

**UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA**



“ESTUDIO DE LA TRANSFERENCIA DE ENERGÍA ENTRE NANOPARTÍCULAS DE ORO GENERADAS POR ABLACIÓN LÁSER Y MOLÉCULAS FLUORÓFORAS”

Trabajo Especial de Grado presentado ante
la Ilustre Universidad Central de Venezuela
por el Br. Irving Alberto Marquez Cruz para
optar al título de Licenciado en Química.

Caracas, abril 2009

Los abajo firmantes designados por la Universidad Central de Venezuela, como integrantes del jurado examinador del Trabajo Especial de Grado titulado: "ESTUDIO DE LA TRANSFERENCIA DE ENERGÍA ENTRE NANOPARTÍCULAS DE ORO GENERADAS POR ABLACIÓN LÁSER Y MOLÉCULAS FLUORÓFORAS". Presentado por el Br. Irving Alberto Marquez Cruz, certificamos que este trabajo cumple con los requisitos exigidos por nuestra Magna Casa de Estudios para optar por el título de Licenciado en Química.

Dr. Jimmy Castillo
(Director)

Dr. Lorenzo Echeverría
(Jurado)

Dr. Héctor Gutiérrez
(Jurado)

RESUMEN

Las nanopartículas de oro poseen propiedades únicas que han motivado el desarrollo de numerosos estudios que buscan implementar su uso para lograr mejoras en la detección de un gran número de enfermedades, células cancerígenas, proteínas y una amplia gama de biomoléculas. Gracias a que presentan resonancia de plasmón superficial, son capaces de incrementar o disminuir la fluorescencia de moléculas fluoróforas que puedan estar en contacto con ellas. Esta característica tiene potenciales aplicaciones en la detección de anticuerpos y antígenos.

La generación de nanopartículas de oro por ablación láser es un método físico que permite obtener muestras de partículas en prácticamente cualquier solvente, sin modificar el entorno químico del medio donde se están generando, evitando así poner en peligro la estructura o actividad biológica de las biomoléculas que se deseen acoplar a ellas.

En el presente trabajo se sintetizaron nanopartículas de oro utilizando la técnica de generación por ablación láser en un medio estabilizante de SDS. Se varió la concentración de estabilizante, la irradiancia utilizada y el tiempo de ablación para estudiar su efecto sobre el diámetro, morfología y el número de partículas. Se tomaron diferentes muestras de nanopartículas de oro y se pusieron en contacto con soluciones de fluoresceína de diferentes concentraciones, observándose un fuerte quenching en la fluorescencia de dicha molécula. Se estudió la posibilidad de transferencia de energía nanopartícula-fluoróforo y se estableció que el quenching observado es debido a la gran cercanía entre las moléculas de fluoróforo y los núcleos metálicos de las nanopartículas de oro.

AGRADECIMIENTOS

Primero que nada quisiera dar gracias al Laboratorio de Química Láser de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela por permitirme realizar este Trabajo Especial de Grado y facilitarme todos los equipos, materiales y asesoramiento requerido para haber podido concluir satisfactoriamente con todo el trabajo de investigación planteado.

Personalmente, quisiera dar gracias a mi mamá por estar conmigo, a todo el personal del Laboratorio de Química Láser por estar siempre dispuestos a ayudarme y aclarar las dudas que tuviese, a Mauro por todo el tiempo dedicado a ayudarme con el montaje del láser, enseñarme a utilizarlo correctamente, aclarar mis inquietudes y demás colaboraciones prestadas, a la prof. Josmery, al prof. Héctor por haberme permitido el uso de su equipo de DLS y tratar de hacer lo posible para mejorar las mediciones que obtuve, a mi tutor el prof. Jimmy Castillo por al menos haberse leído mi tesis el último día. Adicionalmente quisiera agradecer al prof. Lorenzo por toda la colaboración prestada en la USB y muy especialmente a María Alejandra Machuca por haberme ayudado inicialmente con toda la metodología para la generación de nanopartículas por ablación láser y por haber realizado su trabajo de investigación en nanopartículas de oro, el cual me sirvió como guía para la realización del mío.

Por último quisiera agradecer a mis amigos, a Luis Castillo por haberme hecho las correcciones del seminario de investigación, a Leandro por toda la ayuda prestada y los ratos de ocio en el banquito y a toda la gente que estuvo conmigo durante la realización de este trabajo de investigación, me apoyó, creyó en mí y me brindó su amistad.....A todos, muchas gracias.

Dedicado a:
Mi tata....Q.E.P.D.

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN.....	13
CAPÍTULO I.....	17
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	17
I.1. CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS DE LAS NANOPARTÍCULAS.	17
I.1.1. PROPIEDADES DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ORO.	21
I.2. ESTABILIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS.	23
I.2.1 ESTABILIZACIÓN POR INTERACCIÓN ELECTROSTÁTICA.	24
I.2.2. ESTABILIZACIÓN POR IMPEDIMENTO ESTÉRICO.	24
I.3. FUNDAMENTOS TEÓRICOS DE LA ABLACIÓN LÁSER.....	27
I.3.1. LÁSER DE ND:YAG O EXCIMER.	30
I.4. CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS GENERADAS.....	32
I.4.1. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.....	32
I.4.1.2. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (TEM).	33
I.4.2. ESPECTROSCOPIA DE UV-VISIBLE.....	36
I.4.3. DISPERSIÓN DINÁMICA DE LUZ O DINAMIC LIGHT SCATTERING (DLS)..	38
I.5. FLUORESCENCIA.....	39
I.5.1. FLUORESCENCIA.....	42
I.5.2. EFECTOS DE METALES EN LA FLUORESCENCIA.	43
CAPÍTULO II.....	46
OBJETIVOS	46
II.1. OBJETIVO GENERAL.	46
II.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	46
CAPÍTULO III.....	47
METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	47
III.1. MATERIALES UTILIZADOS.	47
III.1.1. SOLVENTES.....	47
III.1.2. REACTIVOS.....	47

III.1.3. EQUIPOS E INSTRUMENTAL.....	47
III.1.3. OTROS MATERIALES.....	48
III.2. OBTENCIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE ORO POR ABLACIÓN LÁSER.	48
III.2.1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.....	48
III.2.2. MONTAJE EXPERIMENTAL.....	49
III.2.3. DETERMINACIÓN DE LA IRRADIANCIA.....	49
III.2.4. ABLACIÓN LÁSER SOBRE LA PLACA DE ORO.....	50
III.3. CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ORO OBTENIDAS.....	51
III.3.1. ESPECTROSCOPIA UV-VISIBLE.....	51
III.3.2. DISPERSIÓN DINÁMICA DE LUZ (DLS).....	52
III.3.3. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN.....	55
III.4. ESTUDIO DE LA TRANSFERENCIA DE ENERGÍA ENTRE LAS NANOPARTÍCULAS DE ORO GENERADAS Y FLUORESCÉINA.....	55
III.4.1. METODOLOGÍA PARA LA REALIZACIÓN DEL ESTUDIO.....	56
III.4.2. OBTENCIÓN DE LOS ESPECTROS DE FLUORESCENCIA.....	56
CAPÍTULO IV.....	58
RESULTADOS EXPERIMENTALES Y DISCUSIONES.....	58
IV.1. INFLUENCIA DE LAS VARIABLES EXPERIMENTALES EN LA SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE ORO POR ABLACIÓN LÁSER.....	58
IV.1.1. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE ESTABILIZANTE.....	58
IV.1.2. INFLUENCIA DE LA IRRADIANCIA.....	64
IV.1.3. INFLUENCIA DEL TIEMPO DE ABLACIÓN.....	72
IV.1.4. DEPENDENCIA DE LA LONGITUD DE ONDA DEL MÁXIMO DE ABSORBANCIA CON EL DIÁMETRO DE PARTÍCULA.....	77
IV.2. ESTUDIO DEL INTERCAMBIO DE ENERGÍA ENTRE NANOPARTÍCULAS DE ORO Y FLUORESCÉINA.....	80
IV.2.1. SÍNTESIS DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ORO UTILIZADAS.....	80
IV.2.2. DETERMINACIÓN DE LOS ESPECTROS DE FLUORESCENCIA DE LA FLUORESCÉINA.....	82

IV.2.3. EFECTO DE LA VARIACIÓN DE LA x_V DE NANOPARTÍCULAS PARA UNA MISMA CONCENTRACIÓN DE FLUORESCEÍNA.....	85
IV.2.4. EFECTO DE LA VARIACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE FLUORESCEÍNA PARA UNA MISMA x_V DE NANOPARTÍCULAS.....	100
CONCLUSIONES.....	105
BIBLIOGRAFÍA.....	107

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Copa de Licurgo (Roma, siglo IV D.C). Copa hecha con un vidrio dicroico que contiene oro coloidal, lo que hace que cambie de color verde a rojo cuando se hace pasar luz a través de ella. Este fenómeno es debido a la SPR de los coloides de oro.	14
Figura 2: Nanopartículas de oro adheridas a células cancerígenas y haciéndolas brillar.	15
Figura 3: Comparación de las bandas de conducción y de valencia en el estado sólido, de nanopartícula y atómico de un semiconductor (izquierda) y un metal (derecha). ..	18
Figura 4: Variación del color de las nanopartículas de oro en solución en función del incremento en el tamaño de la partícula.....	22
Figura 5: (Arriba) Gama de colores observada para soluciones de diferentes tamaños de nanopartículas de oro en luz transmitida. (Abajo) Las mismas soluciones pero ahora observadas con luz reflejada.	23
Figura 6: Estructuras de surfactantes usados comúnmente en bioquímica.....	25
Figura 7: Estructura de una micela formada por fosfolípidos en una solución acuosa. .	26
Figura 8: Imagen obtenida por SEM de un cráter producido por la ablación láser de una superficie de zirconio con 300 pulsos generados por un láser Excimer a 193nm.	30
Figura 9: Imagen obtenida por TEM de nanopartículas de hierro.....	33
Figura 10: Interacciones elásticas que presenta un haz de electrones al atravesar un átomo.....	34
Figura 11: Comparación entre los diversos tipos de microscopios. Óptico, TEM y SEM respectivamente.	35
Figura 12: Espectro de UV-visible de nanopartículas de plata (a) y oro (b) donde se observa el desplazamiento del máximo de absorbancia en función del tamaño de la partícula.....	38
Figura 13: Diagrama ilustrativo de la curva de absorción y de emisión de un determinado compuesto. La diferencia entre ambos máximos se conoce como el desplazamiento de Stokes.....	40

Figura 14: Estructura de la Fluoresceína.....	42
Figura 15: (Izquierda) Fluoresceína en polvo. (Derecha) Solución de Fluoresceína bajo luz ultravioleta.....	43
Figura 16: Montaje experimental para la ablación láser. Donde E es un espejo dicroico colocado a 45° y L es una lente utilizada para enfocar el haz directamente sobre la placa de oro.....	49
Figura 17: Espectro de absorción característico de las nanopartículas de oro obtenido con el OOI Base32.	52
Figura 18: Diagrama del equipo de Dispersión Dinámica de Luz.	53
Figura 19: Panel de control del programa de adquisición de datos mostrando una referencia medida.....	54
Figura 20: Panel de control del programa de procesamiento de datos mostrando una distribución de diámetros obtenida.	55
Figura 21: Elementos del equipo utilizado para la obtención de los espectros de fluorescencia. Espectrómetro (1), fibra óptica (2), base del LED (3), espejo cóncavo (4), case para el receptáculo de la muestra (5), colimador (6), cubeta de muestra (7).....	57
Figura 22: Variación del diámetro de partícula en función de la concentración de SDS en nanopartículas de oro sintetizadas a 0,14 GW/cm ² y a distintos tiempos de ablación. .	61
Figura 23: Comparación de los espectros de absorción de nanopartículas de oro sintetizadas a 0,14 GW/cm ² , estabilizadas con soluciones de SDS de distintas concentraciones para distintos tiempos de ablación.	63
Figura 24: Variación del diámetro de partícula en función de la irradiancia en nanopartículas de oro para tiempos de ablación de 16 y 26 min.....	66
Figura 25: Comparación de los espectros de absorción de nanopartículas de oro sintetizadas a diferentes valores de irradiancia para tiempos de ablación de 16 y 26 min.	68
Figura 26: Variación del diámetro de partícula y del ancho de la distribución de tamaños en función de la irradiancia en nanopartículas de oro sintetizadas por duplicado para un tiempo de ablación de 26 min. Muestras sin promediar (arriba) y promediadas (abajo).70	

Figura 27: Comparación de las distribuciones de tamaño de nanopartículas de oro sintetizadas a diferentes valores de irradiancia para un tiempo de ablación de 26 min.	71
Figura 28: Comparación de los espectros de absorción de nanopartículas de oro sintetizadas a diferentes valores de irradiancia para un tiempo de ablación de 26 min.	72
Figura 29: Variación del diámetro en función del tiempo de ablación en nanopartículas de oro sintetizadas a $0,84 \text{ GW/cm}^2$.	74
Figura 30: Comparación de las distribuciones de tamaño de nanopartículas de oro sintetizadas a $0,84 \text{ GW/cm}^2$ para distintos tiempos de ablación.	75
Figura 31: Comparación de los espectros de absorción de nanopartículas de oro sintetizadas a $0,84 \text{ GW/cm}^2$ para distintos tiempos de ablación.	76
Figura 32: Micrográficas obtenidas por TEM de muestras de nanopartículas de oro sintetizadas por ablación láser a tiempos de ablación de 2 min (izquierda) y 5 min (derecha).	77
Figura 33: Variación de la longitud de onda del máximo de absorbancia en función del diámetro de partícula en nanopartículas de oro sintetizadas a distintos tiempos de ablación.	78
Figura 34: Muestras de nanopartículas de oro mostrando coloraciones de diferentes intensidades.	80
Figura 35: Comparación de los espectros de absorción de nanopartículas de oro sintetizadas a $0,80$ y $1,12 \text{ GW/cm}^2$ para tiempos de ablación de 2 y 16 min.	81
Figura 36: Comparación de las distribuciones de tamaño de nanopartículas de oro sintetizadas 8033 y 11165 GW/m^2 para tiempos de ablación de 2 y 16 min.	82
Figura 37: Variación de la intensidad máxima de fluorescencia en función de la concentración de Fluoresceína en soluciones Fluoresceína-SDS- H_2O .	83
Figura 38: Comparación de los espectros de fluorescencia de soluciones de Fluoresceína-SDS- H_2O con diferentes concentraciones de fluoresceína.	84
Figura 39: Comparación de los espectros de fluorescencia y absorción de una solución de Fluoresceína-SDS- H_2O .	85

Figura 40: Variación de los espectros de fluorescencia en función de la X_v de nanopartículas de oro en muestras nanopartículas-Fluoresceína-SDS.....	87
Figura 41: Variación de la $I_{m\acute{a}x}$ de fluorescencia en función de la X_v de nanopartículas de oro en muestras nanopartículas-Fluoresceína-SDS.....	88
Figura 42: Comparación de la variación de la $I_{m\acute{a}x}$ de fluorescencia en función de la X_v de nanopartículas de oro en muestras nanopartículas-Fluoresceína-SDS.....	89
Figura 43: Efectos de una partícula metálica en las transiciones de un fluoróforo y la dependencia de cada uno con la distancia metal-fluoróforo.....	91
Figura 44: Gráfica de Stern-Volmer de la variación de F_0/F para una X_v de Fluoresceína de 0,75 en función de la X_v de nanopartículas de oro en muestras nanopartículas-Fluoresceína-SDS.....	94
Figura 45: Posible complejo formado entre las nanopartículas de oro y la fluoresceína en un medio de SDS.....	95
Figura 46: Variación del diámetro de partícula en función de la X_v de nanopartículas de oro en muestras nanopartículas-Fluoresceína-SDS.....	96
Figura 47: Solapamiento entre la emisión de la Fluoresceína y la absorbancia de las muestras de nanopartículas de oro utilizadas.....	98
Figura 48: Variación de $\square I_{m\acute{a}x}$ en función del diámetro promedio de las nanopartículas de oro, para una X_v de nanopartículas de 0,25, en muestras nanopartículas-Fluoresceína-SDS.....	99
Figura 49: Variación de los espectros de fluorescencia en función de la concentración de Fluoresceína en muestras nanopartículas-Fluoresceína-H ₂ O.....	101
Figura 50: Variación de la $I_{m\acute{a}x}$ de fluorescencia en función de la concentración de Fluoresceína en muestras nanopartículas-Fluoresceína-H ₂ O.....	102
Figura 51: Comparación de la variación de la $I_{m\acute{a}x}$ de fluorescencia en función de la concentración de Fluoresceína en muestras nanopartículas-Fluoresceína-H ₂ O.....	103
Figura 52: Comparación de la variación de la $\square I_{m\acute{a}x}$ de fluorescencia en función de la concentración de Fluoresceína en muestras nanopartículas-Fluoresceína-H ₂ O.....	103

Figura 53: Variación del diámetro de partícula en función de la concentración de
Fluoresceína en muestras nanopartículas-Fluoresceína-H₂O. 104

INTRODUCCIÓN

La nanotecnología se refiere a la rama de la ciencia y la ingeniería dedicada al diseño, producción, y utilización de estructuras, dispositivos y sistemas que posean una o más dimensiones del orden de 100 nanómetros (100×10^{-9} m) o menos.

Muchas de las aplicaciones de la nanotecnología implican la creación de nuevos materiales que tienen propiedades muy diferentes y nuevos efectos en comparación con los mismos materiales hechos en tamaños más grandes. Esto se debe a la elevada proporción de superficie a volumen de las nanopartículas en comparación con las partículas más grandes, y con los efectos que aparecen en pequeña escala, pero que no son observados a escalas mayores.¹

Las aplicaciones de la nanotecnología pueden ser muy beneficiosas y tienen el potencial de lograr un impacto significativo en la sociedad. En la biología y la medicina, una mayor comprensión del funcionamiento de las moléculas y del origen de las enfermedades a nanoescala ha conducido a mejoras en el diseño y acción de drogas. Por ejemplo las nanopartículas de oro se utilizan para detectar células cancerígenas. Se están elaborando también nanomateriales para aplicaciones instrumentales y analíticas, incluyendo la ingeniería de tejidos y de imágenes.²

El constante impulso hacia la miniaturización en la ingeniería electrónica ha llevado a desarrollar dispositivos y componentes que están dentro del rango nanométrico. Los dispositivos de almacenamiento de datos basados en nanoestructuras proporcionan sistemas más pequeños, más rápidos y con menor consumo.³

En términos conceptuales, una nanopartícula es una nanoestructura amorfa o semicristalina, con al menos una dimensión entre 10 y 100 nm y una dispersión de

tamaño relativamente larga ($> 15\%$). “Nano” viene de la palabra griega “nanos”, que significa enano o extremadamente pequeño.⁴

Particularmente, en la antigua Roma fueron utilizadas nanopartículas de oro para colorear vidrios de intensos colores como amarillo y rojo.



Figura 1: Copa de Licurgo (Roma, siglo IV D.C). Copa hecha con un vidrio dicróico que contiene oro coloidal, lo que hace que cambie de color verde a rojo cuando se hace pasar luz a través de ella. Este fenómeno es debido a la SPR de los coloides de oro.

Una de las características más importantes de las nanopartículas de oro es que presentan resonancia de plasmón superficial (SPR). Ésta característica permite su uso en diferentes aplicaciones como marcadores biológicos y además debido a la sensibilidad del plasmón superficial a dieléctricos locales pueden ser usadas como biosensores, ya que pueden ser monitoreadas a través de microscopios ópticos y su máximo de resonancia se desplaza a medida que se adhieren bio-moléculas a la superficie de la nanopartícula, lo cual se puede observar en el espectro de UV-visible. Además también pueden ser incluidas en la fabricación de tintas y píxeles para LCDs y LEDs, debido a la alta emisión que presentan y que ésta puede ajustarse en un amplio

rango de longitudes de onda. También se está desarrollando su uso para SERS (Surface Enhanced Raman Spectroscopy).

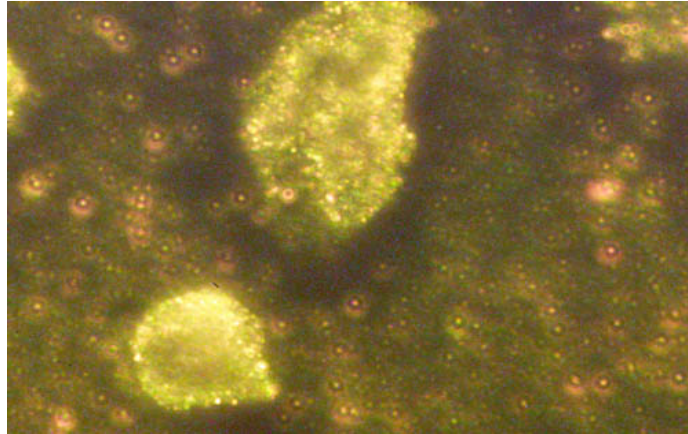


Figura 2: Nanopartículas de oro adheridas a células cancerígenas y haciéndolas brillar.

Gracias a las características únicas de las nanopartículas metálicas y específicamente las que presentan SPR, éstas son capaces de interactuar con otras moléculas que estén en contacto con ellas y modificar ciertas propiedades en dichas moléculas, como por ejemplo la fluorescencia de un fluoróforo.

Debido al potencial uso de la fluorescencia en diversas áreas como por ejemplo la detección de anticuerpos y antígenos, es de gran importancia en la actualidad el desarrollo de técnicas que permitan aumentar mucho más la sensibilidad en la detección, una forma de hacer esto es a través del incremento (enhancement) o disminución (quenching) de la fluorescencia por efecto de un metal (oro o plata).

Actualmente existen diversos métodos tanto físicos como químicos para la síntesis de nanopartículas. La técnica de generación de nanopartículas por ablación láser, constituye un método físico comúnmente usado en la actualidad para generar nanopartículas de oro. Básicamente la técnica consiste en usar un láser pulsado para irradiar la superficie de una placa de oro con un haz que suministre la energía necesaria para arrancar partículas de material metálico de diferentes tamaños de dicha superficie.

La caracterización de las nanopartículas generadas es necesaria para establecer un entendimiento y control de la síntesis y de las aplicaciones de las mismas. Hoy en día la caracterización se hace usando una variedad de técnicas que se encuentran disponibles. Entre las más comunes se encuentran la microscopía electrónica (TEM, SEM), microscopía de fuerza atómica (AFM), dispersión dinámica de luz (DLS), espectroscopia de fotoelectrón de rayos X (XPS), difracción de polvo de rayos X (XRD), espectroscopia de infrarrojo de transformadas de Fourier (FTIR) y espectroscopia de UV-visible.

CAPÍTULO I

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

I.1. CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS DE LAS NANOPARTÍCULAS.

Las nanopartículas a menudo tienen singulares propiedades físicas y químicas. Por ejemplo, las propiedades electrónicas, ópticas y químicas de las nanopartículas pueden diferir en gran medida a las del conjunto macro. En la nanoescala, los materiales se comportan de forma muy diferente en comparación con las escalas mayores y todavía resulta complicado, en ciertos casos, predecir las propiedades físicas y químicas de las partículas de un tamaño tan pequeño.

Un material macizo debería tener propiedades físicas constantes sin importar su tamaño, pero a nano-escala este generalmente no es el caso. Las nanopartículas son más grandes que los átomos individuales y moléculas pero son más pequeñas que el conjunto macro, por lo tanto tienen propiedades que difieren marcadamente de las esperadas.

Se pueden observar propiedades dependientes del tamaño, como por ejemplo, el confinamiento de Quantum en partículas semiconductoras, resonancia de plasmón de superficie en algunas partículas metálicas y superparamagnetismo en materiales magnéticos.

Hay dos grandes fenómenos responsables de estas peculiares características:

El primero es la alta dispersión de los sistemas nanocristalinos. A medida que el tamaño del cristal es reducido, el número de átomos en la superficie del cristal comparado con el número de átomos en el cristal mismo, se incrementa. Propiedades

que usualmente son determinadas por la estructura molecular del reticulado macro, ahora se ven marcadamente dominadas por la estructura de la superficie.

Las propiedades de los materiales cambian a medida que su tamaño se aproxima a la nano-escala y a medida que el porcentaje de átomos en la superficie del material se vuelven significante. Para materiales macizos más grandes que un micrómetro el porcentaje de átomos en la superficie es minúsculamente relativo al total de número de átomos del material.

El segundo fenómeno ocurre notablemente en metales y semiconductores. Es llamado cuantización de tamaño y surge porque el tamaño de una nanopartícula es comparable al de la longitud de onda de sus portadores de carga (electrones y huecos). Debido al confinamiento espacial de los portadores de carga, el filo de las bandas de valencia y de conducción se divide en niveles electrónicos discretos y cuantizados. Estos niveles electrónicos son similares a aquellos en átomos y moléculas.

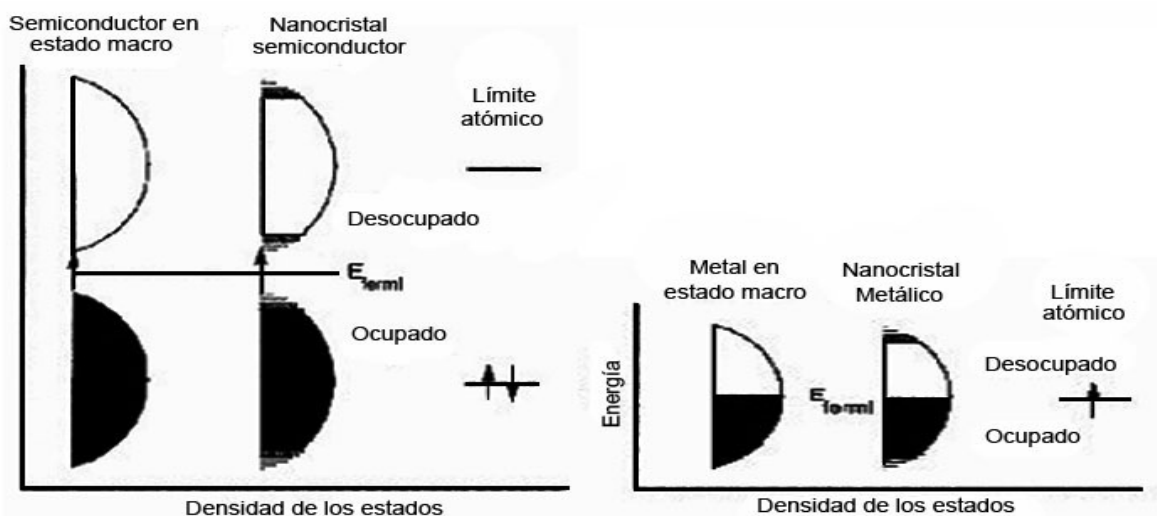


Figura 3: Comparación de las bandas de conducción y de valencia en el estado sólido, de nanopartícula y atómico de un semiconductor (izquierda) y un metal (derecha).

El espaciado de los niveles electrónicos y la brecha de banda (brecha de energía entre la banda de conducción y la banda de valencia) se incrementa a medida que decrece el tamaño de la partícula. Esto es porque los pares de electrones huecos están ahora mucho más cerca y juntos y las interacciones coulómbicas entre ellos ya no pueden ser despreciadas dando en general una mayor energía cinética.

Este incremento en la brecha de banda puede ser observado experimentalmente por el blue-shift (acortamiento de la longitud de onda de una señal transmitida y/o un incremento en su frecuencia)⁵ en el espectro de absorción o a veces incluso visualmente en el color de las muestras. Una brecha de banda más grande significa que más energía es requerida para excitar un electrón de la banda de valencia a la banda de conducción y por lo tanto sería absorbida luz de una frecuencia más alta y longitud de onda más baja.

El incremento en el coeficiente de absorptividad molar muestra que la fuerza del oscilador también se incrementa a medida que el tamaño de la partícula disminuye. Esto es debido al fuerte solapamiento de las funciones de onda de los portadores de carga confinados.⁶

Las nanopartículas exhiben un número de propiedades especiales relativas al conjunto macro. Por ejemplo, el doblamiento de cobre macizo (cable, anillo, etc) ocurre con movimiento de átomos/clústers de cobre que están en la escala de alrededor 50nm. Las nanopartículas de cobre menores a los 50 nm son consideradas materiales súper duros que no exhiben la misma maleabilidad y ductilidad que el cobre macizo. El cambio en las propiedades no siempre es deseado. Los materiales ferroeléctricos menores a los 10 nm pueden cambiar su dirección de la magnetización usando la energía térmica de la temperatura ambiente, volviéndolos así inútiles para el almacenamiento de memoria.

Las suspensiones de nanopartículas son posibles debido a que la interacción de la superficie de la partícula con el solvente es suficientemente fuerte como para sobrepasar las diferencias en densidad, las cuales generalmente causan que un material se hunda o flote en un líquido.

A menudo las nanopartículas tienen propiedades visibles inesperadas porque son lo suficientemente pequeñas como para confinar sus electrones y producir efectos de quantum. Por ejemplo las nanopartículas de oro pueden aparecer desde un color rojo intenso hasta amarillo en solución.

