

Síntesis de Nanoestructuras de Oro Fluorescentes Basadas en Péptidos Sintéticos

Juliet Estefani Parada Orozco

Trabajo de Grado para Optar al Título de Química

Directora

Yuly Andrea Prada Vargas

PhD en Química

Co-director

Enrique Mejía Ospino

PhD en Química

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Bucaramanga

2024

Agradecimientos

A mis padres, por su apoyo a lo largo de este camino y sus actos de amor.

A mi hermana, por ser incondicional y siempre creer en mis proyectos.

A Sebastian, por estar para celebrar los buenos momentos y en los malos momentos soportar mi desahogo, por apoyarme en los días difíciles y alentarme a continuar.

A Gzp por tolerar mis muestras de afecto, los loles y el chisme.

A Angie, por aceptar ser mi compañera cuando fui nueva en el grupo y juntas formar el mejor equipo hasta el final.

A todos los compañeros con los que alguna vez compartí un buen momento después de clases, en centro de estudios o charlas de consuelo durante la pandemia.

A Diego, por influenciarme en adquirir hábitos de estudio en mis primeros años de carrera.

A Andrea Prada por proponerme el proyecto, su apoyo durante el desarrollo de este y en especial, por presentarme a excelentes personas de los grupos de investigación.

Al profe Mejía, el profe Cabanzo y todos los compañeros del grupo por recibirme con los brazos abiertos en el LEAM, por su apoyo en las jornadas de trabajo, por las risas y el café.

A los integrantes del GIBIM por prestarme el espacio de trabajo, materiales y compartir buenos momentos.

A las personas que sembraron cada árbol de la UIS, porque contemplarlos cada vez que estoy en la universidad, me hace feliz.

Y finalmente a mí, por ponerme metas, recorrer el camino y completarlas.

Tabla de Contenido

	Pág.
Introducción	11
1. Objetivos	14
1.1 Objetivo General	14
1.2 Objetivos Específicos.....	14
2. Antecedentes	15
3. Marco teórico	20
3.1 Nanoestructuras.....	20
3.2 Propiedades de los nanoclusters de oro (AuNC)	22
3.3 Síntesis de AuNC	23
3.3.1 Síntesis de AuNC empleando biomoléculas	25
3.4 Aplicaciones de los AuNC.....	28
3.5 Técnicas de caracterización de los AuNC	29
3.5.1 Espectroscopía UV-Vis.....	30
3.5.2 Dispersión de la luz en modo dinámico (DLS).....	30
3.5.3 Espectroscopía de fluorescencia	31
3.5.4 Espectroscopía infrarrojo	31
4. Metodología	31
4.1 Materiales y reactivos	31
4.2 Elección de variables influyentes en la síntesis de AuNC	32

4.2.1 Efecto del aumento del pH al medio de reacción	32
4.2.2 Efecto de la variación de la temperatura de reacción	33
4.2.3 Efecto de la relación volumétrica del ácido ascórbico como agente reductor	33
4.3 Síntesis química de AuNC empleando dos péptidos nuevos	34
4.4 Caracterización de los AuNC.....	34
4.4.1 Análisis del comportamiento plasmónico por espectroscopía UV-Vis	34
4.4.2 Análisis del tamaño hidrodinámico por dispersión de la luz en modo dinámico (DLS)	35
4.4.3 Análisis de las propiedades fluorescentes por espectroscopía de fluorescencia.....	35
4.4.3 Análisis por espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR)	35
5. Resultados y discusión.....	36
5.1. Efecto de variables influyentes en la síntesis de AuNC	36
5.1.1 Efecto del aumento de pH al medio de reacción.....	36
5.1.2 Efecto de la variación de la temperatura de reacción	38
5.1.3 Efecto de la relación volumétrica del ácido ascórbico como agente reductor	40
5.2 Síntesis química de AuNC	48
5.2.1 Síntesis química de AuNC empleando ácido ascórbico como agente reductor.....	48
5.2.2 Síntesis química de AuNC empleando ácido ascórbico como agente reductor a pH 12.0 ..	54
5.2.3 Síntesis química de AuNC empleando borohidruro de sodio como agente reductor	60
5.3 Análisis de las propiedades fotoluminiscentes por espectroscopía de fluorescencia	64
5.4 Análisis de las interacciones del ligando enlazado a los AuNC por espectroscopia infrarrojo (FT-IR).....	73
6. Conclusiones	75

7. Recomendaciones	76
Referencias Bibliográficas	77

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1 <i>Agentes reductores empleados en la síntesis de AuNC</i>	27

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1 <i>Copa de Licurgo</i>	15
Figura 2 <i>Máscara de Tláloc teñida de azul maya</i>	16
Figura 3 <i>Diagrama Kohn-Shan modelado para Au₂₅NC tiolados y su espectro UV-Vis</i>	18
Figura 4 <i>Propiedades de los AuNC y sus aplicaciones biológicas</i>	21
Figura 5 <i>Diagrama de Jablonski</i>	23
Figura 6 <i>Rutas sintéticas para la obtención de los AuNC</i>	24
Figura 7 <i>Métodos de síntesis de AuNC y el efecto de los ligandos en su fluorescencia</i>	26
Figura 8 <i>Prueba efecto de aumentar el pH al medio de reacción</i>	36
Figura 9 <i>Espectros UV-Vis prueba del efecto de aumentar el pH al medio de reacción</i>	37
Figura 10 <i>AuNC obtenidos a pH 12.0 con variación de temperatura</i>	38
Figura 11 <i>Espectro UV-Vis AuNC-Pep2854 y AuNC-Pep2855 a pH 12.0 con variación de temperatura</i>	39
Figura 12 <i>AuNC-Pep2854 y AuNC-Pep2855 con diferentes volúmenes de ácido ascórbico a pH 12.0</i>	41
Figura 13 <i>Espectro UV-Vis AuNC-Pep2854 y AuNC-Pep2855 con diferentes volúmenes de ácido ascórbico a pH 12.0</i>	42
Figura 14 <i>Histogramas de AuNC-Pep2854 y AuNC-Pep2855 con diferentes volúmenes de ácido ascórbico a pH 12.0</i>	45
Figura 15 <i>Síntesis de AuNC empleando ácido ascórbico como agente reductor</i>	49

Figura 16	<i>Espectros UV-Vis de AuNC con ácido ascórbico como agente reductor</i>	50
Figura 17	<i>Histogramas de AuNC con ácido ascórbico como agente reductor</i>	51
Figura 18	<i>Visualización de AuNC en cámara UV</i>	53
Figura 19	<i>AuNC-PepP22 fluorescente al irradiar con apuntador láser</i>	54
Figura 20	<i>Síntesis de AuNC con ácido ascórbico a pH 12.0</i>	55
Figura 21	<i>Espectro UV-Vis AuNC sintetizadas con ácido ascórbico a pH 12.0</i>	56
Figura 22	<i>Histograma AuNC sintetizadas con ácido ascórbico a pH 12.0</i>	57
Figura 23	<i>Visualización cabina UV de AuNC sintetizadas con ácido ascórbico a pH 12.0</i>	59
Figura 24	<i>Síntesis de AuNC con borohidruro de sodio</i>	60
Figura 25	<i>Espectros UV-Vis AuNC sintetizados con borohidruro de sodio como agente reductor</i>	61
Figura 26	<i>Histogramas AuNC sintetizados con borohidruro de sodio como agente reductor</i>	62
Figura 27	<i>Espectro de emisión de fluorescencia de AuNC-PepP22 sintetizados con ácido ascórbico como agente reductor</i>	65
Figura 28	<i>Espectros de emisión de fluorescencia de AuNC-PepP22 por tres rutas de síntesis y espectro del Péptido PepP22</i>	66
Figura 29	<i>Comparación emisión de fluorescencia de AuNC-PepP22 por tres rutas de síntesis y Péptido PepP22</i>	70
Figura 30	<i>Espectros IR PepP22 y AuNC-PepP22</i>	74

Resumen

Título: Síntesis de Nanoestructuras de Oro Fluorescentes Basadas en Péptidos Sintéticos*

Autor: Juliet Estefani Parada Orozco**

Palabras Clave: Nanoestructuras, Emisión de fluorescencia, Biosensores fluorescentes.

Descripción: La síntesis de AuNC fluorescentes empleando biomoléculas como ligandos, ha despertado gran interés en el campo de la medicina. Debido a la alta biocompatibilidad, a su capacidad para interactuar con sistemas biológicos de forma específica y selectiva. Los AuNC han sido aplicados para marcaje biológico, análisis por bioimagen, en el tratamiento de varias enfermedades y en el desarrollo de biosensores. En este trabajo de investigación se obtuvo sistemas nanoestructurados basados en oro y péptidos sintéticos, los cuales presentaron propiedades fotoluminiscentes y una distribución de tamaño inferior a los 5.0 nm. En este estudio se observó el efecto de algunas variables de síntesis como la temperatura, el pH y agente reductor tanto en la formación de AuNC fluorescentes, como su influencia en el tamaño, empleando cuatro péptidos sintéticos como ligando. Los AuNC obtenidos usando el péptido PepP22 (Ac-CTKKCGLWSILKGVGKI-NH₂) en medio básico y ácido ascórbico como agente reductor, favorecieron la formación de AuNC-PepP22 fluorescentes estables, con un tamaño hidrodinámico alrededor de los 2.0 nm y una emisión de fluorescencia a 474 nm, con una longitud de onda de máxima excitación a 400 nm. Esos resultados corroboran estudios previos que han destacado la influencia del tamaño y la composición de los precursores en la estabilidad y la fotoluminiscencia de los AuNCs.

* Trabajo de Grado

** Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Directora: Yuly Andrea Prada Vargas. Doctora en Química. Codirector: Enrique Mejía Ospino. Doctor en Química.

Abstract

Title: Synthesis of Fluorescent Gold Nanostructures Based on Synthetic Peptides*

Author(s): Juliet Estefani Parada Orozco**

Key Words: Nanostructures, Fluorescence emission, Fluorescence biosensors.

Description: The synthesis of fluorescent AuNCs using biomolecules as ligands has aroused great interest in the field of medicine. Due to the high biocompatibility, their ability to interact with biological systems in a specific and selective way. AuNCs have been applied for biomarkers, bioimaging analysis, in the treatment of various diseases and in the development of biosensors. In this research work, nanostructured systems based on gold and synthetic peptides were obtained, which presented photoluminescent properties and a size distribution of less than 5.0 nm. In this study, the effect of some synthesis variables such as temperature, pH and reducing agent on both the formation of fluorescent AuNCs and their influence on size was observed, using four synthetic peptides as ligands. The AuNCs obtained using peptide PepP22 (Ac-CTKKCGLWSILKGVGKI-NH₂) in basic medium and ascorbic acid as reducing agent, favored the formation of stable fluorescent AuNC-PepP22, with a hydrodynamic size around 2.0 nm and fluorescence emission at 474 nm, with a wavelength of maximum excitation at 400 nm. These results corroborate previous studies that have highlighted the influence of precursor size and composition on the stability and photoluminescence of AuNCs.

* Degree Work

** Faculty of Science. School of Chemistry. Director: Yuly Andrea Prada Vargar. PhD in Chemistry. Codirector: Enrique Mejía Ospino. PhD in Chemistry.

Introducción

El análisis óptico basado en el marcaje por fluorescencia es una técnica utilizada para estudiar y visualizar diferentes componentes o biomoléculas en una muestra mediante el uso de sondas fluorescentes (Briones-Vázquez & Álvarez-Hernández, 2021). Este fenómeno se basa en la capacidad de moléculas llamadas fluoróforos, para absorber la luz en una longitud de onda específica y emitir luz a una longitud de onda más larga (F. Lu et al., 2020).

Los fluoróforos utilizados principalmente para estas aplicaciones son los puntos cuánticos (QD), que son nanoestructuras semiconductoras que tienen propiedades ópticas y electrónicas únicas debido a su tamaño y estructura (J. Zheng et al., 2004a). Sin embargo, se ha detectado que los recubrimientos de estos fluoróforos pueden degradarse, lo que sugiere que las superficies reactivas pueden presentar un nivel de toxicidad que se convierte en un riesgo para la salud y un potencial impacto ambiental negativo (Lovrić et al., 2005).

Como alternativa solución, ha surgido la investigación de fluoróforos alternativos como los nanoclusters (NC) de metales como el oro, plata, platino y cobre, los cuales podrían ser una opción más segura para la salud y el medio ambiente (Y. Lu et al., 2012). Dichas nanoestructuras se forman por la agregación de átomos metálicos en estados reducidos y adoptan conformaciones estructurales altamente ordenadas en un rango de tamaño de partícula inferior a los 2.0 nm (Sun et al., 2013).

En particular, los NC de Oro (AuNC) son los candidatos potenciales para reemplazar a los fluoróforos convencionales, ya que por lo general el oro es un metal noble no tóxico, es químicamente estable y no tiende a reaccionar fácilmente con otros elementos. Esta estabilidad

química reduce la posibilidad de liberación de sustancias tóxicas en comparación con los QD. Los AuNC cuentan con una elevada biocompatibilidad, lo que significa que son menos propensos a causar reacciones adversas en sistemas biológicos, además presentan facilidad para funcionalizar su superficie usando un gran número de biomoléculas como ligando, las cuales les otorgan especificidad y selectividad (Hu et al., 2021). Exhiben una amplia gama de propiedades fisicoquímicas, optoelectrónicas y magnéticas únicas y diferentes a las de estos mismos a nivel macroscópico, estas diferencias se atribuyen principalmente a su tamaño nanométrico y su relación superficie-volumen, ya que una proporción significativa de sus átomos se encuentra en la superficie, dando como resultado una mayor reactividad y exposición de los átomos a su entorno (Y. Zheng et al., 2017). Presentan fluorescencia en la zona del visible y del infrarrojo cercano, con un tiempo de vida largo y un importante desplazamiento Stokes, es decir, presentan un desplazamiento espectral hacia una región de menor energía de emisión respecto a la energía de excitación, que permite realizar ensayos en un amplio rango del espectro de luz. Las propiedades fisicoquímicas únicas de los AuNCs los hacen atractivos para su uso tanto en los estudios científicos fundamentales como en la exploración tecnológica. Los recientes avances de estas nanoestructuras encuentran aplicaciones biológicas tales como: biosensores fluorescentes, imágenes biológicas, control medioambiental, catálisis industrial, entre otras. Los sensores fluorescentes basados en biomoléculas han sido identificados como un medio para detectar la contaminación (Bai et al., 2017), también se ha demostrado que gracias a su biocompatibilidad tienen la capacidad de medir y controlar los microorganismos desarrollados a partir del metabolismo y crecimiento de distintos patógenos, brindando una mejora a los métodos

convencionales y obsoletos de detección, los cuales cuentan con marcadas limitaciones (Cao et al., 2020a).

Este trabajo de investigación tuvo como finalidad sintetizar AuNC basados en péptidos sintéticos que exhiben propiedades fluorescentes, partiendo del estudio de las variables influyentes en el proceso de síntesis. Se sintetizaron los AuNC y se realizó la caracterización iniciando con una prueba preliminar de visualización de la ausencia de la banda de plasmón superficial en los espectros ultravioleta-visible (UV-Vis), la ausencia de esta banda en el espectro de absorción es un indicio de la posible presencia de nanoestructuras en solución. El rango de tamaño hidrodinámico presente en los sistemas nanoestructurados se determinó mediante la dispersión de luz en modo dinámico (DLS). La longitud máxima de excitación y emisión de las nanoestructuras se evaluó mediante espectroscopía de fluorescencia, midiendo los espectros de emisión de fluorescencia de los AuNC en el rango de 300 a 700 nm.

1. Objetivos

1.1 Objetivo General

Obtener nanoclusters de oro que exhiban propiedades fluorescentes usando como ligandos diferentes secuencias de péptidos cortos (14-18 AA).

1.2 Objetivos Específicos

Implementar un diseño de experimentos que permita identificar las variables más influyentes en la síntesis de AuNC fluorescentes.

Realizar la síntesis química de AuNC empleando péptidos sintéticos como plantilla molecular.

Determinar la estructura, tamaño y propiedades optoelectrónicas de los AuNC, haciendo uso de técnicas de caracterización espectroscópicas y ópticas.

2. Antecedentes

La investigación sobre nanoestructuras ha experimentado un crecimiento significativo en las últimas décadas, debido a que la particularidad de sus propiedades ha revolucionado diversos sectores de la industria, sin embargo, no es en absoluto novedosa su implementación por parte de la humanidad. La historia del uso de nanomateriales se remonta hace 4.500 años, cuando se utilizaron nanofibras de amianto natural para matrices de cerámica (Amendola et al., 2017). Los sopladores de vidrio romanos descubrieron que los vidrios impregnados con cloruro de oro se volvían rojos durante el recocido (Figura 1), probablemente debido a la reducción de la sal de oro por el monóxido de carbono.

Figura 1

Copa de Licurgo



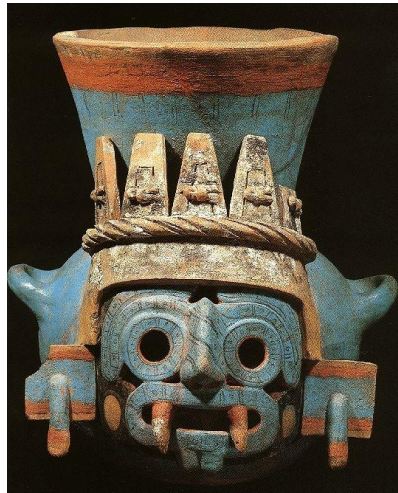
Nota. Tomado de: <https://www.hermesinstitut.org/la-copa-de-licurgo/>

Los antiguos pobladores de Mesoamérica (800 AC) utilizaban en sus murales y piezas el azul maya (Figura 2), un colorante artificial cuya composición fue descubierta por científicos en la

década de 1960. Descubrieron que estaba compuesto por dos ingredientes principales: el índigo, pigmento orgánico azul obtenido de la planta del mismo nombre, y la palygorskita, una arcilla de filosilicato de magnesio y aluminio. La palygorskita tiene largos canales interiores que permiten absorber el colorante en su superficie, estableciendo enlaces de hidrógeno entre la molécula de índigo y la arcilla(L. Li et al., 2022).

Figura 2

Máscara de Tláloc teñida de azul maya



Nota. Tomado de: <https://reconociendomexico.com.mx/tlaloc-en-el-templo-mayor/>

En 1857 Michael Faraday estudió las interacciones de la luz con partículas metálicas de oro, profundizando en la formación y naturaleza de las propiedades físicas de este material, Faraday concluyó que los colores inusuales que mostraban sus soluciones de sales de oro se debían a la presencia de partículas metálicas muy dispersas.

El concepto de nanotecnología no estuvo claro hasta finales de la década de 1950, cuando el físico Richard Feynman dio una conferencia durante una sesión de la American Physical Society en CALTECH, Estados Unidos, titulada “*There’s Plenty of Room at the Bottom*”. En esta charla, Feynman sugirió la posibilidad de fabricar máquinas a nanoescala, destacando que las leyes de la física permitían la manipulación y el control de la posición de átomos y moléculas de manera individual, similar a los bloques de construcción tipo Lego. Esta idea abrió las puertas a un nuevo mundo “infinitamente pequeño” (Xiao et al., 2023). La nanotecnología fue bautizada a principios de los 70s por el profesor Norio Taniguchi de la Universidad de Ciencias de Tokio, Japón. Taniguchi definió: “La nanotecnología consiste principalmente en el proceso de separación, consolidación y deformación de materiales por un átomo o una molécula” (Q. Zhang et al., 2021).

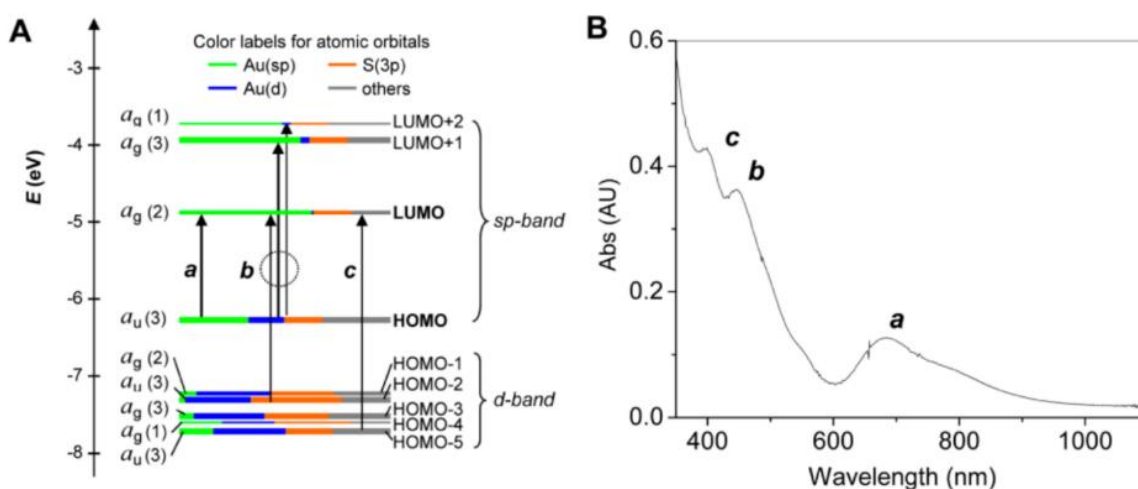
La década de los 70s también vio surgir el oro coloidal como agente de inmunotinción y agente de contraste para microscopía electrónica. Sin embargo, fueron los avances en los métodos sintéticos y las herramientas de caracterización en la década de los 90s los que sentaron las bases de los nanomateriales y aplicaciones del siglo XXI (Schaaff et al., 1998).

Las nanoestructuras fluorescentes, en particular los AuNC han sido objeto de estudio desde el año 2000. Los primeros resultados evidenciaron que la fluorescencia asociada a estas estructuras se relacionaba únicamente con el comportamiento de los electrones libres confinados en el núcleo de los átomos de oro reducidos (Au^0), sin detalles claros sobre el efecto del tamaño nanométrico de los AuNC sobre esta propiedad (Liu et al., 2020). En 2004, Zheng et al., proporcionaron la primera evidencia de la fluorescencia dependiente del tamaño y de las interacciones que tienen lugar entre el núcleo metálico y los ligandos protectores (J. Zheng et al., 2004).

La Figura 3 muestra un diagrama orbital de niveles de energía Kohn-Sham, modelado para nanoclusters de oro de tamaño Au_{25} correspondientes a AuNC tiolados.

