

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA



**DESARROLLO DE PLATAFORMAS FOTOTÉRMICAS:
POTENCIAL APLICACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA**

TRABAJO FIN DE GRADO

Curso académico 2025/2026

JUAN JAVIER SÁNCHEZ-MANZANERA CERDÁ

Tutora: María José Martínez Tomé

Cotutora: Carmen Reyes Mateo Martínez

Departamento de Agroquímica y Medio Ambiente

Área de Química-Física

Instituto de Investigación en Biotecnología y Salud (IDiBE)

1. Introducción	5
1.1 Nanopartículas de oro (AuNPs)	5
1.1.1 ¿Qué son?	5
1.1.2 Propiedades	5
1.1.3 Resonancia de plasmón superficial	5
1.1.4 Síntesis de Nanopartículas	6
1.1.4.1 Síntesis física	6
1.1.4.2 Síntesis química	7
1.1.5 Inmovilización	7
1.1.6 Inmovilización 3D	8
1.1.6.1 Matrices Sol-Gel	8
1.1.6.2 Matrices de hidrogel	8
1.1.7 Aplicaciones	9
2. Antecedentes	9
3. Objetivos	10
4. Materiales y Métodos	11
4.1 Tampón fosfato 50 mM pH 7	11
4.2 AuNPs y AuNRs comerciales	11
4.2.1 Nanopartículas de oro (AuNPs)	11
4.2.2 Nanorods de oro (AuNRs)	11
4.3 Síntesis de AuNPs y recubrimiento	11
4.3.1 Síntesis química mediante el método Turkevich	12
4.3.1.1 Sal de oro	12
4.3.1.2 Citrato	12
4.3.1.3 Protocolo de síntesis	12
4.3.2 Recubrimiento AuNPs y AuNRs	12
4.4 Síntesis de materiales 3D y plataformas fototérmicas	13
4.4.1 Síntesis de matrices Sol-Gel de sílice	13
4.4.1.1 Protocolo de obtención de la matriz sol-gel	13
4.4.1.2 Inmovilización de AuNPs en matrices sol-gel (AuNP@sol-gel)	13
4.4.2 Síntesis de Hidrogeles orgánicos	14
4.4.2.1 AETA como precursor	14
4.4.2.2 MBA como entrecruzante y LiTPO como fotoiniciador	14

4.4.2.3 Protocolo de formación del hidrogel	14
4.4.2.4 Inmovilización de AuNPs en hidrogel (AuNP@hidrogel)	15
4.5 Síntesis de una plataforma fotobioactiva (AuNP@sol-gel@Lac)	15
4.5.1 ¿Qué es la lacasa?	15
4.5.2 Inmovilización de la lacasa y ensayo de actividad en sol-gel	15
4.6. Caracterización de tamaño, carga y morfología	16
4.6.1 Técnicas de Dispersión de Luz Dinámica	16
4.6.2. Técnicas de microscopía electrónica	16
4.7 Caracterización óptica y fototérmica	17
4.7.1 Espectroscopía de absorción	17
4.7.2 Conversión fototérmica	17
4.7.2.1 Metodología de irradiación	18
4.7.2.2 LOG210 Data logger	18
4.7.2.3 Prototipo adaptado para caracterización fototérmica de las plataformas	18
5. Resultados y Discusión	19
5.1 Caracterización de las AuNPs en disolución	19
5.1.1 Índice de Polidispersión, Tamaño y Potencial Z (PZ)	20
5.1.2 Determinación de la banda plasmónica	21
5.1.3 Caracterización de morfología	23
5.1.4 Caracterización de la conversión fototérmica	23
5.2 Inmovilización y caracterización de AuNPs y AuNRs en Sol-gel (plataforma AuNP@sol-gel y AuNR@sol-gel)	27
5.2.1 Determinación de la banda plasmónica	27
5.2.2 Caracterización de la conversión fototérmica	28
5.2.2.1 Conversión fototérmica mediante irradiación con láser a 520 nm	28
5.2.2.2 Conversión fototérmica mediante irradiación con láser a 808 nm	29
5.3 Inmovilización y caracterización de AuNPs y AuNRs en hidrogel (plataforma AuNP@hidrogel y AuNR@hidrogel)	30
5.3.1 Determinación de la banda plasmónica	31
5.3.2 Caracterización de la conversión fototérmica	33
5.4 Desarrollo de una plataforma fotobioactiva para catálisis fotoactivada	34
6. Conclusiones y Perspectivas futuras	35
7. Bibliografía	37

Abreviaturas

- **NPs** Nanopartículas
- **NRs** Nanorods
- **AuNPs** Nanopartículas de oro
- **AuNRs** Nanorods de oro
- **SPR** Resonancia de plasmón superficial
- **LSPR** Resonancia de plasmón superficial localizada
- **NIR** Infrarrojo cercano
- **TEOS** Ortosilicato de tetraetilo
- **CTAB** Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
- **PVP** Polivinilpirrolidona
- **PZ** Potencial Z
- **PdI** Índice de polidispersión
- **TP** Tampón fosfato
- **AETA** [2-(acryloyloxy)ethyl]trimethylammonium chloride
- **MBA** N,N'-metilenbisacrilamida
- **LITPO** (lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate)

Resumen

El presente Trabajo de Fin de Grado se centra en la síntesis y caracterización de plataformas nanohíbridas con propiedades fototérmicas, basadas en nanopartículas de oro esféricas (AuNPs) y cilíndricas (AuNRs) inmovilizadas en materiales 3D. Tras evaluar su resonancia de plasmón superficial y propiedades fisicoquímicas, se seleccionaron las partículas óptimas para su inmovilización en matrices de sílice (sol-gel) e hidrogeles acrílicos. Los ensayos fototérmicos mostraron que las AuNPs son eficientes a 520 nm y las AuNRs en el infrarrojo cercano (808 nm), logrando incrementos de hasta 25 °C en pocos minutos. Al optimizar la inmovilización, las plataformas conservaron su capacidad fototérmica, siendo la agregación un factor clave en su respuesta óptica y térmica. Finalmente, la coinmovilización de la enzima Lacasa con AuNPs en sol-gel aumentó la actividad enzimática bajo irradiación, lo que pone de manifiesto el potencial de estas plataformas en hipertermia, catálisis y liberación controlada.

Palabras clave: Nanopartículas de oro, Plataformas nanohíbridas, Resonancia de Plasmón Superficial (LSPR), Lacasa, Conversión fototérmica, Inmovilización en 3D.

Abstract

This Final Degree Project focuses on the synthesis and characterization of photothermal nanohybrid platforms based on spherical gold nanoparticles (AuNPs) and gold nanorods (AuNRs) immobilized in 3D materials. After evaluating their surface plasmon resonance and physicochemical properties, the optimal particles were selected for immobilization into silica matrices (sol-gel) and acrylic-based hydrogels. Photothermal assays showed that AuNPs exhibit high efficiency under 520 nm irradiation, whereas AuNRs are more efficient in the near-infrared region (808 nm), reaching temperature increases of up to 25 °C within a few minutes. Upon optimizing the immobilization conditions, the platforms retained their photothermal capacity, with the degree of aggregation being a key factor on their optical and thermal response. Finally, the co-immobilization of the laccase enzyme with AuNPs in a sol-gel matrix enhanced enzymatic activity under irradiation, supporting the potential of these platforms for photoactive applications such as hyperthermia, catalysis, and controlled release.

Keywords: Gold nanoparticles, Nanohybrid platforms, Surface plasmon resonance, Laccase, Photothermal conversion, 3D immobilization.

1. Introducción

1.1 Nanopartículas de oro (AuNPs)

1.1.1 ¿Qué son?

Las nanopartículas de oro (AuNPs), como su propio nombre indica, son partículas de oro de tamaño nanométrico. Este tamaño comprende típicamente entre 1 y 100 nm, es decir, una milmillonésima parte de un metro. Estas AuNPs se comportan de forma distinta al oro macroscópico debido a la relación área superficial/volumen y a efectos cuánticos [1]. A estas escalas presentan colores muy intensos (vino tinto, rojo, púrpura), lo que permite detectar dispersiones coloidales incluso a concentraciones nanomolares [1]. Además, su superficie puede funcionalizarse fácilmente con una gran variedad de moléculas como ADN, proteínas, pequeños ligandos, etc. Esto nos permite obtener sistemas muy versátiles en biosensores, catálisis o aplicaciones biomédicas [1].

1.1.2 Propiedades

Por estos motivos las AuNPs se han vuelto casi un “material estándar” en la biomedicina y nanotecnología porque tienen muchas ventajas en un solo componente. Son biocompatibles, químicamente inertes y de baja toxicidad frente a otros metales más reactivos [2]. Además, se sintetizan y controlan con facilidad en tamaño y forma, lo que permite adaptar su comportamiento para aplicaciones concretas, presentan alta estabilidad en medios fisiológicos y pueden ser recubiertas para mejorar aún más esa estabilidad [3]. Otra de sus características clave es la resonancia de plasmones de superficie (SPR) que genera respuestas ópticas muy intensas y ajustables, clave para biosensores, diagnóstico y terapia fototérmica/fotodinámica. [2].

1.1.3 Resonancia de plasmón superficial

En metales como el oro hay muchos electrones de conducción libres. Cuando un nanomaterial de oro se ilumina con luz, el campo eléctrico oscilante de esa luz hace que esos electrones se desplacen colectivamente respecto al “esqueleto” iónico positivo de material. Cuando la frecuencia de la luz coincide con la frecuencia natural de esa oscilación colectiva, se produce el fenómeno SPR: una oscilación coherente de los electrones libres en la superficie metálica en resonancia con el campo electromagnético incidente [4]. En el caso de las AuNPs, la resonancia queda confinada en cada partícula y se habla de resonancia de plasmón superficial localizada (LSPR) (*Ilustración 1*) [5]. En AuNPs esféricas pequeñas, la LSPR se manifiesta como una banda intensa de absorción y dispersión en el visible: la solución de AuNPs toma un color rojizo característico porque parte de la luz se absorbe y parte se dispersa muy eficientemente [6]. La relajación no radiativa de la excitación plasmónica resultante conduce a una conversión altamente eficiente de la energía luminosa en calor. Este calentamiento es rápido, localizado y controlable, lo que hace a las AuNPs ideales para aplicaciones fototérmicas. En nanopartículas de oro no esféricas, como nanocilindros, más conocidos como nanorods (AuNRs), nanoestrellas o nanoprismas, la anisotropía geométrica da lugar a modos plasmónicos desplazados hacia longitudes de onda mayores, extendiéndose desde el visible hasta el infrarrojo cercano (NIR) (800-1300 nm), región espectral preferente para aplicaciones biomédicas debido a su mayor penetración tisular.

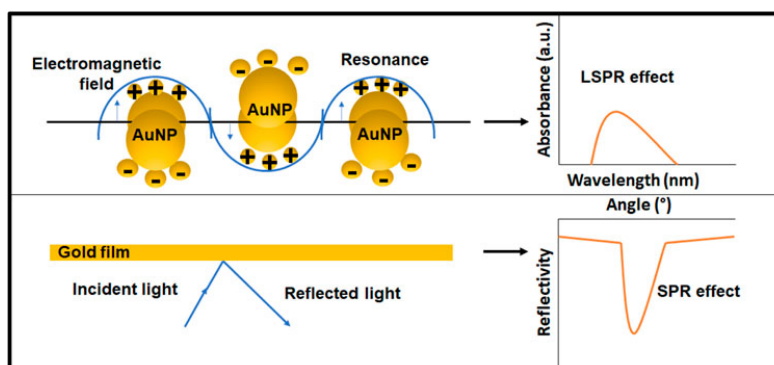


Ilustración 1. El principio de las técnicas de detección SPR y LSPR [4].

Además de la forma de la nanopartícula, otras propiedades como su tamaño, el índice de refracción del medio y la distancia y acoplamiento entre partículas son importantes para ámbitos como la biomedicina y el diagnóstico, ya que cambios en el entorno local (por ejemplo, unión de proteínas, ADN o biomarcadores a la superficie) modifican el índice de refracción cercano y provocan un desplazamiento del pico de LSPR, que se puede medir espectroscópicamente. Por esta razón, las AuNPs se usan como sensores ópticos muy sensibles (*LSPR biosensing*) para detectar interacciones biomoleculares, cambios en la concentración o la presencia de biomarcadores de enfermedad [4],[6].

1.1.4 Síntesis de Nanopartículas

Principalmente, podemos destacar dos enfoques para la síntesis de nanopartículas (NPs); el *top-down* (de arriba hacia abajo) y el *bottom-up* (de abajo hacia arriba), que a su vez pueden ser divididos en diferentes subclases dependiendo de las condiciones empleadas (Ilustración 2).

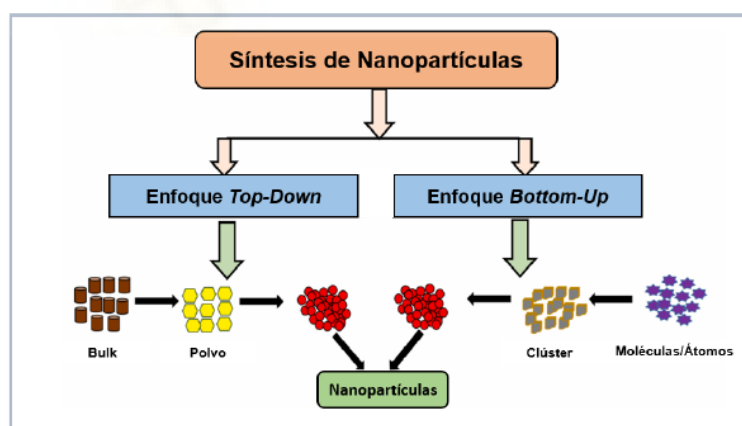


Ilustración 2. Esquema de métodos top-down y bottom-up para la síntesis de nanopartículas [7].

1.1.4.1 Síntesis física

La síntesis física de nanopartículas se basa en generar AuNPs a partir de un sólido, sin reacciones químicas de reducción clásicas. Son métodos *top-down*: se parte de oro macroscópico y se fragmenta hasta la escala nano. Este tipo de síntesis destaca por su alta pureza y su menor uso de reactivos químicos. Sin embargo, se necesita equipamiento más caro (láseres, vacío, plasmas, etc.) [8].

1.1.4.2 Síntesis química

La síntesis química de nanopartículas es una aproximación *bottom-up*: se parte de iones o moléculas en disolución y se construyen nanocristales por reacción química controlada [9]. Para ello, se emplean tres componentes básicos: un precursor metálico (sales, complejos, alcóxidos, etc.), un agente reductor o reactivo de hidrólisis/condensación y un estabilizante o *capping* (polímeros, surfactantes, ligandos) que evita la agregación y controla el crecimiento [10]. En presencia del reductor, los precursores metálicos se reducen a átomos neutros, los cuales experimentan nucleación y crecimiento posterior. Variando la concentración, temperatura, pH o tipo de reductor se ajustan tamaño y forma [10][11]. En el caso de las AuNPs, la síntesis suele llevarse a cabo utilizando el método clásico de Turkevich, que da lugar a la formación de nanopartículas esféricas [11]. Sin embargo, la obtención de nanopartículas con formas anisotrópicas (AuNRs, nanoprismas, etc.) necesarias para desplazar la resonancia plasmónica hacia el NIR, con vistas a aplicaciones biomédicas, requiere estrategias sintéticas considerablemente más complejas que precisan de un control exhaustivo [12]. La ruta más clásica para su obtención utiliza el surfactante bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB), altamente efectivo como agente de crecimiento, pero tóxico, lo que crea un conflicto entre el control de su síntesis y biocompatibilidad [12].

