



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE QUÍMICA

**ACOPLAMIENTO DE NANOPARTÍCULAS DE ORO CON EL FACTOR DE  
CRECIMIENTO EPIDÉRMICO (NPs DE Au-EGF) Y DETERMINACIÓN DE SUS  
INTERACCIONES.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS DE MATERIALES

PRESENTA:

*IBT. MARÍA GUADALUPE GONZÁLEZ PEDROZA*

DIRIGIDA POR:

DR. RAÚL ALBERTO MORALES LUCKIE  
DR. VÍCTOR SÁNCHEZ MENDIETA  
DR. GUSTAVO LÓPEZ TÉLLEZ





3er. oficio de Evaluación de Grado  
359/2016

Toluca, México, 18 de agosto de 2016

Maestría en Ciencia de Materiales  
María Guadalupe González Pedroza  
Facultad de Química, UAEM  
Presente

El que suscribe Director de la Facultad de Química, dependiente de la Universidad Autónoma del Estado de México, comunica a Usted que el Jurado de su Evaluación de Grado estará formado por:

Dra. Susana Hernández López  
PRESIDENTE

FIRMA

Dr. Oscar Fernando Olea Mejía  
SECRETARIO

Dr. Raúl Alberto Morales Luckie  
PRIMER VOCAL

Dr. Iván García Orozco  
SEGUNDO VOCAL

Dra. Liliana Argueta Figueroa  
TERCER VOCAL

Dr. Gustavo López Téllez  
SUPLENTE

Dr. Gonzalo Martínez Barrera  
SUPLENTE

ATENTAMENTE  
PATRIA, CIENCIA Y TRABAJO

"2016, Año del 60 Aniversario de la Universidad Autónoma del Estado de México"  
"2016 año de Leopoldo Flores Verdés"

DR. ENI CARLOS EDUARDO BARRERA DÍAZ  
DIRECTOR



c.c.p. Archivo

WWW.UAEMEX.MX



## DEDICATORIA

A mi Madre Ma. De Lourdes Pedroza Díaz Leal,

A ella mi respeto y mi admiración eterna,

A ella le debo mi ser y mi esencia,

A ella le dedico mi vida.



## AGRADECIMIENTOS

A Dios por el don de la vida.

A Ma. De Lourdes Pedroza Díaz Leal, por el apoyo y amor que me brindo siempre.

A mi familia por el apoyo otorgado en todo momento.

A los Doctores Raúl Alberto Morales Luckie, Víctor Sánchez Mendieta y Gustavo López Téllez, por el apoyo que en todo momento me dieron.

A la Universidad Autónoma del Estado de México y al Claustro de Profesores de Ciencia de Materiales de la Facultad de Química por la formación proporcionada.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la realización de este trabajo de investigación.

Al Centro Conjunto de Investigación en Química Sustentable UAEM-UNAM por las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo de investigación.

# INDICE

---

INDICE .....	I
TABLA DE FIGURAS .....	III
ACRONIMOS .....	IV
ABSTRACT .....	V
RESUMEN.....	VI
INTRODUCCIÓN .....	1
CAPITULO I. ANTECEDENTES .....	3
1.1 Nanomateriales .....	3
1.1.1 Nanopartículas de metales nobles .....	5
1.1.2 Nanopartículas de oro (NPs de Au) .....	7
1.1.3 Nanopartículas metálicas y su uso como agentes teranósticos .....	8
1.2 Factor de crecimiento epidérmico (EGF).....	9
1.2.1 Acoplamiento de NPs de Au-EGF.....	11
CAPITULO 2. TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN. ....	16
2.1 Espectroscopia.....	16
2.1.1 Espectroscopia ultravioleta-visible (UV-VIS) .....	17
2.1.2 Espectroscopia infrarroja con la transformada de Fourier .....	19
2.3 Espectroscopia de Fotoelectrones por Rayos X.....	21
2.4 Microscopia Electrónica de Transmisión (MET) .....	24
2.5 Potencial Z .....	27
HIPOTESIS .....	28
OBJETIVOS .....	28
OBJETIVO GENERAL .....	28
OBJETIVOS PARTICULARES .....	28
CAPITULO III. METODOLOGÍA.....	29
3.1 Síntesis.....	29
3.1.1 Síntesis de las NPs de Au .....	29
3.1.2 Preparación del acoplamiento de NPs de Au / EGF.....	29
3.2 Caracterización .....	30
3.2.1 Caracterización de propiedades ópticas de las NPs de Au con y sin EGF .....	30
3.2.2 Caracterización morfológica de NPs de Au con y sin EGF .....	30
3.2.3 Caracterización estructural del EGF con y sin NPs de Au .....	31



3.2.4 Determinación de la interacción entre nanopartículas de Au y EGF.....	31
3.2.4 Caracterización con Potencial Z.....	31
CAPITULO IV-RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	32
4.1 Síntesis de NPs de Au.....	32
4.1.1 Espectroscopia UV-Vis de NPs de Au.....	32
4.1.2 Microscopia electrónica de transmisión de NPs de Au .....	33
4.2 Acoplamiento de las NPs de Au con EGF.....	35
4.2.1 Espectroscopia UV-Vis del Bionanocomposito .....	36
4.2.2 Microscopia electrónica de transmisión del bionanocomposito .....	37
4.3 Caracterización estructural del EGF con y sin NPs de Au .....	38
4.4 Caracterización por Espectroscopia Fotoelectrónica de Rayos X (XPS) y Potencial Z .....	40
4.5 Artículo .....	47
CAPITULO V-CONCLUSIONES.....	69
BIBLIOGRAFIA .....	70



## TABLA DE FIGURAS

FIGURA 1. LOS NIVELES ENERGÉTICOS DESOCUPADOS MÁS BAJOS CONFORMAN LA BANDA DE CONDUCCIÓN (LILA); LOS NIVELES OCUPADOS DE MAYOR ENERGÍA, LA BANDA DE VALENCIA (FUCSIA). EN LOS METALES, LA BANDA DE CONDUCCIÓN Y LA DE VALENCIA SE SOLAPAN. EN LOS NO METALES, EN CAMBIO, APARECE UNA BRECHA ENERGÉTICA QUE DIFICULTA EL PASO DE LOS ELECTRONES DE UNA BANDA A OTRA [12].	4
FIGURA 2. ESPECTRO DE UV-VIS DE NANOPARTÍCULAS DE AU [20].	6
FIGURA 3. APLICACIONES DE LAS NANOPARTÍCULAS DE AU [25].	8
FIGURA 4. SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DEL EGF, SEÑALANDO LOS TRES PUENTES DISULFURO. [44].	12
FIGURA 5. ESPECTRO ELECTROMAGNÉTICO [52].	16
FIGURA 6. DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DEL APARATO USADO PARA MÉTODOS ANALÍTICOS BASADOS EN LA ABSORCIÓN DE ENERGÍA RADIANTE[51].	18
FIGURA 7.FRECUENCIAS DE VIBRACION DE IR CARACTERISTICAS DE DISTINTOS GRUPOS FUNCIONALES[53].	20
FIGURA 8.TRANSFORMACIÓN DEL INTERFEROGRAMA EN ESPECTRO.	21
FIGURA 9. PROCESO DE FOTOEMISIÓN PARA UN ÁTOMO AISLADO. (A) UN ÁTOMO QUE POSEE EN SU ESTADO INICIAL N ELECTRONES, ES IMPACTADO POR UN FOTÓN DE RAYOS X QUE LE TRANSFIERE SU ENERGÍA A UN ELECTRÓN DE UN NIVEL PROFUNDO, CONDUCIENDO A LA FOTOEMISIÓN DE DICHO ELECTRÓN. (B) EL ÁTOMO AHORA EN UN ESTADO DE N-1 ELECTRONES PUEDE REORGANIZARSE POR LA CAÍDA DE UN ELECTRÓN DE UN NIVEL DE ENERGÍA MÁS ALTO AL HUECO FORMADO EN EL NIVEL PROFUNDO. PUESTO QUE EL ELECTRÓN CAE A UN ESTADO DE ENERGÍA MENOR, EL ÁTOMO PUEDE DISMINUIR EL EXCESO DE ENERGÍA EXPULSANDO UN SEGUNDO ELECTRÓN (ELECTRÓN AUGER) O EMITIENDO UN FOTÓN DE RAYOS X.	23
FIGURA 10. COMPARACIÓN DEL PROCESO DE FORMACIÓN DE LA IMAGEN ENTRE UN MICROSCOPIO ÓPTICO (A) Y UN MICROSCÓPICO ELECTRÓNICO DE TRANSMISIÓN (B).	25
FIGURA 11.TIPOS DE SEÑALES QUE SE PRODUCEN DURANTE LA INTERACCIÓN DEL HAZ ELECTRÓNICO CON LA MUESTRA.	26
FIGURA 12. SOLUCIÓN COLOIDAL DE NPs DE AU.	32
FIGURA 13. ESPECTRO UV-VIS DE LAS NANOPARTÍCULAS DE AU OBTENIDAS.	33
FIGURA 14.MICROGRAFÍAS OBTENIDAS POR MET DE LAS NANOPARTÍCULAS DE AU OBTENIDAS.	34
FIGURA 15. HISTOGRAMA DE FRECUENCIAS DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA.	35
FIGURA 16. BIONANOCOMPOSITO (NPs DE AU- EGF).	36
FIGURA 17. ESPECTRO UV-VIS DEL BIONANOCOMPOSITO (NPs DE AU-EGF).	36
FIGURA 18.MICROGRAFÍAS OBTENIDAS POR MET DEL BIONANOCOMPOSTO (NPs DE AU-EGF).	37
FIGURA 19. HISTOGRAMA DE FRECUENCIAS DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA	38
FIGURA 20.ESPECTROS DE IR DE LA PROTEÍNA EGF Y DE LAS NANOPARTÍCULAS DE AU ACOPLADAS CON LA PROTEÍNA EGF.	40
FIGURA 21.ESPECTROS XPS: A) NPs DE AU EN LA REGIÓN DEL Au 4f 7/2, B)BIONANOCOMPOSITO (NPs DE AU-EGF) EN LA REGIÓN DEL Au 4f 7/2, C) EGF EN LA REGIÓN DEL N1s, D) BIONANOCOMPOSITO (NPs DE AU-EGF) EN LA REGIÓN DEL N1s.	44
FIGURA 22.FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO	45

## ACRONIMOS

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>Arg</b>	Arginina
<b>CTAB</b>	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
<b>Cys</b>	Cisteína
<b>Da</b>	Dalton
<b>EB</b>	Energía de enlace
<b>eF</b>	Nivel de Fermi
<b>EGF</b>	Factor de Crecimiento Epidérmico
<b>EGFR</b>	Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico
<b>EK</b>	Energía Cinética
<b>FTIR</b>	Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier
<b>GDP</b>	Guanosín difosfato
<b>GTP</b>	Guanosín trifosfato
<b>HEPES</b>	Ácido 4- (2-hidroxietil) -1-piperazinetanosulfónico
<b>HOMO</b>	Orbital molecular ocupado de más energía
<b>Hv</b>	Energía del fotón excitante
<b>IR</b>	Infrarrojo
<b>Leu</b>	Leucina
<b>LUMO</b>	Orbital molecular no ocupado de más baja energía
<b>MET</b>	Microscopia Electrónica de Transmisión
<b>NPs</b>	Nanopartículas
<b>NPs de Au</b>	Nanopartículas de oro
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>PEG</b>	Polietilenglicol
<b>RPS</b>	Resonancia plasmónica superficial
<b>RRS</b>	Resonancia de dispersión Raman
<b>Tyr</b>	Tirosina
<b>UV-VIS</b>	Espectroscopia Ultravioleta -Visible
<b>XPS</b>	Espectroscopia Fotoelectrónica de Rayos X
<b>ZSV</b>	Zona Subventricular





## ABSTRACT

---

Nowadays, the biomedical uses of the coupling gold nanoparticles (Au NPs) with Epidermal Growth Factor (EGF) have attracted huge attention because of its potential for theranostic activity, which could be useful for diagnosis of diseases and for the treatment of neurodegenerative diseases. Due of this, there are great interest to know the nature of the intermolecular interactions between the Au NPs with EGF. In a first step, the Au NPs were synthesized by chemical reduction of tetrachloroauric acid using sodium citrate as reducing and capping agent. The Au NPs were characterized by UV-VIS spectroscopy TEM, XPS and zeta-potential. In a second step, the Au NPs with EGF was coupled. Subsequently, the coupling Au NPs with EGF were characterized by UV-VIS, FTIR, XPS, TEM and zeta-potential. The Au NPs with an average diameter size of 8.09 nm were obtained. After coupling the Au NPs with EGF, the average diameter size increased to 9.14 nm. XPS show an electrostatic interaction between Au NPs and EGF. The zeta potential corroborates these results that for the first time allow us to identify interactions between AuNPs with EGF. These results indicate the great potential use of the bionanocomposite, due to the Au NPs may act as carriers of EGF for neurodegenerative disease treatment.



## RESUMEN

---

En la actualidad, los usos biomédicos del acoplamiento de nanopartículas de oro (NPs de Au) con el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) han tenido un gran auge dentro de la comunidad científica debido a su actividad regeneradora a nivel celular y su potente actividad teranóstica, logrando revertir el avance de enfermedades como el cáncer. Por lo tanto, es de interés conocer la naturaleza de las interacciones de las nanopartículas de oro y la estructura proteica del Factor de Crecimiento Epidérmico. Para lograr lo anterior, se sintetizaron nanopartículas de oro, con un tamaño promedio de 8.09 nm de diámetro, mediante la reducción química de un precursor de iones de oro utilizando citrato de sodio, y se caracterizaron por espectroscopia UV-VIS y microscopia electrónica de transmisión (MET); posteriormente se realizó un acoplamiento físico del Factor de Crecimiento Epidérmico con las NPs de Au y se caracterizaron mediante técnicas espectroscópicas de UV-VIS, FTIR, XPS, además de TEM y Potencial Z; por último, se lograron elucidar interacciones electrostáticas entre las NPs de Au y el grupo funcional amino de la estructura proteica correspondiente al EGF.



## INTRODUCCIÓN

---

Los estudios recientes sobre la síntesis de nanopartículas de oro (NPs de Au) han brindado precisión sobre las propiedades físico-químicas y ópticas que poseen, además de demostrar que dichas nanopartículas son inertes, biocompatibles y no tóxicas.

La superficie de las NPs de Au puede ser fácilmente modificada para una aplicación determinada y ligarse para dar orientación hacia cierta región de interés *in vivo*, es por ello que ciertos fármacos o recubrimientos biocompatibles se pueden acoplar a la superficie. En la actualidad, las NPs de Au han tenido una gran importancia como vehículo para transportar fármacos, sin embargo es importante implementar técnicas de caracterización que permitan conocer cómo funcionan y cuáles son sus interacciones a nivel molecular.

En el presente trabajo se estudiaron dichas interacciones acoplando las NPs de Au con el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) el cual es una citosina con capacidad mitogénica, por lo tanto es un agente potencial para la regeneración celular. La caracterización se realizó con la técnica espectroscópica de UV-Vis, donde se identificó y analizó la resonancia de plasmón superficial característica de las NPs de Au; además, se llevó a cabo la caracterización morfológica por la técnica MET donde se visualizaron claramente los tamaños de NPs deseados. El reconocimiento de los grupos funcionales que integran el EGF fueron determinados por medio de FTIR; el reconocimiento de dónde y cómo se lleva a cabo el anclaje de las NPs de Au con el EGF se determinó por medio de XPS. Por último, se corroboraron los resultados obtenido de XPS con un análisis de Potencial Z, donde se identificaron las cargas de las NPs de Au y el acoplamiento (NPs de Au-EGF).

Hoy en día se intenta implementar sistemas teranósticos, dando paso a una nueva ciencia conocida como “bionanomedicina”[1, 2], la cual abrirá muchas puertas a la investigación, que si bien es cierto es el futuro del desarrollo tecnológico; por ello es



relevante dar a conocer, que este trabajo es la antesala de una investigación con mucho potencial, debido a que el EGF promueve la proliferación y migración de precursores oligodendrogiales de la zona subventricular y favorece la remielinización en el cuerpo calloso; debido a esto será posible diseñar tratamientos para pacientes con esclerosis múltiple, conocer más sobre esta enfermedad y sobre todo intentar revertirla.



## CAPITULO I. ANTECEDENTES

---

### 1.1 Nanomateriales

La ciencia de materiales es tan antigua como el hombre mismo, sin embargo día a día presenta avances novedosos, tal es el caso de la Nanociencia, la cual ha cobrado suma importancia debido a las múltiples aplicaciones que presenta la materia en la escala de los nanómetros. De aquí se ha derivado a su vez la nanotecnología encargada, principalmente, del diseño, la manipulación, caracterización, producción y aplicación de nanoestructuras, nanodispositivos, nanosistemas, entre otros[3].

Los materiales nanométricos presentan características muy diferentes a los materiales macroscópicos, es decir, las propiedades de las nanoestructuras se comportan de manera distinta a los mismos materiales a mayor escala presentando así diferencias fisicoquímicas y eléctricas. Con base en lo descrito, estos materiales prometen múltiples aplicaciones en diversas áreas, como la medicina, biología, estudio de propiedades ópticas y magnéticas, entre otras. En la actualidad estos materiales nanométricos se han empleado como[4]; almacenamiento de datos[5], catálisis[6], y en el área biomédica, tal es el caso de liberación de fármacos y terapia génica[7], obtención de imágenes moleculares diagnósticas[8] y como sensores biológicos[9], entre otros.

Es por esto que surge la necesidad de manejar y controlar las características de las nanopartículas, tales como forma, tamaño y composición química[10]. Esto se reflejará directamente en sus propiedades ópticas, eléctricas y magnéticas, principalmente. Las propiedades de los nanomateriales metálicos son consideradas como únicas debido a las características que presenta la banda de conducción[11]. Las propiedades de un material vienen determinadas por la posición del nivel de Fermi ( $eF$ ) y su estructura de bandas electrónicas. El nivel de Fermi corresponde al nivel energético más alto ocupado como se muestra en la figura 1.0.

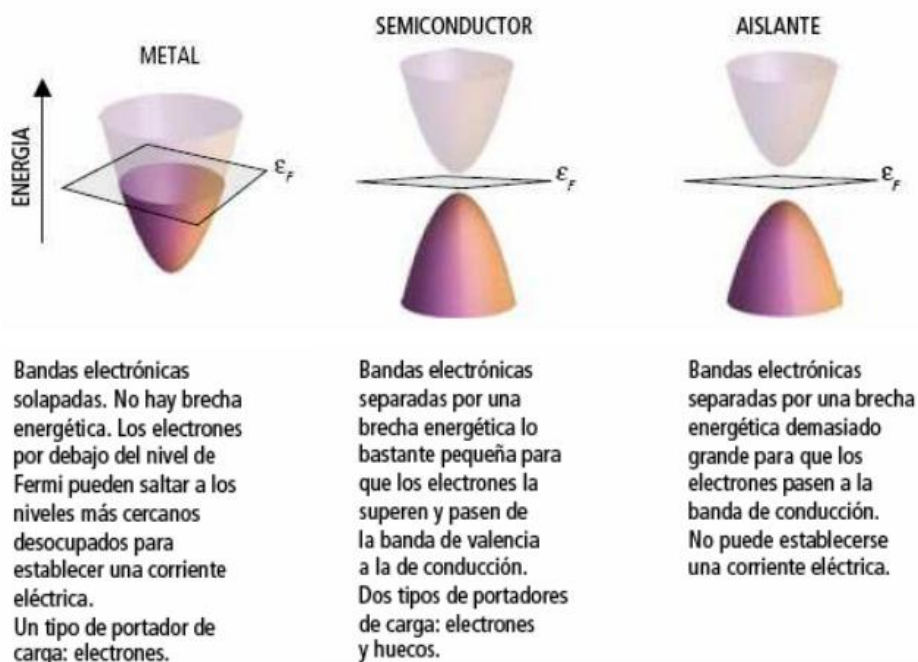


Figura 1. Los niveles energéticos desocupados más bajos conforman la banda de conducción (lila); los niveles ocupados de mayor energía, la banda de valencia (fucsia). En los metales, la banda de conducción y la de valencia se solapan. En los no metales, en cambio, aparece una brecha energética que dificulta el paso de los electrones de una banda a otra [12].

