

UNIVERSIDAD IBEROAMERICANA

Estudios con Reconocimiento de Validez Oficial por Decreto Presidencial
del 3 de abril de 1981



“CRISTALOGÉNESIS DE BIOMACROMOLÉCULAS EN PRESENCIA DE
NANOPARTÍCULAS DE ORO E INMOVILIZACIÓN Y
CARACTERIZACIÓN DE LIGANTES TERMINALES.”

TESIS

Que para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS EN INGENIERÍA QUÍMICA

Presenta

DAVID RAFAEL ORBE FIERRO

Director y Codirector

**DR. JORGE GUILLERMO IBÁÑEZ CORNEJO y
DR. ABEL MORENO CÁRCAMO**

Ciudad de México

2018

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	5	
LISTA DE ABREVIATURAS E ÍNDICE	8	
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS	14	
RESUMEN	21	
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	23	
OBJETIVOS	23	
1.1. NUCLEACIÓN EN DIFERENTES ENTORNOS.....	23	
1.1.1. TIPOS DE NUCLEACIÓN	24	
1.2. SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE ORO	27	
1.2.1. EL CITRATO COMO AGENTE REDUCTOR Y OTROS MÉTODOS DE SÍNTESIS	28	
1.2.2. REVESTIMIENTO, DEPÓSITO E INMOVILIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS	29	
1.2.3. ESTABILIDAD DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ORO.....	30	
1.3. PROPIEDADES DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ORO	32	
1.3.1. PROPIEDADES ESPECTRALES DE LAS NANOPARTÍCULAS METÁLICAS Y LA	DEPENDENCIA DEL TAMAÑO CON EL PLASMÓN DE ABSORCIÓN	33
1.4. CONJUGACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE ORO	35	
1.5. TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE ORO.....	36	
1.6. NANOPARTÍCULAS DE ORO Y MACROMOLÉCULAS.....	37	
1.7. TÉCNICAS ELECTROQUÍMICAS Y NANOPARTÍCULAS DE ORO	38	
1.7.1. CRONOAMPEROMETRÍA	39	
1.7.2. VOLTAMPEROMETRÍA CÍCLICA	40	
1.8. BIOCENSORES ELECTROQUÍMICOS.....	49	
1.9. CRISTALOGÉNESIS DE PROTEÍNAS	50	
1.9.1. NUCLEACIÓN Y CRECIMIENTO DE UN CRISTAL	50	
1.9.2. SOLUBILIDAD DE UNA PROTEÍNA	50	
1.10. TÉCNICAS DE CRECIMIENTO DE CRISTALES DE MACROMOLÉCULAS	BIOLÓGICAS	51
1.10.1. DIFUSIÓN EN FASE VAPOR EN GOTA COLGANTE	53	
1.10.2. DIFUSIÓN EN FASE VAPOR EN GOTA SEDENTE.....	54	
1.11. SOLUCIONES AMORTIGUADORAS, REGULADORES, BUFFER O TAMPONES .	55	
1.11.1. DEFINICIÓN.....	55	
1.11.2. TIPOS DE BUFFERS	56	
1.11.3. CÁLCULO DEL pH DE BUFFERS.....	56	
1.11.4. PRINCIPIO DE LE CHATELIER	58	

1.11.5.	TEORÍA DE BRØNSTED-LOWRY	59
1.11.6.	TIPOS DE EQUILIBRIO	60
CAPÍTULO 2.	DESARROLLO EXPERIMENTAL	62
2.1.	SÍNTESIS Y FUNCIONALIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE ORO	62
2.1.1.	MATERIALES	62
2.1.2.	TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN	64
2.1.3.	METODOLOGÍA.....	66
2.2.	CRISTALOGÉNESIS DE LISOZIMA, XILANASA, FERRITINA, GLUCOSA ISOMERASA Y NANOPARTÍCULAS DE ORO	72
2.2.1.	MATERIALES	72
2.2.2.	TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN	77
2.2.3.	METODOLOGÍA.....	78
2.3.	EVALUACIÓN ELECTROQUÍMICA DE LA MODIFICACIÓN DE LA SUPERFICIE DE UN ELECTRODO DE CARBÓN VÍTREO CON NANOPARTÍCULAS DE ORO E INMOVILIZACIÓN DE BIOMACROMOLÉCULAS	86
2.3.1.	MATERIALES	86
2.3.2.	TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN	89
2.3.3.	METODOLOGÍA.....	89
CAPÍTULO 3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	94
3.1.	SÍNTESIS Y FUNCIONALIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE ORO.....	94
3.1.1.	OBTENCIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE ORO CON CITRATO DE SODIO COMO AGENTE REDUCTOR Y ESTABILIZANTE.....	94
3.1.2.	ESPECTRO DE ABSORCIÓN UV-VIS DE NANOPARTÍCULAS DE ORO DE 18 NM Y 24.5 NM EN CITRATO DE SODIO COMO AGENTE ESTABILIZANTE.....	95
3.1.3.	DETERMINACIÓN DE POTENCIAL ζ DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ORO DE 18 NM. 101	
3.1.4.	MICROGRAFÍAS MET DE NANOPARTÍCULAS DE ORO MONODISPERSAS CUASI-ESFÉRICAS	102
3.1.5.	DISPERSIÓN DE LA LUZ DINÁMICA DE NANOPARTÍCULAS DE ORO DE 18 NM Y 24.5 NM.	103
3.1.6.	ANÁLISIS DE RASTREO DE NANOPARTÍCULAS DE 18 NM.	105
3.2.	CRISTALOGÉNESIS DE LISOZIMA, XILANASA, FERRITINA, GLUCOSA ISOMERASA Y NANOPARTÍCULAS DE ORO	107
3.2.1.	ESPECTROSCOPIA DE MASAS	107
3.2.2.	IMÁGENES EN EL CRECIMIENTO DE CRISTALES DE PROTEÍNAS EN PRESENCIA DE NANOPARTÍCULAS DE ORO	109
3.2.3.	DISPOSITIVOS PARA EL TRANSPORTE DE CRISTALES DE PROTEÍNA A LAS INSTALACIONES DE SINCROTÓN	118

3.3. EVALUACIÓN ELECTROQUÍMICA DE LA MODIFICACIÓN DE LA SUPERFICIE DE UN ELECTRODO DE CARBÓN VÍTREO CON NANOPARTÍCULAS DE ORO E INMOVILIZACIÓN DE BIOMACROMOLÉCULAS	120
3.3.1. EQUILIBRIO PROPUESTO PARA EL SISTEMA	120
3.3.2. CRONOAMPEROGRAMAS DE LA MODIFICACIÓN CON NANOPARTÍCULAS DE ORO DE LA SUPERFICIE ELECTROACTIVA DEL ELECTRODO DE CARBÓN VÍTREO.	122
3.3.3. VOLTAMPEROGRAMAS CÍCLICOS	125
CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	163
REFERENCIAS	165

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a nuestro creador Jehová Dios y salvador Jesucristo. Sobre todo porque de ti obtengo esta lección: "Cuando yo era niño, hablaba como niño, pensaba como niño, juzgaba como niño; mas cuando ya fui hombre, dejé lo que era de niño" (1 CORINTIOS 13:11).

El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, formula y financia programas de becas y en general de apoyo a la formación de capital humano científico, por esta razón estoy en agradecido por la beca otorgada (CVU 714381) durante este sendero profesional y académico.

Hacer algo bien en esta mezcla entre la fantasía creada por el humano y la verosímil creación de Jehová es un poco difícil, pero resulta más fácil cuando vas acompañado por personas profesionales.

Gracias a, Dr Abel Moreno Cárcamo por estar siempre conmigo desde la licenciatura, recuerdo la entrevista en su oficina y siendo aceptado por primera vez en su laboratorio al darme la oportunidad de hacer investigación, y con ímpetu dedico estas palabras: "Mi pasado en el paso de su laboratorio adquiere sentido cuando ofrendo mi gratitud, mi presente se colma de sosiego y crea una perspectiva para el porvenir".

Dr. Jorge Guillermo Ibañez Cornejo a pesar de todo y los acontecimientos maravillosos fue un camino con obstáculos, sin embargo con dedicación y trabajo duro aprendimos a ir juntos para finalizar el trabajo, no puedo desacreditar el gran sustento que me dio, y con consternación destino estos vocablos "Se percata acertadamente el amparo de un faro en la orientación, en intervalos, de un navegante obstinado". Asimismo agradezco a:

Departamento de Química de la UIA, Ciudad de México: Lic. Norma Loera por tener un alto criterio personal, Biólogo Samuel Macías por el tiempo donado en la

evaluación y análisis de mis muestras, Dra. Esther Ramírez por los reactivos expedidos, Dr. Iván Quevedo por el préstamo del NTA, Dra. Lorena Pedraza por el suministro de reactivos, Dr. Martín Rivera Toledo por mantener una relación académica y profesional a lo largo de la impartición de las asignaturas, M. en C. Cristina Marquina por enseñarme que la honestidad y el rigor lo es todo y en palabras suyas “los buenos marineros no se forman en aguas calmadas”, Rebeca Zebadúa por demostrar profesionalismo sin olvidar que somos humanos, Dr Gerardo Salinas por la capacitación en los equipo electroanalíticos, Dr. Rubén Vásquez por demostrar que compañerismo y fraternidad en un ambiente de trabajo, y sin olvidar a mis dos únicos amigos de la maestría Jazmín y Armando, muchas gracias por estar conmigo sin ustedes no podría haber entendido temas de ingeniería química.

Departamento de Física y Matemáticas de la UIA, Ciudad de México: F. Cervantes-Sodi por demostrar verosímilmente su profesionalismo y ayuda en las micrográficas SEM.

Instituto de Química, UNAM, Ciudad de México: Dr. Silvestre Mendoza mi amigo académico, M. en C. Carina Pareja por la capacitación en cristalogénesis de biomacromoléculas, M. en C. Angélica por prestar atención en las necesidades de nuestro laboratorio.

INMEGEN, Ciudad de México: Dr. Juan Pablo Reyes Grajeda, todo un caballero en la atención y búsqueda de resultados.

Universidad de Chapingo: Dr. Herbert Pucheta por la excelente amabilidad y disposición en la difracción de rayos X de los cristales obtenidos.

Facultad de Medicina, UNAM, Ciudad de México: Dra. Evelyn Rivera Toledo por la disposición de otorgar reactivos faltantes.

Laboratorio XRD1 de Elettra Sincrotron, Trieste, Italia: Dr. Nicola Demistri y al Dr. Maurizio Polentarutti por las facilidades en la colecta de datos.

Laboratorio de Estructura de Proteínas del LANEM-IQ: Dra. Adela Rodríguez por la colecta de datos del cristal que difractó a 0.98 angstrom de resolución.

Esta tesis no hubiese sido oportuna sin el socorro de Mildred Juárez, fuiste mi aya y fiel compañera a lo largo de la finalización de la maestría, auxiliaste en la revisión de la tesis y en el diseño editorial para su imprenta.

A los 16 años salí de casa con un sueño Onésima Fierro Barrera, Rafael Orbe Martínez, Silvia Martínez Iturburu, Larissa del Socorro Mas Pool y Monserrat Robledo Soto son testigos que es un proyecto de vida, y me enseñaron que en esta vida hay que partir ligeros para poder volar.

A Alexis Orbe

LISTA DE ABREVIATURAS E ÍNDICE

λ	Longitud de onda
Ω	Frecuencia angular de la luz
∇	Operador nabla
μ	Fuerza iónica
μA	Microamperio
μL	Microlitro
A	Área
A	Absorbancia
a.C.	Antes de Cristo
ACS	Grado Reactivo Analítico
C	Culombio
C	Concentración
Cm	Centímetro
Co	Concentración inicial
D	Coefficiente de difusión
D	Diámetro
DDT	DL-ditiotreitol
DLS	Dispersión de la luz dinámica
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Diámetro óptico
E	Potencial
E'	Potencial corregido del electrodo
E ⁰	Potencial estándar
E ^{0'}	Potencial formal
ECV	Electrodo de carbón vítreo
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida
EDR	Electrodo de Disco Rotatorio
EDS	Espectroscopía de Rayos x de Dispersión de Energía
EM	Mecanismos electromagnéticos
E _{pa}	Potencial de pico anódico
E _{pc}	Potencial de pico catódico

F	Constante de Faraday
FITC	Fluorescein IsoTioCyanate (Isotiocianato de fluoresceína)
G	Gramo
H	Hora
HEPES	Hydroxyethyl Piperazineethanesulfonic acid (ácido hidroxietilpiperacinetanosulfónico)
HEWL	Hen Egg-White Lysozyme (Lisozima de huevo de gallina)
I	Intensidad de corriente
ICP-MS	Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente
i_p	Intensidad de corriente de pico
i_{pa}	Pico anódico
i_{pc}	Pico catódico
IR	Caída de potencial
J	Julio
K	Kelvin
k	Constante cinética
k^0	Constante de velocidad electroquímica estándar
K_a	Constante de acidez
KD	Coefficiente de reparto
kDa	Kilodalton
K_{eq}	Constante de equilibrio
K_f	Constante de formación
kg	Kilogramo
K_{sp}	Producto de solubilidad
kV	Kilovoltio
L	Longitud de trayectoria
L	Litro
M	Molaridad
m	Metro
m/z	Relación masa carga
MALDI-TOF	Desorción por láser asistida por matriz / ionización de tiempo de vuelo
MEB	Microscopio Electrónico de Barrido

MET	Microscopio Electrónico de Transmisión
Mg	Miligramo
Min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
mOsm	Miliosmoles
ms	Milisegundo
MUA	Ácido Mercaptoundecanoico
mV	Milivoltio
MW	Molecular Weight
MWCO	Molecular Weight Cut-off (corte de peso molecular)
MΩ	Megaohmio
<i>n</i>	Número de electrones
N	Newton
η	Moles de electrones intercambiados
NHS	N-hidroxisuccinimida
nm	Nanómetro
NPAu	Nanopartícula de oro
NTA	Nanoparticle Tracking Analysis
p/v	Porcentaje peso/volumen
PBS	Phosphate Buffered Saline (Amortiguador)
PEEK	Polyether ether ketone (polieteretercetona)
PEG	Polietilenglicol
PEGSH	Polietilenglicol tiol terminal
PRS	Plasmón de Resonancia Superficial
PVDF	Polifluoruro de vinilideno
Q	Carga
<i>R</i>	Constante de los gases ideales
RAE	Real Academia Española
Redox	Reducción-oxidación
S	Segundo
SCE	Electrodo de calomel
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico)

SERS	Surface-enhanced Raman Spectroscopy (Dispersión Raman de superficie exacerbada)
SH	Disolvente
T	Tiempo
<i>T</i>	Temperatura
u.a.	Intensidad de absorción (unidades de absorbancia)
UV-Vis	Ultravioleta-visible
V	Voltio
V	Volumen
V_f	Volumen final
W	Trabajo
XYNII	Endo-1,4-β-xilanasas II
α	Coefficiente de simetría
ΔG⁰_r	Energía libre de Gibbs de reacción
ΔG_{productos}	Energía libre de Gibbs de formación de los productos
ΔG_{reactivos}	Energía libre de Gibbs de formación de los reactivos
ε₁	Parte real
ε₂	Parte imaginaria
ε_m	Constante dieléctrica
ζ	Potencial zeta

I

11-mercapto-1-undecanol29

A

ácido 16-mercaptohexadecanoico29

ácido mercaptosuccínico.....29

anticuerpos21

área 21, 28, 29, 48, 49, 87, 89

átomos22, 29, 35, 37

atracción 22, 37, 65, 101

B

biológicas21, 51, 59

biosensor21

C

carbón.. 23, 39, 41, 87, 89, 92, 122, 123, 124, 125, 126, 129, 132, 133, 137, 138, 141, 144, 145, 161, 162

cargas 31, 59

cinético 27

composición..... 26, 27, 37, 38

concentración 25, 27, 31, 37, 38, 44, 46, 47, 48, 51, 52, 53, 58, 65, 78, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 96, 106, 125

conjugación 70

covalente 22, 49, 109

crecimiento... 24, 26, 27, 33, 50, 51, 122

cristales... 23, 24, 26, 50, 51, 54, 76, 77, 80, 81, 107

CRISTALOGÉNESIS1, 23

D

difusión ... 24, 39, 40, 42, 44, 45, 47, 48, 53, 54, 55

dobles capas.....31

E

electrodo . 21, 23, 32, 38, 39, 40, 41, 42, 44, 46, 47, 48, 89, 91, 92, 93, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 129, 131, 132, 133, 137, 138, 141, 144, 145, 148, 149, 150, 154, 155, 159, 160, 161, 162

electrónica 22, 36, 37, 66, 89, 102

electroquímicas.....21, 38, 40

especies... 22, 27, 36, 38, 41, 44, 46, 49, 59, 94, 109, 125

Espectrometría de Masas con Plasma

Acoplado Inductivamente30

espectroscopía Raman32

estabilidad... 22, 25, 37, 49, 64, 99, 101, 109

estructura..... 26, 27, 37, 79, 89, 107

experimentación26, 94

F

filtración.. 63, 67, 68, 69, 70, 74, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 87, 94, 97, 163

funcionalidad26, 27, 37

G

glucosa isomerasa.. 25, 26, 77, 109, 116

H

heterogéneas24

homogéneas.....24

I

impedancia.....23

INMOVILIZACIÓN1, 21, 29, 33

iones... 22, 31, 35, 49, 51, 109, 122, 127

L

ligantes ... 22, 29, 33, 64, 69, 70, 98, 99, 100, 109, 163

longitud de onda 33, 64, 65, 98, 105

M

metales . 22, 35, 49, 74, 95, 96, 109, 163

molécula 22, 29, 37

moléculas 21, 23, 26, 29, 51, 65, 101

monodispersas 27, 102

N

nanomateriales..... 26, 27, 28, 30, 37

NANOPARTÍCULAS 1, 21, 22, 23, 24, 25,

27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36,

37, 38, 39, 64, 65, 67, 68, 69, 70, 71,

78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 92, 93,

94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102,

103, 104, 105, 106, 111, 112, 113,

114, 115, 116, 117, 122, 123, 124,

126, 137, 138, 141, 144, 145, 149,

150, 154, 155, 159, 163

NPAu 23, 35

nucleación 23, 24, 26, 27, 50, 122

O

ORO 1, 22, 23, 25, 27, 28, 29, 30, 31, 32,

33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 64, 65, 68,

69, 70, 71, 72, 78, 79, 80, 81, 82, 83,

84, 85, 87, 90, 93, 94, 95, 96, 97, 98,

99, 100, 101, 102, 103, 104, 105,

106, 111, 112, 113, 114, 115, 116,

117, 122, 123, 124, 126, 131, 137,

138, 141, 144, 145, 148, 149, 150,

154, 155, 159, 160, 163

P

partícula ... 25, 30, 37, 39, 64, 65, 67, 96

partículas. 22, 24, 25, 27, 29, 31, 33, 34, 35, 37, 57, 64, 69, 90, 101

PBS 41, 75, 80, 81, 82, 83, 85, 87, 88,

92, 93, 110, 112, 113, 115, 125, 129,

131, 132, 133, 137, 138, 141, 144,

145, 148, 149, 150, 154, 155, 159,

160

perdurabilidad 31, 97, 99, 163

pH 22, 25, 27, 30, 31, 37, 41, 49, 51, 55,

56, 57, 61, 68, 70, 73, 74, 75, 76, 77,

78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 87, 88,

92, 93, 98, 99, 100, 110, 111, 112,

113, 114, 115, 116, 117, 125, 129,

131, 132, 133, 137, 138, 141, 142,

144, 145, 148, 149, 150, 154, 155,

159, 160, 163

plasmón de resonancia28, 34, 35, 95
plasmónicos30, 32
potencial . 22, 37, 38, 40, 41, 42, 43, 44,
45, 47, 64, 90, 91, 92, 93, 101, 120,
123, 124, 126
proteína... 22, 23, 25, 26, 37, 49, 50, 51,
52, 53, 54, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83,
84, 85, 110
proteínas . 21, 22, 23, 25, 37, 49, 50, 51,
70, 77, 100, 107, 109, 163

Q

química.....26, 27, 32, 37, 38

R

repulsión electrostática31, 122
revestimiento 21, 69, 98, 99, 163

S

SERS.....32

síntesis..... 25, 26, 27, 28, 30, 37, 65, 66,
68, 69, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 104,
105, 106, 163

solubilidad 25, 26, 50, 69, 97

superficie. 21, 22, 27, 28, 29, 30, 32, 34,
35, 36, 37, 39, 49, 50, 54, 55, 64, 68,
89, 92, 93, 95, 98, 100, 122, 123, 124,
126

T

temperatura .. 25, 26, 27, 35, 37, 42, 51,
65, 67, 68, 70, 91, 93, 94, 95, 106

tioles 22, 49, 109

Turkevich 31, 94

V

VÍTREO 1, 23, 39, 41, 87, 89, 92, 122,
123, 124, 125, 126, 129, 132, 133,
137, 138, 141, 144, 145, 161, 162

voltamperometría cíclica. 23, 40, 41, 42,
45, 46, 90, 92, 93, 126, 163

volumen 25, 28, 30, 33, 67, 75, 76

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1 Desplazamiento de equilibrios por cambios de concentración para un equilibrio químico cualquiera (Larrain Ibañez & De Freitas Morcelli, 1980).	58
Tabla 2 Tipos de equilibrio (Christian, 2009).	60
Tabla 3 Respuesta en intensidad de corriente del electrodo de carbón vítreo y sus modificaciones posteriores mediante cronoamperometría.	161
Tabla 4 Respuesta en intensidad de corriente del electrodo de carbón vítreo y sus modificaciones posteriores mediante cronoamperometría obtenidas del software	162
Figura 1 Esquema general de la limpieza del material previo a la síntesis (Turkevich, Stevenson, & Hillier, 1951).	25
Figura 2 Efecto de la temperatura en el crecimiento de cristales de glucosa isomerasa. Izquierda. Crecimiento de cristales de glucosa isomerasa a 18°C. Derecha. Crecimiento de cristales de glucosa isomerasa a 22°C. Las condiciones en ambos casos fueron: 5 µL de 30 mg/mL de glucosa isomerasa y 5 µL de solución de pozo, la cual contiene 0.2 M formiato de magnesio dihidratado. La glucosa isomerasa aumenta su solubilidad relevantemente al aumentar la temperatura.	26
Figura 3 Estabilización electrostática entre dos partículas que se aproximan. La repulsión electrostática de cargas similares separa las partículas cuando sus dobles capas se superponen (Carmargo, Rodrigues, da Silva, & Wang, 2015).	31
Figura 4 Voltamperograma de un electrodo de carbón-vítreo, evaluado en PBS (1 X, pH 7.4) que contiene 5.0 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ y 0.1 M de KCl desde -0.6 V a 0.8 V con una velocidad de barrido de 25 mV/s (2° ciclo, segmentos 3-4). En el voltamperograma es posible observar los picos de potencial catódico, E_{pc} y potencial anódico, E_{pa} . Asimismo, i_{pc} e i_{pa} representan los picos catódico y anódico, respectivamente.	41
Figura 5 Nucleación de proteínas y crecimiento de cristales (Khurshid et al, 2014). ..	50
Figura 6 La técnica de difusión en fase vapor de gota colgante.	53
Figura 7 La técnica de difusión en fase vapor de gota sedente es un método popular para la cristalización de macromoléculas.	55
Figura 8 Esquema general de reacción de síntesis de nanopartículas de oro.	68
Figura 9 Esquema general de revestimiento con ligantes tiol y carboxílico terminales de nanopartículas de oro obtenidas de la reacción de síntesis.	69
Figura 10 Esquema general de diálisis con membrana de 3.5 kDa de nanopartículas de oro revestidas con ligantes tiol y carboxilo terminales.	70
Figura 11 Síntesis de nanopartículas de oro. (A) Durante unos minutos se calienta hasta ebullición de agua desionizada y ultrafiltrada, en este momento se añade la solución de ácido tetracloroáurico (III) trihidrato, (B) Después de un minuto de mezcla incesante se añade la solución de citrato trisódico dihidratado, el color inicial de la reacción es grisáceo. (C) En seguida, el color es azul oscuro-púrpura y (D) finaliza con un color rojo bermellón o rojo anaranjado.	95
Figura 12 Espectro de absorción UV-Vis de nanopartículas de oro de 18 nm y 24.5 nm estabilizadas en la solución de citrato de sodio añadida durante reacción de síntesis.	96
Figura 13 Espectro de absorción UV-Vis de nanopartículas de oro de 18 nm revestidas con 11- ácido mercaptoundecanoico y O-(3-Carboxipropil)-O'-[2-(3-	

mercaptopropionilamino)-etil]-polietilenglicol 3000, estabilizadas en la solución de citrato de sodio añadida durante reacción de síntesis.	97
Figura 14 Espectro de absorción UV-Vis de nanopartículas de oro de 18 nm revestidas con 11- ácido mercaptoundecanoico y O-(3-Carboxipropil)-O'-[2-(3-mercaptopropionilamino)-etil]-polietilenglicol 3000, estabilizadas en la solución de citrato de sodio añadida durante reacción de síntesis y después de preparar ésteres reactivos de amina de grupos carboxilo terminal de los ligantes unidos covalentemente a la superficie de las nanopartículas de oro.....	98
Figura 15 Espectro de absorción UV-Vis de nanopartículas de oro de 18 nm revestidas con 11- ácido mercaptoundecanoico y O-(3-Carboxipropil)-O'-[2-(3-mercaptopropionilamino)-etil]-polietilenglicol 3000, se dializaron y estabilizadas en 50 mM de MES a pH 6.0.	99
Figura 16 Espectro de absorción UV-Vis de nanopartículas de oro de 18 nm revestidas con 11- ácido mercaptoundecanoico y O-(3-Carboxipropil)-O'-[2-(3-mercaptopropionilamino)-etil]-polietilenglicol 3000, se dializaron y estabilizadas en 50 mM de MES a pH 6.0 después de preparar ésteres reactivos de amina de grupos carboxilo terminal de los ligantes unidos covalentemente a la superficie de las nanopartículas de oro.	100
Figura 17 Distribución del potencial ζ de nanopartículas de oro de 18 nm estabilizadas en la solución de citrato de sodio añadida durante la reacción de síntesis.....	102
Figura 18 Imagen MET de nanopartículas de oro de 17.2 nm \pm 3 nm y (b) patrón de difracción de área selecta de las nanopartículas de oro.....	103
Figura 19 Distribución de tamaños de nanopartículas de oro de 18 nm estabilizadas en la solución de citrato de sodio añadida durante la reacción de síntesis.....	104
Figura 20 Distribución de tamaños de nanopartículas de oro de 18 nm revestidas con 11-MUA y estabilizadas en la solución de citrato de sodio añadida durante la reacción de síntesis.	105
Figura 21 Distribución de tamaños y concentración adquirido por el análisis rápido y automatizado del software de nanopartículas de oro de 18 nm estabilizadas en la solución de citrato de sodio añadida durante la reacción de síntesis.	106
Figura 22 Espectro de masas de HEWL, lisozima de huevo de gallina (Seikagaku Corp., Japan, cat. no. 100940).	107
Figura 23 Espectro de masas de xilanas II (endo-1,4-β-xilanas II) de T. reesei (Hampton Research, HR7-104).	108
Figura 24 Espectro de masas de ferritina de bazo de caballo, tipo I, subunidad L (Sigma, cat. no. F4503).....	108
Figura 25 Espectro de masas de IgG de suero de humano (Sigma, cat. no. I4506) ..	109
Figura 26 Lisozima control: 5 μL de lisozima a 75 mg/mL en 0.1 M de acetato de sodio a pH 4.5 y 15 μL de solución de pozo, la cual contiene NaCl 6.5% (p/v) en 0.1 M de acetato de sodio a pH 4.5.	111
Figura 27 Lisozima control: 5 μL de lisozima a 120 mg/mL en 50 mM de MES a pH 6.0 y 15 μL de solución de pozo, la cual contiene NaCl 6.5% (p/v) en 0.1 M de acetato de sodio a pH 4.5.	111
Figura 28 Lisozima y nanopartículas de oro: 5 μL de lisozima a 75 mg/mL en 0.1 M de acetato de sodio (a pH 4.5), 5 μL de nanopartículas de oro de 18 nm estabilizadas en citrato de sodio y 10 μL de solución de pozo, la cual contiene NaCl 6.5% (p/v) en 0.1 M de acetato de sodio a pH 4.5.....	111
Figura 29 Lisozima en MES y nanopartículas de oro: 5 μL de lisozima a 120 mg/mL en 50 mM de MES a pH 6.0, 5 μL de nanopartículas de oro de 18 nm y 10 μL de solución	

de pozo, la cual contiene NaCl 6.5% (p/v) en 0.1 M de acetato de sodio a pH 4.5.	112
Figura 30 Lisozima marcada con FITC y nanopartículas de oro: 5 µL de lisozima-FITC a 75 mg/mL en 1X PBS a pH 7.4, 5 µL de nanopartículas de oro de 18 nm estabilizadas en citrato de sodio y 10 µL de solución de pozo, la cual contiene NaCl 6.5% (p/v) en 0.1 M de acetato de sodio a pH 4.5.....	112
Figura 31 Lisozima-FITC en 1X PBS a pH 7.4 y nanopartículas de oro revestidas con O-(3-Carboxipropil)-O'-[2-(3-mercaptopropionilamino)-etil]-polietilenglicol 3000: 5 µL de lisozima-FITC a 75 mg/mL en 1X PBS a pH 7.4, 5 µL de nanopartículas de oro de 18 nm, revestidas con O-(3-Carboxipropil)-O'-[2-(3-mercaptopropionilamino)-etil]-polietilenglicol 3000, estabilizadas en 50 mM de MES a pH 6.0 y 10 µL de solución de pozo, la cual contiene NaCl 6.5% (p/v) en 0.1 M de acetato de sodio a pH 4.5.....	112
Figura 32 Lisozima-FITC en 1X PBS a pH 7.4 y nanopartículas de oro revestidas con ácido 11-mercaptoundecanoico: 5 µL de lisozima-FITC a 75 mg/mL en 1X PBS a pH 7.4, 5 µL de nanopartículas de oro de 18 nm, revestidas con ácido 11-mercaptoundecanoico, estabilizadas en 50 mM de MES a pH 6.0. y 10 µL de solución de pozo, la cual contiene NaCl 6.5% (p/v) en 0.1 M de acetato de sodio a pH 4.5.	113
Figura 33 Lisozima en MES y nanopartículas de oro revestidas con O-(3-Carboxipropil)-O'-[2-(3-mercaptopropionilamino)-etil]-polietilenglicol 3000: 5 µL de lisozima a 120 mg/mL en 50 mM de MES a pH 6.0, 5 µL de nanopartículas de oro de 18 nm revestidas con O-(3-Carboxipropil)-O'-[2-(3-mercaptopropionilamino)-etil]-polietilenglicol 3000 y estabilizadas en 50 mM de MES a pH 6.0 y 10 µL de solución de pozo, la cual contiene NaCl 6.5% (p/v) en 0.1 M de acetato de sodio a pH 4.5.	113
Figura 34 Ferritina control: 5 µL de ferritina a 75 mg/mL y 15 µL de solución de pozo, la cual contiene 0.8 M de sulfato de amonio, 0.1 M de Tris a pH 7.5, 60 mM de sulfato de cadmio.....	113
Figura 35 Ferritina MES control: 5 µL de ferritina a 75 mg/mL en 50 mM de MES a pH 6.0 y 15 µL de solución de pozo, la cual contiene 0.8 M de sulfato de amonio, 0.1M de Tris a pH 7.5, 60 mM de sulfato de cadmio.....	114
Figura 36 Ferritina y nanopartículas de oro: 5 µL de ferritina a 75 mg/mL, 5 µL de nanopartículas de oro de 18 nm estabilizadas en citrato de sodio y 10 µL de solución de pozo, la cual contiene 0.8 M de sulfato de amonio, 0.1M de Tris a pH 7.5, 60 mM de sulfato de cadmio.....	114
Figura 37 Ferritina MES y nanopartículas de oro: 5 µL de ferritina a 75 mg/mL en 50 mM de MES a pH 6.0, 5 µL de nanopartículas de oro de 18 nm estabilizadas en citrato de sodio y 10 µL de solución de pozo, la cual contiene 0.8 M de sulfato de amonio, 0.1 M de Tris a pH 7.5, 60 mM de sulfato de cadmio.	114
Figura 38 Ferritina-FITC en 1X PBS a pH 7.4 y nanopartículas de oro: 5 µL de ferritina-FITC a 75 mg/mL en 1X PBS a pH 7.4, 5 µL de nanopartículas de oro de 18 nm estabilizadas en citrato de sodio y 10 µL de solución de pozo, la cual contiene 0.8 M de sulfato de amonio, 0.1M de Tris a pH 7.5, 60 mM de sulfato de cadmio.	115
Figura 39 Ferritina-FITC en 1X PBS a pH 7.4 y nanopartículas de oro revestidas con O-(3-Carboxipropil)-O'-[2-(3-mercaptopropionilamino)-etil]-polietilenglicol 3000: 5 µL de ferritina-FITC a 75 mg/mL en 1X PBS a pH 7.4, 5 µL de nanopartículas de oro de 18 nm revestidas con O-(3-Carboxipropil)-O'-[2-(3-mercaptopropionilamino)-etil]-polietilenglicol 3000 y estabilizadas en 50 mM de MES a pH 6.0 y 10 µL de	

solución de pozo, la cual contiene 0.8 M de sulfato de amonio, 0.1M de Tris a pH 7.5, 60 mM de sulfato de cadmio.	115
Figura 40 Glucosa isomerasa control: 5 µL de glucosa isomerasa a 30 mg/mL y 5 µL de solución de pozo, la cual contiene 0.2 M de formiato de magnesio dihidratado. ...	115
Figura 41 Glucosa Isomerasa y nanopartículas de oro: 5 µL de glucosa isomerasa a 30 mg/mL , 5 µL de nanopartículas de oro de 18 nm estabilizadas en citrato de sodio y 5 µL de solución de pozo, la cual contiene 0.2 M de formiato de magnesio dihidratado.	116
Figura 42 Glucosa Isomerasa y nanopartículas de oro revestidas con ácido 11-mercaptoundecanoico: 5 µL de glucosa isomerasa a 30 mg/mL, 5 µL de nanopartículas de oro de 18 nm revestidas con ácido 11-mercaptoundecanoico y estabilizadas en 50 mM de MES a pH 6.0 y 5 µL de solución de pozo, la cual contiene 0.2 M de formiato de magnesio dihidratado.	116
Figura 43 Glucosa Isomerasa y nanopartículas de oro revestidas con O-(3-Carboxipropil)-O'-[2-(3-mercaptopropionilamino)-etil]-polietilenglicol 3000: 5 µL de glucosa isomerasa a 30 mg/mL, 5 µL de nanopartículas de oro de 18 nm revestidas con O-(3-Carboxipropil)-O'-[2-(3-mercaptopropionilamino)-etil]-polietilenglicol 3000 y estabilizadas en 50 mM de MES a pH 6.0 y 5 µL de solución de pozo, la cual contiene 0.2 M de formiato de magnesio dihidratado.	116
Figura 44 Xilanasa en 50 mM de MES control: 5 µL de xilanasa a 30 mg/mL en 50 mM de MES a pH 6.0 y 1.2 µL 1 M yoduro de sodio, 2.8 µL solución de pozo, la cual contiene 1.2 M de sulfato de amonio, 100 mM de tricina a pH 9.0.	117
Figura 45 Xilanasa en 50 mM de MES a pH 6.0 y nanopartículas de oro revestidas con ácido 11-mercaptoundecanoico: 5 µL de xilanasa a 30 mg/mL en 50 mM de MES a pH 6.0, 5µL de nanopartículas de oro de 18 nm revestidas con ácido 11-mercaptoundecanoico y estabilizadas en 50 mM de MES a pH 6.0 y 1.2 µL 1 M yoduro de sodio, 2.8 µL solución de pozo, la cual contiene 1.2 M de sulfato de amonio, 100 mM de tricina a pH 9.0.	117
Figura 46 Xilanasa en 50 mM de MES a pH 6.0 y nanopartículas de oro: 5 µL de xilanasa a 30 mg/mL en 50 mM de MES a pH 6.0, 5 µL de nanopartículas de oro de 18 nm estabilizadas en citrato de sodio y 1.2 µL 1 M yoduro de sodio, 2.8 µL solución de pozo, la cual contiene 1.2 M de sulfato de amonio, 100 mM de tricina a pH 9.0... 	117
Figura 47 Dispositivo construido de poliolefina utilizada para el resguardo térmico durante el almacenamiento y transporte de cristales de proteínas crecidos, los cuales viajan protegidos de la temperatura ambiente a los sincrotrones. Los detalles del diseño se describen en las figuras.	118
Figura 48 Dispositivo construido de poliolefina utilizada para el resguardo térmico. Se muestra el diseño para el transporte de artefactos del instrumento TG40, donde se llevó a cabo el crecimiento de cristales de proteínas.	118
Figura 49 Dispositivo construido de poliolefina utilizada para el resguardo térmico. Se muestra el diseño para el transporte de una placa para el uso de crecimiento cristalino en gota sedente de 96 pozos, donde se llevó a cabo el crecimiento de cristales de proteínas.....	119
Figura 50 Dispositivo construido de poliolefina utilizada para el resguardo térmico. Se muestra el diseño para el transporte de una placa de crecimiento cristalino para gota colgante de 15 pozos, donde se llevó a cabo el crecimiento de cristales de proteínas.	119
Figura 51 Cronoamperograma de la modificación con nanopartículas de oro de la superficie electroactiva del electrodo de carbón vítreo sumergido en una solución	

que contenía 1.0×10^{-3} M de ácido tetracloroáurico (III) trihidrato, 0.01 M de Na_2SO_4 y 0.01 M de H_2SO_4 y suministrado a un potencial en un paso al electrodo de -0.2 V durante 10 s.....	123
Figura 52 Cronoamperograma de la modificación con nanopartículas de oro de la superficie electroactiva del electrodo de carbón vítreo sumergido en una solución que contenía 1.0×10^{-3} M de ácido tetracloroáurico (III) trihidrato, 0.01 M de Na_2SO_4 y 0.01 M de H_2SO_4 y suministrado a un potencial en un paso al electrodo de -0.2 V durante 30 s.....	124
Figura 53 Cronoamperograma de la modificación con nanopartículas de oro de la superficie electroactiva del electrodo de carbón vítreo sumergido en una solución que contenía 1.0×10^{-3} M de ácido tetracloroáurico (III) trihidrato, 0.01 M de Na_2SO_4 y 0.01 M de H_2SO_4 y suministrado a un potencial en un paso al electrodo de -0.2 V durante 60 s.....	124
Figura 54 Imágenes MEB de nanopartículas de oro sobre carbón vítreo a 60 s de cronoamperometría. El potencial de depósito fue de -200 mV (vs. Ag/AgCl); aumento de 20,000, y un poder operativo de 10 kV.....	125
Figura 55 Voltamperograma del electrodo de carbón-vítreo, evaluado en 0.25 M de H_2SO_4 desde -1 V a 1 V con una velocidad de barrido 25 mV/s.....	126
Figura 56 Voltamperograma del electrodo de carbón-vítreo, evaluado en PBS (1 X, pH 7.4) contiene 5.0 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ y 0.1 M de KCl desde -0.6 V a 0.8 V con una velocidad de barrido 25 mV/s (2° ciclo, segmentos 3-4).....	129
Figura 57 Voltamperograma del electrodo de oro, evaluado en PBS (1X, pH 7.4) contiene 5.0 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ y 0.1 M de KCl desde -0.6 V a 0.8 V con una velocidad de barrido 25 mV/s (2° ciclo, segmentos 3-4).....	131
Figura 58 Voltamperograma del electrodo de carbón-vítreo evaluado en PBS (1X, pH 7.4) contiene 5.0 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ y 0.1 M de KCl desde -0.6 V a 0.8 V con una velocidad de barrido 25, 50, 75, 100, 125 mV/s (2° ciclo, segmentos 3-4).....	132
Figura 59 Análisis de un voltamperograma del electrodo de carbón-vítreo evaluado en PBS (1X, pH 7.4) contiene 5.0 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ y 0.1 M de KCl desde -0.6 V a 0.8 V con una velocidad de barrido 25, 50, 75, 100, 125 mV/s (2° ciclo, segmentos 3-4).	133
Figura 60 Voltamperograma del electrodo de carbón-vítreo con depósito de nanopartículas de oro modificado mediante cronoamperometría durante 10s evaluado en PBS (1X, pH 7.4) contiene 5.0 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ y 0.1 M de KCl desde -0.6 V a 0.8 V con una velocidad de barrido 25, 50, 75, 100, 125 mV/s (2° ciclo, segmentos 3-4).....	137
Figura 61 Análisis de un voltamperograma del electrodo de carbón-vítreo con depósito de nanopartículas de oro modificado mediante cronoamperometría durante 10s evaluado en PBS (1X, pH 7.4) contiene 5.0 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ y 0.1 M de KCl desde -0.6 V a 0.8 V con una velocidad de barrido 25, 50, 75, 100, 125 mV/s (2° ciclo, segmentos 3-4).....	138
Figura 62 Voltamperograma del electrodo de carbón-vítreo con depósito de nanopartículas de oro modificado mediante cronoamperometría durante 30s evaluado en PBS (1X, pH 7.4) contiene 5.0 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ y 0.1 M de KCl desde -0.6 V a 0.8 V con una velocidad de barrido 25, 50, 75, 100, 125 mV/s (2° ciclo, segmentos 3-4).....	141
Figura 63 Análisis de un voltamperograma del electrodo de carbón-vítreo con depósito de nanopartículas de oro modificado mediante cronoamperometría durante 30s evaluado en PBS (1X, pH 7.4) contiene 5.0 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ y 0.1 M de KCl desde -	

0.6 V a 0.8 V con una velocidad de barrido 25, 50, 75, 100, 125 mV/s (2° ciclo, segmentos 3-4).....	141
Figura 64 Voltamperograma del electrodo de carbón-vítreo con depósito de nanopartículas de oro modificado mediante cronoamperometría durante 60s evaluado en PBS (1X, pH 7.4) contiene 5.0 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ y 0.1 M de KCl desde -0.6 V a 0.8 V con una velocidad de barrido 25, 50, 75, 100, 125 mV/s (2° ciclo, segmentos 3-4).....	144
Figura 65 Análisis de un voltamperograma del electrodo de carbón-vítreo con depósito de nanopartículas de oro modificado mediante cronoamperometría durante 60s evaluado en PBS (1X, pH 7.4) contiene 5.0 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ y 0.1 M de KCl desde -0.6 V a 0.8 V con una velocidad de barrido 25, 50, 75, 100, 125 mV/s (2° ciclo, segmentos 3-4).....	145
Figura 66 Voltamperograma del electrodo de oro revestido con 11-MUA, evaluado en PBS (1X, pH 7.4) contiene 5.0 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ y 0.1 M de KCl desde -0.6 V a 0.8 V con una velocidad de barrido 25 mV/s (2° ciclo, segmentos 3-4). ..	148
Figura 67 Voltamperograma sobre un electrodo de oro revestido con O-(3-Carboxipropil)-O'-[2-(3-mercaptopropionilamino)-etil]-polietilenglicol 3000, evaluado en PBS (1X, pH 7.4) contiene 5.0 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ y 0.1 M de KCl desde -0.6 V a 0.8 V con una velocidad de barrido 25 mV/s (2° ciclo, segmentos 3-4). ..	148
Figura 68 Voltamperograma voltamperograma sobre un electrodo de carbón vítreo con depósito de nanopartículas de oro modificado mediante cronoamperometría durante 60s, y revestido con 11-MUA, evaluado en PBS (1X, pH 7.4) contiene 5.0 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ y 0.1 M de KCl desde -0.6 V a 0.8 V con una velocidad de barrido 25 mV/s (2° ciclo, segmentos 3-4).....	149
Figura 69 Análisis de un voltamperograma sobre un electrodo de carbón vítreo con depósito de nanopartículas de oro modificado mediante cronoamperometría durante 60s, y revestido con 11-MUA, evaluado en PBS (1X, pH 7.4) contiene 5.0 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ y 0.1 M de KCl desde -0.6 V a 0.8 V con una velocidad de barrido 25 mV/s (2° ciclo, segmentos 3-4).....	150
Figura 70 Voltamperograma sobre un electrodo de carbón vítreo con depósito de nanopartículas de oro modificado mediante cronoamperometría durante 60s, y revestido con O-(3-Carboxipropil)-O'-[2-(3-mercaptopropionilamino)-etil]-polietilenglicol 3000, evaluado en PBS (1X, pH 7.4) contiene 5.0 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ y 0.1 M de KCl desde -0.6 V a 0.8 V con una velocidad de barrido 25, 50, 75, 100, 125 mV/s (2° ciclo, segmentos 3-4).....	154
Figura 71 Análisis de un voltamperograma sobre un electrodo de carbón vítreo con depósito de nanopartículas de oro modificado mediante cronoamperometría durante 60s, y revestido con O-(3-Carboxipropil)-O'-[2-(3-mercaptopropionilamino)-etil]-polietilenglicol 3000, evaluado en PBS (1X, pH 7.4) contiene 5.0 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ y 0.1 M de KCl desde -0.6 V a 0.8 V con una velocidad de barrido 25, 50, 75, 100, 125 mV/s (2° ciclo, segmentos 3-4).....	155
Figura 72 Voltamperograma sobre un electrodo de carbón vítreo con depósito de nanopartículas de oro modificado mediante cronoamperometría durante 10,30, 60s, electrodo de carbón vítreo modificado con nanopartículas de oro a 60 s de exposición en la cronoamperometría, en cada caso, revestido con 11-MUA y O-(3-Carboxipropil)-O'-[2-(3-mercaptopropionilamino)-etil]-polietilenglicol 3000, evaluado en PBS (1X, pH 7.4) contiene 5.0 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ y 0.1 M de KCl desde -0.6 V a 0.8 V con una velocidad de barrido 25 mV/s (2° ciclo, segmentos 3-4). ..	159

Figura 73| Voltamperograma del electrodo de oro revestido con 11-MUA y O-(3-Carboxipropil)-O'-[2-(3-mercaptopropionilamino)-etil]-polietilenglicol 3000, evaluado en PBS (1X, pH 7.4) contiene 5.0 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ y 0.1 M de KCl desde -0.6 V a 0.8 V con una velocidad de barrido 25 mV/s (2° ciclo, segmentos 3-4). .. 160

RESUMEN

En el diseño de un biosensor se localizan el detector, transductor, la interface, el elemento de reconocimiento y un analito de ser necesario, pero una particularidad es la inmovilización del elemento de reconocimiento capaz de perpetuarse sobre un área de un transductor. El éxito de la inmovilización de macromoléculas donde pueden yacer anticuerpos, proteínas, receptores, ácidos nucleicos, células, enzimas e inclusive tejidos, se basa en generar una alta densidad sobre el área del transductor, esta última sea capaz de ser explorada mediante técnicas electroquímicas.

