



UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

TRABAJO FIN DE ESTUDIOS

Título

Estudio de nanoclústeres de oro

Autor/es

Irene Del Campo De Pedro

Director/es

JOSÉ MARÍA LÓPEZ DE LUZURIAGA FERNÁNDEZ, MIGUEL MONGE OROZ y
ALBA SORROCHE EZQUERRO

Facultad

Facultad de Ciencia y Tecnología

Titulación

Grado en Química

Departamento

QUÍMICA

Curso académico

2022-23



Estudio de nanoclústeres de oro, de Irene Del Campo De Pedro
(publicada por la Universidad de La Rioja) se difunde bajo una Licencia Creative
Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Unported.
Permisos que vayan más allá de lo cubierto por esta licencia pueden solicitarse a los
titulares del copyright.



**UNIVERSIDAD
DE LA RIOJA**

Facultad de Ciencia y Tecnología

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Grado en Química

ESTUDIO DE NANOCLÚSTERES DE ORO
STUDY OF GOLD NANOCLUSTERS

Realizado por:

Irene del Campo de Pedro

Tutelado por:

José María López de Luzuriaga Fernández

Miguel Monge Oroz

Alba Sorroche Ezquerro

Logroño, julio, 2023



ESTUDIO DE NANOCÚSTERES DE ORO

Realizado por:

Irene del Campo de Pedro

Tutelado por:

José María López de Luzuriaga Fernández

Miguel Monge Oroz

Alba Sorroche Ezquerro

Abreviaciones

4-AP	4-aminofenol
4-NP	4-nitrofenol
A	Alanina
Ala	Alanina
Arg	Arginina
Asp	Ácido aspártico
AuNCs	Nanoclústeres de oro
AuNPs	Nanopartículas de oro
C	Cisteína
CB	Banda de conducción
CPS	Cuentas por segundo
Cys	Cisteína
D	Ácido aspártico
DPBF	1,3-difenilisobenzofurano
FRET	Transferencia de energía de resonancia de fluorescencia
Glu	Ácido glutámico
Gly	Glicina
GSH	Glutathiona
HAADF	Detector Anular de Campo Oscuro de Ángulos Altos
HOMO	Orbital Molecular Ocupado de Mayor Energía
LSPR	Resonancia de Plasmón Superficial Localizado
LUMO	Orbital Molecular no ocupado de menor energía
NCs	Nanoclústeres
NIR	Infrarrojo cercano
NPs	Nanopartículas
P	Prolina
Pep-9	Nonapéptido
Pro	Prolina
R	Arginina
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RT	Temperatura ambiente
SR	Ligando tiol
STEM	Microscopía electrónica de transmisión con barrido
T	Treonina
Thr	Treonina
tht	Tetrahidrotiofeno
TIPS	Triisopropilsilano
UV-Vis	Ultravioleta visible
VB	Banda de valencia
XPS	Espectroscopía Fotoelectrónica de Rayos-X

Índice

1. Resumen.....	4
1.1. Resumen.....	4
1.2. Abstract.....	4
2. Introducción.....	5
3. Objetivos.....	9
4. Síntesis y caracterización de AuNCs.....	10
4.1. Síntesis y caracterización de AuNCs-(1).....	10
4.1.1. Síntesis.....	10
4.1.2. Caracterización.....	11
4.2. Síntesis y caracterización de AuNCs estabilizados con tioles.....	14
4.2.1. Síntesis.....	14
4.2.2. Caracterización.....	15
5. Propiedades de los AuNCs.....	22
5.1. Catálisis de la reacción de reducción de 4-nitrofenol a 4-aminofenol.....	22
5.2. Efecto fototérmico.....	28
5.3. Generación de $^1\text{O}_2$	31
6. Conclusiones.....	36
7. Experimental.....	37
7.1. Técnicas instrumentales y espectroscópicas utilizadas.....	37
7.1.1. Espectros de absorción UV-Vis en disolución.....	37
7.1.2. Microscopía electrónica de transmisión.....	37
7.1.3. XPS.....	37
7.2. Síntesis de nanoclústeres de oro.....	37
7.2.1. AuNCs-(1).....	37
7.2.2. AuNCs-cys (2) y AuNCs-GSH (3).....	37
7.2.3. AuNCs-pep9 (4).....	37
7.3. Preparación de las muestras de XPS.....	38
7.4. Catálisis de reducción de 4-NP a 4-AP.....	38
7.5. Medidas del efecto fototérmico.....	38
7.6. Generación de $^1\text{O}_2$	39
8. Bibliografía.....	40

1. Resumen

1.1. Resumen

Los nanoclústeres de oro (AuNCs) son materiales muy atractivos debido a sus propiedades únicas y están caracterizados por presentar un tamaño menor a 2 nm. En este trabajo, se ha desarrollado un método organometálico sencillo para la síntesis de nanoclústeres de oro con ligandos tiolato como agentes estabilizantes, a partir del precursor $[\text{Au}(\text{C}_6\text{F}_5)(\text{tht})]$ (tht = tetrahidrotiofeno) utilizando triisopropilsilano como agente reductor. Los ligandos empleados han sido la cisteína, glutatióna y un oligopéptido de 9 aminoácidos, dando lugar a los nanomateriales **AuNCs-cys (2)**, **AuNCs-GSH (3)** y **AuNCs-pep9 (4)**.

Se ha llevado a cabo su caracterización mediante técnicas espectroscópicas de absorción UV-Vis y Espectroscopía Fotoelectrónica de Rayos-X (XPS), así como técnicas de microscopía electrónica (HAADF-STEM), confirmando la presencia de AuNCs homogéneamente distribuidos

Además, se ha evaluado la capacidad catalítica de los cuatro materiales sintetizados mediante la reducción del contaminante 4-nitrofenol a 4-aminofenol obteniéndose buenos resultados en todos los casos. Este estudio ha mostrado una dependencia con el agente estabilizante empleado, dando mejores resultados para el más voluminoso de ellos, que corresponde al nonapéptido.

Por último, los nanoclústeres sintetizados han presentado buenas propiedades fototérmicas en presencia de un láser de 808 nm, logrando una conversión de la luz en energía térmica de manera eficiente. Además, el nanomaterial **AuNCs-pep9 (4)** ha mostrado propiedades fotodinámicas prometedoras, al ser capaz de dar lugar a especies reactivas de oxígeno bajo la irradiación de un láser NIR.

1.2. Abstract

Gold nanoclusters (AuNCs) are very attractive materials due to their unique properties and are characterized by having a size smaller than 2 nm. In this work, a simple organometallic method has been developed for thiolate-protected gold nanoclusters synthesis, using the precursor $[\text{Au}(\text{C}_6\text{F}_5)(\text{tht})]$ (tht = tetrahydrothiophene) and triisopropylsilane as reducing agent. Cysteine, glutathione and a 9 amino acid oligopeptide have been used as protecting ligands, leading to the nanomaterials **AuNCs-cys (2)**, **AuNCs-GSH (3)** and **AuNCs-pep9 (4)**.

Its characterization has been carried out using UV-Vis absorption spectroscopic techniques and X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS), as well as electron microscopy techniques (HAADF-STEM), which have confirmed the presence of homogeneously distributed AuNCs.

In addition, good results have been obtained for the four materials synthesized when evaluating the catalytic performance by reducing the pollutant 4-nitrophenol to 4-aminophenol. This study has shown a stabilizing agent dependence, attaining better results for the bulkiest of them, which corresponds to the nonapeptide.

Finally, the synthesized nanoclusters have shown good photothermal properties in the presence of an 808 nm laser, achieving efficient conversion of light into thermal energy. In addition, **AuNCs-pep9 (4)** has shown promising photodynamic properties, being able to generate reactive oxygen species under NIR laser irradiation.

2. Introducción

Los **nanomateriales** son aquellos que presentan al menos una de sus dimensiones en la escala nanométrica (entre 1 y 100 nm). Debido a sus propiedades ópticas, luminiscentes y magnéticas, se utilizan en diversos campos como la electrónica, medicina, catálisis y agricultura, entre otros.¹

La reducción del tamaño de los materiales aumenta la proporción de átomos en la superficie y, por lo tanto, los nanomateriales exhiben una mayor relación área superficial/volumen, lo que da como resultado cambios anómalos en sus propiedades. Debido a su pequeño tamaño, estas propiedades no pueden ser explicadas con la mecánica clásica, sino que obedecen a las leyes de la mecánica cuántica. Además, la presencia de gran número de átomos en la superficie coordinativamente insaturados provoca una mayor actividad química que en los materiales de mayor escala.²

Según su dimensionalidad, se pueden **clasificar** en nanomateriales de dimensión cero (0D), donde las tres dimensiones se encuentran en la escala nanométrica; unidimensionales (1D), con dos dimensiones de menos de 100 nm; y bidimensionales (2D), con solo una dimensión de tamaño nanométrico.² Ejemplos de estos nanomateriales son nanopartículas, nanoclústeres y nanocristales (0D); nanofibras, nanohilos, nanovarillas y nanotubos (1D); y nanoláminas y nanocapas (2D).

Se han desarrollado diversas técnicas de **síntesis** para conseguir diferentes tipos de nanomateriales con tamaño, forma, estructura y dimensión controlados. Estas técnicas se pueden dividir en dos categorías (Figura 1): *top-down* (de arriba hacia abajo) y *bottom-up* (de abajo hacia arriba). La primera de ellas consiste en la reducción de un material macroscópico a la escala nanométrica. Se utilizan métodos como la ultrasonificación, la ablación con láser y la descomposición térmica para dividir los materiales masivos en otros más pequeños. En cuanto al enfoque de abajo hacia arriba, los nanomateriales se sintetizan a partir de la acumulación de átomos hasta formar grupos y estructuras a nanoescala. Métodos como la reducción fotoquímica, la precipitación química, la microemulsión, la reducción microbiana y métodos hidrotermales son ejemplos de esta segunda categoría.³ Permite producir partículas de tamaño más pequeño y tiene mayor precisión y control sobre el proceso, además de menor pérdida de energía en comparación con el método *top-down*.⁴

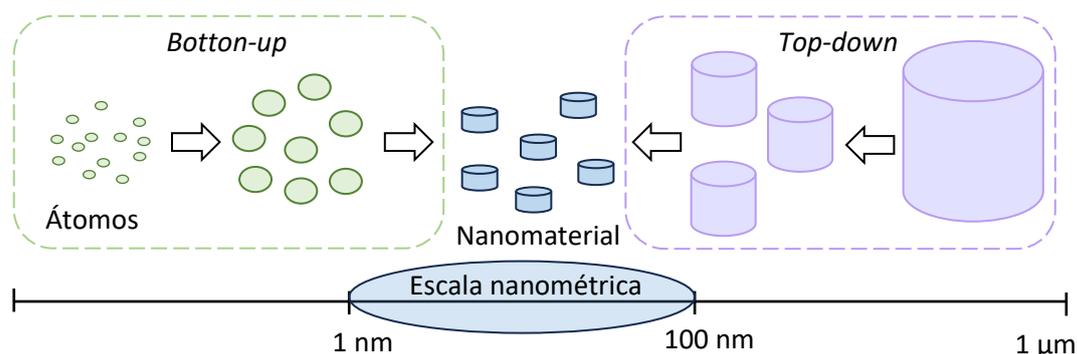


Figura 1. Esquema de las aproximaciones *bottom-up* y *top-down* para la síntesis de nanomateriales.

Los avances en las nuevas técnicas de síntesis hacen posible la preparación de **nanopartículas** de gran variedad de formas como esféricas, cubos, prismas, hexágonos, octaedros, discos, alambres, varillas, tubos, etc. Las propiedades de las nanopartículas no solo dependen del tamaño, sino que también están relacionadas con su forma. Por ejemplo, la actividad catalítica, propiedades eléctricas, ópticas, el punto de fusión y las características de resonancia de plasmón superficial localizado dependen de la morfología de las partículas.⁴

Las nanopartículas plasmónicas se distinguen del resto, como quantum dots, nanopartículas magnéticas y poliméricas, porque presentan **Resonancia de Plasmón Superficial Localizado (LSPR)**.⁵ Este fenómeno óptico tiene lugar cuando la nanopartícula metálica es más pequeña que la longitud de onda de la luz incidente.⁶ Cuando una nanopartícula metálica se expone a la luz, el campo electromagnético de la luz induce una oscilación coherente colectiva de los electrones libres del metal. Esta oscilación provoca una separación de carga con respecto a la red iónica, dando lugar a una oscilación dipolar a lo largo de la dirección del campo eléctrico de la luz (Figura 2). La amplitud de la oscilación alcanza el máximo a una frecuencia específica e induce una fuerte absorción de la luz y, por lo tanto, puede ser detectado con un espectrofotómetro de absorción UV-Vis.⁵

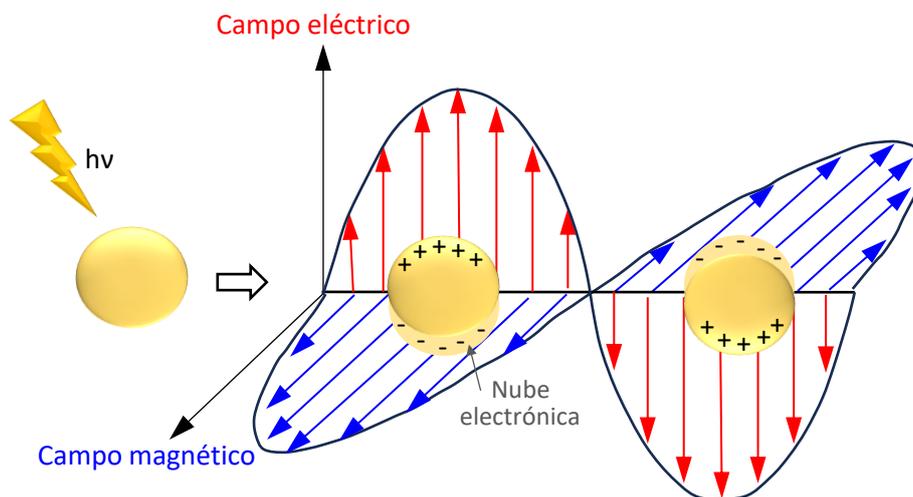


Figura 2. Ilustración esquemática de la Resonancia de Plasmón Superficial Localizado (LSPR).

La intensidad de la banda LSPR y la longitud de onda dependen de factores como la forma de las nanopartículas, así como del metal, composición, estructura y tamaño.⁵ En general, las AuNPs de 5 a 50 nm de tamaño exhiben un pico de absorción pronunciado en el rango de 520 a 530 nm.⁶ La Figura 3 proporciona una descripción general de los efectos sobre la banda LSPR de nanopartículas de oro que ejercen diferentes parámetros como el tamaño de partícula y la morfología. Se observa que para AuNPs esféricas, la posición de la banda se desplaza hacia el rojo al aumentar su diámetro. La desviación de la geometría esférica también provoca un desplazamiento hacia longitudes de onda mayores, con mayor efecto para una menor variación de tamaño en comparación con las AuNPs esféricas.⁷

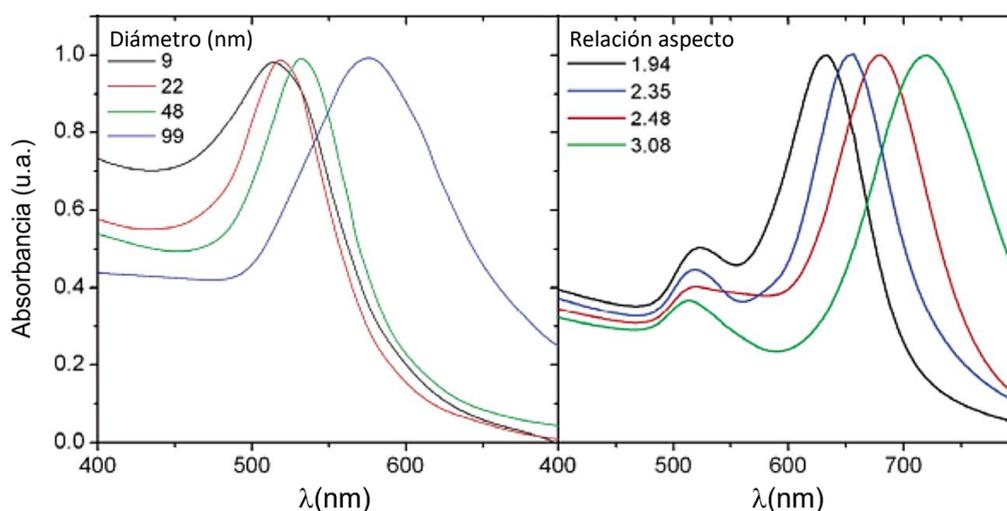


Figura 3. Espectro de absorción UV-Vis experimental para a) AuNPs esféricas con diámetros variables y b) Nanorods de Au.⁷

Los **nanoclústeres metálicos (NCs)** son un tipo de nanomaterial cuyo núcleo comprende de unos pocos a cientos de átomos metálicos y la capa exterior consta de ligandos que protegen el núcleo de la agregación. El tamaño de los nanoclústeres de oro (AuNCs) suele ser inferior a 2 nm, un tamaño comprendido entre las nanopartículas AuNPs y las moléculas discretas (Figura 4).⁸

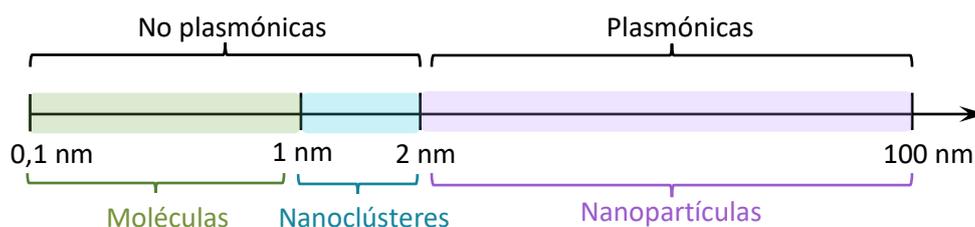


Figura 4. Escala de tamaños de nanomateriales 0D.

Los AuNCs exhiben efectos de confinamiento cuántico debido a su pequeño tamaño y niveles de energía discretos, con estados electrónicos similares a las moléculas y un *band-gap* HOMO-LUMO distinto de cero.¹¹ Además, presentan algunas propiedades de tipo molecular, como múltiples picos de absorción visibles, luminiscencia sintonizable y dinámica de estado excitado de tipo molecular. A diferencia de las moléculas, los AuNCs poseen áreas superficiales específicas altas y gran cantidad de sitios de reacción insaturados, lo que conduce a altas actividades catalíticas y selectividad única en reacciones catalíticas como oxidación, hidrogenación y acoplamiento C-C.⁸ Por el contrario, las AuNPs presentan niveles de energía continuos o semicontinuos (Figura 5).⁹

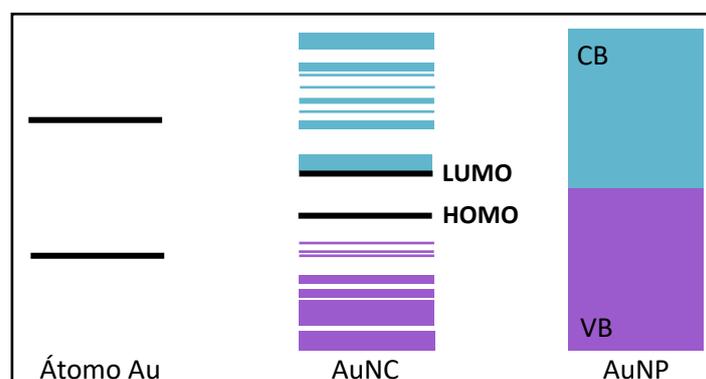


Figura 5. Esquema de los estados electrónicos en función del tipo de partícula.