1.1.5 Inmovilización

Cuando las AuNPs se sintetizan por métodos químicos, quedan suspendidas en un medio líquido, formando una suspensión coloidal estable que se mantiene sin precipitar gracias a repulsiones electrostáticas o estéricas. Sin embargo, cambios de pH, fuerza iónica o temperatura pueden romper el equilibrio e inducir la agregación y posterior precipitación de las nanopartículas. La inmovilización de AuNPs permite mejorar la estabilidad del sistema y controlar espacialmente la generación de calor fototérmico, facilitando su integración en plataformas funcionales, como catalizadores o biosensores. La inmovilización consiste en fijarlas sobre un soporte sólido (vidrio, polímeros, metales, nanopartículas magnéticas, fibras, etc.) o sobre superficies biomoleculares, con el objetivo de que se queden ancladas de forma estable sin perder sus propiedades ópticas o catalíticas. Esto permite pasar de un sistema coloidal (en disolución) a un dispositivo que es más fácil de manejar, recuperar y, además, con la capacidad de reutilizarlo [13]. Para la inmovilización se utilizan dos tipos de interacciones: covalente y no covalente. Las interacciones no covalentes (electrostáticas, hidrofóbicas o de coordinación) son típicas de recubrimientos con polímeros con carga (por ejemplo, polietilamida sobre vidrio) que atraen a las AuNPs cargadas. Este tipo de inmovilización es sencilla, pero es menos estable frente a cambios de pH, fuerza iónica o lavado intenso. En cambio, las interacciones covalentes, se caracterizan por la formación de enlaces químicos directos, que dan lugar a superficies recubiertas de AuNPs con alta estabilidad, capaces de mantener actividad catalítica durante muchos ciclos y largos periodos de almacenamiento [13].

A continuación, se expondrán una lista de ventajas y desventajas de la inmovilización que han sido descritas en diferentes artículos científicos (Tabla 1)[14][15]:

Tabla 1. Ventajas y desventajas generales de la inmovilización de AuNPs.

Ventajas	Desventajas
- Reutilización y manejo más sencillo - Mayor estabilidad frente a agregación - Estabilidad térmica y tamaño controlable - Transparencia y propiedades ópticas reproducibles - Procesado suave y versátil	- Pérdida de accesibilidad superficial - Desafíos de durabilidad y liberación no deseada - Posible agregación durante gelificación

1.1.6 Inmovilización 3D

La inmovilización tridimensional (3D) de AuNPs consiste en confinar las nanopartículas dentro de una matriz o andamiaje volumétrico. Esto habilita la posibilidad de combinar propiedades ópticas, electrónicas y de bioconjugación de las AuNPs con las características mecánicas, de transporte y biocompatibilidad del material huésped, generando sistemas funcionales para múltiples utilidades. En el presente trabajo se utilizó esta técnica de inmovilización empleando dos tipos de materiales: las matrices de sílice sintetizadas por el método sol-gel y los hidrogeles orgánicos. En ambos casos, las nanopartículas quedaron retenidas dentro de una estructura porosa sin formar enlaces fuertes y permanentes (covalentes) con el material.

1.1.6.1 Matrices Sol-Gel

En química de materiales, “sol-gel” es un proceso en el que se parte de precursores moleculares (como el ortosilicato de tetraetilo, TEOS) disueltos en un medio líquido (el “sol”) y, mediante reacciones químicas, se forman progresivamente oligómeros y cadenas inorgánicas que acaban construyendo una red tridimensional continua (el “gel”). En esta red es donde se quedan las AuNPs inmovilizadas, sin necesidad de uniones covalentes [16]. Para la inmovilización de AuNPs en matrices sol-gel se utilizan principalmente dos estrategias: introducir las sales de oro y el agente reductor en la disolución precursora para que se sinteticen las nanopartículas a la vez que la matriz, o añadir las AuNPs ya formadas a la disolución precursora. Para la elaboración de este trabajo se utilizó ésta última estrategia.

1.1.6.2 Matrices de hidrogel

Un hidrogel es una red tridimensional de cadenas poliméricas hidrófilas que, gracias a puntos de unión entre cadenas (entrecruzamiento), forma un sólido blando capaz de absorber y retener grandes cantidades de agua sin disolverse [17]. Para su elaboración se utilizan monómeros/polímeros con grupos reactivos, un iniciador (radicales, UV, radiación) y un agente de entrecruzamiento. Durante la polimerización se forman enlaces covalentes entre cadenas, creando una red permanente, dando como resultado un hidrogel con alta estabilidad mecánica y baja solubilidad [17]. En cuanto a la inmovilización de las nanopartículas dentro del hidrogel, existen varios métodos. En el presente trabajo, se probó a introducir las AuNPs en la matriz partiendo desde un hidrogel deshidratado (xerogel) e hinchándolo con una disolución de estas nanopartículas previamente formadas. Además, también se probó a introducir la AuNPs directamente en la mezcla de precursores del hidrogel, de forma que al polimerizar estas quedaran atrapadas en su interior.

1.1.7 Aplicaciones

Las nanopartículas de oro tienen un gran potencial para diversas aplicaciones biotecnológicas y biomédicas, gracias a sus propiedades ópticas únicas, su capacidad para generar calor bajo irradiación y su biocompatibilidad. Una de sus aplicaciones es la hipertermia localizada, la cual ha sido explorada ampliamente como una alternativa terapéutica en oncología [18]. Otra de sus aplicaciones es el uso en liberación controlada de fármacos. Estas AuNPs integradas en matrices pueden servir como “gatillos” activados por luz para liberar medicamentos encapsulados cuando se alcanza una temperatura específica. Esto contribuye a una estrategia espacial y temporalmente controlada del fármaco, reduciendo efectos secundarios sistémicos [19]. Finalmente, la combinación en un mismo material de AuNPs y enzimas permite activar fototérmicamente su actividad, acelerando y controlando reacciones biocatalíticas de forma remota y precisa. Estas plataformas fotobioactivas constituyen un campo emergente que aprovecha las propiedades ópticas únicas del oro para generar calor de manera localizada, minimizando el calentamiento global del sistema y permitiendo “encender” y “apagar” de forma reversible la actividad enzimática mediante luz. El espectro de aplicaciones de este nuevo enfoque es amplio y se extiende desde la biocatálisis para acelerar reacciones químicas a escala industrial hasta la posible modulación terapéutica de enzimas implicadas en el desarrollo de diversas patologías [20].

En el presente trabajo se han puesto en marcha los primeros ensayos destinados a evaluar la viabilidad de los materiales desarrollados para interactuar con la luz e incrementar la actividad enzimática, de forma que se pueda aumentar la potencia catalítica solo cuando se irradia. Para ello se ha seleccionado como enzima modelo la lacasa, una enzima fundamental en diversos procesos industriales y en la degradación de compuestos complejos, como los fármacos, destacando por su papel en la “biocatálisis verde” y la sostenibilidad [21].

2. Antecedentes

Como se ha comentado en el apartado anterior, las AuNPs, gracias a sus propiedades fototermales y ópticas únicas, su excelente biocompatibilidad y su fácil funcionalización, se utilizan actualmente en diversos campos, entre ellos la catálisis, la bioimagen y la terapéutica. No obstante, el estado coloidal de las AuNPs presenta ciertas limitaciones, como una solubilidad limitada dependiente del pH y de la fuerza iónica del medio, lo que favorece su agregación. Además, una vez añadidas al medio de reacción, su recuperación resulta compleja, lo que restringe su reutilización a un único ciclo de uso [22].

En este contexto, resulta de gran interés el desarrollo de estrategias que permitan aumentar la fotoestabilidad de las AuNPs coloidales sin alterar sus propiedades de LSPR. La inmovilización de las AuNPs sobre soportes sólidos se presenta como una alternativa eficaz para mejorar su estabilidad, facilitar su manipulación y recuperación, permitir su reutilización y ampliar su rango de aplicaciones, dando lugar a plataformas fototérmicas activas en el visible y el NIR. Para la inmovilización de AuNPs se ha empleado una amplia variedad de soportes sólidos, incluyendo materiales porosos, sílica y grafito, así como recubrimientos poliméricos como el polietilenglicol y el alginato, con el objetivo de aumentar la estabilidad coloidal, prevenir la aglomeración y mejorar la eficiencia

catalítica.[23]. El grupo de investigación en el que se ha desarrollado este Trabajo de Fin de Grado cuenta con una amplia experiencia en el campo de la inmovilización de sistemas bio y nanoestructurados. Entre los materiales más utilizados destacan los hidrogeles inorgánicos, como las matrices sol-gel, ampliamente empleadas para la inmovilización de enzimas y el desarrollo de biosensores, así como los hidrogeles orgánicos que, a diferencia de las matrices inorgánicas, presentan una elevada capacidad de hinchamiento al absorber grandes cantidades de agua, lo que los convierte en matrices idóneas para la inmovilización enzimática. Recientemente han desarrollado eutectogeles que combinan las propiedades de los disolventes eutécticos profundos con la estabilidad estructural de una red tridimensional. El grupo también tiene experiencia en incorporar nanopartículas fluorescentes a las matrices mencionadas obteniendo materiales nanocompuestos_[24]_[25]. A estos materiales se les ha incorporado también enzimas como la fosfatasa alcalina y la α -glucosidasa obteniendo plataformas sensoras para la identificación de inhibidores enzimáticos_[26]_[27].

Por otra parte, en el ámbito del transporte y la liberación controlada de fármacos, se han desarrollado nanohíbridos multifuncionales basados en liposomas funcionalizados con AuNPs y nanoprismas de oro. Estos últimos permiten desplazar la banda plasmónica hacia el NIR, posibilitando la liberación de fármacos mediante procesos de hipertermia inducida_[28]_[29]. Teniendo en cuenta toda esta experiencia, en la actualidad, el grupo ha iniciado un proyecto con el objetivo de hacer plataformas fototérmicas para la degradación fotoactivada de compuestos difíciles de degradar, como los fármacos. Estas plataformas incorporarían en una misma matriz AuNPs y enzimas catalíticas, como la lipasa y la lacasa, las cuales verían aumentada enormemente su actividad tras ser irradiadas. El presente Trabajo de Fin de Grado se enmarca dentro de este proyecto y sus objetivos se detallan en el siguiente apartado.

3. Objetivos

Este trabajo tiene como objetivo final preparar plataformas nanohíbridas con propiedades fototérmicas, que integran nanopartículas de oro inmovilizadas en materiales 3D y evaluar sus potenciales propiedades en aplicaciones como biocatálisis o fototermia.

Específicamente, este estudio persigue los siguientes objetivos:

- Selección y caracterización de distintos tipos de nanopartículas de oro, tanto sintetizadas como comerciales.
- Síntesis de matrices 3D basadas en materiales sol-gel y en hidrogeles orgánicos.
- Incorporación de las nanopartículas de oro en las matrices 3D y caracterización de las propiedades fototérmicas de las plataformas desarrolladas.
- Evaluación de las posibles aplicaciones de los nuevos materiales mediante la incorporación de la enzima lacasa.

4. Materiales y Métodos

4.1 Tampón fosfato 50 mM pH 7

El tampón seleccionado para la mayoría de los experimentos fue tampón fosfato 50 mM pH7 (TP), preparado a partir de una mezcla en agua Milli-Q (MQ) de sales de sodio, usando fosfato monosódico como ácido (NaH_2PO_4) y fosfato disódico (Na_2HPO_4) como base. Ambos reactivos se adquirieron en Sigma-Aldrich.

4.2 AuNPs y AuNRs comerciales

4.2.1 Nanopartículas de oro (AuNPs)

Durante este trabajo se utilizaron diferentes tipos de AuNPs, comerciales y sintetizadas en el propio laboratorio. Las comerciales se adquirieron en Sigma-Aldrich y, según la descripción, presentaban forma esférica y distintos tamaños. Los tamaños seleccionados fueron 10, 20, 30, 40, 50 y 80 nm de diámetro (*Ilustración 3, de izquierda a derecha*). Todas ellas en una suspensión de 0.1 mM de tampón fosfato. Las longitudes de onda medias de absorción (λ_{max}), indicadas en fábrica, de cada una de las AuNPs se muestran en la *Tabla 2*.

Tabla 2. Longitudes de onda máximas para cada tamaño de AuNPs comerciales.

	10 nm	20 nm	30 nm	40 nm	50 nm	80 nm
λ_{max} (nm)	515 - 519	518 - 522	523 - 526	526 - 531	531 - 535	536 - 541



Ilustración 3. Stock de nanopartículas de oro y Nanorods comerciales.

4.2.2 Nanorods de oro (AuNRs)

Los Nanorods de oro (AuNRs) que se emplearon (*Ilustración 3, frasco derecho*) presentaron una morfología anisotrópica (cilíndrica), como se mostrará más adelante, con una longitud media de absorción (λ_{max}) de 780 nm. Dichos AuNRs se encontraban en una dispersión de agua y CTAB como estabilizante. Fueron adquiridos en Sigma-Aldrich.

4.3 Síntesis de AuNPs y recubrimiento

Las AuNPs también se sintetizaron en el laboratorio, utilizando el método de Turkevich (MT) [30]. Este método, descrito a continuación, consiste en la reducción de ácido cloroáurico (HAuCl_4) por moléculas de citrato. Tanto

los materiales utilizados para esta síntesis como para el recubrimiento posterior de las AuNPs fueron obtenidos en Sigma-Aldrich. La *Ilustración 4* muestra una imagen de las nanopartículas sintetizadas.



Ilustración 4. AuNPs sintetizadas por el método Turkevich.

4.3.1 Síntesis química mediante el método Turkevich

4.3.1.1 Sal de oro

El HAuCl_4 es la sal de oro que actúa como precursor en la síntesis de nanopartículas mediante el método Turkevich. En este proceso, el oro se encuentra inicialmente en estado Au^{3+} y es reducido por el citrato de sodio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_9$) a Au^0 , formándose los núcleos metálicos que crecen hasta dar lugar a las nanopartículas, mientras que el citrato actúa además como agente estabilizante superficial [30].

4.3.1.2 Citrato

Como se ha comentado en el apartado anterior, el citrato de sodio desempeña un papel fundamental en el método Turkevich, ya que actúa tanto como agente reductor como agente estabilizante de las AuNPs. Cuando se produce la reducción anteriormente comentada del oro, el citrato deja sus grupos carboxilato ($-\text{COO}^-$) adsorbidos en la superficie de las AuNPs, confiriéndoles carga negativa y proporcionando estabilidad coloidal por repulsión electrostática [30].

4.3.1.3 Protocolo de síntesis

Para la síntesis química mediante el método de Turkevich se comenzó añadiendo 20 ml de una disolución de HAuCl_4 1 mM a un matraz Erlenmeyer de 100 ml. Seguidamente, se calentó la disolución hasta llegar a ebullición y con agitación constante. Una vez en ebullición, se añaden 2 ml de $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_9$ 38,8 mM a la disolución y se dejó agitando hasta que tornó a un color rojo muy oscuro, este procedimiento tardó alrededor de 10 minutos. Mientras que transcurría ese tiempo, se fue añadiendo agua MQ para compensar el agua que se iba evaporando en el proceso. Finalmente, se dejó enfriar la disolución a temperatura ambiente.

4.3.2 Recubrimiento AuNPs y AuNRs

A lo largo de los diferentes experimentos realizados, se recubrieron las AuNPs sintetizadas y los AuNRs con polímeros buscando aumentar su estabilidad. Las AuNPs comerciales no necesitaron este recubrimiento, al ser ya estables, mientras que los AuNRs, aunque estables en disolución, si precisaron de recubrimiento durante el protocolo de inmovilización. El polímero utilizado en cuestión fue la polivinilpirrolidona (PVP) (*Ilustración 5*) (PM promedio ~55 kDa, como polímero neutro).