Figura 3

Diagrama Kohn-Shan modelado para $Au_{25}NC$ tiolados y su espectro UV-Vis



Nota: A) Diagrama de niveles de energía de orbitales Kohn-Shan modelado para $Au_{25}NC$ tiolados. B) Espectro UV-Vis calculado de $Au_{25}NC$ tiolados. Tomado de (Chen Zhou, Mengxiao Yu and Jinbin Liu)

Los cálculos sobre la estructura electrónica de los clusters de Au_{25} muestran que el orbital HOMO y los tres orbitales LUMO más bajos están compuestos principalmente por orbitales atómicos $6sp$ del oro y en cierto grado de orbitales $3p$ del azufre. Las transiciones de absorción calculadas coinciden con las observaciones experimentales. Por ejemplo, el primer pico mostrado en el espectro de absorción correspondiente al salto electrónico HOMO \rightarrow LUMO a 670nm, puede considerarse una transición intrabanda $sp \rightarrow sp$. El pico de absorción a 450 nm estaría dado por

transiciones mixtas entre bandas $sp \rightarrow sp$ y $sp \leftarrow d$ y finalmente la banda de absorción a 400 nm sería atribuida a transiciones netamente $sp \leftarrow d$ (J. Zheng et al., 2012).

Por otra parte, se ha estudiado la presencia de diferentes procesos que compiten con la fluorescencia en la desactivación del estado excitado singlete. Un parámetro de gran importancia para la caracterización fotofísica de las moléculas fluorescentes es el rendimiento cuántico de fluorescencia (QY). Representa el número de fotones emitidos por una muestra respecto al número de fotones absorbidos, es decir, nos da la probabilidad de desactivación del estado excitado de la molécula a través de un proceso radiativo como la fluorescencia (Van de Looij et al., 2022).

Se han implementado diferentes rutas para sintetizar NC fluorescentes de metales nobles, con rangos de emisión entre los 400 y 750 nm. En 2017, Zheng y colaboradores., utilizaron NaBH_4 como agente reductor y dendrímeros para encapsular AuNC en un régimen de tamaño inferior a 2 nm con una emisión de fluorescencia desde el rango visible hasta el infrarrojo cercano (Y. Zheng et al., 2017). Algunas biomoléculas se han utilizado como agente de recubrimiento y reducción en la síntesis de AuNC fluorescentes (Zhuang et al., 2020). Recientemente, la albúmina de suero bovino (BSA) y otras biomoléculas se han utilizado como agente de recubrimiento y reducción en la síntesis de AuNC fluorescentes. Además, debido a su solubilidad en agua y funcionalización predominantes, se han introducido varios ligandos tiolados pequeños, como el glutatión (GSH), la D-penicilamina, la L-3,4-dihidroxifenilalanina y el ácido dihidrolipoico (B. Zhang et al., 2021). Duan y colaboradores., desarrollaron un método de grabado para sintetizar AuNC recubiertos de polietilenimina con emisión en el azul (L. Li et al., 2022).

Debido a la facilidad para funcionalizar o modificar la superficie de los AuNCs una vez han sido sintetizados, han sido empleados en terapia dirigida, encapsulación de moléculas

bioactivas y para el diseño de biosensores. Aunque hay desafíos por superar, como la optimización de la selectividad y la seguridad en las aplicaciones clínicas; el potencial inherente de los AuNC en el ámbito de la biociencia apunta hacia un futuro de grandes avances en este campo de las ciencias.

3. Marco teórico

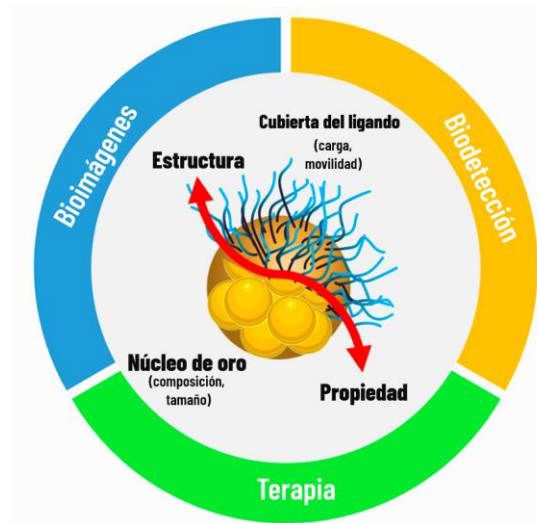
3.1 Nanoestructuras

La nanotecnología es una disciplina científica que integra conocimientos de ciencias como la biología, física, química e ingeniería con el objetivo de desarrollar, diseñar y aplicar estrategias que involucran el uso de nanomateriales para resolver problemas y desafíos en diferentes ámbitos (Shang et al., 2011). Durante los últimos años, los investigadores han logrado desarrollar sistemas nanoestructurados, los cuales han sido empleados como herramientas alternativas para la terapia contra el cáncer, diseño de plataformas de transporte de fármacos, nuevos agentes antibióticos, antifúngicos, antiparasitarios y antivirus basados en nanoestructuras y en la implementación de nuevos sistemas de detección basados en las propiedades optoelectrónicas de los AuNC, las cuales pueden ser medidas de acuerdo con el medio circundante y cambian cuando este medio es perturbado por la presencia e interacción con otras moléculas. Entre las nanoestructuras más conocidas se encuentran: los QD de grafeno, nanocompositos de carbono, los fullerenos, nanopartículas (NP) metálicas, NP poliméricas, y los llamados nanoclusters metálicos (Ding et al., 2018). El interés en las nanoestructuras es debido a sus propiedades, las cuales están ligadas a su tamaño nanométrico y pueden variar significativamente en la medida que este tamaño aumenta unos pocos nanómetros. Dentro de los factores importantes respecto al tamaño están: (I) mayor

relación superficie-volumen, ya que una proporción significativa de sus átomos se encuentra en la superficie, esto resulta en una mayor reactividad y exposición de los átomos a su entorno, (II) los fenómenos cuánticos que tienen lugar como consecuencia de la reducción del tamaño y el confinamiento electrónico. Estos efectos dominan el comportamiento de los sistemas nanoestructurados, afectando sus propiedades ópticas, electrónicas y magnéticas (Y. Lu et al., 2012). En la Figura 4, se pueden observar las propiedades y aplicación de las nanoestructuras en función del tamaño.

Figura 4

Propiedades de los AuNC y sus aplicaciones biológicas



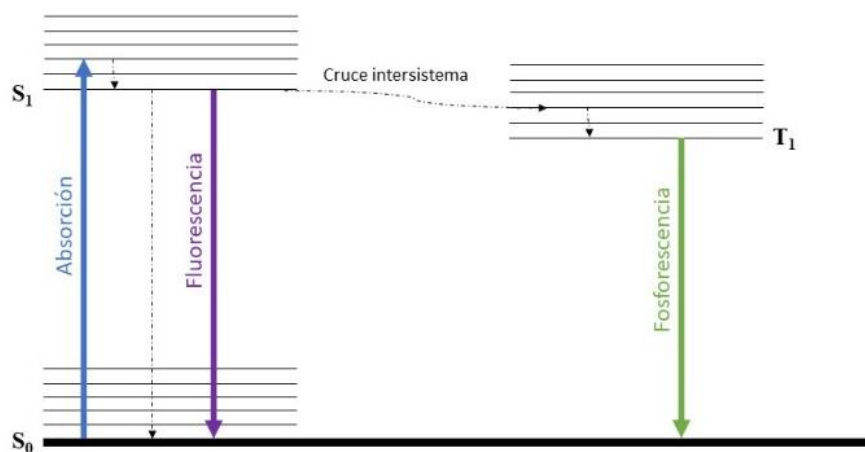
Dentro de este conjunto de nanoestructuras, los nanoclusters (NC) de metales nobles como la plata y el oro, han recibido la mayor atención en los últimos 10 años, ya que sus dimensiones se encuentran en el régimen sub-nanométrico. En este sentido, los nanoclusters son agregaciones de un número pequeño de átomos metálicos reducidos con conformaciones de estructuras altamente

finas, cuyo comportamiento cuántico es casi como el de las moléculas ('quasi-molecular') lo cual les confiere propiedades fluorescentes ya que los electrones confinados en su diminuta superficie, pueden absorber fotones dando lugar a las transiciones electrónicas y posterior emisión radiativa una vez se retorna al estado fundamental como en las moléculas (J. Zheng et al., 2004)

3.2 Propiedades de los nanoclusters de oro (AuNC)

Como se ha mencionado anteriormente, a las propiedades ya presentes en otras nanoestructuras, los nanoclusters son materiales aún más novedosos y atractivos debido a que pueden exhibir fenómenos fotoluminiscentes, especialmente fluorescencia (Halawa et al., 2018).

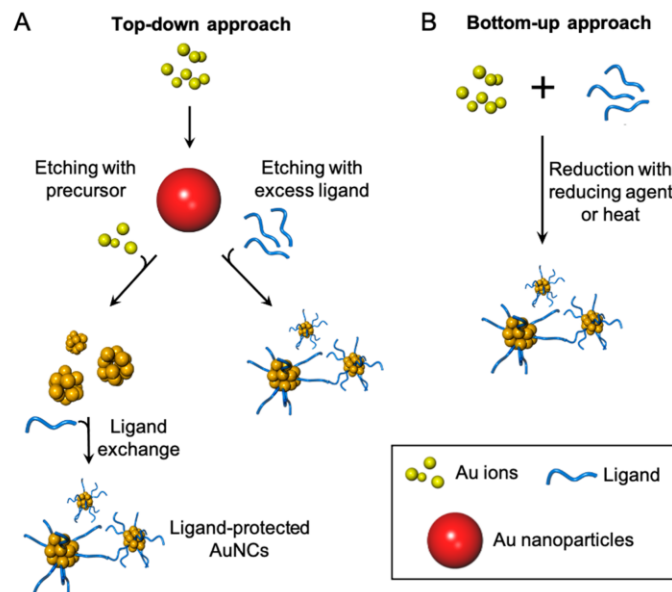
La fotoluminiscencia es un fenómeno óptico donde las nanoestructuras emiten luz tras absorber radiación electromagnética, como la luz UV, visible o infrarroja cercana. Esto implica la excitación de electrones a niveles de energía superiores, seguida de su retorno al estado basal, liberando energía en forma de luz a través de fenómenos de emisión radiativa. Los fenómenos de emisión de fotones o procesos de desactivación radiativos son: la **fluorescencia**, que es la propiedad fotoluminiscente predominante en los AuNC, se da de nanosegundos a microsegundos después de la excitación. Por otra parte, se encuentra la **fosforescencia**, presenta una diferencia importante respecto a la fluorescencia: la emisión de luz ocurre con un retraso significativo después de que cesa la excitación, a menudo en el rango de milisegundos a horas. (Makarava et al., 2005). La Figura 5 ilustra el diagrama de Jablonski el cual presenta los procesos de desactivación radiativos.

Figura 5*Diagrama de Jablonski*

Nota: Fluorescencia: Tras la absorción de energía, el electrón vuelve desde el estado excitado S_1 al estado basal S_0 . Fosforescencia: en este caso el electrón excitado en S_1 sufre un cruce intersistema y se traslada a un estado triplete T_1 , desde allí vuelve al estado basal S_0

3.3 Síntesis de AuNC

La síntesis de AuNC puede ser llevada a cabo desde dos métodos: **I) métodos descendentes** (*top-down*) y **II) métodos ascendentes** (*bottom-up*). Como se observa en la Figura 6. La síntesis descendente involucra principalmente métodos físicos y se fundamenta en fragmentar los materiales sólidos en proporciones más pequeñas. En este sentido, la trituración mecánica y la ablación láser sobre una lámina metálica y la subsiguiente estabilización de las nanopartículas metálicas resultantes mediante la adición de agentes protectores coloidales, es uno de los ejemplos de este tipo de métodos.

Figura 6*Rutas sintéticas para la obtención de los AuNC*

Nota. A) Método descendente (top-down): se sintetizan grandes AuNPs y, posteriormente, se graban en pequeños NCs utilizando una pequeña cantidad de solución precursora o un exceso de ligando. B) Método ascendente (bottom-up): Los NCs se sintetizan reduciendo los iones Au^{3+} y el complejo del ligando utilizando un agente reductor o calor. Tomado de (Cifuentes-Rius et al., 2021).

Los AuNC sintetizados por estos métodos, generalmente presentan un bajo rendimiento de reacción y requieren el uso de compuestos tóxicos, lo cual está lejos de ser ideal para aplicaciones biomédicas (L. Zhang & Wang, 2014).

En el otro extremo se encuentran los métodos ascendentes (bottom-up), que es el más común en la síntesis de NC. En esta ruta de síntesis, los iones de oro (Au^{3+}) se reducen a átomos de Au^0 , luego, los AuNC continúan creciendo por procesos de nucleación de los átomos de Au^0 ya

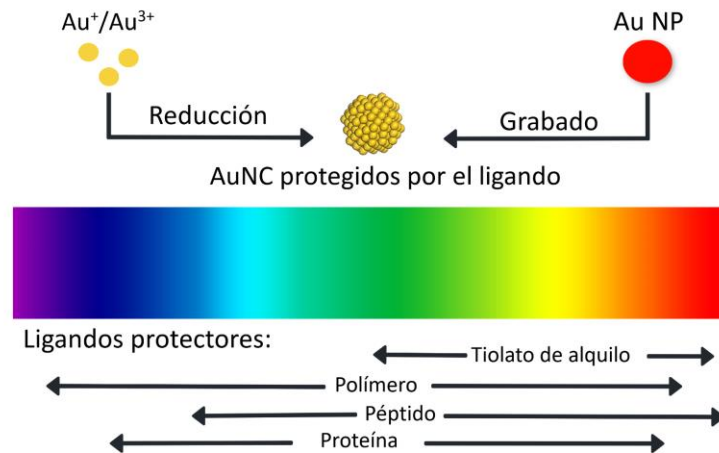
formados (W. Zhang et al., 2017). La síntesis por este enfoque involucra principalmente métodos químicos como la reducción de metales, síntesis solvotermal, síntesis sol-gel, fotoreducción de iones metálicos, síntesis por micelas, agregación coloidal, síntesis electroquímica, entre otros (B. Zhang et al., 2021).

3.3.1 Síntesis de AuNC empleando biomoléculas

En la Figura 7 se observa la región del espectro visible en la cual los AuNC presentan emisión de fluorescencia según el tipo de ligando. La selección de ligandos es crucial en este tipo de síntesis, ya que no solo estabilizan los AuNC resultantes, sino que también influyen en su forma y tamaño (Yao et al., 2018). Algunos de los ligandos comúnmente utilizados para la síntesis de nanoclusters suelen incluir pequeñas moléculas orgánicas, ADN, oligonucleótidos, dendrímeros, polímeros, tiolatos, proteínas y péptidos. Estos últimos son empleados usualmente para producir AuNC aptos para aplicaciones biomédicas (An et al., 2015). En particular, los compuestos tiolados como el tripéptido GSH se utilizan como ligando estabilizador en la reducción química de un precursor de Au, generalmente el ácido cloroaurico (HAuCl_4). La fuerte tendencia que tienen los átomos de azufre a interactuar con el oro permite formar enlaces tipo Au-S altamente estables. Los AuNC protegidos con moléculas tiol podría ajustarse de la región azul a la región NIR. Desafortunadamente, estos AuNC protegidos con tiol presentan bajos rendimientos cuánticos y raramente superan el 0.1% (Wu et al., 2011).

Figura 7

Métodos de síntesis de AuNC y el efecto de los ligandos en su fluorescencia



Los agentes reductores comúnmente empleados en el enfoque ascendente son: borohidruro de sodio ($NaBH_4$), hidrato de hidrazina, tetrakis(hidroximetil)fosfonio (THPC), citrato o ácido ascórbico (Cao et al., 2020b). La selección del agente reductor es fundamental ya que puede influir en las propiedades, tamaño y forma de las nanopartículas obtenidas, se debe evaluar la capacidad del agente reductor seleccionado para reducir el precursor metálico y formar nanopartículas de manera eficiente, esto puede depender de la estructura y la capacidad de donación de electrones del agente reductor (S. Zhu et al., 2020).

A continuación, se presenta una tabla con ventajas y desventajas de distintos agentes reductores empleados en la síntesis de AuNC con biomoléculas como plantilla molecular:

Tabla 1*Agentes reductores empleados en la síntesis de AuNC*

Agente reductor	Ventajas	Desventajas	Volumen o masa agente reductor (para 150 μ L de solución) *
Glutation (GSH)	<ul style="list-style-type: none"> Reducción suave y controlada, permite la formación de clusters homogéneos. Mantiene la estabilidad coloidal de los AuNC. No es considerado tóxico en pequeñas cantidades. Su biocompatibilidad lo hace ideal para aplicaciones biomédicas. 	<ul style="list-style-type: none"> Debido a su facilidad de interacción con otras moléculas biológicas, podría afectar la funcionalidad de los péptidos. Podría ser difícil de purificar debido a su polaridad y tendencia a formar enlaces disulfuro. 	20 μ L
NaBH₄	<ul style="list-style-type: none"> Actúa rápidamente, lo que significa que la síntesis se puede llevar a cabo en un periodo de tiempo corto. Altamente eficiente y ampliamente utilizado en la síntesis de AuNC para aplicaciones biomédicas. 	<ul style="list-style-type: none"> Su uso puede generar residuos tóxicos perjudiciales para la salud. Puede ser difícil controlar la cinética de reacción y la nucleación de los AuNC, lo que puede dar lugar a una distribución de tamaño más amplia y menos uniforme. 	0.75 μ L
Ácido 11-mercaptopundecanoico	<ul style="list-style-type: none"> Se adsorbe en la superficie de los AuNC, lo cual da estabilidad, dispersabilidad y ayuda a prevenir la agregación y oxidación de los cluster. El carboxilo presente en uno de sus extremos puede favorecer la funcionalización de los AuNC formados. 	<ul style="list-style-type: none"> Puede ser difícil de purificar debido a su tamaño y polaridad, lo que hace que se adhiera más fuerte a la superficie de los AuNC. 	1mg
Ácido ascórbico	<ul style="list-style-type: none"> Puede actuar como agente estabilizante, previniendo la agregación de los AuNC y limitando su tamaño. 	<ul style="list-style-type: none"> Baja estabilidad a largo plazo por posible 	3.75 μ L

-
- No es un reactivo tóxico, lo que hace favorable su uso en aplicaciones biomédicas.
 - Se adsorbe en la superficie de los AuNC y forma una capa de protección.
 - oxidación en presencia de oxígeno.
 - Puede ser difícil de purificar debido a su polaridad y posible oxidación.
-

Nota. * Las cantidades son aproximaciones realizadas a partir de las relaciones volumétricas/masas encontradas en artículos que emplean estos agentes reductores en el proceso de síntesis.

Por otra parte, se ha identificado que el pKa de los grupos ionizables que conforman el ligando protector afecta en gran medida a la estructura y la actividad de los NC, lo que determina el estado del compuesto en la solución, por lo tanto, considerar la regulación del pH del medio de reacción constituye otro aspecto esencial que debe analizarse en la síntesis de AuNC (T. Li et al., 2023). Adicionalmente, es importante tener en cuenta otras variables en el proceso de síntesis como son: la selección del solvente, agitación constante, temperatura de reacción y tiempo de incubación de la muestra. Teniendo en cuenta estos aspectos clave a la hora de realizar la síntesis de los AuNC, es posible controlar el tamaño, la estructura, así como las propiedades superficiales y ópticas de los productos obtenidos (Z. Wang et al., 2020).

3.4 Aplicaciones de los AuNC

Dentro de las aplicaciones más recientes y notorias de los nanoclusters de oro se encuentra: el desarrollo de biosensores basados en fluorescencia, se han diseñado nanoestructuras de oro fluorescentes para el ensayo de Hg^{2+} , un contaminante ambiental altamente tóxico, el cual puede encontrarse en diferentes entornos biológicos, fuentes de agua y suelo, producto de las prácticas humanas, generando efectos perjudiciales sobre el cerebro, sistema nervioso y órganos por acumulación en los organismos vivos (X. H. Zhang et al., 2015). También se han reportado investigaciones en torno a la detección y diagnóstico temprano de enfermedades, atravesando el

sensado de moléculas, microorganismos involucrados en dichas infecciones. El uso de los AuNC en estas aplicaciones se basa principalmente en los cambios en la emisión de fluorescencia, ya sea apagamiento, intensificación o desplazamiento de la señal cuando estos sistemas interactúan con el target de interés (N. Li et al., 2019). También se ha reportado el estudio del apagamiento de fluorescencia homóloga competitiva en el análisis de proteínas (L. Zhang & Wang, 2014). Se han obtenido resultados empleando AuNC como sondas fluorescentes de bioimagen, en estudios *in vitro* e *in vivo* realizados sobre animales con el objetivo de detectar células cancerosas e infecciones bacterianas (Le Guével et al., 2011). Dicha aplicación se ha logrado observar debido a que la señal de emisión de fluorescencia de los AuNC en organismos vivos puede distinguirse espectralmente. Los AuNC como agentes antibacterianos podrían interactuar con las bacterias para provocar un desequilibrio en el metabolismo celular bacteriano, lo que daría lugar a un aumento de las especies reactivas del oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) intracelular y, por tanto, mataría a las bacterias. Otras investigaciones descubrieron que cuanto más negativamente cargadas están las AuNC, más ROS producen, lo que permite una mayor eficacia en la eliminación de bacterias (Zi et al., 2021).

3.5 Técnicas de caracterización de los AuNC

Se han descrito varios métodos de caracterización para garantizar el éxito de la síntesis de AuNC e investigar las características ópticas, estructurales y electrónicas que dependen en gran medida del tamaño, la composición y la vía de síntesis. La mayoría de estos métodos son espectrofotométricos, los cuales han permitido analizar y comprender las características presentes en las nanoestructuras sintetizadas (Halawa et al., 2018).

A continuación, se exponen los métodos de caracterización que permitieron estudiar la composición de los AuNC sintetizados en este proyecto de investigación.

3.5.1 Espectroscopía UV-Vis

La espectroscopía UV-Vis es esencial en la caracterización de los AuNC ya que puede brindar información sobre el tamaño de estas nanoestructuras mediante la interacción de la luz ultravioleta-visible con los NC. Las NP con tamaño entre 5.0 - 100 nm exhiben plasmones de superficie, estos son oscilaciones colectivas de electrones en la superficie del material en respuesta a la radiación electromagnética generando bandas de absorción en el espectro UV-Vis, que varían según el tamaño y la forma de las NP. La ausencia de una banda de plasmón superficial cerca de los 540 nm, indica la presencia de partículas con tamaño inferior a 2.0 nm, lo cual está relacionado con la fluorescencia de los nanoclusters (Amendola et al., 2017).

3.5.2 Dispersión de la luz en modo dinámico (DLS)

La dispersión de la luz en modo dinámico (DLS) es una técnica óptica para analizar la distribución de tamaños de las nanoestructuras en suspensión. Se basa en las fluctuaciones de la intensidad de la luz dispersada por partículas en movimiento debido a la difusión browniana. Estas fluctuaciones reflejan el tamaño de las partículas: partículas más grandes generan fluctuaciones más lentas, mientras que las más pequeñas generan fluctuaciones más rápidas (Lin et al., 2018).

Medir el tamaño de los AuNC es crucial para ajustar las condiciones de síntesis y entender sus propiedades ópticas, se ha demostrado que AuNC con tamaño inferior a los 2.0 nm pueden tener propiedades de absorción y emisión de luz (Carro et al., 2021).