Coexisten abundantes habilidades para lograr la inmovilización de moléculas biológicas para distintas superficies electroactivas, inclusive, estrategias de revestimiento de nanopartículas con biomoléculas son similares al recubrimiento de área electroactiva de un electrodo. El método de inmovilización optado debe conservar la consistencia y la función del receptor biológico incorporado a la superficie revestida.

Los primeros estudios sobre la naturaleza de estas diferentes interacciones de metales pesados y proteínas enfatizaron la importancia de la unión covalente a los tioles de los residuos de cisteína. La estabilidad del enlace metal-azufre permitió una fácil identificación del ligante.

Estos ligantes pueden complejar los iones metálicos y, por lo tanto, modificar su reactividad dando lugar a muchas especies posibles de unión a proteínas y un patrón complicado de interacción. El pH y la fuerza iónica también pueden afectar al ligante de la proteína y cambiar su afinidad por el metal.

La exigencia en el estudio de este tema surge debido a que las nanopartículas de oro son capaces de ser revestidas con ligantes para servir como vehículos terapéuticos para la biomedicina, asimismo la citotoxicidad de las nanopartículas está muy influenciada por sus interacciones con las proteínas sanguíneas, los

efectos tóxicos resultantes de las interacciones sanguíneas a menudo se ignoran en el desarrollo y uso de biomateriales nanoestructurados para aplicaciones in vivo y aunque el revestimiento de nanopartículas con proteínas generalmente reducen la citotoxicidad y la inmunotoxicidad, la inmunotoxicidad se puede mitigar o activar según el tipo de nanopartícula y proteína plasmática adsorbida. Sin embargo, el complejo proteína y nanopartícula de oro deriva de procesos aún faltos de entendimiento. Pese a esto, las interacciones de la proteínas con los coloides de oro dependen de: (1) la atracción electrónica entre partículas de oro cargadas negativamente y los abundantes sitios cargados positivamente en la molécula proteica, (2) un suceso de adsorción que implica zonas hidrófobas sobre la proteína que se unen a la superficie de la nanopartícula metálica y (3) el potencial de unión del oro con sitios sulfhidrilo o átomos de oxígeno o nitrógeno a través de sus pares de electrones no compartidos para formar enlaces dativos o covalente coordinado.

Comprender estos procesos a nivel atómico facilitaría el estudio de las interacciones entre proteínas y nanopartículas de oro, y permitiría una visión más profunda de estos bionanosistemas electroquímicos para su desarrollo y optimización

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

OBJETIVOS

- Determinar un método apropiado para el revestimiento con ligantes tiol y carboxilo terminales de NPAu depositadas sobre un electrodo de carbón vítreo
- Evaluar el desempeño del electrodo de carbón vítreo modificado con nanopartículas de oro mediante voltamperometría cíclica.
- Cristalogénesis de proteínas en presencia de nanopartículas de oro

1.1. NUCLEACIÓN EN DIFERENTES ENTORNOS

El fenómeno de nucleación en cristalogénesis inicialmente se propuso para cristales de proteína (Ducruix & Giegé, 1992) (Vekilov, 2010). La usanza de este mecanismo ha sido demostrada para materiales orgánicos e inorgánicos de pequeñas moléculas, coloides (Thanh, Maclean, & Mahiddine, 2014) (Xia, Xiahou, Zhang, Ding, & Wang, 2016) y procesos de biomineralización (Currey, 1999). Para obtener la nucleación espontánea de cristales de proteínas, no es suficiente establecer los ensayos de cristalización en condiciones de sobresaturación. De hecho, en condiciones justo por encima de la curva de solubilidad de la proteína, la sobresaturación no es suficiente para que tenga lugar la nucleación espontánea. Dentro de esta zona de condiciones, comúnmente llamada la "zona metaestable", es posible mantener, pero no iniciar, el crecimiento del cristal (Saridakis & Chayen, 2000), (Ducruix & Giegé, 1992).

La existencia en la solución de un estado de sobresaturación o superenfriamiento por sí sola no es causa suficiente para que un sistema comience con el proceso de cristalogénesis (Mullin, 2001). Por ejemplo, en la gota colgante en el caso de la

cristalogénesis por difusión en fase vapor, es necesario que existan en ella un número de núcleos que permitan fungir como centros de crecimiento.

La nucleación puede verse inducida por agitación, choque mecánico (Wilcox & Khalaf, 1974), fricción y presiones extremas (Mullin, 2001) y en casos recientes, mediante formación de nanopartículas en solución por irradiación láser ultrarrápida (Tibbetts, Tangeysh, Odhner, & Levis, 2016).

1.1.1. TIPOS DE NUCLEACIÓN

Se puede dividir la nucleación en dos categorías: en la primera se conoce como nucleación homogénea (espontánea), y la segunda es la heterogénea (inducidas por partículas del exterior), en la segunda categoría se incluyen aquellas nucleaciones inducidas por microcristales (Mullin, 2001).

El proceso de nucleación se puede ver afectado por las impurezas del exterior, reactivos adheridos a las paredes del contenedor provenientes de otras reacciones, temperatura, concentración, interfases, entre otros. Hay dos casos representativos en este trabajo de tesis de maestría que podemos mencionar:

Caso 1. La síntesis de nanopartículas de oro depende de la concentración del agente reductor en el medio; sin embargo, se ha visto que las partículas del exterior, pérdida de volumen, pH (Piella, Bastús, & Puentes, 2016), agitación, temperatura y adherencia de producto de la síntesis en las paredes del contenedor (Turkevich, Stevenson, & Hillier, 1951), podrían afectar el tamaño de partícula, como su estabilidad. Esto se soluciona con el correcto lavado del material a usar (**Figura 1**).

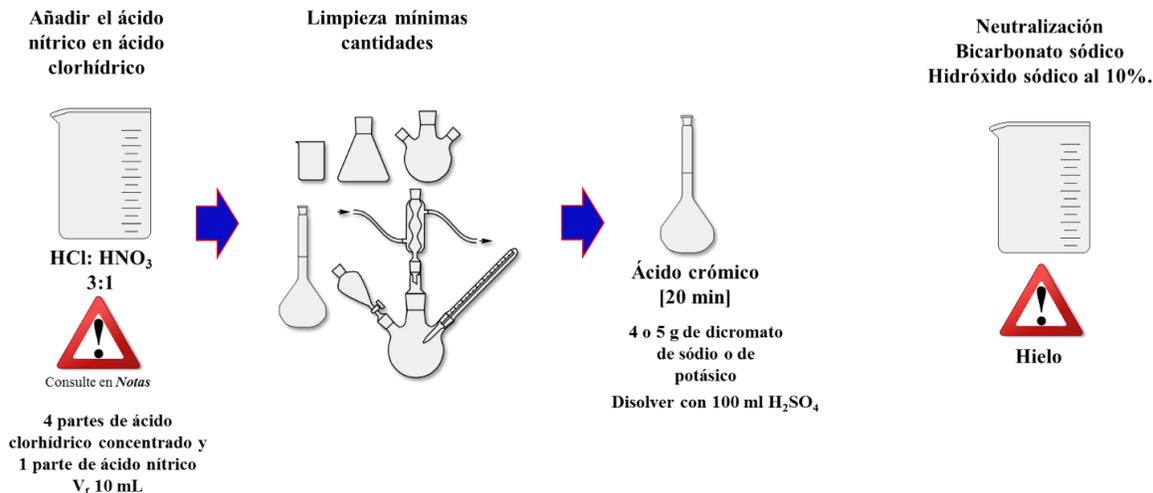


Figura 1 | Esquema general de la limpieza del material previo a la síntesis (Turkevich, Stevenson, & Hillier, 1951).

Caso 2. Un factor fundamental en la cristalogénesis de proteínas es la solubilidad como característica particular. Es importante considerar que las proteínas pueden dividirse en 3 clases dependiendo de su solubilidad con respecto a la temperatura. En la clase uno (la más común) se incluye aquellas que aumenta su solubilidad exponencialmente al aumentar la temperatura. En la clase dos, presentan una solubilidad muy baja o la temperatura no ejerce ningún efecto con respecto a la solubilidad de la proteína. Y, por último, están aquellas donde la solubilidad de la proteína disminuye cuando la temperatura aumenta. La glucosa isomerasa (**Figura 2**) pertenece a aquellas proteínas donde se obtienen mejores resultados a una temperatura más alta, por ejemplo a 22 °C, es mejor que a 18 °C, donde la solubilidad se ve afectada. (Martínez-Caballero, y otros, 2016).

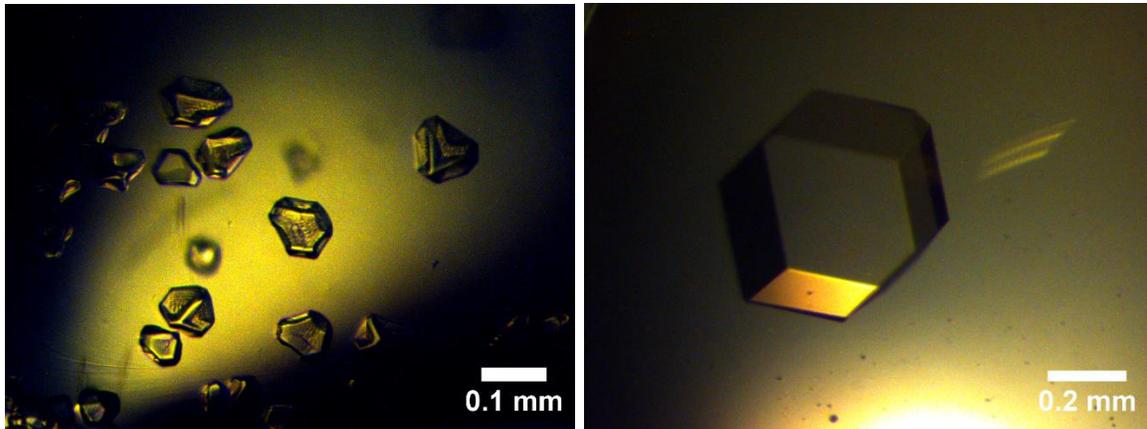


Figura 2 | Efecto de la temperatura en el crecimiento de cristales de glucosa isomerasa. Izquierda. Crecimiento de cristales de glucosa isomerasa a 18°C. Derecha. Crecimiento de cristales de glucosa isomerasa a 22°C. Las condiciones en ambos casos fueron: 5 μ L de 30 mg/mL de glucosa isomerasa y 5 μ L de solución de pozo, la cual contiene 0.2 M formiato de magnesio dihidratado. La glucosa isomerasa aumenta su solubilidad relevantemente al aumentar la temperatura.

En la experimentación y en el proceso de cristalogénesis, predecir la formación de núcleos de cristal es difícil. Durante este proceso la coagulación de las moléculas, la resistencia de la proteína a redisolverse en la gota (es el caso de la técnica empleada en la cristalogénesis), son solo algunos ejemplos a los que se somete el proceso, así como el de orientación en una red fija (Mullin, 2001).

Los inicios de la discusión de la teoría de nucleación están en los trabajos de Gibbs (1948), Volmer (1939), Becker y Döring (1935) y otros, los cuales están basados en la condensación de vapor a líquido, y este tratamiento puede ser extendido a la cristalización a partir de fundidos y soluciones (Mullin, 2001).

La motivación en la obtención de nanomateriales metálicos por medio de síntesis química deriva del aprovechamiento de sus propiedades que dependen de su tamaño, forma, composición, estructura y funcionalidad superficial.

El proceso clásico y de crecimiento de LaMer se utiliza comúnmente para describir el crecimiento de nanopartículas (Sabir, y otros, 2012). Este proceso supone un desencadenamiento de nucleación que produce una serie de núcleos factible para el crecimiento. Después de la nucleación inicial, los núcleos acrecientan en partículas

por la adición molecular de especies precursoras en la superficie de las partículas (maduración de Ostwald), fenómeno observado en soluciones sólidas o líquidas de soles que describe el cambio de una estructura homogénea con el tiempo. En este modelo, las partículas serán esencialmente monodispersas. Este modelo clásico de desencadenamiento de la nucleación ha sido disputado en el caso de la reducción por medio de citrato donde la polidispersidad y el tamaño están influenciados por el pH, la temperatura y la concentración del agente reductor (Sabir, y otros, 2012).

El mecanismo cinético para el crecimiento de nanopartículas de oro durante la reducción de $[\text{AuCl}_4]^-$ y $[\text{AuBr}_4]^-$ con hidracina en las micelas inversas de un tensoactivo no iónico oxietilado incluyen las dos etapas de nucleación (lenta y continua) y un rápido crecimiento superficial autocatalítico. Ambos pasos son limitados por las reacciones de reducción del precursor de oro (Sergievskaya, Tatarchuk, Makotchenko, & Mironov, 2015). En otro estudio, se demostró que dos mecanismos en la nucleación de Au (0) se producen durante la reducción fotoquímica de campo fuerte de $[\text{AuCl}_4]^-$ acuoso para formar nanopartículas de oro. La fotólisis multifotónica de complejos metálicos tiene un papel importante en la formación de nanopartículas en solución por irradiación láser ultrarrápida (Tibbetts, Tangeysh, Odhner, & Levis, 2016)

1.2. SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE ORO

La motivación en la obtención de nanomateriales metálicos por medio de síntesis química deriva del aprovechamiento de sus propiedades que dependen de su tamaño, forma, composición, estructura y funcionalidad superficial. Antes de profundizar es importante definir a los nanomateriales desde el término de nanocompuesto el cual precisa a *un compuesto en el que al menos uno de los dominios de fase tiene al menos una dimensión del orden de los nanómetros*. La definición menciona el dominio de fase, esto es debido a la definición de *compuesto*

que es *un material multicomponente que comprende múltiples, diferentes dominios de fase (no gaseosos) en los que al menos un tipo de dominio de fase es una fase continua* (Alemán, y otros, 2007), (McNaught & Wilkinson, 1997).

1.2.1. EL CITRATO COMO AGENTE REDUCTOR Y OTROS MÉTODOS DE SÍNTESIS

El primer uso de las nanopartículas de oro está íntimamente conectado con la historia del vidrio de color rojo. La elaboración y producción de vidrio rojo (opaco) comienza con el principio de la fabricación de vidrio en Egipto y Mesopotamia en 1400-1300 a.C. (Louis & Pluchery, 2012).

Primordialmente, la diferencia entre los nanomateriales (y principal característica que los distingue entre ellos) es la proporción de su superficie al de volumen. Esta característica está relacionada con las propiedades singulares de cada nanomaterial, en este caso de las nanopartículas de oro y plata. Por ejemplo, el plasmón de resonancia tiene su origen en los electrones libres en el metal (electrones d en plata y oro) que son libres de viajar a través del material (Eustis & El-Sayed, 2005).

Después de la determinación de sus propiedades singulares tenemos la gran relación entre superficie y volumen. Esta implica que los nanomateriales muestran energías de superficie altas (la energía de superficie aumenta con el área de superficie), lo que los hace termodinámicamente inestables o metaestables (Carmargo, Rodrigues, da Silva, & Wang, 2015).

1.2.2. REVESTIMIENTO, DEPÓSITO E INMOVILIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS

Hay nanopartículas de oro pueden ser inmovilizadas en un material mesoporoso, es decir, un material que contiene diámetros de entre 2 y 50 nm (Maji, Mandal, Nguyen, Borah, & Zhao, 2015).

Asimismo, también se han hecho esfuerzos para la obtención de dímeros compuestos por nanopartículas de oro a partir de la funcionalización con ligantes orgánicos y tiol trivalentes con un grupo no reactivo. La funcionalización superficial regioselectiva la lograron en dos etapas. Se explica en una etapa inicial que se utilizó una superficie de vidrio funcionalizada con silano para la inmovilización de nanopartículas de oro estabilizadas en citrato. El sitio de partículas opuesto al vidrio se inactivó con los ligantes. En la etapa posterior se ve involucrada la unión de un reactivo durante la desorción del vidrio. En el estudio probaron con varios ligantes mono-, di y trivalentes, los cuales se investigaron para la inactivación parcial de las partículas inmovilizadas, por ejemplo, como citeamina, 11-mercapto-1-undecanol, ácido 16-mercaptohexadecanoico, ácido mercaptosuccínico, ácido lipoico, entre otros (Hofmann, Schmiel, Stein, & Graf, 2011).

Hay un estudio donde se representa una molécula para el área de ocupación mínima de ligante y con ello de ligantes tiol-alcano sobre una superficie plana de oro y el cálculo correspondiente para el "diámetro" del ligante basado en la geometría estimada. En el mismo estudio, se menciona un ejemplo de cálculo para determinar el número de moléculas de PEGSH necesarias para lograr una cobertura completa de la nanopartícula de oro, basada en los átomos de oro medidos por ICP-MS (Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente, por sus siglas en inglés), volumen de nanopartículas de oro sintetizadas, número de átomos en una nanopartícula de oro y número de moléculas de PEGSH necesarias para una partícula (Smith, y otros, 2015).

En un estudio se demostró una técnica rentable de impresión de una base de nanopartículas metálicas para un patrón selectivo y predefinido, y se evaluó su uso como catalizadores en las enfermedades cardiovasculares (Zopes, von Hagen, Müller, Fiz, & Mathur, 2010).

En el depósito de nanopartículas de oro sobre la superficie de un fotoánodo de hematita, las nanopartículas de oro inducen el equilibrio del nivel de Fermi, la superficie catalítica y los efectos plasmónicos del fotoánodo de oro/hematita (Li, y otros, 2016).

1.2.3. ESTABILIDAD DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ORO

Una vez conocidas las propiedades singulares de cada nanomaterial y la relación entre superficie y volumen, en la síntesis de nanomateriales en solución hay que enfrentar sus grandes energías superficiales y evitar que se aglomeren. La aglomeración es termodinámicamente impulsada por la reducción de la superficie y por lo tanto la energía superficial (Carmargo, Rodrigues, da Silva, & Wang, 2015).

El pH y la capacidad de tolerancia a la sal de las nanopartículas de oro dependen de la naturaleza de los agentes reductores y estabilizadores. Hay un estudio donde observaron que el uso de reactivos que contienen amina orgánica, es decir, polietilenimina, 3-aminopropiltrimetoxisilano, en presencia de formaldehído, permite la síntesis controlada y rápida de nanopartículas de oro con capacidad de tolerancia a la sal y pH (Pandey & Pandey, 2016).

Sin embargo, la perdurabilidad de las nanopartículas de oro no sólo está sometida al pH y concentración de sal, sino sustancialmente en la noción detrás de la estabilización electrostática, la cual se basa en la repulsión de cargas eléctricas

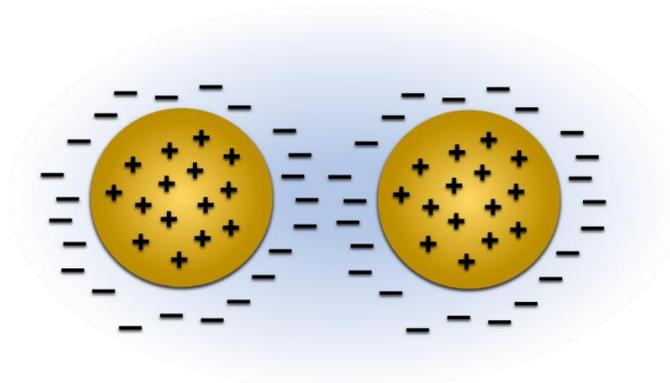


Figura 3| Estabilización electrostática entre dos partículas que se aproximan. La repulsión electrostática de cargas similares separa las partículas cuando sus dobles capas se superponen (Carmargo, Rodrigues, da Silva, & Wang, 2015).

que la suma de sus capas dobles individuales, podemos incluso entender la estabilización electrostática en términos de flujo osmótico (Carmargo, Rodrigues, da Silva, & Wang, 2015).

Turkevich et al. inicialmente informaron y posteriormente lo confirmaron otros investigadores, que solo una pequeña fracción de los iones $[\text{AuCl}_4]^-$ se consumían durante la reducción inicial con citrato, mientras que los iones $[\text{AuCl}_4]^-$ restantes tendían a adsorberse en las nanopartículas de oro recién formadas en una etapa temprana de la reacción; la adsorción de citrato en las recién formadas nanopartículas de oro ocurría al final de la reacción. De acuerdo con las mediciones de la fuerza superficial, la adsorción de iones AuCl_4^- no puede generar una repulsión electrostática lo suficientemente alta entre los elementos de oro recién formados, dando lugar a la aglomeración de nanopartículas de oro a un tiempo de reacción prematuro. Por el contrario, una fuerte repulsión electrostática aparecerá cuando los cuerpos nanoparticulados recién formados estén revestidos predominantemente por

(Figura 3) que tienen el mismo signo presente en las dobles capas eléctricas entre partículas inmediatas (Carmargo, Rodrigues, da Silva, & Wang, 2015).

Si asumimos que el disolvente del medio líquido fluye hacia la región donde las dobles capas se superponen hasta que la distancia entre las nanopartículas es igual o mayor

citrato, lo que dará como resultado la peptización de los agregados de nanopartículas en elementos esferoides de oro finales (Xia, Xiahou, Zhang, Ding, & Wang, 2016), (Turkevich, Stevenson, & Hillier, 1951).

1.3. PROPIEDADES DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ORO

La espectroscopía Raman de superficie exacerbada (SERS, por sus siglas en inglés) permite estudios químicos sensibles y la identificación de materiales, dependiendo de los mecanismos electromagnéticos (EM) y de mejora química (Kusch, y otros, 2017). Una variación en la intensidad y la frecuencia en esta espectroscopía vibracional fueron observadas por primera vez en 1974 para estudiar el papel de la adsorción en los electrodos. En el estudio lograron distinguir dos tipos de adsorción de piridina en un electrodo de plata (Fleischmann, Hendra, & McQuillan, 1974).

Recientemente, conjuntos anisotrópicos como las nanopartículas de oro han atraído mucha atención por su capacidad de maximizar la mejora del campo electromagnético, por ejemplo, en SERS y otros campos espectroscópicos (Sabir, y otros, 2012) (Kusch, y otros, 2017).

Como se dijo antes, las nanopartículas de oro inducen el equilibrio del nivel de Fermi, la superficie catalítica y los efectos plasmónicos del fotoánodo de oro/hematita (Li, y otros, 2016).

1.3.1. PROPIEDADES ESPECTRALES DE LAS NANOPARTÍCULAS METÁLICAS Y LA DEPENDENCIA DEL TAMAÑO CON EL PLASMÓN DE ABSORCIÓN

Tanto la inmovilización de nanopartículas de oro de 5 nm (Swarup Kumar, Amal Kumar, Kim Truc, Parijat, & Yanli, 2014), como la obtención de dímeros de nanopartículas de oro a partir de la funcionalización con ligantes orgánicos de ≈ 17 nm (Hofmann, Schmiel, Stein, & Graf, 2011), el crecimiento de nanopartículas de oro durante la reducción $[\text{AuCl}_4]^-$ y $[\text{AuBr}_4]^-$ con hidracina de 7 nm (Sergievskaya, Tatarchuk, Makotchenko, & Mironov, 2015), y la formación de nanopartículas en solución por irradiación láser ultrarrápida de 4.8 nm (Tibbetts, Tangeysh, Odhner, & Levis, 2016), poseen propiedades espectrales. El coeficiente de extinción total de pequeñas partículas metálicas presentado en la Teoría de Mie se define como la suma de todas las oscilaciones multipolares eléctricas y magnéticas que contribuyen a la absorción y dispersión del campo electromagnético interactivo (Link & El-Sayed, 1999). Para nanopartículas menores que la longitud de onda de la luz absorbente (aproximadamente 25 nm para partículas de oro) sólo se supone que el término dipolo contribuye a la absorción (aproximación de dipolos). En el régimen cuasi-estático el coeficiente de extinción κ para N partículas del volumen V se da entonces mediante la siguiente ecuación (Link & El-Sayed, 1999).

$$\kappa = \frac{18\pi N V \epsilon_m^{3/2} \epsilon_2}{\lambda [\epsilon_1 + 2\epsilon_m] + \epsilon_2^2}$$

Ecuación (1)

donde λ es la longitud de onda de la radiación absorbente, ϵ_m es la constante dieléctrica del medio circundante, la cual se supone independiente de la frecuencia. ϵ_1 y ϵ_2 representan las partes real e imaginaria de la función dieléctrica del material, respectivamente ($\epsilon(\omega) = \epsilon_1(\omega) + i\epsilon_2(\omega)$), donde ω es la frecuencia

angular de la luz). La absorbancia A de una solución coloidal que contiene N partículas en una celda óptica con una longitud de trayectoria L es $A = (\kappa/\ln 10)L$ (Link & El-Sayed, 1999).

La plasmón de resonancia superficial (PRS) es la oscilación resonante de los electrones de conducción en la interfaz entre el material de permeabilidad negativo y positivo estimulado por la luz incidente. SPR es la base de muchas herramientas estándar para medir la adsorción de material en superficies metálicas planas (típicamente doradas o plateadas) o en la superficie de nanopartículas metálicas. Desde su primer uso en un análisis en tiempo real de un sistema biológico en la década de 1990, la plasmón de resonancia superficial (PRS) se ha convertido en una importante tecnología de biosensores ópticos en las áreas de bioquímica, biología y ciencias médicas debido a su tiempo real, naturaleza libre de marcadores y no invasiva (Tang, Zeng, & Liang, 2010).

Las investigaciones de plasmón de resonancia superficial (PRS) a partir de nanopartículas de aleación de oro y plata se han centrado en estudios de las nanopartículas en solución. Como se dijo antes, en el caso de las nanopartículas de oro y plata, por ejemplo, el plasmón de resonancia tiene su origen en los electrones libres en el metal (electrones d en plata y oro) son libres de viajar a través del material (Eustis & El-Sayed, 2005). Los plasmones de superficie se crean en el límite de un metal. Estos representan oscilaciones cuantificadas de la carga superficial producida por un campo eléctrico externo (Eccles, y otros, 2010). Los sensores de plasmón de resonancia superficial (PRS) son herramientas poderosas para monitorear en tiempo real las interacciones de diversos analitos biológicos y químicos. Asimismo, las nanopartículas de oro se han usado comúnmente como marcadores de señalización en sensores PSPR convencionales (Zeng, Baillargeat, Ho, & Yong, 2014). Los picos LSPR de las nanopartículas de oro están fuertemente gobernados por su tamaño, forma y la constante dieléctrica del medio circundante. Por ejemplo, el LSPR de nanobarras de oro (Au NRs) puede sintonizarse sistemáticamente desde la región de longitud de onda del infrarrojo cercano al visible

manipulando cuidadosamente sus relaciones de aspecto. Por lo tanto, uno puede elegir el tamaño de partícula de oro "correcto" y acoplar su LSPR correspondiente a las ondas de plasmón de superficie de los sensores PSPR para obtener el mayor efecto de mejora de campo, aumentando así la sensibilidad del sensor (Zeng, Baillargeat, Ho, & Yong, 2014).

El PRS excitado en nanopartículas metálicas establece interesantes propiedades ópticas. Es notable el color rojo bermellón o rojo anaranjado, el cual está sometido al tamaño de la nanopartícula. Esto se debe a las distintas frecuencias de los PRS en los metales, la cual varía en cada una de las aleaciones. Para los plasmones de superficie en nanopartículas metálicas hay una serie de modos de resonancia relacionadas con la teoría de Mie. Por último, se sabe que la oscilación colectiva de electrones libres en una nanoesfera de oro, es la responsable del plasmón de resonancia superficial (PRS) (Yang, Yang, Pang, Vara, & Xia, 2015).

1.4. CONJUGACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE ORO

Sabemos que después de que HAuCl_4 se disuelve, la solución suele someterse a una temperatura de ebullición con una agitación vertiginosa mientras que el agente reductor se introduce rápidamente para reducir los iones $[\text{AuCl}_4]^-$ a átomos de Au (0). A medida que se producen más átomos de Au (0) la solución se sobresatura, haciendo que los átomos precipiten como núcleos en forma de partículas subnanométricas. Para evitar que los núcleos se agreguen entre sí, un estabilizador que se puede unir a la superficie de Au debe ser introducido, al igual que un ligante puede ser utilizado en la estabilización de nanopartículas de Au (Yang, Yang, Pang, Vara, & Xia, 2015).

La naturaleza anfifílica de los lípidos se debe a su grupo cabezal polar y a las colas de ácidos grasos no polares. Por lo tanto, la asociación de lípidos con la NPAu puede ocurrir ya sea a través de interacciones electrostáticas de los cabezales con carga

en las superficies de NPAu o a través de interacciones hidrofóbicas con las colas y especies hidrofóbicas sobre la superficie de NPAu. El recubrimiento lipídico único y mixto de las NPAu ha sido demostrado en el estudio de [Yang & Murphy, 2012](#), donde se utilizaron dos medios diferentes para asegurar al lípido sobre las interacciones con el metal: hidrofóbicas o electrostáticas ([Yang & Murphy, 2012](#)).

1.5. TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE ORO

Para estudiar el efecto de la adición de NaBr en el espectro de absorción de una mezcla de nanopartículas de oro, se añadieron alcoholes o cetonas a una solución Au (III). Con esto se mejoraron las velocidades, pero las nanopartículas de oro seguían siendo inestables. La adición de tensoactivos aceleró la velocidad y estabilizó a las nanopartículas de oro durante varios meses como estado coloidal ([Nagata, Mizukoshi, Okitsu, & Maeda, 1996](#)).

En microscopía electrónica de transmisión como técnica de caracterización de las nanopartículas, estas se manifiestan como elementos nanoparticulados visibles, densos, de contraste oscuro y generalmente de aspecto negro ([Pandey & Pandey, 2016](#)).

Para nanopartículas de oro, plata y cobre, la resonancia de dipolo se produce en la región UV-Vis haciendo las nanopartículas útiles para aplicaciones ópticas ([Swarup Kumar, Amal Kumar, Kim Truc, Parijat, & Yanli, 2014](#)), ([Hofmann, Schmiel, Stein, & Graf, 2011](#)), ([Yang, Yang, Pang, Vara, & Xia, 2015](#)).

1.6. NANOPARTÍCULAS DE ORO Y MACROMOLÉCULAS

Las nanopartículas de oro en contacto con fluidos biológicos interactúan con macromoléculas como las proteínas, aunque también se sabe que lo hacen con otras biomoléculas. Las nanopartículas estarán revestidas por estas macromoléculas las cuales puede variar debido a circunstancias de asociamiento y disociación a través del tiempo de exposición (Dell'Orco, Lundqvist, Oslakovic, Cedervall, & Linse, 2010).

La obtención de nanomateriales metálicos por medio de síntesis química deriva del aprovechamiento de sus propiedades que dependen de su tamaño, forma, composición, estructura y funcionalidad superficial. La mayoría de las nanopartículas de oro constan de partículas que varían en diámetro de aproximadamente 5 nm a alrededor de 150 nm. Los métodos para formar suspensiones de oro de pequeñas partículas de diámetro conocido dependen de la concentración del agente reductor en el medio, pH, agitación, temperatura, igual modo, estas variables podrían afectar tanto el tamaño de partícula, como su estabilidad (Hermanson, 2013).

Algunos complejos proteína y nanopartícula de oro deriva de procesos aún faltos de entendimiento (Hermanson, 2013). Pese a esto, las interacciones de la proteínas con los coloides de oro dependen de: (1) la atracción electrónica entre partículas de oro cargadas negativamente y los abundantes sitios cargados positivamente en la molécula proteica, (2) un suceso de adsorción que implica zonas hidrófobas sobre la proteína que se unen a la superficie de la nanopartícula metálica y (3) el potencial de unión del oro con átomos accesibles sulfhidrilo, oxígeno o nitrógeno a través de sus pares de electrones no compartidos para formar enlaces dativos o covalentes coordinados (Hermanson, 2013).

1.7. TÉCNICAS ELECTROQUÍMICAS Y NANOPARTÍCULAS DE ORO

En el entorno de la biología y bioquímica se reflexiona cómo los potenciales de reducción y oxidación conducen a un flujo de electrones en la cadena de transporte de electrones y como se recolecta esa energía para potenciar la fosforilación oxidativa (Hendel & Young, 2016). También se nota la aparición de la electroquímica en la generación de estrategias para tratar contaminantes, y de esta manera discutir acerca de la reducción o en el mejor de los casos la abolición del uso de sustancias químicas, y exhortar a los responsables al uso de rutas alternas (Rajeshwar & Ibanez, 1997).

De acuerdo con la Real Academia Española (RAE) la electroquímica es la *parte de la fisicoquímica que trata de las leyes referentes a la producción de la electricidad por combinaciones químicas, y de su influencia en la composición de los cuerpos*. La electroquímica está presente desde los cursos de química general para introducir a las reacciones que conllevan una oxidación y una reducción mediante celdas galvánicas. (Hendel & Young, 2016)

La evolución de una reacción redox estará representada por eventos a lo largo de la misma debido a una alteración o perturbación del entorno eléctrico. Dentro de estos eventos, estará presente el evento o proceso electroquímico y la dimensión de la respuesta estará subordinada a cualquier suceso, acontecimiento, hecho, imprevisto y/o circunstancia asociada. La dimensión o magnitud de esta respuesta estará dada conforme al tipo de alteración o perturbación que ha sido impuesta al sistema. Así, podremos inducir caracterizaciones, reacciones al electrodo, concentración de analito e inclusive la modificación de las especies reactivas en una celda electroanalítica (Baeza Reyes & García Mendoza, 2011).

Podemos mencionar dos conjuntos de técnicas electroquímicas para su clasificación. El primer conjunto está caracterizado por la *imposición de un potencial* ($E = f(t)$) y otras por la *imposición de corriente* ($i = f(t)$), ambas en función del tiempo; el primer

conjunto incluye a aquellas que acarrean técnicas *potenciostáticas* (pulsos de potencial) y *potenciodinámicas* (barrido de potencial). En el segundo conjunto estarán implicadas las *galvanostáticas* (pulsos de corriente) y *galvanodinámicas* (barrido de corriente) (Baeza Reyes & García Mendoza, 2011).

El *electrodo de trabajo* consiste en una barra o disco, típicamente de platino, oro, plata, níquel y pasta de carbono, etc., e incrustada en un bloque de plástico. El electrodo de carbón vítreo es usado comúnmente para los estudios electroquímicos (Bioanalytical Systems, Inc, 2001).

El bloque está hecho de un material polimérico, termoplástico y semicristalino llamado PEEK (polieteretercetona), el cual es resistente a los disolventes y a las temperaturas normalmente usadas en cromatografía líquida y electroquímica. El PEEK se degrada químicamente por ácidos nítrico y/o sulfúrico concentrados, pero se puede usar HNO₃ diluido, por ejemplo, para eliminar el mercurio de los electrodos de amalgama de oro sin dañar la superficie de PEEK. Los electrodos de trabajo se mantienen puliendo según sea necesario, siguiendo las instrucciones en la sección experimental (Bioanalytical Systems, Inc, 2001).

Sin embargo, la respuesta eléctrica de un electrodo puede verse modificada por modificaciones en su superficie, como se muestra en un estudio reciente donde se demuestra una dependencia de la morfología con la respuesta espectral en nanopartículas de oro, debido a la carga capacitiva, y es analizada gracias al uso de la espectroscopía de partícula-única en un entorno electroquímico inerte (Hoener, y otros, 2017).

1.7.1. CRONOAMPEROMETRÍA

Disponemos de la cronoamperometría para el análisis de procesos de difusión, cinética de reacciones químicas y adsorción. Esta técnica electroquímica consta de

suministrar un potencial en un paso al electrodo de trabajo y, con lo anterior, se observa la corriente consecuente al tiempo de excitación provisto.

Al comienzo del ensayo electroquímico el electrodo de trabajo está bajo un potencial en el que no se produce ningún evento faradáico. Entonces para que se lleve a cabo la reacción redox de interés, es necesario suministrar el potencial de excitación.

Para las reacciones que están bajo control de difusión, la corriente se descompone con una decadencia en $t^{1/2}$ y obedece a la ecuación de Cottrell:

$$i(t) = \frac{nFAD_o^{1/2}C_o}{\pi^{1/2}t^{1/2}} \quad \text{Ecuación (2)}$$

La ecuación previa fija un nexo notable para muchas técnicas electroquímicas. Manifiesta el efecto de un escalón de potencial positivo con respecto a E^* , a un potencial más negativo. La disminución de la corriente sigue una ley de tipo $1/\sqrt{t}$ que representa la dependencia básica, con respecto al tiempo, de las soluciones no agitadas. La medición de dichas corrientes se conoce como cronoamperometría.

1.7.2. VOLTAMPEROMETRÍA CÍCLICA

La voltamperometría cíclica es una técnica usada para realizar mediciones de potenciales redox, entre otros (Hendel & Young, 2016).

Dado que se trata de una técnica donde se analiza la variación de la corriente a medida que se modifica el potencial, el nombre correcto es "voltamperometría", sin embargo por error de traducción se la conoce con el nombre más corto: "voltametría".

La voltamperometría cíclica consiste en hacer un barrido de potencial de un electrodo sumergido en una solución la cual no está expuesta a ningún tipo de turbulencia o agitación y se mide la corriente resultante. Al potencial de este electrodo que ha sido sumergido, se le llama potencial de *electrodo de trabajo* y está controlado contra un *electrodo de referencia* el cual puede ser típicamente un electrodo de calomel (SCE) o un electrodo plata/cloruro de plata (Ag/AgCl) (Kissinger & Heineman, 1983).

La celda electroquímica más ordinaria está compuesta por tres electrodos, uno de ellos es el "*electrodo auxiliar*", seguido por el "*electrodo de referencia*" y el "*electrodo de trabajo*"

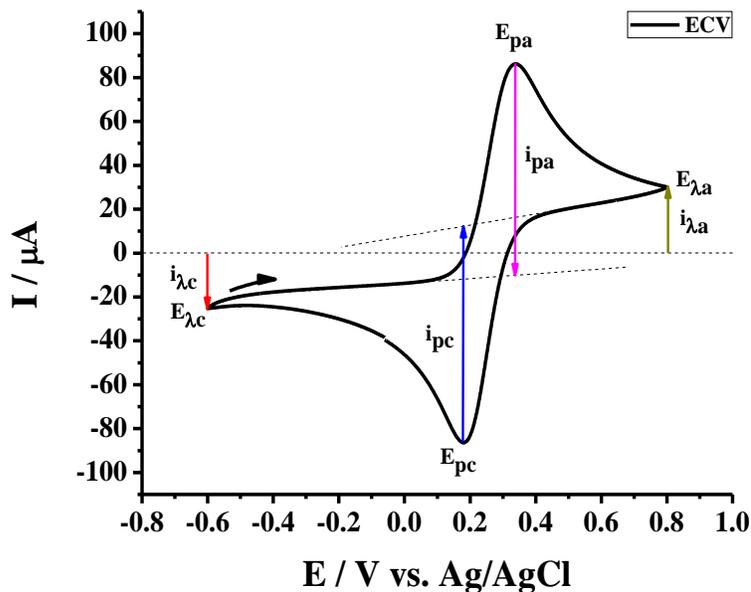


Figura 4 | Voltamperograma de un electrodo de carbón-vítreo, evaluado en PBS (1 X, pH 7.4) que contiene 5.0 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ y 0.1 M de KCl desde -0.6 V a 0.8 V con una velocidad de barrido de 25 mV/s (2° ciclo, segmentos 3-4). En el voltamperograma es posible observar los picos de potencial catódico, E_{pc} y potencial anódico, E_{pa} . Asimismo, i_{pc} e i_{pa} representan los picos catódico y anódico, respectivamente.

mencionados con anterioridad, todos sumergidos en la solución líquida y estos a su vez conectados a un *potenciostato*, el cual tiene como cometido que la diferencia de potencial entre el electrodo de referencia y de trabajo sea controlada con interferencia mínima de la caída IR (óhmica). Esto, en conjunto con las especies que se reducen y oxidan en el medio de solución

líquido, dará lugar al voltamperograma cíclico (Marken, Neudeck, & Bond, 2010). El

potencial de control que se aplica a través de estos dos electrodos se puede considerar una *señal de excitación*. En la voltamperometría cíclica la señal de excitación es una exploración de potencial lineal con una forma de onda triangular (Kissinger & Heineman, 1983). De esta exploración es posible obtener el potencial redox, $E_{1/2}$, el cual se determina usando los dos picos que surgen cuando el potencial aplicado es puesto en ciclo a un potencial de conmutación y luego de nuevo al potencial de partida, es decir, surgen al término de un ciclo de exploración de potencial (Hendel & Young, 2016).

La obtención de un voltamperograma (**Figura 4**) estará dado por la medición de la corriente que el electrodo de trabajo realice durante la exploración del potencial. Se considera a la corriente como señal de respuesta a la señal de potencial de excitación. Un típico voltamperograma presenta a la corriente en el eje de las ordenadas y el potencial en el eje de las abscisas, aunque el eje de abscisas incluso puede fungir como eje de tiempo, ya que el potencial varía linealmente con el tiempo (Kissinger & Heineman, 1983). En el voltamperograma es posible observar los picos de potencial catódico, E_{pc} y potencial anódico, E_{pa} . Se propone que para un sistema perfectamente reversible, es decir que la transferencia de electrones es más rápida que los demás procesos, por ejemplo la difusión, la diferencia de potencial entre los dos picos en una voltamperometría cíclica estará cercana a:

$$|E_{pc} - E_{pa}| = \frac{2.3RT}{nF} \quad \text{Ecuación (3)}$$

donde R es la constante de los gases ideales, F es la constante de Faraday, n es el número de electrones involucrados en el proceso electroquímico, y T es la temperatura en K. Esto es, a 298 K,

$$|E_{pc} - E_{pa}| = \frac{2.3RT}{nF} = \frac{2.3(8.3145 \frac{J}{mol \cdot K})(298 K)}{(1)(96,485.33289 \frac{C}{mol})} = 0.059 V \quad \text{Ecuación (4)}$$

En la demostración anterior se expresa la diferencia de potencial con el *voltio* y no como el cociente de J/C , esto es porque el voltio se define como la diferencia en potencial eléctrico hallado entre dos puntos tales que hay que realizar un trabajo de 1 J para trasladar del uno al otro la carga de 1 C. De igual manera, el voltio es el potencial en un punto de un campo electroestático si la energía potencial en aquel punto es igual a un joule por culombio (Guayasamin, 2010). Si expresamos al voltio en unidades básicas del Sistema Internacional

$$1 V = \frac{W}{Q} = \frac{C}{F} = \frac{J}{C} = \frac{N \cdot m}{A \cdot s} = \frac{kg \cdot m^2}{A \cdot s^3} \quad \text{Ecuación (5)}$$

$$V = \frac{W}{Q} = \frac{\text{Julio (J)}}{\text{Culombio (C)}} = \frac{\text{Newton} \cdot \text{metro}}{\text{Culombio}} \quad \text{Ecuación (6)}$$

$$1 \text{ voltio} = 1 \text{ joule} / 1 \text{ culombio} \quad \text{Ecuación (7)}$$

Continuando,

$$\frac{i_{pc}}{i_{pa}} = -1 \quad \text{Ecuación (8)}$$

Donde i_{pc} e i_{pa} representan las intensidades de corriente de los picos catódico y anódico, respectivamente. Esta relación entre los picos anteriores deberá ser

negativa, esto es, debido al valor absoluto de las alturas, las cuales son el mismo en las exploraciones hacia adelante y hacia atrás para sistemas reversibles y con la misma concentración de las especies redox. Durante estas exploraciones habrán dos corrientes, en la corriente negativa el pico catódico, i_{pc} , compete a la reducción y el pico anódico, i_{pa} , a la oxidación (Hendel & Young, 2016).

