



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

Nanopartículas de oro decoradas con Concanavalina A para la detección  
de glicoconjugados.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
LICENCIADA EN TECNOLOGÍA

PRESENTA:

MARIANA VÁZQUEZ IBARRA

DIRECTORES DE TESIS:

Asesor: Dra. Luz María López Marín

Coasesor: Dr. Ravichandran Manisekaran

CUAUTITLÁN, ESTADO DE MÉXICO

2019



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
SECRETARÍA GENERAL  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLÁN  
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTÁZAR FIGUEROA  
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales  
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Nanopartículas de oro decoradas con Concanavalina A para la detección de glicoconjugados.

Que presenta la pasante: MARIANA VÁZQUEZ IBARRA

Con número de cuenta: 31168342-2 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Tecnología

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

**ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 17 de septiembre de 2019.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	Dr. Juan Manuel Aceves Hernández	
<b>VOCAL</b>	Dra. Luz María López Marín	
<b>SECRETARIO</b>	Dra. Patricia Ramírez Noguera	
<b>1er. SUPLENTE</b>	Dr. José Juan Escobar Chávez	
<b>2do. SUPLENTE</b>	Dra. Alma Guadalupe Vázquez Durán	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/ntm\*

*“La determinada determinación de no parar hasta llegar venga lo que viniere,  
suceda lo que sucediere”.*

Santa Teresa de Jesús.

## Dedicatoria

*Este trabajo está especialmente dedicado a Dios, pues fue la fuerza donde encontré paz cuando más lo necesité. A mi familia pues gracias a su esfuerzo y a los valores que me han enseñado con tanto amor y paciencia, he logrado concluir mis objetivos hasta ahora. No menos importante, a todas aquellas personas que siempre confiaron en mí y me han mostrado su apoyo.*

## Agradecimientos

*A la maravillosa casa de estudios, Universidad Nacional Autónoma de México, por haberme abierto las puertas al conocimiento, y por haber sembrado en mi amor por la ciencia y el arte.*

*A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, por haberme acogido y brindarme el apoyo necesario para formarme como profesionista, enseñándome a mostrar compromiso con la sociedad mexicana.*

*Al Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada por haberme abierto las puertas para poder realizar mi proyecto de tesis.*

*A mi muy amada familia que siempre han estado al pendiente de mí y me han brindado su apoyo y su amor. Mamá te agradezco enseñarme a nunca rendirme, y a luchar por mis sueños. Papá gracias por enseñarme a confiar en mí y a ser perseverante. Hermanita, gracias por enseñarme a actuar de manera justa y comprometida. Juan Carlos, gracias por siempre brindarme apoyo en los momentos en los que lo llegue a necesitar. Ustedes son mi motor.*

*A mis abuelita Ana María, a todos mis tíos y a mis primos por todo su cariño y sus consejos que me alentaron a luchar por terminar mi carrera.*

*Con mucho cariño a mi asesora de tesis, Luz María López Marín. Le agradezco el haberme mostrado su amor por la ciencia, el haberme brindado su confianza y apoyo durante todo este proceso, así como también por incentivar mi curiosidad por lo que nos rodea y fomentar mi creatividad. Gracias.*

*Con mucho cariño para Ravichandran Manisekaran. No tengo palabras suficientes que expresen lo agradecida que me siento por tu esfuerzo, paciencia, apoyo y confianza brindados. Gracias por tu bella amistad y por alentarme a siempre dar lo mejor de mí en todo momento.*

*A la 6<sup>a</sup> generación de la FES Cuautitlán a quienes admiro y considero como mis hermanos. Ari, Kal, Vic, Cris, Jorge, Zuri y Alam. Hermanitos gracias por los momentos de risas, a causa de los chistes buenos y malos (la mayoría malos), por empujarme a dar lo mejor de mí, por sus consejos, por peleas sin sentido, por las bromas y los juegos cartas. Por cuidarme cuando más lo necesite. Por todo eso y más, gracias.*

*Con mucho cariño agradezco a Alma, Alfredo, Eli, Mirle, Pau y Luis Enrique, por su bella amistad. Ustedes siempre me hicieron sentir como en casa, me brindaron su confianza y su apoyo, me sacaron de mi zona de confort y me alentaron a ir un poco más allá, me sacaron risas infinitas y me confiaron sus mayores sueños y temores. Gracias.*

*A la Dra. Alma y al Dr. Abraham. Ustedes han sembrado en mi parte de mi amor por la ciencia de los materiales, me han incentivado a ser mejor persona y profesionalista, no puedo estar más agradecida por el apoyo que me dieron desde que inicié la carrera, por brindarme una bella amistad. Por ser familia. Gracias.*

*A todos mis compañeros de la licenciatura en tecnología de la FESC y de CFATA, por sus enseñanzas, su confianza, sus consejos y las risas infinitas. Por los momentos compartidos y los que vienen.*

*A mi muy querido amigo, Edgar Jimenez. Amigo gracias por confiar a en mí, por tenerme paciencia al enseñarme, por mostrar siempre tu amor por la ciencia, por tu honestidad y tu cariño. Gracias.*

*A la maestra Lulu, por su apoyo, confianza, amistad y cariño brindado a lo largo de la carrera. Por compartir conmigo grandes ideas acompañadas de una buena pizza.*

*Al Dr. Pedro. No solo le agradezco sus valiosas aportaciones a este proyecto, sino también el haberme impulsado a ser mejor persona y profesionalista.*

*A la Dra. Blanca, por su valioso tiempo para ayudarme cuando me sentí perdida, por enseñarme a confiar en mis habilidades y lanzarme al ruedo sin dudarlo. Gracias*

*A la Dra. Paty y Al Dr. Roberto. Ustedes fueron los primeros que me abrieron las puertas para enseñarme lo bonito que es el mundo de la nanotecnología, y sin esperar nada a cambio incentivaron mis alas para volar y explorar ese mundo. Gracias*

*A mis amigos de CFATA: Carlos, Andrea, Alex, María, Narzo, Clarita, Luis Fernando y Martín, con quienes he compartido un sinfín de grandes momentos.*

*Al Dr. Cristian. Gracias por que sin conocerme, siempre me brindaste tu confianza y me cuidaste cuando más lo necesitaba.*

*A los profesores tanto de la FESC como de CFATA, son muchas las cosas que tengo que agradecerles, pero sepan que cada uno apporto su granito de arena para sumar a mi formación y espero poder dar el mismo ejemplo.*

*Al Dr. Remy, gracias por incentivarme a buscar nuevos horizontes al invitarme a CFATA y por el apoyo para lograrlo.*

*A la Lic. Adela Hutrón. Mi querida Ade, gracias por tu apoyo mostrado durante la carrera, y especialmente en esta última parte, ya que sin tu apoyo durante los proceso burocráticos de titulación, definitivamente estaría perdida.*

*Al Dr. Roberto Orozco. Dr. Nano, muchas gracias por brindarme vida cuando más lo necesitaba por su apoyo, confianza y alentarme a lograr mis metas.*

*Sin lugar a duda todos ustedes fueron la justa pimienta y sal, que le dieron buen sabor a mi carrera. Por todo eso y más, gracias.*

## Agradecimientos Técnicos

Agradezco especialmente a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la Universidad Nacional Autónoma de México, por el financiamiento otorgado a través del proyecto PAPIIT IT203518.

Se agradece ampliamente al instituto de Neurobiología de la UNAM y en particular a la técnica titular de la unidad de microscopía María de Lourdes Palma Tirado, por su ayuda en la obtención de las micrografías TEM.

Al Laboratorio Nacional de Caracterización de Materiales del CFATA-UNAM, especialmente a la Dra. Beatriz Millán Malo por su apoyo en la realización de las caracterizaciones por difracción de rayos X, a la Dra. Genoveva Hernández Padrón y a la Dra. Dra. María Antonieta Mondragón Sosa por su apoyo con la técnica de espectroscopía Raman.

Agradezco particular a los laboratorios de Nanobio-óptica, Catálisis y Ondas de choque por permitirme emplear las instalaciones y equipos que hicieron posible el desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Mario Enrique Rodríguez García y al Dr. Cristian Felipe Ramírez Gutiérrez por su apoyo con los análisis de espectroscopía FTIR.

## Contenido

Dedicatoria .....	III
Agradecimientos .....	III
Agradecimientos Técnicos .....	V
Lista de abreviaturas .....	IX
Resumen.....	X
Abstract .....	XI
1      Introducción.....	1
1.1    Marco teórico .....	1
1.1.1    Nanotecnología.....	1
1.1.2 <i>Breve historia de la nanotecnología</i> .....	1
1.1.3    Nanopartículas metálicas.....	4
1.1.4 <i>Nanopartículas de oro</i> .....	4
1.1.5 <i>Síntesis de nanopartículas de oro por el método de Turkevich</i> .....	6
1.1.6    Carbohidratos en membranas celulares.....	7
1.1.7 <i>Carbohidratos en membranas y comunicación celular</i> .....	7
1.1.8 <i>Reconocimiento de carbohidratos por lectinas</i> .....	11
1.1.9    Funcionalización de nanopartículas con proteínas .....	13
1.1.10 <i>Nanopartículas funcionalizadas con proteínas para detección de azúcares.</i> .....	13
1.1.11 <i>Formación de la biocorona.</i> .....	14
1.1.12   Métodos de caracterización .....	16
1.1.13 <i>Espectroscopía UV-Vis</i> .....	16
1.1.14 <i>Espectroscopía FTIR</i> .....	18
1.1.15 <i>Espectroscopía Raman</i> .....	21
1.1.16 <i>Espectroscopía de fluorescencia</i> .....	24
1.1.17 <i>Difracción de rayos X</i> .....	26
1.1.18 <i>Microscopía electrónica de transmisión</i> .....	28
1.1.19 <i>Dispersión Dinámica de Luz</i> .....	30
1.1.20 <i>Potencial zeta</i> .....	33
1.1.21 <i>Ensayo de ninhidrina</i> .....	35
2      Planteamiento del problema.....	36
3      Hipótesis.....	37
4      Objetivos.....	38



4.1.1	Objetivo general .....	38
4.1.2	Objetivos particulares.....	38
5	Metodología.....	39
5.1	Diseño experimental.....	39
5.2	Materiales y métodos .....	40
5.2.1	<i>Compuestos químicos</i> .....	40
5.2.2	<i>Síntesis de nanopartículas de oro por el método de Turkevich</i> .....	40
5.2.3	<i>Funcionalización de nanopartículas de oro con Con-A</i> .....	41
5.2.4	<i>Remoción de excedente de proteína en los lotes de AuNP-ConA</i> .....	41
5.2.5	<i>Reconocimiento de <math>\alpha</math>-metil D-manósido (MeMan)</i> .....	41
5.2.6	<i>Caracterización de nanopartículas</i> .....	42
6	Resultados.....	44
6.1	Síntesis de AuNPs por el método de Turkevich.....	44
6.1.1	<i>Espectroscopía UV-Vis</i> .....	44
6.1.2	Difracción de Rayos X.....	45
6.1.3	<i>Espectroscopía FTIR</i> .....	46
6.1.4	<i>Microscopía electrónica de transmisión</i> .....	48
6.1.5	<i>Dispersión de luz dinámica</i> .....	50
6.1.6	<i>Potencial zeta</i> .....	51
6.2	Características de la Con-A.....	52
6.2.1	<i>Espectroscopía UV-Vis</i> .....	52
6.2.2	<i>Espectroscopía FTIR</i> .....	53
6.2.3	<i>Espectroscopía de fluorescencia</i> .....	55
6.2.4	<i>Potencial zeta</i> .....	56
6.3	Formación de la corona de ConA sobre las AuNPs. ....	58
6.3.1	La Funcionalización de AuNP con Con-A mediante fisisorción .....	58
6.3.2	Evolución del Corona suave.....	59
6.3.3	Aumento del radio hidrodinámico de las AuNPs – corona suave según análisis de DLS	61
6.3.4	Interacciones ConA-AuNP.....	61
6.3.5	Efectos del cambio de pH sobre la formación de la corona. ....	67
6.3.6	Efecto quenching.....	71
6.3.7	<i>Potencial zeta de los complejos ConA-AuNP</i> .....	72
6.3.8	Cuantificación de proteínas de la corona en los complejos ConA-AuNPs .....	73

6.4	Estudio de la interacción AuNP-ConA y su ligando $\alpha$ MeMan.....	74
6.5	Exploración de la técnica Raman-SERS como método para identificar la captura de ligandos sacarídicos por complejos AuNP-ConA.....	77
7	Conclusiones.....	78
8	Perspectivas .....	79
9	Bibliografía.....	80

## Lista de abreviaturas

<b>Con-A</b>	Concanavalina A
<b>DRX</b>	Difracción de rayos X
<b>DLS</b>	Dispersión de Luz dinámica
<b>TEM</b>	Microscopía electrónica de transmisión
<b>NP</b>	Nanopartículas
<b>AuNP</b>	Nanopartículas de oro
<b>SPR</b>	Resonancia del Pasmón de Superficial
<b>FTIR</b>	Transmisión de infrarrojo con transformada de Fourier
<b>UV-Vis</b>	Ultravioleta-visible
<b>MeMan</b>	$\alpha$ -metil D-manósido
<b>PBS</b>	Buffer fosfato salino

## Resumen

Diversos microorganismos presentan carbohidratos en su capa más externa, dando lugar a la primeras interacciones con agentes externos. A su vez, los organismos multicelulares han evolucionado de tal forma que son capaces de sensar la presencia de microbios a través de lectinas, proteínas que reconocen carbohidratos. Una manera de explotar dicho reconocimiento es a través de nanoestructuras biomiméticas.

En este proyecto se planteó el diseño y construcción de nanopartículas de oro y su funcionalización con una lectina que reconoce de manera específica la manosa, azúcar presente en la pared celular de bacterias y hongos, con el propósito de que este complejo se utilice en microbiología y diagnóstico de patógenos.

Se prepararon nanopartículas de oro a partir de ácido cloroáurico en presencia de citrato de sodio (método de Turkevich), y se identificaron condiciones para su funcionalización con la lectina, incluyendo cambios de pH y relación molar oro-proteína. Las estructuras resultantes fueron analizadas mediante diferentes técnicas de caracterización, tales como microscopía electrónica de transmisión, dispersión de luz dinámica, medición de potencial zeta y espectroscopias FTIR y Raman. De acuerdo con nuestros resultados, las partículas resultantes son capaces de unirse a  $\alpha$ -metil D-manósido, un carbohidrato modelo, así como de traducir dicha interacción en cambios espectroscópicos.

## Abstract

Various microorganisms present carbohydrates at the outmost layer, leading to the first interactions with external agents. In turn, multicellular organisms have evolved in such a way that they are able to recognize the presence of microbes through lectins, which are carbohydrate-recognizing proteins. Biomimetic nanoconstructs represent a way to exploit this recognition.

This project raised the design and construction of gold nanoparticles and their functionalization with a lectin that specifically recognizes mannose, a sugar present in the cell wall of bacteria and fungi, for this complex to be used in microbiology and pathogen diagnosis.

Gold nanoparticles were prepared using chloroauric acid in the presence of citrate (Turkevich method), and functionalized with the lectin, through various experimental conditions, including pH changes and molar gold-protein ratio. The resulting structures were analyzed through different techniques such as transmission electron microscopy, dynamic light scattering, zeta potential measurement and FTIR and Raman spectroscopy. According to our results, the functional particles are able to bind  $\alpha$ -methyl D-mannoside, employed as a model carbohydrate, giving rise to measurable spectroscopy changes.

# 1 Introducción

## 1.1 Marco teórico

### 1.1.1 Nanotecnología

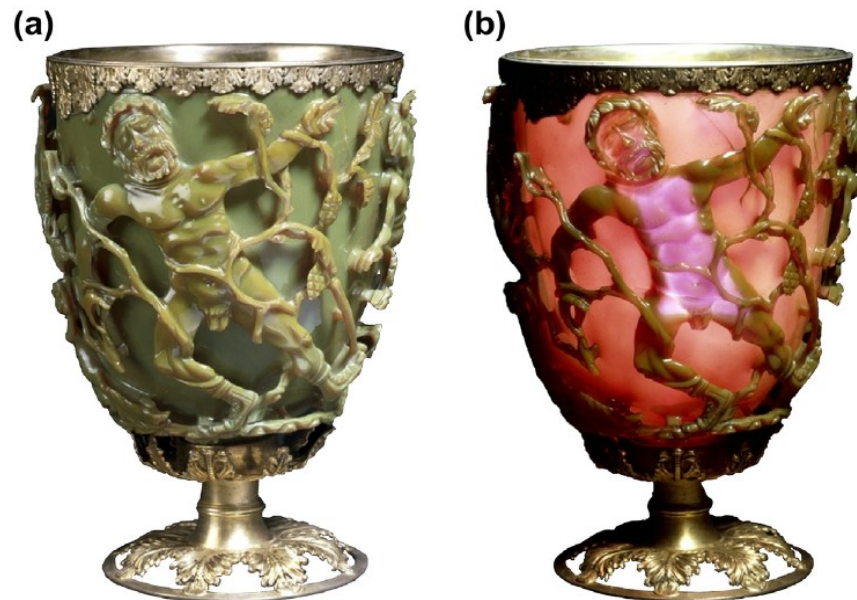
La Nanotecnología es un área del conocimiento en expansión y con grandes alcances en diversas ciencias. Su estudio se ha extendido a nivel mundial y el conocimiento acerca de los efectos biológicos asociados a su exposición es motivo de estudio (Singh, 2016). Las nanopartículas se pueden formar a partir de muchos materiales y tener una amplia diversidad funcional que es muy diferente de los materiales a granel, debido a sus propiedades electrónicas, ópticas y catalíticas originarias de sus dimensiones de escala nanométrica, su tamaño y las diversas formas que pueden adquirir controlando las condiciones de síntesis. Uno de los materiales que más ha llamado la atención a nivel nanométrico es el oro, ya que sus propiedades ópticas han permitido su aplicación en diversas áreas como la electrónica, la fotónica y la medicina, entre otras más.

La Nanotecnología es un campo del conocimiento que busca estudiar, manipular y explorar de manera controlada las propiedades de la materia que comprenden tamaños entre 1 a 100 nanómetros (nm), es decir la millonésima parte de un milímetro. Esta área del conocimiento ha logrado conjuntar áreas como la física, la química, la biología entre otras más, generando diversos avances científicos y tecnológicos a lo largo de la historia por lo que se le considera un área multidisciplinaria (Elahi, Kamali, & Baghersad, 2018).

### *1.1.2 Breve historia de la nanotecnología*

Los materiales a nivel nanométrico se han utilizado desde hace muchos años, un extraordinario trabajo con vidrio hecho por los romanos en el siglo quinto D.C demuestra uno de los mejores ejemplos de Nanotecnología en el mundo antiguo. La copa de Lycurgus, que forma parte de la colección del Museo Británico, muestra al rey Lycurgus arrastrado al inframundo por Ambrosia.

Sorprendentemente, cuando la taza es iluminada desde fuera se ve verde (Figura 1 (a)). Cuando se ilumina desde adentro, la taza se ve rojiza y el rey Licurgo se ve púrpura (Figura 1 (b)) (Loos, 2015).



**Figura 1.** Copa del rey Lycurgus. El cristal aparece en verde cuando se ilumina desde el exterior (a) y en rojo púrpura cuando se ilumina desde el interior (b). Tomada de: Loos, 2015.

La explicación de este fenómeno se obtuvo hasta el año 1990, después de que los científicos analizaron la copa utilizando un microscopio de fuerza atómica. Se encontró que el dicromismo (dos colores) se observa debido a la presencia de nanopartículas, plata en un 66.2%, en un 31.2% hay presencia de oro y en un 2.6% de cobre, de tamaños hasta 100 nm, dispersas en una matriz de vidrio. El color rojo observado es el resultado de la absorción de luz a 520 nm por las partículas de oro. El color púrpura se debe a la absorción por las partículas más grandes, mientras que el color verde se atribuye a la dispersión de la luz por las dispersiones coloidales de partículas de plata con un tamaño mayores a 40 nm. La copa Lycurgus es reconocida como uno de los nanocompuestos sintéticos más antiguos, sin embargo para ese entonces no se tenía

conocimiento de que las propiedades ópticas eran debidas a nanopartículas (Loos, 2015). En 1857 Michael Faraday mientras estudiaba las propiedades de la luz y la materia, encontró que las propiedades ópticas del oro coloidal cambiaban con respecto a las propiedades del oro a granel. Este hecho cobró interés dentro de la comunidad científica, por lo que se empezó a estudiar el fenómeno óptico de las nanopartículas al interactuar con la luz, tal es el caso de Gustave Mie, quien en 1908 describió mediante un conjunto de ecuaciones la interacción de las ondas electromagnéticas con una partícula esférica de metal. Hasta 1914 ya se conocía que las propiedades de materiales como el oro cambian sus propiedades cuando se reduce su tamaño, este hecho también llamó la atención de Richard Zsigmondy y de Heinrich Siedentopf, juntos desarrollaron un ultramicroscopio con el que lograron observar por primera vez partículas coloidales, el conocimiento que tenía sobre sus observaciones de coloides los llevó a utilizar por primera vez el término nanómetro. Con el fin de buscar obtener nanopartículas homogéneas en tamaño y forma, en 1928 el químico Theodor H.E. Svedberg separó por primera vez partículas por sus tamaños construyendo la primera ultracentrífuga, y describió en experimentos utilizando dispersión de rayos X como determinar propiedades de tamaño y forma de las partículas de oro. Todos los hechos mencionados anteriormente son una pequeña parte de los desarrollos para conocer algunas de las propiedades de las coloides, sin embargo la idea de la manipulación y el control de los materiales sintetizados a una escala cada vez menor era poco clara, hasta que en 1959 la visión de un físico llamado Richard Feynman promovió que la idea de la Nanotecnología empezara a tomar un rumbo más estable. En particular, al impartir su conferencia “Hay mucho espacio en el fondo”, Richard Feynman habló acerca de la manipulación de la materia a nivel atómico; a partir de aquí empezó a surgir el interés de mirar con otra óptica las partículas coloidales con tamaños nanométricos y la inmensa posibilidad de aplicarlos en diferentes áreas. Tal fue la motivación por estudiar las propiedades de las nanopartículas que, con los avances en



el área en 1974, el profesor Narro Taniguchi de la Universidad de Ciencias de Tokio acuñó el término Nanotecnología (Li, Zhao, & Astruc, 2014; Voliani, 2013; Schaming & Remita, 2015) Hoy en día, sabemos bien que las nanopartículas se pueden formar a partir de muchos materiales y tener una amplia diversidad funcional, que son muy diferentes de los materiales a granel, debido a sus diferentes propiedades que dependen de su tamaño y morfología. Uno de los materiales que más ha llamado la atención a nivel nanométrico es el oro, ya que sus diferentes propiedades han permitido su aplicación en diversas áreas como la electrónica, la fotónica, y la medicina, entre otras.

### 1.1.3 Nanopartículas metálicas

#### *1.1.4 Nanopartículas de oro*

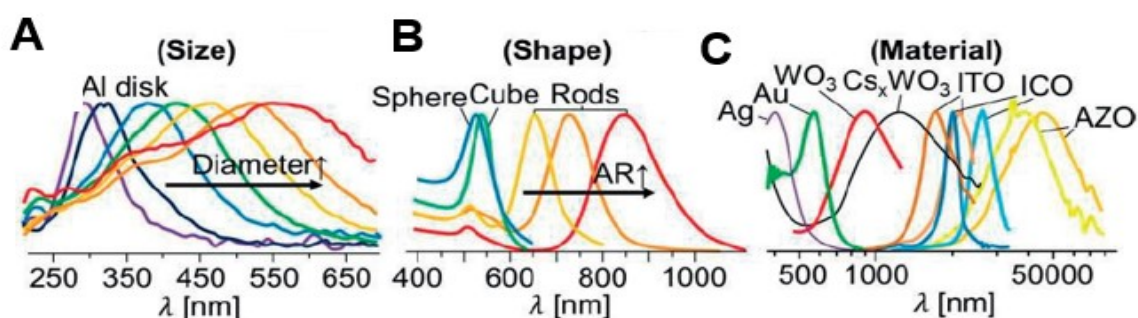
Como se mencionó en la sección anterior, las nanopartículas de oro han sido objeto de investigación desde hace muchos años ya que destacan por las propiedades que tiene este material cuando sus dimensiones están dentro de los nanómetros. Cuando el oro está en bulto es un material metálico brillante de color amarillo, bastante denso y suave, que a diferencia de otros metales es bastante dúctil y maleable, además también es un buen conductor. Mientras que las nanopartículas de oro dependiendo de su tamaño y forma pueden llegar a tener propiedades diferentes que el material en bulto. Este tipo de propiedades que son observables sin necesidad de utilizar equipamiento avanzado, son debido al Plasmón de resonancia superficial (SPR) que presentan los nanomateriales conductores como el oro.

El Plasmón de resonancia superficial es una respuesta oscilatoria conjunta de varios electrones debido a la incidencia de ondas electromagnéticas (luz). Los electrones que componen una matriz de un conductor están ubicados cada uno en un nivel de energía, sin embargo por cada nivel de energía hay un solo electrón y la distancia que hay entre cada nivel es mínima, por lo

que se considera que el sistema está bien empaquetado (Coffey, 2017). Debido a esta disposición en la que se encuentran los electrones, estos llegan a actuar de manera conjunta ante algún estímulo externo que logre excitarlos, en este sentido a nivel cuántico se les considera como un solo sistema o como una partícula, compuesta por una colección de partículas que interactúan de manera conjunta en la superficie de un material conductor. Este fenómeno se puede presentar en materiales conductores en bulto o nanométricos. En el caso de los materiales nanométricos, al reducir el tamaño del material, la respuesta del Plasmón de superficie puede variar debido a tres características principales del material; el tamaño, la forma y el tipo de material del cual este hecho la nanopartícula (Coffey, 2017). El Plasmón de superficie de un material en bulto responde de manera diferente que un material que tenga dimensiones menores a 100 nm y esto es debido a la dimensión de la forma geométrica a esta escala, lo que permite tener una señal de respuesta de la banda del Plasmón de superficie mucho más fuerte que la de un material en bulto, siempre y cuando la onda electromagnética con la que se quiera excitar a los electrones del material, este a la misma frecuencia de resonancia a la que está el Plasmón de superficie del propio material, ya que de no ser así entonces la onda electromagnética no se absorberá y la respuesta del Plasmón será muy pobre. Otra característica de la que depende una buena respuesta del Plasmón de superficie es la forma, ya que la longitud de onda del Plasmón puede recorrerse hacia el azul o al infrarrojo dependiendo del acomodo de los electrones en el nanomaterial. Como se mencionó anteriormente, el material del cual este hecha la nanopartícula, también afecta en la respuesta del Plasmón de superficie, ya que en el caso de tener el mismo tamaño y la misma forma pero diferente material, entonces el Plasmón se verá afectado debido a la densidad de electrones que cada material dispone. Un incremento en la densidad de electrones causa un incremento en la frecuencia del Plasmón de resonancia (Coffey, 2017).

Existen diversas técnicas de caracterización espectroscópicas que permiten tener información sobre el SPR de las nanopartículas de oro y los cambios a los que se enfrenta cuando su Plasmón sufre cambios por adsorción de moléculas en su superficie. Cuando se adsorben moléculas en la superficie de la nanopartícula, se observa un desplazamiento hacia el rojo del pico de la banda SPR (**Figura 2**) (Asahi, Uwada, & Masuhara, 2006; Elahi et al., 2018).

### 1.1.5 Síntesis de nanopartículas de oro por el método de Turkevich



**Figura 2.** Mediante el estudio la banda de Plasmón superficial se puede conocer información relacionada al tamaño (A), la forma (B) y el tipo de material (C). Tomada de Jeong, 2017.

De manera general, la síntesis de nanopartículas metálicas sigue un mismo proceso en el que se utiliza un agente precursor; posteriormente se añade un agente reductor y al final, si es necesario, se agrega un agente estabilizante, y durante todo el proceso se cuidan parámetros de concentración y temperatura de cada uno de los agentes que componen la síntesis. Además de las condiciones ya mencionadas, es necesario hacer énfasis que también la síntesis puede variarse no solo en el material del cual se quieran obtener las nanopartículas, si no también existen diferentes agentes reductores y estabilizantes que pueden afectar de manera directa las propiedades fisicoquímicas (Zhao, Li, & Astruc, 2013).

En particular, las nanopartículas de oro al ser uno de los materiales más utilizados y estudiados en el área de la Nanotecnología, se han hecho diversas variaciones al método de síntesis para

obtener nanopartículas de oro, buscando tener nanopartículas con tamaños y formas homogéneos y monodispersos, que puedan proporcionar propiedades específicas según el requerimiento. Turkevich y colaboradores desarrollaron un método de síntesis de nanopartículas de oro en 1953 mediante el uso de ácido cloroáurico ( $\text{HAuCl}_4$ ) con ácido cítrico en agua hirviendo, donde el citrato actúa como agente reductor y como estabilizante, confiriendo una carga negativa en la superficie (Turkevich, Stevenson, & Hillier, 1969). Frens refinó más el método y le cambió la relación entre oro y citrato para tener un mayor control en el tamaño de las partículas. Este protocolo ha sido extensamente utilizado para la síntesis de nanopartículas de oro (AuNP) que tienen diámetros entre 10 a 20 nm (Philip, 2008; Zhao et al., 2013).

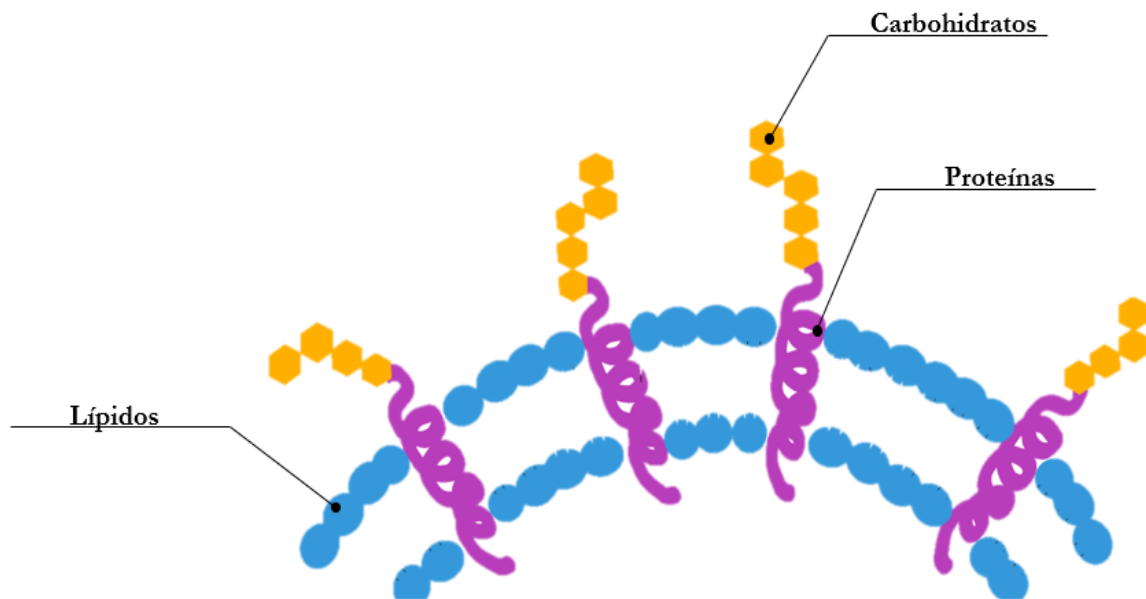
El método Turkevich de consiste en dejar en agitación y llevar hasta punto de ebullición al precursor. Una vez alcanzado el punto de ebullición, hay una mayor presencia de iones oro libres en la solución que se reducirán al agregar el citrato de sodio, lo que permite que los átomos de oro comiencen a agruparse formando pequeños núcleos en la solución. Esto se ve reflejado en el cambio de color del coloide de amarillo claro a negro, y pasados 10 min aproximadamente en agitación constante y a temperatura de  $95^\circ\text{C}$ , el color vuelve a cambiar de negro a rojo tinto, debido al crecimiento de las nanopartículas, para este punto se sabe que hay presencia de nanopartículas de oro entre 10 a 20 nm (S. Kumar, Gandhi, & Kumar, 2007).