3.5.3 Espectroscopía de fluorescencia

La espectroscopía de fluorescencia utiliza el fenómeno de la fluorescencia molecular para analizar propiedades de moléculas y su entorno. Esta técnica estudia la absorción y emisión de luz de las moléculas fluoróforas, brindando datos sobre su estructura, concentración, interacciones y dinámica. El proceso incluye: (I) absorción de energía por la molécula, (II) paso a un estado excitado de electrones; (III) relajación no radiativa a estados de menor energía; (IV) emisión de fluorescencia al volver al estado fundamental, y (V) registro del espectro de emisión (Zhao et al., 2021).

3.5.4 Espectroscopía infrarrojo

Cuando los AuNC están ligados a biomoléculas u otros compuestos orgánicos, la espectroscopia infrarroja puede ser una técnica útil para caracterizar estas interacciones y comparar los espectros del ligando antes y después de la unión a los AuNC, es posible detectar cambios en grupos funcionales y en las bandas de absorción, lo que revela la naturaleza de estas interacciones (H. Zhu et al., 2022).

4. Metodología

4.1 Materiales y reactivos

Los reactivos empleados en este proyecto de investigación fueron: ácido tetracloroáurico trihidratado ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 99.9%, Sigma-Aldrich), L-cisteína ($\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2\text{S}$, 97%, Sigma-Aldrich), hidróxido de sodio (NaOH, Merck Millipore), ácido ascórbico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$, 99.0%, Sigma-Aldrich), agua tipo I, Milli-Q, (Merck Millipore), péptidos sintéticos: Pep2854 (H_2N -HYSRTENMGTSNAC-COOH), Pep2855 (H_2N -KTFLKICKRPYVPSEP-COOH), PepP17 (Ac-

ATKKCGLWSILKGVGKI-NH₂) y PepP22 (Ac-CTKKCGLWSILKGVGKI-NH₂), agitador orbital digital Thermo Scientific MaxQ 4450, cámara ultravioleta UV – CM series - Spectroline.

4.2 Elección de variables influyentes en la síntesis de AuNC

Se reprodujo la síntesis de AuNC basados en los péptidos Pep2854 (H₂N-HYSRTENMGTSNAC-COOH) y Pep2855 (H₂N-KTFLKICKRPYVPSEP-COOH), en la cual se empleó como agente reductor borohidruro de sodio (NaBH₄), propuesta en estudios previos del grupo de investigación LEAM (Prada, 2022). Para el presenta trabajo, se usaron estos dos péptidos (Pep2854 y Pep2855) como un modelo comparativo respecto a una nueva ruta de síntesis propuesta con variación de pH de la reacción, uso de ácido ascórbico como agente reductor con el fin de evaluar su influencia en la formación y estabilidad de AuNCs fluorescentes. Esto con el fin de establecer una ruta de síntesis diferente a través de la cual los sistemas de oro nanoestructurado exhibieron fluorescencia, se seleccionaron las siguientes variables de acuerdo con lo reportado por la literatura:

- pH (8.0 y 12.0)
- Temperatura de reacción (40°C, 50°C, 60°C y 70°C)
- Agente reductor (Borohidruro de sodio y ácido ascórbico)

4.2.1 Efecto del aumento del pH al medio de reacción

Se estudió la capacidad del péptido para actuar como ligando y agente estabilizador sin hacer uso de agentes reductores externos, únicamente llevando la reacción a pH alcalino, empleando una solución de NaOH (100 mM). Para todos los ensayos realizados, se mantuvo constante la relación molar de (1:3) entre los iones Au³⁺ y el Péptido, teniendo en cuenta que esta

relación molar se ha reportado en la literatura como la que favorece la síntesis de AuNC basado en péptidos y proteínas (Wu et al., 2011).

En este sentido, el pH de las soluciones de péptidos (Pep2854 y Pep2855), fue ajustado por adición de una solución de NaOH (100 mM) hasta alcanzar valores de 8.0 y 12.0. Seguidamente, 250µl de cada solución de péptido (3.0 mM) fue adicionada a 250µL de H_{Au}Cl₄ (1.0 mM) en un tubo eppendorf. Las mezclas se sometieron a agitación por ultrasonido durante 15 minutos a temperatura ambiente, esto con el fin de homogenizar, prevenir la agregación entre las moléculas del péptido, asegurar una mayor disposición espacial para la interacción entre las cadenas laterales del péptido y los iones Au³⁺ en solución.

4.2.2 Efecto de la variación de la temperatura de reacción

Para evaluar el efecto de la temperatura, las mezclas a diferente pH sintetizadas en el ítem anterior fueron calentadas a baño de maría depositado sobre una placa de calentamiento, hasta alcanzar temperaturas de 40°C, 50°C, 60°C y 70°C.

4.2.3 Efecto de la relación volumétrica del ácido ascórbico como agente reductor

Para este ensayo se mantuvo constante la relación entre el péptido y los iones Au³⁺ y se emplearon los péptidos modelo (Pep2854 y Pep2855). Se adicionaron 250µl de cada solución del péptido (3.0 mM) sobre 250µl de H_{Au}Cl₄ (1.0 mM) en tubo eppendorf. En experimentos en paralelo, se evaluó la relación molar entre el ácido ascórbico a una concentración de 50 mM, adicionando los volúmenes correspondientes para satisfacer las relaciones molares de 1:30, 1:50 y 1:100, respecto al precursor de oro. Finalmente, las muestras se sometieron a agitación en un agitador orbital digital Thermo Scientific MaxQ 4450, durante 12 h a temperatura ambiente.

4.3 Síntesis química de AuNC empleando dos péptidos nuevos

Una vez establecidas las condiciones de síntesis para los péptidos modelo, se emplearon dos péptidos nuevos designados como PepP17 (Ac-ATKKCGLWSILKGVGKI-NH₂) y PepP22 (Ac-CTKKCGLWSILKGVGKI-NH₂), ambos péptidos con residuos de cisteína para mejorar la interacción de estas biomoléculas con los átomos de Au una vez reducidos. Estos péptidos fueron sintetizados por el Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología (GIBIM), como parte de un conjunto de péptidos antimicrobianos y fueron donados para este proyecto.

Para este ensayo, se mezclaron 250µl de cada péptido (3.0 mM) con 250µl de HAuCl₄ (1.0 mM). Las muestras se llevaron a agitación por ultrasonido durante 15 minutos y posteriormente se adicionaron 500 µL de ácido ascórbico 0.1mM. La muestra se llevó a agitación constante durante 12 horas en un agitador orbital digital Thermo Scientific MaxQ 4450. Concluida la reacción, las muestras se conservaron en nevera a -4°C para su caracterización fisicoquímica.

4.4 Caracterización de los AuNC

La combinación de múltiples técnicas analíticas puede proporcionar información acerca de la estructura y propiedades fisicoquímicas de los AuNC sintetizados, así como predicciones acerca de su comportamiento en aplicaciones biológicas.

4.4.1 Análisis del comportamiento plasmónico por espectroscopía UV-Vis

Las mediciones se llevaron a cabo en un espectrofotómetro UV-Vis Perkin Elmer Modelo UV-1800, usando dos microceldas de cuarzo con capacidad para 100µL y un paso óptico de 0.1 cm. En las celdas se depositaron 100µL de analito (AuNC) y 100µL de blanco para determinar la ausencia de la banda de plasmón superficial.

4.4.2 Análisis del tamaño hidrodinámico por dispersión de la luz en modo dinámico (DLS)

Este análisis se realizó empleando el equipo de Zetasizer Malvern NanoseriesZS90, equipado con un láser Nd_YAG de 635 nm con un ángulo de 90°. Se depositaron 100 µL de los AuNC preparados sobre una celda de polipropileno con capacidad de 1.0 mL y se completó el volumen restante con solvente, se recolectó la dispersión a 90°. El análisis se realizó por triplicado para cada muestra, con el fin de obtener un tamaño promedio en cada caso.

4.4.3 Análisis de las propiedades fluorescentes por espectroscopía de fluorescencia

Las medidas se realizaron en un espectrofluorimetro Marca Photon Technology International (PTI) Modelo QM40 con lámpara de Xenón y detector fotomultiplicador 814. Las muestras de AuNC se depositaron en una microcelda de cuarzo de capacidad 250 µL, con un paso óptico de 1.0 mm. Los espectros fueron adquiridos en un tiempo de integración de 1,0 nm·s⁻¹. Se recolectaron espectros de emisión usando diferentes longitudes de onda de excitación en un rango de 300 a 420 nm, a partir de los cuales se logró determinar la longitud de onda de máxima emisión

4.4.3 Análisis por espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR)

La caracterización por FT-IR se realizó únicamente al sistema AuNC-PepP22, el cuál exhibió una mayor emisión de fluorescencia. Este análisis se realizó usando un espectrofotómetro Thermo Scientific NICOLET iS50 F-IR equipado con una celda de ATR. El espectro fue adquirido en un rango de 400 hasta 4000 cm⁻¹, para AuNC-PepP22 y el péptido P22, con el fin de analizar y comparar las variaciones en las bandas de absorción de cada muestra.

5. Resultados y discusión

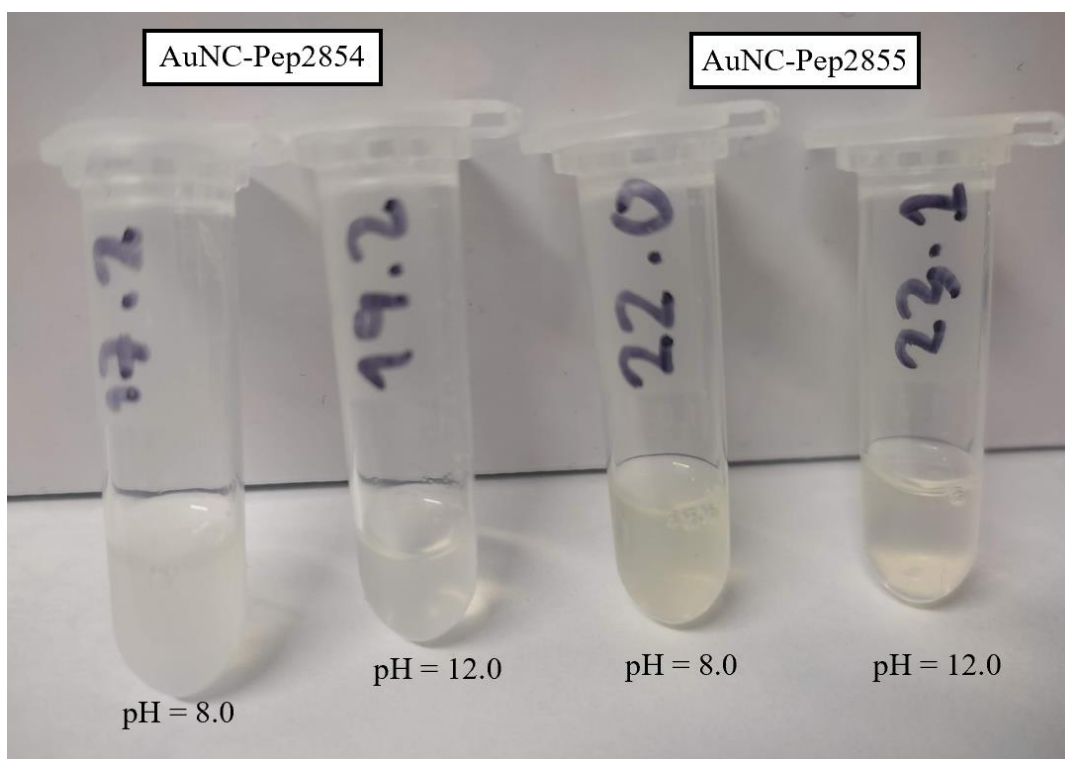
5.1. Efecto de variables influyentes en la síntesis de AuNC

5.1.1 Efecto del aumento de pH al medio de reacción

Algunas de las muestras preparadas en esta prueba preliminar sólo presentaron una leve coloración amarilla luego de finalizar el tiempo de agitación (Figura 8), esta coloración podría ser debido a la sal de oro disuelta en el medio de reacción y no a la formación de nanoestructuras.

Figura 8

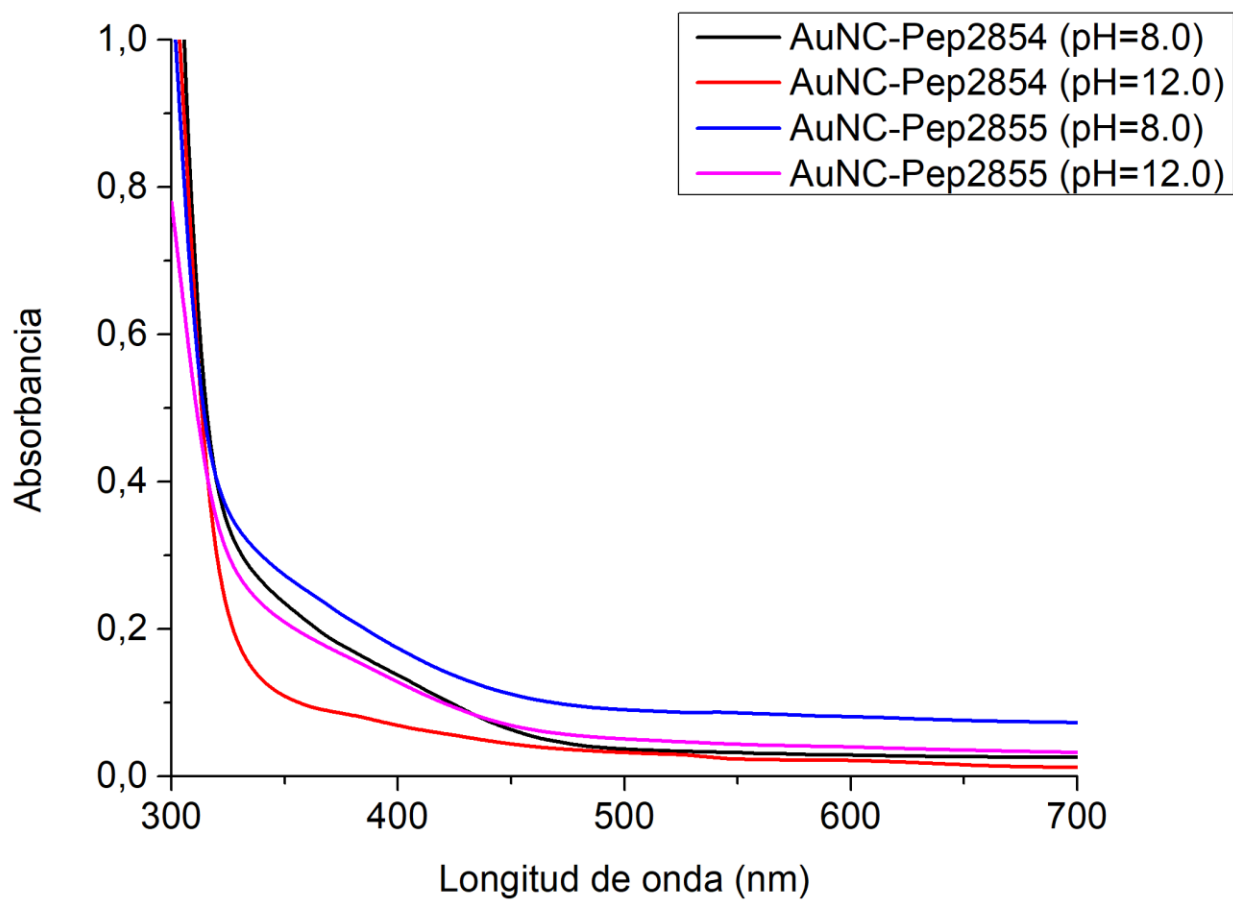
Prueba efecto de aumentar el pH al medio de reacción



Se tomaron los espectros UV-Vis de las cuatro muestras, en el espectro obtenido no se evidenció la señal representativa de la banda de plasmón superficial alrededor de los 520 nm, (Figura 9), esto podría deberse a que no haya AuNC presentes en la muestra, teniendo en cuenta que, en los reactivos de partida, el ligando cumple el rol también de agente reductor y es probable que no tenga la capacidad por sí solo de reducir los iones Au^{3+} y promover la formación de nanoestructuras.

Figura 9

Espectros UV-Vis prueba del efecto de aumentar el pH al medio de reacción

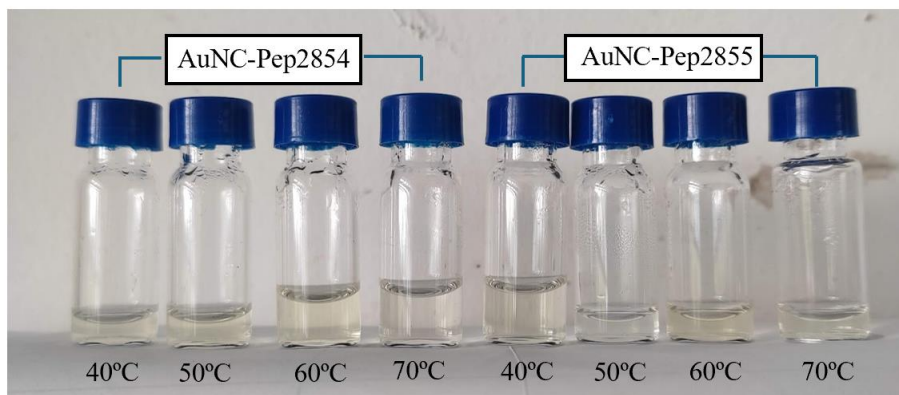


5.1.2 Efecto de la variación de la temperatura de reacción

El calentamiento puede acelerar el proceso de síntesis de AuNC, ya que puede mejorar la solubilidad de los reactivos y productos de la mezcla, lo que facilita la interacción entre la sal de oro y los péptidos (Xiao et al., 2023). Luego de someter a calentamiento las muestras a pH 12.0 durante 2 horas, no se observaron cambios representativos en las muestras (Figura 10), la leve coloración amarilla en algunas de ellas se produjo unos minutos después de disponer la mezcla a baño de maría, posiblemente se deba a la disolución de la sal de oro como efecto del calor.

Figura 10

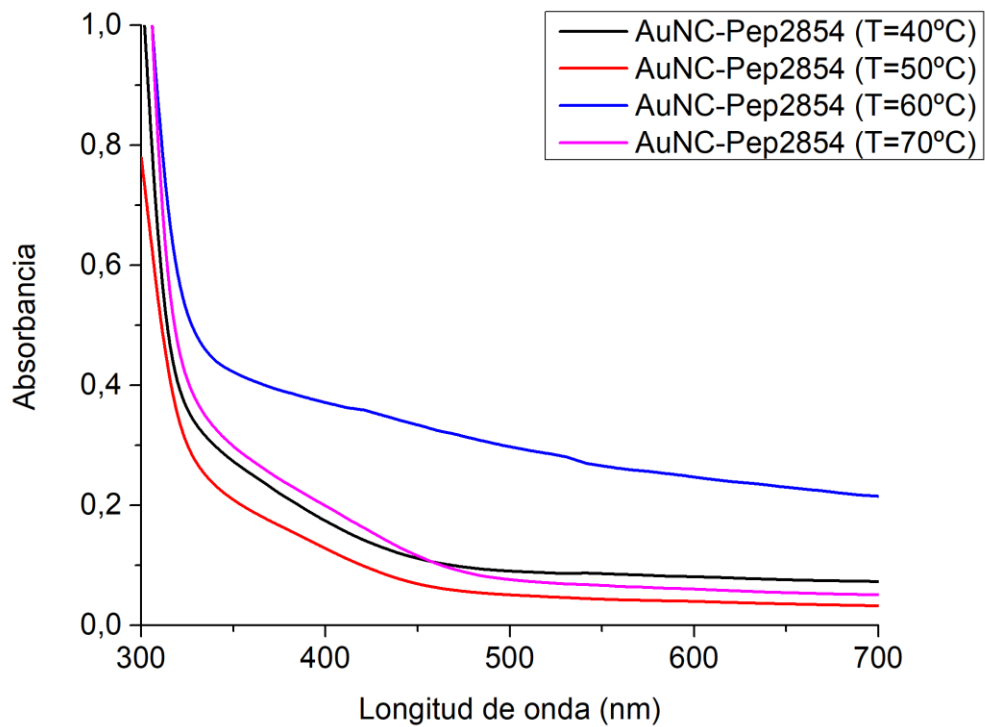
AuNC obtenidos a pH 12.0 con variación de temperatura

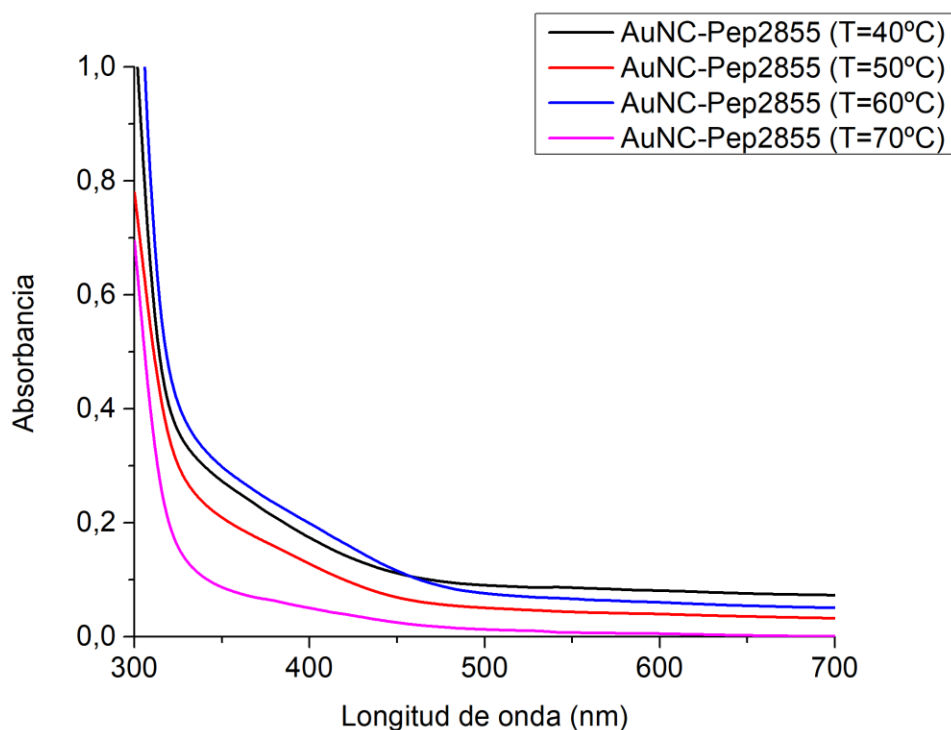


Se tomaron los espectros UV-Vis para las mezclas de cada péptido sometidas a calentamiento, no se observaron señales representativas de la formación de nanoestructuras en ninguno de ellos (Figura 11).