La alta proporción de área de superficie a volumen también reduce la temperatura de fusión incipiente de las nanopartículas.⁷

Los principales parámetros de las nanopartículas son su forma, tamaño, características de la superficie y la estructura interna. Las nanopartículas pueden ser encontradas en forma de aerosoles (sólidos o líquidos en el aire), suspensiones (sólidos en líquidos) o como emulsiones (líquidos en líquidos). En presencia de ciertas sustancias químicas, las propiedades de las nanopartículas pueden ser modificadas.

Las nanopartículas tienen diferentes formas de interactuar unas con otras. Pueden permanecer libres o agruparse dependiendo de las fuerzas de interacción atractoras o repulsivas entre ellas. Estas interacciones siguen siendo difíciles de caracterizar. Las nanopartículas suspendidas en gas tienden a agregarse unas a otras con más facilidad que en los líquidos.⁸

I.1.1. PROPIEDADES DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ORO.

Debido a las propiedades electrónicas y ópticas únicas de las nanopartículas de oro, éstas son objeto de numerosas investigaciones, con aplicaciones en una gran variedad de áreas, sobretodo en medicina, electrónica y nanotecnología.

Las nanopartículas de oro exhiben una fuerte absorción de ondas electromagnéticas en el rango visible, debido a la Resonancia de Plasmón Superficial (SPR). La SPR es causada debido a las oscilaciones colectivas de los electrones de conducción de las nanopartículas de oro (tamaño de partícula en el orden de un décimo de la longitud de onda de la luz incidente) durante la irradiación con luz visible.⁹ La longitud de onda del máximo de absorción depende de varios factores como el tamaño de la partícula, la constante dieléctrica del medio próximo y la distancia interpartícula.

La mayoría de las aplicaciones de las nanopartículas de oro como sensores están basadas en la detección de desplazamientos en el pico de SPR, ya sea debido a cambios en la constante dieléctrica local de las nanopartículas debido a bio-moléculas adsorbidas o debido a la aglomeración inducida de las nanopartículas por bio-moléculas.¹⁰

Una de las características de las nanopartículas de oro, y también de plata, es que ellas poseen un rango de colores bastante inusuales. El oro macizo tiene un familiar color amarillo, el cual es causado por una reducción en la reflectividad de la luz en el extremo azul del espectro. Sin embargo, si subdividimos el oro en partículas cada vez más y más pequeñas, llega un punto en el cual el tamaño de la partícula se vuelve más pequeño que el tamaño de la longitud de onda de la luz incidente.

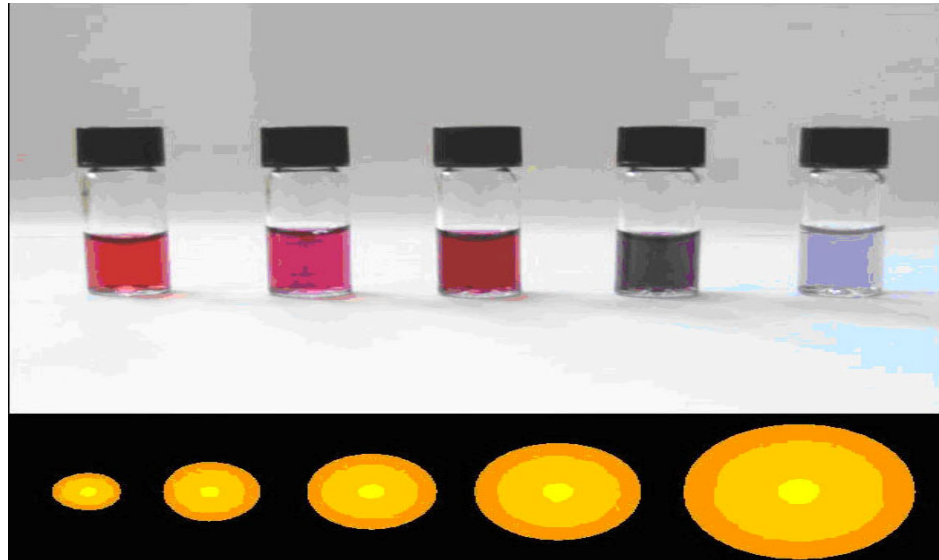


Figura 4: Variación del color de las nanopartículas de oro en solución en función del incremento en el tamaño de la partícula.

Esto genera la predominancia de nuevos modos de interacción del oro con la radiación, particularmente las interacciones que involucran oscilaciones electrónicas (plasmones superficiales). Cuando las partículas de oro son lo suficientemente pequeñas, tienen un color rojo rubí. Ésta coloración es debida a la fuerte absorción de la luz verde que poseen las nanopartículas de oro, correspondiente a la frecuencia a la cual una resonancia ocurre con el oro.

Muchos otros metales, aparte del oro y la plata, presentan este tipo de resonancia espectral selectiva también, pero en general la frecuencia de resonancia se encuentra fuera del rango visible (UV). Adicionalmente, el oro es uno de los pocos metales lo suficientemente noble como para sobrevivir como nanopartícula bajo condiciones atmosféricas.¹¹



Figura 5: (Arriba) Gama de colores observada para soluciones de diferentes tamaños de nanopartículas de oro en luz transmitida. (Abajo) Las mismas soluciones pero ahora observadas con luz reflejada.

Otra característica interesante de las nanopartículas de oro es la siguiente: El oro macizo funde a 1064 °C, por otro lado, el punto de fusión de una nanopartícula de oro puede ser tan bajo como 300 °C. Este fenómeno es el resultado del inmenso incremento en el área de superficie de las nanopartículas de oro. Sin embargo, se observa que tan pronto dos nanopartículas de oro fundidas se ponen en contacto, ellas se soldan una con otra y se fusionan. Esto causa el decrecimiento de su área de superficie y las hace solidificarse nuevamente.

I.2. ESTABILIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS.

Con el uso de los métodos de generación de nanopartículas que se disponen en la actualidad surgen problemas a la hora de querer controlar ciertos parámetros físicos como lo son la distribución de tamaños de las nanopartículas generadas y su estructura morfológica. Esto es debido en gran parte a la tendencia que tienen las nanopartículas a agregarse unas con otras para formar estructuras de mayor tamaño y más estabilidad.

Es por esto que es necesario el uso de reactivos que permitan minimizar estos efectos de aglomeración para realmente poder obtener nanopartículas estables en el tiempo.

Existen fundamentalmente dos formas de estabilizar las nanopartículas, estas son: Por interacción electrostática y por impedimento estérico.¹²

I.2.1 ESTABILIZACIÓN POR INTERACCIÓN ELECTROSTÁTICA.

Este tipo de estabilización se basa en las fuerzas de repulsión debidas al principio de exclusión de Pauli. El principio de la estabilización electrostática es el de la adsorción de iones sobre la superficie electrofílica del metal con el fin de generar una distribución de partículas cargadas positiva y negativamente denominada doble capa, ésta doble capa eléctrica origina fuerzas de repulsión coulómbicas entre las partículas individuales. Si el potencial eléctrico asociado con la doble capa es el adecuado, la repulsión electrostática generada evita la aglomeración de las nanopartículas.¹³ Por ejemplo este efecto es observado cuando se generan nanopartículas de oro usando HAuCl_4 y citrato de sodio con calentamiento, el citrato reduce el oro (III) y genera las partículas coloidales en solución, luego una capa de iones citratos presentes en la solución son absorbidas en la superficie de las nanopartículas generando una doble capa, esto hace que al acercarse una partícula con otra se generen fuerzas de repulsión coulómbicas que las mantienen separadas unas de otras.¹⁴

I.2.2. ESTABILIZACIÓN POR IMPEDIMENTO ESTÉRICO.

Este método para la estabilización de nanopartículas se basa en el uso de materiales denominados surfactantes para generar impedimentos estéricos que eviten la aglomeración de las nanopartículas. Los surfactantes son agentes capaces de reducir la tensión superficial de un líquido facilitando su propagación y disminuyendo la tensión

interfacial entre dos líquidos. Generalmente están compuestos por una porción hidrofóbica, usualmente una larga cadena alquílica, unida a grupos funcionales hidrofílicos o que favorecen su solubilidad en agua.

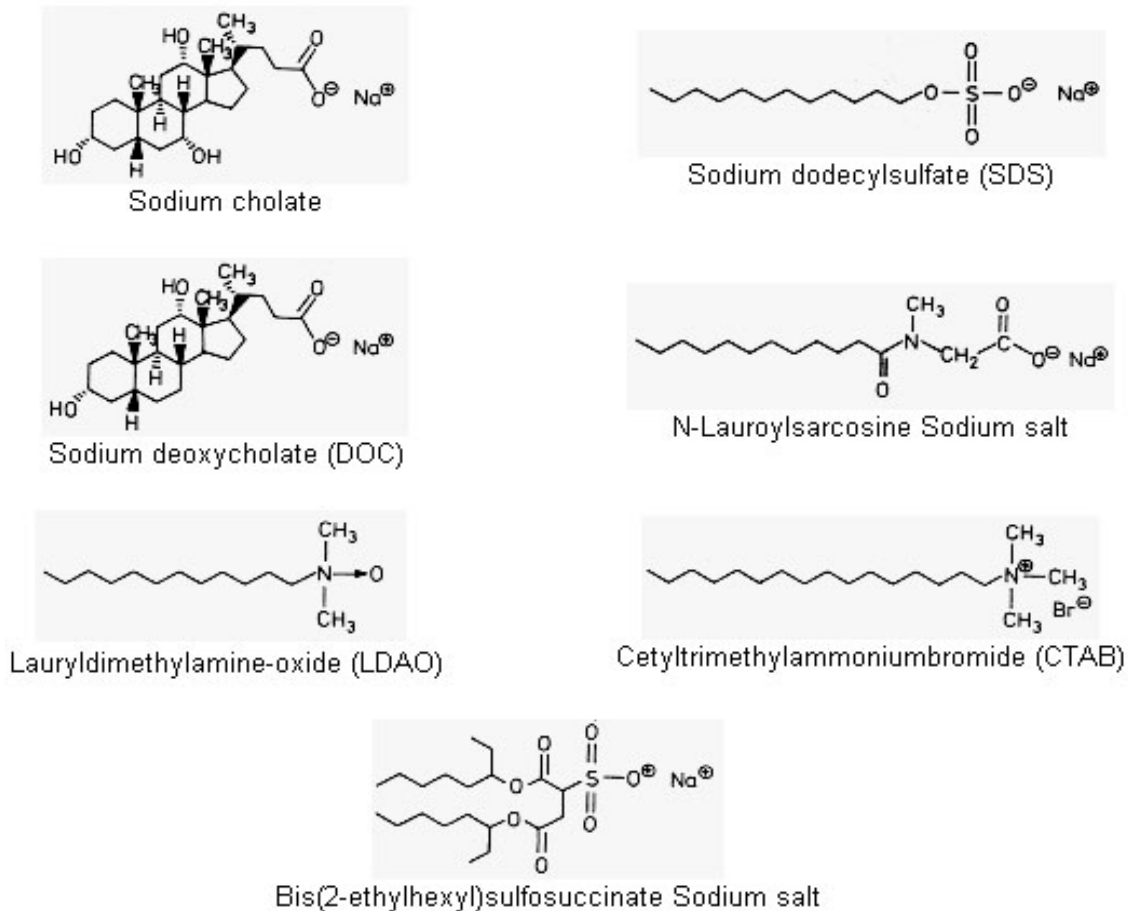


Figura 6: Estructuras de surfactantes usados comúnmente en bioquímica.

Todos los surfactantes poseen la propiedad común de reducir la tensión superficial del agua cuando son agregados en pequeñas cantidades. Una vez en solución los surfactantes saturan la fase acuosa y comienzan a ensamblarse en agregados coloidales llamados micelas. La dimensión y tamaño de las micelas formadas dependen de la estructura del surfactante y del ambiente físico-químico. La

concentración a la cual un surfactante comienza a formar micelas es conocida como la concentración micelar crítica (CMC).¹⁵ Las moléculas individuales de surfactante que están en el sistema pero no forman parte de una micela son llamadas monómeros. En agua, las “cabezas” hidrofílicas de las moléculas de surfactante están siempre en contacto con el solvente, independientemente de que el surfactante exista como monómero o como parte de una micela. Sin embargo las “colas” lipofílicas de las moléculas de surfactante tienen menos contacto con el agua cuando forman parte de una micela, esta es la base para la conducción energética que lleva a la formación de micelas. En una micela, las colas hidrofóbicas de varias moléculas de surfactante se ensamblan en una estructura de núcleo lipofílico, de manera que éste núcleo no tenga contacto con el agua, como se observa en la figura 7, generando así una estructura más estable.¹⁶

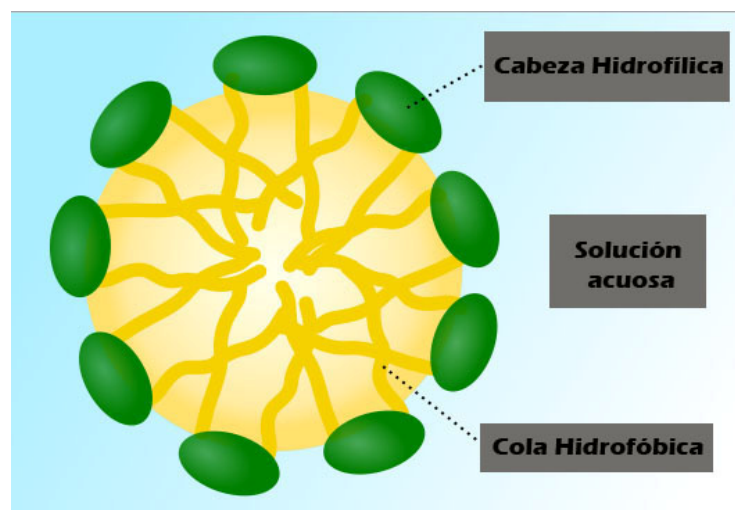


Figura 7: Estructura de una micela formada por fosfolípidos en una solución acuosa.

La forma en que las micelas evitan la agregación de las nanopartículas es la siguiente: al momento de la formación de las nanopartículas en una solución con surfactante, éstas quedan atrapadas en el núcleo de la micela, la micela entonces se convierte en una especie de escudo protector que impide la interacción entre las

nanopartículas para formar agregados más grandes. Por lo tanto a mayor concentración de surfactante en la solución se obtendrá una menor distribución de tamaños de nanopartículas.

I.3. FUNDAMENTOS TEÓRICOS DE LA ABLACIÓN LÁSER.

La ablación láser es el proceso de remover material de una superficie sólida (u ocasionalmente líquida) irradiándola con un láser. A un bajo flujo del láser, el material es calentado por la energía absorbida del láser y entonces se evapora o sublima. A un alto flujo de láser, el material es típicamente convertido en un plasma. Usualmente, la ablación láser se refiere a remover material con un láser pulsado, pero es posible remover por ablación con un láser de onda continua si la intensidad es lo suficientemente alta.

La profundidad sobre la cual la energía del láser es absorbida y además la cantidad de material removido por un pulso del láser, depende de las propiedades ópticas del material y de la longitud de onda del láser.¹⁷

Los pulsos del láser pueden variar entre un amplio rango de duración (milisegundos a femtosegundos) y flujos, y esto puede ser controlado con precisión. Esto hace a la ablación láser una técnica muy valiosa tanto para investigaciones como para aplicaciones industriales.

La interacción del láser con el material involucra el acoplamiento de la energía óptica que resulta en una combinación de los siguientes procesos: vaporización, eyección de átomos, formación de iones, especies moleculares y fragmentos sólidos o líquidos, ondas de choque, formación y expansión de un plasma. Considerando el amplio conjunto de procesos y fenómenos están involucrados en la ablación láser, se justifica que no existan hasta los momentos modelos que describan el proceso

completo. Sin embargo hay modelos parciales que describen de forma separada algunos de los procesos involucrados.

La irradiancia del láser (densidad de potencia) se define como la energía de radiación electromagnética cedida sobre una superficie por unidad de tiempo y por unidad de área (W/cm^2). Considerando la magnitud de la irradiancia se reconocen al menos dos procesos: la vaporización y la ablación. Las propiedades termo-ópticas del material son los parámetros críticos que influyen sobre estos procesos. La vaporización se presenta como el proceso dominante en la remoción del material de la superficie cuando la duración del pulso del láser es del orden de microsegundos y la irradiancia menor de $1 GW/cm^2$. La velocidad de relajación radiativa es del orden de $0,1 ps$, lo que implica que la energía óptica es convertida rápidamente en calor. La disipación de calor y la vaporización son fenómenos rápidos en comparación al tiempo del pulso del láser (tiempo en que se le irradia energía a la muestra). Las propiedades térmicas y ópticas de la muestra van a determinar la cantidad de material removido durante el pulso del láser. Las propiedades ópticas (absorción y reflexión) determinan la fracción de energía incidente que es absorbida y la penetración del haz dentro de la muestra. Diferencias importantes en la velocidad de calentamiento y enfriamiento se observaran dependiendo de la difusividad térmica del material. Aunque esta interacción se define como vaporización, la energía es suministrada a la muestra en un tiempo muy corto y de forma localizada, por lo que los modelos termodinámicos no describen de forma completa esta interacción. Por otra parte, las propiedades ópticas y térmicas de la muestra varían durante la duración del pulso del láser, complicando aún más la predicción de la cantidad de energía acoplada con la muestra y la cantidad de material removido. Sin embargo, la interacción es predominantemente térmica. La fusión es común y la vaporización fraccionada está presente, es decir los elementos o componentes de mayor presión de vapor se encuentran en mayor proporción en el vapor que en el sólido.

La ablación se produce con irradiancias cercanas a 1 GW/cm^2 o superiores y pulsos de nanosegundos o menores. En estos casos se observa claramente la explosión del material de la zona irradiada, originando la formación de un cráter. La temperatura de la superficie es instantáneamente elevada sobrepasando su temperatura de vaporización a través de la absorción de uno a varios fotones y de otros procesos no definidos. Los procesos de disipación de energía a través de la superficie son relativamente lentos comparados con la velocidad a la cual se transmite la energía de excitación a la muestra. Antes de que se pueda vaporizar, capas de material más internas han alcanzado su temperatura de vaporización. La temperatura y presión de estas capas internas superan los valores críticos causando una explosión. Se calcula que esta presión puede ser de orden de 10^6 atm . Esta interacción explosiva se describe como no térmica y en algunos casos no se observan restos del material fundido alrededor del cráter. Es decir, la fusión no es un mecanismo o proceso importante, por lo que la vaporización fraccionada debe ser despreciable. Durante la interacción se genera un plasma con temperaturas superiores a 10^4 K , el transporte de calor radiactivo establecerá la interacción plasma-superficie. Este plasma tiene un tiempo de vida de algunos microsegundos, el cual es considerablemente mayor que el tiempo de duración del pulso del láser. En ese tiempo que domina la interacción plasma-superficie, se presenta la vaporización fraccionada. ¹⁸

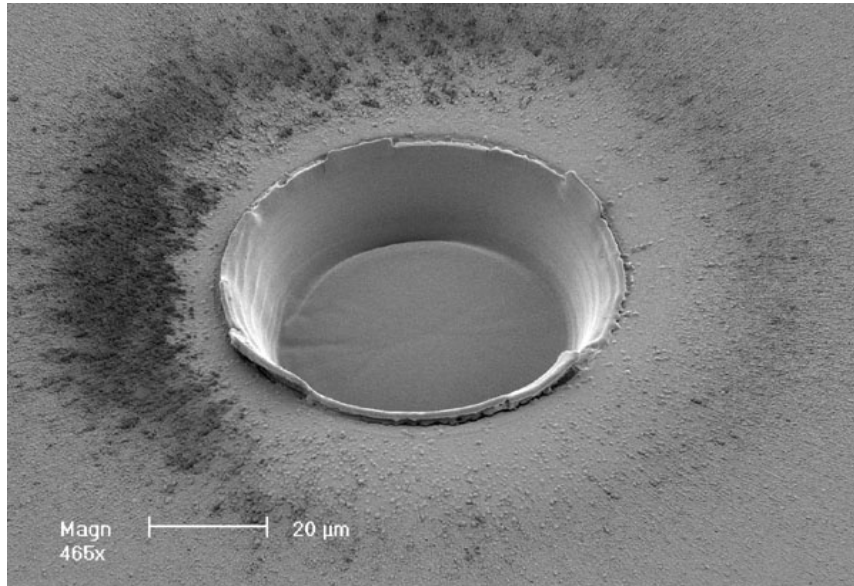


Figura 8: Imagen obtenida por SEM de un cráter producido por la ablación láser de una superficie de zirconio con 300 pulsos generados por un láser Excimer a 193nm.

I.3.1. LÁSER DE ND:YAG O EXCIMER.

El Nd:YAG (granate de itrio y aluminio dopado con neodimio; $\text{Nd:Y}_3\text{Al}_5\text{O}_{12}$) es un cristal que es usado como medio activo para láseres de estado sólido. Un agente dopante es un elemento de impureza añadido al reticulado de un cristal o semiconductor en bajas concentraciones para alterar sus propiedades ópticas y eléctricas. El neodimio dopante y triplemente ionizado generalmente reemplaza al itrio en la estructura cristalina del granate de itrio y aluminio, ya que son de un tamaño similar. Generalmente el huésped cristalino es dopado con aproximadamente 1% de su peso de neodimio.

Actualmente la mayoría de los experimentos de ablación láser son hechos con láseres del tipo Nd:YAG o Excimer. Los láseres de estado sólido Nd:YAG han sido ampliamente utilizados, debido a su relativo bajo costo, poco mantenimiento requerido y que además pueden ser fácilmente incorporados en pequeños sistemas comerciales.

El fenómeno de la ablación es afectado por la longitud de onda del láser utilizado. En general, mientras más corta sea la longitud de onda, mayor será la velocidad de ablación y menor el fraccionamiento. Para los láseres de Nd:YAG, la longitud de onda fundamental está ubicada en el infrarrojo cercano a 1064nm. Las frecuencias ópticas duplicadas, triplicadas, cuadruplicadas y quintuplicadas ($\lambda = 532, 355, 266$ y 213nm respectivamente) de los láseres de Nd:YAG también han sido empleadas para el análisis químico por ablación. Las longitudes de onda cortas ofrecen alta energía fotónica para una eficiente ruptura de enlaces e ionización de la muestra sólida.¹⁹ Si la energía fotónica es mayor que la energía de enlace entre átomos vecinos en la red cristalina, la radiación electromagnética del láser puede directamente romper la red atómica, induciendo la eyección de iones y átomos sin el efecto de calentamiento.

Mayor cantidad de masa puede ser removida por unidad de energía utilizando láseres con pulsos de femtosegundos. Además de la longitud de onda y la duración del pulso, el perfil espacial de energía del haz del láser tiene una marcada influencia en la cantidad de masa removida. Láseres de estado sólido de Nd:YAG usualmente tienen un perfil aproximadamente gaussiano, el cual puede ser fácilmente enfocado en una pequeña área de la superficie de la muestra.

En 1998, M. F. Becker y colaboradores sintetizaron nanopartículas de oro, plata, hierro y níquel con un láser Excimer a 248 nm y con pulsos en nanosegundos. Encontraron que las nanopartículas de oro con diámetros mayores a 100 nm eran cúbicas, las del resto de los elementos eran esféricas independientemente del diámetro.²⁰

En 2002, Mafuné y colaboradores variaron la densidad de potencia a distintas concentraciones de estabilizante para observar su efecto sobre el tamaño de

nanopartículas de oro. Encontraron que a mayor densidad de potencia y mayor concentración de estabilizante el diámetro de partícula disminuye.²¹

I.4. CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS GENERADAS.

I.4.1. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.

Un microscopio electrónico es un tipo de microscopio que usa electrones para iluminar una muestra y crear una imagen ampliada, la interacción del haz de electrones con la muestra permite obtener información sobre su estructura, morfología y/o composición. Los microscopios electrónicos tienen un poder de resolución mucho más grande que los microscopios ópticos o “de luz” y pueden obtener ampliaciones de imagen mucho más grandes. Algunos microscopios electrónicos pueden magnificar muestras hasta 2 millones de veces su tamaño original, mientras que los mejores microscopios de luz están limitados a magnificaciones de máximo 2000 veces. Las limitaciones en la resolución tanto de los microscopios ópticos como de los microscopios electrónicos son determinadas por su longitud de onda. La mayor resolución y magnificación de los microscopios electrónicos es debido a que la longitud de onda de un electrón es mucho más pequeña que la de un fotón de luz.²²

Los microscopios electrónicos usan lentes electrostáticas y electromagnéticas para formar la imagen controlando el haz de electrones para enfocarlo a un plano específico relativo a la muestra en una manera similar como los microscopios de luz usan lentes de vidrio para enfocar la luz en o a través de una muestra para formar la imagen.

I.4.1.2. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (TEM).

La microscopía electrónica de transmisión (TEM) es una técnica de análisis microscópico en la cual un haz de electrones pasa a través de lentes electromagnéticos que enfocan los electrones en un haz muy delgado, este haz es transmitido a través de una muestra ultra delgada, interactuando con la muestra a mediada que pasa a través de ella. Una imagen es formada por los electrones transmitidos a través de la muestra, magnificada y enfocada por unos lentes y plasmada en una pantalla de imagen, generalmente una pantalla fluorescente o una capa de película fotográfica.

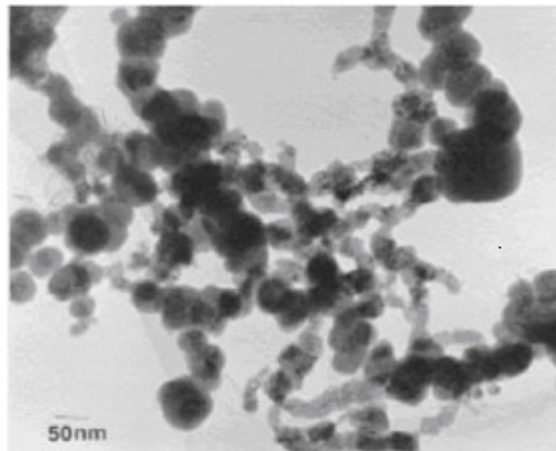


Figura 9: Imagen obtenida por TEM de nanopartículas de hierro.

Los electrones en un microscopio electrónico son usualmente generados por un proceso conocido como emisión termoiónica de un filamento, usualmente tungsteno, de la misma manera que un bombillo.²³ Los electrones son entonces acelerados por un potencial eléctrico (medido en voltios) y enfocado por lentes electrostáticos y electromagnéticos en la muestra. El haz interactúa de varias maneras con la muestra debido a las diferencias químicas o de densidad. El haz que es transmitido a través de la muestra, contiene información sobre estas diferencias y esta información en el haz de electrones es usada para formar una imagen de la muestra. Las interacciones que

tienen los electrones con la materia son 2: a) Interacciones elásticas: No hay energía transferida del electrón a la muestra. El electrón puede pasar sin tener ninguna interacción o son dispersados por el potencial positivo dentro de la nube electrónica. Este tipo de señales son principalmente explotadas en la TEM. b) Interacciones inelásticas: La energía es transferida desde los electrones incidentes hacia la muestra, donde electrones secundarios, fonones, UV quanta o catodoluminiscencia son producidos; el disparar afuera electrones del núcleo interno lleva a la emisión de rayos x o electrones auger. Estas señales son usadas en la microscopía electrónica analítica.

Una de las principales ventajas de un microscopio electrónico de transmisión es la posibilidad de obtener información en espacio real (modo de imagen) y espacio recíproco (modo de difracción) casi simultáneamente.²⁴

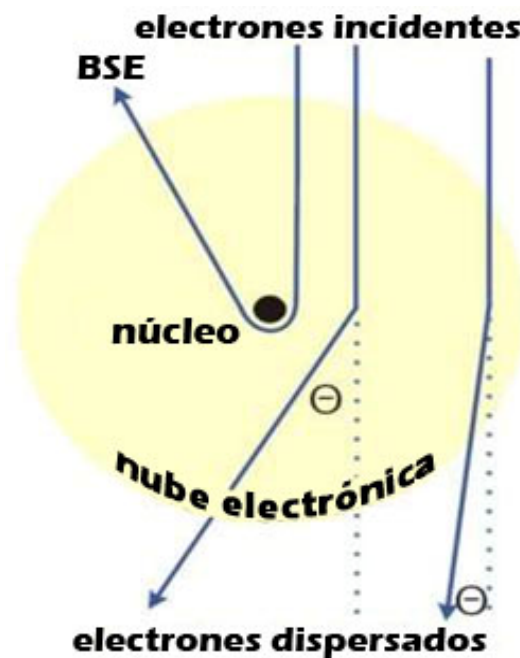


Figura 10: Interacciones elásticas que presenta un haz de electrones al atravesar un átomo.

La TEM es comúnmente usada en la metalurgia, ciencia de materiales y ciencias biológicas. En todos los casos las muestras deben ser muy delgadas y capaces de aguantar la alta succión presente dentro del instrumento.

