

Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

**Estudio de la funcionalización de nanopartículas de oro con L-lisina
mediante técnicas espectroscópicas, el potencial zeta y el análisis de
seguimiento de nanopartículas (NTA)**

TESIS

Que para obtener el título de Lic. en Tecnología

PRESENTA

Kaori Nayeli Sánchez Carrillo

Asesora: Dra. Alma Vázquez Durán

Cuautitlán Izcalli, Edo. de México, 2021



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.

Agradecimientos

Primeramente, lo que todos vemos. A la UNAM, por darme todas las herramientas y oportunidades que me permitieron llegar aquí. A mi tutora la Dra. Alma, por su increíble paciencia y dedicación, por sus enseñanzas, sus consejos y su tiempo. Al Dr. Abraham por sus lecciones, consejos y dedicación. A todos los miembros del Laboratorio 14 de la UIM, por su apoyo y lecciones, por cada pequeño detalle que aprendí con su ayuda, en su compañía. A mis padres, por su apoyo incondicional, por sus frases de aliento, aunque a veces no sonarán como tal, pero más que nada por creer en mi cuando ni yo lo hacía; por estar conmigo en cada momento del camino que me trajo hasta este instante. A mi hermano por ser un pilar de apoyo, aunque no siempre lo exprese.

A continuación, a quienes no siempre vemos, pero son igual de importantes. A mis compañeras de generación, Dulce y Lucero, por todas esas palabras de aliento, por todas esas palmadas en las espaldas, bromas y abrazos que lograron empujarme hasta acá. A mis amigos, por creer en mí, por impulsarme a ser mejor y a superarme, por no permitirme desertar, por no permitir que me rindiera con esta tesis.

Resumen

Las nanopartículas de oro funcionalizadas con L-lisina han sido utilizadas ampliamente para la detección de distintos compuestos de interés para la salud mundial. En este trabajo se establecieron las condiciones de síntesis de nanopartículas de oro mediante la reducción de los iones de oro con citrato de sodio tribásico. Las nanopartículas de oro obtenidas presentaron una morfología esférica con tamaños en el rango de los 20-50 nm, un potencial zeta de -47 mV y fueron estables por hasta 3 meses. Además, se estudió la funcionalización de nanopartículas de oro con L-lisina mediante distintas técnicas de caracterización; y se exploró la aplicación de las nanopartículas de oro funcionalizadas para la detección colorimétrica de la aflatoxina B₁. El estudio de la funcionalización se llevó a cabo mediante técnicas espectroscópicas, UV-Vis y FTIR, el análisis de rastreo de nanopartículas (NTA), dispersión de luz dinámica (DLS), y mediciones de potencial zeta. Se estableció que la relación molar entre las nanopartículas de oro y la lisina, para la funcionalización fue de 1:2 para obtener un sistema estable. Para la detección de aflatoxinas, se determinó que la concentración de iones de cobre para obtener una respuesta óptica fue de 220 µM y el límite inferior de detección de AFB₁ con el sistema AuNP-Lis-Cu fue de 25 µg/L.

Abstract

L-lysine functionalized gold nanoparticles have been widely used for the detection of worldwide-interest complexes. In this work, optimal conditions were established for the synthesis of gold nanoparticles through the reduction of gold ions with sodium citrate tribasic. The obtained gold nanoparticles presented a spherical morphology with sizes in the range between 20-50 nm, a -47 mV zeta potential and were stable for up to 3 months. Furthermore, the L-lysine functionalization of the gold nanoparticles was studied with a variety of characterization techniques; moreover, the application of the functionalized gold nanoparticles as colorimetric detectors for aflatoxin B₁ was explored. The study of the functionalization was carried with spectroscopical techniques, UV-Vis and FTIR, nanoparticle tracking analysis (NTA), dynamic light scattering (DLS), and zeta potential measurements. The molar ratio

between the L-lysine and gold was determined and set to be 1:2, obtaining a stable system. For the detection of aflatoxins, the copper ions concentration needed to trigger an optical response was 220 μM and the lower detection limit for the AFB_1 using the system AuNP-Lis-Cu was 25 $\mu\text{g/L}$.

Índice

Agradecimientos.....	2
Resumen.....	3
Abstract.....	3
Índice.....	5
Índice de figuras.....	7
Índice de tablas.....	8
Listado de abreviaturas.....	9
Introducción.....	10
1. Antecedentes.....	12
1.1 Nanotecnología.....	12
1.2 Nanopartículas de oro.....	13
1.3 Métodos de síntesis de nanopartículas de oro.....	14
1.4 Funcionalización de las nanopartículas de oro.....	16
1.5 Aplicaciones de las nanopartículas de oro.....	20
1.6 Aflatoxinas.....	21
1.7 Técnicas de caracterización de las nanopartículas.....	22
1.7.1 Espectroscopia de absorción UV-Vis.....	22
1.7.2 Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier.....	24
1.7.3 Análisis de rastreo de nanopartículas.....	26
1.7.4 Dispersión dinámica de luz.....	27
1.7.5 Dispersión de luz electroforética.....	29
1.7.5.1 Mediciones de potencial zeta.....	29
2. Justificación.....	31
3. Objetivo.....	32

3.1 General	32
3.2 Particulares.....	32
4. Hipótesis	33
5. Metodología	33
5.1 Materiales	33
5.1.1 Reactivos	33
5.2 Métodos	33
5.2.1 Síntesis de nanopartículas de oro	33
5.2.2 Funcionalización de las nanopartículas de oro con L-lisina	34
5.2.3 Caracterización de las nanopartículas de oro funcionalizadas.....	34
5.2.3.1 Espectroscopia de absorción UV-Vis.....	34
5.2.3.2 Análisis de rastreo de nanopartículas.....	34
5.2.3.3 Mediciones de potencial zeta y dispersión de luz dinámica.....	35
5.2.3.4 Espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier.....	35
5.2.4 Formación del complejo de nanopartículas de oro funcionalizadas con L-lisina (AuNP-Lis) y cobre (II)	35
5.2.5 Detección de aflatoxinas	36
6. Resultados y discusión de resultados	37
6.1 Caracterización de las nanopartículas de oro funcionalizadas con L-lisina .	37
6.1.1 Espectroscopia de absorción UV-Vis	37
6.1.2 Análisis de rastreo de nanopartículas y dispersión de luz dinámica.....	41
6.1.3 Mediciones de potencial zeta	47
6.1.4 Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier.....	48
6.2 Caracterización de la formación del complejo (AuNP-Lis) y cobre (II).....	51
6.2.1 Espectroscopia de absorción UV-Vis	51

6.3 Detección de AFB ₁ utilizando el sistema AuNP-Lis-Cu ²⁺	55
7. Conclusiones.....	58
8. Perspectivas.....	59
9. Referencias.....	59

Índice de figuras

Figura 1. Esquema del mecanismo de la síntesis de nanopartículas de oro.....	16
Figura 2. Diagrama de las técnicas principales utilizadas para la funcionalización de nanopartículas por aproximación (covalente y no covalente).....	17
Figura 3. Estructura química en 2D del aminoácido L-lisina.....	19
Figura 4. Esquema del mecanismo de funcionalización de la L-lisina en la superficie de la nanopartícula de oro.....	19
Figura 5. Representación de un Plasmón de Resonancia Superficial en nanopartículas metálicas.....	23
Figura 6. Espectro de absorción UV-Vis de nanopartículas de oro esféricas de 20 nm.	24
Figura 7. Funcionamiento de un equipo NTA ilustrando sus partes y la forma en la que se realizan las mediciones.	26
Figura 8. Espectro de absorción UV-Vis representativo de las nanopartículas de oro sintetizadas por reducción de Au ³⁺ con citrato de sodio tribásico.	37
Figura 9. Espectro de absorción UV-Vis de las nanopartículas de oro (0.3 mM) funcionalizadas con diferentes concentraciones de L-lisina a temperatura ambiente y 30 minutos de incubación.....	39
Figura 10. Color característico de las nanopartículas de oro a 0.3 mM con L-lisina a distintas concentraciones después de 30 min de incubación.....	40
Figura 11. Distribución de tamaño de partícula de las nanopartículas de oro sintetizadas (a) y gráfico en 3D (b).....	42
Figura 12. Concentración y tamaño de las partículas por mililitro y dispersión de tamaños de las nanopartículas de oro funcionalizadas con L-lisina a 0.2 mM (a), 0.4 mM (b), 0.6 mM (c), 0.8 mM (d) y 1 mM (e).....	43

Figura 13. Mediciones obtenidas por DLS del radio hidrodinámico de las nanopartículas de oro (0.3 mM) (a) y de las nanopartículas de oro funcionalizadas a distintas concentraciones de L-lisina (b).....	46
Figura 14. Espectro de transmitancia de las nanopartículas de oro funcionalizadas con L-lisina a distintas concentraciones a) 0.2 mM, b) 0.4 mM, c) 0.6 mM, d) 0.8 mM, e) 1 mM, f) 2 mM y g) 3 mM.	50
Figura 15. Espectros de absorción UV-Vis de las nanopartículas de oro (0.3 mM) funcionalizadas con L-lisina (negro) y expuestas a distintas concentraciones de cloruro de cobre (II).	51
Figura 16. Espectros de absorción UV-Vis de nanopartículas de oro funcionalizadas con L-lisina (negro) y expuestas a distintas concentraciones de cloruro de cobre (II).	53
Figura 17. Nanopartículas de oro funcionalizadas con L-lisina interactuando con distintas concentraciones de cobre (II).	54
Figura 18. Esquema de la interacción electroestática entre las nanopartículas de oro funcionalizadas con L-lisina y los iones Cu^{2+}	54
Figura 19. Espectros de absorción UV-Vis de las nanopartículas de oro (0.3 mM) funcionalizadas con L-lisina (0.6 mM) y cobre (II) expuestas a aflatoxina B ₁ a distintas concentraciones ($\mu\text{g/L}$).	56
Figura 20. Detección colorimétrica con el sistema AuNP-Lis-Cu de distintas concentraciones de aflatoxina B ₁	56

Índice de tablas

Tabla 1. Comparación del tamaño de las nanopartículas de oro obtenido mediante DLS y NTA, así como del cambio de potencial zeta en función de la concentración de L-lisina.	47
Tabla 2. Potencial zeta de las nanopartículas de oro funcionalizadas diferentes concentraciones de lisina.	48

Listado de abreviaturas

UV-Vis	Espectroscopía de absorción ultravioleta-visible
FTIR	Espectroscopía de infrarrojo con Transformada de Fourier
NTA	Análisis de rastreo de nanopartículas
DLS	Dispersión de luz dinámica
AFB ₁	Aflatoxina B ₁
LSP	Plasmón superficial localizado
SPR	Resonancia del plasmón de superficie
ELS	Dispersión de luz electroforética
AuNP-Lis	Complejo de nanopartículas de oro funcionalizadas con L-lisina
AuNP-Lis-Cu ²⁺	Complejo de nanopartículas de oro funcionalizadas con L-lisina y cloruro de cobre (II)

Introducción

Las nanopartículas son estructuras en las cuales sus tres dimensiones se encuentran dentro de la escala nanométrica (1-100 nm). El estudio de las nanopartículas es de interés a nivel mundial debido a que las propiedades físicas, químicas y morfológicas expuestas a escala nanométrica son diferentes de aquellas que presenta el material a nivel micrométrico [1]. Las nanopartículas ofrecen una variedad amplia de aplicaciones en diversos sectores, como la biomedicina y la detección de analitos. Por otro lado, las propiedades de las nanoestructuras son dependientes de la composición, del tamaño y de la morfología. Por ejemplo, las nanopartículas metálicas, tienen una densidad de carga electrónica alta y una fuerte absorción óptica [2].

Dentro de las nanopartículas metálicas, las sintetizadas con oro han sido ampliamente estudiadas y aplicadas, por sus propiedades ópticas, ejemplo de ello es la presencia del plasmón. El LSP es un fenómeno óptico que resulta de la interacción de un haz electromagnético con las nanopartículas de oro. Al ser las nanopartículas de oro de un tamaño menor a la longitud de onda de la luz, los electrones superficiales de la banda de conducción, confinan el haz electromagnético incidente y se genera una oscilación [3]. Cuando la oscilación entre los electrones superficiales de la nanopartícula y el haz incidente coinciden, entonces tiene lugar la resonancia del plasmón superficial.

El plasmón de resonancia superficial es el responsable de que las nanopartículas de oro adquieran una coloración intensa que está en función del tamaño y la forma de éstas. Además de facilitar su caracterización óptica también permite que las nanopartículas de oro sean utilizadas como sensores colorimétricos; en este contexto, las nanopartículas de oro se han utilizado para la detección de metales pesados, aminoácidos, anticuerpos, micotoxinas, entre otros [4]–[6].

Sin embargo, la aplicación de las nanopartículas de oro depende de la modificación de su superficie. La modificación superficial de las nanopartículas, conocida como funcionalización, determina su interacción con el entorno. Las nanopartículas de oro han sido funcionalizadas con una amplia gama de moléculas entre los que se

incluyen: aminoácidos, anticuerpos, polímeros, proteínas, fármacos, material genético, por mencionar algunos [7]. Dentro de los compuestos empleados para la funcionalización de nanopartículas de oro se encuentran las proteínas y los aminoácidos, pues se ha reportado que incrementan la biocompatibilidad y estabilidad a las nanopartículas, evitando así su aglomeración. Los grupos funcionales presentes en los aminoácidos y las proteínas presentan una alta afinidad por el oro, principalmente los grupos funcionales -SH y -NH₂, esto favorece la funcionalización de las nanopartículas al interactuar electrostáticamente con los grupos cargados negativamente en la superficie de la nanopartícula [8].

En este contexto, Horovitz et al. [9] estudiaron las interacciones entre nanopartículas de oro en presencia de lisina, con la finalidad de utilizarlas para la detección de aminoácidos en distintos medios. Adicionalmente, Sener et al. [4] evaluaron la respuesta colorimétrica de las nanopartículas de oro sintetizadas con citrato de sodio y en presencia de lisina para la detección de mercurio en agua.

Para la caracterización de las nanopartículas metálicas y su interacción con grupos funcionales en su superficie, la espectroscopia de absorción UV-Vis es en la actualidad la técnica más empleada, ya que permite obtener el plasmón de resonancia superficial [10]. Otras técnicas de vanguardia como el análisis de rastreo de nanopartículas y la dispersión de luz dinámica, son empleadas para determinar la concentración, el tamaño y la distribución de tamaño de partículas suspendidas [11].

Al interaccionar con otros compuestos, las nanopartículas de oro experimentan un cambio en sus propiedades físicas y ópticas, las cuales son utilizadas para la detección de analitos. Actualmente, en el área de la detección colorimétrica, hay una creciente tendencia hacia la detección de compuestos biológicos que presentan alta toxicidad, tales como las aflatoxinas, las cuales son metabolitos secundarios sintetizados por diversas especies de hongos del género *Aspergillus*, y que han sido reconocidas como el carcinógeno más importante por la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC) [12]. La aflatoxina B₁ se considera el agente carcinógeno, hepatotóxico, inmunosupresor y mutágeno más potente de origen

natural conocido [13]. Su presencia en los alimentos representa un problema de salud pública, por lo que el desarrollo de métodos para su detección rápida ha sido objeto de estudio.