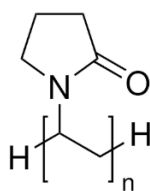


Ilustración 5. Estructura molecular de la Polivinilpirrolidona.

Para llevar a cabo el recubrimiento, se partió de una disolución stock del polímero en agua y, dependiendo del tipo de experimento realizado, se añadieron alícuotas a la suspensión coloidal, hasta obtener concentraciones finales de PVP de 1 mg/ml y 4 mg/ml. Todo para garantizar la estabilidad de las nanopartículas.

4.4 Síntesis de materiales 3D y plataformas fototérmicas

Todos los materiales utilizados para esta síntesis fueron adquiridos en Sigma-Aldrich.

4.4.1 Síntesis de matrices Sol-Gel de sílice

4.4.1.1 Protocolo de obtención de la matriz sol-gel

Para la síntesis de estas matrices se utilizó ortosilicato de tetraetilo (TEOS) como precursor del sol-gel (Ilustración 6), el cual se hidroliza y condensa para formar una red de SiO₂ amorfa. Se siguió un protocolo previamente puesto a punto en el laboratorio que consiste en mezclar 6,69 ml de TEOS con 2,16 ml de agua MQ y 60 µL de HCl 0,62M. Esta mezcla es necesaria para llevar a cabo la hidrólisis del precursor. Al principio, se visualizan dos fases distintas, por ello hay que mantenerla en agitación hasta completar la hidrólisis y obtener una única fase. Durante este proceso se genera etanol, que debe ser eliminado ya que interfiere con la polimerización del gel. Para poder eliminarlo, se mezcló 1 ml de TEOS hidrolizado con 1 ml de agua MQ en un vial, este se colocó bajo una campana extractora y se rotó en un rotavapor a 165 rpm, en un baño de agua destilada a 65°C. La disolución se rotó al vacío aproximadamente 8 minutos, tiempo suficiente para eliminar todo el alcohol. Como resultado, se obtuvo una disolución a la que denominamos TEOS rotado. A continuación, en cubetas desechables se mezcló el TEOS rotado con un volumen equivalente de tampón y se inició la gelificación hasta obtener un monolito transparente.

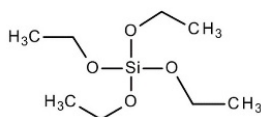


Ilustración 6. Estructura molecular del TEOS.

4.4.1.2 Inmovilización de AuNPs y AuNRs en matrices sol-gel (plataformas AuNP@sol-gel y AuNR@sol-gel)

Para la síntesis de la plataforma fototérmica basada en matrices sol-gel (AuNP@sol-gel) se tomaron 700 µl de TEOS rotado en una cubeta desechable de 4,5 x 10 mm o en una de 10 x 10 mm, obteniendo así distintos formatos. A esta solución se le añadió una cantidad equivalente de una dilución de AuNPs recubiertas con PVP y en tampón fosfato. Una vez mezclado el TEOS con la solución de AuNPs, comienza el proceso de polimerización,

que suele tardar unos 20 minutos. Sin embargo, es necesario el transcurso de 48 horas para su correcta maduración. La *Ilustración 7a* muestra una imagen de la plataforma obtenida.

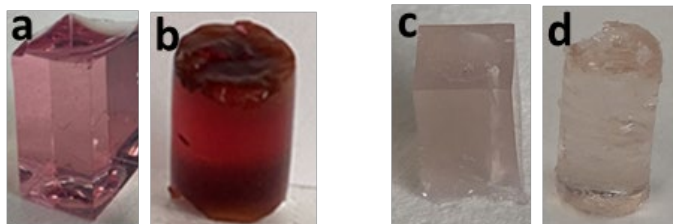


Ilustración 7. Fotografía de las plataformas: AuNP@sol-gel, (a), AuNP@hidrogel (b), AuNR@sol-gel (c) y AuNR@hidrogel (d).

Siguiendo el mismo protocolo que para la plataforma AuNP@sol-gel, se inmovilizaron nanorods recubiertos de PVP, obteniéndose la plataforma AuNR@sol-gel (*Ilustración 7c*).

4.4.2 Síntesis de Hidrogeles orgánicos

4.4.2.1 AETA como precursor

El 2-(acryloyloxy)ethyl]trimethylammonium chloride (AETA) es un precursor utilizado para formar hidrogeles. Se trata de un monómero acrílico catiónico altamente hidrófilo que se fotopolimeriza para generar hidrogeles blandos, cargados positivamente, con buenas propiedades de hinchamiento, estabilidad en seco y potencial autocurativo[26].

4.4.2.2 MBA como entrecruzante y LiTPO como fotoiniciador

El N,N'-metilenbisacrilamida (MBA), es un agente entrecruzante el cual se encarga de mantener los monómeros de AETA unidos, determinando la densidad, rigidez y capacidad de hinchamiento de la red que se crea en el hidrogel[26].

En cuanto al lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate (LiTPO) es un fotoiniciador soluble en agua utilizado en la polimerización de hidrogeles mediante irradiación UV o visible. Al absorber radiación, genera radicales libres que inician la reticulación de los monómeros, permitiendo la formación controlada de la red polimérica[26].

4.4.2.3 Protocolo de formación del hidrogel

Para la síntesis de hidrogeles orgánicos, se siguió un protocolo diseñado por miembros del laboratorio [26], basado en la polimerización radicalaria de AETA en presencia de MBA y LiTPO. La elaboración de estos hidrogeles consistió en mezclar 1,132 ml de AETA junto con 1 ml de agua MQ y se dejó agitando durante unos minutos. Seguidamente, se añadieron 2 mg de MBA y se volvieron a dejar unos minutos en agitación para, a continuación, añadir 4 mg de LiTPO y finalizar la mezcla. Una vez conseguida, se transfirió a una jeringa desechable y se irradió con una lámpara UV a 365 nm durante 1 minuto para inducir la polimerización del gel. Tras finalizar la polimerización, el hidrogel se extrajo mediante un corte en la jeringa y empujando con el propio émbolo. Este se dejó en un vidrio de reloj y se metió en una estufa durante 24 horas para que perdiera parte del agua y, posteriormente, poder introducirlo en una cubeta desechable con objeto de caracterizarlo correctamente.

4.4.2.4 Inmovilización de AuNPs y AuNRs en hidrogeles (plataformas AuNP@hidrogel y AuNR@hidrogel)

Para la síntesis de la plataforma fototérmica basada en hidrogeles (AuNP@hidrogel) se probó como primera estrategia la preparación y posterior deshidratación de un hidrogel hasta obtener un xerogel, que luego fue hinchado con una disolución de AuNPs. Sin embargo, este método indujo la precipitación de las AuNPs, por lo que se diseñó una segunda alternativa que consistió en introducir las AuNPs, recubiertas de PVP desde el inicio, junto con los precursores, es decir, se cambió el mililitro de agua MQ por 1 ml de una disolución de AuNPs. De esta forma el hidrogel se formó con las nanopartículas dentro. La *Ilustración 7b* muestra una imagen de la plataforma obtenida.

Siguiendo el mismo protocolo que para la plataforma AuNP@hidrogel, se inmovilizaron nanorods recubiertos de PVP, obteniéndose la plataforma AuNR@hidrogel (*Ilustración 7d*).

4.5 Síntesis de una plataforma fotobioactiva (AuNP@sol-gel@Lac)

4.5.1 ¿Qué es la lacasa?

Como enzima modelo para la fabricación de la plataforma bioactiva se seleccionó la lacasa. Se trata de una enzima oxidoreductasa multicobre capaz de catalizar la oxidación de compuestos fenólicos y aromáticos, utilizando oxígeno molecular como aceptor final de electrones, generando agua como único subproducto. Esta enzima destaca por su capacidad de oxidar sustratos cromogénicos como la siringaldicina, lo que la convierte en una herramienta muy útil para estudios de actividad enzimática[31]. Además, es capaz de catalizar de forma eficiente la degradación de fármacos, contaminantes emergentes y una amplia variedad de compuestos xenobióticos, desempeñando un papel relevante en estrategias de biorremediación ambiental.

4.5.2 Inmovilización de la lacasa y ensayo de actividad en sol-gel

La lacasa procedente de *Trametes versicolor*, la siringaldicina y resto de reactivos que fueron empleados se adquirieron en Sigma-Aldrich. Se empleó tampón acetato de sodio 50 mM a pH 6 como medio de reacción. El Stock de la siringaldicina se preparó a una concentración de 420 μ M.

La lacasa se incorporó a la matriz sol-gel durante la formación del monolito, como se menciona en el apartado 4.4.1, obteniéndose una concentración final de 1 mg/ml. En concreto, se preparó una disolución de lacasa y AuNPs sintetizadas recubiertas de PVP, a la que se le añadió un volumen equivalente de TEOS rotado, lo que inició la gelificación y obtención del monolito. Para este estudio, se prepararon 6 monolitos con lacasa y nanopartículas inmovilizadas: 3 destinados al ensayo a temperatura ambiente y otros 3 para el ensayo bajo irradiación láser. Cada ensayo se llevó a cabo preparando un volumen final de 3 ml, compuestos por: 1,4 ml pertenecientes al propio monolito con la lacasa y el oro, 300 μ L de disolución de siringaldicina con una concentración final de 42 μ M y 1,3 ml de tampón acetato de sodio. El seguimiento de la actividad se llevó a cabo recogiendo el espectro de la siringaldicina oxidada cuyo máximo se localiza alrededor de 535 nm.

4.6. Caracterización de tamaño, carga y morfología

4.6.1 Técnicas de Dispersión de Luz Dinámica

Para la caracterización del tamaño y el potencial Z de las AuNPs, se utilizó la técnica de Dispersión de Luz Dinámica (DLS por sus siglas en inglés) empleando un Malvern Zetasizer Nano-ZS (*Ilustración 8*) equipado con un láser monocromático de Helio-Neon 4 mW como fuente de luz. Las medidas del tamaño de las partículas se realizaron con un ángulo de dispersión de 173° , analizando las fluctuaciones del patrón de luz generadas por el movimiento browniano de las partículas suspendidas en la muestra.

Este movimiento produce variaciones en el patrón de dispersión de la luz que dependen del tamaño de cada partícula. Las partículas de menor tamaño tienen una velocidad mayor y generan una mayor tasa de fluctuación en el patrón de luz. Estas fluctuaciones son analizadas por un algoritmo aplicando la ecuación de Stokes-Einstein para determinar el tamaño de las partículas [32].



Ilustración 8. Equipo de DLS, modelo Malvern Zetasizer Nano-ZS.

El potencial Z (PZ) es una medida de la magnitud de la atracción o repulsión electrostática (o de carga) que existe en una solución coloidal y da información sobre la estabilidad coloidal de las partículas en disolución. El potencial Z también se midió utilizando el Zetasizer Nano-ZS. Este equipo calcula el potencial Z de las partículas a partir de la movilidad electroforética de las partículas, la cual se determina mediante la electroforesis láser Doppler. Aplicando la ecuación de Henry, que relaciona la movilidad de las partículas en un campo eléctrico con su potencial Z, el equipo es capaz de convertir esta movilidad en el potencial Z [33]. Para la caracterización de las AuNPs se partió de una disolución de 1 ml, sin embargo, la concentración nanopartículas dependía de que muestra fuera. Todas las muestras fueron medidas a 25°C y en cubetas desechables de poliestireno para la distribución de los tamaños. En cuanto al potencial Z, se midieron con cubetas Malvern DTS1070, equipadas con electrodos para la determinación del potencial Z.

4.6.2. Técnicas de microscopía electrónica

Para la obtención de las imágenes de microscopía electrónica, que informaban sobre la forma y tamaño de las nanopartículas, se utilizó el Microscopio Electrónico de Barrido de Campo (FESEM) en modo STEM (microscopio electrónico de transmisión de barrido) modelo SIGMA 300 VP de ZEISS (*Ilustración 9*). Es un instrumento capaz de proporcionar imágenes de la morfología externa de una muestra, permitiendo la observación y caracterización de materiales. Es necesario preparar la muestra a observar antes de introducirla en el microscopio. Para ello, se

utilizó una rejilla de cobre recubierta con una película de carbón 300-Mesh de Sigma-Aldrich. En esta rejilla se depositaron 3 μL de la muestra a analizar, es este caso AuNPs y se dejó secar en la estufa a 43°C durante 24 horas.



Ilustración 9. Microscopio electrónico de barrido de campo, Modelo SIGMA 300 VP de ZEISS.

4.7 Caracterización óptica y fototérmica

4.7.1 Espectroscopía de absorción

Para poder caracterizar la posición del plasmón de las AuNPs se utilizó la técnica de espectroscopía UV-Vis. Para ello, se transfirieron las muestras a cubetas desechables de 10 x 10 mm y se recogieron los espectros de absorción en un rango de 400 a 900 nm, utilizando un espectrofotómetro Shimadzu UV-2700. Todas las mediciones se realizaron a temperatura ambiente.

4.7.2 Conversión fototérmica

Las propiedades fototérmicas de las disoluciones de AuNPs, AuNRs y de las plataformas AuNP@hidrogel y AuNP@sol-gel se caracterizaron midiendo el incremento de temperatura del entorno en función del tiempo de irradiación, utilizando tanto un láser de diodo de 520 nm como uno de 808 nm (PSU-H LED de CNI Laser). También se tomaron medidas en ausencia de nanopartículas. Estos experimentos se realizaron en cubetas desechables, a las que se les añadió bien la disolución (1 ml de muestra) o bien las plataformas. Dichas muestras se irradiaron durante 5 minutos a una potencia de 1200 mW en ambos láseres. Además, se registraban los datos de temperatura cada 5 segundos utilizando una sonda introducida ya sea en la disolución como en las matrices. La *Ilustración 10* muestra una imagen del sistema de irradiación, que fue puesto a punto en el laboratorio y optimizado para maximizar el calor generado en los diferentes materiales, tras la irradiación.

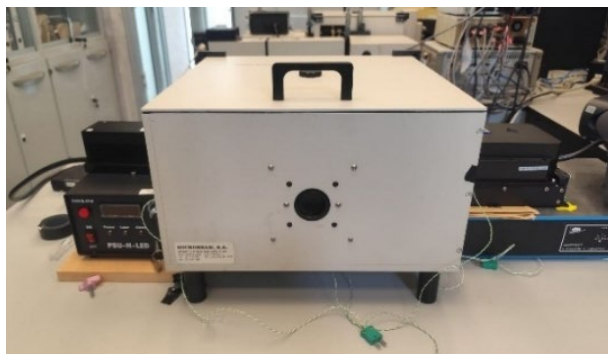


Ilustración 10. Equipo de caracterización fototérmica, ensamblado en el laboratorio, compuesto de dos láseres a 520 nm (derecha) y 808 nm (izquierda) acoplados a sus respectivos portamuestras y conectados a un medidor de temperatura LOG210 mediante sondas (cables blancos y verdes). Los componentes del sistema se esquematizan en la ilustración 11.

4.7.2.1 Metodología de irradiación

En la *Ilustración 11* se muestra de forma gráfica la metodología que se siguió durante la irradiación las diferentes muestras. Se utilizó el mismo protocolo tanto en disolución como en sol-gel e hidrogel, con la única diferencia que, en estos últimos, era necesario hacer unas hendiduras para poder introducir la sonda en el interior del monolito. En el caso del sol-gel, para hacer la hendidura se utilizó el prototipo descrito más adelante en el apartado 4.7.2.3, y en el caso de los hidrogeles con la aguja de una jeringa.

