



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**DISEÑO Y APLICACIÓN DE
NANOPARTÍCULAS
MULTIFUNCIONALES EN CÁNCER**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIÓLOGA

PRESENTA

MITZI ALONDRA REYES SÁNCHEZ

DIRECTOR DE TESIS

DR. JOSÉ ANDRÉS DE LA CRUZ RODRÍGUEZ GALVÁN.

2023

**LOS REYES IZTACALA, TLALNEPANTLA DE BAZ,
ESTADO DE MÉXICO, 2023**





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

Al Dr. José Andrés de la Cruz Rodríguez Galván por darme la oportunidad de realizar este proyecto, por enseñarme con paciencia, escuchar todas mis dudas, aconsejarme, guiarme y motivarme en cada paso.

Al Q.F.B. Oscar Josué Estudiante Manríquez por compartirme sus conocimientos que me ayudaron a sacar adelante este proyecto, por las risas y momentos compartidos que me llevaron a considerarlo un amigo.

A mi comité tutorial: Dr. Ignacio Peñalosa Castro, Dr. Ricardo Mejía Zepeda, Dr. Vladimir Bassiouk Evodokimenko y Dr. Israel Valencia Quiroz por tomarse el tiempo de revisar este trabajo.

A todos los miembros del laboratorio 8 de la Unidad de Biomedicina (UBIMED) de FES Iztacala por facilitarme el espacio y equipo para realizar el proyecto.

Gracias al laboratorio 5 de la UBIMED por permitirme el uso de su equipo, en especial a Ulises por enseñarme y apoyarme en su uso.

Al Dr. Alejandro Heredia Barbero del Instituto de Ciencias Nucleares por permitirme el uso de FT-IR, a la Dra. Margarita Rivera Hernández, al Dr. Carlos Magaña y al técnico Roberto Hernández del Laboratorio Central de Microscopia de Instituto de Física por su valioso apoyo en la obtención de las imágenes de SEM y TEM.

A mi mamá Edith Justina Sánchez Arizmendi, por su esfuerzo para proporcionarme todas las herramientas necesarias para culminar esta etapa de mi vida, por inspirarme para no rendirme y apoyarme con mucho amor, sin ella no hubiera sido posible.

A mis amigas Alejandra y Joselyn por quedarse a mi lado estos años y hacer de la facultad una experiencia bonita, por sus palabras de aliento, risas y momentos compartidos.

Esta tesis se realizó con el apoyo de la Universidad Nacional Autónoma de México mediante el proyecto DGAPA- IA20452.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	VI
RESUMEN	VIII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. <i>Nanopartículas orgánicas vs inorgánicas en la entrega de fármacos y biomoléculas</i>	2
1.2. <i>Nanopartículas de Oro</i>	3
1.3. <i>AuNPs como vehículos no tóxicos de interés para la administración de fármacos</i> 4	
1.4. <i>Caracterización fisicoquímica de AuNPs multifuncionales y su importancia</i>	5
1.5. <i>Nanopartículas de Oro y su aplicación en tratamientos inmunológicos en Cáncer</i>	7
1.5.1. <i>Cáncer</i>	7
1.5.2. <i>Macrófagos asociados a tumores y su papel en el desarrollo y progresión del cáncer</i>	8
1.5.3. <i>Repolarización de TAM M2 a M1 como inmunoterapia contra el cáncer</i> ..	10
1.5.4. <i>Manosa como molécula direccionadora hacia TAM M2</i>	12
2. ANTECEDENTES	13
3. HIPÓTESIS.....	15
4. OBJETIVO GENERAL.....	16
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	17
6.1. <i>Adsorción del ácido lipoico a las AuNPs (AuNP-ALA)</i>	17
6.2. <i>Reacción del ácido lipoico con manosa (AuNP-ALA-MAN)</i>	17
6.3. <i>Comprobación de la formación del enlace amida entre el ácido lipoico con manosa</i>	18
6.4. <i>Carga del fármaco R848 mediante interacciones electrostáticas a AuNP-ALA y AuNP-ALA-MAN</i>	19
6.5. <i>Cuantificación de la cantidad de R848 cargado en AuNP-ALA y AuNP-ALA-MAN</i> 19	
6.6. <i>Carga del fármaco IMDQ mediante la formación de un enlace covalente de tipo amida a AuNP-ALA</i>	21
6.7. <i>Cuantificación de la cantidad de IMDQ cargado en AuNP-ALA</i>	21

6.8.	<i>Espectrofotometría UV-Visible (UV-Vis)</i>	23
6.9.	<i>Cálculo del número estimado de AuNPs</i>	23
6.10.	<i>Espectroscopía FT-IR</i>	23
6.11.	<i>Dispersión dinámica de luz (DLS), diámetro hidrodinámico y potencial Z</i>	24
6.12.	<i>Microscopía de efecto túnel (STM)</i>	24
6.13.	<i>Microscopía electrónica de barrido (SEM) y de transmisión (TEM)</i>	25
7.	RESULTADOS	26
7.1.	<i>Espectrofotometría de UV-Vis</i>	26
7.2.	<i>Estimación del porcentaje cargado de R848</i>	29
7.3.	<i>Estimación del porcentaje cargado de IMDQ</i>	31
7.4.	<i>Análisis por FT-IR</i>	33
7.5.	<i>Diámetro hidrodinámico y Potencial zeta</i>	37
7.6.	<i>Microscopía de efecto túnel (STM)</i>	40
7.7.	<i>Análisis por SEM y TEM</i>	42
8.	DISCUSIÓN	46
8.1.	<i>Adsorción del ácido lipoico en la superficie de las AuNPs</i>	46
8.2.	<i>Carga del fármaco R848 mediante interacciones electrostáticas a los sistemas AuNP-ALA incubados por diferentes tiempos con ALA</i>	47
8.3.	<i>Carga del fármaco IMDQ mediante un enlace covalente a los sistemas AuNP-ALA incubados por diferentes tiempos con ALA</i>	50
8.4.	<i>Incorporación de la manosa como molécula direccionadora específica al sistema AuNP-R848</i>	51
8.5.	<i>Análisis por microscopía de efecto túnel y microscopía electrónica de transmisión</i>	54
	CONCLUSIONES	56
	PERSPECTIVAS	56
	REFERENCIAS	57
	ANEXOS	69

LISTA DE ABREVIATURAS

ADCC: citotoxicidad dependiente de anticuerpos

AuNPs: nanopartículas de oro

DLS: dispersión dinámica de luz

EPR: efecto de permeabilidad y retención incrementada

FT-IR: espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier

HMGN1: proteína 1 de unión a nucleosomas del grupo de alta movilidad

IFN- γ : interferón- γ

IL: interleucina

IMDQ: iniquidad

LPS: lipopolisacárido

LSPR: resonancia de plasmón superficial localizada

LUNA: laboratorio universitario de nanotecnología ambiental

M1: macrófagos asociados a tumores activados clásicamente

M2: macrófagos asociados a tumores activados alternativamente

MME, CD206: receptor de manosa CD206

mV: milivoltios

NO: óxido de nitrógeno

NPs: nanopartículas

R-848: resiquimod

ROS: especies reactivas de oxígeno

Rpm: revoluciones por minuto

SEM: microscopía electrónica de barrido

SI: sistema inmunológico

STM: microscopía de efecto túnel

TAM: macrófagos asociados a tumores

TEM: microscopía electrónica de transmisión

Th2: células T auxiliares 2

TLR: receptor tipo toll

TME: microambiente tumoral

UNAM: Universidad Nacional Autónoma de México

UV-Vis: espectrofotometría UV-visible

RESUMEN

En los últimos años la aplicación de las nanopartículas de oro ha atraído gran atención en el área biomédica especialmente en el tratamiento de cáncer, debido a que son biocompatibles, tienen una gran relación superficie-volumen, se pueden sintetizar en diferentes formas y tamaños, son fáciles de caracterizar y su superficie puede ser modificada con compuestos con diferentes funciones. Uno de los mayores desafíos en el tratamiento del cáncer es la falta de selectividad de los fármacos hacia un tejido o tipo celular específico, lo que ocasiona baja biodisponibilidad en el sitio de acción y por ende efectividad terapéutica reducida y efectos adversos en otros órganos o tejidos; una estrategia prometedora para superar estos inconvenientes es la incorporación de nanovehículos que sean capaces de transportar al fármaco de forma selectiva hacia su sitio de acción. Por ello, el objetivo de este trabajo fue desarrollar y caracterizar nanosistemas de nanopartículas de oro conjugadas con ácido lipoico (ALA) que fueran capaces de conjugarse con fármacos derivados de imidazoquinolina a partir de dos estrategias, una no covalente que integró al resiquimod (R848) y otra covalente con el Imiquimod (IMDQ), ambos fármacos son conocidos por ser potentes inmunoestimuladores capaces de transformar macrófagos asociados a tumores (TAM) con actividad protumoral (M2) a uno antitumoral (M1). Así mismo se añadió el monosacárido manosa (MAN) como molécula direccionadora hacia TAM M2 a los sistemas que integran R848, ya que fueron los más estables. Los resultados mostraron que el sistema final AuNP-MAN-R848 fue estable y presentaba la mayor eficiencia de carga del fármaco (22.47%) cuando las nanopartículas de oro fueron incubadas con ALA durante 48h. Se espera el sistema pueda ser probado en análisis *in vitro* e *in vivo*.

1. INTRODUCCIÓN

La nanotecnología es un nuevo campo de investigación multidisciplinario en el cual se miden, sintetizan, modelan, manipulan, utilizan o incorporan materiales y componentes en la escala nanométrica (1-100 nm), tomando ventaja de las diferencias en el comportamiento de los materiales a esta escala, comparado a escalas mayores con la finalidad de obtener un desempeño funcional (Ramsden, 2016). Debido a esto, en los últimos años se ha explorado su aplicación en el desarrollo de nuevos tratamientos para diferentes enfermedades (Wu & Li, 2013); especialmente en el área de investigación del cáncer (Kim, 2007).

Una desventaja de los tratamientos convencionales en cáncer es la falta de selectividad en la entrega de los compuestos terapéuticos hacia el tumor, lo que resulta en una biodisponibilidad y efectividad reducidas y efectos secundarios aumentados (Vizirianakis, 2011). Estas limitaciones e inconvenientes pueden superarse a partir de la elaboración de nanosistemas que puedan transportar al fármaco hacia el lugar de acción, lo protejan de la degradación, aumenten su concentración en sitios específicos, cuenten con nuevos sistemas para su liberación, e incluso que puedan combinar diferentes fármacos y biomoléculas en un solo agente terapéutico (Surendiran *et al.*, 2009).

Actualmente, el uso de nanopartículas de oro (AuNPs) como nanovehículos para la entrega direccionada de fármacos es de gran interés, pues avances recientes en nanotecnología han demostrado que tienen un gran potencial como transportadores debido a sus tamaños pequeños, y propiedades fisicoquímicas y biológicas únicas (Wilczewska *et al.*, 2012).

Por ello, el presente trabajo se centra en el desarrollo y caracterización de nanosistemas basados en AuNPs conjugadas con ácido lipoico (ALA), manosa (MAN) y dos

tipos de fármacos derivados de imidazoquinolina, utilizando estrategias de acoplamiento tanto covalentes como no covalentes. Tanto Resiquimod (R848) como Imiquimod (IMDQ), son fármacos conocidos por su capacidad para modificar la respuesta inmune, particularmente transformando los macrófagos asociados a tumores (TAM, por sus siglas en inglés) de un fenotipo protumoral o M2 a uno antitumoral o M1. Por otro lado, la manosa (MAN) actúa como una molécula direccionadora hacia TAM M2 ya que éstos se caracterizan por expresar al alza los receptores de manosa CD206.

Los resultados preliminares indican que los nanosistemas que contienen R848 resultaron en una mayor estabilidad y eficiencia de carga del fármaco, además el sistema AuNP-MAN-R848 es particularmente prometedor, mostrando una alta eficiencia de carga del fármaco cuando las AuNPs se incuban con ALA por 48 h.

Esta investigación representa un paso significativo hacia el desarrollo de tratamientos contra el cáncer más efectivos y seguros, ya que los nanosistemas basados en AuNPs presentan un potencial considerable para la entrega selectiva de fármacos, lo que podría transformar el panorama del tratamiento del cáncer. El éxito de estos sistemas en estudios *in vitro* e *in vivo* podría abrir nuevos caminos en la terapia oncológica, proporcionando una plataforma para el desarrollo de tratamientos más precisos y menos tóxicos.

1.1. Nanopartículas orgánicas vs inorgánicas en la entrega de fármacos y biomoléculas

Los diferentes tipos de NPs desarrolladas hasta la fecha pueden ser clasificadas en nanosistemas puramente orgánicos o inorgánicos, sin embargo, las NPs inorgánicas en general requieren un recubrimiento superficial orgánico para garantizar su estabilidad coloidal en condiciones fisiológicas (Wuttke *et al.*, 2017).

Las NPs orgánicas como liposomas y micelas, han sido bastante exitosas en la entrega de medicamentos, sin embargo, han presentado diferentes inconvenientes como poca estabilidad química, una velocidad de liberación de fármacos no adecuada para una aplicación específica y los efectos secundarios de los disolventes orgánicos que son utilizados para su preparación (Paul & Sharma, 2010).

En contraparte, las NPs inorgánicas que incluyen aquellas basadas en óxidos metálicos (óxido de hierro, óxido de cerio, dióxido de titanio, etc.) o metales nobles (oro y plata); han presentado múltiples ventajas como aumento de la estabilidad, alta capacidad de transporte, facilidad para incorporar sustancias hidrofílicas e hidrofóbicas, y además sus diseños pueden permitir la liberación controlada de fármacos, lo que resulta en una reducción de la toxicidad del fármaco, mayor biodisponibilidad, y disminución en la frecuencia de dosificación (Tonga *et al.*, 2014; De Jong, & Borm, 2008; Fadeel, & Garcia-Bennett, 2010).

1.2. Nanopartículas de Oro

Entre las diferentes NPs metálicas, las nanopartículas de oro (AuNPs) son las más estudiadas y exitosas debido a 4 razones principales (i) su gran relación superficie-volumen, ya que al haber un mayor número de átomos en la superficie de las AuNPs, éstas suelen ser químicamente más reactivas, pues tienen una superficie (funcional) relativamente más grande, (ii) la posibilidad de mejorar su estabilidad química y física a partir de la adsorción de diferentes monocapas orgánicas en su superficie que resulta en su biocompatibilidad, (iii) su resonancia de plasmón superficial localizada (LSPR, por sus siglas en inglés) única, que puede ser medida utilizando un espectrofotómetro de absorción UV-Vis, ya que induce una fuerte absorción de luz incidente; cuya intensidad y longitud de onda depende de factores

que afectan la densidad de carga de los electrones que están en la superficie de las AuNPs tales como: su tamaño, forma, composición, etc. y por último (iv) su efecto de permeabilidad y retención aumentada (EPR, por sus siglas en inglés), que tiene especial importancia para el desarrollo de tratamientos en cáncer, ya que al funcionalizar las AuNPs con fármacos, estos son capaces de permanecer una mayor cantidad de tiempo en y además, debido a que la vasculatura de los tumores sólidos se caracteriza por presentar brechas en su revestimiento endotelial, que van de uno a cientos de nanómetros, las AuNPs son capaces de extravasarse preferentemente hacia el microambiente tumoral (TME, por sus siglas en inglés), y posteriormente quedar ahí retenidas debido a que los vasos linfáticos del tumor son anatómica y funcionalmente aberrantes (Amendola *et al.*, 2017; Wuttke *et al.*, 2017; Huang & El-Sayed., 2010; Gao *et al.*, 2021; Iyer, *et al.*, 2006).

1.3. AuNPs como vehículos no tóxicos de interés para la administración de fármacos

En años recientes se ha demostrado que las AuNPs son capaces de administrar fármacos en forma tópica ya que pueden alcanzar la capa más profunda de la piel e interactuar con la membrana celular, así mismo se ha reportado que son capaces de acumularse en sitios tumorales, sin embargo, su extravasación hacia el tumor depende en gran medida de su morfología superficial, tamaño y forma (Gupta & Rai, 2017; Sridhar *et al.*, 2018).

Debido a que la utilidad de las AuNPs depende en gran medida de su citotoxicidad, diversos estudios han demostrado que ésta última se relaciona estrechamente con el tamaño, forma, carga superficial y los grupos funcionales adheridos a ellas (Peng & Liang, 2019), por ello, con la finalidad de mejorar su desempeño éstas generalmente son modificadas con

monocapas orgánicas que se forman a partir de la adsorción de moléculas ligando sobre su superficie (Peng *et al.*, 2017).

Las moléculas unidas a la superficie de las AuNPs pueden desempeñar simultáneamente varias funciones esenciales, como (i) actuar como ligando estabilizador al impedir o reducir la aglomeración y mejorar la dispersión de las AuNPs en solución de tal forma que sus propiedades ópticas y electrónicas no se vean tan afectadas, (ii) protección en soluciones acuosas, al reducir la adsorción no específica y protegiendo su biocompatibilidad lo que es fundamental para su uso como agentes terapéuticos, (iii) posibilitan más pasos de funcionalización con biomoléculas y/o fármacos ya que pueden funcionar como moléculas conectoras y (iv) preservan el tamaño del núcleo principal, lo que permite retener su tamaño en condiciones *in vitro* e *in vivo* (Turcu *et al.*, 2017; Sridhar *et al.*, 2018).

1.4. Caracterización fisicoquímica de AuNPs multifuncionales y su importancia

Cuando las nanopartículas se unen con grupos orgánicos, es importante conocer si la funcionalización se llevó a cabo correctamente, la morfología del sistema resultante y su comportamiento en solución; para ello existen diferentes técnicas ampliamente utilizadas.

Una vez que las AuNPs han sido funcionalizadas es necesario conocer la cantidad de grupos funcionales que se encuentran en la superficie de la NP y su disponibilidad para realizar las funciones que se espera cumplan, para esto se utilizan técnicas como el análisis termogravimétrico (TGA, por sus siglas en inglés) que permite determinar la pureza de las NPs y la presencia y cantidad de cualquier recubrimiento superficial, ya que en ésta técnica se puede cuantificar la pérdida de peso de una muestra de AuNPs funcionalizadas cuando esta se calienta de forma controlada, pues la disminución del peso se debe a la degradación

de la cubierta por efecto de la temperatura. Así mismo, la espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR, por sus siglas en inglés) es útil para identificar la presencia o ausencia de grupos funcionales en una determinada muestra y la espectroscopía UV-visible (UV-Vis, por sus siglas en inglés), para la cuantificación de las moléculas adsorbidas en la superficie de la AuNPs (Lindfors *et al.*,2004; Mansfield *et al.*,2014; Mohrig, J. R. 2010).

La caracterización morfológica de los sistemas resultantes se realiza más comúnmente por espectroscopía UV-visible, ya que debido al LSPR se puede conocer el tamaño y forma de la AuNP dependiendo del rango de la longitud de onda donde se encuentre el pico máximo de absorción (Zhou *et al.*, 2015); y por microscopía electrónica de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés) y/o microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés) que permiten visualizar directamente los núcleos de las nanopartículas modificadas, lo que es útil para determinar si la capa de revestimiento que se eligió fue la adecuada y cumple con funciones de protección y preservación del núcleo, así mismo, equipos modernos pueden realizar análisis y mapeo elemental, lo que desde el punto de vista toxicológico es útil, ya que se obtiene información sobre las propiedades estructurales de la superficie de las AuNPs (Chen *et al.*, 2005). Otra técnica que también proporciona información de la morfología es la microscopía de efecto túnel (STM, por sus siglas en inglés), que a diferencia de TEM y SEM, incluye las capas del ligando, lo que permite determinar el arreglo estructural superficial de todo el sistema, sin embargo, esta técnica presenta complicaciones al momento de obtener las imágenes debido a la curvatura pronunciada en las superficies de las AuNPs (Ong *et al.*, 2013).

Por último, el comportamiento en solución y nuevamente el tamaño se pueden determinar mediante diferentes técnicas, siendo las más comunes la dispersión dinámica de luz (DLS, por sus siglas en inglés) y el uso de TEM y/o SEM , dichas técnicas pueden

complementarse, pues por un lado TEM y SEM se basa en la observación de una pequeña fracción de las muestras secas y generalmente se observa el núcleo metálico y las cubiertas orgánicas son difíciles de observar, por lo tanto los resultados obtenidos pueden no reflejar el tamaño de las partículas y sus cubiertas, mientras que DLS si lo hace, pues los análisis se realizan en solución acuosa y el comportamiento de las partículas entre ellas también se verá reflejado en el tamaño analizado, en el DLS se hace uso de la variación temporal de la luz que es dispersada por las AuNPs suspendidas en una solución y proporciona información sobre los diámetros hidrodinámicos y su polidispersión; que es conveniente para la determinación de la citotoxicidad de las AuNPs pues con ello se puede saber si se encuentran solas o aglomeradas (Pecora, 2000). De igual forma, otro parámetro importante es el potencial zeta, el cual está dado por las cargas superficiales de los sistemas, y es un indicador importante de la estabilidad de las AuNPs en suspensión (Rasmussen *et al.*, 2020).

1.5. Nanopartículas de Oro y su aplicación en tratamientos inmunológicos en Cáncer

1.5.1. Cáncer

El cáncer es la segunda causa principal de mortalidad en el mundo, para el año 2020 se estimaron más de 18 millones de casos nuevos y 9 millones de muertes, mientras que, para México, entre los meses de enero y agosto del 2020 se registraron 60 421 defunciones causadas por tumores malignos (Jemal *et al.*, 2011; WHO, 2020; INEGI, 2021).

En términos generales se puede definir al cáncer como un conjunto de enfermedades altamente dinámicas, que varían a nivel tisular e individual, lo que ocasiona que su diagnóstico específico y eficacia de tratamiento aún sigan representando un desafío (M.D, R. W. R., 2007). Estas enfermedades se caracterizan por ser el producto de disfunciones en la

regulación del ciclo celular, de tal forma que las células afectadas, que normalmente morirían pueden progresar a lo largo del ciclo celular, acumulando mutaciones que favorecen la adquisición de diferentes capacidades que representan ventajas en crecimiento y supervivencia celular, tales como mantenimiento de la señalización proliferativa, evasión de supresores de crecimiento, resistencia a la muerte celular, inmortalidad replicativa, inducción de angiogénesis, y activación de invasión y metástasis (Story, 1998; Hanahan, & Weinberg, 2011).

Investigaciones recientes han demostrado que el microambiente tumoral (TME, por sus siglas en inglés) puede promover la aparición y desarrollo de los tumores ya que mejora la proliferación de células tumorales y su capacidad de invasión y migración, pues sus componentes celulares y estructurales permiten que las células cancerosas se vuelvan invasivas y se diseminen desde el sitio primario a ubicaciones más distantes, a través de complejas cascadas de múltiples pasos (Neophytou *et al.*, 2021).

Un signo importante del TME es la inflamación, ya que las células inmunitarias son su componente principal, de ellas entre el 30-50% son macrófagos infiltrados, conocidos como macrófagos asociados a tumores (TAM, por sus siglas en inglés) (Li *et al.*, 2022).

1.5.2. Macrófagos asociados a tumores y su papel en el desarrollo y progresión del cáncer

Los macrófagos son un grupo de células inmunitarias heterogéneas de gran plasticidad, importantes en la respuesta inmunitaria innata, adaptativa y en el mantenimiento de la homeóstasis del cuerpo (Cendrowicz *et al.*, 2021). Debido a su heterogeneidad, clásicamente han sido categorizados de forma dicotómica en dos fenotipos opuestos de

acuerdo con la forma en que han sido activados, por un lado, están los activados clásicamente o M1 y por el otro los activados alternativamente o M2 (Cendrowicz *et al.*, 2021).

El interferón- γ (IFN- γ), lipopolisacárido (LPS) y agonistas del receptor tipo toll (TLR) pueden inducir a los macrófagos a diferenciarse en M1; que se caracterizan por tener una alta expresión de Interleucina-12 (IL-12), baja expresión de IL-10 y estar involucrados principalmente en la respuesta inflamatoria e inmunidad tumoral, ya que son capaces de mediar la citotoxicidad en células tumorales, por ello también son conocidos como macrófagos antitumorales o “buenos” (Yang & Zhang., 2017; Feng *et al.*, 2022; Pan *et al.*, 2020).

Bajo la inducción de IL-4, IL-10 e IL-13, secretadas por células T auxiliares 2 (Th2), los macrófagos pueden ser inducidos alternativamente a un fenotipo M2 caracterizados por tener baja expresión de IL-12, alta expresión de IL-10 y tener actividades antiinflamatorias y promotoras de tumores, ya que desempeñan un papel importante en la inmunidad humoral, cicatrización de heridas, remodelación de tejidos mediada por Th2 y angiogénesis, así mismo pueden suprimir respuestas inmunológicas adaptativas, por lo que se consideran macrófagos promotores de tumores o “malos” (Li *et al.*, 2022; Feng *et al.*, 2022).

Debido a que los precursores de los macrófagos infiltrados en tejidos inflamados son los monocitos de la médula ósea que penetran en los tejidos desde los vasos sanguíneos y posteriormente se diferencian dependiendo de las señales microambientales del tejido (Yang *et al.*, 2014), los TAM pueden presentar tanto fenotipos M1 como M2, pues su polarización está regulada por estímulos externos, como las citocinas liberadas en el TME por las células tumorales, por ello se cree que los TAM M1 tienen un rol antitumoral en las primeras etapas de la progresión tumoral, y que gradualmente se transforman a M2 que estimulan el crecimiento del tumor, por lo que el número de macrófagos M1 y M2 varía durante las

diferentes etapas de la progresión del cáncer, por lo tanto se considera que en la mayoría de tumores, una alta cantidad de M2 infiltrados está relacionada con un mal pronóstico del paciente y una baja tasa de supervivencia (Chanmee *et al.*, 2014; Mantovani *et al.*, 2006). Una herramienta útil para distinguir el fenotipo M2 del M1 es el receptor de manosa CD206 (MMR, CD206) ya que tiene una alta expresión en los TAM M2 que exhiben una fuerte actividad angiogénica e inmunosupresora (Feng *et al.*, 2022; Bolli *et al.*, 2021).