1. Antecedentes

1.1 Nanotecnología

El prefijo nano en la palabra nanotecnología hace referencia a una mil millonésima parte de un metro (1×10^{-9} m). La nanotecnología se enfoca en varias estructuras de la materia que tienen dimensiones del orden de 1-100 nm [1]. Mientras que la palabra nanotecnología es relativamente nueva, la existencia de dispositivos funcionales y de estructuras de dimensiones nanométricas no lo es, hay evidencia de su existencia desde el principio de la vida misma en la Tierra. Un ejemplo de ello es la concha del caracol nautilus, de la familia *Nautilidae*, en la cual se ha encontrado carbonato de calcio nanoestructurado.

Aunque se desconoce el momento preciso de la historia en el cual las primeras nanopartículas fueron sintetizadas, se ha reportado que para el siglo IV D.C. los fabricantes de vidrio romanos ya utilizaban metales de tamaño nanométrico para colorear el vidrio [14].

En el año de 1960 Richard Feynman, ganador del Premio Nobel en Física de 1965, dictó una conferencia visionaria, en la reunión de la Sociedad Americana de Física, titulada “Hay bastante espacio en el fondo”, en ella, él contempló la posibilidad y el potencial de materiales de tamaño nanométrico, sostenía que era posible manipular átomos individuales para formar nuevas estructuras microscópicas, con propiedades diferentes [1], [15].

Una de las áreas más importantes de la nanotecnología es la síntesis de nanoestructuras, las cuales son definidas como estructuras con tamaños menores a 100 nm en al menos una de sus dimensiones [16]. Estas nanoestructuras pueden ser sintetizadas por diversos métodos clasificados en dos aproximaciones: top-down (de arriba hacia abajo) y bottom-up (de abajo hacia arriba).

Los métodos top-down para la síntesis de nanoestructuras involucran la reducción del tamaño de materiales másicos hasta obtener nanoestructuras, en lo que se incluyen: la litografía, la molienda de alta energía, la erosión catódica, entre otros. Por otro lado, en la aproximación bottom-up, la síntesis de nanoestructuras comienza con átomos, iones o moléculas como unidades de construcción para la formación de clusters u otras estructuras en la escala nanométrica. Dentro de estos métodos se incluyen la síntesis hidrotérmica, solvotérmica, deposición química en fase vapor, síntesis vía química húmeda, reducción química, entre otras [2].

1.2 Nanopartículas de oro

La importancia del oro coloidal (nanopartículas de oro) para colorear vidrio y sus posibles aplicaciones médicas fueron reconocidas desde la antigüedad con los romanos. Los alquimistas, por otra parte, creían que el descubrimiento de una forma soluble de oro resultaría en una “poción” llamada “el elixir de la vida” [14].

El término coloide fue propuesto en 1861 por Thomas Graham, para este momento Michael Faraday ya había establecido que el oro, así como otros metales, presentan la capacidad de formar disoluciones transparentes y películas delgadas; las cuales pueden ser analizadas y estudiadas debido a su interacción con la luz. A partir de esa interacción fue posible asumir que sus dimensiones eran del mismo orden que la longitud de onda de la luz (nm) [14]. Es por ello por lo que se le atribuye a Faraday el reconocer que el color de las nanopartículas de oro, y otros metales, se debe al tamaño de partícula [17].

La interacción de las nanopartículas de oro con la luz se ve fuertemente influenciada por el ambiente circundante, el tamaño y la morfología; resultando en diferentes oscilaciones y longitudes de onda para cada metal, tamaño y geometría [14]. La radiación interactúa con los electrones libres en la superficie de la nanopartícula, ocasionado una oscilación de la carga electrónica; cuando la oscilación de los fotones y los electrones se sincronizan, se presenta una resonancia. Estas oscilaciones se conocen como plasmones de superficie y son el resultado de la absorción de la radiación en el rango del azul-verde (450-530 nm) y con reflexión del color rojo –nanoestructuras OD-, dándole la coloración intensa roja a la

suspensión de nanopartículas [17]. Cuando aumenta el tamaño de la partícula, la longitud de onda del plasmón experimenta un corrimiento hacia el rojo.

Otras de las propiedades ópticas de las nanopartículas de oro son su capacidad de absorción, dispersión y mejoramiento del campo plasmónico para las señales Raman, las cuales han sido utilizadas en imagenología molecular de células cancerosas [18].

Las nanopartículas de oro han recibido gran interés por las propiedades ópticas únicas que presentan al interactuar con la radiación electromagnética, estas propiedades las hacen candidatas para su aplicación en diversas áreas como la catálisis, la electrónica, la biotecnología, la imagenología, como sensores, por mencionar algunas.

1.3 Métodos de síntesis de nanopartículas de oro

Diversos métodos han sido utilizados para el control del tamaño y de la morfología en la síntesis de nanopartículas de oro, destacan los métodos químicos [19] y los métodos biológicos [20], [21]. La síntesis por la vía química húmeda es una de las más utilizadas, debido a las ventajas que ofrece como su simplicidad, reproducibilidad y bajo costo relativo [2].

La síntesis vía química húmeda se divide en dos procesos principales: la reducción de los iones metálicos y la estabilización de las nanopartículas. Para que éstos se lleven a cabo se necesita un agente reductor y un agente estabilizante, o un agente que actúe como reductor y estabilizante simultáneamente. El tamaño de las nanopartículas se puede controlar mediante la variación en la concentración del precursor, del agente reductor, del agente estabilizante, el pH, la temperatura de la reacción, entre otros [16].

La síntesis de nanopartículas de oro en soluciones acuosas se puede llevar a cabo de manera sencilla; sin embargo, obtener una suspensión mayormente monodispersa es el gran reto. Dentro de las metodologías para la síntesis vía química húmeda, la de Turkevich es una de las más utilizadas, debido a su versatilidad para el control de tamaño, bajo costo, tiempo de reacción y bajo impacto ambiental

[22]. Este método de síntesis involucra la adición de citrato de sodio de manera rápida a una solución de HAuCl_4 en ebullición, lo que permite sintetizar nanopartículas de oro con distribuciones pequeñas de tamaño, los cuales oscilan entre los 15 y 20 nm. El citrato de sodio añadido juega un papel doble como donador de electrones y como estabilizante de las nanopartículas [23].

El mecanismo de reacción que se ha propuesto para la síntesis de nanopartículas por el método de Turkevich, indica que el citrato de sodio provee los electrones necesarios para reducir los iones Au^{3+} en el HAuCl_4 , a Au^0 , su estado no oxidado; formando rápidamente clusters (1-2 nm), también llamados semillas o núcleos de crecimiento. Durante esta primera fase, el ritmo de reducción de los iones Au^{3+} es muy alto, en los primeros segundos de la reacción y se consume entre el 1-2% del precursor de oro [24], en este momento es cuando se define el tamaño de las nanopartículas, entre más núcleos de crecimiento se formen, menor será el tamaño de las nanopartículas, en el caso contrario, cuando se forman pocas semillas, las nanopartículas resultantes tendrán un mayor tamaño.

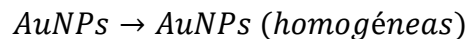
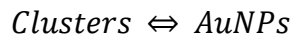
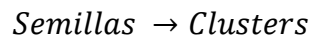
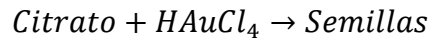
Posteriormente, la velocidad de reducción de los iones de oro disminuye, esto ocasiona que las primeras partículas formadas se fusionen y crezcan, reduciendo la cantidad de partículas primarias. Ahora comienza el crecimiento, en este proceso, el precursor es reducido en la doble capa eléctrica (EDL) que existe en la superficie de la nanopartícula, aumentando su tamaño, a esta etapa se le conoce como “crecimiento difusional”. Finalmente, cuando las nanopartículas alcanzan un tamaño alrededor de los 4-5 nm, aumenta el ritmo de crecimiento, disminuyendo rápidamente los átomos de oro disponibles hasta alcanzar su tamaño final. Una vez formadas las nanopartículas, el citrato se enlaza a su superficie, evitando que más átomos metálicos se adhieran a esta y otorgándoles estabilidad [19], [25].

Otro mecanismo propuesto es el de Méndez et al. [26] en su trabajo, sostienen que después de la formación de núcleos estos no se fusionan disminuyendo el número de partículas, sino que se “atraen” para posteriormente, durante el resto del proceso de síntesis, separarse en el número de partículas finales, este mecanismo se ilustra

en la Figura 1. De la misma manera, el proceso de síntesis descrito puede ser representado a través del siguiente modelo de reacciones:



Figura 1. Esquema del mecanismo de la síntesis de nanopartículas de oro. Obtenido de Méndez et al., [26].



Sin embargo, la polidispersidad y la estabilidad de las nanopartículas de oro sintetizadas por este método, depende del balance entre la concentración de los reactivos, el pH y la temperatura, si uno de ellos cambia, impactará en la cinética de reacción y, por ende, en el resultado final [24].

1.4 Funcionalización de las nanopartículas de oro

Para la gran mayoría de las aplicaciones de las nanopartículas de oro es necesario funcionalizarlas, pues la funcionalización permite la modificación de sus propiedades de la nanopartícula. Existen dos aproximaciones para la funcionalización las de nanopartículas, en la Figura 2 se ilustran las técnicas principales utilizadas para cada aproximación.

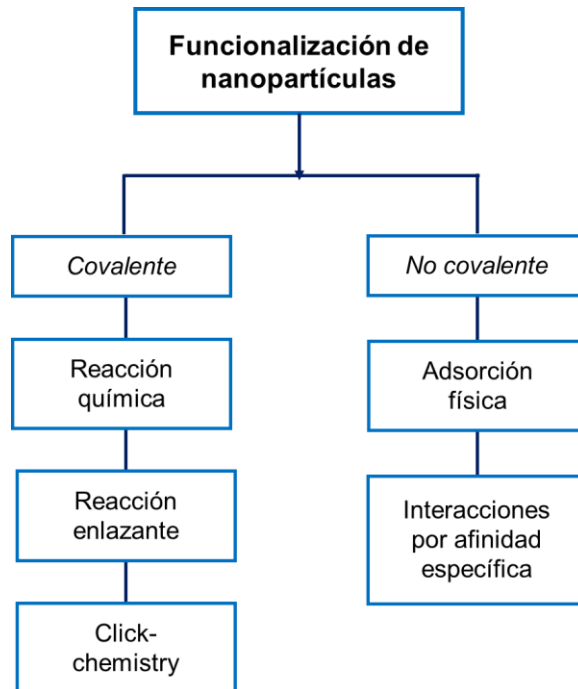


Figura 2. Diagrama de las técnicas principales utilizadas para la funcionalización de nanopartículas por aproximación (covalente y no covalente). Obtenido de Ju et al., [8].

La aproximación covalente, requiere de una reacción enlazante mediada por catalizadores, a través de la cual los grupos funcionales en la superficie de la nanopartícula forman enlaces covalentes con los ligandos más reactivos presentes en la solución. Esta aproximación sucede como resultado de la formación de enlaces covalentes entre la superficie de la nanopartícula y el compuesto a funcionalizar en su superficie; asimismo, es la aproximación con mayor estabilidad; sin embargo, no todos los compuestos son compatibles para funcionalizar las nanopartículas mediante esta aproximación [8].

Por otro lado, se encuentran las interacciones no covalentes, que son el resultado de interacciones electrostáticas, fuerzas de Van der Waals o interacciones de tipo $\pi - \pi$; esta aproximación ofrece un método eficiente para la inmovilización de biomoléculas pues evita la ruptura del conjugado durante la funcionalización, y la pérdida de propiedades eléctricas de la nanopartícula [8]. Este método ha sido empleado para funcionalizar nanopartículas con moléculas pequeñas e incluso proteínas y enzimas. Sin embargo, esta aproximación sólo se puede llevar a cabo

en nanopartículas que han sido estabilizadas con ligandos aniónicos, tales como citrato de sodio y ácido lipoico [8], [27]; por ende, los compuestos con grupos funcionales cargados positivamente, aminoácidos o enzimas por poner un ejemplo; pueden vincularse electroestáticamente con los grupos cargados negativamente en la superficie de la nanopartícula.

Es mediante interacciones electroestáticas bajo las cuales se propone la funcionalización de las nanopartículas de oro con aminoácidos [27]. Al estar las nanopartículas de oro estabilizadas con citrato de sodio, como resultado de la interacción de los grupos carboxilatos aniónicos con los átomos de oro superficiales, se ve favorecida la funcionalización por afinidad electroestática con grupos cargados positivamente [19]. Esta técnica permite el autoensamblaje de las nanopartículas, así como su funcionalización en solución.

En la Figura 3 se observa la estructura de la L-lisina, es posible apreciar dos grupos amino ($-NH_2$) y un grupo carboxilo ($-COOH$). Para la funcionalización de nanopartículas de oro con L-lisina, son los grupos amino los que se adsorben físicamente en la superficie de la nanopartícula al interactuar con los grupos carboxilo presentes en el citrato de sodio, mediante fuerzas electrostáticas, ya que estos grupos tienen una carga negativa y los grupos amino, con carga positiva, son atraídos a la superficie. En concentraciones bajas de L-lisina (≤ 2.5 mM) y pH bajo ($< \text{pH } 7$) la interacción entre los grupos amino y la nanopartícula resulta en la formación de una “corona” de ligandos alrededor de la nanopartícula, como se observa en la Figura 4, lo que facilita su interacción con otros compuestos al tener un grupo amino y el grupo carboxilo libres [28].

Sin embargo, en concentraciones altas de L-lisina y medio alcalino ($> \text{pH } 10$), los ligandos comienzan a formar puentes de hidrógeno entre sí, lo que ocasiona que se formen conjugados de L-lisina entre moléculas presentes en el medio y aquellas funcionalizadas en la superficie de la nanopartícula. Consecuentemente, la L-lisina en la superficie de la nanopartícula puede producir puentes de hidrógeno con otras

moléculas de L-lisina originando el autoensamblado de partículas y la formación de estructuras anisotrópicas de oro¹.

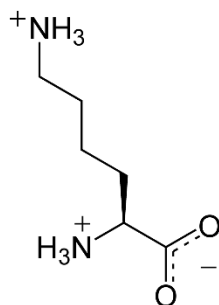


Figura 3. Estructura química en 2D del aminoácido L-lisina.

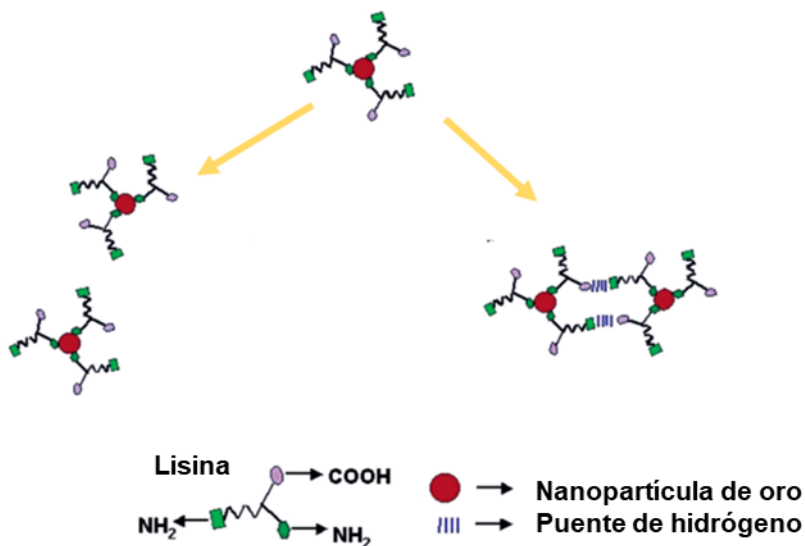


Figura 4. Esquema del mecanismo de funcionalización de la L-lisina en la superficie de la nanopartícula de oro.