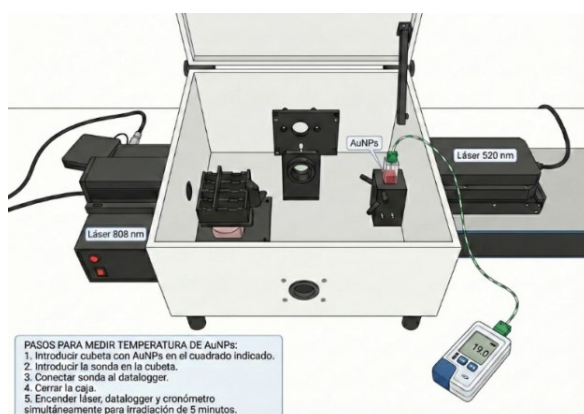


Ilustración 11. Esquema de la metodología de irradiación.

Como se indica en la parte inferior izquierda de la *Ilustración 11*, el protocolo de irradiación está formado por diferentes pasos: colocar la cubeta donde indica la imagen en el caso de irradiar a 520 nm o colocarla en el soporte de la izquierda en el caso de irradiar a 808 nm; se introduce la sonda en el interior de la cubeta para poder medir la temperatura; se conecta la sonda al data logger (LOG210), descrito en el siguiente apartado; se cierra la caja y, finalmente, se encienden simultáneamente el láser a utilizar, el data logger y el cronómetro. Una vez terminado el tiempo de irradiación, la información de todas las medidas queda registrada en el data logger. Este se introduce vía USB al ordenador para extraer todos los datos y poder procesarlos.

4.7.2.2 LOG210 Data logger

La monitorización de la temperatura durante los experimentos de irradiación láser se realizó mediante un registrador de temperatura LOG210 (Data logger). Este dispositivo permitió registrar de manera continua la variación de temperatura del sistema a lo largo de los ciclos de irradiación, garantizando un control riguroso y preciso del incremento de temperatura en las muestras.

Para realizar la medición de la temperatura, fue necesario utilizar sondas como las que se muestran en la *Ilustración 10* (cables blanco y verde). El extremo correspondiente a los pines se conectaba al dispositivo LOG210, mientras que el otro extremo se introducía en las muestras.

4.7.2.3 Prototipo adaptado para caracterización fototérmica de las plataformas

Para caracterizar la respuesta fototérmica de la plataforma AuNP@sol-gel fue necesario hacer una hendidura cilíndrica en las matrices, de forma que se pudiera introducir en ellas la sonda de temperatura. Estas hendiduras no se podían hacer una vez polimerizado el material, debido a que la mayoría de los geles se rompían o eran demasiado sólidos para poder perforarlos. Para ello, se hizo un prototipo que permitió hacer hendiduras en varias

matrices simultáneamente (*Ilustración 12*). Este prototipo permitía hacer la hendidura hasta en 5 matrices simultáneamente, mientras polimerizaban. Ello supuso un gran avance en cuanto a la eficiencia y gestión de tiempo, además de resultados más homogéneos y reproducibles.

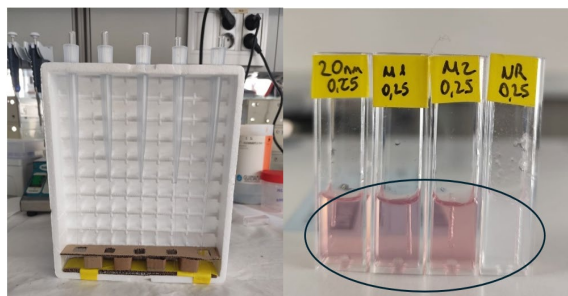


Ilustración 12. A la izquierda se muestra el prototipo soporte adaptado para apertura de hendidura para sol-gel. A la derecha, las imágenes de las matrices una vez hechas las hendiduras.

El soporte de este prototipo está hecho de poliestireno, que proviene de caja de cubetas desechables. También fue necesario la utilización de 5 puntas de pipeta de 5 ml y de 5 pipetas pasteur, que eran las que se introducían dentro de las cubetas para poder hacer la hendidura en las matrices. En cuanto a la parte baja, se hizo un soporte de cartón con el hueco preciso para que quepa una cubeta y se quede inmovilizada. Para su utilización, se colocaban las cubetas con las matrices a polimerizar en los recuadros abiertos del soporte de cartón. Seguidamente, con las pipetas, que se introducían desde la parte superior, por el interior de las puntas de pipeta, se acomodaban hasta alcanzar la altura y posición deseada de la pipeta de vidrio en el interior de estas matrices (*Ilustración 12*).

5. Resultados y Discusión

Se presentan los Resultados y Discusión al mismo tiempo porque se considera que así se facilita el seguimiento del trabajo.

5.1 Caracterización de las AuNPs en disolución

En la parte inicial de este TFG se comenzó con la caracterización de las AuNPs tanto comerciales como sintetizadas en el laboratorio. En concreto, se caracterizaron AuNPs comerciales con diámetros de 10, 20, 30, 40 50 y 80 nm, que se identifican como AuNPs_10, AuNPs_20, AuNPs_30, AuNPs_40, AuNPs_50 y AuNPs_80, respectivamente. También se caracterizaron las AuNPs sintetizadas en el laboratorio (AuNPs_MT), tanto en ausencia como en presencia de dos concentraciones distintas de PVP: 1 mg/ml y 4 mg/ml (AuNPs_MT_1_PVP y AuNPs_MT_4_PVP, respectivamente) y los nanorods comerciales (AuNRs). Primeramente, se comenzó caracterizando todas las nanopartículas en disolución para, así seleccionar las más adecuadas para su inmovilización en hidrogeles y matrices sol-gel. La caracterización de las AuNPs en disolución consistió en: la medida de tamaño, dispersión y potencial Z mediante técnicas de DLS; medida y localización del plasmón a partir de su espectro de absorción; determinación de la morfología mediante microscopía electrónica y, por último, evaluación de sus propiedades fototérmicas.

5.1.1 Índice de Polidispersión, Tamaño y Potencial Z

Los datos del tamaño de las AuNPs y AuNRs, concretamente el diámetro hidrodinámico, el índice de polidispersión y el potencial Z se recogen en la *Tabla 3*. También se incluye el valor del “Z average”, que es el diámetro hidrodinámico medio, ponderado por intensidad del conjunto de nanopartículas.

Tabla 3. Índice de polidispersión (Pdl), diámetro hidrodinámico (d), potencial Z (PZ), Z average y localización de la longitud de onda máxima del plasmón de las diferentes nanopartículas de oro utilizadas en este estudio.

AuNPs	Pdl	d				PZ	Z Average	Pico máx
		Pico 1 ± sd (nm)	%	Pico 2 ± sd (nm)	%	Pico ± sd (mV)	Pico ± sd (mV)	λ (nm)
AuNPs_10	0,266	14,90 ± 0,16	90,5	1208 ± 781	9,5	-34,20 ± 1,35	15,00 ± 0,20	519
AuNPs_20	0,088	27,92 ± 0,37	100	--	--	-38,60 ± 2,25	27,92 ± 0,37	520
AuNPs_30	0,098	49,69 ± 0,72	100	--	--	-32,60 ± 2,60	44,65 ± 0,35	527
AuNPs_40	0,108	55,73 ± 0,59	100	--	--	-43,50 ± 1,45	49,57 ± 0,39	529
AuNPs_50	0,07	69,45 ± 0,67	100	--	--	-36,40 ± 0,20	63,56 ± 0,40	533
AuNPs_80	0,075	96,23 ± 0,67	100	--	--	-45,20 ± 0,74	88,06 ± 0,20	554 - 551
AuNRs	0,625	78,06 ± 6,86	58,4	2,352 ± 0,003	41,6	64,80 ± 2,32	12,27 ± 0,74	798 - 795
AuNPs_MT	0,355	17,92 ± 0,42	83	178,90 ± 29,27	17	-37,90 ± 3,10	19,40 ± 0,42	524 - 522
AuNPs_MT_1_PVP	0,326	43,57 ± 0,97	100	--	--	-8,68 ± 0,41	34,19 ± 0,51	524 - 522
AuNPs_MT_4_PVP	0,292	41,93 ± 0,82	100	--	--	-9,37 ± 0,79	34,13 ± 0,47	524 - 522

Respecto al tamaño hidrodinámico de las AuNPs comerciales, obtenemos unos resultados esperables, exceptuando las AuNPs_10 que tienen una pequeña agregación que nos muestra un 9,5% de partículas de 1208 nm, aunque esto puede ser debido a alguna impureza que se encontrara en la cubeta. A modo de observación, todas estas NPs comerciales tenía un tamaño un poco mayor que el que se indicaba de fábrica. En cuanto a los AuNRs, aparentemente, se obtuvieron dos poblaciones de diferentes tamaños, sin embargo, esto se explica debido a su anisotropía. Al tener forma cilíndrica, una de las poblaciones corresponde a la base (~ 2,3 nm) y otra de las poblaciones a la altura del cilindro (~ 78 nm). Por otro lado, en las NPs que fueron sintetizadas por el método de Turkevich (AuNPs_MT) se puede observar que hay una pequeña población del 17% que agregó al someterse a estas pruebas.

Dado que las AuNPs_MT se sintetizan en agua, se comprobó como afectaba la presencia de tampón fosfato a su estabilidad. El estudio no se hizo necesario con las AuNPs comerciales, al encontrarse ya disueltas en tampón. Para ello, se añadió TP directamente a una disolución de AuNPs_MT. Como se puede ver en la *Ilustración 13*, la adición del tampón indujo la agregación de las nanopartículas, que se hizo visible por el cambio de color ocurrido unos pocos minutos después de ser añadido.

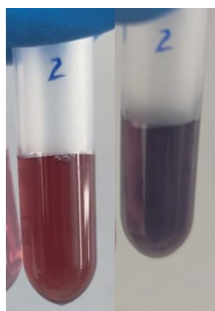


Ilustración 13. Estado de AuNPs_MT después de 20 minutos en disolución con TP 50 mM. A la izquierda se muestra la disolución a tiempo = 0 y a la derecha la disolución a tiempo = 20 minutos.

Con objeto de estabilizar estas nanopartículas se decidió recubrirlas con PVP, a una concentración 1 mg/ml, como se describe en Materiales y Métodos, dando resultados satisfactorios. El recubrimiento con PVP aumentó, como era de esperar, el tamaño hidrodinámico de las AuNPs, pero a su vez, conseguimos eliminar las poblaciones agregadas (*Tabla 3*). Por otro lado, los resultados de potencial Z fueron también los esperados. Todas las AuNPs dieron un potencial negativo inferior a -25 mV, como consecuencia de la estabilización con citrato, lo que indicaba estabilidad coloidal, a excepción de los AuNRs, que dan carga positiva por su método de síntesis con CTAB. Por lo que se refiere a las AuNPs_MT con PVP, se puede comprobar que su carga baja con respecto a las que no lo llevan. Esto es debido a que al recubrir las nanopartículas con PVP estamos cambiando la estabilidad electrostática por la estabilidad estérica, es decir, ahora las NPs tienen una capa polimérica que provoca repulsiones estéricas que impiden que se acerquen unas a otras. Por este motivo, aunque el PZ baje, las AuNPs siguen siendo estables. Por último, respecto a los valores del índice de polidispersión (Pdl), que corresponden a cuánto de monodispersa o polidispersa está nuestra muestra, podemos decir que la mayoría obtuvieron buenos resultados. AuNPs_10 tuvo un resultado más elevado de lo que cabría esperar por el pequeño porcentaje de la segunda población que fue detectado. En cuanto a los AuNRs, era esperable que su Pdl fuera alto por su forma anisotrópica y, finalmente, los resultados de las AuNPs sintetizadas fueron un tanto altos, aunque aceptables.

5.1.2 Determinación de la banda plasmónica

Para determinar la posición de la banda plasmónica de las AuNPs y AuNRs se recogió su espectro de absorción desde los 400 hasta los 900 nm (*Ilustración 14*). Las diferentes muestras se prepararon de manera que los máximos de sus espectros tuvieran una absorbancia próxima a 1. Los espectros obtenidos sugieren cierta homogeneidad y monodispersión en cuanto al tamaño de las poblaciones de las AuNPs (con un pico relativamente estrecho) y el máximo de absorción de estas, cercano a los 525 nm, propio de las AuNPs esféricas y con una tendencia a desplazarse hacia el rojo conforme aumenta el diámetro de la nanopartícula. En la última columna de la tabla 3 se puede ver mejor este efecto, desplazándose los máximos desde 519 nm en las AuNPs_10, hasta 554 en las AuNPs_80.

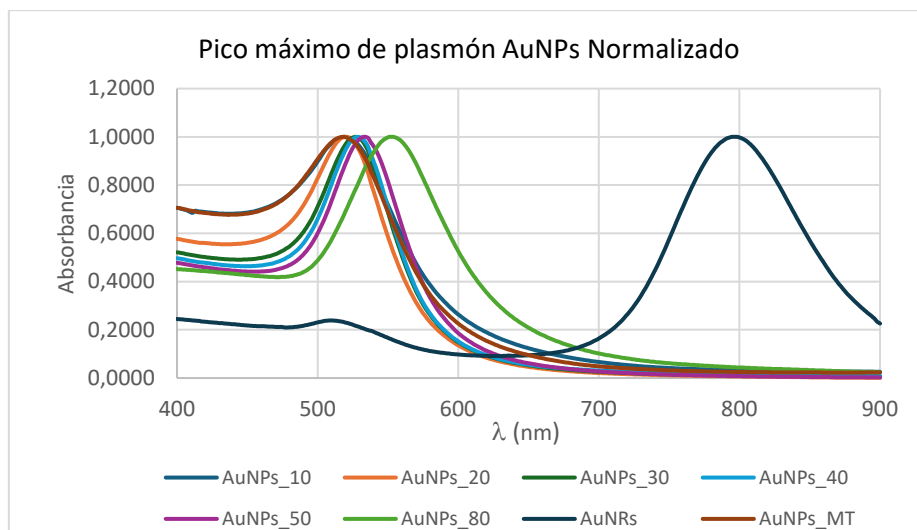


Ilustración 14. Espectros de absorción de distintas AuNPs y AuNRs.

En cuanto al espectro de absorción de los AuNRs, se observó la presencia de dos bandas de absorción, una de mayor intensidad situada en el infrarrojo cercano, cerca de 800 nm, la cual se asocia a la banda de plasmón longitudinal de los AuNRs. La segunda banda, de menor absorción, se situó alrededor de los 520 nm y se asocia a la banda transversal de estos. Por otro lado, hay que comentar que la adición de PVP no modificó el espectro de absorción de las AuNPs_MT (Ilustración 15).

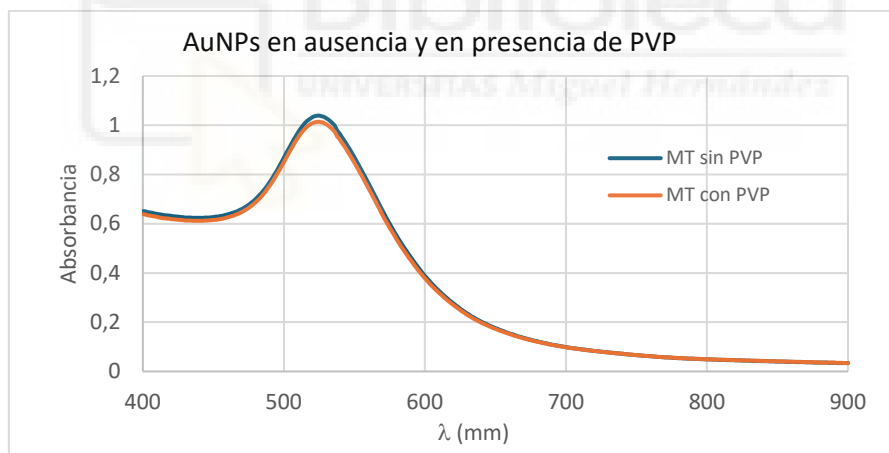


Ilustración 15. Espectro de absorción de las nanopartículas en ausencia (AuNPs_MT, línea negra) y presencia de PVP (AuNPs_MT_1_PVP, línea roja).