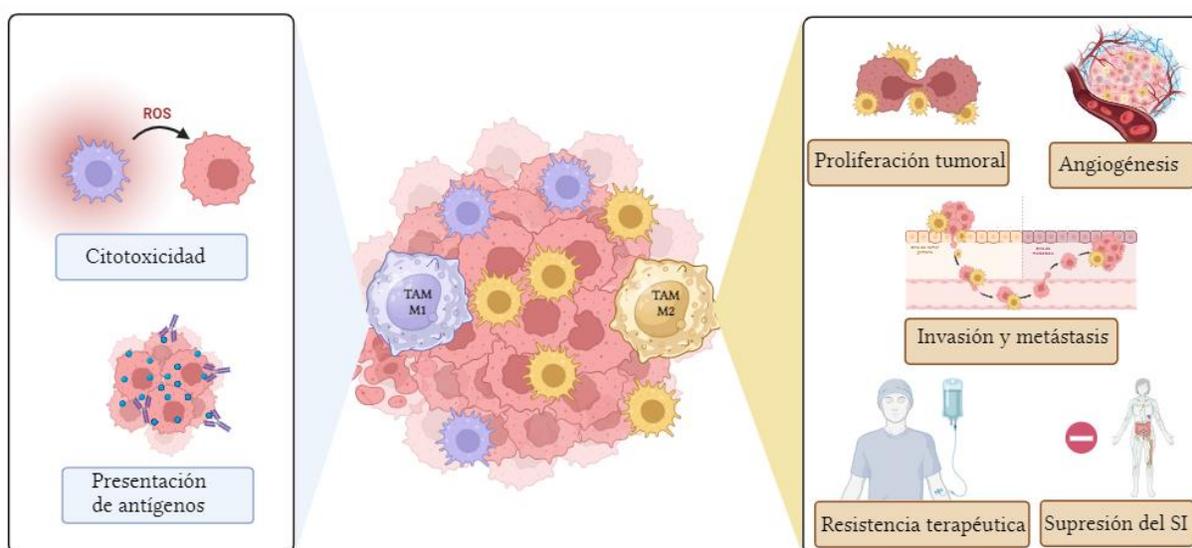


Figura 1. Rol de los TAM M1 y M2 en la progresión del cáncer (información tomada de Boutilier & Elswa (2021) y Pan *et al.* (2020). Creada con BioRender.com).

1.5.3. Repolarización de TAM M2 a M1 como inmunoterapia contra el cáncer

La inmunoterapia contra el cáncer tiene como objetivo activar las propias defensas del organismo con la finalidad de controlar o incluso curar dicha enfermedad, hasta la fecha se reporta que esta estrategia puede conducir a la supervivencia a largo plazo en hasta el 50 % de los pacientes con cáncer avanzado (Shao *et al.*, 2015).

Debido a la capacidad única de los macrófagos para modificar su fenotipo en respuesta a estímulos externos, la repolarización de TAM M2 a M1 se ha convertido en una estrategia prometedora (Kumari & Choi, 2022); pues los M1 tienen la capacidad de destruir células tumorales (Pan *et al.*, 2020). Los agonistas de los receptores tipo Toll (TLR), utilizados generalmente en tratamientos antivirales y antibacterianos por su promoción de la respuesta inmune, pueden inducir a los macrófagos a diferenciarse en M1. Entre los 13 TLR conocidos, TLR7 y TLR8 se expresan principalmente en las membranas de células del sistema inmunológico (SI) innato, entre ellas los macrófagos (Zhou *et al.*, 2022).

Entre los agonistas sintéticos de bajo peso molecular de los TLR, las imidazoquinolinas como el imiquimod (IMDQ, por sus siglas en inglés) y el resiquimod (R-848) son ligandos de los TLR 7 y 8 en humanos, que actúan imitando estructuralmente el ligando natural de estos receptores, que es el ARN monocatenario viral, tras su reconocimiento estimulan el factor nuclear kappa B (NF- κ B, por sus siglas en inglés) que a su vez desencadena la producción de citocinas y quimiocinas proinflamatorias, lo que los hace potentes estimuladores de macrófagos con fenotipo inflamatorio o M1 (Bolli *et al.*, 2021; Kauffman *et al.*, 2012).

Tanto IMDQ como R-848 actualmente se encuentran en el mercado como formulaciones de uso tópico, sin embargo, no son adecuados para una administración parenteral debido a la inflamación sistémica grave que causan debido a su rápida difusión desde el lugar de la inyección cuando se administra localmente, es decir, subcutánea o intramuscularmente, además debido a esto, su duración en el sistema es corta y sólo una pequeña dosis es capaz de llegar al sitio de tratamiento lo que disminuye su eficacia (Wang *et al.*, 2020). Este es un problema que se hace presente en diferentes tratamientos inmunoterapéuticos en cáncer, por lo que con la finalidad de reducir los efectos secundarios

y promover la eficacia de los tratamientos ha habido una serie de informes sobre el uso de nanopartículas para ayudar a la inmunoterapia contra el cáncer a través de la administración de moléculas inmunomoduladoras (Shao *et al.*, 2015).

1.5.4. Manosa como molécula direccionadora hacia TAM M2

El direccionamiento hacia los TAM M2 en la inmunoterapia contra el cáncer ha emergido como una estrategia prometedora en la ablación del cáncer, pues las diferencias fenotípicas de los TAM como la expresión diferencial de varios de sus receptores de superficie permite que sean células objetivo en terapias focalizadas, por ejemplo, el receptor de manosa CD206 que se encuentra sobreexpresado en los M2 (Debacker *et al.*, 2021). Por esta razón en el presente trabajo se funcionalizaron AuNPs con moléculas de MAN que permitieran su direccionamiento específico hacia TAM M2 con la finalidad de mejorar la biodisponibilidad del fármaco en el TME.

2. ANTECEDENTES

De forma general, hay pocos estudios en los que se incorporen imidazoquinolinas a NPs inorgánicas, o en los que los nanosistemas cargados con estos agonistas estén dirigidos a TAM a pesar de que han sido bastante exitosos.

Rodell *et al.* (2018) trabajaron con nanopartículas de ciclodextrina (CDNP) que combinaron con adamantino, lo que les permitió cargar a ellas el fármaco R848, obteniendo un sistema estable en solución acuosa y con administración dirigida a TAM, sus resultados demostraron que las interacciones entre las NPS y el fármaco limitaban la toxicidad sistémica y al mismo tiempo mantenían la especificidad terapéutica.

Mottas *et al.* (2019) utilizaron AuNPs de aproximadamente 5 nm recubiertas con una mezcla de 1-octanotiol y ácido 11-mercaptoundecanosulfónico para transportar R848 (AmpNP-R848) a los ganglios linfáticos encargados de drenar el tumor, concluyeron que las AmpNP-R848 inducían la activación inmunológica local fomentada por las células T citotóxicas, mejorando la eficacia antitumoral del fármaco en ratones portadores de tumores en comparación con la misma dosis de R848 libre, aumentó considerablemente la supervivencia de los ratones.

Por otro lado, Kockelmann *et al.* (2020) demostraron que la unión covalente de IMDQ a nanogeles poliméricos con base de polinorborneno degradables por pH ácido reduce drásticamente la inflamación sistémica de IMDQ, pero conserva su actividad inmunogénica en los tejidos tumorales y ganglios linfáticos de drenaje. Asimismo, Bolli *et al.* (2021) conjugaron el anticuerpo anti-MMR con IMDQ, para direccionar el fármaco hacia los TAM; la inyección intravenosa de estos conjugados resultó en una disminución significativa en el crecimiento del tumor, la repolarización de TAM hacia un fenotipo proinflamatorio y el incremento de la respuesta antitumoral de las células T.

En cuanto al uso de manosa como molécula direccionadora hacia TAM M2 Zang *et al.* (2019) desarrollaron un sistema para la entrega de microRNA basado en nanopartículas de fosfonato de calcio recubiertas de lípidos que contienen manosa conjugada y están protegidas estéricamente con un material sensible a pH que les permite responder a pHs bajos y exponer la manosa para promover la internalización celular en TAM y reprogramar sus funciones revertiendo el microambiente tumoral supresor. Igualmente, Dossou *et al.* 2023 reportaron nanopartículas de lipoproteínas de alta densidad (rHDL NPs) decoradas con DSPE-PEG-manosa (DPM) y cargadas con el agonista de los genes estimuladores de interferón (β y CXCL10) que a través de los restos de manosa, mejoraron la producción de interferón β y CXCL10 en los TAM M2 reeducándolos a un fenotipo M1 en comparación al fármaco libre y las NPs no manosiladas.

3. HIPÓTESIS

El uso de ácido lipoico como molécula ligando permitirá la unión covalente de moléculas de manosa así como la unión electrostática del fármaco R848 o la unión covalente del fármaco IMDQ en nanopartículas de oro, permitiendo la síntesis de nanomateriales híbridos con aplicaciones en cáncer.

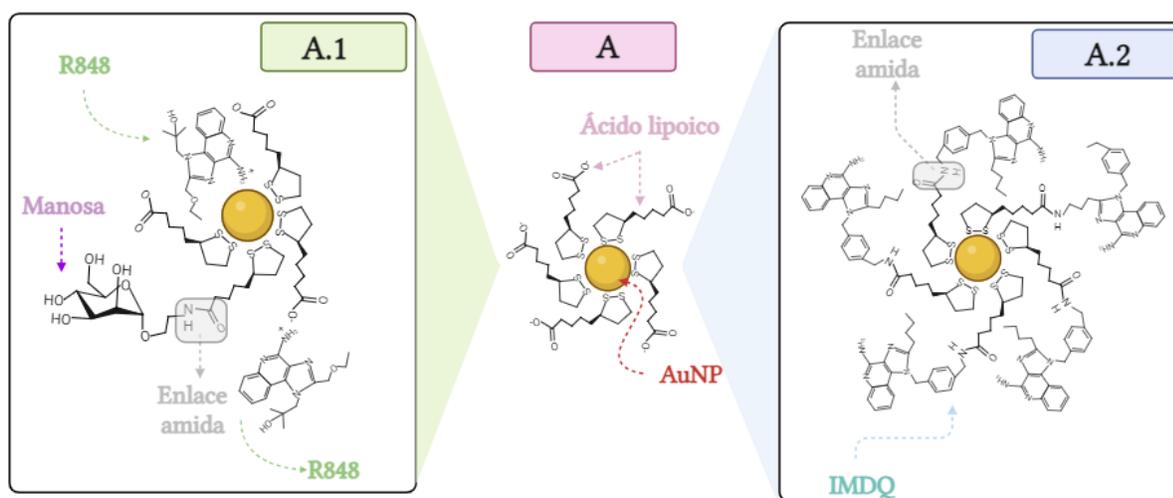


Figura 2. Esquema representativo del sistema A) AuNP-ALA y su posterior conjugación para formar los sistemas A.1) AuNP-MAN-R848 y A.2) AuNP-IMDQ (creado con BioRender.com).

4. OBJETIVO GENERAL

Desarrollo y caracterización fisicoquímica del sistema AuNP-ALA y de sus derivados AuNP-R848 AuNP-MAN, AuNP-MAN-R848 y AuNP-IMDQ para su posible aplicación en cáncer.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1** Funcionalización de AuNPs con ácido lipoico.
- 2** Unión covalente de manosa a AuNPs modificadas con ácido lipoico.
- 3** Unión no covalente de R848 a moléculas funcionalizadas con moléculas de manosa.
- 4** Unión covalente de IMDQ a AuNPs modificadas con ácido lipoico.
- 5** Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas funcionalizadas con manosa y el fármaco R848 o sólo con el fármaco IMDQ.

5.2 Espectroscopía UV-Vis.

5.3 Espectroscopía Infrarroja por transformada de Fourier.

5.4 Dispersión dinámica de luz.

5.5 Microscopía de efecto túnel.

5.6 Microscopía electrónica de barrido.

5.7 Microscopía electrónica de transmisión.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Adsorción del ácido lipoico a las AuNPs (AuNP-ALA).

Para llevar a cabo la adsorción del ácido lipoico a las nanopartículas de oro, primero se colocó 1 mL de AuNPs de 20 nm (Sigma-Aldrich, suspensión estabilizada en amortiguador de citrato) en un tubo Eppendorf. Para su primer lavado, se centrifugaron por 20 minutos a 11500 revoluciones por minuto (rpm) (Prism R™ Refrigerated MicroCentrifuge), se retiraron 900 µL de sobrenadante y se resuspendieron en 900 µL de agua desionizada a pH 11 (ajustada con NaOH 1M). Posteriormente se le realizaron 2 lavados más siguiendo el mismo procedimiento, entre cada lavado las AuNPs se sonicaron por 5 minutos a 50 mV. Al finalizar el tercer lavado se retiraron nuevamente 900 µL de sobrenadante, se agregaron 900 µL de agua desionizada a pH 11 y 100 µL de (S)-(-)- α -Ácido lipoico (Sigma 08561-10 MG) 10 mM (diluido en etanol anhidro), se colocó una mosca limpia y se dejó en agitación constante durante 4 tiempos diferentes (2 h, 24 h, 48 h y 72 h) a temperatura ambiente. Para detener la adsorción se centrifugaron por 20 min a 11500 rpm, se recuperó el sobrenadante para utilizarlo como blanco más adelante, posteriormente se lavaron con agua desionizada a pH 11 dos veces más; entre cada lavado fueron sonicadas por 5 minutos a 50 mV y al finalizar se resuspendieron en agua pH 11, pH 7 o pH 9 dependiendo de para qué iban a ser utilizadas posteriormente. Todo se realizó por triplicado.

6.2. Reacción del ácido lipoico con manosa (AuNP-ALA-MAN).

Para llevar a cabo la reacción entre el ácido lipoico y la manosa sólo se utilizaron aproximadamente el 5 % de los grupos carboxilos disponibles del ALA para unirse a la manosa formando un grupo amida. Para ello se agregaron 2 µL de Clorhidrato de N-(3-

Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida ([EDC] Sigma Aldrich) 10 mM (diluido en agua desionizada a pH 7) y 2.3 μ L de Clorhidrato de 2-Aminoetil-2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-manopiranosido ([Manosa-NH₂] Synthose, AM876) 10 mM (diluida en etanol anhidro) a 1 mL de AuNP-ALA (2 h, 24 h, 48 h y 72 h) suspendidas en agua desionizada a pH 7. Se dejó en agitación constante por 5 h, siendo sonicadas por 10 minutos cada 2 horas a 50 mV; al finalizar ese tiempo se lavaron en tres ocasiones como se describió previamente, se recuperó el sobrenadante, y se resuspendieron en 900 μ L de agua pH 7. Todo se realizó por triplicado para cada tiempo.

6.3. Comprobación de la formación del enlace amida entre el ácido lipoico con manosa.

Para comprobar que la reacción entre los grupos carboxílicos del ácido lipoico y los grupos amina de la manosa ocurrió y se formó un enlace amida, se agregaron 100 μ L de ALA 200 mM (diluido en etanol) a un tubo eppendorf, posteriormente se añadieron 10 μ L de EDC 400 mM (diluido en agua desionizada a pH 7) y 2 μ L de Manosa-NH₂ 230 mM, se dejó en agitación constante por 5h. Al finalizar se montaron las muestras por la técnica prueba de gota en una celda de cuarzo para su posterior análisis por FT-IR.

También se prepararon tres muestras de AuNP-ALA 48h, siguiendo el proceso previamente descrito, luego se llevó a cabo la reacción entre el ácido lipoico y la manosa en una relación 1/1 aproximadamente, formando el sistema AuNP-MAN, para ello se agregó a cada mililitro de AuNP-ALA en agua desionizada pH7 10 μ L de EDC 10 mM y 2 μ L de Manosa-NH₂ 230 mM, se dejó en agitación constante por 5 h, siendo sonicadas por 10 minutos cada 2 horas a 50 mV; al finalizar ese tiempo se lavaron 3 veces, al finalizar el último

lavado se retiró el sobrenadante y los concentrados se utilizaron para su posterior análisis en SEM, TEM y STM.

6.4. Carga del fármaco R848 mediante interacciones electrostáticas a AuNP-ALA y AuNP-ALA-MAN

Primero a 1 mL de AuNP-ALA (2 h, 24 h, 48 h y 72 h) y AuNP-ALA-MAN (48 h y 72 h) en agua pH 11 se les agregó 100 μ L de 4-Amino-2-(etoximetil)-alfa-4-, R-848, R848, S28463, Alfa-dimetil-1H-imidazo(4,5-c)quinolina-1-etanol (R848) (Sigma Aldrich, SML0196) 10 mM (diluido en etanol anhidro, previamente calentado) respectivamente, se dejaron en agitación constante por 24 horas cubiertas con papel aluminio, al finalizar ese tiempo se lavaron en una ocasión como se describió previamente, se recuperó el sobrenadante, y al finalizar se resuspendieron en agua pH 7. Todo se realizó por triplicado para cada tiempo.

6.5. Cuantificación de la cantidad de R848 cargado en AuNP-ALA y AuNP-ALA-MAN

Para determinar la cantidad de R848 que se unió a los sistemas AuNP-R848 (2 h, 24 h, 48 h y 72 h) y AuNP-MAN-R848 (48h y 72h) se utilizó como referencia la absorbancia de R848 a 327 nm, la cual se midió utilizando un lector de microplacas para absorbancia EPOCH (BioTek Instruments, Alemania).

Se preparó un stock de R848 10 mM en etanol anhidro previamente calentado, a continuación, se realizó una curva patrón del fármaco R848 por triplicado, tal y como se muestra en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Puntos de la curva patrón para cuantificar R848.

Concentración (mM)	Volumen Stock de R848 10 mM (μL)	Volumen de Etanol anhidro (μL)	Volumen de agua pH 11(μL)
0	0	180	820
0.02	2	178	820
0.04	4	176	820
0.08	8	172	820
0.12	12	168	820
0.2	20	160	820
0.8	80	100	820
1	100	80	820
1.4	140	40	820

Los sobrenadantes que se recuperaron previamente de la síntesis de los sistemas AuNP-ALA (2, 24, 48 y 72 h) y AuNP-MAN (48h y 72h) se usaron como blanco para leer los sobrenadantes de los sistemas AuNP-ALA-R848 y AuNP-MAN-R848, para ello con ayuda de una micropipeta se depositaron 100 μL de cada uno en una placa de 96 pocitos para posteriormente leer sus absorbancias a 327 nm.

El cálculo para obtener la eficiencia de carga del fármaco se realizó utilizando la siguiente fórmula:

$$Eficiencia\ de\ carga = \left(1 - \frac{Abs\ sobrenadante}{Abs\ total\ del\ fármaco}\right) \times 100\%$$

Ecuación 1 Fórmula para determinar la eficiencia de carga del fármaco en los nanosistemas (Tomado y modificado de Guo *et al.*, 2021).

Donde Abs del sobrenadante y Abs total del fármaco son las absorbancias a la longitud de onda máxima de absorción del fármaco probado en el sobrenadante y en la concentración añadida respectivamente (Guo *et al.*, 2021).

6.6. Carga del fármaco IMDQ mediante la formación de un enlace covalente de tipo amida a AuNP-ALA

Primero a 1 mL de AuNP-ALA (24 h, 48 h y 72 h) en agua a pH 9 se les agregaron 10 μ L de EDC 10mM y 25 μ L de 1-[4-(Aminometil)benzil]-2-butil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amina (IMDQ) (ChemSpider, 26361941) 5 mg/mL (diluido en dimetilsulfóxido, [DMSO]) respectivamente, se dejaron en agitación constante por 24 horas cubiertas con papel aluminio, al finalizar ese tiempo se lavaron en tres ocasiones como se describió previamente, pero se recuperó el primer sobrenadante, y al finalizar se resuspendieron en agua a pH 7. Todo se realizó por triplicado para cada tiempo.

6.7. Cuantificación de la cantidad de IMDQ cargado en AuNP-ALA

Para determinar la cantidad de IMDQ que se unió a los sistemas AuNP-IMDQ (24 h, 48 h y 72 h) se utilizó como referencia la absorbancia de IMDQ a 327 nm, la cual se midió

utilizando un lector de microplacas para absorbencia EPOCH (BioTek Instruments, Alemania).

Se preparó un stock de IMDQ 5 mg/mL en DMSO, luego se realizó una curva patrón del fármaco IMDQ por triplicado, tal y como se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 2. Puntos de la curva patrón para cuantificar IMDQ.

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Volumen Stock de IMDQ 5 mg/mL	Volumen de DMSO (μL)	Volumen de agua pH 9 (μL)
0	0	25	975
50	10	15	975
75	15	10	975
100	20	5	975
125	25	0	975

Los sobrenadantes que se recuperaron previamente de la síntesis de los sistemas AuNP-ALA (24 h, 48 h y 72 h) se usaron como blanco para leer los sobrenadantes del sistema AuNP-IMDQ. Con una micropipeta se depositaron 100 μL de cada uno en una placa de 96 pocitos para posteriormente leer sus absorbencias a 327 nm.

El cálculo para obtener la eficiencia de carga del fármaco se realizó utilizando la fórmula de la **Ecuación 1**.

6.8. Espectrofotometría UV-Visible (UV-Vis)

Para determinar la estabilidad de los sistemas finales, se analizaron los espectros UV-Vis por triplicado, utilizando un lector de microplacas para absorbaecia EPOCH, haciendo un barrido de 300-700 nm. Las AuNPs desnudas fueron utilizadas como grupo control.

6.9. Cálculo del número estimado de AuNPs

Se obtuvo la absorbencia a 450 nm de los diferentes grupos a analizar. Posteriormente, utilizando la siguiente ecuación se cuantificó la concentración (mol/L) de las nanopartículas.

$$c = A_{450} / \epsilon_{450}$$

Ecuación 2. Ecuación para cuantificar la concentración de NPs (mol/L).

Donde A_{450} es la absorbencia a 450 nm y ϵ_{450} el coeficiente de extinción molar (cm-1M-1) a $\lambda = 450$ nm para nanopartículas de oro de 20 nm (Tomado y modificado de Haiss *et al.*, 2007).

Posteriormente esa concentración fue utilizada para calcular el número estimado de AuNPs presentes en las muestras; se utilizó el número de Avogadro (6.022×10^{23} partículas/mol).

6.10. Espectroscopía FT-IR

Las muestras fueron preparadas 24 horas antes de su análisis. En diferentes portaobjetos se depositaron 100 μ L de concentrados, de cada uno de los sistemas en agua pH 11, mediante la técnica de prueba de gota y se dejaron secar a temperatura ambiente, dentro

de una caja Petri, para evitar su contaminación. Las muestras se analizaron en un espectrofotómetro FT-IR (PerkinElmer Spectrum 100, No. de serie 78890) en el Instituto de Ciencias Nucleares de la UNAM. Se realizaron dos mediciones de la misma muestra con una longitud de onda de 4000-600 cm^{-1} , 16 barridos y aplicando una presión al momento de analizar de 60.

6.11. *Dispersión dinámica de luz (DLS), diámetro hidrodinámico y potencial Z*

El diámetro hidrodinámico se determinó usando el equipo Zetasizer Analyzer 90 PLUS/BI-MAS (Brookhaven Instruments Corporation, U.S.A) en el Instituto Nacional de Cancerología (INCan). Para verificar el correcto funcionamiento del equipo se utilizó un estándar de referencia de nanoesferas de poliestireno 10 μL (Duke Scientific, U.S.A) suspendidas en aproximadamente 2 mL de KCl 10 mM, para el análisis de las diferentes muestras se colocaron 500 μL de cada una en celdas de acrílico y se completó el mililitro con 500 μL de KCl 1 mM (ajustado a pH 7 con NaOH 1 M).

El potencial Z se determinó, en el mismo equipo que el diámetro hidrodinámico, empleando un electrodo de paladio. La preparación de la muestra fue igual a la descrita para diámetro hidrodinámico.

6.12. *Microscopía de efecto túnel (STM)*

Se concentraron 1 mL de AuNP, AuNP-ALA (48H) y AuNP-MAN (48H) en agua pH11 en 100 μL y 24 horas antes del análisis en STM se colocó una gota de 20 μL sobre una base de grafito pirolítico altamente ordenado (HOPG) y se dejó secar durante 24 h a temperatura ambiente. Las muestras AuNP, AuNP-ALA (48H) y AuNP-MAN (48) se

observaron en el equipo easyScan E-STM (Nanosurf) en la Unidad de Biomedicina (UBIMED) de FES Iztacala. Su análisis se realizó en el programa Gwyddion 2.62.

6.13. Microscopía electrónica de barrido (SEM) y de transmisión (TEM)

Las muestras AuNP, AuNP-ALA (48h) y AuNP-MAN (48h) se observaron por microscopía electrónica de barrido (SEM) en el equipo Jeol-JSM 5600 y por microscopía electrónica de transmisión en el equipo Jeol-JEM2010 FEG, ambos ubicados en el laboratorio de microscopia del Instituto de Física de la UNAM. Su análisis se realizó en el programa ImageJ.

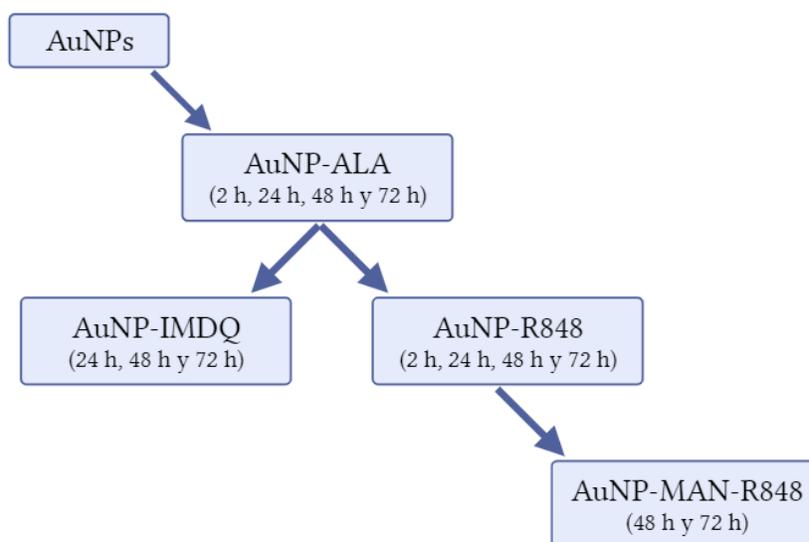


Figura 3. Diagrama de flujo del procedimiento que se siguió en la síntesis de los diferentes sistemas de estudio.

7. RESULTADOS

7.1. Espectrofotometría de UV-Vis

Se obtuvieron los espectros de absorción UV-Vis de las AuNPs desnudas, y de los sistemas AuNP-ALA (2 h, 24 h, 48 h y 72 h), AuNP-MAN (24 h y 48 h) AuNP-R848 (2 h, 24 h, 48 h y 72 h), AuNP- MAN-R848 (48 h y 72 h) y AuNP-IMDQ (24 h, 48 h y 72 h).

Tanto las AuNPs de 20 nm desnudas como los sistemas AuNP-ALA (2 h, 24 h, 48 h y 72 h), AuNP-MAN (24 h y 48 h), AuNP-R848 (2 h, 24 h, 48 h y 72 h) y AuNP- MAN-R848 (48 h y 72 h) presentaron el $\lambda_{\text{máx}}$ del pico del LSPR entre 520 y 522 nm (**Figura 4**). Particularmente en los sistemas AuNP-IMDQ (24 h, 48 h y 72 h) (**Figura 4D**) el $\lambda_{\text{máx}}$ se presentó un pequeño corrimiento hacia el rojo pues estuvo entre 525-529 nm.