Obtenido de Selvakannan et al., [28].

En trabajos previos la L-lisina ha sido utilizada como medio para favorecer la aglomeración de las nanopartículas de oro en presencia de otros compuestos. A ese tipo de detección se le conoce como colorimétrica y se basa en el cambio del color característico de las nanopartículas de oro como consecuencia de su

¹ Una estructura anisotrópica es aquella que tiene un crecimiento preferencial en una dirección específica.

aglomeración. El cambio óptico en las nanopartículas puede ser observado y estudiado mediante espectroscopia UV-Vis, pues es consecuencia del plasmón de resonancia superficial [29], [30].

1.5 Aplicaciones de las nanopartículas de oro

Las propiedades de las nanopartículas de oro las hacen candidatas atractivas para una amplia gama de aplicaciones como la terapia fototérmica, la imagenología, el diagnóstico de enfermedades, la optoelectrónica, el etiquetado de ADN, la catálisis y el transporte de fármacos por mencionar algunas [31]. Adicionalmente, sus propiedades ópticas pueden ser explotadas para el desarrollo de dispositivos o protocolos para la detección de ciertos analitos.

Debido a su versatilidad las nanopartículas de oro tienen un importante lugar en la detección de moléculas, abarcando áreas desde la medicina y la salud hasta el control de la calidad del agua. Los dispositivos para la detección pueden ser colorimétricos con un cambio en el color de la suspensión de las nanopartículas, o a través del cambio del plasmón de resonancia superficial, determinado por espectroscopia de absorción UV-Vis. La detección colorimétrica provee un método relativamente sencillo, rápido, sin la necesidad de un equipo robusto y un costo relativamente bajo [16].

Las nanopartículas de oro funcionalizadas han sido utilizadas para la detección de metales pesados [4], [32], [33], glucosa [34], proteínas [35], ADN [36] y analitos de interés en el sector agroindustrial, como las micotoxinas [37], [38].

Xu et al. [33] utilizaron nanoclusters de oro funcionalizados con lisina (AuNCs-Lis) para la cuantificación de iones de cobre (Cu^{2+}) empleando espectroscopia de fluorescencia. Los autores reportaron un decremento en la señal de fluorescencia al incrementar la concentración de cobre, resultado de la formación de un complejo AuNCsLis-Cu. La determinación de Cu^{2+} fue en un rango lineal de 10 nM a 7 μM .

Se ha reportado la detección colorimétrica y por espectroscopia de absorción UV-Vis de aflatoxinas a través de la formación de un complejo con iones de mercurio (Hg^{2+}) utilizando nanopartículas de oro funcionalizadas con L-Lisina. Los autores

reportaron que al interaccionar las nanopartículas de oro con los iones Hg^{2+} , experimentaron aglomeración; sin embargo, en presencia de aflatoxinas, las nanopartículas fueron estables. Este comportamiento permitió la detección de aflatoxinas hasta una concentración de $1.12 \mu\text{g/L}$ para AFB_1 [6].

El uso del cobre en este trabajo busca sustituir el mercurio (II), debido a su alto nivel de toxicidad, además de ser un contaminante de los mantos acuíferos [32]. Asimismo, los iones Cu^{2+} se pueden obtener con facilidad del cloruro de cobre (II), compuesto que resulta favorable para las nanopartículas utilizadas en este trabajo pues el reactivo del que se partió es ácido cloroáurico, de esta manera se disminuye el número de especies presentes en la solución y eso asegura que la interacción de los compuestos se lleve a cabo de la forma esperada.

1.6 Aflatoxinas

Las aflatoxinas (AF), son metabolitos secundarios sintetizados por diversas especies de hongos del género *Aspergillus*. Estas toxinas tienen cuatro estructuras principales AFB_1 , AFB_2 , AFG_1 y AFG_2 , designadas de esta manera por el color en el que fluorescen [39].

La AFB_1 , es la micotoxina más común encontrada en los alimentos destinados para el consumo humano y animal, la cual ha sido reconocida como el carcinógeno más importante por la Agencia Internacional para la Investigación contra el Cáncer [12]. La aflatoxina B_1 se considera el agente carcinógeno, hepatotóxico, inmunosupresor y mutágeno más potente de origen natural conocido [13].

Una detección oportuna de las aflatoxinas es de suma importancia sanitaria, pues incluso su consumo en bajos contenidos puede tener repercusiones en la salud. Las técnicas analíticas utilizadas actualmente para su cuantificación son los ensayos por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) [40], columnas de inmunoafinidad [41], cromatografía líquida de alta resolución con detección por fluorescencia (HPLC-FLD) [42], cromatografía líquida acoplada con espectrometría de masas (LC-MS/MS) [43]. Adicionalmente, para su detección se han utilizado nanoestructuras funcionalizadas [6], [44] y aptasensores con nanopartículas [5],

[45]. En general, estas técnicas son de alto costo, además de requerir de tiempos de procesamiento largos o equipos sofisticados con alto uso de solventes [46].

En la actualidad existe una tendencia creciente hacia el uso de nanopartículas de oro como detectores para diversas micotoxinas [38]. Esto surge de la necesidad de desarrollar técnicas de bajo costo, que no requieran tiempos de procesamiento demasiado largos y cuyos resultados sean fáciles de interpretar.

1.7 Técnicas de caracterización de las nanopartículas

La caracterización de las nanopartículas de oro es de suma importancia para conocer sus propiedades estructurales, físicas y químicas; así como para estudiar el comportamiento de las nanopartículas al modificar su superficie o el medio circundante. De esta forma es posible obtener información de las interacciones de la nanopartícula, su estabilidad, morfología, entre otras.

1.7.1 Espectroscopia de absorción UV-Vis

El principio de la espectroscopia UV-Vis se basa en la absorción de la luz por parte de los materiales. La luz visible abarca el rango de los 400-700 nm; cuando un haz de luz incidente es absorbido por el material, los electrones de valencia son promovidos de un estado basal a uno excitado de mayor energía, esto sucede para todas las moléculas orgánicas y una gran mayoría de inorgánicas, siendo una excepción las nanopartículas metálicas.

Entre las propiedades ópticas de las nanopartículas metálicas resaltan la presencia de plasmones de superficie localizados (conocidos generalmente como plasmón o banda de plasmón) característicos para cada metal. Estos plasmones se producen por la oscilación colectiva de electrones restringidos en volúmenes metálicos pequeños (escala nanométrica) [47]. Para la formación de un plasmón, es necesario que el tamaño de la partícula sea mucho menor que la longitud de onda incidente. La contribución del campo eléctrico de la radiación incidente induce la formación de un dipolo eléctrico en la partícula (Figura 5).

Los plasmones superficiales se muestran como resonancias ópticas pronunciadas en la región visible del espectro electromagnético. El color de las nanopartículas de oro se debe a la manifestación de los plasmones de superficie localizados [48].

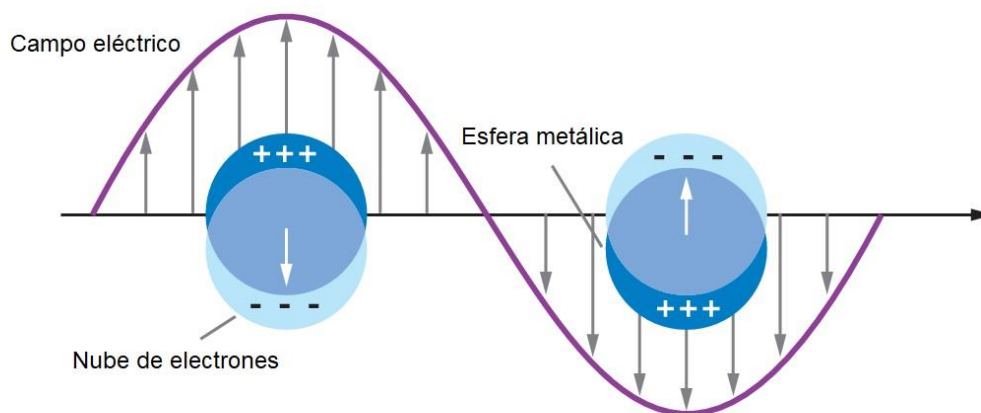


Figura 5. Representación de un Plasmón de Resonancia Superficial en nanopartículas metálicas.
Obtenido de Willets et al., [49]

Para las nanopartículas metálicas, la espectroscopia de absorción UV-Vis, permite determinar la posición del plasmón de resonancia superficial, el cual es dependiente del tamaño, la morfología, la cristalinidad, de la naturaleza química de las nanopartículas, y de las condiciones físicas y químicas del medio circundante a las mismas [10]. En el caso particular de las nanopartículas de oro, se ha reportado que el plasmón característico puede encontrarse en longitudes de onda de alrededor de los 520 nm para nanoestructuras con un tamaño de 20 nm y morfología esférica, como se aprecia en la Figura 6 [50].

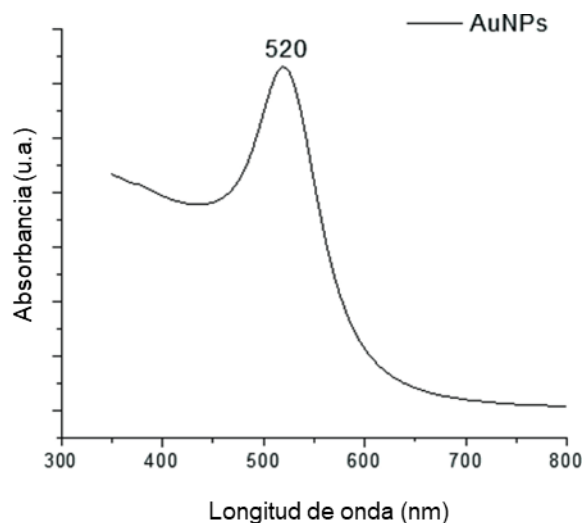


Figura 6. Espectro de absorción UV-Vis de nanopartículas de oro esféricas de 20 nm. Obtenido de Moris et al., [50]

La posición y la forma del plasmón pueden ser utilizadas para calcular el tamaño y la concentración de las nanopartículas de oro. En el trabajo de Haiss et al. [51] los autores hacen uso del valor de la absorbancia en el plasmón de resonancia superficial obtenido mediante espectroscopia UV-Vis, así como la concentración inicial de oro en la reacción y los valores del coeficiente extinción del plasmón; de esta forma los autores calcularon el tamaño real de las nanopartículas sintetizadas. Este trabajo confirma interpretaciones experimentales respecto al tamaño de las nanopartículas sintetizadas, así como en la morfología de las mismas.

1.7.2 Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier

La radiación en el rango infrarrojo tiene asociada una energía que no es suficiente para afectar a los electrones dentro del átomo; sin embargo, es la suficiente para inducir transiciones de traslación, rotación y vibración en las moléculas. Como los movimientos que puede experimentar una molécula son característicos de su estructura, la medición de estas transiciones hace que la espectroscopia de infrarrojo sea una herramienta adecuada para la caracterización de los materiales [52]. Las transiciones primarias en el rango infrarrojo son mayoritariamente del tipo vibracional. En el espectro electromagnético, la región del infrarrojo abarca desde el extremo rojo del visible hasta longitudes de onda de las microondas; se ha

dividido en tres regiones: el infrarrojo cercano (NIR) de 14000-4000 cm^{-1} , el infrarrojo medio (MIR) de 4000-400 cm^{-1} y el infrarrojo lejano (FAR) de 400-100 cm^{-1} . La mayoría de los espectrofotómetros de infrarrojo trabajan en el infrarrojo medio [53].

La técnica de FTIR es una técnica de caracterización de tipo vibracional, que permite la identificación de los grupos funcionales de las moléculas orgánicas. Una molécula puede absorber energía de la radiación IR si ésta posee un momento dipolar y su frecuencia de oscilación es la misma que la frecuencia de la radiación electromagnética incidente [53]. La absorción de la radiación IR transfiere energía a la molécula, induciendo vibraciones de estiramiento, flexión o torsión del enlace covalente. Aquellas moléculas que no presentan momento dipolar no absorben radiación IR y por lo tanto no son activas, un ejemplo de ello son las nanopartículas metálicas.

Para la caracterización de nanomateriales, la espectroscopia FTIR se emplea generalmente para la identificación de las bandas de absorción características de moléculas orgánicas adheridas en la superficie del material [54]. Asimismo, esta técnica se ha utilizado para proponer los posibles grupos funcionales responsables de la estabilización de las nanopartículas cuando son sintetizadas con extractos acuosos de plantas [55], [56] y también para identificar la funcionalización de la superficie de las nanoestructuras con biomoléculas tales como proteínas, aminoácidos, entre otras.

En el caso particular de las nanopartículas de oro, esta técnica permite analizar la estructura química del recubrimiento orgánico que estabiliza la nanopartícula, generalmente citrato de sodio, a través del estudio de las bandas características de los grupos funcionales principales presentes en el agente estabilizante [57]. Asimismo, esta técnica permite el análisis de las características vibracionales típicas de los grupos funcionales adsorbidos en la superficie de la nanopartícula, esto favorece el entendimiento de la interacción y la orientación del enlace [58]. Por otro lado, la técnica FTIR ha sido utilizada para estudiar la funcionalización superficial de las partículas o el intercambio de ligandos en su superficie, mediante una

evaluación de los cambios en el interferograma con el tiempo, observando los cambios en la orientación y tipo de enlace.

1.7.3 Análisis de rastreo de nanopartículas

Entre las técnicas de vanguardia utilizadas para la determinación del tamaño, distribución de tamaño y concentración de las nanopartículas se encuentra el NTA, cuyo funcionamiento se ilustra en la Figura 7. Esta técnica es empleada para la medición del tamaño de nanopartículas *in situ*. Se basa en el análisis de partículas individuales con alta definición mediante el análisis de su movimiento Browniano, en conjunto con la dispersión de luz ocasionada por este; dicho fenómeno es el movimiento estocástico de las partículas inducido por colisiones aleatorias con moléculas del medio. Esto permite la detección de partículas grandes y pequeñas simultáneamente, lo cual resulta en una distribución de tamaños más precisa [59], [60].

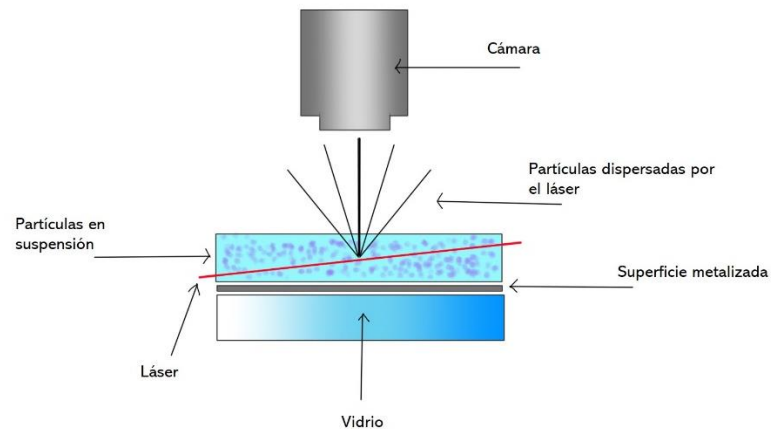


Figura 7. Funcionamiento de un equipo NTA ilustrando sus partes y la forma en la que se realizan las mediciones.
Imagen de autoría propia.