Por su composición, los nanomateriales se pueden clasificar en nanomateriales metálicos, semiconductores, óxidos metálicos y nanocompositos[13]. Por su forma, la clasificación es más compleja, ya que se basa en características tales como esfericidad, llanura y la relación longitud-radio de la nanopartícula[14]. Los nanomateriales metálicos son de suma importancia debido a la variedad de propiedades ópticas, magnéticas y eléctricas que presentan, las cuales se basan en la estructura de su banda electrónica y las diferencias de la misma comparada con la banda de un semiconductor, o bien, de un aislante. Asimismo, los nanocompositos se refieren a materiales que se constituyen de más de un tipo de material convencional, dicha combinación puede darse entre materiales orgánicos, inorgánicos y biológicos, o bien, una mezcla de materiales con propiedades físicas y/o químicas diferentes[15].



Si se compara un metal macroscópico con una nanopartícula metálica, se observan diferencias notables en su reactividad química, así como en su estabilidad cinética y termodinámica, cambios en la relajación fotónica y electrónica, todo esto debido a la elevada relación superficie-volumen[3].

Por otro lado, la obtención de nanopartículas se puede llevar a través de dos procesos básicos, el primero de ellos denominado *top-down*, en el cual se parte de un material macroscópico, hasta llegar a la nanopartícula. Este tipo de proceso involucra, por lo general un mecanismo físico o mecánico de molienda y posteriormente una estabilización de la partícula obtenida a través del uso de un agente protector coloidal. Sin embargo también se han empleado técnicas litográficas para el mismo fin[16].

El otro proceso general, se conoce como *bottom-up* en el que se empieza por átomos hasta llegar a la nanopartícula. Dentro de estos procesos, uno de los más importantes es el método químico de reducción química de una sal metálica. En este caso también se emplean agentes estabilizantes como polímeros y surfactantes, los cuales controlan el crecimiento de la nanopartícula, y previene la aglomeración de *nanoclusters*[17]. Además de esta clasificación general, los métodos de síntesis se pueden dividir en físicos, químicos y biológicos[18].

### **1.1.1 Nanopartículas de metales nobles**

Las nanopartículas metálicas presentan propiedades ópticas derivadas directamente de la estructura de su banda electrónica; el borde de esta banda está más afectada por confinamiento cuántico que la de un semiconductor. El nivel de Fermi de un nanomaterial metálico se ubica en el centro de la banda, lo cual difiere por completo con la de un aislante o un semiconductor, además cuando los electrones en el material están restringidos en su movimiento en una región muy pequeña se observa el confinamiento cuántico[15].

Los metales nobles presentan una intensa absorción óptica, cuando la frecuencia del fotón incidente se encuentra en resonancia con la excitación colectiva de los electrones de la banda de conducción. Con base en lo anterior, las nanopartículas de metales nobles, principalmente, presentan una respuesta óptica denominada Resonancia de Plasmón Superficial (RPS), debido a una radiación ejercida sobre el material a través de un campo eléctrico externo[19]. La frecuencia resonante se encuentra fuertemente ligada al tamaño de la nanopartícula, a su forma y a sus propiedades dieléctricas del medio circundante[15]. Debido a la presencia del plasmón de superficie, las nanopartículas metálicas incrementan drásticamente la sección transversal de absorción de energía electromagnética, generando eficientemente energía térmica y un incremento de temperatura sobre la superficie y alrededor de la partícula este efecto puede ser empleado como un mecanismo de daño sobre el tejido vivo causando una destrucción celular irreversible o también como un mecanismo de liberación de fármacos por respuesta térmica.

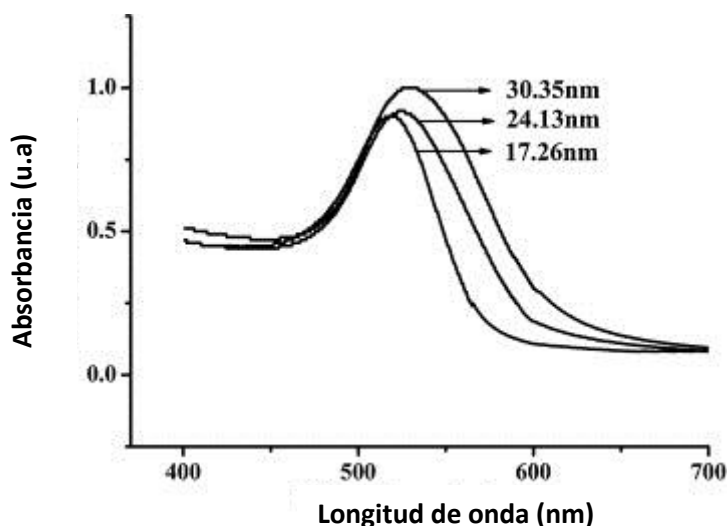


Figura 2. Espectro de UV-Vis de Nanopartículas de Au [20].

El tamaño nanométrico de estos sistemas hace que sean más fáciles de incorporar en sistemas biológicos. Las nanopartículas metálicas se pueden conjugar con moléculas pequeñas, funcionalizar con biomoléculas e incluso con ligantes de reconocimiento selectivo con la finalidad de lograr una especificidad molecular[21].





Las partículas a escala nanométrica, e incluso micrométrica, han sido empleadas en múltiples aplicaciones médicas. Las propiedades más importantes a considerar para emplear las nanopartículas en esta área son: baja toxicidad, biocompatibilidad, son fáciles de inyectar y se acumulan en el órgano o tejido de destino si estas son magnéticas[22].

Debido a la excepcional sensibilidad del RPS a cambios en el medio que rodea a la partícula, estas son candidatos ideales para el biosensado e imagenología óptica; por ejemplo, el uso de nanopartículas bimetálicas de Au recubiertas con SiO<sub>2</sub> de 150 nm de diámetro ha servido para detectar analitos en baja concentración presentes en la sangre[23].

### **1.1.2 Nanopartículas de oro (NPs de Au)**

Las NPs de Au poseen múltiples propiedades físicas, químicas y biológicas, las cuales van relacionadas a su tamaño, lo cual es primordial para ser empleadas. Dichas nanopartículas pueden ser fácilmente funcionalizadas con un amplio abanico de ligandos (anticuerpos, polímeros, sondas de diagnóstico, fármacos, material genético, etc.)[24].

Las NPs de Au pueden ser producidas en distintos métodos de síntesis, los cuales no presentan gran dificultad, además de ocupar cantidades trazas del precursor, lo cual además de hacer fácil la síntesis la hace económica y muy viable. La polidispersidad y las formas son altamente controladas debido a la adición de reductores como es el citrato de sodio; esto hace más importante el estudio de ellas, pues serán fácilmente identificables si se desea aplicar a organismos *in vivo*[24]. En la figura 3 se muestran, las aplicaciones de dichas NPs de acuerdo a su tamaño y forma.

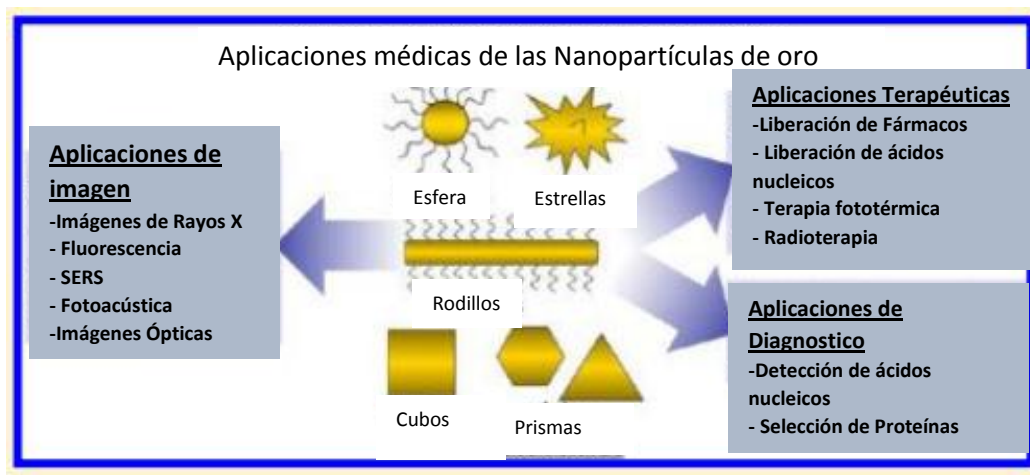


Figura 3. Aplicaciones de las nanopartículas de Au [25].

Estudios recientes han comprobado la interacción entre Au y algunos grupos funcionales como en el caso de tioles y carboxilos, adecuados para la conjugación con Au[26]. De igual forma, se ha indagado sobre las interacciones de proteínas con la superficie de NPs de Au, como es el caso de cupredoxin-redox. A esta proteína se le introdujo un puente disulfuro para promover su anclaje a la superficie de Au, sin perturbar su sitio activo. Se utilizaron técnicas como la espectroscopia UV-Vis, la dispersión Raman y la microscopia para conocer el efecto que tienen las NPs de Au con la proteína. Los resultados dieron a conocer que dichas moléculas quedan auto ensambladas con enlaces fuertes de coordinación e inmobilizadas sobre sustrato de oro[27].

En la actualidad se han estudiado las interacciones electrostáticas entre NPs de Au y nanotubos dopados con nitrógeno, procedentes de un tratamiento térmico con NH<sub>3</sub>[28, 29], donde un polielectrolito catiónico se adsorbe en la superficie de los nanotubos por interacción electrostática[30].

### 1.1.3 Nanopartículas metálicas y su uso como agentes teranósticos

Las nanopartículas híbridas (orgánica/inorgánica) han surgido como una solución simple para la generación de sistemas teranósticos, es así que el diseño de éstas ha sido una fuente importante de dichos sistemas debido a sus propiedades



físicas, químicas y magnéticas; por otra parte, las nanopartículas de oro han sido extensamente estudiadas como estrategia de diagnóstico y terapia en el tratamiento de cáncer, siendo estos dos sistemas de nanopartículas las más relevantes entre los teranósticos[31].

Sabemos que la frecuencia del plasmón de resonancia superficial de las nanopartículas de oro está íntimamente relacionada con propiedades de este sistema tales como tamaño, forma, disolvente, ligante, propiedades dieléctricas, funcionalización de la superficie e índice de refracción del medio que las rodea; por lo cual sus propiedades colorimétricas únicas han incrementado su aplicación en la detección de sistemas biológicos, explotando sus propiedades ópticas en secuencia de ADN, detección de desórdenes genéticos, ensayos de hibridación, citometría, entre otros[32].

Las nanopartículas tienen características diferentes, es decir, el material del que están hechos, tamaño, forma, carga eléctrica, magnética y propiedades ópticas. Por otra parte, las nanopartículas pueden ser modificadas por la conjugación de los grupos funcionales reactivos y cargas. Estas características determinan la naturaleza de las interacciones entre las nanopartículas y las células, tales como la capacidad de las nanopartículas de unirse o penetrar en las células, o para afectar las reacciones bioquímicas. La naturaleza de las interacciones determina la respuesta celular a las nanopartículas, como se manifiesta por la modificación de la morfología celular, la actividad o la diferenciación.

## 1.2 Factor de crecimiento epidérmico (EGF)

El factor de crecimiento epidérmico (EGF, siglas en inglés de *Epidermal Growth Factor*), proviene de una familia de factores de naturaleza proteica ubicada en el cromosoma 4, con un peso molecular de 6.045 Da, es una biomolécula pequeña, estable y resistente de 53 aminoácidos; es conocido como factor de crecimiento o de transferencia, el cual interviene en diversas etapas del crecimiento celular. En la actualidad ha sido aislado, purificado, cristalizado, y presenta



propiedades ácidas. El EGF posee 3 puentes disulfuros en Cys-6 - Cys -20, Cys-14 - Cys-31, Cys-23 - Cys-42, enlaces peptídicos y la cadena de residuos contiene 13 (Tyr) tirosina, 14 (Arg) arginina, 47 (Leu) leucina, 42 (Cys) cisteína; además de un extremo  $\alpha$  amino libre al comienzo de la cadena, en otro extremo carboxiterminal arginina de la forma  $\beta$  [33]. En presencia de ribosomas presenta una importante actividad de hidrólisis del GTP (guanósín trifosfato), el cual se escinde en GDP (guanósín difosfato) y fosfato inorgánico. Se han obtenido dos tipos de mutantes de *E. coli* que producen este factor modificado: en uno, el factor es termoestable y se inactiva a 40°C; en el otro, ya no es sensible al ácido fusídico (inhibidor)[33]. Es importante resaltar que se utilizará el EGF obtenido de *E. coli* para el desarrollo del presente trabajo.

El EGF es un mensajero que emite señal para que se lleve a cabo el crecimiento celular, y es liberado por las células en las zonas de crecimiento activo, estimulando su capacidad de división. El mensaje es recibido por un receptor en la superficie celular, que se une a EGF y transmite el mensaje a las proteínas de señalización dentro de la célula[33].

Recientemente se ha descrito que el factor de crecimiento epidérmico estimula a las células madre astrocitarias, a sus precursores secundarios para proliferar y migrar de forma considerable. Estudios *in vitro* muestran que el EGF incrementa la proliferación de los progenitores neurales derivados de la zona subventricular (ZSV: Zona Subventricular, el principal nicho neurogénico del cerebro adulto)[34, 35]. Estudios *in vivo* indican que las infusiones intracerebrales de EGF dan lugar a un incremento en la proliferación celular tanto en las regiones periventriculares como en la ZSV[36-38]. Particularmente, se ha demostrado que la estimulación *in vitro* con EGF provoca que células aisladas de la ZSV proliferen y den origen a un número importante de progenitores oligodendrogiales[39]. Un estudio reciente demostró que la infusión intracerebro-ventricular ininterrumpida durante una semana del EGF genera un gran número de oligodendrocitos en el cuerpo calloso, los cuales derivan de forma muy importante de las células madre subventriculares[40]. Notablemente, estos oligodendrocitos estimulados por el EGF son eficientes en el proceso de reparación



de las lesiones desmielinizantes y pudieran ser una terapia loable para el manejo de estas patologías[41].

No obstante, un inconveniente que se ha observado con la aplicación del EGF es su gran capacidad de difusión dentro del cerebro; de hecho la infusión intracerebro ventricular produce crecimientos celulares aberrantes, denominados pólipos, que protruyen hacia la cavidad ventricular[42]; otro efecto indeseable que se ha observado es la aparición de una gran cantidad de células infiltrantes que se dispersan de forma muy importante por todo el parénquima cerebral[43]. Esto eventos limitan la aplicación del EGF en alguna terapia de restitución celular en modelos desmielinizantes. Al respecto, el modelo más estudiado y eficiente para replicar enfermedades desmielinizantes es el modelo de administración de cuprizona utilizado desde los años 60s, que consiste en: al alimentar roedores con este quelante de cobre se produce una deficiencia del mismo y en consecuencia se origina la desmielinización del sistema nervioso (Doan, et al. 2013), inhibiendo las enzimas mitocondriales dependientes de cobre citocromo-oxidasa y monoamino-oxidasa. En resumen, esta perturbación en el metabolismo energético lleva a apoptosis de oligodendrocitos maduros, sin dañar otro tipo de células en el sistema nervioso central.[43]

Las nanopartículas, por sus propiedades fisicoquímicas específicas, podrían representar un vehículo muy eficiente para favorecer la liberación de EGF dentro del parénquima cerebral; lo cual limitaría la libre difusión del EGF dentro del tejido nervioso y pudiera evitar los crecimientos celulares aberrantes que ahora se observan en regiones cerebrales distantes al sitio de infusión del EGF.

### **1.2.1 Acoplamiento de NPs de Au-EGF**

Las nanopartículas híbridas de oro acopladas con EGF (NPs de Au-EGF) han surgido como una solución a diferentes enfermedades[25], de forma que el diseño de estos biocompositos es importante, así como la consideración de las propiedades de sus componentes. En la figura 4, se muestra una representación esquemática de la





afinidad que a las células no cancerosas: esta especificación homogénea de unión genera una banda de absorción RPS relativamente nítida con respecto a las células no cancerosas. Los resultados sugieren que los espectros de absorción RPS que generan las nanopartículas de oro bioconjugadas con el anti-EGF pueden ser útiles como biosensores moleculares para el diagnóstico y la investigación de las células cancerosas de estar epiteliales orales *in vivo* e *in vitro*[45].

Estudios recientes del acoplamiento, que están relacionado con la energía absorbida por NPS de Au y su fácil bioconjugación, sugieren su uso como agentes fototérmicos selectivos en células cancerosas con cierta orientación molecular, dan a conocer la incubación con dos líneas de células escamosas de carcinoma (HSC 313 y HOC 3 Clon 8) y una línea celular epitelial benigna (HaCaT), se incuban con el receptor del factor de crecimiento anti-epitelial (EGFR) conjugado con NPS de Au, donde son expuestas a un láser continuo de iones de argón. En este experimento se logra observar que las células malignas requieren menos de la mitad de la energía láser para ser eliminadas que las células benignas después de la incubación con el acoplamiento (NPs de Au-EGF)[46].

Hoy en día las NPs de Au son funcionalizadas con múltiples biomoléculas, donde las interacciones varían de acuerdo a los grupos funcionales presentes. Un ejemplo de estas funcionalizaciones es el caso de NPs de Au interaccionando con L-cisteína soportadas en HOPG (Highly Oriented Pyrolytic Graphite), donde se estudian las posibles interacciones que pueden tener. La cisteína es un aminoácido que posee un grupo tiol en la cadena lateral, el cual es capaz de formar enlaces covalentes con las superficies de metal, como el Au. Estos biocompositos han sido empleados en catálisis, en procesos de oxidación selectiva, teniendo un gran potencial, es por ello que han tratado de elucidar sus interacciones, lo cual lo hacen con una técnica potente para descifrar el ambiente químico, pero sobre todo las interacciones de dichos compuestos la cual es XPS. En este estudio comparan la región visible del oro, azufre y nitrógeno, donde se observan ligeros desplazamientos correspondientes a los enlaces de coordinación que surgen entre las NPs de Au y la cisteína[47].



Además de funcionalizaciones de NPs de Au con aminoácidos, se han estudiado como medios de caracterización asistida para aplicaciones biomédicas, observando el efecto de NPs de Au sobre superficies modificadas de amins funcionalizadas en placas de múltiples pocillos (PS) y superficies de vidrio desplazadas (GS); en dicho estudio se pretenden encontrar las interacciones que surgen durante los tratamientos antes y después de hacer uso de las NPs de Au, con XPS, observando cambios en la región visible del oro, así como en la del nitrógeno. Los resultados obtenidos son los siguientes: amins funcionalizadas con PS sin NPs de Au se refleja un pico en la región del Nitrógeno en 400.3 eV; mientras tanto cuando están en asistidas con NPs de Au, la energía aumenta 0.2 eV; esto indica que la adsorción física de NPs Au sobre la superficie de la placa PS aminado, se debe a interacciones electrostáticas y enlaces de hidrógeno, además de que en la región del oro, se ven dos picos uno de 83.8 eV en 4f 7/2, y el otro de 87.4 eV en 4f 5/2, lo cual evidentemente corresponde a la presencia de las NPs de Au en el sistema. Posteriormente comparan estos resultados con la amina funcionalizadas con GS, donde en la región del nitrógeno se registra un pico de 400.5 eV, y en presencia de las NPs de Au disminuye a 400.0 eV; en la región del Au se registran picos de 84.3 eV en 4f 7/2 y el otro de 88.0 eV en 4f 5/2, al mismo tiempo comprueban la presencia de NPs después de tratamientos específicos, lo cual garantiza este método como eficaz para la caracterización en la industria[48].