Asimismo, la relación de las corrientes de pico y la diferencia entre los potenciales de pico revelan la reversibilidad de la reacción. Cuando más cerca está la relación de corrientes de pico a la vecindad, y la diferencia de potencial de pico a $\frac{2.3RT}{nF}$, la relación será más termodinámicamente reversible (Hendel & Young, 2016).

Cuando se presenta una reacción reversible en el electrodo, el potencial de pico catódico y anódico dependen del potencial formal, $E^{0'}$ (Scholz, 2010), y son presentados de la siguiente forma:

$$E_{pc} = E_c^{0'} - 1.109 \frac{RT}{nF} - \frac{RT}{nF} \ln \frac{D_{Ox}^{1/2}}{D_{Red}^{1/2}} \quad \text{Ecuación (9)}$$

$$E_{pa} = E_c^{0'} + 1.109 \frac{RT}{nF} - \frac{RT}{nF} \ln \frac{D_{Ox}^{1/2}}{D_{Red}^{1/2}} \quad \text{Ecuación (10)}$$

donde D_{Ox} y D_{Red} son los coeficientes de difusión. Si estos se consideran aproximadamente iguales, la diferencia entre los potenciales máximos anódico y catódico es:

$$E_{pa} - E_{pc} = 2 \left(1.109 \frac{RT}{nF} \right) \approx \frac{57}{n} mV \quad \text{Ecuación (11)}$$

Así, cuando los coeficientes de difusión de las formas oxidadas y reducidas sean iguales, se da una relación simple entre los potenciales máximos y el potencial formal. Esta es también utilizada para la determinación del potencial formal de un sistema redox auxiliado por la técnica de voltamperometría cíclica (Scholz, 2010), como sigue:

$$E_c^{0'} = \frac{E_{pa} + E_{pc}}{2} \quad \text{Ecuación (12)}$$

El potencial formal da una muy buena idea del potencial estándar, E^0 , pero afectado por las condiciones específicas de la solución analítica, Sin embargo, es necesario destacar que esto obedece solamente a sistemas reversibles, y el resultado se aplica siempre que el coeficiente de simetría sea $\alpha = 0.5$ (Scholz, 2010).

Para el caso de sistemas totalmente irreversibles, un solo pico será visible, por ejemplo el pico de reducción no se observará cuando la oxidación esté presente en la solución (Scholz, 2010). El potencial de pico catódico dependerá del potencial formal como se muestra:

$$E_{pc} = E_c^{0'} - \frac{RT}{\alpha n F} \left(0.780 + 0.5 \ln \frac{\alpha n D_{Ox} F v}{RT} - \ln k_s \right) \quad \text{Ecuación (13)}$$

La voltamperometría cíclica auxilia en información pronta del comportamiento reducción-oxidación (redox) de las especies, reacciones químicas y determinación de elementos o datos termodinámicos.

Asumiendo un proceso simple redox en donde está implicada la transferencia de un electrón entre el electrodo y las especies químicas A y B en solución, ambas en la misma concentración para que el proceso electroquímico sea independiente de la conversión de alguna de las especies anteriores, y si tenemos que la velocidad de transferencia del electrón es rápida en comparación con la velocidad de transporte de masa, es decir reiterando un proceso redox reversible, tenemos:



La respuesta voltamperométrica cíclica puede ser descubierta resolviendo las ecuaciones de transporte (en tres dimensiones, x , y , z) (Brownson & Banks, 2014):

$$\frac{\partial[A]}{\partial t} = D_A \nabla^2[A] \quad \text{Ecuación (15)}$$

y

$$\frac{\partial[B]}{\partial t} = D_B \nabla^2[B] \quad \text{Ecuación (16)}$$

donde ∇ es el operador nabra, y aplicando condiciones de frontera con la contribución de las siguientes ecuaciones cinéticas de Butler-Volmer:

$$k_{red} = k_{red}^0 \exp\left(\frac{-\alpha F}{RT} \eta\right) \quad \text{Ecuación (17)}$$

$$k_{ox} = k_{ox}^0 \exp\left(\frac{(1-\alpha)F}{RT} \eta\right) \quad \text{Ecuación (18)}$$

donde k^0 es la constante de velocidad electroquímica estándar, α es el coeficiente de transferencia de la especie en exploración y η es el sobrepotencial definido como:

$$\eta = E - E_{A/B}^{0'} \quad \text{Ecuación (19)}$$

donde E es el potencial de electrodo y $E_{A/B}^{0'}$ es el potencial formal para el par A/B , obtenemos:

$$E = E_{inicio} + vt \quad \text{Ecuación (20)}$$

$$0 < t < \frac{E_{final} - E_{inicio}}{v}$$

y

$$E = E_{final} - v \left[t - \frac{E_{final} - E_{inicio}}{v} \right] \quad \text{Ecuación (21)}$$

definen el barrido de potencial entre E_{inicio} y E_{final} con una velocidad de barrido de voltaje de v , en Vs^{-1} y D_A y D_B son los coeficientes de difusión de A y B , respectivamente (Brownson & Banks, 2014).

La ecuación de Randles-Sevcik fija una relación entre el perfil de la corriente alcanzada de la exploración del primer ciclo y la intensidad de corriente, concentración y velocidad de barrido:

$$i_p = 0.4463 \left(\frac{F^3}{RT} \right)^{\frac{1}{2}} n^{\frac{3}{2}} A D^{\frac{1}{2}} C v^{\frac{1}{2}} \quad \text{Ecuación (22)}$$

$$i_p = (2.69 \times 10^5) n^{\frac{3}{2}} A D^{\frac{1}{2}} C v^{\frac{1}{2}} \quad (25^\circ C) \quad \text{Ecuación (23)}$$

Donde:

i_p es la intensidad de corriente de pico

n es el número de electrones transferidos

A es el área superficial del electrodo en cm^2

D es el coeficiente de difusión de la especie electroactiva en $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$

C es la concentración de la especie electroactiva en mol cm^{-3}

v es la velocidad de barrido en V s^{-1}

Para el proceso $A + e^- \xrightleftharpoons[k_{ox}]{k_{red}} B$, si es reversible, la gráfica de $i_p = f\left(v^{\frac{1}{2}}\right)$ exhibe el

perfil de una línea recta, y la misma posibilita la obtención de información analítica, como el número de electrones intercambiados o el valor del coeficiente de difusión de la especie electroactiva (Baeza Reyes & García Mendoza, 2011).

1.8. BIOSENSORES ELECTROQUÍMICOS

Los primeros estudios sobre la naturaleza de estas diferentes interacciones de metales pesados y proteínas enfatizaron la importancia de la unión covalente a los tioles de los residuos de cisteína. La estabilidad del enlace metal-azufre permitió una fácil identificación del ligante (Blundell & Jenkins, 1977).

Estos ligantes pueden complejar los iones metálicos y, por lo tanto, modificar su reactividad dando lugar a muchas especies posibles de unión a proteínas y un patrón complicado de interacción. El pH y la fuerza iónica también pueden afectar al ligante de la proteína y cambiar su afinidad por el metal (Blundell & Jenkins, 1977).

En el área de medicina se han investigado propuestas mediante métodos electroquímicos. Por ejemplo, hay investigaciones prometedoras y eficientes para detectar células de cáncer de mama a través del reconocimiento de dos marcadores tumorales diferentes expresados en la superficie de las células cancerosas al mismo tiempo (Li, y otros, 2010).

1.9. CRISTALOGÉNESIS DE PROTEÍNAS

1.9.1. NUCLEACIÓN Y CRECIMIENTO DE UN CRISTAL

El crecimiento del cristal de una proteína comprende dos etapas principales: la formación de un objeto sólido inicial, o núcleo, en la fase original y el crecimiento real de este núcleo. El crecimiento cristalino es una transición de fase de primer

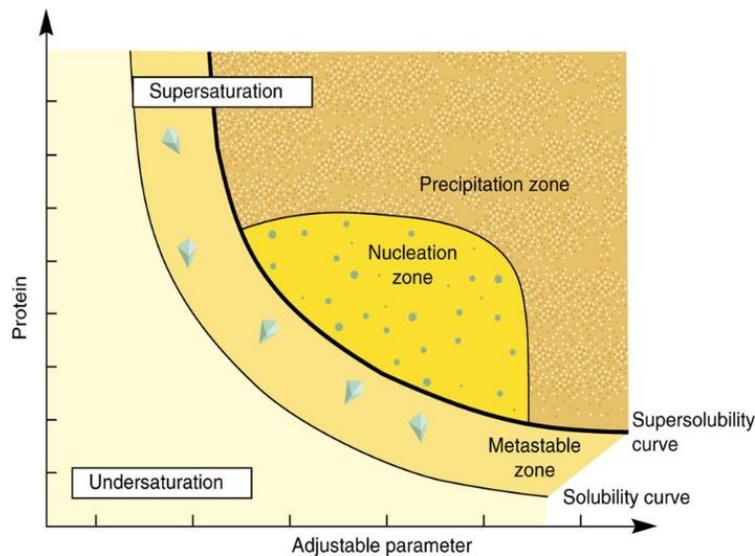


Figura 5 | Nucleación de proteínas y crecimiento de cristales (Khurshid et al, 2014).

orden que involucra (Figura 5): (i) una superficie cristalina, separando el cristal de la fase original, (ii) una zona metaestable alrededor del punto de equilibrio termodinámico, y (iii) una barrera de nucleación, evitando la nucleación adicional en cualquier otra parte de la fase original. Las soluciones de proteínas deben alcanzar la sobresaturación para crear un núcleo cristalino del que crecen los cristales en la zona metaestable (García-Ruiz, 2003).

1.9.2. SOLUBILIDAD DE UNA PROTEÍNA

El proceso de cristalización de una biomacromolécula requiere reducir la solubilidad a una velocidad lenta y constante dentro de un marco temporal adecuado. En la región lábil de la curva (Figura 5), la nucleación cristalina y el crecimiento compiten, mientras que en la región metaestable sólo aparece el crecimiento cristalino. En la

región no saturada los cristales se disuelven. La solubilidad de las proteínas está influenciada por varios factores, como la fuerza iónica, el pH y los contraiones, la temperatura y los disolventes orgánicos. Por ejemplo, para la fuerza iónica (μ), una proteína puede considerarse como un ion polivalente, y por lo tanto su solubilidad se puede discutir sobre la base de la teoría de Debye-Hückel. En solución acuosa, cada ion está rodeado por una atmósfera de contraiones; esta atmósfera influye en las interacciones del ion con las moléculas de agua y por lo tanto la solubilidad. En un medio con baja fuerza iónica, la solubilidad de una proteína puede disminuirse al aumentar o disminuir la concentración de sal. Las sales con iones pequeños y altamente cargados son más efectivas que aquellas con iones grandes y de carga baja. En cuanto al pH, cuanto más soluble es una proteína, mayor es su carga neta, encontrándose la solubilidad mínima en el punto isoeléctrico (Messerschmidt, 2007).

1.10. TÉCNICAS DE CRECIMIENTO DE CRISTALES DE MACROMOLÉCULAS BIOLÓGICAS

El primer registro de cristales de macromoléculas biológicas fue de la hemoglobina, reportado por Hunefeld alrededor de 1840 (McPherson, 1991). Esto estimuló el nacimiento del campo de la biocristalogénesis con objetivos científicos "prácticos" y "básicos". En los primeros años de la bioquímica, la cristalización fue una herramienta para la preparación de sustancias biológicas. Hoy en día, la biocristalogénesis pretende proporcionar métodos eficientes para la fabricación de cristales y un medio para optimizar la calidad del cristal para la cristalografía de rayos X. El desarrollo histórico de los métodos de cristalización para la biología estructural ocurrió primero junto con los métodos bioquímicos y genéticos para la producción de macromoléculas, luego con el desarrollo de metodologías de determinación de estructuras y, recientemente, con acceso rutinario a fuentes de rayos X sincrotrón. Anteriormente, la identificación de las condiciones que sostienen el crecimiento del cristal ocurrió principalmente empíricamente, pero en las últimas

décadas se ha movido progresivamente hacia una mayor racionalidad como resultado de una comprensión más profunda de la química física del crecimiento del cristal de proteína y el uso procedimientos de alto rendimiento. Los procedimientos de ingeniería de proteínas y ácidos nucleicos para facilitar la cristalización, así como los métodos de cristalización en medios gelificados o por contradifusión, representan logros importantes recientes, aunque los conceptos subyacentes son antiguos. Las nuevas nanotecnologías han traído una mejora significativa en la práctica de la cristalización de proteínas. Hoy, el número creciente de estructuras cristalinas depositadas en el Banco de Datos de Proteínas podría significar que la cristalización ya no es un cuello de botella. Sin embargo, este no es el caso, porque los proyectos de biología estructural siempre se vuelven más desafiantes y, por lo tanto, requieren métodos adaptados para permitir el crecimiento de los cristales apropiados, en particular los conjuntos macromoleculares (Giegé, 2013).

Una tarea con dedicación durante las técnicas de cristalogénesis es reconocer el reactivo o precipitante prometedor y descartar los candidatos poco prometedores. Cuando nombramos precipitante es aquella sustancia que será vaciada en mayor concentración en el depósito. Sin embargo, el precipitante se encuentra dentro de la gota que contiene a su vez la proteína.

El proceso de cristalización de una biomacromolécula implica llevar a cabo la disminución de la solubilidad a una velocidad lenta, constante y en un tiempo adecuado. En consecuencia, la cristalogénesis de proteínas se refiere en dos partes: a) aspectos termodinámicos acorde a la solubilidad de la proteína, y b) los aspectos cinéticos, relacionados con el control de la nucleación y el proceso de cristalogénesis. Los factores involucrados en el proceso de cristalogénesis son en general: (1) El pH, tiene la influencia en la solubilidad de la proteína y relación con el punto isoeléctrico de la misma, (2) la concentración de sales, la fuerza iónica puede tener un efecto opuesto sobre la solubilidad, (3) solventes orgánicos, los cuales ayudan a sustraer moléculas de agua de la solución y disminuyen la constante dieléctrica del medio.

1.10.1. DIFUSIÓN EN FASE VAPOR EN GOTA COLGANTE

La técnica de difusión en fase vapor de gota colgante (**Figura 6**) es un método popular para la cristalización de macromoléculas. El principio de la difusión del vapor es directo. Una gota compuesta de una mezcla de muestra de proteína y reactivo se coloca en equilibrio de vapor con un depósito líquido de reactivo. Típicamente, la gota contiene una concentración de reactivo más baja que el depósito. Para lograr el equilibrio, el vapor de agua sale de la gota y finalmente termina en el depósito. A medida que el agua sale de la gota, la muestra sufre un aumento en la sobresaturación relativa (aumentando la concentración de proteína). Tanto la muestra como el reactivo aumentan en concentración cuando el agua deja la gota para el depósito. El equilibrio se alcanza cuando la concentración de reactivo en la gota es aproximadamente la misma que en el depósito ([Hampton Research Corporation, 2003-2017](#)).

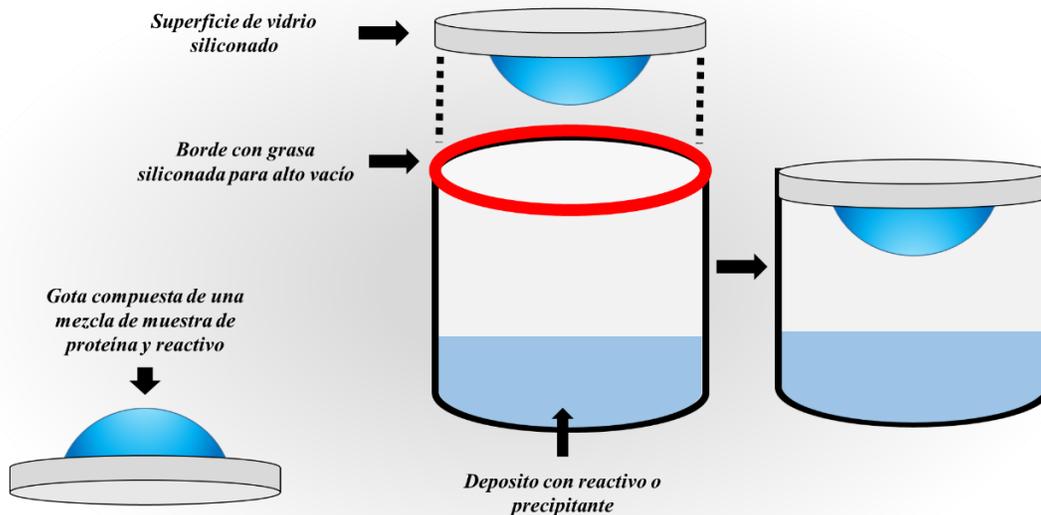


Figura 6 | La técnica de difusión en fase vapor de gota colgante.

Se debe procurar que la gota sea no sea muy densa, para evitar que esta caiga al interior del pozo y el cristal de proteína formado por difusión en fase vapor se redisuelva.

Beneficios de la técnica:

- a. Puede ser rentable.
- b. Muestra y reactivos están en contacto con una superficie de vidrio siliconado.
- c. Fácil acceso a cristales.
- d. Se pueden realizar múltiples gotas (experimentos) con un solo depósito.

1.10.2. DIFUSIÓN EN FASE VAPOR EN GOTA SEDENTE

Al igual que en la difusión en fase vapor en gota colgante, el principio de la difusión del vapor en gota sedente es directo. Una gota compuesta de una mezcla de muestra de proteína y reactivo se coloca en equilibrio de vapor con un depósito líquido de reactivo (**Figura 7**). La técnica de gota sedente contiene beneficios frente a gota colgante. A menudo es más fácil cuando se utilizan detergentes, compuestos orgánicos y reactivos hidrófobos; otro beneficio y el más importante es que las gotas se pueden colocar en una posición de sentado. (Hampton Research Corporation, 2003-2017).

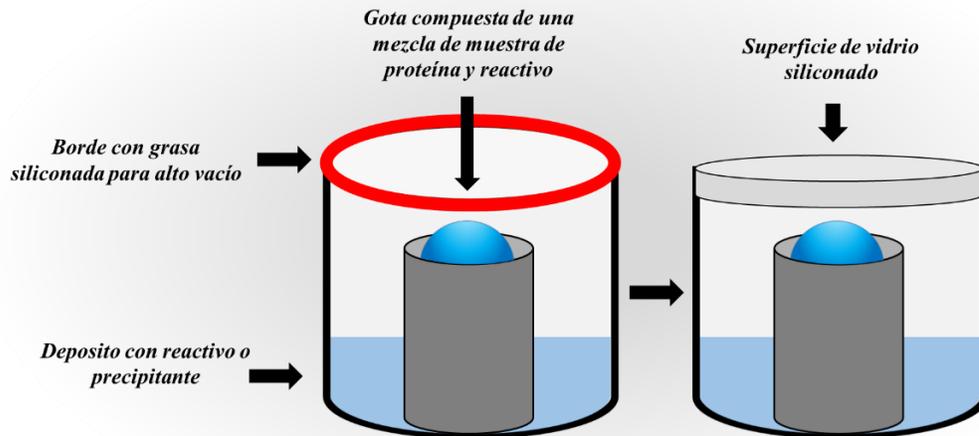


Figura 7 | La técnica de difusión en fase vapor de gota sedente es un método popular para la cristalización de macromoléculas.

En esta técnica (a diferencia de gota colgante) no se corre el riesgo de despeñarse debido a que la gota no está suspendida en la cubierta de vidrio de superficie siliconada, sino que está posada en el interior del depósito de gota, cuya forma aísla a la gota de la solución del pozo.

1.11. SOLUCIONES AMORTIGUADORAS, REGULADORES, BUFFER O TAMPONES

1.11.1. DEFINICIÓN.

Son soluciones que tienen la particularidad de no alterar significativamente al pH, frente a adiciones de ácido o bases. Las soluciones buffer son un caso particular de

equilibrio y también están regidas por el principio de Le Chatelier (Larrain Ibañez & De Freitas Morcelli, 1980). Un buffer produce el desplazamiento de equilibrios en sus componentes cuando se adiciona H^+ u OH^- , de manera tal que la variación en el pH sea mínima (Larrain Ibañez & De Freitas Morcelli, 1980).

1.11.2. TIPOS DE BUFFERS

Estas soluciones están formadas por mezclas de:

1. Ácido débil y la sal de este ácido.
2. Base débil y la sal de esa base

1.11.3. CÁLCULO DEL pH DE BUFFERS

La expresión de pH para buffers formados por ácidos débiles y su sal es:

$$pH = pK_a - \log \frac{[ácido]}{[sal]} \quad \text{Ecuación (24)}$$

y la expresión de pH para buffers formados por mezcla de soluciones de base débil y su sal es:

$$pH = 14 - pK_b + \log \frac{[base]}{[sal]} \quad \text{Ecuación (25)}$$

Para calcular el pH de soluciones buffer (Larrain Ibañez & De Freitas Morcelli, 1980):

- Escribir el equilibrio de reacción del ácido
- Escribir la expresión de pH para esta solución buffer
- Calcular el valor de pKa si es necesario
- Reemplazar los valores en la expresión de pH
- Calcular el pH

Prácticamente en todos los procesos biológicos, como en muchos procesos químicos, es muy importante que el pH no se aparte mucho de un cierto valor. Así, el buen funcionamiento de la sangre humana cuando transporta oxígeno de los pulmones a las células depende de que se conserve un pH próximo a 7.4. De hecho, la diferencia de pH entre la sangre venosa y la arterial no pasa de 0.02 unidades, a pesar de las numerosas reacciones ácido-base a nivel celular (Larrain Ibañez & De Freitas Morcelli, 1980).

Las soluciones que tienen la particularidad de no alterar grandemente su pH frente a adiciones de ácido o base, se llaman soluciones amortiguadoras, reguladoras, buffer o tampones (Larrain Ibañez & De Freitas Morcelli, 1980), (Díaz Portillo, Fernández del Barrio, & Paredes Salido, 1997).

Los amortiguadores, además de fijar el pH dentro del rango fisiológico, generalmente pH 7.2 – 7.3, deben asegurar la osmolaridad (medida del número de partículas de soluto disueltas en una solución) compatible con una buena fijación (Vázquez Nin & Echeverría, 2000).

La osmolaridad fisiológica de tejido de mamífero adulto es cercana a 320 miliosmoles por kilogramo (mOsm/kg) (Vázquez Nin & Echeverría, 2000).

Muchas veces se emplean soluciones amortiguadoras ligeramente hiperosmolares que producen muy buenas fijaciones (Vázquez Nin & Echeverría, 2000).

1.11.4. PRINCIPIO DE LE CHATELIER

“Todo sistema sometido a una acción exterior que provoque un cambio en su estado de equilibrio, se desplazará en el sentido que tienda a eliminar la causa que lo produce” (Larrain Ibañez & De Freitas Morcelli, 1980).

Causa	Cambio de concentración	El equilibrio tiende a eliminar la causa desplazándose hacia:
a) Adición reactante	Mayor [] reactante	Derecha
b) Adición producto	Mayor [] producto	Izquierda
c) Remoción reactante	Menor [] reactante	Izquierda
d) Remoción producto	Menor [] producto	Derecha

Tabla 1 | Desplazamiento de equilibrios por cambios de concentración para un equilibrio químico cualquiera (Larrain Ibañez & De Freitas Morcelli, 1980).

Al iniciar el estudio sobre desplazamiento se dijo que existen dos factores que afectan la posición del equilibrio sin modificar el valor de la constante:

- a) Cambio de concentración;
- b) Cambio de presión total

Este último factor se aplica a sistemas gaseosos.

Es preciso, sin embargo, recordar que en este tipo de sistemas el equilibrio puede modificarse por un cambio de presión total en el sistema, como así también por un cambio de concentración (Larrain Ibañez & De Freitas Morcelli, 1980).

1.11.5. TEORÍA DE BRØNSTED-LOWRY

La teoría de los sistemas de disolventes se aplica a disolventes ionizables, pero no es aprovechable para reacciones ácido-base en disolventes no ionizables, como el benceno o el dioxano (Christian, 2009).

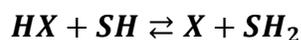
La siguiente ecuación representa el concepto Brønsted-Lowry de ácidos y bases, y expresa la reacción orgánica reversible más simple (Cookson, 1974). Esta teoría sostiene que un ácido es cualquier sustancia que puede donar un protón, y una base es cualquier sustancia que puede aceptar un protón. Así, se puede escribir una "media reacción" (Christian, 2009).



Ecuación (26)

Además, el equilibrio tiene una importancia especial en las áreas biológicas. El ácido y la base en tal equilibrio se describen como un par ácido-base conjugado (Cookson, 1974).

Como el equilibrio es casi invariablemente examinado en un disolvente (SH), todas las especies son solvatadas, un hecho comúnmente ignorado en los tratamientos simples. Por lo tanto, el equilibrio puede ser reescrito:



Ecuación (27)

donde se omiten las cargas, para enfatizar que los ácidos y bases pueden ser neutros o cargados (Cookson, 1974).

1.11.6. TIPOS DE EQUILIBRIO

Los procesos químicos tienen constantes de equilibrio (Christian, 2009).

Equilibrio	Reacción	Constante de equilibrio
Disociación ácido-base	$HA + H_2O \rightleftharpoons H_3O^+ + A^-$	K_a , constante de acidez
Solubilidad	$MA \rightleftharpoons M^{n+} + A^{n-}$	K_{sp} , producto de solubilidad
Formación de complejos	$M^{n+} + aL^{b-} \rightleftharpoons ML_a^{(n-ab)}$	K_f , constante de formación
Reducción-oxidación	$A_{red} + B_{ox} \rightleftharpoons A_{ox} + B_{red}$	K_{eq} , constante de equilibrio
Distribución de fase	$A_{H_2O} \rightleftharpoons A_{orgánico}$	K_D , coeficiente de reparto

Tabla 2 | Tipos de equilibrio (Christian, 2009).

La ecuación de Henderson-Hasselbalch se deriva de la ecuación constante de disociación de ácido por las siguientes etapas:

$$K_a = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]} \quad \text{Ecuación (28)}$$

Tomando el logaritmo, a la base diez, de ambos lados da:

$$\log_{10}(K_a) = \left(\frac{[H^+][A^-]}{[HA]} \right) \log_{10} \quad \text{Ecuación (29)}$$

Luego, usando las propiedades de los logaritmos la cual enuncia que el *logaritmo de un cociente es igual al logaritmo del dividendo menos el logaritmo del divisor*:

$$\log_a(x \cdot y) = \log_a x + \log_a y \quad \text{Ecuación (30)}$$

$$\log_{10}(K_a) = \left(\frac{[H^+]}{1} \cdot \frac{[A^-]}{[HA]} \right) \log_{10} \quad \text{Ecuación (31)}$$

$$\text{donde } x = \frac{[H^+]}{1}, \& y = \frac{[A^-]}{[HA]} \quad \text{Ecuación (32)}$$

$$\log_{10} K_a = \log_{10} [H^+] + \log_{10} \left(\frac{[A^-]}{[HA]} \right) \quad \text{Ecuación (33)}$$

Identificando el lado izquierdo de esta ecuación como $-pK_a$ y el $\log_{10}[H^+]$ como $-pH$:

$$-pK_a = -pH + \log_{10} \left(\frac{[A^-]}{[HA]} \right) \quad \text{Ecuación (34)}$$

Adición de pH y pK_a a ambos lados:

$$pH = pK_a + \log_{10} \left(\frac{[A^-]}{[HA]} \right) \quad \text{Ecuación (35)}$$

La relación $[A^-]/[HA]$ es unitaria, y como tal, se pueden usar otras relaciones con otras unidades.

CAPÍTULO 2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

2.1. SÍNTESIS Y FUNCIONALIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE ORO

2.1.1. MATERIALES

2.1.1.1. REACTIVOS

- Ácido tetracloroáurico (III) trihidrato, reactivo ACS, $\geq 49.0\%$ fundamentalmente, $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Sigma, cat. no. G4022)
- Ácido clorhídrico, grado reactivo, 37% , HCl (Sigma, cat. no. 435570)
- Ácido nítrico, reactivo ACS, $\geq 68.0\text{-}70.0\%$, HNO_3 (Sigma, cat. no. 438073)
- 11- Ácido mercaptoundecanoico, 95% , $\text{HS}(\text{CH}_2)_{10}\text{CO}_2\text{H}$ (Sigma, cat. no.450561)
- O-(3-Carboxipropil)-O'-[2-(3-mercaptopropionilamino)-etil]-polietilenglicol 3000, MW 3000, final- Ω SH, final- α COOH (Sigma, cat. no. 712515)
- Spectra/Por[®] 3 Membrana de diálisis, 3.5 kDa MWCO (Spectrum Laboratories, cat. no. 132724)
- N-Hidroxisuccinimida, 98% , $\text{C}_4\text{H}_5\text{NO}_3$ (Sigma, cat. no. 130672)
- N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida, $\geq 97.0\%$, $\text{C}_8\text{H}_{17}\text{N}_3$ (Sigma, cat. no. 39391)
- Citrato de sodio tribásico dihidrato, para biología molecular, $\geq 99\%$, $\text{HOC}(\text{COONa})(\text{CH}_2\text{COONa}) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Sigma, cat. no. C8532)
- Cloruro de sodio, BioXtra, $\geq 99.5\%$ (AT), NaCl (Sigma, cat. no. S7653)
- Cloruro de potasio, BioXtra, $\geq 99.0\%$, KCl (Sigma, cat. no. P9333)

- Fosfato de potasio monobásico, sustancia para buffer, anhidro, pureza p.a., reactivo ACS, reactivo ISO, reactivo Ph. Eur., 99.5-100.5%, KH_2PO_4 (Sigma, cat. no. 60220)
- Fosfato de sodio dibásico heptahidratado, reactivo ACS, 98.0-102.0%, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Sigma, cat. no. S9390)
- Bromuro de Sodio, reactivo ACS, $\geq 99.0\%$, NaBr (J.T. Baker, cat. no. 3588)
- Unidad de filtración Millex-HV; 0.45 μm , PVDF, d= 33 mm, esterilizada por radiación gamma (Merck, cat. no. SLHV033RS)
- Membrana Durapore, PVDF, hidrófila; 0.22 μm (Merck, cat. no. GVWP04700)
- Agua desionizada ultrafiltrada 18.2 $\text{M}\Omega\text{cm}$ (Thermo SCIENTIFIC, Smart2Pure 3 UV, Langenselbold, Suecia)

2.1.1.2. EQUIPAMIENTO

- TEM JEOL 2000-FXII
- Cary UV-Vis Diode Array System 8454 (Agilent Technologies)
- ZetaSizer Nano ZSP ZEN5600 (Malvern Instruments)
- NanoSight NS300 (Malvern Instruments)

2.1.1.3. SOLUCIONES

- **Solución de agua regia** Mezcla HCl/HNO_3 concentrado 3:1 en un vaso grande dentro de una campana extractora de humo.  **¡CUIDADO!** Usar lentes de protección y guantes mientras esté usando agua regia. Se recomienda preparar el agua regia fresca y evitar guardar.

- **Solución 12.7 mM de ácido tetracloroáurico (III) trihidratado** Disolver 5.0016 mg de ácido tetracloroáurico (III) trihidratado (Sigma, cat. no. G4022) en un 1 mL de agua desionizada y ultrafiltrada. Nota: Esta solución se deberá preparar en fresco
- **Solución 38.8 mM de citrato trisódico dihidratado** Disolver 0.57 g de citrato trisódico dihidratado (Sigma, cat. no. C8532) en 50 mL de agua desionizada y ultrafiltrada.
- **Solución 2.4 M de bromuro de sodio** Disolver 12.35 g de Bromuro de Sodio (J.T. Baker, cat. no. 3588) en 50 mL de agua desionizada y ultrafiltrada.

2.1.2. TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN

- **Espectrofotometría UV-Vis.** Las mediciones para la determinación del espectro de absorbancia de las nanopartículas de oro. A la par, también cuando las nanopartículas de oro han sido revestidas con los ligantes ácido 11-mercaptoundecanoico y O-(3-Carboxipropil)-O'-[2-(3-mercaptopropionilamino)-etil]-polietilenglicol 3000 se llevaron a cabo en un espectrofotómetro Cary UV-Vis Diode Array System 8454 (Agilent Technologies). En una celda depositamos 2 mL de solución, y se llevó a cabo un barrido en la longitud de onda de 200 – 800 nm (Swarup Kumar, Amal Kumar, Kim Truc, Parijat, & Yanli, 2014).
- **Determinación de potencial ζ .** El equipo ZetaSizer Nano ZSP ZEN5600 (Malvern Instruments) determina el potencial ζ de la partícula (relacionado con la magnitud de la carga eléctrica en la superficie de la partícula). La importancia del potencial zeta es que su valor puede estar relacionado con la estabilidad de dispersiones coloidales. El potencial zeta indica el grado de repulsión entre las partículas adyacentes cargadas de manera similar en una

dispersión. Para moléculas y partículas que son lo suficientemente pequeñas, un alto potencial zeta conferirá estabilidad, es decir, la solución o dispersión resistirá la agregación. Cuando el potencial es bajo, la atracción supera la repulsión y la dispersión se romperá y floculará. Para los experimentos en la determinación de potencial ζ se coloca 1 mL de la solución de síntesis de nanopartículas de oro en la celda DTS1070.

- **Determinación de Au(III).** Para determinar la concentración de oro que no reaccionó, Au(III), se aplica el método por colorimetría usando la sal de NaBr. Para este método, 0.15 mL de una solución 2.4 M fue añadida a 1.5 mL de una alícuota de la muestra a estudiar. La longitud de onda de máxima absorción se encuentra a 382 nm (Nagata, Mizukoshi, Okitsu, & Maeda, 1996).
- **Dispersión de la luz dinámica.** Las mediciones mediante dispersión de la luz dinámica (DLS) fueron hechas en un ZetaSizer Nano ZSP ZEN5600 (Malvern Instruments). La fuente de energía fue un con un láser de 10 mW a una longitud de onda de 633 nm, y el ángulo entre la muestra y el detector es de 173°. Las mediciones de DLS fueron llevadas a cabo con nanopartículas de oro en solución a una temperatura de 25°C.
- **Análisis de rastreo de nanopartículas.** Las mediciones se llevaron a cabo usando un instrumento NanoSight NS300 (Malvern Instruments) que proporciona una plataforma reproducible fácil de usar para la caracterización de nanopartículas, con un láser de 50 mW a una longitud de onda de 532 nm. Los análisis se llevaron a cabo usando el software proporcionado por el fabricante, la versión es NTA 3.1. Para las mediciones de rastreo de nanopartículas de oro de 18 nm las muestras fueron preparadas en una dilución de 20 veces, con la finalidad de obtener el tamaño adecuado de partícula. El tiempo de grabación fue de 60 segundos (Bell, Minelli, & Shard, 2013).

- **Microscopía de transmisión electrónica.** Los análisis TEM se llevaron a cabo para verificar la formación de las nanopartículas de oro monodispersas a una intensidad de 200 kV.

2.1.3. METODOLOGÍA

2.1.3.1. PREPARACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE ORO CON CITRATO DE SODIO COMO AGENTE REDUCTOR Y ESTABILIZANTE

- a. La limpieza del material previo a la síntesis se demuestra en el esquema siguiente (Turkevich, Stevenson, & Hillier, 1951):

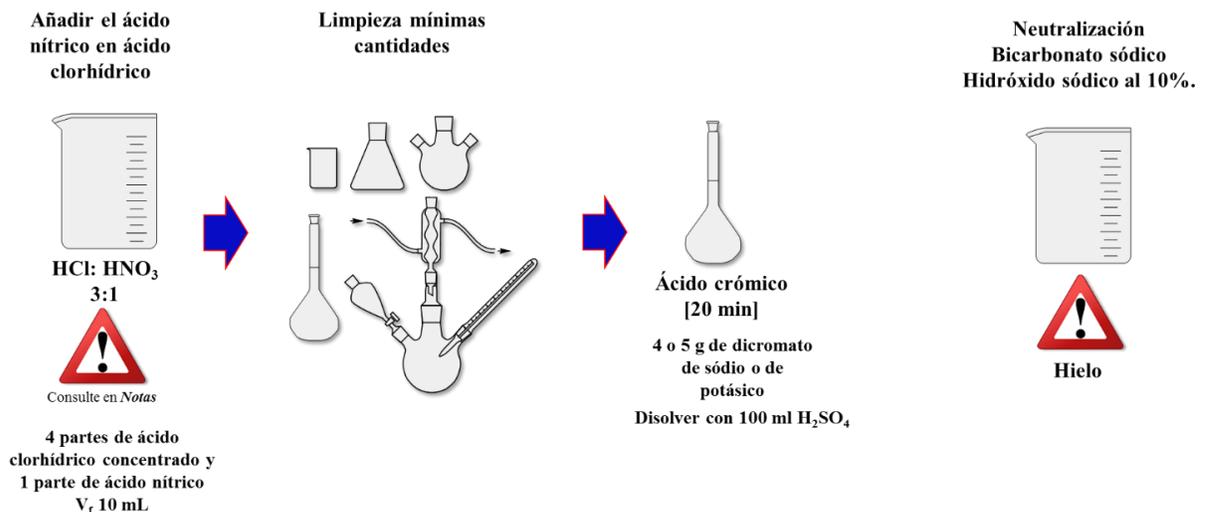


Figura 1| Esquema general de la limpieza del material previo a la síntesis se demuestra en (Turkevich, Stevenson, & Hillier, 1951).

- b. En un matraz de bola de 250 mL se añade 49 mL de agua desionizada y ultrafiltrada, después se calienta hasta ebullición. En este momento se añade 1 mL de la solución 12.7 mM de ácido tetracloroáurico (III) trihidrato. En

seguida se agita con ayuda de una mosca magnética de agitación, y se evita la pérdida de volumen con una columna de reflujo. Después de un minuto de mezcla se añade 0.952 mL de la solución 38.8 mM de citrato trisódico dihidratado. El color inicial de la reacción es grisáceo, después azul oscuro-púrpura y finaliza con un color rojo bermellón o rojo anaranjado. Finalmente se filtra con la unidad de filtración 0.45 μm (Turkevich, Stevenson, & Hillier, 1951), (Kumar, Aaron, & Sokolov, 2008).



IMPORTANTE:

- Evite la evaporación del agua, ya que afecta directamente al volumen de la solución de nanopartículas.
- Mantenga constante la temperatura. De lo contrario, la reacción no se completará, y no se obtendrá el tamaño deseado.
- También puede calentar el agua a temperatura de 90°C o ebullición, pero la pérdida de volumen de agua afecta el volumen de la solución.
- La unidad de filtración 0.45 μm propuesta en este documento evita que el citrato de sodio quede adherido a través de los conductos de la unidad. La pérdida de citrato de sodio en la solución modifica el tamaño de partícula.

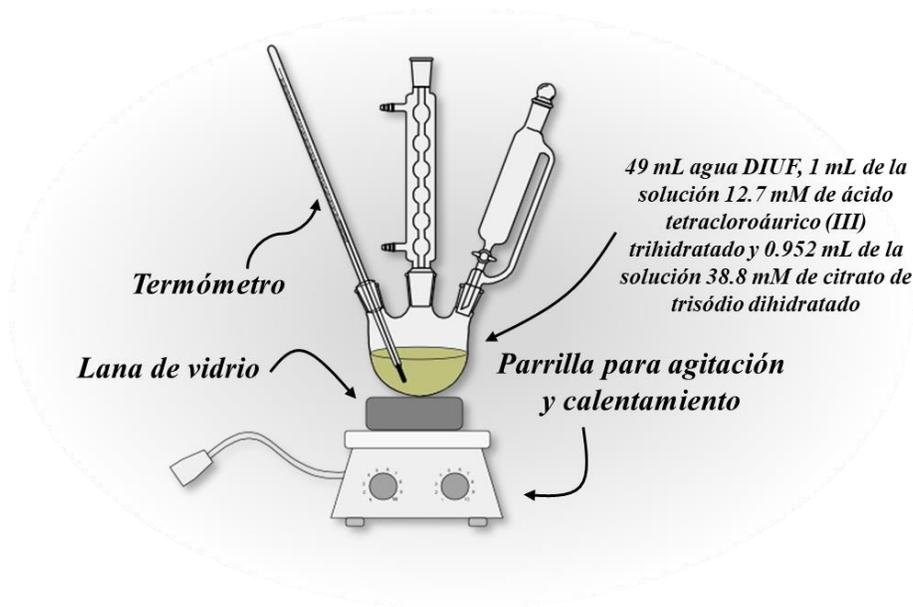


Figura 8 | Esquema general de reacción de síntesis de nanopartículas de oro.

2.1.3.2. REVESTIMIENTO DE NANOPARTÍCULAS DE ORO CON LIGANTES TIOL Y CARBOXILO TERMINALES

- a. En un tubo falcón de 50 mL se incuban 15 mL de nanopartículas de oro de 18 nm estabilizadas en citrato de sodio con agitación moderada durante 48 horas a temperatura ambiente, con un exceso de ácido 11-mercaptoundecanoico. En otro tubo se realiza lo mismo con O-(3-Carboxipropil)-O'-[2-(3-mercaptopropionilamino)-etil]-polietilenglicol 3000; ambos envuelven la unión del grupo tiol inicial con la superficie de la nanopartícula de oro (Piella, Bastús, & Puentes, 2016).
- b. En seguida, 10 mL de nanopartículas revestidas, fueron dializadas con ayuda de una membrana 3.5 kDa durante toda la noche en 200 mL de una solución 50 mM de MES a pH 6.0 a temperatura ambiente. Finalmente se filtraron con la unidad de filtración de 0.45 μm .

⚠ IMPORTANTE:

- El ácido 11-mercaptoundecanoico tiene una muy baja solubilidad en agua, en consecuencia, antes de la diálisis es necesario filtrar con la unidad de filtración de 0.45 μm para retirar el exceso de sólido de la solución. Por otro lado, el O-(3-Carboxipropil)-O'-[2-(3-mercaptopropionilamino)-etil]-polietilenglicol 3000 tiene una mejor solubilidad por lo que la filtración es solo para retirar partículas del exterior.

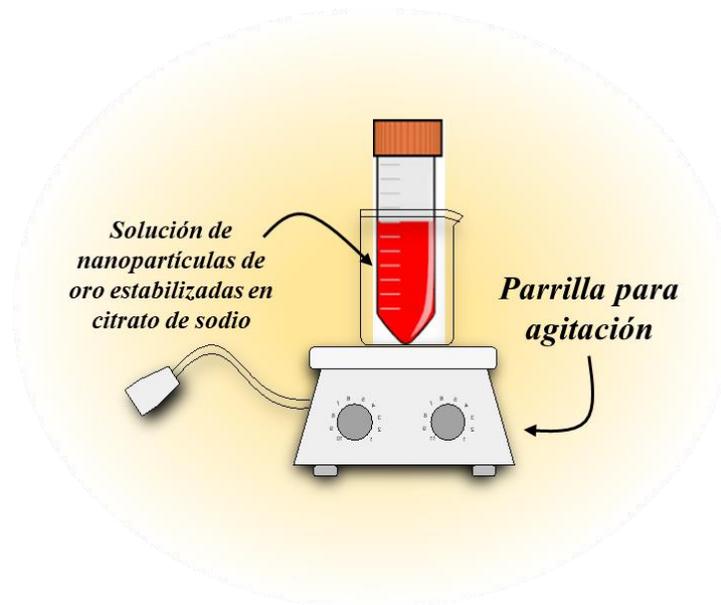


Figura 9| Esquema general de revestimiento con ligantes tiol y carboxílico terminales de nanopartículas de oro obtenidas de la reacción de síntesis.

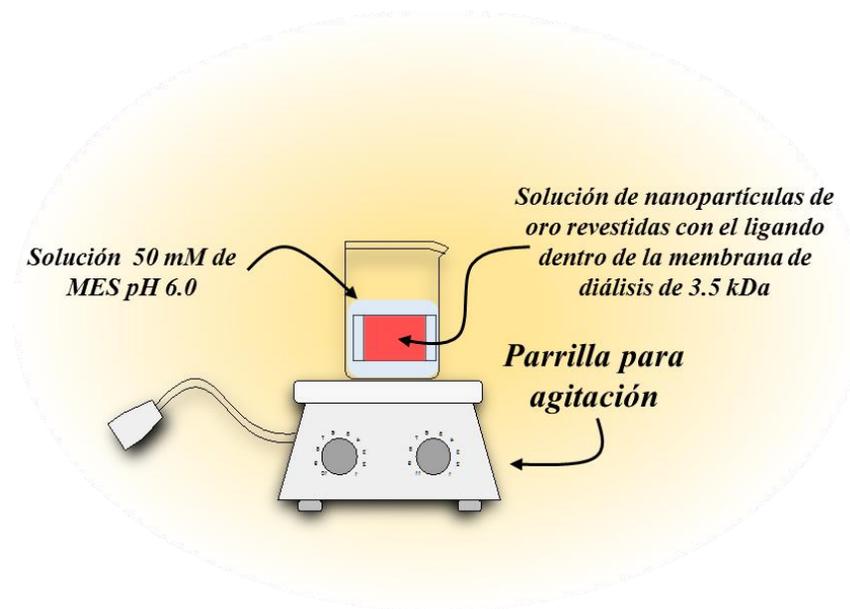


Figura 10| Esquema general de diálisis con membrana de 3.5 kDa de nanopartículas de oro revestidas con ligantes tiol y carboxilo terminales.