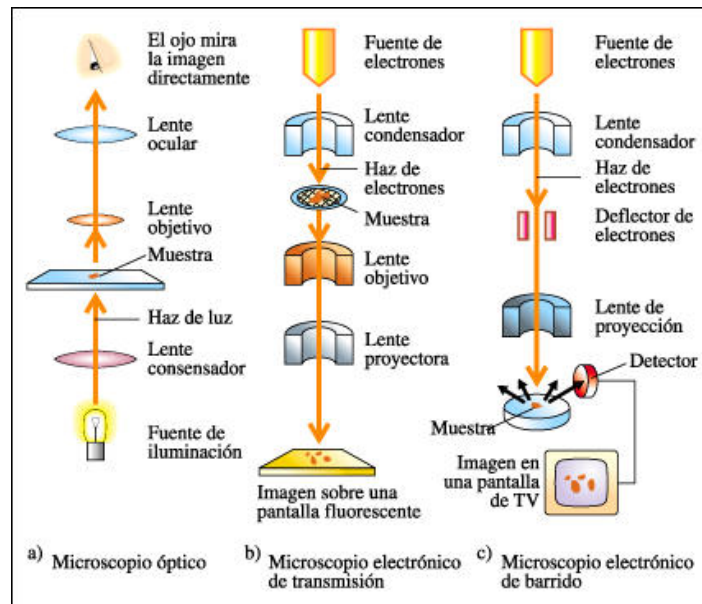


Figura 11: Comparación entre los diversos tipos de microscopios. Óptico, TEM y SEM respectivamente.

La microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM) es un modo de generación de imagen del microscopio electrónico de transmisión que permite la obtención de imágenes de la estructura cristalográfica de una muestra a escala atómica.²⁵ Debido a su gran resolución, es una herramienta invaluable para estudiar propiedades a nanoescala de materiales cristalinos, tales como semiconductores y metales.

Tanto la TEM como la HRTEM son herramientas indispensables a la hora de caracterizar las nanopartículas generadas ya que suministran información directa y visual sobre el tamaño, forma, dispersión, estructura y morfología de las partículas.

Existen algunos inconvenientes a la hora de utilizar la técnica de TEM. Muchos materiales requieren una preparación extensiva de la muestra para volverla lo suficientemente delgada como para ser transparente a los electrones, lo que hace al análisis por TEM un proceso relativamente consumidor de tiempo y de baja capacidad de procesamiento de muestra. La estructura de la muestra puede también ser alterada durante el proceso de preparación. Además el campo de visión es relativamente pequeño, aumentando la posibilidad de que la región analizada no sea característica de la muestra completa, es decir, no sea representativa. También existe la posibilidad de que la muestra sea dañada por el haz de electrones, particularmente en el caso de materiales biológicos.

I.4.2. ESPECTROSCOPIA DE UV-VISIBLE.

Para comprender el porqué del uso de la espectroscopia de UV-visible para la caracterización de nanopartículas metálicas es necesario entender primero los fenómenos sensibles a ésta técnica que están presentes en el sistema de nanopartículas.

Los plasmones superficiales son fluctuaciones en la densidad electrónica en la frontera de dos materiales, o un material y el medio que lo rodea. Los plasmones son las vibraciones colectivas de un gas de electrones (o plasma) que rodean la estructura reticular de un metal. Cuando los plasmones se unen con un fotón, la partícula generada es llamada polaritón. Este polaritón se propaga a lo largo de la superficie del metal, paralelamente a la interfase metal/dieléctrico, hasta que éste decae, ya sea por absorción, donde la energía es convertida en fonones, o por una transición radiativa a un fotón.

La excitación de los plasmones superficiales con luz es llamada resonancia de plasmón superficial (SPR), para el caso de superficies planares, o resonancia de

plasmón superficial localizada (LSPR), para el caso de estructuras metálicas nanométricas.

Éste fenómeno es la base de muchas herramientas estándar utilizadas para medir la absorción de material en las superficies metálicas planares (generalmente oro y plata) o en la superficie de nanopartículas metálicas.²⁶

El componente del campo eléctrico de la luz incidente interactúa con la densidad electrónica de cada partícula metálica, causando que la densidad electrónica colectiva comience a oscilar a una frecuencia que es resonante con la frecuencia de la luz incidente. La longitud de onda de absorción de la LSPR es sensible al tamaño, composición y forma de las nanopartículas, así como también de su orientación, espaciado y del ambiente dieléctrico.

Para el caso de las nanopartículas, las oscilaciones del plasmón superficial localizado son las responsables de los intensos colores observados en las soluciones de nanopartículas con resonancia de plasmón y también de la gran dispersión que presentan. Las nanopartículas de metales nobles muestran fuertes bandas de absorción en el visible que no están presentes en los espectros de sus equivalentes macro ni en los de los átomos individuales.²⁷

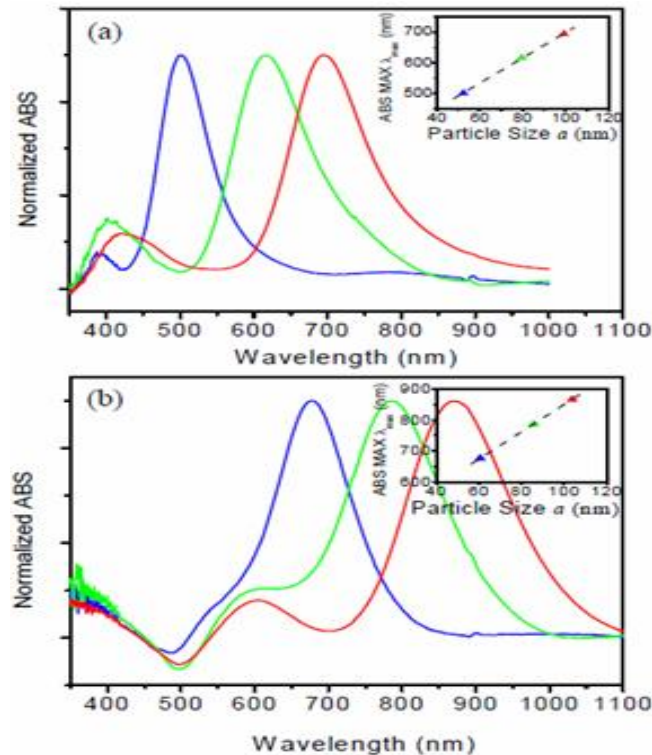


Figura 12: Espectro de UV-visible de nanopartículas de plata (a) y oro (b) donde se observa el desplazamiento del máximo de absorbancia en función del tamaño de la partícula.

I.4.3. DISPERSIÓN DINÁMICA DE LUZ O DINAMIC LIGHT SCATTERING (DLS).

Una de las técnicas empleadas para determinar el tamaño de partículas es la Dispersión Dinámica de Luz, la cual también se conoce como Espectroscopia de Correlación de Fotones. Al incidir un haz de luz monocromático, como un Láser por ejemplo, sobre una solución la cual contiene partículas que siguen un movimiento browniano, se produce un cambio en la dirección del haz incidente, esto ocurre gracias a la fluctuación de la constante dieléctrica en la solución, la cual provoca un cambio en el campo eléctrico del haz.

La dispersión del haz incidente se da en todas las direcciones, un detector es colocado a un ángulo θ respecto al haz incidente. Éste detector, que generalmente se

trata de un fotomultiplicador, recibe la radiación que sale dispersada a dicho ángulo de la solución y transforma esa radiación captada en una señal eléctrica. Esta señal eléctrica es llevada a un sistema de colección de datos (computador). El computador mediante una función de autocorrelación, relaciona la fluctuación del campo eléctrico con la fluctuación de la constante dieléctrica de la solución, esta medida se realiza en tiempo real por lo que se obtiene un rango amplio de intensidades dependientes del tiempo.

Las fluctuaciones de la constante dieléctrica son fluctuaciones no periódicas o aleatorias, una gráfica de esta propiedad fluctuante en función del tiempo, decae de forma exponencial. El tiempo relacionado a dicha relajación, se conoce como tiempo de decaimiento, y está relacionado con el Coeficiente de Difusión D de la solución y a su vez este coeficiente está relacionado mediante la ecuación de Stoke-Einstein con el tamaño de la partícula.²⁸

I.5. FLUORESCENCIA.

La fluorescencia es un tipo de luminiscencia (luz generada no solo por altas temperaturas) que aparece generalmente como un fenómeno óptico en cuerpos fríos, en los cuales la absorción molecular de un fotón induce la emisión de otro fotón con una longitud de onda más larga. La diferencia de energía entre los fotones absorbidos y emitidos se convierte finalmente en vibraciones moleculares o en calor. Usualmente el fotón absorbido está en el rango del UV y la luz emitida está en el rango visible, pero esto depende de la curva de absorbancia y el desplazamiento de Stokes del fluoróforo en particular.

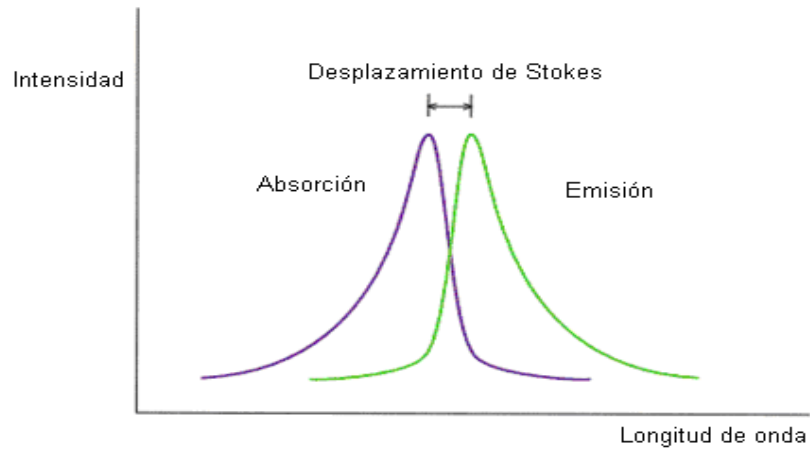
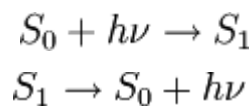


Figura 13: Diagrama ilustrativo de la curva de absorción y de emisión de un determinado compuesto. La diferencia entre ambos máximos se conoce como el desplazamiento de Stokes.

Un fluoróforo, es el componente de una molécula que hace que ésta sea fluorescente. En una molécula, se presenta como un grupo funcional capaz de absorber energía de una longitud de onda específica y emitirla a otra longitud de onda, también específica. Tanto la cantidad como la longitud de onda de la energía emitida dependen del fluoróforo y del ambiente químico que lo rodee.

La fluorescencia ocurre cuando una molécula pasa de un estado fundamental S_0 a un estado excitado S_1 y luego se relaja nuevamente a estados de menor energía hasta llegar al estado fundamental emitiendo la energía absorbida como se observa a continuación:



Donde $h\nu$ es un término genérico para la energía fotónica, en la cual h es la constante de Planck y ν es la frecuencia de la luz.

La fluorescencia persiste mientras se mantenga la estimulación por la radiación incidente.

Puede darse el caso que la molécula pase del estado excitado al fundamental mediante una relajación no radiativa, en la cual la energía es disipada como calor (vibraciones) al medio, y por lo tanto no se observa fluorescencia. La relajación hasta el estado fundamental también puede darse por interacción con una segunda molécula a través del quenching de fluorescencia.

En la fluorescencia, el rendimiento cuántico (Φ) expresa la eficiencia del proceso de fluorescencia. Está definido como la relación del número de fotones emitidos con respecto a los fotones absorbidos. El máximo rendimiento cuántico es 1 (100%), donde cada fotón absorbido se convierte en un fotón emitido.

$$\Phi = \frac{\text{\# de fotones emitidos}}{\text{\# de fotones absorbidos}}$$

El tiempo de vida de la fluorescencia se refiere al tiempo promedio en el cual la molécula permanece en el estado excitado antes de emitir un fotón. Se puede decir que generalmente la fluorescencia sigue una cinética de primer orden:

$$[S1] = [S1]_0 e^{-\Gamma t}$$

Donde $[S1]$ es la concentración de moléculas en el estado excitado a un tiempo t , $[S1]_0$ es la concentración inicial y Γ es la tasa de decaimiento o el inverso del tiempo de

vida de la fluorescencia. Este es un caso de decaimiento exponencial. Varios procesos radiativos y no radiativos pueden desalojar el estado excitado. En ese caso la tasa de decaimiento total (Γ_t) es la suma de todas las tasas:

$$\Gamma_t = \Gamma_r + \Gamma_{nr}$$

Donde Γ_t es la tasa de decaimiento total, Γ_r es la tasa de decaimiento radiativo y Γ_{nr} es la tasa de decaimiento no radiativo.²⁹

I.5.1. FLUORESCÉINA.

La fluoresceína es un fluoróforo comúnmente usado en microscopía, en algunos láseres de medio químico, en medicina forense y serología para detectar manchas latentes de sangre y también en el monitoreo químico de fluidos. La fluoresceína tiene un máximo de absorción alrededor de los 494 nm y un máximo de emisión alrededor de los 521 nm (en agua). Además posee un rendimiento cuántico de alrededor de 95%. La fluoresceína también es conocida como un aditivo colorante (amarillo No 7) y la disodiofluoresceína es conocida como amarillo No 8. Se caracteriza además por presentar una alta fluorescencia.

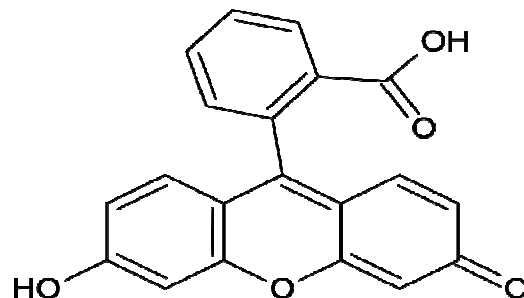


Figura 14: Estructura de la Fluoresceína.

En la biología celular el derivado isotiocianato de la fluoresceína es frecuentemente usado para marcar y monitorear células en aplicaciones de la microscopía de fluorescencia. Una gran cantidad de biomoléculas (como por ejemplo anticuerpos) pueden ser acoplados con la fluoresceína, permitiendo así el marcaje de proteínas específicas o estructuras celulares y mejorar la detección de ciertas enfermedades.

La disodiofluoresceína es ampliamente utilizada como herramienta de diagnóstico en el campo de la oftalmología y la optometría, en el cual la fluoresceína tópica es usada en el diagnóstico de abrasiones corneales, úlceras corneales e infecciones por herpes corneal.



Figura 15: (Izquierda) Fluoresceína en polvo. (Derecha) Solución de Fluoresceína bajo luz ultravioleta.

I.5.2. EFECTOS DE METALES EN LA FLUORESCENCIA.

Al igual que una antena radiante, un fluoróforo es un dipolo oscilante, pero que oscila a alta frecuencia e irradia a longitudes de onda cortas. Las superficies metálicas que estén cerca pueden responder al dipolo oscilante y modificar la tasa de emisión y la distribución espacial de la energía irradiada. El campo eléctrico sentido por un fluoróforo es afectado por interacciones de la luz incidente con la superficie metálica cercana y además por interacción del dipolo oscilante del fluoróforo con la superficie del metal.

Adicionalmente, los dipolos oscilantes de los fluoróforos inducen un campo en el metal. Estas interacciones pueden incrementar o disminuir el campo incidente en el fluoróforo e incrementar o disminuir la tasa de decaimiento radiativo (Γ_r).

A primera vista pareciera inusual el considerar usar superficies metálicas para incrementar la fluorescencia. Los metales son conocidos por inhibir rápidamente (quenching) la fluorescencia. Por ejemplo, superficies de plata de 50 Ångstroms de grosor son usadas en microscopía para inhibir por quenching la emisión de regiones cercanas al metal.³⁰ Ahora se sabe que los metales pueden también incrementar la fluorescencia por varios mecanismos. Las partículas del metal además parecen incrementar las tasas de decaimiento radiativo (Γ_r).³¹

Consideremos los posibles efectos de un metal. Si el metal genera un aumento en la tasa de excitación, esto generará un incremento en el brillo sin cambiar el rendimiento cuántico o el tiempo de vida (t). Este es un efecto útil que permitiría la disminución de la intensidad incidente. La excitación incrementada por el metal también puede generar la excitación selectiva de fluoróforos cerca del metal. Otro efecto posible es un incremento en la tasa de decaimiento radiativo. En este caso a medida que Γ_m se incrementa el rendimiento cuántico aumenta y el tiempo de vida disminuye.

Un decrecimiento en el tiempo de vida está generalmente asociado con un decrecimiento en el rendimiento cuántico. Sin embargo, esto es porque un decrecimiento en el tiempo de vida es debido usualmente a un incremento en Γ_{nr} . Cuando la tasa de decaimiento total aumenta el rendimiento cuántico aumenta. Este incremento ocurre porque una mayor cantidad de fluoróforos emiten antes de que puedan decaer a través de la vía no radiativa.

En 2007 Aslan, K. y colaboradores presentaron la primera observación de incremento de la fluorescencia por efecto de un metal (Metal-Enhanced Fluorescence, MEF) por efecto de coloides grandes de oro. Colocaron coloides de oro entre 40 y 200nm en un substrato de vidrio de manera homogénea y luego absorbieron en ellos moléculas de FITC-HSA. Observaron una intensidad de emisión 2.5 mayor que la observada cuando absorbieron las moléculas en substratos de vidrio solos, a 270°. Concluyeron que el efecto se debía a las transferencias de energía no radiativa entre los estados excitados del fluoróforo y los plasmones superficiales de los coloides de oro. Sus resultados sugirieron que los coloides de oro podrían ser usados para aplicaciones en MEF ya que ofrecen superficies más estables que las de plata, más comúnmente usadas.³²

Se sabe que la MEF se genera cuando se da el acoplamiento entre los plasmones superficiales de las nanoestructuras metálicas y moléculas fluoróforas, incrementando la intensidad de su luminiscencia, éste proceso promete tener utilidad en un amplio rango de aplicaciones que incluyen LEDs, tecnología de sensores, microarreglos y estudios de moléculas independientes. El proceso se vuelve más interesante al aplicarse a nanocristales coloidales semiconductores, los cuales poseen propiedades ópticas dependientes del tamaño, tienen alta estabilidad fotoquímica y se caracterizan por tener espectros de anchos de excitación y bandas estrechas de emisión.³³

En 2004, S. K. Gosh y colaboradores estudiaron la influencia de nanopartículas de oro de varios tamaños en el comportamiento de emisión del metilaminopireno. Encontraron que las moléculas de fluoróforo adsorbidas en la superficie de las partículas metálicas sufrían un fuerte quenching de fluorescencia y que además la eficiencia del quenching era dependiente del tamaño de la nanopartícula, por la influencia del área de superficie en las mismas.³⁴

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

II.1. OBJETIVO GENERAL.

Estudiar la transferencia de energía entre distintas soluciones de nanopartículas de oro sintetizadas por ablación láser en un medio estabilizante de SDS y soluciones de moléculas fluorescentes a distintas concentraciones.

II.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

Sintetizar nanopartículas de oro usando la técnica de generación por ablación láser en un medio estabilizante de SDS.

Variar parámetros como la concentración de estabilizante, irradiancia y tiempo de ablación para estudiar su efecto sobre la forma y distribución de tamaños de las nanopartículas obtenidas.

Caracterizar las nanopartículas obtenidas por espectroscopia de UV-visible, DLS y TEM.

Estudiar las interacciones entre las nanopartículas de oro generadas y soluciones de Fluoresceína de distintas concentraciones, a través de los cambios observados en los espectros de fluorescencia de la Fluoresceína.

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

III.1. MATERIALES UTILIZADOS.

III.1.1. SOLVENTES.

- Agua destilada y desionizada 18m Ω
- Etanol absoluto.

III.1.2. REACTIVOS.

- Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) 95%. Marca Scharlau.
- Disodiofluoresceína. PM = 412,31

III.1.3. EQUIPOS E INSTRUMENTAL.

- Láser Nd:YAG, modelo Surelite II, con pulsos de 8ns, frecuencia de 10 Hz, de longitud de onda variable: fundamental ($\lambda = 1064$ nm), segundo armónico ($\lambda = 532$ nm) y tercer armónico ($\lambda = 355$ nm).
- Espectrofotómetro Ocean Optics de UV-Visible. Modelo LS-I.
- Equipo de Dispersión Dinámica de Luz.
- Equipo de Fluorescencia. Rango de emisión del LED: (410 +/- 10) nm.
- Microscopio Electrónico de Transmisión.
- Medidor de energía. Marca Coherent, modelo FieldMax II.

III.1.3. OTROS MATERIALES.

- Espejos dielectricos para 1064nm.
- Lentes acromáticas.
- Placa de oro 99% de pureza.
- Celdas de cuarzo.
- Viales, pipetas pasteur, micropipetas y otros materiales de vidrio de laboratorio.

III.2. OBTENCIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE ORO POR ABLACIÓN LÁSER.

III.2.1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.

Para la estabilización de las nanopartículas de oro generadas por ablación láser se utilizó Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) como medio estabilizante. Se prepararon 500mL de una solución madre de SDS de concentración $4,5 \times 10^{-2} \text{M}$ en etanol-agua. Una vez preparada, la misma fue filtrada a través de un filtro millipore y posteriormente se realizaron diluciones a partir de esta para obtener soluciones de concentración $4,5 \times 10^{-3} \text{M}$, $4,5 \times 10^{-4} \text{M}$ y $4,5 \times 10^{-5} \text{M}$. Todo el material de vidrio fue lavado con etanol absoluto. Se debe evitar la presencia de polvo, sucio, pelos o cualquier otra partícula que pueda favorecer la agregación de las nanopartículas generadas dentro del vial de ablación.

Una vez decidido con que concentración de SDS se desea trabajar se procede a colocar la placa de oro en un vial limpio y seco. Luego se agrega el volumen deseado de SDS en el vial para realizar la ablación. Es recomendable utilizar de 4 a 5mL de SDS, ya que si se utiliza un volumen menor se corre el riesgo de que se sobrecaliente la solución, debido a la ablación láser sobre la placa de oro, y ésta comience a evaporarse generando espuma en la superficie, la cual interfiere con el camino óptico del láser hacia la placa de oro. Un mayor volumen de solución permite disipar mejor el calor generado. Este cuidado es necesario a altos valores de irradiancia.

III.2.2. MONTAJE EXPERIMENTAL.

Como ya se mencionó se utilizó un láser Nd:YAG, modelo Surelite II, todos los experimentos fueron realizados a la longitud de onda fundamental ($\lambda = 1064\text{nm}$).

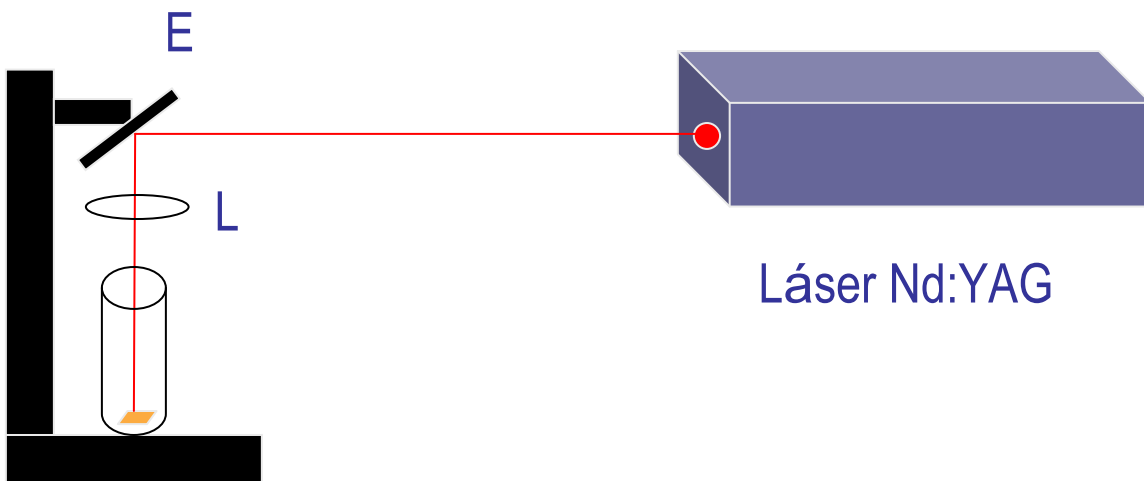


Figura 16: Montaje experimental para la ablación láser. Donde E es un espejo dicroico colocado a 45° y L es una lente utilizada para enfocar el haz directamente sobre la placa de oro.

El montaje utilizado es el que se muestra en la figura 16, allí se puede observar como el haz del láser incide sobre la placa de oro colocada dentro del vial de ablación.

III.2.3. DETERMINACIÓN DE LA IRRADIANCIA.

Una vez encendido el láser es necesario esperar un par de minutos a que se estabilice la energía del mismo, entonces se procede a medir la energía de cada pulso en el haz del láser con un medidor de energía. Luego se mide el spot del láser colocando un papel fotosensible justo en el lugar donde se está enfocando el haz para la ablación y disparando un pulso sobre este. Posteriormente se mide el diámetro de la impresión resultante en el papel.

Una vez conocida la energía promedio de cada pulso, la duración de cada pulso y el área del spot del láser, se puede conocer entonces la densidad de potencia o irradiancia que está incidiendo sobre la placa de oro utilizando la siguiente expresión:

$$I = \frac{E_{\text{prom}}}{t_{\text{pulso}} A_{\text{spot}}}$$

Donde I es la irradiancia que incide sobre la placa de oro (GW/cm^2), E_{prom} es la energía promedio de cada pulso (GJ), t_{pulso} es el tiempo de duración de cada pulso (s) y A_{spot} es el área del spot del láser (cm^2).

III.2.4. ABLACIÓN LÁSER SOBRE LA PLACA DE ORO.

Una vez determinada la irradiancia se procede colocar el vial con la placa de oro en la zona donde se encuentra enfocado el haz y se deja disparando el láser durante el tiempo deseado. El tiempo de ablación debe ser medido con un cronómetro. A medida que el láser incide sobre la placa de oro se comienza a observar el cambio de color de la solución de transparente a un rosado claro, indicando la presencia de nanopartículas en el medio.

Una vez finalizada la ablación se retira el vial y se trasvasa la solución con nanopartículas a un vial limpio y previamente rotulado. Por último, se lava el vial de ablación y la placa de oro con etanol para ser utilizados nuevamente.

III.3. CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ORO OBTENIDAS.

Una vez generadas las nanopartículas de oro, éstas fueron caracterizadas por espectroscopía de UV-Visible y Dispersión Dinámica de Luz. Adicionalmente, solo a algunas de las muestras se les caracterizó por Microscopía Electrónica de Transmisión.

III.3.1. ESPECTROSCOPIA UV-VISIBLE.

A través de la caracterización por espectroscopía de UV-Visible de las nanopartículas generadas, se obtuvieron los espectros de absorción de cada una de dichas soluciones de nanopartículas. Esto permitió observar, para cada muestra, la intensidad del máximo de absorbancia, la longitud de onda del máximo de absorbancia y la forma del espectro de absorción en sí. Todos estos datos proporcionan información cualitativa sobre la cantidad de nanopartículas generadas, la distribución de tamaños y posibles cambios en la morfología de las nanopartículas entre cada muestra.

El equipo utilizado fue un Espectrofotómetro Ocean Optics de UV-Visible, modelo LS-I y el programa utilizado para la adquisición de datos fue el OOI Base32, v2.0.1.4. Para realizar cada medición primero se debe tapar el camino óptico de la lámpara para tomar el negro, luego se coloca la celda con SDS de la misma concentración que el utilizado en la muestra que se desea medir, para tomar así el blanco, y luego se coloca la muestra y se guarda el espectro de absorción obtenido.

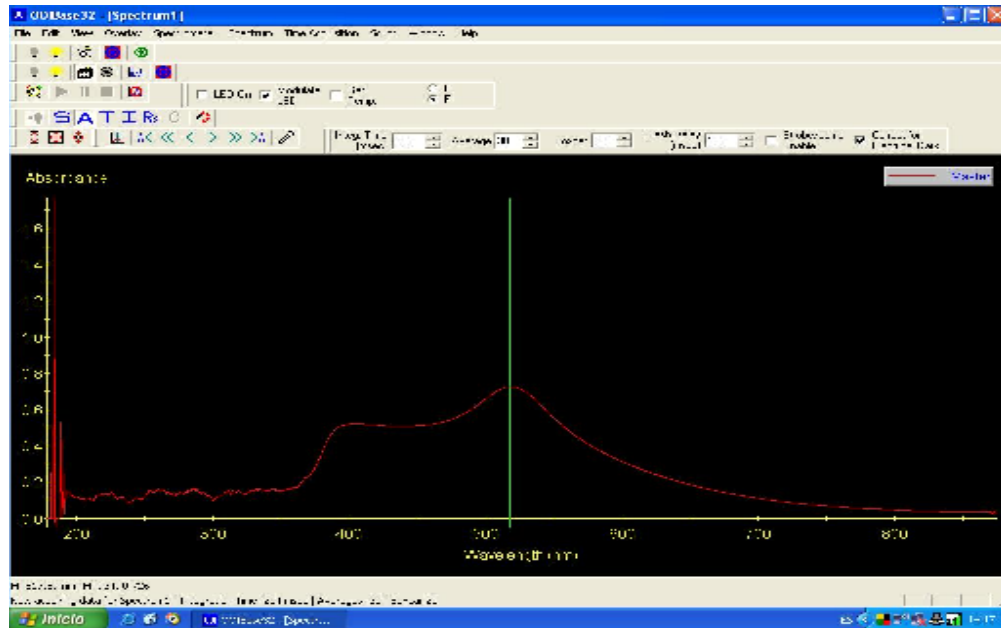


Figura 17: Espectro de absorción característico de las nanopartículas de oro obtenido con el OOI Base32.