Figura 11

Espectro UV-Vis AuNC-Pep2854 y AuNC-Pep2855 a pH 12.0 con variación de temperatura





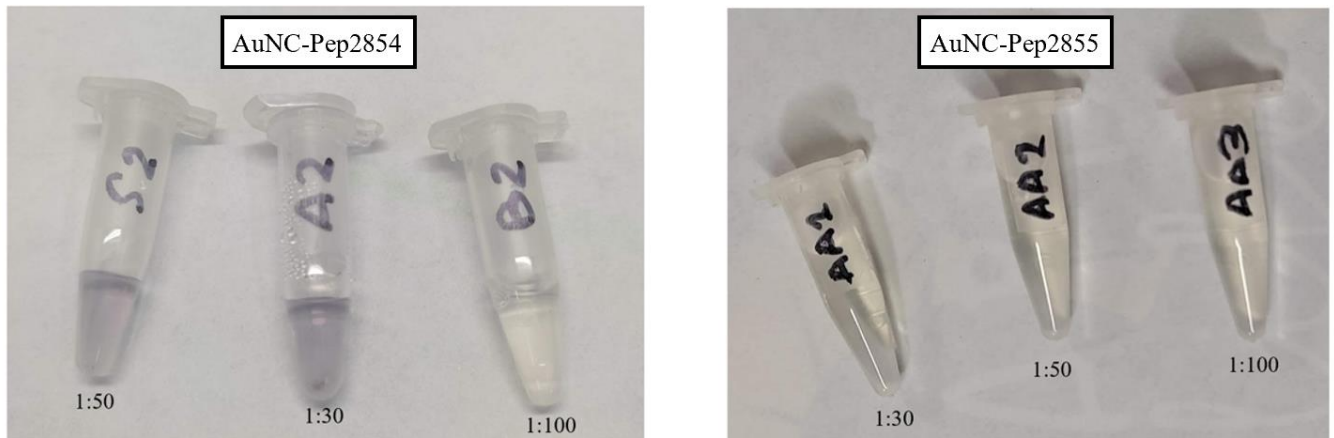
Se decidió retirar la variable temperatura de los ensayos, teniendo en cuenta que en los resultados no se encontró un efecto significativo y por el contrario esta variable podría ocasionar una alteración en la estructura y funcionalidad de los péptidos (X. Wang et al., 2018).

5.1.3 Efecto de la relación volumétrica del ácido ascórbico como agente reductor

En el estudio del efecto del uso del agente reductor se observó un cambio en las muestras correspondientes a AuNC-Pep2854 con relación volumétrica de ácido ascórbico 1:50 y 1:30, así como pequeñas partículas moradas, probablemente son nanoestructuras más grandes que se sedimentaron por el aumento de tamaño e inestabilidad en la reacción, las muestras de AuNC-Pep2855 no presentaron coloración (Figura 12).

Figura 12

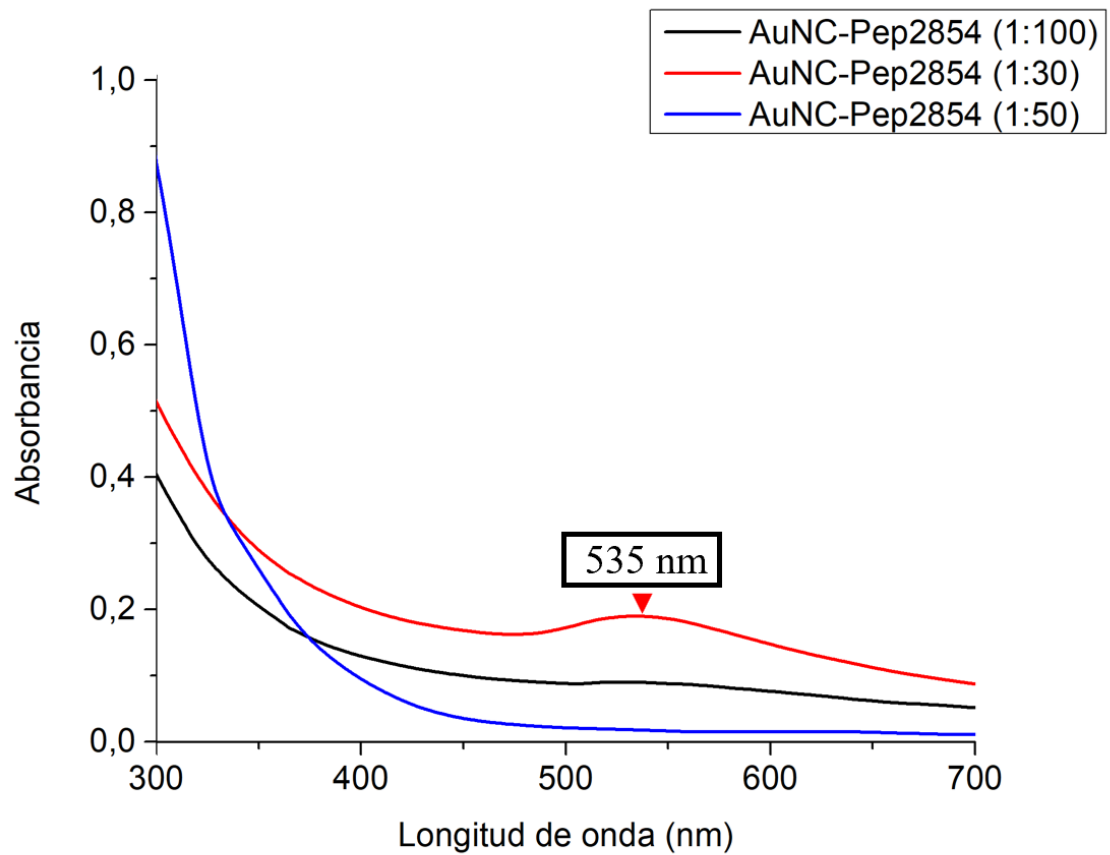
AuNC-Pep2854 y AuNC-Pep2855 con diferentes volúmenes de ácido ascórbico a pH 12.0



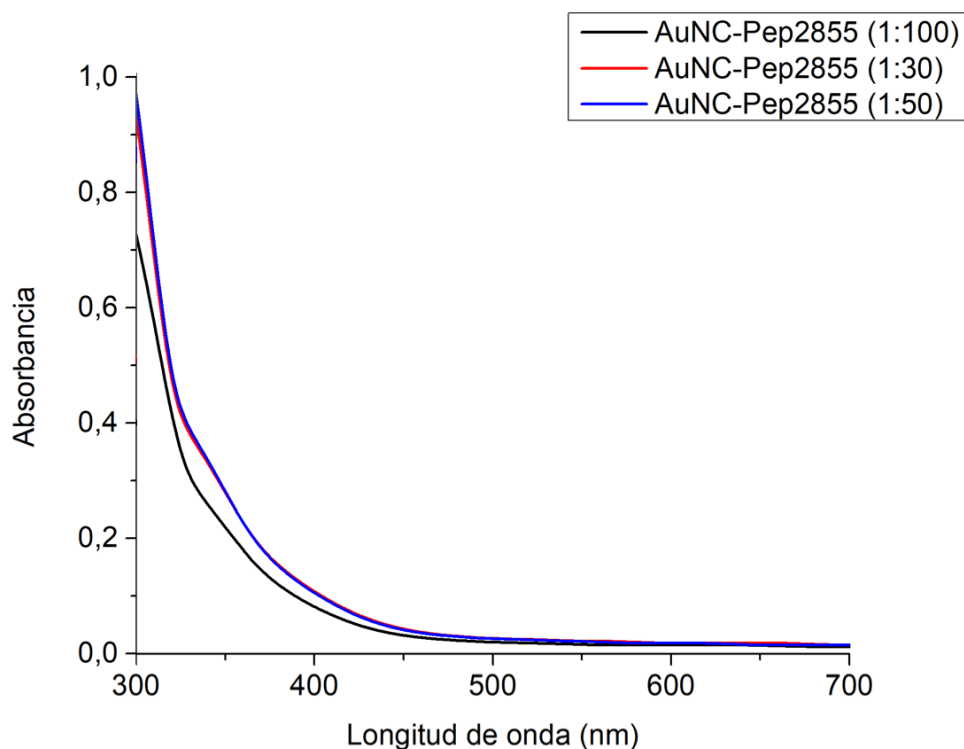
Se tomaron los espectros UV-Vis de las seis muestras, pero sólo se obtuvieron resultados relevantes de la mezcla AuNC-Pep2854 relación 1:30 de ácido ascórbico, se logró identificar en el espectro de absorción de esta muestra una banda en los 535 nm (Figura 13).

Figura 13

Espectro UV-Vis AuNC-Pep2854 y AuNC-Pep2855 con diferentes volúmenes de ácido ascórbico a pH 12.0



Nota: El espectro UV-Vis de la mezcla AuNC-Pep2854 con relación volumétrica 1:30 de ácido ascórbico muestra una banda de plasmón superficial, las otras dos mezclas no presentan señal representativa.



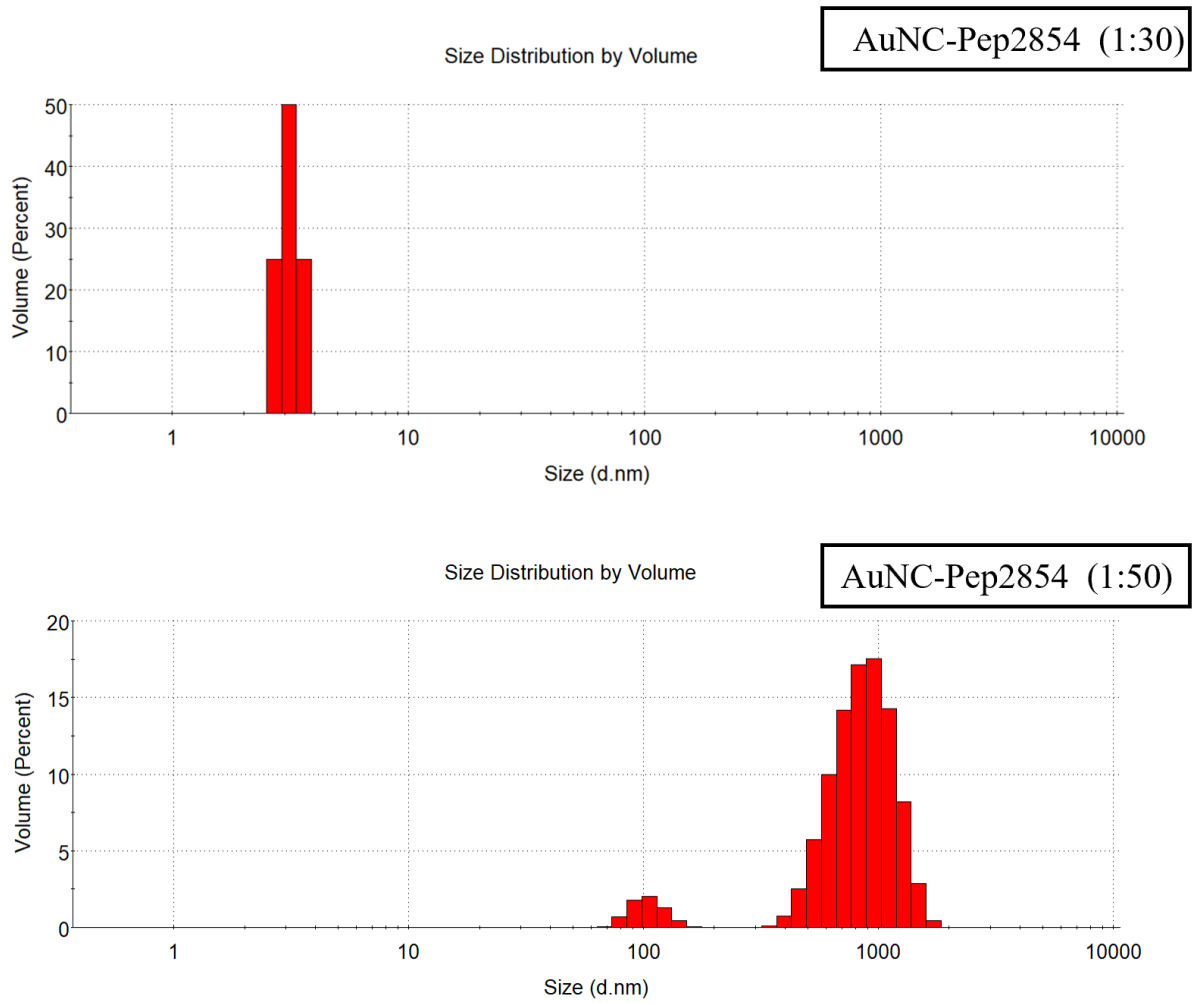
Este resultado se debe a la excitación colectiva de los electrones libres en la superficie de las nanopartículas de oro cuando son iluminadas por la fuente de luz. Cuando el haz de luz incide sobre las nanoestructuras, puede inducir la oscilación colectiva de los electrones libres en la superficie. Esta oscilación colectiva, conocida como plasmón superficial, se produce a una frecuencia específica de la luz incidente y resulta en una fuerte absorción de la luz en la región del espectro UV-Vis. Esta absorción da lugar a una banda de absorción distintiva, conocida como la banda de plasmón superficial característica de las NPs de tamaños cercanos a los 5 nm. La presencia de esta banda en el espectro UV-Vis es un resultado lejano a nuestro objetivo, ya que deseamos obtener nanoestructuras de tamaños cercanos a los 2 nm (nanoclusters), cuando el tamaño de las nanoestructuras se reduce a este rango, los electrones en su superficie experimentan un confinamiento espacial, lo que puede llevar a la formación de niveles de energía discreto, esto

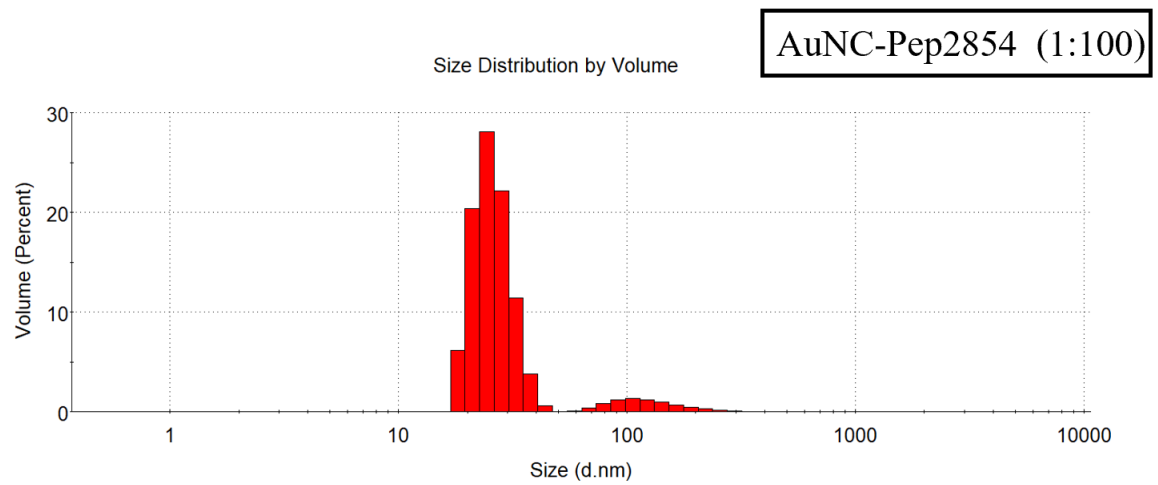
significa que sólo se permiten ciertos niveles de energía para los electrones. En este régimen de tamaño, los AuNC no muestran la banda de plasmón superficial, en su lugar, pueden exhibir emisión de fluorescencia.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la caracterización por UV-Vis, se determinó el tamaño hidrodinámico de las nanoestructuras por DLS para obtener más información de los AuNC obtenidos. Los resultados muestran una amplia gama de tamaños de partículas en las mezclas, como muestra de que las mezclas son sistemas polidispersos con una variedad de tamaños de partículas presentes. El resultado de la medición en DLS para la muestra AuNC-Pep2854 con relación molar 1:30 de ácido ascórbico muestra tamaños cercanos a los 4 nm, este resultado se puede relacionar con la banda SPR que se obtuvo en el espectro de absorción, el cual coincide con la presencia de nanoestructuras de este rango de tamaños en la muestra.

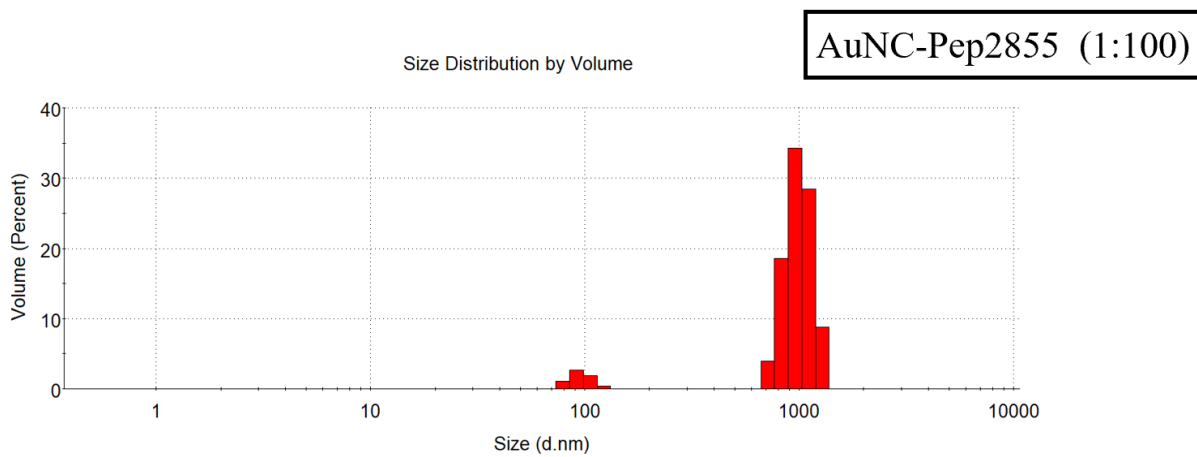
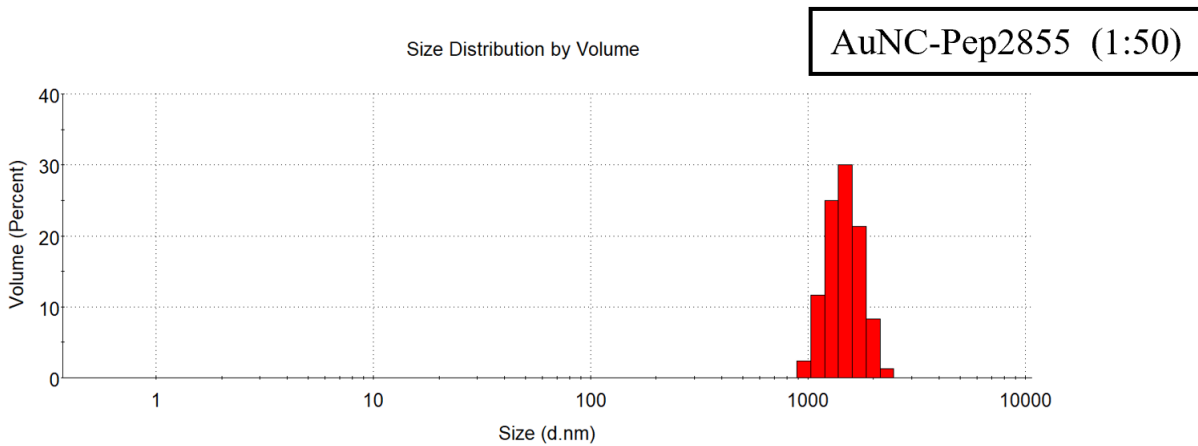
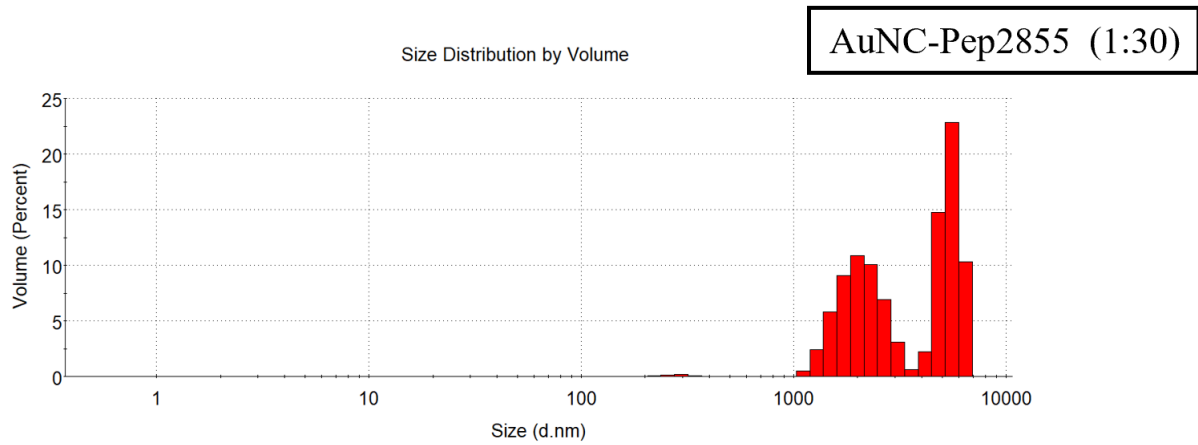
Figura 14

Histogramas de AuNC-Pep2854 y AuNC-Pep2855 con diferentes volúmenes de ácido ascórbico a pH 12.0





Nota: Histograma AuNC-Pep2854 con diferentes volúmenes de ácido ascórbico a pH 12.0



Nota: Histograma AuNC-Pep2855 con diferentes volúmenes de ácido ascórbico a pH 12.0

5.2 Síntesis química de AuNC

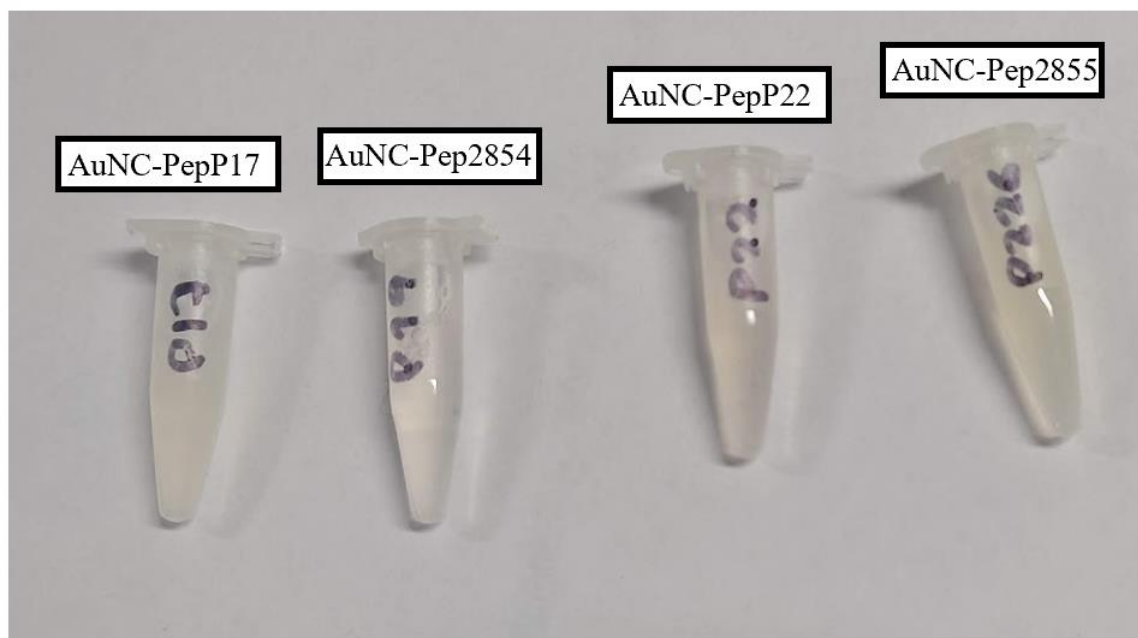
Luego de analizar los resultados obtenidos del efecto de las variables individuales en el proceso de síntesis, se propusieron tres rutas de síntesis: la primer ruta de síntesis sólo para evaluar el efecto del ácido ascórbico como agente reductor, con una concentración menor respecto a la empleada previamente, la segunda ruta de síntesis se planteó con el mismo agente reductor, pero llevando la solución de péptido a pH alcalino adicionando NaOH; en la tercer ruta de síntesis se realizó cambio del ácido ascórbico por borohidruro de sodio como agente reductor.