2.1.3.3. ACTIVACIÓN DEL CARBOXILO TERMINAL MEDIANTE LA REACCIÓN CON EDC/NHS

- a. Para la conjugación de las nanopartículas de oro con las proteínas se utiliza el enlace carbodiimida. 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) fueron preparados a 10 mM en 50 mM de MES a pH 6.0 (Hofmann, Schmiel, Stein, & Graf, 2011). Para 1 mL de nanopartícula revestida fueron añadidos 3 μ L de EDC y después 3 μ L de NHS (Rand, Derdak, Carlson, Wands, & Rose-Petruck, 2015).
- b. En seguida, 10 mL de nanopartículas revestidas y activadas, fueron dializadas con ayuda de una membrana 3.5 kDa durante toda la noche en 200 mL de 50 mM de MES a pH 6.0 a temperatura ambiente. Finalmente se filtraron con la unidad de filtración 0.45 μ m.

 **IMPORTANTE:**

- Añadir un exceso de EDC y NHS produce la agregación de las nanopartículas de oro.
- Primeramente, adicionar EDC y después la adición de NHS. Aunque también se puede realizar en un solo recipiente la solución de EDC y NHS.

2.2. CRISTALOGÉNESIS DE LISOZIMA, XILANASA, FERRITINA, GLUCOSA ISOMERASA Y NANOPARTÍCULAS DE ORO

2.2.1. MATERIALES

2.2.1.1. REACTIVOS

- Ácido tetracloroáurico (III) trihidrato, reactivo ACS, $\geq 49.0\%$ fundamentalmente, $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Sigma, cat. no. G4022)
- Cloruro de potasio, BioXtra, $\geq 99.0\%$, KCl (Sigma, cat. no. P9333)
- Nanopartículas de oro de 18 nm estabilizadas en citrato
- 11- Ácido mercaptoundecanoico, 95%, $\text{HS}(\text{CH}_2)_{10}\text{CO}_2\text{H}$ (Sigma, cat. no.450561)
- O-(3-Carboxipropil)-O'-[2-(3-mercaptopropionilamino)-etil]-polietilenglicol 3000, MW 3000, final- Ω SH, final- α COOH (Sigma, cat. no. 712515)
- HEWL, Lisozima de huevo de gallina (Seikagaku Corp., Japan, cat. no. 100940)
- Ferritina de bazo de caballo (Sigma, cat. no. F4503)
- Xilanasa II (endo-1,4- β -xilanasa II; EC 3.2.1.8) de *T. reesei*, (Hampton Research, HR7-104)
- Glucosa isomerasa (Hampton Research, HR7-100)
- IgG de suero de humano (Sigma, cat. no. I4506)
- p-Stat1 (A-2) anticuerpo monoclonal (Santa Cruz Biotechnology, cat. no. sc-8394)
- N-Hidroxisuccinimida, 98%, $\text{C}_4\text{H}_5\text{NO}_3$ (Sigma, cat. no. 130672)
- N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida, $\geq 97.0\%$, $\text{C}_8\text{H}_{17}\text{N}_3$ (Sigma, cat. no. 39391)
- Cloruro de sodio, BioXtra, $\geq 99.5\%$ (AT), NaCl (Sigma, cat. no. S7653)

- Citrato de sodio tribásico dihidrato, para biología molecular, $\geq 99\%$, $\text{HOC}(\text{COONa})(\text{CH}_2\text{COONa})\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Sigma, cat. no. C8532)
- n-Dodecil- β -D-maltósido, $\geq 99.0\%$, $\text{C}_{25}\text{H}_{48}\text{O}_{11}$ (Sigma, cat. no. 16321)
- MES - Ácido 2-morfolinoetanosulfónico monohidrato, bajo contenido de humedad, $\geq 99\%$, $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_4\text{S}$ (Sigma, cat. no. M3671)
- Tricina, $\geq 99\%$, $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNHCH}_2\text{CO}_2\text{H}$ (Sigma, cat. no. T0377)
- Yoduro de sodio (Hampton Research, HR2-428)
- Triton x-100 (N/A)
- Polietilenglicol 1000 (Hampton, cat. no. HR2-511)
- Ácido clorhídrico, grado reactivo, 37%, HCl (Sigma, cat. no. 435570)
- Bis-Tris, certificado BioPerformance, probado en cultivo celular, adecuado para cultivo de células, $\geq 98\%$, $\text{C}_8\text{H}_{19}\text{NO}_5$ (Sigma, cat. no. B4429)
- Imidazol, para biología molecular, $\geq 99\%$, $\text{C}_3\text{H}_4\text{N}_2$ (Sigma, cat. no. I5513)
- Ácido cítrico monohidratado, reactivo ACS, $\geq 99\%$, $\text{HOC}(\text{COOH})(\text{CH}_2\text{COOH})_2\cdot \text{H}_2\text{O}$ (Sigma, cat. no. C-1909)
- HEPES (Calbiochem)
- Trizma[®] clorhidrato, BioXtra, pH 3.5-5.0 (0.5 M en H_2O), $\geq 99\%$, $\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3\cdot \text{HCl}$ (Sigma, cat. no. T6666)
- Trizma[®] base, BioXtra, pH 10.5-12.0 (1 M en H_2O), $\geq 99\%$ (Sigma, cat. no. T6791)
- Polietilenglicol 3,350 Monodisperso (Hampton, cat. no. HR2-591)
- Acetato de sodio trihidratado, reactivo ACS, 99.0-101.0%, $\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Sigma, cat. no. S-9513)
- Ácido acético, ReagentPlus[®], $\geq 99\%$, $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ (Sigma, cat. no. A6283)
- Cloruro de amonio, reactivo para análisis EMSURE[®] ACS, reactivo ISO, reactivo Ph. Eur (Merck, cat. no. 101145)
- Hidróxido de sodio, BioXtra, $\geq 98\%$ (acidimétrico), pellets (anhidros), NaOH (Sigma, cat. no. S8045)
- Sulfato de amonio, para biología molecular, $\geq 99\%$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Sigma, cat. no. A4418)

- Sulfato de cadmio, $\geq 99.99\%$ base de metales traza, CdSO_4 (Sigma, cat. no. 481882)
- Sulfato de magnesio, anhidro, ReagentPlus®, $\geq 99.5\%$, MgSO_4 (Sigma, cat. no. M7506)
- DDT (DL- ditiotreitól), para electroforesis, $\geq 99\%$, $\text{HSCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{SH}$ (Sigma, cat. no. D9163)
- Parafina (Molecular Dimensions Limited, cat. no. MD2-03)
- Agua desionizada ultrafiltrada 18.2 $\text{M}\Omega\text{cm}$ (Thermo SCIENTIFIC, Smart2Pure 3 UV, Langenselbold, Suecia)

2.2.1.2. EQUIPAMIENTO

- Unidad de filtración Millex-HV; 0.45 μm , PVDF, d= 33 mm, esterilizada por radiación gamma (Merck, cat. no. SLHV033RS)
- Membrana Durapore, PVDF, hidrófila; 0.22 μm (Merck, cat. no. GVWP04700)
- Spectra/Por® 3 Membrana de diálisis, 3.5 kDa MWCO (Spectrum Laboratories, cat. no. 132724)
- Cámara infinity1 (Lumenera Corporation)
- Lente LBD-2N
- Microscopio estereoscópico Olympus SZH10
- Espectrofotómetro NanoDrop Lite (Thermo SCIENTIFIC)
- pH metro ORION STAR A111 (Thermo SCIENTIFIC)
- Placas estériles de cultivo de tejido (Linbro, cat. no. 76-033-05)
- Cubiertas de vidrio siliconado (Hampton Research, HRR-247)
- Grasa de silicona de alto vacío de Dow Corning® (Sigma, cat. no. Z273554)
- Microscopio Confocal, modelo LSM 510. Axiovert 200M (Carl Zeiss)

2.2.1.3. SOLUCIONES

- **Solución 1 X PBS pH 7.4** Se disuelven 8 g de cloruro de sodio (Sigma, cat. no. S7653), 0.2 g de cloruro de potasio (Sigma, cat. no. P9333), 0.24 g de fosfato de potasio monobásico (Sigma, cat. no. 60220) y 2.72 g de fosfato de sodio dibásico heptahidratado (Sigma, cat. no. S9390) en 1 L de agua desionizada y ultrafiltrada.
- **Solución 0.1 M de acetato de sodio a pH 4.5** Se disuelven 0.2413 g de acetato de sodio trihidratado (Sigma, cat. no. S-9513) y 0.185 mL de ácido acético (Sigma, cat. no. A6283) en 50 mL de agua desionizada y ultrafiltrada.
- **Solución 50 mM de citrato de sodio a pH 5.0** Mezclar 10.25 mL de 0.1 M solución ácido cítrico, 14.75 mL de 0.1 M solución citrato de sodio y 25 mL de agua desionizada y ultrafiltrada.
- **Solución 0.1 M de acetato de sodio a pH 4.5 y NaCl 6.5%** Se disuelven 0.2413 g de acetato de sodio trihidratado (Sigma, cat. no. S-9513) y 0.185 mL de ácido acético (Sigma, cat. no. A6283) en 40 mL de agua desionizada y ultrafiltrada, después se añade y Se disuelven 3.25 g de cloruro de sodio (Sigma, cat. no. S7653), finalmente adicionamos agua desionizada y ultrafiltrada hasta un volumen de 50 mL.
- **Solución 120 mg/mL de lisozima en 0.1 M solución acetato de sodio a pH 4.5** Disolver 0.12 g de HEWL, Lisozima de huevo de gallina (Seikagaku Corp., Japan, cat. no. 100940) en 1 mL de **0.1 M solución acetato de sodio a pH 4.5.**  **IMPORTANTE: Mantener la mezcla a 4°C.**
- **Solución 75 mg/mL de lisozima en 0.1 M solución acetato de sodio a pH 4.5** Disolver 0.075 g de HEWL, Lisozima de huevo de gallina (Seikagaku Corp., Japan, cat. no. 100940) en 1 mL de **0.1 M solución acetato de sodio a pH 4.5.**  **IMPORTANTE: Mantener la mezcla a 4°C.**

- **Solución 0.1 M de Tris a pH 7.5, 0.8 M sulfato de amonio y 60 mM sulfato de cadmio** Disolver 0.6298 g de Trizma[®] clorhidrato (Sigma, cat. no. T6666) y 0.1216g de Trizma[®] base (Sigma, cat. no. T6791) en 40 mL de agua desionizada y ultrafiltrada, después se añade a la solución 5.2856 g de sulfato de amonio (Sigma, cat. no. A4418) y 0.6254 g de sulfato de cadmio (Sigma, cat. no. 481882), finalmente adicionamos agua desionizada y ultrafiltrada hasta un volumen de 50 mL.
- **Solución 1.2 M de sulfato de amonio y 100 mM tricina-Trizma[®] base** Disolver 0.0904 g de tricina (Sigma, cat. no. T0377) y 0.5446 g de Trizma[®] base (Sigma, cat. no. T6791) en 30 mL de agua DIUF, después se añade a la solución 7.9284 g de sulfato de amonio (Sigma, cat. no. A4418), finalmente adicionamos agua desionizada y ultrafiltrada hasta un volumen de 50 mL.
- **Solución 1 M de cloruro de amonio** Se disuelven 2.67 g de cloruro de amonio (Merck, cat. no. 101145) en 50 mL de agua desionizada y ultrafiltrada.
- **Solución 1 mg/mL de FITC** Se disuelven 1 mg de isotiocianato de fluoresceína Isómero I (Sigma, cat. no. F7250) en 1 mL de DMSO (Sigma, cat. no. D-5879).
- **Solución 100 mg/mL de FITC** Se disuelven 100 mg de isotiocianato de fluoresceína Isómero I (Sigma, cat. no. F7250) en 1 mL de DMSO (Sigma, cat. no. D-5879).

Para evitar el daño por radiación de los cristales al exponerse a las energías de los rayos X, fue necesario crioproteger los cristales en nitrógeno líquido. Los cristales se suspendieron luego en una solución amortiguadora y crioprotectora.

- **Solución agente crioprotector para cristales de lisozima** 30% (v/v) PEG-1000 con el agente precipitante. (Pareja-Rivera, y otros, 2016)

- **Solución agente crioprotector para cristales de ferritina** Mezclar 4 mL 0.1 M de solución Tris a pH 7.5, 0.8 M sulfato de amonio y 60 mM sulfato de cadmio con 6 mL de glicerol (Sigma, cat. no. G-8773) (Moreno & Rivera, 2005).
- **Solución agente crioprotector para cristales de xilanasa** 30% (v/v) PEG-1000 con el agente precipitante.
- **Solución agente crioprotector para cristales de glucosa isomerasa** 30% (v/v) PEG-1000 con el agente precipitante.

2.2.2. TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN

- **Experimentos de espectrometría de masas.** Se realizaron experimentos de espectrometría de masas para la determinación del peso molecular y pureza en un espectroscopio de masas Bruker Esquire, utilizando la técnica MALDI-TOF (desorción por láser asistida por matriz / ionización de tiempo de vuelo). Esta técnica se utilizó como criterio de pureza basado en el peso molecular de estas proteínas. La matriz usada era una mezcla de ácido sinapínico.
- **Dispositivo para el transporte de cristales de proteína a las instalaciones de sincrotrón.** Un obstáculo que afrontan los cristales de proteínas cuando se portean a los sincrotrones en un recipiente capaz de proporcionar aislamiento térmico, disminuir las pérdidas de calor por conducción, convección o radiación llamado Dewar, por su inventor James Dewar, es la verificación de los aeropuertos, pues si el Dewar se abre los cristales en el interior son generalmente dañados (Pareja-Rivera, y otros, 2016). Una alternativa fue diseñar un dispositivo construido a base de poliolefina (patente estadounidense US 7,971,744) con una densidad entre 0.064 a 0.13 g/cm³, que podría resistir cambios de temperaturas de -100 °C

hasta 50 °C sin alterar la calidad de los cristales de proteína transportados en su interior. La transferencia de calor (capacidad de calor) se minimiza tanto dentro como fuera del fluido. Esto se debe a que la espuma de poliolefina tiene una alta densidad y no permite un intercambio de calor adecuado y fue utilizada para el almacenamiento y transporte térmicamente seguros de cristales de proteínas crecidos y capaces de soportar en el viaje y los diferentes cambios de ambiente hasta su llegada a los sincrotrones (Pareja-Rivera, y otros, 2016).

2.2.3. METODOLOGÍA

2.2.3.1. CRECIMIENTO DE CRISTALES DE XILANASA EN PRESENCIA DE NANOPARTÍCULAS DE ORO

- a. Previo a los experimentos de cristalogénesis, se dializa 1 mL de la solución de proteína (33 mg/mL) durante 24 h a 4 °C en una solución 10 mM de tricina a pH 9.0 conteniendo 1 mM sulfato de magnesio y 1 mM DDT (DL- ditiotreitól), de igual modo, se dializa 1 mL de la solución de proteína (33 mg/mL) en 50 mM de MES a pH 6.0, después filtramos ambas alícuotas a través de una unidad de filtración Millex-HV; 0.45 µm, PVDF, d= 33 mm, esterilizada por radiación gamma (Merck, cat. no. SLHV033RS).
- b. La concentración de la proteína filtrada fue determinada con un espectrofotómetro NanoDrop Lite (Thermo SCIENTIFIC), obteniendo una concentración de 30 mg/mL.
- c. El método de gota colgante fue empleado para la cristalogénesis. Una mezcla de 5 µL de la solución de proteína, 5 µL de nanopartículas de oro de 18 nm fueron incubadas durante 10 minutos, después se añade 1.2 µL de 1 M yoduro de sodio y 2.8 µL de la solución de pozo (1.2 M sulfato de amonio y 100 mM

de tricina- Trizma[®] base a pH 9.0). Finalmente, depositamos una gota colgante de 10 μ L y en cada pozo se equilibró con 1 mL de la solución de pozo.

2.2.3.2. CRECIMIENTO DE CRISTALES DE LISOZIMA EN PRESENCIA DE NANOPARTÍCULAS DE ORO

El peso molecular de la Lisozima es de 14.6 kDa. La lisozima (muramidasa) hidroliza preferentemente los enlaces β -1,4 glucosídicos entre el ácido N-acetilmurámico y la N-acetilglucosamina que se producen en la estructura de la pared celular de mucopéptidos de ciertos microorganismos, tales como *Micrococcus lysodeikticus*. Se muestra una actividad algo más limitada hacia los oligómeros de quitina (Hampton Research Corporation, 1991-2017).

- a. Previo a los experimentos de cristalogénesis, se disuelven 75 mg de proteína en 1mL de la solución 0.1 M de acetato de sodio a pH 4.5 (75 mg/mL), respectivamente, de igual modo, se disuelven 75 mg de proteína en 1 mL de la solución 50 mM de MES a pH 6.0 (75 mg/mL), después filtramos ambas soluciones con proteína a través de una unidad de filtración Millex-HV; 0.45 μ m, PVDF, d= 33 mm, esterilizada por radiación gamma (Merck, cat. no. SLHV033RS).
- b. El método de gota colgante fue empleado para la cristalogénesis. Una mezcla de 5 μ L de la solución de proteína, 5 μ L de nanopartículas de oro de 18 nm fueron incubadas durante 10 minutos, después se añade 10 μ L de la solución de pozo (6.5% NaCl en 0.1 M de acetato de sodio a pH 4.5). Finalmente, depositamos una gota colgante de 10 μ L y en cada pozo se equilibró con 1 mL de la solución de pozo.

Fueron preparados de cristales de lisozima y nanopartículas de oro a una mayor concentración de lisozima.

- a. Previo a los experimentos de cristalogénesis, se disuelven 60 mg de proteína en 0.5 mL de la solución 0.1 M de acetato de sodio a pH 4.5 (120 mg/mL), respectivamente, de igual modo, se disuelven 60 mg de proteína en 0.5 mL de la solución 50 mM de MES a pH 6.0 (75 mg/mL), después filtramos ambas soluciones con proteína a través de una unidad de filtración Millex-HV; 0.45 μ m, PVDF, d= 33 mm, esterilizada por radiación gamma (Merck, cat. no. SLHV033RS).
- b. El método de gota colgante fue empleado para la cristalogénesis. Una mezcla de 5 μ L de la solución de proteína, 5 μ L de nanopartículas de oro de 18 nm fueron incubadas durante 10 minutos, después se añade 10 μ L de la solución de pozo (6.5% NaCl en 0.1 M de acetato de sodio a pH 4.5). Finalmente, depositamos una gota colgante de 10 μ L y en cada pozo se equilibró con 1 mL de la solución de pozo.

2.2.3.3. CRECIMIENTO DE CRISTALES DE LISOZIMA CONJUGADA CON FITC EN PRESENCIA DE NANOPARTÍCULAS DE ORO

- a. Previo a los experimentos de cristalogénesis, se disuelven 75 mg de proteína en 1 mL de la solución 1X PBS a pH 7.4. Después adicionamos 200 μ L de solución FITC 1 mg/mL a 75 mg/mL solución de proteína y muy lentamente en alícuotas de 5 μ L, y se agita continuamente.
- b. La mezcla anterior, la incubamos 8 horas a 4°C en oscuro o toda la noche.
- c. Después, adicionamos NH₄Cl para una concentración final de 50 mM (50 μ L de una solución 1 M NH₄Cl por cada mL de mezcla) e incubamos 2 horas a 4°C.

- d. A continuación, adicionamos xileno cianol para una concentración final de 0.1% (1 μ L por cada mL) y glicerol para una concentración final de 5% (50 μ L de por cada mL).
- e. La anterior, se dializa la solución de proteína en solución 1X solución PBS a pH 7.4, después filtramos ambas alícuotas a través de una unidad de filtración Millex-HV; 0.45 μ m, PVDF, d= 33 mm, esterilizada por radiación gamma (Merck, cat. no. SLHV033RS).
- f. El método de gota colgante fue empleado para la cristalogénesis. Una mezcla de 5 μ L de la solución de proteína, 5 μ L de nanopartículas de oro de 18 nm fueron incubadas durante 10 minutos, después se añade 10 μ L de la solución de pozo (6.5% NaCl en 0.1 M de acetato de sodio a pH 4.5). Finalmente, depositamos una gota colgante de 10 μ L y en cada pozo se equilibró con 1 mL de la solución de pozo.

Fueron preparados de cristales de lisozima-FITC y nanopartículas de oro a una mayor concentración de lisozima.

- a. Previo a los experimentos de cristalogénesis, se disuelven 120 mg de proteína en 1 mL de la solución 1X PBS a pH 7.4.
- b. La mezcla anterior, después adicionamos 30 μ L de solución FITC 100 mg/mL a 120 mg/mL de solución de proteína y muy lentamente en alícuotas de 5 μ L, y se agita continuamente. Incubamos 8 horas a 4°C en oscuro o toda la noche.
- c. Después, adicionamos NH_4Cl para una concentración final de 200 mM (200 μ L de una solución 1 M NH_4Cl por cada mL de mezcla) e incubamos 2 horas a 4°C.

- d. A continuación, adicionamos xileno cianol para una concentración final de 0.1% (1 μ L por cada mL) y glicerol para una concentración final de 10% (100 μ L de por cada mL).
- e. La anterior, se dializa la solución de proteína en solución 1X solución PBS pH 7.4, después filtramos ambas alícuotas a través de una unidad de filtración Millex-HV; 0.45 μ m, PVDF, d= 33 mm, esterilizada por radiación gamma (Merck, cat. no. SLHV033RS).
- f. El método de gota colgante fue empleado para la cristalogénesis. Una mezcla de 5 μ L de la solución de proteína, 5 μ L de nanopartículas de oro de 18 nm fueron incubadas durante 10 minutos, después se añade 10 μ L de la solución de pozo (6.5% NaCl en 0.1 M acetato de sodio a pH 4.5). Finalmente, depositamos una gota colgante de 10 μ L y en cada pozo se equilibró con 1 mL de la solución de pozo.

2.2.3.4. CRECIMIENTO DE CRISTALES DE FERRITINA EN PRESENCIA DE NANOPARTÍCULAS DE ORO

- a. Previo a los experimentos de cristalogénesis filtramos 1 mL de proteína a través de una unidad de filtración Millex-HV; 0.45 μ m, PVDF, d= 33 mm, esterilizada por radiación gamma (Merck, cat. no. SLHV033RS). De igual modo, se dializa 1 mL de la solución de proteína en 400 mL 50 mM de MES a pH 6.0.
- b. La concentración de la proteína proporcionada por el proveedor es de 75 mg/mL.
- c. El método de gota colgante fue empleado para la cristalogénesis. Una mezcla de 5 μ L de la solución de proteína, 5 μ L de nanopartículas de oro de 18 nm fueron incubadas durante 10 minutos, después se añade 5 μ L de la solución de pozo (0.8 M sulfato de amonio, 60 mM sulfato de cadmio y 0.1 M Tris a

pH 7.5). Finalmente, depositamos una gota colgante de 10 μ L y en cada pozo se equilibró con 1 mL de la solución de pozo.

2.2.3.5. CRECIMIENTO DE CRISTALES DE FERRITINA CONJUGADA CON FITC EN PRESENCIA DE NANOPARTÍCULAS DE ORO

- a. Adicionamos 18.75 μ L de 100 mg/mL solución FITC a 75 mg/mL solución de proteína y muy lentamente en alícuotas de 5 μ L, y se agita continuamente.
- b. Incubamos 8 horas a 4°C en oscuro o toda la noche.
- c. Adicionamos NH_4Cl para una concentración final de 200 mM (200 μ L de una solución NH_4Cl 1 M por cada mL de mezcla) e incubamos 2 horas a 4°C.
- d. Adicionamos xileno cianol para una concentración final de 0.1% (1 μ L por cada mL) y glicerol para una concentración final de 10% (100 μ L de por cada mL).
- e. Se dializa la solución de proteína en solución 1X solución PBS pH 7.4, después filtramos ambas alícuotas a través de una unidad de filtración Millex-HV; 0.45 μ m, PVDF, d= 33 mm, esterilizada por radiación gamma (Merck, cat. no. SLHV033RS).
- f. El método de gota colgante fue empleado para la cristalogénesis. Una mezcla de 5 μ L de la solución de proteína, 5 μ L de nanopartículas de oro de 18 nm fueron incubadas durante 10 minutos, después se añade 5 μ L de la solución de pozo (0.8 M sulfato de amonio, 60 mM sulfato de cadmio y 0.1 M Tris a pH 7.5). Finalmente, depositamos una gota colgante de 10 μ L y en cada pozo se equilibró con 1 mL de la solución de pozo.

2.2.3.6. CRECIMIENTO DE CRISTALES DE GLUCOSA ISOMERASA EN PRESENCIA DE NANOPARTÍCULAS DE ORO

El peso molecular de la glucosa isomerasa es 173 kDa. La proteína es un tetrámero compuesto de cuatro polipéptidos idénticos de 43 kDa. En una SDS-PAGE la enzima aparece como una sola banda en 43 kDa y en una electroforesis en gel nativa la enzima se ejecuta cerca de 160-170 kDa.

- a. Previo a los experimentos de cristalogénesis, se dializa 1 mL de la solución de proteína (33 mg/mL) durante 24 h a 4 °C en una solución 10 mM de HEPES pH 7.0 conteniendo 1 mM cloruro de magnesio, después filtramos a través de una unidad de filtración Millex-HV; 0.45 μ m, PVDF, d= 33 mm, esterilizada por radiación gamma (Merck, cat. no. SLHV033RS).
- b. La concentración de la proteína filtrada fue determinada con un espectrofotómetro NanoDrop Lite (Thermo SCIENTIFIC), obteniendo una concentración de 30 mg/mL.
- c. El método de gota colgante fue empleado para la cristalogénesis. Una mezcla de 5 μ L de la solución de proteína, 5 μ L de nanopartículas de oro de 18 nm fueron incubadas durante 10 minutos, después se añade 5 μ L de la solución de pozo (0.2 M formiato de magnesio dihidratado). Finalmente, depositamos una gota colgante de 10 μ L y en cada pozo se equilibró con 1 mL de la solución de pozo.

2.2.3.7. CRECIMIENTO DE CRISTALES DE IgG EN PRESENCIA DE NANOPARTÍCULAS DE ORO

- a. Para los experimentos de cristalogénesis, 8 mg de IgG de suero de humano fueron diluidas en 0.5 mL en 1X solución PBS pH 7.4, después filtramos a través de una unidad de filtración Millex-HV; 0.45 μm , PVDF, d= 33 mm, esterilizada por radiación gamma (Merck, cat. no. SLHV033RS).
- b. La concentración de la proteína filtrada fue determinada con un espectrofotómetro NanoDrop Lite (Thermo SCIENTIFIC), obteniendo una concentración de 16 mg/mL.
- c. El método de gota colgante fue empleado para la cristalogénesis. Una mezcla de 8 μL de la solución de proteína, 4 μL de nanopartículas de oro de 18 nm, 2 μL de 50 mM solución de citrato de sodio a pH 5.0 y 4 μL 0.33 mM solución n-dodecil- β -D-maltósido, fueron incubadas durante 10 minutos, después se añaden 10 μL de la solución de pozo (12% solución PEG 3350). Finalmente, depositamos una gota colgante de 10 μL y en cada pozo se equilibró con 1 mL de la solución de pozo.

2.3. EVALUACIÓN ELECTROQUÍMICA DE LA MODIFICACIÓN DE LA SUPERFICIE DE UN ELECTRODO DE CARBÓN VÍTREO CON NANOPARTÍCULAS DE ORO E INMOVILIZACIÓN DE BIOMACROMOLÉCULAS

2.3.1. MATERIALES

2.3.1.1. REACTIVOS

- Ácido tetracloroáurico (III) trihidrato, reactivo ACS, $\geq 49.0\%$ fundamentalmente, $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Sigma, cat. no. G4022)
- Cloruro de potasio, BioXtra, $\geq 99.0\%$, KCl (Sigma, cat. no. P9333)
- Fosfato de potasio monobásico, sustancia para buffer, anhidro, pureza p.a., reactivo ACS, reactivo ISO, reactivo Ph. Eur., 99.5-100.5%, KH_2PO_4 (Sigma, cat. no. 60220)
- Fosfato de sodio dibásico heptahidratado, reactivo ACS, 98.0-102.0%, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Sigma, cat. no. S9390)
- 11- Ácido mercaptoundecanoico, 95%, $\text{HS}(\text{CH}_2)_{10}\text{CO}_2\text{H}$ (Sigma, cat. no.450561)
- O-(3-Carboxipropil)-O'-[2-(3-mercaptopropionilamino)-etil]-polietilenglicol 3000, MW 3000, final- Ω SH, final- α COOH (Sigma, cat. no. 712515)
- Etanol, reactivo ACS, $\geq 99.5\%$, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ (Sigma, cat. no.459844)
- Hexacianoferrato (II) de potasio trihidratado, reactivo ACS, 98.5-102.0%, $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Sigma, cat. no. P3289)
- Hexacianoferrato (III) de potasio, reactivo ACS, $\geq 99.0\%$, $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (Sigma, cat. no. 244023)

- Sulfato de sodio, reactivo ACS, $\geq 99.0\%$, Na_2SO_4 (J.T. Baker, cat. no. 3898)
- Ácido sulfúrico, reactivo ACS, $\geq 95.0-98.0\%$, H_2SO_4 (J.T. Baker, cat. no. 9681)
- Agua desionizada ultrafiltrada 18.2 M Ω cm (Thermo SCIENTIFIC, Smart2Pure 3 UV, Langenselbold, Suecia)

2.3.1.2. EQUIPAMIENTO

- Unidad de filtración Millex-HV; 0,45 μm , PVDF, d= 33 mm, esterilizada por radiación gamma (Merck, cat. no. SLHV033RS)
- Membrana Durapore, PVDF, hidrófila; 0.22 μm (Merck, cat. no. GVWP04700)
- Sonicador 3510 (BRANSON)
- Microscopio electrónico de barrido (MEB) SU3500 (Hitachi)
- Espectroscopia de rayos X de dispersión de energía (EDS), Quantax 200, XFlash 6, área activa de detección de 30mm² (Bruker)
- Electrodo de oro (Au), diámetro 1.6 mm (1.651mm-1.626mm), 99.95% (BASi, cat. no. MF-2014)
- Electrodo de referencia RE-5B Ag/AgCl (3M NaCl) con conector flexible (BASi, cat. no. MF-2052)
- Potenciostato/galvanostato Epsilon™, modelo E2, serie 1163 (BASi)
- Electrodo de carbón vítreo, DO 5 mm, punta EDR de disco fijo, cubierta polieteretercetona (PEEK) de 12.0 mm de DO, (Pine Research, AFE3T050GCPK)

2.3.1.3. SOLUCIONES

- **Solución 1 X de PBS pH 7.4** Se disuelven 8 g de cloruro de sodio (Sigma, cat. no. S7653), 0.2 g de cloruro de potasio (Sigma, cat. no. P9333), 0.24 g

de Fosfato de potasio monobásico (Sigma, cat. no. 60220) y 2.72 g de Fosfato de sodio dibásico heptahidratado (Sigma, cat. no. S9390) en 1 L de agua desionizada y ultrafiltrada.

- **Solución 1 mM de 11- ácido mercaptoundecanoico** se disuelven 3.3 mg de 11- Ácido mercaptoundecanoico (Sigma, cat. no.450561) en 15 mL de etanol (Sigma, cat. no.459844).
- **Solución 5 mM de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ y 0.1 M de KCl** Se disuelven 42.2 mg de Hexacianoferrato (II) de potasio trihidratado (Sigma, cat. no. P3289), 32.9 mg de Hexacianoferrato (III) de potasio (Sigma, cat. no. 244023) y 0.1491 g de Cloruro de potasio (Sigma, cat. no. P9333) en 20 mL de 1X solución PBS pH 7.4.
- **Solución 1.0×10^{-3} M de ácido tetracloroáurico (III) trihidrato, 0.01 M de Na_2SO_4 y 0.01 M de H_2SO_4** Se disuelven 1.7 mg de Ácido tetracloroáurico (III) trihidrato (Sigma, cat. no. G4022), 7.1 mg de Sulfato de sodio (J.T. Baker, cat. no. 3898) y 2.6 μL de Ácido sulfúrico (J.T. Baker, cat. no. 9681) en 5 mL de agua desionizada y ultrafiltrada.
- **Solución 0.25 M de H_2SO_4** Se disuelven 707 μL Ácido sulfúrico (J.T. Baker, cat. no. 9681) en 100 mL de agua desionizada y ultrafiltrada.
- **Solución 5 mM de 11- ácido mercaptoundecanoico** Se disuelven 10.9 mg de 11- ácido mercaptoundecanoico (Sigma, cat. no.450561) en 10 mL de etanol (Sigma, cat. no.459844).
- **Solución 2.5 mM de O-(3-Carboxipropil)-O'-[2-(3-mercaptopropionilamino)-etil]-polietilenglicol 3000** Se disuelven 7.5 mg de O-(3-Carboxipropil)-O'-[2-(3-mercaptopropionilamino)-etil]-polietilenglicol 3000 (Sigma, cat. no. 712515) en 10 mL de etanol (Sigma, cat. no.459844).

2.3.2. TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN

- **Espectroscopía de rayos X de dispersión de energía (EDS).** Es una técnica analítica utilizada para el análisis elemental o químico caracterización de una muestra. Se basa en una interacción de alguna fuente de excitación de rayos X y una muestra. Sus capacidades de caracterización se deben en gran parte al principio fundamental de que cada elemento tiene una estructura atómica única lo que permite un conjunto único de picos en su espectro de emisión electromagnética. Las mediciones se llevaron a cabo en un equipo de marca Bruker, serie: Quantax 200, modelo: XFlash 6 con área activa de detección de 30mm².
- **Microscopía electrónica de barrido.** Es una técnica de microscopía electrónica capaz de producir imágenes de alta resolución de la superficie de una muestra utilizando las interacciones electrón-materia.

2.3.3. METODOLOGÍA

2.3.3.1. PREPARACIÓN DE NANOPARTICULAS DE ORO SOBRE EL ELECTRODO DE CARBÓN VÍTREO MEDIANTE CRONOAMPEROMETRÍA

- a. Enjuagamos la superficie del electrodo con agua seguida de etanol para eliminar cualquier material incrustado sobre la superficie. Deshumedecemos suavemente con un paño de laboratorio nuevo ([Bioanalytical Systems, Inc, 2001](#)).
- b. Un electrodo de carbón vítreo (5 mm de diámetro) fue pulido con papel lija y solución de alúmina 0.3 y 0.5 μm ; colocamos el electrodo boca abajo en la

almohadilla. Utilizando un movimiento liso circular o figura-ocho e incluso presión, desplazamos el electrodo por todo el cojín. Invertimos la dirección y girar el electrodo 90 ° a intervalos regulares para evitar un desgaste irregular del electrodo (Bioanalytical Systems, Inc, 2001). Después de 1-2 minutos, retiramos el electrodo y enjuagamos todo el grano de pulido restante con etanol. Después sonicamos para eliminar partículas abrasivas residuales durante 5 minutos en etanol (períodos más largos pueden sobrecalentar y dañar el electrodo) y realizamos varios lavados con agua desionizada y ultrafiltrada; después, realizamos una voltamperometría cíclica sujeto a un potencial entre -1.0 y 1.0V en 0.25 M de H₂SO₄ hasta que se alcanzó un estado estable. Para finalizar, el ECV lo sumergimos en una solución que contenía 1.0x10⁻³ M ácido tetracloroáurico (III) trihidrato, 0.01 M de Na₂SO₄ y 0.01 M de H₂SO₄, las nanopartículas de oro se electrodepositan después de someter el sistema a un potencial -0.2 V (vs. Ag/AgCl) y un contra electrodo de platino por 10 s, 30 s y 60 s. Realizamos el lavado con abundante agua desionizada y ultrafiltrada (Gao, Wei, Yang, Yin, & Wang, 2007), (Lin, Ni, & Kokot, 2013).

2.3.3.2. EQUILIBRIO PROPUESTO PARA EL SISTEMA $[Fe(III)(CN)_6]^{3-/4-}$

Se tiene para el pico anódico y se caracterizaron los electrodos mediante voltamperogramas del sistema $[Fe(III)(CN)_6]^{3-/4-}$. La siguiente reacción:



Para verificar que el equilibrio sea el correcto a continuación se calcula teóricamente el valor de potencial a partir de la ecuación de Nernst y la energía libre de Gibbs:

$$\Delta G_r^0 = \sum \Delta G_{\text{productos}} - \sum \Delta G_{\text{reactivos}} \quad \text{Ecuación (37)}$$

donde:

ΔG_r^0 es la energía libre de Gibbs de reacción

$\Delta G_{\text{productos}}$ es la energía libre de Gibbs de formación de los productos

$\Delta G_{\text{reactivos}}$ es la energía libre de Gibbs de formación de los reactivos

$$E^0 = \frac{\Delta G_r^0}{-nF} \quad \text{Ecuación (38)}$$

$$E' = E^0 - \frac{RT}{nF} \ln Q \quad \text{Ecuación (39)}$$

Donde:

E' es el potencial corregido del electrodo

E^0 es el potencial en condiciones estándar

R es la constante de los gases ideales

T es la temperatura

n moles de electrones intercambiados

F es la constante de Faraday

Q es el cociente de reacción

2.3.3.3. VOLTAMPEROMETRÍA CÍCLICA

- a. La técnica de voltamperometría cíclica como técnica experimental fue utilizada en la medición de la reducción de un electrón de hexacianoferrato (III) a hexacianoferrato (II):



- b. Siendo esta la forma de medición del potencial de reducción por medio de voltamperometría cíclica, se realizó después de haber depositado las nanopartículas sobre la superficie del electrodo de carbón vítreo. El medio de solución contiene 20 mL de 1X solución PBS pH 7.4, 0.1 M de cloruro de potasio, 5 mM de hexacianoferrato (II) de potasio trihidratado y 5 mM hexacianoferrato (III) de potasio. Sumergimos de ECV en la solución y sometimos el sistema un barrido de potencial inicial de -0.6 V a 0.8 V, y ajustamos el potencial final a -0.6 V a una velocidad de barrido de 25 mV durante 3 ciclos (6 segmentos) (Cui, y otros, 2016). Posicionar el electrodo de referencia cerca del electrodo de trabajo ayuda además a minimizar la caída de IR entre el electrodo de referencia y de trabajo debido a la resistividad de la fase de solución (Marken, Neudeck, & Bond, 2010).

2.3.3.4. REVESTIMIENTO DEL ELECTRODO CON 11- ÁCIDO MERCAPTOUNDECANOICO

- a. El ECV con superficie modificada con nanopartículas de oro mediante cronoamperometría durante 60 s es incubado durante 24 horas a temperatura ambiente, con la solución 5 mM de 11- ácido mercaptoundecanoico, y en otro ensayo con la solución 2.5 mM de O-(3-Carboxipropil)-O'-[2-(3-mercaptopropionilamino)-etil]-polietilenglicol 3000. Finalmente realizamos un lavado con agua desionizada y ultrafiltrada para proceder a la evaluación mediante voltamperometría cíclica.

2.3.3.5. CRONOAMPEROMETRÍA PARA LA LIMPIEZA DE LA SUPERFICIE DEL ELECTRODO MODIFICADO

- a. Posterior a la obtención de los voltamperogramas y previo al siguiente ensayo de cronoamperometría, es necesario realizar un paso como premisa de limpieza del electrodo el cual consiste en un suministro de potencial positivo de 1000 mV en el primer paso y 2000 mV en el segundo paso, cada uno durante 30 ms en la solución 1 X de PBS pH 7.4. Ulteriormente, se repite el paso de limpieza de la superficie del electrodo descrito con anterioridad.

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. SÍNTESIS Y FUNCIONALIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE ORO

3.1.1. OBTENCIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE ORO CON CITRATO DE SODIO COMO AGENTE REDUCTOR Y ESTABILIZANTE

El protocolo empleado para la obtención de nanopartículas de oro de 18 nm es reproducible arbitrado por el uso del citrato de sodio como agente reductor. Se conoce que la alteración de color insólita fue descrita en primeramente por Turkevich en 1951 (Turkevich, Stevenson, & Hillier, 1951). Para ello, es recomendable conservar las mismas condiciones de temperatura y concentraciones de las especies implicadas en la reacción. Es apreciable el cambio de color (**Figura 11**), el pigmento inicial de la reacción es grisáceo, después azul oscuro-púrpura y el colofón con un color rojo bermellón o rojo anaranjado.

La filtración de las nanopartículas estabilizadas en citrato de sodio mediante la unidad de filtración 0.45 μm puede cambiar insignificamente el tamaño del coloide; sin embargo, el mayor problema lo representa el material de la unidad de filtración. Observamos que con la unidad de filtración (Merck, cat. no. SLHV033RS), la solución de nanopartículas de oro no se adhería al material, como sucedía con otras unidades de filtración.

La solución de nanopartículas de oro mostró perdurabilidad a temperatura ambiente hasta por 6 meses, o el tiempo que duró la experimentación. Sin embargo, para los experimentos de cristalogénesis se usaban alícuotas extraídas a partir de una síntesis recién realizada.

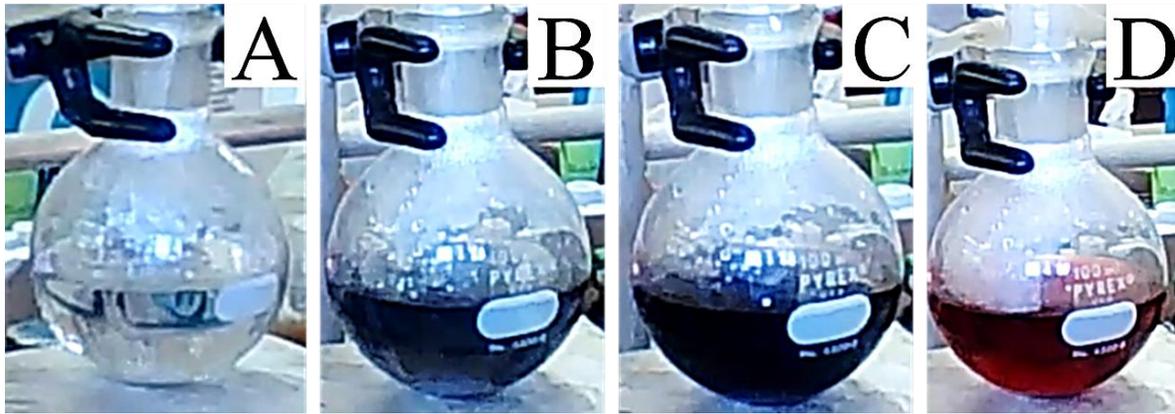


Figura 11 | Síntesis de nanopartículas de oro. (A) Durante unos minutos se calienta hasta ebullición de agua desionizada y ultrafiltrada, en este momento se añade la solución de ácido tetracloroáurico (III) trihidrato, (B) Después de un minuto de mezcla incesante se añade la solución de citrato trisódico dihidratado, el color inicial de la reacción es grisáceo. (C) En seguida, el color es azul oscuro-púrpura y (D) finaliza con un color rojo bermellón o rojo anaranjado.

3.1.2. ESPECTRO DE ABSORCIÓN UV-VIS DE NANOPARTÍCULAS DE ORO DE 18 NM Y 24.5 NM EN CITRATO DE SODIO COMO AGENTE ESTABILIZANTE

Los espectros de absorbencia óptica de las soluciones coloidales de las nanopartículas de oro se midieron a temperatura ambiente y después de la síntesis.

El PRS excitado en nanopartículas metálicas establece interesantes propiedades ópticas. Es notable el color rojo bermellón o rojo anaranjado, el cual está sometido al tamaño de la nanopartícula. Esto se debe las distintas frecuencias de los PRS en los metales, la cual varía en cada una de las aleaciones. Para los plasmones de superficie en nanopartículas metálicas hay una serie de modos de resonancia relacionadas con la teoría de Mie. Por último, se sabe que la oscilación colectiva de electrones libres en una nanoesfera de oro, es la responsable del plasmón de resonancia superficial (PRS) (Yang, Yang, Pang, Vara, & Xia, 2015).

Para nanopartículas de oro, plata y cobre, la resonancia de dipolo se produce en la región UV-Vis haciendo las nanopartículas útiles para aplicaciones ópticas.