Una de las propiedades más relevantes de las nanopartículas de oro son sus características ópticas, las cuales dependen, entre otros factores, de su tamaño y de la longitud de onda máxima de absorción. Como se comentó en la introducción, las AuNPs esféricas presentan diferentes tonalidades de un rojo oscuro característico. Sin embargo, cuando las NPs presentan una morfología anisotrópica, se modifica la relación entre su longitud de onda y su anchura, dando lugar a cambios en su interacción con la radiación electromagnética. Como consecuencia, las disoluciones adquieren tonalidades diferentes, como ocurre en el caso de los AuNRs (ver Ilustración 3, en el apartado de Materiales y Métodos).

5.1.3 Caracterización de morfología

La morfología de las AuNPs y de los AuNRs se pudo ver claramente a partir de las imágenes obtenidas mediante el empleo del FESEM en modo STEM (*Ilustración 16*). Esto también nos proporcionó más información acerca de su tamaño y de la heterogeneidad poblacional de las NPs. En este caso, cabe destacar que no fue necesario el uso de tinciones a las muestras, ya que las AuNPs ejercieron la función de contraste de fase.

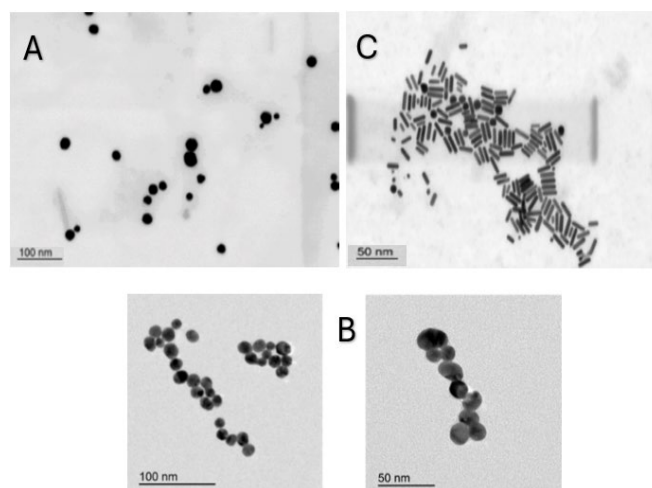


Ilustración 16. Imágenes obtenidas mediante FESEM en modo STEM de algunas de las nanopartículas utilizadas en este trabajo: A) AuNPs_30 nm, B) AuNPs_MT, C) AuNRs.

Gracias a la obtención de estas fotografías, se pudo corroborar por un lado que las AuNPs con las que se han trabajado eran de forma esférica, tal y como sugerían los espectros de absorción y el color de las disoluciones y, por otro lado, que los nanorods tenían efectivamente una geometría cilíndrica.

Además, se ha de tener en cuenta que los valores de diámetro hidrodinámico proporcionados por la técnica de DLS suelen ser más elevados que los observados en el FESEM, debido a que la dispersión dinámica de la luz también tiene en cuenta otros factores (además del tamaño) como son el entorno de la NP, o la conductividad eléctrica del fluido que la contiene.

5.1.4 Caracterización de la conversión fototérmica

Para concluir con la caracterización de las AuNPs y AuNRs en disolución, se probó la capacidad de conversión fototérmica de todas las nanopartículas mencionadas anteriormente, utilizando el equipo descrito en el apartado 4.7.2. Con objeto de seleccionar el tiempo de irradiación más adecuado para llevar a cabo este estudio, se preparó una cubeta con una disolución de AuNPs_20, a una concentración tal que su absorbancia a 520 nm era 0,25, y se colocó en el portamuestras junto a una sonda de temperatura. A continuación, se irradió con el diodo láser de 520 nm y se midió el incremento de temperatura en función del tiempo de irradiación (*Ilustración 17*). Los resultados indican que el incremento de temperatura es muy rápido durante los primeros minutos de irradiación, alcanzando la mayor parte del aumento térmico antes de los 300 s (5 minutos). A partir de ese punto, la pendiente de la curva disminuye notablemente y el sistema comienza a aproximarse a la meseta térmica. Por tanto, para la elaboración de este trabajo, se seleccionó el tiempo de 5 minutos como tiempo de irradiación de todas las muestras. Esto nos permitió alcanzar un incremento elevado y significativo de la temperatura, evitar exposiciones

prolongadas que apenas aportan un aumento térmico significativo y, por lo tanto, reducir el estrés térmico, especialmente relevante cuando se trabaja con enzimas porque su actividad puede verse comprometida.

Otra característica a comentar de esta cinética de calentamiento es que el sistema tiene capacidad de seguir aumentando la temperatura en el caso de que fuera necesario. Ya que cambiando el tiempo de irradiación o regulando la potencia del láser, se podría adaptar según sea necesario.

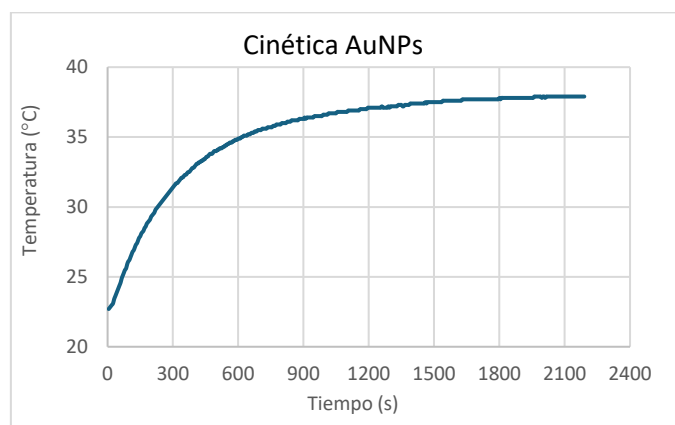


Ilustración 17. Cinética de calentamiento de AuNPs_20 bajo irradiación del láser de 520 nm.

Por otro lado, se hizo un experimento para comprobar si las AuNPs tras ser irradiadas durante 5 minutos y mantener apagado el láser otros 5, con el consiguiente enfriamiento de la muestra, volvían a dar la misma respuesta fototérmica al irradiarse de nuevo. Este experimento se llevó a cabo con AuNPs_20 y consistió en hacer cuatro ciclos de apagado y encendido del láser, midiendo el cambio de temperatura durante todo el experimento (*Ilustración 18*).

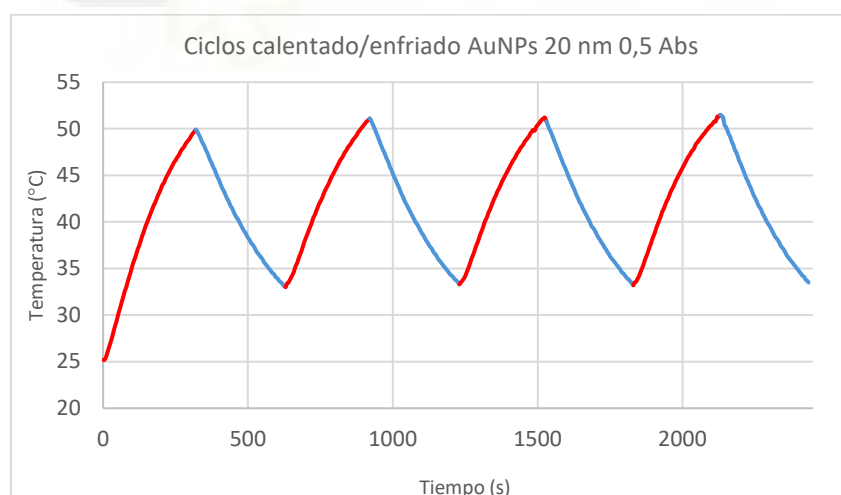


Ilustración 18. Gráfica que muestra 4 ciclos de calentado y enfriado de 5 minutos cada uno.

Los resultados muestran que la variación de temperatura fue similar en los cuatro ciclos, indicando que las AuNPs tienen una gran estabilidad fototérmica, ya que no se degradan y tampoco agregan, ni se producen cambios en el tamaño o morfología. Que esto no ocurra evidencia que el LSPR se mantiene estable, no hay desplazamientos significativos del plasmón ni tampoco hay pérdida de eficiencia de absorción. Esto nos indica que la irradiación

de estas nanopartículas es fiable y reproducible. Tras comprobar la estabilidad fototérmica de las AuNPs y seleccionar el tiempo de irradiación a 5 minutos, se caracterizaron las respuestas fototérmicas de los diferentes tipos de nanopartículas, con excepción de AuNPs_MT, que en ausencia de PVP agregaron con el aumento de temperatura. Por ello, a partir de ese momento, todos los experimentos llevados a cabo con las nanopartículas sintetizadas se hicieron en presencia de PVP. Los resultados obtenidos con el láser de 520 nm se muestran en la gráfica de la *Ilustración 19*, donde se representa el incremento de temperatura (diferencia entre temperatura final alcanzada y temperatura inicial) para cada nanopartícula transcurridos los 5 minutos de irradiación.

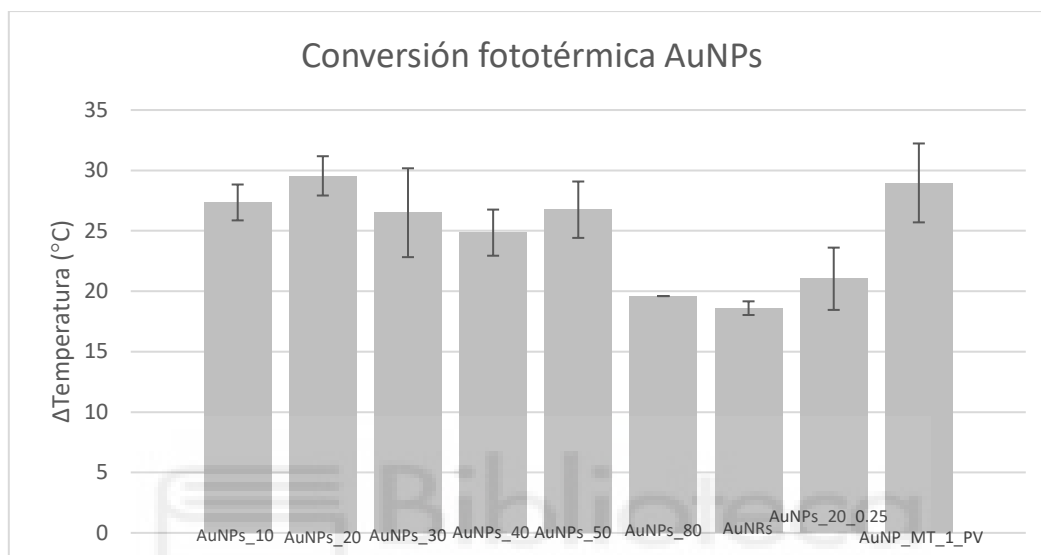


Ilustración 19. Gráfica de barras que muestra la conversión fototérmica de las diferentes nanopartículas en disolución, tras ser irradiadas a 520 nm durante 5 minutos. Las muestras tienen una absorbancia de ~1 en su máximo, excepto la muestra "AuNPs_20_0,25" que se encuentra a 0,25 de absorbancia. Las barras de error indican la variabilidad entre duplicados.

Como se puede observar, casi todas las muestras superan un incremento de temperatura de 20°C. Sin embargo, hay 2 muestras en concreto que dan muy buenos resultados, que son AuNPs_MT_1_PVP, y las AuNPs_20, lo cual tiene mucho sentido, porque si nos fijamos en la *Tabla 3* podemos ver que su máximo de absorción coincide a la perfección con la longitud de onda de emisión del láser (520 nm). Hay que añadir que las AuNPs de 10 nm también cumplen con esta condición, pero al tener un pequeño porcentaje agregado no consigue calentar tanto. Teniendo en cuenta estos resultados, decidimos seguir trabajando únicamente con las AuNPs_20 y AuNPs_MT_1_PVP, sin descartar los AuNRs que serán caracterizados posteriormente utilizando el láser de 808 nm, coincidiendo con el máximo de su plasmón.

A continuación, se exploró qué concentración de AuNPs era más eficiente en relación $[AuNP]/\Delta T$. Para ello, se hizo un experimento preparando un triplicado en disolución de tres concentraciones diferentes de AuNPs_MT_1_PVP y se irradiaron en el láser de 520 nm. Las concentraciones que se utilizaron fueron medidas en unidades de absorbancia a 520 nm y fueron las siguientes: 1; 0,5 y 0,25. (*Ilustración 20*).

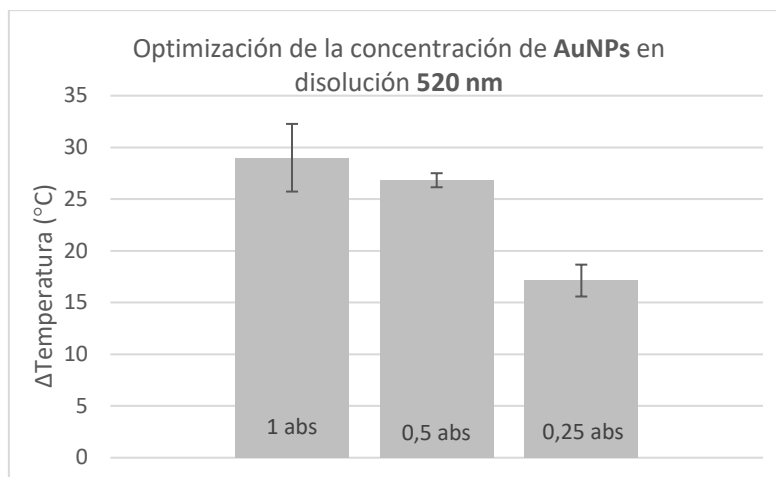


Ilustración 20. Gráfica de barras que muestra la conversión fototérmica de AuNPS_MT_1_PVP en función de la concentración, tras ser irradiadas 5 minutos a 520 nm. Las barras de error indican la variabilidad entre replicados (n = 4).

Este resultado muestra que al aumentar la cantidad de AuNPs la respuesta fototérmica es mayor, aunque no sigue un comportamiento lineal y la concentración no es proporcional a la cantidad de NPs en disolución. Por ello, se decidió que la concentración óptima para seguir con los experimentos fuera la correspondiente a 0,5 de absorbancia. Esto permitió tener un balance correcto entre la cantidad de nanopartículas utilizadas y el incremento de temperatura obtenido.

En cuanto al estudio con el láser de 808 nm, se realizó exclusivamente con los AuNRs, ya que, como se mostró en la *Ilustración 14*, eran las únicas nanopartículas que presentaban una banda plasmónica en dicha región espectral. La *Ilustración 21* muestra el grado de conversión fototérmica de estos AuNRs a diferentes concentraciones (medidos en unidades de absorbancia a 808 nm). Como era de esperar, dado el espectro de los AuNRs mostrado en la *Ilustración 24*, el aumento de temperatura fue superior al obtenido al irradiar a 520 nm, donde la banda de absorción, correspondiente a la banda transversal de los nanorods, presenta una intensidad mucho más moderada. Por otro lado, el efecto de la concentración fue muy similar al obtenido para las AuNPs a 520 nm y, por tanto, también se seleccionó como concentración óptima la de 0,5 de absorbancia.