Asimismo, en todos los sistemas conjugados (**Figura 4B, 4C, 4D, 4E y 4F**); se observa una disminución en la absorbancia, un ensanchamiento en el LSPR, y absorbancia alrededor de los 600 nm en el sistema AuNP-IMDQ. Con respecto a las amplificaciones de la zona de 310 a 340 nm se puede observar un pequeño espectro con una absorbancia máxima a 327 nm en los conjugados AuNP-R848, AuNP-MAN-R848 y AuNP-IMDQ (**Figura 4D, 4E y 4F**) que está ausente en los demás sistemas.

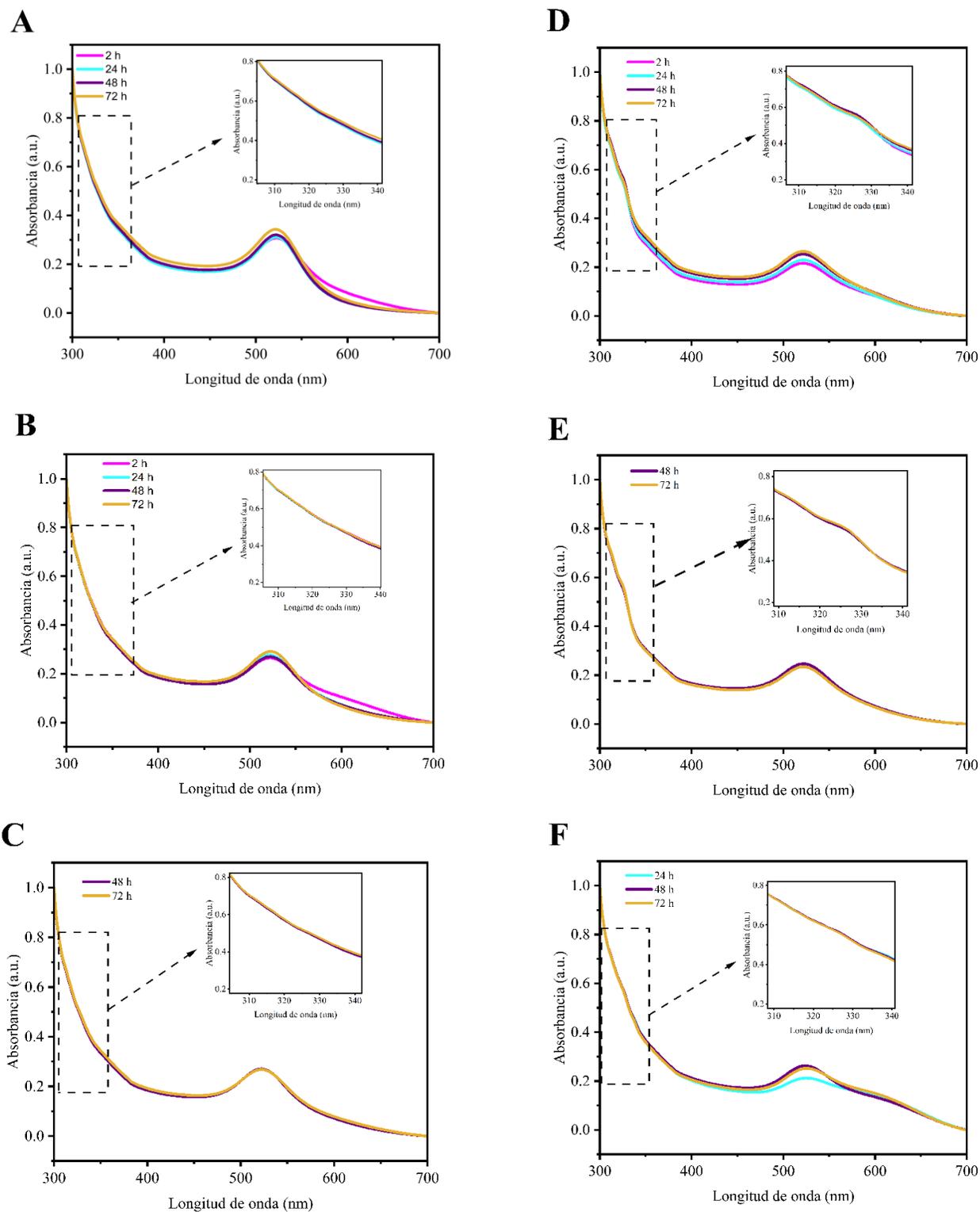


Figura 4. Espectros UV-Vis con su respectiva amplificación en la zona de 310-340 nm de **A)** AuNPs desnudas, **B)** AuNP-ALA- (2 h, 24 h, 48 h y 72 h), **C)** AuNP-MAN (48 h y 72 h), **D)** AuNP-R848 (2 h, 24 h, 48 h y 72 h), **E)** AuNP-MAN-R848 (48 h y 72 h) y **F)** AuNP-IMDQ (24 h, 48 h y 72h).

En el número de AuNPs estimado (**Tabla 3**) para cada grupo es visible la pérdida de material a lo largo de las diferentes síntesis.

Tabla 3. Número estimado de AuNPs desnudas y de los 5 diferentes grupos a evaluar con distintos tiempos de incubación con ALA.

	2 h	24 h	48 h	72 h
AuNP/mL	1.95E+11	1.89E+11	1.97E+11	2.14E+11
AuNP-ALA/mL	1.79E+11	1.83E+11	1.76E+11	1.87E+11
AuNP-MAN/mL	-----	-----	1.76E+11	1.82E+11
AuNP-ALA-R848/mL	1.44E+11	1.54E+11	1.69E+11	1.77E+11
AuNP-MAN-R848/mL	-----	-----	1.62E+11	1.55E+11
AuNP-IMDQ /mL	-----	1.76E+1	1.93E+11	1.85E+11

7.2. Estimación del porcentaje cargado de R848

Tanto el porcentaje de carga (**Tabla 4**) como la concentración de R848 que se adsorben a los diferentes grupos (**Figura 5B**) cambian de acuerdo con los tiempos de incubación de las AuNPs con ALA y el contenido de manosa.

Ya que de los grupos que únicamente fueron incubados con ALA, el tiempo de incubación de 2 h fue el que presentó una menor capacidad de carga del fármaco R848, mientras que los que presentaron una mayor capacidad de carga fueron los de 48 y 72 h, siendo el de 72 h el más alto, siendo esta la razón por la que se decidió añadir únicamente la manosa a estos dos últimos tiempos de incubación.

Después de modificar las nanopartículas con ALA con tiempos de incubación de 48 y 72 h con manosa (aproximadamente 5 %), se observó que la cantidad de fármaco que se cargó en los sistemas disminuyó en comparación a los grupos con esos mismos tiempos que únicamente contenían ALA (vea **Tabla 4** y **Figura 5B**). El tiempo de incubación con ALA de 48 h fue el que presentó mayor capacidad de carga (22.48%).

Tabla 4. Eficiencia de carga del fármaco R848 en los sistemas AuNP-ALA (2 h, 24 h, 48 h y 72 h) y AuNP-MAN 48 h y 72 h, (n=3).

	AuNP-ALA-R848	AuNP-MAN-R848
2 h	6.08 %	-
24 h	16.46 %	-
48 h	23.53 %	22.47 %
72 h	24.48 %	18.83 %

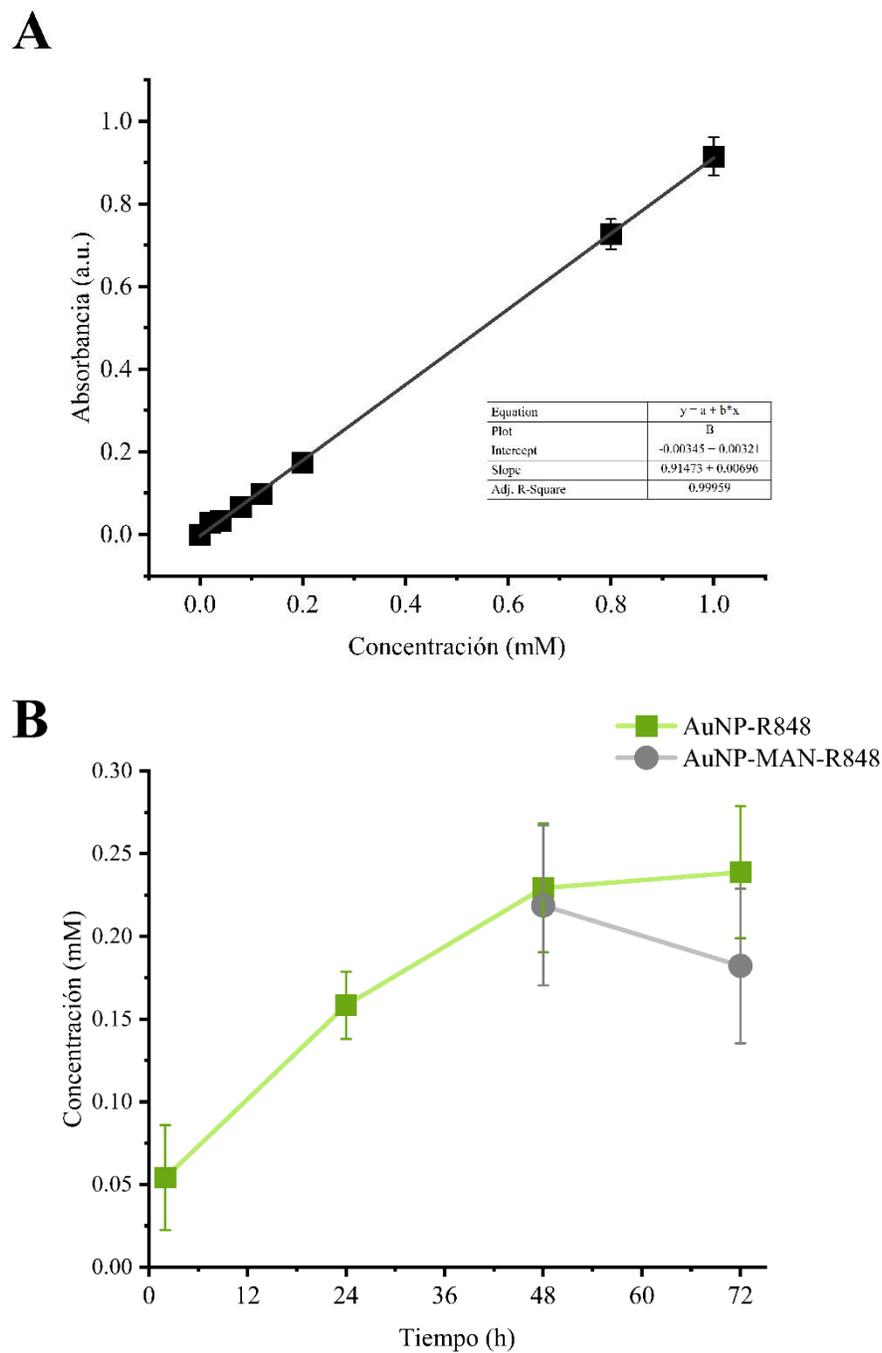


Figura 5. A) Curva patrón del fármaco R848 $r^2 = 0.99979$ ($n = 3$); **B)** Moléculas de R848 cargadas a AuNP-ALA (2 h, 24 h, 48 h y 72 h) y AuNP-MAN (48 h y 72 h) ($n=3$).

7.3. Estimación del porcentaje cargado de IMDQ

El porcentaje de carga (**Tabla 5**) y la concentración de IMDQ unida a los diferentes sistemas de AuNP-ALA (**Figura 6B**) varió proporcionalmente de acuerdo con los tiempos de incubación de las AuNPs con ALA (24 h, 48 h y 72 h), ya que, a mayor tiempo de incubación con ALA, fue mayor la carga de IMDQ.

Tabla 5. Eficiencia de carga del fármaco IMDQ en el sistema AuNP-ALA (24 h, 48 h y 72 h), (n=3).

	AuNP-IMDQ
24 h	58.85%
48 h	61.91 %
72 h	67.77 %

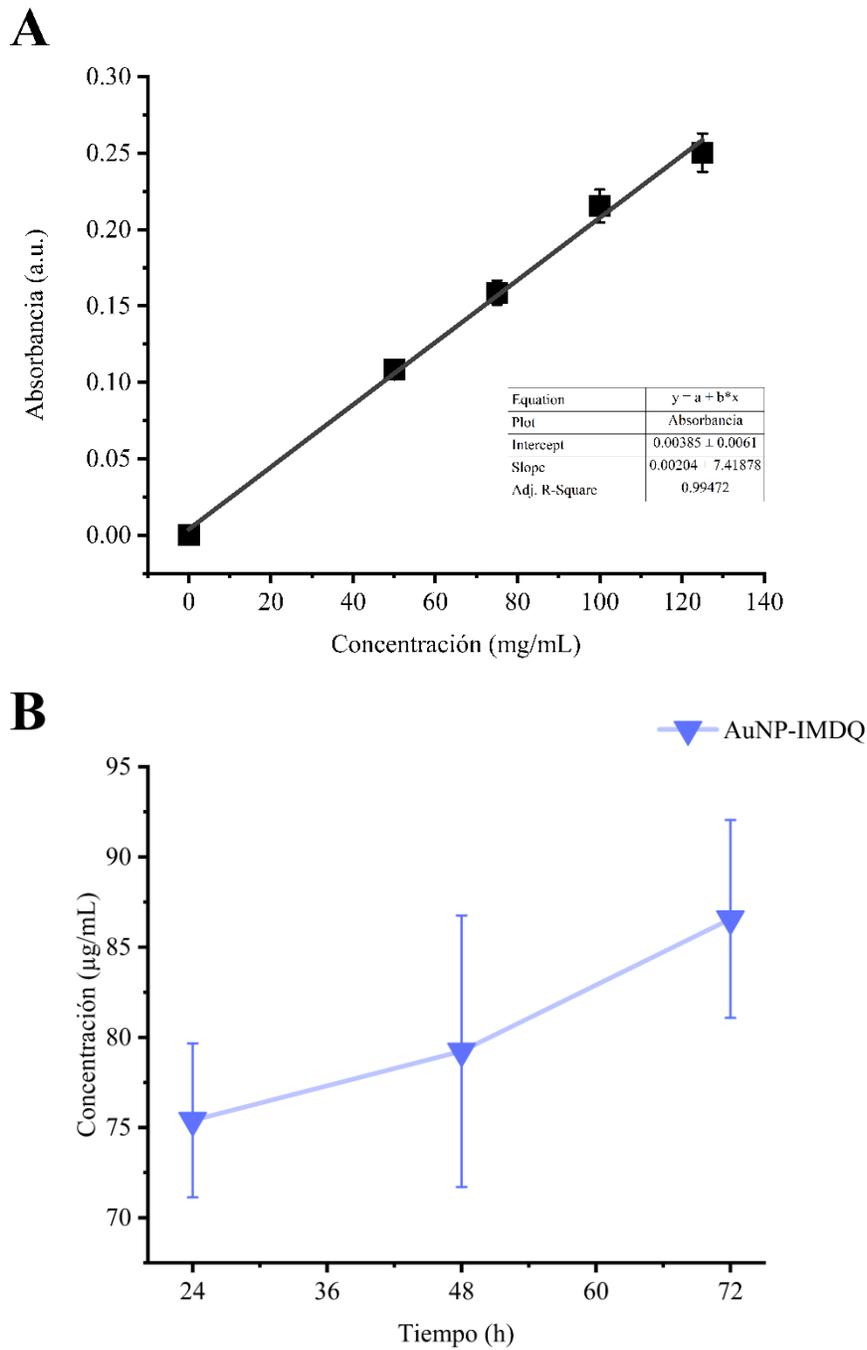


Figura 6. A) Curva patrón del fármaco IMDQ $r^2 = 0.99472$ ($n = 3$) **B)** Concentraciones de IMDQ cargadas a AuNP-ALA (24 h, 48 h y 72 h) ($n = 3$).

7.4. Análisis por FT-IR

Las bandas de los espectros se asignaron de acuerdo con las tablas de Mohrig, J. R. (2010) y a las tablas de espectros infrarrojos de Sigma Aldrich.

En los espectros de ALA y AuNP-ALA incubadas por 48 h (**Figura 7A**) se pueden observar bandas en 1700 y 1720 cm^{-1} (C = O), 2920 y 2891 cm^{-1} (O-H) 1412 y 1406 cm^{-1} (C-O) que fueron asignadas a los enlaces de estiramiento de los grupos carboxilo y las bandas en 2500 y 1500 cm^{-1} se asignaron a los enlaces de estiramiento y flexión de su cadena de alcanos (C-H).

En la molécula de manosa y en la reacción entre el ALA y la MAN (**Figura 7B**) se encuentran similitudes en las banda que cae entre 3500-3200 cm^{-1} asignada al enlace de estiramiento del grupo hidroxilo (O-H) ya que la molécula de manosa-NH₂ utilizada es rica en grupos hidroxilo y también podría encontrarse hidratada, así mismo esta banda entre 3500-3180 cm^{-1} corresponde al enlace amina de estiramiento (N-H) de la molécula de manosa y además entre 3500-3150 cm^{-1} pertenece al enlace de estiramiento de amida secundaria (N-H) que es el resultado de la formación del enlace entre el ALA y la MAN; las bandas de 2930 y 2928 cm^{-1} corresponden a los enlaces de estiramiento de los alcanos, las bandas de 1425, 1490 y 1340 cm^{-1} de flexión (C-H) y las bandas de 1060 y 1026 cm^{-1} (C-O) fueron asignadas a los enlaces de estiramiento de los anillos piranósicos. La principal diferencia entre ambos espectros es la banda que cae en 1650 cm^{-1} (C=O) de estiramiento en la reacción ALA-MAN, característico de las amidas y como sólo cae un pico se puede interpretar que es una amida secundaria. Por otro lado, la banda en 1750 cm^{-1} de estiramiento (C-O) en la manosa corresponde al grupo anhídrido del etanol en el que se encuentra diluida.

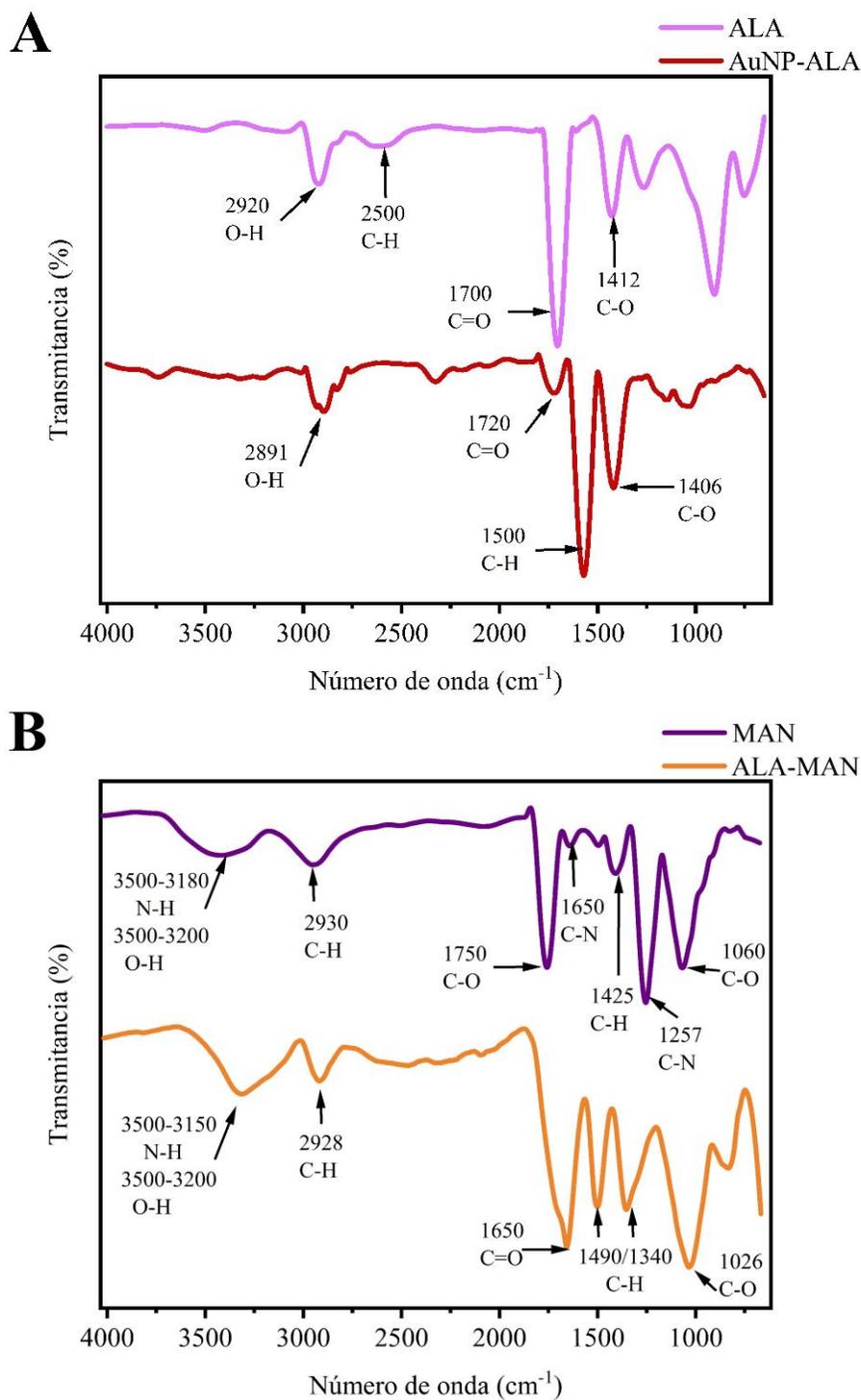


Figura 7. Espectros infrarrojos por transformada de Fourier (FT-IR) de **A**) las moléculas de ALA y AuNP-ALA incubadas por 48 h y **B**) moléculas de manosa-NH₂ (MAN) diluidas en etanol anhidro y su reacción con moléculas de ácido lipoico (ALA).

Los espectros de ambos fármacos también son bastante similares pues ambos son imidazoquinolinas (**Figura 8A y 8B**). Sus bandas similares son las que caen entre 3500-3180 cm^{-1} que corresponden al enlace de estiramiento de las aminas que contienen (N-H), las bandas entre 3100-3000 cm^{-1} (C-H), 1630-1600 cm^{-1} (C=C) ambos de estiramiento y 760-6085 cm^{-1} (C-H) de flexión de los compuestos aromáticos, los enlaces de estiramiento de 2946-2862 cm^{-1} (C-H) y de flexión de 1398-1377 cm^{-1} (C-H) corresponden a los alcanos. Sus diferencias son claramente observables, pues el R848 tiene bandas en 1000 y 1070 cm^{-1} (C-O) y 3550-3200 cm^{-1} (OH) que corresponden a los enlaces de estiramiento del grupo hidroxilo presente en su estructura. Por otro lado el IMDQ tiene bandas que caen en 1300-1266 cm^{-1} (N-H) y 1030-1015 cm^{-1} (C-N) de estiramiento que pertenecen a una amina aromática, mientras que en el espectro de AuNP-IMDQ adicionalmente se puede notar una banda en 800 cm^{-1} que corresponde a un compuesto aromático con dos grupos R, y finalmente también se ve la presencia en 1700 cm^{-1} (C=O) del enlace estiramiento característico de las amidas, que demuestra que IMDQ se unió covalentemente al ácido lipoico formando un enlace tipo amida.

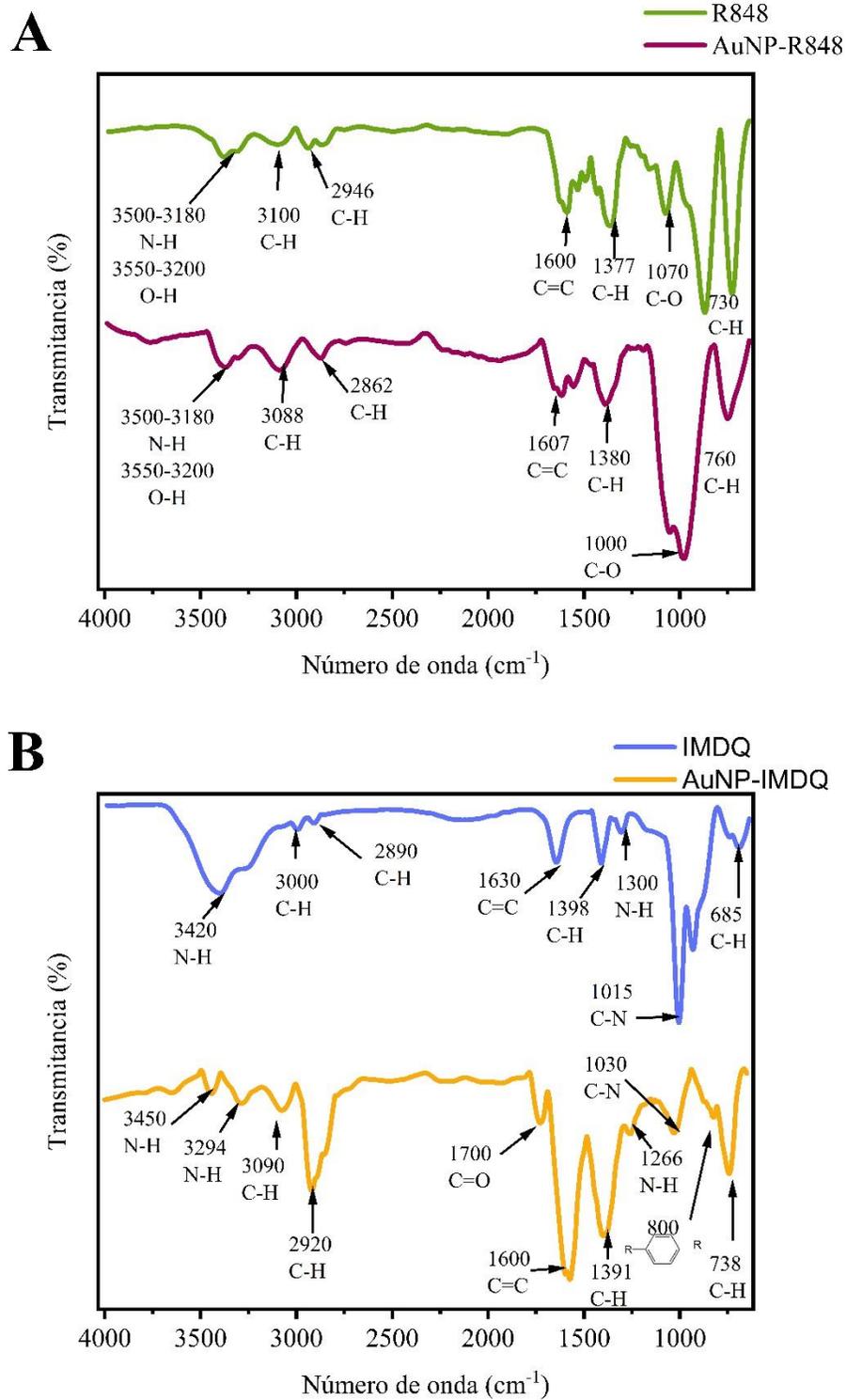


Figura 8. Espectros infrarrojos por transformada de Fourier (FT-IR) de **A)** moléculas de R848 diluidas en etanol anhidrido y AuNP-R848 incubadas con ALA por 48h y **B)** moléculas de IMDQ diluido en DMSO AuNP-IMDQ incubadas con ALA por 48 h.