Al igual que las investigaciones anteriores, surgen novedosos sistemas con propósitos muy prometedores, como: la unión de NPs de Au de tamaños promedio de 5-10 nm con microtúbulos (filamentos de proteína  $\alpha\beta$ -tubulina) para la futura fabricación de bloques de circuitos integrados, ellos resaltan el interés por encontrar interacciones entre sistemas como las proteínas y sistemas metálicos como las NPs de Au. Dentro de los análisis, se establece que los aminoácidos como la histidina, arginina y lisina, poseen posibles sitios de unión con metales<sup>[49]</sup>, y la búsqueda mediante SERS de una variedad de grupos funcionales que pudieran interactuar con las NPs de Au incluyendo imidazol, azufre, anillos aromáticos, amina, y carboxilato; encontrando señales intensas de anillos de imidazol, proponiendo así la interacción potencial con el aminoácido histidina. Por ello se realizaron un análisis de XPS para





identificar la naturaleza de la interacción, en la región visible del Au y del N, antes y después de la funcionalización de las NPs con los microtúbulos, demostrando la presencia del oro metálico; sin embargo, posteriormente se observan picos de menor intensidad al funcionalizarse con los microtúbulos, lo cual asocian con la posible oxidación de las NPs al funcionalizarse. En los espectros de la región visible del nitrógeno, presentan la deconvolución correspondiente a la proteína, donde observan dos picos uno en 400.2 eV y otro en 401.6 eV, las cuales se determinaron como amina y amina protonada; una vez que funcionalizaron los microtúbulos con las NPs el pico a la energía de enlace superior desaparece, dejando un sólo pico a 400.2 eV. La pérdida del pico de energía más alto de unión la asocian a una indicación de que el Au es adsorbido por la carga positiva de la amina, donando electrones a nitrógeno.

En otros estudios sobre interacción de NPs de Au, pero con aminoácidos, se denotan interacciones con aminoácidos básicos como la lisina y ácidos como el ácido aspártico; en donde se dan a conocer mediante UV-Vis, desplazamientos hacia el rojo cuando las NPs se encuentran funcionalizadas, asumen que es debido a la cobertura que se logra a través de funcionalizarse con los aminoácidos; también comentan que podría deberse a agregaciones de las NPs como consecuencia de la modificación de la superficie, mediante XPS se determinó la presencia del oro; y discuten acerca de la deconvolución del nitrógeno haciendo mención a interacciones débiles electrostáticas, tomando en cuenta que la superficie de las NPs está cargada negativamente y la lisina positivamente a pH neutro; mientras tanto determinan fuertes uniones con ácido aspártico[50].

## CAPITULO 2. TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN.

### 2.1 Espectroscopia

Se denomina espectroscopia a la medición de la cantidad de energía radiante que absorbe un sistema químico en función de la longitud de onda de la radiación, basada en la interacción materia – radiación electromagnética, y a las mediciones a una determinada longitud de onda. La teoría ondulatoria de la luz propone la idea de que un haz de luz es un flujo de cuantos de energía llamados fotones; la luz de una cierta longitud de onda está asociada con los fotones, cada uno de los cuales posee una cantidad definida de energía. La longitud de onda,  $\lambda$ , del movimiento ondulatorio por el cual es transmitida la energía radiante varía en un intervalo extremadamente amplio; la magnitud de esta longitud sirve como medio cómodo para clasificar las diversas formas de radiación electromagnética. En la figura 5 se muestra una representación esquemática del espectro electromagnético[51].

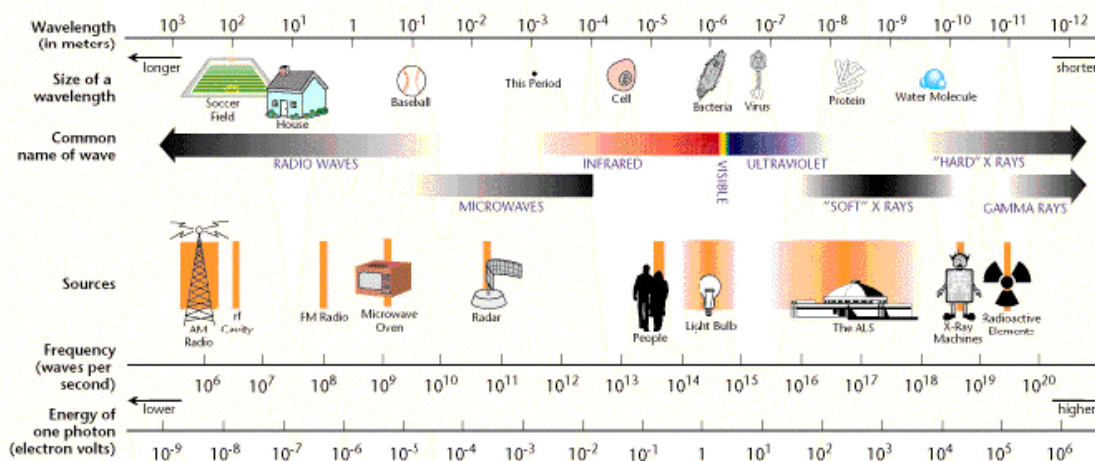


Figura 5. Espectro electromagnético [52].



### 2.1.1 Espectroscopia ultravioleta-visible (UV-VIS)

La espectroscopia UV-VIS es una técnica de absorción que involucra la absorción de luz ultravioleta y visible por parte de una molécula promoviendo el paso de un electrón desde un orbital molecular fundamental a un orbital excitado; es decir, que origina que un electrón sea excitado del orbital de baja energía HOMO al de energía más alta LUMO. Entonces se producen transiciones de electrones desde niveles energéticos bajos a niveles más altos; transiciones entre un orbital enlazante o un par de electrones libres y otro orbital incompleto antienlazante. La separación energética entre estos orbitales moleculares corresponde a las longitudes de onda del visible. Dichas longitudes de onda se encuentran aproximadamente entre 190 y 780 nm (situadas en la zona del ultravioleta visible). En el espectro UV-VIS normalmente sólo se aprecian 2 ó 3 grandes bandas. Las bandas son anchas porque los electrones pueden tener muchos niveles energéticos dependiendo del entorno (vibraciones y/o rotaciones), de manera que lo que se suele representar como un nivel energético en realidad son muchos subniveles y son posibles todas las transiciones.

El espectrofotómetro recoge todas estas pequeñas variaciones de absorción y da una banda ancha. No se da el valor del intervalo sino de la transmitancia máxima. La transmitancia y la absorbancia se miden en un instrumento llamado espectrofotómetro, la solución del analito se debe contener en algún recipiente transparente, tubo o celda[51].

En un espectrofotómetro, la luz de una fuente continua pasa a través de un monocromador (un prisma, rejilla de difracción o filtro), el cual aísla las radiaciones de las longitudes de onda deseadas a partir de las radiaciones heterocromáticas que inciden o se reflejan desde el objeto, seleccionando así una banda estrecha de longitudes de onda de luz incidente. Esta luz monocromática atraviesa una muestra



de espesor conocido, contenida en una celda o cubeta fabricada con material que permite el paso de la radiación en la región espectral que interesa, para luego medir la potencia radiante de la luz que sale por medio de un detector. La figura 6 muestra esquemáticamente este proceso.

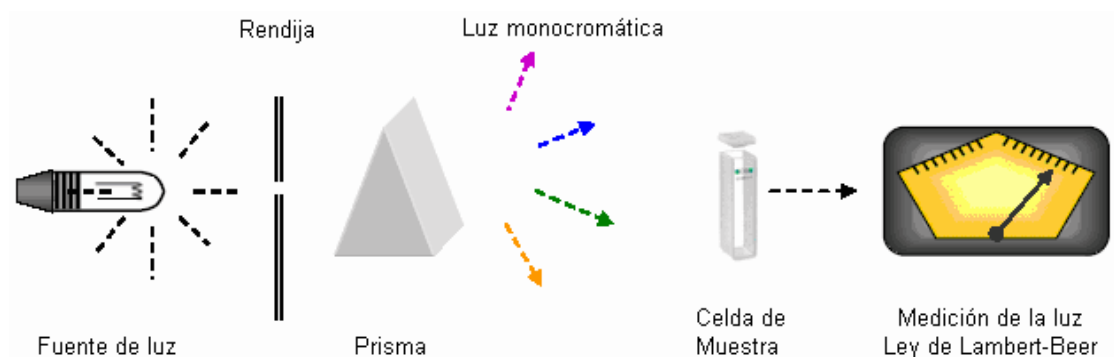


Figura 6. Diagrama esquemático del aparato usado para métodos analíticos basados en la absorción de energía radiante[51].

La fuente de luz en un espectrofotómetro por lo general es una lámpara de tungsteno de bajo voltaje, la cual emite en forma continua una región del espectro, la intensidad de esa radiación varía de forma gradual con la longitud de onda. El monocromador tiene como componentes principales una ranura de entrada, un elemento que dispersa la luz en sus longitudes de onda componentes (en general una red de difracción), y una ranura de salida que permite seleccionar la longitud de onda deseada, la cual permite que sólo una banda estrecha de éstas pueda pasar a través de la muestra. El detector es un fototubo que se utiliza para convertir la señal luminosa en señal eléctrica, y así transmitir informaciones al procesador de señal, el cual permite efectuar lecturas de transmitancia y absorbancia[51].



### **2.1.2 Espectroscopia infrarroja con la transformada de Fourier**

La espectroscopia infrarroja es una técnica muy poderosa que proporciona información cualitativa e incluso cuantitativa sobre las moléculas. Data comercialmente desde 1940 con elementos dispersivos con prismas, estudios más interesantes en la espectroscopia de infrarrojo surgen cuando se incorpora la transformada de Fourier y la sustitución de los elementos dispersivos por interferómetros. La radiación electromagnética infrarroja no tiene energía suficiente para producir transiciones electrónicas en las moléculas; su energía es similar a las pequeñas diferencias energéticas entre los distintos estados vibraciones y rotacionales existentes en la mayoría de las moléculas; por ello, es una herramienta especialmente atractiva para el análisis estructural en química orgánica e inorgánica[53]. Existen varias zonas en la región infrarroja que permiten determinar grupos funcionales en las moléculas con una gran precisión. En la figura 7, se recogen dichas regiones, junto con los grupos funcionales más característicos.



Enlace	Frecuencia de tensión	Forma e intensidad
	Zona 1: 3700-3200 $\text{cm}^{-1}$	
Alcohol O-H	3650 -3200 $\text{cm}^{-1}$	Fuerte y ancha
Alquino $\text{C}\equiv\text{C}-\text{H}$	3340 - 3250 $\text{cm}^{-1}$	Fuerte y fina
Amina o amida N-H	3500 - 3300 $\text{cm}^{-1}$	Media, con frecuencia ancha
	Zona 2: 3200-2700 $\text{cm}^{-1}$	
Aril o vinil $\text{sp}^2$ C-H	3100 - 3000 $\text{cm}^{-1}$	Variable
Alquil $\text{sp}^3$ C-H	2960 - 2850 $\text{cm}^{-1}$	Variable
Aldehído C-H	2900, 2700 $\text{cm}^{-1}$	Medio, dos picos
Acido carboxílico O-H	3000 - 2500 $\text{cm}^{-1}$	Fuerte, muy ancha
	Zona 3: 2300 - 2000 $\text{cm}^{-1}$	
Alquino $\text{C}\equiv\text{C}$	2260 - 2000 $\text{cm}^{-1}$	Fina y variable
Nitrilo $\text{C}\equiv\text{N}$	2260 - 2220 $\text{cm}^{-1}$	Fina y variable
	Zona 4: 1850-1650 $\text{cm}^{-1}$	
Cetone C=O	1750 - 1705 $\text{cm}^{-1}$	Fuerte
Ester C=O	1750 - 1735 $\text{cm}^{-1}$	Fuerte
Aldehído C=O	1740 - 1720 $\text{cm}^{-1}$	Fuerte
Acido carboxílico C=O	1725 - 1700 $\text{cm}^{-1}$	Fuerte
Amida C=O	1690 - 1650 $\text{cm}^{-1}$	Fuerte
	Zona 5: 1680 - 1450 $\text{cm}^{-1}$	
Alqueno C=C	1680 - 1620 $\text{cm}^{-1}$	Variable
Benceno C=C	1600 y 1500-1450 $\text{cm}^{-1}$	Variable; 1600 $\text{cm}^{-1}$ dos picos
	Zona 6: 1300-700 $\text{cm}^{-1}$	

Figura 7. Frecuencias de vibración de IR características de distintos grupos funcionales[53]

La Espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier, también llamada FTIR (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*), se desarrolló para solventar las limitaciones de los instrumentos dispersivos, en particular el lento proceso de barrido; la solución consistió en el empleo de un dispositivos óptico muy simple, llamado interferómetro. El interferómetro produce un tipo de señal único (interferograma) que contiene todas las frecuencias infrarrojas codificadas; la señal se puede medir de forma rápida, en unos cuantos segundos. Un equipo FTIR consta de dos partes; una parte (operación mecánica), codifica y modula la información espectral empleando un interferómetro de Michelson; y la otra parte (operación



matemática), procede al procesado de la información codificada para producir el espectro (descodificación), como se muestra en la figura 8.

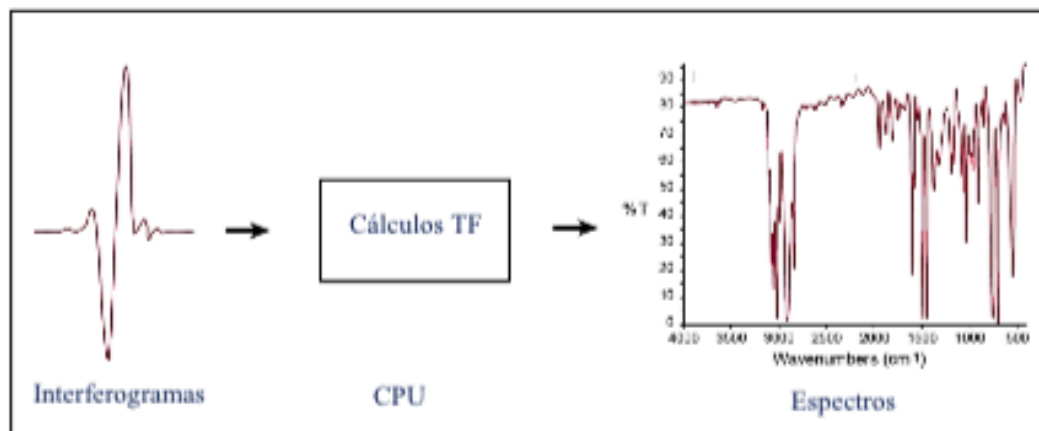


Figura 8. Transformación del interferograma en espectro.

Como todo el espectro IR se mide de forma continua, todos los analitos activos en IR se pueden identificar y determinar su concentración.

### 2.3 Espectroscopia de Fotoelectrones por Rayos X

El XPS es una técnica espectroscópica de fotoelectrones que figura como una poderosa y versátil técnica cuantitativa no destructiva, que se usa para analizar la superficie de los sólidos (20 a 30 Å de profundidad). Las bases de esta técnica yacen en la explicación de Einstein del efecto fotoeléctrico[54].

En un experimento de XPS, la superficie a ser analizada se pone primero en un ambiente de ultra alto vacío ( $> 10^{-9}$  torr) y luego se irradia con un haz de rayos X de aproximadamente 1keV de energía, causando con ello la fotoemisión de electrones pertenecientes a los niveles profundos (principalmente) y a los niveles de valencia de los átomos de la superficie. Los niveles profundos se definen como las capas cuánticas internas que no participan en el enlace químico, mientras que



los niveles de valencia están constituidos por los electrones que participan en el enlace químico del átomo. Es necesario mencionar que en un experimento de XPS las variables que se miden son el número de electrones emitidos y la energía cinética de los mismos; con estos datos se registra un espectro de fotoelectrones que consiste en un gráfico XY, en la ordenada aparece el número de electrones (intensidad) y en el eje X aparece la energía cinética (o de enlazamiento), tal como se muestra en la figura 2.28[55]. Adicionalmente, en un espectro de XPS los picos de fotoemisión se etiquetan con números cuánticos de la siguiente forma:

$$nlj$$

Con “n” el número cuántico principal, “l” el número cuántico orbital y “j” el momento angular total.

La espectroscopia de fotoelectrones por rayos X puede proporcionar, bajo ciertas condiciones favorables, información sobre algunas de las propiedades físicas, químicas y electrónicas de la superficie bajo estudio. El interés técnico de esta información es enorme en campos como la catálisis, corrosión, tratamientos de superficies de vidrios. Una de las características más importante de la técnica XPS es que en algunas ocasiones permite diferenciar distintos estados de oxidación y/o situaciones del entorno (coordinación) de los átomos en las muestras sólidas analizadas, así como el estudio de perfiles de composición, combinando la técnica con el devastado iónico en el cual se emplean iones de argón  $Ar^+$  acelerados. Un entendimiento de efecto fotoeléctrico es esencial para poder apreciar el método de análisis superficial XPS. Cuando un fotón impacta con un átomo, dependiendo de su energía, puede ocurrir uno de los tres eventos siguientes[56]:

- El fotón puede ser desviado por un electrón de un orbital atómico, conduciendo a una pérdida parcial de energía, lo cual se conoce como Efecto Compton.





- El fotón puede interactuar con el átomo y conducir a la producción de un par electrón-positrón.
- El fotón puede interactuar con un electrón de un orbital atómico y transferir toda su energía al electrón, produciendo de esta manera la emisión del electrón por el átomo.

El tercer proceso describe correctamente la fotoemisión de un electrón. La física básica de este proceso para un átomo libre se puede explicar por la relación de Einstein.

$$h\nu = EK + EB , \quad (1)$$

Donde “ $h\nu$ ” es la energía del fotón excitante, “EK” es la energía cinética del electrón emitido, y “EB” es la energía de enlace o ligadura del electrón en el átomo, la cual se define como la energía positiva necesaria para remover el electrón del átomo y ponerlo a una distancia  $r = \infty$  de éste. La figura 9 da a conocer el proceso de fotoemisión de un átomo aislado.

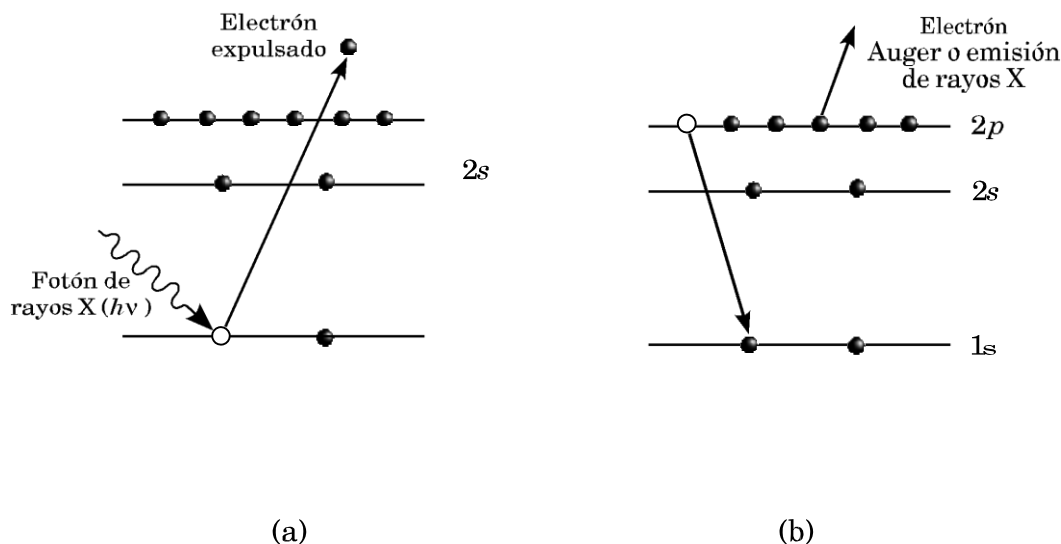


Figura 9. Proceso de fotoemisión para un átomo aislado. (a) un átomo que posee en su estado inicial  $n$  electrones, es impactado por un fotón de rayos X que le transfiere su energía a un electrón de un nivel profundo, conduciendo a la fotoemisión de dicho electrón. (b) el átomo ahora en un estado de  $n-1$  electrones puede reorganizarse por la caída de un electrón de un nivel de energía más alto al hueco formado en el nivel profundo. Puesto que el electrón cae a un estado



*de energía menor, el átomo puede disminuir el exceso de energía expulsando un segundo electrón (electrón Auger) o emitiendo un fotón de rayos X.*

En los sólidos, la presencia de la superficie hace que una energía adicional se deba aplicar para remover un electrón desde un nivel de energía de un átomo perteneciente al sólido, hacia el exterior del material. Esta energía adicional se llama función trabajo,  $\phi$ , y se define como la mínima energía requerida para llevar un electrón del nivel de Fermi al nivel de vacío[54, 57]. Se sabe que un átomo dentro de un sólido está sometido a múltiples interacciones, cosa que complica el proceso de fotoemisión de un sólido, ya que dicho proceso se traduce en un problema de muchos cuerpos en donde el electrón excitado puede experimentar procesos inelásticos en el volumen (bulk) del material[58].