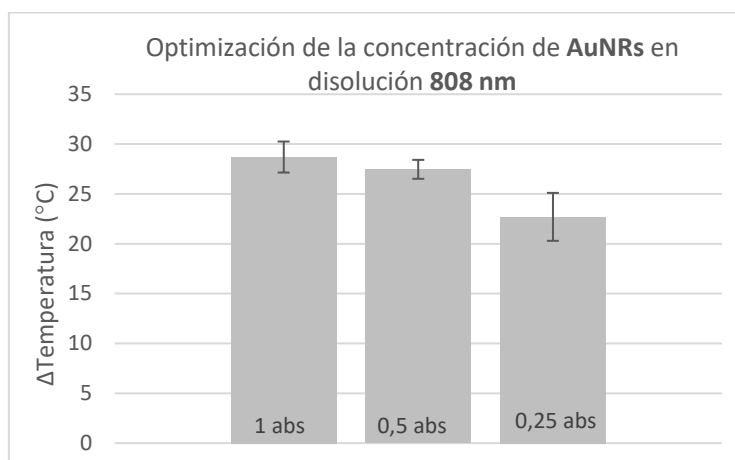


Ilustración 21. Gráfica de barras que muestra la conversión fototérmica de AuNRs en función de la concentración, tras ser irradiadas a 808 nm durante 5 minutos. Las barras de error indican la variabilidad entre replicados (n = 3).

5.2 Inmovilización y caracterización de AuNPs y AuNRs en Sol-gel (plataforma AuNP@sol-gel y AuNR@sol-gel)

Una vez caracterizadas las nanopartículas de oro en disolución, se evaluó su comportamiento tras su incorporación en matrices sol-gel. La incorporación se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito en Materiales y Métodos (apartado 4.4.1.2) y las plataformas obtenidas mostraron un color rojizo y homogéneo, en el caso de las AuNPs y un color rosa muy tenue en el caso de las AuNRs (*Ilustración 22*). Para la inmovilización de las nanopartículas se partió de las disoluciones de AuNPs y AuNRs que presentaban una absorbancia de 1 en sus máximos, de forma que en la matriz la concentración final tuviera una absorbancia de 0,5, para poder comparar los resultados con los obtenidos en disolución. Esta etapa permitió analizar cómo la inmovilización en una red sólida afecta a sus propiedades ópticas, estabilidad coloidal, conversión fototérmica, así como comprobar si las nanopartículas conservan su funcionalidad dentro del material híbrido.

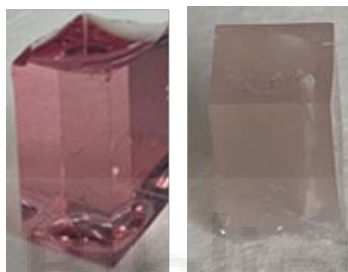


Ilustración 22. Imagen correspondiente a las plataformas AuNP@sol-gel (izquierda) y AuNR@sol-gel (derecha).

5.2.1 Determinación de la banda plasmónica

Previamente al análisis de la conversión fototérmica, se compararon los espectros UV-Vis normalizados de las AuNPs en disolución y de las plataformas AuNP@sol-gel, que se fabricaron utilizando tanto AuNPs_20 como AuNPs_MT_1_PVP (*Ilustración 23*). Esta comparación permite evaluar posibles modificaciones en la posición de la banda del plasmón superficial como consecuencia de la inmovilización de las nanopartículas en la red sólida.

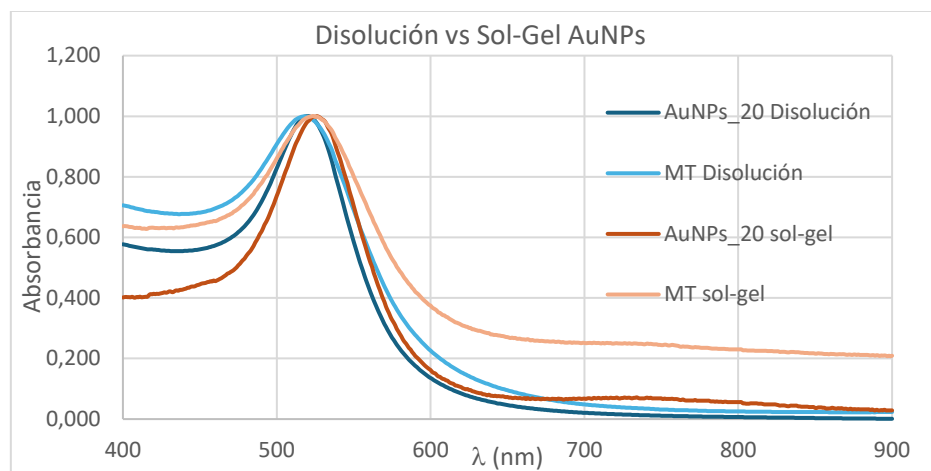


Ilustración 23. Espectros de absorción normalizados de AuNPs en disolución y sol-gel.

De la misma manera, se compararon los espectros UV-Vis normalizados de los AuNRs en disolución y de la plataforma AuNR@sol-gel, que fue fabricada siguiendo el mismo protocolo que la plataforma AuNP@sol-gel (*Ilustración 24*).

Como se observa en las *Ilustraciones 23 y 24*, la posición del LSPR se mantiene prácticamente invariable, con una diferencia de tan solo 1-5 nm y 5-10 nm, respectivamente, tras la incorporación en la matriz sol-gel. Esto indica que las propiedades ópticas de las nanopartículas no se ven alteradas de forma apreciable por su integración en la matriz.

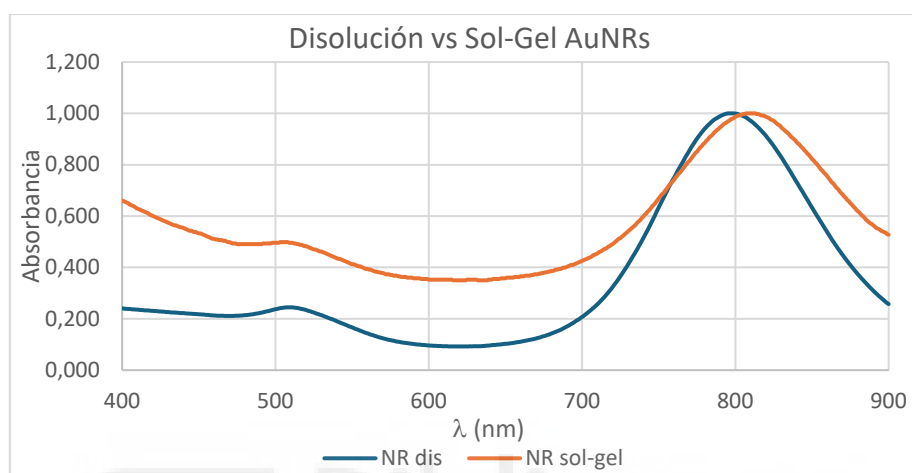


Ilustración 24. Espectros de absorción normalizados de AuNRs en disolución y sol-gel.

La conservación de la LSPR resulta especialmente relevante, ya que esta banda es la responsable directa de la absorción de radiación y, por tanto, del posterior efecto fototérmico de las nanopartículas.

5.2.2 Caracterización de la conversión fototérmica

Una vez verificada la conservación de la LSPR tras la incorporación en la matriz sol-gel, se procedió al estudio de su capacidad de conversión fototérmica en este entorno. En este apartado se presentan los resultados obtenidos para las AuNP_20, AuNPs_MT_1_PVP y AuNRs, evaluando su respuesta frente a la irradiación láser a 520 y 808 nm.

5.2.2.1 Conversión fototérmica mediante irradiación con láser a 520 nm

Se comenzó analizando la respuesta fototérmica de las NPs en el láser de 520 nm. Los resultados obtenidos en la *Ilustración 25* muestran que las AuNPs conservan una elevada capacidad de conversión fototérmica, indicando que la matriz no impide la absorción de la radiación ni la posterior disipación de la energía en forma de calor. Esto sugiere que las propiedades ópticas responsables del efecto fototérmico se mantienen tras la inmovilización de las AuNPs, tanto en el caso de las sintetizadas como de las comerciales, confirmando la idoneidad del sistema sol-gel como plataforma para distintas aplicaciones. En contraste, los AuNRs presentan un rendimiento fototérmico relativamente bajo a esta longitud de onda de irradiación. Esto se debe, como se comentó anteriormente, a que su banda de plasmones longitudinal, responsable de la mayor absorción de energía y del calentamiento eficiente, se encuentra desplazada hacia el infrarrojo cercano (NIR), mientras que su banda transversal, ubicada en torno a

los 520 nm, absorbe significativamente menos radiación. Por tanto, se obtiene un calentamiento insuficiente comparable con el láser de 808 nm, como se describe en el siguiente apartado.

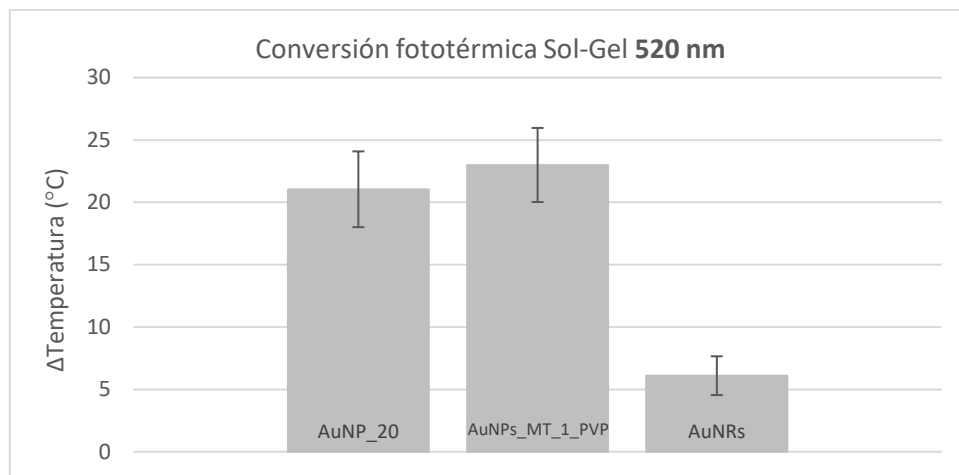


Ilustración 25. Gráfica de barras que muestra la conversión fototérmica a 520 nm de AuNPs_MT_1_PVP, AuNPs_20 y AuNRs inmovilizadas en matrices sol-gel. Las barras de error indican la variabilidad entre duplicados.

5.2.2.2 Conversión fototérmica mediante irradiación con láser a 808 nm

En este caso, decidimos irradiar con el láser de 808 nm tanto los AuNRs como las AuNPs, dado que estas últimas, como se muestra en la *Ilustración 23*, presentan una leve señal de absorbancia a 800 nm que podría ser consecuencia de una pequeña agregación ocurrida durante el proceso de inmovilización. Los resultados del experimento se muestran en la *Ilustración 26* y confirman que la inmovilización de los AuNRs, al igual que ocurría con las nanopartículas esféricas, no modifica sus propiedades fototérmicas.

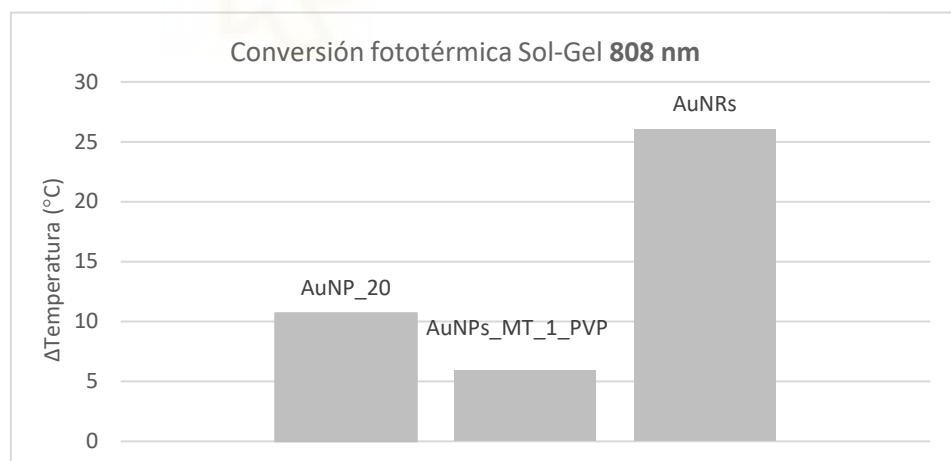


Ilustración 26. Gráfica de barras que muestra la conversión fototérmica a 808 nm de AuNPs_20, AuNPs_1_PVP y AuNRs inmovilizadas en matrices sol-gel.

El mayor incremento de temperatura observado en los AuNRs bajo la irradiación a 808 nm era esperado y se debe a la presencia de plasmones longitudinales, como se comentó en el apartado anterior. Por el contrario, las AuNPs apenas absorbieron la radiación a 808 nm, lo que explica su menor capacidad de conversión fototérmica en estas condiciones.

En conjunto, los resultados anteriores demuestran la capacidad de las plataformas AuNP@sol-gel y AuNR@sol-gel para actuar como sistemas fototérmicos eficientes, activables tanto en el visible (AuNP@sol-gel) como en el infrarrojo cercano (AuNR@sol-gel).

5.3 Inmovilización y caracterización de AuNPs y AuNRs en hidrogel (plataforma AuNP@hidrogel y AuNR@hidrogel)

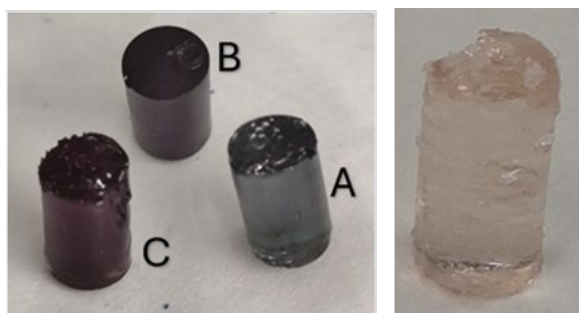
Las nanopartículas de oro también se inmovilizaron en hidrogeles orgánicos, como alternativa a los materiales sol-gel. El estudio se llevó a cabo con las nanopartículas sintetizadas en el laboratorio y como se obtuvieron buenos resultados, se descartó utilizar las nanopartículas comerciales, con excepción de los nanorods.

Como se describe en Materiales y Métodos, en un primer intento, las nanopartículas se añadieron durante el proceso de hinchamiento de un hidrogel que se había preparado y llevado a sequedad, hasta obtener un xerogel. La idea era que, aprovechando la capacidad de absorción del xerogel, este absorbiera toda la disolución hasta integrar en su red polimérica a las AuNPs. Sin embargo, aunque el agua penetró en el hidrogel, tanto las AuNPs como los AuNRs fueron excluidas de él, como se muestra en la *Ilustración 27*, quedándose en el fondo y paredes de la cubeta. Por ello, fue necesario abordar una segunda estrategia consistente en incorporar las nanopartículas desde el inicio del proceso de formación del hidrogel, es decir, directamente mezclándolas con los precursores, permitiendo que quedaran atrapadas en la red poliméricas durante la gelificación.



Ilustración 27. Imagen mostrando el estado de un hidrogel tras hincharse con una disolución de AuNPs (izquierda) y AuNRs (derecha).

Durante esta segunda estrategia, las AuNPs se incorporaron junto con los precursores del hidrogel, primero en ausencia de PVP, por si este polímero interfería en la formación del hidrogel. Sin embargo, se observó que al mezclarlas directamente con el precursor AETA las nanopartículas tendían a agregarse y el hidrogel resultante adquiría una tonalidad gris, aunque homogénea (*Ilustración 28A*). En consecuencia, fue necesario añadir PVP como agente estabilizante. Se añadió inicialmente PVP en la misma concentración que se utilizó en sol-gel (1 mg/ml), aunque esta cantidad no resultó suficiente para inhibir completamente la agregación, obteniéndose hidrogeles en tono morado (*Ilustración 28B*). Por este motivo, se decidió aumentar la concentración de PVP a 4 mg/ml. Esta concentración permitió mantener la mayoría de las nanopartículas dispersas, facilitando su correcta inmovilización dentro de la red polimérica durante el proceso de gelificación. El resultado final fue una plataforma cilíndrica, rojiza y homogénea (*Ilustración 28C*).