7.5. Diámetro hidrodinámico y Potencial zeta

El análisis del potencial Z y diámetro hidrodinámico únicamente se llevó a cabo en las AuNP y en los sistemas AuNP-ALA, AuNP-R848 y AuNP-MAN-R848 que fueron los más estables.

Por un lado, los análisis de diámetro hidrodinámico (**Figura 9**), muestran que las AuNPs tienen un diámetro de aproximadamente 30 nm y después de la adsorción del ALA se observa un incremento en el tamaño de las nanopartículas de aproximadamente 30 nm para las incubadas 48 h y de ~ 60 nm para las de 72 h, posterior a la adición del fármaco o de la manosa y el fármaco hay un incremento en el tamaño para ambos tiempos, siendo el de 48 h de ~ 50 nm y ~ 140 nm para el de 72 h, así mismo se puede notar que las AuNP-R848 (48 y 72 h) son sutilmente más grandes que las AuNP-MAN-R848 (48 y 72 h), no obstante las desviaciones estándar para ambos grupos en el tiempo de incubación con ALA de 72 h son muy grandes, lo que indica que los valores están muy dispersos. Los valores de polidispersión (**Figura 9**) en ambos tiempos (48 y 72 h) para los grupos AuNP-ALA, AuNP-ALA-R848 y AuNP-MAN-R848 fueron mayores a 1.0, por ello se puede pensar que existen poblaciones de diferentes tamaños y por lo cual las AuNPs podrían estar formando agregados.

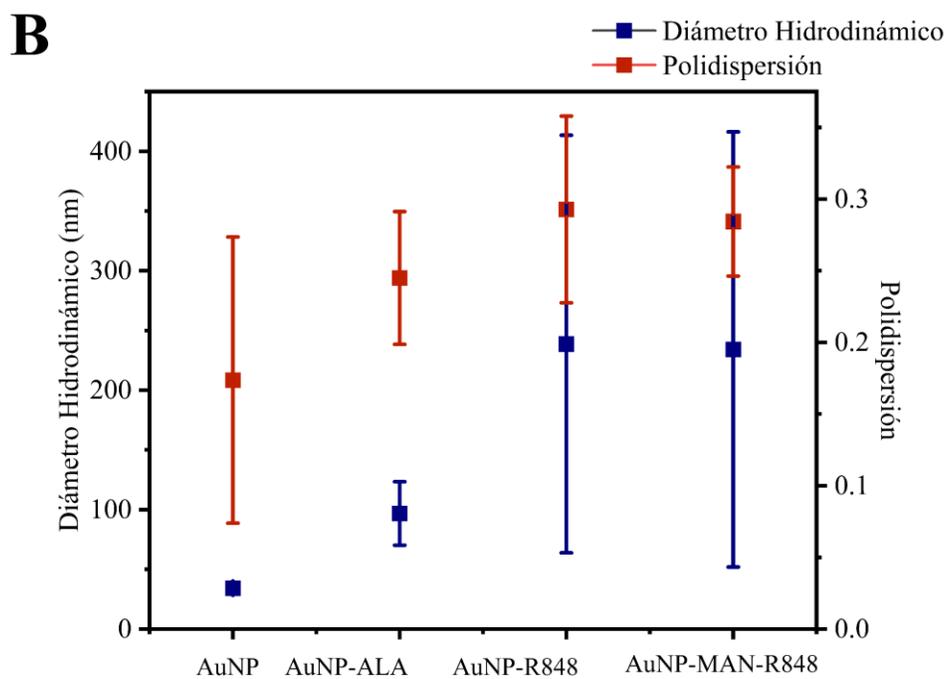
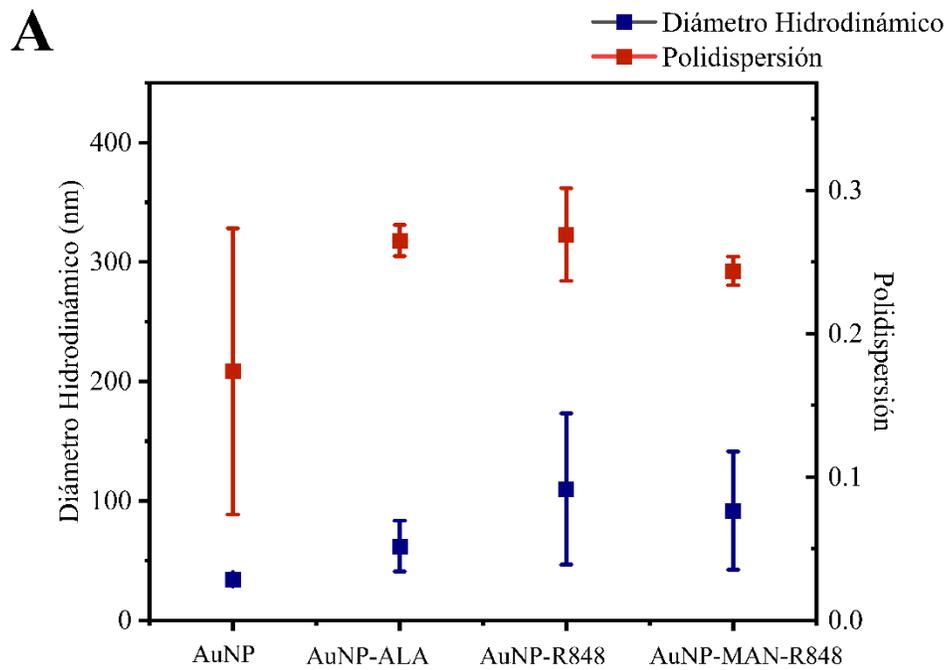


Figura 9. Diámetro Hidrodinámico (n=3) de **A)** AuNPs desnudas, con su posterior adsorción de ALA incubado por 48 h y su seguimiento hasta la incubación con R848 o R848 y MAN. **B)** AuNPs desnudas, con su posterior adsorción de ALA incubado por 72 h y su seguimiento hasta la incubación con R848 o R848 y MAN.

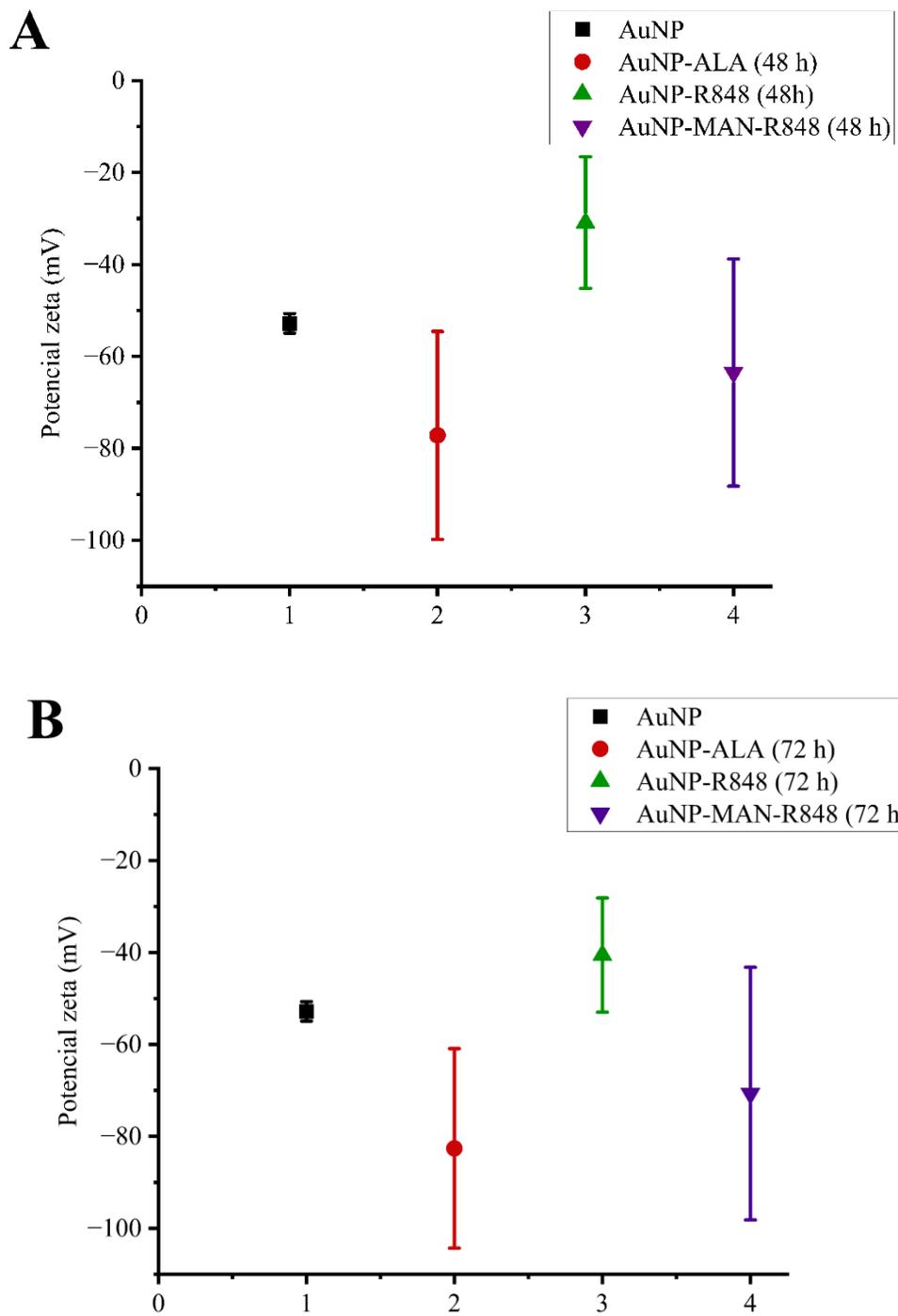


Figura 10. Potencial Z (n=3) de **A)** AuNPs desnudas, con su posterior adsorción de ALA incubado por 48 h y su seguimiento hasta la incubación con R848 o R848 y MAN. **B)** AuNPs desnudas, con su posterior adsorción de ALA incubado por 72 h y su seguimiento hasta la incubación con R848 o R848 y MAN.

El potencial zeta (**Figura 10**), muestra que las AuNPs desnudas tienen una carga superficial de aproximadamente -54 mV y después de la adsorción del ALA en los tiempos de incubación de 48h y 72h se vuelven más negativos a -77 y -82 mV respectivamente, posteriormente cuando se añade únicamente el fármaco se vuelven menos negativos en ambos tiempos llegando a -30 y -40 mV, así mismo cuando se añade la manosa y el fármaco también se vuelven menos electronegativos que cuando sólo tienen el ALA, sin embargo son más negativos que cuando únicamente tienen el fármaco, pues sus potenciales son de -63 mV para 48h y -70 mV para 72h.

7.6. Microscopía de efecto túnel (STM).

En el análisis de STM se observó que tanto las AuNPs desnudas, como las AuNP-ALA y AuNP-MAN (**Figura 11**) exhiben un empaquetamiento denso, sin embargo, hay bordes evidentes entre ellas y presentan una forma de elipse característica de las AuNPs cuando éstas se encuentran sobre superficies planas para ser visualizadas por STM (Rodríguez-Galván *et al.*, 2023). El análisis de la sección transversal mostró que las AuNPs desnudas (**Figura 11B**) tienen diámetros entre 18 y 20 nm, en tanto las que contienen ALA (**Figura 11D**) y ALA-MAN (**Figura 11F**) incrementaron su tamaño, por un lado, las AuNP-ALA van de los 22 a los 25 nm y por otro las AuNP-MAN miden ~ 25 nm.

Así mismo los análisis de la sección transversal mostraron que las AuNPs desnudas, las AuNP-ALA y AuNP-MAN no tienen una superficie lisa, lo cual está relacionado con las moléculas adsorbidas a su superficie.

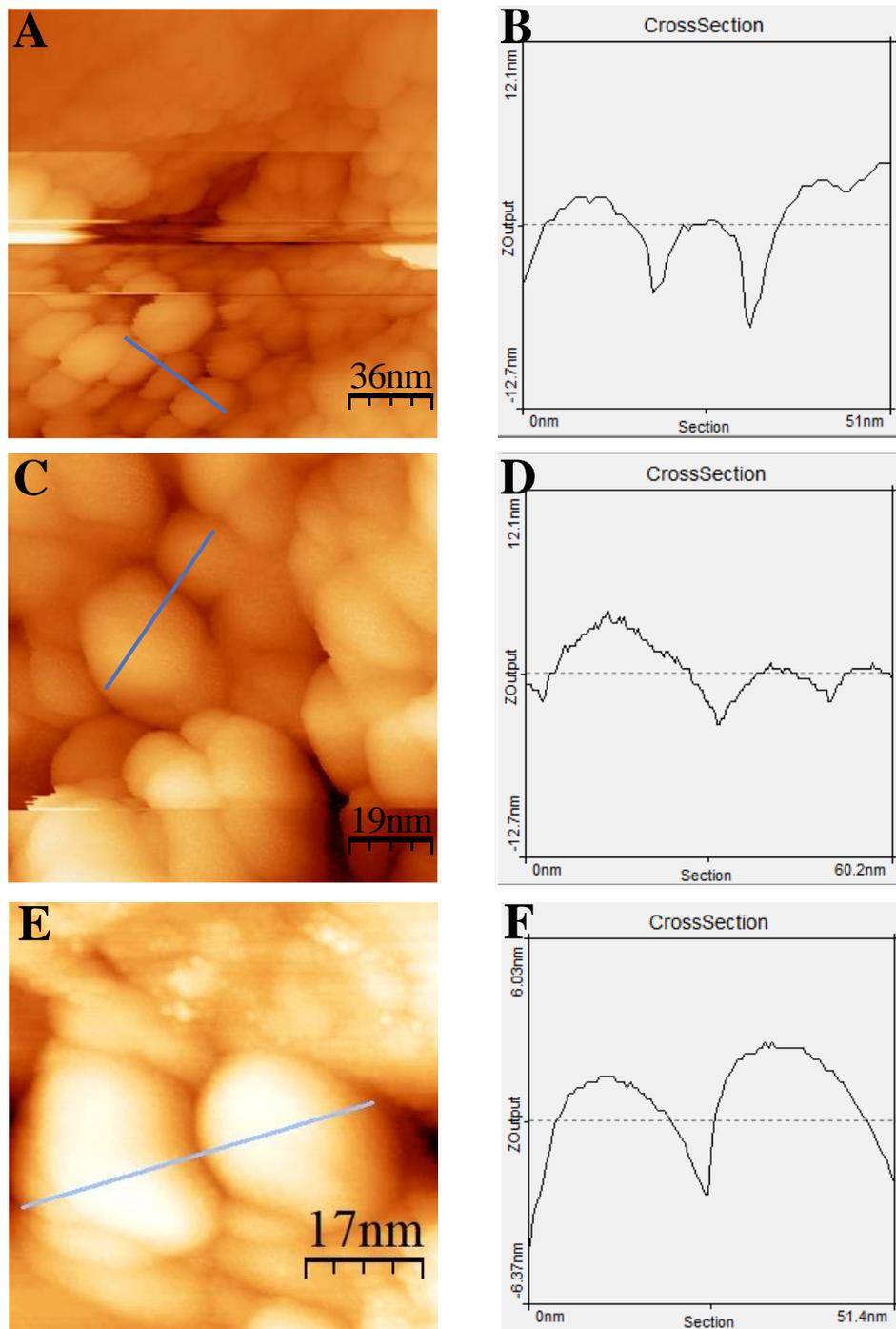


Figura 11. Imágenes topográficas de STM (escala 17 nm). **A)** AuNPs desnudas depositadas en HOPG ($181 \times 181 \text{ nm}^2$, $V_s = 0.5 \text{ V}$, $I = 1.0 \text{ nA}$, Time/line: 0.3 s). **B)** Perfil transversal de las AuNPs desnudas **C)** AuNP-ALA 48 h depositadas en HOPG ($200 \times 200 \text{ nm}^2$, $V_s = 0.05 \text{ V}$, $I = 1.0 \text{ nA}$, Time/line: 0.2 s). **D)** Perfil transversal de las AuNPs-ALA **E)** AuNP-MAN. (incubadas por 48 h con ácido lipoico) depositadas en HOPG ($60.6 \times 60.6 \text{ nm}^2$, $V_s = 0.0501 \text{ V}$, $I = 1.0 \text{ nA}$, Time/line: 0.2 s). **E)** Perfil transversal de las AuNP-MAN.

7.7. Análisis por SEM y TEM

En las imágenes de SEM (**Figura 12**) y TEM (**Figura 13**) se observaron y midieron los núcleos metálicos de alta densidad electrónica de las AuNPs desnudas y de los grupos AuNP-ALA y AuNP-MAN (ambos incubados con ALA durante 48 h). Los valores oscilan entre los 14 y 32 nm, sin embargo, no se observaron cambios estructurales visibles en el núcleo al modificarlas con las distintas moléculas, pero sí fue visible la formación de agregados.

Al realizar el análisis por TEM de las nanopartículas individuales de cada grupo (**Figura 14**) se pudo observar la presencia de un halo de electrones de baja densidad en las nanopartículas conjugadas que se interpretó como la presencia de las diferentes cubiertas (ALA o ALA-MAN) ya que no se observaron en las AuNPs desnudas.

El análisis elemental (**Figura 14**) mostró la presencia de oro (Au) en todos los grupos, y la aparición de un pico correspondiente a azufre (S) en AuNP-ALA (**Figura 14**). Los picos correspondientes a cobre (Cu) y carbón (C) que también están presentes en todos los grupos se deben a la rejilla de cobre que se utiliza para montar las muestras.

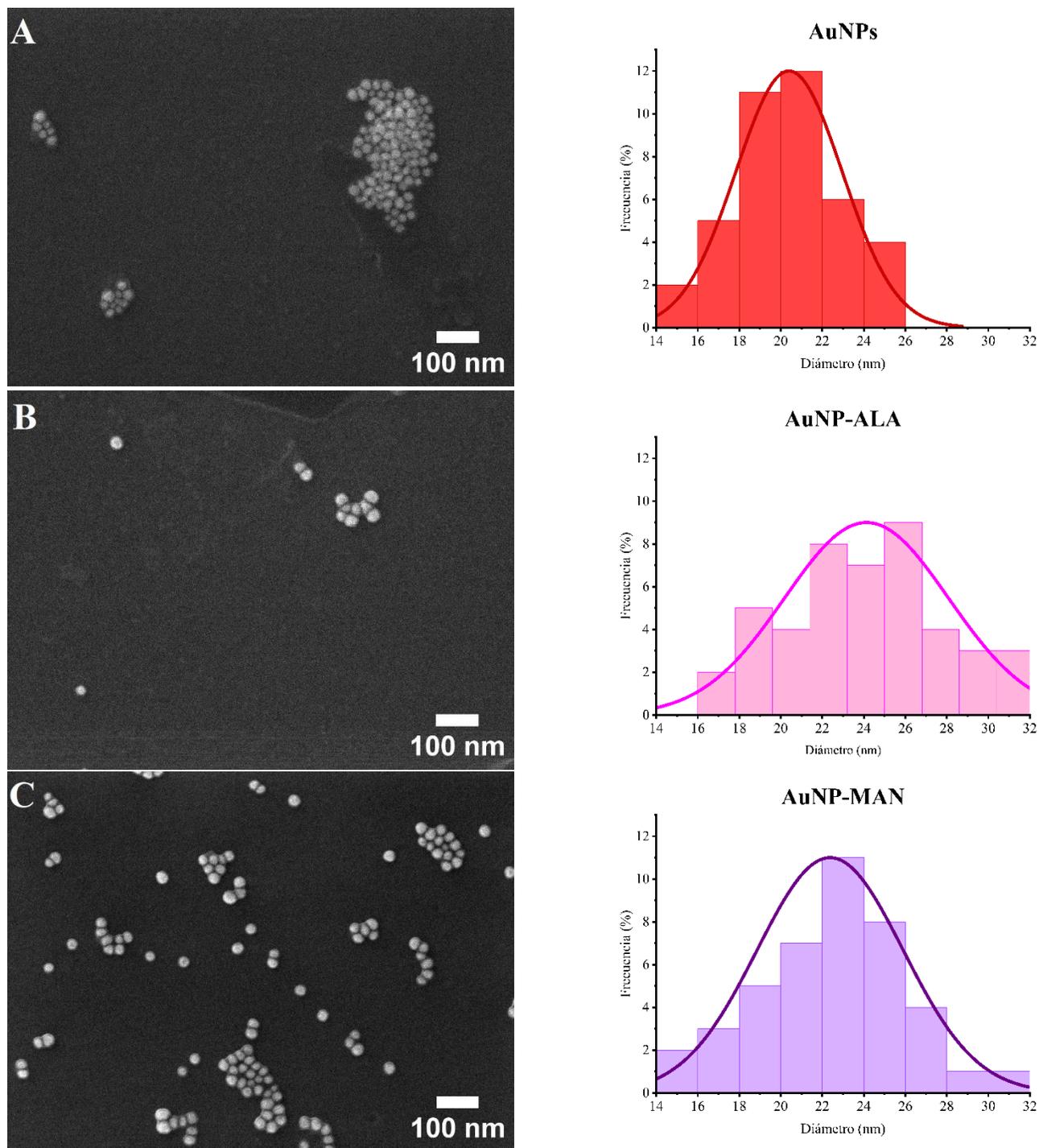


Figura 12. Imágenes SEM -UED (escala 100 nm) y sus respectivos histogramas de distribución de tamaños. **A)** AuNPs desnudas; **B)** AuNP-ALA 48 h **C)** AuNP-MAN (incubadas por 48 h con ácido lipoico).

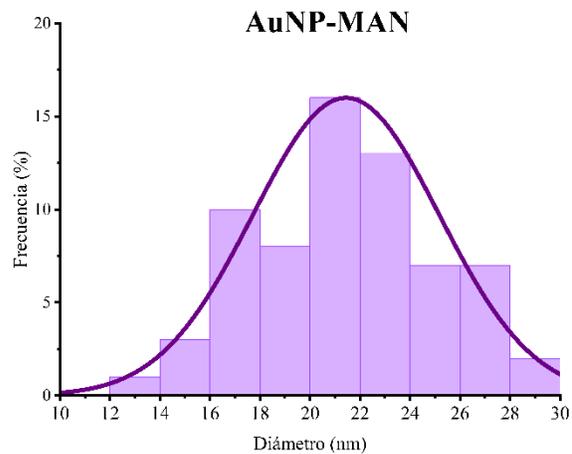
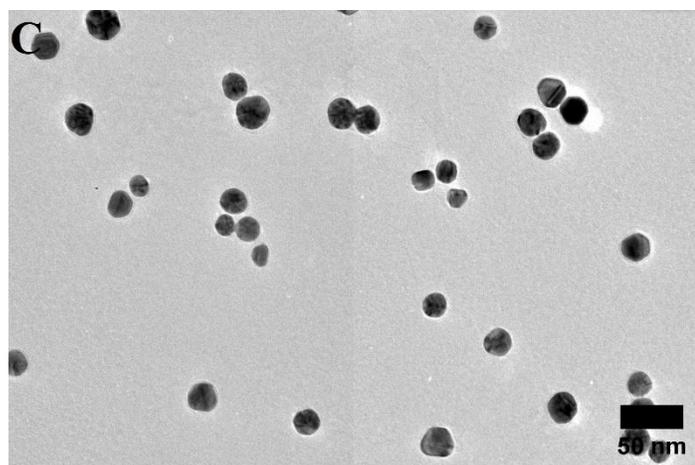
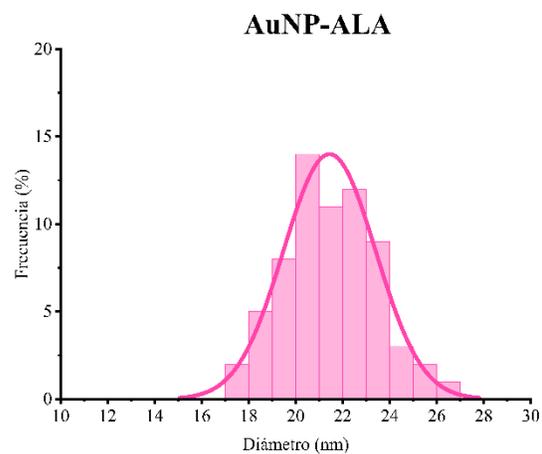
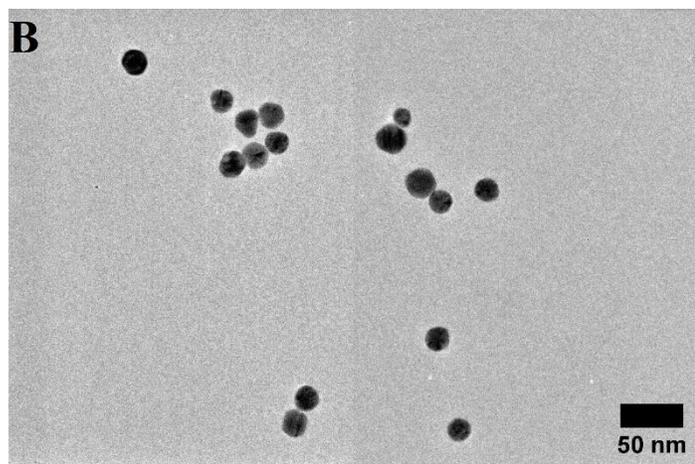
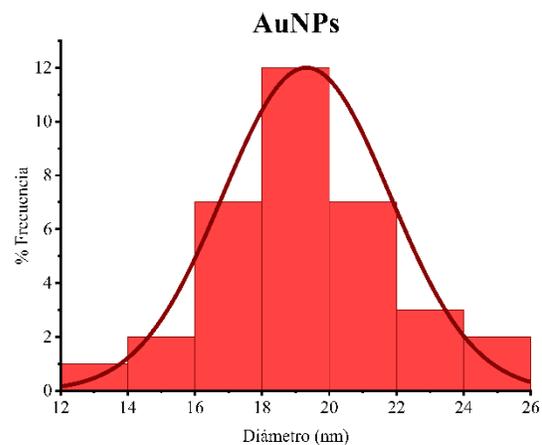
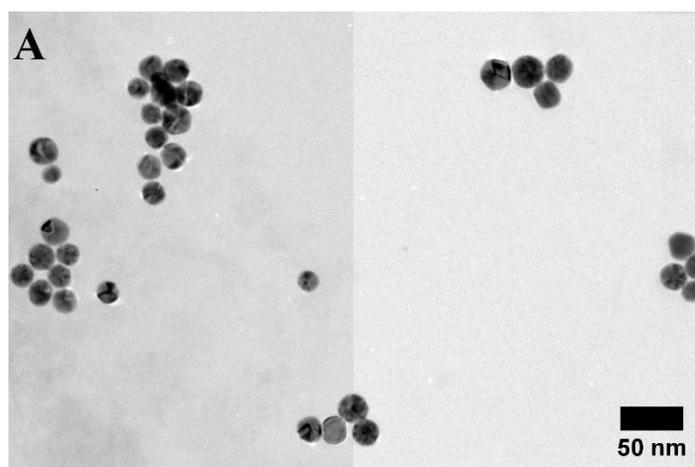


Figura 13. Imágenes TEM (escala 50 nm) y sus respectivos histogramas de distribución de tamaños. **A)** AuNPs desnudas, **B)** AuNP-ALA 48 h **C)** AuNP-MAN (incubadas por 48 h con ácido lipoico).