La técnica de NTA es capaz de determinar el tamaño de las nanopartículas de entre 10 y 1,000 nm con el límite de detección inferior siendo dependiente del índice refractivo de las nanopartículas. Un láser monocromático pasa a través de un prisma de vidrio que se encuentra en el porta muestras. El ángulo de incidencia y el índice de refracción del vidrio son tales que, al interactuar el láser con la interfase entre el

vidrio y la muestra, el haz se refracta, resultando en un haz comprimido. Las partículas que se encuentran en la trayectoria del láser dispersan la luz de forma que pueden ser visualizadas fácilmente por un microscopio con magnificación de 20x [61]. Por otro lado, el software del NTA identifica y sigue a las nanopartículas individuales y relaciona su movimiento con el tamaño de partícula utilizando la ecuación de Stokes-Einstein para dos dimensiones:

$$\overline{(x,y)^2} = \frac{4tk_B T}{3d_h \pi \eta}$$

Donde k_B es la constante de Boltzmann y $\overline{(x,y)^2}$ es la velocidad promedio al cuadrado de una partícula a una temperatura T , en un medio de viscosidad η , con un diámetro hidrodinámico d_h y durante un tiempo t ; el tiempo durante el cual se realiza la medición junto con el desplazamiento medio al cuadrado, en una, dos o tres dimensiones; permite determinar el coeficiente de difusión de las nanopartículas [11], [61].

Esta técnica ha sido utilizada para la caracterización de nanomateriales biológicos [62], así como de nanopartículas de plata [53], dióxido de titanio [54], óxido de zinc [65]; y nanopartículas de oro [66], debido a su alta sensibilidad y precisión.

Una técnica similar a NTA, es dispersión dinámica de luz (DLS), debido a que también se basa en el movimiento Browniano de las partículas, aunque su enfoque es hacia la dispersión de la luz con el tiempo.

1.7.4 Dispersión dinámica de luz

DLS es una técnica de caracterización *in situ* que permite conocer el tamaño y la dispersión de tamaño de las partículas. Esta técnica generalmente se divide en dos categorías principales, las que se basan en correlación de fotones, también llamadas técnicas relacionadas con el “dominio-tiempo” que evalúa la distribución de frecuencias de la luz dispersada y aquellas que miden directamente las frecuencias mediante un monocromador [67].

La importancia de esta técnica reside en que hace uso de dos características de las nanopartículas, el efecto Tyndall (dispersión) y el movimiento Browniano. Junto con

otros factores, tales como el tamaño de la partícula, las partículas pequeñas se mueven con mayor velocidad, la viscosidad y la temperatura; la intensidad de la luz dispersada por una nanopartícula depende del ángulo de dispersión y del tiempo de observación [52], [55]. Lo cual lleva a obtener dos tipos de experimentos dispersantes, la dispersión estática de luz (SLS) donde el tiempo promedio de dispersión es medido a distintos ángulos, y DLS donde la dependencia del tiempo respecto a la intensidad de dispersión es medida.

Una de las ventajas de DLS es que permite medir partículas con un tamaño menor a la longitud de onda de la radiación. Esto es logrado debido a que la técnica hace uso de la dispersión de Rayleigh, en la cual cambia únicamente la dirección de la luz incidente, más no la energía del haz [68]. Como consecuencia, es posible realizar mediciones rápidas con pulsos angostos, bien enfocados. La dependencia del tiempo se debe a que en una suspensión coloidal las partículas no se encuentran estáticas sino en un constante desplazamiento aleatorio como resultado del movimiento Browniano.

Cuando un haz de luz monocromático incide sobre una colección de partículas, cada partícula actúa como una fuente de luz secundaria debido a la dispersión de la radiación. Dado que las partículas se encuentran moviéndose aleatoriamente, la distancia recorrida por las ondas dispersadas de la partícula al detector varía con el tiempo. Sin embargo, la intensidad de la luz dispersada es proporcional a la sexta potencia del diámetro de la partícula ($I \propto d_{part}^6$), es decir, aumenta conforme aumenta el tamaño de partícula; por lo tanto, esta técnica presenta una alta sensibilidad a las partículas grandes. La técnica de DLS determina el radio hidrodinámico de las partículas, llamado cantidades hidrodinámicas, en la muestra [69].

La técnica de DLS se ha utilizado en múltiples ocasiones junto con NTA de una forma comparativa entre ambas técnicas, pues son complementarias, ya que las deficiencias de una pueden compensarse con la otra [60]. A lo largo de los últimos años, sin embargo, el alcance de NTA ha ido en aumento, pero sin dejar de lado

DLS, que sigue considerándose una técnica básica en la caracterización de nanopartículas de oro [70], [71].

Las nanopartículas de oro son coloides, como resultado de lo cual es que presentan un potencial eléctrico en la interfase sólido-líquido. El potencial zeta es una medición que permite conocer la carga superficial de las nanopartículas, así como monitorear los cambios en el potencial como consecuencia de su funcionalización de las nanopartículas.

1.7.5 Dispersión de luz electroforética

En el caso de partículas cargadas en suspensiones líquidas, como lo son las nanopartículas de oro, la carga superficial y la morfología son características importantes; el potencial zeta es una medición que permite obtener información al respecto, así como de la estabilidad de las partículas. La técnica utilizada para la medición del potencial zeta es ELS, esta técnica mide la movilidad electroforética de las partículas en la suspensión, para ello se hace pasar una corriente baja, generalmente 30 mV, a través de una muestra, las nanopartículas negativas o positivas se moverán hacia el ánodo o cátodo respectivamente y el equipo mide la velocidad de difusión [72].

Esta movilidad se puede convertir en un valor de potencial zeta de acuerdo con la ecuación de Poisson y modelos que dependen de las características de las partículas y el medio, tales como pH y la conductividad del medio [73], [74]. En este trabajo la medición de interés es el valor de potencial zeta, por lo cual a continuación se explica su importancia.

1.7.5.1 Mediciones de potencial zeta

Un coloide es una sustancia heterogénea en la cual se encuentran suspendidas partículas de tamaño nanométrico, lo que ocasiona que su precipitación sea muy lenta [75]. De acuerdo con esto, el hecho de que las nanopartículas de oro en suspensión sean una sustancia coloidal, permite su estudio y evaluación a través de mediciones como lo son el potencial zeta.

Para comprender el principio del potencial zeta primeramente se debe hablar de la *doble capa*. Una nanopartícula de oro, en solución, generalmente posee una carga negativa, esa carga negativa ocasiona que, inicialmente, otros coloides, o iones, cargados positivamente se atraigan hacia la partícula formando una capa adyacente a ésta llamada la *capa de Stern* [76]. A pesar de la presencia de esta primera capa, otros coloides positivos presentarán atracción hacia la partícula, sin embargo, la capa de Stern, cargada positivamente, los rechazará; en este trabajo, los contraiones que presentan atracción hacia la nanopartícula son los iones Na^+ . Como resultado de este equilibrio dinámico, se forma una *capa difusa*. A la capa de Stern y la capa difusa se les conoce como la *doble capa* y se encuentran presentes en la mayoría de los coloides, incluyendo las nanopartículas de oro [14].

El potencial zeta representa el valor del potencial que se forma en el punto donde la capa difusa y la de Stern coinciden. Surge de la caída generada por el potencial relativo de las nanopartículas negativas y su atmósfera positiva; esto es, dado que dicho potencial tiene un valor máximo en la superficie y disminuye gradualmente con la distancia, aproximándose a cero fuera de la capa difusa, es esta caída de potencial la que se mide. La caída del potencial y la distancia desde la nanopartícula es un indicador de la fuerza repulsiva entre los coloides en función de la distancia a las cuales estas fuerzas se involucran [76].

Esta medición es una forma efectiva de comprender y predecir el comportamiento de las nanopartículas puesto que indica cambios en el potencial de la superficie y en las fuerzas de repulsión entre las nanopartículas. Muchas propiedades de las nanopartículas son determinadas directa o indirectamente por la carga eléctrica (el potencial) de las mismas. La distribución del potencial en sí determina la energía de interacción entre las partículas y es responsable del flujo de los sólidos en la solución [76], [77].

En el caso de las nanopartículas de oro, la técnica de potencial zeta se ha utilizado en diversos ensayos para la detección y cuantificación de conjugados funcionalizados en las nanopartículas de oro, ya que es posible conocer el cambio

de carga de las nanopartículas como resultado de la funcionalización de las mismas con un compuesto de distinta o igual carga.

2. Justificación

Las propiedades únicas que las nanopartículas de oro presentan, las hacen atractivas para diversas aplicaciones como la terapia fototérmica, la imagenología, el diagnóstico de enfermedades, la optoelectrónica, el etiquetado de ADN, la catálisis, el transporte de fármacos por mencionar algunas. Una de sus propiedades, la óptica (plasmón de superficie) ha sido estudiada para el desarrollo de dispositivos o de protocolos para la detección colorimétrica de analitos.

No obstante, es necesario funcionalizar la superficie de las nanopartículas, para este fin, diversas moléculas orgánicas se han utilizado, entre ellas, las proteínas y los aminoácidos por su afinidad con los sistemas biológicos. Como ejemplo, se ha funcionalizado la superficie de las nanopartículas con L-lisina y el sistema AuNPs-Lis se ha evaluado para la detección de iones de cobre y de mercurio. En el caso de los iones de mercurio, éstos tienen la capacidad de romper la estabilidad del sistema AuNPs-Lis y formar aglomerados, esta respuesta ha permitido la detección de algunas micotoxinas. Sin embargo, la aplicación de las nanopartículas de oro para este propósito supone varios retos como lo son el control del tamaño, la forma, la reproducibilidad, su estabilidad a largo plazo y su funcionalización óptima, por lo que una evaluación sistemática de sus propiedades fisicoquímicas es indispensable.

En consecuencia, en este trabajo se analizó la funcionalización de nanopartículas de oro con L-Lisina mediante técnicas espectroscópicas, el potencial zeta y el análisis de rastreo de nanopartículas (NTA), para conocer sus propiedades fisicoquímicas y aplicarlas en la detección colorimétrica de aflatoxinas con la formación de un complejo con iones de cobre.

3. Objetivo

3.1 General

Estudiar la funcionalización de nanopartículas de oro con L-Lisina mediante su caracterización por técnicas espectroscópicas, mediciones del potencial zeta y el análisis de rastreo de nanopartículas (NTA), para conocer sus propiedades fisicoquímicas y aplicarlas en la detección colorimétrica de aflatoxinas.

3.2 Particulares

- a) Sintetizar nanopartículas de oro mediante la técnica de química húmeda para evaluar su funcionalización con L-lisina.
- b) Establecer las condiciones óptimas para la funcionalización con L-lisina de la superficie de las nanopartículas de oro.
- c) Caracterizar las nanopartículas de oro funcionalizadas con L-lisina mediante las técnicas de espectroscopia de absorción UV-Vis y espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier para determinar el cambio en el plasmón y los grupos funcionales en la superficie.
- d) Caracterizar las nanopartículas de oro funcionalizadas con L-lisina con las técnicas de dispersión de luz dinámica, análisis de rastreo de nanopartículas y el potencial zeta para conocer su tamaño, índice de polidispersión, concentración y carga superficial para el desarrollo de un protocolo de la funcionalización de nanopartículas de oro con L-lisina.
- e) Caracterizar por espectroscopia de absorción UV-Vis la estabilidad de las nanopartículas de oro funcionalizadas con L-lisina al interactuar con los iones de Cu^{2+} para la evaluación de su posible uso como detectores colorimétricos de aflatoxinas.
- f) Evaluar la capacidad del complejo de AuNPs-Lis-Cu para la detección colorimétrica de aflatoxinas (AFB_1).

4. Hipótesis

La caracterización de las nanopartículas de oro funcionalizadas con L-Lisina permitirá conocer su comportamiento óptico, para que éstas puedan ser empleadas en la detección colorimétrica de aflatoxinas al interactuar con los iones Cu^{2+} .

5. Metodología

5.1 Materiales

5.1.1 Reactivos

El ácido tetracloruro áurico ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ~99%), el citrato de sodio tribásico ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$), la L-lisina, el cloruro de cobre (II) (CuCl_2) y la aflatoxina B_1 fueron adquiridos de Sigma Aldrich y fueron utilizados sin purificación. Como disolvente se utilizó agua desionizada.

5.2 Métodos

5.2.1 Síntesis de nanopartículas de oro

La síntesis de las nanopartículas se realizó de acuerdo al método de Turkevich [22], con algunas modificaciones. Brevemente, 40 mL de una solución de ácido tetracloroáurico a una concentración de 0.5 mM se calentaron hasta la ebullición con agitación constante durante 15 minutos; enseguida, se adicionaron 10 mL de una solución de citrato de sodio tribásico a una concentración de 50 mM previamente calentada a una temperatura de 60 °C. La solución resultante se dejó en agitación constante a 70°C durante 30 minutos para permitir la reducción de los iones Au^{3+} y la subsecuente formación de las nanopartículas de oro. La solución adquirió una coloración rojo rubí, indicativa de la formación de las nanopartículas de oro.

Para eliminar los subproductos de la reacción, las nanopartículas de oro fueron lavadas por triplicado con ciclos de centrifugado (7,000 RPM x 10 min) y resuspendidas en agua desionizada. Las nanopartículas de oro lavadas fueron almacenadas en recipientes herméticos y a una temperatura de 4°C, para su posterior caracterización y funcionalización.

5.2.2 Funcionalización de las nanopartículas de oro con L-lisina

Para la funcionalización de las nanopartículas de oro con L-lisina se utilizaron diferentes concentraciones del aminoácido (0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 2 y 3 mM), para encontrar la relación óptima Au:Lis para prevenir su aglomeración de las nanopartículas.

La funcionalización se llevó a cabo de la siguiente manera: en un tubo de vidrio se depositaron 3 mL de nanopartículas de oro (0.3 mM); enseguida se adicionaron 6, 12, 18, 24, 30, 60 o 90 μ L de una solución de L-lisina (0.1 M) para obtener las diferentes concentraciones del aminoácido, la mezcla se dejó en agitación constante durante 30 min a temperatura ambiente para permitir la interacción de las nanopartículas de oro con la lisina. Transcurridos los 30 minutos, la muestra fue caracterizada por espectroscopia de absorción UV-Vis, tomando alícuotas de 200 μ L cada 10 minutos para determinar su estabilidad.

5.2.3 Caracterización de las nanopartículas de oro funcionalizadas

5.2.3.1 Espectroscopia de absorción UV-Vis

Para evaluar la funcionalización de las nanopartículas de oro con L-lisina, las muestras fueron caracterizadas por espectroscopia de absorción UV-Vis. El análisis se realizó utilizando un espectrofotómetro UV-Vis de microplacas Multiskan Sky (Thermo Fisher), para lo cual se empleó una placa de 96 pozos. En cada pozo se colocaron 200 μ L de las muestras de nanopartículas de oro funcionalizadas con diferentes concentraciones de L-lisina, y se tomó como referencia las nanopartículas de oro sin funcionalizar. Las mediciones se llevaron a cabo en un rango de 300 a 900 nm, utilizando agua desionizada como blanco.

5.2.3.2 Análisis de rastreo de nanopartículas

Para el análisis de rastreo de nanopartículas se utilizó un equipo NanoSight NS300 (Malvern Panalytical) equipado con un láser verde (532 nm). Para la preparación de la muestra, se tomaron 10 μ L de las nanopartículas de oro funcionalizadas y se diluyeron con agua desionizada a un volumen total de 10 mL, enseguida se tomó una alícuota de 5 mL con una jeringa estéril y se inyectó en la cámara para muestras del equipo. En la dilución de la muestra se aseguró que existieran entre 10^6 y 10^9

partículas por mililitro. El software utilizado para capturar y analizar los datos fue el NTA 2.0 Build 127, el tiempo de grabación de video fue de 60 segundos con una velocidad de 25 cuadros por segundo (FPS).