#### 1.1.6 Carbohidratos en membranas celulares

#### *1.1.7 Carbohidratos en membranas y comunicación celular*

La membrana plasmática envuelve la célula definiendo sus límites y manteniendo las diferencias esenciales de concentración de componentes celulares entre el citosol y el ambiente extracelular. La membrana celular está constituida por proteínas, lípidos y carbohidratos, donde es bien conocida por los especialistas la función de los lípidos y las proteínas, sin embargo, la función

de los carbohidratos es poco clara. Los carbohidratos que se encuentran en la membrana celular forman glicoconjugados con las proteínas y los lípidos mediante enlaces covalentes, a estos glicoconjugados se les conoce como glicoproteínas y glicolípidos respectivamente como se representa en la figura 3.



**Figura 3.** Los carbohidratos ubicados en la membrana plasmática son la primera barrera de contacto con agentes externos.

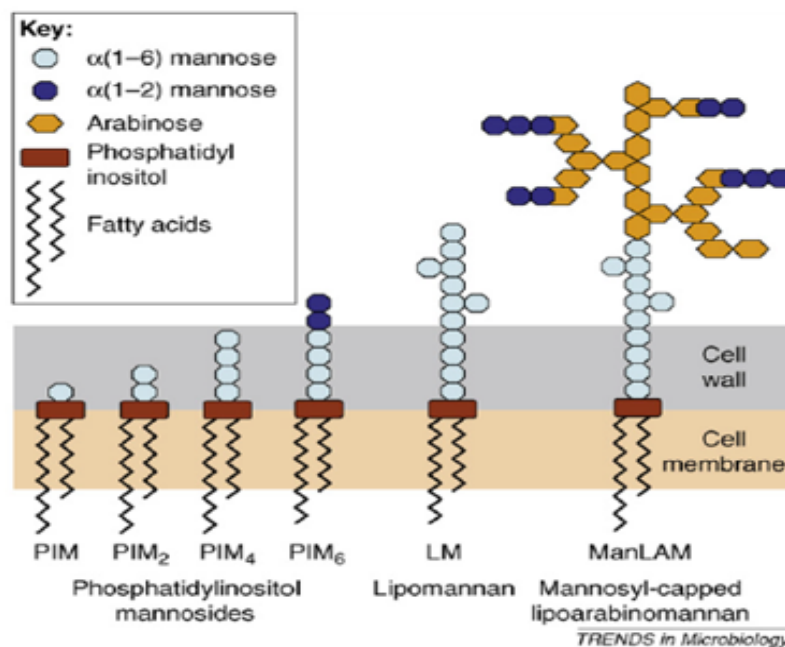
Dependiendo de la especie y el tipo de célula, el contenido de carbohidratos en la membrana plasmática se encuentra en un rango que va del 2 al 10 % del peso total. Más del 90 % de los carbohidratos presentes en la membrana, están unidos a proteínas, formando glicoproteínas y el resto de carbohidratos está unido a lípidos, formando glicolípidos (Geoffrey, 2000).

De manera más específica, hay diferentes microorganismos como bacterias y hongos que cuentan con una densa estructura que los rodea por encima de su membrana celular; a esta estructura se le denomina pared celular, la cual puede variar dependiendo del microorganismo.

Sin embargo, de manera general está constituida por estructuradas biomoléculas, dentro de las cuales los carbohidratos están presentes formando glicoconjugados con proteínas y lípidos.

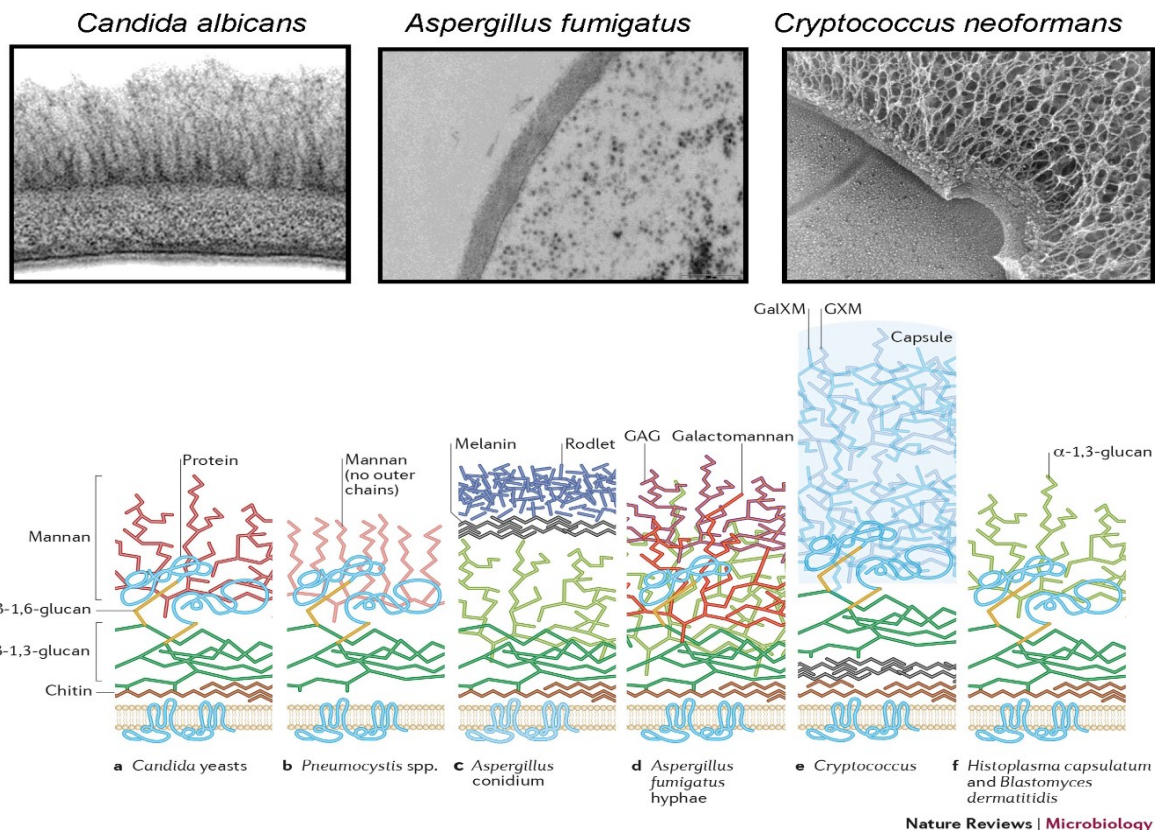
En el caso de la pared celular de las bacterias, los carbohidratos están mayormente asociados a lípidos formando glicolípidos, fosfolípidos glicosilados o carbohidratos complejos con péptidos o ácidos micólicos (Winzler, n.d.). Las porciones glicosiladas de estas moléculas están involucradas con la interacción con componentes asociados a la respuesta inmune. En las células eucariotas los glicolípidos participan en mecanismos de comunicación celular, pero en el caso de diferentes microorganismos se les considera factores de virulencia. Un ejemplo es el de las micobacterias, género que cuenta con una gran cantidad de glicoconjugados (figura 4), que están estrechamente relacionados con la patogenicidad (Ka, Pawlowski, Hamasur, & Svenson, 2008)

**Estructura esquemática de Lipoarabinomanano (LAM) y sus precursores.**



**Figura 4.** Tres componentes más importantes de la pared células de las micobacterias son Lipoarabinomanano (LAM), lipomanano (LM) y fosfatidilmiinositol manosido (PIM). Estos componentes se unen de forma no covalente a la membrana plasmática a través de su anclaje de fosfatidil-mio-inositol, y se extienden hacia el exterior de la pared celular. Gow, Latge, & Munro, 2017

En el caso de los hongos, la pared celular está formada por una densa capa de carbohidratos que en su mayoría están unidos a proteínas. Los carbohidratos que principalmente constituyen a la pared celular de los hongos son los glucanos (polisacáridos formados específicamente por unidades monómeras del monosacárido D-glucosa), ubicados junto a la membrana celular, y por encima de la zona donde están los glucanos hay otra zona llamada manano, compuesta principalmente por polímeros de manosa, ligados a proteínas. Esta disposición de diferentes azúcares cambia según el tipo de hongo como se muestra en la Figura 5. Estas estructuras están estrechamente relacionadas con diferentes procesos que tienen que ver con la respuesta inmune de otros organismos, también están relacionados con el balance de la flora intestinal, y con la interacción con otros microorganismos. (Gow, Latge, & Munro, 2017)



**Figura 5.** Organización estructural de las paredes celulares de patógenos fúngicos. Las representaciones muestran los componentes principales de la pared celular y la hipótesis actuales sobre sus interconexiones. En los tres hongos se observa la presencia de una capa abundante de diferentes azúcares entre los que destaca la manosa. Adaptada de: (Gow, Latge, & Munro, 2017).

### *1.1.8 Reconocimiento de carbohidratos por lectinas*

Al grupo de carbohidratos unidos a proteínas (glicoproteínas) y a lípidos (glicolípidos), se les conoce como glicanos. Con lo mencionado anteriormente, queda claro que los glicanos al estar presentes en la parte externa de diferentes microorganismos, se sabe que están involucrados en casi todas los procesos biológicos de comunicación entre las células y el mundo exterior, además de estar involucrados en la patogenia. Sin embargo, al tener poca información sobre su desempeño en diferentes procesos biológicos, los últimos años ha surgido el área de la glicociencia la cual se enfoca en definir las estructuras y entender los roles funcionales en los diferentes sistemas biológicos en los que participan los glicanos. Esta área se ha enfocado en estudiar las diferentes interacciones entre los glicanos y la diferente biomoléculas con las que interacciona, dentro de las cuales la que más llama la atención, es la interacción carbohidrato-proteína que está dada por moléculas proteicas. Estas proteínas con unión a carbohidratos incluyen anticuerpos, lectinas, receptores, toxinas o enzimas (Hart & Copeland, 2010). Dichas interacciones de glicanos con proteínas con unión a carbohidratos pueden promover la adhesión celular, las interacciones entre la matriz y la célula, la señalización celular, el plegamiento de glicoproteínas y la orientación intracelular / extracelular a los organelos. Además, los glicanos unidos a las macromoléculas ejercen el control a través de mecanismos indirectos sobre la conformación, estabilidad, oligomerización, tiempo de residencia de la superficie celular y el recambio de glicoproteínas (Cummings & Pierce, 2014).

Una de las clases de proteínas con unión a carbohidratos que llama más la atención está constituido por las lectinas. Las proteínas involucradas tienen sitios de reconocimiento específicos de azúcares, y se sabe son partícipes en muchos procesos biológicos. Este tipo de moléculas se conocen desde hace mucho tiempo, la primera lectina fue informada por Peter



Hermann Stillmark en 1888, quién aisló la ricina de las semillas de ricino (*Ricinus communis*) y la describió como una proteína extremadamente tóxica. Stillmark también probó la reactividad de los extractos de proteínas parcialmente purificados hacia los glóbulos rojos y observó un agrupamiento de las células. Este fenómeno fue analizado con más detalle en los años que siguieron a su descubrimiento. En 1898, Elfstrand describió la actividad de las proteínas para agrupar o aglutinar eritrocitos, lo que llevó a la introducción del término "aglutinina". Poco después del descubrimiento de la ricina se han identificado varias proteínas tóxicas. Sin embargo, a medida que se purificaban más y más sustancias, se hizo evidente que no todas las proteínas con actividad aglutinante son tóxicas. Landsteiner y Raubitschek (1907) presentaron evidencia de lectinas no tóxicas de semillas de leguminosas, en particular *Phaseolus vulgaris* (frijol), *Pisum sativum* (guisante), *Lens culinaris* (lenteja) y *Vicia sativa* (veza). (Sharon & Lis, 2004; Walker, 2014)

El término "lectina" (derivado del latín *legere*, que significa seleccionar, elegir) fue introducido por primera vez por Boyd y Shapleigh en 1954 para referirse al hecho de que las lectinas pueden reconocer y unirse a estructuras específicas de carbohidratos. Además, algunas lectinas de plantas tienen la capacidad de distinguir entre eritrocitos de diferentes tipos de sangre y, por lo tanto, pueden seleccionar ciertos tipos de células. Sin embargo, esta selectividad no es una característica general de las lectinas vegetales (Walker, 2014). Las lectinas están presentes en cualquier tipo de organismo y se pueden clasificar dependiendo de su origen. Una de las primeras lectinas descubiertas fue la Con-A.

#### 1.1.8.1 Concanavalina A

La Con-A es una lectina de origen vegetal con capacidad de aglutinar. Esta lectina proviene del frijol, *Canavalia ensiformis*, y fue descubierta por James B. Sumner, quien observó que la lectina

tenía la capacidad de reconocer  $\alpha$ -D-manosil y al  $\alpha$ -D-glucosil. La Con-A es una proteína constituida por 237 aminoácidos que a su vez le otorgan un carácter fluorescente a la proteína. Otra característica acerca de la Con-A es que, dependiendo del pH, puede presentar una estructura en forma de tetrámero (pH=7) o una estructura en forma de dímero (pH=5) (Sharon & Lis, 2004; Sharon, Lis, Sharon, & Lis, 2018; Walker, 2014; X. Wang, Xu, Wang, Wang, & Chen, 2016; Welch, Turner, & Preast, 2008). Esta proteína se ha empleado en diferentes áreas biológicas tanto para hacer ensayos para cuantificar proteínas como para reconocimiento de microorganismos (Hurkat, Jain, & Jain, 2012; Van Der Wel et al., 2017; Xu et al., 2017).

#### 1.1.9 Funcionalización de nanopartículas con proteínas

Siguiendo en una línea multidisciplinaria, ha surgido el interés de conjuntar el uso de los nanomateriales para el estudio de los glicanos, en este sentido ha surgido el área de la Gliconanotecnología. La sinergia entre la Nanotecnología y el estudio de los glicoconjugados se ve favorecida debido a las dimensiones similares que tienen. Una de las áreas que busca explorar la Gliconanotecnología es la interacción entre carbohidratos-proteína, debido a la presencia de estas interacciones en diferentes procesos biológicos que pueden afectar o beneficiar a los diferentes organismos. En este sentido una de las maneras en las que la Gliconanotecnología ha abordado el estudio de esta interacción, es mediante el biomimetismo de diferentes nanoestructuras recubiertas de proteínas con el fin de que puedan reconocer carbohidratos, tales como las lectinas (Reichardt & Marti, 2013).

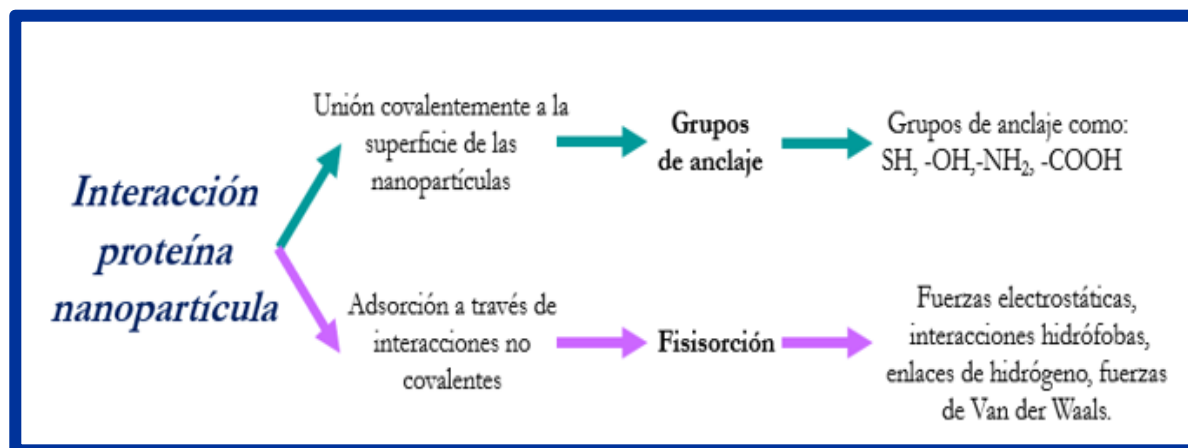
#### *1.1.10 Nanopartículas funcionalizadas con proteínas para detección de azúcares.*

Explorando la funcionalización de NP-proteínas, se ha encontrado que cuando estas están expuestas al mismo medio en el que están las NP, tienden a formar una estructura denominada

corona proteica. Dicha disposición de proteínas alrededor de NP, le confiere al nanomaterial una nueva identidad biológica. Este hecho se ha visto cuando las NP entran en contacto en el torrente sanguíneo con la posibilidad de que ahora con la nueva identidad las células puedan reconocer al nanomaterial como un agente no patógeno. Por otra parte, también se ha estudiado el biomimetismo de NP con diferentes proteínas, con la finalidad de aplicar estos nanomateriales en diferentes áreas como el diagnóstico de enfermedades y el acarreo de fármacos (Rahman, Laurent, Tawil, & Yahia, 2013).

### 1.1.11 Formación de la biocorona.

Se han explorado diferentes maneras de adsorción de proteínas en la superficie de las NP, las cuales se pueden clasificar en fisisorción y quimisorción, donde la primera se refiere a conexiones multi sitio no específicas, no covalentes, que incluyen fuerzas electrostáticas, interacciones hidrófobas, enlaces de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, mientras que la segunda requiere la presencia de un grupo de anclaje en la superficie de la biomolécula, que sean capaz de unirse covalentemente a la superficie de la nanopartícula de oro; los ejemplos típicos incluyen -SH, -OH, -NH<sub>2</sub>, -COOH (figura 6) (C. Kumar, 2010).



**Figura 6.** La corona de proteínas alrededor de nanopartículas puede formarse ya sea por la previa funcionalización de la nanopartícula con grupos de anclaje, o bien por diferentes fuerzas de interacción entre la proteína y la superficie de la nanopartícula, estas fuerzas de interacción dependen de diferentes factores como tipo de material y el pH por mencionar algunos. Adaptado de C. Kumar, 2010.

El proceso de formación de la corona proteica en la superficie de las NP suele ser dinámico, en el cual se forman dos capas de coronas proteicas, una corona de proteínas “dura” y otra corona de proteínas “suave”. La corona de proteínas dura consiste en proteínas con altas afinidades de unión que están estrechamente ligadas y muestran tiempos de intercambio mayores que el tiempo necesario para la internalización de una partícula, mientras que las proteína que conforman la corona suave tienen una alta tasa intercambio con las proteínas que tengan menor afinidad por unirse a la superficie de la NP (Tabla 1). En la práctica, la corona dura se puede definir como aquellas proteínas que no se eliminan de la superficie del nanomaterial durante los procedimientos de preparación, como el lavado y la centrifugación. Estos procedimientos pueden interrumpir las interacciones proteína-proteína relativamente débiles que eliminarían la corona de proteína blanda (Pederzoli et al., 2017; Winzen et al., 2015a).

**Tabla 1.** Características de la Corona dura y Corona Sauave. Adaptada de Corbo & Toledo, 2016.

<b>Corona dura</b>	<b>Corona suave</b>
Mayor energía de adsorción	Menor energía de adsorción
Menor disociación	Mayor disociación
Interacción directa con la NP	Interacción proteína-proteína
Proteínas ligadas estrechamente a la NP	Proteínas unidas débilmente a la NP
Estable en la superficie de la NP	Inestable interacción con la superficie de la NP
Capaz de influir en la respuesta funcional	Incapaz de influir en la respuesta de la NP

Las fuerzas que participan en la interacción entre las proteínas y la superficie de las NP son interacciones de Van de Waals, Fuerzas de Coulomb, interacciones hidrófobas, y puentes de

hidrógeno. Dicha interacción se va a ver afectada por las características del nanomaterial, la proteína y el medio en el que se encuentren. (Gehr Peter, 2019).

Dichas características se pueden estudiar mediante el uso de diferentes técnicas de caracterización, destacando el uso de métodos espectroscópicos y microscópicos, así como también el uso de ensayos biológicos (Capjak, Goreta, Jurašin, & Vrček, 2017; Cheema, 2017; Nel et al., 2009).

### 1.1.12 Métodos de caracterización

#### 1.1.13 Espectroscopía UV-Vis

Esta técnica de caracterización aborda la zona del espectro que va de 190 a 800 nm. Cuando una onda electromagnética de esta zona espectral interactúa con algún material, el material absorbe dicha energía, que permite que los electrones sean excitados de su orbital basal a otro de mayor energía (Royal Society of Chemistry, 2009).

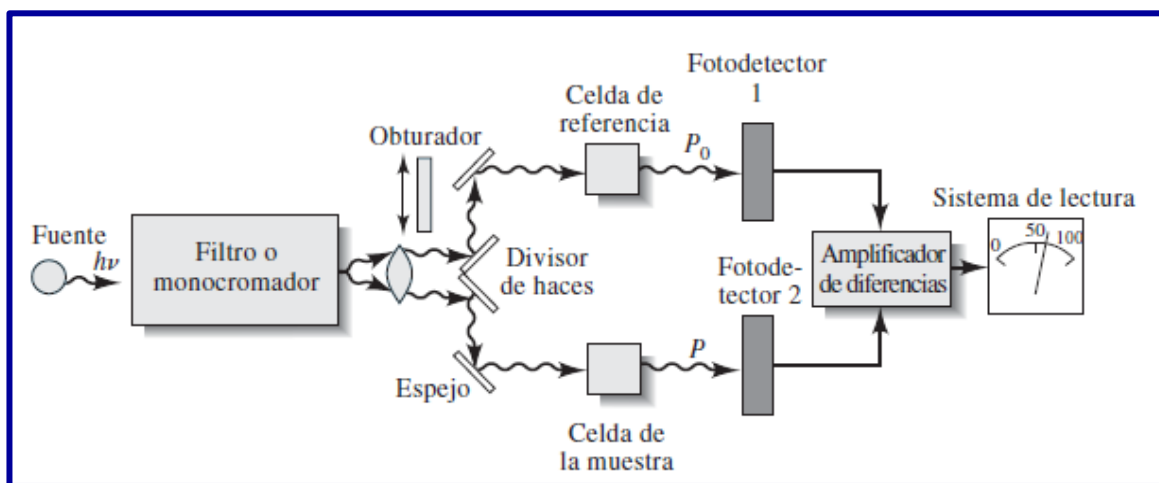
La espectroscopía por absorción molecular se basa en la medición de la transmitancia  $T$  o de la absorbancia  $A$  de soluciones que están en celdas transparentes que tienen una longitud de trayectoria de  $b$  cm. Normalmente, la concentración de un analito absorbente se relaciona en forma lineal con la absorbancia según la ley de Beer:

$$A = -\log T = \log \frac{p_0}{p} = \epsilon bc$$

Donde  $A$  es la absorbancia,  $T$  es la transmitancia,  $P_0$  es la potencia radiante incidente,  $P$  es la potencia radiante transmitida,  $\epsilon$  es la absorptividad molar,  $b$  es la longitud de la trayectoria de la muestra y  $c$  es la concentración del absorbente. (Skoog, Nieman, & Holler, 2008)

En cuanto a la instrumentación para esta técnica, muchos fotómetros y espectrofotómetros modernos se basan en un diseño de haz doble. En la figura 7 se ilustra un instrumento de doble haz en el espacio en el cual se forman dos haces mediante un espejo en forma de V llamado divisor de haz. Un haz pasa a través de la solución de referencia y continua hasta un fotodetector. En forma simultánea, el segundo rayo atraviesa la muestra hasta un segundo detector ajustado. Las dos señales de salida se amplifican y su cociente, o bien, el logaritmo de su cociente se determina de manera electrónica y se representa mediante un dispositivo de lectura (Skoog et al., 2008).

En el caso de los nanomateriales metálicos, esta técnica permite obtener información acerca del tamaño, la forma y la presencia de aglomerados. Esto se debe al Plasmón de resonancia superficial que presentan los nanomateriales específicamente metálicos, como ya se ha mencionado anteriormente (Cruz et al., 2012).



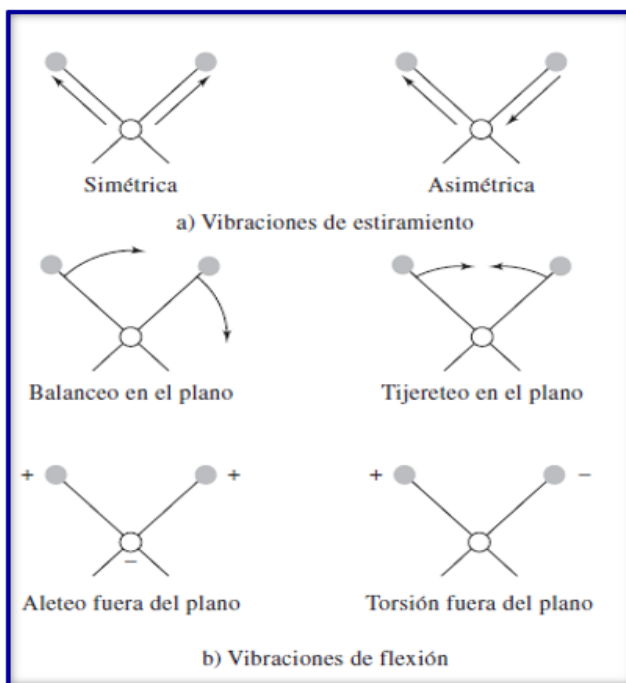
**Figura 7.** Se ilustra un instrumento de doble haz. En este caso, la radiación proveniente del filtro o monocromador se divide en dos haces que atraviesan de manera simultánea las celdas de referencia y de la muestra antes de chocar con los fotodetectores que se han hecho corresponder. (Skoog et al., 2008)

En el caso de los nanomateriales metálicos, esta técnica permite obtener información acerca del tamaño, la forma y la presencia de aglomerados. Esto se debe al Plasmón de resonancia superficial que presentan los nanomateriales específicamente metálicos, como ya se ha mencionado anteriormente (Cruz et al., 2012).

#### *1.1.14 Espectroscopía FTIR*

Esta técnica de caracterización aborda la zona del infrarrojo del espectro electromagnético. Las moléculas que presentan momento dipolar donde vibran alrededor de su posición de equilibrio, similar a un oscilador armónico (estado basal). Para aumentar la amplitud del movimiento vibratorio de los átomos de enlace (estado excitado), es necesario que la frecuencia de la radiación electromagnética con la que se va a incidir una molécula sea la misma frecuencia de vibración del momento dipolar del enlace que forma a la molécula. En este sentido la molécula va a absorber la energía produciendo que el momento de la molécula resuene con el campo eléctrico de la radiación electromagnética produciendo con el aumento de la amplitud del movimiento vibratorio de la molécula. La radiación electromagnética de origen infrarrojo tiene suficiente energía para aumentar la vibración del momento dipolar del enlace que forma a una molécula, esta energía es mucho mejor comparada con la radiación ultravioleta o visible que permiten excitar a los electrones. (Barth, 2007; Hammouda, n.d.; Ismail, Voort, & Sedman, 1997; Mondragón, 2000)

Existen diferentes modos de vibración de las moléculas, vibración de tensión, la cual consiste en un cambio continuo en la distancia entre los átomos, puede ser dividida en tensión simétrica y asimétrica. También está el modo de vibración de flexión, que consiste en un cambio en el ángulo de enlace, se divide en balanceo en el plano y fuera del plano, y torsión en el plano y fuera del plano (Figura 8) (Avila et al., 2018; G, 2001; Healthcare GE Sciences Life, 2013).



**Figura 8.** Tipos de vibraciones moleculares. Note que + indica movimiento desde plano de la página hacia el lector y - indica un movimiento desde el plano de la página alejándose del lector. (Skoog et al., 2008)

Cuando se da un fenómeno de absorción que produce un aumento en la vibración de una molécula en la cantidad de energía absorbida y transmitida va a ser diferente por lo que cuando el detector del espectrofotómetro, los datos obtenidos generan un espectro demostrando que tanta fue la energía absorbida a diferentes frecuencias por la muestra, logrando distinguir así las moléculas con momentos dipolares que forman al compuesto en estudio. (Ismail et al., 1997)

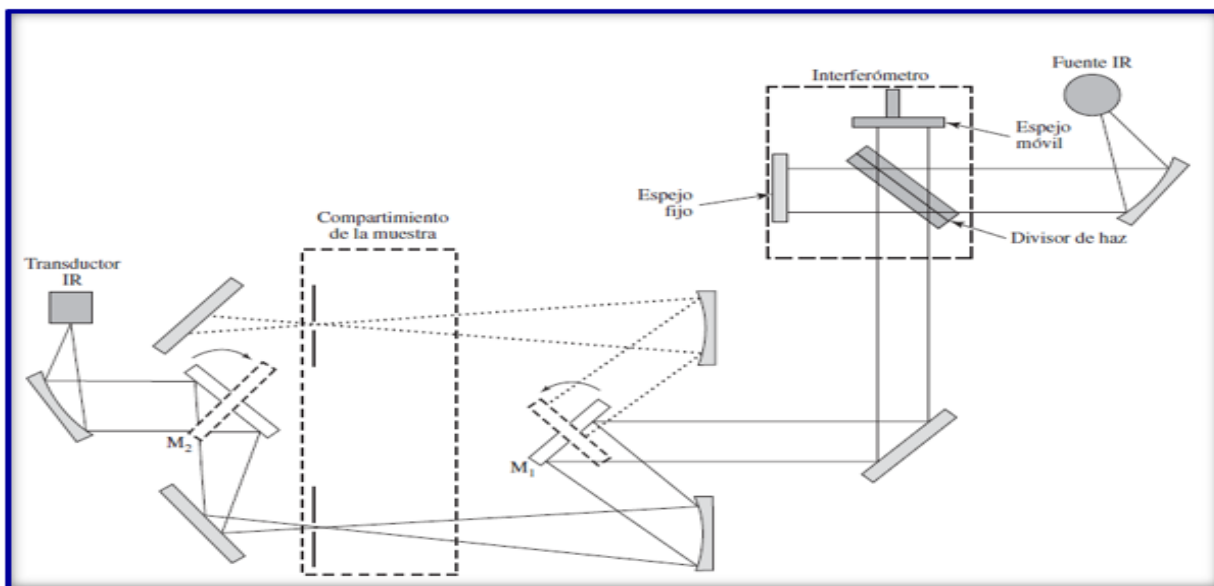
A nivel instrumental se utiliza espectrómetros de transformada de Fourier para efectuar mediciones en el infrarrojo mediano y lejano, debido a su velocidad, confiabilidad, ventaja en la relación señal ruido y comodidad.