Los espectros de absorción UV-Vis de los nanoclústeres y nanopartículas son también distintos. Los AuNCs no presentan la banda correspondiente a la resonancia plasmónica superficial, sino que pueden presentar múltiples picos en sus espectros de absorción¹¹ debido a transiciones de un solo electrón entre los niveles de energía discretos⁸. En la Figura 6, se observa el pico de absorción correspondiente a LSPR para la nanopartícula Au₂₄₀₆, mientras que esta banda está ausente para Au₂₅, Au₅₅ y Au₁₄₀, lo que confirma que los tres últimos corresponden a nanoclústeres. Además, entre ellos también se observan diferencias que dependen de su tamaño, lo que sugiere que las características moleculares aumentan a medida que disminuye el tamaño del núcleo¹⁰.

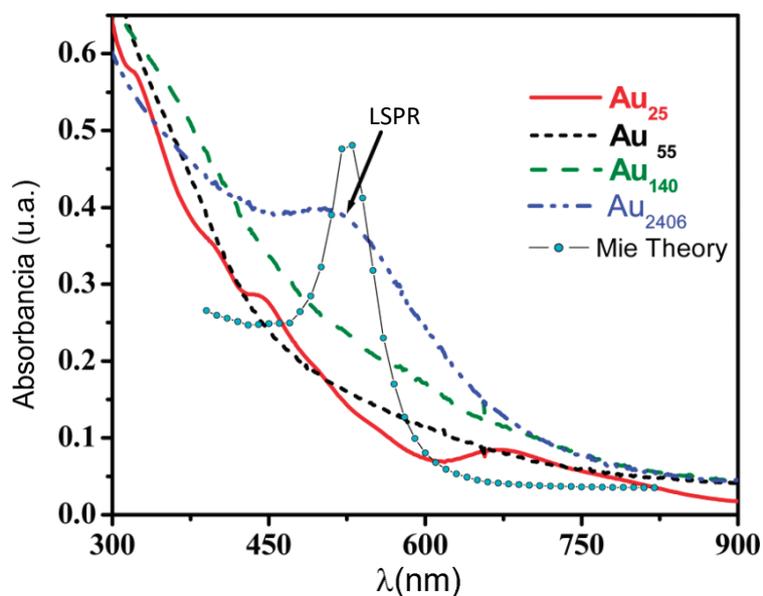


Figura 6. Espectros de absorción UV-vis-NIR de AuNP y AuNCs.¹⁰

Para evitar la agregación de las nanopartículas, es importante el uso de **agentes estabilizantes**. La modificación de la superficie con estos ligandos protectores es importante para lograr suficientes fuerzas de repulsión entre las partículas que impidan su agregación y ayuden a su estabilización. Con esta finalidad, se utilizan varios compuestos orgánicos como tensoactivos, compuestos orgánicos bifuncionales, polímeros naturales o materiales biológicos, oligómeros o polímeros que portan diferentes grupos funcionales. Estos grupos funcionales del ligando también alteran las propiedades de las nanopartículas.¹²

En el caso de AuNCs, se pueden utilizar numerosos ligandos orgánicos para su protección, como tiolatos, fosfinas, selenolatos, teluratos, carbenos y alquinos. Entre estos ligandos protectores, los tiolatos son los más atractivos debido al fuerte enlace entre el oro y el azufre.⁹

La alta estabilidad de las nanopartículas de oro protegidas con ligandos de tipo tiolato es debida al fuerte enlace covalente entre el azufre y el oro, responsable de la difícil disociación del ligando de la superficie de la nanopartícula. Además, las cadenas carbonadas de estos ligandos ofrecen una protección estérica y evitan la agregación.¹³

Como ya se ha comentado, los AuNCs, debido a su pequeño tamaño exhiben una gran área superficial, con abundantes sitios activos insaturados, lo que provoca que presenten una excelente actividad catalítica. Además, debido a la presencia de niveles de energía discretos y propiedades electrónicas controlables, han sido muy estudiados en los campos de termocatálisis y electrocatálisis. En la actualidad, los AuNCs se han utilizado en la conversión fotocatalítica de compuestos orgánicos, la degradación fotocatalítica de colorantes, la reducción fotocatalítica de CO₂ y la fototerapia.⁸ De todos ellos, la **fototerapia** está adquiriendo gran importancia debido a que se trata de una tecnología de tratamiento contra virus, bacterias¹⁴ y células tumorales prometedora con pocos efectos secundarios y alta eficacia.⁸ Se aprovecha la interacción entre la luz y los materiales para convertir la luz en calor (terapia fototérmica) o iniciar la generación de especies reactivas de oxígeno ROS (terapia fotodinámica).¹⁵

Por todo ello, debido a sus propiedades únicas, los nanoclústers de metales nobles, especialmente los de oro, han atraído mucho la atención en las últimas décadas. El presente trabajo se centrará en el estudio de estos compuestos (AuNCs), desde su síntesis y caracterización hasta la evaluación de sus propiedades.

3. Objetivos

Uno de los objetivos de este trabajo es **sintetizar** nanoclústeres de oro estabilizados con ligandos de tipo tiolato (**AuNCs-SR**). Para ello, se han seleccionado tres ligandos con un grupo tiol en su estructura, que además forman parte de la familia de los péptidos. Se trata del aminoácido cisteína (cys), el tripéptido glutathiona (GSH) y un nonapéptido. Todos ellos tienen en común un mismo aminoácido en su estructura, la cisteína, que presenta un grupo tiol (-SH). Con esta idea, se pretende además de comparar el efecto de los diferentes ligandos sobre las propiedades de los AuNCs, obtener una metodología de síntesis aplicable a ligandos de mayor tamaño que puedan tener interés biológico.

Una vez lograda la síntesis de estos nanomateriales, se ha llevado a cabo su **caracterización** morfológica y de composición. Las técnicas espectroscópicas de absorción UV-Vis y Espectroscopía Foelectrónica de Rayos-X (XPS), así como técnicas de microscopía electrónica (HAADF-STEM), han permitido visualizar y confirmar la presencia de los nanoclústeres deseados, así como dar información sobre el tamaño de los mismos y del estado de oxidación de sus elementos componentes.

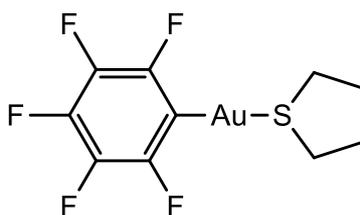
Además, debido a que los AuNCs presentan una excelente actividad catalítica gracias a su gran área superficial, otro de los objetivos de este estudio es la evaluación de la **capacidad catalítica** de los nanoclústeres sintetizados. Para ello, se ha empleado la reacción de reducción de 4-nitrofenol a 4-aminofenol, que permite comparar la actividad de distintos catalizadores y puede monitorizarse fácilmente mediante espectroscopía de absorción UV-Vis.

Por último, se ha propuesto evaluar la **capacidad fototérmica y fotodinámica** de los nanomateriales sintetizados debido a que la fototerapia es una tecnología muy interesante con aplicaciones importantes en el tratamiento oncológico y antibacteriano.

4. Síntesis y caracterización de AuNCs

Inicialmente, el método de síntesis de AuNCs más utilizado se basó en un procedimiento en dos pasos: en el primero de ellos una sal de Au(III), generalmente HAuCl_4 , se disolvía en agua y se transfería a un disolvente orgánico utilizando un reactivo de transferencia de fase. En el segundo paso, se añadía el agente reductor NaBH_4 y los ligandos protectores, reduciendo los iones de Au y dando lugar a pequeñas nanopartículas en la fase orgánica. Tales condiciones de reacción a menudo conducían a cierta polidispersidad en los nanomateriales. Posteriormente, las modificaciones en la proporción de tiolato con respecto a oro y un mayor exceso del reductor han conseguido dar lugar a AuNCs de tamaños de hasta 1,5 nm.⁹ Las condiciones de reacción optimizadas para sintetizar nanoclústeres de oro incluyen usar un exceso de tiol para convertir Au(III) en polímeros de Au(I)-SR y usar un gran exceso de agente reductor (típicamente 10 equivalentes de NaBH_4 por mol de oro) para reducir Au(I) a Au(0).¹⁶ Además, en los últimos años se han desarrollado metodologías atómicamente precisas.⁹

La aproximación utilizada para la síntesis de AuNCs en este trabajo consiste en un método de tipo *bottom-up* centrado en la reducción del precursor organometálico $[\text{Au}(\text{C}_6\text{F}_5)(\text{tht})]$ (tht = tetrahidrotiofeno) (Esquema 1). A diferencia de los precursores de oro más utilizados en las síntesis reportadas en la bibliografía, se trata de un compuesto organometálico de Au(I), en lugar de una sal de Au(III). Esto provocaría que no fuese necesario tanto exceso del ligando tiol en comparación con el oro, ya que no se produce el paso de reducción de Au(III) a Au(I). Además, una de las ventajas de trabajar con precursores organometálicos es su mayor estabilidad.



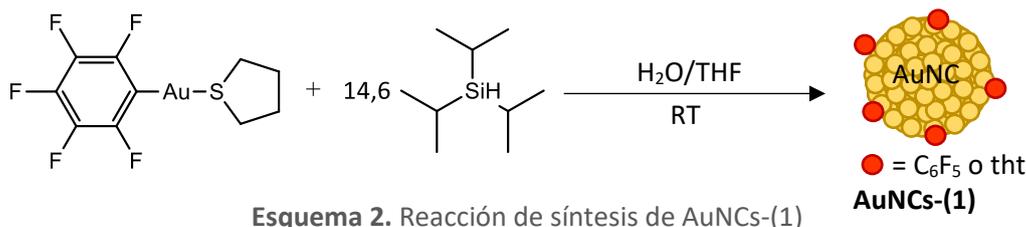
Esquema 1. Precursor organometálico $[\text{Au}(\text{C}_6\text{F}_5)(\text{tht})]$.

El agente reductor utilizado es el triisopropilsilano (TIPS), un agente suave capaz de reducir el Au(I) a Au(0) para la formación de nanoclústeres.

4.1. Síntesis y caracterización de AuNCs-(1)

4.1.1. Síntesis

El primer nanomaterial estudiado **AuNCs-(1)**, se ha sintetizado a partir de la reducción del precursor de oro organometálico en ausencia de ligandos estabilizantes. El procedimiento seguido consistió en la adición de triisopropilsilano (TIPS) sobre una disolución del precursor organometálico $[\text{Au}(\text{C}_6\text{F}_5)(\text{tht})]$ en una mezcla de THF y H_2O bajo agitación magnética. En pocos segundos se obtuvo una mezcla turbia de color naranja/marrón claro (Esquema 2) correspondiente a nanoclústeres metálicos de oro **AuNCs-(1)**.



Esquema 2. Reacción de síntesis de AuNCs-(1)

La mezcla de **AuNCs-(1)**, preparada siguiendo el procedimiento de síntesis presentado en el esquema 2, experimenta un cambio de color y de turbidez con el transcurso del tiempo: En el primer día de preparación (**1a**), la disolución presenta un color naranja oscuro/marrón y turbia; al día siguiente (**1b**), el color de la disolución es más rojo y sigue siendo turbia; a los 3 días (**1c**), se pierde la turbidez de la mezcla; y conforme avanza el tiempo el color rojo va siendo cada vez más oscuro.

La ausencia de agentes estabilizantes en la disolución de (**1**) podría indicar que alguno de los ligandos del precursor de oro (I), C_6F_5 o tht, o ambos, serían los responsables de evitar que las nanopartículas se agreguen de forma masiva. Se ha reportado algún caso previamente donde las nanopartículas son estabilizadas con ligandos arilo¹⁷ y tioéteres¹⁸.

4.1.2. Caracterización

Se ha medido el **espectro de absorción UV-Vis** en disolución para la muestra de **AuNCs-(1)** en diferentes días (Figura 7), observando un cambio en el máximo de absorción. La muestra recién preparada es de color marrón y presenta una absorción fuerte en 300 nm con un decaimiento exponencial, al igual que el observado en bibliografía para nanoclústeres de oro.¹⁹ Además, no está presente la banda de plasmón, de acuerdo con la presencia de AuNPs de menos de 2 nm de diámetro.²⁰

Al día siguiente, para la disolución de color rojo claro (**1b**) se observa una banda de absorción con un máximo en 502 nm, que corresponde al plasmón superficial característico de las AuNPs más grandes.²¹ Con el tiempo, el color rojo de la disolución se vuelve más oscuro y el máximo de absorción se va desplazando a mayores longitudes de onda. Este espectro de absorción recuerda a la figura 3 comentada en la introducción, que relaciona un desplazamiento de la banda de plasmón hacia el rojo con un mayor tamaño de las nanopartículas. Este comportamiento observado podría indicar el aumento de tamaño de los nanoclústeres por agregación.¹⁰

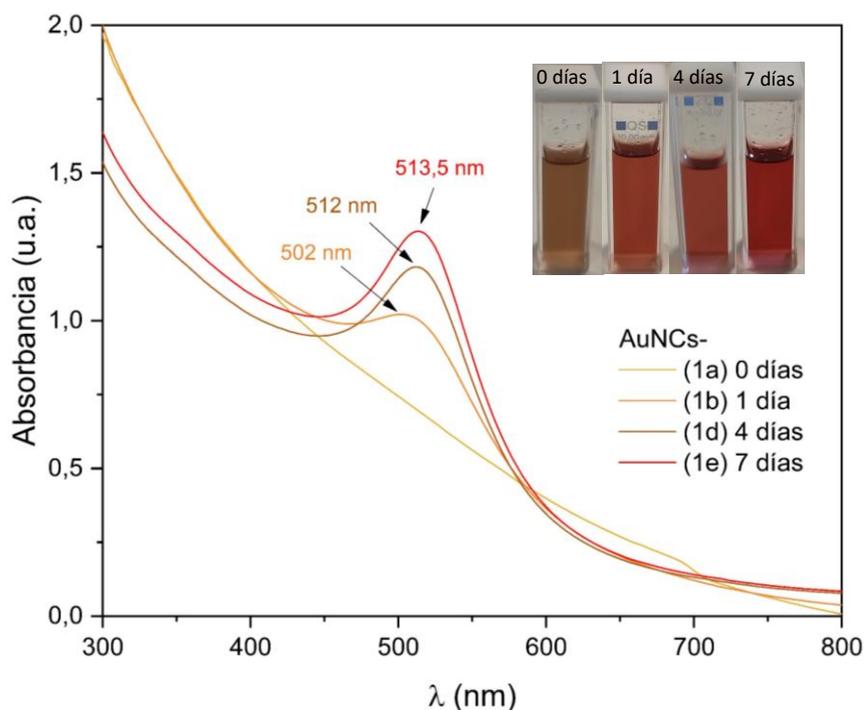


Figura 7. Espectro UV-vis de AuNCs-(1) con el tiempo.

La suposición de que los AuNCs se van agregando y haciéndose más grandes, hasta obtener AuNPs se confirma mediante medidas de **microscopía HAADF-STEM**. Se ha utilizado la Microscopía Electrónica de Transmisión de Barrido (STEM) con un Detector Anular de Campo Oscuro de Ángulos Altos (HAADF), que captura electrones inelásticos dispersados a altos ángulos. De esta forma, se obtiene una imagen cuyo contraste depende del número atómico y por lo tanto se observan los nanoclústeres de oro de color blanco en un fondo negro.

Se observa que para la muestra recién preparada **AuNCs-(1a)** (Figura 8a) hay presentes AuNCs de pequeño tamaño, siendo la población de tamaños más abundante de 1,5 a 2 nm, aunque también hay presentes algunas AuNPs de hasta 5 nm. Se obtiene un diámetro medio de $1,4 \pm 0,6$ nm (Figura 9a).

La muestra **AuNCs-(1c)**, preparada a los 3 días (Figura 8b) ya no presenta apenas AuNCs, sino que únicamente se observan AuNPs de pequeño tamaño, la mayoría de entre 2 y 5 nm. La distribución de tamaños para esta muestra es de $3,6 \pm 1,7$ nm (Figura 9b).

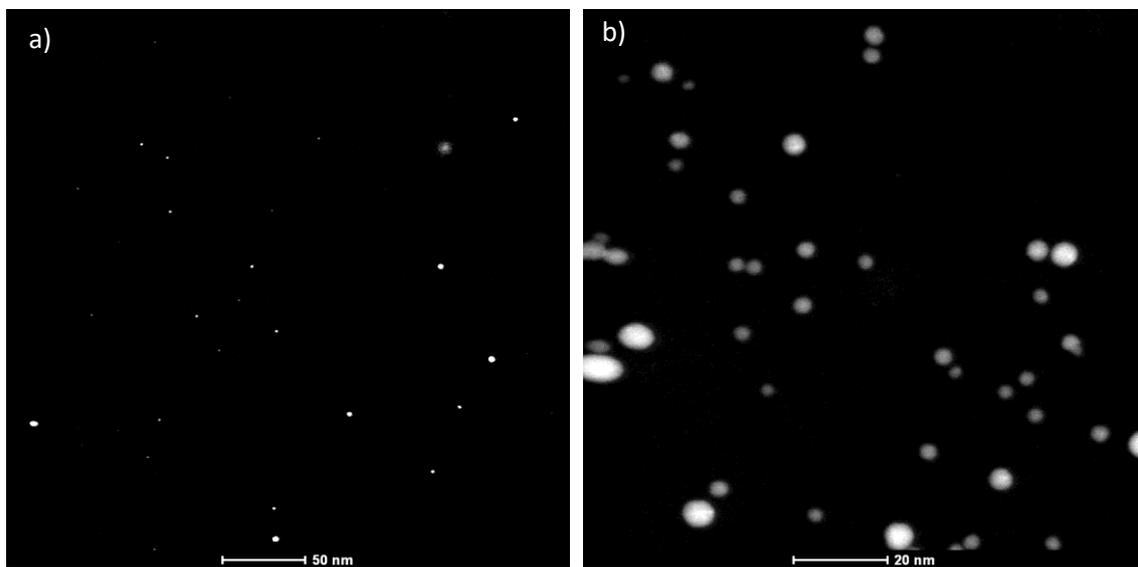


Figura 8. Imágenes HAADF-STEM de a) AuNCs-(1a) 0 días y b) AuNCs-(1c) 3 días.