III.3.2. DISPERSIÓN DINÁMICA DE LUZ (DLS).

Se utilizó un equipo de Dispersión Dinámica de Luz diseñado en el laboratorio de Química Láser de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela (figura 18). Este equipo permitió obtener una distribución de tamaños así como también el diámetro promedio de dicha distribución para cada una de las muestras de nanopartículas generadas.

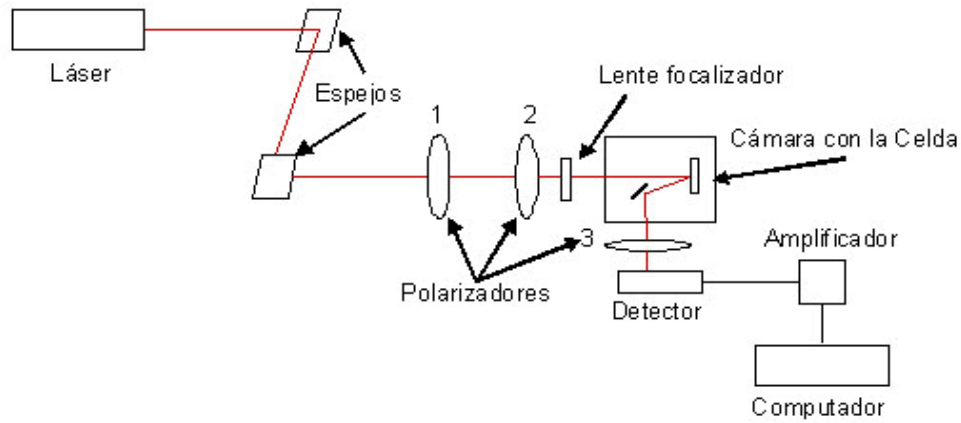


Figura 18: Diagrama del equipo de Dispersión Dinámica de Luz.

Para realizar la medición, una vez encendido el láser y el amplificador, se abre el programa de adquisición de datos (figura 19), antes que nada se debe medir primero la referencia colocando la misma celda donde se colocará la muestra, limpia y seca, dentro del equipo. Se enciende el detector y se toma la referencia. Una vez medida la referencia, se coloca la muestra deseada, se adquiere la medida y se guarda el archivo con la curva obtenida.

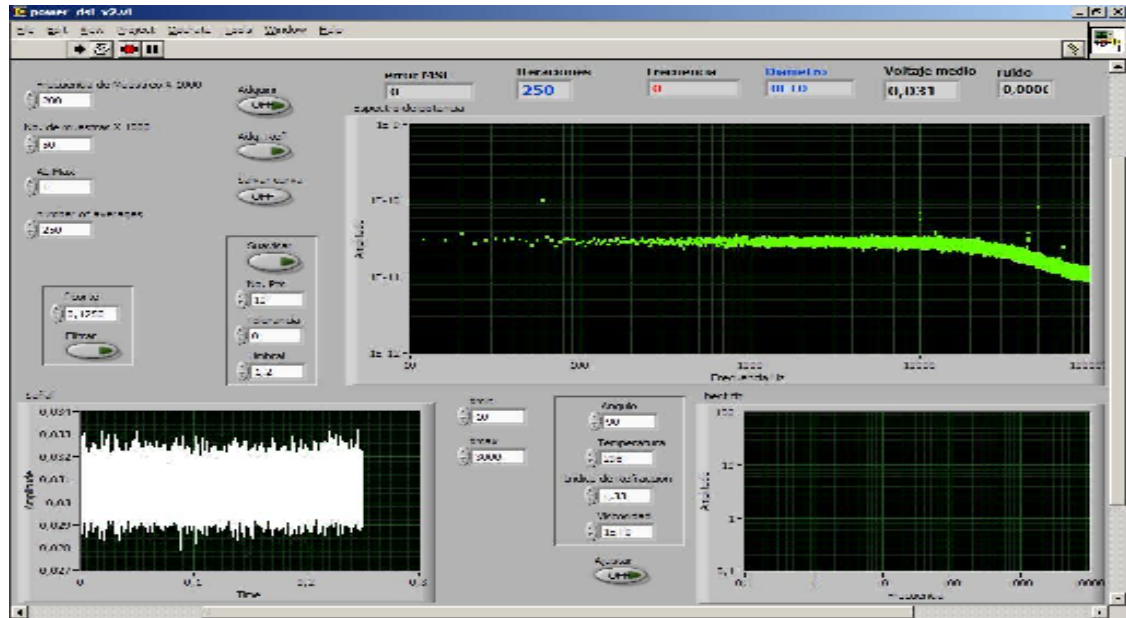


Figura 19: Panel de control del programa de adquisición de datos mostrando una referencia medida.

Luego se abre dicho archivo con el programa para el tratamiento de datos (figura 20), colocando los datos de las condiciones en las que se realizó la medida (ángulo utilizado, temperatura, índice de refracción del medio, viscosidad y longitud de onda del láser empleado) y se guarda el archivo de datos con la distribución de tamaños, el diámetro promedio y el ancho de la distribución. El programa de adquisición fue diseñado en LabView 8 y el programa para el tratamiento de las curvas obtenidas fue diseñado en Matlab R2006a.

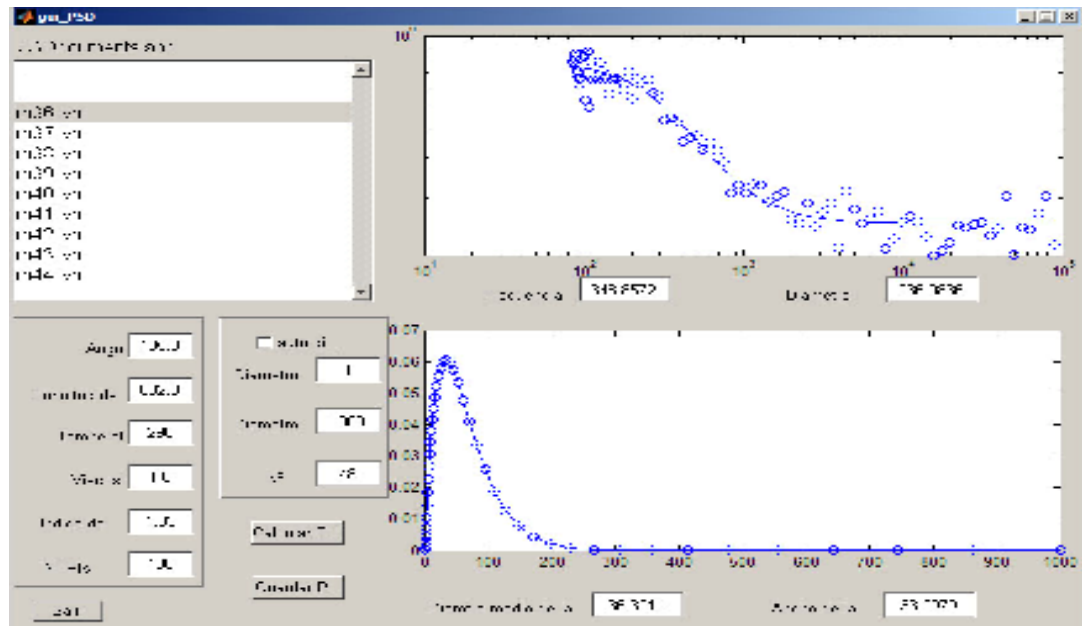


Figura 20: Panel de control del programa de procesamiento de datos mostrando una distribución de diámetros obtenida.

III.3.3. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN.

Algunas de las muestras fueron caracterizadas por Microscopía Electrónica de Transmisión en el Centro de Microscopía Electrónica de la Universidad Simón Bolívar. Las imágenes obtenidas por esta técnica permiten observar la morfología de las nanopartículas obtenidas y los posibles agregados que puedan estar formando.

III.4. ESTUDIO DE LA TRANSFERENCIA DE ENERGÍA ENTRE LAS NANOPARTÍCULAS DE ORO GENERADAS Y FLUORESCÉINA.

Una vez generadas varias soluciones de nanopartículas, de diferentes tamaños y con diferentes densidades de partículas, se procedió a realizar una serie de experimentos para observar como cambiaban los espectros de fluorescencia de la Fluoresceína.

III.4.1. METODOLOGÍA PARA LA REALIZACIÓN DEL ESTUDIO.

Primero se hizo una solución concentrada de Disodiofluoresceína y se realizaron diferentes diluciones a las cuales se les midió la fluorescencia para determinar a cual concentración la intensidad era máxima. Una vez determinada esa concentración ($3,5 \times 10^{-4} \text{M}$), se prepararon 100mL de solución de dicha concentración y se realizaron una serie de experimentos, donde primero, se procedió a medir la fluorescencia y absorción de la Fluoresceína sola a partir de varias diluciones de la solución de $3,5 \times 10^{-4} \text{M}$, las cuales serían utilizadas como blancos para el estudio. Luego se realizó una primera tanda de experimentos donde se prepararon muestras dejando fija la concentración de Fluoresceína y variando la X_v de nanopartículas. Posteriormente se realizó una segunda serie de experimentos donde se prepararon muestras dejando fija la fracción de volumen (X_v) de nanopartículas y variando la concentración de Fluoresceína. En ambas series de experimentos se midió a cada una las muestras preparadas, el espectro de fluorescencia, el espectro de absorción y el tamaño de partícula con el equipo de DLS, para poder así comparar los resultados obtenidos para la Fluoresceína sola con los obtenidos para las muestras nanopartícula-Fluoresceína.

III.4.2. OBTENCIÓN DE LOS ESPECTROS DE FLUORESCENCIA.

Para las medidas de fluorescencia se utilizó un equipo diseñado en el laboratorio de Química Láser de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela (figura 21). El equipo utiliza un LED con un rango de emisión de $(410 \pm 10) \text{ nm}$ y el programa utilizado para la adquisición de datos fue el OOI Base32, v2.0.1.4. La metodología para la obtención del espectro de fluorescencia es análoga a la utilizada para la obtención del espectro de absorción.

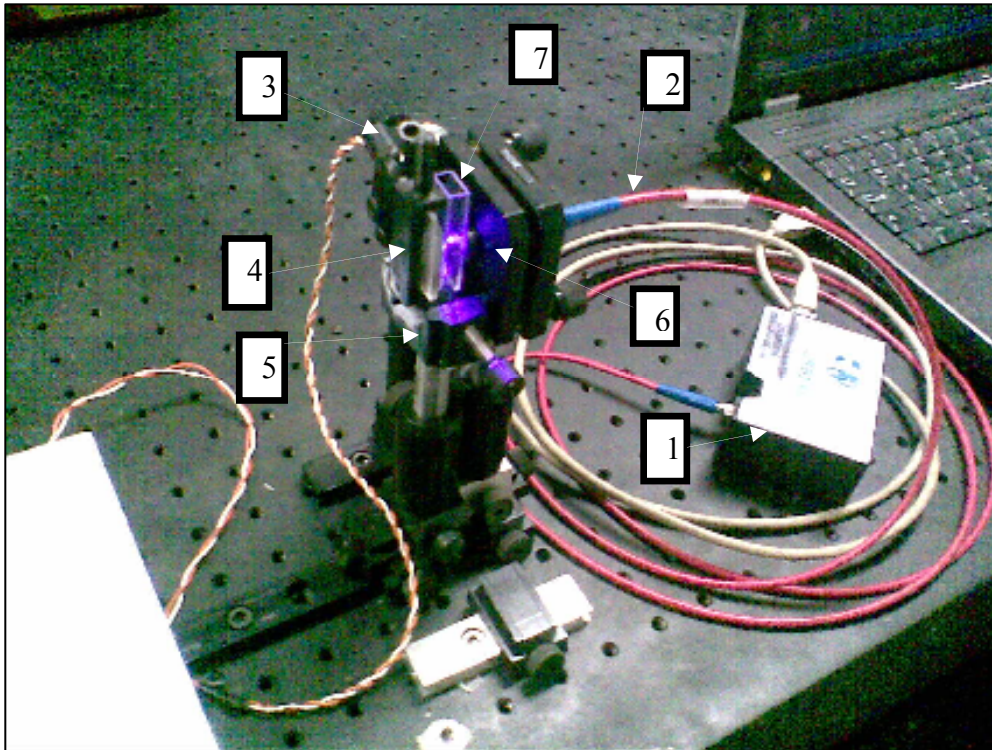


Figura 21: Elementos del equipo utilizado para la obtención de los espectros de fluorescencia. Espectrómetro (1), fibra óptica (2), base del LED (3), espejo cóncavo (4), case para el receptáculo de la muestra (5), colimador (6), cubeta de muestra (7).

CAPÍTULO IV

RESULTADOS EXPERIMENTALES Y DISCUSIONES

IV.1. INFLUENCIA DE LAS VARIABLES EXPERIMENTALES EN LA SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE ORO POR ABLACIÓN LÁSER.

En primera instancia se quiso hacer un pequeño estudio para determinar como ciertas variables experimentales influían sobre los espectros de absorción, morfología, distribución de tamaños y cantidad de nanopartículas de oro generadas por ablación láser. La finalidad de este estudio era el de ser capaces de generar nanopartículas de oro diferentes características para posteriormente observar el efecto que tenían sobre los espectros de fluorescencia de la fluoresceína y tratar así de establecer una correlación entre el efecto observado y el tamaño, forma o la cantidad de nanopartículas.

Las variables experimentales que se modificaron fueron: concentración de estabilizante, irradiancia del láser y tiempo de ablación. La longitud de onda del láser no se varió, solo se trabajó a la longitud de onda fundamental (1064 nm) y a una frecuencia fija de 10 Hz.

IV.1.1. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE ESTABILIZANTE.

Como ya se ha mencionado anteriormente, el estabilizante utilizado fue el Dodecil sulfato de sodio (SDS). Su acción estabilizante se basa en el impedimento estérico que genera entre las nanopartículas al rodearlas por micelas formadas por moléculas de SDS en solución acuosa impidiendo así su agregación.

Inicialmente se preparó una solución de SDS de concentración $4,5 \times 10^{-2}$ M y a partir de esta se realizaron diluciones de manera de obtener un rango de concentraciones amplio para observar el efecto de estas en la síntesis de las nanopartículas de oro.

Tabla 1: Datos de las soluciones de SDS utilizadas.

Dilución realizada (mL)	[SDS] (M)	Volumen de solución (mL)
-	$4,5 \times 10^{-2}$	500
10 en 100	$4,5 \times 10^{-3}$	100
1 en 100	$4,5 \times 10^{-4}$	100
0,1 en 100	$4,5 \times 10^{-5}$	100

Utilizando las soluciones preparadas de SDS que se muestran en la tabla 1, se realizó la síntesis de las nanopartículas de oro por ablación láser. Se probó cada concentración a distintos tiempos de ablación y se trabajó a la energía más baja posible con el láser (en la cual se lograra apreciar ablación), la cual fue en promedio 9 mJ por pulso. Las condiciones de generación y los diámetros promedios las muestras obtenidas se presentan en la tabla 2.

Tabla 2: Condiciones de generación de nanopartículas de oro por ablación láser y diámetros promedios obtenidos.

Muestra	D prom (+/- 2% nm)	[SDS] (M)	I (GW/cm²)	t de ablación (min)
m1	103,90	4,50E-02	0,14	5
m2	87,31	4,50E-03	0,14	5
m3	2012,00	4,50E-04	0,14	5
m4	125,43	4,50E-05	0,14	5
m5	98,07	4,50E-02	0,14	8
m6	130,63	4,50E-03	0,14	8
m7	139,18	4,50E-04	0,14	8
m8	108,17	4,50E-05	0,14	8
m9	142,82	4,50E-02	0,14	12
m10	146,30	4,50E-03	0,14	12
m11	137,65	4,50E-04	0,14	12
m12	116,43	4,50E-05	0,14	12
m13	70,67	4,50E-02	0,14	16
m14	70,03	4,50E-03	0,14	16
m15	117,93	4,50E-04	0,14	16
m16	115,17	4,50E-05	0,14	16

En la figura 22 podemos observar como varía el diámetro de partícula en función de la concentración de SDS. Se observa una aparente tendencia de que a medida que se aumenta la concentración de SDS el diámetro de las nanopartículas generadas va disminuyendo. Sin embargo, la tendencia no es muy clara y posiblemente el diámetro puede haberse mantenido relativamente constante, por lo que los cambios observados

se pueden deber a variaciones en las distribuciones más que a cambios en el diámetro promedio.

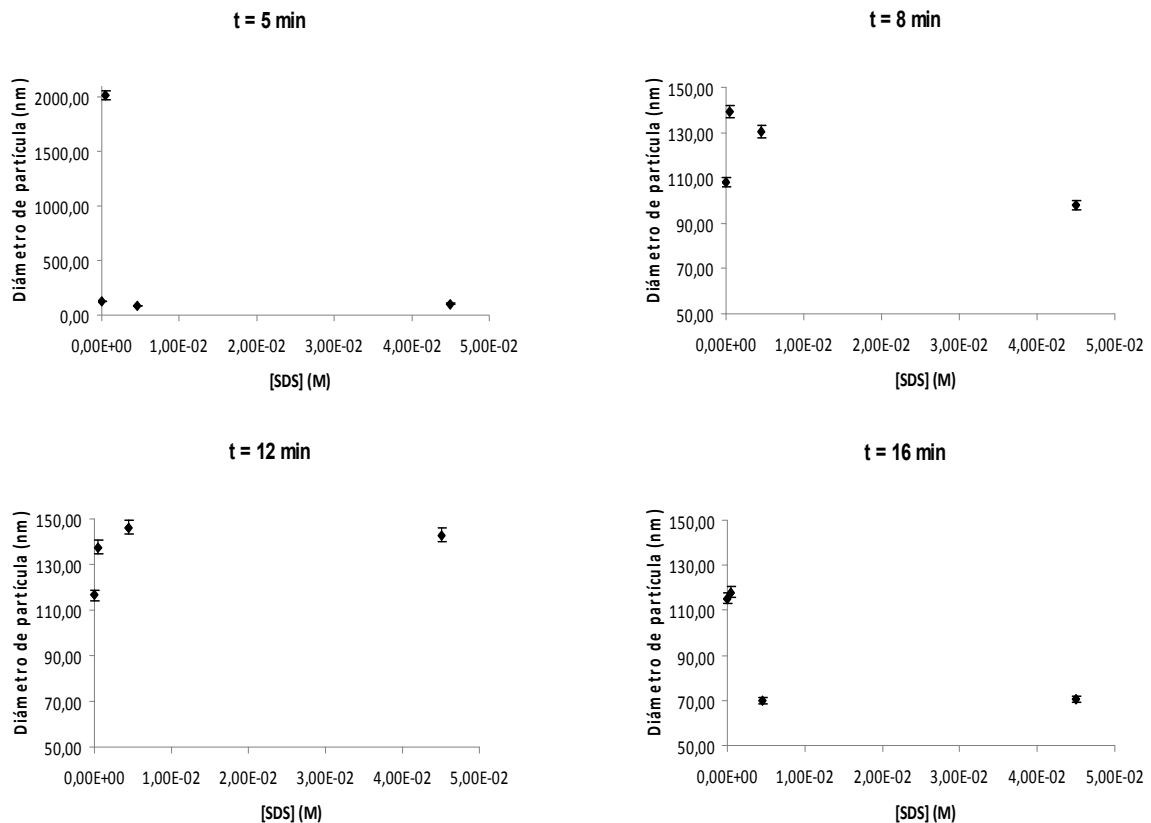


Figura 22: Variación del diámetro de partícula en función de la concentración de SDS en nanopartículas de oro sintetizadas a $0,14 \text{ GW/cm}^2$ y a distintos tiempos de ablación.

En teoría, una concentración mayor de SDS se traduce en un mayor número de moléculas de SDS en el medio. Una vez que se realiza la ablación sobre la placa, se forma una densa nube de átomos de oro alrededor de la zona de ablación. Las interacciones entre estos átomos son bastante fuertes por lo que de inmediato comienzan a agregarse para formar partículas de mayor tamaño. A medida que aumenta el tamaño de la partícula, estas se vuelven más estables y por lo tanto su crecimiento se vuelve más lento. En este punto las interacciones con el medio comienzan a competir con las interacciones interpartícula, es entonces cuando las

moléculas del surfactante comienzan a rodear las nanopartículas formadas e interactúan con ellas, por su parte hidrofóbica, formando las micelas que evitan que se agreguen con otras partículas. Sabiendo esto es razonable pensar que un mayor número de moléculas de surfactante en el medio impedirá más efectivamente la agregación de las partículas formadas y debido a que un mayor número de moléculas se traduce en un mayor volumen ocupado por el surfactante dentro del medio, el tamaño máximo de las partículas se ve limitado y reducido a media que la concentración de surfactante aumenta.

Adicionalmente se sabe que la concentración micelar crítica (CMC) del SDS es 8×10^{-3} M, en las gráficas de la figura 22 podemos observar que un mayor aumento de diámetro se genera cuando la concentración de SDS es significativamente menor a este valor. Esto puede deberse a que a un rango de concentraciones menor a 8×10^{-3} M las moléculas de SDS son solvatadas por el solvente y dejan de formar micelas, las cuales son las responsables de evitar la agregación de las nanopartículas.

En la figura 23 se presenta la comparación entre los espectros de absorción de las muestras sintetizadas. Se puede observar como para todos los tiempos de ablación se obtienen espectros bastante definidos y máximos estrechos. Esto es coherente ya que como la irradiancia incidente es relativamente baja, el proceso de ablación se realiza de una forma un poco más ordenada ya que se remueve menos material y el surfactante puede ir poco a poco recubriendo a todas las partículas generadas, lo que se traduce en principio en una distribución de tamaños más estrecha.

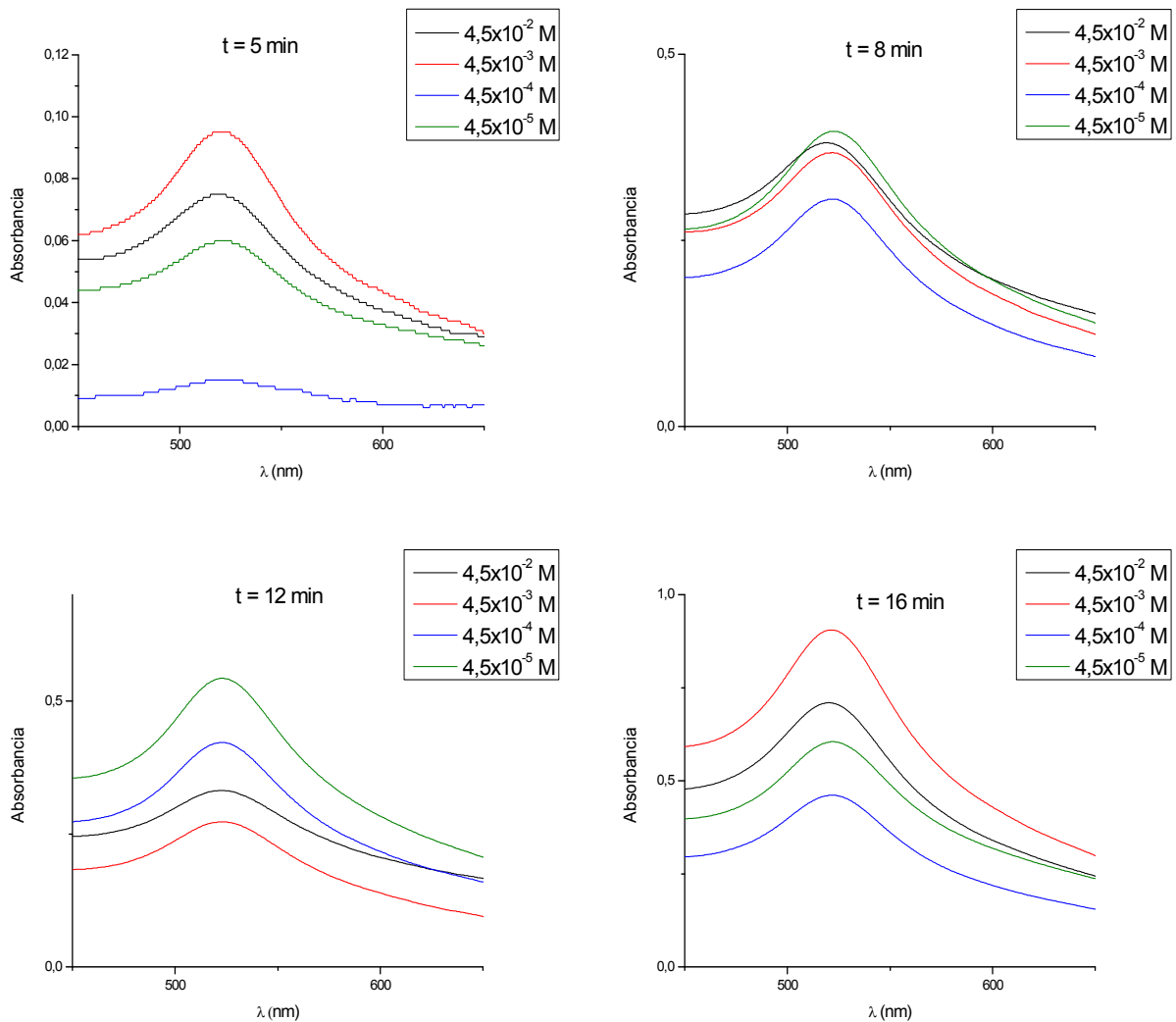


Figura 23: Comparación de los espectros de absorción de nanopartículas de oro sintetizadas a $0,14 \text{ GW/cm}^2$, estabilizadas con soluciones de SDS de distintas concentraciones para distintos tiempos de ablación.

Adicionalmente podemos observar como a las concentraciones de $4,5 \times 10^{-2}$ M y $4,5 \times 10^{-3}$ M de SDS se obtienen espectros que presentan una mayor absorción, a excepción de las muestras generadas a un tiempo de 12 min, por lo que se puede afirmar que estas concentraciones permiten una estabilización más efectiva de las nanopartículas generadas, responsables de la absorción observada.

La influencia de la CMC sobre el diámetro partícula pareciera ponerse en evidencia en la muestra m3, donde para una concentración de $4,5 \times 10^{-4}$ M de SDS se obtuvo un diámetro medio de partícula de 2012 nm, y al observar el espectro obtenido (figura 22), se ve que tiene un máximo de absorción considerablemente menos intenso que el resto de las muestras generadas al mismo tiempo de ablación (5 min). Esto indica que en esta muestra el solvente fue capaz de solvatar prácticamente todas las moléculas de SDS, y por consiguiente no se formaron micelas, esto permitió la libre agregación de las nanopartículas de oro en coloides de un tamaño mucho mayor.

IV.1.2. INFLUENCIA DE LA IRRADIANCIA.

En base a los resultados presentados en la sección anterior se decidió trabajar con una concentración de SDS igual a $4,5 \times 10^{-2}$ M para la síntesis de todas las nanopartículas que se utilizaran durante el resto de este trabajo de investigación. Esto con el fin de lograr nanopartículas del tamaño más pequeño posible y evitar la agregación que se pueda producir por trabajar con una concentración cercana o menor a la CMC.

Una vez decidido esto, se procedió a realizar un estudio para determinar como los cambios en la irradiancia podían influir en las características de las nanopartículas de oro generadas.

Para esto se sintetizaron muestras de nanopartículas a diferentes valores de irradiancia, a tiempos de ablación de 16 y 26 min para cada valor (tabla 3), ya que en principio estos tiempos permitirían la generación de un gran número de nanopartículas. Se utilizó un rango de energía por pulso de 23 a 72 mJ.

Tabla 3: Condiciones de generación de nanopartículas de oro por ablación láser, diámetros promedios y distribuciones de tamaño obtenidas.

Muestra	D prom (+/- 2% nm)	Ancho dist.	I (GW/cm²)	t de ablación (min)
m23	68,82	64,11	0,37	16
m24	64,15	66,14	0,41	26
m25	42,19	51,08	0,56	16
m26	47,04	46,52	0,56	26
m17	37,10	-	0,68	16
m18	35,82	-	0,68	26
m19	29,58	-	0,89	16
m20	47,17	-	0,89	26
m21	36,00	-	1,15	16
m22	59,74	-	1,15	26

A partir de los datos presentados en la tabla 3 se construyeron las gráficas presentadas en la figura 24. Allí se puede observar que para un tiempo de ablación de 16 min, a medida que se incrementa la irradiancia sobre la placa de oro se generan nanopartículas de un diámetro menor. El diámetro de partícula va disminuyendo progresivamente con el aumento de la irradiancia hasta llegar a un punto donde parece estabilizarse.

El hecho de que el diámetro de partícula disminuya a medida que aumenta la irradiancia puede explicarse por el fenómeno de fragmentación inducida por el láser de las nanopartículas ya formadas.^[35] Cuando el láser irradia una nanopartícula de oro, el plasmón superficial de ésta comienza a absorber una gran cantidad de fotones. Una vez absorbidos, gran parte de la energía de estos fotones es convertida rápidamente en calor, lo que genera un incremento significativo en la temperatura de la nanopartícula.