## **2.4 Microscopia Electrónica de Transmisión (MET)**

Un microscopio electrónico de transmisión utiliza un haz de electrones para visualizar un objeto, ya que la potencia amplificadora de un microscopio óptico está limitada por la longitud de onda de la luz visible, esto se debe a que los electrones tienen una longitud de onda mucho menor que la de luz. El microscopio electrónico de transmisión consiste fundamentalmente de un cañón de electrones (su fuente de iluminación), lentes condensadoras, lentes objetivas, lentes intermedias y lentes proyectoras. El cañón electrónico es la única lente electrostática que tiene el microscopio electrónico; las demás son lentes electromagnéticas. En la figura 10 se presentan esquemáticamente los componentes del microscopio electrónico de observar, existe una fuente análoga en los procesos de formación de imágenes transmisión convencional. Como se puede observar, existe una fuente análoga en los procesos de formación de imágenes de los microscopios electrónicos y ópticos.

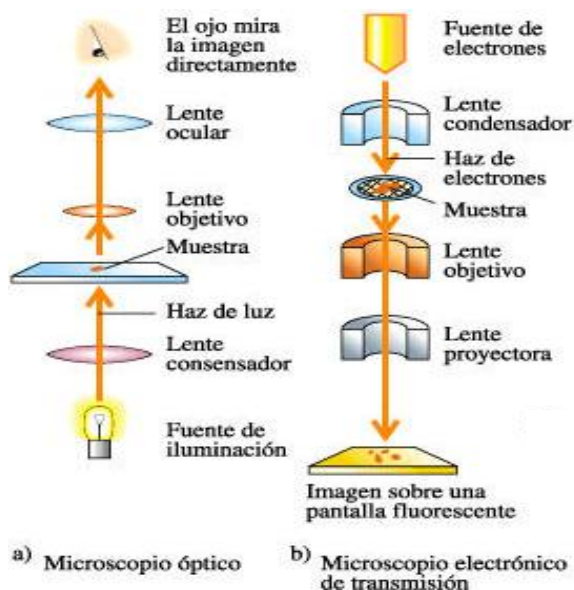


Figura 10. Comparación del proceso de formación de la imagen entre un microscopio óptico (a) y un microscopio electrónico de transmisión (b).

La amplificación de la imagen es llevada a cabo de la siguiente manera: la imagen producida por la lente objetiva sirve como objeto para la lente intermedia, la cual producirá una segunda imagen, que a su vez es amplificada por la lente proyectora para producir la imagen final en la pantalla o en una placa fotográfica.

Cuando un haz de electrones interactúa con la muestra se producen varios tipos de señales, que nos permiten hacer la caracterización estructural y química de ésta. Las señales son: electrones retrodispersados, secundarios, absorbidos, Auger, transmitidos y rayos X característicos. La figura 11 muestra esquemáticamente la interacción del haz electrónico- muestra y las señales que se originan.

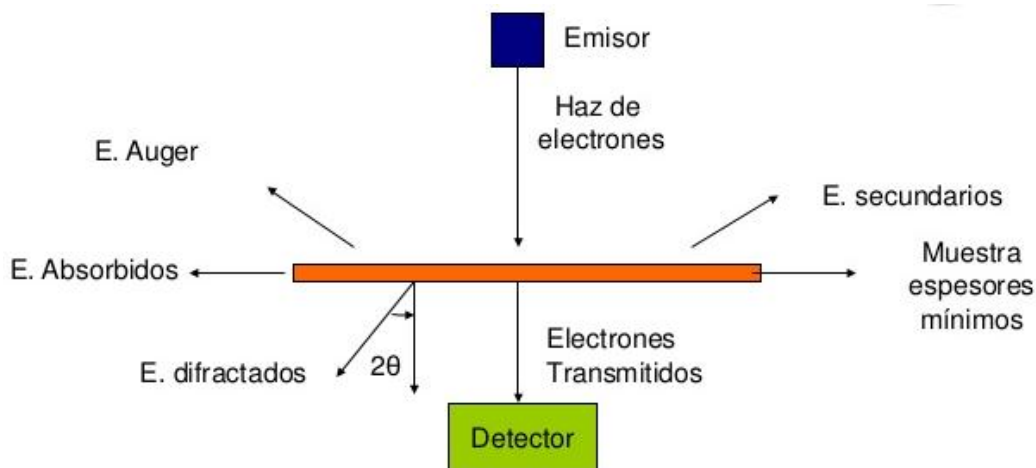


Figura 11. Tipos de señales que se producen durante la interacción del haz electrónico con la muestra.

Los electrones retrodispersados y secundarios nos dan información sobre la superficie de la muestra, permitiendo obtener una imagen topográfica de ella. Los electrones absorbidos, con el detector adecuado, nos dan información sobre la resistividad de la muestra. Los electrones Auger y los rayos X característicos dependen de la composición química de la muestra, permiten hacer un análisis químico de ella. Los electrones que atraviesan la muestra los podemos clasificar en dos tipos: transmitidos, aquellos que pasan la muestra sin ser desviados de su dirección incidente; y difractados, aquellos que son desviados de su dirección de incidencia. Los haces transmitidos y difractados son los que usa la lente objetiva para formar la imagen de la muestra en un microscopio electrónico de transmisión, como ellos pasan a través de la muestra, portan información sobre las características estructurales de ésta. Si en lugar de enfocar el plano-imagen de la lente objetiva para observar la imagen de la muestra, enfocamos el plano focal de esta, lo que se observa es un arreglo de puntos luminosos que no son más que el arreglo de los haces difractados y transmitidos, este arreglo recibe el nombre de patrón de difracción. El análisis del patrón de difracción nos permitirá hacer el



estudio de la estructura atómica de la muestra. De hecho los patrones de difracción son la huella digital de esta[59].

## 2.5 Potencial Z

Dentro de los fenómenos que ocurren en la dinámica coloidal, uno de los que mayor influencia tiene en el comportamiento de la suspensión es el potencial Z, éste es la medida de la diferencia de potencial que se genera entre la carga electromagnética que tienen las partículas en su superficie y la nube de electrones que la rodea, el valor y su signo depende las características propias de las partículas y la fuerza iónica presente en la fase acuosa.

El coloide negativo y su atmósfera cargada positivamente producen un potencial eléctrico relativo a la solución; éste tiene un valor máximo en la superficie y disminuye gradualmente con la distancia, aproximándose a cero fuera de la capa difusa. La caída del potencial, y la distancia desde el coloide es un indicador de la fuerza repulsiva entre los coloides en función de la distancia a las cuales estas fuerzas entran en juego.

Un punto de particular interés es el potencial donde se unen la capa difusa y la de Stern. Este potencial es conocido como el potencial zeta, el cual es importante porque puede ser medido de una manera muy simple, mientras que la carga de la superficie y su potencial no pueden medirse. El potencial zeta puede ser una manera efectiva de controlar el comportamiento del coloide puesto que indica cambios en el potencial de la superficie y en las fuerzas de repulsión entre los coloides.



## HIPOTESIS

---

Mediante técnicas espectroscópicas se podrán elucidar las interacciones entre las NPs de Au y el EGF.

## OBJETIVOS

---

### OBJETIVO GENERAL

Determinar mediante técnicas espectroscópicas las interacciones entre NPs de Au / EGF.

### OBJETIVOS PARTICULARES

- Sintetizar NPs de Au con tamaños menores de 50 nm y caracterizar con las técnicas TEM, UV-Vis.
- Acoplar las NPs de Au con el EGF y caracterizar por UV-Vis.
- Caracterizar estructuralmente el EGF, y el acoplamiento con FTIR.
- Determinar la interacción entre las nanopartículas de Au y el EGF por medio de XPS.



## CAPITULO III. METODOLOGÍA

### 3.1 Síntesis

#### 3.1.1 Síntesis de las NPs de Au

Las NPs de Au fueron sintetizadas por el método de reducción con citrato, el cual consiste en usar como precursor de Au una suspensión coloidal de  $\text{HAuCl}_4$  al 1% en 100 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  desionizada a punto de ebullición, agregando rápidamente en el matraz con agitación 5.0 ml de solución de citrato de sodio (0.05M en 50 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  desionizada) donde los iones de citrato actúan como un agente reductor. La formación de las partículas ocurre mediante la reducción del  $\text{Au}^{3+}$  a  $\text{Au}^{1+}$  por la oxidación del citrato de trisodico a acetona dicarboxílica, esta última se descompone con la temperatura a que se lleva a cabo la reacción. Los átomos de  $\text{Au}^0$  se forman por la disminución desproporcional de  $\text{Au}^{1+}$ , lo que conlleva a una reacción de oxidación-reducción del  $\text{Au}^{1+}$ [60], Dicha mezcla se calienta continuamente durante 20 min, hasta obtener un color rojo intenso, lo cual indica la presencia de NPs de Au[46].

#### 3.1.2 Preparación del acoplamiento de NPs de Au / EGF

Las NPs de Au recubiertas con EGF fueron preparadas de acuerdo al método descrito por Sokolov, *et al.*, 2006. Las NPs de Au obtenidas se diluyeron en una solución buffer 20 mM de HEPES (pH 7.4, Sigma-Aldrich) hasta obtener una densidad óptica final de 0.8 a 530 nm. 50  $\mu\text{L}$  de EGF (Sigma-Aldrich); posteriormente, se disuelven en 500  $\mu\text{L}$  de la misma solución buffer HEPES, para mantener las condiciones fisiológicas de la proteína; después, 10 ml de la solución



de Au preparada previamente se mezclaron con la solución diluida de EGF por 20 min.; luego, 0.5 mL de polietilenglicol al 1% (MW=4000, Boheringer) se agregaron a la mezcla para prevenir su agregación y la mezcla se centrifugó a 6000 rpm por 18 min.; por último, el biocomposito de NPs de Au/EGF se redisperso en el buffer PBS (pH 7.4) con el fin de mantener el pH del acoplamiento almacenándose a 4 °C.

## **3.2 Caracterización**

### **3.2.1 Caracterización de las NPs de Au con y sin EGF mediante UV-Vis**

Las propiedades ópticas de las NPs de Au con y sin acoplamiento de EGF se obtuvieron empleando la espectroscopia UV-Vis, con un equipo Varian Cary 5000 de doble haz, diluyendo 1 ml de NPs de Au y del acoplamiento (NPs de Au / EGF) en H<sub>2</sub>O desionizada hasta llenar la celda del equipo; posteriormente se analizó en un intervalo de 200-800 nm, en modo de absorción, con una resolución de 1 nm.

### **3.2.2 Caracterización morfológica de NPs de Au con y sin EGF**

Se caracterizaron las propiedades estructurales de las nanoestructuras formadas, tales como morfología, tamaño de partícula y distribución de las mismas, para ello se empleó un Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM) JEOL-2100 de 200 kV con filamento de LaB<sub>6</sub>. Se colocó una gota de las NPs de Au y del biocomposito (NPs de Au / EGF) en una rejilla y se dejó secar por 20 min, posteriormente se introdujo al equipo, analizándola de acuerdo a lo reportado por Sokolov, *et al.*, 2006.





### **3.2.3 Caracterización del EGF con y sin NPs de Au mediante FTIR**

Con ayuda de la técnica FTIR y del equipo Bruker, modelo TENSOR 27, se identificaron los grupos funcionales que están presentes en esta proteína, también se verificó la presencia de las NPs de Au en el biocomposito (NPs de Au / EGF) colocando una gota sobre el dispositivo de análisis y operando bajo condiciones estándar. La resolución del equipo fue de  $8 \text{ cm}^{-1}$ .

### **3.2.4 Determinación de la interacción entre nanopartículas de Au y EGF**

Los espectros de XPS fueron adquiridos usando un JEOL JPS-9200, equipado con una fuente de Mg (1253.6 eV) a 300 W, el área de análisis fue de  $3 \text{ mm}^2$ , y el vacío fue del orden de  $7,5 \times 10^{-9}$  Torr para todas las muestras. Los espectros se analizaron mediante el software specsurf™ incluido con el instrumento, en todos los espectros la carga fue corregida por medio de la señal de carbono accidental (C1s) a 284,5 eV. El método Shirley se utilizó para la sustracción de fondo, mientras que se utilizó el método de Gauss-Lorentz para la curva.

### **3.2.4 Caracterización con Potencial Z**

Se determinó la carga de las NPs de Au y del acoplamiento (NPs de Au-EGF), con ayuda del equipo Zetasizer 2000 (Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, Reino Unido). El voltaje aplicado a los electrodos de accionamiento de la celda de electroforesis capilar era 150 V. La muestra se preparó inyectando 2 ml aproximadamente de solución en la celda.



## CAPITULO IV-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Síntesis de NPs de Au

Se realizó la síntesis de NPs de Au, obteniendo una solución coloidal color rojo intenso (figura 12), este color se atribuye al tamaño de las nanopartículas, debido a que las NPs esféricas y cuasiesféricas de Au tienen un color rojo característico, en contraste con las NPs de Au en forma de rodillos que presentan colores diferentes, corroborando lo reportado por El-Sayed, *et al.* (2006). Los estudios más recientes han demostrado que el color de la solución coloidal se debe a la oscilación colectiva de los electrones en la banda de conducción, a esto se le conoce como la resonancia del plasmón de superficie[61].

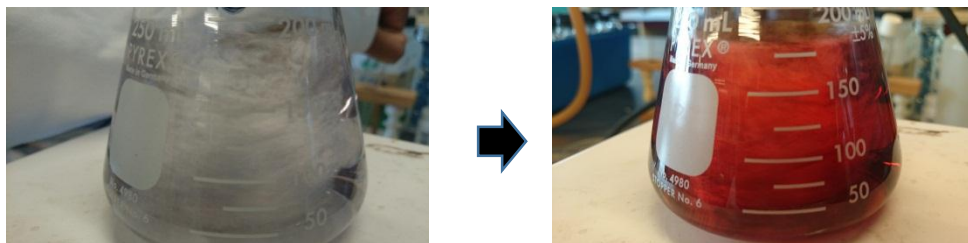


Figura 12. Solución coloidal de NPs de Au.

#### 4.1.1 Espectroscopia UV-Vis de NPs de Au

En el espectro que se obtuvo de UV-Vis de las NPs de Au (figura 13) se registró sólo una banda de absorción máxima en 520 nm, de acuerdo a lo reportado por El-Sayed, *et al.* (2008); la banda con el máximo de absorbancia en 530 nm, corresponde a un tamaño de partícula de NPs de Au de 40 nm. Sokolov *et al.* (2005); reportan un pico máximo de absorción en 540 nm, obteniendo NPs de Au con un tamaño promedio de 50nm.; Liz-Marzán (2004) establece que el número de bandas representa la morfología de las nanopartículas; es decir, la presencia de una banda en el espectro, refiere morfología esférica y cuasiesférica, mientras tanto la



presencia de dos bandas de absorbancia en el espectro reflejan una morfología de nanopilares[61]. Por lo que se asume que la morfología de las NPs de Au sintetizadas es esférica o cuasiesférica.

Los corrimientos del pico máximo de absorción hacia el rojo aumenta el tamaño de las nanopartículas. Este fenómeno ocurre debido a la oscilación colectiva de los electrones en un campo electromagnético, ya que entre mayor sea el tamaño de la nanopartícula, por consiguiente, se registrara una mayor oscilación[20, 46].

*Figura 13. Espectro UV-Vis de las nanopartículas de Au obtenidas.*

#### **4.1.2 Microscopia electrónica de transmisión de NPs de Au**

En las micrografías (figura 14) observamos que si hay presencia de NPs de Au sintetizadas a partir de citrato de sodio, se identifica una morfológica cuasiesférica (figura 14a), además de corroborar que son uniformes y menores a 50



nm. En el patrón de SAED (figura 14b) se observa una pequeña población de las NPs de Au obtenidas, además de los anillos de difracción fueron indexados a (111), (220) y (311) de acuerdo a los planos de difracción de la estructura cúbica de metal de oro de acuerdo con el patrón de XRD característico de oro que corresponden a archivo JCPDS: 004-0784.

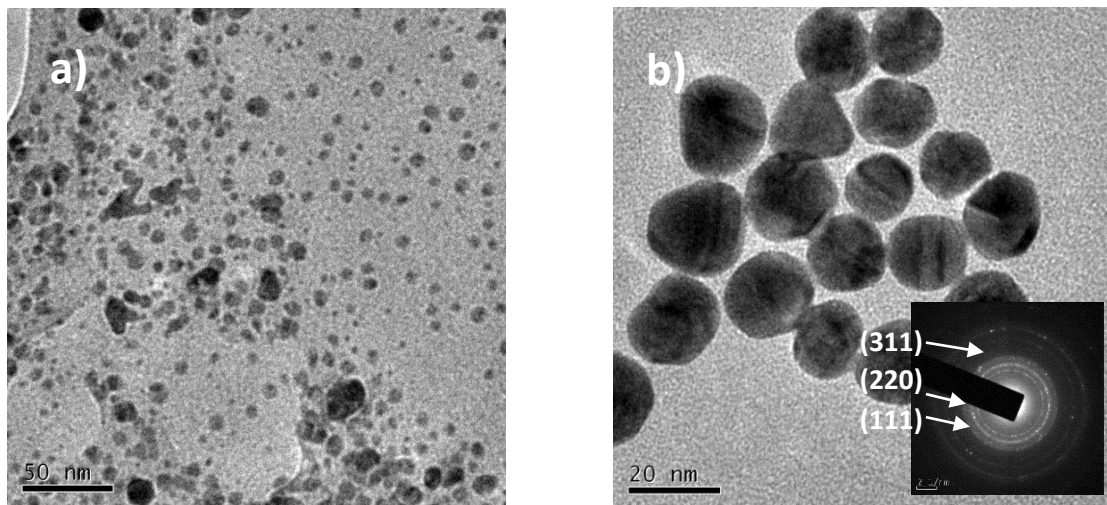


Figura 14. Micrografías obtenidas por MET de las nanopartículas de Au obtenidas.

El tamaño promedio de las NPs de Au es de 8.09 nm, con una desviación estándar de 3.60 (figura 15), el tamaño de las partículas obtenidas fueron los que se esperaban (tamaños menores a 50 nm), ya que estos brindan mejores propiedades ópticas[62] y biocompatibles[20, 46].

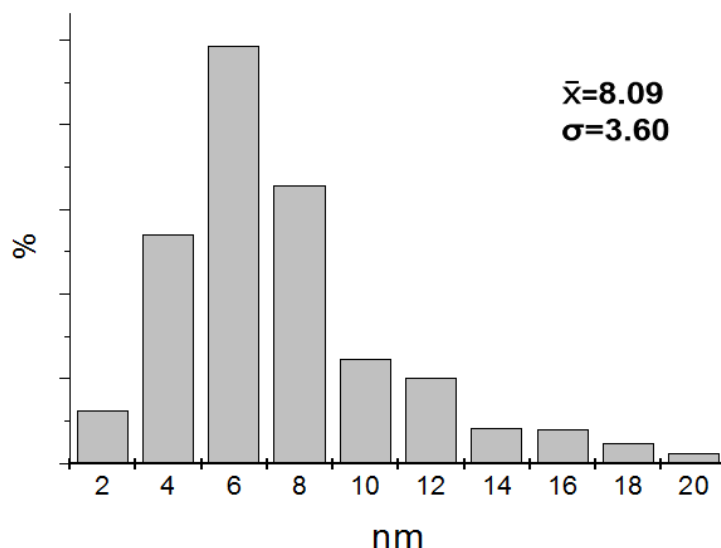


Figura 15. Histograma de frecuencias del tamaño de pa

## 4.2 Acoplamiento de las NPs de Au con EGF

Se lograron acoplar las NPs de Au y el EGF con el fin de identificar la naturaleza de la interacción que existe entre ambos componentes, el acoplamiento se puede distinguir al formarse un precipitado después de centrifugar la mezcla (figura 16), al que posteriormente nos referiremos como bionanocomposito. Una de las características del bionanocomposito es la sensibilidad a cambios de pH y temperaturas altas, debido a que al sobrepasar los 40°C, se desnaturaliza la proteína EGF[63]. Por lo que se sugiere regular el pH y almacenar a 4°C para evitar su desnaturalización.