5.2.1 Síntesis química de AuNC empleando ácido ascórbico como agente reductor

Se comparó el efecto del ácido ascórbico respecto a la síntesis empleando borohidruro de sodio, con el fin de determinar la facilidad para formar nanoclusters fluorescentes empleando agentes reductores más amigables y con menos toxicidad. Teniendo en cuenta el resultado de la prueba preliminar de que una concentración alta (30.0 mM) de ácido ascórbico respecto a la concentración del HAuCl_4 (1.0 mM) promueve la formación de NPs de oro de tamaños grandes, se decidió reducir la concentración de la solución de ácido ascórbico a 0.1 mM, ya que posiblemente adicionar una cantidad mayor de agente reductor de menor concentración respecto al volumen de sal de oro, puede favorecer la interacción entre los iones, conducir a una reducción controlada de los iones Au^{3+} y la subsecuente formación de AuNCs. Al finalizar el proceso de síntesis se observó coloración amarilla de algunas de las muestras (Figura 15).

Figura 15

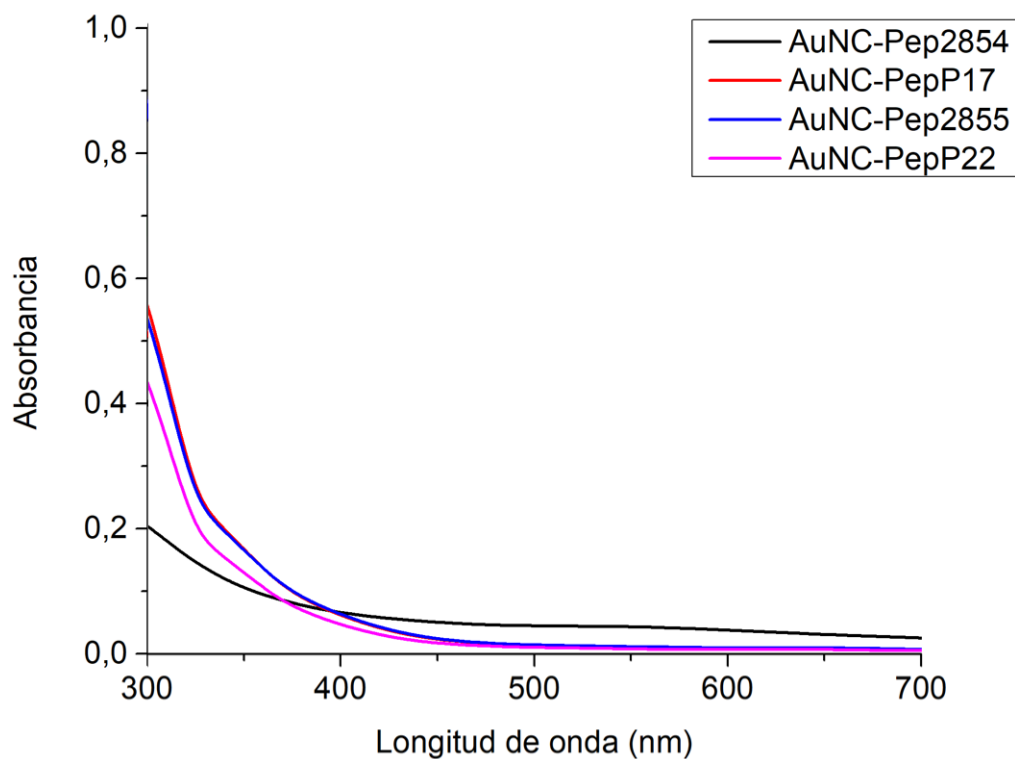
Síntesis de AuNC empleando ácido ascórbico como agente reductor



Se realizó la caracterización de los AuNC sintetizados por espectroscopia UV-Vis, para visualizar el comportamiento plasmónico de las nanoestructuras obtenidas, en el espectro no se logra observar evidencia de alguna señal o banda característica SPR (Figura 16).

Figura 16

Espectros UV-Vis de AuNC con ácido ascórbico como agente reductor



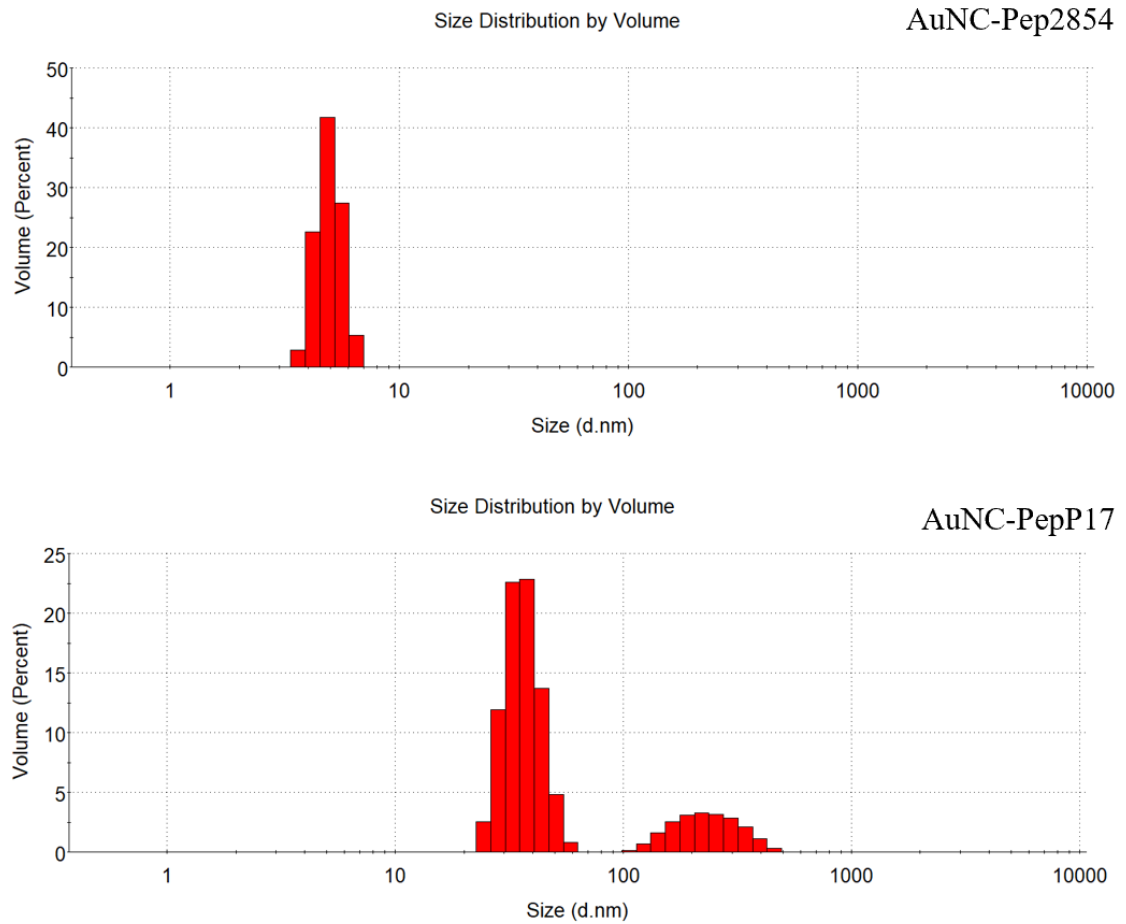
Nota: AuNC sintetizados con ácido ascórbico como agente reductor

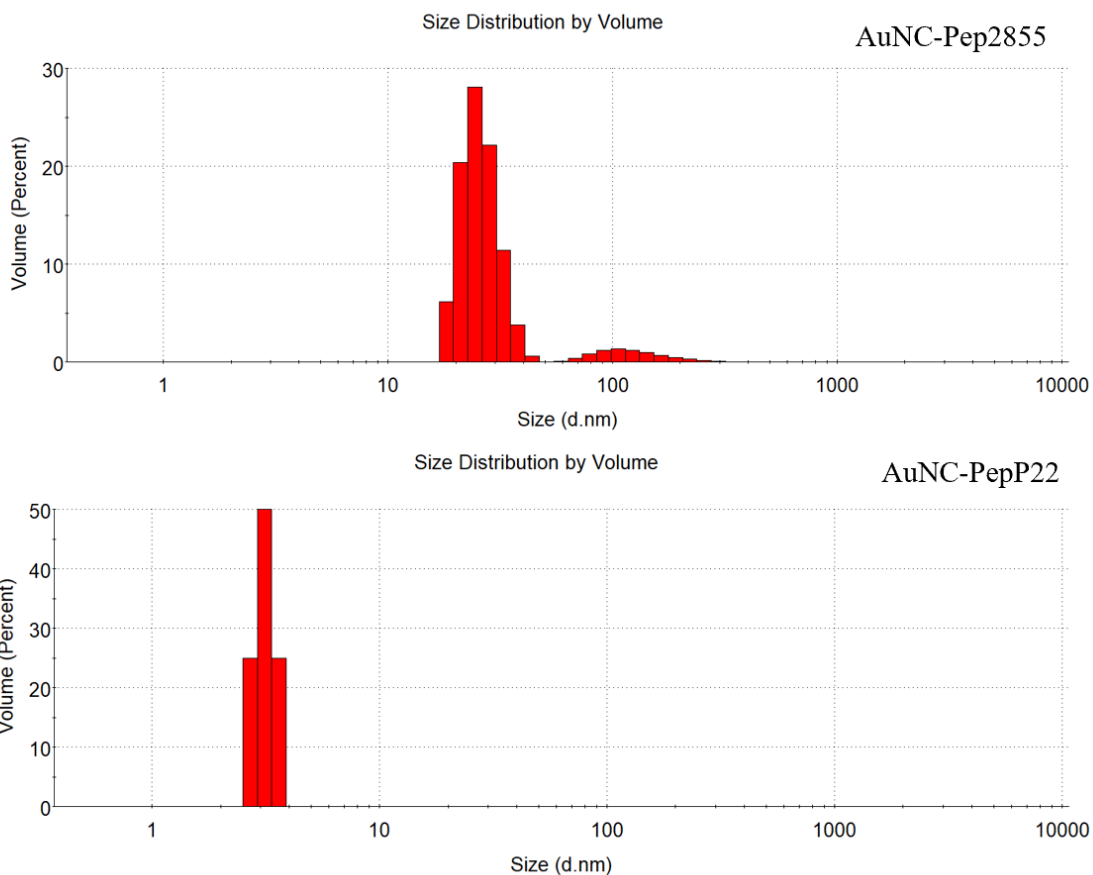
Para obtener más información de los AuNC sintetizados por esta ruta de síntesis, se realizó el análisis de tamaño hidrodinámico y se obtuvo el histograma para cada muestra (Figura 17). La distribución de tamaños por volumen presenta los siguientes rangos: AuNC-Pep2854: 4,849 – 8,721 (d.nm), AuNC-Pep2855: 13,642 – 659,432 (d.nm); AuNC-PepP17: 24,36 – 531 (d.nm) y AuNC-PepP22: 3,615 – 6,503 (d.nm). Ninguno de estos rangos de tamaño coincide con el tamaño

esperado de AuNC que presenten la propiedad de emisión de fluorescencia, ya que son tamaños fuera del rango que se estima para que estas nanoestructuras presenten emisión de fluorescencia.

Figura 17

Histogramas de AuNC con ácido ascórbico como agente reductor



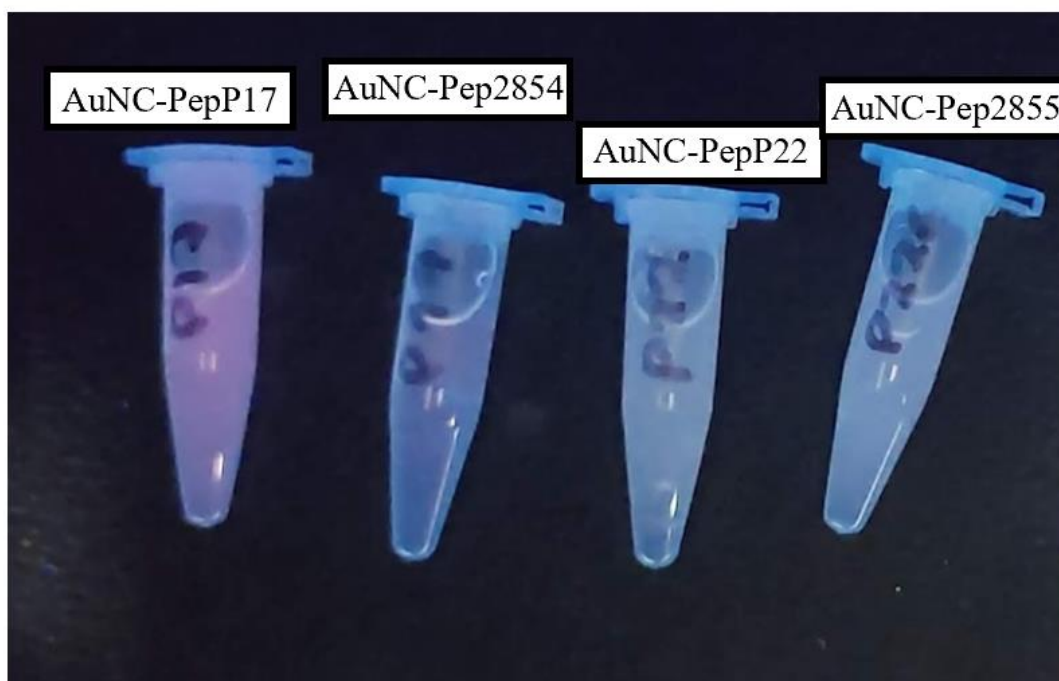


Nota: Distribución de tamaños de AuNC sintetizados en presencia de ácido ascórbico como agente reductor

Se realizó una prueba preliminar de emisión de fluorescencia a los AuNC obtenidos, empleando una cabina de visualización UV – CM series – Spectroline, equipada con una lámpara de fluorescencia de 365 nm, se observó cambio de color en las muestras AuNC-PepP17 y AuNC-PepP22 (Figura 18), este resultado podría ser un indicio de que existen nanoestructuras en esas dos muestras con la capacidad de emitir fluorescencia al ser irradiadas con una fuente de luz externa.

Figura 18

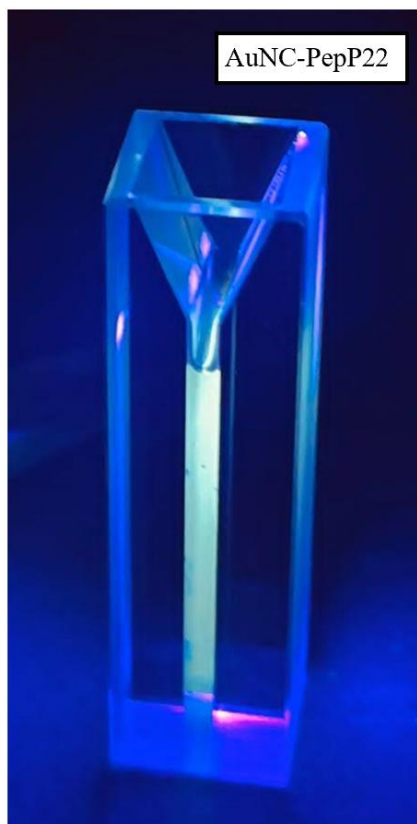
Visualización de AuNC en cámara UV



Teniendo en cuenta la observación de la aparente emisión de fluorescencia luego de irradiar las muestras con la lámpara UV de la cabina, se decidió realizar otra prueba de visualización preliminar de emisión de fluorescencia con un apuntador láser de longitud de onda 400 nm. Como resultado sólo se observó emisión de fluorescencia en la muestra AuNC-PepP22 (Figura 19). Estas pruebas preliminares se usan como soporte en la caracterización de los AuNC obtenidos, con el propósito de decantar cuáles mezclas deberían ser analizadas por espectroscopía de fluorescencia, es este caso se seleccionó únicamente la mezcla AuNC-PepP22, tomando en cuenta los resultados preliminares de visualización y decantando las muestras que no presentan un rango de tamaño esperado de nanoestructuras que presenten la propiedad de emisión de fluorescencia.

Figura 19

AuNC-PepP22 fluorescente al irradiar con apuntador láser

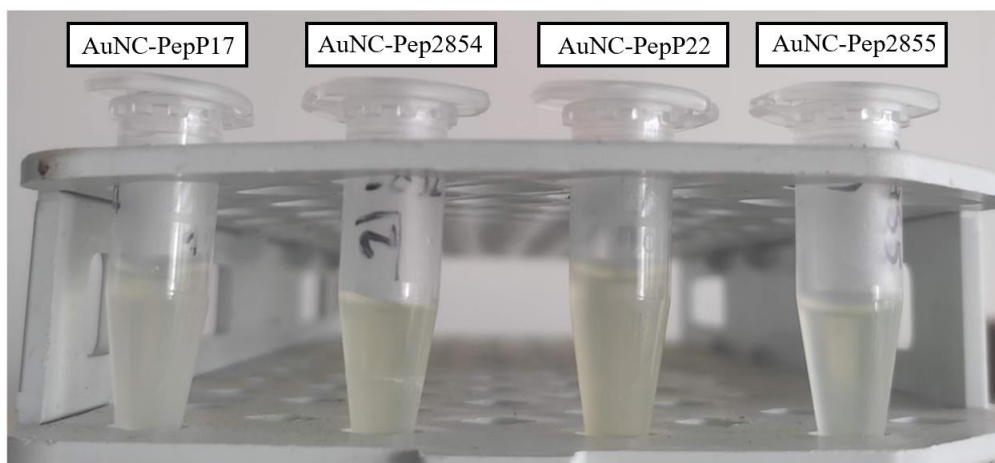
**5.2.2 Síntesis química de AuNC empleando ácido ascórbico como agente reductor a pH 12.0**

Revisando la literatura relacionada con síntesis de AuNC ligadas a biomoléculas, se encontró una amplia cantidad de artículos bibliográficos que reportan la necesidad de llevar a cabo la reacción en medio alcalino, con el objetivo de favorecer la interacción entre los iones Au^{3+} y el Azufre cargado negativamente presente en la cadena peptídica del ligando. Se decidió evaluar el

impacto de esta variable realizando una síntesis en medio alcalino. Luego del tiempo de incubación, no se observaron cambios en la coloración de las muestras (Figura 20).

Figura 20

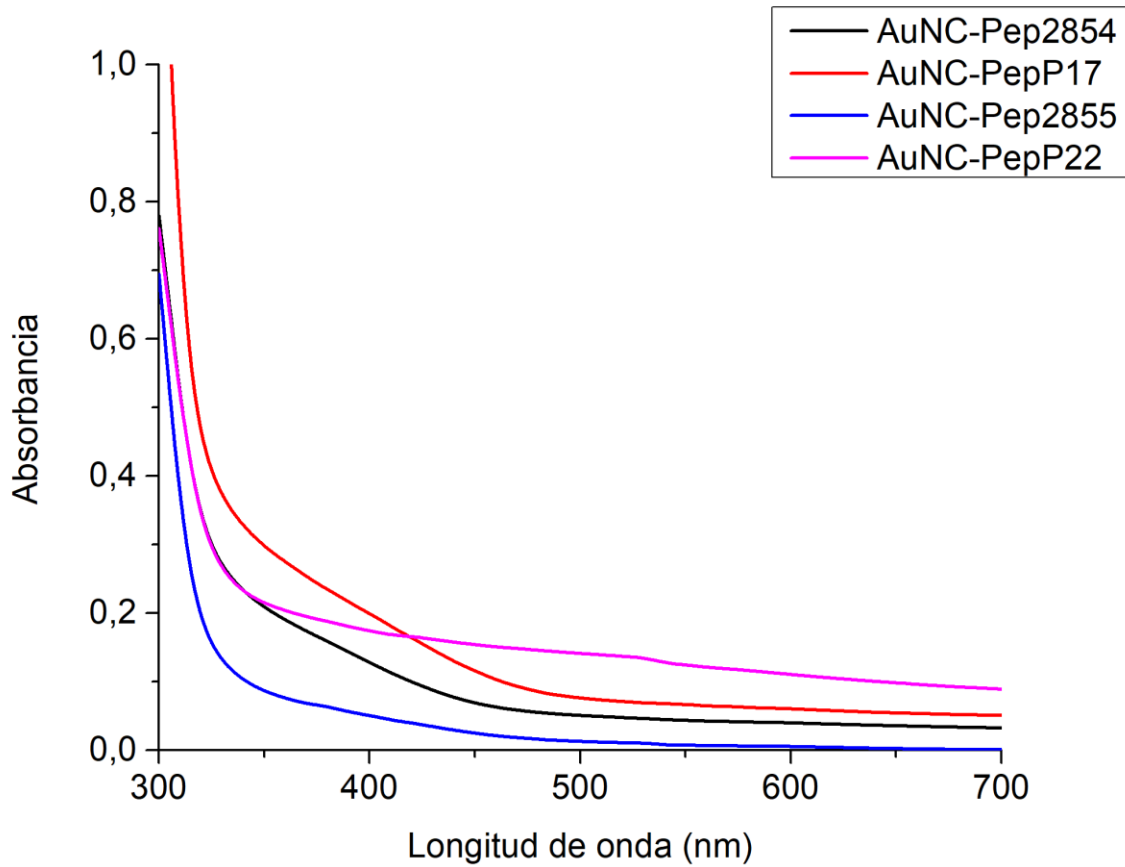
Síntesis de AuNC con ácido ascórbico a pH 12.0



Se realizó la caracterización por espectroscopía UV-Vis de los AuNC obtenidos, los resultados no son representaciones que confirmen la presencia de nanoestructuras en cada mezcla (Figura 21).