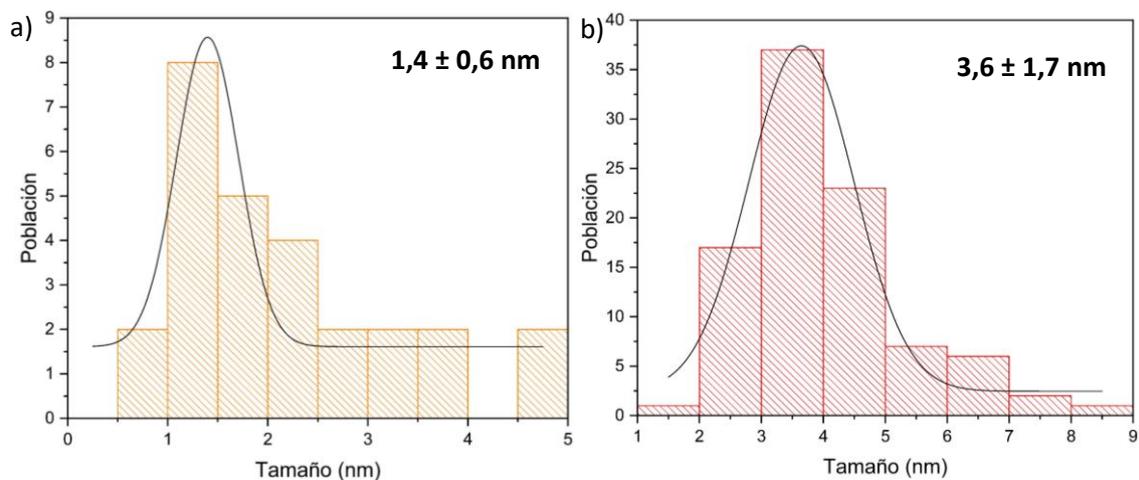


Figura 9. Histograma de distribución de tamaños de a) AuNCs-(1a) 0 días y b) AuNCs-(1c) 3 días.

El número de átomos de oro correspondiente a los nanoclústeres se puede calcular asumiendo una forma de nanopartícula de oro cuasi esférica utilizando la ecuación 1, donde V_{Au} es el volumen del átomo de Au ($V_{Au} = 17 \text{ \AA}^3$), r y D son el radio y el diámetro de la nanopartícula de oro en \AA , respectivamente.²²

$$N_{Au} = \frac{4\pi r^3}{3V_{Au}} = \frac{\pi D^3}{102} \quad (1)$$

Con esta ecuación, para la muestra de **AuNCs-(1a)** recién preparada se obtiene una media de 85 átomos de oro mientras que para la muestra **(1c)** de 3 días un valor de 1437 átomos de oro (Tabla 1).

Tabla 1. Número de átomos de oro de los AuNCs-(1) en función de su tamaño.

AuNCs-	Tamaño (nm)	Media N° Au	Intervalo N° Au
(1a) 0 días	1,4 ± 0,6	85	16 - 246
(1c) 3 días	3,6 ± 1,7	1437	211 - 4585

Debido a la ausencia de agentes protectores, los nanoclústeres sintetizados tendrían una energía superficial alta y una vida útil corta. Estos grupos se volverían inestables y podrían agregarse fácilmente en partículas más grandes, aumentando la polidispersidad.⁹ Esto explica la banda observada en el espectro UV-Vis de **AuNCs-(1)** con el tiempo. A medida que transcurre el tiempo, los nanoclústeres de oro se van agregando, dando lugar a AuNPs de mayor tamaño que presentan la banda de plasmón superficial característica. Cuanto mayores son esas nanopartículas este máximo de absorción se va desplazando más hacia energías menores.

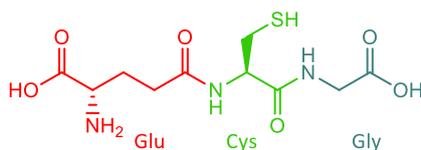
Esto puede ser debido a que el ligando que estabiliza los AuNCs (C_6F_5 y/o tht) es lo suficientemente estabilizante para evitar su agregación rápida e incontrolada, pero lo suficientemente lábil para que este sistema no presente tamaños homogéneos y evolucione en poco tiempo a nanopartículas más grandes. Este hecho es interesante debido a que en este trabajo se utiliza como primer paso para la síntesis de los AuNCs estabilizados con diferentes tioles. Los ligandos seleccionados serán capaces de desplazar fácilmente a los ligandos lábiles (C_6F_5 o tht).

4.2. Síntesis y caracterización de AuNCs estabilizados con tioles

Una vez sintetizados los nanoclústeres desnudos **AuNCs-(1)**, planteamos su estabilización mediante diferentes ligandos con el fin de ampliar y mejorar la metodología sintética y obtener nanoclústeres más homogéneos en tamaño. Dada la afinidad del azufre por el oro, tal como se ha mencionado en la introducción, se han propuesto tres compuestos azufrados como estabilizantes de los nanoclústeres. Además, debido a que buscamos una posible aplicación futura en el ámbito de la medicina, es importante que los ligandos utilizados sean biocompatibles. Por ello, se han seleccionado tres ligandos de tipo peptídico, que difieren en el número de aminoácidos constituyentes.

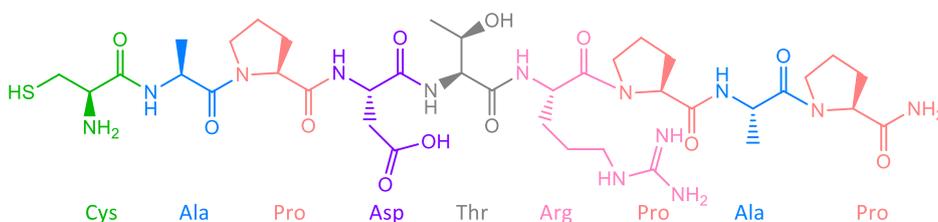
El primero de ellos, el aminoácido L-cisteína (cys), es un aminoácido natural que presenta un grupo tiol en su estructura. Los otros dos compuestos propuestos son un tripéptido, la L-glutaciona reducida (GSH), y un nonapéptido (pep9), proporcionado por el grupo de investigación **Glycopep4life** de la Universidad de la Rioja. Estos dos últimos presentan también el aminoácido cisteína como uno de sus aminoácidos constituyentes, importante para la protección del nanoclúster debido al fuerte enlace del azufre con el oro.

La glutaciona (GSH) es un ligando comúnmente utilizado para la síntesis de AuNCs. Se trata de un tripéptido natural compuesto por los aminoácidos ácido glutámico, cisteína y glicina (Esquema 3).



Esquema 3. Estructura del tripéptido GSH.

El nonapéptido utilizado presenta 9 aminoácidos (esquema 4) y su secuencia es: H₂N-CAPDTRPAP-CONH₂. Debido a su larga cadena se esperaría una mayor protección estérica para los AuNCs.

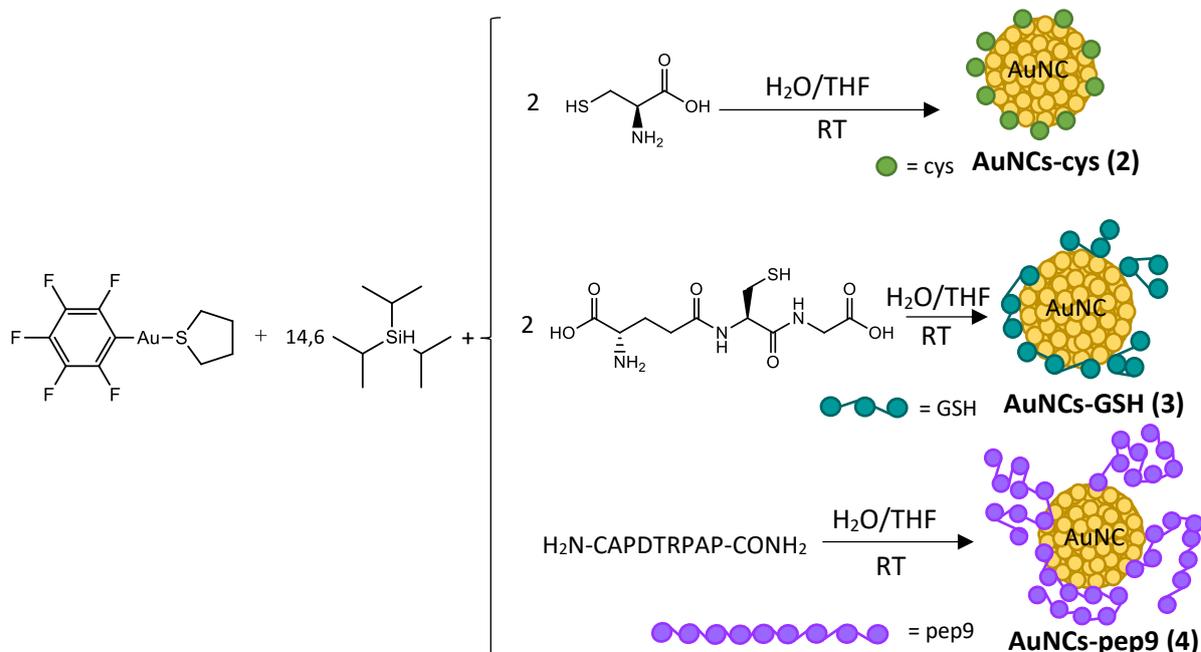


Esquema 4. Estructura del péptido H₂N-CAPDTRPAP-CONH₂

4.2.1. Síntesis

El procedimiento de síntesis comienza de la misma manera que **AuNCs-(1)**, con la reducción del compuesto organometálico [Au(C₆F₅)(tht)] con TIPS. Posteriormente, tras la adición del reductor y obtención de la disolución de color marrón claro a los pocos segundos, se añadió una disolución del ligando en agua, cambiando el color de la disolución a marrón oscuro. La relación del ligando añadido con respecto al oro fue de 1:2 (Au:S) para **AuNCs-cys (2)** y **AuNCs-GSH (3)** y equimolar para **AuNCs-pep9 (4)** debido al mayor tamaño del péptido.

Así, atendiendo al procedimiento de síntesis representado en el esquema 5, se obtienen AuNCs protegidos con ligandos tiolato. En el caso de **GSH (3)** el color obtenido es más oscuro que con el ligando **cisteína (2)** y ambos presentan un precipitado marrón. La ausencia de turbidez en la muestra **AuNCs-pep9 (4)** y, por tanto, la mayor solubilidad en agua contrasta con lo observado para los otros dos ligandos.



Esquema 5. Reacción de síntesis de AuNCs-cys (2), AuNCs-GSH (3) y AuNCs-pep9 (4).

El cambio en el orden de adición del reductor y ligando o su adición de manera simultánea modifica el resultado final de la síntesis dando lugar a una disolución transparente con un precipitado de color blanco, lo que indicaría la ausencia de los nanoclústeres.

4.2.2. Caracterización

El espectro de **absorción UV-Vis** para los tres tipos de AuNCs-SR (Figura 10) consiste en un decaimiento con ausencia de bandas, al igual que en el caso del **AuNCs-(1a)** recién preparado. El color de las disoluciones obtenidas es también marrón, típico de nanopartículas de oro ultrapequeñas²⁰. Comparando estos espectros con la figura 6 de la introducción, podríamos llegar a la conclusión de que los **AuNCs-cys (2)** tendrían un tamaño menor a los otros dos debido a que su comportamiento es similar a Au_{55} , mientras que para **AuNCs-GSH (3)** y **AuNCs-pep9 (4)** serían de mayor tamaño ya que se asemejan a Au_{140} .

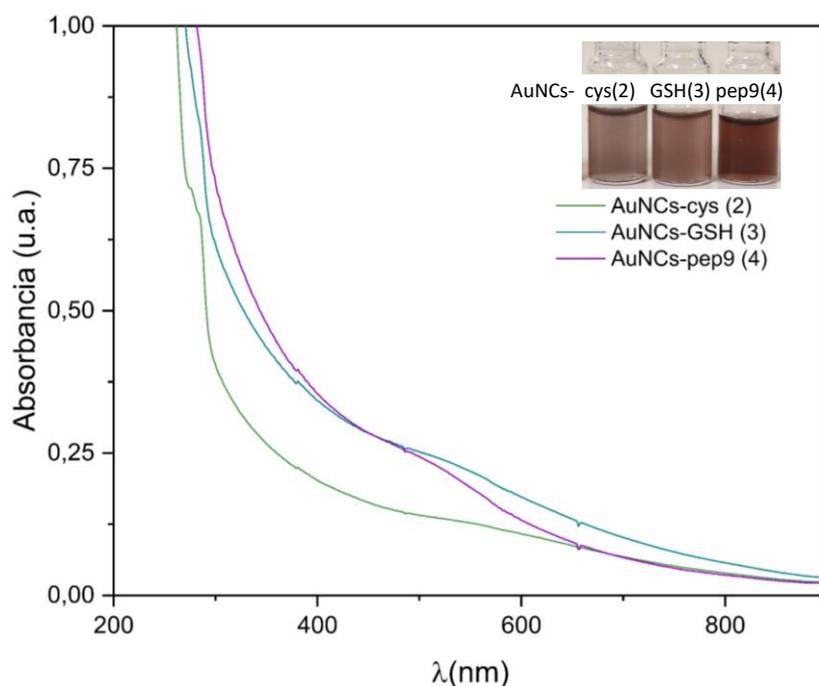


Figura 10. Espectro de absorción UV-Vis de AuNCs-SR (SR = cys (2), GSH (3) y pep9 (4)).

Esta técnica también ha permitido controlar la estabilidad de los AuNCs-SR sintetizados debido a que un aumento de intensidad en la región de 500-600 nm está relacionado con la banda de plasmón asociada con las AuNPs más grandes.

En la figura 11 se muestran las imágenes de **HAADF-STEM** obtenidas para las tres muestras.

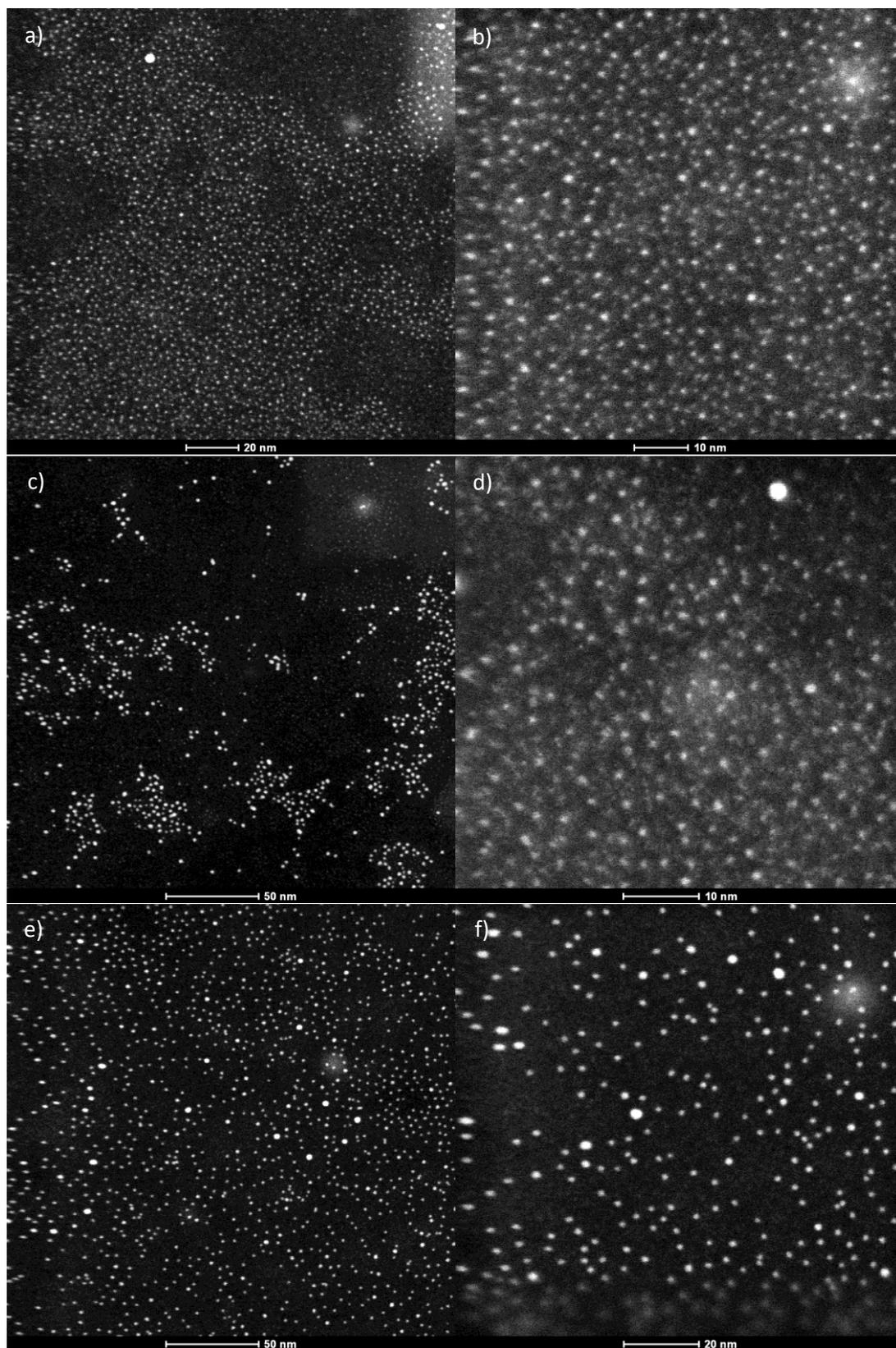


Figura 11. Imágenes STEM a) y b) AuNCs-cys (2); c) y d) AuNCs-GSH (3) y e) y f) AuNCs-pep9 (4).

En los tres casos se han obtenido nanoclústeres de menos de 2 nm homogéneamente distribuidos (Figura 11). La homogeneidad de las muestras se representa mediante histogramas de distribución de tamaños en la figura 12. En el caso de **AuNCs-cys (2)** se observa poca dispersión en los tamaños y para **AuNCs-GSH (3)** se obtiene un resultado similar, pequeños clústeres de oro de un tamaño más o menos homogéneo, aunque en este caso se observan tamaños de hasta 3 nm. Por último, para **AuNCs-pep9 (4)** además de los nanoclústeres, aparecen pequeñas cantidades de nanopartículas de pequeño tamaño de hasta 4 nm.

Se han obtenido diámetros medios para **AuNCs-cys (2)** de $1,1 \pm 0,5$ nm; para **AuNCs-GSH (3)** de $1,9 \pm 0,6$ nm y para **AuNCs-pep9 (4)** de $1,8 \pm 0,6$ nm.