Los espectrómetros de infrarrojo de transformada de Fourier son instrumentos de un solo haz o de doble haz. Un procedimiento característico para determinar la transmitancia o la absorbancia con este tipo de instrumento consiste, en primer lugar, en obtener un interferograma de referencia mediante barridos de una referencia (por lo general, aire) 20 o 30 veces, acumular los datos y



almacenar los resultados en la memoria de la computadora del instrumento (casi siempre, después de convertirlos en el espectro). A continuación, se coloca la muestra en la trayectoria de la radiación y se repite el proceso. Se calcula entonces la relación entre los datos espectrales de la muestra y la referencia, y se obtiene la transmitancia a distintas frecuencias. Con esta relación se calcula la absorbancia en función del número de onda. De ordinario, las fuentes y detectores modernos tienen la estabilidad suficiente como para que los espectros de referencia se tengan que obtener solo en forma ocasional.

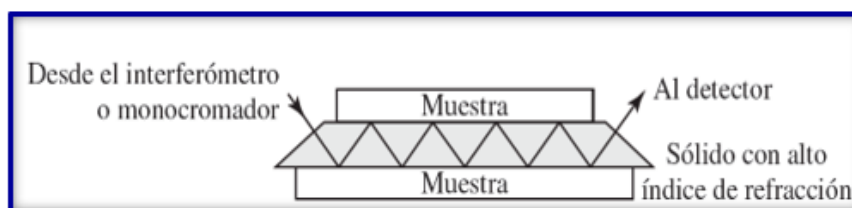
En la figura 9, se ilustra un espectrómetro de doble haz. Los espejos que dirigen el haz del interferómetro a través de la muestra y de las celdas de referencia oscilan rápidamente en comparación con el movimiento del espejo del interferómetro, de modo que la información de la muestra y de la referencia se puede obtener en cada una de las posiciones del espejo. El diseño de doble haz compensa las derivas de la fuente y del detector.



**Figura 9.** Espectro de IR de transformada de Fourier de doble haz. El rayo que sale del interferómetro choca con el espejo M1, el cual dirige al haz a través de la celda de referencia, y en otra posición dirige a través de la celda de la muestra. El espejo M2, que está sincronizado con M1, dirige de manera atenuada el haz de referencia y el haz de la muestra hacia el transductor (Skoog et al., 2008).

Para muestras que presentan alguna dificultad asociada a sólidos de limitada solubilidad, películas, fibras, pastas, adhesivos y polvos, es posible utilizar diferentes adaptadores instrumentales que facilitan la medición en las muestras ya mencionadas. En la actualidad, la mayoría de los fabricantes de instrumentos IR de transformada de Fourier ofrece unos adaptadores que se instalan en los compartimientos de las celdas y permiten realizar mediciones de reflectancia difusa.

En la figura 10 se ilustra un aparato para la medición de la reflectancia atenuada total. Como se puede apreciar en la figura superior, la muestra, en este caso, un sólido, se coloca sobre las caras opuestas de un material cristalino transparente con un alto índice de refracción. Al efectuar ajustes adecuados del ángulo incidente, la radiación experimenta múltiples reflexiones internas antes de pasar del cristal al detector. En cada una de esas reflexiones tiene lugar la absorción y la atenuación. En la figura 10 se muestra un esquema óptico de un adaptador que se instala dentro del área de la celda de la mayor parte de los espectrómetros de infrarrojo y permite medir la reflectancia atenuada total. También hay celdas para muestras líquidas (Skoog et al., 2008).



**Figura 10.** Se muestra un accesorio representativo para reflectancia atenuada total (Skoog et al., 2008).

### 1.1.15 Espectroscopía Raman

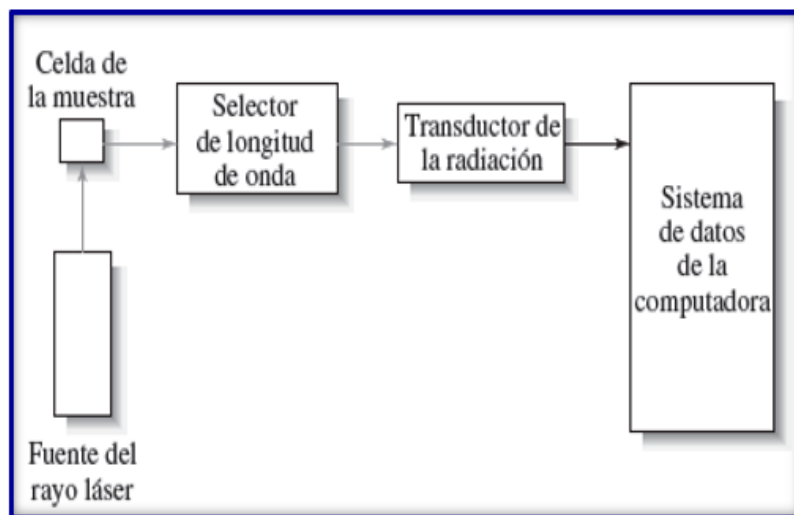
Esta técnica de caracterización aborda la región espectral del infrarrojo cercano, es decir de 785 a 1064 nm. En esta técnica de caracterización la luz se va a dispersar en la muestra por efecto del campo eléctrico y va a polarizar una molécula, lo que dará como resultado un momento

dipolar inducido en la molécula. La polarizabilidad es la deformabilidad de la nube electrónica sobre la molécula por efecto de un campo eléctrico. Resultado del momento dipolar inducido, causado por la polarización de la molécula, se pueden generar diferentes señales que van a ser captadas por el detector del equipo. Estas señales, dependen del tipo de frecuencia de salida de la muestra. Si la longitud de onda y la frecuencia de salida de la luz emitida por la muestra es la misma que la incidente, entonces el proceso no pierde energía dispersada elásticamente, caso contrario cuando la longitud de onda y la frecuencia de salida de la luz emitida por la muestra es diferente que la incidente, entonces el proceso pierde energía dispersada inelásticamente. La señal correspondiente donde no hay pérdida de energía se le conoce como Rayleigh, mientras que a la señal correspondiente donde sí hay pérdida de energía se le conoce como Raman. Las señales Raman se pueden clasificar en dos tipos Stokes y Anti-Stokes, donde la primera se produce cuando la frecuencia de salida es menor que la de entrada, mientras que la segunda se produce cuando la frecuencia de salida es mayor que la de entrada (Larkin, 2011; Solís et al., 2015).

Una desventaja de esta técnica de caracterización es que las señales Raman son débiles, sin embargo, una manera de poder amplificar estas señales es mediante el empleo de la técnica conocida como SERS (Surface enhanced Raman spectroscopy, por sus siglas en inglés). La mejora se debe a la amplificación de la luz mediante la excitación del Plasmón de resonancia superficial. Esta concentración de luz se produce preferentemente en los huecos, grietas o características afiladas de los materiales plasmónicos, que tradicionalmente son metales nobles (por ejemplo, plata, oro y cobre) con características a nanoescala. Gracias a estos materiales metálicos con dimensiones nanométricas es posible la amplificación de las señales Raman,

proporcionando información que es característica del material que se esté utilizando. (Sharma, Frontiera, Henry, Ringe, & Duyne, 2012)

Los instrumentos para la espectroscopía Raman moderna constan de una fuente láser, un sistema para iluminar la muestra y un espectrómetro apropiado, como se ilustra en la figura 12. Sin embargo, las características de funcionamiento de estos componentes son más rigurosos que para los espectrómetros moleculares que ya se describieron debido a la inherente debilidad de la señal de difusión de Raman comparada con la señal producida por la difusión de Rayleigh. En la figura 11 se puede observar un diagrama de bloques con los componentes de un espectrómetro Raman donde la radiación de rayo láser se dirige hacia la celda de la muestra. La difusión Raman se mide por lo regular en ángulos rectos para evitar ver la fuente de radiación. Un selector de longitud de onda aísla la región del espectro deseada. El transductor convierte la señal Raman en una señal eléctrica proporcional que es procesada mediante el sistema de datos de la computadora. (Skoog et al., 2008)

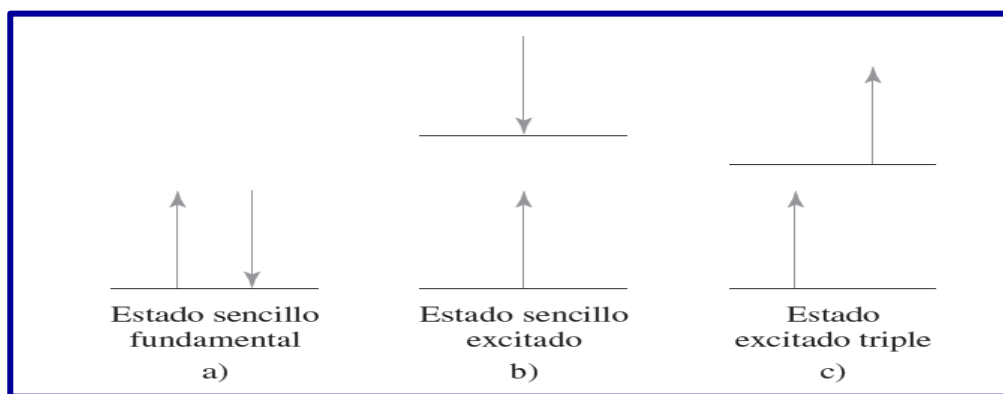


**Figura 11.** Diagrama de bloques de un espectrómetro Raman (Skoog et al., 2008).

### 1.1.16 Espectroscopía de fluorescencia

Esta técnica de caracterización aborda en su mayoría la zona del espectro ultravioleta (UV) y visible. Cuando una onda con una longitud característica del espectro UV o del visible interactúa con un electrón en estado fundamental, este puede ser excitado y cambiar a un nivel de energía mayor, provocando emisión de luz de menor energía.

La fluorescencia es un tipo de luminiscencia que depende del estado excitado. En la fluorescencia se va a emitir un fotón a causa de una transición de un electrón que se encuentra en un estado excitado de mayor energía a un estado base de menor energía, siempre y cuando previo a esta transición, el spin del electrón excitado sea contrario al spin del electrón del estado base, es decir que el electrón excitado se encuentre en un estado sencillo excitado (Figura 12). Este hecho se va a traducir en una tasas de emisión de fluorescencia de  $10\text{ s}^{-1}$ , por lo que una vida útil de fluorescencia típica es de aproximadamente  $10\text{ ns}$  ( $10 \times 10^{-9}\text{ s}$ ). La fluorescencia se produce típicamente a partir de moléculas aromáticas. (McPhie, 2000; Roger & Weiss, 2001)



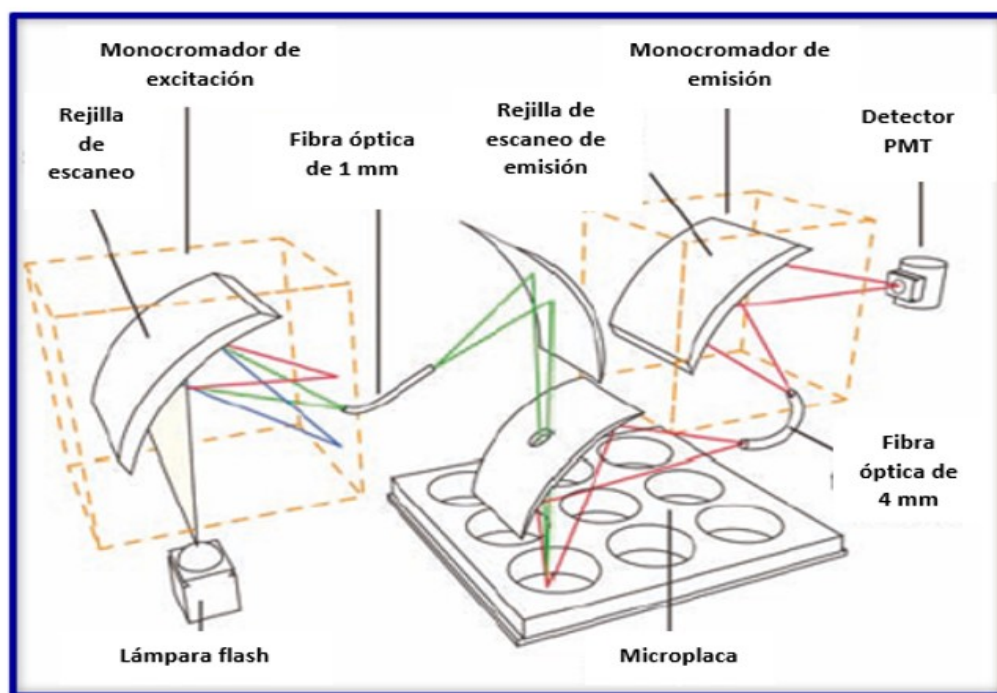
**Figura 12.** Estados electrónicos del espín de moléculas. En a) se ilustra el estado electrónico fundamental, donde los espines siempre están emparejados, por lo que se dice que el estado es sencillo. En b) y c) se muestran los estados electrónicos excitados. b) Si los espines siguen formando pareja en el estado excitado, la molécula está en un estado excitado sencillo. c) Si los espines ya no están emparejados, la molécula está en un estado excitado triple. (Skoog et al., 2008)

La intensidad de la fluorescencia puede disminuirse mediante una amplia variedad de procesos. Estas disminuciones de intensidad se denominan "Quenching". El quenching puede ocurrir por diferentes mecanismos. El quenching por colisión se produce cuando el fluoróforo en estado excitado se desactiva al entrar en contacto con alguna otra molécula en solución, a esta molécula se le denomina quencher. El fenómeno quenching ocurre en procesos de interacción por lo que se pueden hacer estudios para analizar un quenching y comprobar la interacción entre dos sistemas (Femenias, 2015; Govindaraju, Ankireddy, Viswanath, Kim, & Yun, 2017).

Los fluoróforos se dividen en dos clases generales: intrínsecos y extrínsecos. Los fluoróforos intrínsecos son aquellos que florecen de manera natural como: los aminoácidos aromáticos, NADH, clorofila, entre otros. Los fluoróforos extrínsecos son aquellos que se agregan a una muestra que no muestra las propiedades fluorescentes espectrales deseadas, como cloruro de dansilo, fluoresceína, rodamina y muchas otras sustancias (Roger & Weiss, 2001).

En la actualidad, los experimentos de fluorescencia están cambiando para poder analizar adecuadamente incluir muchas muestras. Dichos experimentos pueden incluir estudios utilizando microplacas, cada una con 384 o más pocillos. Dichas mediciones se realizan típicamente usando lectores de microplacas. Tal instrumento puede proporcionar rápidamente mediciones en numerosas muestras. La óptica utilizada en los lectores de microplacas es diferente a la de un instrumento diseñado para usar con una cubeta. Las placas de micropocillos deben permanecer horizontales, y no es posible usar la observación en ángulo recto como se puede usar con una cubeta. La Figura 13 muestra una ruta óptica típica para lectores de microplacas. La fuente de luz es una lámpara de flash de xenón, que se está volviendo más común en los instrumentos de fluorescencia. La longitud de onda de excitación deseada se selecciona usando un monocromador. Una característica única es el espejo con un orificio para transmitir la excitación. La fluorescencia, que ocurre en todas las direcciones, se dirige hacia la

óptica del detector por el mismo espejo. Típicamente, la microplaca se mueve para colocar cada pocillo en la ruta de observación mediante una etapa de exploración x-y. Algunos lectores de microplacas incluyen un segundo espejo debajo de la microplaca para facilitar ensayos basados en células o mediciones de absorción. Los lectores de microplacas se usan típicamente para mediciones de intensidad en una gran cantidad de muestras. Los lectores de microplacas están disponibles para la investigación de espectrofluorómetros que permiten la recolección de espectros, anisotropías y vidas (Lakowicz, 2010).



**Figura 13.** Arreglo óptico para un lector de microplaca para fluorescencia.

### 1.1.17 Difracción de rayos X

La difracción de rayos X (XRD, por sus siglas en inglés) es una técnica que permite conocer la estructura cristalina de un material. Esta técnica se fundamenta en la difracción de radiación electromagnética que comprende la zona de rayos X del espectro electromagnético al interactuar con un material cristalino, dando lugar a un patrón de difracción característico. Cuando las ondas que son dispersadas por el material interaccionan entre ellas de manera constructiva,

proporcionan información de los planos cristalinos del material (Aparicio, 2010). Este fenómeno cumple con la ley de Bragg que se representa por la siguiente expresión:

$$n\lambda = 2d\sin(\theta) \quad (1)$$

Donde  $n$  es un número entero,  $\theta$  es ángulo de difracción de los planos cristalinos,  $\lambda$  es la longitud de onda de rayos x y  $d$  es distancia de los planos cristalinos.

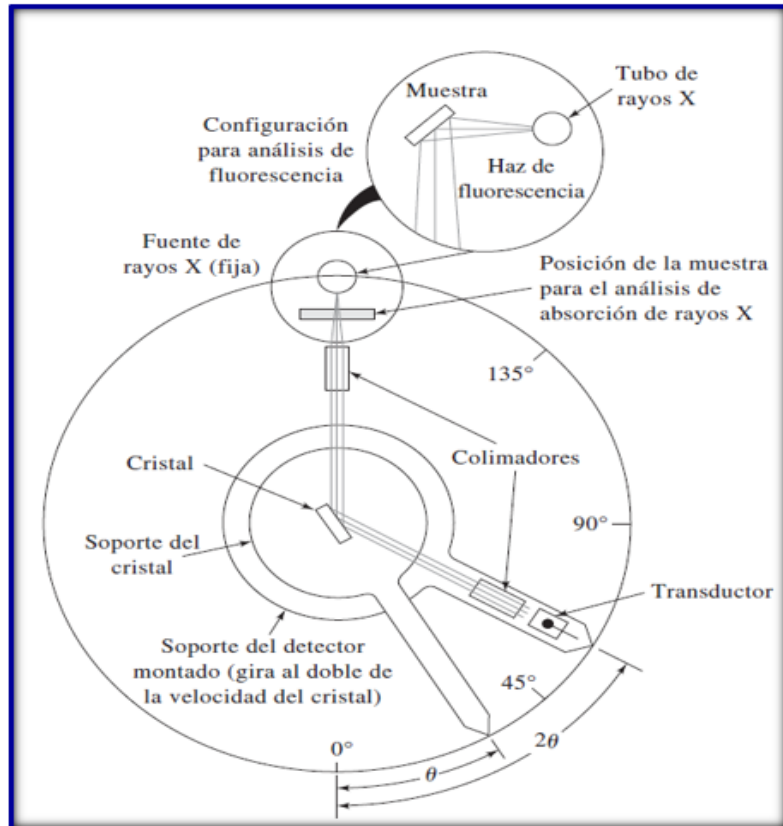
Una vez obtenido el patrón de difracción del material es posible conocer el arreglo cristalino e identificar el material que se está estudiando. (Kumari et al., 2016) En el caso de tener una muestra de nanopartículas a partir de su patrón de difracción, se puede calcular el tamaño del cristal mediante el uso de la ecuación de Sherrer, la cual se muestra a continuación:

$$D_p = \frac{k \lambda}{\beta_{1/2} \cos\theta} \quad (2)$$

Donde  $D_p$  es el tamaño del cristalito en la dirección evaluada,  $\lambda$  es la longitud de onda de la radiación de rayos x,  $\theta$  es el ángulo de difracción de la reflexión evaluada,  $k$  es la constante que depende de la forma del cristal, en el caso de partículas esféricas se considera  $k = 0.94$  y  $\beta_{1/2}$  es el ancho que presenta la reflexión a la mitad de la altura.

Para la técnica de difracción de rayos X, se utiliza un difractómetro que tiene un arreglo entre la fuente de rayos X, la muestra y el detector que se conoce como geometría Bragg-Brentano (Figura 14), la cual está construida en torno a un goniómetro de radio fijo. El haz de rayos X procedente del foco lineal del tubo incide sobre la muestra plana, situada en el eje del goniómetro y una rendija situada sobre el círculo del goniómetro re-enfoca el haz de rayos X difractado por la muestra dirigiéndolo hacia el detector, registrando la intensidad de los rayos X recibida frente al doble del ángulo de Bragg ( $2\theta$ ).





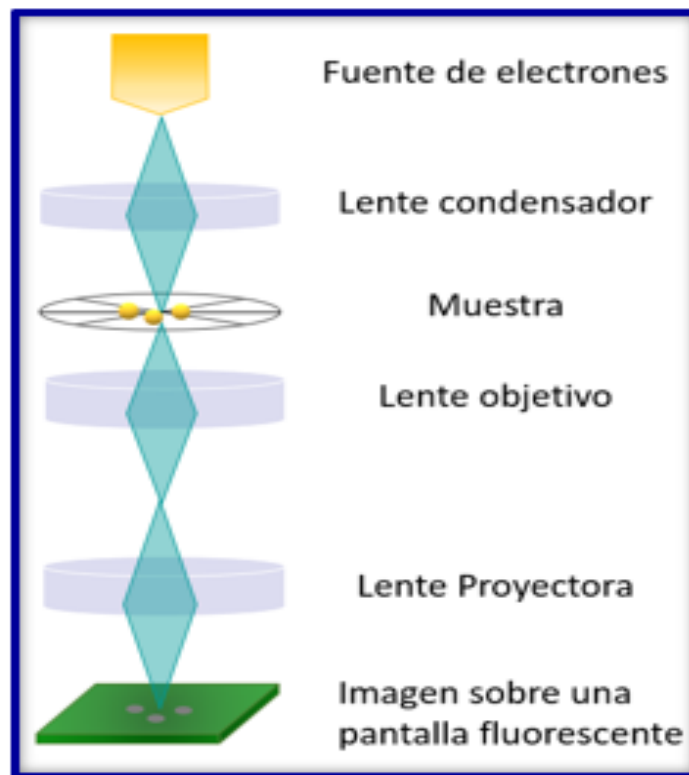
**Figura 14.** Arreglo Bragg-Brantano. El ángulo del detector respecto al haz ( $2\theta$ ) duplica el de la cara del cristal. En el caso de análisis de absorción, la fuente es un tubo de rayos X y la muestra se localiza el haz (Skoog et al., 2008).

### 1.1.18 Microscopía electrónica de transmisión

La microscopía electrónica de transmisión es una técnica de caracterización que se ha empleado en diferentes áreas de la ciencia, en la Nanotecnología es ampliamente utilizado para conocer el tamaño y la forma de las nanopartículas.

La obtención de las imágenes mediante microscopía electrónica de transmisión es gracias a que un haz de electrones que es acelerado a través de un sistema sometido a vacío, donde interviene un arreglo óptico compuesto por diferentes lentes magnéticas las cuales permiten direccionar a los electrones hacia el espécimen, obteniendo una imagen de la muestra que se está estudiando en una pantalla fluorescente (Tang & Yang, 2017).

El sistema de lentes está formado por lentes denominadas por su función como: condensadoras, objetivas, intermedias y proyectoras como se muestra en la Figura 15. Hay dos lentes condensadoras donde la primera reduce la imagen de la fuente mientras que la segunda lente obtiene la adecuada intensidad de iluminación. La lente objetivo forma la primera imagen, localizada debajo del espécimen. De ésta lente depende, en gran medida la resolución final. Esta lente, tiene dos componentes importantes: la apertura física (apertura de objetivo), localizada en el plano focal posterior de la lente, y un corrector de astigmatismo. Los diferentes tamaños de la apertura de objetivo permiten variar la proporción de electrones que son detenidos por esta apertura, lo que modifica el contraste de la imagen. Las lentes intermedia y proyectora son las encargadas de amplificar la imagen dada por la lente objetivo y proyectarla sobre la pantalla de observación.



**Figura 15.** Arreglo óptico de los principales componentes del microscopio electrónico de transmisión. Adaptado de: Aryal, 2018.

Los electrones al interactuar con el material lo pueden hacer de manera elástica y de manera inelástica. Se le conoce interacción elástica, cuando los electrones interactúan con la muestra cambian de dirección sin perder una cantidad apreciable de energía, mientras que la interacción inelástica es cuando no hay cambios de dirección y tampoco pérdida de energía. Ambas maneras en las que el haz de electrones interactúa con el material, producen en consecuencia diferentes señales dependientes del grosor del material, en el caso de TEM, el material normalmente es muy delgado por lo que las señales obtenidas son a partir de los electrones secundarios, los electrones difractados, los electrones transmitidos y los electrones no dispersados. A partir de las señales obtenidas, se crea un contraste de amplitud y de fase, donde la primera está relacionada con el grosor de la muestra que depende del número atómico. Por otra parte, el contraste de fase está relacionado con la diferencia de fase de los electrones dispersados. Gracias al contraste obtenido es que se puede visualizar la muestra de interés (Tang & Yang, 2017).

### *1.1.19 Dispersión Dinámica de Luz*

La técnica dispersión de luz dinámica, también conocida como espectroscopía de correlación de fotones, es una técnica de caracterización que permite conocer el diámetro hidrodinámico de las partículas. El diámetro hidrodinámico, también llamado diámetro Stokes-Einstein o diámetro de Stokes, representa el diámetro de una esfera dura hipotética que tiene el mismo coeficiente de difusión o viscosidad que la partícula bajo estudio (Giannini y compañía, 2011).

Esta técnica puede determinar el diámetro hidrodinámico de las partículas cuando a estas se les hace incidir luz, la cual es dispersada por las partículas que se encuentran dispersas en un medio líquido y presentan un movimiento browniano. Debido al movimiento browniano, la distancia entre las partículas (es decir, los centros de dispersión) varía con el tiempo, lo que crea interferencias constructivas y destructivas en la intensidad de la luz dispersada. Por lo tanto, la

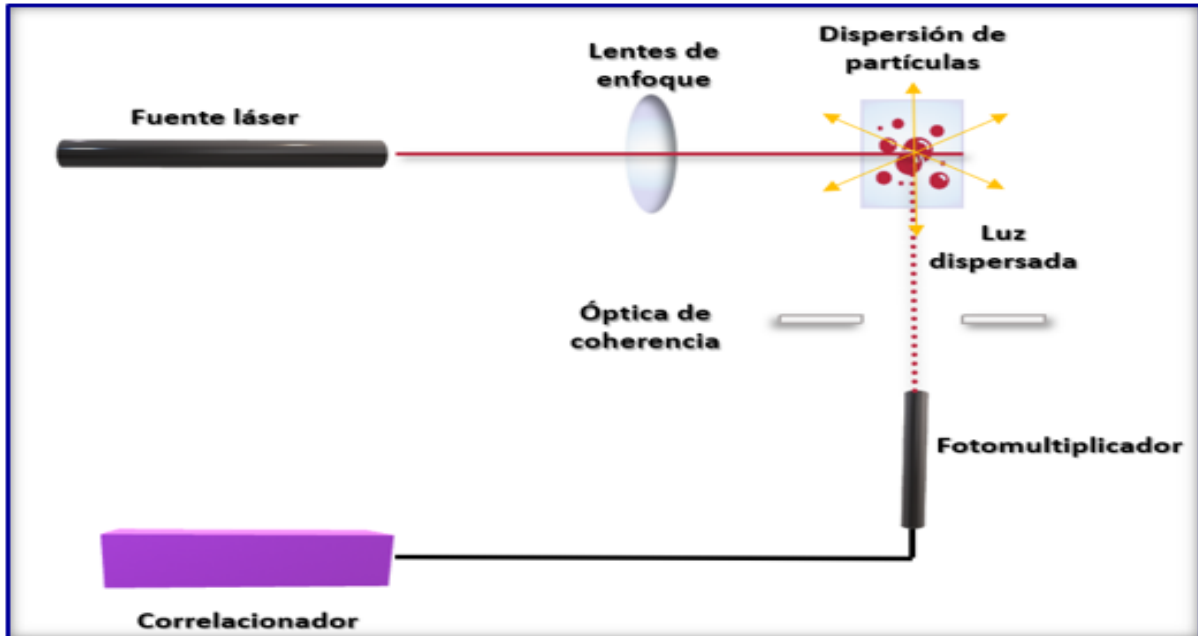
fluctuación de la intensidad de la luz dispersada en función del tiempo revela información sobre la velocidad de los centros de dispersión. Las partículas más grandes causarían tasas de fluctuación más pequeñas en la luz dispersada, mientras que las partículas más pequeñas y rápidas resultarán en tasas de fluctuación más altas (Bhattacharjee, 2016).

Aunque es útil y fácil de determinar, este análisis considera el tamaño hidrodinámico, que puede variar significativamente del verdadero tamaño físico. La velocidad de una partícula bajo el movimiento browniano cambia no solo con el tamaño físico y el comportamiento relacionado con el tamaño (por ejemplo, difusión o viscosidad), sino también con cualquier estructura y textura de la superficie (topografía, rugosidad, cargas), así como con la concentración y el tamaño de los iones presente en el medio. El diámetro hidrodinámico también cambia con los cambios en la forma de la partícula de una manera que afecta la velocidad de difusión. Los electrolitos desempeñan un papel en la velocidad de difusión de las partículas al alterar la interacción electrostática a través de su doble capa eléctrica conocida como la resistencia electroviscosa. Además, los fenómenos de aglomeración y fluctuación pueden afectar la medición del tamaño de partícula y el efecto resultante depende del tamaño y la cantidad de iones introducidos. En el caso de las partículas esféricas, si las partículas son más pequeñas que la longitud de onda de la luz utilizada, la luz dispersada por la partícula será principalmente isotrópica, lo que conlleva que ya no se determine un tamaño estimado exacto de las partículas (Pimentel & Martín-martínez, 2014; Thomas & Kalarikkal, 2017).

La dispersión de luz dinámica es una técnica establecida para medir el tamaño promedio y la distribución de tamaño de las partículas en una suspensión con estructuras esféricas o anisotrópicas. Este método analítico tiene la ventaja de ser rápido, no invasivo, sin requisitos de

calibración y sensibilidad a las nanopartículas, pero requiere bajas concentraciones de partículas (Hackley & Clogston, 2011; Thomas & Kalarikkal, 2017).