5.2.3.3 Mediciones de potencial zeta y dispersión de luz dinámica

La determinación de la carga superficial, del tamaño (radio hidrodinámico) y distribución de tamaño de las nanopartículas de oro funcionalizadas se llevaron a cabo en un equipo Zetasizer Pro (Malvern Panalytical). La preparación de la muestra se realizó tomando una alícuota de 500 μL de las nanopartículas de oro funcionalizadas y diluyendo a un volumen total de 5 mL con agua desionizada. Las mediciones se realizaron a temperatura ambiente, tres mediciones para el potencial zeta y tres mediciones por dispersión de luz dinámica, con 120 segundos de calibración entre las mediciones de potencial zeta y las de dispersión de luz dinámica. Se utilizaron las constantes de referencia del oro coloidal de la base de datos previamente cargada en el equipo.

5.2.3.4 Espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier

Las mediciones fueron realizadas en un espectrofotómetro Frontier SP8000 - FTIR equipado con un detector de sulfato de triglicina deuterado (DTGS). Brevemente, 250 μL de la muestra de nanopartículas de oro funcionalizadas sin diluir se colocaron sobre el cristal de reflectancia total atenuada (ATR), el rango de medición fue de 400-4000 cm^{-1} con una resolución de 4 cm^{-1} con datos registrados de 32 escaneos. El blanco que se tomó fue el espectro del agua desionizada.

5.2.4 Formación del complejo de nanopartículas de oro funcionalizadas con L-lisina (AuNP-Lis) y cobre (II)

Para determinar la concentración óptima de los iones de Cu^{2+} para la formación de un complejo con las nanopartículas de oro funcionalizadas con L-lisina se evaluaron diferentes concentraciones del metal. Para tal efecto se añadieron 100 μL de cloruro de cobre (II) a 3.2, 1.6, 0.8, 0.4, 0.2, 0.1 mM posteriormente se añadieron 400 μL de agua desionizada. Para la formación del complejo se utilizaron nanopartículas de oro (0.3 mM) funcionalizadas con una concentración de lisina de 0.6 mM, las cuales fueron las condiciones óptimas en las que no presentaban aglomeración. Por

esta razón, finalmente se adicionaron 500 μL de nanopartículas de oro (0.6 mM) funcionalizadas con L-lisina (1.2 mM) para obtener una concentración final de 0.3 mM para las nanopartículas de oro y 0.6 mM de L-lisina.

El complejo se agitó en un vortex por 10 segundos y se dejó interaccionar a temperatura ambiente durante 5 min, después de los cuales se tomaron alícuotas de 200 μL y se evaluó su estabilidad cada 10 minutos mediante espectroscopía de absorción UV-Vis.

Una vez obtenido el rango de concentraciones en la cual se presentaba la aglomeración, se realizó una segunda cinética a concentraciones finales de 180, 200, 220, 240 y 260 μM de cloruro de cobre (II). Para esto, se repitió el procedimiento anteriormente usado volúmenes idénticos. A partir de los resultados se realizó una curva con los datos de absorbancia, con ello se pudo conocer la concentración ideal para el complejo de AuNP-Lis-Cu²⁺.

5.2.5 Detección de aflatoxinas

Para la detección de las aflatoxinas utilizando el sistema AuNP-Lis, se tomaron 500 μL de nanopartículas de oro a 0.6 mM funcionalizadas con L-lisina 1.2 mM (solución A). Adicionalmente, de una solución stock de aflatoxina B₁ a una concentración de 400 $\mu\text{g/L}$, se prepararon diluciones dobles seriadas de 400 μL en tubos de vidrio, a concentraciones de 400, 200, 100, 50, 25, 12.5 y 6.25 $\mu\text{g/L}$. A estas soluciones se adicionaron 100 μL de una solución de cloruro de cobre (2.2 mM) para obtener una concentración final de 220 μM de Cu²⁺. Posteriormente, la mezcla se agitó en un vórtex por 10 segundos y se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 5 min (solución B). Las soluciones A y B se mezclaron y el resultante se agitó durante 10 segundos en un vórtex, enseguida se tomó una alícuota de 200 μL , y se depositó en el pozo de la microplaca. Los espectros de absorción fueron determinados en un rango de los 300-900 nm. Las concentraciones finales para el sistema AuNP-Lis fueron de 0.3 mM y 0.6 mM respectivamente, mientras que las concentraciones finales de aflatoxina fueron 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 y 3.12 $\mu\text{g/L}$.

6. Resultados y discusión de resultados

6.1 Caracterización de las nanopartículas de oro funcionalizadas con L-lisina

6.1.1 Espectroscopia de absorción UV-Vis

La formación de nanopartículas de oro puede ser observada por el cambio en el color de la suspensión de incoloro a un color rubí intenso. En la Figura 8 se presenta el espectro de absorción UV-Vis de las nanopartículas de oro sintetizadas, en el cual se observa una banda de absorción a una longitud de onda de 522 nm, correspondiente al plasmón de resonancia superficial. Tanto la forma como la posición de la banda son indicativos del tamaño y la morfología de la nanoestructura, y la presencia de una sola banda de absorción indica la formación de nanoestructuras de 0 dimensiones, con morfología esférica [14].

Figura 8. Espectro de absorción UV-Vis representativo de las nanopartículas de oro (0.5 mM) sintetizadas por reducción de Au^{3+} con citrato de sodio tribásico.

Haiss et al. [51] reportaron la síntesis de nanopartículas de oro utilizando borohidruro de sodio y citrato de sodio tribásico como agente reductor y

estabilizante, respectivamente. Los autores encontraron un plasmón en los 520 nm, el cual relacionaron con un tamaño de nanopartícula de aproximadamente 20 nm al observarlas con microscopía electrónica de transmisión.

Shi et al. [23] sintetizaron nanopartículas de oro mediante el método de Turkevich a distintas relaciones molares entre el HAuCl_4 y el citrato de sodio y señalaron que un plasmón alrededor de los 522-523 nm corresponde a un tamaño aproximado de 25 nm con morfología esférica; por lo que se puede asumir que el tamaño de las nanopartículas sintetizadas en este trabajo es similar.

En la Figura 9 se presentan los espectros de absorción UV-Vis de las nanopartículas de oro funcionalizadas con diferentes concentraciones de lisina. Se observó que al incrementar la concentración de lisina (0 – 1 mM) el máximo de absorción del plasmón presentó un ligero corrimiento hacia el rojo (longitud de onda mayor) el cual se hizo más evidente conforme aumentó la concentración de L-lisina, junto con este corrimiento se observó una disminución en la intensidad de la absorbancia. Sin embargo, cuando la concentración de lisina fue de 3 mM, las nanopartículas de oro presentaron un plasmón adicional a una longitud de onda de 660 nm. La disminución de la intensidad del plasmón y el corrimiento están relacionados con un incremento en el tamaño de las nanopartículas, posiblemente como consecuencia del enlace de las moléculas de lisina en la superficie de la partícula a través de la interacción de los grupos NH^{3+} (cargados positivamente) con los grupos carboxilo (cargados negativamente) presentes en las moléculas del citrato de sodio que estabilizan a las nanopartículas [8], [9].

Se ha reportado por Horovitz et al. [9] que a concentraciones bajas (≤ 2.5 mM) de L-lisina, la funcionalización de las nanopartículas de oro se realiza a través de la formación de una “corona” en la cual las moléculas de L-lisina rodean a la nanopartícula, sin alterar de manera evidente la forma y la posición del plasmón de resonancia superficial, en comparación con las nanopartículas de oro sin funcionalizar. Asimismo, Horovitz et al. también reportaron que al cambiar la concentración de L-lisina de 0.1 M a 0.78 M se presenta una disminución en la intensidad de la absorbancia y un corrimiento hacia el rojo; esto resulta, de acuerdo

con el mismo trabajo, de que a concentraciones altas del aminoácido, se establecen enlaces entre las moléculas de lisina en la superficie de la nanopartícula, ocasionando el autoensamblaje, con estructuras tipo rosario que producen un cambio en el plasmón de resonancia superficial, lo que resulta en un cambio de color y la aparición de un segundo plasmón [6], [9].

En comparación, para la concentración de lisina de 3 mM (Figura 9) se observa la presencia de un doble plasmón, indicativo de la formación de estructuras anisotrópicas de oro, debido a su autoensamblaje, por establecimiento de enlaces, puentes de hidrógeno, entre las moléculas de lisina, lo cual coincide con lo reportado por Horovitz.

Figura 9. Espectro de absorción UV-Vis de las nanopartículas de oro (0.3 mM) funcionalizadas con diferentes concentraciones de L-lisina a temperatura ambiente y 30 minutos de incubación.

En este trabajo se evaluó la funcionalización con concentraciones más bajas de lisina y de oro (mM); sin embargo, el comportamiento del plasmón de resonancia superficial fue similar. De la misma manera, el corrimiento hacia el rojo observado con relaciones molares oro:lisina mayores a 1:2.5 se observa en ambos trabajos, lo

cual indica que la estabilidad de las nanopartículas de oro funcionalizadas con lisina está en función de las relaciones molares entre el oro y la lisina.

Un cambio en el color de la suspensión está asociado con un cambio en el tamaño y la morfología de las nanopartículas, a mayor tamaño el color rubí de las nanopartículas de oro cambia a tonalidades moradas cuya intensidad aumenta al incrementarse el tamaño, y a colores azul-morado al modificarse la morfología; como se ha reportado por Mingos et al. [14] y Chen et al. [16]. En la Figura 10 se muestra el color de las suspensiones de nanopartículas de oro funcionalizadas, no se observó un cambio evidente en la coloración de estas en concentraciones de lisina de 0.2 a 1 mM; sin embargo, a una concentración de 2 mM el tono de la suspensión adquirió una coloración morada, indicativo del crecimiento de las nanopartículas de oro. El cambio más evidente se presentó a una concentración de 3 mM, donde el color fue azul-morado. Aunado con los resultados obtenidos por espectroscopia de absorción UV-Vis, se infiere que a esta concentración las nanopartículas de oro han pasado por un proceso de autoensamblaje para formar otras nanoestructuras. Como se espera que la respuesta colorimétrica se presente hasta la detección del analito, es importante que las nanopartículas de oro no presenten aglomeración durante su funcionalización con la lisina y sean estables en el tiempo.

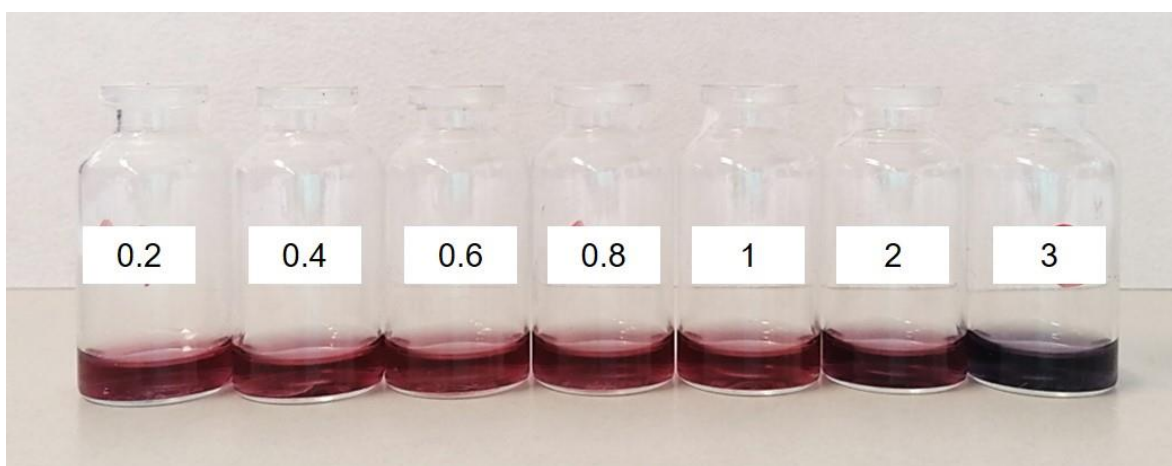


Figura 10. Color característico de las nanopartículas de oro a 0.3 mM con L-lisina a distintas concentraciones después de 30 min de incubación.

6.1.2 Análisis de rastreo de nanopartículas y dispersión de luz dinámica

En la Figura 11 se presenta la distribución de tamaño de las nanopartículas de oro analizadas por la técnica de NTA. En el perfil a) se observa que la distribución de tamaño es polidispersa, con poblaciones de partículas de 27, 41 y 68 nm, y en menor proporción partículas mayores a los 100 nm. En el gráfico 3D (Figura 11, perfil b) se observa que la mayor contribución en la intensidad es la de partículas con tamaños menores a los 100 nm. De acuerdo con los datos arrojados por el software del equipo, la moda en el tamaño de las partículas fue de 26.6 nm, mientras que el tamaño promedio es de $49.1 \text{ nm} \pm 41.6 \text{ nm}$. Estos datos coinciden con los obtenidos mediante espectroscopia UV-Vis, donde el tamaño aproximado de las nanopartículas fue de 20-30 nm. De la misma manera, a partir de los datos obtenidos del equipo, hay 5×10^{11} partículas/ mL.

a)

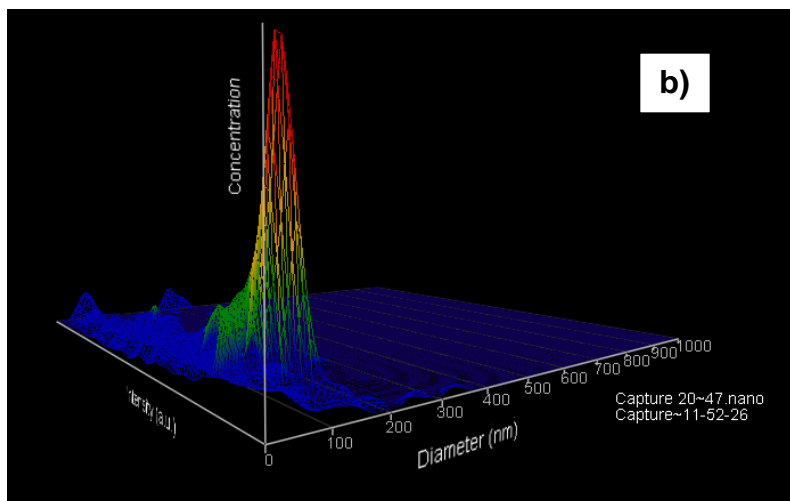


Figura 11. Distribución de tamaño de partícula de las nanopartículas de oro sintetizadas (a) y gráfico en 3D (b).

Malik et al. [78] sintetizaron nanopartículas de oro a una concentración de 0.225 mM de ácido cloroáurico con el del método de Turkevich, dichas nanopartículas fueron caracterizadas mediante la técnica de NTA. El tamaño promedio reportado de las nanopartículas fue de 35 nm; estos resultados obtenidos son similares y consistentes con los reportados en este trabajo; sin embargo la diferencia reside en la relación molar oro:citrato, debido a que esa relación modula el tamaño de las nanopartículas, por lo cual las nanopartículas del presente trabajo poseen un tamaño menor.