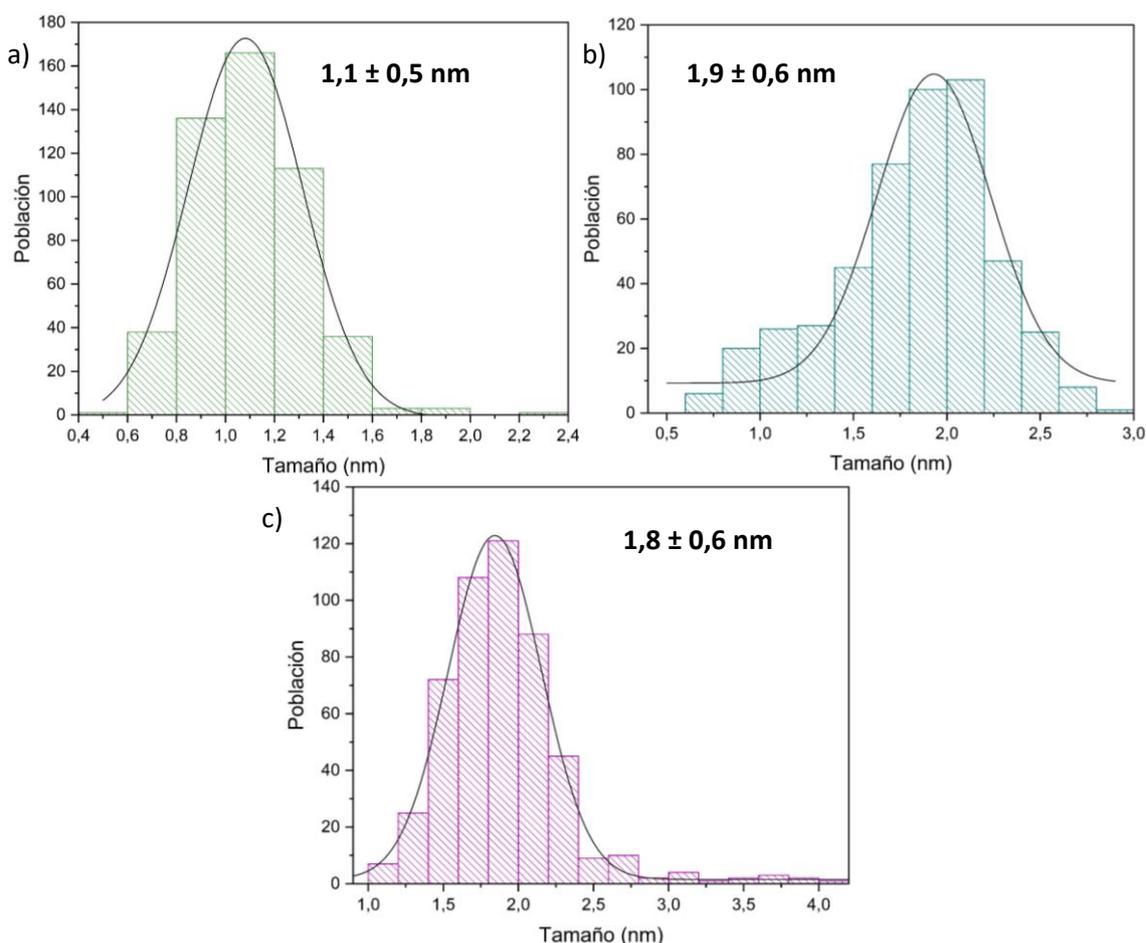


Figura 12. Histograma de distribución de tamaños de a) AuNCs-cys (2), b) AuNCs-GSH (3) y c) AuNCs-pep9 (4).

Estos tamaños corresponden a un número de átomos de oro de 41 para AuNCs-cys (2), 211 para AuNCs-GSH (3) y 180 para AuNCs-pep9 (4) (Tabla 2), calculado a partir de la ecuación 1. Esto está de acuerdo con la conclusión obtenida a partir de los espectros de absorción, pudiendo afirmar que los **AuNCs-cys (2)** tienen un tamaño menor a **AuNCs-GSH (3)** y **AuNCs-pep9 (4)**.

Tabla 2. Número de átomos de oro de los AuNCs-SR en función de su tamaño.

AuNCs-	Tamaño (nm)	Media N° Au	Intervalo N° Au
Cys (2)	$1,1 \pm 0,5$	41	7 - 126
GSH (3)	$1,9 \pm 0,6$	211	68 - 481
pep9 (4)	$1,8 \pm 0,6$	180	53 - 426

Por último, los AuNCs-SR (SR = **cys (2)**, **GSH (3)** y **pep9 (4)**) sintetizados se han caracterizado mediante **Espectroscopía Fotoelectrónica de Rayos-X (XPS)**. Esta técnica se fundamenta en la detección de los fotoelectrones emitidos por la superficie de la muestra al ser expuesta a un haz de rayos X. Permite conocer la concentración atómica de la superficie y los estados de oxidación de estos elementos.

A partir de los espectros generales (Figura 13) se han identificado y cuantificado los elementos presentes en la superficie, mediante % atómico (Tabla 3). Además de la presencia de Au y de C, S, O y N debido a los ligandos, también se han identificado átomos de flúor en las muestras. Esto podría indicar la presencia del precursor $[\text{Au}(\text{C}_6\text{F}_5)(\text{tht})]$ sin reaccionar, la presencia de C_6F_5 en la superficie originando una estabilidad adicional o por el contrario, la presencia de especies $\text{C}_6\text{F}_5\text{H}$ y $\text{C}_6\text{F}_5\text{-C}_6\text{F}_5$ en el medio que indicarían la necesidad de algún paso posterior para su eliminación y purificación final de los nanoclústeres.

Tabla 3. Cuantificación elemental de la superficie de las muestras de AuNCs-SR.

AuNCs-	C 1s	O 1s	N 1s	Au 4f	S 2p	F 1s	Na 1s	Si 2s
Cys (2)	55,18	15,16	6,19	3,68	6,11	13,04	0,37	
GSH (3)	60,86	16,24	7,90	2,49	1,99	7,29	0,13	3,08
pep9 (4)	63,96	14,62	13,14	0,54	0,78	5,21	0,26	1,48

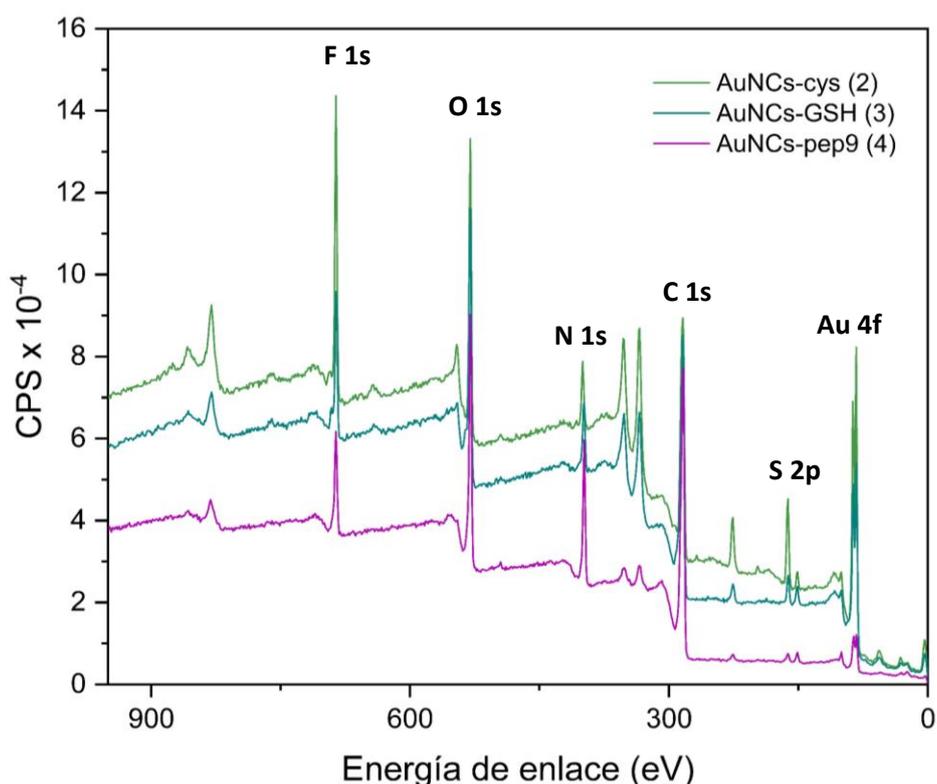


Figura 13. Espectro XPS completo para las muestras AuNCs-SR (SR = cys (2), GSH (3) y pep9 (4)).

También se puede obtener una cuantificación elemental relativa a partir de las regiones de alta resolución (Tabla 4). Se observa un aumento en la proporción de C, O, y N y una disminución de Au y S al aumentar el tamaño del ligando, tal y como se esperaba debido a que los ligandos seleccionados aumentan el número de aminoácidos manteniéndose constante el número de cisteínas.

Si se compara la cantidad de S con Au, se observa una relación Au:S de 1:1,85 para **AuNCs-cys(2)**, 1:0,97 para **AuNCs-GSH (3)** y 1:1,56 para **AuNCs-pep9 (4)**. La menor cantidad de azufre observada para **AuNCs-GSH (3)** podría ser debida a que en la glutatona el aminoácido cisteína se encuentra en la posición central, al contrario de lo que ocurre con el nonapéptido, lo que originaría un impedimento estérico a ambos lados del grupo tiol y disminuiría la cantidad de ligandos en la superficie.

Tabla 4. Cuantificación elemental relativa de la superficie de las muestras de AuNCs-SR a partir de las regiones de alta resolución.

AuNCs-	C 1s	O 1s	N 1s	Au 4f	S 2p
Cys (2)	63,02	19,75	7,91	3,27	6,06
GSH (3)	66,04	20,95	8,38	2,35	2,28
pep9 (4)	68,90	15,94	13,93	0,48	0,75

Antes de comentar el espectro correspondiente al oro, es importante conocer el comportamiento observado en otros sistemas de este tipo para su interpretación.

La figura 14 muestra un espectro de XPS de Au 4f de nanopartículas de varios tamaños, indicando que cuando el tamaño de las nanopartículas disminuye, los picos de Au 4f cambian sensiblemente a una energía de enlace más alta. Estas observaciones indican que a medida que el tamaño de la partícula se vuelve más pequeño hasta la obtención de nanoclústeres, su comportamiento electrónico pasa a comportarse de manera más similar a una molécula.²³ La señal correspondiente suele variar $0,85 \pm 0,10$ eV hacia una energía más alta.

Como ejemplo, en la bibliografía se ha observado que los resultados de XPS para nanoclústeres de 25 átomos de Au dieron lugar a un cambio positivo de 0,8 a 0,9 eV²⁴ con respecto a las señales de oro macroscópico 87,4 y 84,0 eV.²⁵

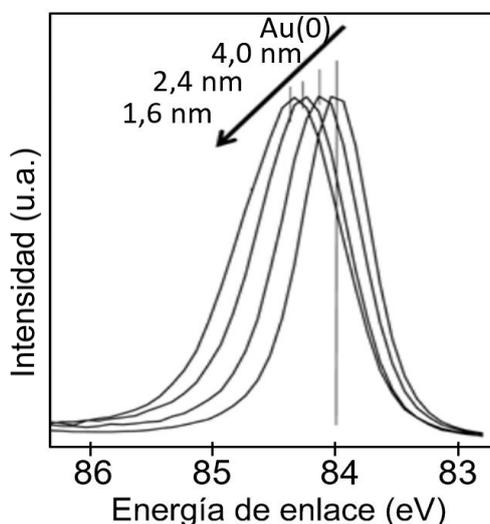


Figura 14. Posición del pico de Au 4f en el espectro de XPS para nanopartículas de oro.²³

A continuación, se muestran los espectros de alta resolución registrados para la región de Au 4f (Figuras 15 y 16), junto con una tentativa de ajuste. En los tres casos el espectro experimental se ajusta a 4 picos al realizar la deconvolución de la señal.

El espectro de **AuNCs-cys(2)** (figura 15) presenta dos dobletes de diferente intensidad pero con la misma separación energética ($\Delta E = 3,7\text{eV}$): el primero de ellos a 85,1 eV y 88,8 eV y el segundo a 87,1 eV y 90,8 eV. El primer doblete se atribuye a Au(0) y el segundo a oro en un estado de oxidación superior, Au(I).²⁶ El porcentaje de área de cada pico permite su cuantificación relativa, mostrando un 89 % de Au(0) y un 11 % de Au(I). La composición mayoritaria de Au(0) nos indicaría una reducción efectiva del centro metálico con TIPS para la síntesis de los nanoclústeres. La presencia de una pequeña cantidad de Au(I) puede ser debida a la formación de tiolatos de oro (I) Au(I)-SR que se encuentran en la superficie. Además, también podría deberse a pequeñas cantidades del precursor organometálico sin reaccionar y a que, al tratarse de especies tan pequeñas, la superficie se puede oxidar con facilidad.

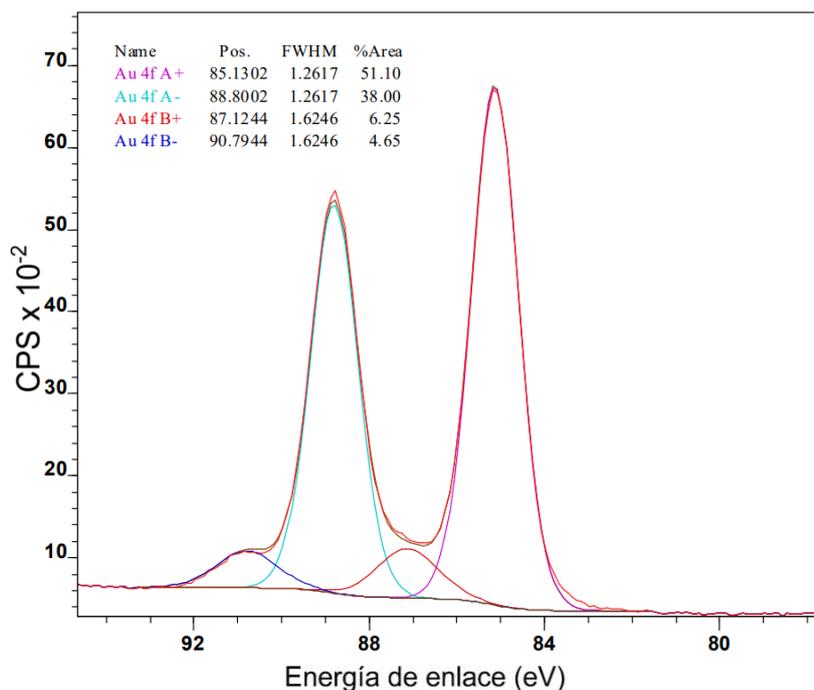


Figura 15. Espectro XPS de alta resolución para Au 4f para la muestra AuNCs-cys (2).

Para las otras dos muestras estudiadas **AuNCs-GSH (3)** y **AuNCs-pep9 (4)** (Figura 16) se obtienen los mismos resultados: un doblete correspondiente a Au(0) mayoritario y otro doblete correspondiente a Au(I) con un porcentaje de área de menos del 10 %. Por ello, las conclusiones anteriores se pueden extender a los tres sistemas.

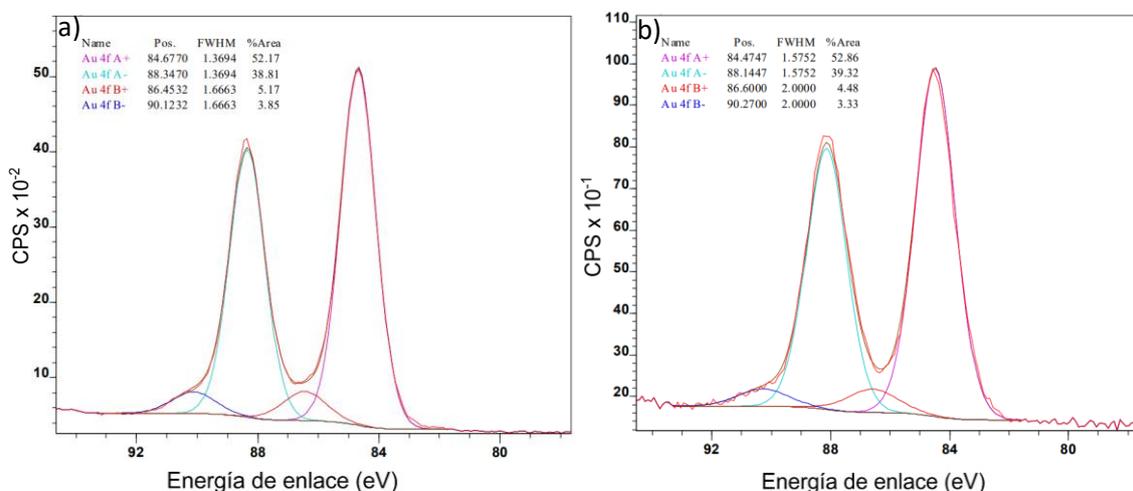


Figura 16. Espectro XPS de alta resolución Au 4f para a) AuNCs-GSH (3) y b) AuNCs-pep9 (4).

El cambio de la señal con respecto a la referencia de 84,0 eV se muestra en la tabla 5. En los tres casos se obtiene una desviación positiva de la señal, siendo mayor para **AuNCs-cys (2)** y menor para **AuNCs-pep9 (4)**, lo que indicaría una diferencia entre los tamaños de los nanomateriales al presentar distinta desviación.

Tabla 5. Desviación de la señal de XPS obtenida para Au 4f.

AuNCs-	Au 4f	Cambio con respecto a la referencia 84,0 eV.
Cys (2)	85,1302	1,1302
GSH (3)	84,6770	0,6770
pep9 (4)	84,4747	0,4747

Por lo tanto, se puede confirmar que se han conseguido sintetizar nanoclústeres de oro de menos de 2 nm homogéneamente distribuidos mediante el procedimiento de síntesis desarrollado en este trabajo. Se trata de una metodología sintética aplicable en sistemas que presenten un grupo tiol en su estructura.

5. Propiedades de los AuNCs

Una vez realizada la caracterización de los nanoclústeres sintetizados en este trabajo, obteniendo resultados acordes con los de la bibliografía para este tipo de sistemas, se ha propuesto el estudio de varias de sus interesantes propiedades.

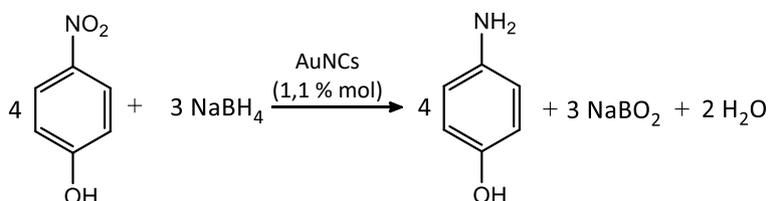
En primer lugar, se ha evaluado la capacidad catalítica de los nanomateriales empleando la reacción de reducción de 4-nitrofenol a 4-aminofenol. A continuación, se ha procedido al análisis de los efectos fototérmico y propiedades fotodinámicas de estos nanoclústeres utilizando un láser NIR de 808 nm.