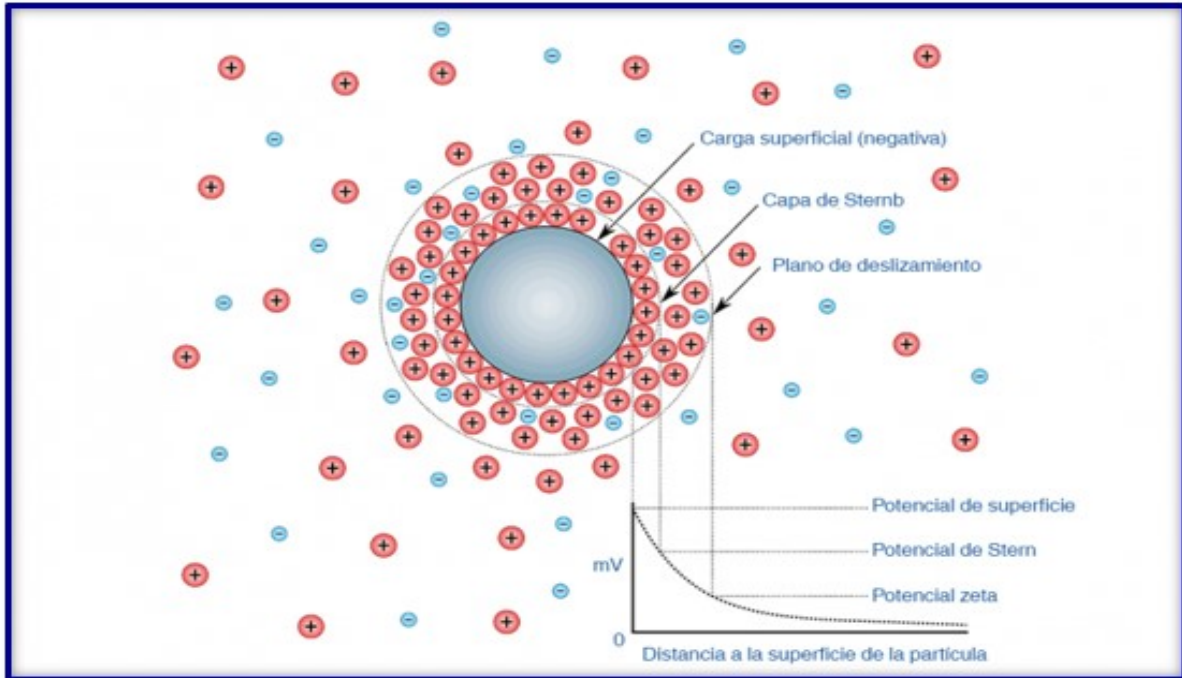
Para poder conocer el diámetro hidrodinámico, se utiliza un equipo de dispersión de luz dinámica, el cual comprende seis principales componentes, que se muestran en la Figura 16. Primero, un láser, provisto de una fuente de luz para iluminar la muestra contenida en la celda para concentraciones diluidas, la mayoría del rayo láser pasa a través de la muestra, pero una parte de la luz es dispersada en todos los ángulos por las partículas dentro de la muestra. Se usa un detector, para medir la luz dispersada. La intensidad de la luz dispersada debe estar dentro de un intervalo específico para que el detector la mida exitosamente, si se detecta mucha mayor cantidad de luz, el detector se saturará. Para superar esto, se usa un atenuador, para reducir la energía de la fuente de luz láser y disminuir así la intensidad de la dispersión. Para muestras que no dispersan mucha luz, tales como partículas muy pequeñas o muestras con bajas concentraciones, se debe incrementar la cantidad de luz dispersada, en cuya situación el atenuador permitirá el paso de más luz del láser a través de la muestra. Para muestras que dispersan más luz, como las de partículas grandes o muestras a más altas concentraciones, se debe disminuir la intensidad de la luz dispersada. La señal de la luz dispersada proveniente del detector pasa a un procesador digital de señal llamado correlacionador. El correlacionador compara la intensidad de la dispersión en intervalos de tiempos sucesivos para determinar la velocidad a la cual la intensidad está variando. La información del correlacionador pasa a la computadora donde el software analiza los datos y determina la información de tamaño.



**Figura 16.** Arreglo de los componentes para un instrumento de dispersión de luz dinámica. Adaptada de: Giuduce, 2016.

### 1.1.20 Potencial zeta

El potencial zeta es una técnica que permite evaluar la carga superficial de las nanopartículas. Las nanopartículas cargadas en una solución iónica llevan una doble capa eléctrica que comprende una capa de iones con carga opuesta fuertemente unida a la superficie de la partícula (capa de Stern o capa estacionaria) y una segunda capa de iones ligeramente asociados que comprenden la capa difusa externa. El movimiento de la nanopartícula conduce a una diferencia distinta entre los iones en la capa difusa que se mueve junto con ella y los iones asociados con la fase de dispersante en masa. El potencial electrostático en este límite depende de la carga superficial de la nanopartícula y se conoce como potencial zeta (Figura 17 ) (Bhattacharjee, 2016).



**Figura 17.** Diagrama que ilustra el potencial de superficie, el potencial de Stern y el potencial zeta en función de la distancia de una partícula cargada negativamente en un medio de dispersión. Tomada de: Acniti, 2019.

Las dimensiones positivas o negativas del potencial zeta se determinan identificando a qué electrodo se están moviendo las partículas durante la electroforesis. Una amplia variedad de factores (el pH, grupos ligandos, etc) puede cambiar el potencial zeta de positivo a negativo o viceversa (J., 1988; Mourdikoudis & Pallares, 2018).

Uno de los usos más comunes de los datos obtenidos mediante potencial zeta es relacionarlo con la estabilidad coloidal. Las pautas que clasifican las dispersiones de nanopartículas son en base a los valores del potencial zeta que pueden ubicarse de  $\pm 0-10$  mV,  $\pm 10-20$  mV y  $\pm 20-30$  mV y  $> \pm 30$  mV, dichos valores se refieren a altamente inestables, relativamente estables, moderadamente estables y altamente estables, respectivamente. Desafortunadamente, la realidad es más compleja que eso. Aunque el potencial zeta proporciona indicaciones sobre la estabilidad coloidal, no refleja la imagen completa de la estabilidad en sí. Según la teoría coloidal DLVO

(llamada así por los inventores Derjaguin, Landau, Verwey y Overbeek), la estabilidad del coloide depende de la suma de las fuerzas atractivas de Van der Waals y de las fuerzas repulsivas electrostáticas debidas a la doble capa electrostática. Las fuerzas de repulsión electrostática no proporcionan ninguna información sobre las fuerzas atractivas de van der Waals. Por lo tanto, no es inusual encontrar coloides estables con un potencial zeta bajo o viceversa (“Charge and Potential Distribution at Interfaces,” 1973).

### 1.1.21 Ensayo de ninhidrina

El ensayo de ninhidrina es una técnica colorimétrica muy utilizada en el área de la biotecnología para calcular la concentración de proteínas en una muestra de interés. Una de las ventajas del ensayo de ninhidrina es ser una de las técnicas más sensible para cuantificar concentraciones muy bajas de aminoácidos.

La ninhidrina reacciona con los aminoácidos formando  $\text{CO}_2$ ,  $\text{NH}_3$  y aldehído. Esta reacción produce un cromóforo de ninhidrina color azul-púrpura conocido como “Púrpura de Ruhemann” (Figura 18), dando lugar a espectros de absorbancia, con máximo a 570nm generalmente. La intensidad del color formado depende del número y la naturaleza química de los grupos amino que se analizan. La reacción se lleva a cabo con grupos amino libres, dando lugar a una reacción que genera productos de color violeta con aminas primarias, o amarillo, en el caso de la prolina, cuya amina secundaria genera un producto de un máximo espectral a los 440 nm. (Perrett, D and Nayuni, 2014; Regional, 2004)

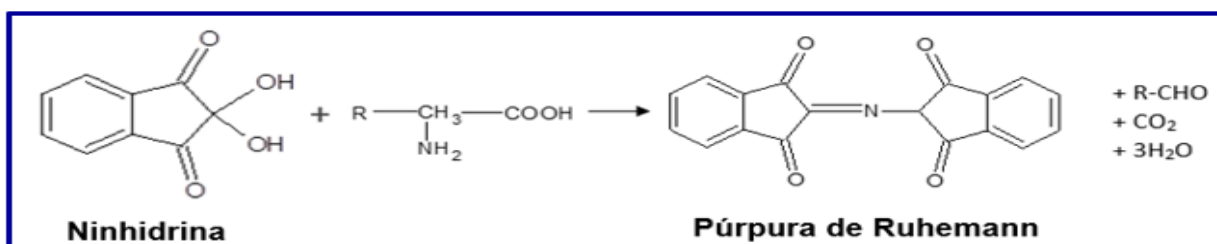


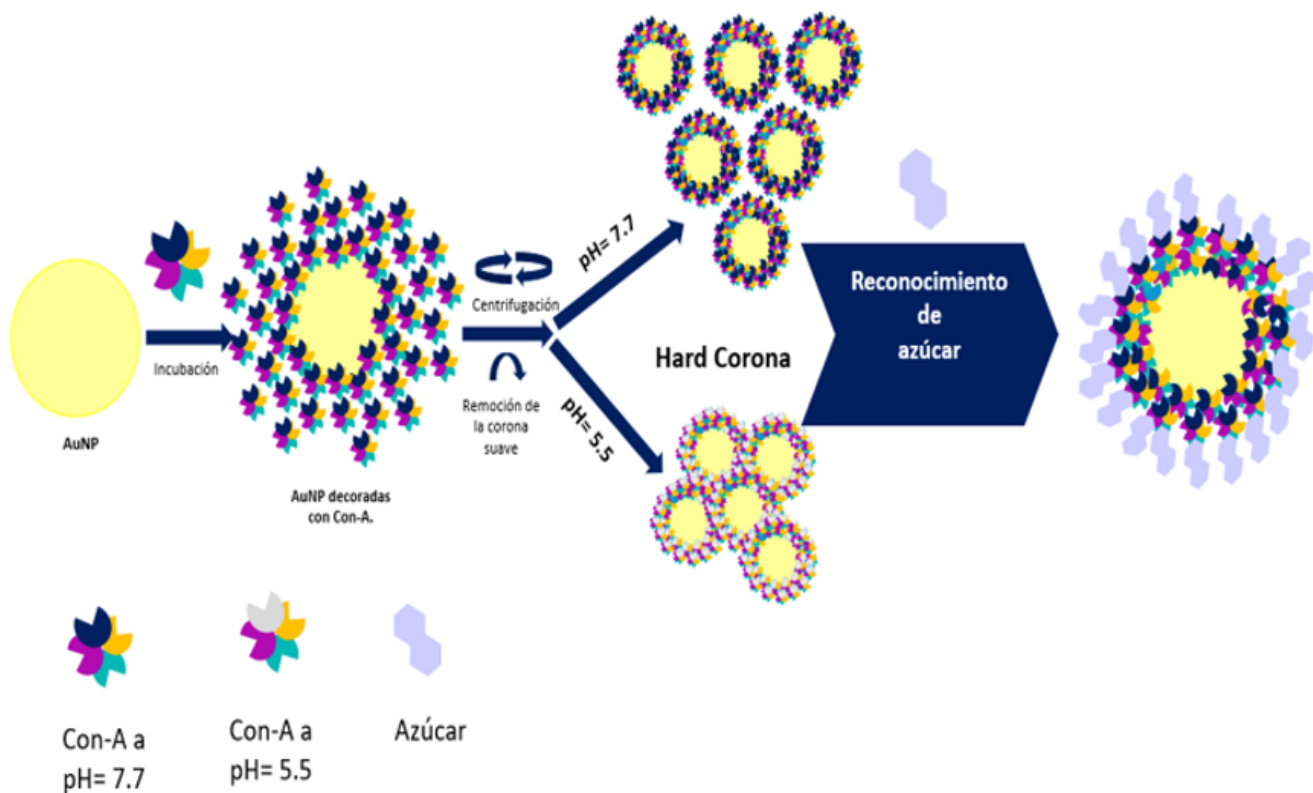
Figura 18. Reacción de ninhidrina Adaptada de: Damodaran, 2016.



## 2 Planteamiento del problema.

Los carbohidratos, una de las cuatro clases de biomoléculas fundamentales, junto a los ácidos nucleicos, proteínas y lípidos, forman parte importante de los componentes de los seres vivos. Actualmente, mucho se conoce sobre la estructura, las interacciones y las funciones de los ácidos nucleicos y las proteínas. Sin embargo, el papel de los carbohidratos es aún poco claro y la importancia que recae en estas biomoléculas es su rol como primera línea de contacto con otros agentes externos (Docter et al., 2015; Kumari et al., 2016). Frecuentemente, los carbohidratos actúan como ligandos de receptores de superficie celular. Una de las interacciones más importantes entre las diferentes biomoléculas es la de carbohidrato-proteína, que ocurren en la superficie celular, como en infecciones bacterianas y virales, en procesos de metástasis de cáncer y durante la respuesta inmune (Hong, Kwon, Kim, & Yang, 2015a; Lee, 2017). Hoy en día, hay un creciente entusiasmo por desarrollar técnicas que exploten las interacciones entre hidratos de carbono y otras biomoléculas, como las proteínas, con el fin de contribuir al desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico y medicamentos. A este respecto, una clase de proteínas utilizada con suma frecuencia es la de las lectinas, las cuales son proteínas que unen azúcares de un tipo determinado. Debido a su interacción de alta afinidad, las lectinas se han utilizado como herramientas para purificación de carbohidratos, y para rastreo de azúcares en células y tejidos, entre otros (Casals et al., 2010). Por otra parte, el estudio de este tipo de proteínas también ha causado interés, debido a que diferentes organismos multicelulares han evolucionado de tal forma que son capaces de censar la presencia de microbios, a través de lectinas (Lee, 2017).

Una manera de explotar dicho reconocimiento es a través de nanoestructuras biomiméticas. En este trabajo se plantea el reconocimiento de manosa, un azúcar muy común en la superficie celular de bacterias y hongos, a partir de nanopartículas de oro con una lectina, la Con-A, que tiene afinidad por reconocer a este azúcar (Figura 19).



**Figura 19.** En el diagrama se presenta la propuesta del reconocimiento de un azúcar modelo, mediante el uso de nanopartículas de oro decoradas con Con-A. Las posibles diferencias que resultan de cambios estructurales de la Con-A a distintos pHs (5 Y 7) se encuentran esquematizadas.

### 3 Hipótesis.

- El uso de nanopartículas de oro funcionalizadas con Con-A (AuNPs-Con-A), permitirá reconocer a la manosa.
- La detección de la manosa mediante el empleo de una corona de Con-A en AuNPs, se podrá realizar mediante espectroscopía Raman (SERS).

## 4 Objetivos.

### 4.1.1 Objetivo general

Preparar nanopartículas de oro (AuNPs) decoradas con Concanavalina A (Con-A) y determinar su capacidad de reconocimiento del  $\alpha$ -metil D-manósido (MeMan), como una molécula modelo para evaluar su potencial en la detección de glicoconjugados.

### 4.1.2 Objetivos particulares

- I. Realizar síntesis de AuNPs mediante el método de Turkevich.
- II. Funcionalizar las AuNPs con Con-A.
- III. Exponer en un mismo medio, las estructuras AuNPs-ConA con MeMan para su reconocimiento.
- IV. Evaluar las estructuras resultantes AuNPs-ConA en función al cambio de pH de 7 a 5.
- V. Realizar las siguientes caracterizaciones para evaluar la calidad y el cambio de las diferentes nanoestructuras:
  - Espectroscopía ultravioleta-visible (UV-Vis).
  - Difracción de rayos X (DRX, por sus siglas en inglés).
  - Dispersión de luz dinámica. (DLS, por sus siglas en inglés)
  - Potencial zeta.
  - Espectroscopía de transmisión de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR, por sus siglas en inglés)
  - Espectroscopía Raman.
  - Espectroscopía de fluorescencia.
  - Microscopía electrónica de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés).
  - Cuantificación de proteína por el ensayo de ninhidrina.

## 5 Metodología

### 5.1 Diseño experimental

La estrategia desarrollada consistió en sintetizar nanopartículas de oro y funcionalizarlas con Con-A, lectina de reconocimiento de azúcares. La estabilidad del conjugado fue analizada a distintos valores de pHs y, finalmente, la función de la corona proteica sobre la superficie de las NPs fue explorada mediante ensayos de unión al azúcar  $\alpha$ -metilmanósido. En el siguiente diagrama se representa la estrategia seguida.

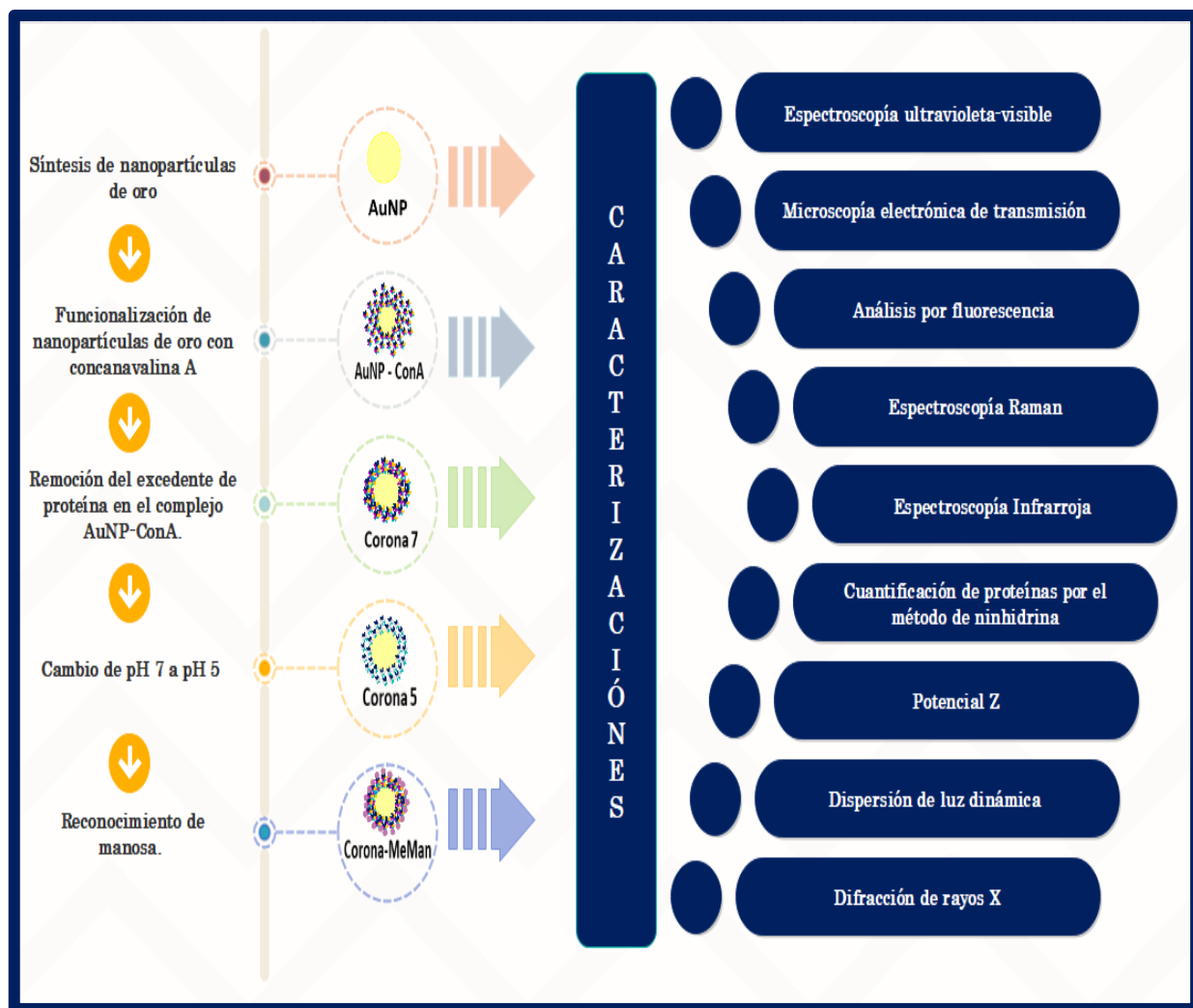


Figura 20. Diagrama experimental del proyecto.

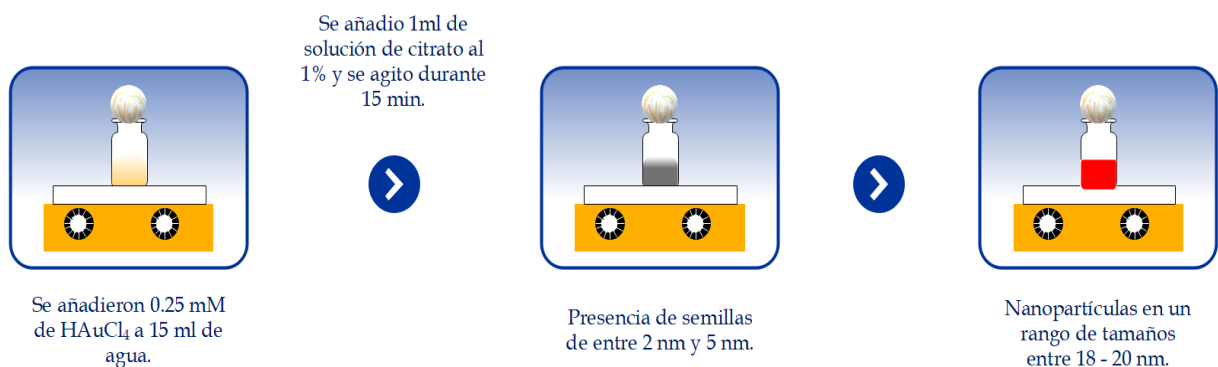
## 5.2 Materiales y métodos

### 5.2.1 Compuestos químicos

El Ácido cloroáurico ( $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ), el Citrato de sodio  $\geq 99\%$  ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), el cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$ ), el Fosfato de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), el Acetato de uranilo ( $\text{UO}_2(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), el Con-A (número CAS 11028-71-0), el Ácido clorhídrico ( $\text{HCl}$  37% puro), el Ninhidrina ( $\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_4$ ), el  $\alpha$ -Metil D-Manósido ( $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_6$ ), el Cloruro de estaño ( $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), el Ácido cítrico ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ ) y el 2- Metoxietanol ( $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_2$ ), el Hidróxido de sodio ( $\text{NaOH}$ ). Todos los compuestos mencionados anteriormente se compraron de Sigma-Aldrich. El Cloruro de potasio ( $\text{KCl}$ ), el Fosfato de sódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) se adquirieron en J.T. Baker.

### 5.2.2 Síntesis de nanopartículas de oro por el método de Turkevich

Se sintetizaron 15 ml de nanopartículas de oro por el método de Turkevich para obtener una concentración de oro de 0.5 mM. Primero, en un vial de vidrio se dispuso un volumen de 4.25 ml de ácido cloroáurico monohidratado a 0.25 mM, después el sistema se lleva a punto de ebullición elevando la temperatura a  $\approx 95^\circ\text{C}$  y manteniendo el sistema en agitación constante con un agitador. Una vez alcanzado el punto de ebullición se agregó 750  $\mu\text{l}$  de citrato de sodio al 1%, y pasados 10 min aproximadamente en agitación constante y a temperatura de  $95^\circ\text{C}$ , el sistema cambia de color a rojo tinto. Posteriormente, el vial de vidrio se retira y se deja enfriar. La Figura 21 muestra el arreglo experimental usado para la síntesis de nanopartículas de oro.



**Figura 21.** Diagrama de síntesis de nanopartículas de oro por el método de Turkevich.

### 5.2.3 *Funcionalización de nanopartículas de oro con Con-A*

#### **Preparación del PBS 1X**

En un vaso de precipitados, se adicionaron 8 g de NaCl, 200 mg de KCl, 1.44 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 240 mg de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, se ajustó el pH  $\approx$  7.4, se agitó hasta disolución y se aforó con agua destilada.

Para la funcionalización primero se tomaron 250  $\mu$ l de AuNP [0.5mM] y se llevaron a 1ml con agua destilada, se centrifugó durante 30 min a temperatura ambiente y al finalizar se les retiró el sobrenadante con el fin de remover residuos del citrato provenientes de la síntesis de las nanopartículas de oro. Posteriormente, se le agregó 357  $\mu$ l del stock de Con-A [1mg/ml] y para finalizar se llevó a un volumen final de 5 ml con PBS 1X. Se homogenizó suavemente y después se incubó durante 48hrs. La relación final peso-peso en mol de la nanopartícula de oro y la proteína es de 1:10.

### 5.2.4 *Remoción de excedente de proteína en los lotes de AuNP-ConA*

Para remover el excedente de proteína se tomó una alícuota de 3 ml del medio de reacción y se centrifugó a 13,000 rpm durante 1 h a 4°C y posteriormente se toma una alícuota de 1 ml de cada lote y se cambió el pH de 7.7 a un pH ácido por debajo de 6 ya que la estructura de la proteína cambia de tetrámero a dímero a ese pH. Para ello se añade gota a gota HCl 1 M hasta alcanzar un pH de 5. A esta nueva estructura, a pH 7, le llamamos complejo ConA-AuNP a pH 7 y la obtenida a pH 5 se le llamó complejo ConA-AuNP a pH 5.

### 5.2.5 *Reconocimiento de $\alpha$ -metil D-manósido (MeMan)*

#### **Preparación de MeMan 1M**

En un vaso de precipitado se disolvieron 0.9709 g de MeMan en 5 mL de agua desionizada y se agitaron hasta disolución.

Para el reconocimiento del MeMan, se mezclaron en tubos Eppendorf 200  $\mu$ l de las muestras funcionalizadas de ConA-AuNP y se le añadieron 200  $\mu$ l de MeMan 1M; posteriormente, los tubos se incubaron a una temperatura de 4°C durante 24 hrs. A las estructuras resultantes se les llamó complejo ConA-AuNP a pH 5 – MeMan y complejo ConA-AuNP a pH 7– MeMan.

## 5.2.6 *Caracterización de nanopartículas*

### 5.2.6.1 *Espectroscopía UV-Vis*

Los espectros de absorción UV-Vis se obtuvieron en un espectrofotómetro Thermo Scientific™ GENESYS 10S usando celdas de cuarzo de 1 cm de longitud. Se añadieron 2 ml de muestra en la celda de cuarzo y se midió su absorción en un rango de 200 a 800 nm

### 5.2.6.2 *Caracterización mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM)*

En rejillas de cobre con película de carbono (modelo, marca) se depositaron 4  $\mu$ l de muestra y se dejaron secar a vacío. Posteriormente se realizó una tinción negativa con acetato de uranilo al 2% para visualizar su morfología, tamaño y el acomodo de la proteína alrededor de la nanopartícula, en el microscopio electrónico de transmisión JEM-1010 (JEOL Co., Peabody).

### 5.2.6.3 *Análisis por fluorescencia*

Se preparó una curva estándar de Con-A de 50, 100, 200, 300, 400, 500, 700, 750 y 1000  $\mu$ g/ $\mu$ l. Para el estudio de la intensidad de fluorescencia de las muestras: complejo ConA-AuNP a pH 5 y complejo ConA-AuNP a pH 7, se tomaron diferentes volúmenes de cada una de las muestras y se analizaron la variación intensidad de fluorescencia en función del cambio de volumen de la muestra. Los volúmenes que se tomaron de la muestra complejo ConA-AuNP, son los siguientes: 5,15,20,30,40,50,75, y 100  $\mu$ l. Para los complejos a pH 5 y a pH 7 se tomaron los siguientes volúmenes 5, 10, 20, 30 y 50  $\mu$ l. El análisis se llevó a cabo en una Microplaca de 384 pocillos Corning™ (Thermo Scientific). Las muestras se excitaron a 280nm. El análisis fue llevado a cabo en el equipo Varioskan LUX (Thermo Fisher Scientific).

### 5.2.6.4 *Caracterización mediante espectroscopía Raman*

Para la caracterización por Raman, se depositaron 5  $\mu$ l de cada muestra en portamuestras de vidrio recubierto con papel aluminio liso y posteriormente se secaron a vacío para su análisis en

el espectroscopio dispersivo Senterra II (Bruker, Optik GMBH), con una fuente láser de 785 nm, a una potencia de 100 mW; el tiempo de integración fue de 1 segundo y el número de repeticiones fue de 10.

#### 5.2.6.5 *Caracterización mediante espectroscopía Infrarroja*

Para la preparación de la muestra se depositaron 5  $\mu$ l en portamuestras de vidrio recubiertas con papel aluminio liso y posteriormente se secaron a vacío y se analizaron en el espectrofotómetro Frontier MIR/FIR (PerkinElmer) por la técnica de ATR (Attenuated Total Reflection, por sus siglas en inglés).

#### 5.2.6.6 *Cuantificación de proteínas por el método de ninhidrina*

Para cuantificar la cantidad de proteína (Con-A) adherida a las AuNPs, se utilizó el método de la ninhidrina. Primero se colocó 1 ml de Con-A a [1mg/ml] en tubos de ensayo de 13 x 100 con tapón de rosca, se añadió 0.2 ml de HCl 6N preparado previamente (diluir 1 ml de HCl al 37 % (12.1 N) en 1 ml de agua) y la mezcla fue incubada en horno a 110°C durante 16 horas. Pasado el tiempo de hidrólisis, se evaporó el medio de reacción bajo corriente de nitrógeno y posteriormente se neutralizó el medio con una solución de NaOH 6 N preparada previamente (1.2 g de NaOH en 5 ml de agua); finalmente, se adicionó 1 ml de agua destilada.

Para la cuantificación, se preparó una curva estándar de Con-A en tubos eppendorf con las siguientes concentraciones: 0, 0.5, 0.1, 0.2 y 0.3  $\mu$ g/ $\mu$ l. Posteriormente se depositaron 100  $\mu$ l de cada punto de la curva y de las muestras a analizar (complejo ConA-AuNP, complejo ConA-AuNP a pH 5 y complejo ConA-AuNP a pH 7) en una microplaca de 96 pocillos. Después se le adicionaron 100  $\mu$ l de reactivo de ninhidrina a cada muestra y se homogenizaron. La microplaca se colocó en baño de agua a temperatura de ebullición durante 5 min.



Pasado el tiempo de reacción, se retiró la microplaca del baño de agua y se dejó enfriar 5 min a temperatura ambiente; posteriormente, se midió la absorbancia a 570 nm de la curva estándar de Con-A y las muestras problema, en el equipo Varioskan LUX (Thermo Fisher Scientific).

#### 5.2.6.7 *Caracterización mediante Dispersión de luz dinámica (DLS) y Potencial Z*

Para determinar el radio hidrodinámico de las nanopartículas se realizó un análisis de dispersión de luz dinámica utilizando un equipo Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical), utilizando una celda capilar plegada. En el mismo equipo se realizaron mediciones del potencial zeta.

#### 5.2.6.8 *Caracterización mediante Difracción de rayos X (XRD)*

Para conocer el tamaño de cristalito de las nanopartículas de oro de la corona de proteínas, se realizó la caracterización mediante difracción de rayos X utilizando radiación  $\text{CuK}\alpha$  ( $\lambda = 0.15406$  nm) en un difractómetro Ultima IV (RigaKu).