Figura 16. Bionanocomposito (NPs de Au-EGF).

#### 4.2.1 Espectroscopia UV-Vis del Bionanocomposito

En el espectro UV-Vis del bionanocomposito (figura 17) observamos un corrimiento hacia el rojo de 6 nm, comparándolo con el espectro de las NPs de Au sin acoplar (Figura 13); Joshi, *et al.* (2004) asocian este corrimiento a la cobertura que se obtiene al funcionalizarlas con otros agentes, en este caso las proteínas y aminoácidos, líneas celulares[45], etc. Además de que también se puede deber a agregaciones de las NPs como consecuencia de la modificación de la superficie[50].

Figura 17. Espectro UV-Vis del bionanocomposito (NPs de Au-EGF).



#### 4.2.2 Microscopia electrónica de transmisión del bionanocomposito

En las micrografías del bionanocomposito (figura 18) observamos una buena distribución de tamaños de partícula; las NPs de Au conservan su morfología, pese a que se encuentran acopladas al EGF. En el histograma (figura 19) se observa un aumento del tamaño promedio de partícula, con respecto al obtenido con las NPs recién sintetizadas, el cual es de 8.09 nm, con una desviación estándar de 3.60. Al acoplar las NPs de Au con el EGF, el tamaño promedio de partícula resulta de 9.14 nm y se tiene una desviación estándar de 5.28, sin embargo los datos se encuentran dentro de la desviación estándar, además de que posterior a la síntesis de NPs de Au, se agregaron diferentes sustancias como: PEG, y buffers como el PBS y el HEPES, los cuales garantizaran la estabilidad del acoplamiento (NPs de Au-EGF).

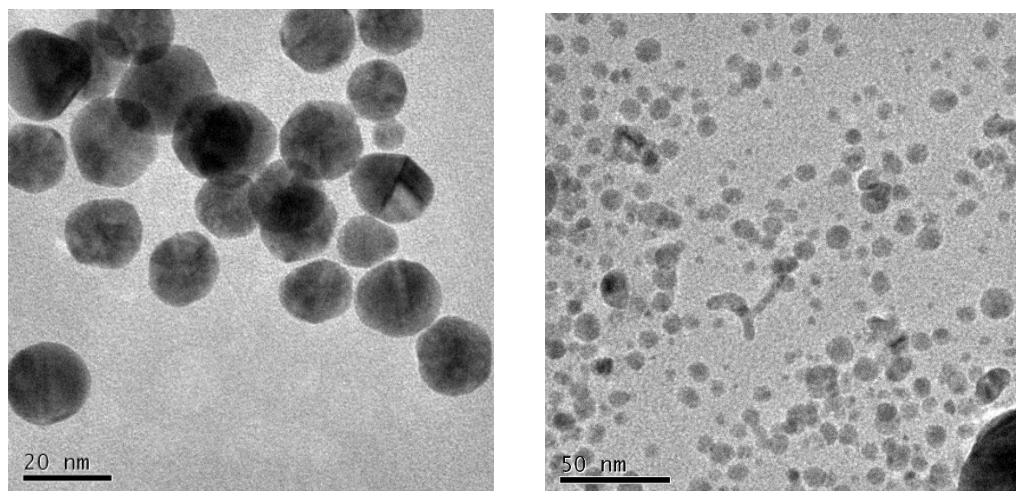


Figura 18. Micrografías obtenidas por MET del bionanocomposito (NPs de Au-EGF).

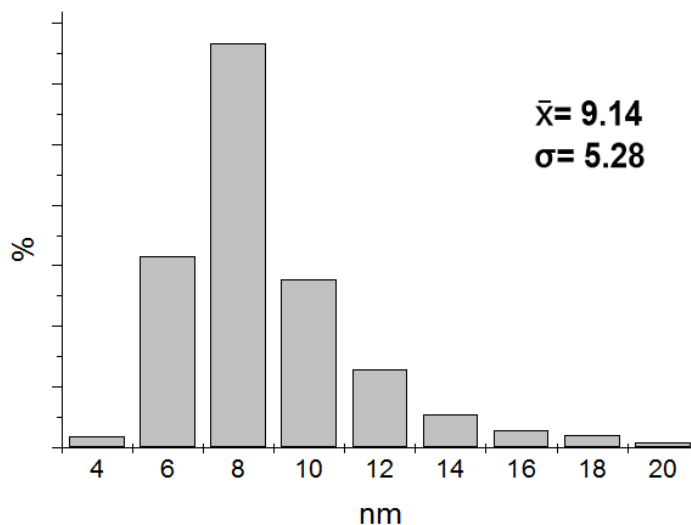


Figura 19. Histograma de frecuencias del tamaño de partícula

### 4.3 Caracterización del EGF con y sin NPs de Au por FTIR

El espectro FTIR de una proteína se considera como una suma lineal de los espectros de sus cambios conformacionales. Existen numerosas correlaciones muy bien establecidas entre los espectros infrarrojos para estructuras particulares de proteínas[64].

La estructura de las proteínas como el EGF se caracterizan por nueve bandas de absorción en el infrarrojo[64, 65]. De acuerdo al espectro FTIR obtenido para el EGF (figura 20), las bandas se asignaron de la siguiente manera: la banda que se encuentran en  $3325 \text{ cm}^{-1}$  se asignó a la vibración característica del grupo NH(estiramiento)[66]. Las bandas que se encuentran en  $1652 \text{ cm}^{-1}$  y  $1618 \text{ cm}^{-1}$ , se asocian a las amidas[67], las cuales se consideran las más importantes bandas de la vibración del esqueleto de las proteínas, siendo la banda amida ( $\tilde{\nu}$  entre  $1700\text{-}1600 \text{ cm}^{-1}$ ) la más representativa, se le asocia a la vibración de estiramiento del grupo C=O del enlace peptídico. La banda amida también está asociada a la vibración en el plano del grupo NH (flexión) principalmente y del grupo CN





(estiramiento)[68-70]; se observan pequeñas bandas de vibración en  $1397\text{ cm}^{-1}$  y  $1260\text{ cm}^{-1}$  [69] que corresponden a amidas. Además, se observan las bandas de vibración grupos amino y grupos carboxilos en  $1584\text{ cm}^{-1}$  (flexión) y  $1460\text{ cm}^{-1}$  (estiramiento), siendo estos los grupos característicos de los aminoácidos que contiene la proteína [71].

Como se observa en la figura 20, en el espectro del bionanocomposito (NPs de Au-EGF), la banda correspondiente los grupos OH del HEPES (ácido 4- (2-hidroxietil) - 1-piperazinetanosulfónico) aparece en los  $3446\text{ cm}^{-1}$  (estiramiento), se identificaron en  $1618\text{ cm}^{-1}$  y  $1320\text{ cm}^{-1}$  (estiramiento) bandas características de grupos carboxilato, debido a la presencia del citrato de sodio como pasivante de las NPs; Además, surge una banda intensa en  $1179\text{ cm}^{-1}$  (estiramiento) correspondiente al grupo sulfónico del HEPES; también hay una banda intensa en  $1074\text{ cm}^{-1}$  (estiramiento) que corresponde a las vibraciones del grupo éter C-O-C (estiramiento), el cual se asocia con la banda principal de absorción característico de moléculas de PEG [72]. Esta banda también concuerda con la vibración del enlace C-N presente en la proteína, lo cual podría explicar su intensidad.

Aun cuando mediante FTIR no es posible determinar algún tipo de interacción entre las NPs de Au y el EGF, si es posible aseverar que existe un acoplamiento entre EGF y NPs de Au debido a las diferencias entre los espectros FTIR de los componentes antes y después de acoplarlos.

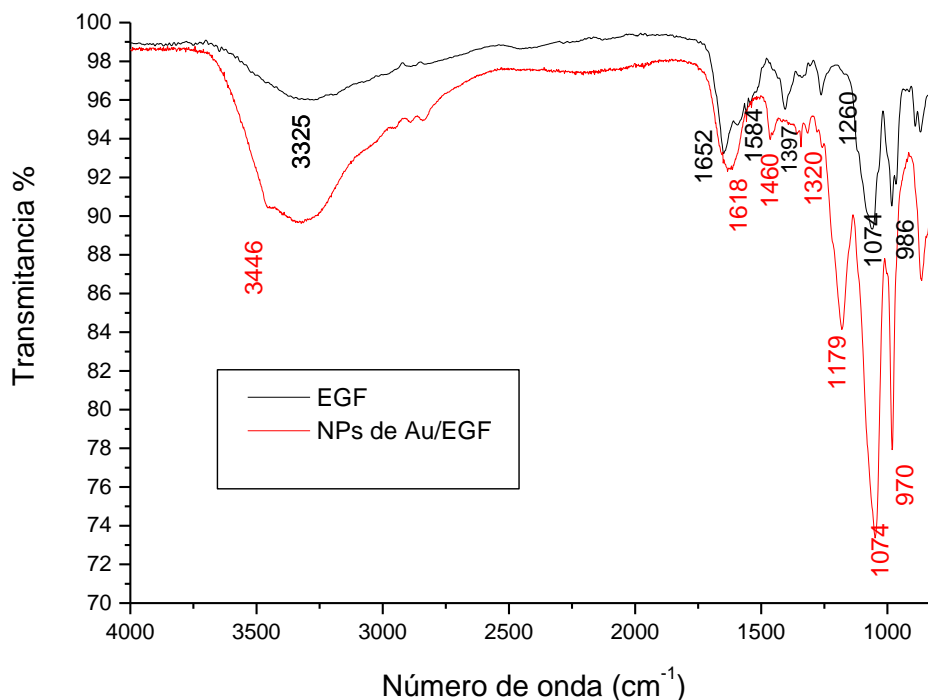


Figura 20. Espectros de IR de la proteína EGF y de las nanopartículas de Au acopladas con la proteína EGF.

#### 4.4 Caracterización por Espectroscopia Fotoelectrónica de Rayos X (XPS) y Potencial Z

De acuerdo al tipo de síntesis llevada a cabo, se espera que las NPs de Au estén rodeadas de una capa de moléculas de citrato. Lo anterior, es comprobado por el valor de potencial Z de -30 mV para las NPs de Au, que implica que efectivamente las nanopartículas deben tener una capa de cierto grosor de moléculas de citrato y que sirve también para su estabilidad en solución[73].

Cuando se genera el bionanocompuesto de NPs de Au-EGF, las moléculas de EGF, por su naturaleza química, deben entonces llevar a cabo dos procesos principales



de anclaje en las NPs de Au pasivadas con citrato. El primer proceso consiste en la interacción de tipo electrostático entre los grupos carboxilato del citrato y grupos funcionales del tipo amonio del EGF, o algún otro tipo de grupo funcional con carácter catiónico, que pudieron haberse generado durante el procedimiento experimental de acoplamiento (ver parte experimental). Esta interacción electrostática entre biomoléculas de tipo proteico y moléculas de citrato pasivantes de nanopartículas metálicas han sido reconocidas previamente por otros investigadores[74, 75]. Este primer tipo de interacción es comprobado en este trabajo por el valor obtenido de -7 mV del potencial Z para el bionanocomposito. Es decir, la magnitud de la carga negativa presente en los carboxilatos de las moléculas de citrato que rodean a las NPs de Au se reduce considerablemente cuando se lleva a cabo el acoplamiento del EGF, debido, principalmente, a la interacción electrostática entre los carboxilatos y los grupos funcionales catiónicos que se hubieran generado en el EGF durante la metodología de acoplamiento empleada, disminuyendo así la carga negativa superficial en el sistema NPs de Au– EGF.

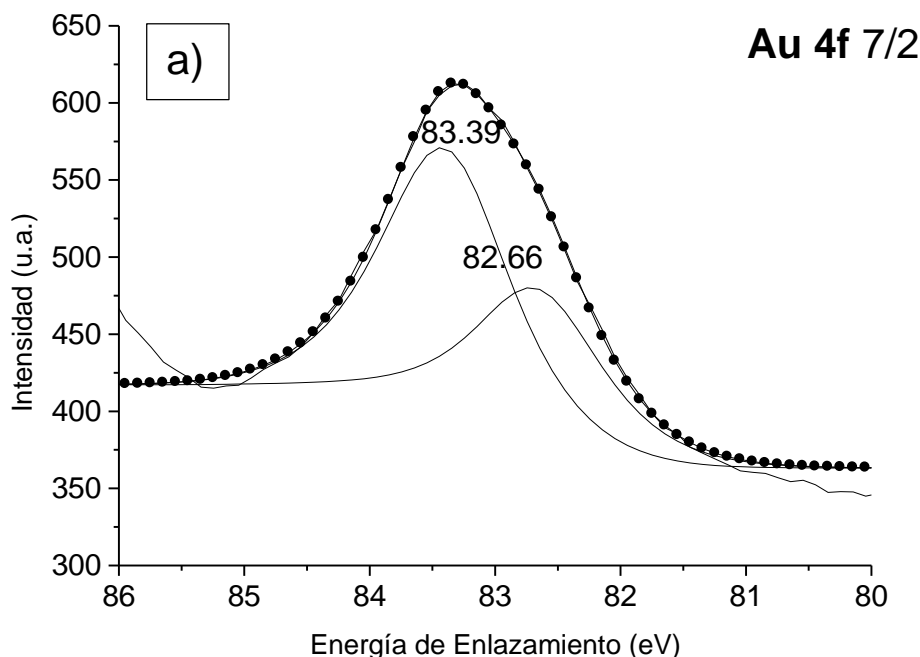
No obstante esa primera interacción, moléculas de EGF deben de interactuar, también de manera electrostática, con los átomos de las NPs de Au durante el tratamiento de acoplamiento, como ha sido reportado en estudios previos de acoplamiento de NPs de Au con otras biomoléculas [2,3].

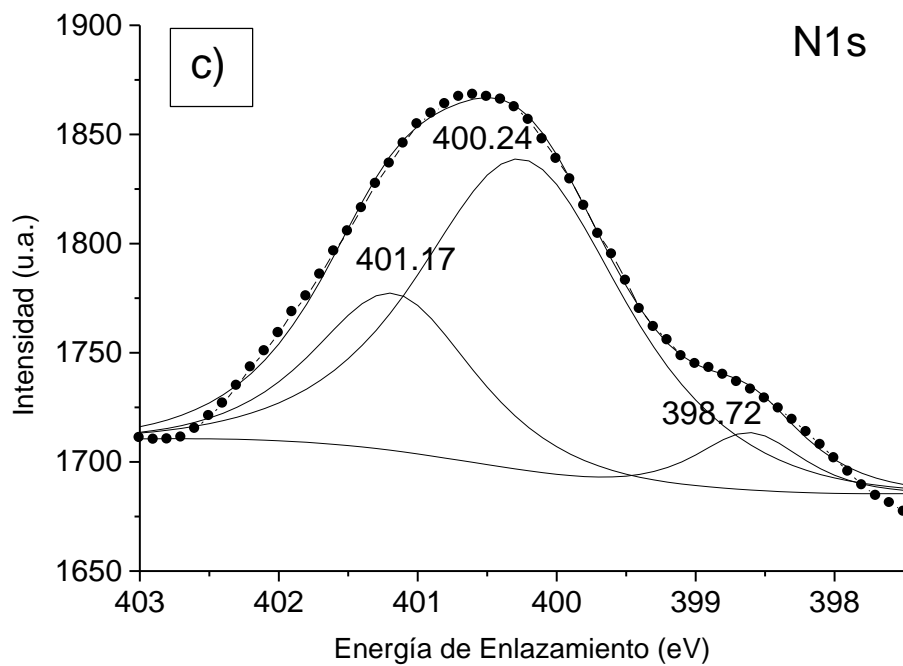
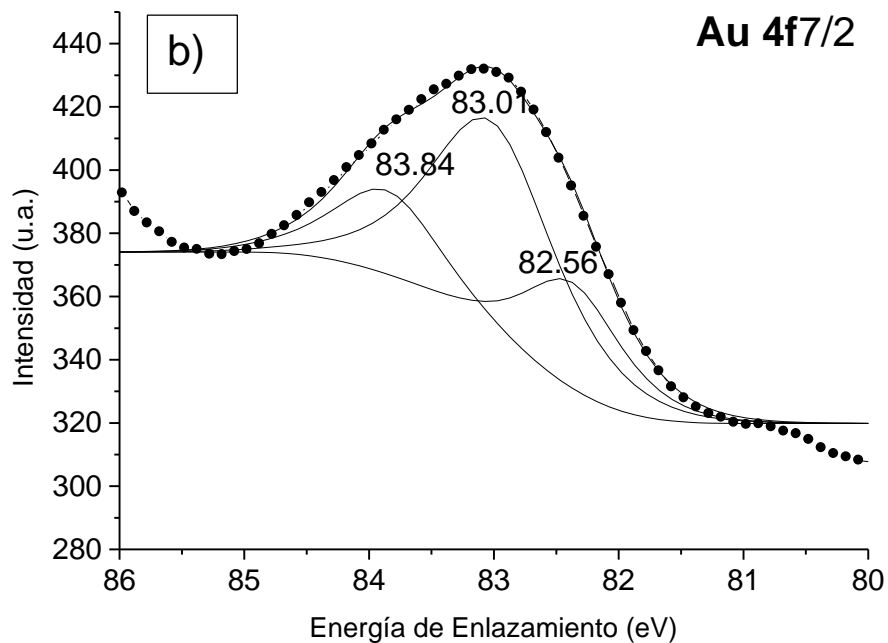
Este segundo tipo de interacción o anclaje puede corroborarse por los picos obtenidos en los espectros de XPS de Au 4f 7/2 y de N 1s, donde se analizaron tres muestras: NPs de Au, EGF y el bionanocomposito (NPs de Au-EGF).

En la figura 21a, se observa la línea experimental punteada, en conjunto con las deconvoluciones de las NPs de Au obtenidas, en la región 4f 7/2 del Au, donde se registran dos picos: uno de ellos ubicado en 83.39 eV, corresponde a Au<sup>0</sup>; el siguiente situado en 82.66 eV, correspondiente al pico satélite  $\alpha_5$  del Si 2p 3/2 que



interfiere con la región del oro. Los picos satélites son desplazamientos generados por las radiaciones alternativas provenientes de la misma fuente, en este caso la fuente utilizada es de Magnesio, se corrobora la presencia de estos picos en las capas  $\alpha_3$ ,  $\alpha_4$  y este pico en la  $\alpha_5$  (es importante describir que la presencia del elemento silicio, es debido a que lo utilizamos como soporte de dichas muestras). Al mismo tiempo se deconvolucionó en la región del  $\text{Au}^0$  4f 7/2 del bionanocomposito (NPs de Au-EGF) obteniéndose 3 picos, los cuales se muestran en la figura 21b. El pico en 83.01 eV, así como el pico en 83.39 eV de la figura 21a son atribuidos a  $\text{Au}^0$ , sólo que en el espectro del bionanocomposito existe un desplazamiento de 0.38 eV de esta señal, el cual puede ser atribuido a la interacción electrostática entre los átomos de Au de las NPs con el nitrógeno de los grupos amina de la proteína. Este tipo de interacción ha sido identificada por otros autores[48, 50, 76]. También se observa la presencia de un pico nuevo en 83.84 eV (figura 21b), el cual se puede relacionar con una posible oxidación del Au cuando las NPs fueron acopladas con el EGF. Existen reportes en la literatura en donde atribuyen el surgimiento de nuevos picos, a mayor energía de enlace, al hecho de que el Au se oxida cuando es funcionalizado[76].