Figura 21

Espectro UV-Vis AuNC sintetizadas con ácido ascórbico a pH 12.0



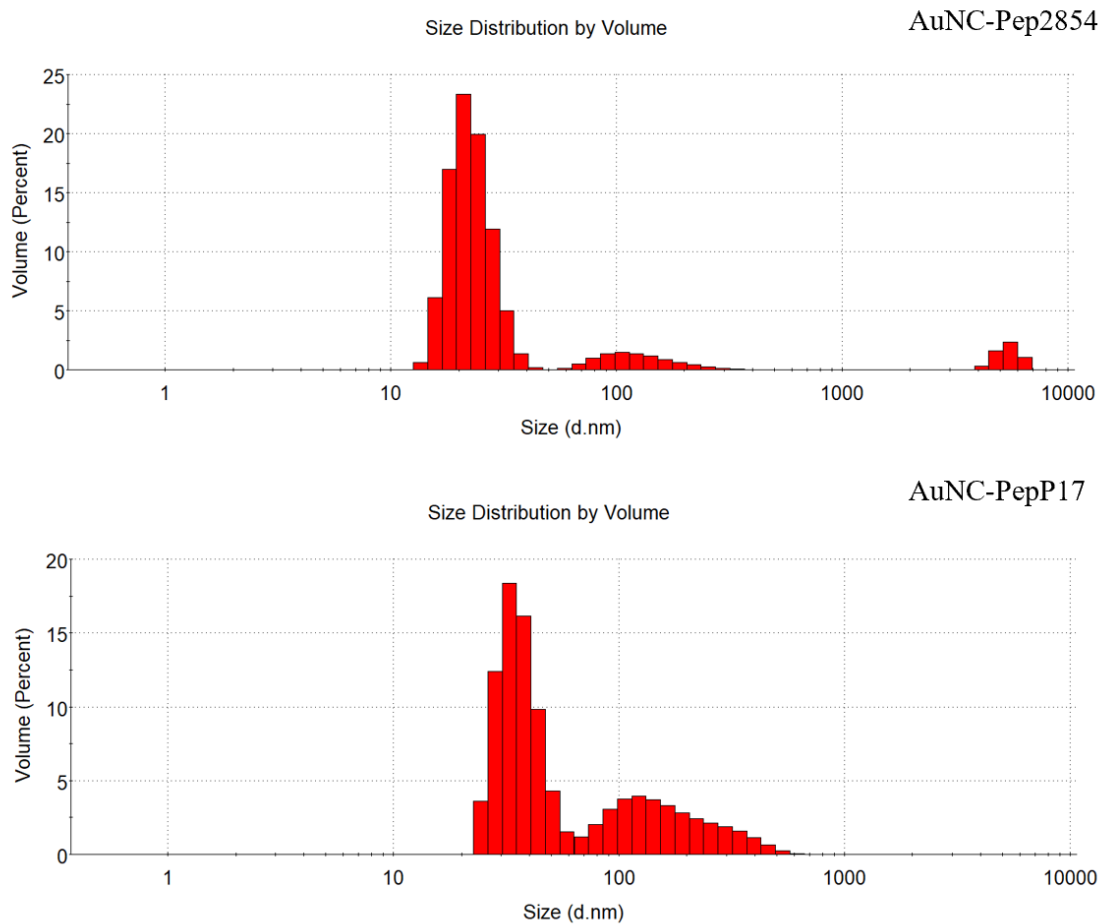
Nota: Espectro UV-Vis de AuNC sintetizadas con ácido ascórbico a pH 12.0

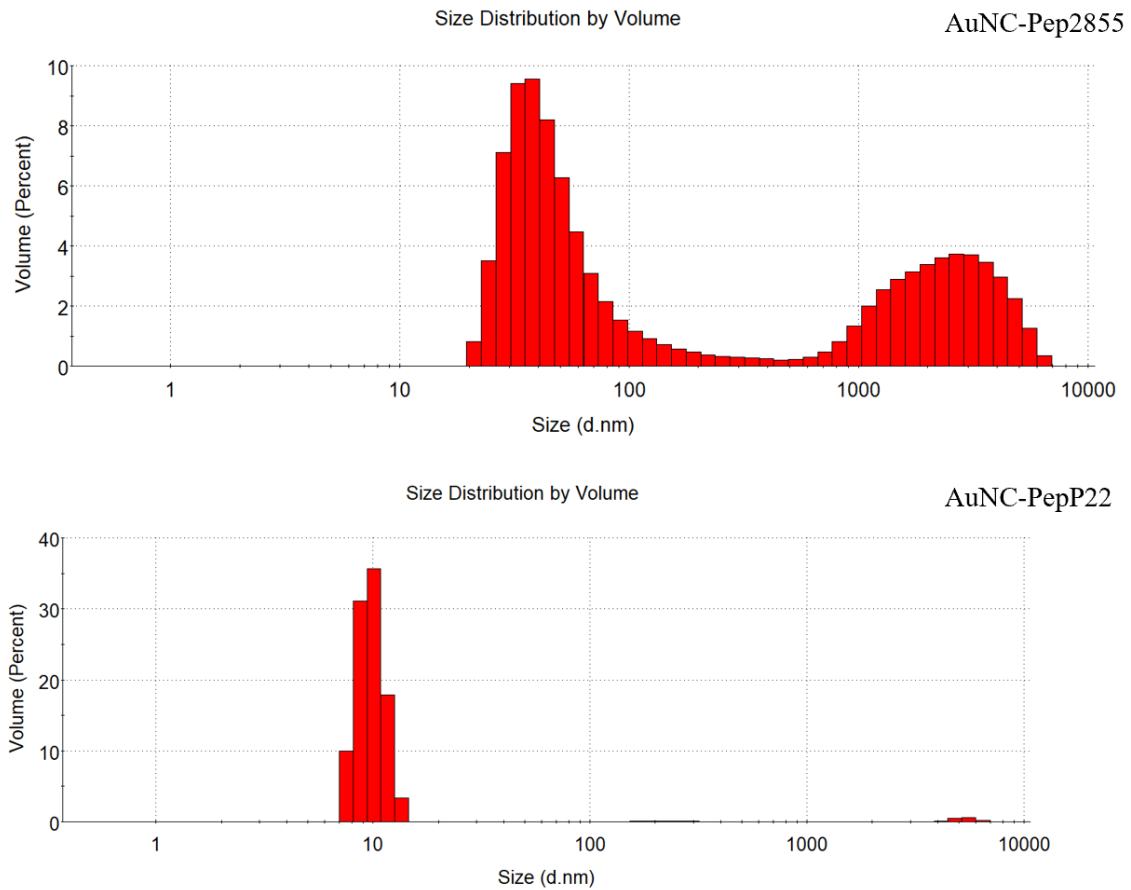
Además, se obtuvo la distribución de tamaño hidrodinámicos por DLS (Figura 22). El rango de tamaños para las mezclas sintetizadas por esta ruta de síntesis dio un resultado con una amplia variedad de tamaños de partículas presentes en las muestras, se obtuvieron tamaños por encima de los 10 (d.nm) para tres muestras y alcanzó tamaños hasta de 6000 (d.nm) en el caso de

AuNC-Pep2854 y AuNC-Pep2855, la muestra AuNC-PepP22 tuvo un rango de tamaño menor, el cuál fue de 7,531 – 13,541 (d.nm).

Figura 22

Histograma AuNC sintetizadas con ácido ascórbico a pH 12.0



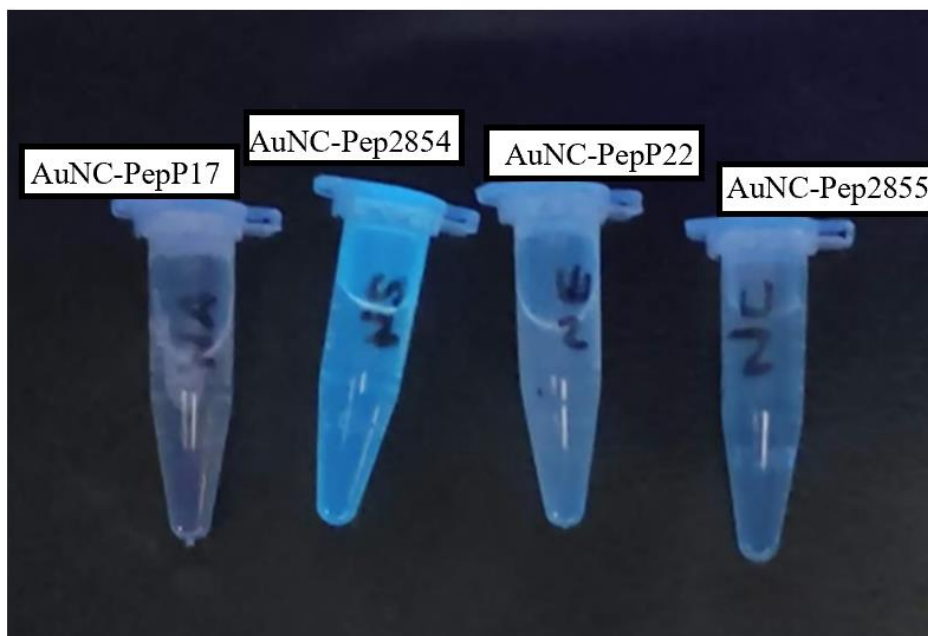


Nota: Distribución de tamaños de AuNC sintetizados en presencia de ácido ascórbico como agente reductor a pH 12.0

Para estas muestras no se obtuvo ningún resultado preliminar en la visualización de emisión de fluorescencia empleando la cabina UV, se observa los tubos invariables en su color y sólo un tubo eppendorf emite tras irradiar con la lámpara (Figura 23).

Figura 23

Visualización cabina UV de AuNC sintetizadas con ácido ascórbico a pH 12.0



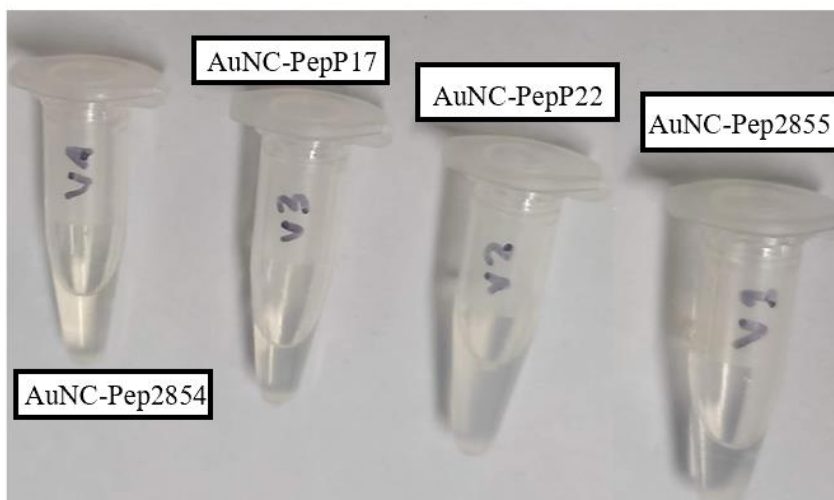
De los resultados obtenidos por esta ruta de síntesis se evidencia que estas condiciones de síntesis no favorecen la formación de nanoestructuras, posiblemente para las secuencias peptídicas estudiadas en este proyecto de investigación, el medio alcalino no es favorable en el medio de reacción, es probable que el recubrimiento orgánico de los AuNC se desestabilice por pérdida o alteración de su estructura y se promueva el apagamiento, la pérdida de la estabilidad coloidal y las propiedades ópticas de los AuNC. También se puede presentar una competencia por la adsorción, los OH⁻ del hidróxido de sodio pueden competir con la cadena lateral peptídica por la adsorción en la superficie de las nanopartículas, esto puede desplazar los ligandos, desestabilizar los AuNC y modificar sus propiedades químicas y ópticas.

5.2.3 Síntesis química de AuNC empleando borohidruro de sodio como agente reductor

Se introdujo el agente reductor fuerte NaBH_4 teniendo en cuenta que este agente reductor en la mayoría de los reportes hallados en la literatura de síntesis de AuNC ligados a biomoléculas, garantiza la formación casi inmediata de estas nanoestructuras, que además cuentan con la propiedad óptica de emisión de fluorescencia. Al finalizar el proceso de síntesis por esta tercera ruta no se observaron cambios visuales en las muestras (Figura 24).

Figura 24

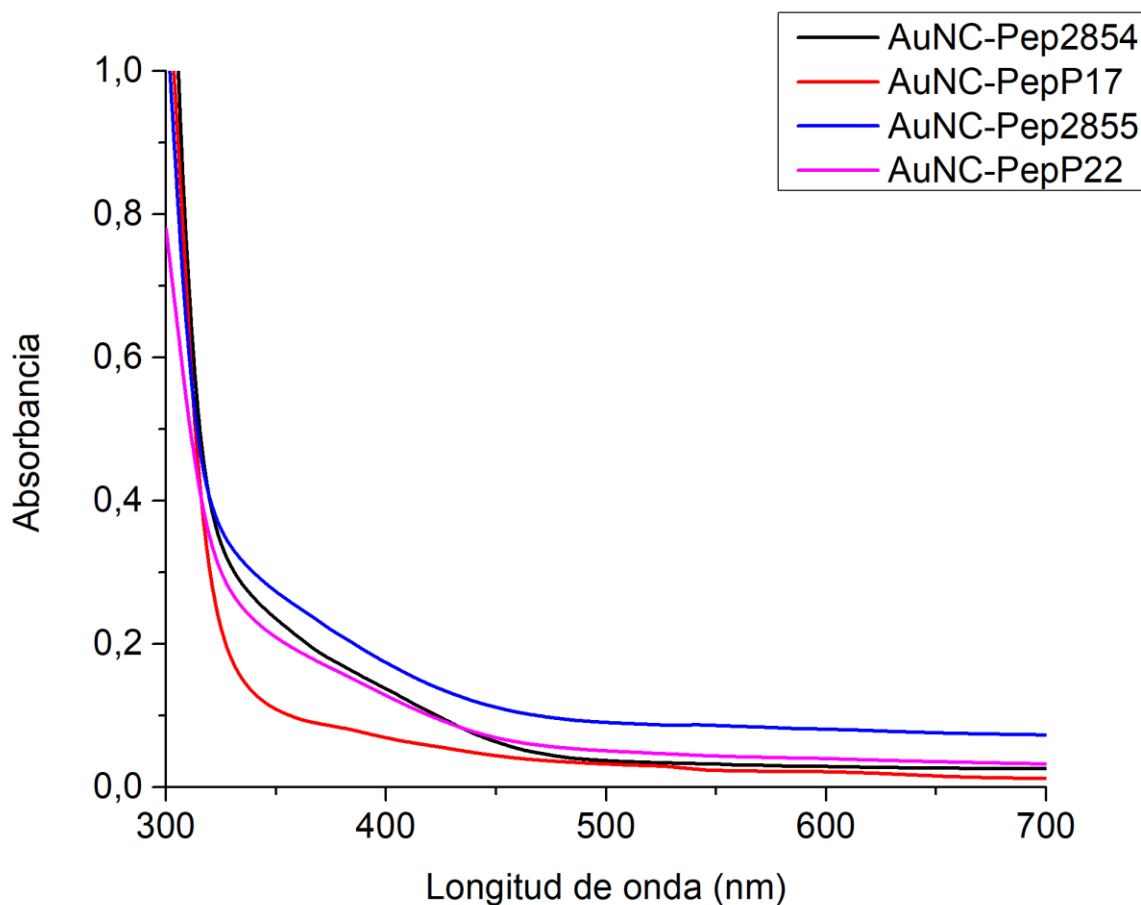
Síntesis de AuNC con borohidruro de sodio



Se realizó la caracterización de los AuNC sintetizados con borohidruro de sodio, iniciando con los espectros de absorción por espectroscopia UV-Vis, estos espectros no presentaron señales significativas (Figura 25).

Figura 25

Espectros UV-Vis AuNC sintetizados con borohidruro de sodio como agente reductor



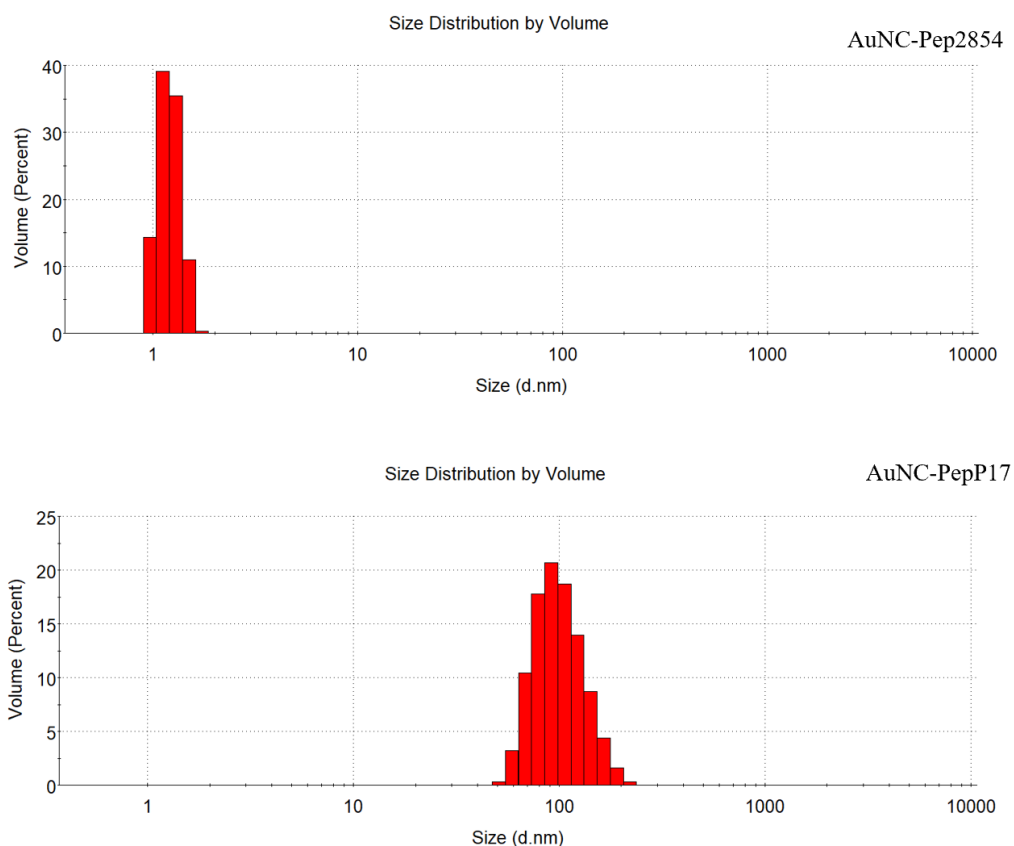
Nota: Espectros de emisión AuNC sintetizados con borohidruro de sodio como agente reductor

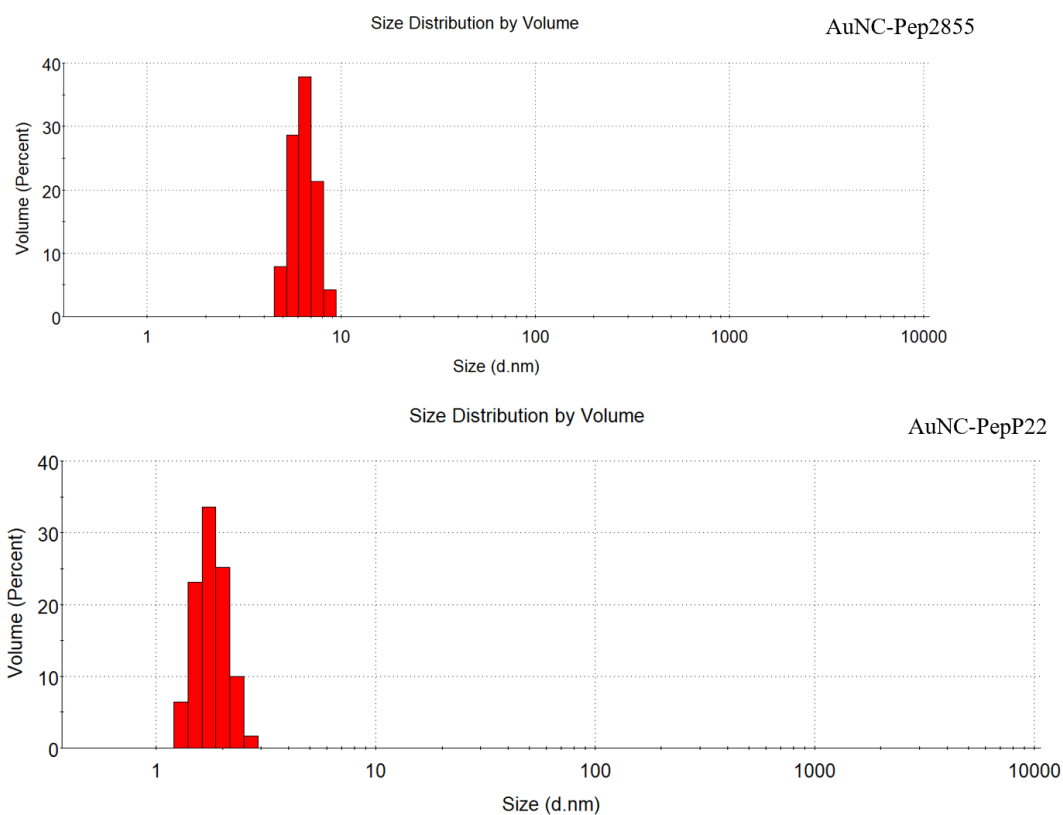
Continuando con la caracterización de las mezclas obtenidas, se determinó el rango de tamaño hidrodinámico por DLS (Figura 26). El resultado del tamaño hidrodinámico de las muestras sintetizadas empleando borohidruro de sodio como agente reductor, muestra un rango de tamaños monodisperso respecto a las otras rutas de síntesis estudiadas. Se obtuvieron los siguientes

rangos de tamaño para cada muestra: AuNC-Pep2854: 0,964 – 1,736 (d.nm), AuNC-Pep2855: 6,439 – 9,721 (d.nm); AuNC-PepP17: 57,841 – 295,3 (d.nm) y AuNC-PepP22: 2,696 – 3,615 (d.nm). El rango de tamaños obtenidos por esta ruta de síntesis para AuNC-Pep2854, valida el resultado que se obtuvo según la revisión bibliográfica de AuNC fluorescentes, además en este caso AuNC-PepP22 también presenta un rango de tamaños que se encuentra dentro del esperado para nanoestructuras con emisión de fluorescencia.