*Ilustración 28. Izquierda: Fotografía de hidrogeles híbridos obtenidos tras incorporar las AuNPs con distintas concentraciones de PVP: **A)** Sin PVP, **B)** 1 mg/ml de PVP (AuNP_MT_1_PVP), **C)** 4 mg/ml de PVP (AuNP_MT_4_PVP). Derecha: Fotografía correspondiente a la plataforma AuNR@hidrogel.*

5.3.1 Determinación de la banda plasmónica

Una vez lograda la inmovilización efectiva de las nanopartículas en el hidrogel se procedió a analizar si esta incorporación afectaba a sus propiedades ópticas. Para ello, se compararon los espectros UV-Vis de las nanopartículas en disolución con los obtenidos tras su integración en el hidrogel, prestando especial atención a la posición de la banda LSPR. Se utilizaron las AuNP_MT_4_PVP como muestra a comparar. Esto nos permite evaluar cómo el entorno del polímero influye en la interacción de las nanopartículas con la luz.

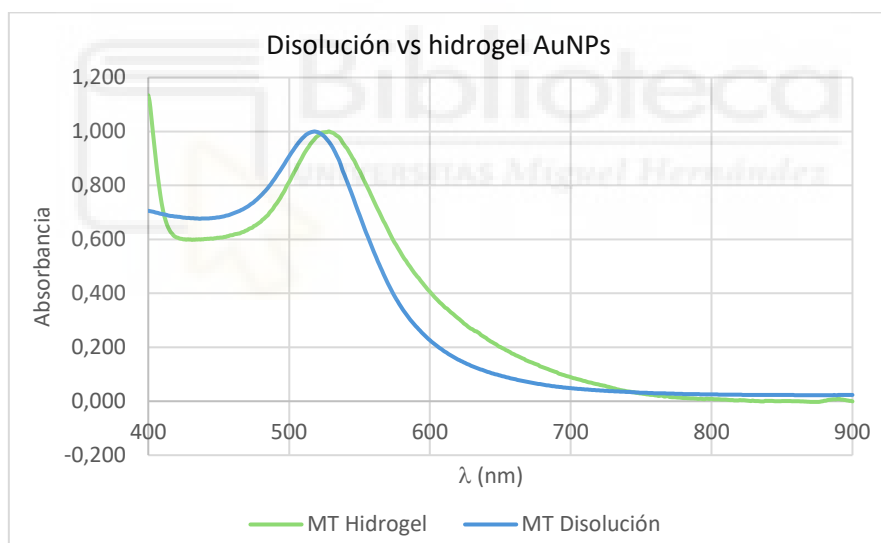


Ilustración 29. Espectros de absorción normalizados de las AuNP_MT_4_PVP en disolución (azul) y en hidrogel (verde).

Al comparar los espectros mostrados en la *Ilustración 29*, se observa que la posición de la banda LSPR en el hidrogel presenta un ligero desplazamiento hacia el rojo, de aproximadamente 10-15 nm, respecto a la observada en disolución. Este desplazamiento puede deberse al cambio en el índice de refracción del medio que rodea a las nanopartículas al pasar de un entorno líquido a una matriz polimérica más densa, lo que modifica las condiciones de resonancia sin que haya una alteración significativa de la integridad o estabilidad de las AuNPs. Sin embargo, no podemos descartar que el desplazamiento se deba a que, aun con una concentración de 4mg/mL de PVP, una mínima población de nanopartículas agregue.

Con objeto de conocer el plasmón a distintas concentraciones de PVP, se compararon los espectros de absorción de las nanopartículas en ausencia y en presencia de 1 y 4 mg/ml de PVP (*Ilustración 30*). Se observaron claramente diferencias en la forma, posición e intensidad de las bandas plasmónicas en función de la concentración del estabilizante. En ausencia de PVP, la señal plasmónica aparece más débil y desplazada hacia longitudes de onda mayores, con una banda ancha, casi plana. Esto muestra un estado de agregación elevado, donde la interacción entre nanopartículas genera acoplamiento plasmónico y desplazamiento claro hacia el infrarrojo cercano. En presencia de 1 mg/ml, la banda se define mejor y se observa una mayor intensidad, indicando una estabilización parcial del sistema. Sin embargo, el desplazamiento de la banda sugiere que aún existen poblaciones agregadas. En cambio, con una concentración de 4 mg/ml de PVP se observa claramente una banda más intensa y en su longitud de onda correspondiente (~ 520 nm), indicando una mayor dispersión individual de las partículas y un menor grado de agregación. La estabilización a esta concentración evita el acoplamiento plasmónico significativamente.

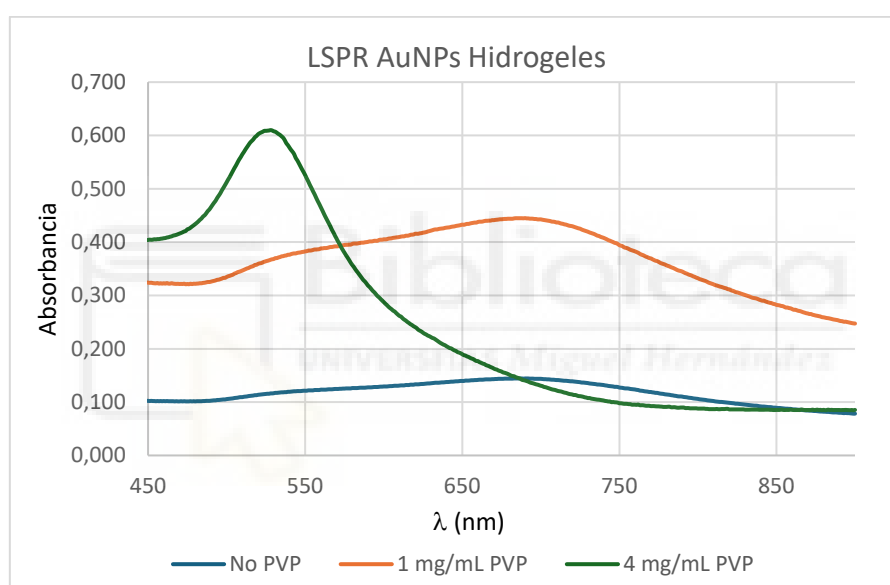


Ilustración 30. Espectros de absorción de AuNPs_MT@hidrogel a diferentes concentraciones de PVP.

Desde el punto de vista funcional, el grado de agregación influye directamente en las aplicaciones potenciales del sistema. Las AuNPs bien dispersas son muy adecuadas para aplicaciones que requieren estabilidad coloidal y con respuesta óptica reproducible, como biosensores o plataformas fototérmicas controladas. En cambio, AuNPs parcialmente agregadas pueden presentar absorción desplazada hacia el NIR, siendo una ventaja en aplicaciones fototérmicas donde se busca mayor absorción en esas longitudes de onda. Sin embargo, una agregación excesiva compromete la reproducibilidad y la estabilidad del material.

De la misma manera que las AuNPs, los AuNRs recubiertos de PVP se incorporaron a los hidrogeles obteniendo plataformas AuNR@hidrogel (*Ilustración 28*, imagen derecha). La *Ilustración 31* muestra que al igual que sucede en sol-gel, el LSPR de los nanorods inmovilizados se mantiene aproximadamente en los 800 nm, aunque presenta un ensanchamiento de banda con respecto a la disolución. Esto puede ser debido a un entorno local heterogéneo que rodea a las nanopartículas tras su inmovilización en la matriz. Además, posiblemente la variabilidad en la

orientación de los nanorods en la estructura del hidrogel pueda contribuir a este ensanchamiento. Asimismo, una ligera proximidad entre nanopartículas sin llegar a agregación macroscópica podría favorecer interacciones plasmónicas débiles, contribuyendo también sin producir desplazamiento del LSPR.

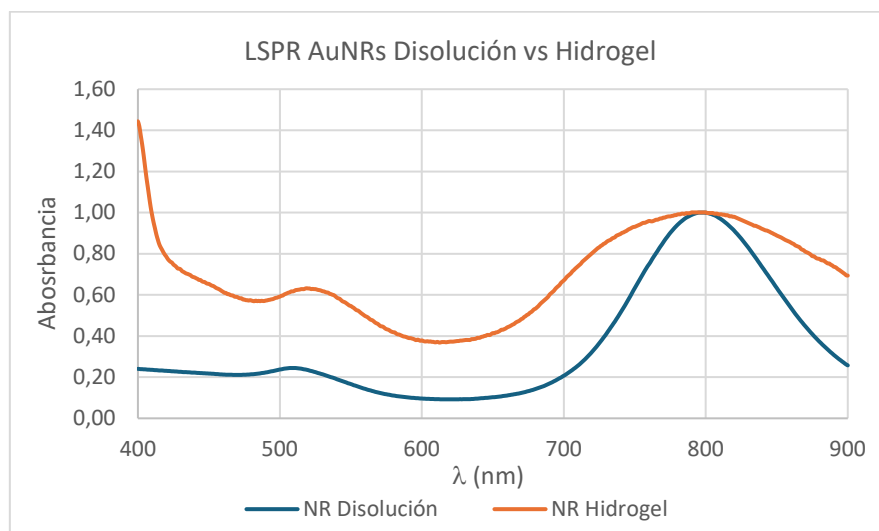


Ilustración 31. Espectros de absorción normalizados de AuNRs en disolución e hidrogel.

5.3.2 Caracterización de la conversión fototérmica

Tras analizar las propiedades ópticas de las AuNPs y AuNRs inmovilizados en el hidrogel, se evaluó su capacidad de conversión fototérmica, al igual que en sol-gel, bajo la irradiación a 520 y 808 nm. Para ello, se comparó el comportamiento de los AuNRs y de las nanopartículas esféricas (AuNPs_MT) estabilizadas con diferentes concentraciones de PVP (0, 1, 4 mg/ml). Este estudio permite analizar cómo el estado de dispersión de las nanopartículas dentro de la matriz polimérica influye directamente en su respuesta fototérmica. También muestra como el propio hidrogel, en ausencia de nanopartículas, tiene una cierta capacidad fototérmica.

Los resultados obtenidos (*Ilustración 32*) siguen la misma tendencia observada previamente en disolución y en matrices sol-gel. Bajo irradiación a 520 nm, las AuNPs_MT muestran una mayor conversión fototérmica que los AuNRs, mientras que a 808 nm ocurre el comportamiento inverso, siendo la plataforma AuNR@hidrogel la que presenta mayor incremento de temperatura.

Además, se observa un efecto particularmente relevante en aquellos hidrogeles donde las AuNPs esféricas habían agregado parcial o totalmente. Esta agregación provoca un desplazamiento de la banda LSPR hacia el NIR, como ya se mostró en los espectros de la *Ilustración 30*, lo que se traduce en una disminución del rendimiento a 520 nm y, simultáneamente, en una mejora de la respuesta bajo irradiación a 808 nm. Este comportamiento confirma la fuerte relación entre el estado de dispersión de las nanopartículas, la posición de los plasmones en el espectro y su eficiencia en la conversión fototérmica.

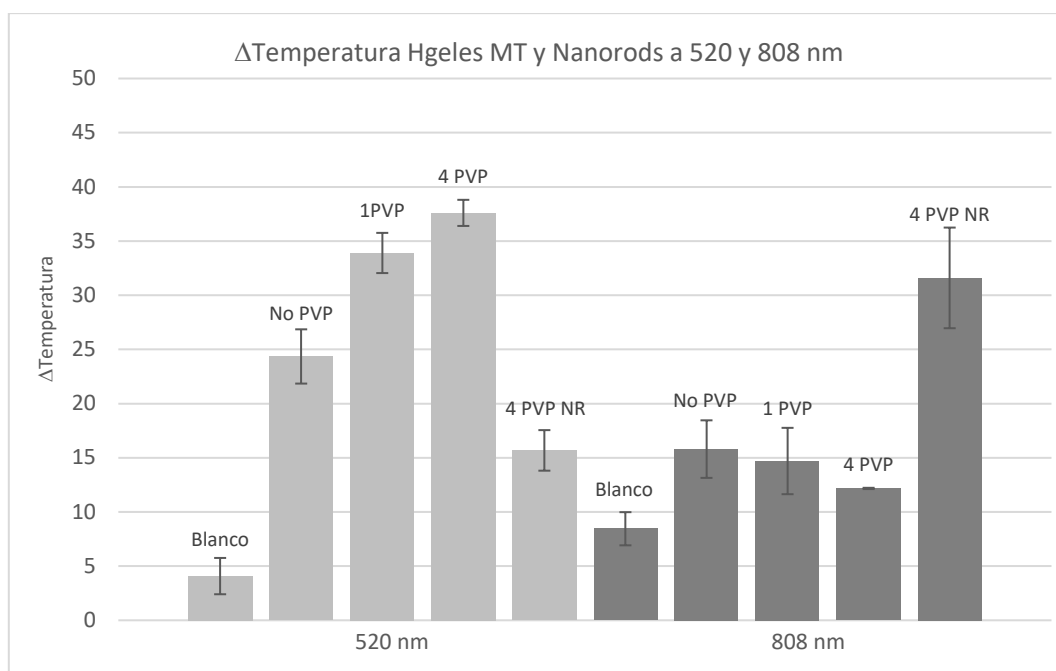


Ilustración 32. Gráfica de barras que muestra la conversión fototérmica de los AuNRs y AuNPs_MT inmovilizadas en el hidrogel, a diferentes concentraciones de PVP. Las barras de error indican la variabilidad entre duplicados.

En conjunto, los resultados obtenidos evidencian la capacidad de las plataformas AuNP@hidrogel y AuNR@hidrogel para actuar como sistemas fototérmicos eficientes, cuya activación puede ajustarse a diferentes regiones espectrales en función del protocolo de síntesis.

5.4 Desarrollo de una plataforma fotobioactiva para catálisis fotoactivada

Con el fin de evaluar las posibles aplicaciones de las plataformas desarrolladas, se realizó un estudio preliminar para investigar si la incorporación de enzimas en dichas plataformas permite obtener materiales híbridos fotoactivables, en los que la actividad enzimática pueda modularse y acelerarse mediante irradiación.