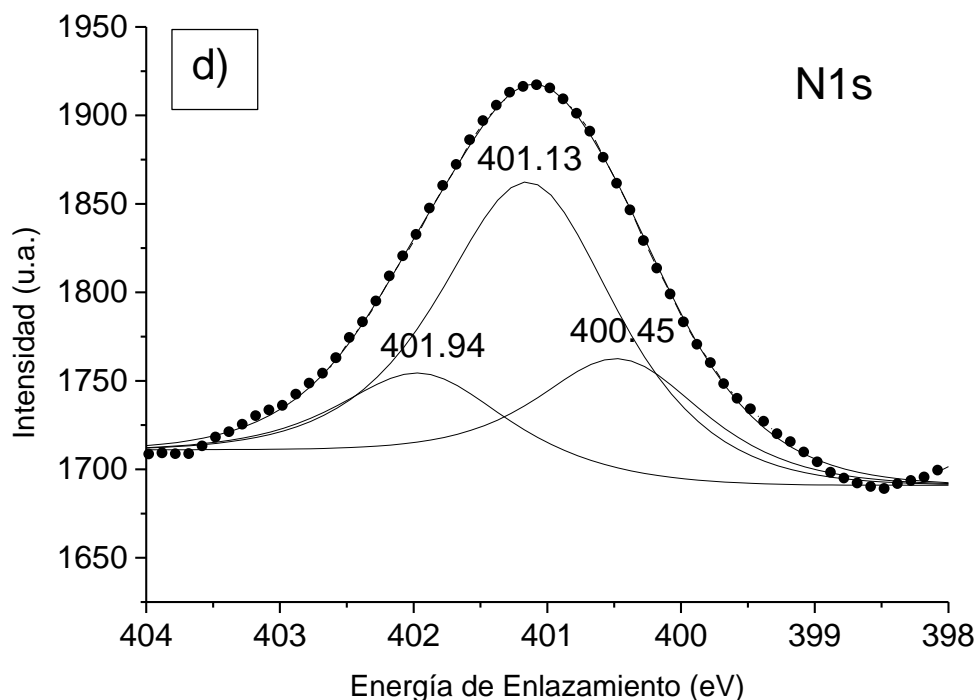


Figura 21. Espectros XPS: a) NPs de Au en la región del Au 4f 7/2, b) Bionanocomposito (NPs de Au-EGF) en la región del Au 4f 7/2, c) EGF en la región del N1s, d) Bionanocomposito (NPs de Au-EGF) en la región del N1s.

Hoy en día se conocen una variedad de grupos funcionales que pudieran interactuar con las NPs de Au, incluyendo imidazol, azufre, anillos aromáticos, amina y carboxilatos[49]. Sin embargo, reconocemos mediante infrarrojo los grupos funcionales presentes en el EGF. En la literatura se establece que en un extremo terminal del EGF existen 5 aminoácidos básicos[77] (expuestos como se muestra en la figura 22 en la parte superior de la molécula), como son: la ARG (arginina) y la HIS (histidina).

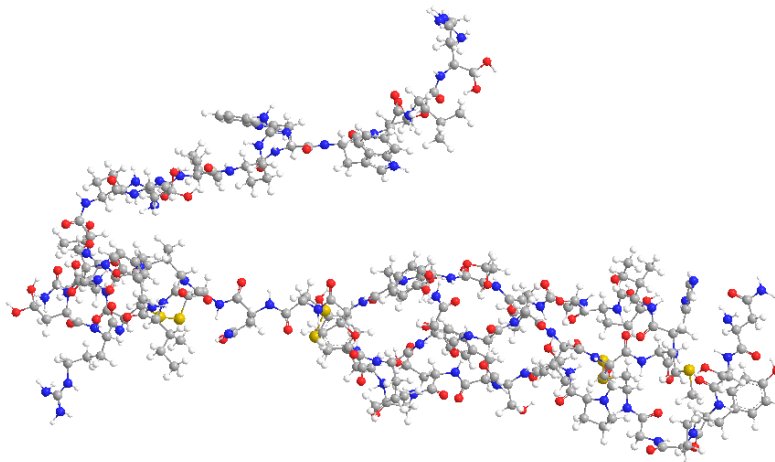


Figura 22. Representación tridimensional de la conformación más estable del Factor de crecimiento epidérmico por Mercury.

Para justificar la interacción que se registró en la región del Au, se deconvolucionó en la región del Nitrógeno, tanto de la muestra del EGF como también en el bionanocomposito (NPs de Au-EGF); analizando el espectro en la región N1s correspondiente al EGF, el cual se muestra en la figura 21c, la posición del pico en 400.24 eV es congruente con la energía de enlace del grupo amina; un segundo pico de menor magnitud en 401.17 eV[66] lo asociamos con la energía de enlace de aminas protonadas. En el espectro XPS del bionanocomposito (NPs de Au-EGF) ilustrado en la figura 21d, se observa un desplazamiento de 0.38 eV de esta última señal, el cual puede ser atribuido a la interacción electrostática entre los átomos de nitrógeno de aminas protonadas de la proteína con las NPs de Au. Este tipo de interacción también ha sido identificada por otros autores[16, 48, 50, 76]. También se han reportado comportamientos similares pues han observado cambios de energía de mayor magnitud cuando el sistema se encuentra funcionalizado con NPs de Au, indicando una absorción física[48, 78]. Otras investigaciones describen que debido el acoplamiento de NPs de Au con otras proteínas[76] surgen picos adicionales de menor intensidad, pero de mayor energía de enlace, ellos establecen un aumento de 0.8 eV [76], en nuestro sistema es de 0.77 eV, lo cual concuerda



con hallazgos anteriores de interacciones entre nanopartículas metálicas y biomoléculas.

Descartamos la posibilidad de que interaccione con grupos tioles, pues no reconocemos la presencia de interacciones con azufre en los espectros de XPS; pues se encuentra formando puentes disulfuros entre cisteínas otro aminoácido que pudiera interactuar con las NPs de Au es la metionina; sin embargo, solo hay un aminoácido presente en nuestra estructura, pese a esto, debemos tomar en cuenta que estos aminoácidos no se encuentran expuestos en la superficie de la molécula EGF, por lo tanto no son accesibles para interactuar con las NPs de Au[76, 79].

De acuerdo a la discusión anterior, tanto los resultados de potencial-Z (variaciones de la carga superficial) como de XPS (desplazamientos en energías de enlace) permitieron corroborar el proceso de acoplamiento del EGF en Au NPs pasivadas con citrato; también, a través de estas técnicas fue viable identificar que las interacciones que ocurren entre la biomolécula y el sistema nanoestructurado son principalmente de tipo electrostático[2].





## 4.5 Artículo

### **Synthesis and characterization of coupling gold nanoparticles with epidermal growth factor for potential use in biomedicine**

González-Pedroza, María G.<sup>1</sup>; Morales-Luckie, Raúl A.<sup>1\*</sup>; Sánchez-Mendieta, Víctor.<sup>2</sup>; López-Téllez, Gustavo.<sup>1</sup>; Argueta-Figueroa, Liliana.<sup>3</sup>; and González-Pérez, Oscar<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Centro Conjunto de Investigación en Química Sustentable UAEMex-UNAM (CCIQS).

<sup>2</sup>Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMex)

<sup>3</sup>Laboratorio de Investigación Interdisciplinaria, Nanoestructuras y Biomateriales. Escuela Nacional de Estudios Superiores (ENES) Unidad León, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

<sup>4</sup>Laboratorio de Neurociencias, Facultad de Psicología, Universidad de Colima. Colima 28040, México

\*Corresponding author

Dr. Raúl Alberto Morales Luckie

Centro de Investigación en Química Sustentable UAEMex-UNAM

Laboratorio de Nanomateriales

Km. 14.5 Carretera Toluca-Atlacomulco

C.P. 50200, Toluca, Estado de México, México.

Phone: +(52) (722) 2766610 ext. 7705 (CCIQS-Toluca)

Fax: +(52) (722) 1806217

Email: ramluckie@gmail.com



## Abstract

Nowadays, the biomedical uses of the coupling gold nanoparticles (Au NPs) with Epidermal Growth Factor (EGF) have attracted huge attention because of its potential for theranostic activity, which could be useful for diagnosis of diseases and for the treatment of neurodegenerative diseases. Therefore, there is great interest to know the nature of the intermolecular interactions between the Au NPs with EGF. In a first step, the Au NPs were synthesized by chemical reduction of tetrachloroauric acid using sodium citrate as reducing and capping agent. The Au NPs were characterized by UV-VIS spectroscopy TEM, XPS and zeta-potential. In a second step, the Au NPs with EGF was coupled. Subsequently, the coupling Au NPs with EGF were characterized by UV-VIS, FTIR, XPS, TEM and zeta-potential. The Au NPs with an average diameter size of 8.09 nm were obtained. After coupling the Au NPs with EGF, the particles average diameter size increased to 9.14 nm. XPS shows an electrostatic interaction between Au NPs and EGF. The zeta potential corroborates these results. So, for the first time it was possible to identify the interactions between AuNPs with EGF. These results promise great potential for the use of this bionanocomposite, since the Au NPs may act as carriers of EGF for neurodegenerative disease treatment.

**Key words:** electrostatic interactions; coupling gold nanoparticles; epidermal Growth Factor; neurodegenerative disease; bionanocomposite.



## 1. Introduction

Biomedical applications of nanotechnology include delivery of drugs, proteins and peptides [1], detection of molecules, organisms and even viruses [2], the controlled drug targeting or some other substance to target, the diagnosis through magnetic resonance imaging [3], or the treatment of neurodegenerative diseases, cancer or diabetes mellitus, among others [4]. The epidermal growth factor (EGF) is involved in various stages of cell proliferation, tissue regeneration, cell survival among others [5]. Recent studies supported the hypothesis that the low EGF levels detected in cerebrospinal fluid of patients with diagnosis of multiple sclerosis may be causally related with the disease [6, 7]. In fact, EGF strongly promotes the proliferation and migration of the oligodendrocytes (cells involved in myelin production) in both physiological and pathological conditions [8, 9] Therefore, it has been suggested that myelin-related molecules as EGF may improve the remyelination process in multiple sclerosis or other demyelinating disease [10]. EGF possesses three disulfide bridges, peptide bonds and a free amino group  $\alpha$  at the beginning of the chain. It has an arginine carboxy group of the  $\beta$  form. It is heat stable and is inactivated at 40 °C [11]. It is important to recognize the magnitude of the protein structure, due to this, it was decided to rebuild the EGF molecule (Figure 1).

The gold nanoparticles (Au NPs) have physical, chemical and biological properties that are related to their size and morphology, which are essential to be used [12]. Recently, one of the most common methods of synthesis is the chemical reduction of a gold precursor by using sodium citrate. Turkevich in 1951 reported the basic experimental approach to produce Au NPs and described the effect of temperature and concentration of sodium citrate on the size of nanoparticles [13-15]. These nanoparticles can be easily functionalized with a wide range of ligands (antibodies, polymers, diagnostic probes, drugs, genetic material, etc.) [14].



Hybrid nanoparticles (with organic and inorganic parts) have emerged as a simple solution for generating theranostics systems. Thus, the design of this type of nanoparticles has been an important source of such systems [16]. The frequency of plasmon surface resonance of the gold nanoparticles is closely related to system properties such as: size, shape, miscibility, binder, dielectric properties, surface functionalization and refractive index of the surrounding medium [17]. Coupling gold nanoparticles with EGF may represent a novel therapeutic approach against several diseases; therefore, determining the synthesis and chemical properties of these biocomposites is an important step to develop Ag NPs with clinical applications [13-16].

A variety of chemical functional groups that could interact with the Au NPs, including imidazole, sulfur, aromatic rings, amine and carboxylate, have been established in the literature. Different kinds of interactions between gold and sulfur, thiols, etc. [18, 19]. However, at the nanoscale the Au NPs exhibit electrostatic interactions with amine groups [20, 21]. Whereas, the amine groups establish similar interactions with carboxyl groups present on the surface of Au NPs that have been capped with sodium citrate [20, 22-26]. The aims of the present study were to synthesize Au NPs by chemical reduction of tetrachloroauric acid using sodium citrate as reducing and capping agent; and to couple the Au NPs with EGF and to determine the nature of the interaction between them.



## 2. Material and methods

### 2.1 *Synthesis of Au NPs*

The Au NPs were synthesized using the citrate reduction method, from a 1% HAuCl<sub>4</sub> colloidal suspension. Subsequently, 100 ml of deionized H<sub>2</sub>O were heated to the boiling point; and 5.0 ml of sodium citrate solution (0.05M in 50 ml of deionized H<sub>2</sub>O) were added quickly into the flask with stirring. The mixture was continuously heated under stirring for 20 min until a ruby-red color solution was obtained [13, 27].

### 2.2 *Preparation of coupling Au NPs-EGF.*

The Au NPs coated with EGF were prepared according to the method described by Sokolov, et al., 2006 [13]. The Au NPs were diluted in HEPES buffer solution at 20 mM (pH 7.4, Sigma-Aldrich) until a final optical density of 0.8 at 530 nm was obtained. Subsequently, 50  $\mu$ l of EGF (Sigma-Aldrich) were diluted in 500  $\mu$ l of the same HEPES buffer solution. Then, 10 ml of the solution previously prepared of Au NPs in colloidal solution were mixed with the diluted solution of EGF for 20 min. Subsequently, 0.5 ml of 1% polyethylene glycol (MW = 4000, Boehringer) were added to the mixture to prevent aggregation and the mixture was centrifuged at 6000 rpm for 18 min. Finally, the biocomposite (Au NPs-EGF) was redispersed in PBS buffer (pH 7.4) and stored at 4 °C.



### *2.3 Characterization of the Au NPs before and after their coupling with EGF*

The optical properties of the Au NPs before and after their coupling with EGF were determined using UV-Vis spectroscopy (Varian Cary 5000 UV-Vis-NIR, Agilent Technologies, UK). The two samples were diluted, 1ml of Au NPs and 1ml of biocomposite (Au NPs-EGF) in deionized H<sub>2</sub>O, each one for separate analysis. Then, each sample was analyzed in a range of 200-800nm in the absorption mode.

Structural properties of the nanoparticles formed, such as morphology, size and particle distribution are characterized using a Transmission Electron Microscope (TEM) (JEOL-2100 200 kV with LaB<sub>6</sub> filament). A drop of the Au NPs and a drop of the biocomposite (Au NPs-EGF) were placed on grids and allowed to dry for 20min before the analysis.

FTIR analysis was performed (Bruker, Model 27) to investigate and characterize functional groups that are present in this protein, the EGF. In addition to verifying the presence of Au NPs in the biocomposite (Au NPs -EGF) and their interactions was elucidated. FTIR technique was carried out by placing a drop of each sample on the analysis device and operating under standard conditions.

Zeta potential measurements were determined using the Zetasizer 2000 (Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, UK). The voltage applied to driving electrodes of the cell was 150V capillary electrophoresis. The sample was prepared by injecting 2 ml of solution approximately in the cell.



For determination of interactions between the functional groups of EGF and the surface of the Au nanoparticles were studied through X-ray photoelectron spectroscopy (XPS). XPS spectra were acquired using a JEOL JPS-9200, equipped with an X-ray source Mg (1253.6 eV) at 300 W, the area of analysis was 3mm<sup>2</sup>, and vacuum was of the order of 7.5 x 10<sup>9</sup> Torr for all samples. The spectra were analyzed using the included software with the instrument specsurfTM in all load spectra was corrected by signal accidental carbon (C1s) to 284.5 eV. The Shirley method was used for background subtraction, while the curve was used to the Gauss-Lorentz.

### 3. Results and Discussion

#### 3.1 Synthesis of Au NPs

The synthesis of Au NPs was performed, obtaining a ruby red colloidal solution. This color is attributed to the size and spherical shape of the Au NPs nanoparticles.. In contrast, the Au nanorods show different colors in solution, according to the reported by El-Sayed *et al* [27]. More recent studies have shown that the color of the colloidal solution is due to various conditions: size, shape, crystallinity, interparticle interactions, the collective oscillation of electrons in the conduction band, known as surface plasmon oscillation [28] and the dielectric constant of the surrounding medium [29]. As a result, the solvent used will have an effect on the oscillation frequency due to the varying ability of the surface to accommodate electron charge density from the nanoparticles [30].

#### 3.2 Coupling of Au NPs with EGF.

We coupled the Au NPs with EGF and determined the nature of the interaction between both components. The coupling can be distinguished by forming a precipitate after the mixture is centrifuged, which subsequently will be referred as bionanocomposite. The main characteristics of bionanocomposite are the sensitivity



to changes in pH and to high temperatures; when the ambient temperature exceeds 40 °C, the EGF protein is denaturalized [31]. Therefore, the mixture must be stored at 4 °C to avoid denaturalization and maintain the pH of the solution during the coupling process though the addition of HEPES buffer solution.

### 3.3 UV-Vis analysis

In the UV-Vis spectrum of the Au NPs (Figure 2) a single peak of maximum absorption is observed at 520 nm. According to that reported by El-Sayed et al. [32], a maximum absorbance peak in 530 nm corresponds to a gold particle size of 40 nm. Sokolov *et al.* [13] reported a maximum absorption peak at 540 nm, obtaining Au NPs with an average particle size of 50nm. Liz-Marzán et al. [28] and Eustis S, et al. [33] demonstrated that the number of peaks represents the morphology of nanoparticles, which means that the presence of a single peak refers to a spherical morphology. In contrast, if the spectrum shows the presence of two absorbance bands, it means that the morphology is comprised by nanorods [28]. Due to the aforementioned, it is possible to assume that the morphology of the Au NPs synthesized is spherical. By analyzing the different absorption peaks previously reported, it was determined that variations depend directly on the added amount of sodium citrate and the concentration of HAuCl<sub>4</sub>. Due to this, the intensity of absorption in the spectrum is affected by the size of the nanoparticles. If the maximum absorption peak was observed and a red-shift of a few nanometers occurs, this indicates an increase in size of the nanoparticles. This event is due to the collective oscillation of electrons in an electromagnetic field, since the larger the size of the nanoparticle a higher oscillation is registered as consequence [27, 34].

In the UV-Vis spectrum of the bionanocomposite Au NPs-EGF (Figure 2) a red-shift of 6 nm was observed in comparison to the Au NPs without EGF spectrum. Joshi *et*





*al.* [35]. This shift was associated with the coverage obtained to functionalize the nanoparticles with other agents, in this case with proteins. In addition, another possible explanation for that event may be the aggregations of NPs as a result of surface modification [36], instead of the simple change of size of the functionalized nanoparticle.

### 3.4 TEM analysis

In the TEM micrographs (Figure 3) the presence of Au NPs synthesized from sodium citrate is observed, and a spherical morphology can be appreciated. In addition, it was confirmed that the nanoparticles exhibit a uniform distribution without agglomerates. In the SAED (Figure 3), the measurements of the interplanar distances correspond to the planes (111), (220) and (311) in accordance with the structure the face centered cubic of metallic gold which correspond to JCPDS file: 004-0784. In the TEM micrographs of bionanocomposite (Figure 3), a good distribution of particle sizes was observed, besides, the Au NPs maintain their morphology even after coupled to EGF. The histogram (Figure 3) shows an increase in average particle size compared to the size of the NPs obtained before coupling. The size of the Au NPs was 8.09 nm, with a standard deviation of 3.60 nm. After coupling the Au NPs with EGF, the average particle size was 9.14 nm and a standard deviation of 5.28 nm. However, this increase in size was expected by molecular coupling in the Au-EGF NPs to different substances, such as: PEG, PBS and HEPES, which ensured the stability of the bionanocomposite (Au NPs -EGF). The size of the particles obtained in our study, less than 50 nm, provides better optical properties [37] and biocompatibility [27, 34].



### 3.5 FTIR analysis.

FTIR spectra of a protein are considered as a linear sum of the spectrum of its conformational changes. There are numerous well-established correlations between very infrared spectra for certain protein structures [38]. As is shown in the Figure 4, the follow bands are found in our both spectra. The structure of proteins such as EGF are characterized by nine absorption bands in the infrared [38, 39]. These bands were assigned as follows, the band found in  $3325\text{ cm}^{-1}$  was assigned to the characteristic vibration of NH group [40]. The bands located at  $1652\text{ cm}^{-1}$  and  $1618\text{ cm}^{-1}$  are associated with the amides I and II [41], which are considered the most important bands of skeletal vibration of proteins. The amide I band ( $\tilde{\nu}$  between  $1700\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$ ) is the most sensitive of all. This band is associated with the stretching vibration of C=O group of the peptide bond. Regarding the amide II band, it is mainly associated with the vibration in the plane of the NH group (flexion) and the group CN (stretching) [42-44]. Small vibration bands are observed at  $1397\text{ cm}^{-1}$   $1260\text{ cm}^{-1}$  [43], which corresponding to the amides III. Then the vibrational bands amino groups and carboxyl groups are located in  $1584\text{ cm}^{-1}$  and  $1460\text{ cm}^{-1}$ , respectively. These groups are characteristic of amino acids containing the protein [45].