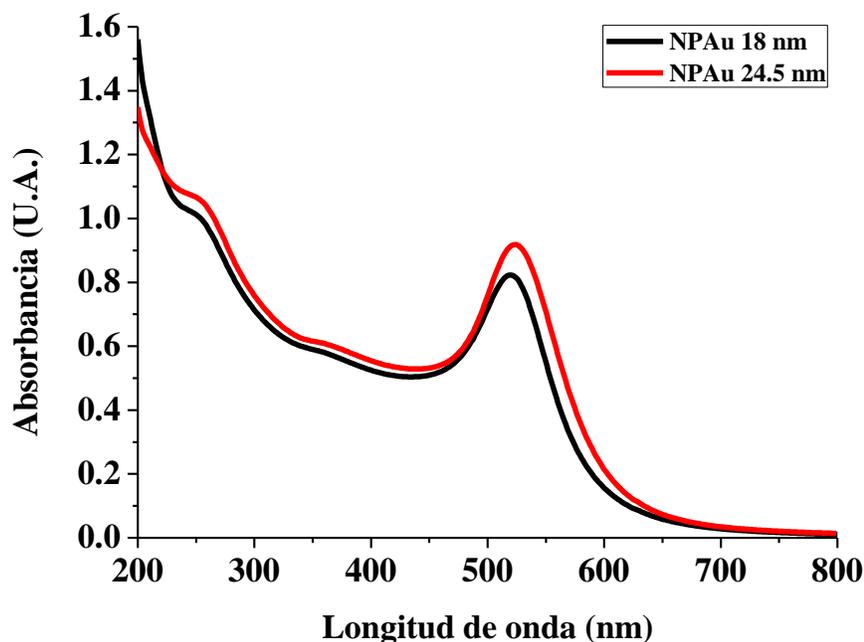


Figura 12 | Espectro de absorción UV-Vis de nanopartículas de oro de 18 nm y 24.5 nm estabilizadas en la solución de citrato de sodio añadida durante reacción de síntesis.

De acuerdo con la teoría de Mie, la intensidad y el ancho del pico de absorbancia de los metales nobles dependen del diámetro de la partícula (Link & El-Sayed, 1999), (Eustis & El-Sayed, 2005). La absorbancia es proporcional a la concentración de nanopartículas de oro y el tamaño de las anteriores (Kaminskienė, Prosyčėvas, Stonkutė, & Guobienė, 2013). Este cambio en la absorbancia y la longitud de onda (Figura 12) es apreciable de acuerdo a la concentración y tamaño de nanopartículas de oro sintetizadas.

ESPECTRO DE ABSORCIÓN UV-VIS COMO TÉCNICA DE CARACTERIZACIÓN EN EL REVESTIMIENTO DE NANOPARTÍCULAS DE ORO DE 18 NM CON LIGANTES TIOL Y CARBOXIL TERMINALES

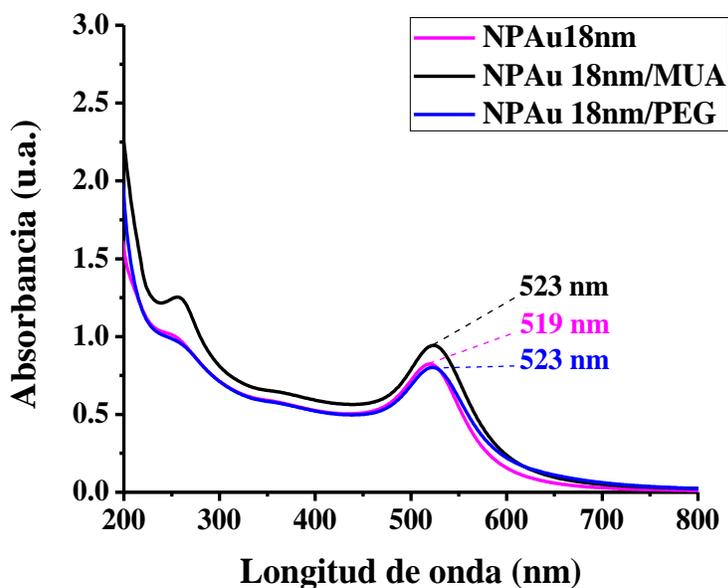


Figura 13 | Espectro de absorción UV-Vis de nanopartículas de oro de 18 nm revestidas con 11-ácido mercaptoundecanoico y O-(3-Carboxipropil)-O'-[2-(3-mercaptopropionilamino)-etil]-polietilenglicol 3000, estabilizadas en la solución de citrato de sodio añadida durante reacción de síntesis.

Las nanopartículas de oro de 18 nm revestidas con 11-ácido mercaptoundecanoico y O-(3-Carboxipropil)-O'-[2-(3-mercaptopropionilamino)-etil]-polietilenglicol 3000 y estabilizadas en citrato de sodio fueron depuradas del exceso de ligante insoluble e impurezas mediante la unidad de filtración 0.45 μm (Merck, cat. no. SLHV033RS). La solución de nanopartículas de oro no se adhería al material y el revestimiento de los coloides de oro da perdurabilidad y protección ante la agregación de nanopartículas de oro en la solución de síntesis. En el caso del ligante O-(3-Carboxipropil)-O'-[2-(3-mercaptopropionilamino)-etil]-polietilenglicol 3000, su solubilidad es mucho mayor que el 11-ácido mercaptoundecanoico, por lo tanto los

ligantes no unidos a la superficie de las nanopartículas de oro no fueron aislados de la solución hasta la diálisis en 50 mM MES a pH 6.0.

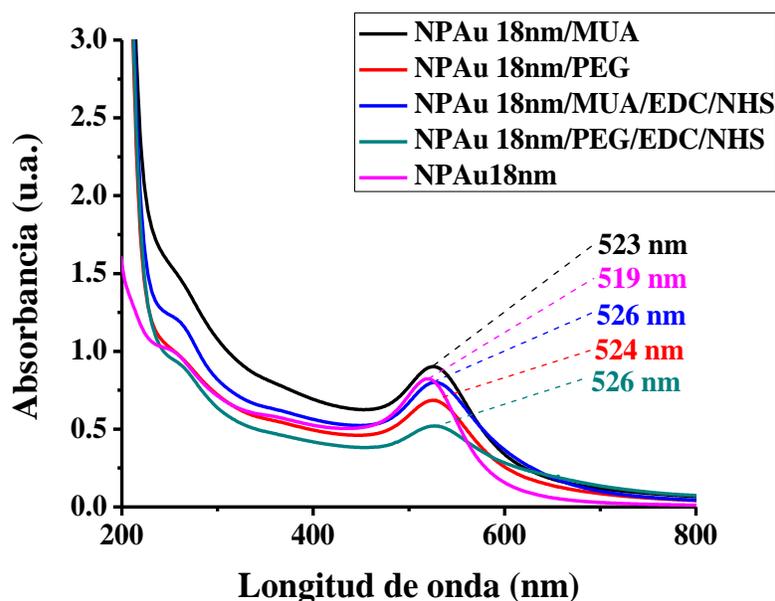


Figura 14 | Espectro de absorción UV-Vis de nanopartículas de oro de 18 nm revestidas con 11-ácido mercaptoundecanoico y O-(3-Carboxipropil)-O'-[2-(3-mercaptopropionilamino)-etil]-polietilenglicol 3000, estabilizadas en la solución de citrato de sodio añadida durante reacción de síntesis y después de preparar ésteres reactivos de amina de grupos carboxilo terminal de los ligantes unidos covalentemente a la superficie de las nanopartículas de oro.

El revestimiento con ligantes tiol y carboxil terminales modifican los espectros de absorbancia óptica y de longitud de onda de las soluciones coloidales de las nanopartículas de oro (**Figura 13**). El leve desplazamiento en espectros de absorbancia y de longitud de onda (**Figura 14**) nos asiste en la caracterización del proceso de modificación de la superficie de los elementos esféricos de oro en solución. Para las nanopartículas de oro obtenidas de la síntesis la longitud de onda es de 519 nm; después de revestir con 11-ácido mercaptoundecanoico es de 523 nm, en el proceso de modificación con O-(3-Carboxipropil)-O'-[2-(3-mercaptopropionilamino)-etil]-polietilenglicol 3000 está entre 523-524. Finalmente,

después de preparar ésteres reactivos de amina de grupos carboxilo terminal de ambos ligantes unidos covalentemente a la superficie de las nanopartículas de oro con EDC y NHS las longitudes de onda son de 526 nm.

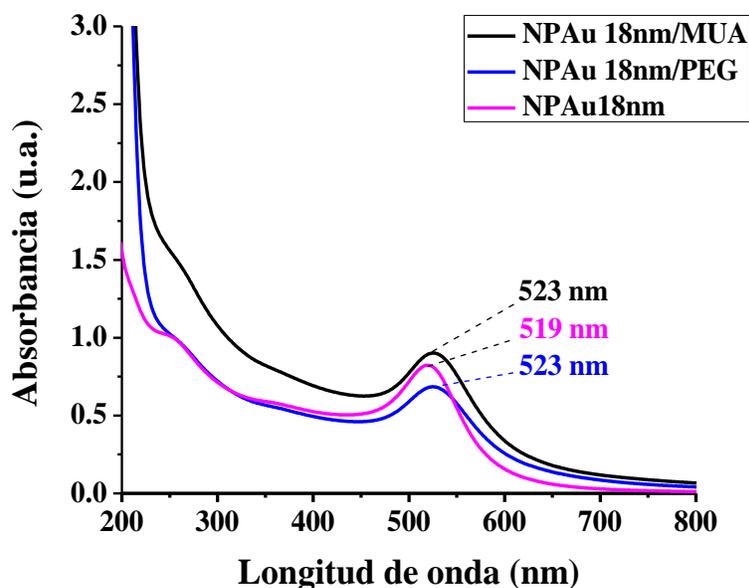


Figura 15 | Espectro de absorción UV-Vis de nanopartículas de oro de 18 nm revestidas con 11-ácido mercaptoundecanoico y O-(3-Carboxipropil)-O'-[2-(3-mercaptopropionilamino)-etil]-polietilenglicol 3000, se dializaron y estabilizadas en 50 mM de MES a pH 6.0.

El revestimiento con ligantes tiol y carboxilo terminales de estos cuerpos metálicos de oro dan perdurabilidad y protección ante la agregación de nanopartículas de oro en la solución de síntesis y también en la separación de las nanopartículas de oro de la solución de citrato de sodio mediante la membrana de diálisis de 3.5 kDa en 50 mM de MES a pH 6.0. Aunque la reacción de activación con EDC y NHS es más eficiente a pH 4.5-7.2, las reacciones de EDC a menudo se realizan en solución de MES. Estos coloides de oro recubiertos demostraron estabilidad y perdurabilidad en la solución 50 mM de MES a pH 6.0 (**Figura 15**). Asimismo, la solución dializada prestó en la elaboración de ésteres reactivos de amina de grupos carboxilo terminal

de ambos ligantes unidos covalentemente a la superficie de las nanopartículas de oro con EDC y NHS para los experimentos de cristalogénesis de proteínas. Las longitudes de onda de los coloides después de haber sido se dializaron y estabilizadas en 50 mM MES a pH 6.0 (**Figura 16**) fueron análogas a aquellas que permanecieron en la solución de citrato de sodio de la reacción de síntesis.

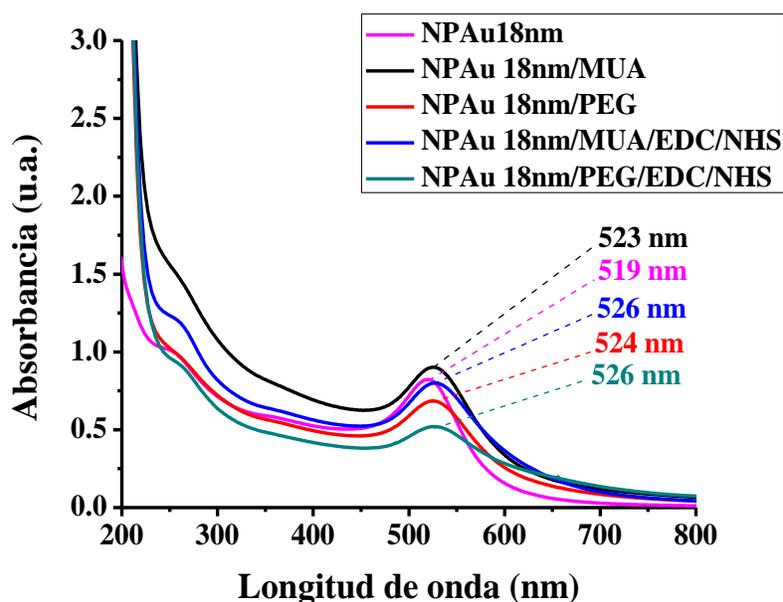


Figura 16 | Espectro de absorción UV-Vis de nanopartículas de oro de 18 nm revestidas con 11-ácido mercaptoundecanoico y O-(3-Carboxipropil)-O'-[2-(3-mercaptopropionilamino)-etil]-polietilenglicol 3000, se dializaron y estabilizadas en 50 mM de MES a pH 6.0 después de preparar ésteres reactivos de amina de grupos carboxilo terminal de los ligantes unidos covalentemente a la superficie de las nanopartículas de oro.

3.1.3. DETERMINACIÓN DE POTENCIAL ζ DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ORO DE 18 NM.

Las mediciones se obtuvieron de soluciones coloidales de las nanopartículas de oro y se midieron a 25°C.

La importancia del potencial ζ es que su valor puede estar relacionado con la estabilidad de dispersiones coloidales. El potencial zeta indica el grado de repulsión entre las partículas adyacentes cargadas de manera similar en una dispersión. Para moléculas y partículas que son lo suficientemente pequeñas, un alto potencial zeta conferirá estabilidad, es decir, la solución o dispersión resistirá la agregación. Cuando el potencial es bajo, la atracción supera la repulsión y la dispersión se romperá y floculará.

El potencial ζ proporciona una idea de la perdurabilidad de las partículas. Si las partículas suspendidas tienen un alto potencial, se repelen entre sí y no se produce agregación, como en el caso de las soluciones de nanopartículas de oro.

Sin embargo, si las partículas tienen un bajo valor de potencial, la fuerza de repulsión no será suficiente para evitar su agregación. Las partículas con valores de potencial ζ por encima de +30 mV o por debajo de -30 mV, generalmente se consideran estables. Varios factores afectan el potencial ζ exhibido por las partículas, especialmente el pH y la fuerza iónica de la solución acuosa, por lo que, midiendo los valores de potencial ζ es posible comprender cómo esas condiciones afectan a las nanopartículas de oro.

Las mediciones del potencial ζ revelan que las nanopartículas son altamente estables y tienen una carga superficial promedio (Ivanov, Bednar, & Haes, 2010), (Xia, Xiahou, Zhang, Ding, & Wang, 2016). El tamaño y el potencial ζ (Figura 17) de las partículas obtenidas en la solución de reacción en la etapa final y el color de la

solución característica de nanopartículas de 18 nm tiene un potencial zeta de -40.6 mV.

Cabe señalar que a medida que el potencial ζ se acerca a cero, empeora la estabilidad inherente de las nanopartículas (Ivanov, Bednar, & Haes, 2010).

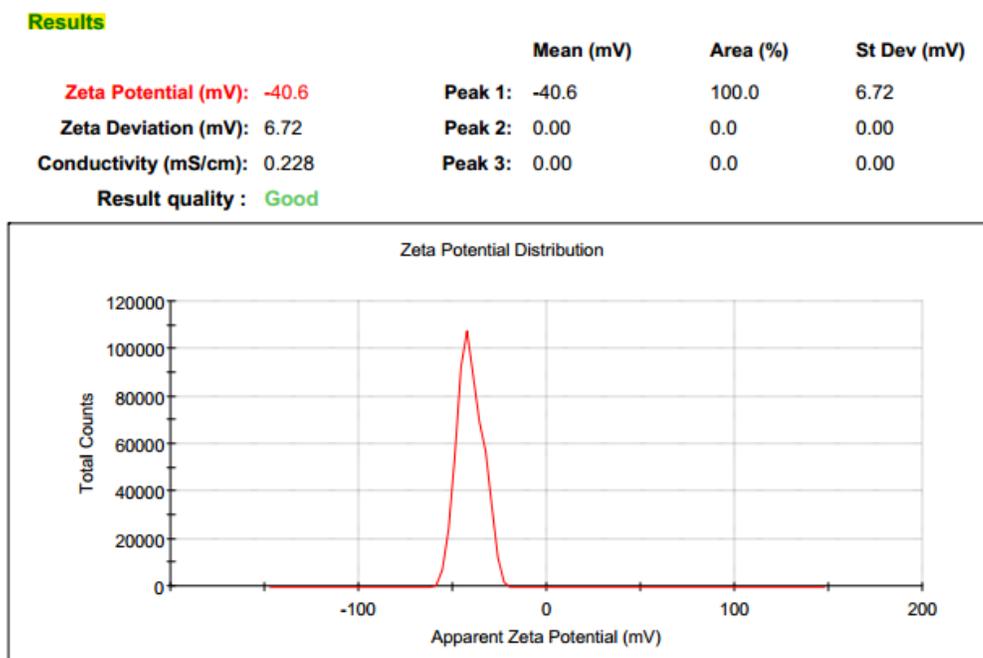


Figura 17| Distribución del potencial ζ de nanopartículas de oro de 18 nm estabilizadas en la solución de citrato de sodio añadida durante la reacción de síntesis.

3.1.4. MICROGRAFÍAS MET DE NANOPARTÍCULAS DE ORO MONODISPERSAS CUASI-ESFÉRICAS

Las nanopartículas de oro consisten en cuerpos de forma aproximadamente esférica de este metal de transición en una dispersión duradera y uniforme. En las micrografías, las nanopartículas de oro se exhiben como elementos esferoides. En microscopía electrónica de transmisión como técnica de caracterización de las nanopartículas, estas se manifiestan como cuerpos visibles, densos, señaladas en oscuro y generalmente de aspecto negro. El análisis de las medidas fueron

expresadas en nm con el programa de libre acceso ImageJ, el cual es una herramienta para el procesamiento de imágenes Java de dominio público inspirado en NIH Image para Macintosh.

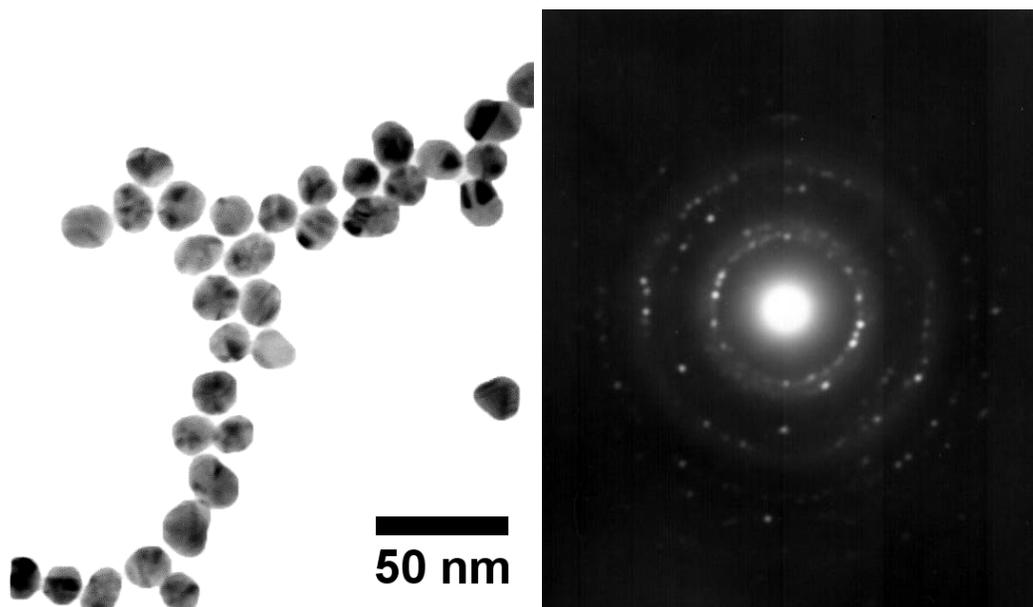


Figura 18 | Imagen MET de nanopartículas de oro de $17.2 \text{ nm} \pm 3 \text{ nm}$ y (b) patrón de difracción de área selecta de las nanopartículas de oro.

3.1.5. DISPERSIÓN DE LA LUZ DINÁMICA DE NANOPARTÍCULAS DE ORO DE 18 NM Y 24.5 NM.

Las mediciones para obtención de la distribución de tamaños y del diámetro hidrodinámico (**Figura 19** y **20**) de las soluciones coloidales de las nanopartículas de oro se midieron a 25°C .

Cuando un medio líquido mueve una partícula dispersa, la mayoría de veces se adhiere una capa eléctrica dipolar a su superficie. Debido a que esta capa influye en

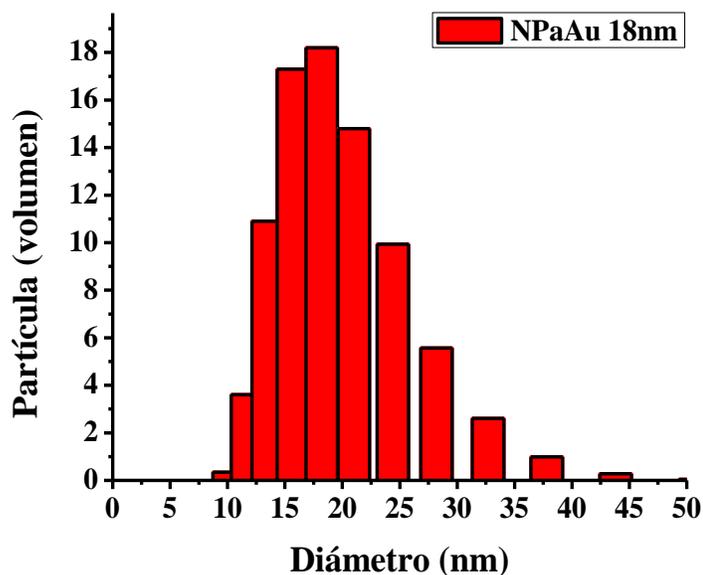


Figura 19 | Distribución de tamaños de nanopartículas de oro de 18 nm estabilizadas en la solución de citrato de sodio añadida durante la reacción de síntesis.

cuales cuenta la conductividad eléctrica del líquido.

el movimiento de la partícula, en la dispersión de luz dinámica (DLS) el diámetro medido de la partícula, que se conoce como hidrodinámico, la mayoría de veces es superior al diámetro que se mide con un microscopio electrónico de transmisión (TEM). El grosor de la capa depende de distintos factores, entre los

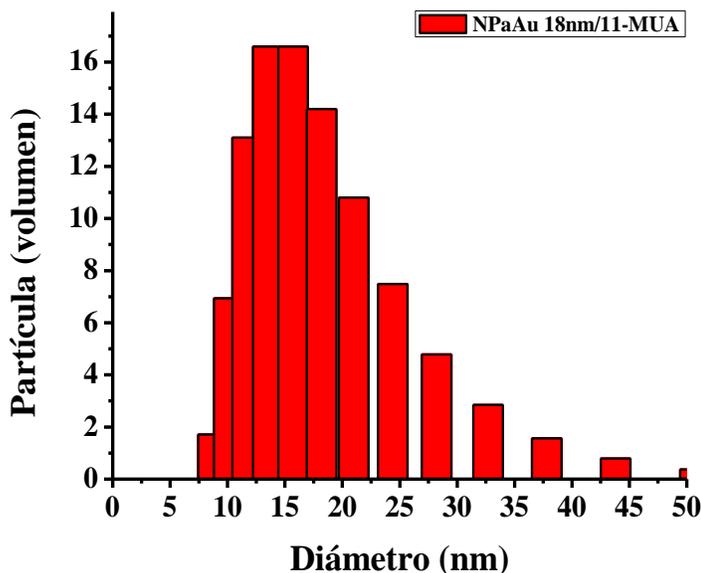


Figura 20 | Distribución de tamaños de nanopartículas de oro de 18 nm revestidas con 11-MUA y estabilizadas en la solución de citrato de sodio añadida durante la reacción de síntesis.

3.1.6. ANÁLISIS DE RASTREO DE NANOPARTÍCULAS DE 18 NM.

Las mediciones se llevaron a cabo usando un instrumento Malvern NanoSight NS300 y al instante de la preparación de las diluciones, con un láser a una longitud de onda de 532nm (NanoSight NS300); los análisis para lograr la distribución de tamaños se llevaron a cabo usando el software proporcionado por el fabricante, la versión es NTA 3.1. Para las mediciones de rastreo de nanopartículas las muestras fueron preparadas en una dilución de 20 veces para las de 18 nm.

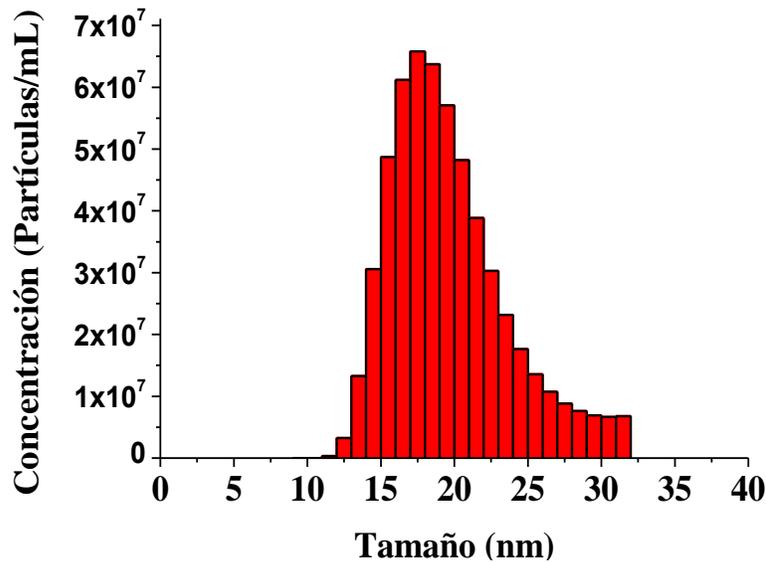


Figura 21 | Distribución de tamaños y concentración adquirido por el análisis rápido y automatizado del software de nanopartículas de oro de 18 nm estabilizadas en la solución de citrato de sodio añadida durante la reacción de síntesis.

El NS300 nos proporcionó el análisis rápido y automatizado de la distribución de tamaños y la concentración de las nanopartículas de 18 nm de diámetro **(Figura 21)**,

previamente caracterizadas por MET, obedeciendo la configuración del instrumento y el tipo de muestra, éste último,

son nanopartículas de oro con citrato de sodio como agente estabilizante. La temperatura de la muestra fue totalmente programable a través del software Nanoparticle Tracking Analysis (NTA).

3.2. CRISTALOGÉNESIS DE LISOZIMA, XILANASA, FERRITINA, GLUCOSA ISOMERASA Y NANOPARTÍCULAS DE ORO

3.2.1. ESPECTROSCOPIA DE MASAS

Los experimentos de espectrometría de masas para la determinación del peso molecular y pureza en un espectroscopio de masas, utilizando la técnica MALDI-TOF (desorción por láser asistida por matriz/ionización de tiempo de vuelo), nos auxilió como criterio de pureza basado en el peso molecular de estas proteínas. No se

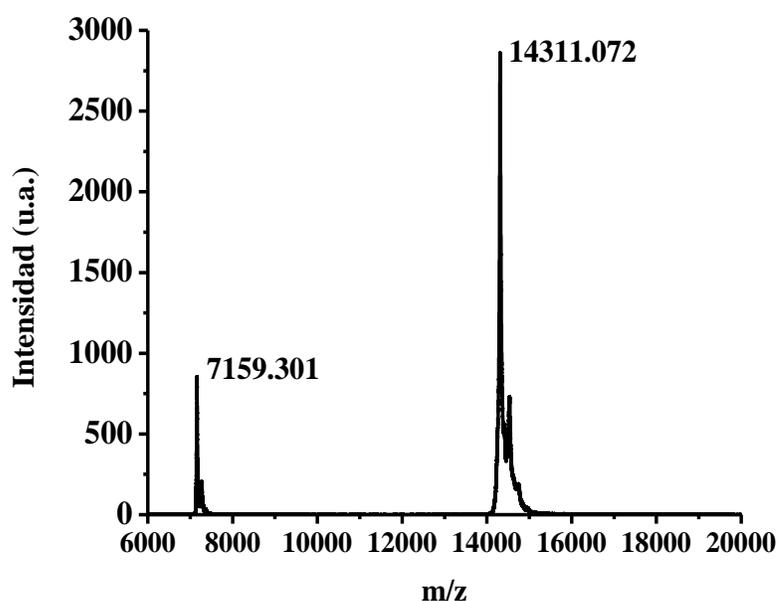


Figura 22 | Espectro de masas de HEWL, lisozima de huevo de gallina (Seikagaku Corp., Japan, cat. no. 100940).

detectaron picos característicos de impurezas, lo que sugiere que la alta calidad y pureza de las proteínas y su manejo (**Figuras 23, 24, 25 y 26**).

El peso molecular de la Lisozima es de 14.6 kDa ([Hampton Research Corporation, 1991-2017](#)).

La estructura molecular de XYNII se describe en el documento de Anneli Torronen et al. XYN II consiste en 190 aminoácidos y tiene un peso molecular de 21 kDa. Los cristales originales de calidad para efectuar una difracción de rayos X se prepararon en yoduro de sodio, sulfato de amonio y tricina.

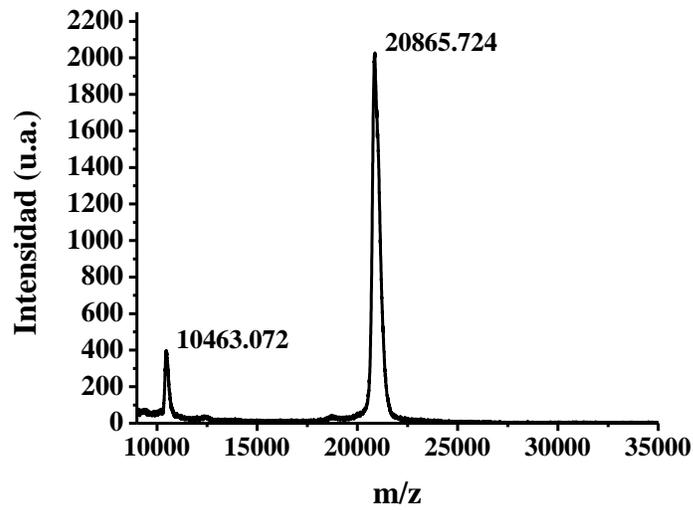


Figura 23 | Espectro de masas de xilanasa II (endo-1,4- β -xilanasa II) de *T. reesei* (Hampton Research, HR7-104).

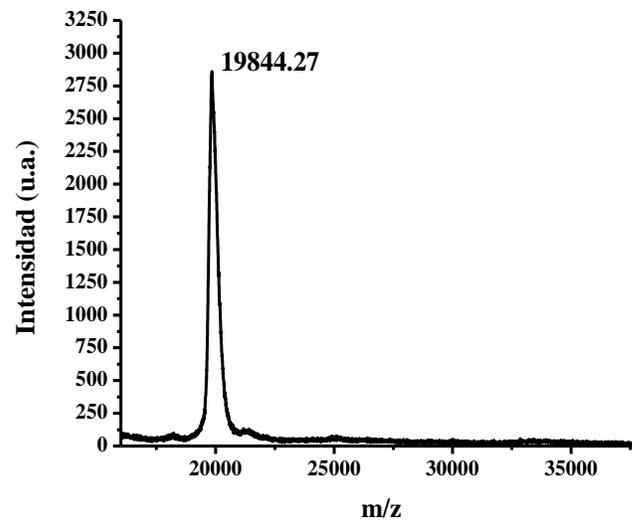


Figura 24 | Espectro de masas de ferritina de bazo de caballo, tipo I, subunidad L (Sigma, cat. no. F4503)

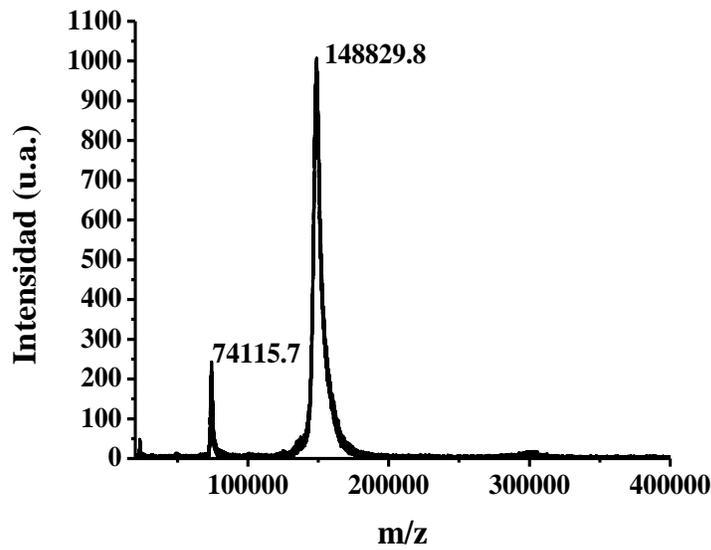


Figura 25 | Espectro de masas de IgG de suero de humano (Sigma, cat. no. I4506)

3.2.2. IMÁGENES EN EL CRECIMIENTO DE CRISTALES DE PROTEÍNAS EN PRESENCIA DE NANOPARTÍCULAS DE ORO

Todas las imágenes fueron tomadas con ocular micrométrico adosado a un microscopio estereoscópico Olympus SZH10 y el análisis de las medidas fueron expresadas en mm con el programa de libre acceso ImageJ, el cual es una herramienta para el procesamiento de imágenes Java de dominio público inspirado en NIH Image para Macintosh.

Los primeros estudios sobre la naturaleza de estas diferentes interacciones de metales pesados y proteínas enfatizaron la importancia de la unión covalente a los tioles de los residuos de cisteína. La estabilidad del enlace metal-azufre permitió una fácil identificación del ligante (Blundell & Jenkins, 1977). Estos ligantes pueden complejar los iones metálicos y, por lo tanto, modificar su reactividad dando lugar a muchas especies posibles de unión a proteínas y un patrón complicado de

interacción. El pH y la fuerza iónica también pueden afectar al ligante de la proteína y cambiar su afinidad por el metal (Blundell & Jenkins, 1977).

Para los cristales de lisozima la morfología no cambia en presencia de nanopartículas de oro (**Figuras 27, 28, 29, 30, 31**), y tampoco cuando están revestidas con el ligante 11- ácido mercaptoundecanoico (**Figura 33**) sino hasta cuando están en presencia de nanopartículas de oro de 18 nm revestidas con O-(3-Carboxipropil)-O'-[2-(3-mercaptopropionilamino)-etil]-polietilenglicol 3000 (**Figura 32 y 34**), se dializaron y estabilizadas en 50 mM de MES a pH 6.0 y después de haber sido preparados los ésteres reactivos de amina de grupos carboxilo terminales de los ligantes unidos covalentemente a la superficie de las nanopartículas de oro, en estas, se observa un cambio notable de la morfología del cristal característico de la lisozima pero no de su celda unidad. Estudios previos demostraron que las nanopartículas de oro podrían actuar como nucleantes para la cristalización de HEWL, promoviendo su crecimiento cristalino en condiciones para las cuales la enzima sola no podía formar cristales, y también un aumento en el tamaño del cristal en algunas condiciones específicas (Wei, y otros, 2010).

Para los cristales de lisozima, ferritina, glucosa isomerasa y xilanasas en 50 mM de MES a pH 6.0 en la cristalogénesis no se vieron afectados por los parámetros de pH e inclusive para aquellos conjugados con FITC como el caso de la lisozima y la ferritina.

La fluorescencia del cristal fue observada mediante un microscopio confocal, modelo LSM 510. Axiovert 200M (Carl Zeiss), nos aseguramos que antes de las pruebas de cristalogénesis la proteína fuera constantemente dializada en la solución 1 X de PBS a pH 7.4 y con la ayuda de la membrana de diálisis, 3.5 kDa para retirar el exceso de FITC no conjugado. La solubilidad de la proteína solamente se vio afectada en la preparación de cristales de lisozima conjugadas con FITC, cuando altas concentraciones de FITC son agregadas en el proceso de conjugación, afectando el pH de la solución que contiene a la proteína.

Los cristales de glucosa isomerasa pueden ser obtenidos a partir de 10 - 15 % m/v PEG 4,000-8,000, 0.2 M de alguna sal como sulfato de amonio, cloruro de magnesio, acetato de magnesio, acetato de calcio o acetato de amonio a pH 6.0 - 9.0 (Pareja-Rivera, y otros, 2016); sin embargo, en los estudios de cristalogénesis observamos que en presencia de PEG, aún en diluciones 1:5, se veían afectados ya que provocaban la agregación de las nanopartículas de oro.

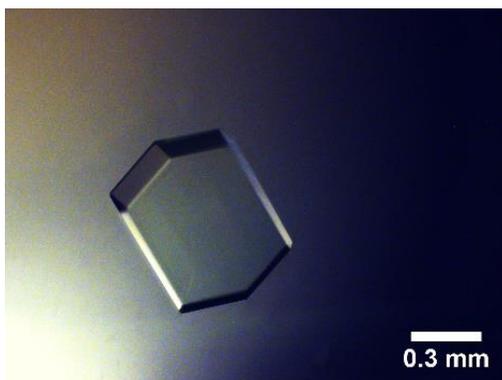


Figura 26 | Lisozima control: 5 μL de lisozima a 75 mg/mL en 0.1 M de acetato de sodio a pH 4.5 y 15 μL de solución de pozo, la cual contiene NaCl 6.5% (p/v) en 0.1 M de acetato de sodio a pH 4.5.

Figura 27 | Lisozima control: 5 μL de lisozima a 120 mg/mL en 50 mM de MES a pH 6.0 y 15 μL de solución de pozo, la cual contiene NaCl 6.5% (p/v) en 0.1 M de acetato de sodio a pH 4.5.

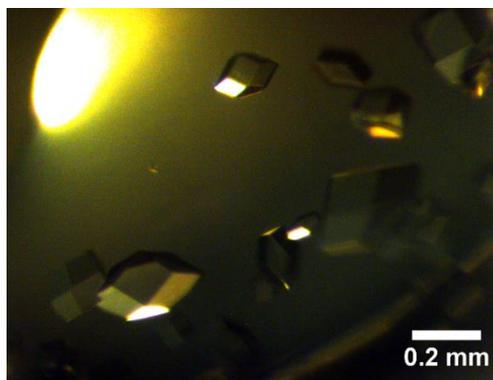


Figura 28 | Lisozima y nanopartículas de oro: 5 μL de lisozima a 75 mg/mL en 0.1 M de acetato de sodio (a pH 4.5), 5 μL de nanopartículas de oro de 18 nm estabilizadas en citrato de sodio y 10 μL de solución de pozo, la cual contiene NaCl 6.5% (p/v) en 0.1 M de acetato de sodio a pH 4.5.

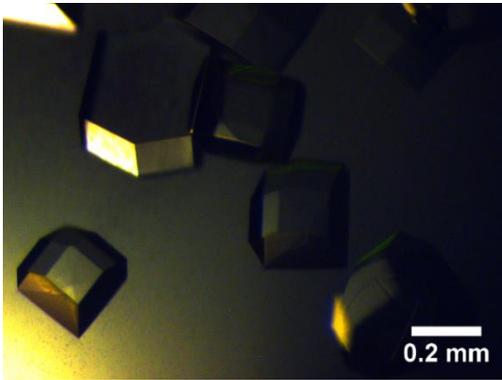


Figura 29 | Lisozima en MES y nanopartículas de oro: 5 μL de lisozima a 120 mg/mL en 50 mM de MES a pH 6.0, 5 μL de nanopartículas de oro de 18 nm y 10 μL de solución de pozo, la cual contiene NaCl 6.5% (p/v) en 0.1 M de acetato de sodio a pH 4.5.

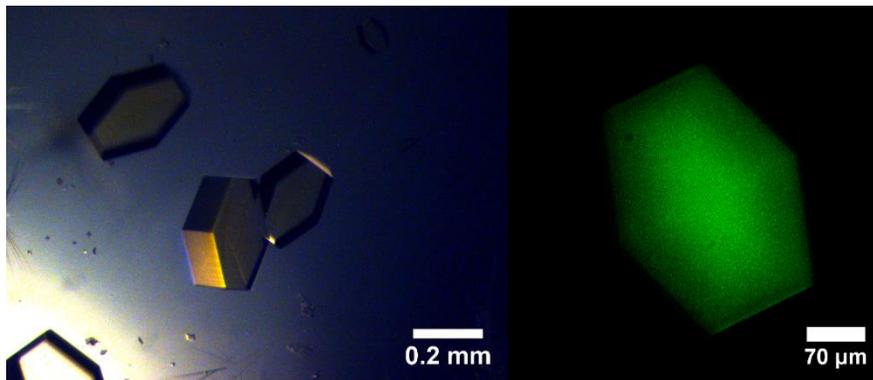


Figura 30 | Lisozima marcada con FITC y nanopartículas de oro: 5 μL de lisozima-FITC a 75 mg/mL en 1X PBS a pH 7.4, 5 μL de nanopartículas de oro de 18 nm estabilizadas en citrato de sodio y 10 μL de solución de pozo, la cual contiene NaCl 6.5% (p/v) en 0.1 M de acetato de sodio a pH 4.5.

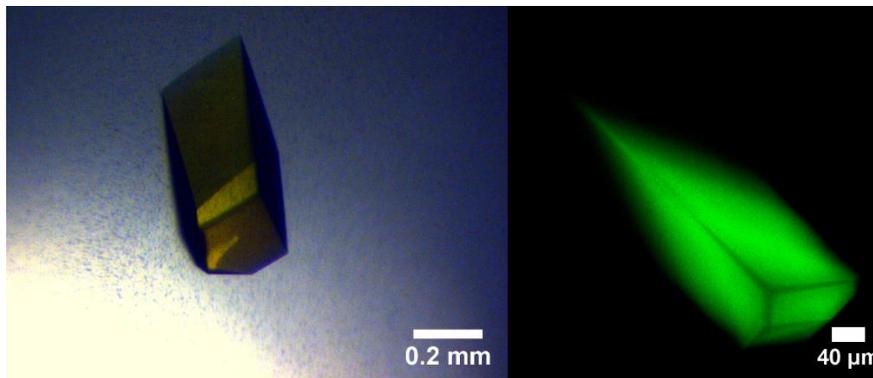


Figura 31 | Lisozima-FITC en 1X PBS a pH 7.4 y nanopartículas de oro revestidas con O-(3-Carboxipropil)-O'-[2-(3-mercaptopropionilamino)-etil]-polietilenglicol 3000: 5 μL de lisozima-FITC a 75 mg/mL en 1X PBS a pH 7.4, 5 μL de nanopartículas de oro de 18 nm, revestidas con O-(3-Carboxipropil)-O'-[2-(3-mercaptopropionilamino)-etil]-polietilenglicol 3000, estabilizadas en 50 mM de MES a pH 6.0 y 10 μL de solución de pozo, la cual contiene NaCl 6.5% (p/v) en 0.1 M de acetato de sodio a pH 4.5.

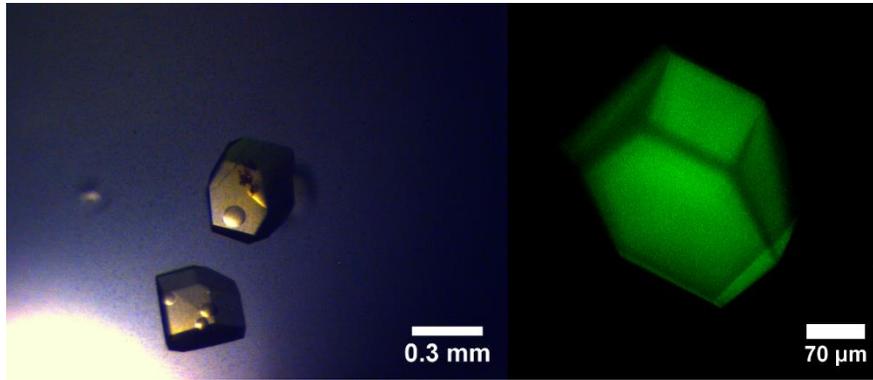


Figura 32| Lisozima-FITC en 1X PBS a pH 7.4 y nanopartículas de oro revestidas con ácido 11-mercaptoundecanoico: 5 μ L de lisozima-FITC a 75 mg/mL en 1X PBS a pH 7.4, 5 μ L de nanopartículas de oro de 18 nm, revestidas con ácido 11-mercaptoundecanoico, estabilizadas en 50 mM de MES a pH 6.0. y 10 μ L de solución de pozo, la cual contiene NaCl 6.5% (p/v) en 0.1 M de acetato de sodio a pH 4.5.