En la Figura 12 se presentan los resultados obtenidos mediante la técnica de NTA para las nanopartículas de oro funcionalizadas con L-lisina a concentraciones de 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 mM. Los tamaños obtenidos fueron de 30, 31, 36, 38 y 40 nm respectivamente. Como resultado de la interacción entre las nanopartículas de oro con la L-lisina se tiene un aumento en el tamaño de las nanopartículas de oro conforme aumenta la concentración de L-lisina, esto es consecuencia de la formación de puentes de hidrógeno entre los grupos $-NH_2$ y $-COOH$ presentes en la L-lisina [9]. De esta manera, las moléculas de L-lisina se atraen formando cadenas que, por ende, alteran el tamaño y la forma de las nanopartículas. Los resultados son consistentes con lo observado mediante espectroscopia UV-Vis, en la cual también se observó un crecimiento de las nanopartículas y un cambio en la

morfología en concentraciones de L-lisina altas (≥ 3 mM), en forma de un segundo plasmón.

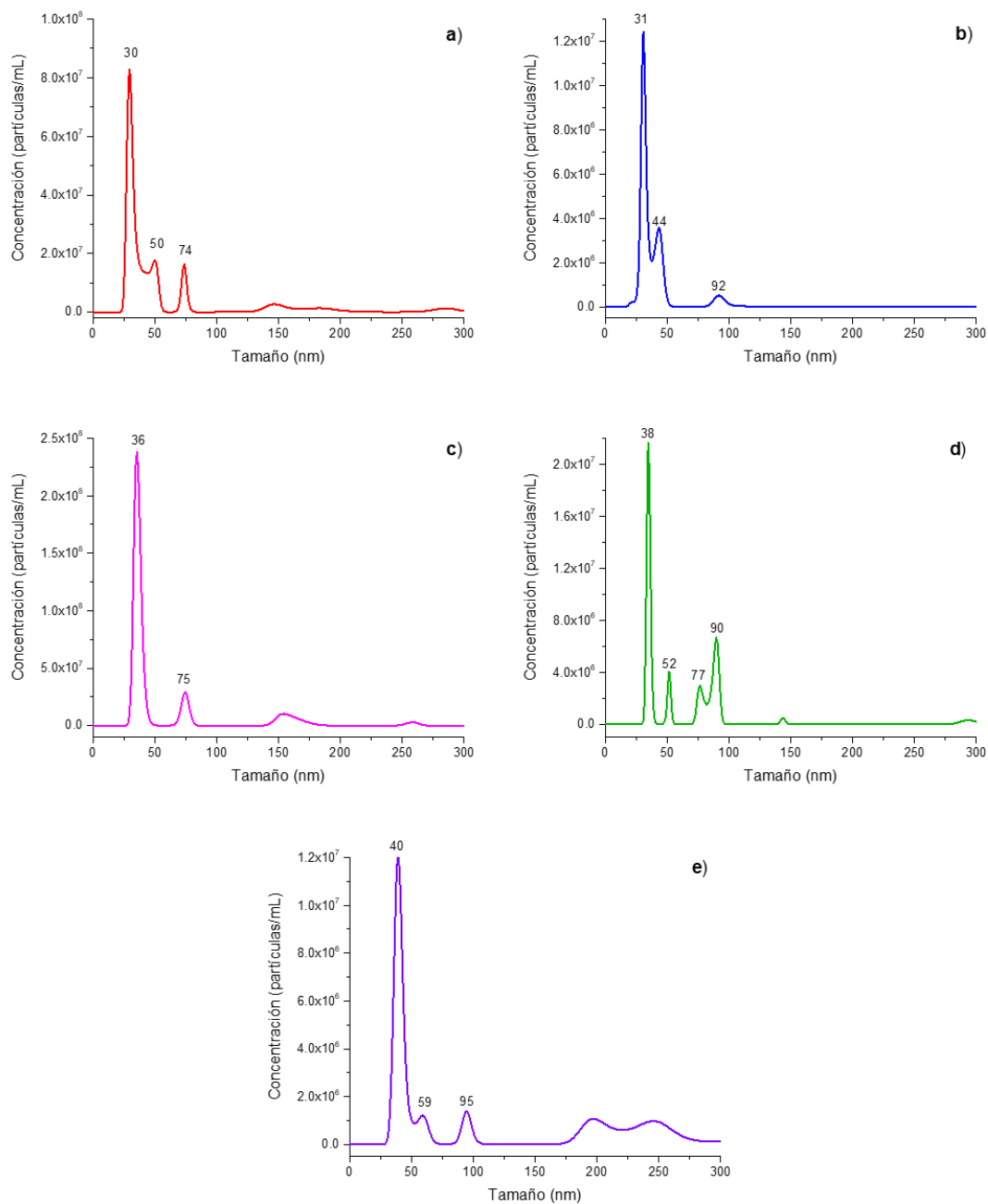


Figura 12. Concentración y tamaño de las partículas por mililitro y dispersión de tamaños de las nanopartículas de oro funcionalizadas con L-lisina a 0.2 mM (a), 0.4 mM (b), 0.6 mM (c), 0.8 mM (d) y 1 mM (e).

De la misma manera, a partir de los datos de la cantidad de partículas por mililitro obtenida directamente del equipo, se pudo comparar que la concentración de nanopartículas de oro fuera la misma entre todas las diluciones de L-lisina y de la solución stock de nanopartículas de oro a 0.3 mM. La concentración de todas las soluciones fue de 4×10^{11} - 5×10^{11} partículas/mL, confirmando que se mantuvo la concentración de nanopartículas.

En la Figura 13 se muestra la gráfica representativa obtenida por DLS de la distribución de tamaño de las nanopartículas de oro (13a) y de las nanopartículas de oro funcionalizadas con diferentes concentraciones de L-lisina (13b). En general, se observa que el pico del tamaño de las nanopartículas de oro funcionalizadas presenta un corrimiento a tamaños mayores, alrededor de los 70 nm, en comparación con las nanopartículas de oro sin funcionalizar. Los valores para los tamaños de las nanopartículas obtenidos por esta técnica difieren ligeramente de los resultados obtenidos mediante la técnica de NTA. Hassan et al. [69] reportaron que DLS tiene desventajas para identificar individualmente partículas con distintos tamaños en muestras polidispersas, y más aún cuando los tamaños son muy pequeños. La técnica de DLS presenta mayor sensibilidad por partículas grandes, de acuerdo con lo reportado por Hou et al. [60] y James et al. [59] esto es resultado de que DLS evalúa y compara la intensidad de la luz dispersada por el movimiento de las partículas, mientras que NTA se basa en el rastreo de partículas individualmente y el análisis de la velocidad con la que se mueven como resultado de su movimiento Browniano. En consecuencia, DLS demostró tener un nivel de precisión menor que NTA para la determinación del tamaño de las nanopartículas, con diferencias reportadas de entre 5-60 nm con respecto a NTA (tabla 1).

En este contexto, Zheng et al. [79] realizaron varias mediciones de DLS para nanopartículas de oro de distintos tamaños, y obtuvieron que, para nanopartículas de oro de 20 nm, de diámetro, analizadas por microscopía electrónica de transmisión (TEM), el tamaño obtenido de la nanopartícula por DLS fue aproximadamente de 30 nm, lo cual no se observa en los resultados obtenidos en este trabajo, donde las mediciones por DLS presentan un tamaño promedio menor

que las mediciones de NTA; sin embargo, Hinterwirth et al. [80] sintetizaron nanopartículas de oro de distintos tamaños mediante la reducción con citrato de sodio, utilizando distintas relaciones molares oro:citrato; dichas nanopartículas fueron posteriormente caracterizadas mediante TEM. Las nanopartículas de oro con un tamaño aproximado de 26 nm, reportaron un aumento de hasta 12 nm en su tamaño al ser medidas mediante DLS, estos resultados coinciden en comportamiento con los observados en el presente trabajo.

a)

b)

Figura 13. Mediciones obtenidas por DLS del radio hidrodinámico de las nanopartículas de oro (0.3 mM) (a) y de las nanopartículas de oro funcionalizadas a distintas concentraciones de L-lisina (b).

En general, mientras que el diámetro de las nanopartículas analizado por NTA y UV-Vis es de entre 25-27 nm para las nanopartículas sin funcionalizar, los resultados obtenidos por DLS exceden por hasta 20 nm, comportamiento que también se observa para las nanopartículas de oro funcionalizadas. Cabe destacar que conforme aumenta el tamaño de las nanopartículas funcionalizadas, el nivel de detección de DLS se vuelve más preciso, con resultados más cercanos a los obtenidos mediante NTA. Por otro lado, al incrementar la concentración de lisina, el tamaño aumenta entre 3-5 nm cuando se determina por NTA; sin embargo, el valor de la desviación estándar es grande, lo que indica el grado de polidispersión.

Esto coincide con lo obtenido mediante DLS, donde el índice de polidispersión en todas las muestras es mayor a 0.5, lo cual indica una muestra con poblaciones de varios tamaños, sin embargo, la muestra no llega a ser altamente polidispersa, pues de acuerdo con los estándares ISO (ISO 22,412:2017 e ISO 22,412:2017) para que se puedan definir como tal su nivel de polidispersión debe de ser mayor a 0.7 [81]; por lo que para este trabajo, el grado de polidispersión es aceptable.

Tabla 1. Comparación del tamaño de las nanopartículas de oro obtenido mediante DLS y NTA en función de la concentración de L-lisina.

Concentración de lisina (mM)	Tamaño por DLS (nm)	Índice de polidispersión (DLS)	Tamaño promedio por NTA (nm)	Desviación estándar (NTA)	Moda por NTA (nm)
0	48.0	--	49	41.6	26.6
0.2	50.0	0.601	67.3	78.1	29.3
0.4	52.6	0.616	38.3	15.5	30.6
0.6	51.8	0.586	56.8	46.8	35.3
0.8	53.2	0.605	146.6	167.1	34.7
1	54.0	0.596	125.4	102.4	39.4

6.1.3 Mediciones de potencial zeta

El valor del potencial zeta es un parámetro que indica la estabilidad de las nanopartículas en suspensión, y la carga en la superficie de la partícula. Para la estabilización electrostática de las nanopartículas se requieren valores mayores a ± 30 mV. En la tabla 2 se presentan los valores del potencial zeta obtenidos para las nanopartículas de oro a una concentración de 0.3 mM y las nanopartículas de oro funcionalizadas con lisina a distintas concentraciones. En esta tabla se aprecia que el valor de potencial zeta para las nanopartículas de oro es de -47 mV, lo que indica el grado de estabilidad que presentan éstas y una carga negativa en la superficie. Este valor es similar al reportado por Wenjie et al. [73] quienes reportaron un valor de potencial zeta alrededor de los -40 mV para nanopartículas de oro sintetizadas a través del método de Turkevich. De la misma manera Ivanov et al. [82] reportaron un potencial zeta de -39 ± 7 mV para nanopartículas de oro estabilizadas con citrato de sodio.

Por otro lado, las nanopartículas de oro funcionalizadas con lisina experimentaron un cambio en el valor de potencial zeta de -47 mV sin lisina hasta de -37 mV para una concentración de 1 mM.

Tabla 2. Potencial zeta de las nanopartículas de oro funcionalizadas diferentes concentraciones de lisina.

Concentración de lisina (mM)	Potencia zeta (mV)
0	-47
0.2	-40
0.4	-43
0.6	-37
0.8	-39
1	-37

Este hecho resulta de la presencia de los grupos $-NH_2$ en la molécula de la L-lisina; conforme aumenta la concentración de lisina en el medio aumenta la cantidad de moléculas de L-lisina adsorbidas en la superficie de las nanopartículas de oro generando una modificación de la carga superficial a valores más positivos, como resultado de la interacción de la L-lisina con los grupos funcionales del citrato de sodio presentes en la superficie de la nanopartícula de oro.

6.1.4 Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier

En la Figura 14 se observan los espectros FTIR de las nanopartículas de oro funcionalizadas con distintas concentraciones de L-lisina, en contraste con las nanopartículas de oro, las nanopartículas de oro funcionalizadas presenta más bandas de absorción, que corresponden a los grupos amino y carboxilo presentes en la molécula de la lisina.

En concordancia con los datos extraídos de los trabajos de Mohamed et al. [83] y Durmus et al. [84] es posible identificar las bandas obtenidas. La banda de baja intensidad presente alrededor de los 3700 cm^{-1} corresponde al enlace $-OH$ de la L-lisina, mientras que la banda a aproximadamente 3200 cm^{-1} corresponde a las frecuencias vibracionales características de $-NH_2$ al igual que la banda presente alrededor de los 1200 cm^{-1} . Por otro lado, las frecuencias vibracionales simétricas y asimétricas del carboxilo se observan alrededor de los 1000 cm^{-1} . De la misma manera, el aumento en la intensidad de las bandas es coherente con el aumento en

la concentración de L-lisina, así, el espectro correspondiente a 3 mM de L-lisina presenta las bandas más intensas.

Figura 14. Espectro de transmitancia de las nanopartículas de oro funcionalizadas con L-lisina a distintas concentraciones a) 0.2 mM, b) 0.4 mM, c) 0.6 mM, d) 0.8 mM, e) 1 mM, f) 2 mM y g) 3 mM.

6.2 Caracterización de la formación del complejo (AuNP-Lis) y cobre (II)

6.2.1 Espectroscopia de absorción UV-Vis

En la Figura 15 se presentan los espectros de absorción UV-Vis de las nanopartículas de oro funcionalizadas con L-lisina a distintas concentraciones de cloruro de cobre (II). Se observa que conforme aumentó la concentración de cloruro de cobre (II) el plasmón (522 nm) de las nanopartículas de oro disminuyó en intensidad y se corrió hacia el rojo. Cuando la concentración de cloruro de cobre fue de 80 μM apareció un ligero hombro en el plasmón principal, que está relacionado con el aumento de tamaño de las nanopartículas. A partir de la concentración de 160 μM , la forma del plasmón cambió drásticamente, apareciendo un segundo pico de absorción alrededor de los 680 nm, indicando la formación de estructuras anisotrópicas de oro.

Figura 15. Espectros de absorción UV-Vis de las nanopartículas de oro (0.3 mM) funcionalizadas con L-lisina (negro) y expuestas a distintas concentraciones de cloruro de cobre (II).

La aparición de un segundo plasmón conforme aumentó la concentración de iones Cu^{2+} en la solución se relaciona con el grado de autoensamblaje que presentan las nanopartículas de oro funcionalizadas. En el trabajo de Xu et al. [33] se sintetizaron nanopartículas de oro para realizar una detección colorimétrica de Cu^{2+} en agua potable. La síntesis se realizó mediada por lisina e hidróxido de sodio, para de esta forma obtener nanopartículas funcionalizadas con lisina, que posteriormente fueron utilizadas para detectar Cu^{2+} a distintas concentraciones, de 0 a 100 μM . Los resultados observados fueron una disminución en la intensidad de la absorción del plasmón, así como un corrimiento hacia el rojo, lo que coincide con los resultados observados en este trabajo.

Para disminuir la concentración de cobre necesaria para la respuesta óptica, el rango de concentraciones de cloruro de cobre se hizo más estrecho. En la Figura 16 se presentan los espectros de absorción del sistema AuNP-Lis al interactuar con los iones de cobre. Se observó que una concentración de 220 μM o 240 μM fue suficiente para generar un cambio evidente en el color de las nanopartículas de oro (Figura 17) y en el plasmón. Es posible apreciar que conforme aumentó la concentración de cloruro de cobre (II), se presentó un cambio en el color de la solución de rojo a morado y hasta un tono gris, que coincidió con el corrimiento hacia el rojo y la aparición de un segundo plasmón que se observó en espectroscopia UV-Vis. Estos cambios ópticos son resultado de la interacción entre las nanopartículas de oro funcionalizadas con lisina y el cobre, interacción que resultó en el aumento gradual de tamaño hasta la formación de otras estructuras.