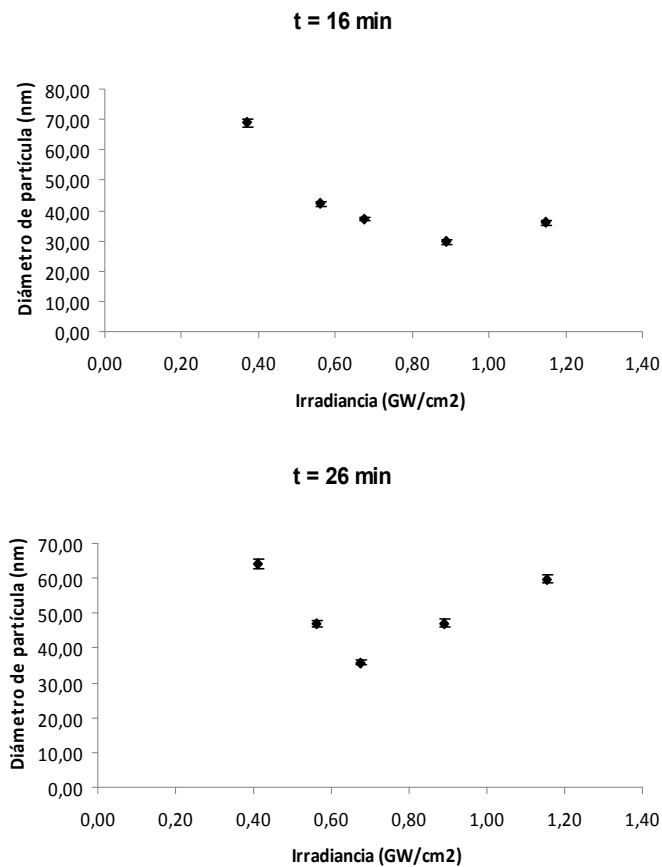


Figura 24: Variación del diámetro de partícula en función de la irradiancia en nanopartículas de oro para tiempos de ablación de 16 y 26 min.

A valores de irradiancia bajos, el medio estabilizante es capaz de difundir el calor generado entre pulso y pulso, regulando así la temperatura de la nanopartícula. A medida que se incrementa la irradiancia, el incremento de la temperatura es más intenso y entonces el medio ya no es capaz de disipar tanta cantidad de calor generado en tan poco tiempo. En este punto la nanopartícula aumenta tanto su temperatura que comienza a fraccionarse, generando así partículas de diámetro menor.

Por otro lado, se puede ver como para un tiempo de ablación de 26 min, y a los mismos valores de irradiancia anteriores, el diámetro de partícula disminuye progresivamente a medida que aumenta la irradiancia hasta alcanzar un valor mínimo,

pero en lugar de estabilizarse, comienza a aumentar nuevamente a medida que se sigue incrementando la irradiancia.

Este incremento del diámetro puede explicarse por el hecho de que al incrementar la irradiancia se está arrancando también una mayor cantidad de material de la placa de oro, lo cual se traduce en una mayor cantidad de nanopartículas en el medio. Si a esto se le suma el hecho de que se utilizó un tiempo de ablación significativamente mayor, lo que aumenta a su vez la cantidad de material removido de la placa de oro, es fácil llegar a la conclusión de que hay una enorme cantidad de nanopartículas generadas en el medio. Para este tiempo de ablación, a valores de irradiancia altos, el medio estabilizante comienza a ser insuficiente para estabilizar todas las nanopartículas generadas, y estas comienzan entonces a agregarse progresivamente una vez que no quedan moléculas libres de SDS en el medio.

Todo lo explicado anteriormente se puede corroborar observando los espectros de absorción obtenidos (figura 25). A 16 min se observa como a medida que se incrementa la irradiancia se incrementa también la absorción, esto debido a la presencia de un mayor número de partículas en el medio y también a la reducción de tamaño progresiva, ya que a medida que las nanopartículas disminuyen de tamaño son capaces de absorber más energía, por el aumento en su brecha de banda.

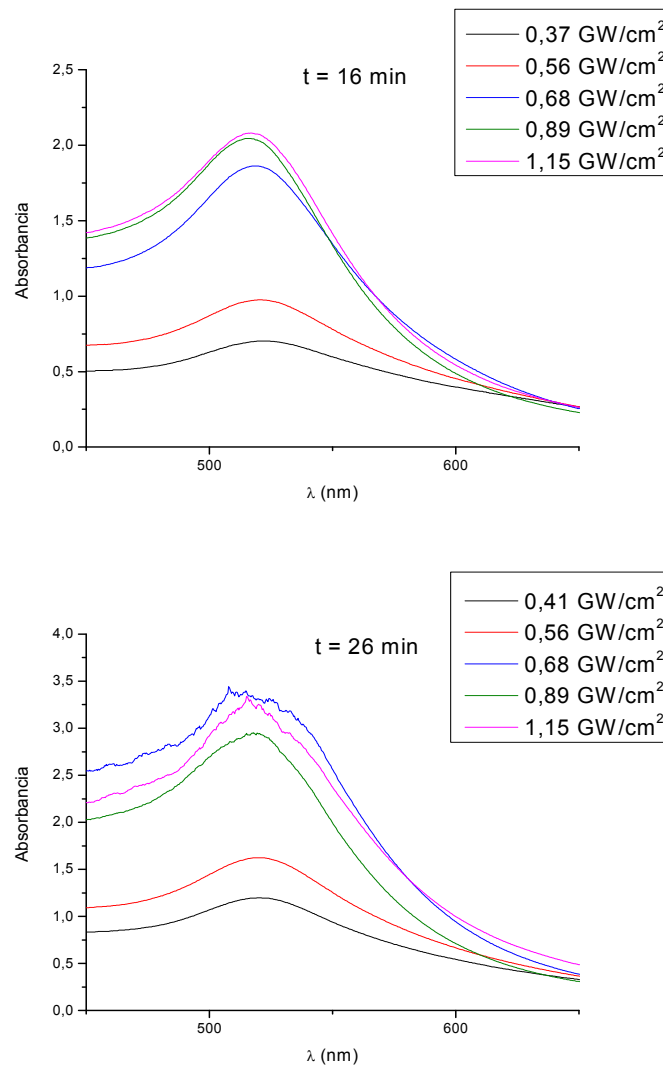


Figura 25: Comparación de los espectros de absorción de nanopartículas de oro sintetizadas a diferentes valores de irradiancia para tiempos de ablación de 16 y 26 min.

Esta misma tendencia se observa en los espectros obtenidos a 26 min, pero se ve como a altos valores de irradiancia los espectros comienzan a saturarse y ensancharse debido a la agregación y a la gran cantidad de nanopartículas presentes.

Una vez observados estos resultados, se sintetizaron nanopartículas a un tiempo de ablación 26 min usando valores aún más altos de irradiancia (tabla 4), para

comprobar si la tendencia se mantenía y ver su efecto sobre los espectros de absorción obtenidos y sobre el ancho de la distribución de tamaños. Se utilizó un rango de energía por pulso de 56 a 180 mJ y se sintetizó cada muestra por duplicado a las mismas condiciones.

Tabla 4: Condiciones de generación de nanopartículas de oro por ablación láser, diámetros promedios y distribuciones de tamaño obtenidas.

Muestra	D prom (+/- 2% nm)	Ancho dist.	I (GW/cm²)	t de ablación (min)
m27a	18,49	32,56	0,89	26
m27b	17,17	25,41	0,89	26
m29a	21,49	29,82	0,90	26
m29b	26,69	34,96	0,90	26
m30a	19,15	27,54	1,27	26
m30b	19,94	29,22	1,27	26
m28a	39,57	56,86	1,51	26
m28b	28,11	38,51	1,51	26

En la figura 26 se puede observar como en efecto a medida que se sigue incrementando la irradiancia el diámetro de partícula continúa incrementándose, confirmando que la gran cantidad de partículas presentes favorecen ahora la agregación progresiva. Adicionalmente se puede ver como el ancho de la distribución de tamaños aumenta con el incremento de la irradiancia. Esto es debido a que ahora las partículas de diámetros menores comienzan a agregarse para formar partículas de mayor tamaño y al ya no estar limitadas por las moléculas de SDS, no se logra establecer un diámetro máximo de partícula.

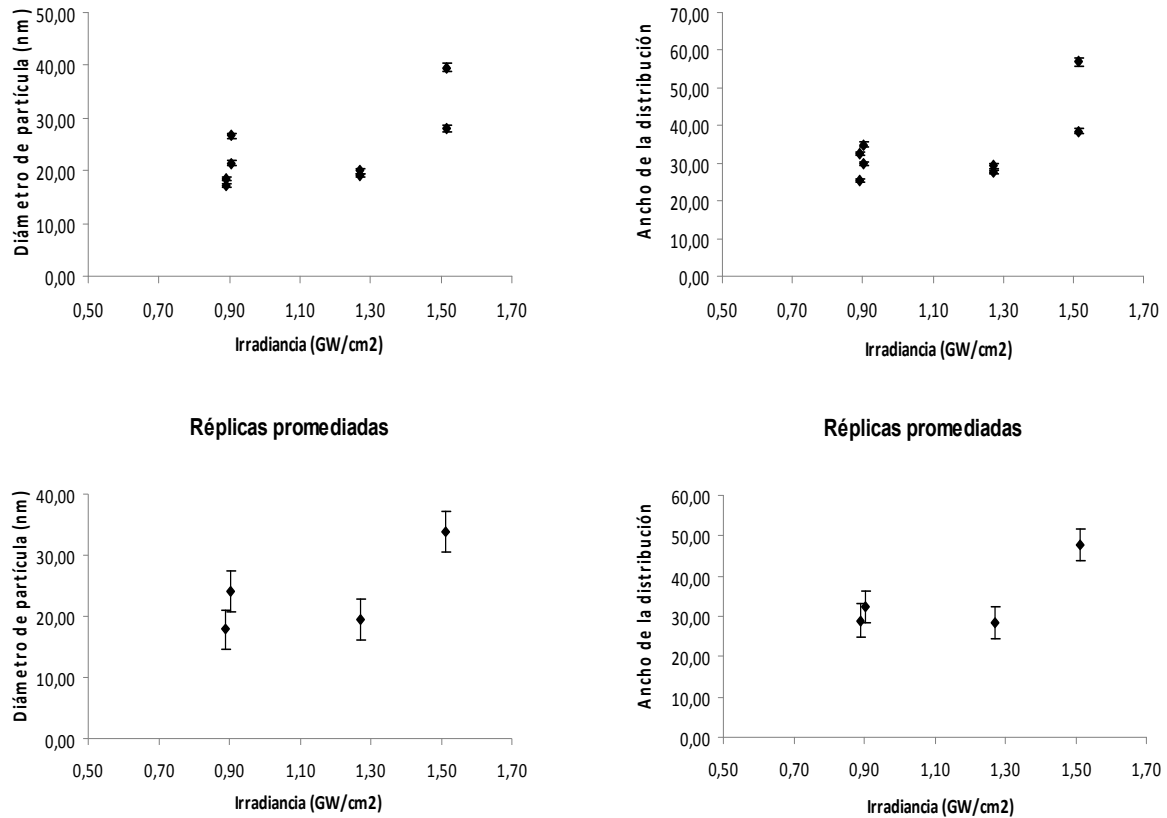


Figura 26: Variación del diámetro de partícula y del ancho de la distribución de tamaños en función de la irradiancia en nanopartículas de oro sintetizadas por duplicado para un tiempo de ablación de 26 min. Muestras sin promediadas (arriba) y promediadas (abajo).

En este punto se pierde el control sobre la generación de las nanopartículas, lo cual se ve reflejado en la pérdida de reproducibilidad de las características entre cada muestra. Este efecto se observa notablemente en el par de muestras sintetizadas al mayor valor de irradiancia utilizado. Una forma de prevenir este efecto sería el de utilizar un mayor volumen de estabilizante cuando se quieran sintetizar un número muy grande de nanopartículas.

La dependencia de la forma de las distribuciones de tamaño de las nanopartículas generadas con la irradiancia se puede apreciar claramente en la figura

27, donde se muestran tres de las distribuciones obtenidas para distintos valores de irradiancia.

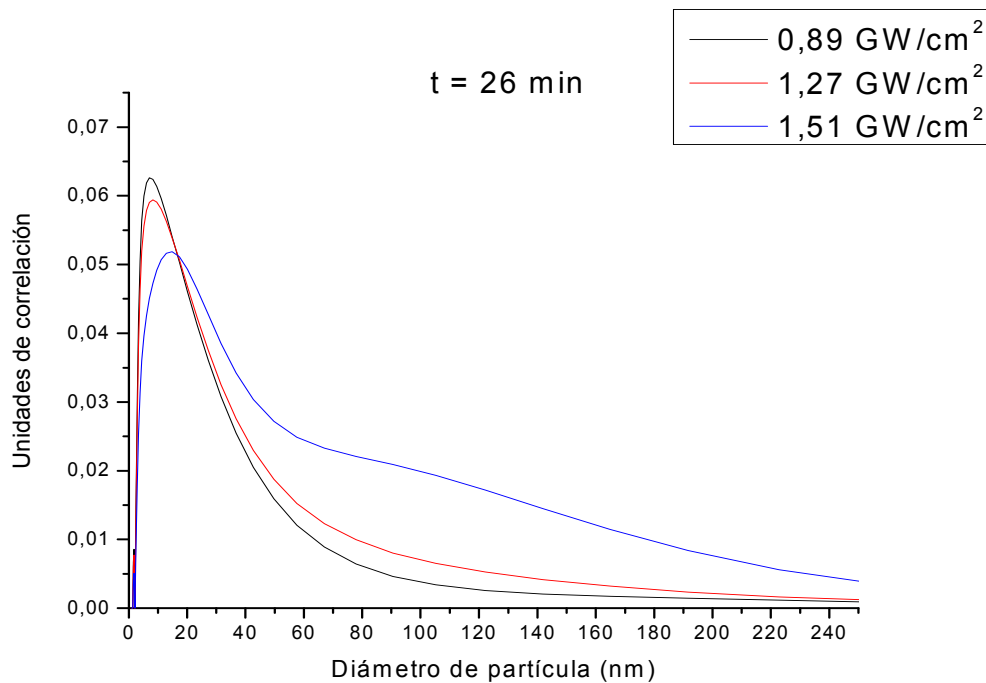


Figura 27: Comparación de las distribuciones de tamaño de nanopartículas de oro sintetizadas a diferentes valores de irradiancia para un tiempo de ablación de 26 min.

Por último, al analizar los espectros de absorción obtenidos (figura 28), se observa nuevamente como a altos valores de irradiancia el espectro comienza a saturarse y a ensancharse debido al ensanchamiento en la distribución de tamaños de las nanopartículas generadas.

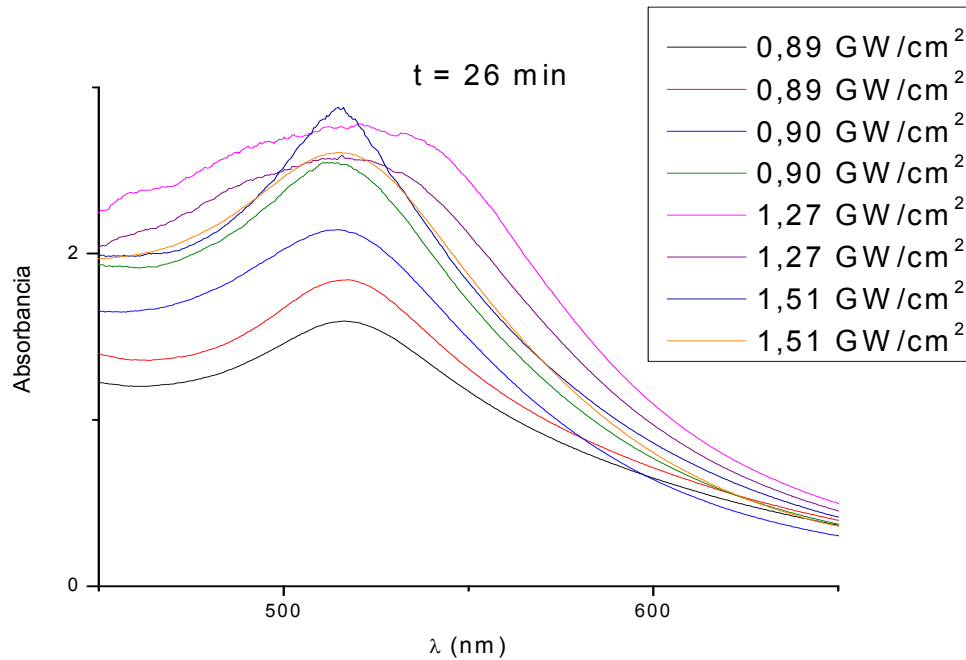


Figura 28: Comparación de los espectros de absorción de nanopartículas de oro sintetizadas a diferentes valores de irradiancia para un tiempo de ablación de 26 min.

IV.1.3. INFLUENCIA DEL TIEMPO DE ABLACIÓN.

Por último se estudió como el tiempo de ablación influía en las características de las nanopartículas de oro generadas para un mismo valor de irradiancia. Los resultados previamente obtenidos sugerían que el uso un mayor tiempo de ablación se traduce en una mayor cantidad de nanopartículas generadas.

Para este estudio se sintetizaron muestras de nanopartículas de oro a un valor moderadamente alto de irradiancia, ya que se observó anteriormente que para valores muy altos de irradiancia y altos tiempos de ablación la generación de nanopartículas pierde reproducibilidad, y se varió el tiempo de ablación para cada muestra sintetizada (tabla 5).

Tabla 5: Condiciones de generación de nanopartículas de oro por ablación láser, diámetros promedios y distribuciones de tamaño obtenidas.

Muestra	D prom (+/- 2% nm)	Ancho dist.	I (GW/cm²)	t de ablación (min)
m36	36,32	33,30	0,84	2
m37	37,55	45,18	0,84	4
m38	51,87	53,32	0,84	6
m39	56,14	62,08	0,84	9
m40	57,83	60,72	0,84	12
m41	75,36	68,16	0,84	15
m42	74,64	66,15	0,84	19
m43	66,95	67,17	0,84	22
m44	62,26	63,03	0,84	25

En la figura 29 se puede apreciar como el diámetro de partícula se incrementa a medida que aumenta el tiempo de ablación utilizado. La tendencia obtenida sugiere que el diámetro se mantiene relativamente constante para intervalos pequeños de tiempo, es decir, de 0 a 5 min se obtienen partículas de diámetro similar, de 5 a 10 min se obtienen partículas de diámetro similar pero de mayor magnitud en comparación a los obtenidos para el intervalo de tiempo anterior y así sucesivamente. Se observa como el diámetro medio toma un valor máximo alrededor de los 20 min y luego se mantiene constante.

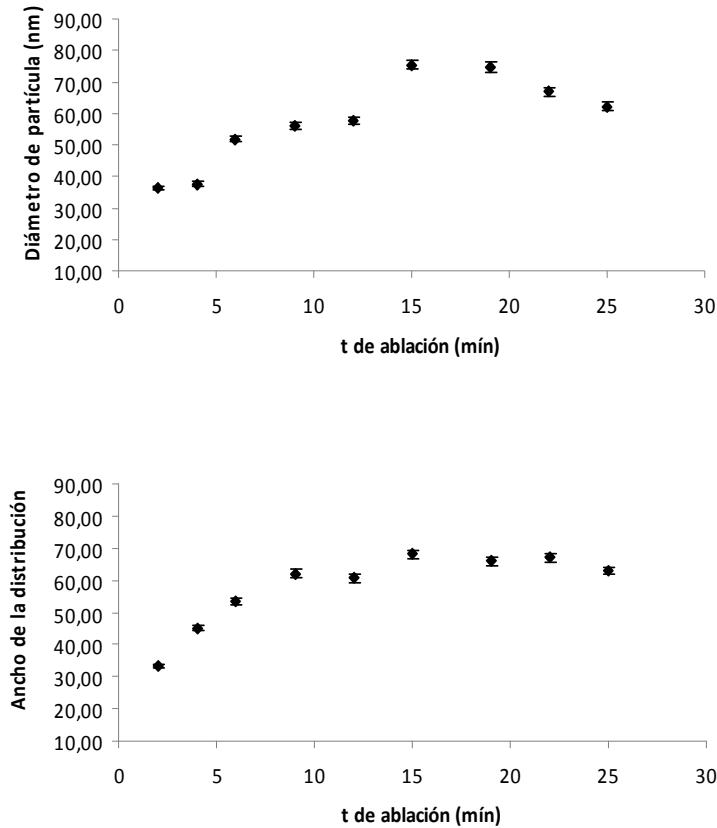


Figura 29: Variación del diámetro en función del tiempo de ablación en nanopartículas de oro sintetizadas a $0,84 \text{ GW/cm}^2$.

En cuanto al ancho de la distribución de tamaños, se puede ver como ésta también se incrementa a medida que se utiliza un tiempo de ablación mayor. Esta tendencia tiene que ver con el incremento en el número de partículas generadas dentro del medio, que a su vez favorece poco a poco la agregación de las mismas y por lo tanto la obtención de una población de nanopartículas con una mayor variedad de tamaños. Los cambios en la forma de las distribuciones a medida que se incrementa el tiempo de ablación pueden ser observados en la figura 30.

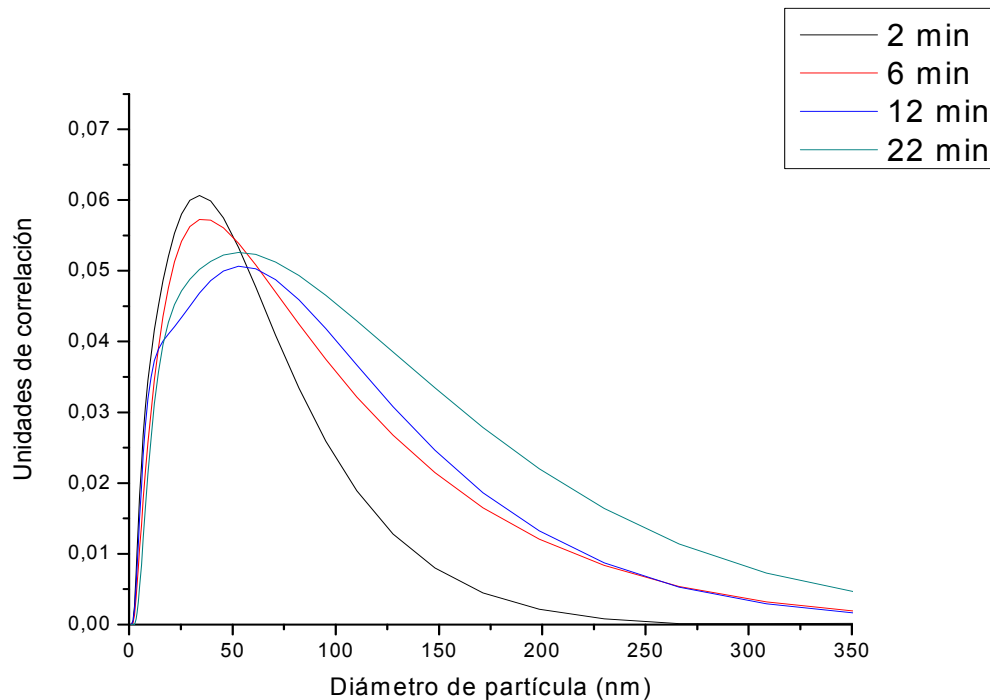


Figura 30: Comparación de las distribuciones de tamaño de nanopartículas de oro sintetizadas a 0,84 GW/cm² para distintos tiempos de ablación.

En cuanto a los espectros de absorción obtenidos (figura 31), se observa un aumento en la absorción a medida que se incrementa el tiempo de ablación. Previamente se pudo comprobar como las nanopartículas absorben más a medida que su tamaño disminuye, en este caso se ve como están absorbiendo más a medida que el tamaño se incrementa. Esto se debe a que, en este caso, el incremento en la absorción no está asociado con el tamaño, sino más bien con el número de nanopartículas en el medio, ya que por Ley de Beer es sabido que la absorción es proporcional a la cantidad de sustancia capaz de absorber radiación en el medio.

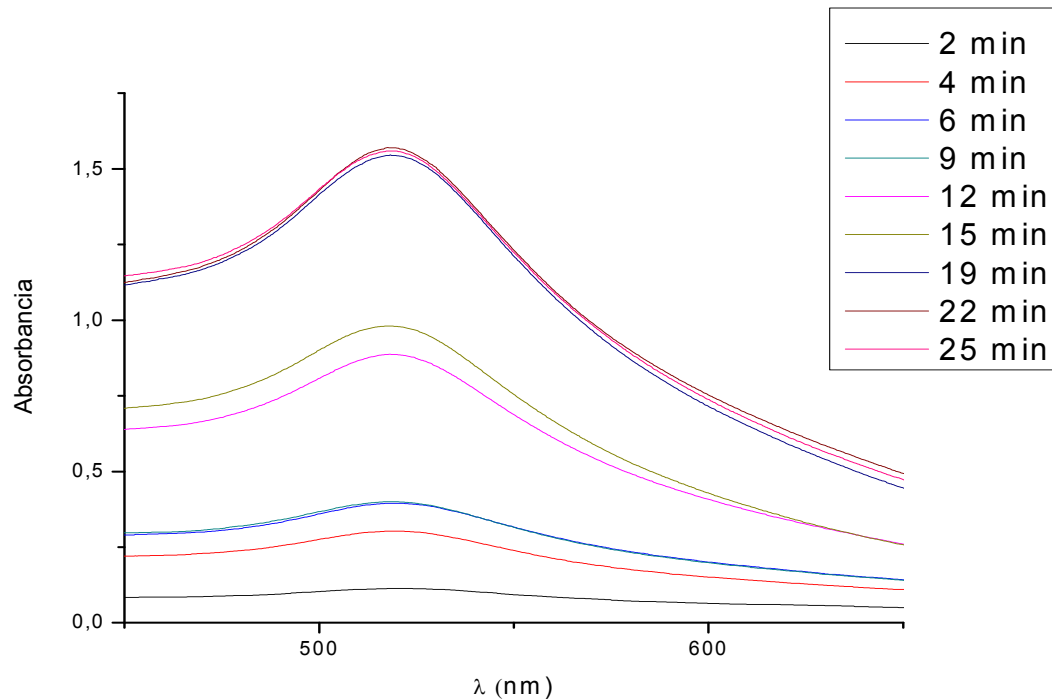


Figura 31: Comparación de los espectros de absorción de nanopartículas de oro sintetizadas a 0,84 GW/cm² para distintos tiempos de ablación.

Por último vale la pena señalar que no se observa la saturación o el ensanchamiento de los espectros a los valores de tiempo más altos, ya que no se utilizó un valor de irradiancia muy alto.

En la figura 32 podemos observar un par de micrografías obtenidas por TEM de muestras nanopartículas sintetizadas a 2 y 5 mín. Se puede apreciar la morfología esférica de las mismas y la distribución relativa de tamaños.

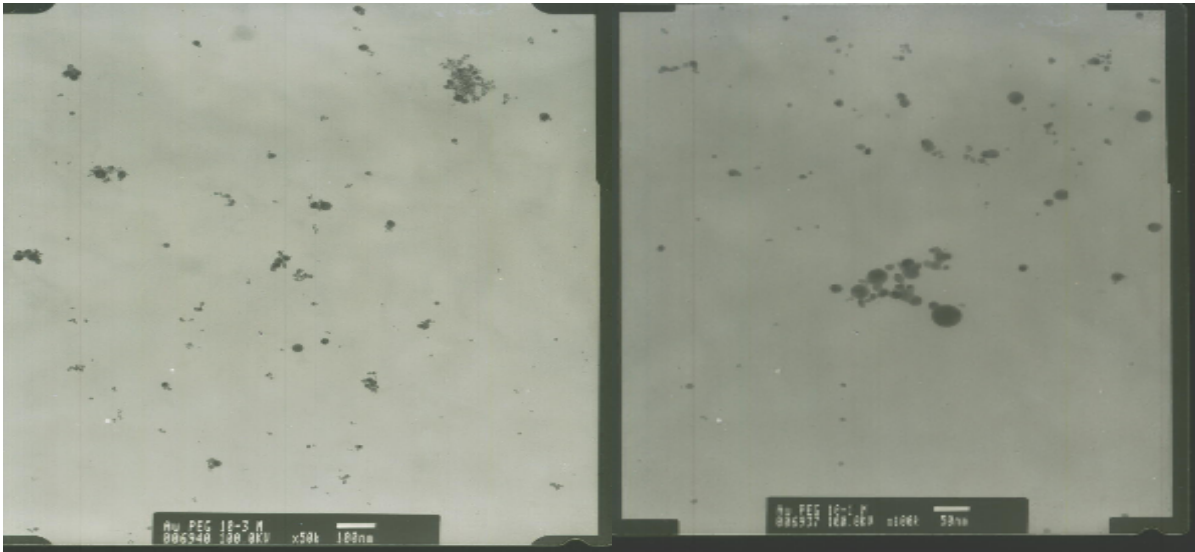


Figura 32: Micrografías obtenidas por TEM de muestras de nanopartículas de oro sintetizadas por ablación láser a tiempos de ablación de 2 min (izquierda) y 5 min (derecha).

IV.1.4. DEPENDENCIA DE LA LONGITUD DE ONDA DEL MÁXIMO DE ABSORBANCIA CON EL DIÁMETRO DE PARTÍCULA.