As shown in Figure 4, the spectra of the bionanocomposite, the OH groups of HEPES (4- (2-hydroxyethyl) -1-piperazineethanesulfonic) are located at  $3446\text{ cm}^{-1}$  and an intense band at  $1179\text{ cm}^{-1}$  corresponding to the sulfonic group is observed. In addition, a second band at  $1074\text{ cm}^{-1}$  corresponding to the vibrations of ether group C-O-C, which is the main characteristic absorption band for molecules of PEG, appears stronger [46]. This band is also associated with the C-N vibration present in this protein.



### *3.6 Characterization by X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS) and Zeta Potential*

According to the nature of process for the synthesis of these Au NPs, it was expected that the Au NPs are surrounded by a layer of citrate molecules. This is confirmed by the value of zeta potential at -30 mV for Au NPs, which effectively means that the nanoparticles could have a layer of citrate molecules and these molecules serve to maintain the stability of the nanoparticles in aqueous solution [47]. When the bionanocomposite of Au NPs-EGF is synthesized, the EGF molecules, by their chemical nature, carry out two main processes for attaching to Au NPs (which are passivated with citrate). The first process involves the interaction of electrostatic type between the carboxylate groups from the citrate and type ammonium functional groups, or some other functional group with cationic character, that could have been generated during the experimental procedure for coupling. This electrostatic interaction between biomolecules, as protein, and passivating agents, as citrate molecules, of metal nanoparticles have been previously recognized by other researchers [48, 49]. This first type of interaction is found in the present study by the value obtained of -7 mV of zeta potential for bionanocomposite. Explicitly, the magnitude of the negative charge that exists in the carboxylates of the citrate molecules surrounding the Au NPs and that is considerably reduced when the coupling of EGF occurs. This phenomenon is mainly due to the electrostatic interaction between carboxylates and cationic functional groups, which were generated in the EGF during coupling that, in turn, reduces the negative charge on the surface of Au NPs -EGF. However, in this first interface, the EGF molecules interact, also electrostatically, with the Au NPs atoms during coupling, as reported in previous studies of coupled Au NPs with other biomolecules [2,3]. This second type of interaction or attachment can be corroborated by the peaks obtained in the XPS spectra of Au 4f 7/2 and of N 1s. To this end, Au NPs, EGF and bionanocomposite (Au NPs-EGF) samples were analyzed. In the (Figure 5a), two peaks that can be observed, one of them is located at 83.39 eV, corresponding to 7/2 4f Au<sup>0</sup>, and the



other peak was located at 82.66 eV, which corresponds to a satellite peak  $\alpha_5$  of Si 2p  $3/2$  that interferes with the gold region. At the same time, it was after deconvolution in the region 4f  $7/2$  Au<sup>0</sup> of the bionanocomposite (Au NPs-EGF) three peaks were obtained (Figure 5b). The peaks located at 83.01 eV and 83.39 eV (Figure 5b) are attributed to Au<sup>0</sup>. In the spectrum of the bionanocomposite occurs a displacement of 0.38 eV of this signal compared to the same peak obtained for the Au NPs only. This displacement can be attributed to the electrostatic interaction between atoms from the Au NPs with the nitrogen from the amine groups of the EGF protein. This type of interaction has been identified by other authors [19, 36, 50]. The third peak is observed at 83.84 eV (Figure 6), which may be related to a possible oxidation of the Au NPs when coupled with EGF. Reports have been attributed the emergence of new peaks, at higher binding energy, to oxidative reaction when gold is functionalized [19].

Currently, a variety of functional groups that could interact with the Au NPs are known, including imidazole, sulfur, aromatic rings, amine and carboxylates [51]. In our study, we recognized the presence of zwitterions in EGF molecule located at a terminal end of the protein chain and conformed by five basic amino acids. This protein possess four amino acids of ARG (arginine) and one amino acid of HIS (histidine) [52], as is shown in Figure 1.

In order to further demonstrate the interaction occurring between Au and nitrogen moieties present in EGF, the N 1s region of XPS spectrum was deconvoluted. The spectrum in the N1s region corresponding to EGF is shown in Figure 21c, the peak located at 400.24 eV is consistent with the binding energy of the amine group [40]. A second peak with lower intensity at 401.17 eV is associated with the binding energy of protonated amines. In the XPS spectrum of the bionanocomposite (Au NPs-EGF) as illustrated in Figure 21d, there is a shift of this last signal (0.38 eV),



which can be attributed to the electrostatic interaction between the nitrogen atoms of protonated amines of the protein with the Au NPs. This type of interaction is in accordance with the ones proposed by other authors [19, 36, 50, 53]. Furthermore similar energy changes have been observed when the Au NPs system is functionalized, indicating a physical absorption [50, 54].

Other studies described that due to the Au NPs coupling with other proteins [19]. So, an extra peaks appear with lower intensity but higher binding energy, they provide an increase of 0.8 eV [19]. In our system it was of 0.77 eV, which is consistent with previous findings of interactions between metallic nanoparticles and biomolecules. This event excludes the possibility of interactions with thiol groups, because the sulfur found between cysteines forms disulfide bridges. Methionine is another amino acid that could interact with Au NPs, however, there is only one of this amino acids in the EGF structure. Despite this, these amino acids are not exposed on the surface of the EGF molecule, therefore these amino acids are not accessible binding sites to interact with the Au NPs [19, 55]. According to the current results, both zeta potential (surface charge variations) and XPS analysis (displacement binding energies) allowed confirm the coupling of Au NPs (passivated with citrate) with the EGF. Moreover, through these techniques is possible to identify the electrostatic interaction between the biomolecule and the nanostructured system.

One of the biggest advantages of using Au NPs coupled to biomolecules is their excellent biocompatibility, [56] due to the weak interactions that Au NPs have with some proteins and amino acids *in vivo*. [57, 58] A high percentage of these Au NPs is cleared by the mononuclear phagocyte system (macrophages) [59, 60], and only a low amount of Au NPs (about 3%) is accumulated in the liver and very high concentrations are required to produce hepatotoxicity [61]. Due to the binding with the EGF is electrostatic, the use of Au NPs as drug carriers is promising. Hence,



the bionanocomposite Au NPs-EGF has a great potential to use for treatment in diseases where EGF is required as in multiple sclerosis or demyelinating diseases. However, further studies *in vivo* are required to determine other biological aspects, such as: biodistribution, dose and possible side effects in the organism.

## Conclusions

1. We synthesized Au NPs (diameter < 10 nm) functionalized with EGF by the method of sodium citrate.
2. The bionanocomposite (Au NPs-EGF) was satisfactorily characterized.
- 3.
4. We identified the interactions into the bionanocomposite that has an electrostatic binding between Au NPs with the cationic groups present in the EGF protein.

## Acknowledgements

This work was supported by grants kindly provided by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. 2015-01-465) and UAEMex (3789/2014/CIA).

## Conflict of interest

None.



## References

- [1] Connor EE, Mwamuka J, Gole A, Murphy CJ, Wyatt MD. Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity. *Small*. 2005;1:325-7.
- [2] Qu M, Mallidi S, Mehrmohammadi M, Truby R, Homan K, Joshi P, et al. Magneto-photo-acoustic imaging. *Biomedical optics express*. 2011;2:385-96.
- [3] Nam SY, Ricles LM, Suggs LJ, Emelianov SY. In vivo ultrasound and photoacoustic monitoring of mesenchymal stem cells labeled with gold nanotracers. *PLoS One*. 2012;7:e37267.
- [4] Ahmed N, Fessi H, Elaissari A. Theranostic applications of nanoparticles in cancer. *Drug discovery today*. 2012;17:928-34.
- [5] Erfani P, Tome-Garcia J, Canoll P, Doetsch F, Tsankova NM. EGFR promoter exhibits dynamic histone modifications and binding of ASH2L and P300 in human germinal matrix and gliomas. *Epigenetics*. 2015;10:496-507.
- [6] Tejera-Alhambra M, Casrouge A, de Andrés C, Seyfferth A, Ramos-Medina R, Alonso B, et al. Plasma biomarkers discriminate clinical forms of multiple sclerosis. *PLoS one*. 2015;10:e0128952.
- [7] Bieber AJ, Suwansrinon K, Kerkvliet J, Zhang W, Pease LR, Rodriguez M. Allelic variation in the Tyk2 and EGF genes as potential genetic determinants of CNS repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010;107:792-7.
- [8] Swayne LA, Wicki-Stordeur L. Ion channels in postnatal neurogenesis: potential targets for brain repair. *Channels*. 2012;6:69-74.
- [9] Gonzalez-Perez O, Quiñones-Hinojosa A. Dose-dependent effect of EGF on migration and differentiation of adult subventricular zone astrocytes. *Glia*. 2010;58:975-83.
- [10] Gonzalez-Perez O, Alvarez-Buylla A. Oligodendrogenesis in the subventricular zone and the role of epidermal growth factor. *Brain research reviews*. 2011;67:147-56.
- [11] Causa JE, Vila EH. Factor de crecimiento epidérmico, innovación y seguridad. *Medicina Clínica*. 2015;145:305-12.
- [12] Mieszawska AJ, Mulder WJ, Fayad ZA, Cormode DP. Multifunctional gold nanoparticles for diagnosis and therapy of disease. *Molecular pharmaceutics*. 2013;10:831-47.
- [13] Sokolov K, Follen M, Aaron J, Pavlova I, Malpica A, Lotan R, et al. Real-time vital optical imaging of precancer using anti-epidermal growth factor receptor antibodies conjugated to gold nanoparticles. *Cancer research*. 2003;63:1999-2004.
- [14] Al-Qadi S, López CR. Nanopartículas metálicas: oro. *Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia*. 2009.
- [15] Turkevich J, Stevenson PC, Hillier J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discussions of the Faraday Society*. 1951;11:55-75.
- [16] Gautier J, Allard-Vannier E, Munnier E, Soucé M, Chourpa I. Recent advances in theranostic nanocarriers of doxorubicin based on iron oxide and gold nanoparticles. *Journal of Controlled Release*. 2013;169:48-61.



- [17] Sharma P, Brown S, Walter G, Santra S, Moudgil B. Nanoparticles for bioimaging. *Advances in colloid and interface science*. 2006;123:471-85.
- [18] Caprile L, Cossaro A, Falletta E, Della Pina C, Cavalleri O, Rolandi R, et al. Interaction of l-cysteine with naked gold nanoparticles supported on HOPG: a high resolution XPS investigation. *Nanoscale*. 2012;4:7727-34.
- [19] Zhou JC, Wang X, Xue M, Xu Z, Hamasaki T, Yang Y, et al. Characterization of gold nanoparticle binding to microtubule filaments. *Materials Science and Engineering: C*. 2010;30:20-6.
- [20] Jiang K, Eitan A, Schadler LS, Ajayan PM, Siegel RW, Grobert N, et al. Selective Attachment of Gold Nanoparticles to Nitrogen-Doped Carbon Nanotubes. *Nano Letters*. 2003;3:275-7.
- [21] Jiang L, Gao L. Modified carbon nanotubes: an effective way to selective attachment of gold nanoparticles. *Carbon*. 2003;41:2923-9.
- [22] El-Sayed IH, Huang X, El-Sayed MA. Surface plasmon resonance scattering and absorption of anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles in cancer diagnostics: applications in oral cancer. *Nano letters*. 2005;5:829-34.
- [23] Ellis AV, Vijayamohan K, Goswami R, Chakrapani N, Ramanathan L, Ajayan PM, et al. Hydrophobic anchoring of monolayer-protected gold nanoclusters to carbon nanotubes. *Nano Letters*. 2003;3:279-82.
- [24] Parthasarathy R, Lin X-M, Jaeger HM. Electronic transport in metal nanocrystal arrays: The effect of structural disorder on scaling behavior. *Physical Review Letters*. 2001;87:186807.
- [25] Eitan A, Jiang K, Dukes D, Andrews R, Schadler LS. Surface modification of multiwalled carbon nanotubes: toward the tailoring of the interface in polymer composites. *Chemistry of Materials*. 2003;15:3198-201.
- [26] Cheng HM. Carbon nanotubes: synthesis, microstructure, properties and applications. Beijing: Chemical Industry Press; 2002.
- [27] El-Sayed IH, Huang X, El-Sayed MA. Selective laser photo-thermal therapy of epithelial carcinoma using anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles. *Cancer letters*. 2006;239:129-35.
- [28] Liz-Marzán LM. Nanometals: formation and color. *Materials today*. 2004;7:26-31.
- [29] Ghosh SK, Pal T. Interparticle coupling effect on the surface plasmon resonance of gold nanoparticles: from theory to applications. *Chemical reviews*. 2007;107:4797-862.
- [30] Eustis S, El-Sayed MA. 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*. 2006;35:209-17.
- [31] O'connell J, Fox P. Heat-induced coagulation of milk. *Advanced Dairy Chemistry—1 Proteins*: Springer; 2003. p. 879-945.
- [32] Jain PK, Huang X, El-Sayed IH, El-Sayed MA. Noble metals on the nanoscale: optical and photothermal properties and some applications in imaging, sensing, biology, and medicine. *Accounts of chemical research*. 2008;41:1578-86.
- [33] Jain PK, Eustis S, El-Sayed MA. Plasmon coupling in nanorod assemblies: optical absorption, discrete dipole approximation simulation, and exciton-coupling model. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2006;110:18243-53.





- [34] Liu X, Yang Y, Mao L, Li Z, Zhou C, Liu X, et al. SPR quantitative analysis of direct detection of atrazine traces on Au-nanoparticles: nanoparticles size effect. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2015;218:1-7.
- [35] Beebe SJ, Blackmore PF, White J, Joshi RP, Schoenbach KH. Nanosecond pulsed electric fields modulate cell function through intracellular signal transduction mechanisms. *Physiological measurement*. 2004;25:1077.
- [36] Joshi H, Shirude PS, Bansal V, Ganesh K, Sastry M. Isothermal titration calorimetry studies on the binding of amino acids to gold nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2004;108:11535-40.
- [37] Auffan M, Rose J, Bottero J-Y, Lowry GV, Jolivet J-P, Wiesner MR. Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective. *Nature nanotechnology*. 2009;4:634-41.
- [38] Kong J, Yu S. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta biochimica et biophysica Sinica*. 2007;39:549-59.
- [39] Adochitei A, Drochioiu G. Rapid characterization of peptide secondary structure by FT-IR spectroscopy. *Rev Roum Chim*. 2011;56:783-91.
- [40] Ren Z, Xu X, Wang X, Gao B, Yue Q, Song W, et al. FTIR, Raman, and XPS analysis during phosphate, nitrate and Cr (VI) removal by amine cross-linking biosorbent. *Journal of colloid and interface science*. 2016;468:313-23.
- [41] Sun Z, Xu H, Cao Y, Wang F, Mi W. Elucidating the interaction of propofol and serum albumin by spectroscopic and docking methods. *Journal of Molecular Liquids*. 2016;219:405-10.
- [42] Pandey P, Samanta AK, Bandyopadhyay B, Chakraborty T. Amide-I and amide-A bands of  $\delta$ -valerolactam and its dimers: A combined matrix isolation-FTIR spectroscopy and quantum chemistry study. *Journal of Molecular Structure*. 2010;975:343-8.
- [43] Depciuch J, Sowa-Kućma M, Misztak P, Szewczyk B, Nowak G, Pankiewicz P, et al. Olfactory bulbectomy-induced changes in phospholipids and protein profiles in the hippocampus and prefrontal cortex of rats. A preliminary study using a FTIR spectroscopy. *Pharmacological Reports*. 2015.
- [44] Zhao X, Chen F, Xue W, Lee L. FTIR spectra studies on the secondary structures of 7S and 11S globulins from soybean proteins using AOT reverse micellar extraction. *Food Hydrocolloids*. 2008;22:568-75.
- [45] Sarmiento B, Ferreira D, Veiga F, Ribeiro A. Characterization of insulin-loaded alginate nanoparticles produced by ionotropic pre-gelation through DSC and FTIR studies. *Carbohydrate Polymers*. 2006;66:1-7.
- [46] Deygen IM, Kudryashova EV. New versatile approach for analysis of PEG content in conjugates and complexes with biomacromolecules based on FTIR spectroscopy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2016.
- [47] Casals E, Pfaller T, Duschl A, Oostingh GJ, Puntès V. Time evolution of the nanoparticle protein corona. *ACS nano*. 2010;4:3623-32.
- [48] Ivanov MR, Bednar HR, Haes AJ. Investigations of the mechanism of gold nanoparticle stability and surface functionalization in capillary electrophoresis. *ACS Nano*. 2009;3:386-94.
- [49] Brewer SH, Glomm WR, Johnson MC, Knag MK, Franzen S. Probing BSA binding to citrate-coated gold nanoparticles and surfaces. *Langmuir*. 2005;21:9303-7.



- [50] Dharanivasan G, Rajamuthuramalingam T, Jesse DMI, Rajendiran N, Kathiravan K. Gold nanoparticles assisted characterization of amine functionalized polystyrene multiwell plate and glass slide surfaces. *Applied Nanoscience*. 2015;5:39-50.
- [51] Cowan JA. *Bioinorganic Chemistry: A Short Course*. Rosette M. Roat-Malone. Hoboken, NJ: Wiley-Interscience, A John Wiley & Sons Inc. Publication, 2002, 366 pp., \$89.95, softcover. ISBN 0-471-15976-X. *Clinical Chemistry*. 2003;49:1565-6.
- [52] Roat-Malone RM. *Inorganic Chemistry Essentials*. *Bioinorganic Chemistry: A Short Course*, Second Edition. 2007:1-28.
- [53] Sasikumar R, Arunachalam R. Synthesis of nanostructured aluminium matrix composite (AMC) through machining. *Materials Letters*. 2009;63:2426-8.
- [54] Carré A, Birch W, Lacarrière V. Glass substrates modified with organosilanes for DNA immobilization. Silanes and other coupling agents. 2007;4:1-14.
- [55] Wang B, Chen Y, Wu Y, Weng B, Liu Y, Lu Z, et al. Aptamer induced assembly of fluorescent nitrogen-doped carbon dots on gold nanoparticles for sensitive detection of AFB 1. *Biosensors and Bioelectronics*. 2016;78:23-30.
- [56] Leifert A, Pan-Bartnek Y, Simon U, Jähnen-Dechent W. Molecularly stabilised ultrasmall gold nanoparticles: synthesis, characterization and bioactivity. *Nanoscale*. 2013;5:6224-42.
- [57] Selvakannan P, Mandal S, Phadtare S, Gole A, Pasricha R, Adyanthaya S, et al. Water-dispersible tryptophan-protected gold nanoparticles prepared by the spontaneous reduction of aqueous chloroaurate ions by the amino acid. *Journal of colloid and interface science*. 2004;269:97-102.
- [58] Liu Y, Sun J, Han J, He Z. Long-circulating targeted nanoparticles for cancer therapy. *Current Nanoscience*. 2010;6:347-54.
- [59] Yokel R, Grulke E, MacPhail R. Metal-based nanoparticle interactions with the nervous system: the challenge of brain entry and the risk of retention in the organism. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*. 2013;5:346-73.
- [60] Weissleder R, Nahrendorf M, Pittet MJ. Imaging macrophages with nanoparticles. *Nature materials*. 2014;13:125-38.
- [61] Zhou C, Long M, Qin Y, Sun X, Zheng J. Luminescent gold nanoparticles with efficient renal clearance. *Angewandte Chemie*. 2011;123:3226-30.



## Figure captions

Figure 1. Epidermal Growth Factor (EGF) representation.

Figure 2. UV-visible spectra; (curve 1) AuNPs, (curve 2) Bionanocomposite (EGF-AuNPs).

Figure 3. TEM observations. (a) Micrograph of AuNPs (c) The X-ray diffraction pattern, (b) Micrograph of binonanocomposite (EGF-AuNPs), insets show the particles size distribution.

Figure 4. FTIR spectra of the protein EGF and bionanocomposite (EGF-AuNPs).

Figure 5. XPS spectra: a) Au 4f 7/2 region of Au NPs solution, b) Au 4f 7/2 region of Bionanocomposite (Au NPs-EGF), c) N1s region of EGF protein, d) N1s region of Bionanocomposite (Au NPs-EGF).

Figure 1.