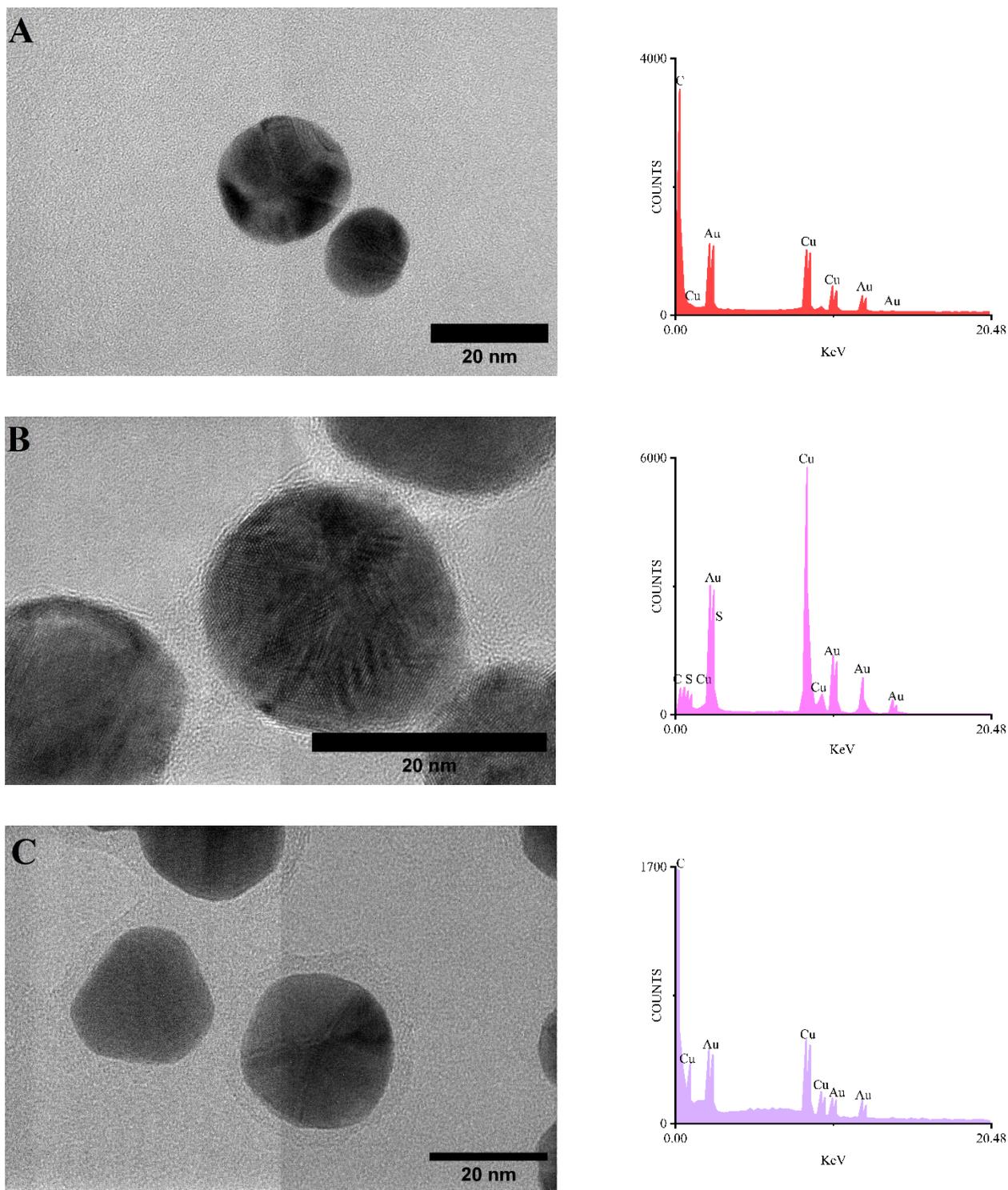


Figura 14. Imágenes TEM (escala 20 nm) y su respectivo análisis elemental. **A)** AuNPs desnudas **B)** AuNP-ALA, **C)** AuNP-Manosa (incubadas por 48 h con ácido lipico).

8. DISCUSIÓN

El diseño de nanovehículos inorgánicos direccionados generalmente emplea cubiertas de moléculas que permiten su estabilidad en términos de polidispersabilidad y su conjugación posterior con fármacos o agentes direccionales que favorezcan su acumulación en tejidos específicos. Distintas estrategias de conjugación covalente y no covalente se han empleado para garantizar los efectos terapéuticos del fármaco y una alta eficiencia de carga (Conniot *et al.*, 2014; Shao *et al.*, 2015), por esta razón en el presente trabajo se desarrollaron dos estrategias para cargar de forma covalente y no covalente 2 fármacos inmunomoduladores derivados de imidazoquinolina en nanopartículas de oro de 20 nm recubiertas con una monocapa de ácido lipoico, que actuó como estabilizador y ligando permitiendo la conjugación con los distintos fármacos y la manosa cuyo propósito es ser el direccionador hacia TAM M2.

8.1. Adsorción del ácido lipoico en la superficie de las AuNPs

El ácido lipoico es una molécula pequeña que contiene un grupo carboxilo y un grupo ditiol que lo convierten en un buen candidato para actuar como molécula ligando de las AuNPs, pues se ha demostrado que existe una alta afinidad entre el oro y el azufre (Han *et al.*, 2007) lo que sugiere que el ALA puede ser adsorbido en las AuNPs a partir del grupo ditiol mientras que el grupo carboxilo queda disponible y puede formar una superficie negativa a pHs adecuados. Por éstas razones el análisis de los espectros FT-IR de las nanopartículas incubadas con ALA exhiben bandas que corresponden a enlaces del grupo carboxilo (**Figura 7A**) en tanto que los valores del potencial zeta, que son una medida de la carga superficial de las nanopartículas, muestran que las AuNP-ALA suspendidas en agua

pH 11 se volvieron más negativas en comparación a las AuNPs desnudas (**Figura 10**) lo que confirma que los grupos ácidos carboxílicos están expuestos y cargados negativamente ya que están desprotonados debido a que se encuentran en un pH mayor a su pK_a que es de 4.7, por último, el tamaño del diámetro hidrodinámico también es una forma de comprobar la adsorción del ALA pues hubo un incremento en el tamaño de éstos después de la adsorción del ALA (**Figura 9**).

8.2. Carga del fármaco R848 mediante interacciones electrostáticas a los sistemas AuNP-ALA incubados por diferentes tiempos con ALA

La mayoría de los fármacos son ácidos y/o bases débiles, por ello el conocimiento de su pK_a es esencial para comprender la forma iónica que adoptará la molécula a diferentes rangos de pH (Manallack, D. T. (2007). R848, es una pequeña molécula insoluble en agua cuyo pK_a de acuerdo con drugbank (2023) para su parte más ácida es de 14.91 mientras que para la básica es de 4.83. Teniendo en cuenta esta información se decidió continuar con la carga del fármaco a pH 11 para asegurar que la mayor parte de los grupos carboxílicos del ALA permanecieran desprotonados proveyendo una carga negativa, así mismo la parte básica del fármaco también estará desprotonada y se encontrará como NH_2 que debido a la diferencia de electronegatividad entre el nitrógeno (N) (3.04) y el hidrógeno (H) (2.2) se forma una carga parcial positiva en los átomos de H y una carga negativa en el N (Carey *et al.*, 2011), dichas cargas parciales positivas fueron utilizadas para unir de forma no covalente por medio de atracciones electrostáticas el fármaco con los grupos carboxílicos cargados negativamente del ALA.

Se trabajaron 4 diferentes tiempos de incubación con ALA, debido a que estudios previos como el de Estudiante-Marquez *et al.*, (2020) han demostrado que el número de moléculas de ALA adsorbidas a las superficies de las AuNPs se puede controlar a través del tiempo de incubación, ya que probaron 4 tiempos de incubación con ALA (2 h, 24 h, 48 h y 72 h) y determinó que el número de moléculas adsorbidas incrementaba en cada tiempo.

Si bien es cierto que el enfoque del proyecto plantea la unión de R848 mediante interacciones electrostáticas al ALA, también se tomó en cuenta el carácter hidrofóbico del fármaco y se consideró que éste posiblemente podría cargarse entre los espacios de las cadenas hidrofóbicas del ALA.

La carga del fármaco R848 a los sistemas AuNP-ALA incubados por diferentes tiempos con ALA, mostró que su adsorción incrementaba de acuerdo con el tiempo de incubación del ALA, alcanzando la capacidad más alta en el tiempo de 72 h (**Figura 5B y Tabla 4**), lo que sugiere que la adsorción del fármaco al sistema AuNP-ALA se lleva a cabo principalmente por interacciones electrostáticas. La caracterización del sistema resultante (AuNP-ALA-R848) por DLS se realizó únicamente en los tiempos de 48 h y 72 h debido a que fueron los que presentaron una mayor capacidad de carga, sin embargo, los espectros UV-vis (**Figura 4D**), indicaron que todos los sistemas eran estables pues el $\lambda_{\text{máx}}$ del pico del LSPR se encontraba entre 520 y 522 nm, por lo que ninguno presentó un corrimiento hacia el rojo después de la adsorción de ALA y R848, ya que el $\lambda_{\text{máx}}$ del pico del LSPR de las AuNPs desnudas también se encuentra entre 520 y 522 nm, así mismo el proveedor (Sigma Aldrich) indica que las AuNPs de 20 nm presentan su $\lambda_{\text{máx}}$ entre 520 y 522 nm. Por otro lado, la disminución en la absorbancia del pico del LRSP en los sistemas AuNP-ALA y AuNP-R848 es notoria (**Figura 4B y 4C**) siendo más evidente en este último, lo que puede

deberse a la pérdida de material después de los lavados que también se puede ver en la cuantificación del número de AuNPs (**Tabla 3**).

Los espectros de FT-IR (**Figura 8A**) mostraron la presencia del fármaco en el sistema AuNP-ALA-R848 ya que aparecieron bandas relacionadas a los enlaces de los compuestos heteropolicíclicos aromáticos que lo componen. Los valores de potencial zeta (**Figura 10**) mostraron una disminución de la electronegatividad de los sistemas AuNP-ALA después de absorber el fármaco, esto puede deberse a la gran presencia de los grupos amino del fármaco, sin embargo, sigue siendo negativa lo que es importante ya que se ha demostrado que si la carga superficial de las AuNPs es positiva su citotoxicidad incrementa (Peng & Liang, 2019).

El tamaño hidrodinámico (**Figura 9**) mostró un incremento mayor al esperado en ambos tiempos de incubación, lo que puede estar relacionado con la carga del fármaco en el sistema o la formación de agregados; no obstante las desviaciones estándar del tiempo de 72 h fueron grandes, por lo que los tamaños se encuentran muy dispersos tal y como se ve reflejado en los valores de polidispersión (**Figura 8**) que describen la distribución de tamaños de las nanopartículas, estos valores pueden variar de 0 a 1, donde las partículas con valores de polidispersión inferiores a 0.1 implican partículas monodispersas y los valores superiores a 0.1 pueden significar la distribución de tamaños de partículas polidispersas (Raval *et al.*, 2019), los valores obtenidos para los sistemas AuNP-ALA-R848 son mayores a 0.1 para ambos tiempos de incubación, pero los de 72 h son de 0.3, y su desviación estándar también es grande. Cabe recalcar que los valores de polidispersión tanto de las AuNP-ALA y de las AuNPs desnudas son mayores a 0.1 y éstas últimas tienen desviaciones estándar muy grandes por lo que se puede pensar que las AuNPs de 20 nm comerciales utilizadas para realizar el presente estudio no eran tan homogéneas en tamaño o estaban agregadas.

8.3. Carga del fármaco IMDQ mediante un enlace covalente a los sistemas AuNP-ALA incubados por diferentes tiempos con ALA

El diseño típico de la conjugación por enlaces covalentes entre un fármaco y un nanovehículo inorgánico presenta ventajas como un incremento en la cantidad de fármaco que llega al sitio de acción y una disminución en la frecuencia de dosificación, sin embargo, las modificaciones en los fármacos a menudo resultan en una eficacia terapéutica reducida y costos elevados (Shao *et al.*, 2015), por ello es necesario buscar estrategias de conjugación que permitan cargar de forma covalente los fármacos sin afectar su eficacia terapéutica.

IMDQ es una pequeña molécula agonista de los receptores TLR7 y TLR8 derivada de imidazoquinolina que ha sido ampliamente estudiada como un potente activador de la respuesta inmune, sin embargo debido a su pequeño tamaño se disemina rápidamente provocando toxicidad sistémica que ha impedido su uso clínico (Bolli *et al.*, 2021) por lo que con la finalidad de mejorar su farmacocinética, diversos autores como Li *et al.*, (2021) han demostrado que la conjugación covalente del IMDQ a transportadores macromoleculares o coloidales a partir de una estrategia simple y eficiente que consta de la conjugación de su bencilamina a un ácido carboxílico para formar un enlace tipo amida resulta en la disminución de su diseminación sistémica y no reduce su efectividad terapéutica. Por esta razón en el presente trabajo se desarrolló una estrategia que permitiera la unión de las bencilaminas del IMDQ a los ácidos carboxílicos del ALA que están expuestos en la superficie de la AuNP, para ello se utilizó el EDC que es una carbodiimina que se encuentra como una sal y es utilizada frecuentemente para formar enlaces amida en soluciones acuosas.

La carga del fármaco se probó en los sistemas AuNP-ALA con los 3 tiempos de incubación con ALA (24 h, 48 h y 72 h) que tienen una mayor adsorción de moléculas en su

superficie, pues en esta ocasión es necesario tener el mayor número de carboxilos disponibles para llevar a cabo la reacción. Los espectros UV-vis (**Figura 4F**) muestran que el $\lambda_{\text{máx}}$ del LRSP se corrió ligeramente hacia el rojo, y su banda presentó una amortiguación, al igual que en el resto de sistemas, sin embargo en esta ocasión puede no sólo deberse a la pérdida de material, sino también a la aglomeración de las AuNPs, pues es visible la formación de una segunda zona de absorción alrededor de los 600 nm en comparación con el resto de sistemas, que podría deberse a un exceso de sales al momento de la síntesis, pues está comprobado que un exceso de sales puede desestabilizar las AuNPs fomentando la formación de agregados (Carl et al., 2017). A pesar de que el sistema AuNP-IMDQ no es estable, presentó una eficiencia de carga mayor al 50 % en todos sus tiempos.

La carga del IMDQ a AuNP-ALA también se puede comprobar con los espectros de FT-IR (**Figura 8B**) en los que se puede observar la aparición en 1700 cm^{-1} del enlace de estiramiento C=O característico de las amidas que está ausente en la molécula del fármaco solo.

8.4. Incorporación de la manosa como molécula direccionadora específica al sistema AuNP-R848

R848 es un fármaco inmunomodulador ligando de los receptores TLR7 y TLR8 presentes en diferentes tipos de células inmunitarias incluidos los macrófagos (Bolli, et al., 2021); debido a esto se considera que por sí misma puede actuar como molécula direccionadora a células del sistema inmunitario, sin embargo, con el propósito de direccionar el sistema AuNP-ALA-R848 de forma más específica hacia los macrófagos TAM M2 para repolarizarlos de manera efectiva y reducir la respuesta inmunitaria sistémica e

inespecífica que causa su citotoxicidad, se incorporó manosa-NH₂, ya que el receptor de manosa (CD206) medía el reconocimiento de sustratos manosilados y su posterior endocitosis a través de vesículas recubiertas de clatrina, si bien, la mayoría de los macrófagos expresan niveles bajos de CD206, este se encuentra regulado al alza en TAM M2 (Vasievich & Huang, 2011; East & Isacke, 2002), además, actualmente se ha explorado muy poco el potencial para dirigirse a M2 a través de la manosa, a pesar de que es accesible a costos significativamente más bajos que otros objetivos para direccionamiento como anticuerpos y péptidos (Yu et al., 2013).

Aunado a lo anterior, estudios han reportado que el receptor de manosa al unirse a su ligando promueve directamente la activación proinflamatoria de los macrófagos (Ye *et al.*, 2019; van der Zande *et al.*, 2021), por ello se puede sugerir que la manosa unida en los sistemas AuNP-MAN-R848 es multifuncional pues aparte de funcionar como molécula direccionadora específica del sistema, puede actuar como molécula sinérgica del fármaco R848.

Para su incorporación, se partió de las AuNP-ALA incubados por 48 y 72 h, debido a que fueron los tiempos que mayor capacidad de carga de R848 presentaron. Se realizó la funcionalización de MAN, utilizando únicamente el 5% de los grupos carboxilos del ALA debido a que en la literatura se ha reportado que la internalización de diferentes tipos de nanopartículas que contienen manosa es mayor cuando ésta sólo cubre un 5 o 10 % de la superficie total de la NP, sin embargo, el porqué de esto aún es incierto (Markov *et al.*, 2015).

La reacción química llevada a cabo unió covalentemente el extremo amina de la manosa y los grupos carboxilo del ALA, a través de la formación de un enlace amida, dando lugar al sistema AuNP-MAN, al que posteriormente se le cargó el fármaco R848, para formar AuNP-MAN-R848, cuyos espectros UV-vis (**Figura 4C y 4E**) no mostraron un corrimiento

hacia el rojo, entonces se deduce que son estables, no obstante, la pérdida de material también es evidente (**Tabla 3**).

Para obtener los espectros FT-IR y comprobar que la reacción ALA-MAN ocurre y se forma un enlace amida, se sintetizó únicamente la reacción sin nanopartículas y fue la que se analizó, esto debido a que la cantidad de manosa unida al sistema original es muy poca y por lo tanto no se podía detectar en el equipo, debido a que los picos quedaban enmascarados por otros enlaces.

El diámetro hidrodinámico (**Figura 9**) mostró que hubo una ligera disminución en el tamaño para ambos tiempos, sin embargo, nuevamente las desviaciones estándar para el tiempo de incubación de 72 h son muy grandes por lo que son poco confiables, así mismo la polidispersión para ambos tiempos es grande, por lo que nuevamente se puede pensar que las nanopartículas están formando agregados. En cuanto al potencial zeta (**Figura 10**), se observa que las nanopartículas se volvieron más negativas nuevamente con respecto al sistema AuNP-ALA-R848.

La diferencia en la eficiencia de carga del fármaco en los sistemas AuNP-MAN-R848 (48 h y 72 h) fue menor en contraste con AuNP-R848, una explicación para esto podría ser que la parte del ALA que queda descubierta es menos polar que la molécula de manosa que contiene varios grupos hidroxilo, por lo que el fármaco que no es polar puede interactuar más fácilmente con ella que cuando hay manosa en el sistema,

En general, en literatura se ha reportado que la carga de fármacos a diferentes nanovehículos a través de la adsorción física y electrostática a menudo resulta en bajas eficiencias de carga del fármaco (10%), es por ello que generalmente se busca unir al fármaco a través de cristalización y enlaces covalentes, sin embargo, este tipo de modificaciones puede afectar la efectividad terapéutica de la molécula (Shen *et al.*, 2010; Shao *et al.*, 2015),

aunque en el presente estudio demostramos que los sistemas AuNP-R848 Y AuNP-MAN-R848 tuvieron una eficiencia de carga máxima del 24.48 % y 22.77% respectivamente, que se encuentra en el intervalo esperado para esta forma de cargar fármacos, además debe tenerse en cuenta la pérdida de AuNPs después de cada paso de funcionalización (**Tabla 3**).

8.5. Análisis por microscopía de efecto túnel y microscopía electrónica de transmisión

El tamaño del núcleo de la nanopartícula es un parámetro básico para determinar la toxicidad, pues estudios han demostrado que tamaños entre 2.0 a 5.0 nm son significativamente más citotóxicos debido a su capacidad de entrar al núcleo, en contraste con NPs de 10, 20 y 50 nm (Xia *et al.*, 2019), del mismo modo, los diferentes estados de agregación afectan las diferentes funciones fisiológicas de la membrana celular y organelos pues mientras mayor sea su agregación mayor será su citotoxicidad (Montasser *et al.*, 2017; Peng & Liang, 2019).

El análisis por STM (**Figura 11**) reveló que las nanopartículas incluyendo la cubierta miden entre 22 y 25 nm aproximadamente, mientras que las desnudas están entre 18 y 20 nm, lo que confirma que efectivamente las moléculas de ALA se adsorben a las nanopartículas, y que posteriormente estas se unen a las de manosa, así mismo en los análisis transversales se ve que las superficies de las nanopartículas no son lisas, en las AuNPs desnudas la presencia de moléculas puede deberse a residuos del amortiguador de citratos en el que se encuentran suspendidas inicialmente, que a pesar de los múltiples lavados aún persisten, mientras que en las AuNP-ALA las moléculas presentes serían de ácido lipoico, pues estas cubrirían la superficie de las AuNPs ya que su afinidad por las AuNPs es mayor que la del

citrato, por otro lado las AuNP-MAN también muestran la presencia de moléculas pero estas se encuentran más compactas lo que puede ser resultado de que hay un mayor número de moléculas en la superficie.

Por otra parte, los análisis de SEM (**Figura 12**) y TEM (**Figura 13**), en donde se observan los núcleos de alta densidad electrónica se puede observar que los tamaños rondan entre los 14 y 32 nm, confirmando que tenemos poblaciones de diferentes tamaños desde fábrica, pues de acuerdo con Sigma Aldrich, que es el fabricante, las poblaciones deberían medir entre 18 y 22 nm, no obstante, es importante reconocer la formación de agregados en los diferentes grupos evaluados.

En cuanto a los análisis individuales por TEM (**Figura 11**) de las AuNPs desnudas, AuNP-ALA y AuNP-MAN, podemos observar la presencia de un halo rodeando los núcleos de las AuNPs conjugadas que está ausente en las NPs desnudas. Al realizar el análisis elemental, encontramos la presencia de oro en todos los grupos, que confirma la naturaleza metálica de las AuNPs, también el carbón (C) y cobre (Cu) fueron elementos constantes en todos los análisis debido al soporte que se utiliza para montar las muestras. La aparición del azufre (S) en el sistema AuNP-ALA, lo interpretamos como la adsorción de esta molécula a la superficie de las AuNPs pues corresponde a los grupos tiol (-SH). Mientras tanto el análisis del sistema AuNP-MAN sólo mostró la presencia carbón (C), cobre (Cu) y oro (Au), a pesar de que es visible que las nanopartículas presentan una cubierta, por lo que es posible que elementos como el oxígeno (O) y nitrógeno (N) que debieron aparecer fueran enmascarados por los picos de los otros elementos o las cantidades presentes en las muestras estuvieron por debajo del límite de detección del equipo.

CONCLUSIONES

- El ácido lipoico adsorbido en la superficie de las AuNPs preservó sus núcleos y permitió su funcionalización.
- El fármaco R848 puede ser cargado en las AuNPs funcionalizadas con ALA por medio de interacciones electrostáticas no covalentes.
- Los sistemas AuNP-ALA-R848 y AuNP-MAN-R848 resultaron ser estables en solución acuosa.
- El fármaco IMDQ pudo ser unido de forma covalente a las AuNPs funcionalizadas con ALA por medio de la formación de un enlace amida.

PERSPECTIVAS

- Probar diferentes técnicas para lavar las nanopartículas.
- Mejorar el método por el cual se conjuga químicamente el IMDQ a las AuNP-ALA para evitar su aglomeración e incrementar su eficiencia de carga.
- Realizar estudios para conocer cuál es el número real de moléculas de manosa que se conjugan a las AuNPs.
- Realizar estudios para conocer cómo se libera el fármaco de los diferentes sistemas en condiciones fisiológicas.
- Realizar estudios in vitro con líneas celulares de macrófagos TAM M2 probando la efectividad de los AuNP-ALA-R848 y AuNP-MAN-R848 incubadas por 48 h.