Figura 16. Espectros de absorción UV-Vis de nanopartículas de oro funcionalizadas con L-lisina (negro) y expuestas a distintas concentraciones de cloruro de cobre (II).

De la misma forma en su trabajo Sener et al. [4] utilizaron nanopartículas de oro funcionalizadas con lisina para la detección del ion Hg^{2+} en soluciones acuosas, los resultados obtenidos indicaron que a concentraciones altas de Hg^{2+} aparece un segundo plasmón alrededor de los 750 nm correspondiente al autoensamblaje de las nanopartículas de oro como resultado de su interacción con el ion Hg^{2+} , estos datos coinciden con lo obtenido en este trabajo.

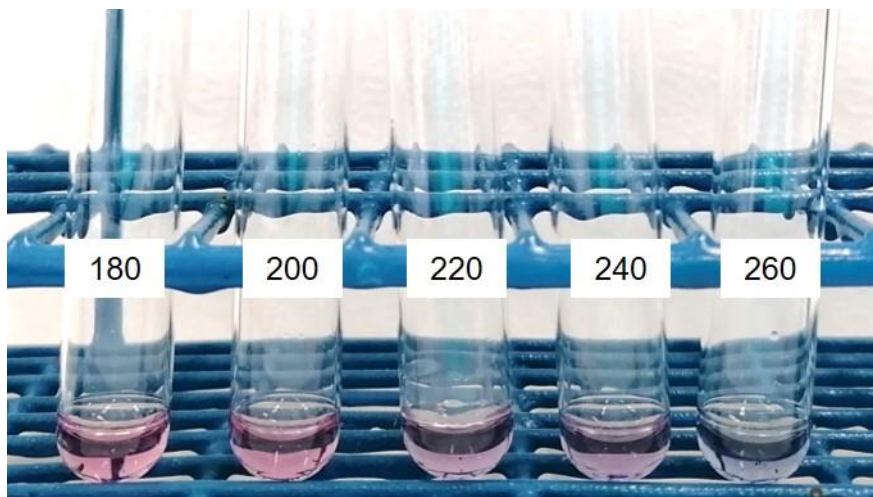


Figura 17. Nanopartículas de oro funcionalizadas con L-lisina interactuando con distintas concentraciones de cobre (II).

En la Figura 18 se presenta el posible mecanismo de autoensamblaje de las nanopartículas de oro funcionalizadas con L-lisina al interactuar con los iones de cobre. Se ha reportado que la formación de cadenas entre los grupos funcionales libres de la lisina (-NH₂ y -COOH) y los iones Cu²⁺ al interactuar electrostáticamente, formando estructuras ramificadas de nanopartículas [28].

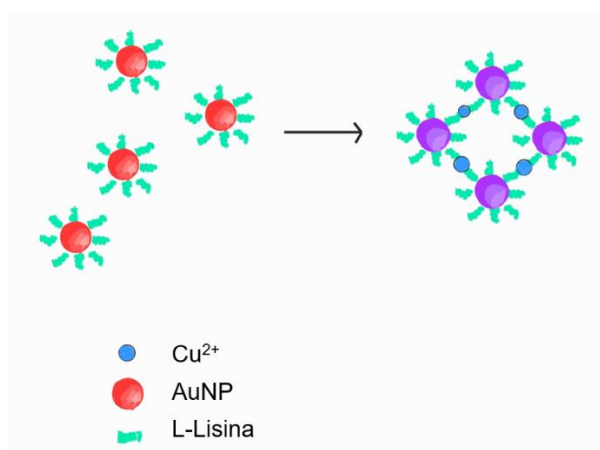


Figura 18. Esquema de la interacción electrostática entre las nanopartículas de oro funcionalizadas con L-lisina y los iones Cu²⁺. Imagen de autoría propia.

Por otro lado, el valor del potencial zeta para las nanopartículas de oro (0.3 mM) funcionalizadas con L-lisina (0.6 mM) y cobre a 220 μM fue de -35 mV; al enlazarse los iones Cu²⁺ con los radicales libres de la L-lisina, no se presentó un cambio

significativo en el potencial zeta respecto al de las nanopartículas funcionalizadas con L-lisina a 0.6 mM; esto puede ser consecuencia del autoensamblaje que se genera en las nanopartículas, pues al interactuar el cobre (II) con la L-lisina, se forman aglomerados de nanopartículas de oro que presentan un potencial zeta negativo.

6.3 Detección de AFB₁ utilizando el sistema AuNP-Lis-Cu²⁺

En la Figura 19 se presentan los espectros de absorción del sistema AuNP-Lis-Cu después de reaccionar con diferentes concentraciones de AFB₁. En ésta se observa la definición de un segundo plasmón hacia longitudes de onda mayores (640 – 670 nm), junto con un corrimiento hacia el rojo al incrementarse la concentración de aflatoxina (3 – 200 µg/L). Mientras que en concentraciones inferiores a 50 µg/L la absorción del segundo plasmón es menor a la del plasmón principal, este comportamiento se invierte en concentraciones mayores de 50 µg/L, lo que sugiere que las aflatoxinas están contribuyendo en la formación de ramificaciones y su consecuente cambio en la morfología de la nanopartícula.

Figura 19. Espectros de absorción UV-Vis de las nanopartículas de oro (0.3 mM) funcionalizadas con L-lisina (0.6 mM) y cobre (II) expuestas a aflatoxina B₁ a distintas concentraciones (µg/L).

De acuerdo con los datos obtenidos, el grado máximo de autoensamblaje de las nanopartículas se volvió más evidente a partir de 100 µg/L, como se observa en la Figura 20, esto sugiere que en concentraciones más altas el grado de autoensamblaje será aún mayor hasta la llegar a la aglomeración. Por otro lado, el límite inferior de detección es de 25 µg/L, esto debido a que en concentraciones inferiores no es posible diferenciar cualitativamente las muestras.

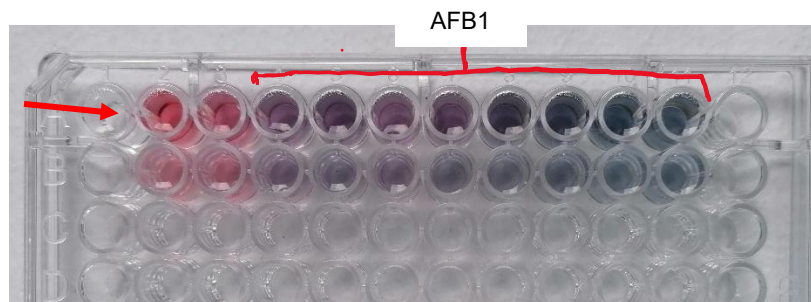


Figura 20. Detección colorimétrica con el sistema AuNP-Lis-Cu de distintas concentraciones de aflatoxina B₁.

Los resultados obtenidos para la detección de la aflatoxina B₁ siguen el mismo comportamiento de los reportados en el trabajo de Du et al. [6], pero inversamente. En su trabajo, los autores hicieron uso de mercurio (II) para la formación del complejo AuNP-Lis-Hg²⁺; las nanopartículas de oro disminuyen su grado de autoensamblaje conforme aumenta la concentración de aflatoxinas (inversamente proporcional), de esta forma, las nanopartículas se encuentran nuevamente estables en concentraciones superiores a 600 µg/L de aflatoxinas. Por el contrario, los resultados obtenidos en este trabajo siguen una relación directamente proporcional, conforme aumenta a concentración de aflatoxinas, aumenta el grado de autoensamblaje, mientras que en concentraciones bajas de aflatoxinas el grado de autoensamblaje es menor; esto sugiere que la interacción del complejo con las aflatoxinas es opuesta en ambos trabajos, sin embargo, ambos permiten la detección de dicho compuesto.

Esta diferencia en los resultados es sugerente de una diferencia en la forma en que el complejo AFB₁-Cu²⁺ y las nanopartículas interactúan. De esta forma, la cantidad de aflatoxinas excede la cantidad de cobre (II) con el que puede enlazarse, y, por ende, disminuir el autoensamblaje; al ser mayor la cantidad de cobre que de aflatoxinas, es posible suponer que el exceso de aflatoxinas recurre a las nanopartículas de oro funcionalizadas con L-lisina e interactúa electroestáticamente con los radicales libres del aminoácido, formando cadenas de aflatoxinas con nanopartículas de oro funcionalizadas, ocasionando la aglomeración de estas últimas. Por otro lado, en concentraciones bajas de aflatoxinas, el cobre (II) presente en la solución interactúa en su totalidad con las aflatoxinas; de esta forma, las aflatoxinas forman ramificaciones alrededor de los iones de cobre, dejando las nanopartículas de oro funcionalizadas estables [6], [85].

7. Conclusiones

En este trabajo se estudió el sistema resultante de la funcionalización de nanopartículas de oro con el aminoácido L-lisina, además de haber utilizado dicho sistema (AuNP-Lis) junto con cloruro de cobre (II) para la detección colorimétrica de la aflatoxina B₁. El objetivo de este trabajo fue proveer información específica sobre la funcionalización que permita su reproducibilidad para diversas aplicaciones.

Las nanopartículas de oro sintetizadas a través del método de Turkevich presentaron un tamaño en el rango de los 5-50 nm, la síntesis demostró poseer un alto grado de reproducibilidad y consistencia con otros trabajos en la materia. Las partículas presentaron un potencial zeta de -47 mV, motivo por el cual son altamente estables. De acuerdo con los datos recabados, la relación molar oro:citrato requerida en la síntesis para obtener nanopartículas en este rango de tamaños fue de 1:20 respectivamente, las nanopartículas resultantes presentan menor tamaño conforme aumenta la concentración de citrato de sodio respecto a la de oro.

Por otro lado, las nanopartículas de oro funcionalizadas con L-lisina no presentaron cambios morfológicos ni autoensamblaje en concentraciones del aminoácido menores a 2.5 mM, por lo cual se concluye que la relación molar ideal para la funcionalización de nanopartículas de oro con L-lisina es de 1:2 respectivamente. En relaciones molares superiores, las nanopartículas de oro experimentan aglomeración, lo cual fue comprobado por la formación de un doble plasmón observado con espectroscopia UV-Vis.

De la misma manera, los resultados obtenidos por NTA y DLS muestran un cambio en el tamaño conforme aumenta la concentración, lo cual se aprecia con mayor claridad en los espectros de FTIR, pues las bandas correspondientes a los grupos funcionales de la L-lisina aumentan de tamaño conforme aumenta la concentración; asimismo, se observa que las mediciones de potencial zeta cambian a valores más positivos, es por ello que se puede concluir que las relaciones electroestáticas entre los grupos funcionales presentes en el aminoácido y la superficie de la nanopartícula influyen en la agregación y morfología del sistema.

Finalmente, el sistema AuNP-Lis-Cu presentó una clara respuesta colorimétrica al estar en presencia de la aflatoxina B1, con un límite de detección inferior de 25 µg/L. Esto confirma que el sistema puede ser utilizado efectivamente para la detección de la AFB1, asimismo, se sentaron las bases para el uso del sistema AuNP-Lis en la detección de otros analitos de interés mundial.

8. Perspectivas

En futuros trabajos se espera explorar más a fondo la relación molar lisina:cobre, esto con el propósito de disminuir los niveles de detección para obtener límites inferiores a aquellos requeridos por instituciones internacionales; asimismo, los datos obtenidos en este trabajo para la funcionalización de nanopartículas representan un nicho importante para el desarrollo de nuevas aplicaciones basadas en la detección colorimétrica mediada por nanopartículas.

9. Referencias

- [1] E. Záyago-Lau and G. Foladori, "La nanotecnología en México: un desarrollo incierto Nanotechnology in Mexico: an uncertain development," 2010.
- [2] R. Zanella, "Metodologías para la síntesis de nanopartículas: controlando forma y tamaño," *Mundo Nano*, vol. 5, no. 1, pp. 69–81, 2012.
- [3] Y.-T. Long and C. Jing, *Localized surface plasmon resonance based nanobiosensors*. 2014.
- [4] G. Sener, L. Uzun, and A. Denizli, "Lysine-promoted colorimetric response of gold nanoparticles: A simple assay for ultrasensitive mercury(II) detection," *Anal. Chem.*, vol. 86, no. 1, pp. 514–520, 2014.
- [5] J. Lerdsri, W. Chananchana, J. Upan, T. Sridara, and J. Jakmune, "Label-Free colorimetric aptasensor for Rapid detection of aflatoxin B1 by utilizing cationic perylene probe and localized surface plasmon resonance of gold nanoparticles," *Sensors Actuators B Chem.*, p. 128356, May 2020.
- [6] B. Du *et al.*, "Antibody-free colorimetric determination of total aflatoxins by mercury(II)-mediated aggregation of lysine-functionalized gold nanoparticles," *Microchim. Acta*, vol. 183, no. 4, pp. 1493–1500, 2016.
- [7] P. Tiwari, K. Vig, V. Dennis, and S. Singh, "Functionalized Gold Nanoparticles and Their Biomedical Applications," *Nanomaterials*, vol. 1, no. 1, pp. 31–63, 2011.
- [8] H. Ju, X. Zhang, and J. Wang, *NanoBiosensing: Principles, Development and*

Application. NY: Springer, 2011.

- [9] O. Horovitz and M. Tomoaia-Cotisel, "Lysine mediated assembly of Gold Nanoparticles," *Chemia*, vol. 2, no. 1, pp. 97–108, 2007.
- [10] V. Amendola and M. Meneghetti, "Size Evaluation of Gold Nanoparticles by UV-vis Spectroscopy."
- [11] V. Filipe, A. Hawe, and W. Jiskoot, "Critical evaluation of nanoparticle tracking analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates," *Pharm. Res.*, vol. 27, no. 5, pp. 796–810, 2010.
- [12] International Agency for Research on Cancer, "Aflatoxins."
- [13] J. D. Groopman, W. F. Busby, and G. N. Wogan, "Nuclear Distribution of Aflatoxin B1 and Its Interaction with Histones in Rat Liver in Vivo," *Cancer Res.*, vol. 40, no. 12, 1980.
- [14] D. M. P. Mingos, *Gold Clusters, Colloids and Nanoparticles I*. 2014.
- [15] M. Steinhart, "Introduction to Nanotechnology. By Charles P. Poole, Jr. and Frank J. Owens.," *Angew. Chemie Int. Ed.*, vol. 43, no. 17, pp. 2196–2197, Apr. 2004.
- [16] H. Chen, K. Zhou, and G. Zhao, "Gold nanoparticles: From synthesis, properties to their potential application as colorimetric sensors in food safety screening," 2018.
- [17] Y. Wu, M. R. K. Ali, K. Chen, N. Fang, and M. A. El-Sayed, "Gold nanoparticles in biological optical imaging," *Nano Today*, vol. 24, pp. 120–140, 2019.
- [18] X. Huang and M. A. El-Sayed, "Gold nanoparticles: Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy," *Journal of Advanced Research*, vol. 1, no. 1. Elsevier, pp. 13–28, 01-Jan-2010.
- [19] C. Daruich De Souza, B. Ribeiro Nogueira, and M. E. C. M. Rostelato, "Review of the methodologies used in the synthesis gold nanoparticles by chemical reduction," *J. Alloys Compd.*, vol. 798, pp. 714–740, 2019.
- [20] S. Menon, R. S., and V. K. S., "A review on biogenic synthesis of gold nanoparticles, characterization, and its applications," *Resour. Technol.*, vol. 3, no. 4, pp. 516–527, Dec. 2017.
- [21] T. Khan, N. Ullah, M. A. Khan, Z. ur R. Mashwani, and A. Nadhman, "Plant-based gold nanoparticles; a comprehensive review of the decade-long research on synthesis, mechanistic aspects and diverse applications," *Advances in Colloid and Interface Science*, vol. 272. Elsevier B.V., p. 102017, 01-Oct-2019.
- [22] J. Kimling, M. Maier, B. Okenve, V. Kotaidis, H. Ballot, and A. Plech, "Turkevich Method for Gold Nanoparticle Synthesis Revisited," 2006.
- [23] L. Shi, E. Buhler, F. Boué, and F. Carn, "How does the size of gold

nanoparticles depend on citrate to gold ratio in Turkevich synthesis? Final answer to a debated question," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 492, pp. 191–198, 2017.