## 6 Resultados

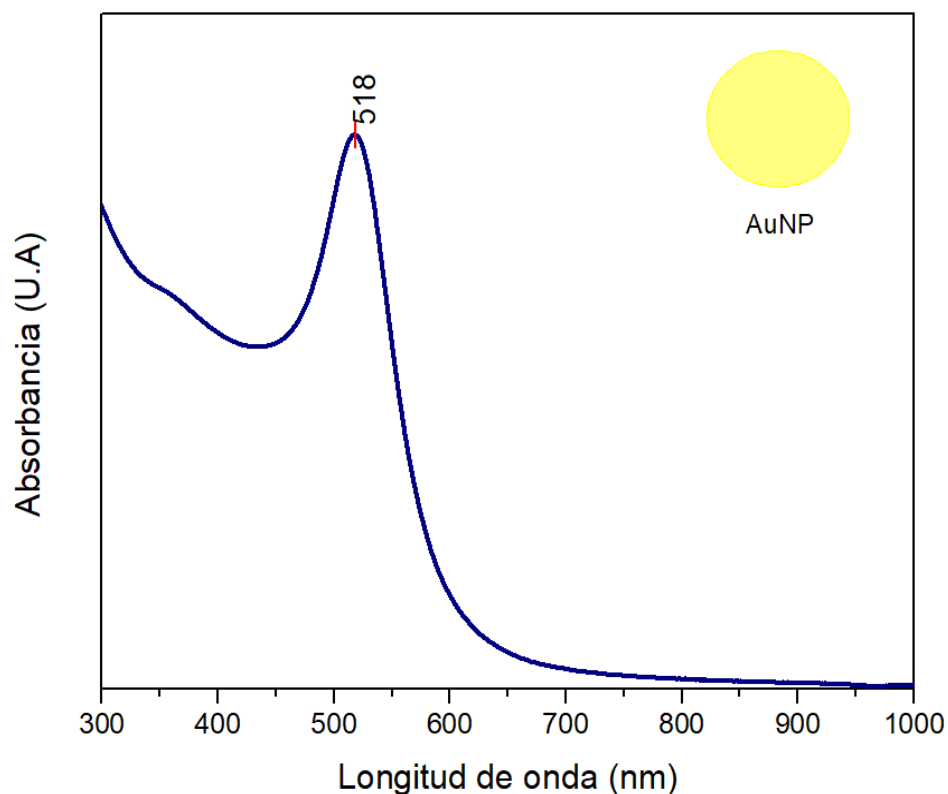
### 6.1 Síntesis de AuNPs por el método de Turkevich

#### 6.1.1 *Espectroscopía UV-Vis*

Se realizó una síntesis de AuNP siguiendo la metodología de Turkevich, en el que se obtienen nanopartículas de tamaño homogéneo de entre 15 a 20 nm utilizando como precursor al ácido cloroáurico monohidratado a 0.25 mM, mientras que como agente reductor y estabilizante se utilizó citrato de sodio al 1%, el cual es una molécula biocompatible.

Se caracterizaron las nanopartículas de oro previamente sintetizadas mediante espectroscopía UV-Vis, con el fin de estimar de manera general el tamaño aproximado, forma y estabilidad, y con ello conocer la calidad de la síntesis de las nanopartículas de una manera rápida y sencilla.

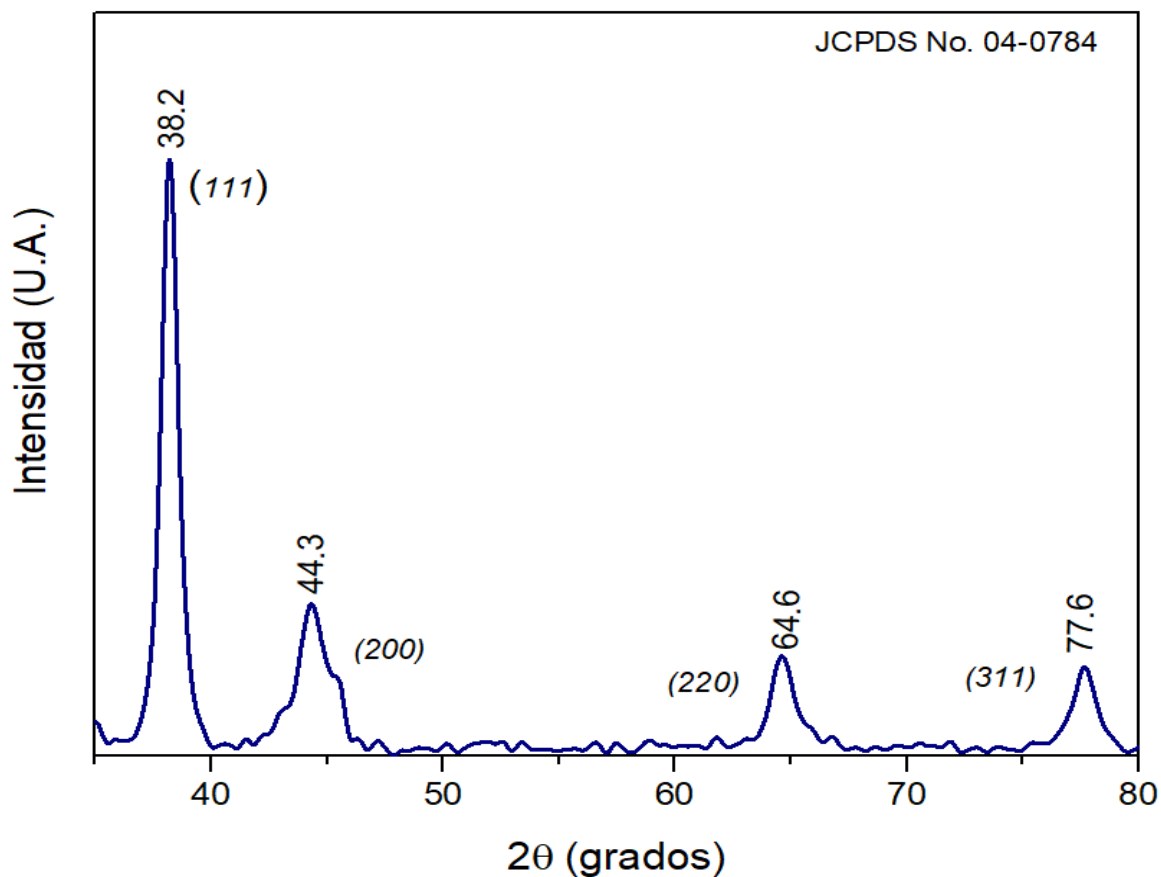
En la Figura 22, se puede observar que el Plasmón de superficie está claramente bien definido, con un solo máximo a 518 nm, correspondiente a tamaños entre 15 a 20 nm y con una morfología esférica de acuerdo con la síntesis por el método de Turkevich (Turkevich, 1951).



**Figura 22.** Plasmón de resonancia superficial de AuNP.

### 6.1.2 Difracción de Rayos X

Con la finalidad de conocer la cristalinidad de las nanopartículas de oro, se utilizó la técnica de difracción de rayos X, obteniendo el patrón de difracción mostrado en la Figura 23. Los nanocristales de oro exhibieron cuatro picos distintos donde:  $2\theta = 38.2^\circ$ ,  $44.3^\circ$ ,  $64.6^\circ$  y  $77.6^\circ$ , que correspondieron a las siguientes reflexiones estándar de Bragg (111), (200), (220) y (311) respectivamente, los cuales corresponden a una estructura con arreglo cristalino cúbico centrado en las caras (FCC).



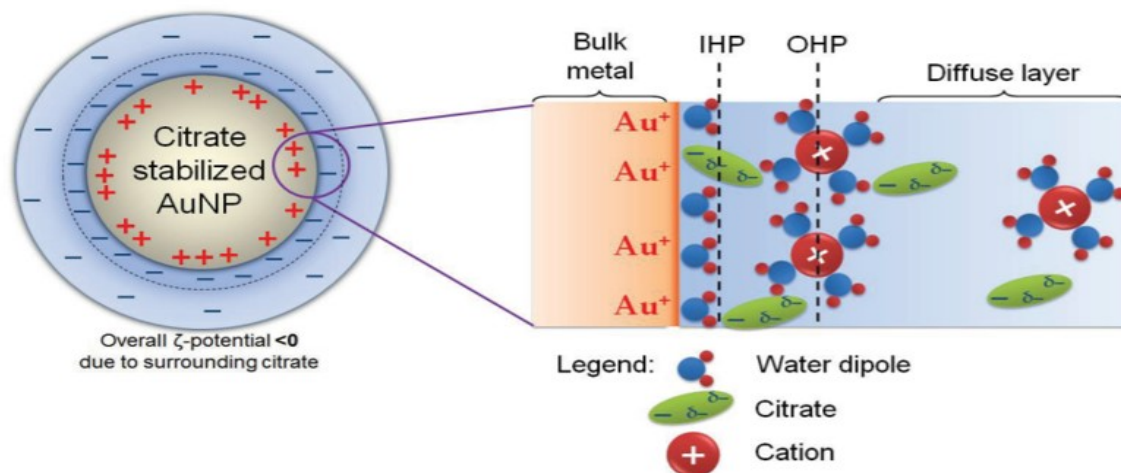
**Figura 23.** Patrón de difracción de la AuNP.

Este patrón de difracción coinciden típicamente a nanocristales puros de oro, concordando también con la base de datos JCPDS con número 040784 (Aparicio, 2010).

### 6.1.3 Espectroscopía FTIR

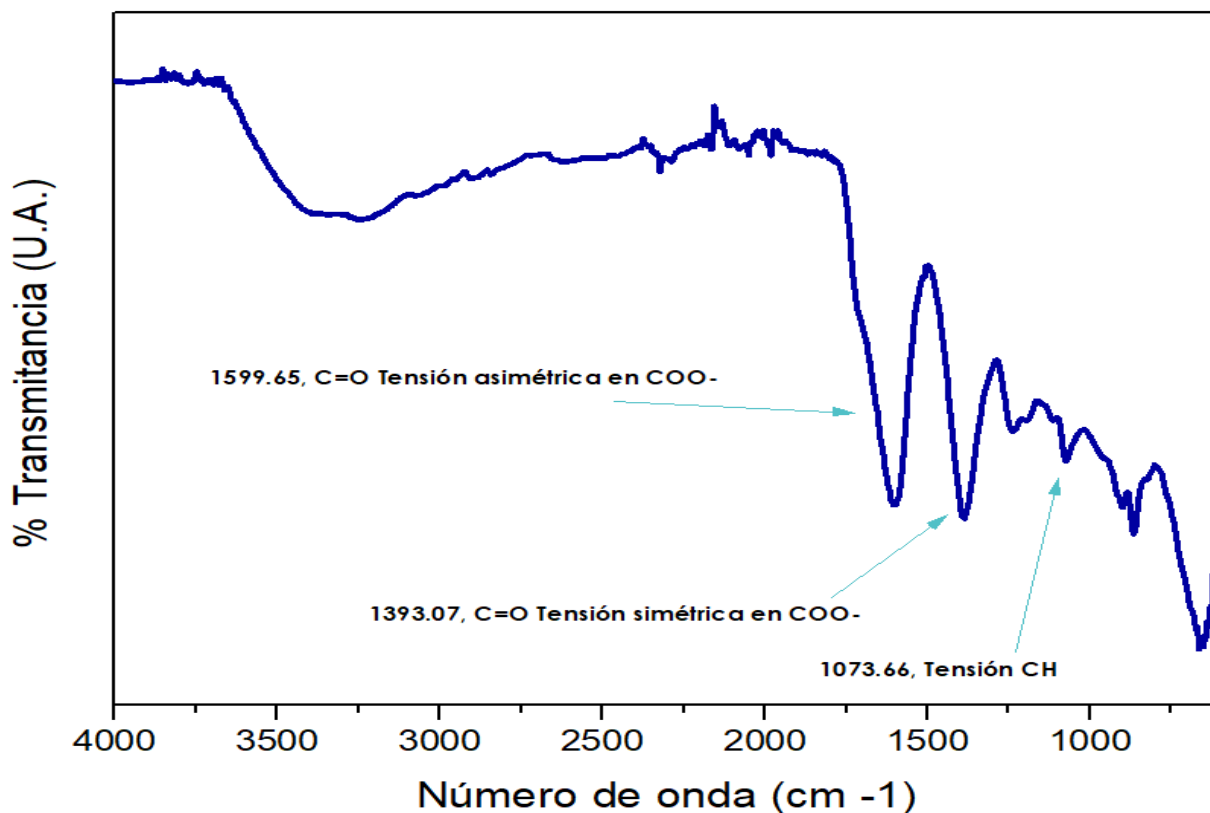
En el caso en las nanopartículas de oro los grupos que pudieran presentar un momento dipolar al interactuar con radiación de origen infrarrojo son los grupos provenientes del reductor, ya que se ha visto reportado en la literatura que el citrato se puede oxidar rápidamente a ácido acetonedicarboxílico (DCA) o se puede descomponer completamente en  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ , generándose varios electrones libres para realizar la reducción de  $\text{Au}^{3+}$  a  $\text{Au}^+$ . El ácido

acetonodicarboxílico presenta grupos funcionales carboxilo ( $-\text{COOH}$ ), los cuales son posibles de observar mediante espectroscopía FTIR (Figura 24) (Smirnov, 2017).



**Figura 24.** Representación espectro química de una estructura probable de AuNP estabilizado con citrato con un núcleo de carga positiva. Las moléculas de citrato y / o DCA de carga doble o triple fuertemente adsorbidas en la superficie de nanopartículas de oro compensan una carga positiva debido a Au y, por tanto, la carga aparente de la nanopartícula se presenta como negativa (Smirnov, 2017).

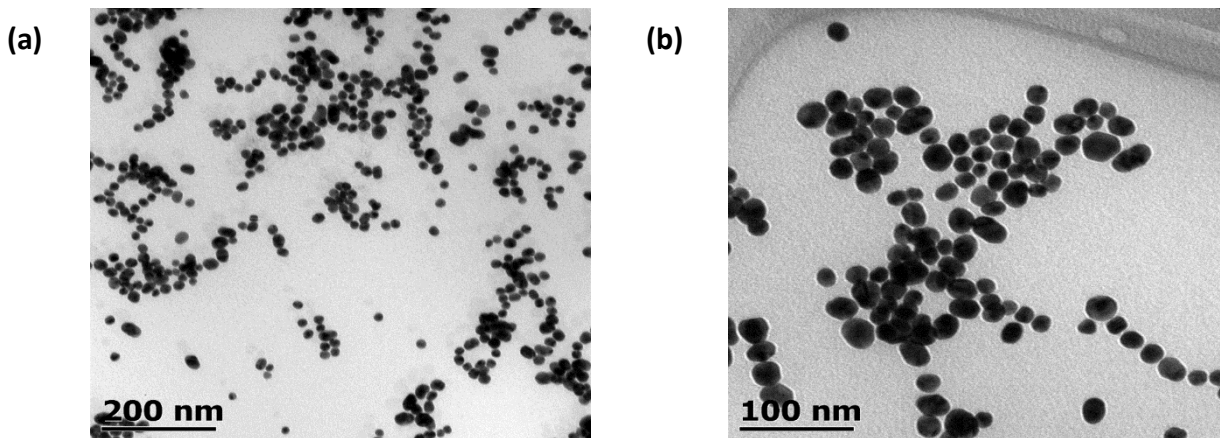
El espectro obtenido por FTIR de las nanopartículas de oro, que se observa en la Figura 25, muestra bandas ubicadas a 1599.65, 1393.07 y 1073.66  $\text{cm}^{-1}$  donde las primeras dos están asociadas con tensiones de enlaces dobles  $\text{C} = \text{O}$ , mientras que la tercera banda de tensión corresponde a enlaces  $\text{CH}_2$  (Lou, 2012). La afluencia de estas bandas resalta la presencia de residuos provenientes del citrato como lo son grupos carboxilo ( $-\text{COOH}$ ), que se sabe quedan adsorbidos en la superficie de la nanopartícula de oro después de la síntesis (Figura 21) (Wuithschick et al., 2015).



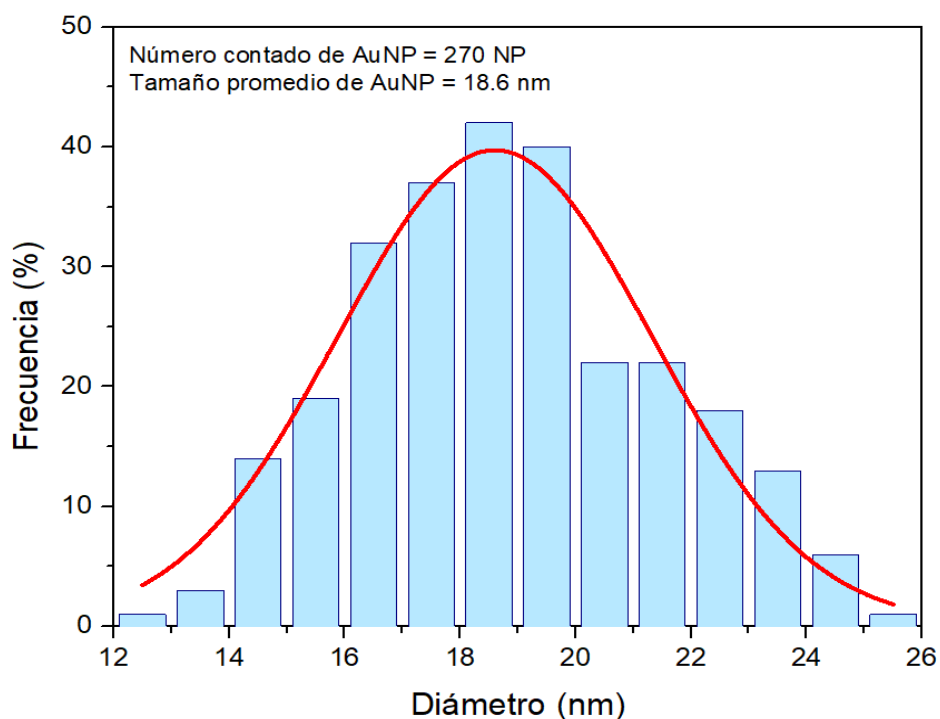
**Figura 25.** Espectro de FTIR correspondiente a AuNP.

#### 6.1.4 Microscopía electrónica de transmisión

La obtención de imágenes mediante TEM de nanopartículas de oro sintetizadas por el método de Turkevich se muestran en la Figura 26, donde se puede observar que su morfología es esférica, con un diámetro promedio de 18.6 nm (Figura 27). Para la obtención del diámetro de las nanopartículas se realizó un conteo con el software ImageJ del área de 270 NP en base a la imagen (a). A partir del área se obtuvo el diámetro de las 270 NP, y los resultados se muestran en el histograma de la Figura 27.



**Figura 26.** Imágenes de TEM mostrando nanopartículas de oro sintetizadas por el método de Turkevich.



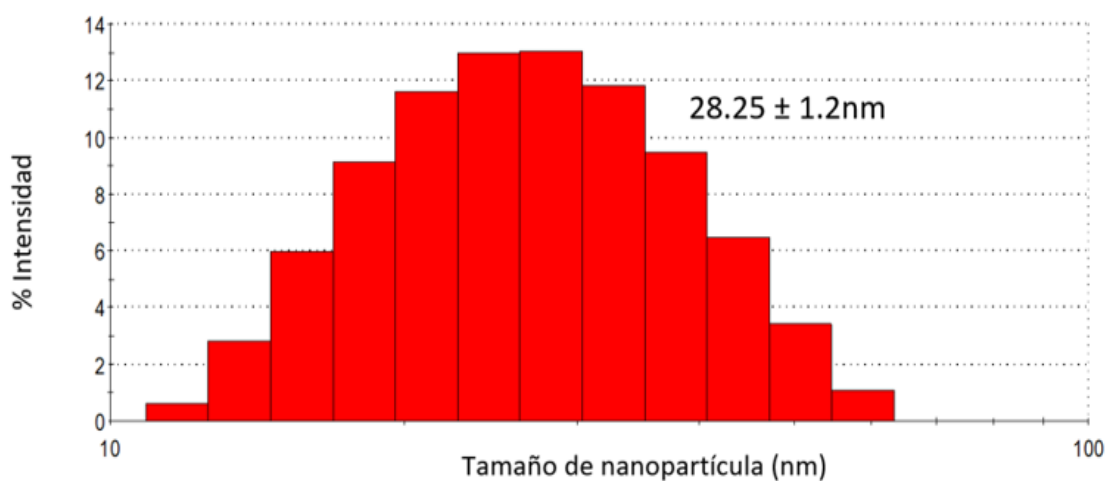
**Figura 27.** Histograma de distribución de tamaños de las nanopartículas de oro sintetizadas por el método de Turkevich.

A partir de las imágenes obtenidas por TEM se logró hacer un cálculo aproximado del diámetro de las nanopartículas de oro.

### 6.1.5 Dispersión de luz dinámica

Con el fin de complementar los resultados obtenidos en TEM, se realizó un análisis por dispersión de luz dinámica, ya que con esta técnica es posible conocer el diámetro hidrodinámico de las nanopartículas de oro, dicho diámetro contempla a las moléculas que se adsorben en la superficie de las nanopartículas, por lo que generalmente es mayor que el observado mediante TEM.

Para este caso, los valores obtenidos del diámetro hidrodinámico se muestran en la Figura 28, donde se observa que hay tamaños mayores a 10 nm y menores a 60 nm, siendo el tamaño promedio de 28.25 nm. Dichos valores son mayores comparados con los valores obtenidos por TEM, ya que como se mencionó anteriormente, el diámetro hidrodinámico contempla a las moléculas adsorbidas en la superficie de la nanopartícula y las moléculas presentes en el medio en el que se encuentran suspendidas. Complementando con los resultados obtenidos por FTIR, se sabe que parte de la contribución al diámetro hidrodinámico está dado por la presencia de grupos carboxilos, provenientes de la síntesis hecho que explica el aumento de tamaño del diámetro si se compara con el obtenido por TEM.

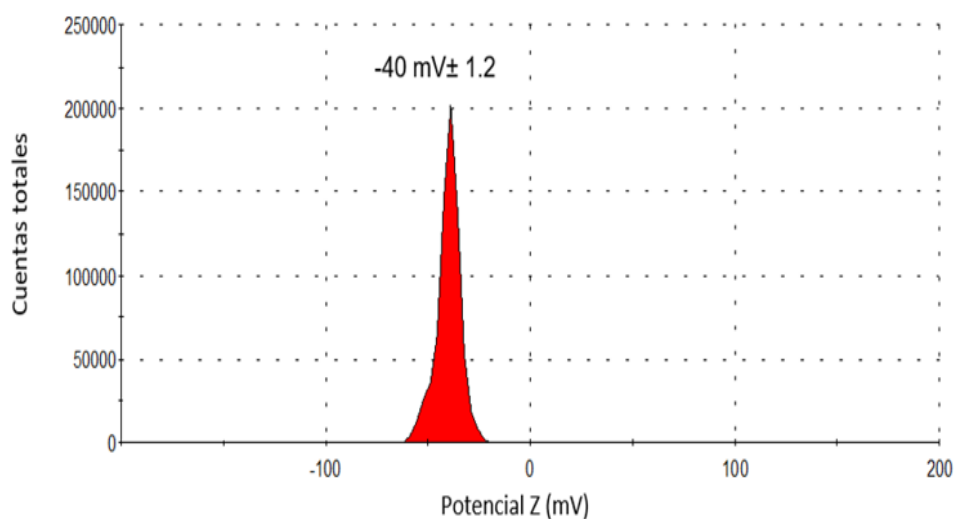


**Figura 28.** Distribución de tamaño hidrodinámico de las AuNP sintetizadas.

### 6.1.6 Potencial zeta

Para el caso de las nanopartículas de oro, conforme a lo obtenido en FTIR y a los reportes encontrados en la literatura, se sabe que al haber presencia de grupos carboxilo que se encuentran interaccionando con la superficie de las nanopartículas, estos grupos le proporcionan una estabilidad por aniones asociada con un potencial de al menos -30 mV (W. Wang et al., 2016).

Como se muestra en la Figura 29 el resultado al evaluar la carga superficial de las AuNP mediante la técnica de potencial zeta arrojó un valor promedio de -40 mV, indicando la estabilidad de la dispersión por cargas, en su mayoría aniónicas, corroborando los resultados obtenidos por UV-VIS, TEM Y DLS.



**Figura 29.** Carga superficial de las AuNP obtenidas por la técnica de potencial zeta.

Hasta este momento, y por medio de las técnicas de caracterización mencionadas anteriormente, se comprobó que la población de nanopartículas de oro obtenidas, empleando el método de Turkevich, tenían un Plasmón ubicado a 518 nm lo que sugiere una morfología esférica que más tarde se comprobó por TEM, técnica con la cual se pudo calcular el diámetro del núcleo de 18.6 nm. Asimismo, se mostró que su diámetro hidrodinámico era mayor, con un valor de 28.9 nm,



atribuyéndose este aumento a la presencia de grupos carboxilo, provenientes del método de síntesis y visualizados por espectroscopía FTIR. Cabe mencionar que dichos grupos aniónicos estabilizan a la nanopartícula de oro, como lo indica el potencial zeta de la muestra, con un valor negativo mayor que -30 mV. Todos estos datos demuestran la obtención de nanopartículas estables.

## 6.2 Características de la Con-A

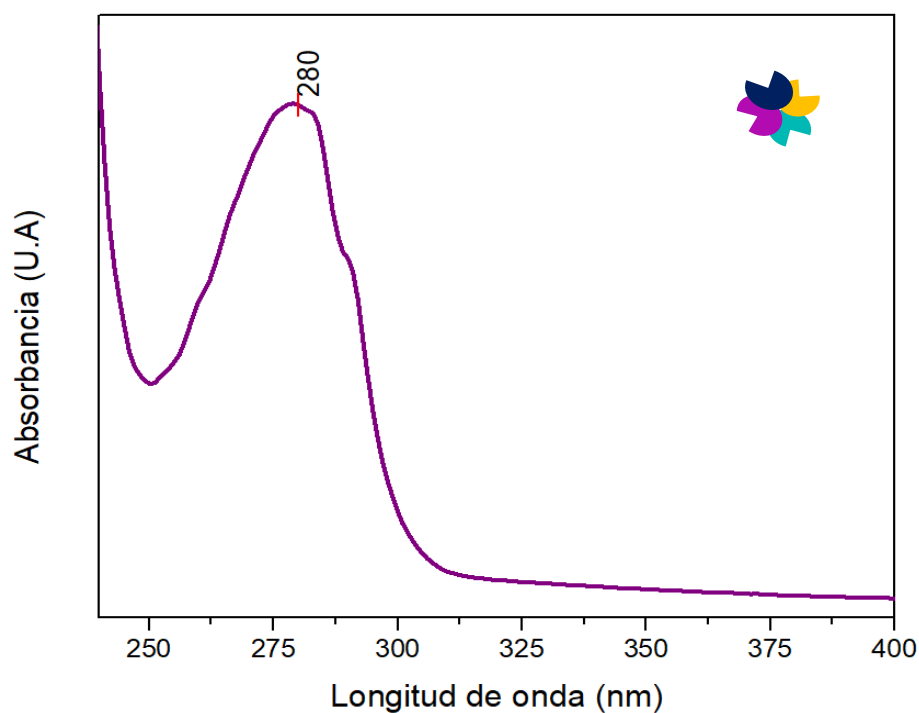
A la par de la caracterización de las AuNP desnudas, también se exploró el análisis de diferentes características de la Con-A, mediante técnicas de caracterización como UV-Vis, FTIR, Fluorescencia y potencial zeta, con el fin de tener mayor información que permitirá analizar de mejor manera el complejo ConA-AuNP y sus cambios posteriores al proceso de lavado en distinto pH, o al reconocimiento del  $\alpha$ -metil D-manósido. En este sentido, a continuación se muestran los resultados obtenidos de las diferentes caracterizaciones ya mencionadas para el análisis de la Con-A.

### 6.2.1 Espectroscopía UV-Vis

Una de las ventajas de la caracterización por espectroscopía UV-Vis es que permite conocer la concentración de proteína que hay en una solución a partir de la banda de absorbancia de las proteínas en la muestra. En el caso del estudio de la formación de una corona de proteínas alrededor de las nanopartículas, va a reflejar cambios en el espectro de absorbancia obtenido por espectroscopía UV-Vis, como corrimiento de la banda hacia el infrarrojo o su disminución en absorbancia. Sin embargo, es necesario utilizar otros métodos de caracterización como complemento, con el fin de estudiar la interacción entre la proteína y la nanopartícula. En este sentido, el estudio de la banda de absorción de la Con-A se utilizó como referente para el estudio

del cambio del Plasmón de las nanopartículas al interactuar con la Con-A (Antosiewicz & Shugar, 2016; Schmid & Beer, 2001). En el caso de las proteínas, estas pueden presentar absorción UV en el rango de 180 a 230 nm, que se debe casi en su totalidad a las transiciones  $\pi \rightarrow \pi^*$  de los grupos benceno en las cadenas R de triptófano, tirosina y fenilalanina, y también pueden presentarse débiles contribuciones de los enlaces disulfuro cerca de 260 nm (Antosiewicz & Shugar, 2016)

En la Figura 30 se puede observar la banda de absorbancia de la Con-A con un máximo a 280 nm.



**Figura 30.** Banda de absorbancia de la concaivalina A.

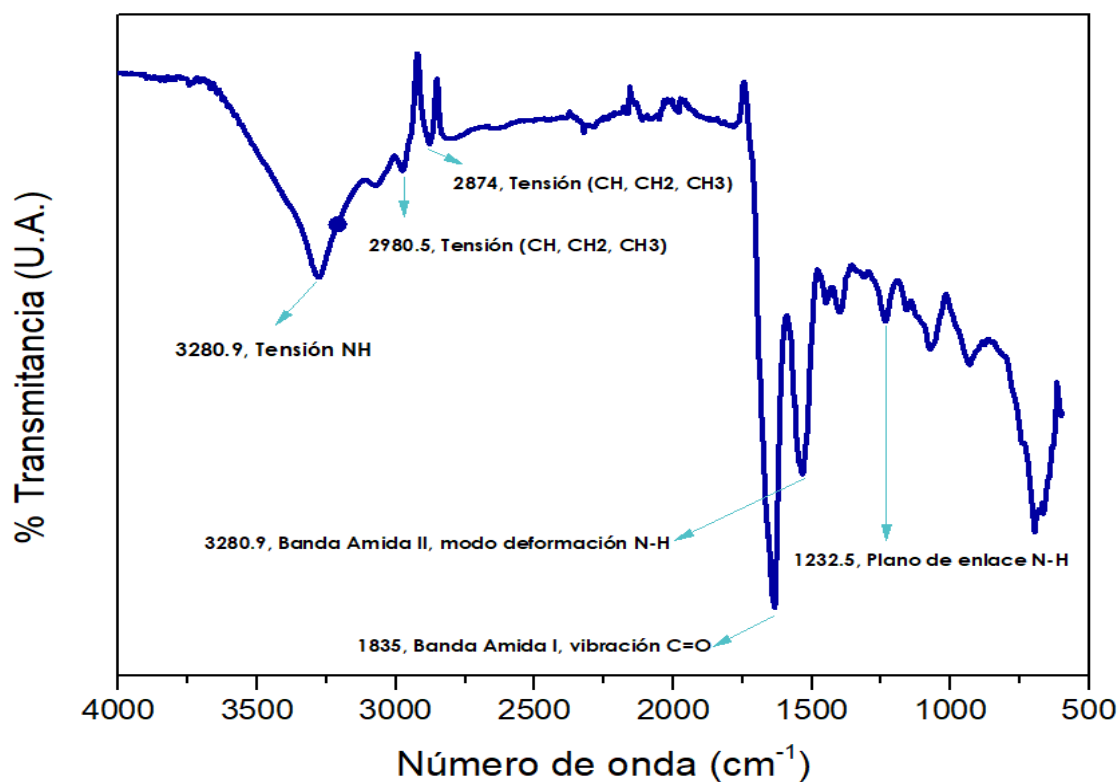
### 6.2.2 Espectroscopía FTIR

Para el caso del estudio de proteína, la espectroscopía infrarroja se ha convertido en una herramienta valiosa para el estudio de su estructura, su plegamiento, y su interacción con otras moléculas. Las bandas características que se pueden identificar en un espectro infrarrojo son

principalmente amida I, amida II y amida III. La amida I proviene de vibraciones de estiramiento del enlace C = O, la amida II proviene de vibraciones de flexión del enlace N-H y la Amida III proviene de la combinación en fase de flexión en el plano N-H y vibraciones de estiramiento C-N, y además son bandas altamente sensibles al plegamiento de la estructura secundaria (Cai & Singh, 2004).

