processing of Colloids: Fundamentals and Applications, *American Chemical Society* 3990-4103, (2015). REFVACALL: 77, 79, 82, 86, 87:
- 26 Sakka, T.; Iwanaga, S.; Ogata, Y. H.; Matsunawa, A.; Takemoto, T. Laser Ablation at Solid–Liquid Interfaces: An Approach from Optical Emission Spectra. *J. Chem. Phys.* 2000, 112, 8645–8653.
- 27 Kim, K. K.; Roy, M.; Kwon, H.; Song, J. K.; Park, S. M. Laser Ablation Dynamics in Liquid Phase: The Effects of Magnetic Field and Electrolyte. *J. Appl. Phys.* 2015, 117, 074302.
- 28 Lau, M.; Barcikowski, S. Quantification of Mass-Specific Laser Energy Input Converted into Particle Properties during Picosecond Pulsed Laser Fragmentation of Zinc Oxide and Boron Carbide in Liquids. *Appl. Surf. Sci.* 2015, 348,22–29.
- 29 Boyer, P.; Meunier, M. Modeling Solvent Influence on Growth Mechanism of Nanoparticles (Au, Co) Synthesized by Surfactant Free Laser Processes. *J. Phys. Chem. C* 2012, 116, 8014–8019.
- 30 Weisbecker, C. S., Merritt, M. V., & Whitesides, G. M. (1996). Molecular self-assembly of aliphatic thiols on gold colloids. *Langmuir*, 12(16), 3763–3772. <https://doi.org/10.1021/la950776r>
- 31 Wenjie Wang, Xiaofan Ding, Qing Xu, Jing Wang, Lei Wang, Xinhui Lou, Zeta-potential data reliability of gold nanoparticle biomolecular conjugates and its application in sensitive quantification of surface absorbed protein, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Volume 148, 2016, 541-548.
- 32 Nichols, G., Byard, S., Bloxham, M. J., Botterill, J., Dawson, N. J., Dennis, A., ... Sherwood, J. D. (2002). A review of the terms agglomerate and aggregate with a recommendation for nomenclature used in powder and particle characterization. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 91(10), 2103–2109. <https://doi.org/10.1002/jps.10191>
- 33 Xue, Y., Li, X., Li, H., & Zhang, W. (2014). Quantifying thiol-gold interactions towards the efficient strength control. *Nature Communications*, 5, 1–9.

- 34** Weisbecker, C. S., Merritt, M. V., & Whitesides, G. M. (1996). Molecular self-assembly of aliphatic thiols on gold colloids. *Langmuir*, 12(16), 3763–3772.
- 35** Bürgi, T. (2015). Properties of the gold-sulphur interface: from self-assembled monolayers to clusters. *Nanoscale*, 7(38), 15553–15567.
- 36** Mori, T., & Hegmann, T. (2016). Determining the composition of gold nanoparticles: a compilation of shapes, sizes, and calculations using geometric considerations. *Journal of Nanoparticle Research*, 18(10). <https://doi.org/10.1007/s11051-016-3587-7>
- 37** Poletti, A., Fracasso, G., Conti, G., Pilot, R., & Amendola, V. (2015). Laser generated gold nanocorals with broadband plasmon absorption for photothermal applications. *Nanoscale*, 7(32), 13702–13714. <https://doi.org/10.1039/c5nr03442f>
- 38** Bensebaa, F., Zhou, Y., Brolo, A. G., Irish, D. E., Deslandes, Y., Kruus, E., & Ellis, T. H. (1999). Raman characterization of metal-alkanethiolates. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 55(6), 1229–1236.
- 39** Zhao, P., Li, N., & Astruc, D. (2013). State of the art in gold nanoparticle synthesis. *Coordination Chemistry Reviews*, 257(3–4), 638–665.
- 40** Valverde-Alva, M. A., García-Fernández, T., Esparza-Alegría, E., Villagrán-Muniz, M., Sánchez-Aké, C., Castañeda-Guzmán, R., ... Sanchez Llamazares, J. L. (2016). Laser ablation efficiency during the production of Ag nanoparticles in ethanol at a low pulse repetition rate (1-10 Hz). *Laser Physics Letters*, 13(10).
- 41** Aldama-Reyna, W & Agreda Delgado, Jhenry & Valverde-Alva, Miguel & Angelats-Silva, Luis. (2018). Photoacoustic study of Changes in Optical Properties of Colloids with Silver Nanoparticles Produced by Laser Ablation. *International Journal of Applied Engineering Research*. 13. 1408-1414.