- [24] F. Kettemann *et al.*, "Missing Piece of the Mechanism of the Turkevich Method: The Critical Role of Citrate Protonation," *Chem. Mater.*, vol. 28, no. 11, pp. 4072–4081, Jun. 2016.
- [25] J. Polte, "Fundamental growth principles of colloidal metal nanoparticles - a new perspective," *CrystEngComm*, vol. 17, no. 36, pp. 6809–6830, Jun. 2015.
- [26] E. Méndez, P. Fagúndez, P. Sosa, M. V. Gutiérrez, and S. Botasini, "Experimental evidences support the existence of an aggregation/disaggregation step in the Turkevich synthesis of gold nanoparticles," *Nanotechnology*, vol. 32, no. 4, p. 045603, Jan. 2021.
- [27] Nicol, J. R. Dixon, Dixon D, and J. A. Coulter, "Gold nanoparticle surface functionalization: a necessary requirement in the development of novel nanotherapeutics Gold Nanoparticle Surface Functionalisation-A Necessary Requirement in the Development of Novel Nano-Therapeutics," 2015.
- [28] P. R. Selvakannan, S. Mandal, S. Phadtare, R. Pasricha, and M. Sastry, "Capping of gold nanoparticles by the amino acid lysine renders them water-dispersible," *Langmuir*, vol. 19, no. 8, pp. 3545–3549, 2003.
- [29] S. Zeng, K. T. Yong, I. Roy, X. Q. Dinh, X. Yu, and F. Luan, "A Review on Functionalized Gold Nanoparticles for Biosensing Applications," *Plasmonics*, vol. 6, no. 3, pp. 491–506, 2011.
- [30] D. Patra and F. Sleem, "A new method for pH triggered curcumin release by applying poly(L-lysine) mediated nanoparticle-congregation," *Anal. Chim. Acta*, vol. 795, pp. 60–68, Sep. 2013.
- [31] F. K. Alanazi, A. A. Radwan, and I. A. Alsarra, "Biopharmaceutical applications of nanogold," 2010.
- [32] C. C. Huang and H. T. Chang, "Selective gold-nanoparticle-based 'turn-on' fluorescent sensors for detection of mercury(II) in aqueous solution," *Anal. Chem.*, vol. 78, no. 24, pp. 8332–8338, 2006.
- [33] Y. Xu, X. Yang, S. Zhu, and Y. Dou., "Selectively fluorescent sensing of Cu²⁺ based on lysine-functionalized gold nanoclusters," *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 450, no. 1, pp. 115–120, 2014.
- [34] D. Liu, Z. Wang, and X. Jiang, "Gold nanoparticles for the colorimetric and fluorescent detection of ions and small organic molecules," *Nanoscale*, vol. 3, no. 4, pp. 1421–1433, Apr. 2011.
- [35] M. De *et al.*, "Sensing of proteins in human serum using conjugates of nanoparticles and green fluorescent protein," *Nat. Chem.*, vol. 1, no. 6, pp. 461–465, Sep. 2009.

- [36] L. M. Zanolì, R. D'Agata, and G. Spoto, "Functionalized gold nanoparticles for ultrasensitive DNA detection," *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 402, no. 5. Springer, pp. 1759–1771, 25-Feb-2012.
- [37] Q. Chen, W. Hu, C. Sun, H. Li, and Q. Ouyang, "Synthesis of improved upconversion nanoparticles as ultrasensitive fluorescence probe for mycotoxins," *Anal. Chim. Acta*, vol. 938, pp. 137–45, Sep. 2016.
- [38] Y. Wu *et al.*, "Engineered gold nanoparticles as multicolor labels for simultaneous multi-mycotoxin detection on the immunochromatographic test strip nanosensor," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 316, p. 128107, Aug. 2020.
- [39] "Resumen por estado." [Online]. Available: http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/ResumenProducto.do. [Accessed: 31-Aug-2020].
- [40] J.-S. Wang, S. Abubaker, X. He, G. Sun, P. T. Strickland, and J. D. Groopman, "Development of Aflatoxin B 1-Lysine Adduct Monoclonal Antibody for Human Exposure Studies Downloaded from," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 67, no. 6, pp. 2712–2717, 2001.
- [41] A. Zavala-Franco *et al.*, "Assessing the aflatoxin B1 adsorption capacity between biosorbents using an in vitro multicompartamental model simulating the dynamic conditions in the gastrointestinal tract of poultry," *Toxins (Basel)*, vol. 10, no. 11, Nov. 2018.
- [42] H. U. Yan-Yun, P. Zheng, Z. X. Zhang, and H. E. You-Zhao, "Determination of aflatoxins in high-pigment content samples by matrix solid-phase dispersion and high-performance liquid chromatography," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 54, no. 12, pp. 4126–4130, Jun. 2006.
- [43] Y. Nonaka, K. Saito, N. Hanioka, S. Narimatsu, and H. Kataoka, "Determination of aflatoxins in food samples by automated on-line in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-mass spectrometry," *J. Chromatogr. A*, vol. 1216, no. 20, pp. 4416–4422, May 2009.
- [44] A. Sharma, Z. Matharu, G. Sumana, P. R. Solanki, C. G. Kim, and B. D. Malhotra, "Antibody immobilized cysteamine functionalized-gold nanoparticles for aflatoxin detection," in *Thin Solid Films*, 2010, vol. 519, no. 3, pp. 1213–1218.
- [45] S. H. Jalalian, M. Ramezani, N. M. Danesh, M. Alibolandj, K. Abnous, and S. M. Taghdisi, "A novel electrochemical aptasensor for detection of aflatoxin M1 based on target-induced immobilization of gold nanoparticles on the surface of electrode," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 117, pp. 487–492, Oct. 2018.
- [46] M. Jiang *et al.*, "Aflatoxin B1 detection using a highly-sensitive molecularly-imprinted electrochemical sensor based on an electropolymerized metal organic framework," *Toxins (Basel)*, vol. 7, no. 9, pp. 3540–3553, 2015.

- [47] T. Klar, M. Perner, S. Grosse, G. von Plessen, W. Spirkl, and J. Feldmann, "Surface-plasmon resonances in single metallic nanoparticles," *Phys. Rev. Lett.*, vol. 80, no. 19, pp. 4249–4252, May 1998.
- [48] E. Hutter and J. H. Fendler, "Exploitation of localized surface plasmon resonance," *Adv. Mater.*, vol. 16, no. 19, pp. 1685–1706, 2004.
- [49] K. A. Willets and R. P. Van Duyne, "Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy and Sensing," *Annu. Rev. Phys. Chem.*, vol. 58, no. 1, pp. 267–297, May 2007.
- [50] S. Moris, N. Silva, C. Saitz, P. Jara, and B. Chornik, "Nanodecoration of single crystals of 5,11,17,23-tetra-tert-butyl-25,27-bis(cyanomethoxy)-26,28-dihydroxycalix[4]arene," *J. Chil. Chem. Soc.*, vol. 62, no. 4, pp. 3772–3778, 2017.
- [51] W. Haiss, N. T. K. Thanh, J. Aveyard, and D. G. Fernig, "Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-Vis spectra," *Anal. Chem.*, vol. 79, no. 11, pp. 4215–4221, 2007.
- [52] A. P. Ramos, "Nanocharacterization Techniques," 2017.
- [53] C. Berthomieu and R. Hienerwadel, "Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy," *Photosynthesis Research*, vol. 101, no. 2–3. Springer, pp. 157–170, 10-Sep-2009.
- [54] P.-C. Lin, S. Lin, P. C. Wang, and R. Sridhar, "Techniques for physicochemical characterization of nanomaterials," 2013.
- [55] D. Titus, E. James Jebaseelan Samuel, and S. M. Roopan, "Nanoparticle characterization techniques," in *Green Synthesis, Characterization and Applications of Nanoparticles*, Elsevier, 2019, pp. 303–319.
- [56] K. S. Siddiqi and A. Husen, "Recent advances in plant-mediated engineered gold nanoparticles and their application in biological system," *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, vol. 40. Elsevier GmbH, pp. 10–23, 01-Mar-2017.
- [57] H. H. Mantsch, P. W. Yang, and H. L. Casal, "Infrared spectrometry of living systems: current trends and perspectives.," *J. Mol. Struct.*, vol. 141, no. C, pp. 237–242, 1986.
- [58] Y. Kumari *et al.*, "Historical perspective Gold nanoparticles: New routes across old boundaries," 2019.
- [59] A. E. James and J. D. Driskell, "Monitoring gold nanoparticle conjugation and analysis of biomolecular binding with nanoparticle tracking analysis (NTA) and dynamic light scattering (DLS)," *Analyst*, vol. 138, no. 4, pp. 1212–1218, 2013.
- [60] J. Hou *et al.*, "Nanoparticle tracking analysis versus dynamic light scattering: Case study on the effect of Ca²⁺ and alginate on the aggregation of cerium oxide nanoparticles," *J. Hazard. Mater.*, vol. 360, no. January, pp. 319–328,

2018.

- [61] P. Hole *et al.*, "Interlaboratory comparison of size measurements on nanoparticles using nanoparticle tracking analysis (NTA)," *J. Nanoparticle Res.*, vol. 15, no. 12, 2013.
- [62] S. Sladek, K. McComiskey, A. M. Healy, and L. Tajber, "Nanoparticle Tracking Analysis to Examine the Temperature-Induced Aggregation of Proteins," in *Methods in Molecular Biology*, vol. 2039, Humana Press Inc., 2019, pp. 131–139.
- [63] P. Cervantes-Avilés, Y. Huang, and A. A. Keller, "Multi-technique approach to study the stability of silver nanoparticles at predicted environmental concentrations in wastewater," *Water Res.*, vol. 166, p. 115072, Dec. 2019.
- [64] D. Wang, P. Wang, C. Wang, and Y. Ao, "Effects of interactions between humic acid and heavy metal ions on the aggregation of TiO₂ nanoparticles in water environment," *Environ. Pollut.*, vol. 248, pp. 834–844, May 2019.
- [65] J. Estrada-Urbina, A. Cruz-Alonso, M. Santander-González, A. Méndez-Albores, and A. Vázquez-Durán, "Physiological and sanitary quality of a Mexican landrace of red maize," *Nanomaterials*, vol. 8, no. 4, pp. 1–12, 2018.
- [66] M. Kuralkar, A. Ingle, S. Gaikwad, A. Gade, and M. Rai, "Gold nanoparticles: Novel catalyst for the preparation of direct methanol fuel cell," *IET Nanobiotechnology*, vol. 9, no. 2, pp. 66–70, Apr. 2015.
- [67] R. Pecora, "Dynamic light scattering measurement of nanometer particles in liquids," 2000.
- [68] M. Tavakkoli Yaraki and Y. N. Tan, "Recent advances in metallic nanobiosensors development: Colorimetric, dynamic light scattering and fluorescence detection," *Sensors Int.*, vol. 1, p. 100049, Jan. 2020.
- [69] P. A. Hassan, S. Rana, and G. Verma, "Making Sense of Brownian Motion: Colloid Characterization by Dynamic Light Scattering," 2014.
- [70] S. A. Khan, J. A. DeGrasse, B. J. Yakes, and T. R. Croley, "Rapid and sensitive detection of cholera toxin using gold nanoparticle-based simple colorimetric and dynamic light scattering assay," *Anal. Chim. Acta*, vol. 892, pp. 167–174, Sep. 2015.
- [71] C. Xiong and L. Ling, "Label-free, sensitive detection of Hg(II) with gold nanoparticles by using dynamic light scattering technique," *Talanta*, vol. 89, pp. 317–321, Jan. 2012.
- [72] A. S. Dukhin and R. Xu, "Zeta-potential measurements," in *Characterization of Nanoparticles: Measurement Processes for Nanoparticles*, Elsevier, 2019, pp. 213–224.
- [73] W. Wang, X. Ding, Q. Xu, J. Wang, L. Wang, and X. Lou, "Zeta-potential data reliability of gold nanoparticle biomolecular conjugates and its application in

- sensitive quantification of surface absorbed protein,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 148, pp. 541–548, 2016.
- [74] F. Varenne *et al.*, “Evaluation of zeta potential of nanomaterials by electrophoretic light scattering: Fast field reversal versus Slow field reversal modes,” *Talanta*, vol. 205, p. 120062, Dec. 2019.
- [75] R. Moreno, Juan; Peinado, “The Colloidal State,” in *Enological Chemistry*, España: Elsevier, 2012, pp. 303–321.
- [76] Z.-M. Inc., “Potencial Zeta: Un Curso Completo en 5 Minutos,” *Zeta-m. Inc.*, pp. 1–22, 2008.
- [77] R. J. HUNTER and R. J. HUNTER, “Chapter 1 – Introduction,” *Zeta Potential Colloid Sci.*, pp. 1–10, Jan. 1981.
- [78] S. A. Malik *et al.*, “Electrospun fabrication of one-dimensional composite nanofibres using colloidal gold/polymer aqueous blends,” in *IEEE-NANO 2015 - 15th International Conference on Nanotechnology*, 2015, pp. 1350–1353.
- [79] T. Zheng, S. Bott, and Q. Huo, “Techniques for Accurate Sizing of Gold Nanoparticles Using Dynamic Light Scattering with Particular Application to Chemical and Biological Sensing Based on Aggregate Formation,” 2016.
- [80] H. Hinterwirth *et al.*, “Comparative method evaluation for size and size-distribution analysis of gold nanoparticles,” *J. Sep. Sci.*, vol. 36, no. 17, pp. 2952–2961, Sep. 2013.
- [81] T. Mudalige, H. Qu, D. Van Haute, S. M. Ansar, A. Paredes, and T. Ingle, “Characterization of Nanomaterials: Tools and Challenges,” in *Nanomaterials for Food Applications*, Elsevier, 2018, pp. 313–353.
- [82] M. R. Ivanov, H. R. Bednar, and A. J. Haes, “Investigations of the mechanism of gold nanoparticle stability and surface functionalization in capillary electrophoresis,” *ACS Nano*, vol. 3, no. 2, pp. 386–394, Feb. 2009.
- [83] M. A. Mohamed, J. Jaafar, A. F. Ismail, M. H. D. Othman, and M. A. Rahman, “Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy,” in *Membrane Characterization*, Elsevier Inc., 2017, pp. 3–29.
- [84] Z. Durmus *et al.*, “l-lysine coated iron oxide nanoparticles: Synthesis, structural and conductivity characterization,” *J. Alloys Compd.*, vol. 484, no. 1–2, pp. 371–376, Sep. 2009.
- [85] Y. Guo, Z. Wang, W. Qu, H. Shao, and X. Jiang, “Colorimetric detection of mercury, lead and copper ions simultaneously using protein-functionalized gold nanoparticles,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 26, pp. 4064–4069, 2011.