5.1. Catálisis de la reacción de reducción de 4-nitrofenol a 4-aminofenol

El 4-nitrofenol (4-NP) es uno de los contaminantes más comunes debido a su alta solubilidad y estabilidad en agua. La reacción de reducción de este compuesto da lugar a 4-aminofenol (4-AP), un intermedio útil en la preparación de fármacos. Por ello, esta transformación ha sido ampliamente estudiada en los últimos años.²⁷

La reacción de reducción de 4-NP a 4-AP es una reacción comúnmente empleada para comparar la actividad de distintos catalizadores debido a que no se produce en ausencia de catalizador; tiene lugar a temperatura ambiente, presión atmosférica y en soluciones acuosas; y puede monitorizarse cuantitativamente mediante espectroscopía de absorción UV-Vis.²⁸ Entre los catalizadores más comunes para esta reacción se encuentran nanopartículas de oro, plata, paladio, platino y níquel²⁹, aunque también puede ser catalizada por nanoclústeres de oro³⁰ y por otros materiales no metálicos como grafeno dopado con nitrógeno³¹.

Debido a la eficiencia catalítica observada en la bibliografía para AuNPs y AuNCs sobre la reacción de reducción de 4-NP a 4-AP, se ha propuesto examinar las propiedades catalíticas que experimentan los compuestos descritos en esta memoria. Para ello, se ha seguido el procedimiento catalítico representado en el esquema 6.



Esquema 6. Reacción de reducción de 4-NP a 4-AP.

El mecanismo propuesto (figura 17) consiste en un primer paso donde las moléculas de 4-NP se convierten en iones 4-nitrofenolato en presencia de NaBH_4 . Después, el NaBH_4 se descompone por hidrólisis y el hidrógeno activo se transfiere al catalizador y se adsorbe en la superficie.²⁹ A continuación, los iones 4-nitrofenolato se adsorben en la superficie del catalizador y se reducen primero a 4-nitrosfenol y después a 4-hidroamilaminofenol como intermedios del ciclo catalítico. Finalmente, se completa la reducción dando lugar al 4-aminofenol.²⁷ La eliminación del producto de la superficie del nanoclúster proporciona un espacio libre en la superficie del catalizador para el inicio de un nuevo ciclo catalítico.

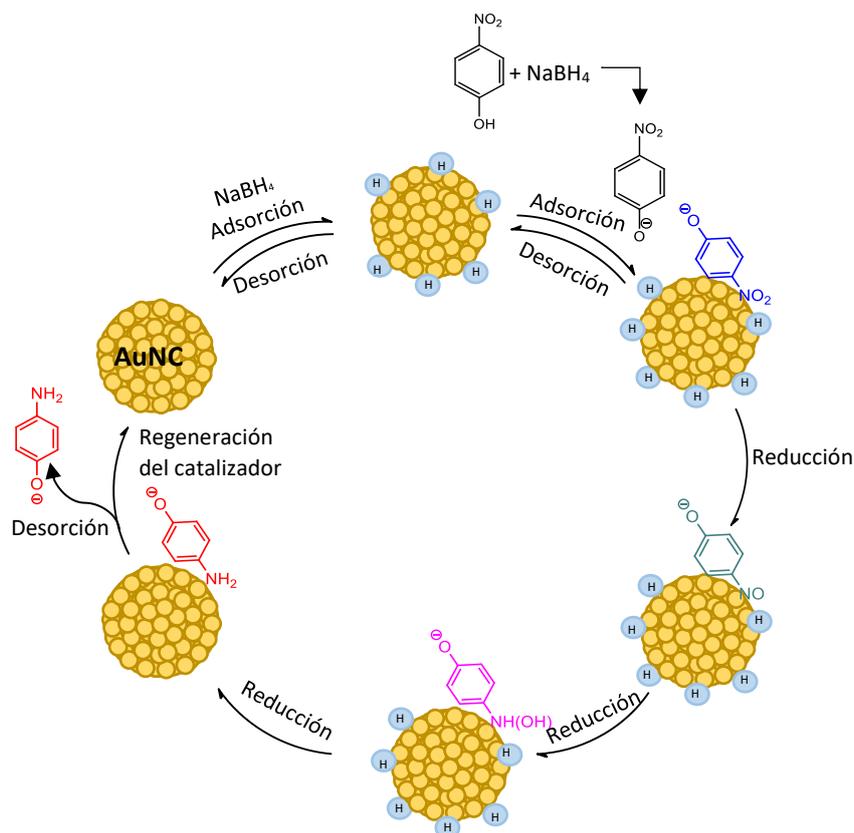


Figura 17. Mecanismo de la reducción de 4-NP a 4-AP.³²

El progreso de la reacción puede ser estudiado mediante espectroscopía UV-Vis debido a que tanto el reactivo (4-NP) como el producto (4-AP) presentan absorción en esta zona del espectro (Figura 18). En concreto, se observa una disminución en la banda a 400 nm correspondiente al 4-nitrofenolato y un aumento de absorción en 300 nm (4-aminofenolato).

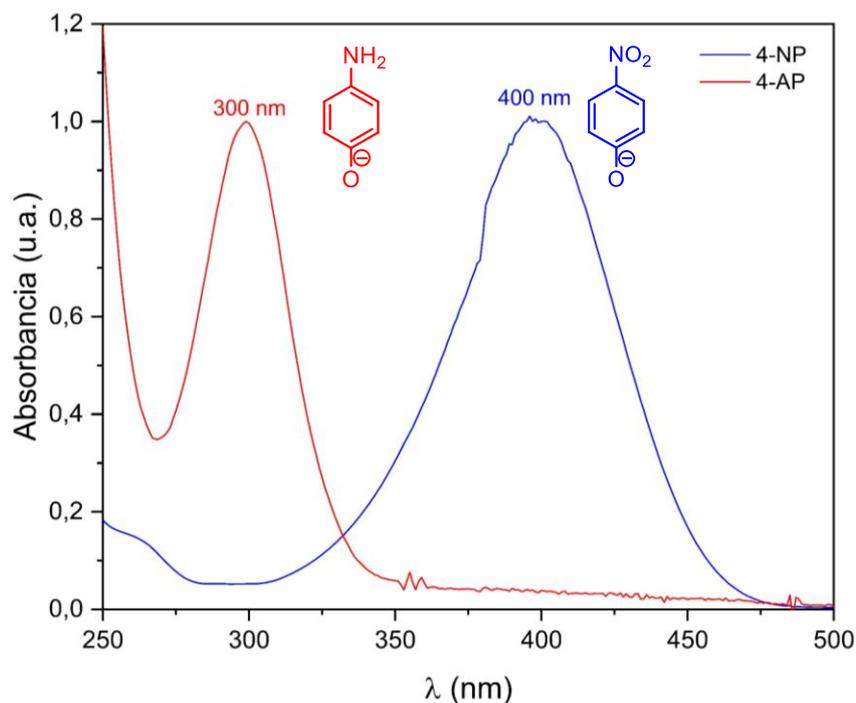


Figura 18. Espectros de absorción de 4-NP (azul) y 4-AP (rojo).

La reacción de reducción se ha realizado en medio acuoso y con exceso de NaBH_4 con respecto al 4-NP. En estas condiciones, se considera que la reacción sigue una cinética de pseudoprimer orden.²⁹ De acuerdo con este modelo se puede calcular la constante cinética mediante la ecuación 2.

$$\ln \frac{A_t}{A_0} = -k \cdot t \quad (2)$$

Se ha estudiado esta reacción para los 4 tipos de AuNCs descritos en este trabajo, preparándolos el mismo día de la realización de la catálisis mediante el procedimiento mencionado anteriormente. Las disoluciones se mantuvieron en agitación durante media hora tras la adición del ligando (o de TIPS en el caso de **AuNCs-(1)**) y se utilizaron directamente de la disolución preparada, realizando la dilución correspondiente.

Se llevó a cabo la catálisis de reducción utilizando un 1,2 % de **AuNCs-(1a)** y completándose la reacción en un tiempo de unos 9 minutos (Figura 19a). Aplicando la fórmula de la cinética mostrada en la ecuación 2 (Figura 19b), se observa un periodo de tiempo inicial de 1,5 minutos en los que no hay variación en la absorbancia del reactivo 4-NP. Esto puede indicar que existe un periodo de inducción donde se produce la adsorción de los reactivos a la superficie del catalizador, pero sin que comience la reducción. Por ello, los primeros 6 puntos no se han tenido en cuenta para el cálculo de la constante cinética. El resto de los puntos siguen una cinética de primer orden y se ajustan a una única recta, obteniéndose un valor para la constante cinética de $0,49681 \text{ min}^{-1}$.

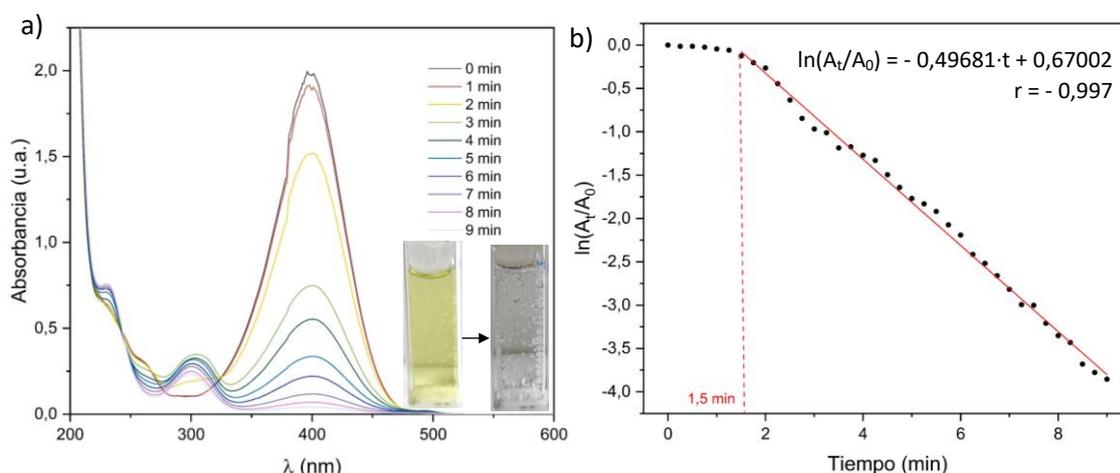


Figura 19. Seguimiento de la reacción de reducción de 4-NP a 4-AP con catalizador AuNCs-(1a). a) Espectro con el tiempo y b) $\ln(A_t/A_0)$ frente al tiempo.

El mismo procedimiento se llevó a cabo para los otros tres AuNCs-SR (SR = **cys (2)**, **GSH (3)** y **pep9 (4)**), utilizando un 1,1 % de catalizador y obteniendo en todos los casos una reacción de catálisis rápida, con tiempos totales entre 7 y 9 minutos (Figuras 20 y 21).

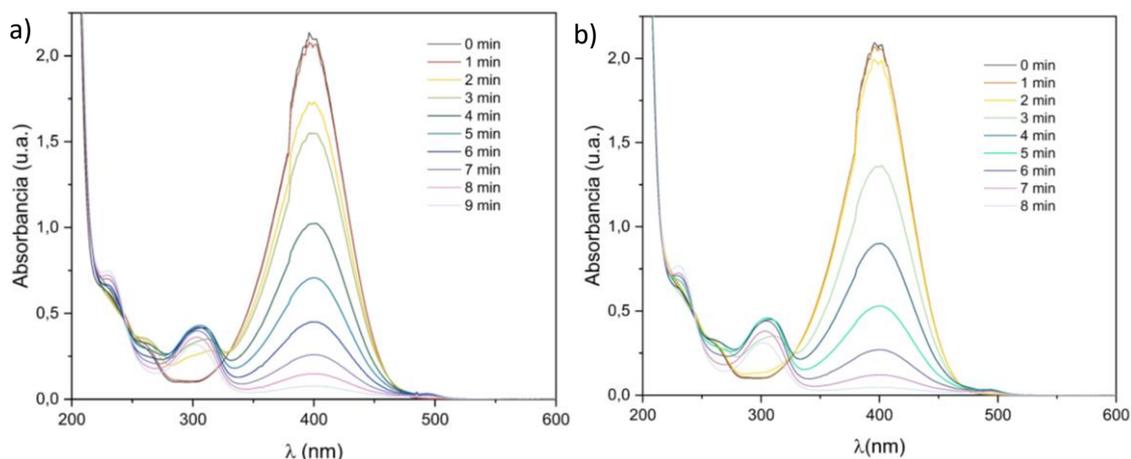


Figura 20. Seguimiento de la reducción de 4-NP a 4-AP con a) AuNCs-cys (2) y b) AuNCs-GSH (3)

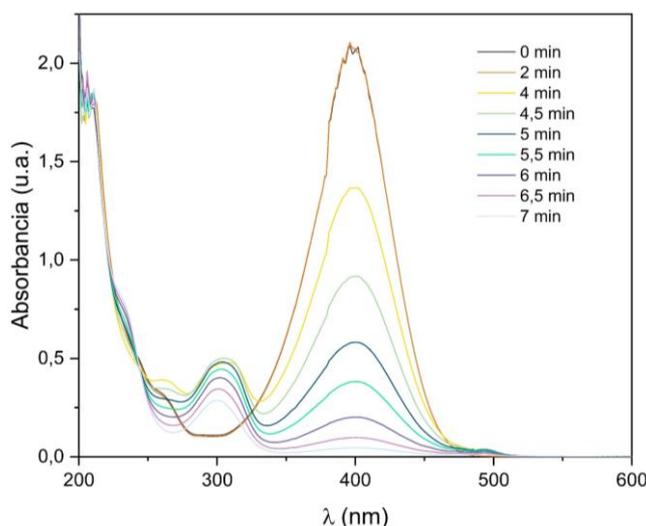


Figura 21. Seguimiento de la reducción de 4-NP a 4-AP usando con AuNCs-pep9 (4).

La representación de $\ln(A_t/A_0)$ (Figura 22) permite visualizar el tiempo de inducción, que varía dependiendo del ligando utilizado: es mayor para el péptido de 9 aminoácidos (pep9), con un valor de 4 min. Este tiempo de inducción es más pequeño para cys y GSH, y aunque entre ellas son muy similares, es un poco mayor en el caso de la cisteína.

En los tres casos se observa los datos que no se ajustan a una única recta, sino que presentan dos comportamientos que se ajustan cada uno a una recta diferente. Este segundo comportamiento con tendencia lineal tiene una pendiente mayor que el primero, lo que podría indicar que se ha producido una modificación en la superficie del catalizador que permita una mejor interacción y favorezca la catálisis.

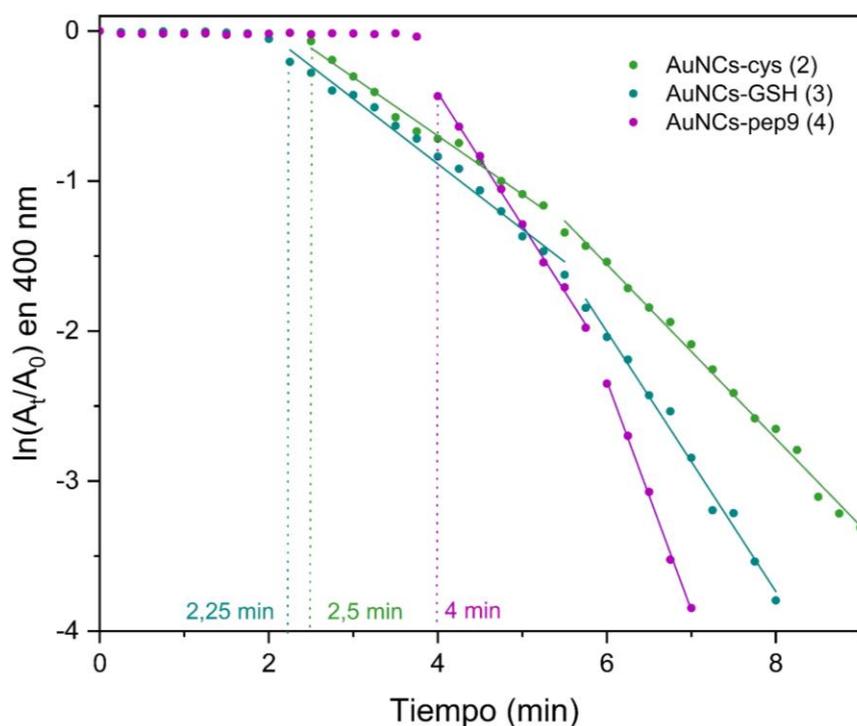


Figura 22. $\ln(A_t/A_0)$ frente al tiempo para el cálculo de la constante cinética de la reacción de reducción de 4-NP a 4-AP con los catalizadores AuNCs-SR (SR = cys (2), GSH (3) y pep9 (4)).

Las ecuaciones de estas rectas se presentan en la tabla 6, junto con su coeficiente de regresión lineal.

Tabla 6. Ecuaciones de las rectas de regresión para la catálisis de 4-NP a 4-AP y coeficiente de regresión lineal para las dos rectas observadas con los catalizadores AuNCs-SR.

Catalizador	$\ln(A_t/A_0) =$	r
AuNCs-cys (2)	$-0,39041 \cdot t + 0,86363$	-0,995
	$-0,58081 \cdot t + 1,92996$	-0,997
AuNCs-GSH (3)	$-0,43108 \cdot t + 0,83704$	-0,994
	$-0,86652 \cdot t + 3,19556$	-0,994
AuNCs-pep9 (4)	$-0,88196 \cdot t + 3,11546$	-0,9992
	$-1,52667 \cdot t + 6,82586$	-0,9990

Como el porcentaje de oro en relación a 4-NP es el igual en todos los casos y se han utilizado las mismas condiciones de reacción, es posible comparar la efectividad de los catalizadores. En la tabla 7 se muestra un resumen de los datos obtenidos para estas reacciones.

Tabla 7. Comparación de los valores obtenidos para los distintos catalizadores en la reacción de reducción de 4-NP a 4-AP.

AuNCs-	Tiempo inducción (min)	Tiempo catálisis (min)	Tiempo total (min)	k_1 (min^{-1})	k_2 (min^{-1})	% Au
-(1a)	1,5	6,9	8,4	0,49681		1,2
-cys(2)	2,5	6,8	9,3	0,39041	0,58081	1,1
-GSH(3)	2,25	5,5	7,7	0,43108	0,86652	1,1
-pep9(4)	4	2,8	6,8	0,88196	1,52667	1,1

Se observa que el tiempo de inducción es menor en el caso de **AuNCs-(1a)**, probablemente debido a que la superficie del catalizador está menos protegida por la ausencia de ligando tiol estabilizante (Figura 23). El mayor tiempo de inducción se ha observado en **AuNCs-pep9 (4)**, lo que puede ser debido a que el péptido de 9 aminoácidos que actúa como ligando estabilizante es más voluminoso e impide el primer paso de adsorción. Para **AuNCs-cys (2)** y **AuNCs-GSH (3)**, se obtienen tiempos intermedios entre los dos anteriores, pero con un mayor valor para GSH, al contrario de lo que se podría esperar con la tendencia observada y el volumen del ligando.