- 42** F. Varenne et al., “Towards quality assessed characterization of nanomaterial: Transfer of validated protocols for size measurement by dynamic light scattering and evaluation of zeta potential by electrophoretic light scattering,” *Int. J. Pharm.*, vol. 528, no. 1–2, pp. 299–311, 2017
- 43** Centrifugal force size selection [Digital]. Tomada de <https://www.nanopartz.com/gold-nanoparticles-properties-centrifuge-speeds.asp>
- 44** Kang J, Richardson JP, Macmillan D. 3-Mercaptopropionic acid-mediated synthesis of peptide and protein thioesters. *Chem Commun (Camb)*. 2009;(4):407–409.
- 45** Peter van de PlasStan Willems Jan Leunissen, GOLD NANOPARTICLE CONJUGATION Adsorption or Covalent Binding? Tech Support: Newsletter 6 2018-1.
- 46** González-Rubio, G., Guerrero-Martínez, A., & Liz-Marzán, L. M. (2016). Reshaping, Fragmentation, and Assembly of Gold Nanoparticles Assisted by Pulse Lasers. *Accounts of Chemical Research*, 49(4), 678–686. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.6b00041>
- 47** Logunov, S. L. Ahmadi, T. S. El-Sayed, M. A. Khoury, J. T. Whetten, R. L. Electron Dynamics of Passivated Gold Nanocrystals Probed by Subpicosecond Transient Absorption Spectroscopy. *J. Phys* (1997).
- 48** Ahmadi, T. S.; Logunov, S. L.; El-Sayed, M. A. Picosecond Dynamics of Colloidal Gold Nanoparticles. *J. Phys. Chem.* 1996, 100,8053–8056.
- 49** Zijlstra, P.; Chon, J. W. M.; Gu, M. White Light Scattering Spectroscopy and Electron Microscopy of Laser Induced Melting in Single Gold Nanorods. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2009, 11, 5915–5921.

- 50 Tsuji, T., Yahata, T., Yasutomo, M., Igawa, K., Tsuji, M., Ishikawa, Y., & Koshizaki, N. (2013). Preparation and investigation of the formation mechanism of submicron-sized spherical particles of gold using laser ablation and laser irradiation in liquids. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 15(9), 3099–3107. <https://doi.org/10.1039/c2cp44159d>
- 51 Steinigeweg, D., Schütz, M., Salehi, M., & Schlücker, S. (2011). Fast and cost-effective purification of gold nanoparticles in the 20-250 nm size range by continuous density gradient centrifugation. *Small*, 7(17), 2443–2448.
- 52 Liang, Z., Zhang, J., Wang, L., Song, S., Fan, C., & Li, G. (2007). A centrifugation-based method for preparation of gold nanoparticles and its application in biodetection. *International Journal of Molecular Sciences*, 8(6), 526–532. <https://doi.org/10.3390/i8060526>
- 53 Balasubramanian, S. K., Yang, L., Yung, L. Y. L., Ong, C. N., Ong, W. Y., & Yu, L. E. (2010). Characterization, purification, and stability of gold nanoparticles. *Biomaterials*, 31(34), 9023–9030. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.08.012>
- 54 Novak, J. P., Nickerson, C., Franzen, S., & Feldheim, D. L. (2001). Purification of molecularly bridged metal nanoparticle arrays by centrifugation and size exclusion chromatography. *Analytical Chemistry*, 73(23), 5758–5761. <https://doi.org/10.1021/ac010812t>
- 55 Roca, M., Pandya, N. H., Nath, S., & Haes, A. J. (2010). Linear assembly of gold nanoparticle clusters via centrifugation. *Langmuir*, 26(3), 2035–2041. <https://doi.org/10.1021/la902572m>
- 56 Lucas, L. and J. Zhang, *Femtosecond laser micromachining: a back-to-basics primer*. 2012, <http://www.industrial-lasers.com/>
- 57 Abubaker Hassan Hamad, Effects of Different Laser Pulse Regimes (Nanosecond, Picosecond and Femtosecond) on the Ablation of Materials for Production of Nanoparticles in Liquid Solution, High Energy and Short Pulse Lasers, Richard Viskup, IntechOpen, DOI: 10.5772/63892.
- 58 P. Sharma, R.K. Vatsa, Chapter 16 - Nanoclusters Under Extreme Ionization Conditions, Editor(s): A.K. Tyagi, S. Banerjee, Materials Under Extreme Conditions, Elsevier, 2017, pp 575-613, ISBN 9780128013007, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801300-7.00016-4>.
- 59 Peng, Z., Walther, T., & Kleinermanns, K. (2005). Photofragmentation of phase-transferred gold nanoparticles by intense pulsed laser light. *The Journal of Physical Chemistry B*, 109(33), 15735–15740.