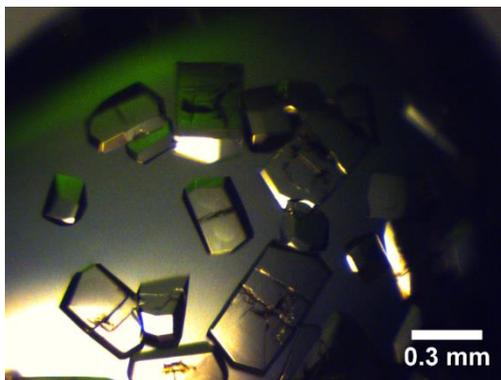


Figura 33| Lisozima en MES y nanopartículas de oro revestidas con O-(3-Carboxipropil)-O'-[2-(3-mercaptopropionilamino)-etil]-polietilenglicol 3000: 5 μ L de lisozima a 120 mg/mL en 50 mM de MES a pH 6.0, 5 μ L de nanopartículas de oro de 18 nm revestidas con O-(3-Carboxipropil)-O'-[2-(3-mercaptopropionilamino)-etil]-polietilenglicol 3000 y estabilizadas en 50 mM de MES a pH 6.0 y 10 μ L de solución de pozo, la cual contiene NaCl 6.5% (p/v) en 0.1 M de acetato de sodio a pH 4.5.

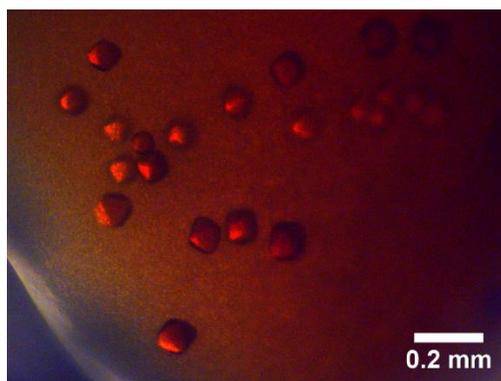


Figura 34| Ferritina control: 5 μ L de ferritina a 75 mg/mL y 15 μ L de solución de pozo, la cual contiene 0.8 M de sulfato de amonio, 0.1 M de Tris a pH 7.5, 60 mM de sulfato de cadmio.

Figura 35 | Ferritina MES control: 5 μ L de ferritina a 75 mg/mL en 50 mM de MES a pH 6.0 y 15 μ L de solución de pozo, la cual contiene 0.8 M de sulfato de amonio, 0.1M de Tris a pH 7.5, 60 mM de sulfato de cadmio.

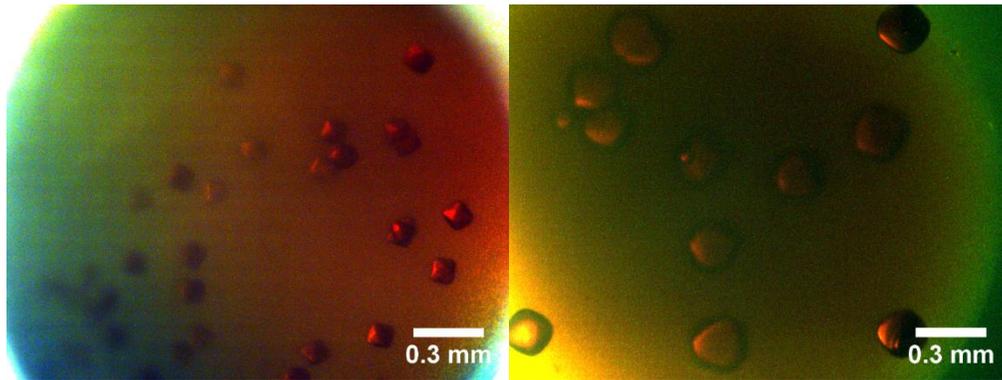
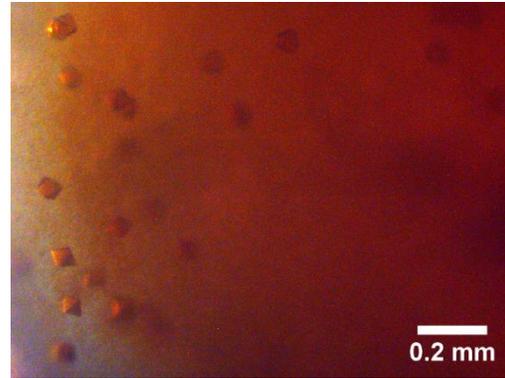


Figura 36 | Ferritina y nanopartículas de oro: 5 μ L de ferritina a 75 mg/mL, 5 μ L de nanopartículas de oro de 18 nm estabilizadas en citrato de sodio y 10 μ L de solución de pozo, la cual contiene 0.8 M de sulfato de amonio, 0.1M de Tris a pH 7.5, 60 mM de sulfato de cadmio.

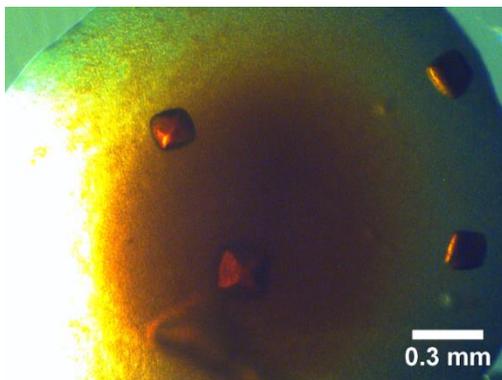


Figura 37 | Ferritina MES y nanopartículas de oro: 5 μ L de ferritina a 75 mg/mL en 50 mM de MES a pH 6.0, 5 μ L de nanopartículas de oro de 18 nm estabilizadas en citrato de sodio y 10 μ L de solución de pozo, la cual contiene 0.8 M de sulfato de amonio, 0.1 M de Tris a pH 7.5, 60 mM de sulfato de cadmio.

Figura 38| Ferritina-FITC en 1X PBS a pH 7.4 y nanopartículas de oro: 5 μ L de ferritina-FITC a 75 mg/mL en 1X PBS a pH 7.4, 5 μ L de nanopartículas de oro de 18 nm estabilizadas en citrato de sodio y 10 μ L de solución de pozo, la cual contiene 0.8 M de sulfato de amonio, 0.1M de Tris a pH 7.5, 60 mM de sulfato de cadmio.

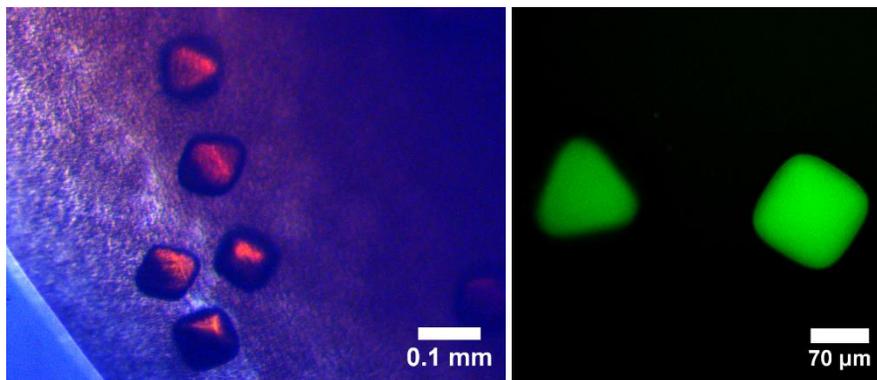
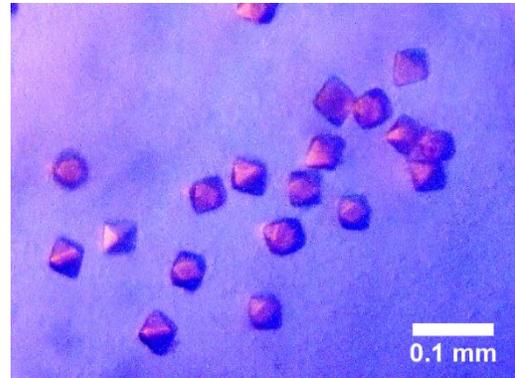


Figura 39| Ferritina-FITC en 1X PBS a pH 7.4 y nanopartículas de oro revestidas con O-(3-Carboxipropil)-O'-[2-(3-mercaptopropionilamino)-etil]-polietilenglicol 3000: 5 μ L de ferritina-FITC a 75 mg/mL en 1X PBS a pH 7.4, 5 μ L de nanopartículas de oro de 18 nm revestidas con O-(3-Carboxipropil)-O'-[2-(3-mercaptopropionilamino)-etil]-polietilenglicol 3000 y estabilizadas en 50 mM de MES a pH 6.0 y 10 μ L de solución de pozo, la cual contiene 0.8 M de sulfato de amonio, 0.1M de Tris a pH 7.5, 60 mM de sulfato de cadmio.

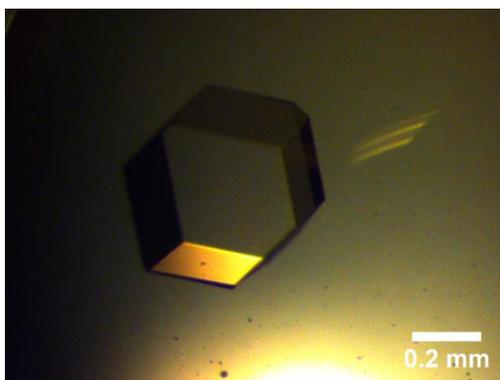


Figura 40| Glucosa isomerasa control: 5 μ L de glucosa isomerasa a 30 mg/mL y 5 μ L de solución de pozo, la cual contiene 0.2 M de formiato de magnesio dihidratado.

Figura 41 | Glucosa Isomerasa y nanopartículas de oro: 5 μ L de glucosa isomerasa a 30 mg/mL , 5 μ L de nanopartículas de oro de 18 nm estabilizadas en citrato de sodio y 5 μ L de solución de pozo, la cual contiene 0.2 M de formiato de magnesio dihidratado.

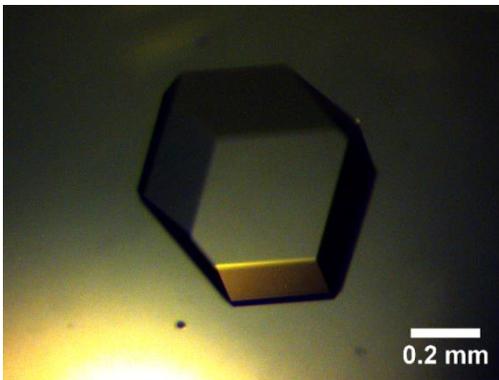
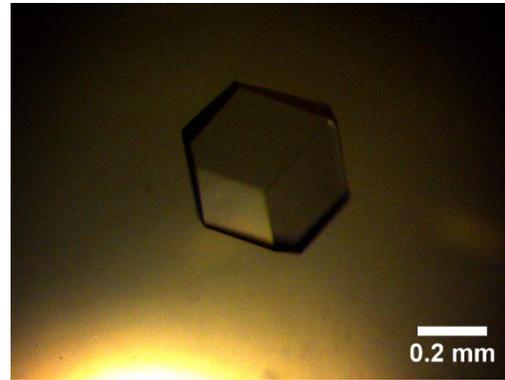


Figura 42 | Glucosa Isomerasa y nanopartículas de oro revestidas con ácido 11-mercaptoundecanoico: 5 μ L de glucosa isomerasa a 30 mg/mL, 5 μ L de nanopartículas de oro de 18 nm revestidas con ácido 11-mercaptoundecanoico y estabilizadas en 50 mM de MES a pH 6.0 y 5 μ L de solución de pozo, la cual contiene 0.2 M de formiato de magnesio dihidratado.

Figura 43 | Glucosa Isomerasa y nanopartículas de oro revestidas con O-(3-Carboxipropil)-O'-[2-(3-mercaptopropionilamino)-etil]-polietilenglicol 3000: 5 μ L de glucosa isomerasa a 30 mg/mL, 5 μ L de nanopartículas de oro de 18 nm revestidas con O-(3-Carboxipropil)-O'-[2-(3-mercaptopropionilamino)-etil]-polietilenglicol 3000 y estabilizadas en 50 mM de MES a pH 6.0 y 5 μ L de solución de pozo, la cual contiene 0.2 M de formiato de magnesio dihidratado.



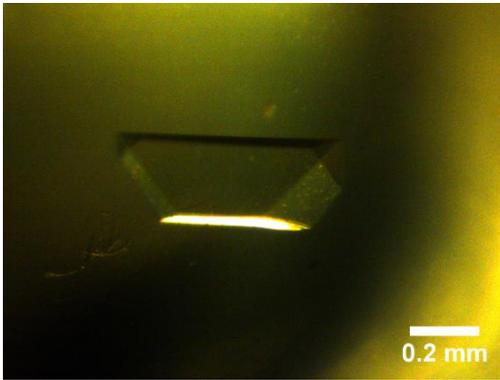


Figura 44 | Xilanasa en 50 mM de MES control: 5 μ L de xilanasa a 30 mg/mL en 50 mM de MES a pH 6.0 y 1.2 μ L 1 M yoduro de sodio, 2.8 μ L solución de pozo, la cual contiene 1.2 M de sulfato de amonio, 100 mM de tricina a pH 9.0.

Figura 45 | Xilanasa en 50 mM de MES a pH 6.0 y nanopartículas de oro revestidas con ácido 11-mercaptoundecanoico: 5 μ L de xilanasa a 30 mg/mL en 50 mM de MES a pH 6.0, 5 μ L de nanopartículas de oro de 18 nm revestidas con ácido 11-mercaptoundecanoico y estabilizadas en 50 mM de MES a pH 6.0 y 1.2 μ L 1 M yoduro de sodio, 2.8 μ L solución de pozo, la cual contiene 1.2 M de sulfato de amonio, 100 mM de tricina a pH 9.0.

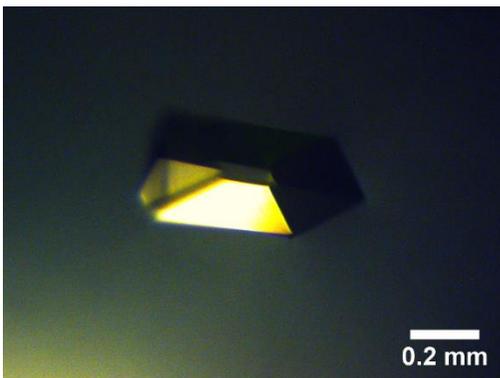
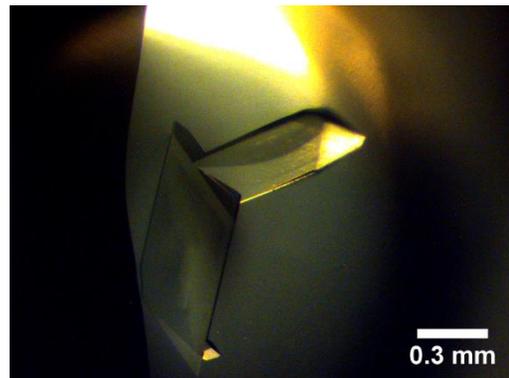


Figura 46 | Xilanasa en 50 mM de MES a pH 6.0 y nanopartículas de oro: 5 μ L de xilanasa a 30 mg/mL en 50 mM de MES a pH 6.0, 5 μ L de nanopartículas de oro de 18 nm estabilizadas en citrato de sodio y 1.2 μ L 1 M yoduro de sodio, 2.8 μ L solución de pozo, la cual contiene 1.2 M de sulfato de amonio, 100 mM de tricina a pH 9.0.

3.2.3. DISPOSITIVOS PARA EL TRANSPORTE DE CRISTALES DE PROTEÍNA A LAS INSTALACIONES DE SINCROTÓN

Nos auxiliamos con el dispositivo y patente registrada en el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (IMPI) esta tiene un número de EXP. MX/a/2017/016449 y se titula: "Dispositivo para la protección térmica y transporte de materiales cristalinos".

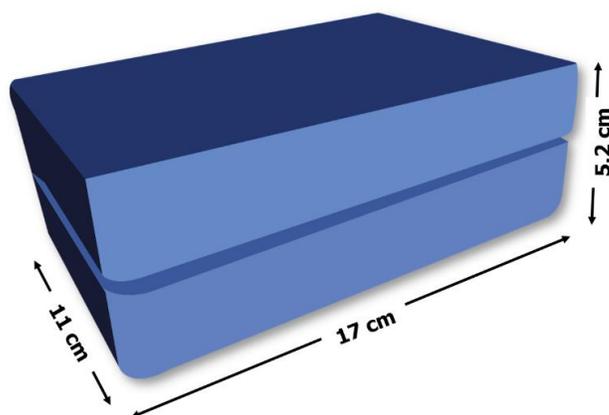


Figura 47 | Dispositivo construido de poliolefina utilizada para el resguardo térmico durante el almacenamiento y transporte de cristales de proteínas crecidos, los cuales viajan protegidos de la temperatura ambiente a los sincrotrones. Los detalles del diseño se describen en las figuras.

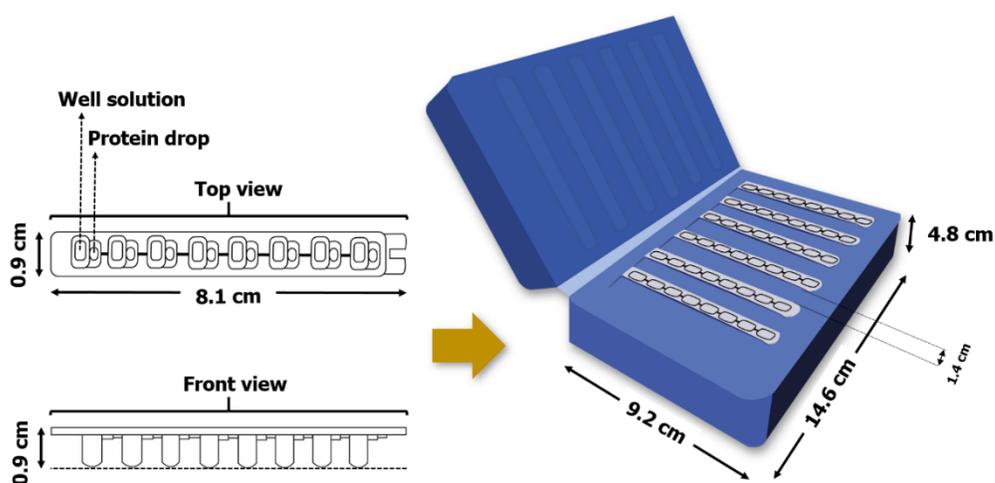


Figura 48 | Dispositivo construido de poliolefina utilizada para el resguardo térmico. Se muestra el diseño para el transporte de artefactos del instrumento TG40, donde se llevó a cabo el crecimiento de cristales de proteínas.

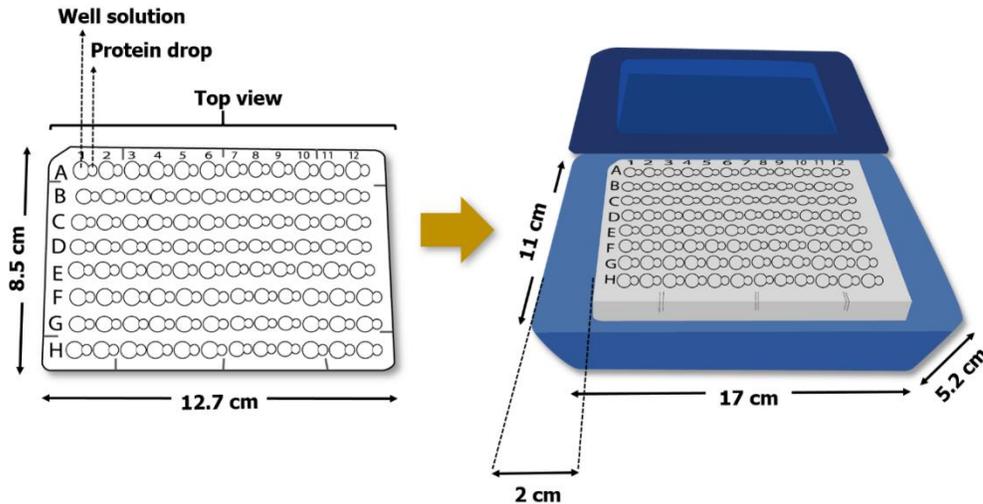


Figura 49 | Dispositivo construido de poliolefina utilizada para el resguardo térmico. Se muestra el diseño para el transporte de una placa para el uso de crecimiento cristalino en gota sedente de 96 pozos, donde se llevó a cabo el crecimiento de cristales de proteínas.

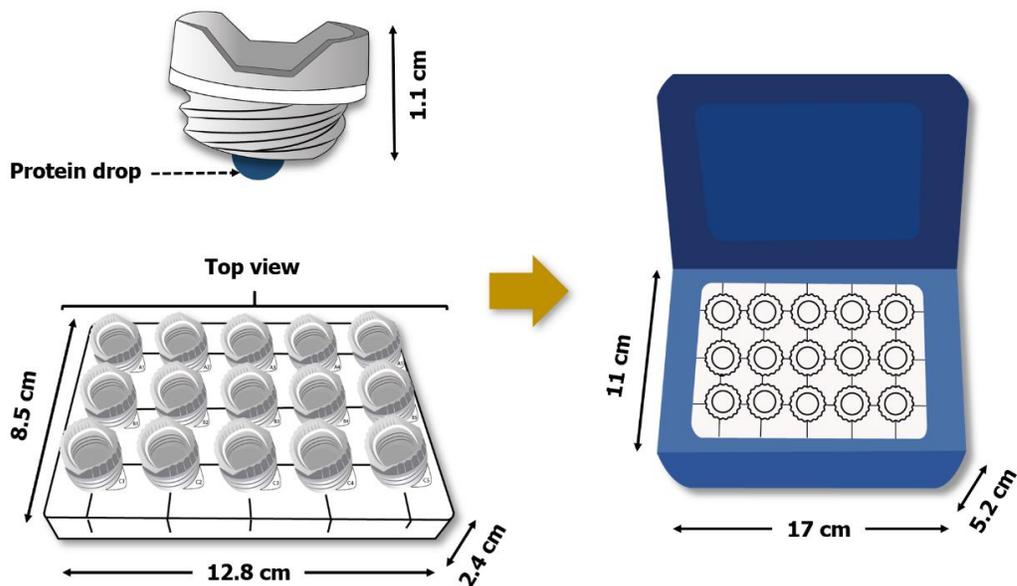
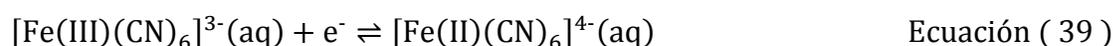


Figura 50 | Dispositivo construido de poliolefina utilizada para el resguardo térmico. Se muestra el diseño para el transporte de una placa de crecimiento cristalino para gota colgante de 15 pozos, donde se llevó a cabo el crecimiento de cristales de proteínas.

3.3. EVALUACIÓN ELECTROQUÍMICA DE LA MODIFICACIÓN DE LA SUPERFICIE DE UN ELECTRODO DE CARBÓN VÍTREO CON NANOPARTÍCULAS DE ORO E INMOVILIZACIÓN DE BIOMACROMOLÉCULAS

3.3.1. EQUILIBRIO PROPUESTO PARA EL SISTEMA

Para el pico anódico de los voltamperogramas del sistema $[Fe(III)(CN)_6]^{3-/4-}$ se enuncia la siguiente reacción:



Para verificar que el equilibrio sea el correcto a continuación se calcula teóricamente el valor de potencial a partir de la ecuación de Nernst y la energía libre de Gibbs:

$$\Delta G_r^0 = \sum \Delta G_{\text{productos}} - \sum \Delta G_{\text{reactivos}} \quad \text{Ecuación (40)}$$

$$\Delta G_r^0 = [Fe(II)(CN)_6]^{4-}(aq) - [Fe(III)(CN)_6]^{3-}(aq) \quad \text{Ecuación (40)}$$

$$\Delta G_r^0 = 695,020.976 \frac{J}{mol} - 729,585 \frac{J}{mol} \quad \text{Ecuación (41)}$$

$$\Delta G_r^0 = -34,564.024 \frac{J}{mol} \quad \text{Ecuación (42)}$$

$$E^0 = \frac{\Delta G_F^0}{-nF} \quad \text{Ecuación (41)}$$

$$E^0 = \frac{-34,564.024 \frac{J}{mol}}{-\left(1 \frac{mole^-}{mol[Fe(II)(CN)_6]^{4-}(aq)}\right) \left(96,485 \frac{C}{mole^-}\right)} = 0.3582 \frac{J}{C} = -0.3582 V \quad \text{Ecuación (43)}$$

$$E' = E^0 - \frac{RT}{nF} \ln Q \quad \text{Ecuación (42)}$$

$$E' = 0.3582 V - \frac{0.059}{1} \log \left(\frac{[Fe(III)(CN)_6]^{3-}}{[Fe(II)(CN)_6]^{4-}} \right) \quad \text{Ecuación (44)}$$

$$E' = 0.3582 V - \frac{0.059}{1} \log(1) \quad \text{Ecuación (45)}$$

$$E' = 0.3582 V \quad \text{Ecuación (46)}$$

3.3.2. CRONOAMPEROGRAMAS DE LA MODIFICACIÓN CON NANOPARTÍCULAS DE ORO DE LA SUPERFICIE ELECTROACTIVA DEL ELECTRODO DE CARBÓN VÍTREO.

De acuerdo con las mediciones de la fuerza superficial, la adsorción de iones AuCl_4^- no puede generar una repulsión electrostática lo suficientemente alta entre los elementos de oro recién formados, dando lugar a la aglomeración de nanopartículas de oro a un tiempo de reacción prematuro. Por el contrario, una fuerte repulsión electrostática aparecerá cuando los cuerpos nanoparticulados recién formados estén revestidos predominantemente por citrato, lo que dará como resultado la peptización de los agregados de nanopartículas en elementos esferoides de oro finales (Xia, Xiahou, Zhang, Ding, & Wang, 2016), (Turkevich, Stevenson, & Hillier, 1951).

Aunque en el caso anterior hablamos de un proceso de nucleación en solución a través del mismo precursor, la respuesta del electrodo en la cronoamperometría (**Figura 48, 49 y 50**) en una solución no agitada 1.0×10^{-3} M de ácido tetracloroáurico (III) trihidrato presenta 3 regiones: una primera región (región A) que corresponde al aumento abrupto de la corriente atribuida a procesos como la oxidación de los electrodos metálicos, debido al medio acuoso y a la oxidación del precursor. Un segundo proceso (región B) donde tiene lugar el fenómeno de nucleación de lo (adherencia de las nanopartículas de oro sobre el electrodo de carbón vítreo) y finalmente un tercer proceso debido al crecimiento gradual de la película de nanopartículas de oro (región C).

En las cronoamperogramas el flujo de corriente pasa a través del electrodo indicador el cual es medido como una función del tiempo, durante el proceso, en el electrodo negativo, los iones de Au(III) se reducen a Au(0) , insoluble, dando como resultado el depósito de este último sobre la superficie electroactiva del electrodo de carbón vítreo.

El electrodo de trabajo, se introduce en la disolución y se somete a un potencial inicial E_1 , correspondiente al potencial de doble capa eléctrica formada entre el electrodo y la disolución (Amat Martínez & Cabanillas Pérez, 2003). Cuando se produce el salto de potencial, la doble capa eléctrica tiene que ajustarse al nuevo potencial E_2 , de manera que, al recogerse la variación de la densidad de corriente con el tiempo, se obtiene un gran pico inicial. Seguidamente, al irse oxidando la especie, su concentración disminuye, y la densidad de corriente va disminuyendo hasta estabilizarse. Esta variación, para un electrodo plano, está expresada por la ecuación de Cottrell (Amat Martínez & Cabanillas Pérez, 2003).

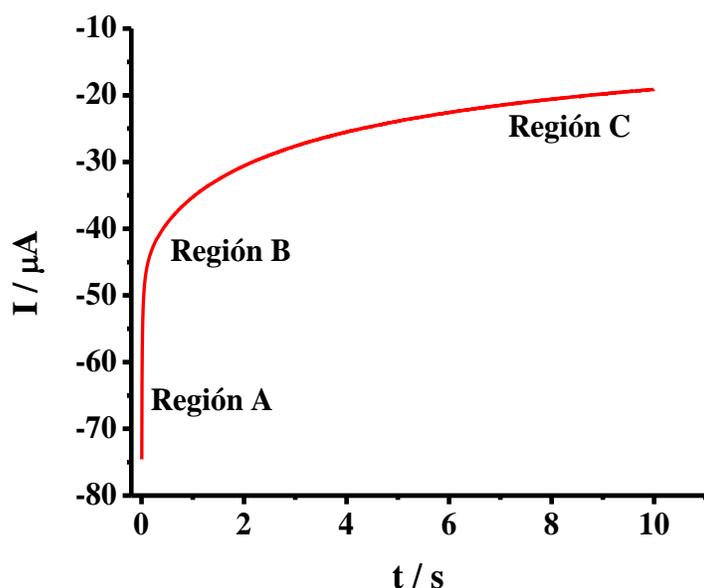


Figura 51| Cronoamperograma de la modificación con nanopartículas de oro de la superficie electroactiva del electrodo de carbón vítreo sumergido en una solución que contenía 1.0×10^{-3} M de ácido tetracloroáurico (III) trihidrato, 0.01 M de Na_2SO_4 y 0.01 M de H_2SO_4 y suministrado a un potencial en un paso al electrodo de -0.2 V durante 10 s.

Finalmente, el análisis de las micrografías adquiridas de las superficies modificadas con nanopartículas de oro fueron expresadas en nm con el programa de libre acceso ImageJ, el cual es una herramienta para el procesamiento de imágenes Java de dominio público inspirado en NIH Image para Macintosh. En microscopía electrónica de barrido (MEB), los cuerpos o depósitos de oro se observan como elementos de contraste claro.

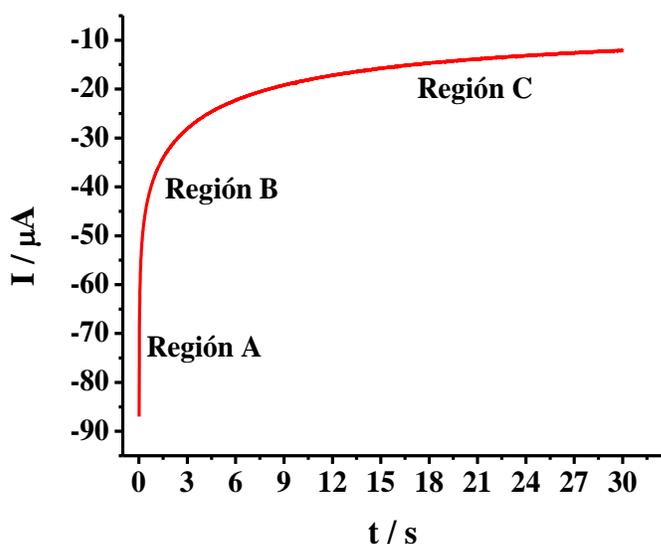


Figura 52| Cronoamperograma de la modificación con nanopartículas de oro de la superficie electroactiva del electrodo de carbón vítreo sumergido en una solución que contenía 1.0×10^{-3} M de ácido tetracloroáurico (III) trihidrato, 0.01 M de Na_2SO_4 y 0.01 M de H_2SO_4 y suministrado a un potencial en un paso al electrodo de -0.2 V durante 30 s.

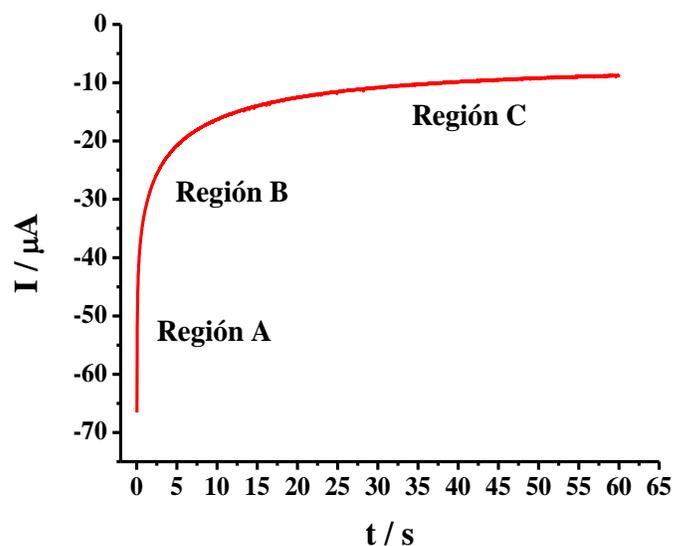


Figura 53| Cronoamperograma de la modificación con nanopartículas de oro de la superficie electroactiva del electrodo de carbón vítreo sumergido en una solución que contenía 1.0×10^{-3} M de ácido tetracloroáurico (III) trihidrato, 0.01 M de Na_2SO_4 y 0.01 M de H_2SO_4 y suministrado a un potencial en un paso al electrodo de -0.2 V durante 60 s.

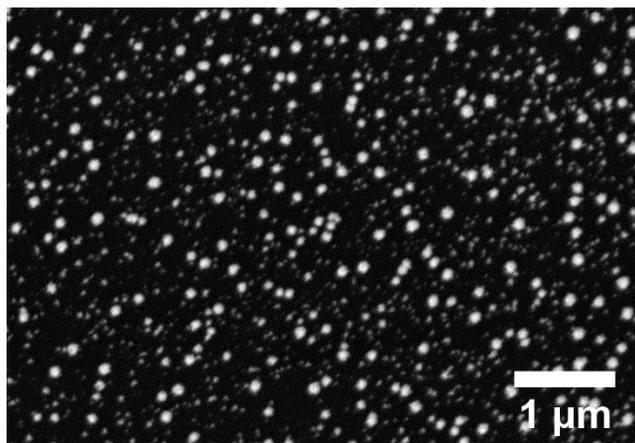
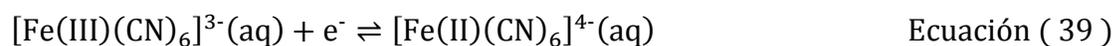


Figura 54| Imágenes MEB de nanopartículas de oro sobre carbón vítreo a 60 s de cronoamperometría. El potencial de depósito fue de -200 mV (vs. Ag/AgCl); aumento de 20,000, y un poder operativo de 10 kV.

3.3.3. VOLTAMPEROGRAMAS CÍCLICOS

El estudio en el comportamiento de un proceso redox en donde está implicada la transferencia de un electrón entre el electrodo de carbón vítreo y las especies químicas $[Fe(III)(CN)_6]^{3-}(aq)$ y $[Fe(II)(CN)_6]^{4-}(aq)$ en solución 1X PBS pH 7.4, ambas con la misma concentración 5 mM para que el proceso electroquímico sea independiente de la conversión de alguna de las especies anteriores, y tenemos que la velocidad de transferencia del electrón es rápida en comparación con la velocidad de transporte de masa, es decir reiterando un proceso redox reversible, tenemos:



En el voltamperograma logrado, observamos que la reacción $[Fe(III)(CN)_6]^{3-}(aq) + e^- \rightleftharpoons [Fe(II)(CN)_6]^{4-}(aq)$ exhibe una reacción reversible, donde la velocidad de

transferencia del electrón es, en estos casos y potenciales, mayor que la velocidad de transporte de masa y el potencial de pico en la exploración de potencial, realizado en la voltamperometría cíclica, es independiente del tiempo de reducción aplicado en la cronoamperometría para la modificación de la superficie del electrodo con nanopartículas de oro (Scholz, 2010) .

La reacción que compensa en el contraelectrodo (auxiliar) no se conoce; sin embargo, es probable que los iones hidronio del agua se reduzcan a hidrógeno. En

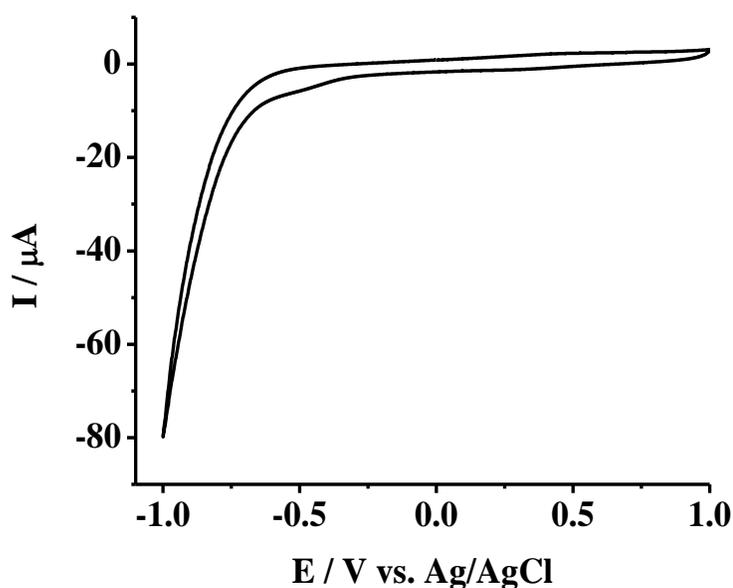


Figura 55| Voltamperograma del electrodo de carbón-vítreo, evaluado en 0.25 M de H₂SO₄ desde -1 V a 1 V con una velocidad de barrido 25 mV/s.

la siguiente exploración a potenciales negativos, los iones de hexacianoferrato (III) formados en el primer escaneo se reducen nuevamente a hexacianoferrato (II). Aquí la reacción de compensa en el electrodo auxiliar puede ser una oxidación del hidrógeno adsorbido o la oxidación de los iones de hexacianoferrato (II), que también están

presentes en el electrodo auxiliar (siempre que este electrodo esté, como normalmente, en la misma solución que el electrodo de trabajo) (Scholz, 2010).

Prácticamente no se permite que circule corriente a través del electrodo de referencia y su construcción es tal que su potencial es constante (potencial de equilibrio) en todas las condiciones, en particular, independientemente de la composición de la solución que se estudia. Ya que el potencial del electrodo de

trabajo siempre se refiere al del electrodo de referencia, se debe reconocer que la reacción electroquímica en el electrodo de referencia es la reacción teóricamente contrabalanceada para el proceso estudiado (Scholz, 2010). Esto significa que el voltamperograma cíclico que se muestra en la Figura 58 corresponde a la siguiente reacción de la celda, siempre que el electrodo de referencia sea un electrodo de Ag/AgCl:



El polietilenglicol es un poliéter disponible en el mercado que se utiliza en la investigación clínica. El PEG no es tóxico, no es inmunogénico y está aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los EE. UU. para diversos usos clínicos. En muchos casos, el PEG se ha usado como un "material sigiloso" porque es inerte para la mayoría de las moléculas biológicas, como las proteínas. Se han usado muchas formas de modificación de la superficie de PEG para hacer que la superficie sea resistente a proteínas y para mejorar la biocompatibilidad de la superficie. En presencia de células, el PEG es pasivo para los constituyentes del entorno celular porque previene la adsorción de proteínas (Chandrashekar, y otros, 2010).

Una pronta pauta para identificar la reversibilidad de un sistema estriba en efectuar el cociente de las señales de corriente anódica y catódica para diversas concentraciones o diversas velocidades de barrido. Debe cumplirse que $\frac{i_{pa}}{i_{pc}} = 1$ para una electroreducción y $\frac{i_{pc}}{i_{pa}} = 1$ para una electrooxidación, donde la corriente debida a la especie que se genera al electrodo se coloca en el numerador (Baeza Reyes & García Mendoza, 2011). El cociente de las intensidades de corriente obtenidas en los voltamperogramas fue para el ECV, 1.07 ± 0.03 , para el ECV modificado con nanopartículas de oro mediante cronoamperometría a 10, 30 y 60 s, donde los iones

de Au(III) se reducen a Au(0), fue de 1.34 ± 0.05 , 1.13 ± 0.04 , 1.09 ± 0.03 , respectivamente. En el caso de ECV modificado con nanopartículas de oro mediante cronoamperometría a 60 s y revestido con 11-MUA el valor de los cocientes a diferentes velocidades de barrido fue de 1.17 ± 0.11 , y para el ligante O-(3-Carboxipropil)-O'-[2-(3-mercaptopropionilamino)-etil]-polietilenglicol 3000 es de 1.05 ± 10 , lo que sugiere en ambos casos que a pesar de que hay una reversibilidad el cociente tiende a alejarse del valor de 1, como demuestra en los casos anteriores donde hay ausencia de ligante. No podemos determinar si toda la superficie del ECV ha sido cubierta por las nanopartículas de oro, y aunque las micrografías de SEM demuestran ausencia de nanopartículas de oro o de aglomerados de oro en algunas zonas del electrodo e inclusive si toda la superficie de nanopartículas de oro han sido revestidas con el ligante. Sin embargo, las concentraciones de ligante en ambos casos es considerable para lograr recubrir toda la superficie capaz de generar enlaces covalentes coordinados entre la terminación tiol de los ligantes y el área del electrodo modificada con nanopartículas de oro.

En los voltamperogramas es fácil identificar el aumento de intensidades de corriente de los picos anódico y catódico al ser modificada su superficie con nanopartículas de oro, y el análisis nos da un parámetro cuantitativo que fundamentan esta aseveración. Destacamos que en los picos de intensidad de corriente disminuyen cuando el electrodo de carbón vítreo modificado con nanopartículas de oro ha sido incubado con 11-MUA y O-(3-Carboxipropil)-O'-[2-(3-mercaptopropionilamino)-etil]-polietilenglicol 3000, y asemejan a un voltamperograma del ECV, es decir, suponemos que el área electroactiva de oro que pudiera estar expuesta al electrolito se ve inhibida por el revestimiento de los ligantes, obteniendo de esta manera una disminución del área electroactiva originalmente disponible.

El electrodo de oro fue expuesto a los ligantes para su revestimiento y comparar las señales de intensidad de corriente con respecto al ECV modificado con nanopartículas de oro, observamos que la intensidad de corriente se ve inhibida por completo cuando es revestido con 11-MUA, pero una señal de intensidad de

corriente catódica incapaz de ser calculada pero está presente y creemos que es debido a que el PEG podría formar un complejo especial de iones con $K_3Fe(CN)_6$ a través de la interacción electrostática y podría ser adsorbido en la interfaz entre la superficie hidrofóbica y la solución acuosa (Chandrashekar, y otros, 2010), aun de este modo, es insuficiente adquirir un dato en las intensidades de corriente, a diferencia del electrodo de carbón vítreo modificado con nanopartículas de oro y revestido con los ligantes.

Finalmente, para lograr obtener intensidades de corriente nos auxiliamos del programa computacional Origin 8, en el cual vaciamos todos los datos exportados de los voltamperogramas realizados, esto debido, a la incapacidad del software proporcionado por el proveedor del potenciostato.

Cuando los puntos se encuentran ubicados sobre el eje de las ordenadas o en una recta paralela a este eje, la distancia entre los puntos corresponde al valor absoluto de la diferencia de sus ordenadas.