En la figura 33 se presenta la variación de la longitud de onda del máximo de absorbancia en función de los diámetros promedio de partícula obtenidos para todas las muestras de nanopartículas que fueron sintetizadas en este trabajo de investigación. Las muestras se clasificaron en las que fueron sintetizadas tiempos de ablación menores, iguales y mayores a 16 min, independientemente de la irradiancia utilizada.

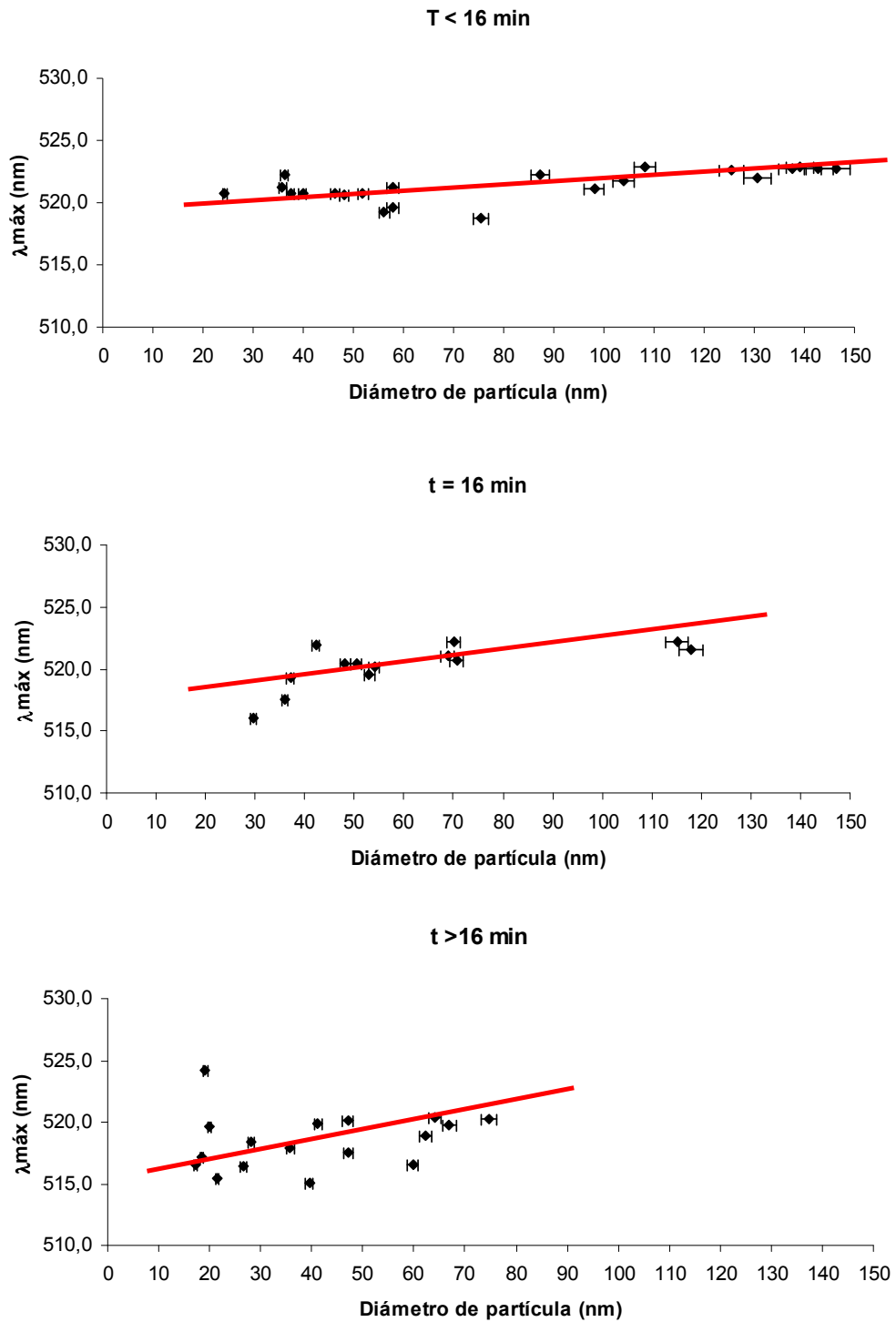


Figura 33: Variación de la longitud de onda del máximo de absorción en función del diámetro de partícula en nanopartículas de oro sintetizadas a distintos tiempos de ablación.

Al observar la figura 33, se puede apreciar claramente como a medida que se incrementa el diámetro de partícula, la longitud de onda del máximo de absorbancia se va incrementando ligeramente en magnitud.

Este incremento no se logra apreciar en la misma medida en las muestras sintetizadas a tiempos de ablación mayores a 16 min, ya que el desplazamiento en la longitud de onda es dependiente del tamaño de partícula, por lo tanto para observar un desplazamiento apreciable es necesario obtener una distribución de tamaños estrecha, lo cual como ya se comprobó, no se obtiene para tiempos de ablación mayores a 16 min.

El hecho de este incremento en la longitud de onda del máximo de absorbancia a medida que el tamaño de partícula aumenta tiene que ver con el fenómeno de cuantización de tamaño, previamente mencionado, que consiste en la cuantización del filo de las bandas de conducción y de valencia en una nanopartícula y al aumento en su brecha de banda debido al confinamiento espacial de sus electrones. A medida que la nanopartícula disminuye de tamaño, el confinamiento de sus electrones aumenta, causando a su vez un aumento en el espaciado entre los niveles y en la brecha de banda. Esto genera que mientras más pequeña sea la nanopartícula, ésta será capaz de absorber una energía de mayor frecuencia y por lo tanto de una longitud de onda más corta.

En la figura 34 se observan soluciones de nanopartículas de oro de diferentes intensidades de color. Soluciones de tonalidad más intensa indican una mayor densidad de partículas y por lo tanto presentarán espectros de absorción más intensos. Los cambios de color de rosado a rojo indican desplazamientos en la longitud de onda del máximo de absorbancia debido a diferencias entre los diámetros promedio de partícula entre cada muestra. Típicamente, en soluciones de nanopartículas de oro de color rojo

intenso se reportan diámetros promedio de partículas de alrededor 8 nm y en las de color rosado claro, diámetros promedio alrededor de 40-60 nm.

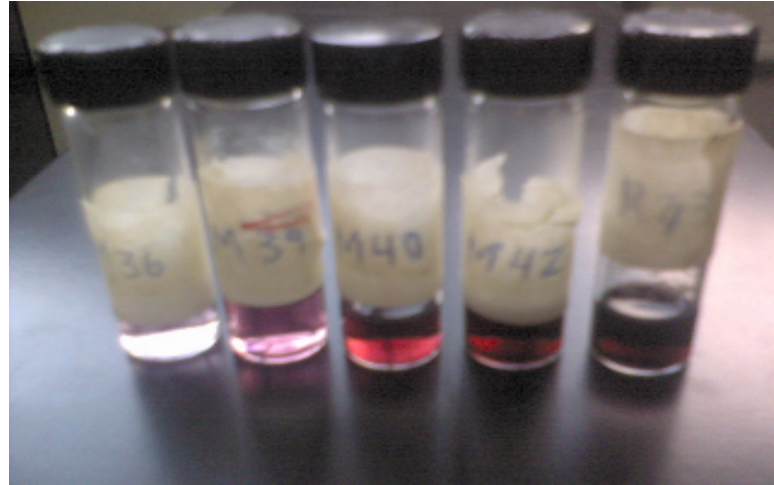


Figura 34: Muestras de nanopartículas de oro mostrando coloraciones de diferentes intensidades.

IV.2. ESTUDIO DEL INTERCAMBIO DE ENERGÍA ENTRE NANOPARTÍCULAS DE ORO Y FLUORESCÉINA.

La segunda parte de este trabajo de investigación consistió en estudiar los cambios que se producían en los espectros de fluorescencia de la Fluoresceína al ponerla en contacto con diferentes soluciones de nanopartículas de oro sintetizadas por ablación láser.

IV.2.1. SÍNTESIS DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ORO UTILIZADAS.

En base a los resultados mostrados en la sección IV.1, se sintetizaron nanopartículas de oro utilizando condiciones que permitieran obtener soluciones de diferentes densidades de partícula, diámetros promedio y distribuciones de tamaños (tabla 6). Se sintetizaron muestras por duplicado para cada condición. Para los

experimentos con fluoresceína se seleccionaron las muestras m45a, m46a, m47a y m48a.

Tabla 6: Condiciones de generación de nanopartículas de oro por ablación láser, diámetros promedios y distribuciones de tamaño obtenidas.

Muestra	D prom (+/- 2% nm)	Ancho dist.	I (GW/cm ²)	t de ablación (min)
m45a	35,87	34,68	0,80	2
m45b	57,85	56,13	0,80	2
m46a	50,45	46,96	0,80	16
m46b	54,07	52,23	0,80	16
m47a	48,26	54,15	1,12	2
m47b	46,36	47,62	1,12	2
m48a	53,05	53,52	1,12	16
m48b	48,20	51,20	1,12	16

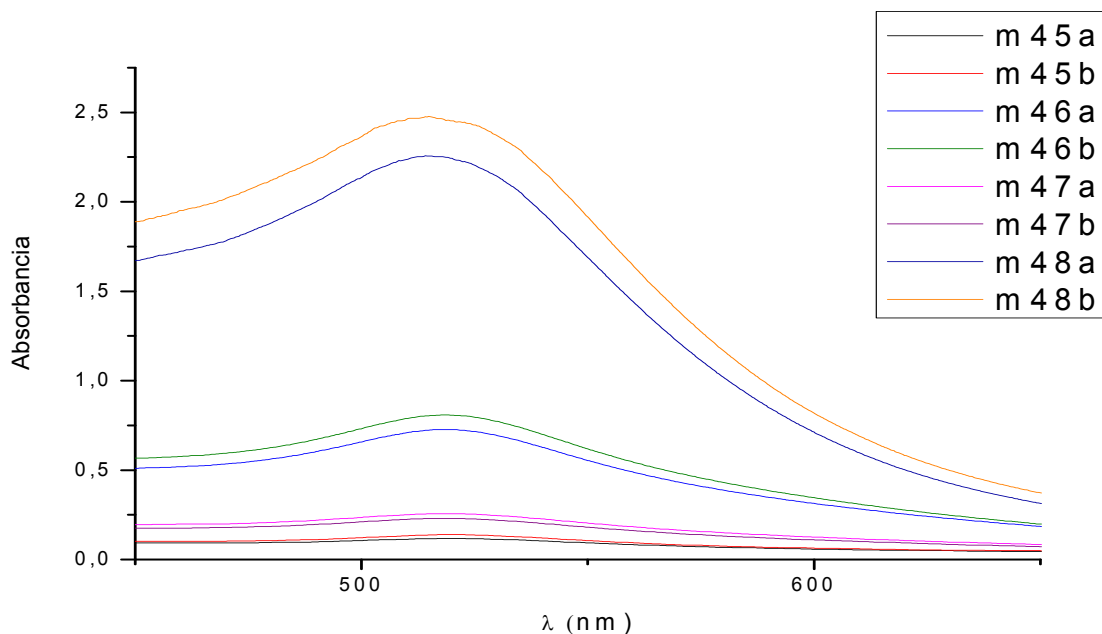


Figura 35: Comparación de los espectros de absorción de nanopartículas de oro sintetizadas a 0,80 y 1,12 GW/cm² para tiempos de ablación de 2 y 16 min.

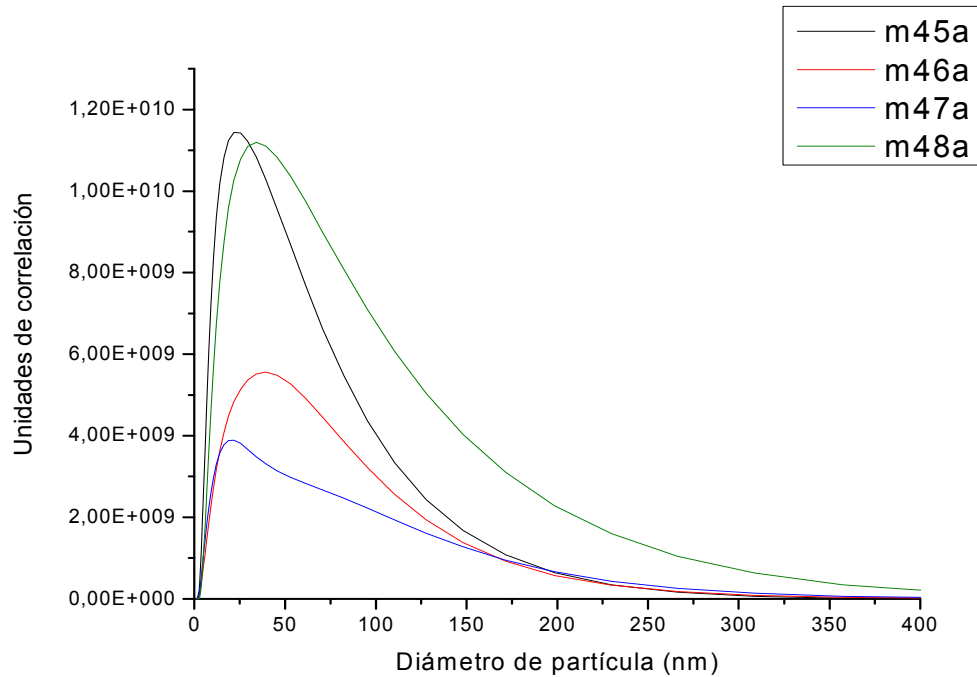


Figura 36: Comparación de las distribuciones de tamaño de nanopartículas de oro sintetizadas a 0,80 y 1,12 GW/cm² para tiempos de ablación de 2 y 16 min.

IV.2.2. DETERMINACIÓN DE LOS ESPECTROS DE FLUORESCENCIA DE LA FLUORESCÉINA.

Como se mencionó anteriormente, se preparó una solución madre de Disodiofluoresceína de concentración $3,5 \times 10^{-4}$ M y a partir de esta se prepararon muestras de concentraciones inferiores (tabla 7). A cada muestra se le tomó el espectro de absorción y de fluorescencia. Estas muestras serán tomadas como blancos para el estudio.

Tabla 7: Datos de las muestras Fluoresceína-SDS-H₂O tomadas como blancos y valores de la intensidad de fluorescencia obtenidos para cada muestra.

Muestra	V Fluoresceína (mL)	V SDS (mL)	V H ₂ O (mL)	[Fluoresceína] (M)	I _{máx}
H1a	1,5	0,5	-	$2,60 \times 10^{-4}$	2154
H2a	1,5	0,5	-	$2,60 \times 10^{-4}$	2158
H2b	1,3	0,5	0,2	$2,30 \times 10^{-4}$	2067
H2c	1,1	0,5	0,4	$1,90 \times 10^{-4}$	1956
H2d	0,9	0,5	0,6	$1,60 \times 10^{-4}$	1832
H2e	0,6	0,5	0,9	$1,05 \times 10^{-4}$	1476

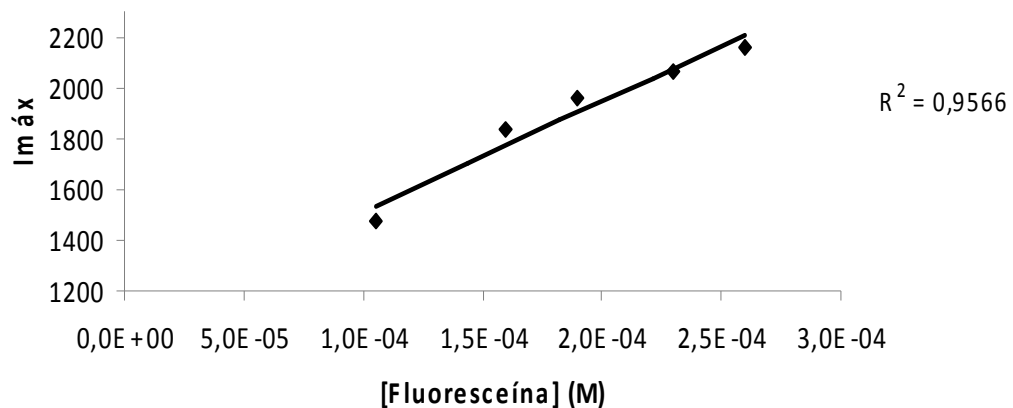


Figura 37: Variación de la intensidad máxima de fluorescencia en función de la concentración de Fluoresceína en soluciones Fluoresceína-SDS-H₂O.

En la figura 37 se puede observar como la intensidad de fluorescencia disminuye a medida que la concentración de fluoresceína disminuye. Se puede considerar que en el rango de concentraciones utilizado la fluorescencia tiene una dependencia lineal con la concentración.

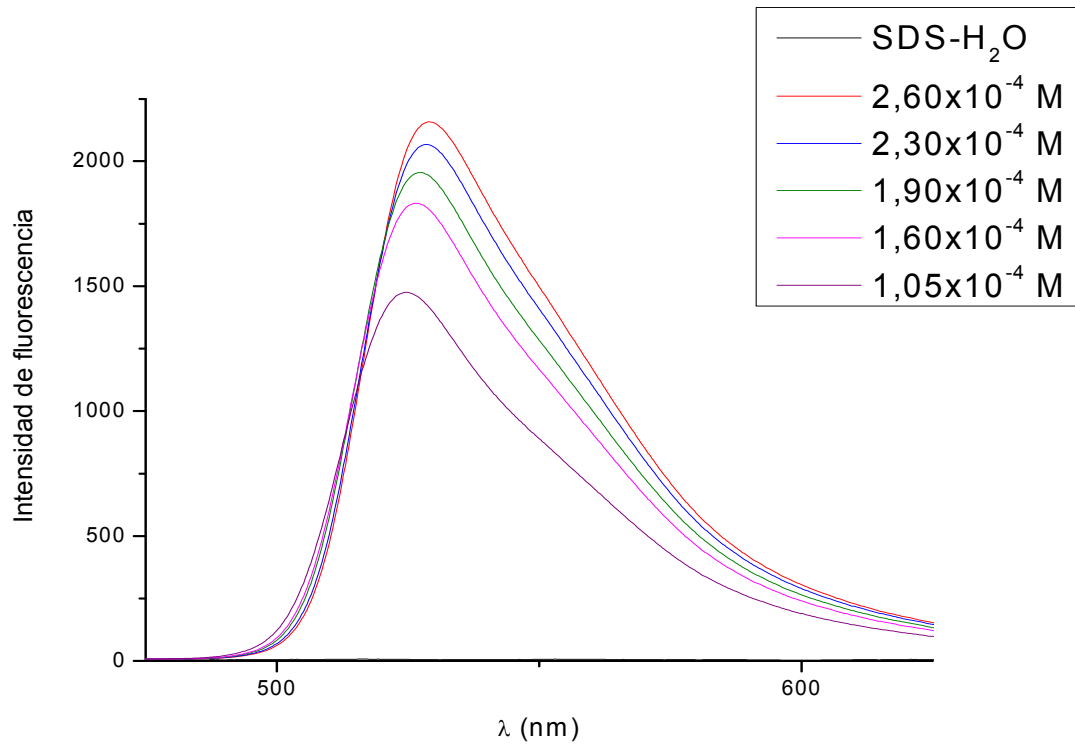


Figura 38: Comparación de los espectros de fluorescencia de soluciones de Fluoresceína-SDS-H₂O con diferentes concentraciones de fluoresceína.

En la figura 38 se puede observar la dependencia de los espectros de fluorescencia con la concentración de fluoresceína, donde se observa que para la concentración más diluida se obtiene una intensidad máxima de alrededor 1300.

Por otro lado, en la figura 39 podemos apreciar el desplazamiento de Stokes entre la longitud de onda de máxima absorción (487 nm) y de máxima emisión (524 nm) para la Fluoresceína.

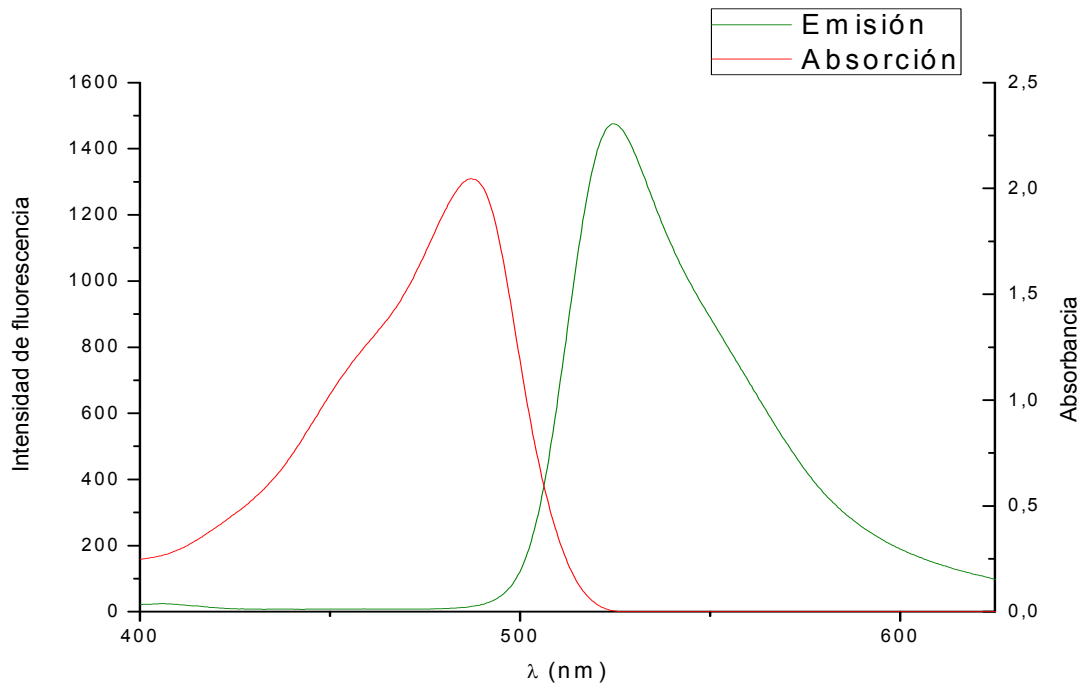


Figura 39: Comparación de los espectros de fluorescencia y absorción de una solución de Fluoresceína-SDS-H₂O.

IV.2.3. EFECTO DE LA VARIACIÓN DE LA X_V DE NANOPARTÍCULAS PARA UNA MISMA CONCENTRACIÓN DE FLUORESCÉINA.

Se prepararon muestras de nanopartículas-Fluoresceína-SDS dejando fija la concentración de Fluoresceína ($2,60 \times 10^{-4}$ M) y variando la X_V de nanopartículas de oro, manteniendo fijo el volumen total de solución y la proporción Fluoresceína-SDS, para observar los cambios que se producían en los espectros de fluorescencia.

Tabla 8: Datos de las muestras nanopartículas-Fluoresceína-SDS y valores de la intensidad de fluorescencia obtenidos para cada muestra.

Muestra	V Fluoresceína (mL)	V m45a (mL)	V SDS (mL)	X_v de m45a	Imáx
H3a	1,5	0,5	-	0,25	1933
H3b	1,5	0,4	0,1	0,20	1976
H3c	1,5	0,3	0,2	0,15	2010
H3d	1,5	0,2	0,3	0,10	2052
H3e	1,5	0,1	0,4	0,05	2083
H1a	1,5	0	0,5	0,00	2154
Muestra	V Fluoresceína (mL)	V m46a (mL)	V SDS (mL)	X_v de m46a	Imáx
H5a	1,5	0,5	-	0,25	1047
H5b	1,5	0,4	0,1	0,20	1228
H5c	1,5	0,3	0,2	0,15	1397
H5d	1,5	0,2	0,3	0,10	1581
H5e	1,5	0,1	0,4	0,05	1897
H1a	1,5	0	0,5	0,00	2154
Muestra	V Fluoresceína (mL)	V m47a (mL)	V SDS (mL)	X_v de m47a	Imáx
H7a	1,5	0,5	-	0,25	1690
H7b	1,5	0,4	0,1	0,20	1789
H7c	1,5	0,3	0,2	0,15	1860
H7d	1,5	0,2	0,3	0,10	1940
H7e	1,5	0,1	0,4	0,05	2068
H1a	1,5	0	0,5	0,00	2154
Muestra	V Fluoresceína (mL)	V m48a (mL)	V SDS (mL)	X_v de m48a	Imáx
H9a	1,5	0,5	-	0,25	245
H9b	1,5	0,4	0,1	0,20	367
H9c	1,5	0,3	0,2	0,15	542
H9d	1,5	0,2	0,3	0,10	838
H9e	1,5	0,1	0,4	0,05	1235
H1a	1,5	0	0,5	0,00	2154

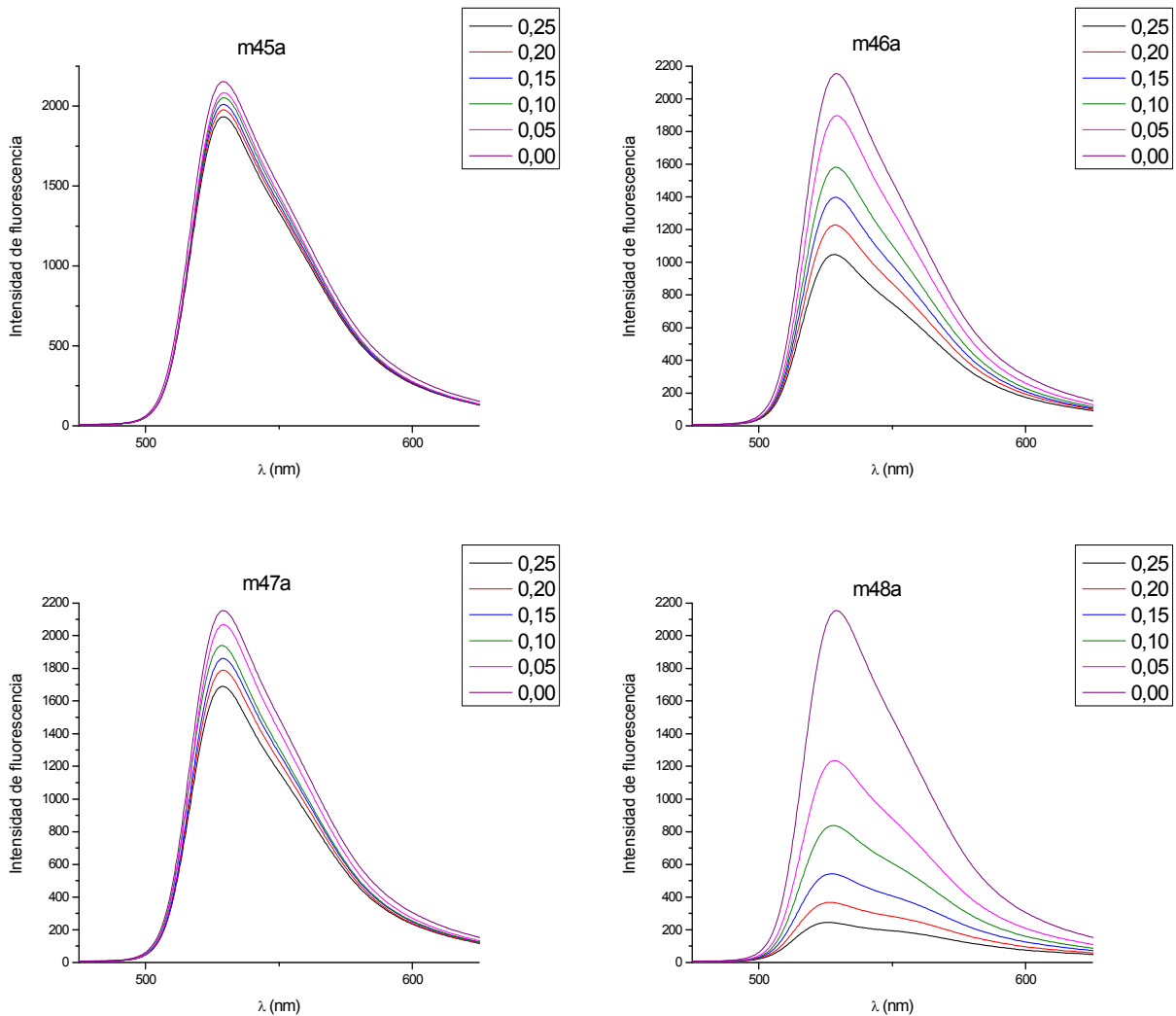


Figura 40: Variación de los espectros de fluorescencia en función de la X_v de nanopartículas de oro en muestras nanopartículas-Fluoresceína-SDS.

Al observar los espectros de fluorescencia obtenidos, se puede apreciar un decaimiento (quenching) en la intensidad máxima de fluorescencia de la Fluoresceína a medida que aumenta la X_v de nanopartículas de oro en cada muestra. Adicionalmente se puede apreciar como el patrón de decaimiento en la intensidad varía según la muestra de nanopartículas de oro utilizada.