Figura 26

Histogramas AuNC sintetizados con borohidruro de sodio como agente reductor





Nota: Histograma de AuNC sintetizados con borohidruro de sodio como agente reductor

. La posible ausencia de AuNC en las muestras sintetizadas por esta ruta de síntesis puede ser a causa de que a pesar de que el NaBH_4 es un agente reductor fuerte que promueve rápidamente la reducción del precursor de oro y la posterior formación de AuNC, presenta una cinética de reacción difícil de predecir y controlar debido a su alto poder de reactividad, esta característica también puede afectar la nucleación de los clusters, lo que puede dar lugar a una distribución de tamaño y forma de partícula más amplia y menos uniforme, esta polidispersidad en el rango de tamaños no es favorable para que el sistema presente la propiedad óptica de emisión de fluorescencia, ya que una distribución amplia de tamaños de partícula puede dar lugar a una fluorescencia más variable y/o apagamiento debido a los choques intermoleculares.

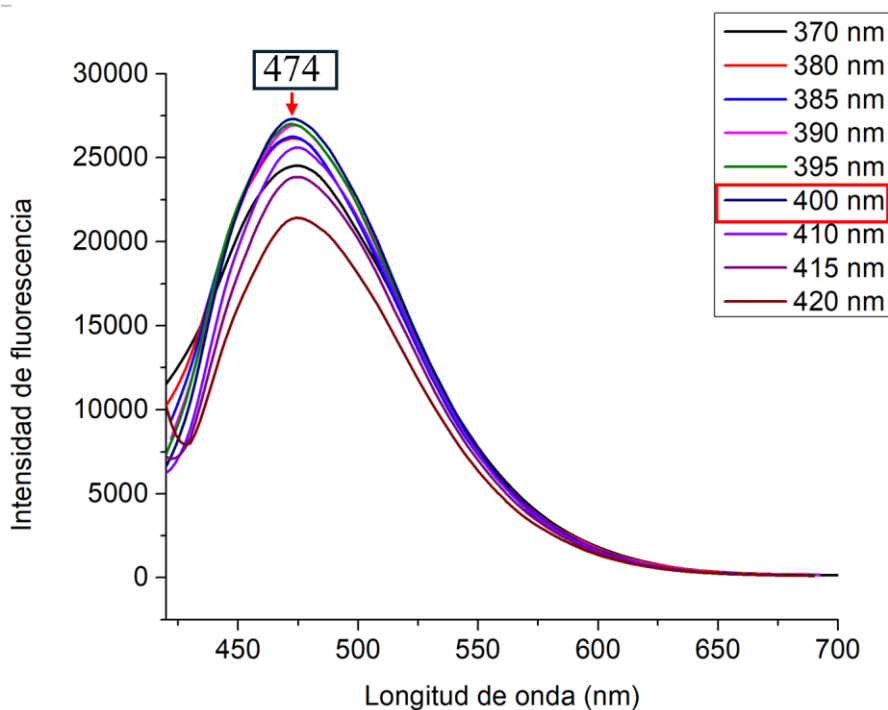
5.3 Análisis de las propiedades fotoluminiscentes por espectroscopía de fluorescencia

Retomando el análisis de los resultados obtenidos en la prueba de caracterización por DLS, el rango de tamaño hidrodinámico de los AuNC-PepP22 obtenidos en la síntesis con ácido ascórbico como agente reductor, se encuentra entre 3,615 y 6,503 (d.nm), estos tamaños están un poco alejados al tamaño promedio de sistemas que presentan la propiedad óptica de emisión de fluorescencia, sin embargo, el resultado de visualización preliminar irradiando con un fuente de luz es un indicio de la posible emisión de los AuNC, es por esto que se decidió realizar el análisis de emisión de fluorescencia únicamente de las muestras AuNC-PepP22 que se obtuvieron por cada ruta de síntesis.

Se inició con un barrido de emisión de fluorescencia para la muestra AuNC-PepP22 sintetizada con ácido ascórbico como agente reductor, en un rango de longitud de onda de excitación desde los 370 a 420 nm, como resultado, para la longitud de onda de excitación de 400 nm se obtuvo la banda de emisión con mayor intensidad de fluorescencia en los 474 nm, esta longitud de onda, según el espectro visible se encuentra casi al final del rango del color azul e inicio del color verde, se podría estimar la correspondencia a un color verde aguamarina en la emisión de fluorescencia de los AuNC-PepP22, resultado que coincide con el color que se observó en las pruebas preliminares con la fuente externa de luz UV (Figura 27).

Figura 27

Espectro de emisión de fluorescencia de AuNC-PepP22 sintetizados con ácido ascórbico como agente reductor

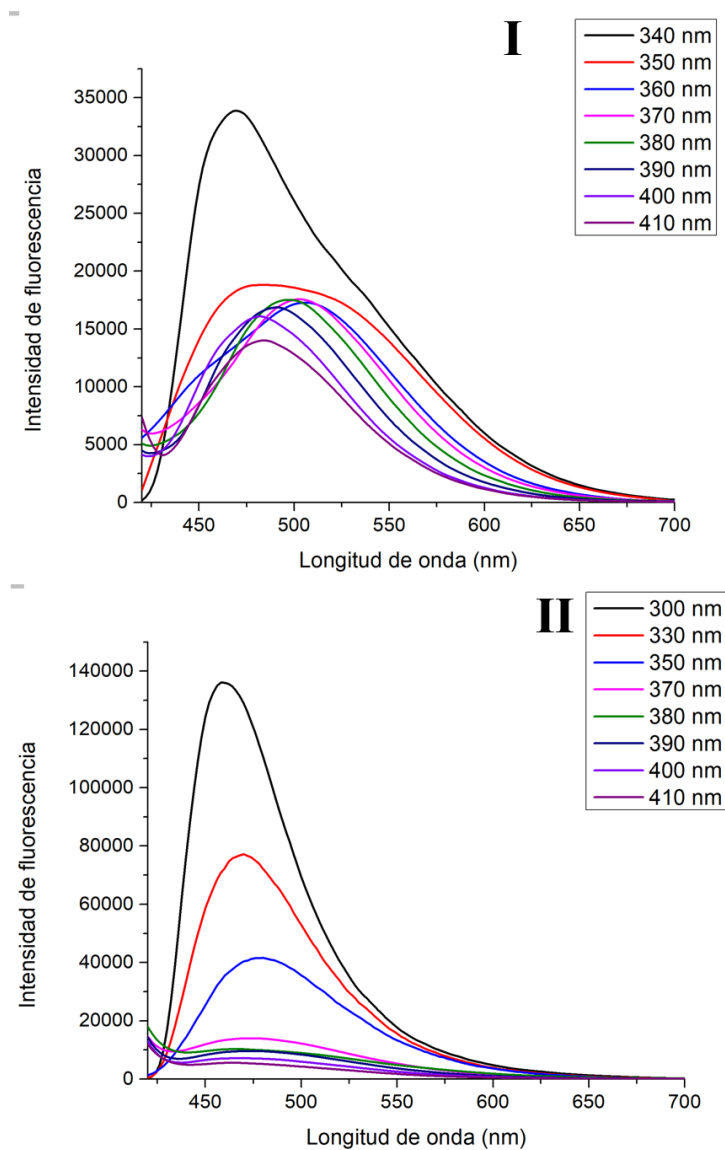


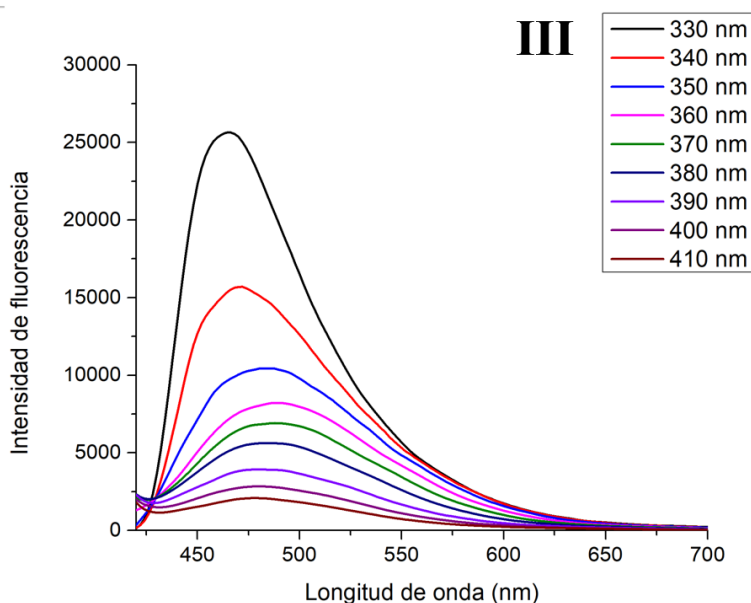
La inconsistencia entre el tamaño hidrodinámico de los AuNC-PepP22 sintetizados con ácido ascórbico y su amplia emisión de fluorescencia, conducen a evaluar la posibilidad de que el péptido empleado como plantilla molecular cuente con la propiedad inherente de emisión de fluorescencia, por lo tanto, se preparó una solución Blanco del péptido PepP22 bajo las mismas condiciones establecidas para cada síntesis, y se tomó el espectro de emisión del péptido en el rango de longitud de onda de excitación de 340 – 410 nm. Además, se tomó el espectro de emisión de fluorescencia de la muestra AuNC-PepP22 sintetizada con borohidruro de sodio, en el rango de

longitud de onda de excitación de 330 – 410 nm, y la muestra AuNC-PepP22 sintetizada con ácido ascórbico a pH 12.0, en el rango de longitud de onda de excitación de 300 – 410 nm (Figura 28).

Figura 28

Espectros de emisión de fluorescencia de AuNC-PepP22 por tres rutas de síntesis y espectro del Péptido PepP22





Nota: Espectros de emisión de fluorescencia de: **I**) Péptido PepP22, **II**) AuNC-PepP22 sintetizados con ácido ascórbico a pH 12.0 y **III**) AuNC-PepP22 sintetizados con borohidruro de sodio

Los resultados obtenidos en el barrido de emisión de fluorescencia del péptido validan la emisión inherente de esta estructura péptidica. Los aminoácidos fluorescentes, son aquellos aminoácidos que exhiben propiedades fluorescentes intrínsecas, lo que significa que pueden emitir luz fluorescente cuando se excitan con una fuente de energía apropiada, como la luz ultravioleta o la luz visible. Los principales aminoácidos fluorescentes son: Triptófano (W): el triptófano es el aminoácido más fluorescente de los aminoácidos protéicos naturales. Su grupo indol tiene una alta capacidad de emisión de fluorescencia cuando se excita con luz UV, con un máximo de emisión alrededor de los 350-355 nm. Tirosina (Y): la tirosina también puede exhibir fluorescencia, aunque con menor intensidad respecto al triptófano. Su grupo fenol puede emitir luz fluorescente en el rango de los 275-300 nm cuando es excitado con una fuente de luz UV. Fenilalanina (F): puede

presentar emisión de fluorescencia en menor medida que los otros dos aminoácidos, sin embargo su presencia podría contribuir a la fluorescencia total del péptido (Maity, 2020).

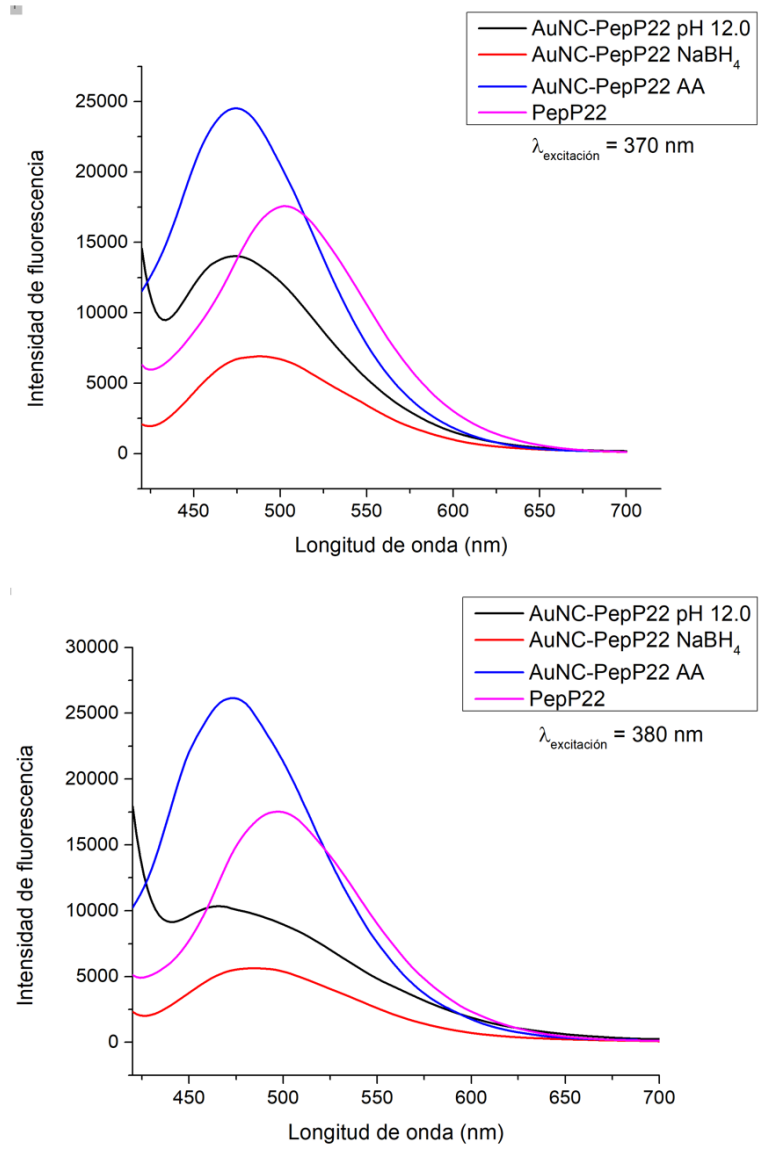
Recordando la estructura del péptido PepP22: Ac-CTKKCGLWSILKGVGKI-NH₂, observamos que contiene en su cadena lateral uno de los tres y el más eficiente de los aminoácidos que presentan propiedades fluorescentes intrínsecas, es decir, el Triptófano (W). Es posible que este péptido presente la propiedad de emisión de fluorescencia debido a la presencia de este aminoácido. Sin embargo, la intensidad y las características de la fluorescencia pueden variar dependiendo del entorno y las condiciones experimentales. A grandes rasgos, se observa cómo la intensidad en la emisión de fluorescencia decrece de forma notoria a medida que aumenta la longitud de onda de excitación para el blanco y las muestras sintetizadas por la ruta con ácido ascórbico a pH 12.0 y síntesis con borohidruro de sodio, además presenta un desplazamiento espectral a la derecha, en el caso de las muestras sintetizadas este desplazamiento puede ser debido a que la molécula fluorescente forme complejos con otras moléculas presentes en la muestra y alterar su comportamiento de emisión, en el caso del péptido, se podría producir este desplazamiento a causa de efectos de solvatación, la solvatación del péptido por el solvente puede influir en su estructura y conformación, lo que a su vez puede afectar la energía de emisión de fluorescencia. Si el solvente proporciona un ambiente que estabiliza ciertas conformaciones del péptido que tienen una energía de emisión más baja, esto puede resultar en un desplazamiento hacia longitudes de onda más largas en el espectro de emisión (Zanetti-Polzi et al., 2022). Por otra parte, en la síntesis con ácido ascórbico se observó pero un decaimiento lento de la banda de emisión, pierde poca intensidad a medida que se aumenta la longitud de onda de excitación.

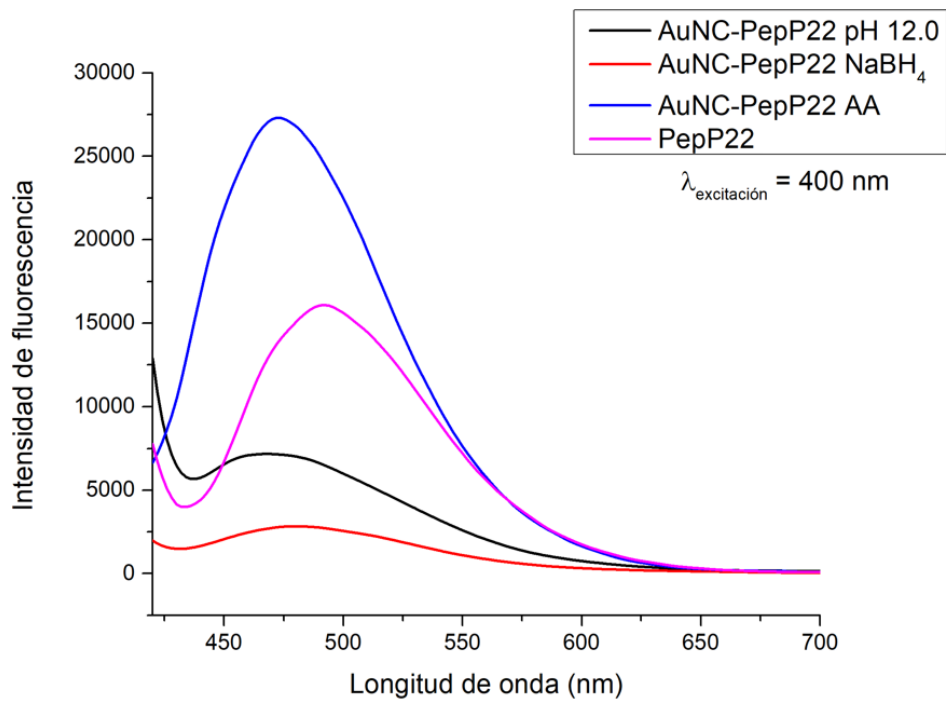
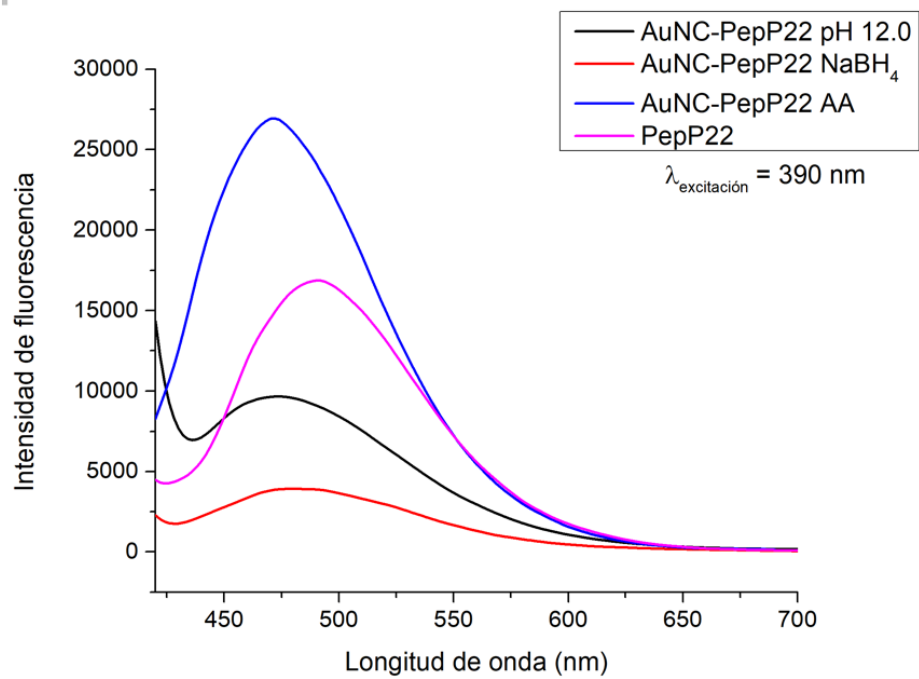
Se realizó una revisión bibliográfica acerca de AuNC ligados a biomoléculas que contienen cisteína en su estructura, presentan emisión de fluorescencia en el verde y son empleados como sondas fluorescentes en la detección de iones metálicos (Zhao et al., 2021) y otras moléculas que representan riesgo biológico (Y. Li et al., 2020;). Como resultado en estas investigaciones se encontró que el máximo de emisión de fluorescencia se presenta alrededor de los 500 nm, con una longitud de onda de excitación de ~ 370 nm.

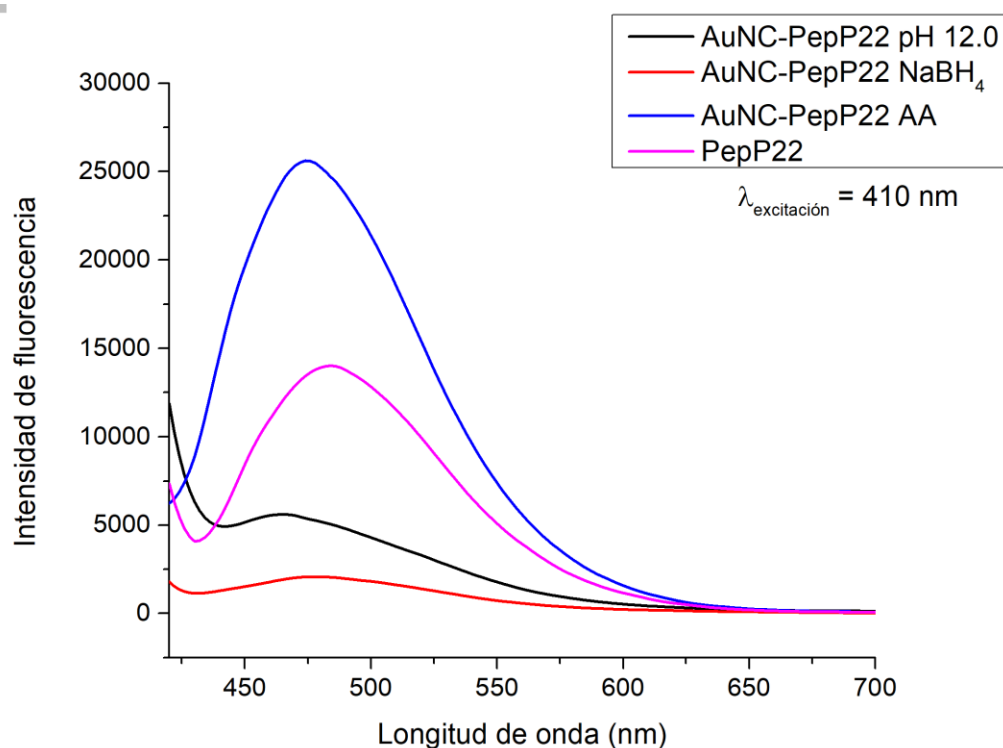
Teniendo en cuenta este parámetro hallado en la revisión, se realizó la comparación entre la emisión de fluorescencia de las tres rutas de síntesis y el péptido PepP22, en el rango de longitud de onda de excitación que va de 370 – 410 nm (Figura 29).