Ahora, si los puntos se encuentran en cualquier lugar del sistema de coordenadas, la distancia queda determinada por la relación:

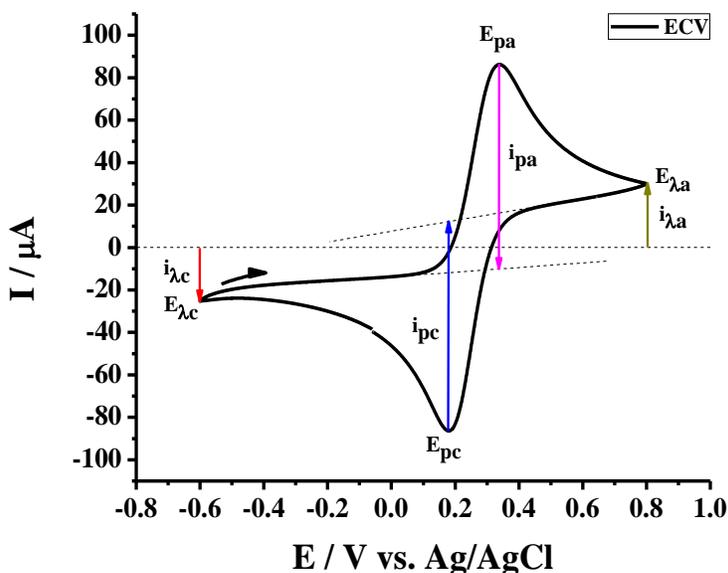


Figura 56 | Voltamperograma del electrodo de carbón-vítreo, evaluado en PBS (1 X, pH 7.4) contiene 5.0 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ y 0.1 M de KCl desde -0.6 V a 0.8 V con una velocidad de barrido 25 mV/s (2° ciclo, segmentos 3-4).

$$d = \sqrt{(x_2 - x_1)^2 + (y_2 - y_1)^2}$$

Ecuación (48)

$$i_{pa} = \sqrt{(0.3381 V - 0.3381 V)^2 + (86.9844 \mu A - (-10.3331 \mu A))^2}$$

$$i_{pa} = \sqrt{9,470.7117 \mu A^2}$$

$$i_{pa} = \mathbf{97.3175 \mu A}$$

$$E_{pa} = \mathbf{0.3381 V}$$

$$i_{pc} = \sqrt{(0.1795 V - 0.1795 V)^2 + (12.3757 \mu A - (-86.6302 \mu A))^2}$$

$$i_{pc} = \sqrt{9,802.1895 \mu A^2}$$

$$i_{pc} = \mathbf{99.006 \mu A}$$

$$E_{pc} = \mathbf{0.1795 V}$$

$$E^{0'} = \frac{E_{pa} + E_{pc}}{2} = \frac{0.3381 V + 0.1795 V}{2} = \mathbf{0.2588 V}$$

$$\frac{i_{pc}}{i_{pa}} = \frac{99.006 \mu A}{97.3175 \mu A} = \mathbf{1.0173}$$

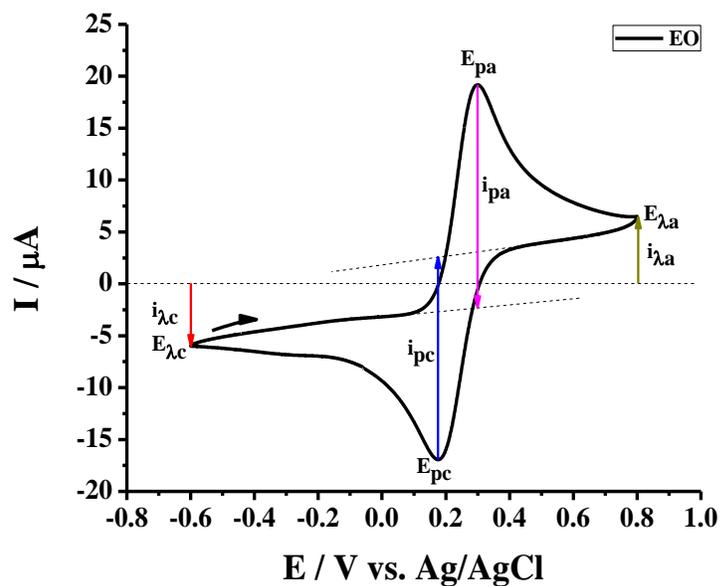


Figura 57 | Voltamperograma del electrodo de oro, evaluado en PBS (1X, pH 7.4) contiene 5.0 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ y 0.1 M de KCl desde -0.6 V a 0.8 V con una velocidad de barrido 25 mV/s (2° ciclo, segmentos 3-4).

$$i_{pa} = \sqrt{(0.2997 \text{ V} - 0.2997 \text{ V})^2 + (-2.2876 \mu\text{A} - 19.1491 \mu\text{A})^2}$$

$$i_{pa} = \sqrt{459.5349 \mu\text{A}^2}$$

$$i_{pa} = 21.4367 \mu\text{A}$$

$$E_{pa} = 0.2997 \text{ V}$$

$$i_{pc} = \sqrt{(0.1761 \text{ V} - 0.1761 \text{ V})^2 + (2.5676 \mu\text{A} - (-17 \mu\text{A}))^2}$$

$$i_{pc} = \sqrt{382.9232 \mu\text{A}^2}$$

$$i_{pc} = 19.5684 \mu\text{A}$$

$$E_{pc} = 0.1761 \text{ V}$$

$$E^{0'} = \frac{E_{pa} + E_{pc}}{2} = \frac{0.2997 \text{ V} + 0.1761 \text{ V}}{2} = 0.2379 \text{ V}$$

$$\frac{i_{pc}}{i_{pa}} = \frac{19.56842388 \mu\text{A}}{21.43676593 \mu\text{A}} = 0.9128$$

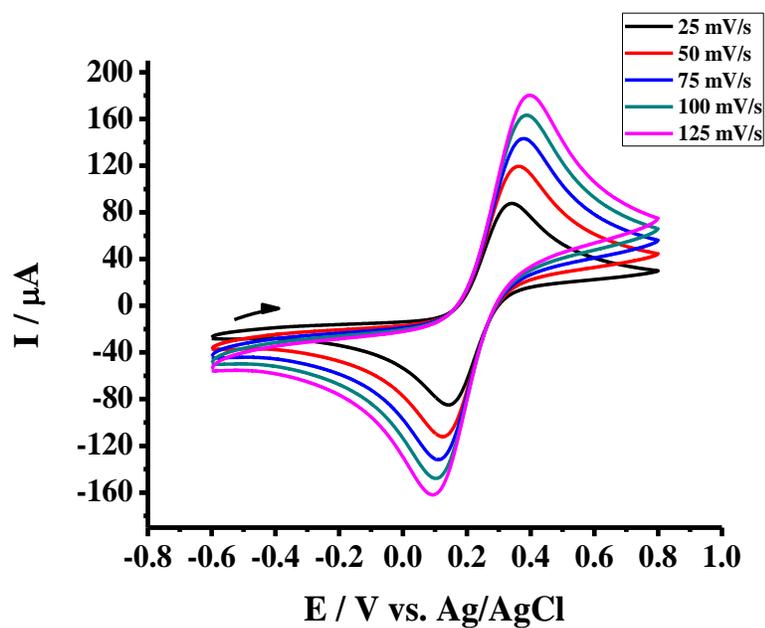


Figura 58 | Voltamperograma del electrodo de carbón-vítreo evaluado en PBS (1X, pH 7.4) contiene 5.0 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ y 0.1 M de KCl desde -0.6 V a 0.8 V con una velocidad de barrido 25, 50, 75, 100, 125 mV/s (2° ciclo, segmentos 3-4).

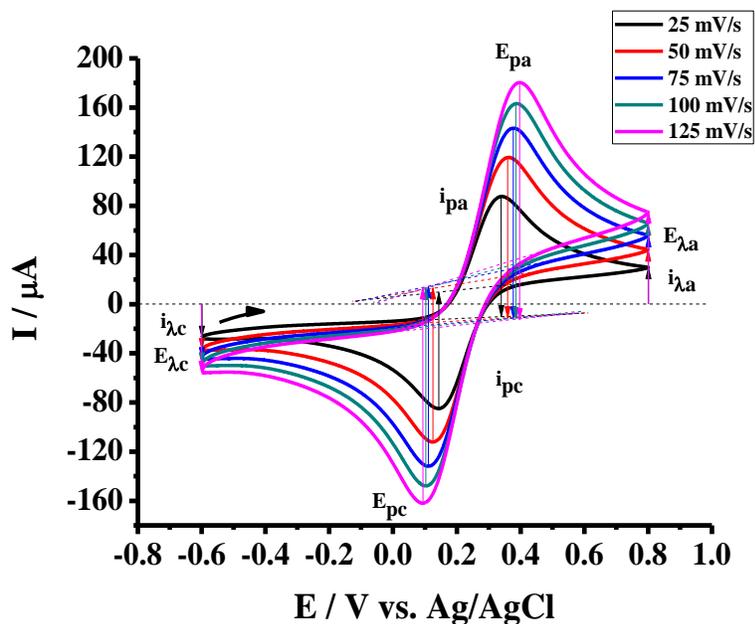


Figura 59 | Análisis de un voltamperograma del electrodo de carbón-vítreo evaluado en PBS (1X, pH 7.4) contiene 5.0 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ y 0.1 M de KCl desde -0.6 V a 0.8 V con una velocidad de barrido 25, 50, 75, 100, 125 mV/s (2° ciclo, segmentos 3-4).

Velocidad de barrido 25 mV/s

$$i_{pa} = \sqrt{(0.3393 \text{ V} - 0.3393 \text{ V})^2 + (-10.2922 \mu\text{A} - 87.7956 \mu\text{A})^2}$$

$$i_{pa} = \sqrt{9,621.2467 \mu\text{A}^2}$$

$$i_{pa} = 98.0879 \mu\text{A}$$

$$E_{pa} = 0.3393 \text{ V}$$

$$i_{pc} = \sqrt{(0.1437 \text{ V} - 0.1437 \text{ V})^2 + (9.5329 \mu\text{A} - (-84.7145 \mu\text{A}))^2}$$

$$i_{pc} = \sqrt{8,882.5862 \mu\text{A}^2}$$

$$i_{pc} = 94.2474 \mu\text{A}$$

$$E_{pc} = 0.1437 V$$

$$E^{0'} = \frac{E_{pa} + E_{pc}}{2} = \frac{0.3393 V + 0.1437 V}{2} = 0.2415 V$$

$$\left| \frac{i_{pa}}{i_{pc}} \right| = \frac{98.0879541 \mu A}{94.2474734 \mu A} = 1.0407$$

Velocidad de barrido 50 mV/s

$$i_{pa} = \sqrt{(0.3601 V - 0.3601 V)^2 + (-11.4340 \mu A - 119.5574 \mu A)^2}$$

$$i_{pa} = \sqrt{17,157.7815 \mu A^2}$$

$$i_{pa} = 130.9915 \mu A$$

$$E_{pa} = 0.3601 V$$

$$i_{pc} = \sqrt{(0.1253 V - 0.1253 V)^2 + (12.9582 - (-112.0131 \mu A))^2}$$

$$i_{pc} = \sqrt{15,617.8306 \mu A^2}$$

$$i_{pc} = 124.9713 \mu A$$

$$E_{pc} = 0.1253 V$$

$$E^{0'} = \frac{E_{pa} + E_{pc}}{2} = \frac{0.3601 V + 0.1253 V}{2} = 0.2427 V$$

$$\left| \frac{i_{pa}}{i_{pc}} \right| = \frac{130.9915 \mu A}{124.9713 \mu A} = 1.0481$$

Velocidad de barrido 75 mV/s

$$i_{pa} = \sqrt{(0.3769 V - 0.3769 V)^2 + (-11.6416 \mu A - 143.2231 \mu A)^2}$$

$$i_{pa} = \sqrt{23,983.1034 \mu A^2}$$

$$i_{pa} = 154.8647 \mu A$$

$$E_{pa} = 0.3769 V$$

$$i_{pc} = \sqrt{(0.1105 V - 0.1105 V)^2 + (14.4113 \mu A - (-131.942 \mu A))^2}$$

$$i_{pc} = \sqrt{24,419.3337 \mu A^2}$$

$$i_{pc} = 146.3534 \mu A$$

$$E_{pc} = 0.1105 V$$

$$E^{0'} = \frac{E_{pa} + E_{pc}}{2} = \frac{0.3769 V + 0.1105 V}{2} = 0.2437 V$$

$$\left| \frac{i_{pa}}{i_{pc}} \right| = \frac{154.8647 \mu A}{146.3534 \mu A} = 1.0581$$

Velocidad de barrido 100 mV/s

$$i_{pa} = \sqrt{(0.3849 V - 0.3849 V)^2 + (-11.1226 \mu A - 163.3597 \mu A)^2}$$

$$i_{pa} = \sqrt{30,444.1016 \mu A^2}$$

$$i_{pa} = 174.4823 \mu A$$

$$E_{pa} = 0.3849 V$$

$$i_{pc} = \sqrt{(0.1029 V - 0.1029 V)^2 + (13.1658 \mu A - (-147.9267 \mu A))^2}$$

$$i_{pc} = \sqrt{25,950.825 \mu A^2}$$

$$i_{pc} = 161.0925 \mu A$$

$$E_{pc} = 0.1029 V$$

$$E^{0'} = \frac{E_{pa} + E_{pc}}{2} = \frac{0.3849 V + 0.1029 V}{2} = 0.2439 V$$

$$\left| \frac{i_{pa}}{i_{pc}} \right| = \frac{174.4823 \mu A}{161.0925 \mu A} = 1.0831$$

Velocidad de barrido 125 mV/s

$$i_{pa} = \sqrt{(0.3969 V - 0.3969 V)^2 + (-11.953 \mu A - 180.4862 \mu A)^2}$$

$$i_{pa} = \sqrt{37,032.855 \mu A^2}$$

$$i_{pa} = 192.4392 \mu A$$

$$E_{pa} = 0.3969 V$$

$$i_{pc} = \sqrt{(0.0934 V - 0.0934 V)^2 + (12.6468 \mu A - (-161.8355 \mu A))^2}$$

$$i_{pc} = \sqrt{30,444.1015 \mu A^2}$$

$$i_{pc} = 174.4823 \mu A$$

$$E_{pc} = 0.0934 \text{ V}$$

$$E^{0'} = \frac{E_{pa} + E_{pc}}{2} = \frac{0.3969 \text{ V} + 0.0934 \text{ V}}{2} = 0.2451 \text{ V}$$

$$\left| \frac{i_{pa}}{i_{pc}} \right| = \frac{192.4392 \mu\text{A}}{174.4823 \mu\text{A}} = 1.1029$$

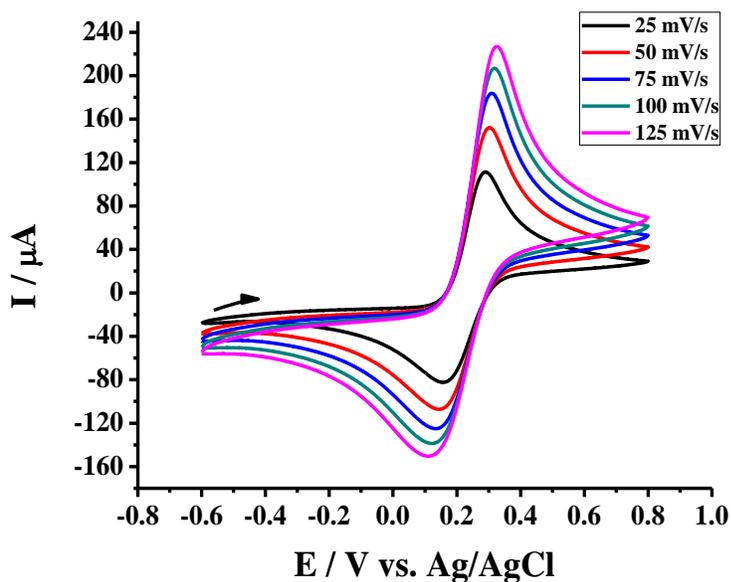


Figura 60 | Voltamperograma del electrodo de carbón-vítreo con depósito de nanopartículas de oro modificado mediante cronoamperometría durante 10s evaluado en PBS (1X, pH 7.4) contiene 5.0 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ y 0.1 M de KCl desde -0.6 V a 0.8 V con una velocidad de barrido 25, 50, 75, 100, 125 mV/s (2° ciclo, segmentos 3-4).

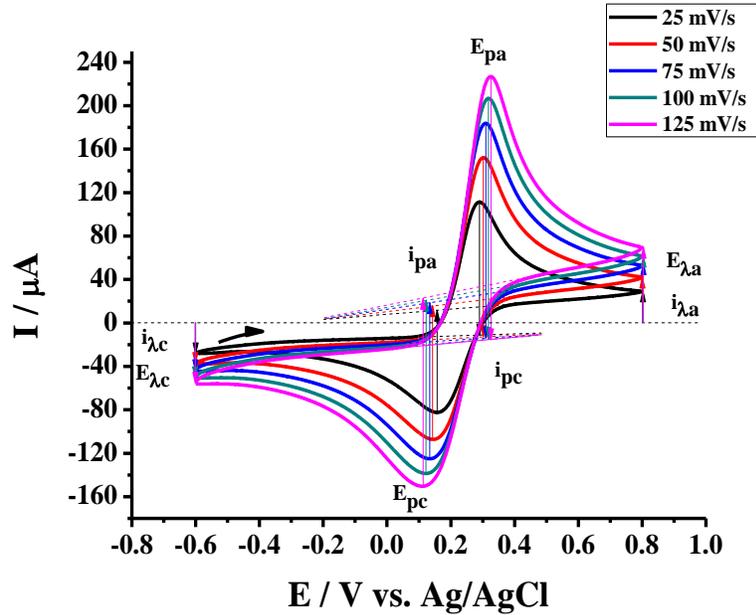


Figura 61| Análisis de un voltamperograma del electrodo de carbón-vítreo con depósito de nanopartículas de oro modificado mediante cronoamperometría durante 10s evaluado en PBS (1X, pH 7.4) contiene 5.0 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ y 0.1 M de KCl desde -0.6 V a 0.8 V con una velocidad de barrido 25, 50, 75, 100, 125 mV/s (2° ciclo, segmentos 3-4).

Velocidad de barrido 25 mV/s

$$i_{pa} = \sqrt{(0.2893 \text{ V} - 0.2893 \text{ V})^2 + (-11.4531 \mu\text{A} - 111.169 \mu\text{A})^2}$$

$$i_{pa} = \sqrt{15,036.2122 \mu\text{A}^2}$$

$$i_{pa} = 122.6222 \mu\text{A}$$

$$E_{pa} = 0.2893 \text{ V}$$

$$i_{pc} = \sqrt{(0.1573 \text{ V} - 0.1573 \text{ V})^2 + (11.9202 \mu\text{A} - (-82.8653 \mu\text{A}))^2}$$

$$i_{pc} = \sqrt{8,984.3057 \mu\text{A}^2}$$

$$i_{pc} = 94.7855 \mu\text{A}$$

$$E_{pc} = 0.1573 \text{ V}$$

Velocidad de barrido 50 mV/s

$$i_{pa} = \sqrt{(0.3017 V - 0.3017 V)^2 + (-12.98 \mu A - 151.8082 \mu A)^2}$$

$$i_{pa} = \sqrt{27,155.1868 \mu A^2}$$

$$i_{pa} = 164.7883 \mu A$$

$$E_{pa} = 0.3017 V$$

$$i_{pc} = \sqrt{(0.1433 V - 0.1433 V)^2 + (15.4438 \mu A - (-107.7656 \mu A))^2}$$

$$i_{pc} = \sqrt{15,180.5823 \mu A^2}$$

$$i_{pc} = 123.2095 \mu A$$

$$E_{pc} = 0.1433 V$$

Velocidad de barrido 75 mV/s

$$i_{pa} = \sqrt{(0.3089 V - 0.3089 V)^2 + (-13.8022 \mu A - 183.7558 \mu A)^2}$$

$$i_{pa} = \sqrt{39,029.1806 \mu A^2}$$

$$i_{pa} = 197.558 \mu A$$

$$E_{pa} = 0.3089 V$$

$$i_{pc} = \sqrt{(0.1341 V - 0.1341 V)^2 + (18.4976 \mu A - (-124.679 \mu A))^2}$$

$$i_{pc} = \sqrt{20,499.5752 \mu A^2}$$

$$i_{pc} = 143.1767 \mu A$$

$$E_{pc} = 0.1341 V$$

Velocidad de barrido 100 mV/s

$$i_{pa} = \sqrt{(0.3181 V - 0.3181 V)^2 + (-14.6244 \mu A - 206.8942 \mu A)^2}$$

$$i_{pa} = \sqrt{49,070.5391 \mu A^2}$$

$$i_{pa} = 221.5187 \mu A$$

$$E_{pa} = 0.3181 V$$

$$i_{pc} = \sqrt{(0.1213 V - 0.1213 V)^2 + (20.6118 \mu A - (-139.2433 \mu A))^2}$$

$$i_{pc} = \sqrt{25,553.6947 \mu A^2}$$

$$i_{pc} = 159.8552 \mu A$$

$$E_{pc} = 0.1213 V$$

Velocidad de barrido 125 mV/s

$$i_{pa} = \sqrt{(0.3261 V - 0.3261 V)^2 + (-14.9767 \mu A - 226.3916 \mu A)^2}$$

$$i_{pa} = \sqrt{59,258.7423 \mu A^2}$$

$$i_{pa} = 241.3684 \mu A$$

$$E_{pa} = 0.3261 V$$

$$i_{pc} = \sqrt{(0.1133 V - 0.1133 V)^2 + (23.3133 \mu A - (-150.4015 \mu A))^2}$$

$$i_{pc} = \sqrt{30,176.843 \mu A^2}$$

$$i_{pc} = 173.7148 \mu A$$

$$E_{pc} = 0.1133 V$$

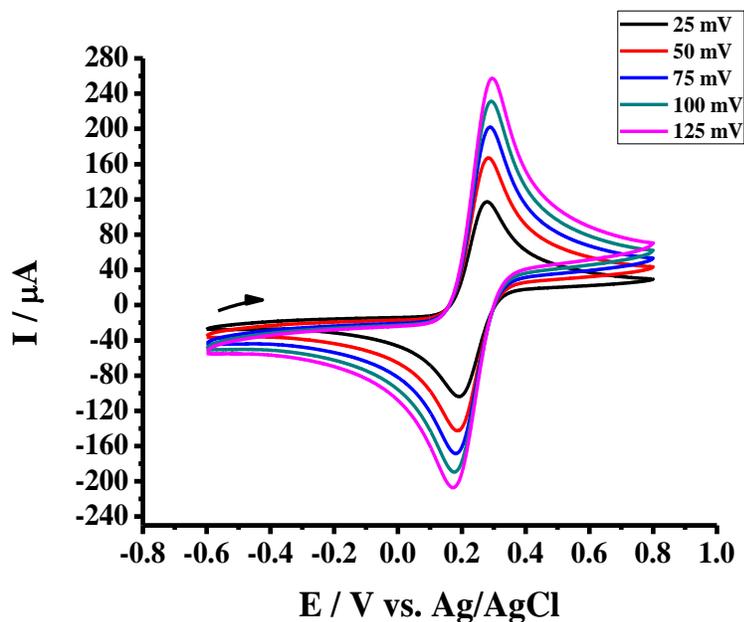


Figura 62 | Voltamperograma del electrodo de carbón-vítreo con depósito de nanopartículas de oro modificado mediante cronoamperometría durante 30s evaluado en PBS (1X, pH 7.4) contiene 5.0 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ y 0.1 M de KCl desde -0.6 V a 0.8 V con una velocidad de barrido 25, 50, 75, 100, 125 mV/s (2° ciclo, segmentos 3-4).

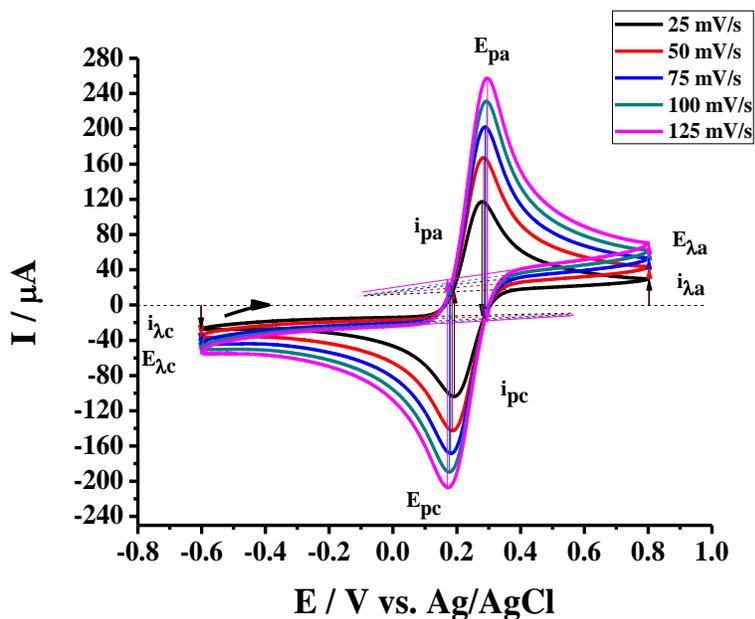


Figura 63 | Análisis de un voltamperograma del electrodo de carbón-vítreo con depósito de nanopartículas de oro modificado mediante cronoamperometría durante 30s evaluado en PBS (1X,

pH 7.4) contiene 5.0 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ y 0.1 M de KCl desde -0.6 V a 0.8 V con una velocidad de barrido 25, 50, 75, 100, 125 mV/s (2° ciclo, segmentos 3-4).

Velocidad de barrido 25 mV/s

$$i_{pa} = \sqrt{(0.2773 \text{ V} - 0.2773 \text{ V})^2 + (-11.4203 \mu\text{A} - 117.1346 \mu\text{A})^2}$$

$$i_{pa} = \sqrt{16,526.3982 \mu\text{A}^2}$$

$$i_{pa} = 128.555 \mu\text{A}$$

$$E_{pa} = 0.2773 \text{ V}$$

$$i_{pc} = \sqrt{(0.1921 \text{ V} - 0.1921 \text{ V})^2 + (14.9276 \mu\text{A} - (-103.4935 \mu\text{A}))^2}$$

$$i_{pc} = \sqrt{14,023.5797 \mu\text{A}^2}$$

$$i_{pc} = 118.4211 \mu\text{A}$$

$$E_{pc} = 0.1921 \text{ V}$$

Velocidad de barrido 50 mV/s

$$i_{pa} = \sqrt{(0.2853 \text{ V} - 0.2853 \text{ V})^2 + (-13.7366 \mu\text{A} - 166.6457 \mu\text{A})^2}$$

$$i_{pa} = \sqrt{32,537.8134 \mu\text{A}^2}$$

$$i_{pa} = 180.3824 \mu\text{A}$$

$$E_{pa} = 0.2853 \text{ V}$$

$$i_{pc} = \sqrt{(0.1857 \text{ V} - 0.1857 \text{ V})^2 + (19.4154 \mu\text{A} - (-143.0157 \mu\text{A}))^2}$$

$$i_{pc} = \sqrt{26,383.8396 \mu\text{A}^2}$$

$$i_{pc} = 162.431 \mu\text{A}$$

$$E_{pc} = 0.1857 \text{ V}$$

Velocidad de barrido 75 mV/s

$$i_{pa} = \sqrt{(0.2893 \text{ V} - 0.2893 \text{ V})^2 + (-15.6186 \mu\text{A} - 201.9694 \mu\text{A})^2}$$

$$i_{pa} = \sqrt{47,344.5770 \mu\text{A}^2}$$

$$i_{pa} = 217.5884 \mu\text{A}$$

$$E_{pa} = 0.2893 \text{ V}$$

$$i_{pc} = \sqrt{(0.1805 \text{ V} - 0.1805 \text{ V})^2 + (22.166 \mu\text{A} - (-168.6397 \mu\text{A}))^2}$$

$$i_{pc} = \sqrt{36,406.8498 \mu\text{A}^2}$$

$$i_{pc} = 190.8057 \mu\text{A}$$

$$E_{pc} = 0.1805 \text{ V}$$

Velocidad de barrido 100 mV/s

$$i_{pa} = \sqrt{(0.2933 \text{ V} - 0.2933 \text{ V})^2 + (-17.2111 \mu\text{A} - 231.2127 \mu\text{A})^2}$$

$$i_{pa} = \sqrt{61,714.4477 \mu\text{A}^2}$$

$$i_{pa} = 248.4239 \mu\text{A}$$

$$E_{pa} = 0.2933 \text{ V}$$

$$i_{pc} = \sqrt{(0.1765 \text{ V} - 0.1765 \text{ V})^2 + (25.2062 \mu\text{A} - (-189.3417 \mu\text{A}))^2}$$

$$i_{pc} = \sqrt{46,030.8176 \mu\text{A}^2}$$

$$i_{pc} = 214.5479 \mu\text{A}$$

$$E_{pc} = 0.1765 \text{ V}$$

Velocidad de barrido 125 mV/s

$$i_{pa} = \sqrt{(0.2957 \text{ V} - 0.2957 \text{ V})^2 + (-17.7902 \mu\text{A} - 257.416 \mu\text{A})^2}$$

$$i_{pa} = \sqrt{75,738.4681 \mu\text{A}^2}$$

$$i_{pa} = 275.2062 \mu\text{A}$$

$$E_{pa} = 0.2957 \text{ V}$$

$$i_{pc} = \sqrt{(0.1705 \text{ V} - 0.1705 \text{ V})^2 + (28.8254 \mu\text{A} - (-207.1483 \mu\text{A}))^2}$$

$$i_{pc} = \sqrt{55,683.6236 \mu\text{A}^2}$$

$$i_{pc} = 235.9737 \mu\text{A}$$

$$E_{pc} = 0.1705 \text{ V}$$

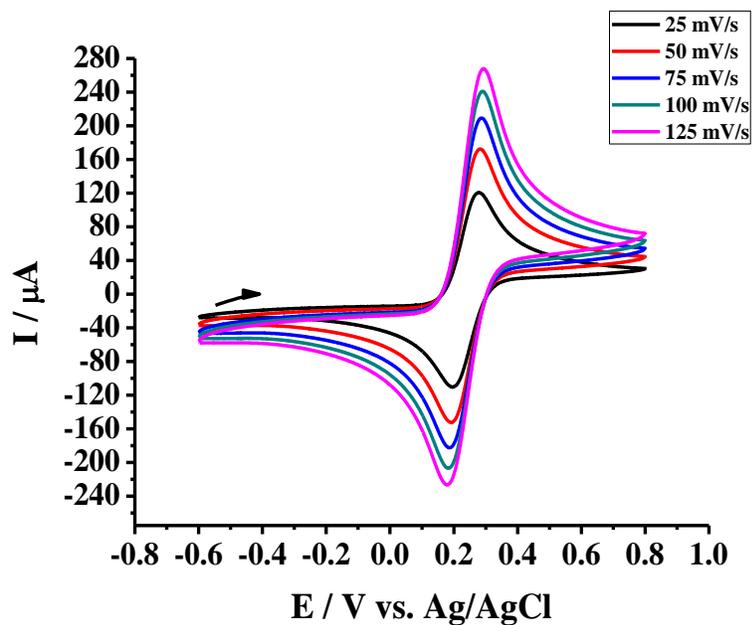


Figura 64 | Voltamperograma del electrodo de carbón-vítreo con depósito de nanopartículas de oro modificado mediante cronoamperometría durante 60s evaluado en PBS (1X, pH 7.4) contiene 5.0 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ y 0.1 M de KCl desde -0.6 V a 0.8 V con una velocidad de barrido 25, 50, 75, 100, 125 mV/s (2° ciclo, segmentos 3-4).

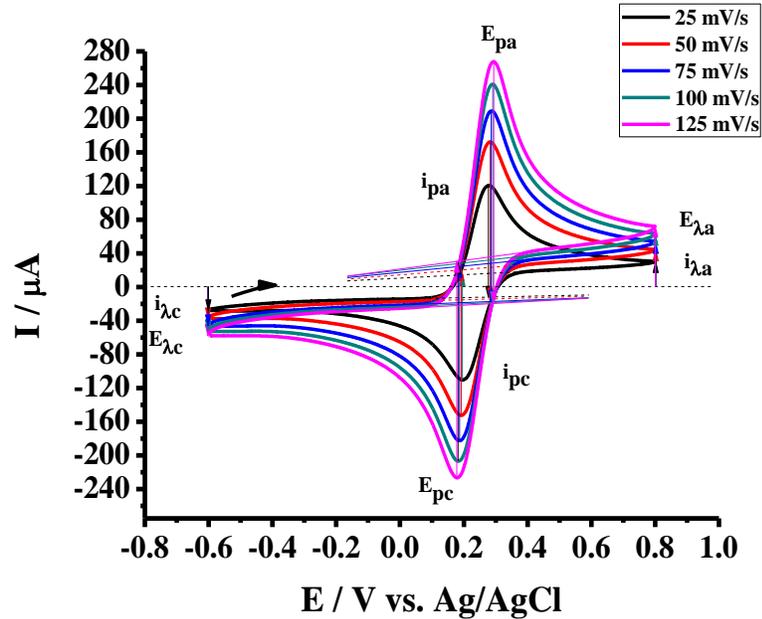


Figura 65 | Análisis de un voltamperograma del electrodo de carbón-vítreo con depósito de nanopartículas de oro modificado mediante cronoamperometría durante 60s evaluado en PBS (1X, pH 7.4) contiene 5.0 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ y 0.1 M de KCl desde -0.6 V a 0.8 V con una velocidad de barrido 25, 50, 75, 100, 125 mV/s (2° ciclo, segmentos 3-4).

Velocidad de barrido 25 mV/s

$$i_{pa} = \sqrt{(0.2773 \text{ V} - 0.2773 \text{ V})^2 + (-11.6744 \mu\text{A} - 120.6705 \mu\text{A})^2}$$

$$i_{pa} = \sqrt{17,515.1958 \mu\text{A}^2}$$

$$i_{pa} = 132.3449 \mu\text{A}$$

$$E_{pa} = 0.2773 \text{ V}$$

$$i_{pc} = \sqrt{(0.1957 \text{ V} - 0.1957 \text{ V})^2 + (14.7036 \mu\text{A} - (-110.0614 \mu\text{A}))^2}$$

$$i_{pc} = \sqrt{15,566.3281 \mu\text{A}^2}$$

$$i_{pc} = 124.765 \mu\text{A}$$

$$E_{pc} = 0.1957 \text{ V}$$

Velocidad de barrido 50 mV/s

$$i_{pa} = \sqrt{(0.2817 V - 0.2817 V)^2 + (-13.9483 \mu A - 172.517 \mu A)^2}$$

$$i_{pa} = \sqrt{34,769.3628 \mu A^2}$$

$$i_{pa} = 186.4654 \mu A$$

$$E_{pa} = 0.2817 V$$

$$i_{pc} = \sqrt{(0.1917 V - 0.1917 V)^2 + (20.7675 \mu A - (-152.5088 \mu A))^2}$$

$$i_{pc} = \sqrt{30,024.72 \mu A^2}$$

$$i_{pc} = 173.2764 \mu A$$

$$E_{pc} = 0.1917 V$$

Velocidad de barrido 75 mV/s

$$i_{pa} = \sqrt{(0.2865 V - 0.2865 V)^2 + (-17.1319 \mu A - 209.2037 \mu A)^2}$$

$$i_{pa} = \sqrt{51,227.8491 \mu A^2}$$

$$i_{pa} = 226.3357 \mu A$$

$$E_{pa} = 0.2865 V$$

$$i_{pc} = \sqrt{(0.1865 V - 0.1865 V)^2 + (24.709 \mu A - (-182.6768 \mu A))^2}$$

$$i_{pc} = \sqrt{43,008.9363 \mu A^2}$$

$$i_{pc} = 207.3859 \mu A$$

$$E_{pc} = 0.1865 V$$

Velocidad de barrido 100 mV/s

$$i_{pa} = \sqrt{(0.2909 V - 0.2909 V)^2 + (-18.6479 \mu A - 241.19 \mu A)^2}$$

$$i_{pa} = \sqrt{67,516.2235 \mu A^2}$$

$$i_{pa} = 259.8388 \mu A$$

$$E_{pa} = 0.2909 V$$

$$i_{pc} = \sqrt{(0.1821 V - 0.1821 V)^2 + (27.8926 \mu A - (-207.0841 \mu A))^2}$$

$$i_{pc} = \sqrt{55,214.0882 \mu A^2}$$

$$i_{pc} = 234.9767 \mu A$$

$$E_{pc} = 0.1821 V$$

Velocidad de barrido 125 mV/s

$$i_{pa} = \sqrt{(0.2933 V - 0.2933 V)^2 + (-19.5574 \mu A - 268.0237 \mu A)^2}$$

$$i_{pa} = \sqrt{82,702.9822 \mu A^2}$$

$$i_{pa} = 287.5812 \mu A$$

$$E_{pa} = 0.2933 V$$

$$i_{pc} = \sqrt{(0.1781 V - 0.1781 V)^2 + (30.4698 \mu A - (-226.9434 \mu A))^2}$$

$$i_{pc} = \sqrt{66,261.5941 \mu A^2}$$

$$i_{pc} = 257.4132 \mu A$$

$$E_{pc} = 0.1781 V$$

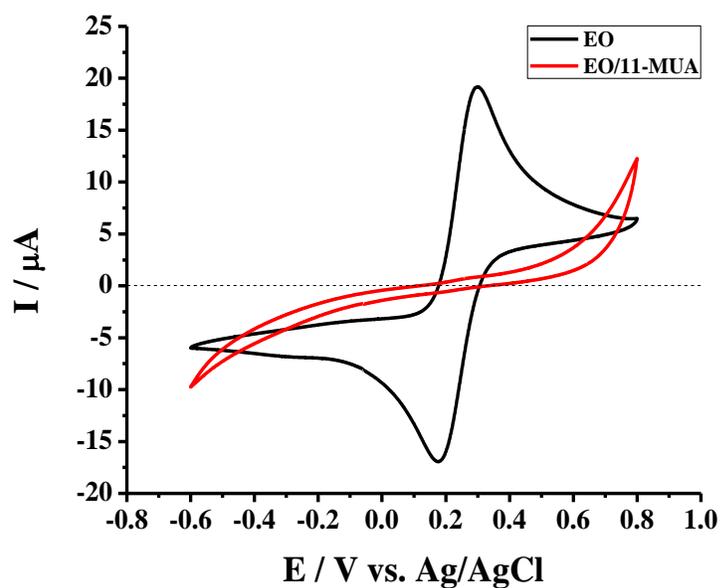


Figura 66 | Voltamperograma del electrodo de oro revestido con 11-MUA, evaluado en PBS (1X, pH 7.4) contiene 5.0 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ y 0.1 M de KCl desde -0.6 V a 0.8 V con una velocidad de barrido 25 mV/s (2° ciclo, segmentos 3-4).

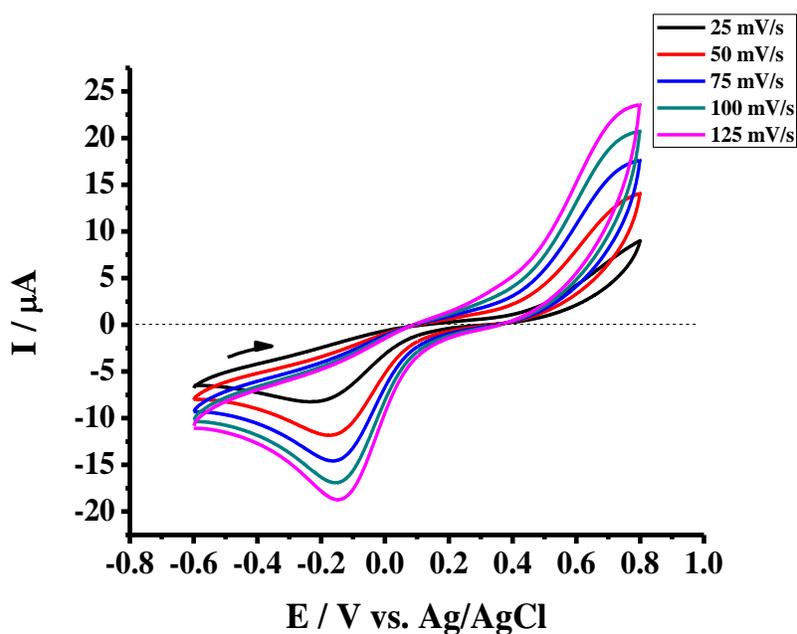


Figura 67 | Voltamperograma sobre un electrodo de oro revestido con O-(3-Carboxipropil)-O'-[2-(3-mercaptopropionilamino)-etil]-polietilenglicol 3000, evaluado en PBS (1X, pH 7.4) contiene 5.0

mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ y 0.1 M de KCl desde -0.6 V a 0.8 V con una velocidad de barrido 25 mV/s (2° ciclo, segmentos 3-4).

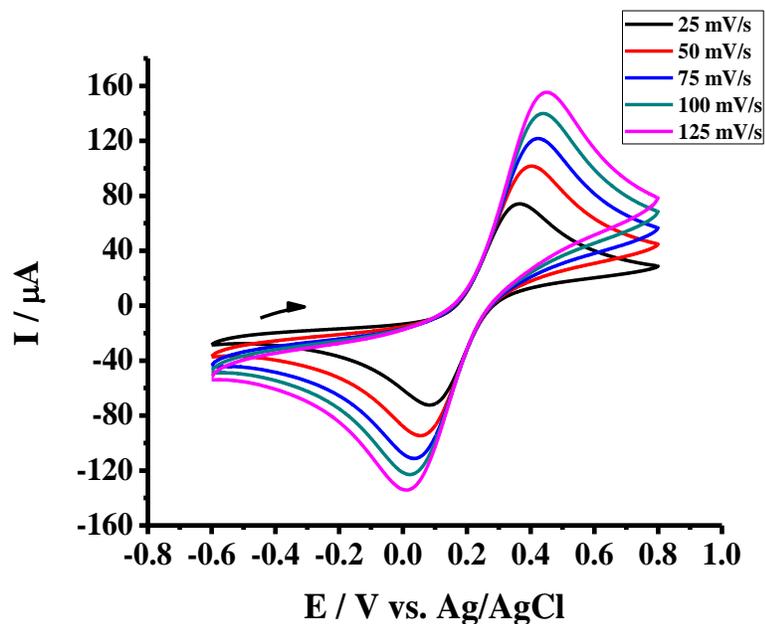


Figura 68 | Voltamperograma voltamperograma sobre un electrodo de carbón vítreo con depósito de nanopartículas de oro modificado mediante cronoamperometría durante 60s, y revestido con 11-MUA, evaluado en PBS (1X, pH 7.4) contiene 5.0 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ y 0.1 M de KCl desde -0.6 V a 0.8 V con una velocidad de barrido 25 mV/s (2° ciclo, segmentos 3-4).

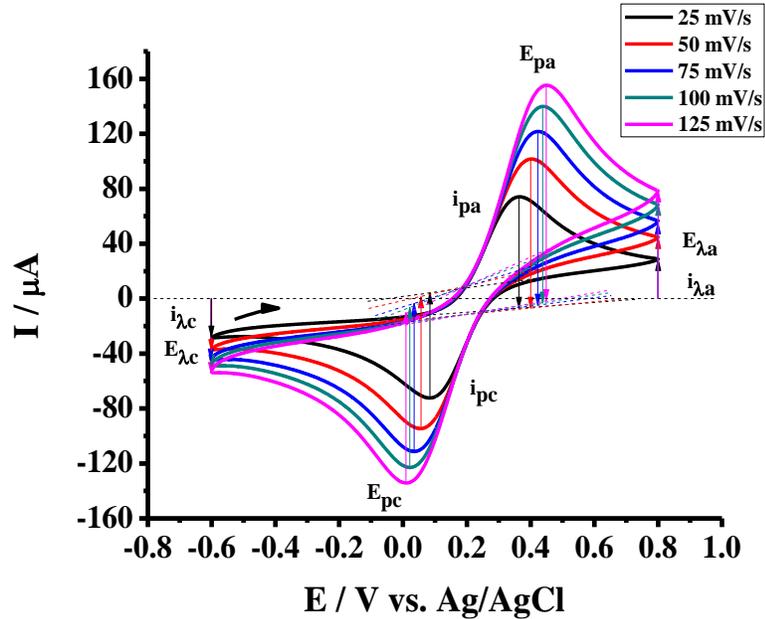


Figura 69 | Análisis de un voltamperograma sobre un electrodo de carbón vítreo con depósito de nanopartículas de oro modificado mediante cronoamperometría durante 60s, y revestido con 11-MUA, evaluado en PBS (1X, pH 7.4) contiene 5.0 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ y 0.1 M de KCl desde -0.6 V a 0.8 V con una velocidad de barrido 25 mV/s (2° ciclo, segmentos 3-4).