Para este estudio se seleccionó la enzima lacasa, que destaca en el campo de la biotecnología ambiental por su capacidad para degradar compuestos complejos y contaminantes persistentes. Para maximizar su eficiencia operativa se están explorando diferentes alternativas. Entre ellas, una de las menos investigadas es su acoplamiento a un sistema fototérmico. Con esto en mente, como prueba de concepto se ha incorporado la enzima lacasa a la plataforma AuNP@sol-gel. Para ello se ha seguido un protocolo descrito en Materiales y Métodos (apartado 4.5.2), donde la lacasa se mezcló con las AuNPs_MT_1_PVP y la disolución resultante se puso en contacto con el TEOS hidrolizado hasta obtener la plataforma AuNP@sol-gel_Lac. El objetivo de este experimento fue evaluar si la inmovilización de la enzima, seguida de irradiación láser, conducía a un incremento de su actividad catalítica. Para ello, se prepararon dos plataformas idénticas, que se introdujeron en cubetas de cuarzo y cuya actividad enzimática se determinó empleando siringaldazina como sustrato. Este compuesto presenta en disolución una coloración amarillo-verdosa que, tras su oxidación catalizada por la lacasa, evoluciona a un tono púrpura rojizo. A una de las plataformas se le añadió siringaldazina y se registró su espectro de

absorción tras 16 minutos de reacción. La segunda plataforma, tras la adición de la misma cantidad de sustrato, fue irradiada a 520 nm durante el mismo intervalo de tiempo. Posteriormente, se registró su espectro y se comparó con el correspondiente al sistema no irradiado, observándose un mayor grado de oxidación del sustrato en la plataforma sometida a irradiación. Los resultados se muestran en la *Ilustración 33*. Este comportamiento se atribuye al aumento local de temperatura generado por la conversión fototérmica de las AuNPs. La actividad enzimática de la lacasa, como ocurre en la mayoría de las enzimas, se incrementa al acercarse a su temperatura óptima de funcionamiento ($\sim 50^{\circ}\text{C}$) [34]. En este caso, el efecto fototérmico produce un calentamiento localizado dentro de la matriz sol-gel, generando un microentorno térmico favorable sin comprometer la estabilidad estructural de la enzima. Además, al estar la lacasa encerrada en la matriz permite que pueda ser reutilizable, puesto que no se produce una mezcla homogénea de todos los componentes de la reacción. Esto es una clara ventaja frente a la catálisis en disolución y demuestra el potencial de la plataforma desarrollada como herramienta en aplicaciones biocatalíticas, tales como la biorremediación [35].

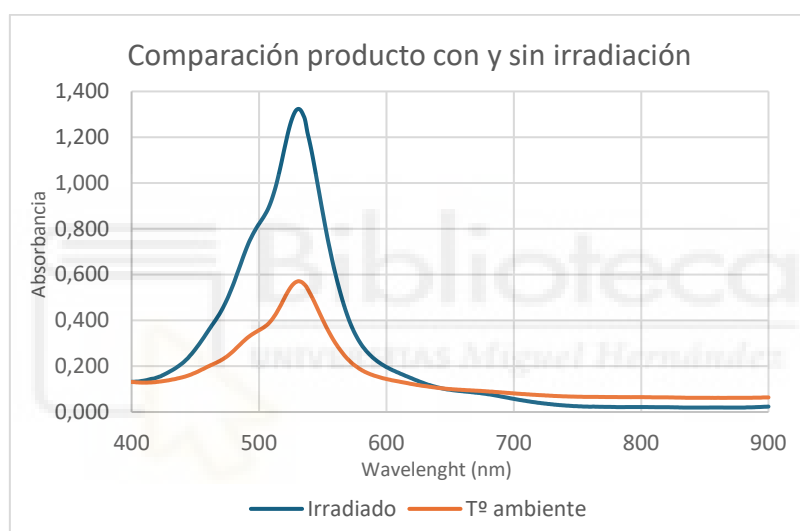


Ilustración 33. Espectros de absorción de la siringaldacina oxidada: a temperatura ambiente por la plataforma AuNP@sol-gel_Lac sin irradiar (naranja) y tras irradiar durante 16 minutos (azul).

6. Conclusiones y Perspectivas futuras

En este Trabajo de Fin de Grado, se ha estudiado la síntesis, caracterización e inmovilización de nanopartículas de oro esféricas (AuNPs) y cilíndricas (AuNRs) en matrices sol-gel e hidrogeles orgánicos, valorando su comportamiento óptico y su capacidad de conversión fototérmica bajo la irradiación a 520 y 808 nm. Las nanopartículas sintetizadas por el método Turkevich (AuNPs_MT) presentaron propiedades ópticas óptimas, que fueron confirmadas mediante espectroscopía UV-Vis y DLS. Mediante la incorporación PVP se permitió la mejora de su estabilidad, reduciendo la agregación inducida por cambios en el medio y favoreciendo una estabilización estérica eficaz sin comprometer su respuesta plasmónica.

A la hora de inmovilizar tanto las AuNPs como las AuNRs en matrices sol-gel no se produjo un desplazamiento significativo de la resonancia plasmónica superficial localizada (LSPR), indicando que las nanopartículas

mantienen sus propiedades ópticas y morfológicas tras su encapsulación. En el caso de los hidrogeles, se observó un ligero desplazamiento (10-15 nm) y un ensanchamiento en el LSPR, atribuibles a posibles interacciones interparticulares y heterogeneidad de microambientes. Sin embargo, esto no implicó una pérdida significativa de funcionalidad.

Para el rendimiento fototérmico, se estableció una absorbancia óptima aproximada de 0,5, ya que proporciona un equilibrio adecuado entre eficiencia térmica y estabilidad coloidal. En cuanto a la elección del tiempo de irradiación, se seleccionaron 5 minutos justificados a partir de estudios cinéticos donde se comprobó que la mayor parte del incremento térmico se producía en ese rango de tiempo, evitando exposiciones prolongadas innecesarias, especialmente importantes en sistemas que incorporan biomoléculas.

Desde el punto de vista morfológico, las AuNPs_{MT} demostraron ser las más eficientes bajo irradiación a 520 nm, debido a la coincidencia entre su LSPR y la longitud de onda del láser. Por su parte, los AuNRs mostraron un rendimiento superior a 808 nm gracias a su banda longitudinal en la región NIR, confirmando que la eficiencia fototérmica depende directamente de la adecuación espectral entre la nanopartícula y la fuente de irradiación. Además, se comprobó que el grado de agregación influye de manera determinante en la respuesta óptica y térmica del sistema. Una agregación parcial desplaza el LSPR hacia el infrarrojo cercano, reduciendo su rendimiento a 520 nm y ganándolo a 808 nm. Esto demuestra la importancia del control de la estabilización coloidal para ajustar correctamente la funcionalidad del material según la aplicación deseada.

Finalmente, la integración de la lacasa en la matriz sol-gel junto con AuNPs permitió observar un incremento de actividad enzimática bajo irradiación con respecto a temperatura ambiente, concluyendo que la conversión fototérmica puede utilizarse como herramienta catalítica. Este resultado confirma el potencial de estas plataformas como sistemas fotoactivos con posibles aplicaciones en hipertermia localizada, catálisis fotoactivada y liberación controlada mediante estímulos luminosos.

En conjunto, los resultados obtenidos demuestran que el control de la morfología, concentración y estabilización superficial de las nanopartículas, junto con la elección adecuada de la matriz de inmovilización y longitud de onda de irradiación, permite diseñar plataformas fototérmicas eficientes, estables y versátiles para aplicaciones avanzadas en el ámbito biomédico y catalítico. Además, dadas las propiedades de los distintos materiales, las plataformas basadas en matrices sol-gel parecen más indicadas para aplicaciones biocatalíticas, mientras que las basadas en hidrogeles, gracias a su capacidad de hinchamiento, estarían más indicadas para el *drug delivery*.

Como líneas futuras de investigación, sería de interés profundizar en la estabilidad a largo plazo de las plataformas sol-gel e hidrogel bajo ciclos repetidos de irradiación, además de su combinación con sistemas enzimáticos u otros agentes bioactivos para el desarrollo de materiales multifuncionales capaces de integrar hipertermia localizada, catálisis y liberación controlada en un único dispositivo.

7. Bibliografía

- [1] J. P. Vanegas García, *Gold nanomaterials decorated dna bases: design, synthesis and application*, Valencia, 2016.
- [2] H. Duman, E. Akdaşçi, F. Eker, M. Bechelany y S. Karav, "Gold Nanoparticles: Multifunctional Properties, Synthesis, and Future Prospects," *Nanomaterials*, vol. 14, nº 22, p. 1805, Nov. 2024.
- [3] Ielo, I. , et al, "Synthesis, Chemical–Physical Characterization, and Biomedical Applications of Functional Gold Nanoparticles: A Review," *molecules*, vol. 26, nº 19, p. 5823, Sep. 2021.
- [4] J. Tai, S. Fan, S. Ding y L. Ren, "Gold Nanoparticles Based Optical Biosensors for Cancer Biomarker Proteins: A Review of the Current Practices," *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 10, p. 877193, Apr. 2022.
- [5] Bai, X. , et al. "The Basic Properties of Gold Nanoparticles and their Applications in Tumor Diagnosis and Treatment," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, nº 7, p. 2480, Apr. 2020.
- [6] V. Semwal, O. R. Jensen, O. Bang y J. Janting, "Investigation of Performance Parameters of Spherical Gold Nanoparticles in Localized Surface Plasmon Resonance Biosensing," *Micromachines*, vol. 14, nº 9, p. 1717, Aug. 2023.
- [7] Kuamari, S. , et al. "A comprehensive review on various techniques used for synthesizing nanoparticles," *Journal of Materials Research and Technology*, vol. 27, Nov. 2023.
- [8] P. Slepíčka, N. Slepíčková Kasálková, J. Siegel, Z. Kolská y V. Švorčík, "Methods of Gold and Silver Nanoparticles Preparation," *Materials*, vol. 13, nº 1, p. 1, Jan. 20120.
- [9] R. Zanella, "Metodologías para la síntesis de nanopartículas: controlando forma y tamaño," *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria en Nanociencias y Nanotecnología*, vol. 5, nº 1, 2012.
- [10] P. Szczygłowska, "Nanotechnology–General Aspects: A Chemical Reduction Approach to the Synthesis of Nanoparticles," *MDPI*, 2023.
- [11] Z. Jia, "The Controllable Synthesis and Growth Mechanism of," *Advances in Engineering Technology Research*, vol. 14, nº 1, p. 1589, Jul. 2025.
- [12] N. Li, P. Zhao y D. Astruc, "Anisotropic Gold Nanoparticles: Synthesis, Properties, Applications, and Toxicity," *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 53, nº 7, pp. 1756-1789, Feb. 2014.
- [13] C. Boukoufi, A. Boudier y I. Clarot, "Increased Range of Catalytic Activities of Immobilized Compared to Colloidal Gold Nanoparticles," *Molecules*, vol. 28, 2023.
- [14] H. J. Csupász-Szabó, B. Dönczö, M. Szarka, L. Daróczi y I. Lázár, "Thermal Reverse-Engineered Synthesis and Catalytic Activity of Nanogold-Containing Silica Aerogels," *Gels*, vol. 11, nº 2, p. 87, Jan. 2025.

- [15] S. C. Kudaibergenov, G. S. Tatykhanova y B. S. Selenova, "Polymer Protected and Gel Immobilized Gold and Silver Nanoparticles in Catalysis," *J. Inorg. Organomet. Polym. Mater.*, vol. 26, nº 6, pp. 1198-1211, Nov. 2016.
- [16] A. H. E. Yousif y M. S. A. Eltoum, "Mechanistic Investigation of Sol–Gel Reactions Using Alkoxysilane Precursor," *Chemical Science International Journal*, vol. 29, nº 5, pp. 25-31, Jul. 2020.
- [17] S. Bashir, M. Hina, J. Iqbal, M. S. Rajan, A. Azam y A. A. Satti, "Fundamental Concepts of Hydrogels: Synthesis, Properties, and Their Applications," *Polimers*, vol. 12, nº 11, p. 2702, Nov. 2020.
- [18] M. Broadbent, S. J. Chadwick, M. Brust y M. Volk, "Gold Nanoparticles for Photothermal and Photodynamic Therapy," *ACS Omega*, vol. 9, nº 44, pp. 44846-44559, Oct. 2024.
- [19] Mirrahimi, M. , et al. "A thermo-responsive alginate nanogel platform co-loaded with gold nanoparticles and cisplatin for combined cancer chemo-photothermal therapy," *Pharmacological Research*, vol. 143, pp. 178-185, may. 2019.
- [20] H. Ribiero de Barros, "Mechanistic Insights into the Light-Driven Catalysis of an Immobilized Lipase on Plasmonic Nanomaterials," *ACS Catal.*, vol. 11, nº 1, pp. 414-423, Nov. 2021.
- [21] H. D. Kyomuhimbo y H. G. Brink, "Applications and immobilization strategies of the copper-centred laccase enzyme; a review," *Heliyon*, vol. 9, nº 2, p. e13156, Jan. 2023.
- [22] C. Boukifi, A. Boudier, S. Lahouari, J. Vigneron y I. Clarot, "Activity and reusability of immobilized gold nanoparticles for the catalysis of both oxidation and reduction reactions," *Results Chem.*, vol. 5, p. 100979, May. 2023.
- [23] S. Yoshida, K. Yoshida, T. Isozaki, M. Oura, M. Ozaki, T. Tsuruoka y K. Usui, "One-Pot Synthesis and Immobilization of Gold Nanoparticles Using Peptidyl Microbeads," *Molecules*, vol. 30, nº 8, 2025.
- [24] Y. Alacid, R. Esquembre, F. Montilla, M. J. Martínez-Tomé y C. R. Mateo, "Fluorescent Nanocomposite Hydrogels Based on Conjugated Polymer Nanoparticles as Platforms for Alkaline Phosphatase Detection," *Biosensors*, vol. 13, nº 3, p. 408, Mar. 2023.
- [25] Y. Alacid, R. Martínez-Baquero, R. Esquembre, F. Montilla, M. J. Martínez-Tomé y C. R. Mateo, "Innovative fluorescent nanocomposite eutectogels: Design and characterization towards biosensing applications," *J. Mol. Liq.*, vol. 424, p. 127123, Feb. 2025.
- [26] Y. Alacid, M. J. Martínez-Tomé, R. Esquembre, M. A. Herrero y C. R. Mateo, "Portable Alkaline Phosphatase–Hydrogel Platform: From Enzyme Characterization to Phosphate Sensing," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 24, nº 3, p. 2672, Jan. 2023.
- [27] Y. Alacid, M. J. Martínez-Tomé y C. R. Mateo, "Reusable Fluorescent Nanobiosensor Integrated in a Multiwell Plate for Screening and Quantification of Antidiabetic Drugs," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 13, nº 22, pp. 25624-25634, May. 2021.

- [28] M. Rubio-Camacho, M. J. Martínez-Tomé, C. Cuestas-Ayllón, J. M. de la Fuente, R. Esquembre y C. R. Mateo, "Tailoring the plasmonic properties of gold-liposome nanohybrids as a potential powerful tool for light-mediated therapies," *Colloid and Interface Sci. Commun.*, vol. 52, p. 100690, Jan. 2023.
- [29] M. Rubio-Camacho, C. Cuestas-Ayllón, B. Torres-Herrero, M. J. Martínez-Tomé, J. M. de la Fuente y C. R. Mateo, "Harnessing the power of thermosensitive liposomes with gold nanoprisms and silica for controlled drug delivery in combined chemotherapy and phototherapy," *RSC Adv.*, vol. 14, nº 32, pp. 23073-23082, Jul. 2024.
- [30] J. Turkevich, P. C. Stevenson y J. Hillier, "A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold," *Discussions of the Faraday Society*, vol. 11, pp. 55-75, Jan. 1951.
- [31] C. F. Thurston, "The structure and function of fungal laccases," *Microbiology*, vol. 140, nº 1, pp. 19-26, 1994.
- [32] D. Li, G. Kagan, R. Hopson y P. G. Williard, "Formula Weight Prediction by Internal Reference Diffusion-Ordered NMR Spectroscopy (DOSY)," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 131, nº 15, pp. 5627-5634, Apr. 2009.
- [33] M. Kaszuba, J. Corbett, F. M. Watson y A. Jones, "High-concentration zeta potential measurements using light-scattering techniques," *Phil. Trans. R. Soc. A*, vol. 368, nº 1927, pp. 4439-4451, Sep 2010.
- [34] Xu, X. , et al. "A customizable 3D printed device for enzymatic removal of drugs in water," *Water Research*, vol. 208, p. 117861, Jan. 2022.
- [35] Zhu, Q. , et al. "Photothermal catalytic degradation of textile dyes by laccase immobilized on Fe₃O₄@SiO₂ nanoparticles," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 623, pp. 992-1001, Oct. 2022.