La Con-A se caracterizó mediante espectroscopía FTIR con el fin de conocer la ubicación de las bandas pertenecientes a esta proteína y facilitar el estudio de la funcionalización de las AuNP con Con-A.

En la Figura 31, se observan las bandas de transmisión resultantes de la Con-A mediante espectroscopía infrarroja. En el espectro se logran observar con claridad la presencia de grupos amida, localizándose la banda de Amida I a  $1638\text{ cm}^{-1}$ , proveniente de vibraciones de estiramiento del enlace C = O de las amidas de este tipo presentes en la proteína, y la banda de Amida II a  $1533\text{ cm}^{-1}$ , proveniente de vibraciones de flexión del enlace N-H también presentes en los aminoácidos que constituyen la Con-A; por otra parte se observan grupos de aminas del lado de la huella digital a los  $1232\text{ cm}^{-1}$  y una tensión NH del lado del infrarrojo cercano a los  $3280.9\text{ cm}^{-1}$ . Se observaron grupos CH correspondientes a cadenas alifáticas de algunos aminoácidos que conforman la Con-A (Novak, 2017).

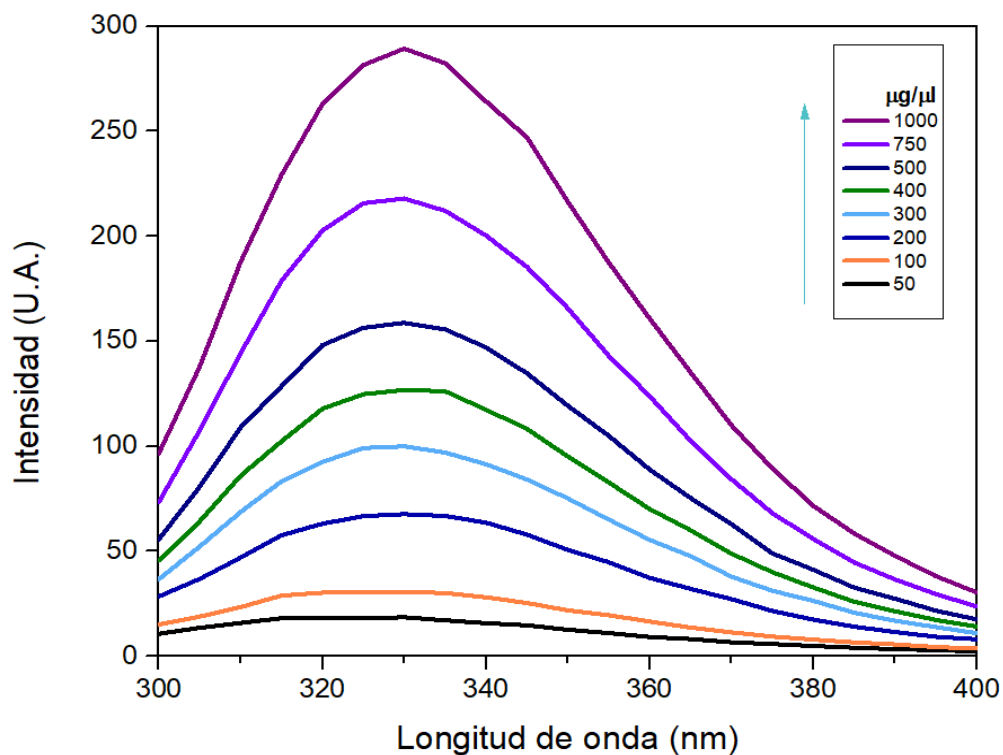


**Figura 31.** Bandas de transmitancia de la concanavalina A.

### 6.2.3 Espectroscopía de fluorescencia

La fluorescencia de una proteína al interactuar con una nanopartícula cambia, y estos cambios se pueden ver reflejados por una disminución en la intensidad de fluorescencia o quenching (Lakowicz, 2010) por ello en este proyecto se realizó un análisis de fluorescencia a diferentes concentraciones de proteína, con el fin de conocer la absorción característica de la proteína, y a su vez evaluar la relación entre la concentración y la intensidad fluorescente. En la Figura 32 se observan los resultados obtenidos de la absorbancia que cada muestra presenta a concentración diferente, pudiendo visualizarse que a medida que la concentración aumenta la fluorescencia

también lo hace, es decir que la concentración es directamente proporcional a la intensidad fluorescente. (Lakowicz, 2010; Rao, Atreyi, & Rajeswari, 1984)



**Figura 32.** Curva de fluorescencia de la ConA en concentraciones de hasta 50 hasta 1000 ug/ul.

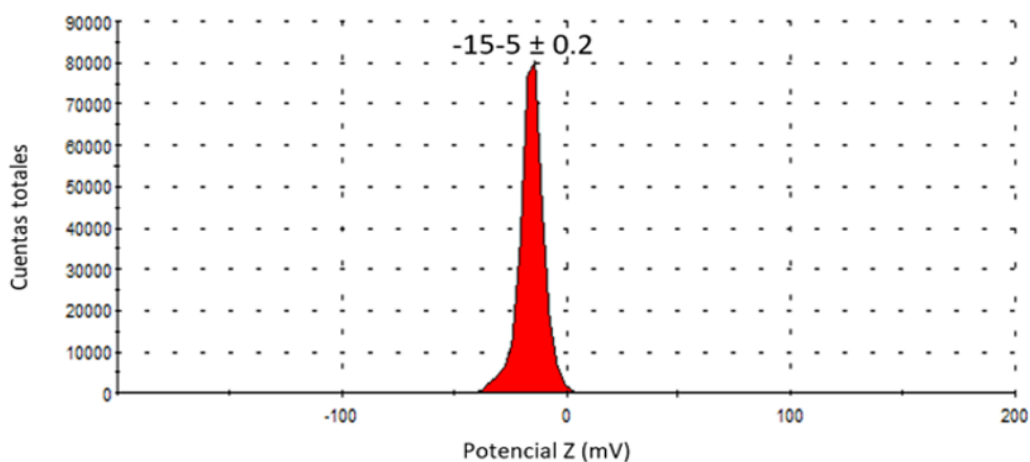
#### 6.2.4 Potencial zeta

El potencial está determinado por la naturaleza de la superficie y por las características de la solución circundante, incluido su pH y su fuerza iónica, por lo que los cambios que sufran las cargas ubicadas en la superficie de la nanopartícula serán resultado de su interacción con la proteína, y estos cambios se verán reflejados en el cambio del potencial zeta. En este sentido al tener fuerzas de interacción electrostáticas presentes en la superficie de las AuNP y la Con-A, en una zona como es la capa difusa y la capa estacionaria, acarrearía cambios en el potencial

zeta de la AuNP, lo que permitiría monitorear la evolución de la funcionalización, así como observar diferencias luego de procesos de lavado y de cambios de pH.

En el caso de las proteínas, estas pueden cargarse positiva o negativamente al ganar o perder protones debido al pH de su entorno. El punto isoeléctrico (pI) es el pH al que una proteína tiene una carga neta de cero y puede calcularse utilizando las cargas para los aminoácidos específicos en la secuencia de la proteína. Los valores estimados para las cargas se denominan constantes de disociación ácida o valores de pKa (Kirkwood, Hargreaves, Keefe, & Wilson, 2015)

En la Figura 33, se observa que la carga de la Con-A es mayormente negativa, a pH de 7, con un valor entre  $-15.5 \pm 0.2$  mV, esto debido a la presencia de los grupos carboxílicos -COOH que es ligeramente mayor que la de los grupos amina, lo que a su vez se relaciona con el punto isoeléctrico que presenta la Con-A de 5.4. A ese valor su carga es negativa, lo que corrobora el valor obtenido en el potencial zeta. (Cantarutti et al., 2017; Kirkwood et al., 2015).



**Figura 33.** Potencial zeta de la Concanavalina A en solución a pH 7.

Con los resultados obtenidos por las técnicas de caracterización utilizadas, se confirma la Con-A es una proteína que absorbe a 280 nm, y que emite fluorescencia de manera dependiente de la

dosis; por otra parte, también se observó que la proteína tiende a formar aglomerados, ya que los resultados obtenidos por potencial zeta mostraron diversidad de cargas, en su mayoría aniónicas.

### 6.3 Formación de la corona de ConA sobre las AuNPs.

Una vez caracterizadas las nanopartículas de oro y la Con-A, se continuó con la formación de la corona de Con-A sobre las AuNPs. Para ello, se incubaron las AuNP y la Con-A durante 48 hras. Como se mencionó anteriormente, el objetivo buscado fue promover la formación de una corona de Con-A dispuesta alrededor de nanopartículas de oro, que facilitara el reconocimiento del  $\alpha$ -metil D-manósido, y con ello poder hacer la detección del ligando reconocido por las partículas mediante técnicas de caracterización como FTIR y SERS. Por la influencia que tiene el pH sobre la conformación 3D de proteínas, los análisis fueron realizados en dos medios de distinto pH.

#### 6.3.1 La Funcionalización de AuNP con Con-A mediante fisisorción

Debido a sus propiedades fisicoquímicas, a su biocompatibilidad y a un área superficial elevada, las nanopartículas de oro se pueden funcionalizar de manera fácil con diferentes materiales tales como las proteínas. Las estrategias de funcionalización de nanopartículas de oro con proteínas se pueden clasificar en fisisorción y quimisorción.

La estrategia seguida en este proyecto fue por fisisorción, que ocurre en sitios no específicos mediante interacciones no covalentes, tales como interacciones electrostáticas, interacciones hidrófobas, enlaces de hidrógeno, fuerza hidrofóbica. (C. Kumar, 2010) En este trabajo se utilizó la fisisorción como estrategia de funcionalización ya que propone ser un método fácil y reproducible para la obtención de AuNP que desplieguen la lectina en su superficie.

A medida que pasa el tiempo de interacción entre la proteína y la nanopartícula, se pueden dar sucesos de intercambio y de organización en la interfaz de la superficie de la nanopartícula debido a las fuerzas de interacción mencionadas anteriormente por fisisorción. Las proteínas tienden a formar dos capas dispuestas en forma de corona, a las que se les denomina “Corona dura” y “Corona suave”, y que difieren entre si por la fuerza de unión y las tasas de intercambio de las proteínas asociadas con la superficie del nanomaterial (Choi, Webster, & Kim, 2015). En la práctica, la corona dura se puede definir como aquellas proteínas que no se eliminan de la superficie del nanomaterial durante los procedimientos de preparación, como el lavado y la centrifugación. Estos procedimientos pueden interrumpir las interacciones proteína-proteína relativamente débiles que eliminarían la corona de proteína blanda.(Winzen et al., 2015b)

## 6.3.2 Evolución del Corona suave

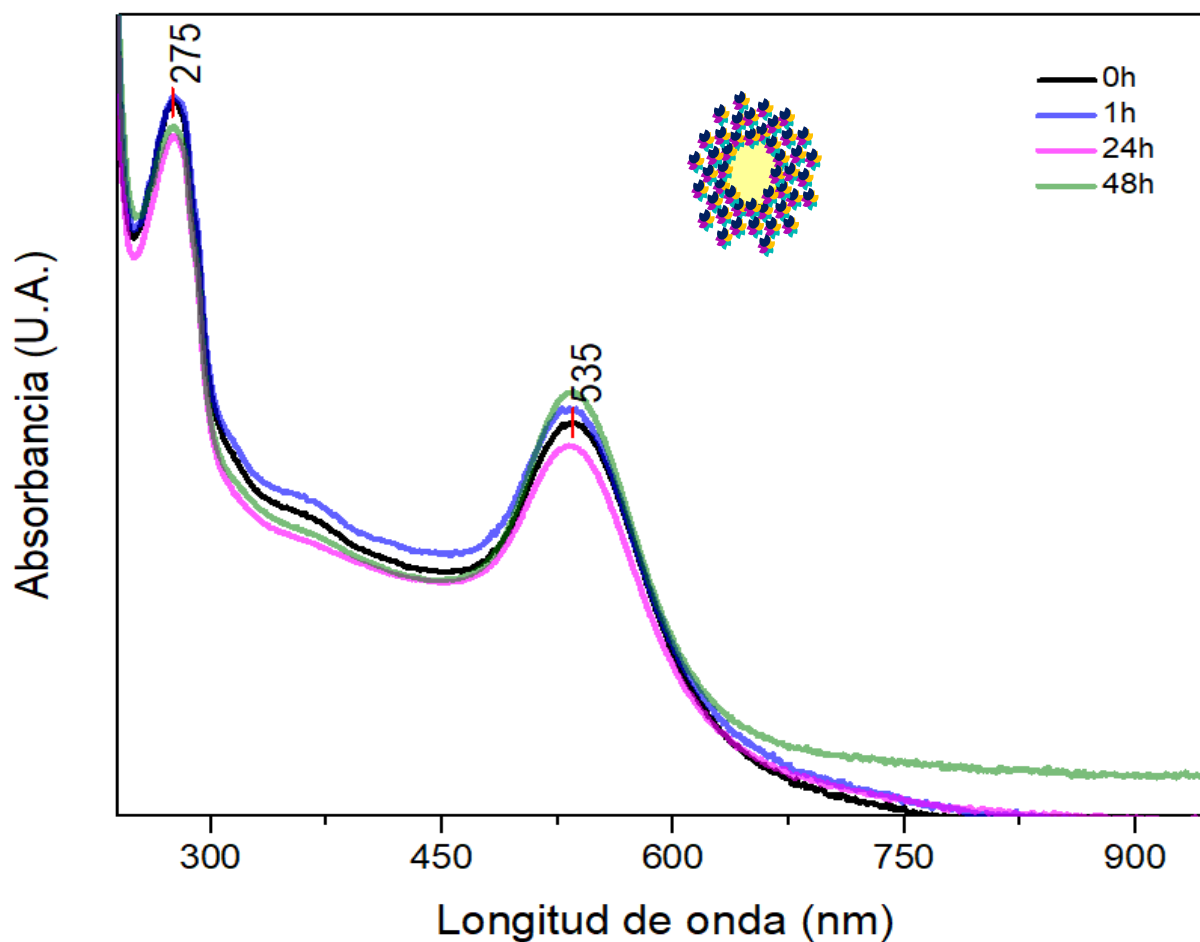
### 6.3.2.1 Espectroscopía UV-VIS

Como se mencionó atrás, el cambio y la ampliación de los espectros de absorción del complejo NP-Proteína dependen del tamaño, estado de agregación de la nanopartícula y las fuerzas locales. (Carrillo-carrion, Carril, & Wolfgang, 2017; Mahmoudi et al., 2011)

En la Figura 34, se muestran los resultados obtenidos de la caracterización por espectroscopía UV-Vis del complejo ConA-AuNP, donde se analizó la calidad en cuanto al cambio de tamaño y forma del complejo con respecto del tiempo. En este sentido se puede observar dos máximos, el primero a 535 nm que pertenece al complejo ConA-AuNP, y el segundo a 275 nm, que provienen a la absorbancia de los grupos aromáticos presentes en la proteína. El máximo ubicado a 535 nm (Plasmón de superficie del complejo ConA-AuNP) comparado con el espectro de la Figura 1 que muestra un máximo a 518 nm (pasmón de superficie de AuNP desnudas), indican un desplazamiento hacia el infrarrojo, lo que denotaría la presencia de nanopartículas de oro



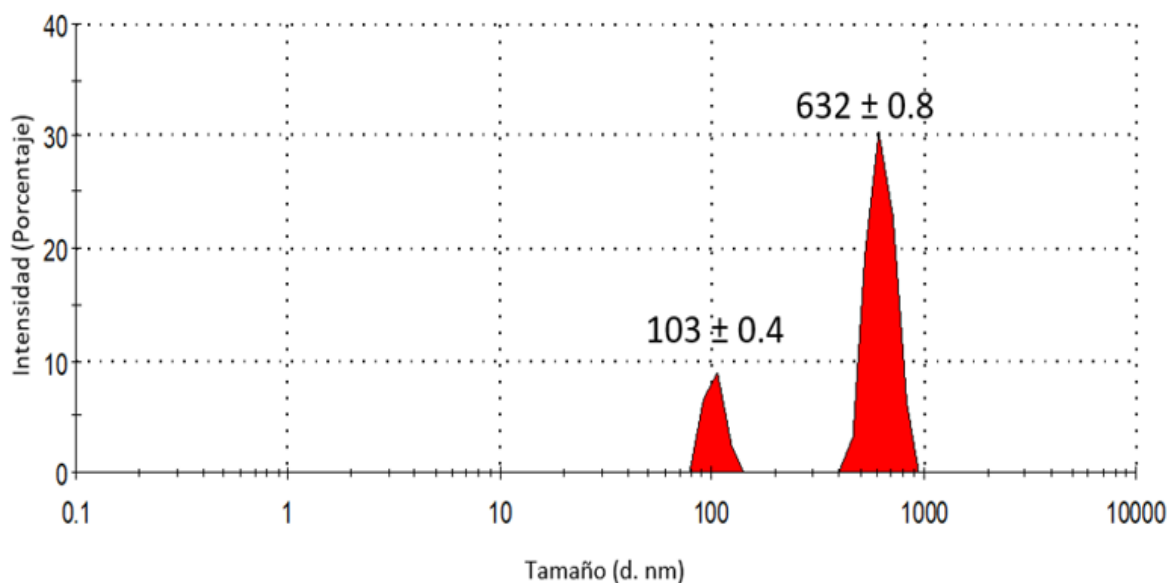
mayores a 20 nm en su mayoría, y a algunos agregados. Este fenómeno es debido a la presencia de la proteína en interacción con las AuNP, desde el inicio de su incubación hasta después de las 24 hrs. De notarse, la absorbancia presentada por el complejo partículas-corona de proteínas no presentó cambios espectroscópicos de manera posterior a su formación, indicando la estabilidad del complejo en el tiempo. Por otro lado, la presencia de la banda de proteína denota que no toda la proteína fue adsorbida en la superficie de la nanopartícula de oro, sino que podría estar en el medio dispersa o formando agregados entre ella misma.



**Figura 34.** Espectro de absorción de formación del complejo ConA-AuNP.

### 6.3.3 Aumento del radio hidrodinámico de las AuNPs – corona suave según análisis de DLS

En la gráfica que se muestra en la Figura 35, podemos observar el tamaño del diámetro aproximado del complejo ConA - AuNP, donde se pueden observar dos poblaciones de tamaños de diámetro diferentes, una a  $103 \pm 0.4$  nm y otra a  $632 \pm 0.8$ . El análisis por DLS corrobora el aumento del tamaño del diámetro de las nanopartículas de oro, de 28 a 103 nm en su diámetro hidrodinámico. El aumento del diámetro hidrodinámico corrobora la presencia de agregados en la muestra.



**Figura 35.** Distribución del tamaño hidrodinámico del complejo ConA-AuNP.

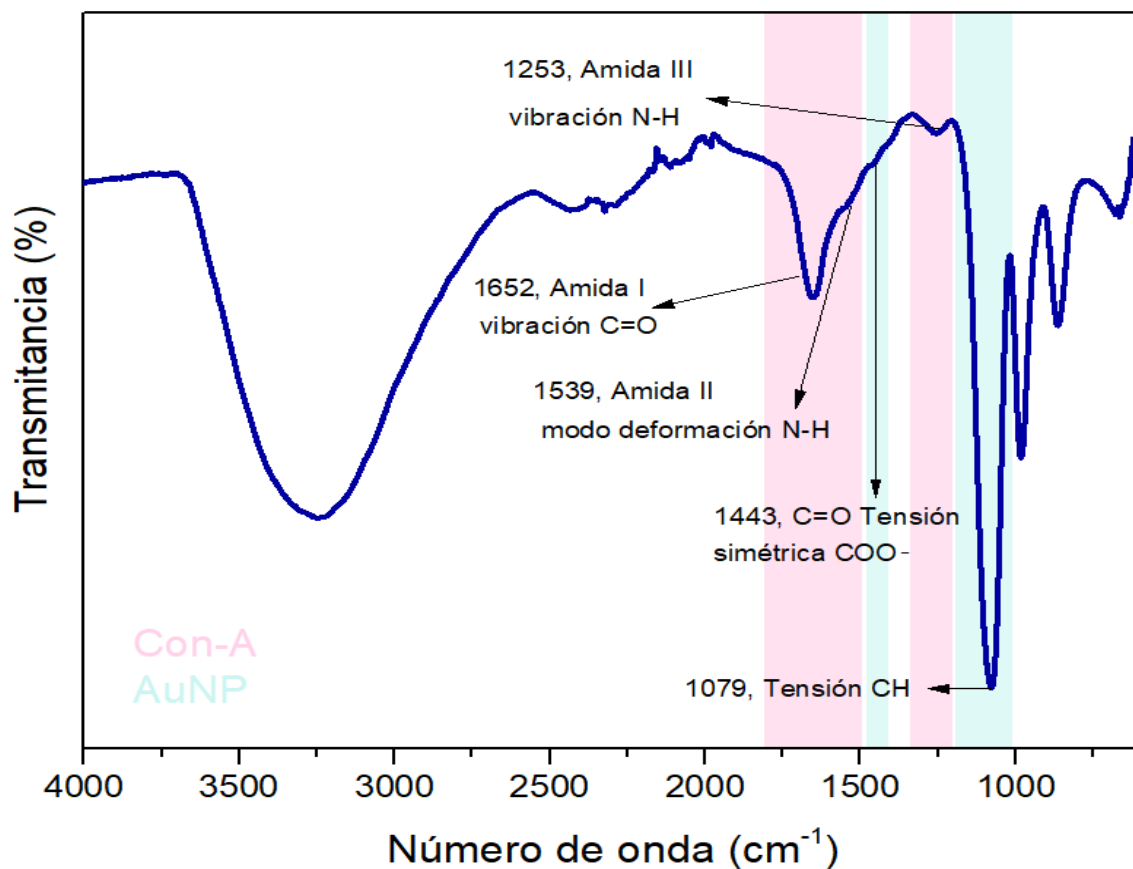
### 6.3.4 Interacciones ConA-AuNP.

#### 6.3.4.1 Espectroscopía FTIR

Se ha demostrado que la espectroscopía FTIR proporciona información útil sobre la interacción proteína-nanopartículas. Esta técnica de caracterización proporciona información sobre la unión de proteínas a las NP, a través de la aparición de bandas características de la proteína y la

nanopartícula de oro. La espectroscopía FTIR se ha utilizado para monitorear los cambios estructurales de las proteínas, y estos cambios se estiman con base en la absorción de los enlaces amida que se ubican en el espectro de FTIR como bandas amida I, II y III (Mahmoudi et al., 2011). A continuación se muestra el espectro obtenido por espectroscopía FTIR de la muestra de AuNP que se incubó con Con-A para formar la corona proteica.

En la Figura 36, se observan las bandas de transmitancia resultantes del complejo ConA-AuNP. Se puede observar que hay presencia de banda de transmitancia proveniente de tensiones simétrica de grupo carboxilo, además de la presencia de la banda de transmitancia perteneciente a grupos -CH (bandas nombradas con color negro); ambos grupos se visualizaron en el espectro de las nanopartículas de oro mostrado anteriormente en la Figura 25. Tanto la banda del grupo carboxilo como la del grupo -CH provienen del citrato. Por otra parte, también se observan los grupos amida I, amida II (bandas nombradas con color rojo), pertenecientes a la Con-A, como se observó en la Figura 31. Comparando el espectro de la Figura 36 con el espectro de las AuNP (Figura 25) y de la Con-A (Figura 31), se puede visualizar que la transmitancia de una de las bandas resulta afectada en el complejo ConA-AuNP, que es la correspondiente a la tensión simétrica de grupos carboxilo provenientes de las AuNP (Figura 25), lo que indicaría la presencia de interacciones entre la Con-A y la superficie de las AuNP.



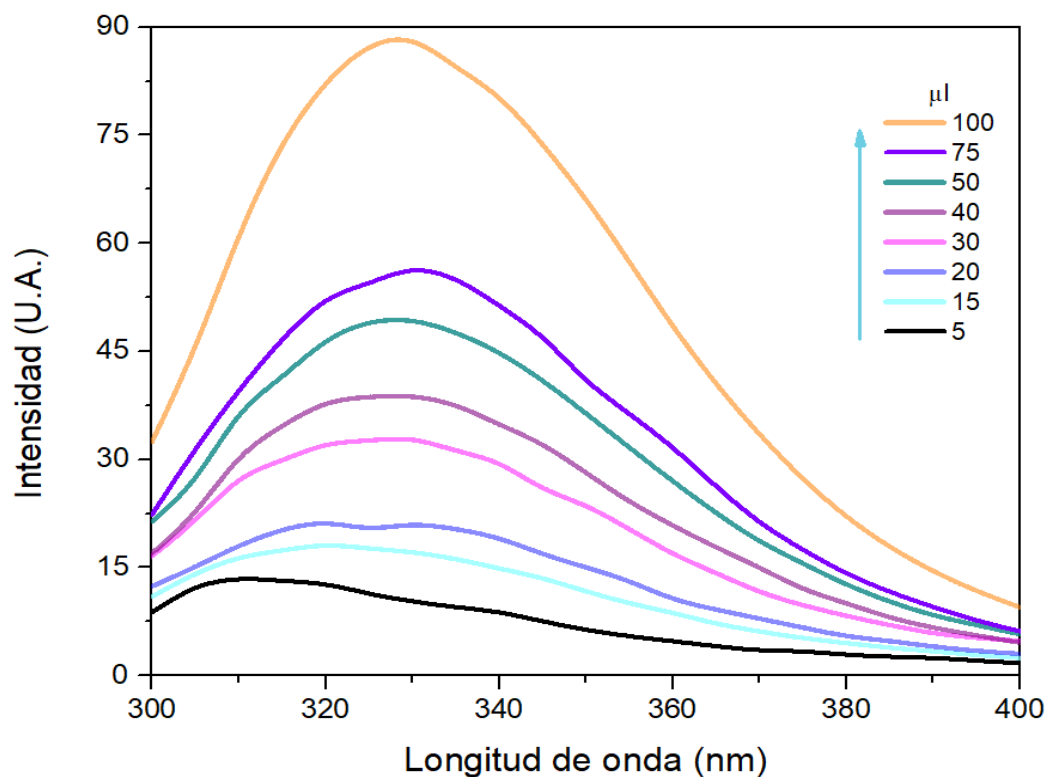
**Figura 36.** Bandas de transmitancia resultantes del complejo AuNP-ConA.

#### 6.3.4.2 Inhibición del efecto Quenching

Otro análisis que se ha utilizado para estudiar la interacción entre las nanopartículas y las proteínas es el estudio de la fluorescencia. La base de este análisis es la disminución drástica en la intensidad de las señales de proteínas que suele producir la cercanía a superficies de nanopartículas. Este fenómeno proviene de la dinámica de asociación / disociación de las proteínas hacia las superficies de NP, lo que se traduce como una pérdida de energía mediante interacciones moleculares, también llamado quenching, El quenching es debido a que la interacción NP-proteína altera el entorno químico local de los fluoróforos, y apaga la fluorescencia de las proteínas. Por lo tanto, la disminución de la intensidad de la fluorescencia y

el desplazamiento del pico de emisión, indican interacciones entre los NP y las proteínas (L. Li, Mu, Zhang, & Yan, 2010).

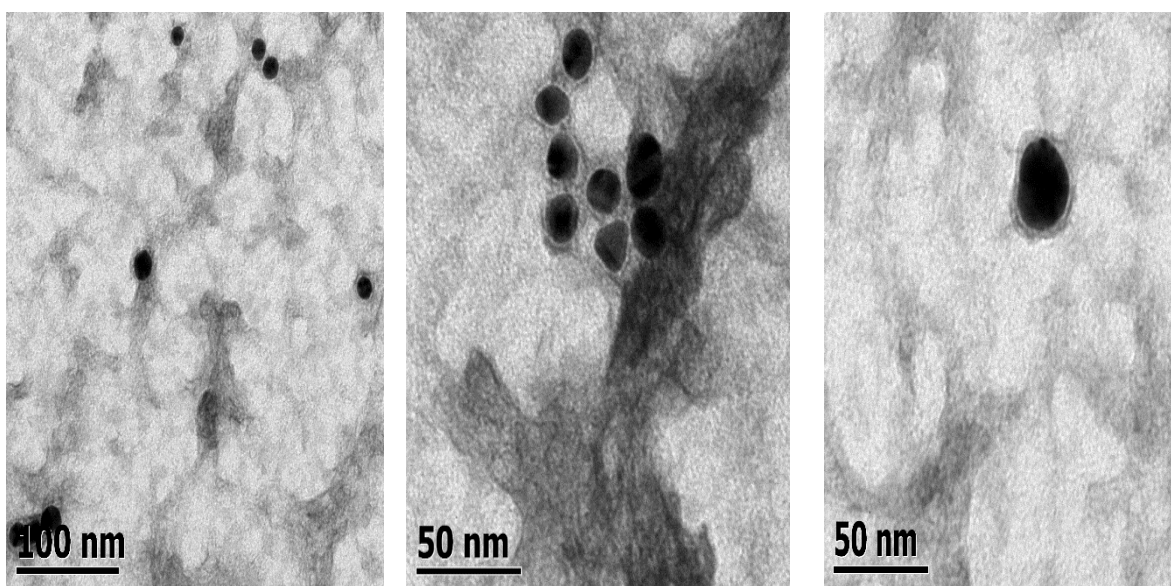
En este sentido, a continuación se muestra los cambios en la intensidad de fluorescencia cuando diferentes volúmenes del complejo ConA-AuNP son analizados. En la Figura 37, se observa como la intensidad fluorescente va aumentando conforme el volumen de muestra del complejo va aumentando, lo que indicaría que hay un excedente de proteína que no necesariamente esta interactuando directamente con la superficie de la nanopartícula, debido a este excedente de proteína, es poco claro la presencia de un quenching. El resultado obtenido por esta técnica evidencia exceso de proteína.