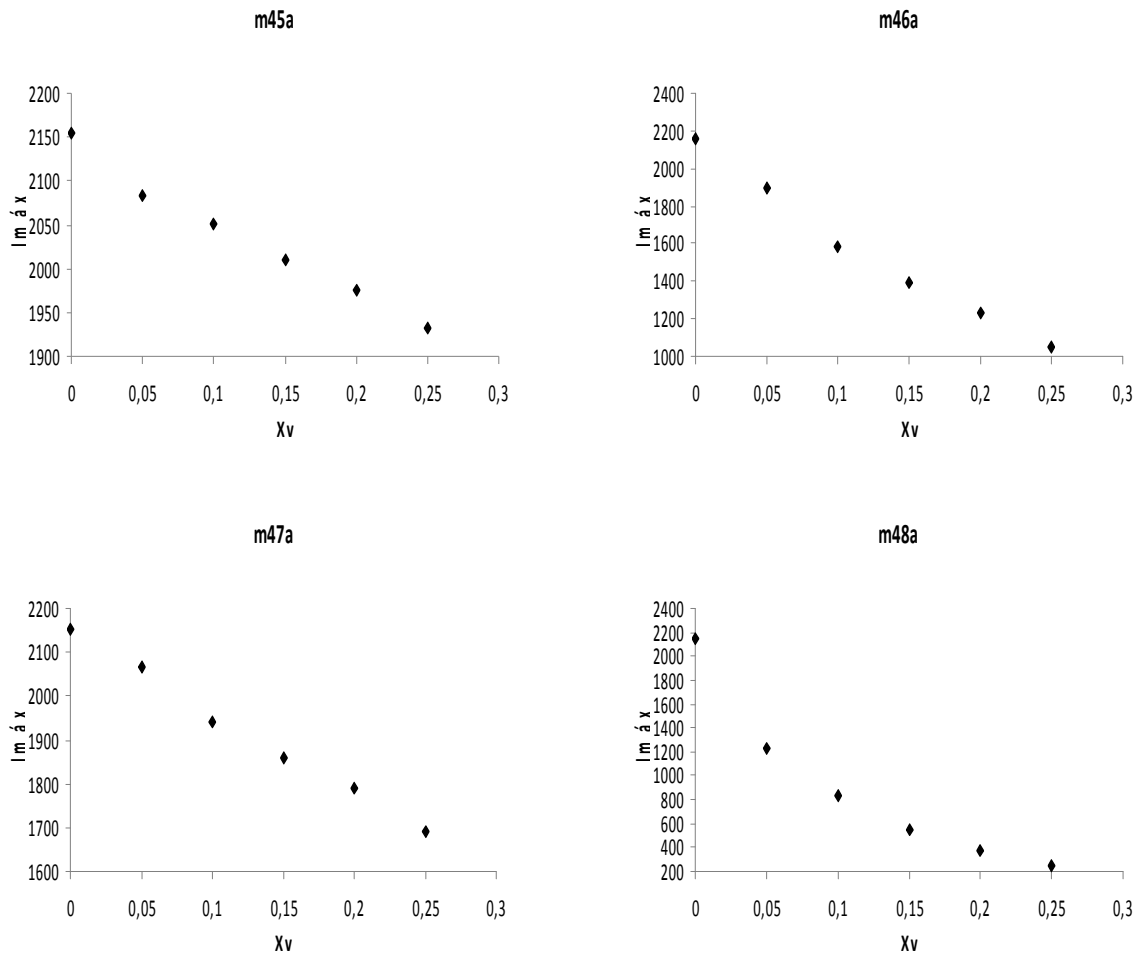


Figura 41: Variación de la $I_{máx}$ de fluorescencia en función de la X_v de nanopartículas de oro en muestras nanopartículas-Fluoresceína-SDS.

Al comparar las gráficas de la figura 42 se observa que para las muestras m45a, m46a y m47a el decaimiento en función de la X_v de nanopartículas de oro es lineal, mientras que para la muestra m48a el decaimiento de la intensidad máxima de fluorescencia muestra una tendencia exponencial.

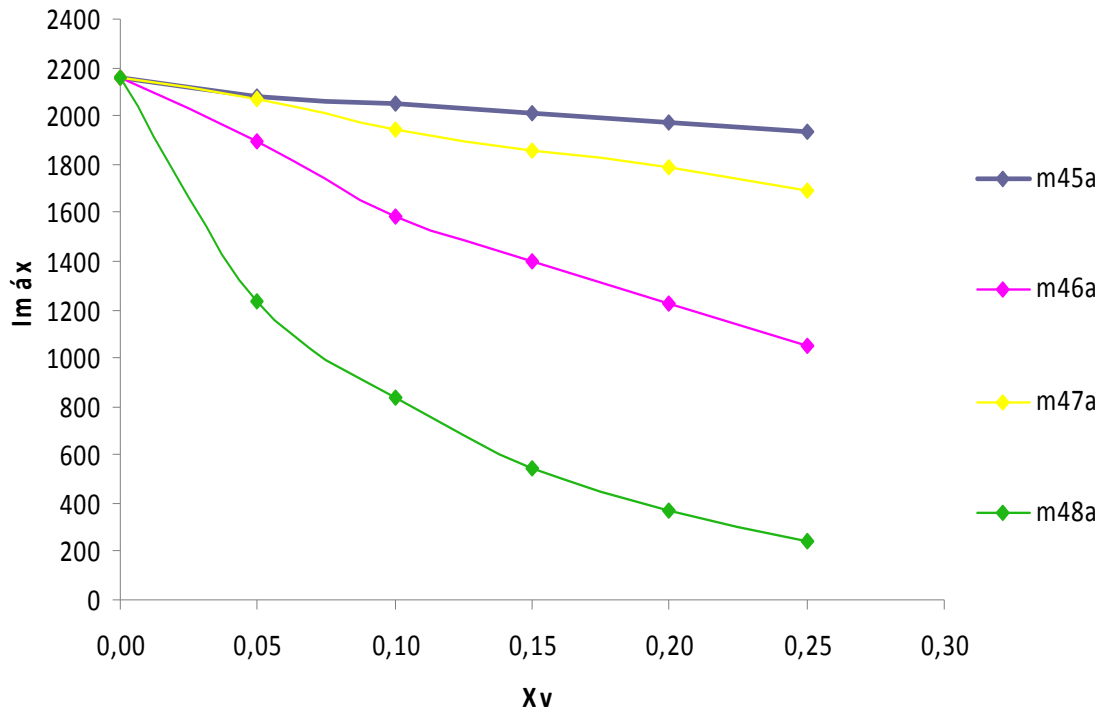


Figura 42: Comparación de la variación de la $I_{máx}$ de fluorescencia en función de la X_v de nanopartículas de oro en muestras nanopartículas-Fluoresceína-SDS.

En el caso particular de la muestra m48 se puede apreciar como se logra un quenching prácticamente completo de la intensidad de fluorescencia de la Fluoresceína.

Vale la pena destacar que la longitud de onda de excitación (410 nm) no coincide con el máximo de resonancia plasmónica de las nanopartículas de oro utilizadas (520 nm) y que las partículas de oro no presentan fluorescencia alguna. Adicionalmente el quenching causado por las moléculas de SDS es prácticamente despreciable y además ya se está considerando, debido a que siempre se mantuvo la proporción Fluoresceína-SDS en los blancos y en las muestras.

Todo lo mencionado anteriormente sugiere que el quenching observado es debido a la presencia de las nanopartículas de oro en el medio.

En la actualidad se sabe que las superficies metálicas son capaces de inducir un fuerte quenching de fluorescencia y que algunas en particular, como las de oro y plata, pueden generar un incremento en la misma.

La excitación de la resonancia plasmónica en la superficie del metal genera un incremento en la tasa de absorción del mismo. Por otro lado, el dipolo de emisión molecular interactúa con la resonancia plasmónica generando un incremento en la tasa de decaimiento radiativo. Sin embargo, la parte no radiativa del decaimiento genera un efecto de disminución adicional. El quenching de la fluorescencia se observa cuando este último efecto sobrepasa el efecto del incremento en la tasa de decaimiento radiativo.

Asimismo, un fluoróforo puede sufrir quenching cuando se encuentra a una distancia cercana del metal (k_m). Puede haber un incremento en la tasa de excitación (E_m) o puede haber un incremento en la tasa de decaimiento radiativo (Γ_m).³⁶ Estos fenómenos tienen una importante dependencia con la distancia metal-fluoróforo como se puede observar en la figura 43.

En nuestro caso el fenómeno observado en todas las muestras fue el quenching de fluorescencia, lo que indica que la distancia nanopartícula-Fluoresceína es bastante pequeña (alrededor de 1-100 Angstrom).

Como ya se ha mencionado anteriormente el quenching se refiere a cualquier proceso que disminuye la intensidad de fluorescencia de una muestra. Una variedad de interacciones pueden generar quenching. Estas incluyen reacciones de estado excitado,

rearrreglos moleculares, transferencias de energía, formación de complejos de estado fundamental y quenching colisional.

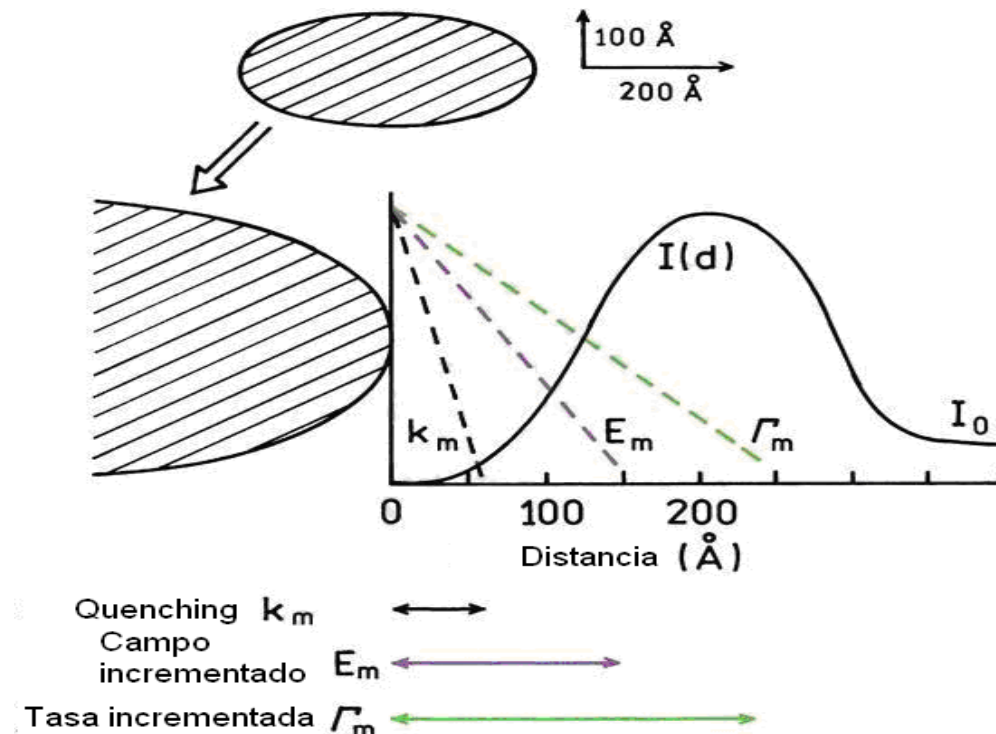


Figura 43: Efectos de una partícula metálica en las transiciones de un fluoróforo y la dependencia de cada uno con la distancia metal-fluoróforo.

Tanto el quenching estático como el quenching dinámico requieren de contacto molecular entre el fluoróforo y el quencher. En el caso del quenching dinámico o colisional, el quencher (elemento o sustancia que disminuye la intensidad de fluorescencia) debe difundirse al fluoróforo durante el tiempo de vida del estado excitado. Una vez entran en contacto, el fluoróforo regresa al estado fundamental sin la emisión de un fotón. En general el quenching ocurre sin ningún cambio permanente en las moléculas, es decir, no se produce una reacción fotoquímica. En el caso del quenching estático, se forma un complejo entre el quencher y el fluoróforo, y este complejo no presenta fluorescencia.

El quenching colisional de fluorescencia está descrito por la ecuación de Stern-Volmer (ecuación 1).

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

Donde, F_0 y F son las intensidades de fluorescencia en la ausencia y en presencia del quencher, respectivamente, k_q es la constante de quenching bimolecular, τ_0 es el tiempo de vida del fluoróforo en la ausencia de quencher y Q es la concentración de quencher. La constante de quenching de Stern-Volmer esta dada por $K_D = k_q \tau_0$.

La constante k_q refleja la eficiencia del quenching o la accesibilidad del fluoróforo al quencher. Un quenching controlado por difusión generalmente muestra valores de k_q cercanos a $1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Valores menores de k_q pueden deberse a impedimento estérico del fluoróforo o a una baja eficiencia de quenching. Valores superiores de k_q indican algún tipo de interacción de enlace o acoplamiento.

El quenching estático se genera por la formación de complejos de estado fundamental, que no presentan fluorescencia, entre el fluoróforo y el quencher. Cuando este complejo absorbe luz, éste vuelve inmediatamente al estado fundamental sin la emisión de un fotón.

El quenching estático se puede describir por la siguiente ecuación:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_s [Q] \quad (2)$$

$$\text{Donde, } K_s = \frac{[F-Q]}{[F][Q]} \quad (3)$$

Se puede observar como en este caso K_s es una constante que relaciona la concentración del complejo fluoróforo-quencher [F-Q] con la concentración de fluoróforo libre [F] y la concentración de quencher [Q].

Al igual que en el quenching dinámico se puede observar que para el quenching estático la dependencia de F_0/F con [Q] es lineal.³⁶

Al realizar las respectivas curvas F_0/F para los resultados obtenidos (figura 44) podemos observar una tendencia lineal para el caso de la muestra m45, en el caso de las muestras m46a y m47a se observa como la recta comienza a deformarse ligeramente hacia arriba, y ya para el caso de m48a se observa una clara desviación de la linealidad.

Esto sugiere que el quenching observado no es enteramente dinámico o estático, sino más bien una combinación de ambos. En este tipo de quenching combinado se observa generalmente una desviación de la linealidad y la formación de una curvatura hacia arriba en la gráfica F_0/F . La ecuación de Stern-Volmer que describe este tipo de quenching es la siguiente:

$$\frac{F_0}{F} = (1 + K_D[Q])(1 + K_s[Q]) \quad (4)$$

Esta forma modificada de la ecuación de Stern-Volmer (ecuación 4) es de segundo orden en [Q], debido a la curvatura observada cuando ocurre quenching dinámico y estático para un mismo fluoróforo.

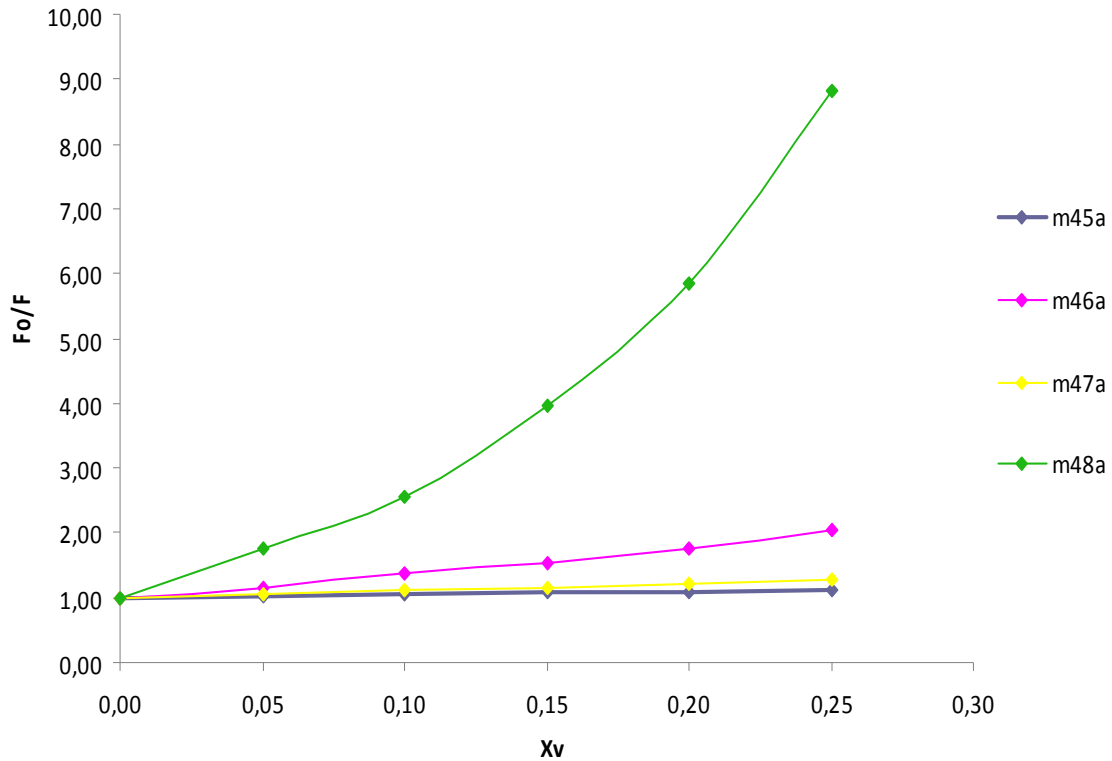


Figura 44: Gráfica de Stern-Volmer de la variación de F_0/F para una X_v de Fluoresceína de 0,75 en función de la X_v de nanopartículas de oro en muestras nanopartículas-Fluoresceína-SDS.

Las desviaciones positivas de la ecuación de Stern-Volmer, como la observada en nuestro caso, se observan frecuentemente cuando la magnitud del quenching es grande. En ciertos casos, esto no es debido a la formación de un complejo de estado fundamental, sino más bien el componente estático se debe a una distancia muy pequeña entre el quencher y el fluoróforo al momento de la excitación. Estos pares fluoróforo-quencher, muy cercanos entre sí, sufren un quenching inmediato.

Este tipo de quenching aparentemente estático es interpretado usualmente en términos de una “esfera de acción” en la cual la probabilidad de quenching es la

unidad. La forma modificada de la ecuación de Stern-Volmer que describe esta situación es la siguiente:

$$\frac{F_0}{F} = (1 + K_D [Q]) \exp ([Q]VN/1000) \quad (5)$$

Donde V es el volumen de la “esfera”.

Cuando el fluoróforo y el quencher se encuentran a una distancia muy pequeña, existe una gran probabilidad de que el quenching ocurra antes de que estas moléculas se difundan y se alejen una de otra. A medida que la concentración de quencher aumenta, aumenta la probabilidad de que exista un quencher dentro de la primera capa de solvente del fluoróforo al momento de la excitación.³⁶

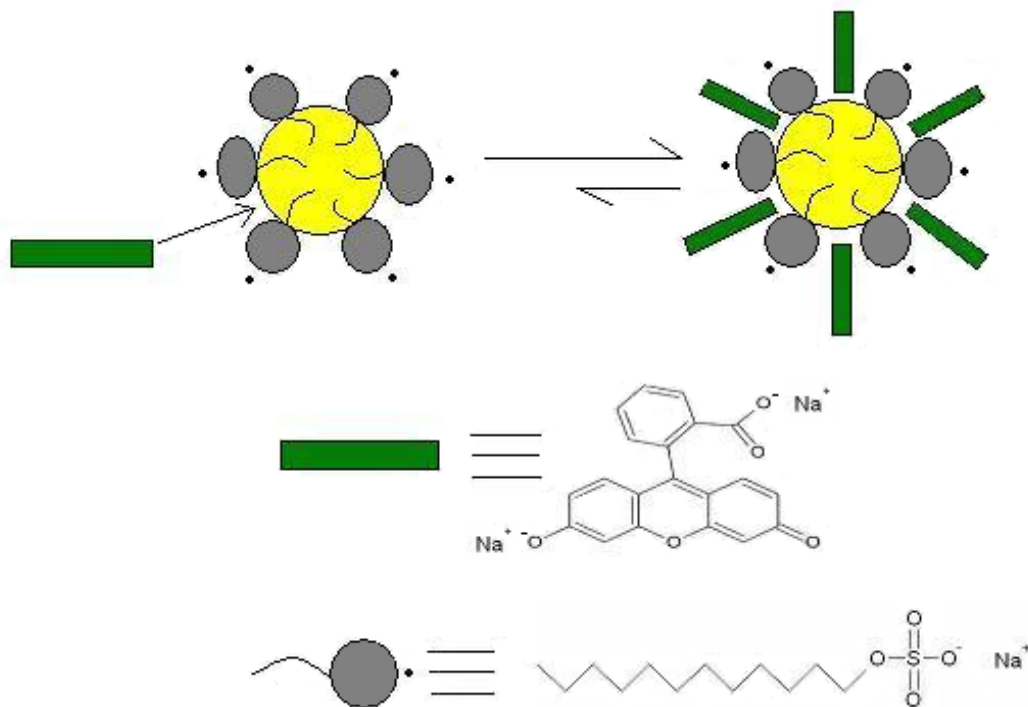


Figura 45: Posible complejo formado entre las nanopartículas de oro y la fluoresceína en un medio de SDS.

Si en nuestro caso el quenching fuese debido a la formación de un complejo de estado fundamental, el fenómeno sería algo similar a lo observado en la figura 45, donde se ve como se acoplan moléculas de fluoresceína alrededor de una nanopartícula de oro.

En la figura 46 se puede observar como al determinar el diámetro de las estructuras nanopartículas-fluoresceína no se observa un cambio aparente en el diámetro promedio de las nanopartículas.

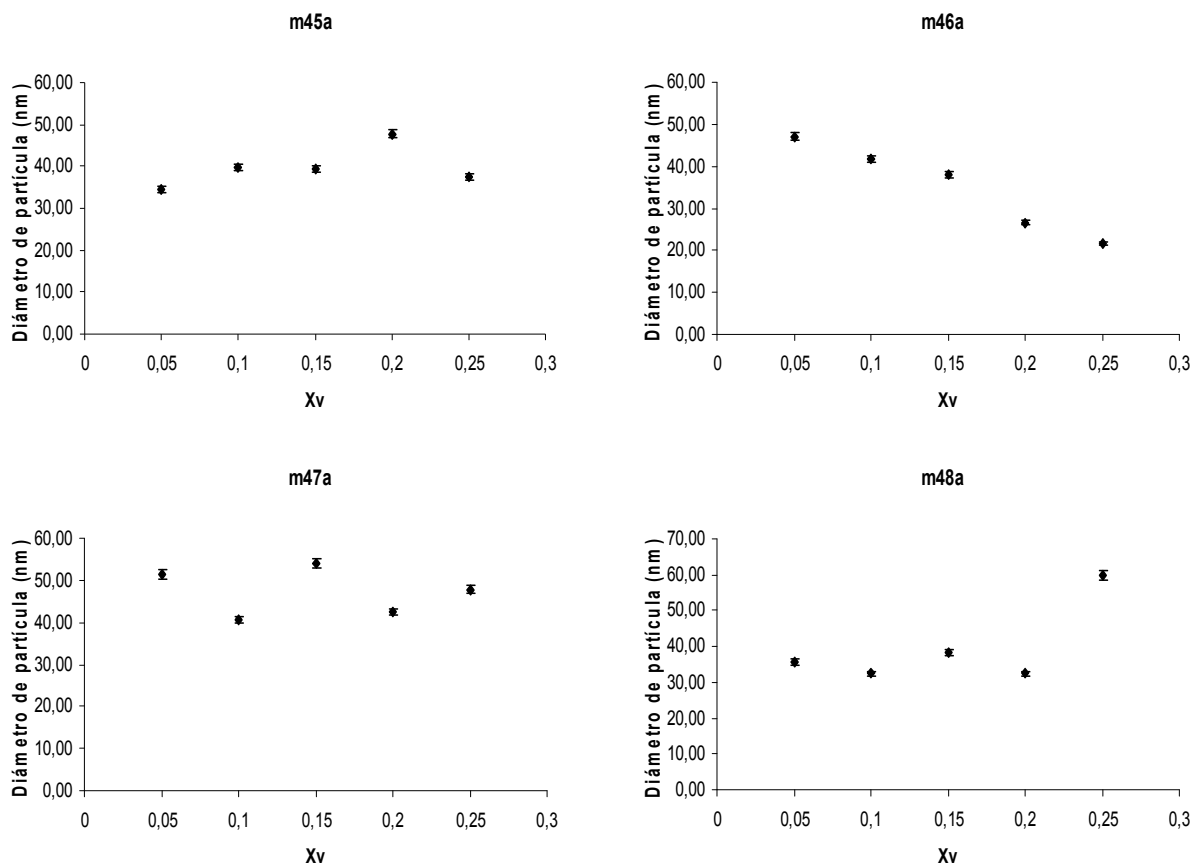


Figura 46: Variación del diámetro de partícula en función de la X_v de nanopartículas de oro en muestras nanopartículas-Fluoresceína-SDS.

Todo lo propuesto anteriormente hace pensar entonces que lo más probable es que el quenching observado es del tipo de “esfera de acción”, debido a una gran cercanía entre las nanopartículas de oro y las moléculas de Fluoresceína.

El mecanismo de quenching observado en estos casos es generalmente de transferencia de electrones o transferencia de energía. La transferencia de electrones se produce predominantemente en partículas menores a 5 nm. En nuestro caso las muestras utilizadas son mayores a 5 nm por lo que se puede afirmar que predomina la transferencia de energía. Una vez más, el grado de quenching se ve determinado por la distancia entre el fluoróforo y el núcleo metálico de la nanopartícula.

Una vez que una molécula donadora se encuentra cerca de la superficie de un metal conductor, comienza a darse una transferencia de energía resonante entre ambos. La probabilidad de que se de esta transferencia de energía depende de la superposición de la banda de emisión del fluoróforo con la banda de absorción de la partícula metálica.³⁴

En la figura 47 se puede observar la superposición completa de la banda de emisión de la fluoresceína con las bandas de absorción de todas las muestras de nanopartículas utilizadas. Esto garantiza una transferencia de energía eficiente entre la radiación emitida por la fluoresceína y los plasmones superficiales de las nanopartículas de oro.

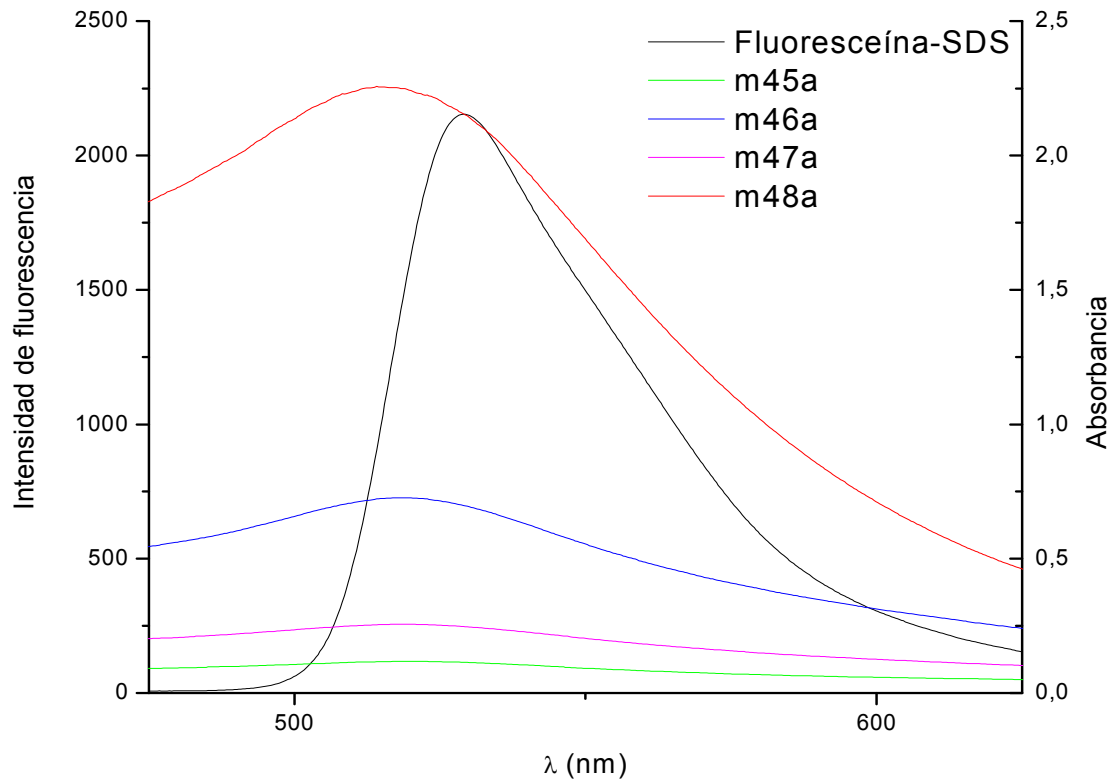


Figura 47: Solapamiento entre la emisión de la Fluoresceína y la absorbancia de las muestras de nanopartículas de oro utilizadas.

La dependencia del quenching con el diámetro promedio de las nanopartículas de oro utilizadas se puede observar en la figura 48. Se ve como a medida que el tamaño de la partícula aumenta, la disminución en la intensidad de fluorescencia es mayor.

En principio es de esperar que a medida que la partícula metálica disminuye de tamaño, comienza a incrementarse su relación área de superficie a volumen, lo cual permite un mejor arreglo de las moléculas de fluoróforo alrededor de la misma, y además la resonancia plasmónica se incrementa, aumentando aún más la capacidad de

la nanopartícula de absorber radiación. Lo cual se debería traducir en un mayor quenching de fluorescencia.