En cuanto al tiempo de catálisis, se observa una tendencia constante para los cuatro catalizadores. Es mayor para el caso de los catalizadores menos protegidos (6,9 min para **AuNCs-(1a)** y 6,8 min para **AuNCs-cys (2)**), disminuyendo progresivamente (5,5 para **AuNCs-GSH (3)**) hasta obtener el menor tiempo para **AuNCs-pep9 (4)** (2,8 min). Estos tiempos se han calculado como la diferencia entre el tiempo total y el tiempo de inducción. Para que puedan ser datos comparables el tiempo total se ha considerado como aquel en el que se cumple que $\ln(A_t/A_0) = -3,5$ que correspondería a un 3 % del reactivo 4-NP restante.

Cabe destacar que las constantes cinéticas para el segundo comportamiento lineal son en todos los casos mayores que para la primera recta. Además, a medida que aumenta el volumen del ligando estas dos constantes tienen mayores valores, lo que indicaría una mayor capacidad catalítica de **AuNCs-pep9 (4)** a pesar de que presenta un mayor tiempo de inducción.

Aunque la eficacia de la catálisis está relacionada con el tamaño de las nanopartículas²⁹, en este caso no se puede hablar de diferencias debidas a los tamaños de los nanoclústeres porque, como se ha observado en las imágenes de microscopía, son muy similares. Las diferencias observadas en los tiempos catalíticos podrían ser debidas al volumen de los distintos ligandos estabilizantes (Figura 23). Por lo tanto, debido a la presencia de un grupo más voluminoso, el primer paso de adsorción del 4-NP a la superficie del AuNC sería más lento debido al impedimento estérico, pero por esta misma razón, podría permitir una mejor adsorción del 4-NP una vez alcanzada la superficie provocando una reducción más rápida.

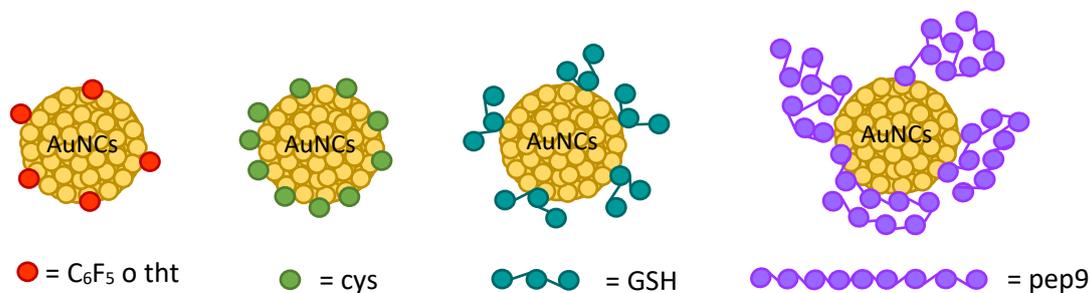


Figura 23. Representación esquemática de AuNCs-(1), AuNCs-cys(2) , AuNCs-GSH(3) y AuNCs-pep9(4).

5.2. Efecto fototérmico

Los nanomateriales de oro son agentes fototérmicos muy prometedores debido a su gran capacidad para convertir la radiación del infrarrojo cercano (NIR) en energía térmica.³³ La ventaja de las radiaciones NIR es la producción de calor localizado (efecto fototérmico), su mínima invasividad y mayor efectividad.³⁴

Las nanopartículas de oro, debido a la resonancia de plasmón localizado, muestran una fuerte absorción de luz en la región visible e infrarroja cercana convirtiéndola mediante procesos de desactivación no radiativa en energía térmica³⁵. Este proceso es mucho más eficiente cuando la radiación corresponde al infrarrojo cercano, por lo que las nanobarras de oro, que presentan una fuerte absorción de plasmón localizado longitudinal en la región del infrarrojo cercano³⁶, dan lugar a alta eficiencia de conversión fototérmica y han sido empleadas en la mayor parte de las aplicaciones de nanopartículas de oro en terapia fototérmica.

En el caso de los AuNCs, los efectos fototérmicos observados pueden ser explicados mediante la transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) cuando entran en contacto con moléculas funcionales. A través de los AuNCs se produce la absorción de los fotones y conversión de la radiación en fonones, provocando una pérdida de energía por calor (Figura 24).³⁷

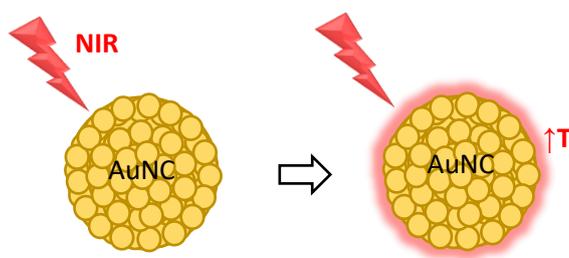


Figura 24. Esquema de la producción de calor por el efecto fototérmico.

Se ha demostrado que los AuNCs presentan una excelente biocompatibilidad, farmacocinética, y biodegradabilidad, por lo que se pueden usar ampliamente en campos biomédicos como biodetección, fotoluminiscencia y terapia contra el cáncer.⁸

Con todo esto, se ha propuesto el estudio de las propiedades fototérmicas de los nanoclústeres sintetizados en la presente memoria debido a que es una propiedad muy prometedora para posibles aplicaciones futuras. Para ello, se midió la variación de la temperatura de las muestras de AuNCs al ser irradiadas con un láser NIR de 808 nm con una densidad de potencia de 2,5 W/cm².

En la figura 25a se muestra la representación del calentamiento fototérmico para los cuatro tipos de **AuNCs (1a), (2), (3) y (4)** y el disolvente. Se observa que, en el caso del disolvente (mezcla de H₂O con THF), la irradiación con el láser provoca un aumento en la temperatura de menos de 3 °C. En cambio, para los cuatro nanomateriales estudiados, se produce un cambio en la temperatura apreciable, llegando a un aumento de hasta más de 25 °C. La comparación del comportamiento de estas muestras con el disolvente sugiere que los nanoclústeres presentan propiedades fototérmicas, es decir, tienen la capacidad de convertir la luz en energía térmica al ser irradiados con un láser NIR.

Un estudio de este efecto fototérmico para las muestras de los nanoclústeres durante un mayor periodo de tiempo de irradiación, seguido de un periodo de enfriamiento se muestra en la figura 25b. Se observa que **AuNCs-cys (2)** muestra un calentamiento más rápido que el resto, llegando

desde temperatura ambiente hasta 52,2 °C en 6 minutos. **AuNCs-pep9 (4)** también presenta una gran capacidad fototérmica, alcanzando los 51,8 °C en menos de 10 minutos. **AuNCs-GSH (2)** y **AuNCs (1a)** presentan un comportamiento similar entre ellos, con una velocidad de calentamiento ligeramente superior para los nanoclústeres protegidos con el ligando glutatona. Estas observaciones indicarían que el ligando estabilizante tendría un efecto sobre las propiedades fototérmicas de los nanomateriales estudiados.

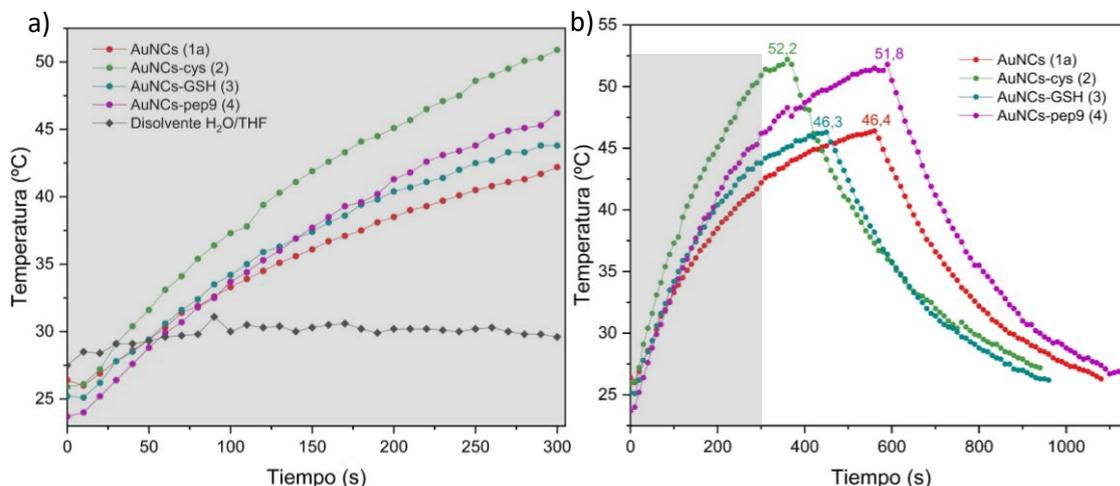


Figura 25. Representación de las temperaturas para las muestras: disolvente, AuNCs (1a), AuNCs-cys (2), AuNCs-GSH (3) y AuNCs-pep9 (4) a) del calentamiento con un láser de 808 nm a 2,5 W/cm² b) Calentamiento y enfriamiento

La Figura 26 muestra las imágenes dependientes del tiempo de las muestras al irradiar con el láser. Visualmente se observa el calentamiento rápido para **AuNCs-GSH (2)** y que el gran cambio en la temperatura de **AuNCs-pep9 (4)** requiere una mayor cantidad de tiempo, aunque comienza desde una menor temperatura. También es posible apreciar la menor temperatura final para las muestras correspondientes a **AuNCs (1a)** y **AuNCs-GSH (2)**

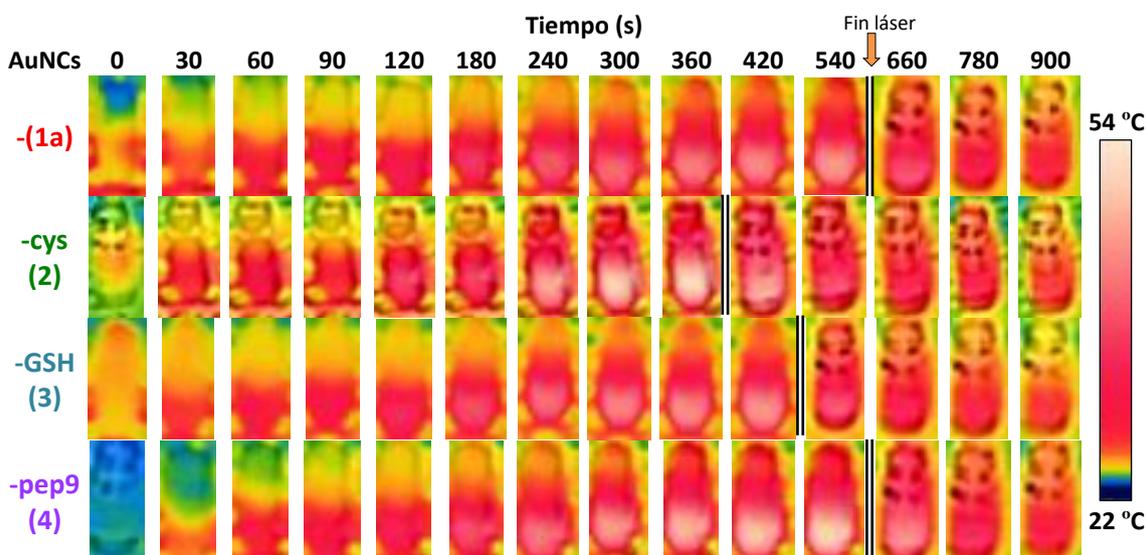


Figura 26. Imágenes dependientes del tiempo de los nanoclústeres AuNCs-(1a), -cys(2), GSH(3) y pep9(4) durante la irradiación láser de 808 nm a 2,5 W/cm² y seguida de un período de enfriamiento.

Por último, se ha querido estudiar la **estabilidad fototérmica** para comprobar tanto una posible reutilización como la estabilidad del sistema, dos características muy importantes para posibles aplicaciones prácticas. Se ha seleccionado **AuNCs-pep9 (4)** para este estudio, debido a que muestra buenas propiedades fototérmicas y presenta el ligando de mayor tamaño.

Se realizaron tres ciclos de conversión térmica que consistieron en el calentamiento con el láser de 808 nm con $2,5 \text{ W/cm}^2$ hasta la obtención de una temperatura constante y un posterior enfriamiento.

La figura 27 sugiere una gran estabilidad fototérmica para la muestra estudiada. En los tres ciclos se obtiene una temperatura superior a $51 \text{ }^\circ\text{C}$, aumentando ligeramente este valor en el siguiente ciclo realizado. Además, los tiempos necesarios para la obtención de la temperatura más alta a partir de temperatura ambiente son también muy similares, lo que indica un mantenimiento de la capacidad de conversión de la radiación en calor en los distintos ciclos.

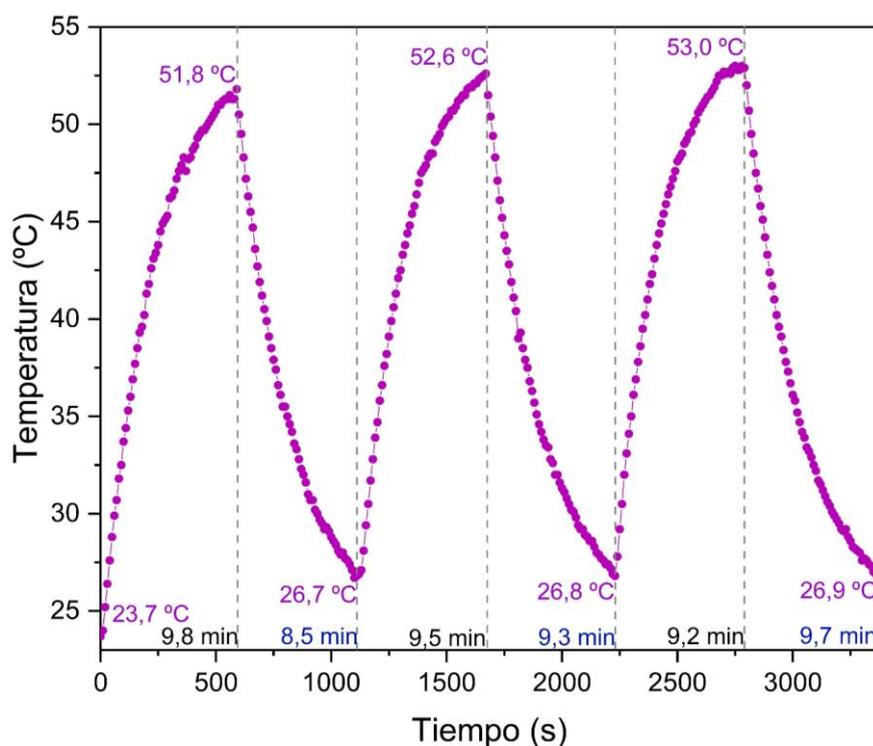


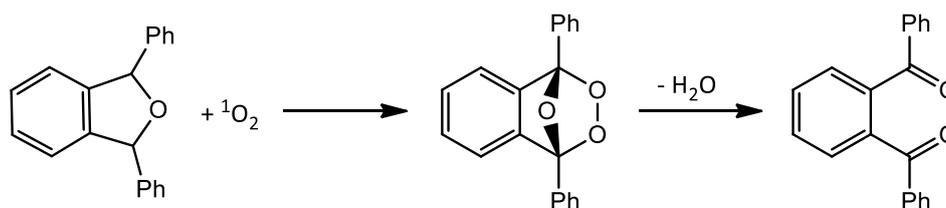
Figura 27. Propiedades fototérmicas de AuNCs-pep9 (4), tres ciclos de conversión térmica utilizando un láser de 808 nm a $2,5 \text{ W/cm}^2$.

5.3. Generación de $^1\text{O}_2$

La terapia fotodinámica consiste en la destrucción de las células cancerosas mediante el uso de un fotosensibilizador que absorbe selectivamente una longitud de onda de la luz para producir especies de oxígeno reactivas (ROS), como los radicales libres o el oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), generando toxicidad hacia las células. En cambio, la terapia fototérmica absorbe energía de la luz y la transforma en calor, lo que puede causar daño celular irreversible. Por lo tanto, la combinación de la terapia fotodinámica y fototérmica resulta una buena estrategia para el tratamiento de enfermedades debido a la mayor eficacia terapéutica.³⁸

Con esta idea, una vez se ha demostrado que los nanoclústeres sintetizados en esta memoria presentan propiedades fototérmicas, nos hemos propuesto comprobar si son capaces de generar especies reactivas de oxígeno, en este caso $^1\text{O}_2$.

Para confirmar la generación de $^1\text{O}_2$ se ha utilizado el 1,3-difenilisobenzofurano (DPBF) como atrapador de $^1\text{O}_2$. Cuando este compuesto es oxidado por $^1\text{O}_2$, su absorbancia a 410 nm disminuye, lo que permite que sea utilizado como indicador específico de la presencia de $^1\text{O}_2$.³⁹ El DPBF reacciona cuantitativamente con $^1\text{O}_2$ rompiendo su sistema π y formando un peróxido inestable que descompone dando lugar a un producto incoloro que no absorbe luz (Esquema 7). Por lo tanto, la reducción de la intensidad de absorbancia de DPBF refleja la cantidad de $^1\text{O}_2$ generada.⁴⁰



Esquema 7. Reacción de oxidación de DPBF con $^1\text{O}_2$.⁴⁰

Algunos nanoclústeres de oro pueden mostrar una actividad similar a la catalasa, descomponiendo el peróxido de hidrógeno en O_2 para mejorar la terapia fotodinámica. Los microambientes de tumores e infecciones generalmente muestran una alta concentración de H_2O_2 y un bajo nivel de O_2 , por lo que este hecho puede solucionar el agotamiento del oxígeno durante un tratamiento fotodinámico.¹⁹

En este trabajo se ha comprobado la generación de oxígeno singlete para los nanoclústeres de oro protegidos con ligandos AuNCs-SR (SR = **cys** (2), **GSH** (3) y **pep9** (4)), utilizando DPBF como indicador en presencia de H_2O_2 e irradiando con un láser de 808 nm a $2,5 \text{ W/cm}^2$. La figura 28 muestra un resumen de las reacciones que tienen lugar en este procedimiento.

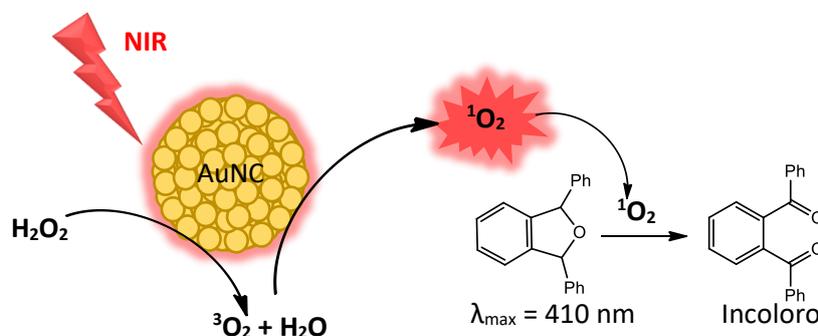


Figura 28. Esquema de la generación de $^1\text{O}_2$ en presencia de H_2O_2 y radiación NIR.