Figura 29

Comparación emisión de fluorescencia de AuNC-PepP22 por tres rutas de síntesis y Péptido PepP22







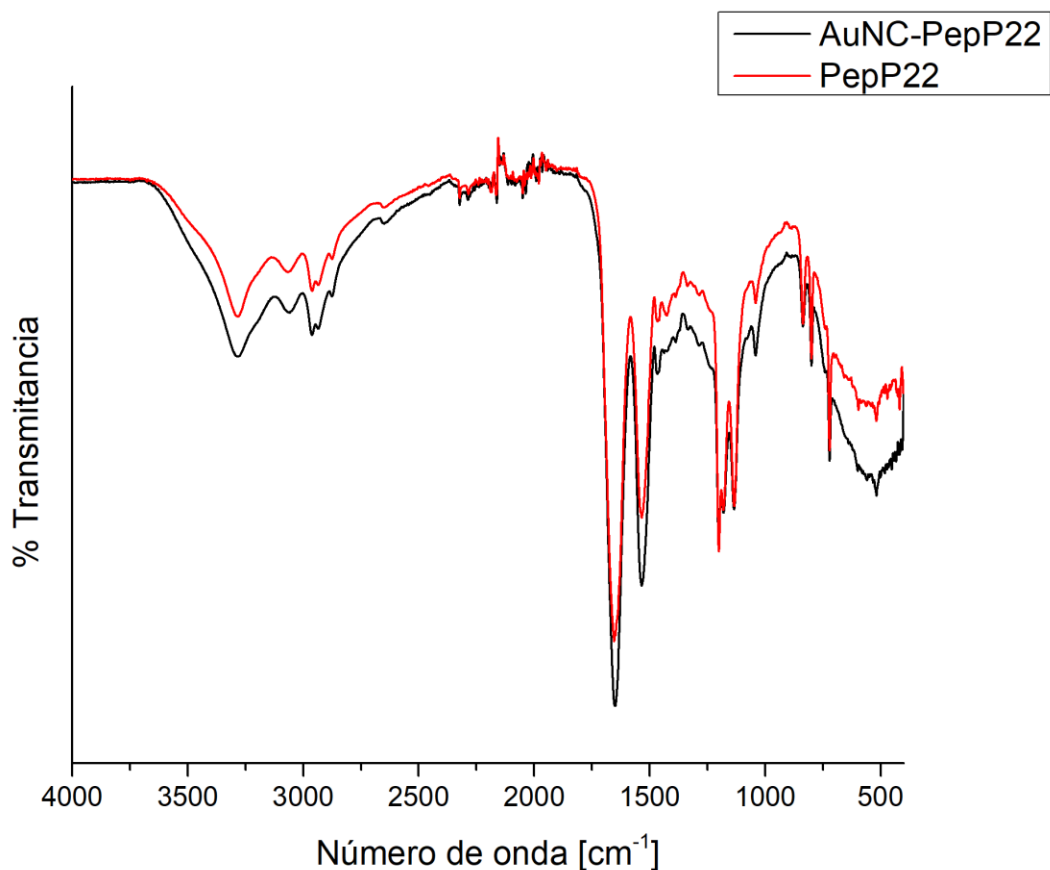
A partir de las gráficas de comparación de emisión de fluorescencia podemos observar cómo las rutas de síntesis a pH 12.0 y con borohidruro de sodio, así como el péptido, presentan un corrimiento al azul a medida que aumenta la longitud de onda. En el caso de la síntesis a pH 12.0, se puede presentar el corrimiento debido a que cambios drásticos en el pH del sistema afectan el estado de carga del cromóforo e influenciar la fluorescencia (Zanetti-Polzi et al., 2022), ya que puede afectar la extensión de la conjugación o aromaticidad del compuesto, es decir, puede alterar la alternancia de enlaces simples y dobles (o resonancia) dentro de la estructura molecular, lo que da como resultado una distribución de electrones a lo largo de toda la molécula. Cuando una molécula tiene una extensión de la conjugación significativa, los electrones se pueden deslocalizar a través de varios enlaces conjugados, lo que aumenta la estabilidad de la molécula y su capacidad

para absorber y emitir luz en el caso de compuestos aromáticos (Zhuang et al., 2020), en este caso nos referimos al Triptófano que es el compuesto aromático presente en la cadena peptídica y presenta la propiedad de emisión de fluorescencia. En la síntesis con borohidruro de sodio, el resultado del desplazamiento en la emisión de fluorescencia podría ser debido a las interacciones moleculares, ya que la interacción entre moléculas presentes en el medio de reacción pueden afectar la emisión del AuNC debido a modificaciones en su estructura, estas interacciones pueden provocar cambios en la energía de excitación y por lo tanto, la longitud de onda de la fluorescencia emitida. Por otra parte, la ruta de síntesis con ácido ascórbico presenta un comportamiento estable con cada longitud de onda de excitación.

La comparación de los resultados de la síntesis de AuNC con ácido ascórbico y borohidruro de sodio, muestran que para el péptido PepP22 la ruta de síntesis con ácido ascórbico proporciona nanoestructuras que presentan la propiedad de emisión de fluorescencia estable e intensa, mientras que la síntesis con borohidruro de sodio para esta secuencia peptídica resulta en nanoestructuras inestables y con baja emisión de fluorescencia.

5.4 Análisis de las interacciones del ligando enlazado a los AuNC por espectroscopia infrarrojo (FT-IR)

Con el objetivo de obtener información acerca de las interacciones del ligando enlazado a los AuNC, se realizaron mediciones de espectroscopia infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR) (Figura 30).

Figura 30*Espectros IR PepP22 y AuNC-PepP22*

Con esta prueba de caracterización se deseaba observar el corrimiento en los números de onda del espectro infrarrojo del AuNC-PepP22 respecto al espectro infrarrojo del Péptido PepP22, debido a los distintos tipos de vibraciones entre el C y O, como el correspondiente a la vibración de estiramiento C = O en el rango de $1600 - 1700 \text{ cm}^{-1}$ y la vibración de estiramiento simétrica – COO – alrededor de los 3400 cm^{-1} , así como la vibración de estiramiento C-H en los 2700 cm^{-1} , igualmente se esperaba confirmar la oxidación del tiol en la síntesis de AuNC, con la desaparición

de la señal atribuida a la vibración del enlace S – H alrededor de los 2550 cm^{-1} , debido a la formación del enlace covalente estable tras la formación de AuNC y la unión del péptido a la superficie de los AuNC. Sin embargo, se obtuvo como resultado para esta prueba dos espectros sin corrimiento en número de onda, posiblemente se deba a que el enlace entre el péptido y el oro no causó cambios significativos en la estructura molecular del péptido. Si el enlace no afecta la posición de los grupos funcionales en el péptido, entonces no se observarán cambios en el espectro IR.

6. Conclusiones

El estudio de variables influyentes en la síntesis de AuNC, condujo a descartar y establecer parámetros y reactivos que facilitaran la búsqueda de una ruta de síntesis óptima, que favoreciera la nucleación del Au y el crecimiento de los AuNC. El análisis de las tres rutas de síntesis propuestas a través de las pruebas de caracterización permitió conocer las mejores condiciones de síntesis de AuNC que presentaran la propiedad óptica de emisión de fluorescencia.

Los AuNC sintetizados con el péptido PepP22 presentaron tamaño inferior a los 5.0 nm y emisión de fluorescencia como resultado de un estudio cualitativo, en contraste con los AuNC sintetizados con los otros tres péptidos, esto llevó a descartar la evaluación de emisión de fluorescencia de los AuNC sintetizados con dichos péptidos y realizar únicamente el estudio con AuNC-PepP22.

La caracterización mediante la técnica de emisión de fluorescencia permitió identificar la emisión inherente del péptido PepP22, y comparar su emisión de fluorescencia respecto a los AuNC que emplean este péptido como ligando, sintetizados por las tres rutas propuestas. El

resultado a destacar de la emisión de fluorescencia de los AuNC-PepP22 respecto al péptido PepP22, es el obtenido mediante la síntesis empleando ácido ascórbico como agente reductor, ya que las nanoestructuras sintetizadas bajo estas condiciones presentan una intensidad de fluorescencia y un máximo de emisión en los 474 nm, para una longitud de onda de máxima excitación de 400 nm. Estas nanoestructuras fluorescentes podrían tener aplicaciones como sondas fluorescentes aplicadas en la biomedicina para visualizar, detectar y cuantificar diversas moléculas y procesos biológicos.

7. Recomendaciones

Se recomienda partir de un diseño experimental computacional, la simulación por ordenador y el modelado matemático para planificar y optimizar experimentos, puede permitir explorar virtualmente un amplio espacio de diseño, evaluar múltiples variables, condiciones experimentales y predecir el rendimiento o comportamiento de un sistema antes de realizar experimentos en laboratorio. La herramienta del diseño computacional complementa los enfoques experimentales tradicionales, permitiendo realizar investigaciones más eficientes, económicas y seguras.

Referencias Bibliográficas

- Amendola, V., Pilot, R., Frasconi, M., Maragò, O. M., & Iatì, M. A. (2017). Surface plasmon resonance in gold nanoparticles: A review. In *Journal of Physics Condensed Matter* (Vol. 29, Issue 20). Institute of Physics Publishing. <https://doi.org/10.1088/1361-648X/aa60f3>
- An, D., Su, J., Weber, J. K., Gao, X., Zhou, R., & Li, J. (2015). A Peptide-Coated Gold Nanocluster Exhibits Unique Behavior in Protein Activity Inhibition. *Journal of the American Chemical Society*, *137*(26), 8412–8418. <https://doi.org/10.1021/jacs.5b00888>
- Bai, Z., Ren, X., Gong, Z., Hao, C., Chen, Y., Wan, P., & Meng, X. (2017). 11-Mercaptoundecanoic acid functionalized gold nanoclusters as fluorescent probes for the sensitive detection of Cu²⁺ and Fe³⁺ ions. *Chinese Chemical Letters*, *28*(9), 1901–1904. <https://doi.org/10.1016/j.ccllet.2017.05.005>
- Briones-Vázquez, C. A., & Álvarez-Hernández, A. (2021). Sondas fluorescentes, una revisión general: propiedades, diseño y aplicaciones. *Pädi Boletín Científico de Ciencias Básicas e Ingenierías Del ICBI*, *9*(17), 9–16. <https://doi.org/10.29057/icbi.v9i17.7143>
- Cao, Z., Chen, J., Tran, J., Chen, X., Bacacao, B., Bekale, L. A., & Santa Maria, P. L. (2020a). Antimicrobial Gold Nanoclusters Eradicate Escherichia coli Biofilms and Are Nontoxic by Oral Administration. *ACS Applied Bio Materials*, *3*(8), 5275–5286. <https://doi.org/10.1021/acsabm.0c00641>
- Cao, Z., Chen, J., Tran, J., Chen, X., Bacacao, B., Bekale, L. A., & Santa Maria, P. L. (2020b). Antimicrobial Gold Nanoclusters Eradicate Escherichia coli Biofilms and Are Nontoxic by Oral Administration. *ACS Applied Bio Materials*, *3*(8), 5275–5286. <https://doi.org/10.1021/acsabm.0c00641>

- Carro, P., Azofra, L. M., Albrecht, T., Salvarezza, R. C., & Pensa, E. (2021). Unraveling the Causes of the Instability of Au_n(SR)_x Nanoclusters on Au(111). *Chemistry of Materials*, 33(9), 3428–3435. <https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.1c00816>
- Cifuentes-Rius, A., Deepagan, V. G., Xie, J., & Voelcker, N. H. (2021). Bright Future of Gold Nanoclusters in Theranostics. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 13(42), 49581–49588. <https://doi.org/10.1021/acsami.1c14275>
- Ding, C., Xu, Y., Zhao, Y., Zhong, H., & Luo, X. (2018). Fabrication of BSA@AuNC-Based Nanostructures for Cell Fluorescence Imaging and Target Drug Delivery. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 10(10), 8947–8954. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b18493>
- Halawa, M. I., Lai, J., & Xu, G. (2018). Gold nanoclusters: synthetic strategies and recent advances in fluorescent sensing. *Materials Today Nano*, 3, 9–27. <https://doi.org/10.1016/j.mtnano.2018.11.001>
- Hu, F., Guan, Z. J., Yang, G., Wang, J. Q., Li, J. J., Yuan, S. F., Liang, G. J., & Wang, Q. M. (2021). Molecular Gold Nanocluster Au₁₅₆ Showing Metallic Electron Dynamics. *Journal of the American Chemical Society*, 143(41), 17059–17067. <https://doi.org/10.1021/jacs.1c06716>
- Le Guével, X., Hötzer, B., Jung, G., Hollemeyer, K., Trouillet, V., & Schneider, M. (2011). Formation of Fluorescent Metal (Au, Ag) Nanoclusters Capped in Bovine Serum Albumin Followed by Fluorescence and Spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry C*, 115(22), 10955–10963. <https://doi.org/10.1021/jp111820b>

- Li, L., Zhuang, G., Li, M., Yuan, P., Deng, L., & Guo, H. (2022). Influence of indigo-hydroxyl interactions on the properties of sepiolite-based Maya blue pigment. *Dyes and Pigments*, 200. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2022.110138>
- Li, N., Shang, Y., Han, Z., Wang, T., Wang, Z. G., & Ding, B. (2019). Fabrication of Metal Nanostructures on DNA Templates. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 11(15), 13835–13852. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b16194>
- Li, T., Zhu, H., & Wu, Z. (2023). Viewing Aggregation-Induced Emission of Metal Nanoclusters from Design Strategies to Applications. In *Nanomaterials* (Vol. 13, Issue 3). MDPI. <https://doi.org/10.3390/nano13030470>
- Li, Y., Wen, Q. L., Liu, A. Y., Long, Y., Liu, P., Ling, J., Ding, Z. T., & Cao, Q. E. (2020). One-pot synthesis of green-emitting gold nanoclusters as a fluorescent probe for determination of 4-nitrophenol. *Microchimica Acta*, 187(2). <https://doi.org/10.1007/s00604-019-4090-5>
- Lin, Y., Charchar, P., Christofferson, A. J., Thomas, M. R., Todorova, N., Mazo, M. M., Chen, Q., Douth, J., Richardson, R., Yarovsky, I., & Stevens, M. M. (2018). Surface Dynamics and Ligand-Core Interactions of Quantum Sized Photoluminescent Gold Nanoclusters. *Journal of the American Chemical Society*, 140(51), 18217–18226. <https://doi.org/10.1021/jacs.8b04436>
- Liu, C., Zhang, X., Han, X., Fang, Y., Liu, X., Wang, X., Waterhouse, G. I. N., Xu, C., Yin, H., & Gao, X. (2020). Polypeptide-Templated Au Nanoclusters with Red and Blue Fluorescence Emissions for Multimodal Imaging of Cell Nuclei. *ACS Applied Bio Materials*, 3(4), 1934–1943. <https://doi.org/10.1021/acsabm.9b01078>

- Lovrić, J., Bazzi, H. S., Cuie, Y., Fortin, G. R. A., Winnik, F. M., & Maysinger, D. (2005). Differences in subcellular distribution and toxicity of green and red emitting CdTe quantum dots. *Journal of Molecular Medicine*, 83(5), 377–385. <https://doi.org/10.1007/s00109-004-0629-x>
- Lu, F., Yang, H., Tang, Y., Yu, C. J., Wang, G., Yuan, Z., & Quan, H. (2020). 11-Mercaptoundecanoic acid capped gold nanoclusters with unusual aggregation-enhanced emission for selective fluorometric hydrogen sulfide determination. *Microchimica Acta*, 187(4). <https://doi.org/10.1007/s00604-020-4159-1>
- Lu, Y., Wei, W., & Chen, W. (2012). Copper nanoclusters: Synthesis, characterization and properties. *Chinese Science Bulletin*, 57(1), 41–47. <https://doi.org/10.1007/s11434-011-4896-y>
- Maity, D. (2020). Selected peptide-based fluorescent probes for biological applications. In *Beilstein Journal of Organic Chemistry* (Vol. 16, pp. 2971–2982). Beilstein-Institut Zur Forderung der Chemischen Wissenschaften. <https://doi.org/10.3762/BJOC.16.247>
- Makarava, N., Parfenov, A., & Baskakov, I. V. (2005). Water-Soluble Hybrid Nanoclusters with Extra Bright and Photostable Emissions: A New Tool for Biological Imaging. *Biophysical Journal*, 89(1), 572–580. <https://doi.org/10.1529/biophysj.104.049627>
- Schaaff, T. G., Knight, G., Shafiqullin, M. N., Borkman, R. F., & Whetten, R. L. (1998). Isolation and Selected Properties of a 10.4 kDa Gold:Glutathione Cluster Compound. *The Journal of Physical Chemistry B*, 102(52), 10643–10646. <https://doi.org/10.1021/jp9830528>

- Shang, L., Dong, S., & Nienhaus, G. U. (2011). Ultra-small fluorescent metal nanoclusters: Synthesis and biological applications. *Nano Today*, 6(4), 401–418. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2011.06.004>
- Sun, J., Zhang, J., & Jin, Y. (2013). 11-Mercaptoundecanoic acid directed one-pot synthesis of water-soluble fluorescent gold nanoclusters and their use as probes for sensitive and selective detection of Cr³⁺ and Cr⁶⁺. *Journal of Materials Chemistry C*, 1(1), 138–143. <https://doi.org/10.1039/c2tc00021k>
- Van de Looij, S. M., Hebels, E. R., Viola, M., Hembury, M., Oliveira, S., & Vermonden, T. (2022). Gold Nanoclusters: Imaging, Therapy, and Theranostic Roles in Biomedical Applications. In *Bioconjugate Chemistry* (Vol. 33, Issue 1, pp. 4–23). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.1c00475>
- Wang, X., Xu, Y., Ma, X., & Tian, H. (2018). Multicolor Photoluminescence of a Hybrid Film via the Dual-Emitting Strategy of an Inorganic Fluorescent Au Nanocluster and an Organic Room-Temperature Phosphorescent Copolymer. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 57(8), 2866–2872. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.7b04759>
- Wang, Z., Hu, T., Liang, R., & Wei, M. (2020). Application of Zero-Dimensional Nanomaterials in Biosensing. *Frontiers in Chemistry*, 8. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00320>
- Wu, Z., Chen, J., & Jin, R. (2011). One-pot synthesis of Au₂₅(SG)₁₈ 2- and 4-nm gold nanoparticles and comparison of their size-dependent properties. *Advanced Functional Materials*, 21(1), 177–183. <https://doi.org/10.1002/adfm.201001120>

- Xiao, R., Jia, J., Wang, R., Feng, Y., & Chen, H. (2023). Strong Ligand Control for Noble Metal Nanostructures. *Accounts of Chemical Research*, 56(12), 1539–1552. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.3c00119>
- Yao, Q., Chen, T., Yuan, X., & Xie, J. (2018). Toward Total Synthesis of Thiolate-Protected Metal Nanoclusters. *Accounts of Chemical Research*, 51(6), 1338–1348. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.8b00065>
- Zanetti-Polzi, L., Charchar, P., Yarovsky, I., & Corni, S. (2022). Origins of the pH-Responsive Photoluminescence of Peptide-Functionalized Au Nanoclusters. *ACS Nano*, 16(12), 20129–20140. <https://doi.org/10.1021/acsnano.2c04335>
- Zhang, B., Chen, J., Cao, Y., Chai, O. J. H., & Xie, J. (2021). Ligand Design in Ligand-Protected Gold Nanoclusters. In *Small* (Vol. 17, Issue 27). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/sml.202004381>
- Zhang, L., & Wang, E. (2014). Metal nanoclusters: New fluorescent probes for sensors and bioimaging. *Nano Today*, 9(1), 132–157. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2014.02.010>
- Zhang, Q., Wang, J., Meng, Z., Ling, R., Ren, H., Qin, W., Wu, Z., & Shao, N. (2021). Glutathione disulfide as a reducing, capping, and mass-separating agent for the synthesis and enrichment of gold nanoclusters. *Nanomaterials*, 11(9). <https://doi.org/10.3390/nano11092258>
- Zhang, W., Lin, D., Wang, H., Li, J., Nienhaus, G. U., Su, Z., Wei, G., & Shang, L. (2017). Supramolecular Self-Assembly Bioinspired Synthesis of Luminescent Gold Nanocluster-Embedded Peptide Nanofibers for Temperature Sensing and Cellular Imaging. *Bioconjugate Chemistry*, 28(9), 2224–2229. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.7b00312>

- Zhang, X. H., Zhou, T. Y., & Chen, X. (2015). Applications of metal nanoclusters in environmental monitoring. In *Chinese Journal of Analytical Chemistry* (Vol. 43, Issue 9, pp. 1296–1305). Chinese Academy of Sciences. [https://doi.org/10.1016/S1872-2040\(15\)60856-8](https://doi.org/10.1016/S1872-2040(15)60856-8)
- Zhao, R. X., Liu, A. Y., Wen, Q. L., Wu, B. C., Wang, J., Hu, Y. L., Pu, Z. F., Ling, J., & Cao, Q. (2021). Glutathione stabilized green-emission gold nanoclusters for selective detection of cobalt ion. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 254. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2021.119628>
- Zheng, J., Zhang, C., & Dickson, R. M. (2004a). Highly Fluorescent, Water-Soluble, Size-Tunable Gold Quantum Dots. *Physical Review Letters*, 93(7), 077402. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.93.077402>
- Zheng, J., Zhang, C., & Dickson, R. M. (2004b). Highly fluorescent, water-soluble, size-tunable gold quantum dots. *Physical Review Letters*, 93(7). <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.93.077402>
- Zheng, J., Zhou, C., Yu, M., & Liu, J. (2012). Different sized luminescent gold nanoparticles. In *Nanoscale* (Vol. 4, Issue 14, pp. 4073–4083). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/c2nr31192e>
- Zheng, Y., Lai, L., Liu, W., Jiang, H., & Wang, X. (2017). Recent advances in biomedical applications of fluorescent gold nanoclusters. *Advances in Colloid and Interface Science*, 242, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.02.005>
- Zhu, H., Zhou, Y., Wang, Y., Xu, S., James, T. D., & Wang, L. (2022). Stepwise-Enhanced Tumor Targeting of Near-Infrared Emissive Au Nanoclusters with High Quantum Yields and Long-

Term Stability. *Analytical Chemistry*, 94(38), 13189–13196.

<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.2c02717>

Zhu, S., Wang, X., Li, S., Liu, L., & Li, L. (2020). Near-Infrared-Light-Assisted in Situ Reduction of Antimicrobial Peptide-Protected Gold Nanoclusters for Stepwise Killing of Bacteria and Cancer Cells. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 12(9), 11063–11071.

<https://doi.org/10.1021/acsami.0c00310>

Zhuang, Q. Q., He, S. Bin, Huang, K. Y., Peng, H. P., Chen, C. M., Deng, H. H., Xia, X. H., Chen, W., & Hong, G. L. (2020). Decisive role of pH in synthesis of high purity fluorescent BSA-Au₂₀ nanoclusters. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 239. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.118520>

Zi, Y., Xu, D., Li, C., Qu, F., & Zhao, X. E. (2021). Aggregation-enhanced emission of metal nanoclusters triggered by peptide self-assembly and application in chymotrypsin inhibitor screening. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 345.

<https://doi.org/10.1016/j.snb.2021.130243>