En nuestro caso se observa una tendencia opuesta debido a que las distribuciones de tamaño son amplias, lo que genera un desplazamiento en la magnitud del diámetro promedio. Sin embargo se ve como la muestra m48a produce un quenching casi total de la intensidad, y esta muestra fue generada a un alto valor de irradiancia, que en principio se traduce en un gran refraccionamiento de las partículas, y por lo tanto la presencia de muchas partículas de diámetro pequeño, dentro de una amplia distribución de tamaños. Adicionalmente el hecho de que hayan sido generadas utilizando un tiempo de ablación de 16 min, se traduce en una alta concentración de nanopartículas de oro en la muestra, lo cual genera un quenching mayor.

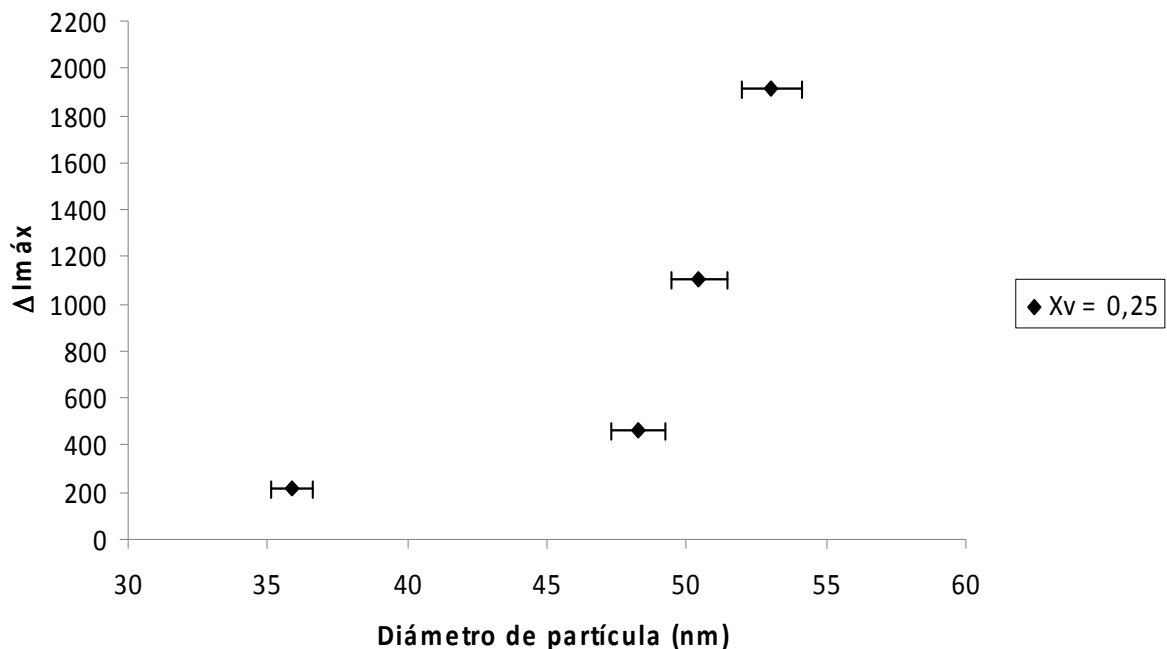


Figura 48: Variación de $\Delta I_{máx}$ en función del diámetro promedio de las nanopartículas de oro, para una X_v de nanopartículas de 0,25, en muestras nanopartículas-Fluoresceína-SDS.

IV.2.4. EFECTO DE LA VARIACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE FLUORESCÉINA PARA UNA MISMA X_V DE NANOPARTÍCULAS.

Tabla 9: Datos de las muestras nanopartículas-Fluoresceína-H₂O y valores de la intensidad de fluorescencia obtenidos para cada muestra.

Muestra	V Fluoresceína (mL)	V m45a (mL)	V H2O (mL)	[Fluoresceína] (M)	Imáx
H4a	1,5	0,5	-	2,60E-04	1917
H4b	1,3	0,5	0,2	2,30E-04	1714
H4c	1,1	0,5	0,4	1,90E-04	1749
H4d	0,9	0,5	0,6	1,60E-04	1600
H4e	0,6	0,5	0,9	1,05E-04	1249
Muestra	V Fluoresceína (mL)	V m46a (mL)	V H2O (mL)	[Fluoresceína] (M)	Imáx
H6a	1,5	0,5	-	2,60E-04	1072
H6b	1,3	0,5	0,2	2,30E-04	1029
H6c	1,1	0,5	0,4	1,90E-04	960
H6d	0,9	0,5	0,6	1,60E-04	875
H6e	0,6	0,5	0,9	1,05E-04	703
Muestra	V Fluoresceína (mL)	V m47a (mL)	V H2O (mL)	[Fluoresceína] (M)	Imáx
H8a	1,5	0,5	-	2,60E-04	1680
H8b	1,3	0,5	0,2	2,30E-04	1605
H8c	1,1	0,5	0,4	1,90E-04	1500
H8d	0,9	0,5	0,6	1,60E-04	1398
H8e	0,6	0,5	0,9	1,05E-04	1102
Muestra	V Fluoresceína (mL)	V m48a (mL)	V H2O (mL)	[Fluoresceína] (M)	Imáx
H10a	1,5	0,5	-	2,60E-04	257
H10b	1,3	0,5	0,2	2,30E-04	243
H10c	1,1	0,5	0,4	1,90E-04	223
H10d	0,9	0,5	0,6	1,60E-04	209
H10e	0,6	0,5	0,9	1,05E-04	167

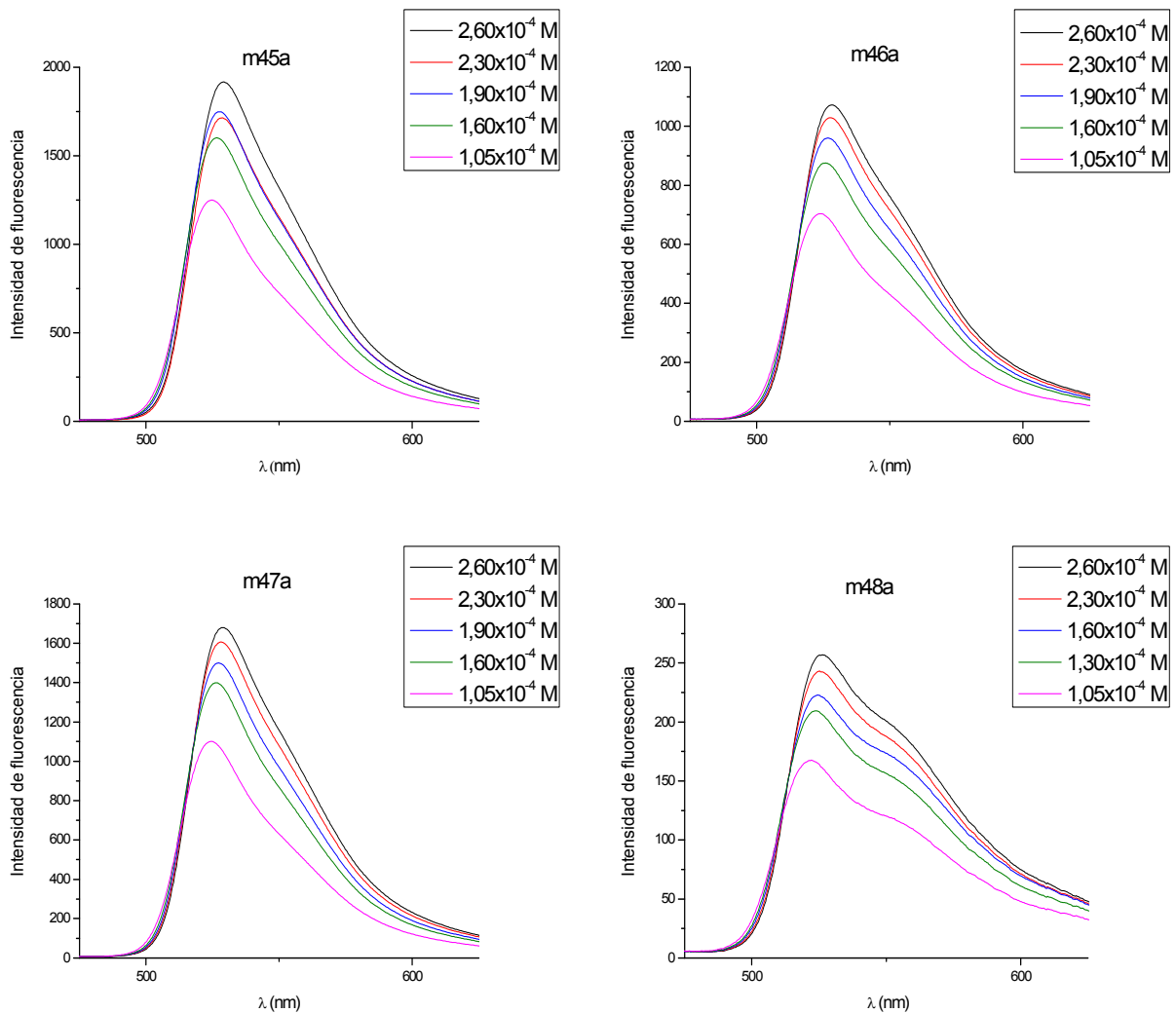


Figura 49: Variación de los espectros de fluorescencia en función de la concentración de Fluoresceína en muestras nanopartículas-Fluoresceína-H₂O.

Al observar los espectros de fluorescencia obtenidos para las muestras donde se mantuvo fija la X_v de nanopartículas de oro, se puede apreciar nuevamente quenching de la intensidad de fluorescencia, nuevamente un fuerte quenching es observado en la solución que contiene la muestra m48 de nanopartículas de oro.

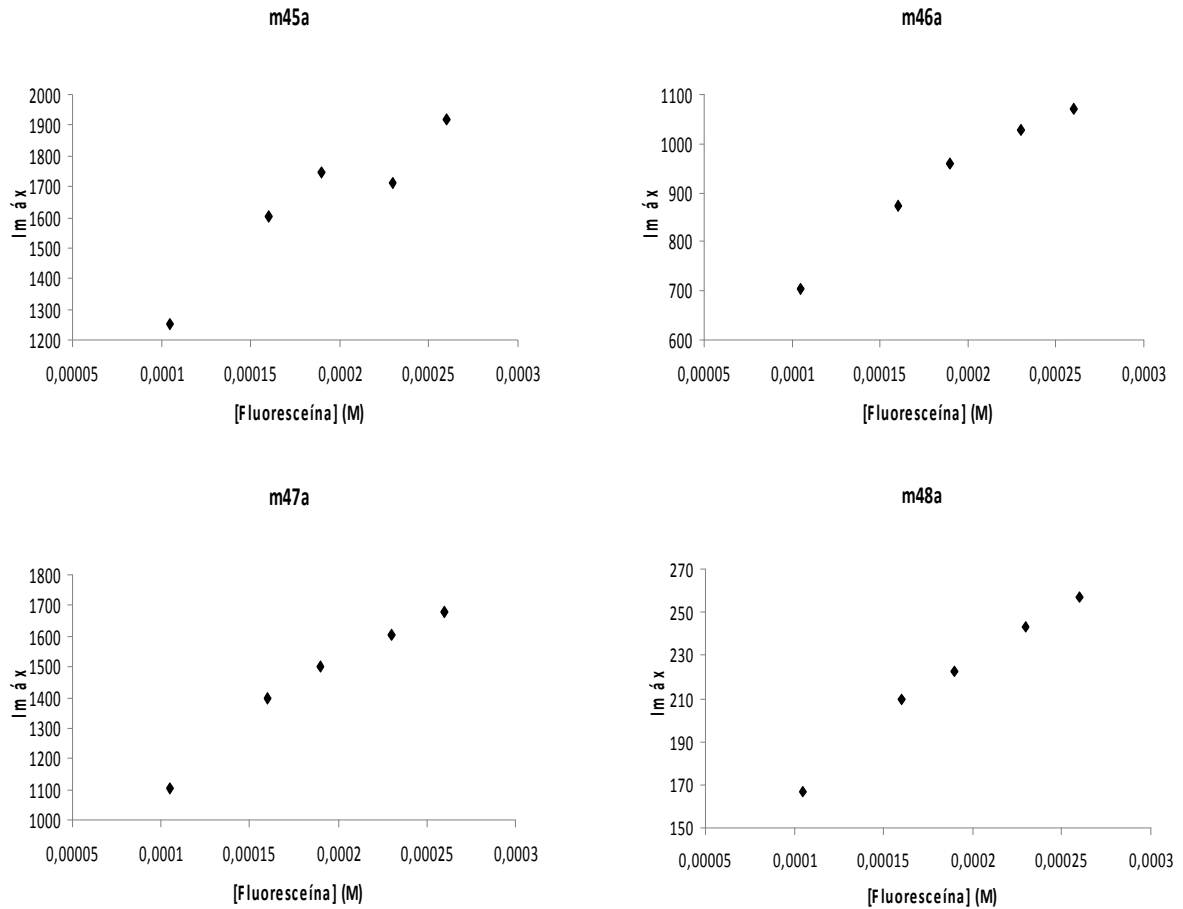


Figura 50: Variación de la $I_{máx}$ de fluorescencia en función de la concentración de Fluoresceína en muestras nanopartículas-Fluoresceína- H_2O .

En la figura 51 se observa como la dependencia de la intensidad de fluorescencia con la concentración de fluoróforo utilizada es la misma en todos los casos. En la figura 52 se puede apreciar como lo que varía es la magnitud del quenching observado en comparación con la curva de intensidad máxima vs concentración de la Fluoresceína-SDS.

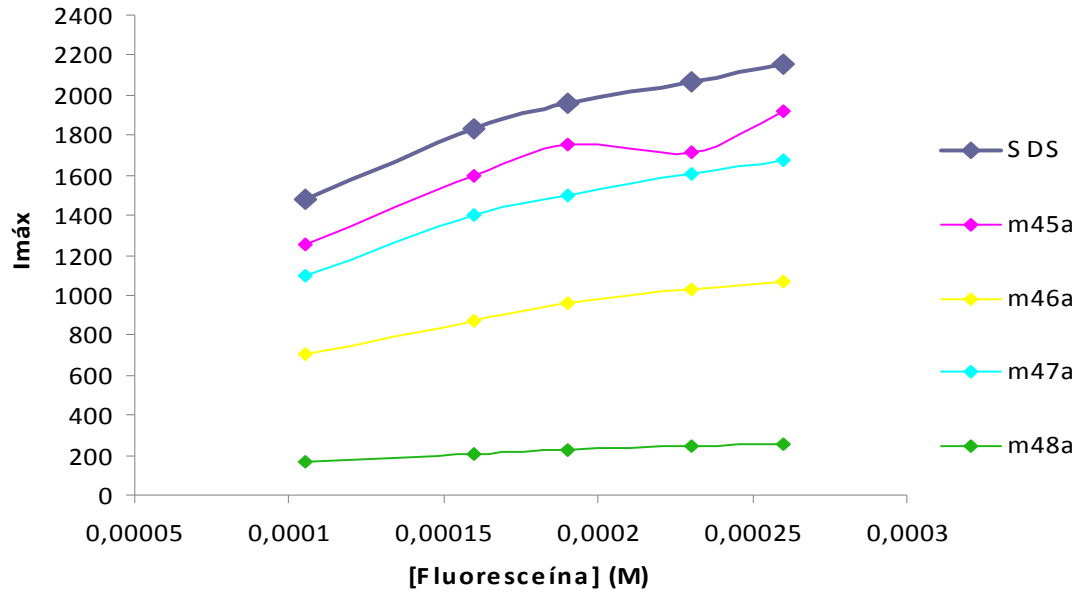


Figura 51: Comparación de la variación de la $I_{m\acute{a}x}$ de fluorescencia en función de la concentración de Fluoresceína en muestras nanopartículas-Fluoresceína- H_2O .

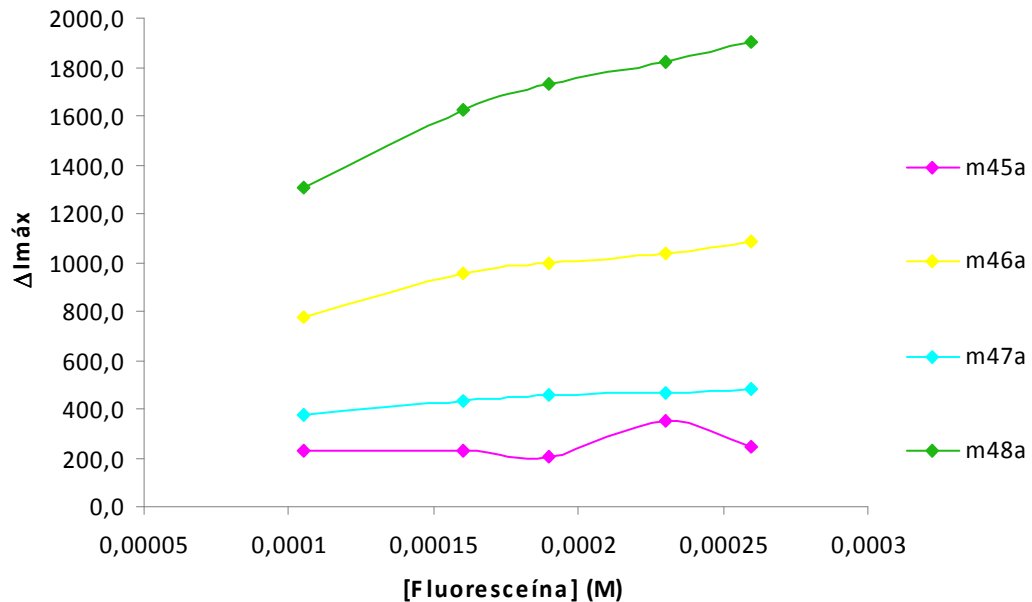


Figura 52: Comparación de la variación de la $\Delta I_{m\acute{a}x}$ de fluorescencia en función de la concentración de Fluoresceína en muestras nanopartículas-Fluoresceína- H_2O .

Con estos resultados se puede concluir que como se discutió anteriormente la concentración de quencher es el factor que domina el proceso y no la concentración de fluoróforo.

Por último no se observó una tendencia de variación de tamaño en las muestras nanopartículas-Fluoresceína (figura 53).

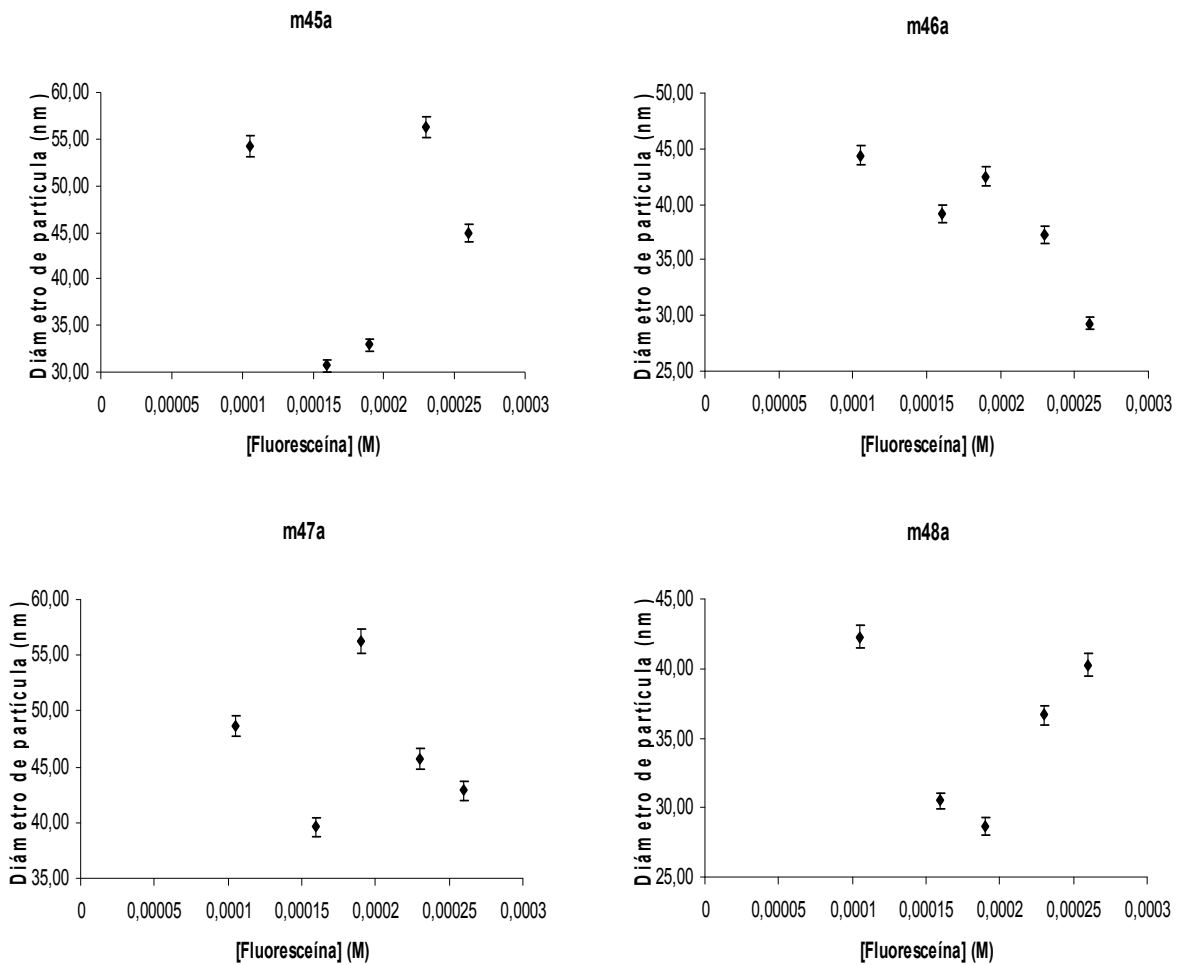


Figura 53: Variación del diámetro de partícula en función de la concentración de Fluoresceína en muestras nanopartículas-Fluoresceína-H₂O.

CONCLUSIONES

La técnica de ablación láser constituye un método rápido y eficiente para la generación de nanopartículas, que no requiere de modificaciones en el entorno químico del medio estabilizante.

A medida que se aumenta la concentración de SDS se estabilizan mejor las nanopartículas generadas y logra una ligera disminución en el diámetro promedio de partícula.

Un aumento en la irradiancia se traduce en un aumento en el refraccionamiento de las partículas generando soluciones con nanopartículas de diámetro promedio menor. Esta tendencia es observada hasta un valor límite de irradiancia después del cual el diámetro aumenta nuevamente debido a la agregación inducida por la gran cantidad de partículas en el medio.

Incrementos en el tiempo de ablación generan ensanchamiento en las distribuciones de tamaño obtenidas y una alta concentración de partículas en el medio.

La longitud de onda del máximo de absorción de las nanopartículas de oro es dependiente del diámetro de partícula. A medida que aumenta el diámetro promedio, la longitud de onda máxima aumenta. Se concluyó que esto debido a los efectos de confinamiento cuántico.

Las nanopartículas de oro son capaces de producir un quenching prácticamente completo en la emisión de fluorescencia de la Fluoresceína, y este quenching es dependiente de la X_v de nanopartículas en la muestra.

El quenching observado se debió a la gran cercanía entre las nanopartículas y las moléculas de fluoróforo y se concluyó que fue un quenching estático y dinámico del tipo “esfera de acción”.

Se concluyó que la transferencia de energía entre los pares nanopartícula-fluoróforo fue eficiente debido al completo solapamiento entre la banda de emisión de la Fluoresceína y las bandas de absorción de todas las nanopartículas utilizadas.

BIBLIOGRAFÍA

[1] Ying, Jackie. *Nanostructured Materials*. New York: Academic Press, 2001.

[2] <http://al-quimicos.blogspot.com/2006/11/nuevo-nanomaterial-del-gel-orgnico.html>
(2008)

[3] Jakob Kjelstrup-Hansen, *Integration of Nanocomponents in Microsystems*. MIC - Department of Micro and Nanotechnology, Technical University of Denmark, 2006.

[4] Fahlman, B. D. *Materials Chemistry*; Springer: Mount Pleasant, MI, 2007; **Vol. 1**, pp 282-283.

[5] http://en.wikipedia.org/wiki/Blue_shift (2008)

[6] <http://www.chm.bris.ac.uk/webprojects2002/etan/Webpages/> (2008)

[7] Buffat, Ph. & Burrel, J.-P. (1976), Size effect on the melting temperature of gold particles, *Physical Review A* **13** (6): 2287 - 2298

[8] <http://ec.europa.eu/health/opinions2/en/nanotechnologies/l-2/3-nanoparticle-properties.htm#0> (2008)

[9] S. Link y M. A. El-Sayed, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **Vol 54**, 2003, pp. 331-366.

[10] N. Nath y A. Chilkoti, *J. Fluores.*, **Vol 14(4)**, 2004, pp 377-389.

[11] <http://www.mjsajournal.org/features/0503/index.php> (2008)

[12] R. H. Hannik y A. J. Hill. Nanostructure control of materials. *Woodhead Publishing*. 1. 2006.

[13] Castañeda Priego, R. *Estructura e interacciones efectivas en soluciones coloidales*. Tesis PhD. CINVESTAV-IPN. 2003.

[14]<http://www.chemexper.com/cheminfo/servlet/org.chemcalc.ChemCalc?isograph=on&mformula=HauCl4> (2008)

[15]http://www2.sigmaaldrich.com/suite7/Area_of_Interest/Biochemicals/BioUltra/Detergents_Surfactants.html?cm_mmc=wiki_-_social_-_surfactants_-_Surfactants (2008)

[16] J. M. Seddon, R. H. Templer. Polymorphism of Lipid-Water Systems. *Handbook of Biological Physics*, Vol. 1, ed. R. Lipowsky, and E. Sackmann. © 1995, Elsevier Science B.V.

[17] Russo R. Laser Ablation, *Review*. **49**, **9**. 1995.

[18] N. A Kotov. *Nanoparticles Assemblies and Superstructures*. Taylor and Francis Ed. 2006.

[19] Koechner, Walter. *Solid-State Laser Engineering*, 2nd Edition, Springer-Verlag. (1988)

[20] M.F. Becker; J.R Brock; H. Cai; D.E. Henneke; J.W. Keto; J.Lee; W.T. Nichols; H.D. Glicksman, *Nanostructured Materials*, **10**, **5**, 853, 1998

[21] . F. Mafuné; J. Khono; Y. Takeda; T. Kondow; H. Sawabe, *J. Phys. Chem. B*, **106**, 7575, 2002

[22] <http://www.microscopy.ethz.ch/tem> (2008)

[23] E.L. Murphy and R.H. Good, Thermionic Emission and the Transition Region, *Phys. Rev.* **102(6)**, pp. 1464-1473 (1956).

[24] <http://www.microscopy.ethz.ch/elast> (2008)

[25] John C. H. Spence. *Experimental high-resolution Electron microscopy*. Oxford U. Press, NY. (1980/1988)

[26] Hutter E, Fendler J. Exploitation of Localized Surface Plasmon Resonance. *Adv. Mater.* 2004, **16, 19**, 1685-1706.

[27] S. Nath, S. K. Ghosh, S. Kundu, S. Praharaj, S. Panigrahi and T. Pal, J. Silver organosol: synthesis, characterisation and localised surface plasmon resonance study. *New J. Chem.*, 2005, **29**, 1527 – 1534.

[28] Berne, B. J., and R. Pecora. *Dynamic Light Scattering with Application to Chemistry, Biology and Physics*. Wiley, New York. (1976).

[29] Lakowicz, J.R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, New York Press.1983

[30] Axelrod D, Hellen EH, Fulbright RM.1992. Total internal reflection fluorescence. *Topics in Fluorescence Spectroscopy*, **Vol.3**, pp. 289-343. Ed. JR Lakowicz. Plenum Press, New York.

[31] Zhang and J. R. Lakowicz, Metal-enhanced fluorescence of an organic fluorophore using gold particles, *Opt. Express* **15**, 2598-2606 (2007).

[32] K. Aslan; S. Malyn; C. Geddes. Metal-Enhanced Fluorescence from Gold Surfaces: Angular Dependent Emisión. *Journal of Fluorescence*, **Volume 17**, Number 1, January 2007 , pp. 7-13(7).

[33] P. P. Pompa, L. Martiradonna, A. Della Torre, F. Della Sala, L. Manna, M. De Vittorio, F. Calabi, R. Cingolani & R. Rinaldi. Metal-enhanced fluorescence of colloidal nanocrystals with nanoscale control. *Nature Nanotechnology* **1**, 126 - 130 (2006).

[34] S. K. Gosh. ; A. Pal; S. Kundu; S. Nath; T Pal. Fluorescence quenching of 1-methylaminopyrene near gold nanoparticles: size regime dependence of the small metallic particles. *Chemical Physics Letters*, **Volume 395**, 2007 , pp. 366-372.

[35] F. Mafuné, J. Cono, Y. Takeda, T. Kondow, *J Pys. Chem. B*, **105**, 9050-9056 (2001)

[36] J. R. Lacowicz. *Principles of Fluorescence Espectroscopy*, **Third edition**, ed. Springer. 2006. pp. 277-285. 841-847.