REFERENCIAS

- Amendola, V., Pilot, R., Frasconi, M., Maragò, O. M., & Iatì, M. A. (2017). Surface plasmon resonance in gold nanoparticles: A review. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 29(20), 203002. <https://doi.org/10.1088/1361-648X/aa60f3>
- Bhattacharya, R., & Mukherjee, P. (2008). Biological properties of “naked” metal nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(11), 1289–1306. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.03.013>
- Bolli, E., Scherger, M., Arnouk, S. M., Pombo Antunes, A. R., Straßburger, D., Urschbach, M., Stickdorn, J., De Vlaminck, K., Movahedi, K., Räder, H. J., Hernot, S., Besenius, P., Van Ginderachter, J. A., & Nuhn, L. (2021). Targeted Repolarization of Tumor-Associated Macrophages via Imidazoquinoline-Linked Nanobodies. *Advanced Science*, 8(10), 2004574. <https://doi.org/10.1002/advs.202004574>
- Boutillier, A. J., & Elswa, S. F. (2021). Macrophage Polarization States in the Tumor Microenvironment. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(13), 6995. <https://doi.org/10.3390/ijms22136995>
- Carey Bissonnette, F. Geoffrey Herring, Jeffry D. Madura & Ralph H. Petrucci (2011). *Química General (10 Ed)*. Editorial Pearson. https://quimica247403824.files.wordpress.com/2018/11/quimica_general_petrucci.pdf
- Carl, N., Prévost, S., Fitzgerald, J. P. S., & Karg, M. (2017). Salt-induced cluster formation of gold nanoparticles followed by stopped-flow SAXS, DLS and extinction spectroscopy. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 19(25), 16348–16357. <https://doi.org/10.1039/C7CP01807J>

- Cendrowicz, E., Sas, Z., Bremer, E., & Rygiel, T. P. (2021). The Role of Macrophages in Cancer Development and Therapy. *Cancers*, 13(8), 1946.
<https://doi.org/10.3390/cancers13081946>
- Chen, Y., Gu, X., Nie, C.-G., Jiang, Z.-Y., Xie, Z.-X., & Lin, C.-J. (2005). Shape controlled growth of gold nanoparticles by a solution synthesis. *Chemical Communications*, 33, 4181–4183. <https://doi.org/10.1039/B504911C>
- Connot, J., Silva, J. M., Fernandes, J. G., Silva, L. C., Gaspar, R., Brocchini, S., Florindo, H. F., & Barata, T. S. (2014). Cancer immunotherapy: Nanodelivery approaches for immune cell targeting and tracking. *Frontiers in Chemistry*, 2.
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fchem.2014.00105>
- Debacker, J. M., Gondry, O., Lahoutte, T., Keyaerts, M., & Huvenne, W. (2021). The Prognostic Value of CD206 in Solid Malignancies: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Cancers*, 13(14), 3422. <https://doi.org/10.3390/cancers13143422>
- Dossou, A. S., Mantsch, M. E., Sabnis, N., Berg, R. E., Fudala, R., & Lacko, A. G. (2023). Mannose-functionalization of reconstituted high-density lipoprotein nanoparticles improves payload delivery and enhances M2-to-M1 phenotype reprogramming of RAW 264.7 macrophages polarized by B16-F10 melanoma cells. *Frontiers in Drug Delivery*, 3.
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fddev.2023.1281066>
- East, L., & Isacke, C. M. (2002). The mannose receptor family. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1572(2–3), 364–386. [https://doi.org/10.1016/s0304-4165\(02\)00319-7](https://doi.org/10.1016/s0304-4165(02)00319-7)
- Estudiante-Mariquez, O. J., Rodríguez-Galván, A., Ramírez-Hernández, D., Contreras-Torres, F., & Medina, L. A. (2020). Technetium-Radiolabeled Mannose-Functionalized Gold Nanoparticles as Nanoprobes for Sentinel Lymph Node Detection. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(8), 1982. <https://doi.org/10.3390/molecules25081982>

- Fadeel, B., & Garcia-Bennett, A. E. (2010). Better safe than sorry: Understanding the toxicological properties of inorganic nanoparticles manufactured for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62(3), 362–374.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.11.008>
- Feng, Y., Ye, Z., Song, F., He, Y., & Liu, J. (2022). The Role of TAMs in Tumor Microenvironment and New Research Progress. *Stem Cells International*, 2022, 5775696.
<https://doi.org/10.1155/2022/5775696>
- Gupta, R., & Rai, B. (2017). Effect of Size and Surface Charge of Gold Nanoparticles on their Skin Permeability: A Molecular Dynamics Study. *Scientific Reports*, 7(1), Art. 1.
<https://doi.org/10.1038/srep45292>
- Gao, Q., Zhang, J., Gao, J., Zhang, Z., Zhu, H., & Wang, D. (2021). Gold Nanoparticles in Cancer Theranostics. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9.
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2021.647905>
- Guo, L., Ping, J., Qin, J., Yang, M., Wu, X., You, M., You, F., & Peng, H. (2021). A Comprehensive Study of Drug Loading in Hollow Mesoporous Silica Nanoparticles: Impacting Factors and Loading Efficiency. *Nanomaterials*, 11(5), Article 5.
<https://doi.org/10.3390/nano11051293>
- Haiss, W., Thanh, N. T. K., Aveyard, J., & Fernig, D. G. (2007). Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from UV–Vis Spectra. *Analytical Chemistry*, 79(11), 4215–4221. <https://doi.org/10.1021/ac0702084>
- Han, G., Ghosh, P., & Rotello, V. M. (2007). Multi-Functional Gold Nanoparticles for Drug Delivery. En W. C. W. Chan (Ed.), *Bio-Applications of Nanoparticles* (pp. 48–56). Springer. https://doi.org/10.1007/978-0-387-76713-0_4

- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, *100*(1), 57–70.
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)
- Huang, X., & El-Sayed, M. A. (2010). Gold nanoparticles: Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy. *Journal of Advanced Research*, *1*(1), 13–28. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2010.02.002>
- INEGI. (2021). *ESTADÍSTICAS A PROPÓSITO DEL DÍA MUNDIAL CONTRA EL.pdf*. Recuperado el 27 de julio de 2022, de https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2021/cancer2021_Nal.pdf
- Iyer, A. K., Khaled, G., Fang, J., & Maeda, H. (2006). Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting. *Drug Discovery Today*, *11*(17), 812–818.
<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2006.07.005>
- Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E., & Forman, D. (2011). Global cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *61*(2), 69–90.
<https://doi.org/10.3322/caac.20107>
- Kauffman, E. C., Liu, H., Schwartz, M. J., & Scherr, D. S. (2012). Toll-Like Receptor 7 Agonist Therapy with Imidazoquinoline Enhances Cancer Cell Death and Increases Lymphocytic Infiltration and Proinflammatory Cytokine Production in Established Tumors of a Renal Cell Carcinoma Mouse Model. *Journal of Oncology*, *2012*, 103298.
<https://doi.org/10.1155/2012/103298>
- Kim, K. Y. (2007). Nanotechnology platforms and physiological challenges for cancer therapeutics. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, *3*(2), 103–110.
<https://doi.org/10.1016/j.nano.2006.12.002>
- Kockelmann, J., Stickdorn, J., Kasmi, S., De Vrieze, J., Pieszka, M., Ng, D. Y. W., David, S. A., De Geest, B. G., & Nuhn, L. (2020). Control over Imidazoquinoline Immune Stimulation

by pH-Degradable Poly(norbornene) Nanogels. *Biomacromolecules*, 21(6), 2246–2257.

<https://doi.org/10.1021/acs.biomac.0c00205>

Kumari, N., & Choi, S. H. (2022). Tumor-associated macrophages in cancer: Recent advancements in cancer nanoimmunotherapies. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 41(1), 68. <https://doi.org/10.1186/s13046-022-02272-x>

Lavin, Y., Winter, D., Blecher-Gonen, R., David, E., Keren-Shaul, H., Merad, M., Jung, S., & Amit, I. (2014). Tissue-resident macrophage enhancer landscapes are shaped by the local microenvironment. *Cell*, 159(6), 1312–1326. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.018>

Li, M., He, L., Zhu, J., Zhang, P., & Liang, S. (2022). Targeting tumor-associated macrophages for cancer treatment. *Cell & Bioscience*, 12(1), 85. <https://doi.org/10.1186/s13578-022-00823-5>

Li, H., Van Herck, S., Liu, Y., Hao, Y., Ding, X., Nuhn, L., Zhong, Z., Combes, F., Sanders, N. N., Lienenklaus, S., Koker, S. D., David, S. A., Wang, Y., De Geest, B. G., & Zhang, Z. (2020). Imidazoquinoline-Conjugated Degradable Coacervate Conjugate for Local Cancer Immunotherapy. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 6(9), 4993–5000. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.0c00485>

Lindfors, K., Kalkbrenner, T., Stoller, P., & Sandoghdar, V. (2004). Detection and Spectroscopy of Gold Nanoparticles Using Supercontinuum White Light Confocal Microscopy. *Physical Review Letters*, 93(3), 037401. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.93.037401>

MacParland, S. A., Tsoi, K. M., Ouyang, B., Ma, X.-Z., Manuel, J., Fawaz, A., Ostrowski, M. A., Alman, B. A., Zilman, A., Chan, W. C. W., & McGilvray, I. D. (2017). Phenotype Determines Nanoparticle Uptake by Human Macrophages from Liver and Blood. *ACS Nano*, 11(3), 2428–2443. <https://doi.org/10.1021/acs.nano.6b06245>

- Manallack, D. T. (2007). The pKa Distribution of Drugs: Application to Drug Discovery. *Perspectives in Medicinal Chemistry*, 1, 25–38.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2754920/>
- Mansfield, E., Tyner, K. M., Poling, C. M., & Blacklock, J. L. (2014). Determination of Nanoparticle Surface Coatings and Nanoparticle Purity Using Microscale Thermogravimetric Analysis. *Analytical Chemistry*, 86(3), 1478–1484.
<https://doi.org/10.1021/ac402888v>
- Markov, O. V., Mironova, N. L., Shmendel, E. V., Serikov, R. N., Morozova, N. G., Maslov, M. A., Vlassov, V. V., & Zenkova, M. A. (2015). Multicomponent mannose-containing liposomes efficiently deliver RNA in murine immature dendritic cells and provide productive anti-tumour response in murine melanoma model. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 213, 45–56.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.06.028>
- M.D, R. W. R. (2007). *Cancer Biology*. Oxford University Press.
- Mohrig, J. R. (2010). *Techniques in Organic Chemistry*. Freeman and Company. (pp. 295-304).
- Montasser, M. S., Hegazi, M. M., Younes, A. M., Dashti, N. H., & El-Sharkawey, A. E. (2017). Effect of Gold Chloride Concentration and Volume on Size and Shape of Biological Synthesized Gold Nanoparticles (AuNPs) Using Red Algae (*Laurencia papillosa*). *Science of Advanced Materials*, 9(7), 1105–1113. <https://doi.org/10.1166/sam.2017.3094>
- Mottas, I., Bekdemir, A., Cereghetti, A., Spagnuolo, L., Yang, Y.-S. S., Müller, M., Irvine, D. J., Stellacci, F., & Bourquin, C. (2019). Amphiphilic nanoparticle delivery enhances the anticancer efficacy of a TLR7 ligand via local immune activation. *Biomaterials*, 190–191, 111–120. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.10.031>

- Neophytou, C. M., Panagi, M., Stylianopoulos, T., & Papageorgis, P. (2021). The Role of Tumor Microenvironment in Cancer Metastasis: Molecular Mechanisms and Therapeutic Opportunities. *Cancers*, 13(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/cancers13092053>
- Ong, Q. K., Reguera, J., Silva, P. J., Moglianetti, M., Harkness, K., Longobardi, M., Mali, K. S., Renner, C., Feyter, S. D., & Stellacci, F. (2013, septiembre 18). *High-Resolution Scanning Tunneling Microscopy Characterization of Mixed Monolayer Protected Gold Nanoparticles* (world) [Research-article]. ACS Publications; American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/nn402414b>
- Pan, Y., Yu, Y., Wang, X., & Zhang, T. (2020). Tumor-Associated Macrophages in Tumor Immunity. *Frontiers in Immunology*, 11. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.583084>
- Paul, W., & Sharma, C. P. (2010). 8—Inorganic nanoparticles for targeted drug delivery. En C. P. Sharma (Ed.), *Biointegration of Medical Implant Materials* (pp. 204–235). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1533/9781845699802.2.204>
- Pecora, R. (2000). Dynamic Light Scattering Measurement of Nanometer Particles in Liquids. *Journal of Nanoparticle Research*, 2(2), 123–131. <https://doi.org/10.1023/A:1010067107182>
- Peng, C., Gao, X., Xu, J., Du, B., Ning, X., Tang, S., Bachoo, R. M., Yu, M., Ge, W.-P., & Zheng, J. (2017). Targeting orthotopic gliomas with renal-clearable luminescent gold nanoparticles. *Nano Research*, 10(4), 1366–1376. <https://doi.org/10.1007/s12274-017-1472-z>
- Peng, J., & Liang, X. (2019). Progress in research on gold nanoparticles in cancer management. *Medicine*, 98(18), e15311. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000015311>

- Ramsden, J. J. (2016). Chapter 1—What is nanotechnology? En J. J. Ramsden (Ed.), *Nanotechnology (Second Edition)* (pp. 1–18). William Andrew Publishing.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-39311-9.00007-8>
- Rasmussen, M. K., Pedersen, J. N., & Marie, R. (2020). Size and surface charge characterization of nanoparticles with a salt gradient. *Nature Communications*, *11*(1), Art. 1.
<https://doi.org/10.1038/s41467-020-15889-3>
- Rana, S., Bajaj, A., Mout, R., & Rotello, V. M. (2012). Monolayer coated gold nanoparticles for delivery applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *64*(2), 200–216.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.08.006>
- Raval, N., Maheshwari, R., Kalyane, D., Youngren-Ortiz, S. R., Chougule, M. B., & Tekade, R. K. (2019). Chapter 10—Importance of Physicochemical Characterization of Nanoparticles in Pharmaceutical Product Development. En R. K. Tekade (Ed.), *Basic Fundamentals of Drug Delivery* (pp. 369–400). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817909-3.00010-8>
- Rodell, C. B., Arlauckas, S. P., Cuccarese, M. F., Garris, C. S., Li, R., Ahmed, M. S., Kohler, R. H., Pittet, M. J., & Weissleder, R. (2018). TLR7/8-agonist-loaded nanoparticles promote the polarization of tumour-associated macrophages to enhance cancer immunotherapy. *Nature biomedical engineering*, *2*(8), 578–588. <https://doi.org/10.1038/s41551-018-0236-8>
- Rodríguez-Galván, A., Reyes, M., Ávila-Cruz, M., Rivera, M., & Basiuk, V. A. (2023). Scanning Tunneling Microscopy Study of Lipoic Acid, Mannose, and cRGD@AuNPs Conjugates. *Nanomaterials*, *13*(18), Article 18. <https://doi.org/10.3390/nano13182596>
- Shao, K., Singha, S., Clemente-Casares, X., Tsai, S., Yang, Y., & Santamaria, P. (2015). Nanoparticle-Based Immunotherapy for Cancer. *ACS Nano*, *9*(1), 16–30.
<https://doi.org/10.1021/nn5062029>

- Shen, S., Wu, Y., Liu, Y., & Wu, D. (2017). High drug-loading nanomedicines: Progress, current status, and prospects. *International Journal of Nanomedicine*, *12*, 4085–4109. <https://doi.org/10.2147/IJN.S132780>
- Shi, L., & Gu, H. (2021). Emerging Nanoparticle Strategies for Modulating Tumor-Associated Macrophage Polarization. *Biomolecules*, *11*(12), Article 12. <https://doi.org/10.3390/biom11121912>
- Sridhar, D. B., Gupta, R., & Rai, B. (2018). Effect of surface coverage and chemistry on self-assembly of monolayer protected gold nanoparticles: A molecular dynamics simulation study. *Physical Chemistry Chemical Physics*, *20*(40), 25883–25891. <https://doi.org/10.1039/C8CP04044C>
- Story, M. (1998). Signal transduction during apoptosis implications for cancer therapy. *Frontiers in Bioscience*, *3*(4), d365-375. <https://doi.org/10.2741/A281>
- Surendiran, A., Sandhiya, S., Pradhan, S. C., & Adithan, C. (2009). Novel applications of nanotechnology in medicine. *Indian Journal of Medical Research*, *130*(6), 689–701. <https://login.pbidi.unam.mx:2443/login?url=https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=asn&AN=48484422&site=ehost-live&scope=site>
- Tonga, G. Y., Moyano, D. F., Kim, C. S., & Rotello, V. M. (2014). Inorganic Nanoparticles for Therapeutic Delivery: Trials, Tribulations and Promise. *Current opinion in colloid & interface science*, *19*(2), 49–55. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2014.03.004>
- Turcu, I., Zarafu, I., Popa, M., Chifiriuc, M. C., Bleotu, C., Culita, D., Ghica, C., & Ionita, P. (2017). Lipoic Acid Gold Nanoparticles Functionalized with Organic Compounds as Bioactive Materials. *Nanomaterials*, *7*(2), Art. 2. <https://doi.org/10.3390/nano7020043>
- van der Zande, H. J. P., Nitsche, D., Schlautmann, L., Guigas, B., & Burgdorf, S. (2021). The Mannose Receptor: From Endocytic Receptor and Biomarker to Regulator of

(Meta)Inflammation. *Frontiers in Immunology*, 12, 765034.

<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.765034>

Vasievich, E. A., & Huang, L. (2011). The Suppressive Tumor Microenvironment: A Challenge in Cancer Immunotherapy. *Molecular pharmaceuticals*, 8(3), 635–641.

<https://doi.org/10.1021/mp1004228>

Vizirianakis, I. S. (2011). Nanomedicine and personalized medicine toward the application of pharmacotyping in clinical practice to improve drug-delivery outcomes. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 7(1), 11–17.

<https://doi.org/10.1016/j.nano.2010.11.002>

Wang, B., Van Herck, S., Chen, Y., Bai, X., Zhong, Z., Deswarte, K., Lambrecht, B. N., Sanders, N. N., Lienenklaus, S., Scheeren, H. W., David, S. A., Kiessling, F., Lammers, T., De Geest, B. G., & Shi, Y. (2020). Potent and Prolonged Innate Immune Activation by Enzyme-Responsive Imidazoquinoline TLR7/8 Agonist Prodrug Vesicles. *Journal of the American Chemical Society*, 142(28), 12133–12139. <https://doi.org/10.1021/jacs.0c01928>

WHO. (2020). *40-All-cancers-excluding-non-melanoma-skin-cancer-fact-sheet.pdf*. Recuperado el 1 de agosto de 2022, de <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/40-All-cancers-excluding-non-melanoma-skin-cancer-fact-sheet.pdf>

Wilczewska, A. Z., Niemirowicz, K., Markiewicz, K. H., & Car, H. (2012). Nanoparticles as drug delivery systems. *Pharmacological Reports: PR*, 64(5), 1020–1037.

[https://doi.org/10.1016/s1734-1140\(12\)70901-5](https://doi.org/10.1016/s1734-1140(12)70901-5)

Wu, J., & Li, Z. (2013). Applications of nanotechnology in biomedicine. *Chinese Science Bulletin*, 58(35), 4515–4518. <https://doi.org/10.1007/s11434-013-6063-0>

- Wuttke, S., Lismont, M., Escudero, A., Rungtaweivoranit, B., & Parak, W. J. (2017). Positioning metal-organic framework nanoparticles within the context of drug delivery – A comparison with mesoporous silica nanoparticles and dendrimers. *Biomaterials*, *123*, 172–183. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.01.025>
- Xia, Q., Huang, J., Feng, Q., Chen, X., Liu, X., Li, X., Zhang, T., Xiao, S., Li, H., Zhong, Z., & Xiao, K. (2019). Size- and cell type-dependent cellular uptake, cytotoxicity and in vivo distribution of gold nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, *14*, 6957–6970. <https://doi.org/10.2147/IJN.S214008>
- Yang, J., Zhang, L., Yu, C., Yang, X.-F., & Wang, H. (2014). Monocyte and macrophage differentiation: Circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomarker Research*, *2*(1), 1. <https://doi.org/10.1186/2050-7771-2-1>
- Yang, L., & Zhang, Y. (2017). Tumor-associated macrophages: From basic research to clinical application. *Journal of Hematology & Oncology*, *10*, 58. <https://doi.org/10.1186/s13045-017-0430-2>
- Ye, J., Yang, Y., Dong, W., Gao, Y., Meng, Y., Wang, H., Li, L., Jin, J., Ji, M., Xia, X., Chen, X., Jin, Y., & Liu, Y. (2019). Drug-free mannoseylated liposomes inhibit tumor growth by promoting the polarization of tumor-associated macrophages. *International Journal of Nanomedicine*, *14*, 3203–3220. <https://doi.org/10.2147/IJN.S207589>
- Yu, S. S., Lau, C. M., Barham, W. J., Onishko, H. M., Nelson, C. E., Li, H., Smith, C. A., Yull, F. E., Duvall, C. L., & Giorgio, T. D. (2013). Macrophage-Specific RNAi Targeting via ‘Click’, Mannosylated Polymeric Micelles. *Molecular pharmaceuticals*, *10*(3), 975–987. <https://doi.org/10.1021/mp300434e>

Zhou, J., Xu, Y., Wang, G., Mei, T., Yang, H., & Liu, Y. (2022). The TLR7/8 agonist R848 optimizes host and tumor immunity to improve therapeutic efficacy in murine lung cancer.

International Journal of Oncology, 61(1), 1–11. <https://doi.org/10.3892/ijo.2022.5371>

Zhou, W., Gao, X., Liu, D., & Chen, X. (2015). Gold Nanoparticles for In Vitro Diagnostics.

Chemical Reviews, 115(19), 10575–10636. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00100>

ANEXOS



Article

Scanning Tunneling Microscopy Study of Lipoic Acid, Mannose, and cRGD@AuNPs Conjugates

Andrés Rodríguez-Galván ^{1,*}, Mitzi Reyes ¹, Marisol Ávila-Cruz ¹, Margarita Rivera ² and Vladimir A. Basiuk ³

¹ Carrera de Biología, Unidad de Biomedicina, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Tlalnepantla 54090, Mexico; 316225425@iztacala.unam.mx (M.R.); biomar14sol@gmail.com (M.Á.-C.)

² Instituto de Física, Departamento de Materia Condensada, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán, Ciudad de México 04510, Mexico; mrivera@fisica.unam.mx

³ Instituto de Ciencias Nucleares, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior C.U., Ciudad de México 04510, Mexico; basiuk@nucleares.unam.mx

* Correspondence: andres.rodriguez@comunidad.unam.mx

Abstract: The functionalization of AuNPs with different biological elements was achieved to investigate their possibility in biomedical applications such as drug delivery, vaccine development, sensing, and imaging. Biofunctionalized AuNPs are pursued for applications such as drug delivery, vaccine development, sensing, and imaging. In this study, AuNPs with diameters of 20 nm were functionalized with lipoic acid, mannose, or the cRGD peptide. By using UV-vis spectroscopy, Fourier transform infrared spectroscopy, dynamic light scattering, transmission electron microscopy, and scanning tunneling microscopy techniques, we showed that AuNPs can be functionalized by these biomolecules in a reliable way to obtain conjugates to explore potential biomedical applications. In particular, we demonstrate that the STM technique can be employed to analyze biofunctionalized AuNPs, and the obtained information can be valuable in the design of biomedical applications.

Keywords: biofunctionalization; gold nanoparticles; lipoic acid; mannose; RGD cyclic peptide; scanning tunneling microscopy



Citation: Rodríguez-Galván, A.; Reyes, M.; Ávila-Cruz, M.; Rivera, M.; Basiuk, V.A. Scanning Tunneling Microscopy Study of Lipoic Acid, Mannose, and cRGD@AuNPs Conjugates. *Nanomaterials* **2023**, *13*, 2596. <https://doi.org/10.3390/nano13182596>

Academic Editor: Wen-Huei Chang

Received: 23 August 2023

Revised: 11 September 2023

Accepted: 13 September 2023

Published: 20 September 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Gold nanoparticles (AuNPs) are widely studied due to their interesting optical, thermal, and chemical properties that can be implemented for advanced biomedical applications [1]. In particular, they are promising platforms for molecular imaging, biomarker sensors, drug delivery, diagnostic, therapy (photon-induced), and theragnostics, among others. Several reports have shown the binding of peptides [2], proteins [3], nucleic acids [4], or carbohydrates [5] to AuNPs via ligand exchange, taking advantage of the strong thiol-gold interaction. The binding of biomolecules to AuNPs can improve their stability in physiological media and biodistribution and allows the design of conjugates with active targeting capability, which emerge due to the high specificity of biomolecules by specific biomarkers. These ligands help nanoparticles to target specific cells or tissues, improving the accumulation and biodistribution of loads (active drugs or contrast agents) compared with free loads [2,6].

Recently, the attachment of biomolecules on AuNP surfaces has been extensively studied, and several successful protocols have been reported [7]. In contrast, there is an open challenge over the orientation and assembly of the attached biomolecules. This is an important issue since the orientation, form (structure), and assembly of ligands on AuNPs can impact the biological activity and binding affinity of biomolecules; for example, the antigen-recognition Fv regions of immunoglobulin G should be correctly oriented on surfaces for effective antigen recognition [8]. Also, it is well known that the assembly of carbohydrates on cell surfaces can affect their interaction with proteins; e.g., when

carbohydrates are assembled into small clusters, their binding to proteins called lectins is more efficient than when they are isolated [9], because the number of simultaneous interactions formed between clusters of carbohydrates and recognition proteins are multiple and enhance the binding affinity compared with individual carbohydrates [9]. Liese and Netz [10] reported that the interaction of synthetic systems is most efficient when the size of the clusters of recognition of biomolecules is similar compared to the size of their receptor, and, also, that an excess of ligands does not improve the selectivity, i.e., there is not a linear correlation between the interaction and the number of ligands [11].

The direct visualization of the orientation and assembly of biological ligands on the surfaces of AuNPs can help to understand and tailor their biological behavior. Several techniques have been employed for the characterization of thiolated bounded ligands on AuNPs, such as inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), that has been used for the quantification of ligands [12], and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), which has been used for density packing analysis [13], and the adsorption of thiol molecules has been extensively studied using UV-visible spectroscopy (UV-vis) and *in silico* studies [14]. In particular, to elucidate the assembly of thiolated molecules, electron spin resonance (EPR), small-angle neutron scattering (SANS), mass spectrometry (MS), and nuclear magnetic resonance (NMR) have been employed [15]. However, for the direct visualization of biomolecules on AuNPs, scanning tunneling microscopy (STM) represents a viable alternative; for example, it has been widely employed for the analysis of biomolecules on metallic surfaces and the surfaces of nanomaterials. In particular, STM has been employed in the analysis of thiolate molecules on AuNPs and Ag nanoclusters, showing that these molecules can form patterns on AuNPs [15,16]. Also, many biomolecules such as lipids, carbohydrates, proteins, and nucleic acids have been imaged near molecular resolution on flat surfaces of Cu, Au, and highly ordered pyrolytic graphite (HOPG) [17]. In previous works, we employed STM to obtain information of individual organic molecules and proteins deposited on HOPG and the surfaces of carbon nanomaterials [18–20]. Also, conventional techniques employed in the analysis of biomolecules, such as circular dichroism (CD) or X-ray crystallography, present several limitations for the routine analysis of biofunctionalized nanoparticles, for example, the necessity of high concentrations of conjugates or the compulsory requirement of diffracting crystals [17].

By considering the importance of the orientation and assembly of biomolecules on surfaces of AuNPs, in this work, we analyzed the surfaces of functionalized AuNPs with lipoic acid (ALA@AuNPs), mannose (MAN@AuNPs), and the Arg-Gly-Asp cyclic peptide (cRGD@AuNPs). These biomolecules were selected since they might exhibit potential biomedical applications: ALA is an antioxidant biomolecule that has been used as a linker molecule for the attachment of drugs and proteins to AuNPs [21,22]; MAN is a carbohydrate that has been employed in the design of contrast agents for molecular imaging in cancer [5]; and cRGD has been widely employed for the active targeting of cancer cells [23]. The resulting information from this study will be of benefit in the development of biomodified nanomaterials and their potential applications.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

AuNPs of 20 nm diameter in citrate buffer (SC@AuNPs), lipoic acid (ALA), hydrochloric acid (HCl), sodium hydroxide (NaOH), and N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC) were obtained from Sigma-Aldrich (Mexico City, Mexico). The cRGD peptide (Cyclo(Arg-Ala-Asp-D-Phe-Lys-cCys)) was acquired from Peptides international (Louisville, KY, USA). 2-aminoethyl 2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -D-mannopyranoside hydrochloride (MAN) was obtained from Synthose Inc., (Concord, ON, Canada). Deionized water (18.2 M Ω cm) was used in all experiments.