- 60 Giammanco, F., Giorgetti, E., Marsili, P., & Giusti, A. (2010). Experimental and theoretical analysis of photofragmentation of Au nanoparticles by picosecond laser radiation. *The Journal of Physical Chemistry C*, 114(8), 3354–3363.
- 61 Mafuné, F., & Kondow, T. (2003). Formation of small gold clusters in solution by laser excitation of interband transition. *Chemical physics letters*, 372(1-2), 199–204.
- 62 Ito, S., Mizuno, T., Yoshikawa, H., & Masuhara, H. (2007). Laser ablation of individual gold nanoparticles in solution. *Japanese journal of applied physics*, 46(3L), L241.
- 63 Kawasaki, M., & Masuda, K. (2005). Laser fragmentation of water-suspended gold flakes via spherical submicroparticles to fine nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry B*, 109(19), 9379–9388.
- 64 Kurita, H., Takami, A., & Koda, S. (1998). Size reduction of gold particles in aqueous solution by pulsed laser irradiation. *Applied Physics Letters*, 72(7), 789–791.
- 65 Link, S., Burda, C., Mohamed, M. B., Nikoobakht, B., & El-Sayed, M. A. (1999). Laser photothermal melting and fragmentation of gold nanorods: energy and laser pulse-width dependence. *The Journal of Physical Chemistry A*, 103(9), 1165–1170.
- 66 Palazzo, G., Valenza, G., Dell’Aglia, M., & De Giacomo, A. (2017). On the stability of gold nanoparticles synthesized by laser ablation in liquids. *Journal of Colloid and Interface Science*, 489, 47–56. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2016.09.017>

- 67 Schneider G, Decher G. From functional core/shell nanoparticles prepared via layer-by-layer deposition to empty nanospheres. *Nano Lett* 2004; 4:1833e9.
- 68 Slot JW, Geuze HJ. Sizing of protein A-colloidal gold probes for immune- electron microscopy. *J Cell Biol* 1981; 90:533e6.
- 69 Kim JH, Lee TR. Thermo- and pH-responsive hydrogel-coated gold nano- particles. *Chem Mater* 2004; 16:3647e51.
- 70 Murphy D, Redmond G, De La Torre BG, Eritja R. Hybridization and melting behavior of peptide nucleic acid (PNA) oligonucleotide chimeras conjugated to gold nanoparticles. *Helv Chim Acta* 2004; 87:2727e34.
- 71 Schneider GF, Decher G. From “nano-bags” to “micro-pouches”. Understanding and tweaking flocculation-based processes for the preparation of new nanoparticle-composites. *Nano Lett* 2008; 8:3598e604.
- 72 Kim D, Park S, Jae HL, Yong YJ, Jon S. Antibiofouling polymer-coated gold nanoparticles as a contrast agent for in vivo X-ray computed tomography imaging. *J Am Chem Soc* 2007; 129:7661e5.
- 73 McMahan JM, Emory SR. Phase transfer of large gold nanoparticles to organic solvents with increased stability. *Langmuir* 2007; 23:1414e8.
- 74 Wybranowski T, Cyrankiewicz M, Kruszewski S. Binding of drugs to serum albumin determined by changes in surface plasmon resonance signal of gold nanoparticles. *Proc SPIE Int Soc Opt Eng* 2008;7141. 71411B/1e71411B/7.
- 75 Bhattacharjee, S. (2016). DLS and zeta potential - What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release*, 235, 337–351. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>.
- 76 Ulrike Taylor, Sabine Klein, Svea Petersen, Wilfried Kues, Stephan Barcikowski, Detlef Rath, Nonendosomal cellular uptake of ligand-free, positively charged gold nanoparticles, *Journal of Quantitative Cell Science*, 2010 pp 439-446.
- 77 Marie Christine, Daniel y Didier Astruc, *Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum size-related properties and Applications toward Biology, Catalysis and Nanotechnology*, Molecular Nanosciences and Catalysis Group, *Chem.Rev.*, 2004, 104(1), pp. 293-346.
- 78 Jae-Seung Lee, Min Su Han y Chad A. Mirkin, Colorimetric Detection of Mercuric Ion (Hg²⁺) in Aqueous Media using DNA-Functionalized Gold Nanoparticles, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2007,46,4093–4096.
- 79 Prashant K. Jain, Kyeong Seok Lee, Ivan H. El-Sayed y Mostafa A. El-Sayed, *Calculated Absorption and Scattering Properties of Gold Nanoparticles of Different Size, Shape and Composition: Applications in Biological Imaging and Biomedicine*, *J. Phys.Chem. B*,2006,110 (14), pp7238–7248.