**Figura 37.** Curva de fluorescencia del complejo AuNP-ConA en volúmenes desde 5 hasta 100 µl.

### 6.3.4.3 Microscopía electrónica de transmisión

Esta técnica fue realizada después de una tinción con acetato de uranilo, a fin de poder visualizar estructuras de átomos poco densos, como serían los de la proteína que aquí se espera observar (Pederzoli et al, 2017). En la Figura 38, se muestran las imágenes obtenidas. Como puede observarse, las AuNP resultaron rodeadas por una capa de proteína. Adicionalmente, esta microscopía muestra un fondo de material en forma de aglomerado semitransparente a los electrones, lo que es interpretado como la proteína excedente (Au, Yeung, Wientjes, Lu, & Wientjes, 2016; Choi et al., 2015; Corbo & Toledano, 2016) cuya presencia se dedujo en el apartado anterior (y que impedía observar el fenómeno de quenching de fluorescencia)”.



**Figura 38.** Imágenes de TEM mostrando el complejo ConA- AuNP.

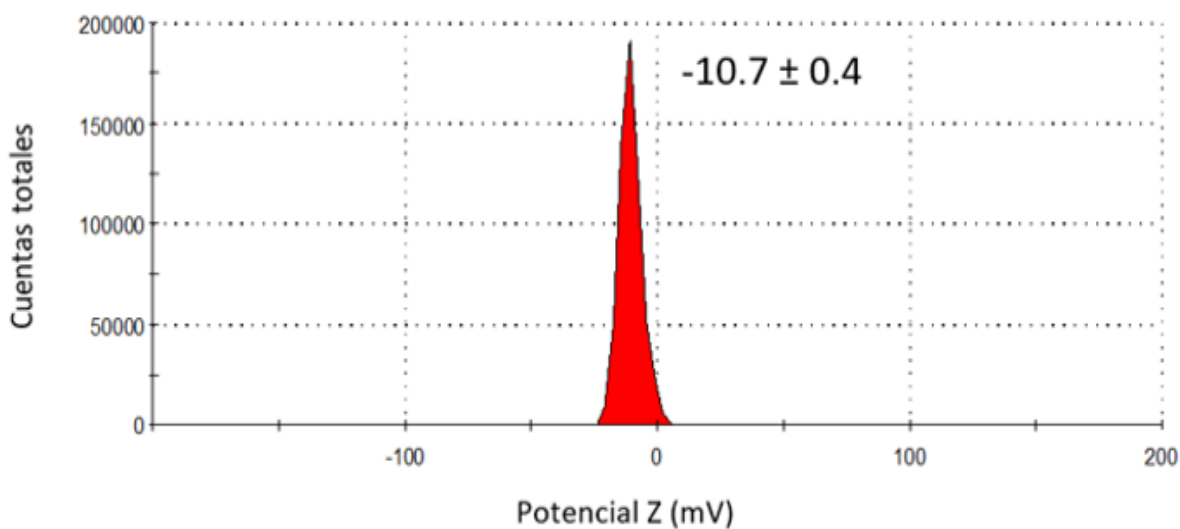
A pesar de este excedente de proteína, a una amplificación adecuada, logra observarse que las AuNP se encuentran embebidas por una capa de Con-A, Se sabe que la proteína cercana a la superficie de una nanopartícula se encuentra en una situación de competencia con la proteína que se encuentra distante a la superficie, y esto se debe a que las proteínas distantes a la superficie de las AuNP son influenciadas

por la fuerza electrostática, siendo atraídas hacia la superficie de la nanopartícula. Los resultados obtenidos por TEM coinciden con los obtenidos por fluorescencia y UV-VIS, es decir que indican un exceso de proteína. Sin embargo, también es visible una capa un poco más densa rodeando a las nanopartículas, lo que esclarece la interacción entre la proteína y la nanopartícula de oro, que también se observó mediante UV-Vis y FTIR.

#### 6.3.4.4 Potencial zeta

El potencial zeta es otro enfoque que se ha utilizado para el estudio de las interacciones NP-proteína. Se tiene reportado que el potencial zeta de las NP se vuelve menos negativo cuando existen proteínas adsorbidas en su superficie. (Clemments, Botella, & Landry, 2015)

En la Figura 39, se observan los resultados del potencial zeta del complejo ConA-AuNP, que indican el decrecimiento de la carga comparado con el obtenido para el caso de las AuNP desnudas, donde el potencial zeta obtenido fue de -40 mV, lo que delataba estructuras estables por cargas negativas (Figura 29). En el caso de las partículas con Con-A es posible apreciar la disminución del potencial a  $-10.7 \pm 0.4$  mV, resultando evidente una interacción de la proteína con la superficie de las AuNP. Asimismo, esta



**Figura 39.** Análisis del potencial zeta del complejo ConA-AuNP.

disminución de potencial también podría explicar la presencia de aglomerados debido a un exceso de proteína presente en la muestra, como se observa en las imágenes de TEM.

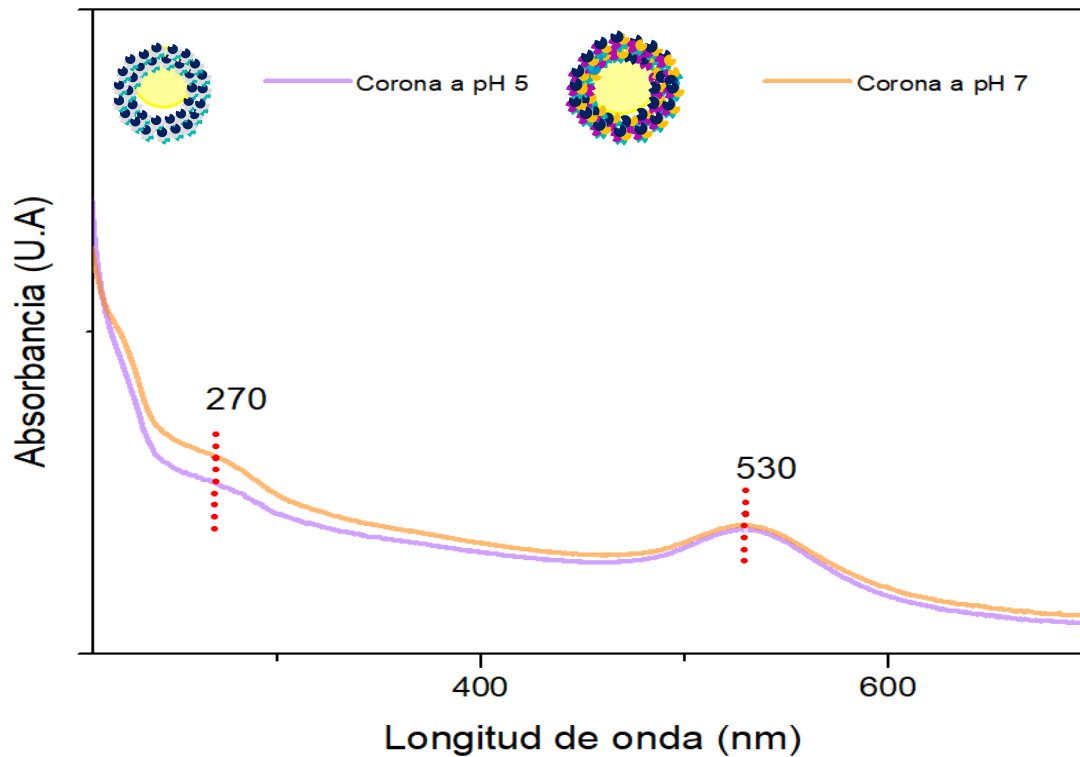
En general al observar los resultados obtenidos del complejo ConA-AuNP, se comprobó por diferentes técnicas de caracterización la interacción entre la proteína y las nanopartículas de oro; sin embargo era necesario eliminar este excedente de proteína en la muestra. Para ello, se realizó una serie de lavados y centrifugaciones, que permitieran remover la ConA excedente. En la siguiente sección se muestran los análisis de la corona de proteínas en nanopartículas de oro tratadas con la proteína y lavadas sucesivas veces, y también se evalúa el efecto que un cambio de pH puede producir en la formación de la corona.

### 6.3.5 Efectos del cambio de pH sobre la formación de la corona.

Posteriormente al lavado para remover el excedente de proteína, se evaluó la influencia del pH sobre la formación de la corona de Con-A sobre nanopartículas de oro. Como se mencionó anteriormente, la Con-A cambia su estructura 3D a un pH menor de 6, presentando una estructura de dímero (complejo ConA-AuNP a pH 5), mientras que a pH de 7 (complejo ConA-AuNP a pH 7) presenta una estructura de tetrámero. La influencia de este cambio de conformación en la corona formada a pH 5 fue evaluada.

Mediante espectroscopía UV-visible se observa que ambas coronas se asocian con la banda de absorción de la Con-A a un máximo de 270 nm, al igual que la banda de resonancia del Plasmón de superficie del oro, a 530 nm (Figura 40).

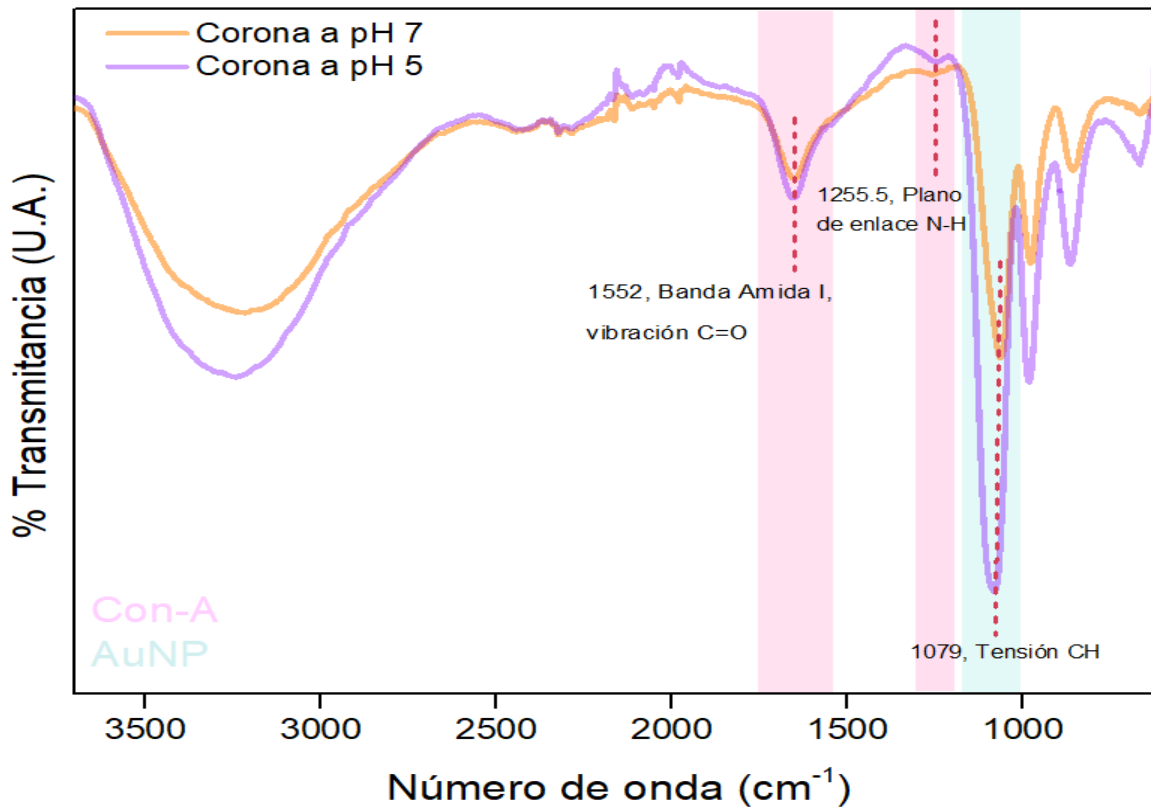




**Figura 40.** Espectro de absorción UV-visible del complejo ConA-AuNP de manera nativa, (Corona a pH 7), y luego de su exposición a pH de 5 (Corona a pH 5).

El resultado obtenido en la espectroscopía UV-Vis, muestra en el caso de las bandas de absorción de la complejo ConA-AuNP a pH 7 y la complejo ConA-AuNP a pH a 5, que ambas se mantienen a la misma longitud de onda, pero con una disminución en la absorbancia de la proteína, en comparación con el espectro obtenido antes de los lavados del complejo ConA-AuNP (ver Figura 34).

El análisis de las partículas desprovistas de proteína excedente a dos distintos pHs también fue realizado mediante espectroscopía FTIR, obteniéndose la siguiente gráfica:

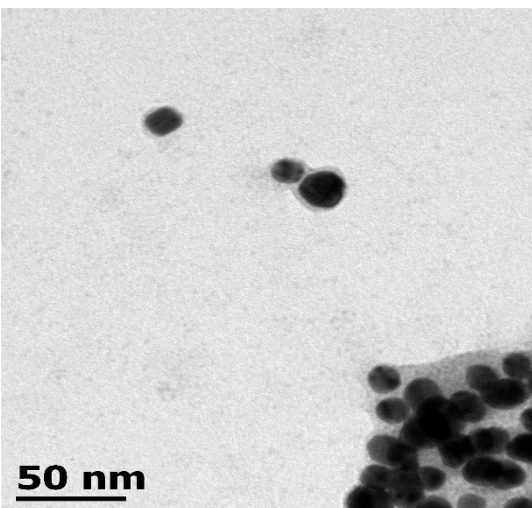
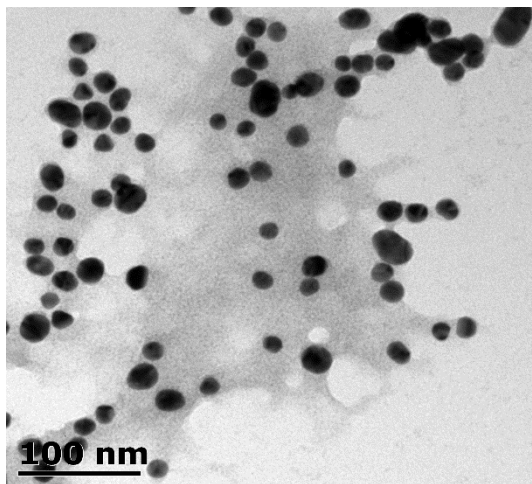
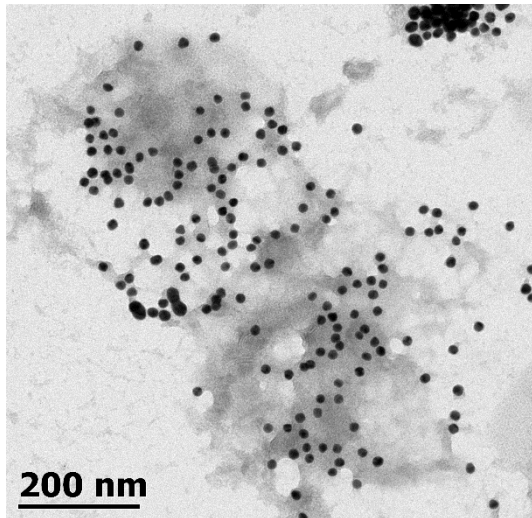


**Figura 41.** Espectro de FTIR de los complejos ConA-AuNP a pH 7 y a pH5

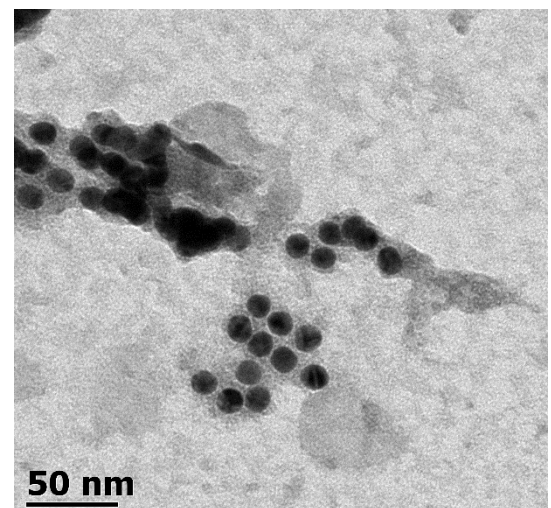
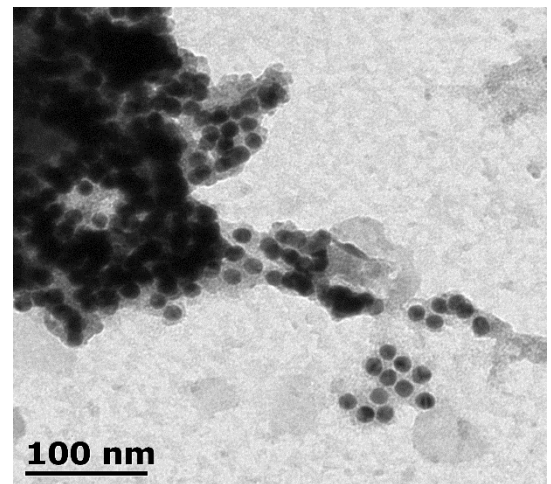
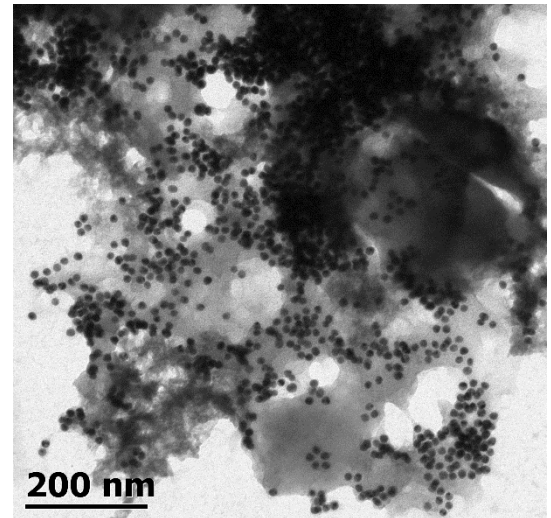
Estos espectros muestran bandas que provienen de las AuNP y bandas que indican la presencia de la Con-A, lo que demuestra la absorción de proteína en la superficie de las nanopartículas de oro que corresponde a la llamada corona dura. Por otra parte, considerando que el análisis fue realizado con cantidades similares de producto, resulta evidente que las bandas de absorción son de mayor intensidad en el espectro del complejo ConA-AuNP a pH 7.

Las muestras fueron analizadas por TEM. Como se puede visualizar en la Figura 42, los complejos ConA-AuNP son evidentes a partir de muestras tanto a pH 7.7, como a pH 5.5. Como era de esperarse, el lavado de las partículas permitió eliminar la proteína excedente que se visualizaba en las micrografías obtenidas anteriormente (ver Figura 42).

Complejo ConA-AuNP a  
pH 7



Complejo ConA-AuNP a  
pH 5

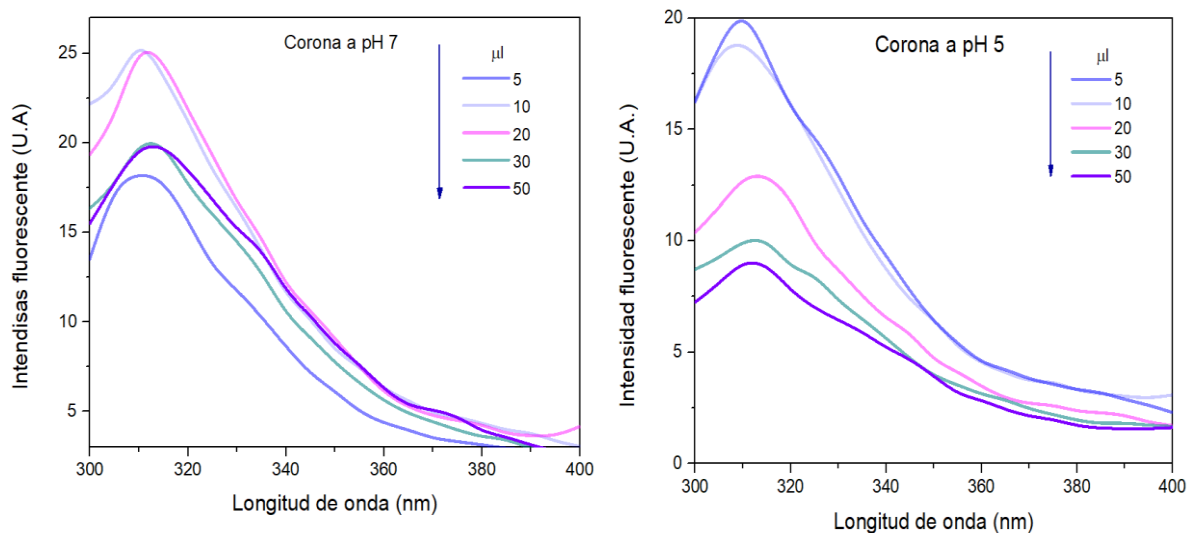


**Figura 43.** Imágenes de TEM del complejo ConA-AuNP luego de su exposición a pH de 5 (Corona a pH 5).

### 6.3.6 Efecto quenching

Dado que la presencia de Con-A en exceso produjo la ausencia de efecto quenching en el complejo ConA-AuNP (antes de los lavados), la búsqueda de este fenómeno fue realizada en las muestras de complejos a pH 7.7 y pH 5.5 una vez realizados los lavados para eliminar el exceso de proteína.

En la Figura 43 se muestran los espectros de emisión de fluorescencia a concentraciones crecientes de cada uno de los complejos (pH 5.5 y pH 7.7).



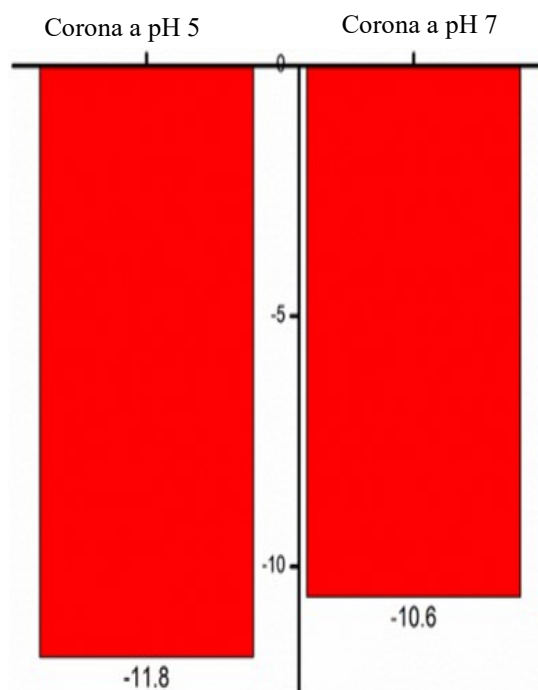
**Figura 44.** Emisión de fluorescencia de los complejos ConA-AuNP a pH 5 y pH 7. Se muestra la relación de la intensidad fluorescente que cada muestra presenta a diferentes volúmenes que van desde 5 hasta 100 µl.

Como puede observarse en estos espectros, la intensidad de fluorescencia de las muestras no es proporcional a la concentración de los complejos, sino que disminuye en las concentraciones más altas. Este análisis indica, por lo tanto, que la fluorescencia (proveniente de la proteína) sufre un fenómeno de auto apagamiento o quenching, y que la proteína se encuentra en interacción cercana con las nanopartículas.

### 6.3.7 Potencial zeta de los complejos ConA-AuNP

Debido a que la presencia de cargas menos negativas es evidencia de la formación de coronas proteicas en nanopartículas, era necesario evaluar el cambio del potencial zeta en los complejos finales. En la Figura 44 se muestran los resultados obtenidos con ambas muestras.

El potencial zeta obtenido para la corona 5 y la corona 7 mostró valores de -11.8 y -10.6 mV,

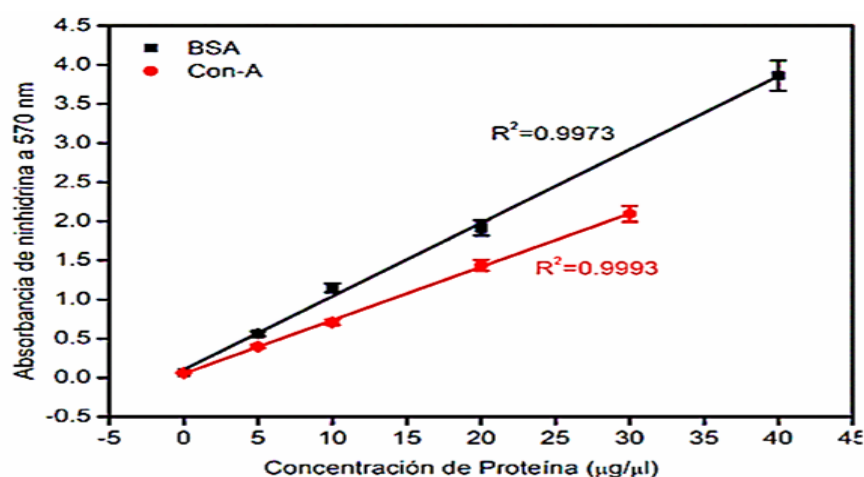


**Figura 45.** Resultado del potencial zeta de la complejo ConA-AuNP a pH a 5 (Corona 5) y complejo ConA-AuNP a pH a 7 (Corona 7).

respectivamente, con valores claramente menos negativos que las AuNPs no funcionalizadas, que mostraron un potencial mayor a -30 mV (ver Figura 20). Estos resultados coinciden con los ya mencionados anteriormente, confirmando la presencia de la Con-A en interacción con las AuNPs.

### 6.3.8 Cuantificación de proteínas de la corona en los complejos ConA-AuNPs

Por la necesidad de aplicar un método altamente sensible, capaz de detectar cantidades de proteína de manera muy sensible, la cuantificación de proteínas se realizó mediante el ensayo de ninhidrina. De manera previa al análisis, se exploró la viabilidad de utilizar la BSA, como proteína de uso común en el laboratorio, como componente de una curva estándar de concentración proteica. En la Figura 46, se muestran las curvas de absorbancia de BSA y de Con-A a concentraciones crecientes.



**Figura 46.** Curva de BSA (color negro) y de Con-A (color rojo), obtenidas por ensayo de ninhidrina.

Como puede observarse, la absorbancia de cada una de las proteínas es distinta, y una proteína no puede servir para deducir el contenido proteico de la otra. Por esta razón, las reacciones colorimétricas subsecuentes fueron realizadas con Con-A como estándar.

Mediante el ensayo de ninhidrina se evaluó la concentración de proteína presente en el complejo ConA-AuNP antes de la eliminación de proteína excedente y después de los lavados, así como a pH distintos. En la Tabla 2, se muestran los resultados de cuantificación de proteínas en las coronas de AuNP incubadas con Con-A.

Tabla 2. Cuantificación de la ConA en los diferentes complejos.

Complejo	Tipo de corona	Concentración de proteína
ConA-AuNP sin lavados	Corona suave	$1.9 \pm 0.2$ ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )
ConA-AuNP lavado, a pH 7.7	Corona dura	$0.3 \pm 0.1$ ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )
ConA-AuNP lavado, a pH 5.5	Corona dura	$0.4 \pm 0.1$ ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )

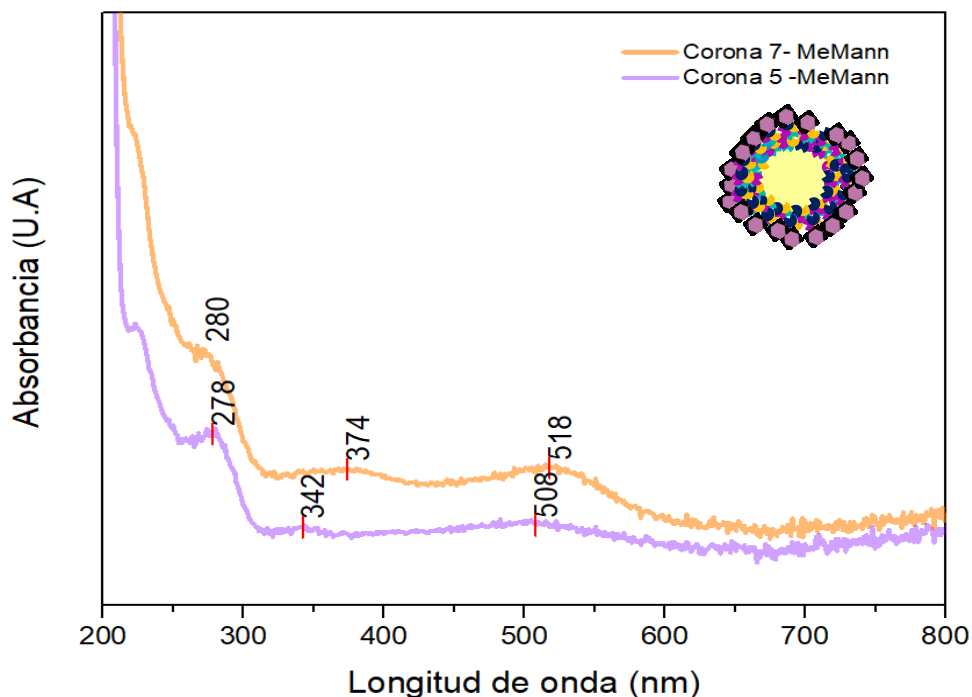
De acuerdo con estos resultados, la realización de lavados con PBS permite eliminar proteína en exceso, de tal manera que la cantidad de proteína encontrada corresponde a un 42% del inicial, antes de los lavados. Por otro lado, el cambio de pH del complejo no afectó significativamente la cantidad de proteína adherida (Tabla 2).

#### 6.4 Estudio de la interacción AuNP-ConA y su ligando $\alpha\text{MeMan}$

Se exploró si la técnica de espectroscopía UV-Vis permitía visualizar cambios en el Plasmón de superficie de las AuNP, luego de la interacción entre el complejo ConA-AuNP y  $\alpha$ -metil D-manósido, ligando de la lectina. Para ello, los complejos fueron incubados con el  $\alpha$ -metil D-manósido durante 24 hrs.

En la figura 47, se muestran los espectros UV-visible para complejos a pH 7.7 y pH 5.5. Como se puede observar, en ambos espectros aparecen dos bandas de absorción principales: la primera de ellas con un máximo de absorción a 518 nm, correspondiente a la resonancia del Plasmón de superficie del complejo ConA-AuNP-ligando a pH 7.7. A su vez, el complejo formado a un pH de 5.5, muestra una banda de absorción a 508 nm. Este comportamiento espectral indica el desplazamiento de energía de absorción del Plasmón, muy probablemente debido al crecimiento de las partículas (la energía de las partículas nativas se asociaba con un máximo de absorción a 530 nm – ver Figura 17). Asimismo, la baja intensidad de la señal (en comparación con la de las

partículas nativas) indica una menor interacción de la luz en los complejos, rodeados por proteínas y azúcar.