Primero, se realizó un experimento de control (Figura 29a) en ausencia de nanoclústeres, midiendo la absorbancia de una disolución de DPBF (60 μM) a $\lambda = 410 \text{ nm}$ en acetonitrilo previamente oxigenado y H_2O_2 (125 mM) bajo irradiación con láser de 808 nm a 2,5 W/cm^2 . Se obtuvo una disminución de la absorbancia de un 50 % en un tiempo de 40 minutos. Este resultado se puede interpretar teniendo en cuenta que el DPBF también reacciona con H_2O_2 , pudiendo utilizarse también como un indicador para este compuesto.⁴¹ Además, DPBF es inestable y sensible a factores externos como la luz ultravioleta y el calor.³⁹

En la figura 29b se muestra la disminución de la absorbancia de DPBF en las mismas condiciones que el experimento control, pero en presencia de **AuNCs-pep9 (4)** (230 μM). En este caso la absorbancia a 410 nm disminuyó hasta un valor de 0 en 25 minutos, lo que indica una diferencia significativa con respecto al experimento en ausencia de nanoclústeres.

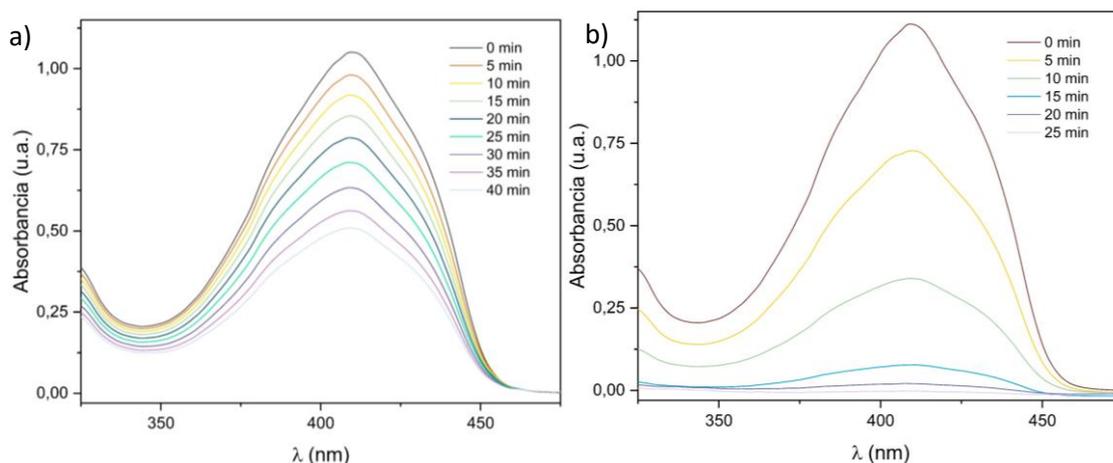


Figura 29. Espectros de absorción del DPBF a) sin catalizador y b) con AuNCs-pep9 (4).

A continuación, se muestra el decaimiento en la absorbancia a 410 nm del compuesto DPBF en presencia de los tres nanomateriales protegidos con ligandos tiolato y del control (figura 30), observando un comportamiento diferente en los tres nanoclústeres estudiados.

La disminución en la absorbancia en la muestra **AuNCs-pep9 (4)** sigue una mayor pendiente que en el resto de los casos, llegando hasta la desaparición total de la banda en menos de 30 minutos. En cambio, **AuNCs-cys (2)** muestra una pendiente inicial más pequeña, aunque mayor que en el caso del disolvente. Esto podría indicar que presentaría la capacidad de generar $^1\text{O}_2$, pero en menor proporción que **AuNCs-pep9 (4)**. Sin embargo, esta pendiente cambia drásticamente cuando se alcanzan los 12 minutos, dando lugar a un comportamiento en el que la absorbancia de DPBF disminuye incluso en menor proporción que el experimento control. Por último, para **AuNCs-GSH (3)**, se obtiene una pendiente de la recta de disminución de la absorbancia menor de la del experimento sin nanoclústeres.

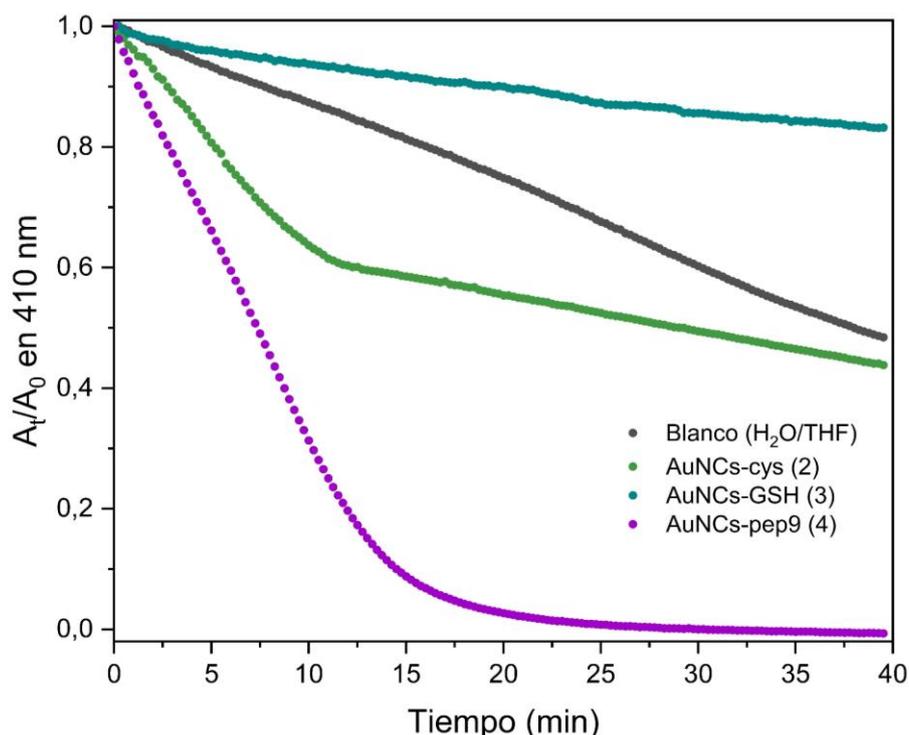


Figura 30. Decaimiento de la absorbancia del reactivo DPBF en 410 nm con el tiempo para el experimento control y con AuNCs-SR (SR = cys (2), GSH (3) y pep9 (4)).

Estos resultados obtenidos se pueden explicar atendiendo a la estabilidad de los nanoclústeres. En el caso de **AuNCs-cys (2)** y **AuNCs-GSH (3)**, tras este experimento se observa una descomposición del catalizador, dando lugar a agregados y partículas insolubles (Figura 31a, b). En cambio, **AuNCs-pep9 (4)** sigue presentando la misma apariencia inicial, una disolución transparente de color marrón (Figura 31c). Esto podría explicar que, en el caso de **AuNCs-cys (2)**, el cambio en el comportamiento observado en la generación de 1O_2 se debe al momento en el que comienza a descomponerse el catalizador. Con este mismo planteamiento, para **AuNCs-GSH (3)** esta desestabilización del catalizador se produciría en los instantes iniciales de la reacción, debido a que el comportamiento observado es igual que la segunda etapa correspondiente al **AuNCs-cys (2)**. Esto indicaría menor estabilidad de la muestra (3), que podría estar en consonancia con lo observado en el efecto fototérmico al no alcanzar una temperatura tan alta como las otras dos muestras con ligandos. Por el contrario, **AuNCs-pep9 (4)** presentaría una mayor estabilidad que sus análogas con **cys (2)** y **GSH (3)**, logrando un efecto fotodinámico efectivo bajo la irradiación de luz NIR.

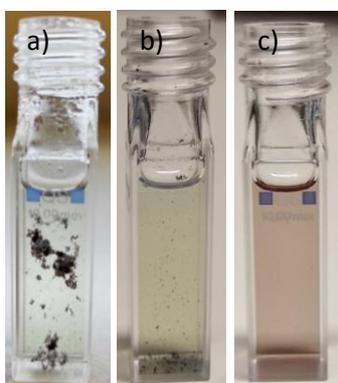


Figura 31. Apariencia de las disoluciones finales del experimento de generación de 1O_2 : a) AuNCs-cys (2), b) AuNCs-GSH (3) y c) AuNCs-pep9 (4).

Debido a que el compuesto DPBF es sensible al calor, para asegurarnos que la degradación del compuesto es debida a la generación de $^1\text{O}_2$ y no a un mayor calor producido al utilizar los nanoclústeres, se comprobó la temperatura inicial y final.

Como se muestra en la tabla 8, la temperatura final obtenida en el experimento sin AuNCs es ligeramente menor que en el resto. Sin embargo, para **AuNCs-GSH (3)** la temperatura final es más alta que en el experimento control y da lugar a una disminución menor en la absorbancia, por lo que el efecto de las diferentes temperaturas no sería el responsable de las diferencias de comportamiento obtenidas.

Tabla 8. Temperaturas correspondientes a la reacción de generación de $^1\text{O}_2$ a tiempo 0 min y tras 40 minutos de irradiación.

Sin láser t=0	Con láser tras 40 min de reacción				Escala
Blanco	Blanco	AuNCs			50,0 °C 20,0 °C
 21,0 °C	 43,9 °C	-cys(2)  47,9 °C	-GSH(3)  48,2 °C	-pep9(4)  49,7 °C	

Por último, debido a que **AuNCs-pep9 (4)** ha presentado buenas propiedades fotodinámicas y estabilidad fototérmica, se ha querido comprobar la capacidad de reutilización del catalizador en la reacción de generación de $^1\text{O}_2$. El procedimiento seguido se realizó de igual manera que el comentado para el estudio anterior, pero realizando tres ciclos de manera continua. Al comienzo de cada uno de ellos se adicionó tanto el compuesto DPBF como H_2O_2 manteniendo constante la cantidad de **AuNCs-pep9 (4)** añadida desde el inicio de la reacción catalítica, reutilizándose en cada uno de los ciclos medidos.

Los resultados obtenidos (Figura 32) muestran una conversión completa del compuesto DPBF en los tres ciclos realizados, indicando la capacidad del nanomaterial de ser reutilizado. En los dos primeros ciclos, el tiempo de decaimiento de la absorbancia del compuesto es muy similar, mientras que en el tercero es necesario un tiempo mayor para la completa conversión del compuesto, lo que indicaría una pérdida de la eficacia de **AuNCs-pep9 (4)** con el tiempo. Analizando los espectros de absorción completos, se ha observado además de la disminución en la banda de 410 nm correspondiente a DPBF, un aumento de la absorbancia en la zona de 512 nm (Figura 33) a partir del segundo ciclo de generación de $^1\text{O}_2$. Esto indicaría que los nanoclústeres han comenzado a agregarse dando lugar a nanopartículas plasmónicas pequeñas y provocando, por tanto, la reducción en la eficiencia del catalizador.

La banda observada también se desplaza con el tiempo, obteniendo un máximo en 519 nm al finalizar el tercer ciclo, lo que está de acuerdo con la suposición de la agregación de los

nanoclústeres. Este hecho también se observa visualmente con el color de las disoluciones (Figura 33), pasando del color marrón característico de los nanoclústeres a un color más rosáceo que recuerda a **AuNCs-(1d)**.

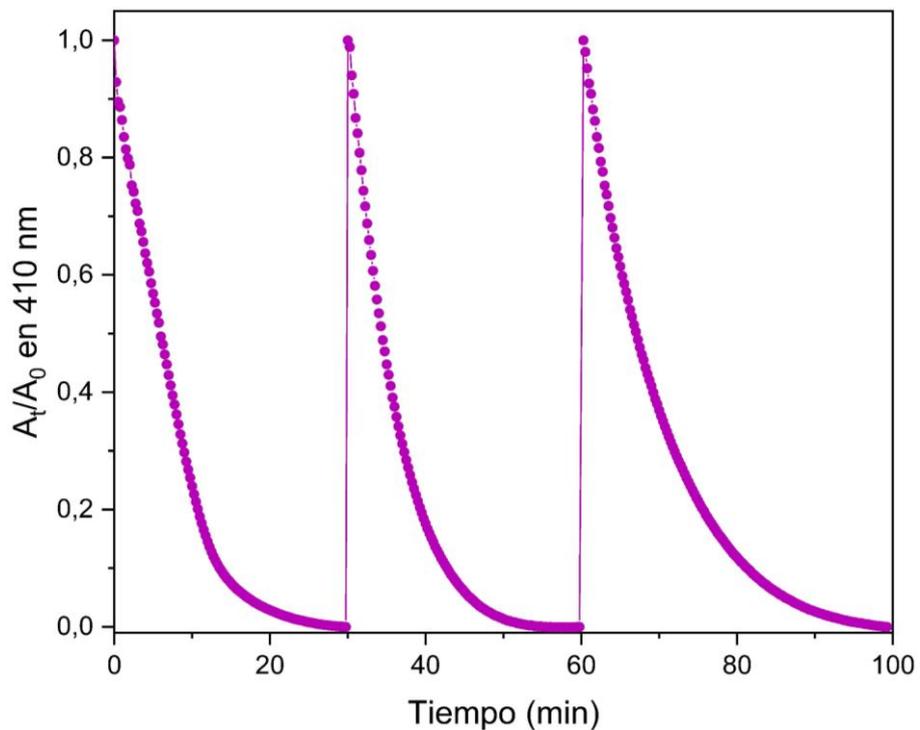


Figura 32. Tres ciclos de decaimiento de la absorbancia del reactivo DPBF en 410 nm con el tiempo utilizando AuNCs-pep9 (4).

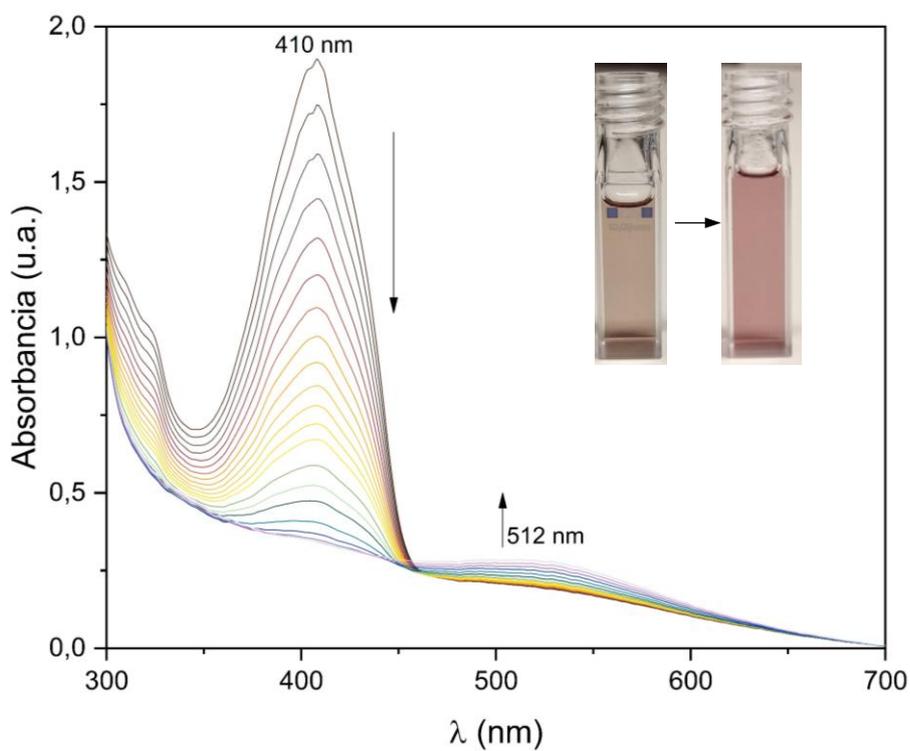


Figura 33. Espectro completo del segundo ciclo de reacción de DPBF en presencia de AuNCs-pep9 (4) con el tiempo.

6. Conclusiones

Se ha conseguido desarrollar un método sencillo y eficaz para la síntesis de nanoclústeres de oro con ligandos tiolato como agentes estabilizantes a partir de la reducción del precursor organometálico $[\text{Au}(\text{C}_6\text{F}_5)(\text{tht})]$ con el reductor suave triisopropilsilano. Debido a que se han obtenido buenos resultados con los tres ligandos utilizados, esta metodología es prometedora y podría ser ampliada utilizando otros agentes estabilizantes que tengan en común el grupo funcional tiol en su estructura.

Con el estudio de las propiedades catalíticas de los nanomateriales de la presente memoria, se ha observado una dependencia de la eficacia catalítica con el ligando estabilizante. El tiempo de inducción necesario depende del volumen del ligando, siendo generalmente mayor para agentes protectores más voluminosos. En cambio, la velocidad de catálisis sigue la tendencia contraria, cuanto mayor es el impedimento ofrecido por el ligando, la reacción es más rápida.

Los nanoclústeres sintetizados en este trabajo, presentan buenas propiedades fototérmicas, siendo capaces de transformar la energía de la luz en energía térmica de manera eficiente. Estas propiedades también son dependientes del grupo protector.

La obtención de buenos resultados en la evaluación de la estabilidad fototérmica de **AuNCs-pep9 (4)** ofrece una idea de la buena estabilidad que ofrece el ligando más voluminoso, además de la posible reutilización del sistema estudiado.

En la evaluación de la generación de $^1\text{O}_2$, se ha demostrado que **AuNCs-pep9 (4)** y **AuNCs-cys (2)** tienen la capacidad de generar especies de oxígeno reactivas, un hecho de gran importancia para su uso en terapia fotodinámica. En este estudio también se ha observado que los dos nanoclústeres con ligandos menos voluminosos **AuNCs-cys (2)** y **AuNCs-GSH (3)** presentan una menor estabilidad y se descomponen en las condiciones de reacción estudiadas. En cambio, un ligando más impedido provoca una mayor estabilización y solubilidad, dando lugar a mejores resultados e incluso la posibilidad de su reutilización en varios ciclos.

Todavía queda un gran estudio de otros posibles ligandos que mejoren las propiedades mencionadas anteriormente. A la vista de los resultados obtenidos, serían interesantes ligandos de mayor tamaño, que favorezcan la solubilidad en agua y a su vez estabilicen mejor los nanoclústeres obtenidos. Esta metodología puede suponer un comienzo prometedor para el estudio de nanoclústeres estabilizados con ligandos tiolato con interés biológico y posibles aplicaciones futuras.

7. Experimental

7.1. Técnicas instrumentales y espectroscópicas utilizadas

7.1.1. Espectros de absorción UV-Vis en disolución

Los espectros de absorción UV-Vis de las muestras **AuNCs-(1)** fueron registrados en disolución en un espectrofotómetro Shimadzu UV-3600 y de AuNCs-SR (SR = **cys (1)**, **GSH (2)** y **pep9 (4)**) en el espectrofotómetro Agilent 8453 Diode-array.