2.2. ALA@AuNPs

Three milliliters (1 nM) of SC@AuNPs was washed three times at 11,500 rpm (30 min) and resuspended in deionized water (pH 11). Then, 2.5 mL (1 nM) of washed nanoparticles was incubated with 250 μ L of ALA (10 mM) at constant stirring (3000 rpm, 48 h at room temperature). The excess of ALA was removed by centrifugation (11,500 rpm, 30 min) and then resuspended in deionized water at pH 7 and adjusted to 1 nM of AuNPs.

2.3. MAN@AuNPs

For the preparation of the MAN@AuNPs conjugates, 1 mL (1 nM) of ALA@AuNPs, 2 μ L of MAN (100 mg/mL, in ethanol), and 10 μ L of EDC (40 mM, pH 6.5) were mixed and incubated at constant stirring (3000 rpm, 48 h). Then, the conjugate was washed three times in deionized water at pH 11 and left in basic hydrolysis for 24 h.

2.4. cRGD@AuNPs

For the preparation of the cRGD@AuNPs conjugate, 1 mL of SC@AuNPs (1 nM, pH 7) was mixed with 2 μ L of cRGD (100 mg/mL) and incubated at constant stirring (3000 rpm, 24 h). Then, cRGD@AuNPs were washed three times in deionized water and left in water at pH 7.

2.5. Characterization

UV-Vis spectra (300–700 nm) were recorded in a Beckman Coulter DU-530 (Life science) with quartz cuvettes (1 cm). The hydrodynamic diameter and Z-potential were recorded in a Zetasizer Nano ZSP analyzer (HeNe laser (633 nm, 5 mW), Malvern, Worcestershire, UK). Fourier transform infrared spectroscopy coupled to ATR analysis were recorded on a Perkin-Elmer Spectrum 100 spectrometer (Perkin Elmer, Akron, OH, USA). For this analysis, samples were deposited by drop casting on the ATR crystal. The microscopy analysis was performed in a JEM-2010F FASTEM JEOL coupled to a NORAN energy dispersive spectrophotometer (EDS) operating at 200 kV. For this analysis, the conjugates (SC-AuNPs, ALA@AuNPs, MAN@AuNPs, or cRGD@AuNPs) were prepared by depositing a drop of the samples onto carbon-coated copper grids (Ted Pella, Redding, CA, USA) and allowed to dry at room temperature overnight. The recorded images were analyzed using the software ImageJ version 1.54d (NIH, Wayne Rasband), and the statistical analysis was performed with the Origin Pro 2023b software (Northampton, MA, USA).

STM measurements were carried out in a NaoiSTM system (Nanosurf AG, Liestal, Switzerland). The analysis was carried out at room temperature using mechanically cut Pt/Ir tips of 0.25 mm diameter (Nanosurf AG, Liestal, Switzerland). For the analyses, 50 μ L of each sample was drop-casted onto a freshly cleaved HOPG substrate (5 \times 5 \times 2 mm, grade ZYB). The deposited samples were incubated for 30 min, washed with 2 mL of deionized water, and dried overnight in a vacuum. The STM images were analyzed by using the Nanotec Electronica WSxM 5.0 (Madrid, Spain) software [24].

3. Results

The UV-Vis spectroscopy results showed that SC@AuNPs and biofunctionalized samples ALA@AuNPs, MAN@AuNPs, and cRGD@AuNPs exhibited a strong absorbance band in the visible region at 523 nm without broadening, suggesting that the conjugates were stable after functionalization. The DLS measurement showed small differences; the diameters of SC@AuNPs and ALA@AuNPs were similar, 31.7 ± 0.11 nm and 31.9 ± 0.13 nm, respectively. After biofunctionalization with MAN, the size increased to 37.7 ± 0.81 nm, suggesting it was due to the covalent attachment of MAN. The size of the cRGD@AuNPs decreased to 29.5 ± 0.37 nm, a small change compared to the starting gold nanoparticles with sodium citrate. The size analysis showed that the conjugates and SC@AuNPs were moderately polydispersed (PDI 0.3–0.4); in particular, ALA@AuNPs and MAN@AuNPs showed a wider size distribution in comparison with SC@AuNPs and cRGD@AuNPs. Z potential analysis showed that the conjugates increased their negativity after biofunc-

tionalization as follows: cRGD@AuNPs > MAN@AuNPs > ALA@AuNPs > SC@AuNPs (Figure 1, right column). These results suggest that the biomolecules contribute to the increased negativity. ALA can be attached to gold nanoparticles via the dithiol ring, with the carboxylic acid exposed to solution; the covalent binding of MAN to ALA increased the number of electronegative atoms on the AuNPs surface, and the binding of cRGD to AuNPs also increased the number of electronegative atoms on the surface.

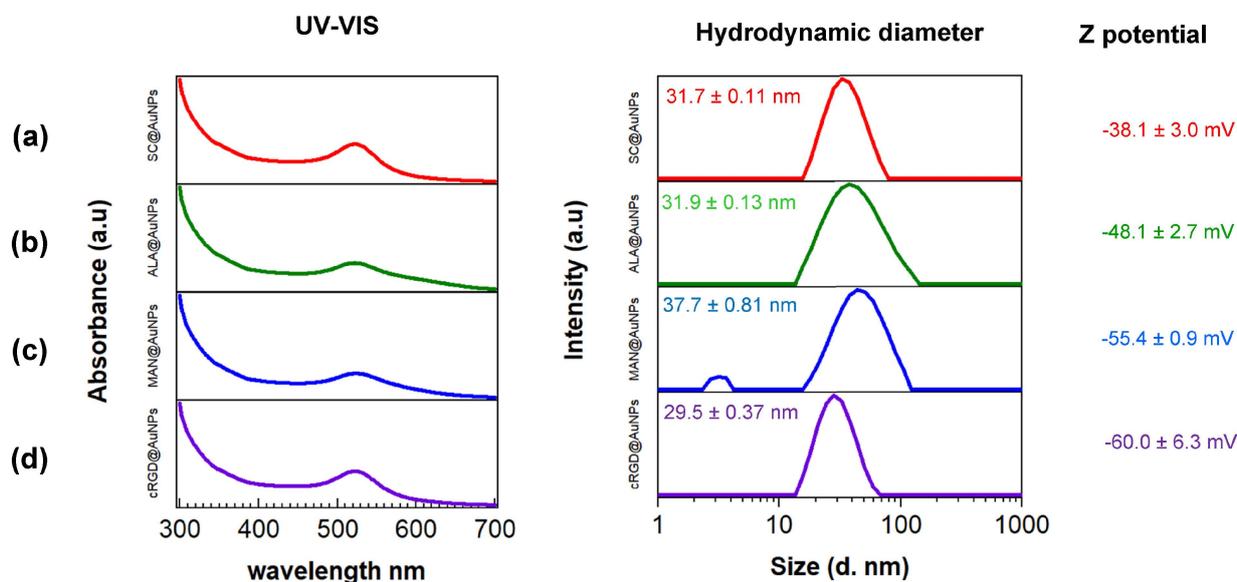


Figure 1. UV-Vis and DSL analysis of: (a) SC@AuNPs, (b) ALA@AuNPs, (c) MAN@AuNPs, and (d) cRGD@AuNPs. UV-VIS (left column), hydrodynamic diameter (middle column), and Z-potential (right column). All the measurements were conducted in deionized water at pH 11.0 by using NaOH (1 M). The color code of the surface coating is as follows: SC (red), ALA (green), MAN (blue), and cRGD (purple).

To confirm the presence of biomolecules on AuNPs, FT-IR experiments were performed. The SC@AuNPs (Figure 2a) showed a peak at 3300 cm^{-1} that was assigned to OH stretching, one peak at 2916 cm^{-1} that was assigned to CH_2 , one peak at 1420 cm^{-1} assigned to carboxylic groups, and a peak at 1002 cm^{-1} assigned to CO; all these groups are present in sodium citrate [5]. The ALA@AuNPs (Figure 2b) showed one peak at 1730 cm^{-1} assigned to C=O double bond stretching, a peak at 2850 cm^{-1} assigned to CH_2 symmetric stretching, and a peak at 2916 cm^{-1} assigned to CH_2 asymmetric stretching; these peaks suggested the presence of ALA molecules [5]. After the covalent bond of MAN to ALA molecules attached to AuNPs, MAN@AuNPs (Figure 2c) showed a spectrum with three peaks at 1140 , 1045 , and 1082 cm^{-1} that suggested the presence of pyranose rings; meanwhile, the peak at 1738 cm^{-1} was assigned to the asymmetric vibration of C=O [25]. The peak at 1631 cm^{-1} was assigned to C=O and C-N stretching. Meanwhile, the peak at 1567 cm^{-1} suggested in-plane N-H bending and C-N stretching, and the C-O-C asymmetric frequency was placed between 1368 and 1045 cm^{-1} . Finally, the peak at 1221 cm^{-1} was assigned to C-N stretching, and the peak at 1045 cm^{-1} was related to C-O stretching. The cRGD@AuNPs showed a peak at 3295 that was assigned to the N-H stretching of Amide A, one peak at 1673 cm^{-1} was assigned to the stretching band of C=O of Amide I, and the peak at 1563 cm^{-1} was assigned to the C-N stretching and N-H bending of amide II; meanwhile, the peak at 777 cm^{-1} was assigned to the out-of-plane N-H bending. As a whole, the FTIR analysis suggested the presence of each one of the biomolecules employed for biofunctionalization [26].

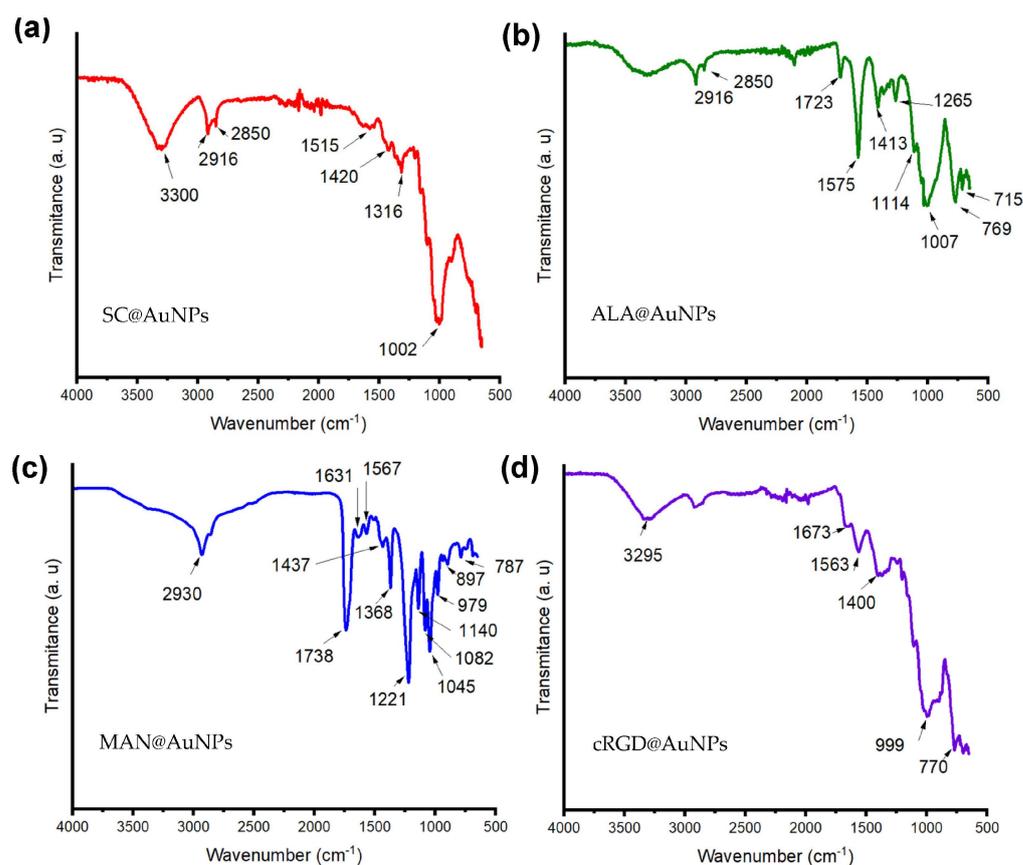


Figure 2. Attenuated total reflection Fourier transform infrared (ATR-FTIR) spectra of (a) SC@AuNPs, (b) ALA@AuNPs, (c) MAN@AuNPs, and (d) cRGD@AuNPs. The color code of the surface coating is as follows: SC (red), ALA (green), MAN (blue), and cRGD (purple).

Transmission electron microscopy images of the biofunctionalized nanoparticles are shown in Figure 3. All the conjugates were spherical, and no changes in size and morphology occurred after biofunctionalization. The histograms of size distribution are shown in Figure 3e. However, there was the presence of a low-electron-density halo around ALA@AuNPs, MAN@AuNPs, and cRGD@AuNPs (see Figure 3b–d). This material was associated with the presence of ALA, MAN, and cRGD on the surface of the AuNPs. The size of the coat for ALA was near 1.07 nm, for MAN near 3.72 nm, and for cRGD 4.8 nm. The elemental analysis of the conjugates confirmed the presence of gold as well as N and S, and the gold was related to AuNPs; meanwhile, the other elements were related to ALA, MAN, and cRGD.

Although TEM imaging suggested the adsorption of ALA, MAN, and cRGD molecules onto the surfaces of the AuNPs, it did not allow us to resolve finer structural details. For this purpose, the STM technique was explored to analyze the conjugates. We used HOPG as a substrate for the analysis since it may have advantages over metallic substrates. It was reported that the thiolated protecting coat of gold nanoparticles can redistribute on the Au(111) surface in minutes and form islands [27]. Also, HOPG consists of high-quality defect-free graphene layers that provide clean and atomically flat surfaces suitable for material depositions, it is easily cleaved [17], and the defects are easy to recognize and differentiate from gold nanoparticles.

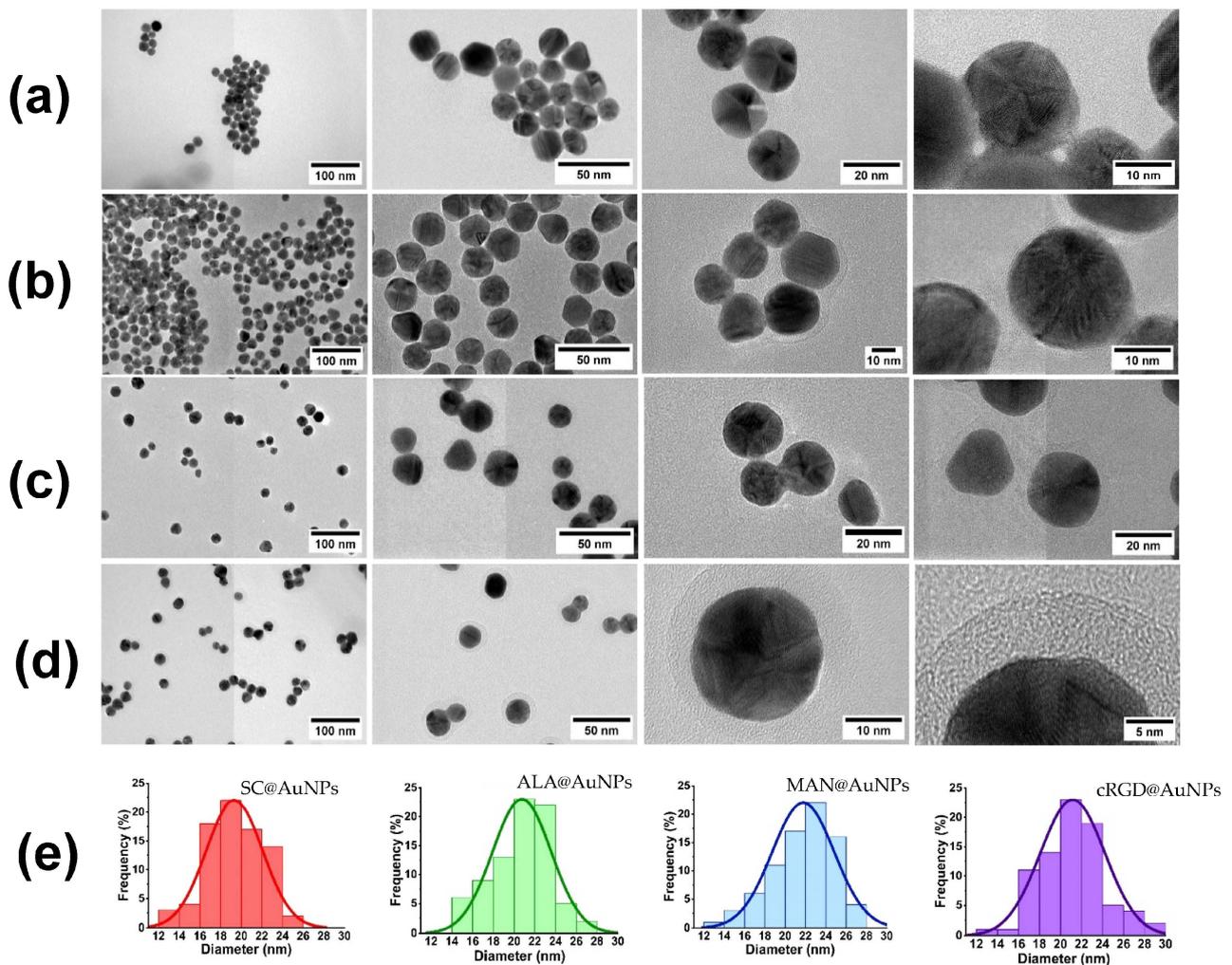


Figure 3. Sequences of transmission electron microscopy images and size histogram distribution for (a) SC@AuNPs, (b) ALA@AuNPs, (c) MAN@AuNPs, and (d) cRGD@AuNPs. (e) Histograms are indicated by the color code of the surface coating as follows: SC (red), ALA (green), MAN (blue), and cRGD (purple).

The SC@AuNPs showed large agglomerates of densely packed particles, in addition to sparse individual nanoparticles. Before STM analysis, these particles were washed several times, and throughout the process, the stabilizing citrate was washed off, decreasing the repulsive forces which maintain the stability of gold nanoparticles. Cross-sectional analysis of these samples showed diameters between 18 and 22 nm (Figure 4c,f,i) and 3 and 5 nm high. A smooth surface was observed after analyzing the conjugates at high resolution. The images of the ALA@AuNPs showed densely packed nanoparticles with evident borders between the nanoparticles as compared to SC@AuNPs. These particles are 25 to 28 nm long and 3 to 6 nm high (see Figure 5c,f). The analysis of individual nanoparticles also showed the presence of terraces. In addition, the cross-sectional analysis of particles under these conditions showed that the surface was not smooth (see Figure 5i). It is important to mention that ALA@AuNPs exhibited an ellipsoid shape that is characteristic of gold nanoparticles on flat surfaces, as seen with STM, which was not as evident for the SC@AuNPs. The images of MAN@AuNPs showed a pattern similar to ALA@AuNPs; however, it was more evident, even at high magnifications (Figure 6d). These particles showed a size between 20 and 25 nm long and 1 and 2 nm high. Finally, the cRGD@AuNPs showed the presence of a large number of individual nanoparticles with dimensions of 10 to 22 nm long and 3 to 8 nm high (Figure 7). The images showed the ellipsoid form

despite the densely packed aggregation of the particles in contrast to the SC@AuNPs and MAN@AuNPs.

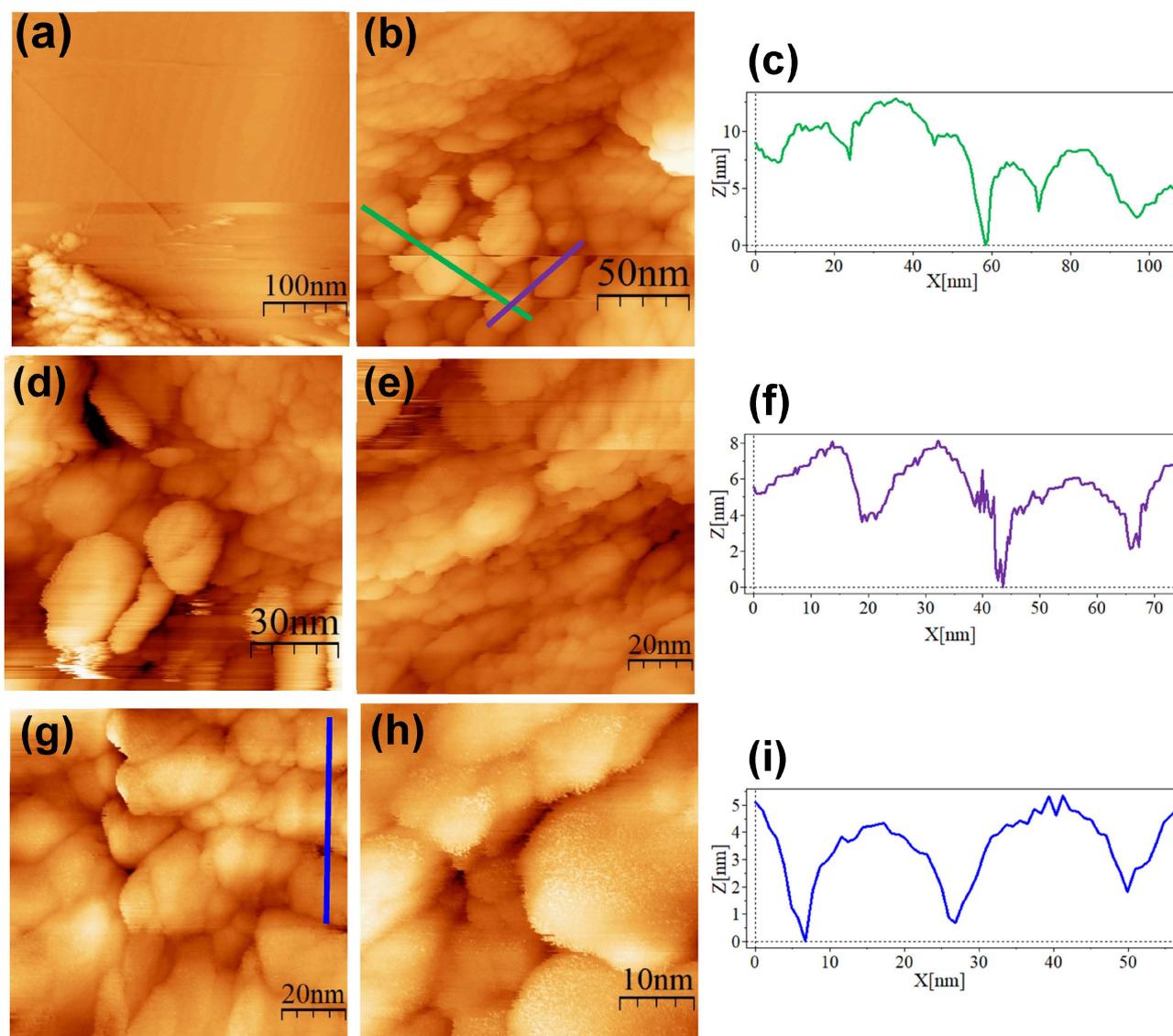


Figure 4. STM topographic images of SC@AuNPs deposited onto bare HOPG. STM imaging parameters: (a) ($400 \times 400 \text{ nm}^2$, $V_s = 0.5 \text{ V}$, $I = 1.0 \text{ nA}$, time/line: 0.382 s); (b) ($181 \times 181 \text{ nm}^2$, $V_s = 0.5 \text{ V}$, $I = 1.0 \text{ nA}$, time/line: 0.3 s); (c) profile corresponding to the blue line in (b); (d) ($114 \times 114 \text{ nm}^2$, $V_s = 0.5 \text{ V}$, $I = 1.0 \text{ nA}$, time/line: 0.3 s); (e) ($103 \times 103 \text{ nm}^2$, $V_s = 0.5 \text{ V}$, $I = 1.0 \text{ nA}$, time/line: 0.3 s); (f) profile corresponding to the green line in (b); (g) ($103 \times 103 \text{ nm}^2$, $V_s = 0.5 \text{ V}$, $I = 1.0 \text{ nA}$, time/line: 0.382 s); (h) ($44.3 \times 44.3 \text{ nm}^2$, $V_s = 0.5 \text{ V}$, $I = 1.0 \text{ nA}$, time/line: 0.3 s); (i) profile corresponding to the blue line in (g).