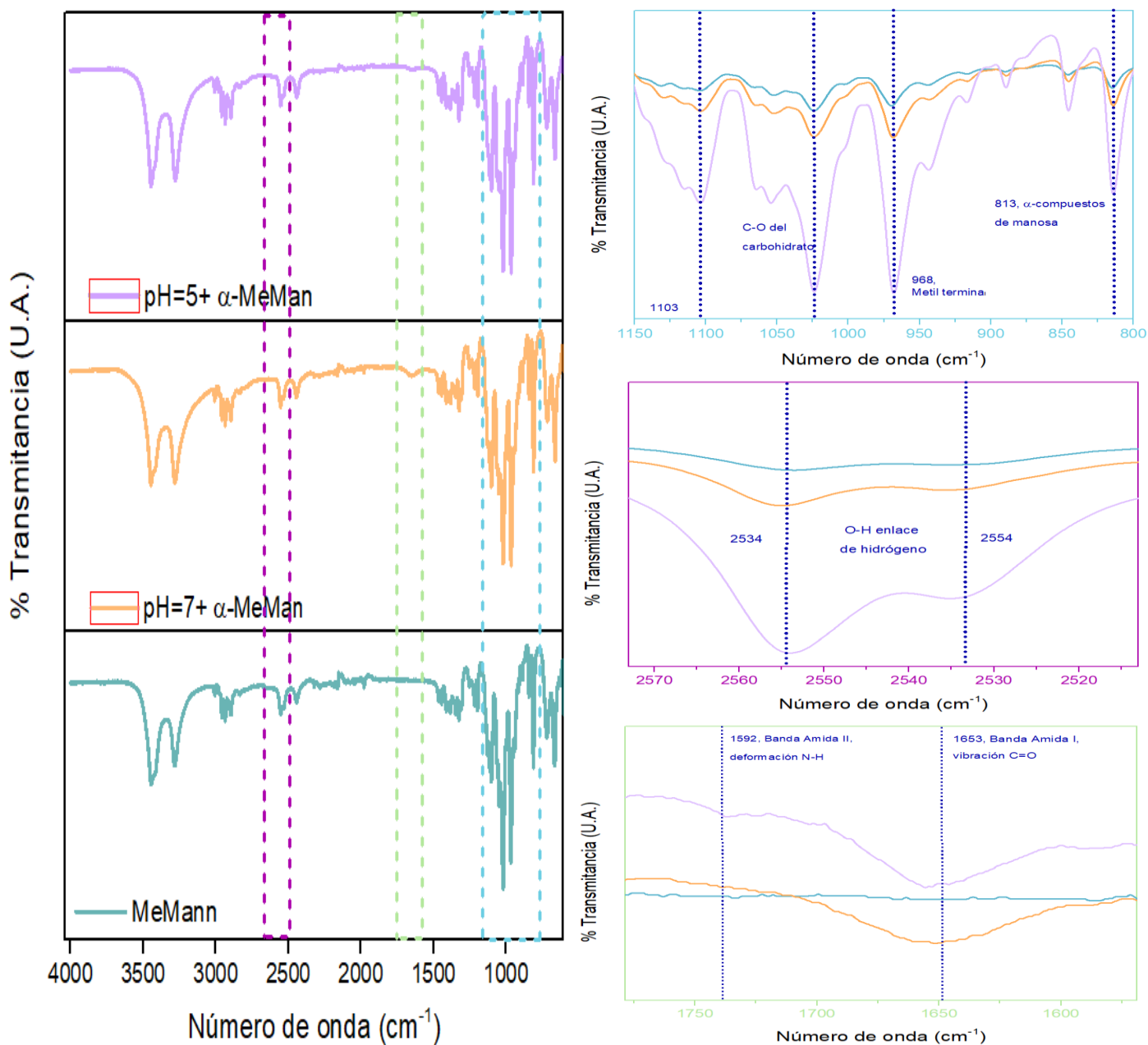


**Figura 47.** Espectros de absorción de UV-vis de los complejos ConA-AuNP + ligando ( $\alpha$ -MeMan).

Para explorar la presencia del ligando, el azúcar Alpha MeMan, en el complejo final de partículas se utilizó la espectroscopía FTIR. En la Figura 48 A) se muestran los espectros correspondientes al azúcar, alpha-MeMan, y a los complejos ConA-AuNP a pH 5- MeMan y complejo ConA-AuNP a pH 7-MeMan. De manera interesante, el espectro de los complejos cambia claramente en la región de la huella dactilar, con respecto a los complejos no incubados con el azúcar. Además, los espectros de los complejos en unión con el azúcar muestran bandas provenientes de la absorción de este mismo en la región IR (Figura 48 B) y C)). En particular, hay presencia de bandas debidas a la absorción de grupos piranosa, de grupos metil y de vibraciones C-O, correspondientes al  $\alpha$ -metil D-manósido (Socrates, 2001) (Figura 47 B) y C)). Asimismo, en la



Figura 27 D) se puede observar la presencia de grupos amida, en este caso amina I y amina II , que fueron atribuidas a la presencia de Con-A en los complejos (Barth, 2007).

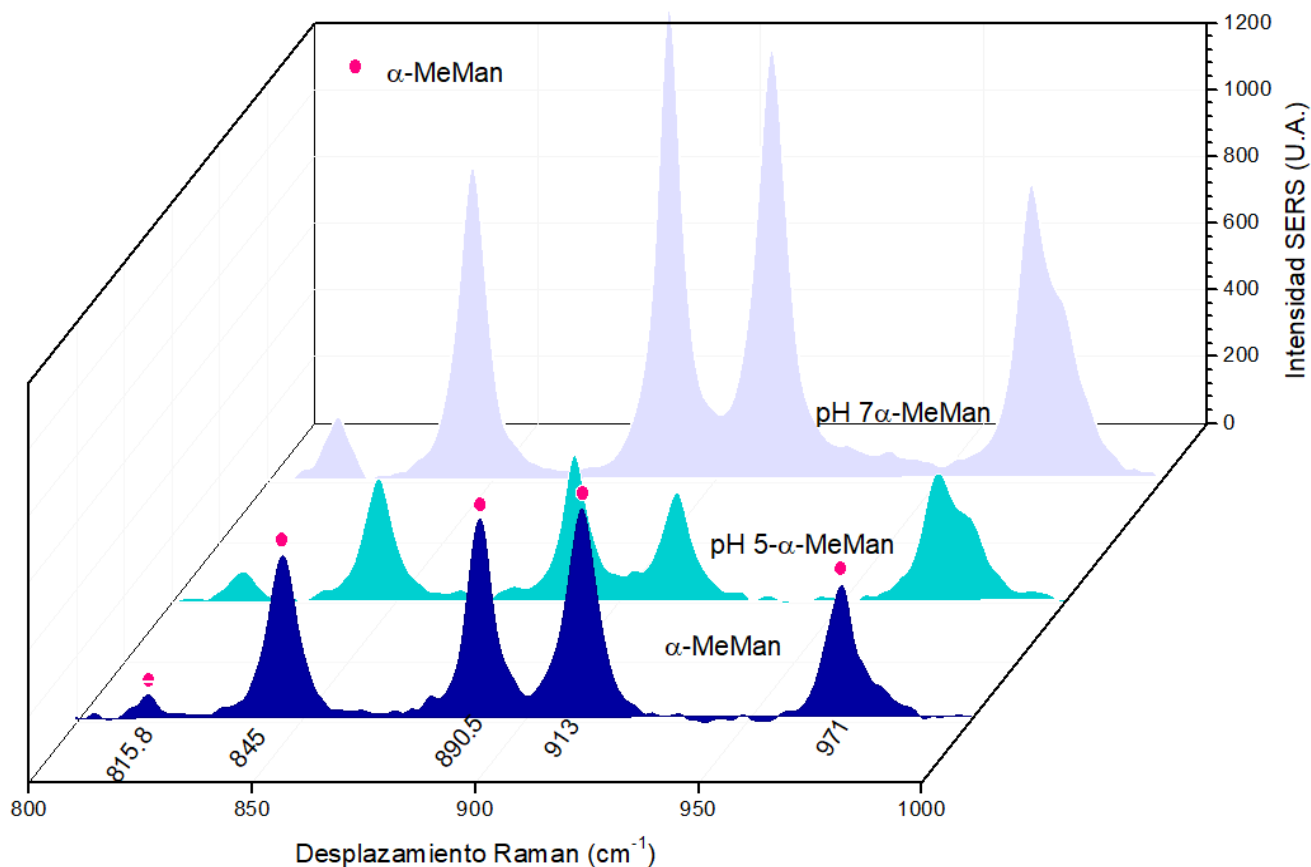


**Figura 48.** A) Espectros de absorción obtenidos por FTIR de  $\alpha$ -MeMan (color azul), complejo ConA-AuNP a pH 7 (color naranja) y complejo ConA-AuNP a pH 5 (color morado). B) y C) muestran una aplicación de las bandas de transmitancia que corresponde a la presencia del MeMan. D) muestra la ampliación del espectro que corresponde a las bandas que delatan la presencia de la Con-A.

## 6.5 Exploración de la técnica Raman-SERS como método para identificar la captura de ligandos sacarídicos por complejos AuNP-ConA

En general, los espectros Raman son más simples que los espectros FTIR, ya que las vibraciones localizadas de enlaces dobles o triples o grupos ricos en electrones producen bandas más intensas que las vibraciones de un enlace simple o grupos pobres en electrones. (Pederzoli et al., 2017)

En la Figura 28, se observan tres gráficas correspondientes a MeMan (gráfica color negro), complejo ConA-AuNP a pH 5- MeMan (gráfica color rojo) y complejo ConA-AuNP a pH 7- MeMan (gráfica color verde). , donde se puede ver como la intensidad de ambas coronas aumenta presentando un efecto SERS a diferencia del  $\alpha$ -metil D-manósido, esto gracias a las propiedades ópticas del oro, que permitan que la señal del azúcar se presente en ambas coronas. Por otra parte, la señal es muy similar en las tres muestras, la diferencia entre ellas es principalmente el aumento de la intensidad, por lo que es visible por SERS la detección del reconocimiento del azúcar por parte de ambas coronas, sin embargo la señal es mucho mayor para el caso de la complejo ConA-AuNP a pH a pH 7-MeMan comparada con la señal obtenida en la complejo ConA-AuNP a pH a 5-MeMan. La detección del reconocimiento mediante el efecto SERS, comprueba junto con los resultados presentados previamente que ambas coronas reconocen el azúcar, sin embargo este reconocimiento tiene mejor intensidad en la señal SERS, cuando se hace mediante el uso del complejo ConA-AuNP a pH 7 esto debido a mayores sitios de contacto directo con el azúcar, que están relacionados a la estructura tetraédrica dispuesta alrededor de la nanopartícula de oro formando una corona.



**Figura 49.** Espectro Raman de las muestras de  $\alpha$ -metil D-manósido (gráfica de color azul, complejo ConA-AuNP a pH 7-MeMan (gráfica color morado).

## 7 Conclusiones

Los resultados aquí presentados permiten mostrar la factibilidad de producir nanopartículas de oro biofuncionales que, debido a su recubrimiento con la lectina Con-A, son capaces de reconocer manosas.

Se demostró que los complejos AuNP – lectina son fácilmente producidos mediante un simple paso de fisisorción, como se esperaba para una estructura metálica con afección por interactuar con proteínas y formar la llamada biocorona.

Debido a los posibles cambios de pH que un complejo AuNP-lectina podría experimentar en condiciones biológicas, en este trabajo se exploró la estabilidad y las características del complejo obtenido cuando se mantiene a un pH de 7, y cuando es sometido a medios acidificantes, a un pH de 5.5.

El uso del  $\alpha$ -metil D-manósido (MeMan), molécula que se utilizó como azúcar modelo debido a su amplia distribución en la pared celular de hongos y bacterias, permitió evaluar la funcionalidad de la construcción obtenida, es decir su unión al azúcar.

Los complejos AuNP-lectina experimentan cambios en cuanto a su resonancia del Plasmón de superficie luego de su unión con el azúcar modelo, indicando la presencia de interacción lectina-ligando.

Mediante espectroscopías FTIR y Raman, la construcción obtenida es capaz de reportar la presencia del ligando utilizado, el  $\alpha$ - metil D-manósido, generándose señales específicas, así como un aumento en la intensidad de señales del ligando, debido al efecto SERS. Adicionalmente, los resultados obtenidos indican que el potencial diagnóstico del complejo ConA-AuNP para monitorear la presencia de azúcares microbianos sería superior a un pH de 7.

## 8 Perspectivas

A partir de los estudios y discusiones presentados en el presente trabajo, las perspectivas de trabajos a futuro se pueden orientar en diferentes direcciones.

En primer plano estarían los trabajos destinados al diagnóstico, para la cual se propone la evaluación de la construcción aquí obtenida como una herramienta para detectar la presencia de patógenos específicos, particularmente mediante el uso de espectroscopía Raman-SERS. Para

lograr esto, es necesario estudios de reconocimiento del complejo ya mencionado con diferentes microorganismos.

En segundo plano, estudiar el posible uso del complejo ConA-AuNP a pH de 7 para la detección de estructuras glicosiladas que se forman durante la progresión del cáncer, con el fin de poder detectar dichas estructuras aprovechando las propiedades ópticas y fisicoquímicas que el complejo (Hendrickson & Zherdev, 2018).

Existen diferentes posibles aplicaciones de diagnóstico, desarrollo de micro ensayos, detección de células, etc., que podrían ser posibles gracias a las propiedades fisicoquímica y ópticas que ofrece el complejo ConA-AuNP a pH 7.

## 9 Bibliografía

Antosiewicz, J. M., & Shugar, D. (2016). UV – Vis spectroscopy of tyrosine side-groups in studies of protein structure . Part 2: selected applications, 163–177. <https://doi.org/10.1007/s12551-016-0197-7>

Aparicio, M. (2010). Utilidad de la difracción de rayos x en las nanociencias, 3(2), 62–72.

Asahi, T., Uwada, T., & Masuhara, H. (2006). *Single particle spectroscopic study on surface plasmon resonance probing local environmental conditions*. *HANDAI ANOPHOTONICS* (Vol. 2). Elsevier B.V. [https://doi.org/10.1016/S1574-0641\(06\)80017-3](https://doi.org/10.1016/S1574-0641(06)80017-3)

Au, J. L., Yeung, B. Z., Wientjes, M. G., Lu, Z., & Wientjes, M. G. (2016). Delivery of cancer therapeutics to extracellular and intracellular targets : Determinants , barriers , challenges and opportunities ☆, 97, 280–301. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.12.002>

Avila, R., Tamariz, E., Medina-Villalobos, N., Andilla, J., Marsal, M., & Loza-Alvarez, P. (2018). Effects of near infrared focused laser on the fluorescence of labelled cell membrane. *Scientific Reports*, 8(1), 17674. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36010-1>

Barth, A. (2007). Infrared spectroscopy of proteins, 1767, 1073–1101. <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2007.06.004>

Bewley, C. A., & Shahzad-ul-hussan, S. (2013). Invited Review Characterizing Carbohydrate–Protein Interactions by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, 99(10), 796–806. <https://doi.org/10.1002/bip.22329>

Bhattacharjee, S. (2016). Review article DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release*, 235, 337–351. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>

Cai, S., & Singh, B. R. (2004). A Distinct Utility of the Amide III Infrared Band for Secondary Structure Estimation of Aqueous Protein Solutions Using Partial Least Squares Methods †, 2541–2549.

Cantarutti, C., Bertocin, P., Corazza, A., Giorgetti, S., Mangione, P. P., Bellotti, V., ... Viale, I. (2017). Short-Chain Alkanethiol Coating for Small-Size Gold Nanoparticles Supporting Protein Stability, 1–11. <https://doi.org/10.3390/magnetochemistry3040040>

Capjak, I., Goreta, S. Š., Jurašin, D. D., & Vrček, I. V. (2017). How protein coronas determine the fate of engineered nanoparticles in biological environment, 245–253. <https://doi.org/10.1515/aiht-2017-68-3054>

Carrillo-carrion, C., Carril, M., & Wolfgang, J. (2017). Techniques for the experimental investigation of the protein corona, (Figure 1), 106–113.

Casals, E., Pfaller, T., Duschl, A., Oostingh, G. J., & Puntès, V. (2010). Time Evolution of the Nanoparticle Protein Corona, 4(7), 3623–3632.

Charge and Potential Distribution at Interfaces. (1973), 11–58. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-361961-7.50006-7>

Cheema, A. (2017). Investigating the protein corona of novel nanovehicles in model biological fluids.

Chmielewski, M. J., Buhler, E., Candau, J., & Lehn, J. (2014). Multivalency by Self-Assembly : Binding of Concanavalin A to Metallosupramolecular Architectures Decorated with Multiple Carbohydrate Groups, 6960–6977. <https://doi.org/10.1002/chem.201304511>

Choi, E., Webster, T. J., & Kim, S. (2015). Effect of the protein corona on nanoparticles for modulating cytotoxicity and immunotoxicity, 97–113.

Clemments, A. M., Botella, P., & Landry, C. C. (2015). Protein Adsorption From Biofluids on Silica Nanoparticles: Corona Analysis as a Function of Particle Diameter and Porosity. <https://doi.org/10.1021/acsami.5b07631>

Coffey, T. (2017). *Surface Plasmons*.

Corbo, C., & Toledano, N. E. (2016). The impact of nanoparticle protein corona on cytotoxicity , immunotoxicity and target drug delivery, 11, 81–100.

Cruz, D. A., Rodríguez, M. C., López, J. M., Herrera, V. M., Orive, A. G., & Creus, A. H. (2012). NANOPARTÍCULAS METÁLICAS Y PLASMONES DE SUPERFICIE : UNA RELACIÓN PROFUNDA METALLIC NANOPARTICLES AND SURFACE PLASMONS : A DEEP RELATIONSHIP, 3(2), 67–78.

- Cummings, R. D., & Pierce, J. M. (2014). The challenge and promise of glycomics. *Chemistry and Biology*, 21(1), 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.12.010>
- Docter, D., Westmeier, D., Markiewicz, M., Stolte, S., & Knauer, S. K. (2015). Chem Soc Rev The nanoparticle biomolecule corona : lessons learned – challenge accepted ? *Chemical Society Reviews*. <https://doi.org/10.1039/C5CS00217F>
- Elahi, N., Kamali, M., & Baghersad, M. H. (2018). Recent biomedical applications of gold nanoparticles: A review. *Talanta*, 184(November 2017), 537–556. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.02.088>
- Electron, S., Microscopy, M., & External, X. (n.d.). Characterization Techniques, 19–34.
- Femenias, A. F. (2015). Escuaramidas como agentes de “ Quenching ” de fluorescencia Grado de Química.
- G, S. (2001). *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies Contents*.
- Gehr Peter, Z. R. (2019). Biological Responses to Nanoscale Particles.
- Geoffrey, C. (2000). *The Cell: A Molecular Approach*.
- Giannini, C., Siliqi, D., Altamura, D., & Sibillano, T. (2015). G. Ríos, 81(3), 254–262.
- Govindaraju, S., Ankireddy, S. R., Viswanath, B., Kim, J., & Yun, K. (2017). Fluorescent Gold Nanoclusters for Selective Detection of Dopamine in Cerebrospinal fluid. *Scientific Reports*, 7, 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep40298>
- Gow, N. A. R., Latge, J., & Munro, C. A. (2017). The Fungal Cell Wall : Structure , Biosynthesis , and Function, (May), 1–25. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0035-2016.Correspondence>
- Hackley, V. A., & Clogston, J. D. (2011). Chapter 4 Measuring the Hydrodynamic Size of Nanoparticles, 697(3), 35–52. <https://doi.org/10.1007/978-1-60327-198-1>
- Haiss, W., Thanh, N. T. K., Aveyard, J., & Fernig, D. G. (2007). Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from UV - Vis Spectra, 79(11), 4215–4221.
- Hammouda, B. (n.d.). Physical characterization methods.
- Hart, G. W., & Copeland, R. J. (2010). Glycomics hits the big time. *Cell*, 143(5), 672–676. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.11.008>
- Harvey, D. (1999). Chapter 10, Spectroscopic Methods.
- Healthcare GE Sciences Life. (2013). Spectrophotometry - Handbook. <https://doi.org/29-0331-82 AB 03/2013>
- Hendrickson, O. D., & Zherdev, A. V. (2018). Analytical applications of lectins, 8347(January).

<https://doi.org/10.1080/10408347.2017.1422965>

Hong, S. A., Kwon, J., Kim, D., & Yang, S. (2015a). A rapid , sensitive and selective electrochemical biosensor with concanavalin A for the preemptive detection of norovirus, *64*, 338–344. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.09.025>

Hong, S. A., Kwon, J., Kim, D., & Yang, S. (2015b). Biosensors and Bioelectronics A rapid , sensitive and selective electrochemical biosensor with concanavalin A for the preemptive detection of norovirus. *Biosensors and Bioelectronic*, *64*, 338–344. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.09.025>

Hurkat, P., Jain, A., & Jain, A. (2012). Concanavalin A conjugated biodegradable nanoparticles for oral insulin delivery. <https://doi.org/10.1007/s11051-012-1219-4>

Ismail, A. A., Voort, F. R. Van De, & Sedman, J. (1997). Chapter 4 Fourier Transform Infrared Spectroscopy : Principles and Applications.

J., H. R. (1988). Zeta Potential in Colloid Science: Principles and Applications. In *Zeta Potential in Colloid Science: Principles and Applications* (pp. 1–10). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-361961-7.50005-5>

Ka, G., Pawlowski, A., Hamasur, B., & Svenson, S. B. (2008). Mycobacterial glycoconjugates as vaccine candidates against tuberculosis, (September). <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.07.007>

Kirkwood, J., Hargreaves, D., Keefe, S. O., & Wilson, J. (2015). Using isoelectric point to determine the pH for initial protein crystallization trials, *31*(January), 1444–1451. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv011>

Kumar, C. (2010). *Nanocomposites*. Wiley-VICH.

Kumar, S., Gandhi, K. S., & Kumar, R. (2007). Modeling of Formation of Gold Nanoparticles by Citrate Method †, 3128–3136. <https://doi.org/10.1021/ie060672j>

Kumari, M., Mishra, A., Pandey, S., Singh, S. P., Chaudhry, V., Mudiam, M. K. R., ... Nautiyal, C. S. (2016). Physico-Chemical Condition Optimization during Biosynthesis lead to development of Improved and Catalytically Efficient Gold Nano Particles. *Scientific Reports*, *6*(February), 1–14. <https://doi.org/10.1038/srep27575>

Lakowicz, J. R. (2010). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*.

Larkin, P. (2011). *Infrared and Raman Spectroscopy*.

Lee, B. (2017). Protein corona : a new approach for nanomedicine design, 3137–3151.

Li, L., Mu, Q., Zhang, B., & Yan, B. (2010). Analytical strategies for detecting nanoparticle-protein interactions. *Analyst*, *135*(7), 1519–1530. <https://doi.org/10.1039/c0an00075b>

Li, N., Zhao, P., & Astruc, D. (2014). Anisotropic gold nanoparticles: Synthesis, properties,



applications, and toxicity. *Angewandte Chemie - International Edition*, 53(7), 1756–1789. <https://doi.org/10.1002/anie.201300441>

Li, T., Dong, Z. R., Guo, Z. Y., Wang, C. H., Zhi, X. T., Zhou, J. W., ... Hu, S. Y. (2015). Mannose-mediated inhibitory effects of PA-MSHA on invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma via EGFR/Akt/I $\kappa$ B $\beta$ /NF- $\kappa$ B pathway. *Liver International*, 35(4), 1416–1429. <https://doi.org/10.1111/liv.12644>

Loos, M. (2015). *Carbon Nanotube Reinforced Composites*. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-3195-4.00001-1>

Lou, S. (Ningbo I. of M. T. & E. (2012). PAPER A gold nanoparticle-based immunochromatographic assay: The influence of nanoparticulate size, 1174–1181. <https://doi.org/10.1039/c2an15844b>

Mahmoudi, M., Lynch, I., Ejtehadi, M. R., Monopoli, M. P., Bombelli, F. B., & Laurent, S. (2011). Protein A Nanoparticle Interactions : Opportunities and Challenges, 5610–5637.

McPhie, P. (2000). *Principles of Fluorescence Spectroscopy, Second ed. Joseph R. Lakowicz. Analytical Biochemistry* (Vol. 287). <https://doi.org/10.1006/abio.2000.4850>

Mondragón, P. (2000). *Espectroscopia de infrarrojo para todos*.

Mourdikoudis, S., & Pallares, R. M. (2018). Characterization techniques for nanoparticles : comparison and complementarity upon studying, 12871–12934. <https://doi.org/10.1039/c8nr02278j>

Mourdikoudis Stefanos, P. R. M. and T. N. T. K. (n.d.). Characterization techniques for nanoparticulate carriers, 87–121. <https://doi.org/10.1533/9781908818195.87>

Nel, A. E., Mädler, L., Velegol, D., Xia, T., Hoek, E. M. V., Somasundaran, P., ... Thompson, M. (2009). Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nature Materials*, 8(7), 543–557. <https://doi.org/10.1038/nmat2442>

Novak, U. (2017). The hydration of Concanavalin A studied by infrared spectroscopy, 1135, 138–143. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2017.01.052>

Pederzoli, F., Tosi, G., Vandelli, M. A., Belletti, D., Forni, F., & Ruozi, B. (2017). Protein corona and nanoparticles : how can we investigate on ?, 9(December), 1–23. <https://doi.org/10.1002/wnan.1467>

Perrett, D and Nayuni, N. K. (2014). *Efficacy of current and novel cleaning technologies (ProReveal) for assessing protein contamination on surgical instruments*. <https://doi.org/10.1533/9780857096692.3.598>

Philip, D. (2008). Synthesis and spectroscopic characterization of gold nanoparticles, 71, 80–85. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2007.11.012>

Pimentel, R. C., & Martín-martínez, E. S. (2014). Dispersión de luz dinámica en la determinación de tamaño de nanopartículas poliméricas, 1–5.

Rao, M. V. R., Atreyi, M., & Rajeswari, M. R. (1984). Fluorescence studies on concanavalin-A. *Journal of Biosciences*, 6(6), 823–828. <https://doi.org/10.1007/BF02716842>

Regional, W. (2004). Applications of the Ninhydrin Reaction for Analysis of Amino Acids , Peptides , and Proteins to Agricultural and Biomedical.

Reichardt, N. C., & Martí, M. (2013). Glyconanotechnology. *Chem Soc Rev*, 4358–4376. <https://doi.org/10.1039/c2cs35427f>

Roger, M. J. R., & Weiss, O. (2001). Fluorescence techniques, 155–171.

Royal Society of Chemistry. (2009). Ultraviolet -Visible Spectroscopy (UV). *RSC - Advancing the Chemical Sciences*, 68. <https://doi.org/10.1016/j.jpccs.2008.07.014>

Schmid, F., & Beer, L. (2001). Biological Macromolecules : Spectrophotometry Concentrations, 1–4.

Schutter, K. De, & Damme, E. J. M. Van. (2015). Protein-Carbohydrate Interactions, and Beyond ..., 15202–15205. <https://doi.org/10.3390/molecules200815202>

Sharma, B., Frontiera, R. R., Henry, A., Ringe, E., & Duyne, R. P. Van. (2012). SERS : Materials , applications , and the future Surface enhanced Raman spectroscopy ( SERS ) is a powerful vibrational. *Materials Today*, 15(1–2), 16–25. [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(12\)70017-2](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(12)70017-2)

Sharon, N., & Lis, H. (2004). History of lectins : from hemagglutinins to biological recognition molecules, 14(11), 53–62. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwh122>

Sharon, N., Lis, H., Sharon, N., & Lis, H. (2018). Linked references are available on JSTOR for this article : Lectins as Cell Recognition Molecules, 246(4927), 227–234.

Singh, A. K. (2016). Introduction to Nanoparticles and Nanotoxicology. *Engineered Nanoparticles*, 1–18. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801406-6.00001-7>

Skoog, D. A., Nieman, T. A., & Holler, F. J. (2008). *principios de análisis instrumental*.

Smirnov, E. (2017). *Assemblies of gold nanoparticles at liquid-liquid interfaces : from liquid optics to electrocatalysis*.

Solís, D., Bovin, N. V., Davis, A. P., Jiménez-Barbero, J., Romero, A., Roy, R., ... Gabius, H. J. (2015). *A guide into glycosciences: How chemistry, biochemistry and biology cooperate to crack the sugar code*. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* (Vol. 1850). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.03.016>

Stevenson, C., Hillier, J., & Hillier, J. (1969). The Formation of Colloidal Gold, 670–673. <https://doi.org/10.1021/j150508a015>

Tang, C. Y., & Yang, Z. (2017). *Transmission Electron Microscopy (TEM). Membrane Characterization*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63776-5.00008-5>

Thomas, S., & Kalarikkal, N. (2017). *Chapter 2 - Dynamic Light Scattering & DLS; Thermal and Rheological Measurement Techniques for Nanomaterials Characterization*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-46139-9.00002-5>

Turkevich, J. (1951). A STUDY OF THE NUCLEATION AND GROWTH PROCESSES IN THE SYNTHESIS OF, (c).

Van Der Wel, C., Bossert, N., Mank, Q. J., Winter, M. G. T., Heinrich, D., & Kraft, D. J. (2017). Surfactant-free Colloidal Particles with Specific Binding Affinity. *Langmuir*, 33(38), 9803–9810. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b02065>

Walker, J. M. (2014). *Lectins IN Series Editor*.

Wang, W., Ding, X., Xu, Q., Wang, J., Wang, L., & Lou, X. (2016). Colloids and Surfaces B : Biointerfaces Zeta-potential data reliability of gold nanoparticle biomolecular conjugates and its application in sensitive quantification of surface absorbed protein, 148, 541–548.

Wang, X., Xu, J., Wang, Y., Wang, F., & Chen, Y. (2016). A universal strategy for direct immobilization of intact bioactivity-conserved carbohydrates on gold nanoparticles. *RSC Advances*, 6(88), 85333–85339. <https://doi.org/10.1039/c6ra16511g>

Welch, K. T., Turner, T. A., & Preast, C. E. (2008). Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters Rational design of novel glycomimetics: Inhibitors of concanavalin A, 18, 6573–6575. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.09.095>

Winzen, S., Schoettler, S., Baier, G., Rosenauer, C., Mailaender, V., Landfester, K., & Mohr, K. (2015a). Complementary analysis of the hard and soft effects corona composition †. *Nanoscale*, 7, 2992–3001. <https://doi.org/10.1039/c4nr05982d>

Winzen, S., Schoettler, S., Baier, G., Rosenauer, C., Mailaender, V., Landfester, K., & Mohr, K. (2015b). Complementary analysis of the hard and soft effects corona composition. *Nanoscale*, 7, 2992–3001. <https://doi.org/10.1039/c4nr05982d>

Winzler, J. (n.d.). Carbohydrates in Cell Surfaces', (Gb 6746).

Wuithschick, M., Birnbaum, A., Witte, S., Sztucki, M., Vainio, U., Pinna, N., ... Kraehnert, R. (2015). Turkevich in New Robes: Key Questions Answered for the Most Common Gold Nanoparticle Synthesis, (7), 7052–7071.

Xu, X., Yuan, Y., Hu, G., Wang, X., Qi, P., Wang, Z., ... Yang, H. (2017). Exploiting pH-Regulated Dimer- Tetramer Transformation of Concanavalin A to Develop Colorimetric Biosensing of Bacteria, (November 2016), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01371-6>

Zhao, P., Li, N., & Astruc, D. (2013). State of the art in gold nanoparticle synthesis, 257(September 2012), 638–665.