Los espectros de absorción relacionados con las reacciones de reducción de 4-nitrofenol a 4-aminofenol se registraron en un espectrofotómetro Agilent 8453 Diode-array.

Los espectros correspondientes al estudio de generación de $^1\text{O}_2$ se midieron en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 265.

7.1.2. Microscopía electrónica de transmisión

Las muestras de STEM se prepararon adicionando varias gotas sobre rejillas de Cu recubiertas por una película de carbono.

Las imágenes HAADF-STEM se obtuvieron en un Tecnai F30 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) o en un instrumento Titan con sonda Cs corregido (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) a una tensión de trabajo de 300 kV, junto con un detector HAADF (Fischione, Export, PA, EE. UU.).

7.1.3. XPS

Los experimentos de XPS se llevaron a cabo en un espectrómetro Kratos AXIS Supra usando una fuente monocromática Al K α 120W que opera a 15 kV u 8 mA. Los espectros generales se adquirieron a una energía de paso del analizador de 160 eV, mientras que los de alta resolución con una energía de paso constante de 20 eV con cambios de 0,1 eV. La presión basal en la cámara de análisis fue menor de 10^{-9} Torr. Los espectros fueron obtenidos a temperatura ambiente y la escala de energía de enlace (BE) se referenció internamente al pico de C 1s (C-C = 284,9 eV).

7.2. Síntesis de nanoclústeres de oro

7.2.1. AuNCs-(1)

En un vial provisto de un agitador magnético se adicionan 2600 μL de THF y 100 μL $\text{Au}(\text{C}_6\text{F}_5)(\text{tbt})$ 50 mM disuelto en THF. En agitación se añaden 3000 μL de H_2O mili-Q y después 15 μL de TIPS (triisopropilsilano), obteniendo en pocos segundos una disolución de color naranja/marrón y turbia (Figura 34a), que se mantiene en agitación durante 30 min.

7.2.2. AuNCs-cys (2) y AuNCs-GSH (3)

El procedimiento es igual que en el caso de **AuNCs-(1)**, pero añadiendo un ligando (L-cys o L-GSH reducida): tras la adición de TIPS y obtención de una disolución de color marrón claro, se añaden bajo agitación 200 μL del ligando 50 mM en agua, cambiando el color de la disolución a marrón oscuro, que se deja en agitación 30 minutos. En el caso de GSH el color obtenido es más oscuro que en cys (Figura 34b y 34c). Los dos presentan un precipitado marrón.

7.2.3. AuNCs-pep9 (4)

Se utiliza el mismo procedimiento que para **AuNCs-cys (2)** y **AuNCs-GSH (3)** pero añadiendo la misma cantidad de ligando que de oro, en lugar de una relación 1:2. Tras la adición de TIPS se añaden 100 μL del péptido 50 mM en agua, obteniendo una disolución de color marrón sin precipitado (Figura 34d).

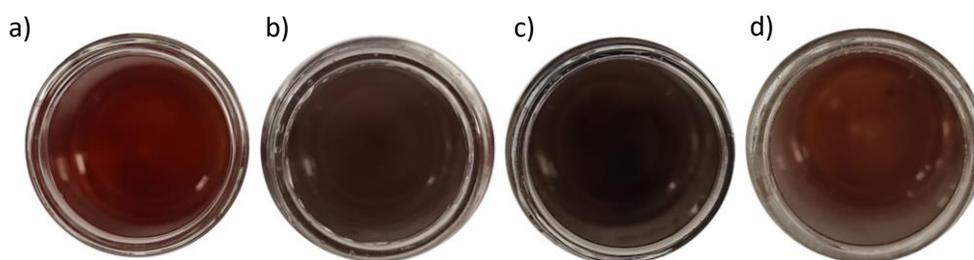


Figura 34. Disoluciones obtenidas: a) AuNCs-(1a), b) AuNCs-cys (2), c) AuNCs-GSH (3), d) AuNCs-pep9 (4).

7.3. Preparación de las muestras de XPS

Se sintetizaron los AuNCs siguiendo el procedimiento descrito en el apartado anterior y se dejaron en agitación durante 30 minutos. Posteriormente, se evaporó parcialmente el disolvente mediante una bomba de vacío. Por último, se congeló utilizando nitrógeno líquido y se dejó liofilizando durante un día y medio, obteniendo un sólido de color marrón.

7.4. Catálisis de reducción de 4-NP a 4-AP

La reacción de reducción de 4-NP a 4-AP se llevó a cabo en una cubeta de cuarzo y se monitorizó el seguimiento de la reacción mediante un espectrofotómetro Agilent 8453 Diode-array cada 15 segundos hasta la completa desaparición del reactivo inicial.

En la cubeta se añaden 2,5 mL de H₂O milliQ y 100 μ L de 4-nitrofenol 2,5 mM. A continuación, se adicionan 150 μ L de una disolución de NaBH₄ 1M recién preparada, dando lugar a una disolución de color amarillo intenso. Después se añade el volumen deseado del catalizador.

Los nanoclústeres sintetizados se diluyeron directamente de la disolución de reacción con un factor de dilución 1:10. Los volúmenes empleados de estas diluciones fueron de 30 μ L para AuNCs-(1a), -cys(2) y -GSH(3) y 29,5 μ L AuNCs-pep9(4).

7.5. Medidas del efecto fototérmico

En un vial de 2 mL se añade 1 mL de la disolución correspondiente y se irradia desde arriba mediante un láser de 808 nm con una fibra óptica seleccionando la densidad de potencia deseada, en este caso 2,5 W/cm² (Figura 35).

Mediante una cámara termográfica FLIR E6 se controla la temperatura cada 10 segundos tanto del calentamiento con el láser como del enfriamiento posterior.



Figura 35. Montaje para el estudio del efecto fototérmico.

7.6. Generación de $^1\text{O}_2$

En la cubeta se añaden 1844 μL de acetonitrilo previamente oxigenado y 300 μL de una disolución recién preparada de DPBF 600 μM disuelto en CH_3CN . Posteriormente y de manera rápida se adicionan 38,6 μL de H_2O_2 (30%) y 817 μL del catalizador 0,85 mM, se coloca el láser de 808 nm a $2,5\text{W}/\text{cm}^2$ irradiando desde arriba sobre la cubeta y se comienza inmediatamente la medida de la absorbancia cada 15 segundos. El montaje empleado se muestra en la figura 36.

Para el experimento control se adicionaron 817 μL de la mezcla de disolventes $\text{H}_2\text{O}/\text{THF}$ en lugar del catalizador.

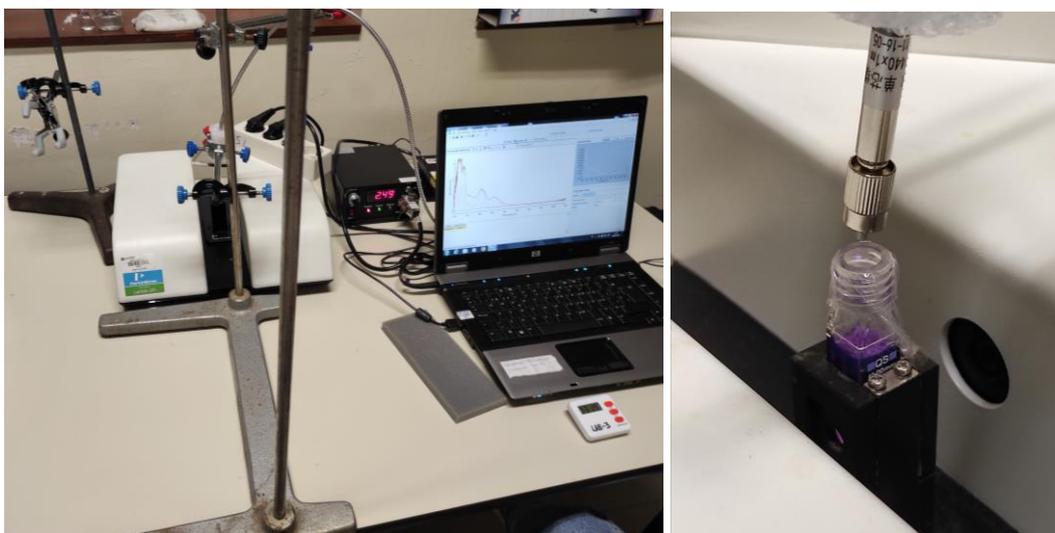


Figura 36. Montaje para el estudio de la generación de $^1\text{O}_2$.

8. Bibliografía

1. Demirbas, A., Karaytuğ, T., Arabaci, N., Yilmaz, E. S., & Ocsoy, I. Synthesis of metallic and metal oxide nanomaterials. *Green Synthesis of Nanomaterials for Bioenergy Applications*, **2020**, p. 99-123.
2. Singh, D. k., Singh, S. & Singh, P. (2023). *Nanomaterials. Advances and Applications*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-981-19-7963-7>
3. Lu, H., Tang, S. Y., Yun, G., Li, H., Zhang, Y., Qiao, R., & Li, W. Modular and integrated systems for nanoparticle and microparticle synthesis - a review. *Biosensors*, **2020**, 10(11), 165.
4. Ghosh Chaudhuri, R., & Paria, S. Core/shell nanoparticles: classes, properties, synthesis mechanisms, characterization, and applications. *Chemical reviews*, **2012**, 112(4), 2373-2433.
5. Huang, X., & El-Sayed, M. A. Gold nanoparticles: Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy. *Journal of advanced research*, **2010**, 1(1), 13-28.
6. Peiris, S., McMurtrie, J., & Zhu, H. Y. Metal nanoparticle photocatalysts: emerging processes for green organic synthesis. *Catalysis Science & Technology*, **2016**, 6(2), 320-338.
7. Liz-Marzán, L. M. Tailoring surface plasmons through the morphology and assembly of metal nanoparticles. *Langmuir*, **2006**, 22(1), 32-41.
8. Cheng, D., Liu, R., & Hu, K. Gold nanoclusters: Photophysical properties and photocatalytic applications. *Frontiers in Chemistry*, **2022**, 10.
9. Nasaruddin, R. R., Chen, T., Yan, N., & Xie, J. Roles of thiolate ligands in the synthesis, properties and catalytic application of gold nanoclusters. *Coordination Chemistry Reviews*, **2018**, 368, 60-79.
10. Yau, S. H., Varnavski, O., Gilbertson, J. D., Chandler, B., Ramakrishna, G., & Goodson III, T. Ultrafast optical study of small gold monolayer protected clusters: a closer look at emission. *The Journal of Physical Chemistry C*, **2010**, 114(38), 15979-15985.
11. Aikens, C. M. Electronic structure of ligand-passivated gold and silver nanoclusters. *The journal of physical chemistry letters*, **2011**, 2(2), 99-104.
12. Jadhav, S. A., Brunella, V., & Scalapone, D. Polymerizable ligands as stabilizers for nanoparticles. *Particle & Particle Systems Characterization*, **2015**, 32(4), 417-428.
13. Zeng, C., & Jin, R. Gold nanoclusters: size-controlled synthesis and crystal structures. *Gold Clusters, Colloids and Nanoparticles I*, **2014**, 87-115.
14. Younis, M. R., He, G., Qu, J., Lin, J., Huang, P., & Xia, X. H. Inorganic nanomaterials with intrinsic singlet oxygen generation for photodynamic therapy. *Advanced Science*, **2021**, 8(21), 2102587.
15. Xie, Y., Zheng, W., & Jiang, X. Near-infrared light-activated phototherapy by gold nanoclusters for dispersing biofilms. *ACS applied materials & interfaces*, **2020**, 12(8), 9041-9049.
16. Jin, R., Zeng, C., Zhou, M., & Chen, Y. Atomically precise colloidal metal nanoclusters and nanoparticles: fundamentals and opportunities. *Chemical reviews*, **2016**, 116(18), 10346-10413.
17. Ahmad, A. A., Panicker, S., Chehimi, M. M., Monge, M., Lopez-de-Luzuriaga, J. M., Mohamed, A. A., Bruce, A. E., & Bruce, M. R. Synthesis of water-soluble gold-aryl nanoparticles with distinct catalytic performance in the reduction of the environmental pollutant 4-nitrophenol. *Catalysis Science & Technology*, **2019**, 9(21), 6059-6071.

18. Li, X. M., De Jong, M. R., Inoue, K., Shinkai, S., Huskens, J., & Reinhoudt, D. N. Formation of gold colloids using thioether derivatives as stabilizing ligands. *Journal of materials chemistry*, **2001**, 11(7), 1919-1923.
19. Dan, Q., Yuan, Z., Zheng, S., Ma, H., Luo, W., Zhang, L., Su, N., Hu, D., Sheng, Z., & Li, Y. Gold Nanoclusters-Based NIR-II Photosensitizers with Catalase-like Activity for Boosted Photodynamic Therapy. *Pharmaceutics*, **2022**, 14(8), 1645.
20. Crespo, J., Guari, Y., Ibarra, A., Larionova, J., Lasanta, T., Laurencin, D., Lopez-de-Luzuriaga, J. M., Monge, M., Olmos, M. E. & Richeter, S. Ultrasmall NHC-coated gold nanoparticles obtained through solvent free thermolysis of organometallic Au (i) complexes. *Dalton Transactions*, **2014**, 43(42), 15713-15718.
21. Alvarez, M. M., Khoury, J. T., Schaaff, T. G., Shafigullin, M. N., Vezmar, I., & Whetten, R. L. Optical absorption spectra of nanocrystal gold molecules. *The Journal of Physical Chemistry B*, **1997**, 101(19), 3706-3712.
22. Mori, T., & Hegmann, T. Determining the composition of gold nanoparticles: a compilation of shapes, sizes, and calculations using geometric considerations. *Journal of Nanoparticle Research*, **2016**, 18, 1-36.
23. Zhang, P. X-ray spectroscopy of gold–thiolate nanoclusters. *The Journal of Physical Chemistry C*, **2014**, 118(44), 25291-25299.
24. Simms, G. A., Padmos, J. D., & Zhang, P. Structural and electronic properties of protein/thiolate-protected gold nanocluster with “staple” motif: A XAS, L-DOS, and XPS study. *The Journal of chemical physics*, **2009**, 131(21).
25. Ishida, Y., Akita, I., Sumi, T., Matsubara, M., & Yonezawa, T. Thiolate–protected gold nanoparticles via physical approach: Unusual structural and photophysical characteristics. *Scientific reports*, **2016**, 6(1), 29928.
26. Caux, M., Menard, H., AlSalik, Y. M., Irvine, J. T. S., & Idriss, H. Photo-catalytic hydrogen production over Au/gC 3 N 4: Effect of gold particle dispersion and morphology. *Physical Chemistry Chemical Physics*, **2019**, 21(29), 15974-15987.
27. Kohantorabi, M., & Gholami, M. R. AgPt nanoparticles supported on magnetic graphene oxide nanosheets for catalytic reduction of 4-nitrophenol: Studies of kinetics and mechanism. *Applied Organometallic Chemistry*, **2017**, 31(11), e3806.
28. Strachan, J., Barnett, C., Masters, A. F., & Maschmeyer, T. 4-Nitrophenol reduction: probing the putative mechanism of the model reaction. *ACS Catalysis*, **2020**, 10(10), 5516-5521.
29. Zhao, P., Feng, X., Huang, D., Yang, G., & Astruc, D. Basic concepts and recent advances in nitrophenol reduction by gold-and other transition metal nanoparticles. *Coordination Chemistry Reviews*, **2015**, 287, 114-136.
30. Yao, X., Jin, M., Du, J., & Wan, D. Uniform Gold Nanoclusters Supported on Mesoporous Polymer Beads Decorated with Polyaminophosphine Patches for the Catalytic Reduction of 4-Nitrophenol. *ACS Applied Nano Materials*, **2023**, 6(8), 6653-6661.
31. Kong, X. K., Sun, Z. Y., Chen, M., & Chen, Q. W. Metal-free catalytic reduction of 4-nitrophenol to 4-aminophenol by N-doped graphene. *Energy & Environmental Science*, **2013**, 6(11), 3260-3266.
32. De Oliveira, F. M., Nascimento, L. R. B. D. A., Calado, C. M. S., Meneghetti, M. R., & Da Silva, M. G. A. Aqueous-phase catalytic chemical reduction of p-nitrophenol employing soluble gold nanoparticles with different shapes. *Catalysts*, **2016**, 6(12), 215.
33. Sheng, Y., Lin, M., Li, X., Hao, H., Lin, X., Sun, H., & Zhang, H. Enhancement of the 808 nm Photothermal Effect of Gold Nanorods by Thiol-Induced Self-Assembly. *Particle & Particle Systems Characterization*, **2014**, 31(7), 788-793.

34. Neelgund, G. M., & Oki, A. Photothermal effect: an important aspect for the enhancement of photocatalytic activity under illumination by NIR radiation. *Materials chemistry frontiers*, **2018**, 2(1), 64-75.
35. Chen, X., Chen, Y., Yan, M., & Qiu, M. Nanosecond photothermal effects in plasmonic nanostructures. *ACS nano*, **2012**, 6(3), 2550-2557.
36. Li, Y., Song, Y., Zhang, X., Liu, T., Xu, T., Wang, H., Jiang, D., & Jin, R. Atomically precise Au₄₂ nanorods with longitudinal excitons for an intense photothermal effect. *Journal of the American Chemical Society*, **2022**, 144(27), 12381-12389.
37. Chen, D., & Li, J. Ultrasmall Au nanoclusters for bioanalytical and biomedical applications: the undisclosed and neglected roles of ligands in determining the nanoclusters' catalytic activities. *Nanoscale Horizons*, **2020**, 5(10), 1355-1367.
38. Yang, D., Yang, G., Gai, S., He, F., An, G., Dai, Y., Lv, R., & Yang, P. Au 25 cluster functionalized metal-organic nanostructures for magnetically targeted photodynamic/photothermal therapy triggered by single wavelength 808 nm near-infrared light. *Nanoscale*, **2015**, 7(46), 19568-19578.
39. Meng, A. N., Chaihu, L. X., Chen, H. H., & Gu, Z. Y. Ultrahigh adsorption and singlet-oxygen mediated degradation for efficient synergetic removal of bisphenol A by a stable zirconium-porphyrin metal-organic framework. *Scientific Reports*, **2017**, 7(1), 6297.
40. Zhang, X. F., & Li, X. The photostability and fluorescence properties of diphenylisobenzofuran. *Journal of Luminescence*, **2011**, 131(11), 2263-2266.
41. Żamojć, K., Zdrowowicz, M., Rudnicki-Velasquez, P. B., Krzymiński, K., Zaborowski, B., Niedziałkowski, P., Jacewicz, D., & Chmurzyński, L. The development of 1, 3-diphenylisobenzofuran as a highly selective probe for the detection and quantitative determination of hydrogen peroxide. *Free radical research*, **2017**, 51(1), 38-46.