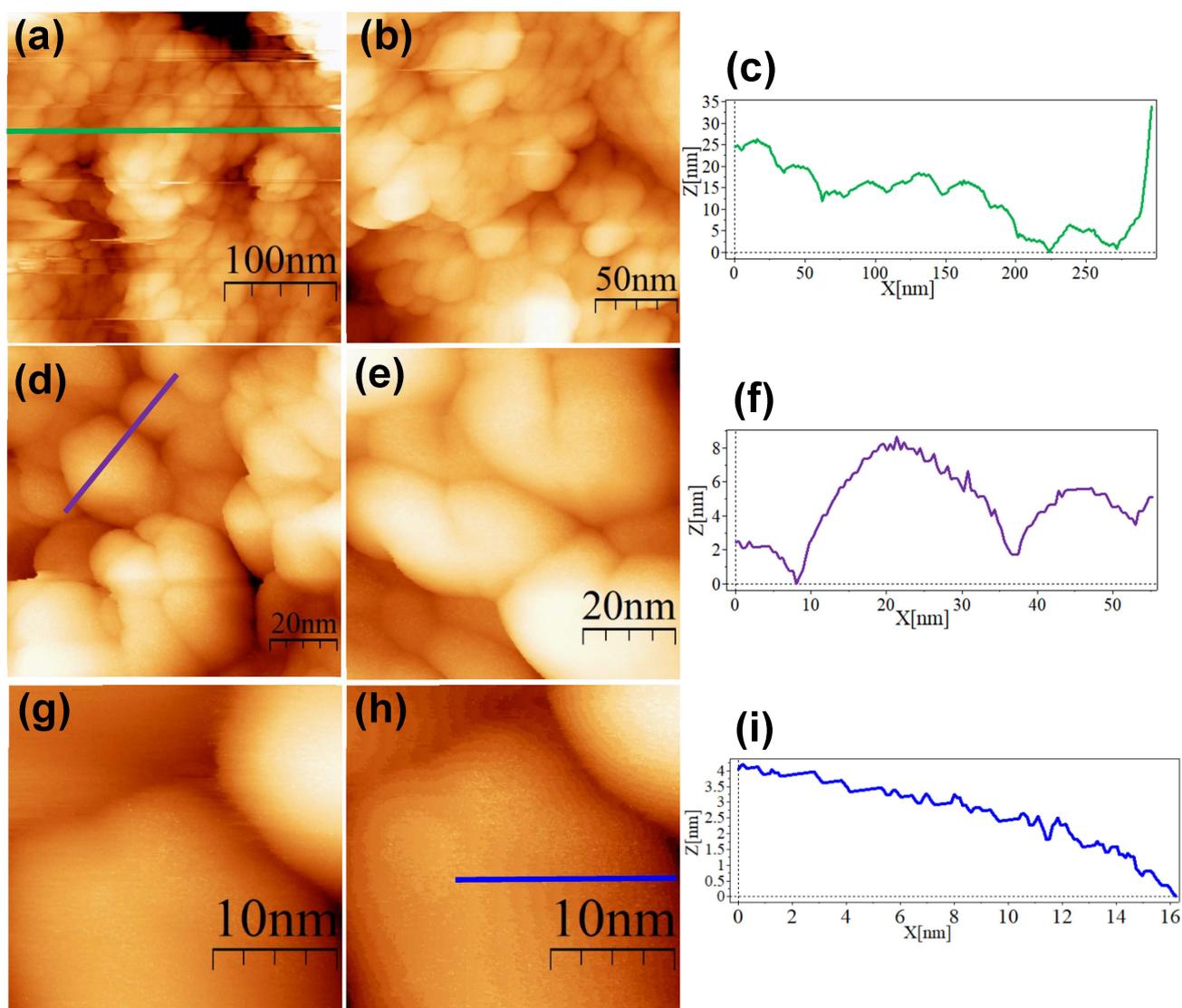


Figure 5. STM topographic images of ALA@AuNPs deposited onto bare HOPG. STM imaging parameters: (a) $300 \times 300 \text{ nm}^2$, $V_s = 0.5 \text{ V}$, $I = 1.0 \text{ nA}$, time/line: 0.3 s); (b) $200 \times 200 \text{ nm}^2$, $V_s = 0.5 \text{ V}$, $I = 1.0 \text{ nA}$, time/line: 0.3 s); (c) profile corresponding to the blue line in (a); (d) $97.3 \times 97.3 \text{ nm}^2$, $V_s = 0.5 \text{ V}$, $I = 1.0 \text{ nA}$, time/line: 0.3 s); (e) $70.9 \times 70.9 \text{ nm}^2$, $V_s = 0.5 \text{ V}$, $I = 1.0 \text{ nA}$, time/line: 0.3 s); (f) profile corresponding to the blue line in (d); (g) $26.6 \times 26.6 \text{ nm}^2$, $V_s = 0.5 \text{ V}$, $I = 1.0 \text{ nA}$, time/line: 0.3 s); (h) $26.6 \times 26.6 \text{ nm}^2$, $V_s = 0.5 \text{ V}$, $I = 1.0 \text{ nA}$, time/line: 0.3 s); (i) profile corresponding to the blue line in (h).

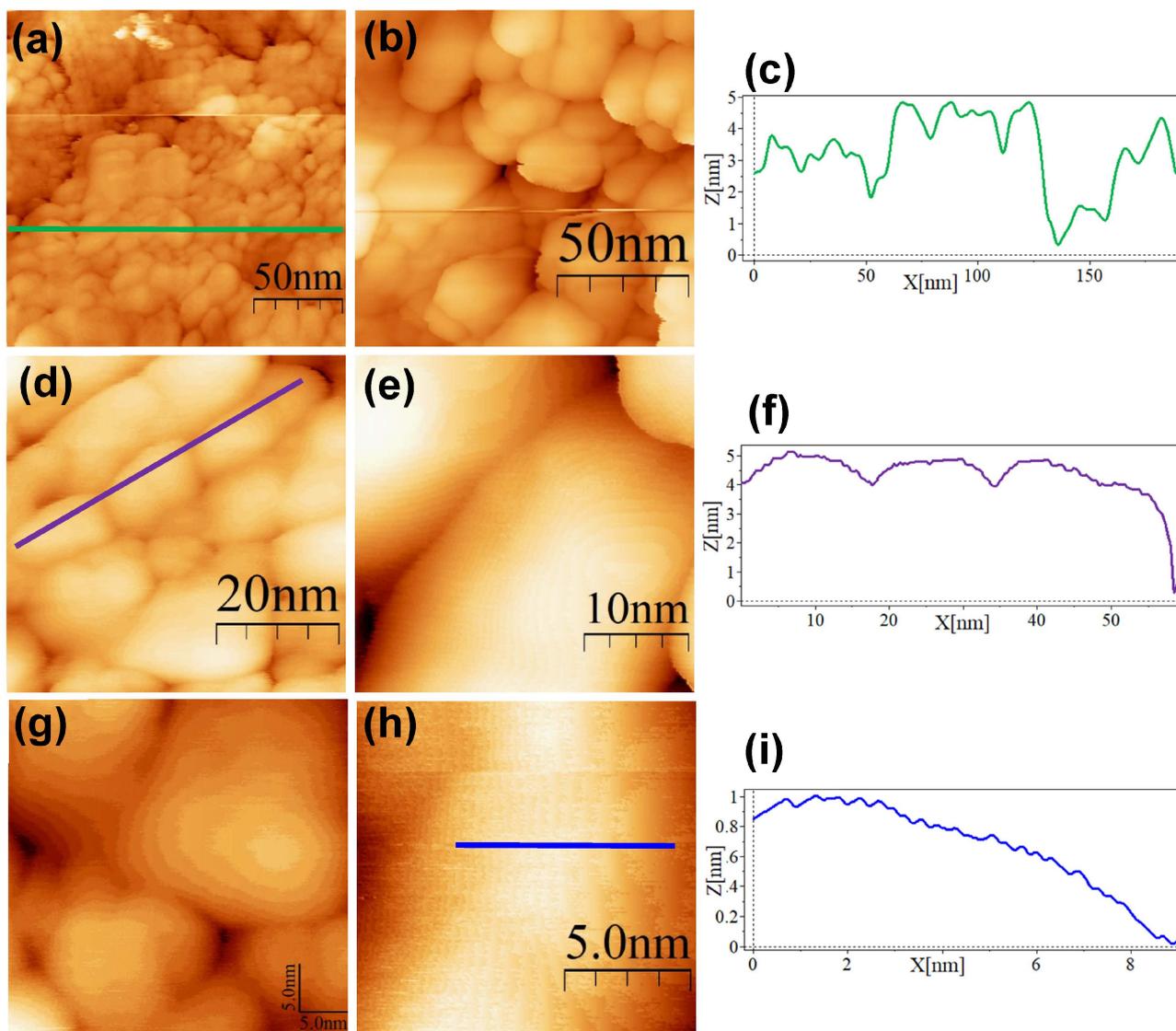


Figure 6. STM topographic images of MAN@AuNPs deposited onto bare HOPG. STM imaging parameters: (a) ($189 \times 189 \text{ nm}^2$, $V_s = 0.5 \text{ V}$, $I = 1.0 \text{ nA}$, time/line: 0.365 s); (b) ($128 \times 128 \text{ nm}^2$, $V_s = 0.5 \text{ V}$, $I = 1.0 \text{ nA}$, time/line: 0.365 s); (c) profile corresponding to the blue line in (a); (d) ($54.7 \times 54.7 \text{ nm}^2$, $V_s = 0.5 \text{ V}$, $I = 1.0 \text{ nA}$, time/line: 0.365 s); (e) ($32 \times 32 \text{ nm}^2$, $V_s = 0.5 \text{ V}$, $I = 1.0 \text{ nA}$, time/line: 0.365 s); (f) profile corresponding to the blue line in (d); (g) ($35 \times 35 \text{ nm}^2$, $V_s = 0.5 \text{ V}$, $I = 1.0 \text{ nA}$, time/line: 0.365 s); (h) ($13.3 \times 13.3 \text{ nm}^2$, $V_s = 0.4 \text{ V}$, $I = 1.0 \text{ nA}$, time/line: 0.365 s); (i) profile corresponding to the blue line in (h).

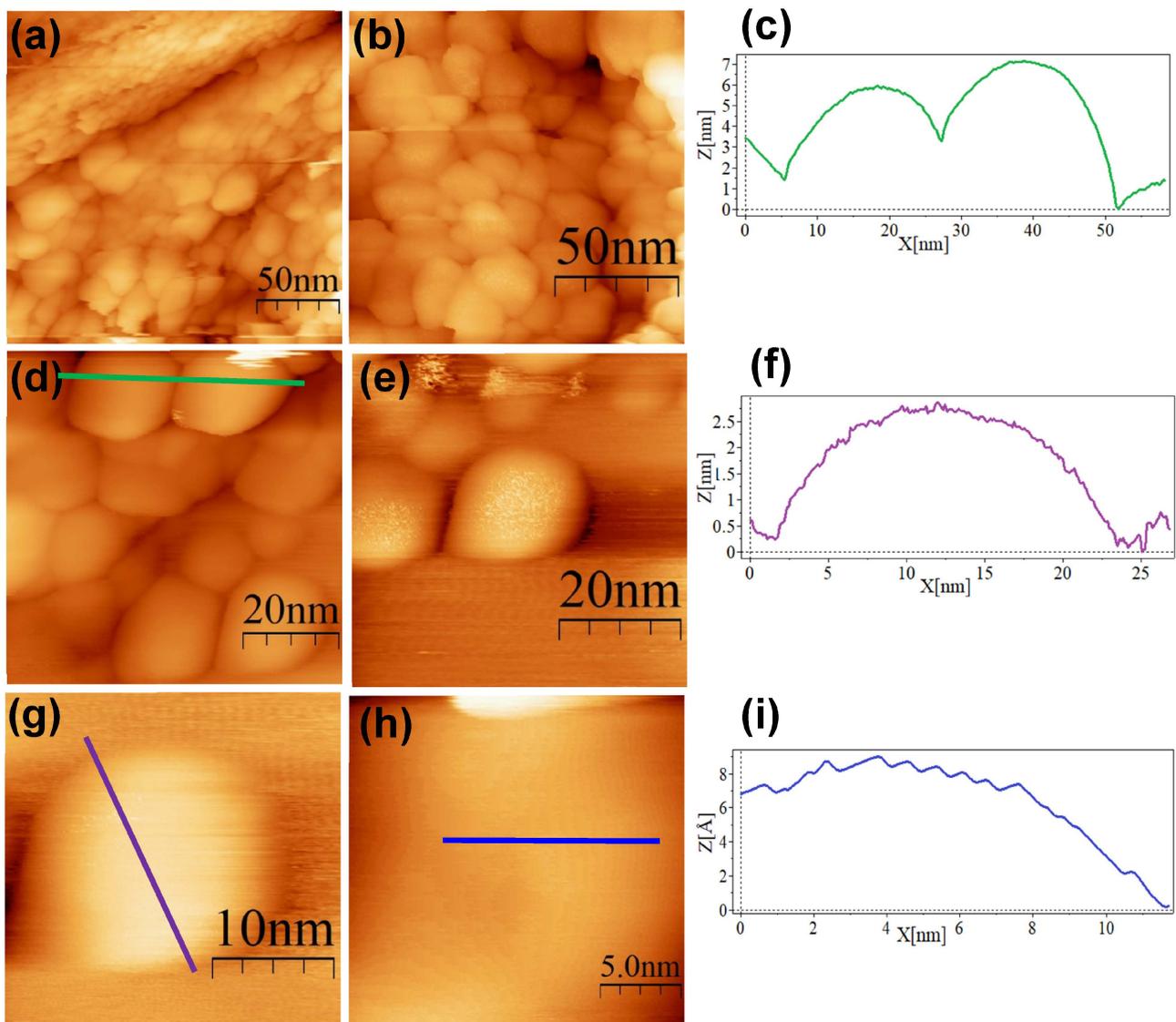


Figure 7. STM topographic images of cRGD@AuNPs deposited onto bare HOPG. STM imaging parameters: (a) ($200 \times 200 \text{ nm}^2$, $V_s = 0.5 \text{ V}$, $I = 1.0 \text{ nA}$, time/line: 0.4 s); (b) ($134 \times 134 \text{ nm}^2$, $V_s = 0.5 \text{ V}$, $I = 1.0 \text{ nA}$, time/line: 0.4 s); (c) profile corresponding to the blue line in (d); (d) ($69.1 \times 69.1 \text{ nm}^2$, $V_s = 0.5 \text{ V}$, $I = 1.0 \text{ nA}$, time/line: 0.399 s); (e) ($54.6 \times 54.6 \text{ nm}^2$, $V_s = 0.5 \text{ V}$, $I = 1.0 \text{ nA}$, time/line: 0.399 s); (f) profile corresponding to the blue line in (g); (g) ($27.3 \times 27.3 \text{ nm}^2$, $V_s = 0.5 \text{ V}$, $I = 1.0 \text{ nA}$, time/line: 0.399 s); (h) ($20.4 \times 20.4 \text{ nm}^2$, $V_s = 0.5 \text{ V}$, $I = 1.0 \text{ nA}$, time/line: 0.4 s); (i) profile corresponding to the blue line in (h).

4. Discussion

In this work, gold nanoparticles 20 nm in diameter were covered with thiolated biomolecules via S-Au bonds. This is a post synthesis methodology, well known as ligand exchange, where sodium citrate from the initial nanoparticles is exchanged by the thiolated molecules. It is important to mention that the exposed molecules at the interface determine the chemical and biological properties of the conjugates. Our results showed that the nanoparticles were stable after ALA, MAN, or cRGD modification, as confirmed by UV-Vis. The incorporation of functional groups provided by these molecules, as suggested by the FTIR analysis, can help to maintain the stability of these colloids in water, for example, allowing the formation of hydrogen bonds and electrostatic repulsion interactions. For biomedical applications, the stability of AuNPs is compulsory as it plays an important role in determining their toxicity [28]. Here, the stability was

analyzed after synthesis and in water at pH 11. The size of the AuNPs after functionalization showed small changes due to the adsorption of the biomolecules compared to the initial AuNPs stabilized with sodium citrate (SC@AuNPs). In contrast, the Z potential showed that the conjugates increased their negativity after biofunctionalization: cRGD@AuNPs > MAN@AuNPs > ALA@AuNPs > SC@AuNPs. The change in the electronegativity of the conjugates can be attributed to the presence of aspartic acid amino acids (D) for cRGD, electronegative oxygens for MAN, and carboxylic acids for ALA. The size and charge of the nanoparticles are significant parameters as it was reported that these physicochemical parameters can influence the in vitro and in vivo behavior of functionalized gold nanoparticles, i.e., the in vitro uptake and the in vivo biodistribution [29].

Our TEM images showed the presence of a low-density coating around ALA@AuNPs, MAN@AuNPs, and cRGD@AuNPs, suggesting the presence of the biomolecules [30]. In addition, no aggregates were observed, which indicates that the nanoparticles' modification state diminished their aggregation behavior. On the other hand, our STM analysis showed that it is a viable microscopy technique for the characterization of biofunctionalized AuNPs. The STM images showed an aspherical morphology that was more evident for ALA@AuNPs and cRGD@AuNPs than for SC@AuNPs and MAN@AuNPs. The presence of free material could affect the morphology resolution in the MAN@AuNP case, the bonding reaction required mannose and EDC in excess, and even after several centrifugation washes, some residual material could be present, affecting the imaging of individual nanoparticles. Also, in the SC@AuNPs case, the presence of free molecules of sodium citrate could affect the resolution of individual molecules. The size of the nanoparticles measured by cross-sectional analyses showed particles with diameters longer than 20 nm, which can be attributed to the biomolecules attached to the AuNPs, as seen by TEM. A high-resolution analysis of the biomolecular coating of our as-synthesized conjugates was not achieved in our study. STM is a very sensitive technique, and several factors can limit its resolution power when analyzing biofunctionalized gold nanoparticles: the presence of free material can contaminate the tip, degrading its ability to produce images of high resolution; the mobility of the nanoparticles is another parameter that can affect an STM study. In our analysis, the mobility of individual nanoparticles on the HOPG substrate made it difficult to analyze their surfaces at a high resolution. Previous studies have reported the attachment of AuNPs on gold surfaces, which improved their analysis [15]. In addition, we employed the drop-cast technique for deposition, and we observed the formation of large agglomerates; in contrast, the deposition of monolayers can help to resolve individual AuNPs at a high resolution. In general, the previously mentioned parameters should be considered for the analysis of gold nanoparticles functionalized with biomolecules. Finally, the analysis of individual biomolecules as lipids, carbohydrates, proteins, or nucleic acids onto flat substrates is a complex task, and, moreover, the analysis of biomolecules on the surface of AuNPs represents an extreme challenge [17].

5. Conclusions

The biofunctionalization of AuNPs with lipoic acid, mannose, and the cRGD peptide via the formation of the Au-S bond via ligand exchange is a reliable method to obtain conjugates with potential biomedical applications. Combining several analytical techniques, the as-synthesized conjugates are described as stable without evidence of aggregation. Our preliminary studies using STM demonstrate that this technique can be employed to analyze biofunctionalized AuNPs; however, several parameters, such as the elimination of free ligands, the reduction in mobility, and the deposition of monolayers, should be optimized for the analysis of the surfaces of bioconjugates at a high resolution. The biofunctionalized nanoparticles with lipoic acid, mannose, and the cRGD peptide can also be conjugated with drugs and/or contrast agents. Also, it was shown that the STM can be used as a complementary technique for the characterization of biofunctionalized nanoparticles. Furthermore, the STM is a versatile technique that can be used for the electronic characterization of conjugates and the analysis of samples in physiological solutions.

Author Contributions: Conceptualization, A.R.-G.; methodology, M.R. (Mitzi Reyes), M.Á.-C. and A.R.-G.; validation, A.R.-G.; formal analysis, M.R. (Mitzi Reyes), M.Á.-C. and A.R.-G.; investigation, M.R. (Mitzi Reyes), M.Á.-C. and A.R.-G.; resources, A.R.-G.; data curation, A.R.-G.; writing—original draft preparation, A.R.-G.; writing—review and editing, M.R. (Margarita Rivera), A.R.-G. and V.A.B.; funding acquisition, A.R.-G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Financial support from the National Autonomous University of Mexico (UNAM; Grant DGAPA-PAPIIT IA204521).

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors thank Alejandro Heredia Barbero for his technical assistance with the FTIR analysis and Fís. Roberto Hernández for HRTEM imaging.

Conflicts of Interest: No conflicts of interest exist in the submission of this manuscript.

References

1. Anik, M.I.; Mahmud, N.; Al Masud, A.; Hasan, M. Gold Nanoparticles (GNPs) in Biomedical and Clinical Applications: A Review. *Nano Sel.* **2022**, *3*, 792–828. [[CrossRef](#)]
2. Amina, S.J.; Guo, B. A Review on the Synthesis and Functionalization of Gold Nanoparticles as a Drug Delivery Vehicle. *Int. J. Nanomed.* **2020**, *15*, 9823–9857. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Fan, L.; Wang, W.; Wang, Z.; Zhao, M. Gold Nanoparticles Enhance Antibody Effect through Direct Cancer Cell Cytotoxicity by Differential Regulation of Phagocytosis. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 6371. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Wang, C.; Zhang, H.; Zeng, D.; San, L.; Mi, X. DNA Nanotechnology Mediated Gold Nanoparticle Conjugates and Their Applications in Biomedicine. *Chin. J. Chem.* **2016**, *34*, 299–307. [[CrossRef](#)]
5. Estudiante-Mariquez, O.J.; Rodríguez-Galván, A.; Ramírez-Hernández, D.; Contreras-Torres, F.F.; Medina, L.A. Technetium-Radiolabeled Mannose-Functionalized Gold Nanoparticles as Nanoprobes for Sentinel Lymph Node Detection. *Molecules* **2020**, *25*, 1982. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Ghosh, P.; Han, G.; De, M.; Kim, C.K.; Rotello, V.M. Gold Nanoparticles in Delivery Applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60*, 1307–1315. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Lee, J.W.; Choi, S.-R.; Heo, J.H. Simultaneous Stabilization and Functionalization of Gold Nanoparticles via Biomolecule Conjugation: Progress and Perspectives. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2021**, *13*, 42311–42328. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Iijima, M.; Somiya, M.; Yoshimoto, N.; Niimi, T.; Kuroda, S. Nano-Visualization of Oriented-Immobilized IgGs on Immunosensors by High-Speed Atomic Force Microscopy. *Sci. Rep.* **2012**, *2*, 790. [[CrossRef](#)]
9. Adak, A.K.; Lin, H.-J.; Lin, C.-C. Multivalent Glycosylated Nanoparticles for Studying Carbohydrate–Protein Interactions. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 5563–5573. [[CrossRef](#)]
10. Liese, S.; Netz, R.R. Quantitative Prediction of Multivalent Ligand–Receptor Binding Affinities for Influenza, Cholera, and Anthrax Inhibition. *ACS Nano* **2018**, *12*, 4140–4147. [[CrossRef](#)]
11. Tjandra, K.C.; Thordarson, P. Multivalency in Drug Delivery—When Is It Too Much of a Good Thing? *Bioconjug. Chem.* **2019**, *30*, 503–514. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Hinterwirth, H.; Kappel, S.; Waitz, T.; Prohaska, T.; Lindner, W.; Lämmerhofer, M. Quantifying Thiol Ligand Density of Self-Assembled Monolayers on Gold Nanoparticles by Inductively Coupled Plasma–Mass Spectrometry. *ACS Nano* **2013**, *7*, 1129–1136. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Volkert, A.A.; Subramaniam, V.; Ivanov, M.R.; Goodman, A.M.; Haes, A.J. Salt-Mediated Self-Assembly of Thiocetic Acid on Gold Nanoparticles. *ACS Nano* **2011**, *5*, 4570–4580. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Grönbeck, H.; Curioni, A.; Andreoni, W. Thiols and Disulfides on the Au(111) Surface: The Headgroup–Gold Interaction. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 3839–3842. [[CrossRef](#)]
15. Ong, Q.; Luo, Z.; Stellacci, F. Characterization of Ligand Shell for Mixed-Ligand Coated Gold Nanoparticles. *Acc. Chem. Res.* **2017**, *50*, 1911–1919. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Zhou, Q.; Kaappa, S.; Malola, S.; Lu, H.; Guan, D.; Li, Y.; Wang, H.; Xie, Z.; Ma, Z.; Häkkinen, H.; et al. Real-Space Imaging with Pattern Recognition of a Ligand-Protected Ag 374 Nanocluster at Sub-Molecular Resolution. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 2948. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Rodríguez-Galván, A.; Contreras-Torres, F.F. Scanning Tunneling Microscopy of Biological Structures: An Elusive Goal for Many Years. *Nanomaterials* **2022**, *12*, 3013. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Rodríguez-Galván, A.; Heredia, A.; Amelines-Sarria, O.; Rivera, M.; Medina, L.A.; Basiuk, V.A. Non-Covalent Attachment of Silver Nanoclusters onto Single-Walled Carbon Nanotubes with Human Serum Albumin as Linking Molecule. *Appl. Surf. Sci.* **2015**, *331*, 271–277. [[CrossRef](#)]
19. Rodríguez-Galván, A.; Amelines-Sarria, O.; Rivera, M.; del Pilar Carreón-Castro, M.; Basiuk, V.A. Adsorption and Self-Assembly of Anticancer Antibiotic Doxorubicin on Single-Walled Carbon Nanotubes. *Nano* **2015**, *11*, 1650038. [[CrossRef](#)]

20. Rodríguez-Galván, A.; Heredia, A.; Plascencia-Villa, G.; Ramírez, O.T.; Palomares, L.A.; Basiuk, V.A. Scanning Tunneling Microscopy of Rotavirus VP6 Protein Self-Assembled into Nanotubes and Nanospheres. *J. Scanning Probe Microsc.* **2008**, *3*, 25–31. [[CrossRef](#)]
21. Dzwonek, M.; Załubiniak, D.; Piątek, P.; Cichowicz, G.; Męczynska-Wielgosz, S.; Stępkowski, T.; Kruszewski, M.; Więckowska, A.; Bilewicz, R. Towards Potent but Less Toxic Nanopharmaceuticals—Lipoic Acid Bioconjugates of Ultrasmall Gold Nanoparticles with an Anticancer Drug and Addressing Unit. *RSC Adv.* **2018**, *8*, 14947–14957. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Abad, J.M.; Mertens, S.F.L.; Pita, M.; Fernández, V.M.; Schiffrin, D.J. Functionalization of Thioctic Acid-Capped Gold Nanoparticles for Specific Immobilization of Histidine-Tagged Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 5689–5694. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Gajbhiye, K.R.; Gajbhiye, V.; Siddiqui, I.A.; Gajbhiye, J.M. cRGD Functionalised Nanocarriers for Targeted Delivery of Bioactives. *J. Drug Target.* **2019**, *27*, 111–124. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Horcas, I.; Fernández, R.; Gómez-Rodríguez, J.M.; Colchero, J.; Gómez-Herrero, J.; Baro, A.M. WSXM: A Software for Scanning Probe Microscopy and a Tool for Nanotechnology. *Rev. Sci. Instrum.* **2007**, *78*, 013705. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Hong, T.; Yin, J.-Y.; Nie, S.-P.; Xie, M.-Y. Applications of Infrared Spectroscopy in Polysaccharide Structural Analysis: Progress, Challenge and Perspective. *Food Chem. X* **2021**, *12*, 100168. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Krimm, S.; Bandekar, J. Vibrational Spectroscopy and Conformation of Peptides, Polypeptides, and Proteins. In *Advances in Protein Chemistry*; Anfinsen, C.B., Edsall, J.T., Richards, F.M., Eds.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 1986; Volume 38, pp. 181–364.
27. Pensa, E.; Albrecht, T. Controlling the Dynamic Instability of Capped Metal Nanoparticles on Metallic Surfaces. *J. Phys. Chem. Lett.* **2018**, *9*, 57–62. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Wang, L.; Wu, W.-M.; Bolan, N.S.; Tsang, D.C.W.; Li, Y.; Qin, M.; Hou, D. Environmental Fate, Toxicity and Risk Management Strategies of Nanoplastics in the Environment: Current Status and Future Perspectives. *J. Hazard. Mater.* **2021**, *401*, 123415. [[CrossRef](#)]
29. Xu, M.; Soliman, M.G.; Sun, X.; Pelaz, B.; Feliu, N.; Parak, W.J.; Liu, S. How Entanglement of Different Physicochemical Properties Complicates the Prediction of in Vitro and in Vivo Interactions of Gold Nanoparticles. *ACS Nano* **2018**, *12*, 10104–10113. [[CrossRef](#)]
30. Egorova, E.A.; van Rijt, M.M.J.; Sommerdijk, N.; Gooris, G.S.; Bouwstra, J.A.; Boyle, A.L.; Kros, A. One Peptide for Them All: Gold Nanoparticles of Different Sizes Are Stabilized by a Common Peptide Amphiphile. *ACS Nano* **2020**, *14*, 5874–5886. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.