Velocidad de barrido 25 mV/s

$$i_{pa} = \sqrt{(0.3633 \text{ V} - 0.3633 \text{ V})^2 + (-7.2275 \mu\text{A} - 74.313 \mu\text{A})^2}$$

$$i_{pa} = \sqrt{6,648.8633 \mu\text{A}^2}$$

$$i_{pa} = 81.5405 \mu\text{A}$$

$$E_{pa} = 0.3633 \text{ V}$$

$$i_{pc} = \sqrt{(0.0846 \text{ V} - 0.0846 \text{ V})^2 + (4.3813 \mu\text{A} - (-72.3299 \mu\text{A}))^2}$$

$$i_{pc} = \sqrt{5,884.6206 \mu\text{A}^2}$$

$$i_{pc} = 76.7112 \mu A$$

$$E_{pc} = 0.0846 V$$

$$E^{0'} = \frac{E_{pa} + E_{pc}}{2} = \frac{0.3633 V + 0.0846 V}{2} = 0.2239 V$$

$$\left| \frac{i_{pa}}{i_{pc}} \right| = \frac{81.5405 \mu A}{76.7112 \mu A} = 1.0499$$

Velocidad de barrido 50 mV/s

$$i_{pa} = \sqrt{(0.4005 V - 0.4005 V)^2 + (-7.9704 \mu A - 101.7099 \mu A)^2}$$

$$i_{pa} = \sqrt{12,029.7934 \mu A^2}$$

$$i_{pa} = 109.6804 \mu A$$

$$E_{pa} = 0.4005 V$$

$$i_{pc} = \sqrt{(0.0562 V - 0.0562 V)^2 + (1.5951 - (-94.6189 \mu A))^2}$$

$$i_{pc} = \sqrt{9,257.1625 \mu A^2}$$

$$i_{pc} = 96.2141 \mu A$$

$$E_{pc} = 0.0562 V$$

$$E^{0'} = \frac{E_{pa} + E_{pc}}{2} = \frac{0.4005 V + 0.0562 V}{2} = 0.2283 V$$

$$\left| \frac{i_{pa}}{i_{pc}} \right| = \frac{109.6804 \mu A}{96.2141 \mu A} = 1.1399$$

Velocidad de barrido 75 mV/s

$$i_{pa} = \sqrt{(0.4225 V - 0.4225 V)^2 + (-4.9057 \mu A - 121.5842 \mu A)^2}$$

$$i_{pa} = \sqrt{15,999.7275 \mu A^2}$$

$$i_{pa} = 126.49 \mu A$$

$$E_{pa} = 0.4225 V$$

$$i_{pc} = \sqrt{(0.035 V - 0.035 V)^2 + (-3.5127 \mu A - (-111.4285 \mu A))^2}$$

$$i_{pc} = \sqrt{11,645.8349 \mu A^2}$$

$$i_{pc} = 107.9158 \mu A$$

$$E_{pc} = 0.035 V$$

$$E^{0'} = \frac{E_{pa} + E_{pc}}{2} = \frac{0.4225 V + 0.0350 V}{2} = 0.2287 V$$

$$\left| \frac{i_{pa}}{i_{pc}} \right| = \frac{126.49 \mu A}{107.9158 \mu A} = 1.1721$$

Velocidad de barrido 100 mV/s

$$i_{pa} = \sqrt{(0.4381 V - 0.4381 V)^2 + (-2.9554 \mu A - 139.8798 \mu A)^2}$$

$$i_{pa} = \sqrt{20,401.9202 \mu A^2}$$

$$i_{pa} = \mathbf{142.8352 \mu A}$$

$$E_{pa} = 0.4381 V$$

$$i_{pc} = \sqrt{(0.021 V - 0.021 V)^2 + (-6.4845 \mu A - (-122.8516 \mu A))^2}$$

$$i_{pc} = \sqrt{13,541.3049 \mu A^2}$$

$$i_{pc} = \mathbf{116.3671 \mu A}$$

$$E_{pc} = 0.021 V$$

$$E^{0'} = \frac{E_{pa} + E_{pc}}{2} = \frac{0.4381 V + 0.021 V}{2} = \mathbf{0.2295 V}$$

$$\left| \frac{i_{pa}}{i_{pc}} \right| = \frac{142.8352 \mu A}{116.3671 \mu A} = 1.2274$$

Velocidad de barrido 125 mV/s

$$i_{pa} = \sqrt{(0.4485 V - 0.4485 V)^2 + (-1.7481 \mu A - 155.3892 \mu A)^2}$$

$$i_{pa} = \sqrt{24,692.1606 \mu A^2}$$

$$i_{pa} = \mathbf{157.1373 \mu A}$$

$$E_{pa} = \mathbf{0.4485 V}$$

$$i_{pc} = \sqrt{(0.009 V - 0.009 V)^2 + (-10.8494 \mu A - (-134.089 \mu A))^2}$$

$$i_{pc} = \sqrt{15,187.9872 \mu A^2}$$

$$i_{pc} = 123.2395 \mu A$$

$$E_{pc} = 0.009 V$$

$$E^{0'} = \frac{E_{pa} + E_{pc}}{2} = \frac{0.4485 V + 0.009 V}{2} = 0.2287 V$$

$$\left| \frac{i_{pa}}{i_{pc}} \right| = \frac{157.1373 \mu A}{123.2395 \mu A} = 1.275$$

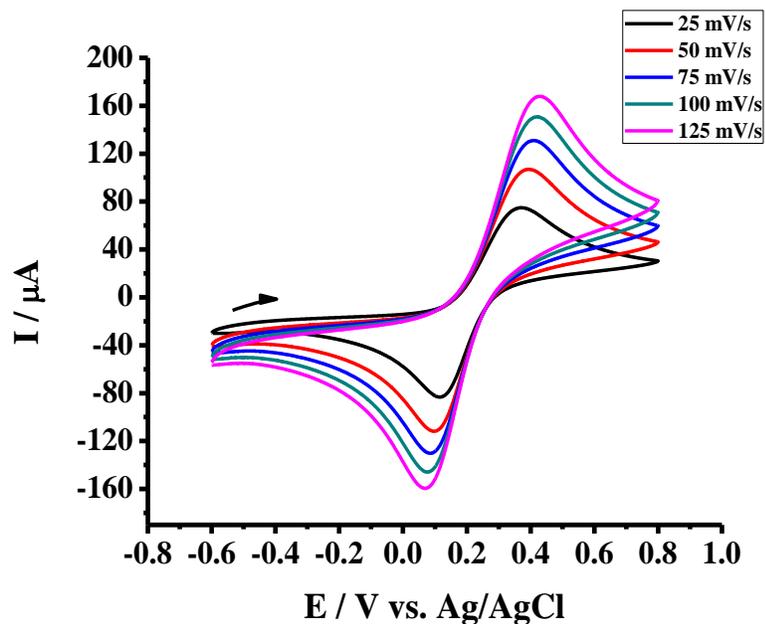


Figura 70 | Voltamperograma sobre un electrodo de carbón vítreo con depósito de nanopartículas de oro modificado mediante cronoamperometría durante 60s, y revestido con O-(3-Carboxipropil)-O'-[2-(3-mercaptopropionilamino)-etil]-polietilenglicol 3000, evaluado en PBS (1X, pH 7.4) contiene 5.0 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ y 0.1 M de KCl desde -0.6 V a 0.8 V con una velocidad de barrido 25, 50, 75, 100, 125 mV/s (2° ciclo, segmentos 3-4).

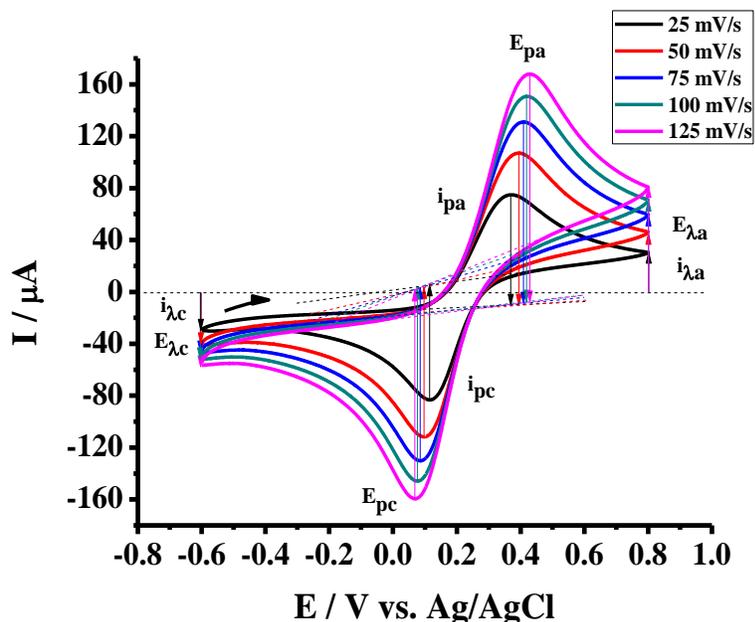


Figura 71 | Análisis de un voltamperograma sobre un electrodo de carbón vítreo con depósito de nanopartículas de oro modificado mediante cronoamperometría durante 60s, y revestido con O-(3-Carboxipropil)-O'-[2-(3-mercaptopropionilamino)-etil]-polietilenglicol 3000, evaluado en PBS (1X, pH 7.4) contiene 5.0 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ y 0.1 M de KCl desde -0.6 V a 0.8 V con una velocidad de barrido 25, 50, 75, 100, 125 mV/s (2° ciclo, segmentos 3-4).

Velocidad de barrido 25 mV/s

$$i_{pa} = \sqrt{(0.3689 \text{ V} - 0.3689 \text{ V})^2 + (-10.2758 \mu\text{A} - 74.9795 \mu\text{A})^2}$$

$$i_{pa} = \sqrt{7,268.4823 \mu\text{A}^2}$$

$$i_{pa} = 85.2553 \mu\text{A}$$

$$E_{pa} = 0.3689 \text{ V}$$

$$i_{pc} = \sqrt{(0.1145 \text{ V} - 0.1145 \text{ V})^2 + (5.1625 \mu\text{A} - (-83.3378 \mu\text{A}))^2}$$

$$i_{pc} = \sqrt{7,832.3225 \mu\text{A}^2}$$

$$i_{pc} = 88.5004 \mu\text{A}$$

$$E_{pc} = 0.1145 \text{ V}$$

$$E^{0'} = \frac{E_{pa} + E_{pc}}{2} = \frac{0.3689 \text{ V} + 0.1145 \text{ V}}{2} = \mathbf{0.2417 \text{ V}}$$

$$\left| \frac{i_{pa}}{i_{pc}} \right| = \frac{85.2553 \mu\text{A}}{88.5004 \mu\text{A}} = 0.9633$$

Velocidad de barrido 50 mV/s

$$i_{pa} = \sqrt{(0.3945 \text{ V} - 0.3945 \text{ V})^2 + (-10.2758 \mu\text{A} - 107.0363 \mu\text{A})^2}$$

$$i_{pa} = \sqrt{13,762.1545 \mu\text{A}^2}$$

$$i_{pa} = \mathbf{117.3122 \mu\text{A}}$$

$$E_{pa} = 0.3945 \text{ V}$$

$$i_{pc} = \sqrt{(0.097 \text{ V} - 0.097 \text{ V})^2 + (3.2941 - (-111.953 \mu\text{A}))^2}$$

$$i_{pc} = \sqrt{13,281.917 \mu\text{A}^2}$$

$$i_{pc} = \mathbf{115.2471 \mu\text{A}}$$

$$E_{pc} = 0.097 \text{ V}$$

$$E^{0'} = \frac{E_{pa} + E_{pc}}{2} = \frac{0.3945 \text{ V} + 0.097 \text{ V}}{2} = \mathbf{0.2457 \text{ V}}$$

$$\left| \frac{i_{pa}}{i_{pc}} \right| = \frac{117.3122 \mu A}{115.2471 \mu A} = 1.0179$$

Velocidad de barrido 75 mV/s

$$i_{pa} = \sqrt{(0.4089 V - 0.4089 V)^2 + (-8.9975 \mu A - 130.9314 \mu A)^2}$$

$$i_{pa} = \sqrt{19,580.1196 \mu A^2}$$

$$i_{pa} = 139.9289 \mu A$$

$$E_{pa} = 0.4089 V$$

$$i_{pc} = \sqrt{(0.0854 V - 0.0854 V)^2 + (3.0975 \mu A - (-130.1447 \mu A))^2}$$

$$i_{pc} = \sqrt{17,753.506 \mu A^2}$$

$$i_{pc} = 133.2422 \mu A$$

$$E_{pc} = 0.0854 V$$

$$E^{0'} = \frac{E_{pa} + E_{pc}}{2} = \frac{0.4089 V + 0.0854 V}{2} = 0.2471 V$$

$$\left| \frac{i_{pa}}{i_{pc}} \right| = \frac{139.9289 \mu A}{133.2422 \mu A} = 1.0501$$

Velocidad de barrido 100 mV/s

$$i_{pa} = \sqrt{(0.4185 V - 0.4185 V)^2 + (-7.5225 \mu A - 150.5981 \mu A)^2}$$

$$i_{pa} = \sqrt{25,002.1658 \mu A^2}$$

$$i_{pa} = \mathbf{158.1207 \mu A}$$

$$E_{pa} = 0.4185 V$$

$$i_{pc} = \sqrt{(0.0758 V - 0.0758 V)^2 + (2.8025 \mu A - (-145.8781 \mu A))^2}$$

$$i_{pc} = \sqrt{21,892.3651 \mu A^2}$$

$$i_{pc} = \mathbf{147.9606 \mu A}$$

$$E_{pc} = 0.0758 V$$

$$E^{0'} = \frac{E_{pa} + E_{pc}}{2} = \frac{0.4185 V + 0.0758 V}{2} = \mathbf{0.2471 V}$$

$$\left| \frac{i_{pa}}{i_{pc}} \right| = \frac{158.1207 \mu A}{147.9606 \mu A} = 1.0686$$

Velocidad de barrido 125 mV/s

$$i_{pa} = \sqrt{(0.4281 V - 0.4281 V)^2 + (-7.6208 \mu A - 167.9049 \mu A)^2}$$

$$i_{pa} = \sqrt{30,809.3109 \mu A^2}$$

$$i_{pa} = \mathbf{175.5258 \mu A}$$

$$E_{pa} = 0.4281 V$$

$$i_{pc} = \sqrt{(0.0686 V - 0.0686 V)^2 + (1.8191 \mu A - (-159.4482 \mu A))^2}$$

$$i_{pc} = \sqrt{23,490.8999 \mu A^2}$$

$$i_{pc} = 153.2674 \mu A$$

$$E_{pc} = 0.0686 V$$

$$E^{0'} = \frac{E_{pa} + E_{pc}}{2} = \frac{0.4281 V + 0.0686 V}{2} = 0.2483 V$$

$$\left| \frac{i_{pa}}{i_{pc}} \right| = \frac{175.5258 \mu A}{153.2674 \mu A} = 1.1452$$

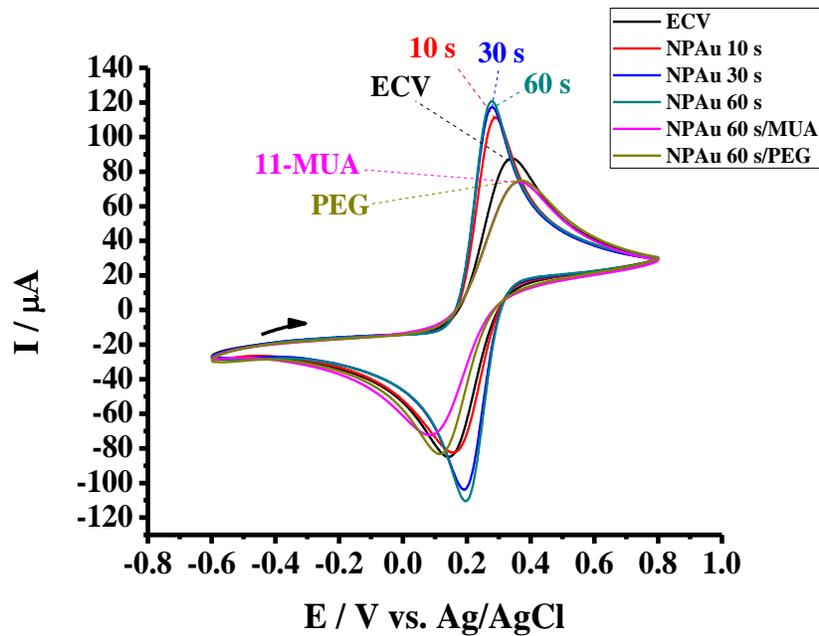


Figura 72 | Voltamperograma sobre un electrodo de carbón vítreo con depósito de nanopartículas de oro modificado mediante cronoamperometría durante 10,30, 60s, electrodo de carbón vítreo modificado con nanopartículas de oro a 60 s de exposición en la cronoamperometría, en cada caso, revestido con 11-MUA y O-(3-Carboxipropil)-O'-[2-(3-mercaptopropionilamino)-etil]-polietilenglicol 3000, evaluado en PBS (1X, pH 7.4) contiene 5.0 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ y 0.1 M de KCl desde -0.6 V a 0.8 V con una velocidad de barrido 25 mV/s (2° ciclo, segmentos 3-4).

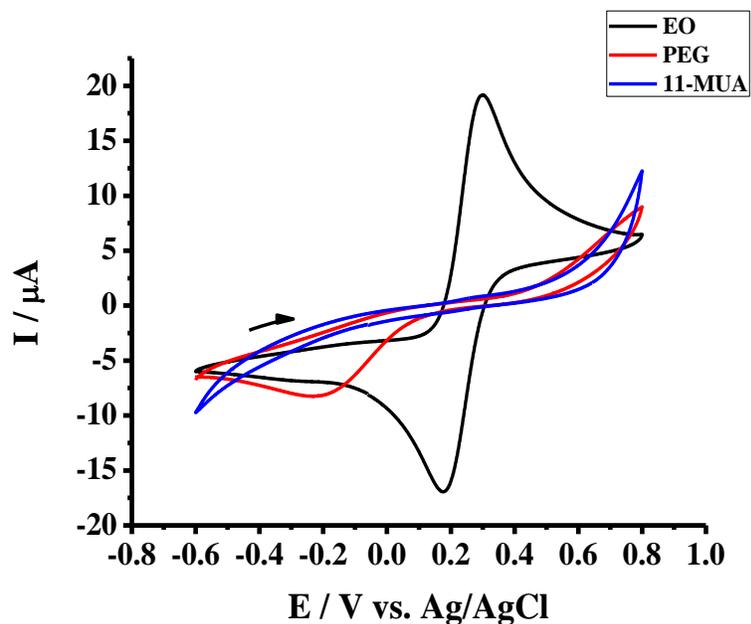


Figura 73 | Voltamperograma del electrodo de oro revestido con 11-MUA y O-(3-Carboxipropil)-O'-[2-(3-mercaptopropionilamino)-etil]-polietilenglicol 3000, evaluado en PBS (1X, pH 7.4) contiene 5.0 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ y 0.1 M de KCl desde -0.6 V a 0.8 V con una velocidad de barrido 25 mV/s (2° ciclo, segmentos 3-4).

Electrodo	Tiempo de electrodepósito (s)	Respuesta de potencial (V)		Respuesta de intensidad de corriente (μA)		Velocidad de barrido (mV/s)	Potencial formal estándar, E^0 (mV)	i_{pa}/i_{pc}
		E_{pa}	E_{pc}	i_{pa}	i_{pc}			
CV	-	0.339	0.144	98.09	94.25	25	242	1.04
		0.36	0.125	130.99	124.97	50	243	1.05
		0.377	0.111	154.86	146.35	75	244	1.06
		0.385	0.103	174.48	161.09	100	244	1.08
		0.397	0.093	192.44	174.48	125	245	1.10
CV/NPAu	10	0.289	0.157	122.62	94.79	25	223	1.29
		0.302	0.143	164.79	123.21	50	223	1.34
		0.309	0.134	197.56	143.18	75	222	1.38
		0.318	0.121	221.52	159.86	100	220	1.39
		0.326	0.113	241.37	173.71	125	220	1.39
	30	0.277	0.192	128.56	118.42	25	235	1.09
		0.285	0.186	180.38	162.43	50	236	1.11
		0.289	0.181	217.59	190.81	75	235	1.14
		0.293	0.177	248.42	214.55	100	235	1.16
		0.296	0.171	275.21	235.97	125	234	1.17
60	0.277	0.196	132.34	124.77	25	237	1.06	
	0.281	0.192	186.47	173.28	50	237	1.08	
	0.287	0.187	226.34	207.39	75	237	1.09	
	0.291	0.182	259.84	234.98	100	237	1.11	
	0.293	0.178	287.58	257.41	125	236	1.12	
CV/NPAu/MUA	60	0.363	0.085	81.54	76.71	25	224	1.06
		0.401	0.056	109.68	96.21	50	229	1.14
		0.423	0.035	126.49	107.92	75	229	1.17
		0.438	0.021	142.84	116.37	100	230	1.23
		0.449	0.009	157.14	123.24	125	229	1.28
CV/NPAu/PEG	60	0.369	0.115	85.26	88.5	25	242	0.96
		0.395	0.097	117.31	115.25	50	246	1.02
		0.409	0.085	139.93	133.24	75	247	1.05
		0.419	0.076	158.12	147.96	100	247.5	1.07
		0.428	0.068	175.53	153.27	125	248	1.15
ORO	-	0.3	0.176	21.44	19.57	25	238	1.10
ORO/MUA	-	-	-	-	-	25	-	-
ORO/PEG	-	-	-	-	-	25	-	-

Tabla 3 | Respuesta en intensidad de corriente del electrodo de carbón vítreo y sus modificaciones posteriores mediante cronoamperometría.

Electrodo	Tiempo de electrodeposición (s)	Respuesta de potencial (V)		Respuesta de intensidad de corriente (μA)		Velocidad de barrido (mV/s)	Potencial formal estándar, E^0 (mV)	i_{pa}/i_{pc}
		E_{pa}	E_{pc}	i_{pa}	i_{pc}			
CV	-	0.342	0.142	63.98	63.48	25	242	1.01
		0.364	0.125	68.3	65.8	50	245	1.04
		0.378	0.111	62.3	66.5	75	245	0.94
		0.388	0.102	53.1	63.9	100	245	0.83
		0.395	0.094	51.6	55.7	125	245	0.93
CV/NPAu	10	0.289	0.159	111.9	73.8	25	224	1.52
		0.301	0.145	150.1	77.3	50	223	1.94
		0.308	0.132	174.7	74.3	75	220	2.35
		0.318	0.123	187.3	60.9	100	221	3.08
		0.324	0.114	202	41.7	125	219	4.84
	30	0.278	0.192	124.3	112.1	25	235	1.11
		0.283	0.185	174.9	150.6	50	234	1.16
		0.29	0.181	209.6	175.4	75	236	1.19
		0.292	0.178	234.3	192.4	100	235	1.22
		0.295	0.174	254.9	212.2	125	235	1.20
60	0.278	0.195	141.5	119.7	25	237	1.18	
	0.282	0.192	173.1	163.3	50	237	1.06	
	0.286	0.187	216.4	197.8	75	237	1.09	
	0.29	0.182	246.6	216.2	100	236	1.14	
	0.293	0.179	271.6	235.2	125	236	1.15	
CV/NPAu/MUA	60	0.366	0.082	27.46	28.08	25	224	0.98
		0.403	0.056	16.6	17.6	50	230	0.94
		0.423	0.031	10.8	10	75	227	1.08
		-	-	-	-	100	-	-
		-	-	-	-	125	-	-
CV/NPAu/PEG	60	0.371	0.116	18.43	56.1	25	244	0.33
		0.396	0.097	13.4	62.4	50	247	0.21
		0.408	0.088	14	60.3	75	248	0.23
		0.421	0.077	11.6	64.1	100	249	0.18
		0.429	0.069	11.7	59.4	125	249	0.20
ORO	-	0.301	0.176	20.11	16.85	25	239	1.19
ORO/MUA	-	-	-	-	-	25	-	-
ORO/PEG	-	-	-	-	-	25	-	-

Tabla 4 | Respuesta en intensidad de corriente del electrodo de carbón vítreo y sus modificaciones posteriores mediante cronoamperometría obtenidas del software

CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En los experimentos de evaluación del diámetro hidrodinámico mediante DLS, se observa estabilidad en el tamaño de partícula. Asimismo, para obtener el diámetro de partícula real se realizaron caracterizaciones por microscopía electrónica de transmisión. La filtración de las nanopartículas estabilizadas en citrato de sodio mediante la unidad de filtración 0.45 μm puede cambiar insignificamente el tamaño del coloide. Sin embargo, el mayor problema lo representa el material de la unidad de filtración. Observamos que con la unidad de filtración Merck SLHV033RS, la solución de nanopartículas de oro no se adhería al material, como sucedía con otras unidades de filtración. El revestimiento con ligantes tiol y carboxilo terminales de estos cuerpos metálicos de oro demostraron perdurabilidad y protección ante la agregación de nanopartículas de oro en la solución de síntesis, y también en la separación de las nanopartículas de oro de la solución de citrato de sodio mediante la membrana de diálisis de 3.5 kDa en 50 mM MES pH 6.0. El proceso de cristalogénesis proporcionó un enfoque único para preparar cristales de proteínas en presencia de nanopartículas de oro, y mediante estas técnicas empleadas nos aproximamos a comprender estos procesos a nivel atómico, y esclarecer los estudios sobre la naturaleza de estas diferentes interacciones de metales pesados y proteínas. La voltamperometría cíclica demostró una disminución de la intensidad de corriente en sus picos anódicos y catódicos cuando fueron expuestos en solución con ligantes tiol y carboxilo terminales, lo que sugiere una monocapa sobre la superficie electroactiva del electrodo de oro y de carbón vítreo modificado con nanopartículas de oro. Esta caracterización electroquímica de bajo costo relaciona la determinación de la resistencia a la intensidad de corriente por parte de ligantes tiol y carboxilo terminales unidos sobre la superficie de un metal capaz de generar interacciones covalentes coordinadas. La respuesta del electrodo de carbón vítreo modificado con nanopartículas de oro comparada contra la del electrodo de oro da una posibilidad de obtener aún una señal significativa en la intensidad de corriente en el electrodo

de carbón vítreo modificado con nanopartículas de oro, y recomienda la inmovilización y caracterización de la unión y/o interacción de macromoléculas con metales pesados. Estudios preliminares realizados de impedancia en el electrodo de carbón vítreo modificado con nanopartículas de oro, se observa una disminución de Z'' (imaginaria) y Z' (real) a altas frecuencias, caso contrario cuando en este caso fue expuesto a 11-MUA se observa el aumento de los parámetros antes mencionados en los diagramas de Nyquist.

REFERENCIAS

- Alemán, J. V., Chadwick, A. V., He, J., Hess, M., Horie, K., Jones, R. G., . . . Stepto, R. F. (2007, January). Definitions of terms relating to the structure and processing of sols, gels, networks, and inorganic-organic hybrid materials (IUPAC Recommendations 2007). (H. Burrows, R. Weir, & J. Stohner, Eds.) *Pure and Applied Chemistry*, 1801-1829. doi:<https://doi.org/10.1351/pac200779101801>
- Amat Martínez, R., & Cabanillas Pérez, S. (2003). *Estudio electroquímico de polímeros conductores : polimerización del α -tetratiofeno*. Escola Universitària d'Enginyeria Tècnica Industrial de Barcelona. Barcelona: UPCommons . Retrieved from <http://hdl.handle.net/2099.1/4861>
- Baeza Reyes, A., & García Mendoza, A. d. (2011). *Principios de electroquímica*. Ciudad de México: UNAM. Retrieved from http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/DOC_APOY_FUNDAMENTOS_ELECTROANALITICA_2011_16333.pdf
- Bell, N. C., Minelli, C., & Shard, A. G. (2013, Julio 24). Quantitation of IgG protein adsorption to gold nanoparticles using particle size measurement. *Analytical Methods*, 5, 4591-4601. doi:10.1039/C3AY40771C
- Bioanalytical Systems, Inc. (2001, January). Electrode polishing and care. West Lafayette, Indiana, USA. Retrieved from <https://www.basinc.com/assets/library/manuals/epc.pdf>
- Blundell, T. L., & Jenkins, J. A. (1977). The Binding of Heavy Metals to Proteins. *Chemical Society Reviews*, 6(2), 139-171. doi:10.1039/CS9770600139
- Brownson, D. A., & Banks, C. E. (2014). *Interpreting Electrochemistry. In: The Handbook of Graphene Electrochemistry*. London: Springer. doi:https://doi.org/10.1007/978-1-4471-6428-9_2
- Carmargo, P. H., Rodrigues, T. S., da Silva, A. G., & Wang, J. (2015). Controlled Synthesis: Nucleation and Growth in Solution. In Y. Xiong, & X. Lu, *Metallic Nanostructures From Controlled Synthesis to Applications* (pp. 49-74). New York: Springer International Publishing. doi:10.1007/978-3-319-11304-3
- Chandrashekar, B. N., Kumara Swamy, B. E., Pandurangachar, M., Shankar, S. S., Gilbert, O., Manjunatha, J. G., & Sherigara, B. S. (2010). Electrochemical Oxidation of Dopamine at Polyethylene glycol Modified Carbon Paste Electrode: A Cyclic Voltammetric Study.

- International journal of electrochemical science*, 5(4). Retrieved from <http://www.electrochemsci.org/papers/vol5/5040578.pdf>
- Christian, G. D. (2009). *Química Analítica* (Sexta ed.). (P. E. Roig Vázquez, & A. L. Delgado Rodríguez, Eds.) Ciudad de México: Mc Graw Hill.
- Cookson, R. F. (1974, Febrero). Determination of acidity constants. *Chemical Reviews*, 74(1), 5-28. doi:10.1021/cr60287a002
- Cui, M., Song, Z., Wu, Y., Guo, B., Fan, X., & Luo, X. (2016, May 15). A highly sensitive biosensor for tumor marker alpha fetoprotein based on poly(ethylene glycol) doped conducting polymer PEDOT. *Biosensors and Bioelectronics*, 79, 736-741. doi:10.1016/j.bios.2016.01.012
- Currey, J. D. (1999). The design of mineralised hard tissues for their mechanical functions. *Journal of Experimental Biology*, 202(23), 3285-3294. Retrieved from <http://jeb.biologists.org/content/202/23/3285.article-info>
- Dell'Orco, D., Lundqvist, M., Oslakovic, C., Cedervall, T., & Linse, S. (2010, June 3). Modeling the Time Evolution of the Nanoparticle-Protein Corona in a Body Fluid. (Y. Astier, Ed.) *PLoS ONE*, 5(6), 1-8. doi:10.1371/journal.pone.0010949
- Díaz Portillo, J., Fernández del Barrio, M. T., & Paredes Salido, F. (1997). *Aspectos básicos de bioquímica clínica*. España: Díaz de Santos, S.A.
- Ducruix, A., & Giegé, R. (1992). *Crystallization of nucleic acids and proteins: a practical approach*. New York: Oxford University Press.
- Eccles, J., Bangert, U., Bromfield, M., Christian, P., Harvey, A. J., & Thomas, P. (2010). UV-Vis plasmon studies of metal nanoparticles. *Journal of Physics: Conference Series*, 241(1), 1-4. doi:<https://doi.org/10.1088/1742-6596/241/1/012090>
- Eustis, S., & El-Sayed, M. A. (2005, December 16). Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold: Noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and nonradiative properties of nanocrystals of different shapes. *Chemical Society Reviews*, 35(3), 209-217. doi:10.1039/B514191E
- Fleischmann, M., Hendra, P. J., & McQuillan, A. J. (1974, May 15). Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode. *Chemical Physics Letters*, 26(2), 163-166. doi:[https://doi.org/10.1016/0009-2614\(74\)85388-1](https://doi.org/10.1016/0009-2614(74)85388-1)

- Gao, X., Wei, W., Yang, L., Yin, T., & Wang, Y. (2007). Simultaneous Determination of Lead, Copper, and Mercury Free from Macromolecule Contaminants by Square Wave Stripping Voltammetry. *Analytical Letters*, *38*(14), 2327-2343. doi:http://dx.doi.org/10.1080/00032710500316423
- García-Ruiz, J. M. (2003). Nucleation of protein crystals. *Journal of Structural Biology*, *142*(1), 22-31. doi:https://doi.org/10.1016/S1047-8477(03)00035-2
- Guayasamin, G. (2010). *Física: Ciencia Fundamental*. Estados Unidos de America: Xlibris Corporation.
- Hampton Research Corporation. (1991-2017). *Hampton Research*. Retrieved from Solutions for Crystal Growth: [https://hamptonresearch.com/documents/product/hr008695_7-110_user_guide_\(2017\).pdf](https://hamptonresearch.com/documents/product/hr008695_7-110_user_guide_(2017).pdf)
- Hampton Research Corporation. (2003-2017). *Hampton Research*. Retrieved from Solutions for Crystal Growth: https://hamptonresearch.com/documents/growth_101/3.pdf
- Hendel, S. J., & Young, E. R. (2016, September 16). Introduction to Electrochemistry and the Use of Electrochemistry to Synthesize and Evaluate Catalysts for Water Oxidation and Reduction. *Journal of Chemical Education*, *93*(11), 1951-1956. doi:10.1021/acs.jchemed.6b00230
- Hermanson, G. (2013). *Bioconjugate Techniques* (Third ed.). Rockford, Illinois: ACADEMIC PRESS. doi:https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382239-0.00014-5
- Hoener, B. S., Zhang, H., Heiderscheid, T. S., Kirchner, S. R., De Silva Indrasekara, A. S., Baiyasi, R., . . . Chang, W.-S. (2017, May 23). Spectral Response of Plasmonic Gold Nanoparticles to Capacitive Charging: Morphology Effects. *The Journal Physical Chemistry Letters*, *8*(12), 2681-2688. doi:10.1021/acs.jpcllett.7b00945
- Hofmann, A., Schmiel, P., Stein, B., & Graf, C. (2011, October 26). Controlled Formation of Gold Nanoparticle Dimers Using Multivalent Thiol Ligands. *Langmuir*, *27*(24), 15165-15175. doi:10.1021/la2028498
- Ivanov, M. R., Bednar, H. R., & Haes, A. J. (2010). Investigations of the Mechanism of Gold Nanoparticle Stability and Surface Functionalization in Capillary Electrophoresis. *ACS Nano*, *3*(2), 386-394. doi:10.1021/nn8005619
- Kaminskienė, Ž., Prosyčėvas, I., Stonkutė, J., & Guobienė, A. (2013). Evaluation of Optical Properties of Ag, Cu, and Co Nanoparticles Synthesized in Organic Medium. *ACTA PHYSICA POLONICA A*, 111-114. doi:10.12693/APhysPolA.123.111
- Kissinger, P. T., & Heineman, W. R. (1983, Septoembre). Cyclic voltammetry. *Journal of Chemical Education*, *60*(9), 702-706. doi:10.1021/ed060p702

- Kumar, S., Aaron, J., & Sokolov, K. (2008, February 7). Directional conjugation of antibodies to nanoparticles for synthesis of multiplexed optical contrast agents with both delivery and targeting moieties. *Nature Protocols*, 3(2), 314-320. doi:10.1038/nprot.2008.1
- Kusch, P., Mastel, S., Mueller, N. S., Azpiazu, N. M., Heeg, S., Gorbachev, R., . . . Hillenbrand, R. (2017, March 21). Dual-Scattering Near-Field Microscope for Correlative Nanoimaging of SERS and Electromagnetic Hotspots. *Nano Letters*, 17(4), 2667-2673. doi:10.1021/acs.nanolett.7b00503
- Larrain Ibañez, R., & De Freitas Morcelli, L. C. (1980). *Química General Modulos 5-6-7*. Santiago, Chile: Andres Bello.
- Lee, Y. K., Choi, E.-J., Webster, T. J., Kim, S.-H., & Khang, D. (2014). Effect of the protein corona on nanoparticles for modulating cytotoxicity and immunotoxicity. (C. Rinaldi, Ed.) *10(1)*, 97-113. doi:https://doi.org/10.2147/IJN.S72998
- Li, J., Cushing, S. K., Chu, D., Zheng, P., Bright, J., Castle, C., . . . Wu, N. (2016, June 14). Distinguishing surface effects of gold nanoparticles from plasmonic effect on photoelectrochemical water splitting by hematite. *Journal of Materials Research*, 1608-1615. doi:https://doi.org/10.1557/jmr.2016.102
- Li, T., Fan, Q., Liu, T., Zhu, X., Zhao, J., & Li, G. (2010, August 15). Detection of breast cancer cells specially and accurately by an electrochemical method. *Biosensors and Bioelectronics*, 25(12), 2686-2689. doi:10.1016/j.bios.2010.05.004
- Li, T., Fan, Q., Liu, T., Zhu, X., Zhao, J., & Li, G. (2010, August 15). Detection of breast cancer cells specially and accurately by an electrochemical method. *Biosensors and Bioelectronics*, 25(12), 2686-2689. doi:10.1016/j.bios.2010.05.004
- Li, T., Fan, Q., Liu, T., Zhu, X., Zhao, J., & Li, G. (2010, May 7). Detection of breast cancer cells specially and accurately by an electrochemical method. *Biosensors and Bioelectronics*, 25(12), 2686-2689. doi:https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.05.004
- Lin, X., Ni, Y., & Kokot, S. (2013). Glassy carbon electrodes modified with gold nanoparticles for the simultaneous determination of three food antioxidants. *Analytica Chimica Acta*, 765, 54-62. doi:https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.12.036
- Link, S., & El-Sayed, M. A. (1999, September 10). Spectral Properties and Relaxation Dynamics of Surface Plasmon Electronic Oscillations in Gold and Silver Nanodots and Nanorods. *The Journal of Physical Chemistry B*, 103(40), 8410-8426. doi:10.1021/jp9917648

- Louis, C., & Pluchery, O. (2012). *Gold nanoparticles for physics, chemistry and biology*. London: Imperial College Press.
- Maji, S. K., Mandal, A. K., Nguyen, K. T., Borah, P., & Zhao, Y. (2015, April 24). Cancer Cell Detection and Therapeutics Using Peroxidase-Active Nanohybrid of Gold Nanoparticle-Loaded Mesoporous Silica-Coated Graphene. *ACS Applied Materials & Interfaces*, *7*(18), 9807–9816. doi:10.1021/acsami.5b01758
- Marín-García, L., Frontana-Uribe, B. A., Reyes-Grajeda, J. P., Stojanoff, V., Serrano-Posada, H. J., & Moreno, A. (2008, February 27). Chemical Recognition of Carbonate Anions by Proteins Involved in Biomineralization Processes and Their Influence on Calcite Crystal Growth. *Crystal Growth & Design*, *8*(4), 1340-1345. doi:10.1021/cg701156r
- Marken, F., Neudeck, A., & Bond, A. M. (2010). *Electroanalytical Methods Guide to Experiments and Applications* (Second ed.). (F. Scholz, Ed.) Greifswald, Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. doi:10.1007/978-3-642-02915-8
- Martínez-Caballero, S., Cuéllar-Cruz, M., Demitri, N., Polentarutti, M., Rodríguez-Romero, A., & Moreno, A. (2016, January 29). Glucose Isomerase Polymorphs Obtained Using an Ad Hoc Protein Crystallization Temperature Device and a Growth Cell Applying an Electric Field. *Crystal Growth & Design*, *16*(3), 1679-1686. doi:10.1021/acs.cgd.5b01755
- McNaught, A. D., & Wilkinson, A. (1997). *IUPAC. Compendium of Chemical Terminology* (Second ed.). Oxford: Blackwell Scientific Publications. doi:https://doi.org/10.1351/goldbook.NT07243
- McPherson, A. (1991, March). A brief history of protein crystal growth. *Journal of Crystal Growth*, *110*(1), 1-10. doi:10.1016/0022-0248(91)90859-4
- Messerschmidt, A. (2007). *X-Ray Crystallography of Biomacromolecules: A Practical Guide*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. doi:10.1002/9783527610129.ch1
- Moreno, A., & Rivera, M. (2005, December). Conceptions and first results on the electrocrystallization behaviour of ferritin. *Acta Crystallographica Section D*, *61*(12), 1678-1681. doi:10.1107/S0907444905033937
- Mullin, J. M. (2001). *Crystallization* (Fourth Edition ed.). Butterworth-Heinemann.
- Nagata, Y., Mizukoshi, Y., Okitsu, K., & Maeda, Y. (1996, Septiembre). Sonochemical Formation of Gold Particles in Aqueous Solution. *Radiation Research*, *146*(3), 333-338. doi:10.2307/3579465

- Pandey, P. C., & Pandey, G. (2016, November 14). Synthesis of gold nanoparticles resistant to pH and salt for biomedical applications; functional activity of organic amine. *Journal of Materials Research, 31*(21), 3313-3323. doi:<https://doi.org/10.1557/jmr.2016.374>
- Pareja-Rivera, C., Cuéllar-Cruz, M., Esturau-Escofet, N., Demitri, N., Polentarutti, M., Stojanoff, V., & Moreno, A. (2016, December 5). Recent Advances in the Understanding of the Influence of Electric and Magnetic Fields on Protein Crystal Growth. *Crystal Growth and Design, 17*(1), 135-145. doi:10.1021/acs.cgd.6b01362
- Piella, J., Bastús, N. G., & Puntès, V. (2016, February 23). Size-controlled Synthesis of sub-10 nm Citrate-stabilized Gold Nanoparticles and Related Optical Properties. *Chemistry of Materials, 28*(4), 1066-1075. doi:10.1021/acs.chemmater.5b04406
- Rajeshwar, K., & Ibanez, J. G. (1997). *Environmental Electrochemistry: Fundamentals and Applications in Pollution Abatement*. San Diego: Academic Press.
- Rand, D., Derdak, Z., Carlson, R., Wands, J. R., & Rose-Petruck, C. (2015, October 29). X-ray Scatter Imaging of Hepatocellular Carcinoma in a Mouse Model Using Nanoparticle Contrast Agents. *Scientific Reports, 5*(15673), 1-14. doi:10.1038/srep15673
- Ruiz-Arellano, R. R., & Moreno, A. (2014, September 8). Obtainment of Spherical-Shaped Calcite Crystals Induced by Intramineral Proteins Isolated from Eggshells of Ostrich and Emu. *Crystal Growth & Design, 14*(10), 5137-5143. doi:10.1021/cg5008389
- Sabir, T. S., Yan, D., Milligan, J. R., Aruni, A. W., Nick, K. E., Ramon, R. H., . . . Perry, C. C. (2012, January 30). Kinetics of Gold Nanoparticle Formation Facilitated by Triblock Copolymers. *The Journal of Physical Chemistry C, 116*(7), 4431-4441. doi:10.1021/jp210591h
- Saridakis, E., & Chayen, N. E. (2000). Improving protein crystal quality by decoupling nucleation and growth in vapor diffusion. *Protein Science, 9*, 755-757. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2144611/pdf/10794418.pdf>
- Scholz, F. (2010). *Electroanalytical Methods Guide to Experiments and Applications* (Second ed.). (F. Scholz, Ed.) Greifswald, Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. doi:10.1007/978-3-642-02915-8
- Sergievskaya, A. P., Tatarchuk, V. V., Makotchenko, E. V., & Mironov, I. V. (2015, June 28). Formation of gold nanoparticles during the reduction of H₂AuBr₄ in reverse micelles of oxyethylated surfactant: Influence of gold precursor on the growth kinetics and properties of the particles. *Journal of Materials Research, 30*(12), 1925-1933. doi:<https://doi.org/10.1557/jmr.2015.121>

- Smith, A. M., Marbella, L. E., Johnston, K. A., Hartmann, M. J., Crawford, S. E., Kozycz, L. M., . . . Millstone, J. E. (2015, February 6). Quantitative Analysis of Thiolated Ligand Exchange on Gold Nanoparticles Monitored by ^1H NMR Spectroscopy. *Analytical Chemistry*, *87*(5), 2771-2778. doi:10.1021/ac504081k
- Swarup Kumar, M., Amal Kumar, M., Kim Truc, N., Parijat, B., & Yanli, Z. (2014, April 24). Cancer Cell Detection and Therapeutics Using Peroxidase-Active Nanohybrid of Gold Nanoparticle-Loaded Mesoporous Silica-Coated Graphene. *ACS Applied Materials and Interfaces*, *7*(18), 9807-9816. doi:10.1021/acsami.5b01758
- Tang, Y., Zeng, X., & Liang, J. (2010). Surface Plasmon Resonance: An Introduction to a Surface Spectroscopy Technique. *Journal of Chemical Education*, *87*(7), 742-746. doi:10.1021/ed100186y
- Thanh, N. T., Maclean, N., & Mahiddine, S. (2014, July 8). Mechanisms of Nucleation and Growth of Nanoparticles in Solution. *Chemical Reviews*, *114*(15), 7610-7630. doi:10.1021/cr400544s
- Tibbetts, K. M., Tangeysh, B., Odhner, J. H., & Levis, R. J. (2016, May 26). Elucidating Strong Field Photochemical Reduction Mechanisms of Aqueous $[\text{AuCl}_4]^-$: Kinetics of Multiphoton Photolysis and Radical Mediated Reduction. *The Journal of Physical Chemistry A*, *120*(20), 3562-3569. doi:10.1021/acs.jpca.6b03163
- Turkevich, J., Stevenson, P. C., & Hillier, J. (1951, January 01). A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discussions of the Faraday Society*, *11*, 55-75. doi:10.1039/DF9511100055
- Vázquez Nin, G., & Echeverría, O. (2000). *Introducción a la Microscopía Electrónica Aplicada a las Ciencias Biológicas* (Primera ed.). Distrito Federal: Fondo de Cultura Económica.
- Vekilov, P. G. (2010, November 15). Nucleation. *Crystal Growth & Design*, *10*(12), 5007-5019. doi:10.1021/cg1011633
- Wei, H., Wang, Z., Zhang, J., House, S., Gao, Y.-G., Yang, L., . . . Lu, Y. (2010). Time-dependent, protein-directed growth of gold nanoparticles within a single crystal of lysozyme. *Nature Nanotechnology*, *6*, 93-97. doi:10.1038/nnano.2010.280
- Wilcox, W. R., & Khalaf, A. A. (1974, December 14). Nucleation of monosodium urate crystals. *Annals of the Rheumatic Diseases*, *34*(4), 332-339. doi:http://dx.doi.org/10.1136/ard.34.4.332

- Xia, H., Xiahou, Y., Zhang, P., Ding, W., & Wang, D. (2016, June 14). Revitalizing the Frens Method To Synthesize Uniform, QuasiSpherical Gold Nanoparticles with Deliberately Regulated Sizes from 2 to 330 nm. *Langmuir*, *32*(23), 5870-5880. doi:10.1021/acs.langmuir.6b01312
- Yang, J. A., & Murphy, C. J. (2012). Evidence for Patchy Lipid Layers on Gold Nanoparticle Surfaces. *Langmuir*, *28*(12), 5404-5416. doi:10.1021/la300325p
- Yang, X., Yang, M., Pang, B., Vara, M., & Xia, Y. (2015, October 14). Gold Nanomaterials at Work in Biomedicine. *Chemical Reviews*, *115*(19), 10410–10488. doi:10.1021/acs.chemrev.5b00193
- Zeng, S., Baillargeat, D., Ho, H.-P., & Yong, K.-T. (2014). Nanomaterials enhanced surface plasmon resonance for biological and chemical sensing applications. *Chemical Society Reviews*, *43*(10), 3426-3452. doi:10.1039/c3cs60479a
- Zopes, D., von Hagen, R., Müller, R., Fiz, R., & Mathur, S. (2010, August 4). Ink-jetable patterning of metal-catalysts for regioselective growth of nanowires. *Nanoscale*, *2*, 2091-2095. doi:10.1039/C0NR00131G