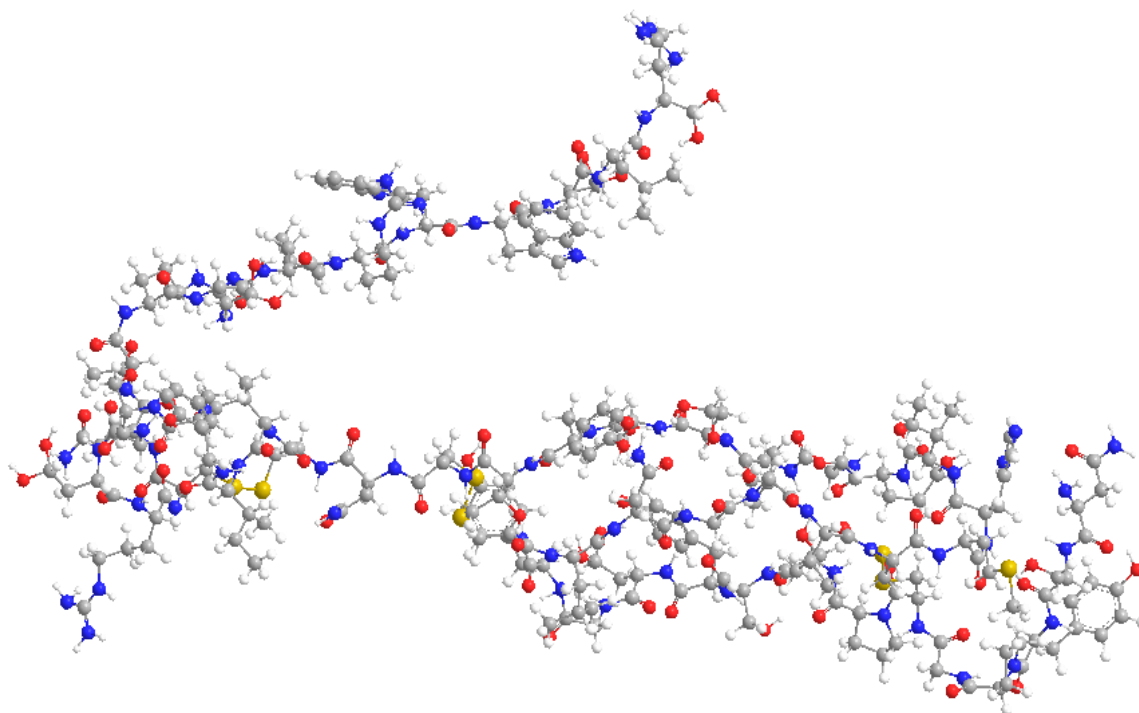




Figure 2.

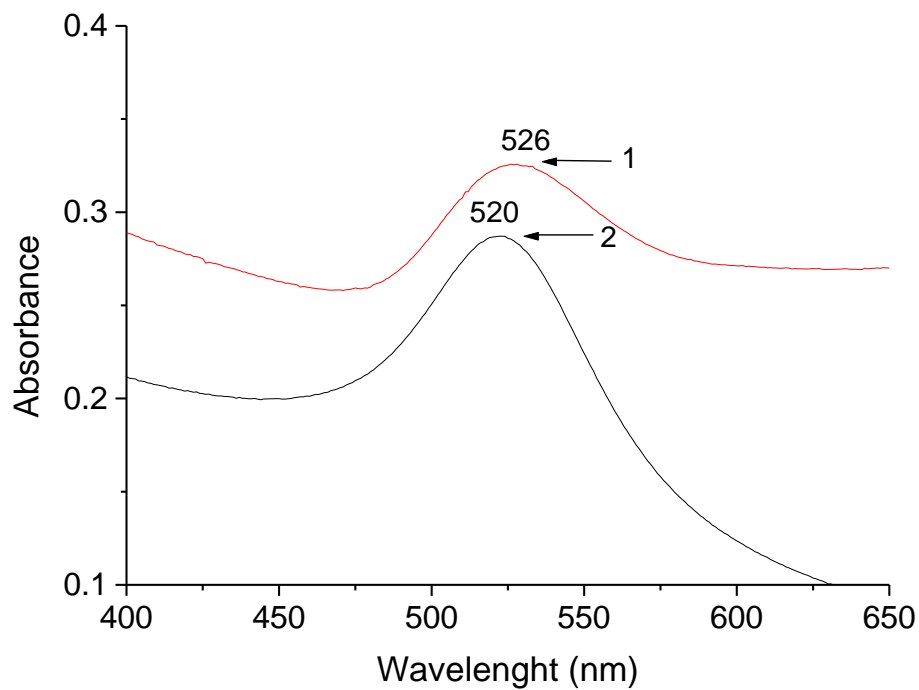


Figure 3.

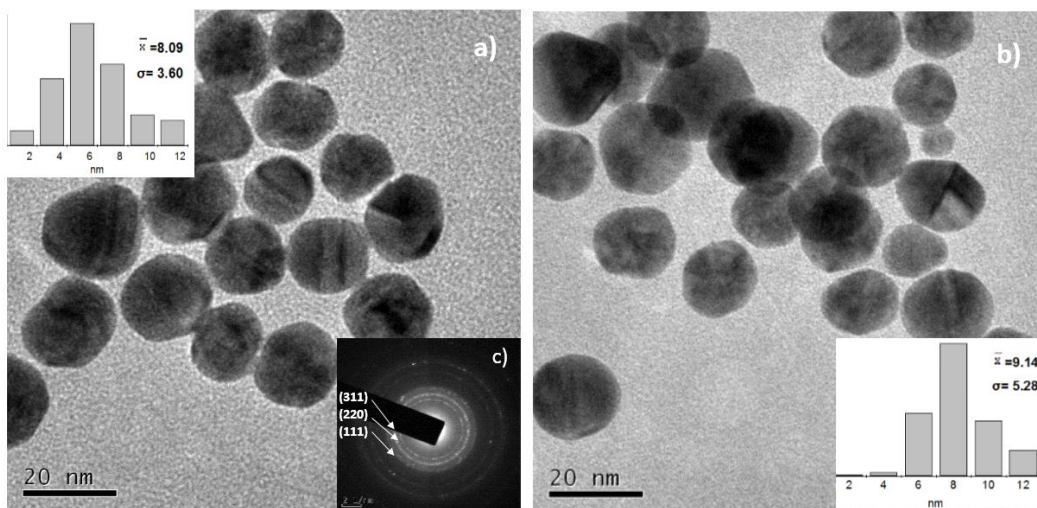




Figure 4.

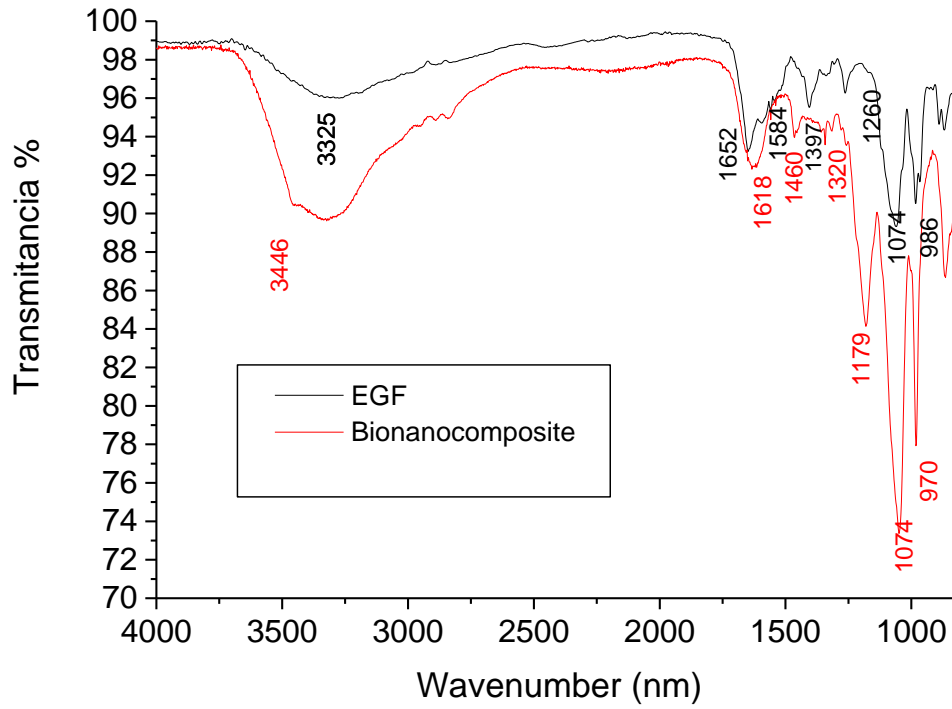
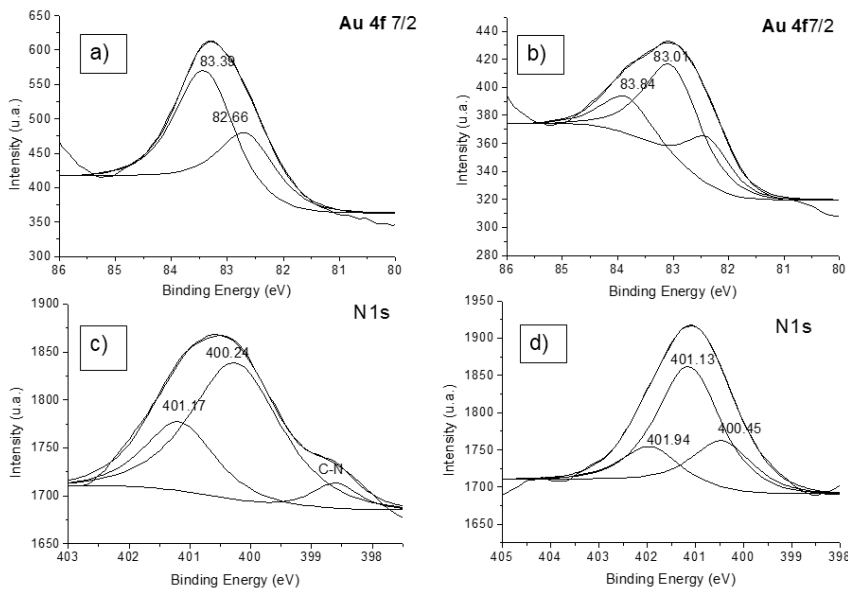


Figure 5.





[Imprimir](#)

[Cerrar](#)

De: **Progress in Natural Science: Materials International** (pns-mi@c-mrs.org.cn)

Enviado: viernes, 05 de agosto de 2016 11:33:51 a.m.

Para: [marilubell@hotmail.com](mailto:marilubell@hotmail.com)

Dear Dr. María González-Pedroza,

You have been listed as a Co-Author of the following submission:

Journal: Progress in Natural Science: Materials International

Corresponding Author: RAUL ALBERTO MORALES LUCKIE

Co-Authors: María G González-Pedroza, IBT; Víctor Sánchez-Mendieta, DR; Gustavo López-Téllez,

DR; Liliana Argueta-Figueroa, DR.

Title: Synthesis and characterization of coupling gold nanoparticles with epidermal growth factor for potential use in biomedicine

If you did not co-author this submission, please contact the Corresponding Author of this submission at [ramluckie@gmail.com](mailto:ramluckie@gmail.com); [rmoralesl@uaemex.mx](mailto:rmoralesl@uaemex.mx); do not follow the link below.

An Open Researcher and Contributor ID (ORCID) is a unique digital identifier to which you can link your published articles and other professional activities, providing a single record of all your research.

We would like to invite you to link your ORCID ID to this submission. If the submission is accepted, your ORCID ID will be linked to the final published article and transferred to CrossRef. Your ORCID account will also be updated.

To do this, visit our dedicated page in EES. There you can link to an existing ORCID ID or register for one and link the submission to it:

<http://ees.elsevier.com/pnsmi/l.asp?i=6934&l=80VOE769>

More information on ORCID can be found on the ORCID website, <http://www.ORCID.org>, or on our help page: [http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a\\_id/2210/p/7923](http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/2210/p/7923)

Like other Publishers, Elsevier supports ORCID - an open, non-profit, community based effort - and has adapted its submission system to enable authors and co-authors to connect their submissions to their unique ORCID IDs.

Thank you,

Progress in Natural Science: Materials International



## CAPITULO V-CONCLUSIONES

---

- La Microscopia Electrónica de Transmisión nos permitió reconocer la presencia de NPs de Au cuasiesféricas con un tamaño promedio de 8.09 nm.
- Se lograron acoplar las NPs de Au con el EGF siguiendo la metodología de Sokolov, *et al*, 2006, determinándose una banda de máxima absorción por la técnica UV-VIS de 526 nm y un tamaño promedio de partícula de 9.14, sin embargo, se atribuye este incremento al margen de error de 5.28 que se obtiene de la desviación estándar.
- Mediante FTIR no es posible determinar algún tipo de interacción entre las NPs de Au y el EGF, sin embargo podemos reconocer la presencia de los componentes antes y después de acoplarlos.
- Identificamos la interacción entre las NPs de Au y el EGF mediante XPS, a través de las diferencias de energía de enlace entre las muestras, analizando en las regiones de Au4f 7/2 y N1s, la cual resultó ser de tipo electrostática entre las NPs de Au y los grupos catiónicos (aminas protonadas) presentes en la proteína EGF.
- Corroboramos la interacción con un análisis con Potencial Z, donde observamos una disminución de la magnitud de la carga de las NPs de Au en solución de -30.15 a -7.19 mV, cuando se encuentran acopladas con el EGF.
- Estos estudios ayudarán a futuras investigaciones, puesto que estos dos materiales, forman un bionanocomposito con aplicaciones potenciales teranósticas, para revertir enfermedades crónicas degenerativas, como el cáncer, la esclerosis múltiple, entre otras.



## BIBLIOGRAFIA

1. Oh, J.K. and J.M. Park, *Iron oxide-based superparamagnetic polymeric nanomaterials: design, preparation, and biomedical application*. Progress in Polymer Science, 2011. **36**(1): p. 168-189.
2. Polak, P. and O. Shefi, *Nanometric agents in the service of neuroscience: Manipulation of neuronal growth and activity using nanoparticles*. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 2015. **11**(6): p. 1467-1479.
3. Poole Jr, C.P. and F.J. Owens, *Introduction to nanotechnology*. 2003: John Wiley & Sons.
4. Staniszewski, A., et al., *Slow cation transfer follows sensitizer regeneration at anatase TiO<sub>2</sub> interfaces*. Journal of the American Chemical Society, 2008. **130**(35): p. 11586-11587.
5. El-Shall, M., et al., *Nanomaterials: synthesis, properties and applications*. Institute of Physics Publishing, Bristol and Philadelphia, PA, 1996: p. 13-54.
6. Narayanan, R. and M.A. El-Sayed, *Changing catalytic activity during colloidal platinum nanocatalysis due to shape changes: electron-transfer reaction*. Journal of the American Chemical Society, 2004. **126**(23): p. 7194-7195.
7. Mateo, D., et al., *Nanopartículas de oro: aplicaciones y citotoxicidad in vitro*. Acta toxicológica argentina, 2013. **21**(2): p. 102-109.
8. Yang, M., et al., *Affibody modified and radiolabeled gold-iron oxide hetero-nanostructures for tumor PET, optical and MR imaging*. Biomaterials, 2013. **34**(11): p. 2796-2806.
9. Lim, J. and S.A. Majetich, *Composite magnetic-plasmonic nanoparticles for biomedicine: Manipulation and imaging*. Nano Today, 2013. **8**(1): p. 98-113.
10. Santos-Hernández D, G.-G.B.e.a., (2002) Electroanalysis 14-18.
11. Daniel, M.-C. and D. Astruc, *Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology*. Chemical reviews, 2004. **104**(1): p. 293-346.
12. 2012, M.e.I.F.D.d.C.R.C.I.
13. Wiley B, S.Y., Chen J, Chang H, Li Z Y, Li X, and Xia Y (2005) Mrs Bulletin 30,356.
14. Buzea, C., I.I. Pacheco, and K. Robbie, *Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity*. Biointerphases, 2007. **2**(4): p. MR17-MR71.
15. Ma, W., et al., *High-strength composite fibers: realizing true potential of carbon nanotubes in polymer matrix through continuous reticulate architecture and molecular level couplings*. Nano letters, 2009. **9**(8): p. 2855-2861.
16. Sasikumar, R. and R. Arunachalam, *Synthesis of nanostructured aluminium matrix composite (AMC) through machining*. Materials Letters, 2009. **63**(28): p. 2426-2428.
17. Zhou, J., et al., *Functionalized gold nanoparticles: synthesis, structure and colloid stability*. Journal of Colloid and Interface Science, 2009. **331**(2): p. 251-262.
18. España, C.M.M.T.N.A.y.f.
19. Noguez, C., *Surface plasmons on metal nanoparticles: the influence of shape and physical environment*. The Journal of Physical Chemistry C, 2007. **111**(10): p. 3806-3819.
20. Liu, X., et al., *SPR quantitative analysis of direct detection of atrazine traces on Au-nanoparticles: nanoparticles size effect*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2015. **218**: p. 1-7.
21. Huang, X., et al., *Plasmonic photothermal therapy (PPTT) using gold nanoparticles*. Lasers in medical science, 2008. **23**(3): p. 217-228.
22. Ito, A., et al., *Medical application of functionalized magnetic nanoparticles*. Journal of bioscience and bioengineering, 2005. **100**(1): p. 1-11.
23. Gold, A.W.B.I.U., *Nanoshells Hirsch, LR; Jackson, JB; Lee, A.; Halas, NJ; West, JL*. Analytical Chemistry, 2003. **75**(10): p. 2377-2381.
24. Al-Qadi, S. and C.R. López, *Nanopartículas metálicas: oro*. Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia, 2009.





25. Mieszawska, A.J., et al., *Multifunctional gold nanoparticles for diagnosis and therapy of disease*. Molecular pharmaceutics, 2013. **10**(3): p. 831-847.
26. Ohlsson, J. and G. Magnusson, *Analogues of glycosphingolipids and glycerolipids suitable for conjugation to gold-and amino-functionalised surfaces*. Tetrahedron, 2000. **56**(51): p. 9975-9984.
27. Andolfi, L., et al., *A poplar plastocyanin mutant suitable for adsorption onto gold surface via disulfide bridge*. Archives of biochemistry and biophysics, 2002. **399**(1): p. 81-88.
28. Jiang, L. and L. Gao, *Modified carbon nanotubes: an effective way to selective attachment of gold nanoparticles*. Carbon, 2003. **41**(15): p. 2923-2929.
29. Jiang, K., et al., *Selective Attachment of Gold Nanoparticles to Nitrogen-Doped Carbon Nanotubes*. Nano Letters, 2003. **3**(3): p. 275-277.
30. Satishkumar, B., et al., *Synthesis of metal oxide nanorods using carbon nanotubes as templates*. Journal of Materials Chemistry, 2000. **10**(9): p. 2115-2119.
31. Gautier, J., et al., *Recent advances in theranostic nanocarriers of doxorubicin based on iron oxide and gold nanoparticles*. Journal of Controlled Release, 2013. **169**(1): p. 48-61.
32. Sharma, P., et al., *Nanoparticles for bioimaging*. Advances in colloid and interface science, 2006. **123**: p. 471-485.
33. Causa, J.E. and E.H. Vila, *Factor de crecimiento epidérmico, innovación y seguridad*. Medicina Clínica, 2015. **145**(7): p. 305-312.
34. Reynolds, B. and S. Weiss, *Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system*. Science, 1992. **255**: p. 1707-1710.
35. Vescovi, A.L., et al., *bFGF regulates the proliferative fate of unipotent (neuronal) and bipotent (neuronal/astroglial) EGF-generated CNS progenitor cells*. Neuron, 1993. **11**(5): p. 951-66.
36. Craig, C.G., et al., *In vivo growth factor expansion of endogenous subependymal neural precursor cell populations in the adult mouse brain*. J.Neurosci., 1996. **16**: p. 2649-2658.
37. Kuhn, H.G., et al., *Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain*. J.Neurosci., 1997. **17**: p. 5820-5829.
38. Doetsch, F., et al., *EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells*. Neuron, 2002. **36**(6): p. 1021-34.
39. Gonzalez-Perez, O. and A. Quinones-Hinojosa, *Dose-dependent effect of EGF on migration and differentiation of adult subventricular zone astrocytes*. Glia, 2010. **58**(8): p. 975-83.
40. Gonzalez-Perez, O., et al., *Epidermal growth factor induces the progeny of subventricular zone type B cells to migrate and differentiate into oligodendrocytes*. Stem Cells, 2009. **27**(8): p. 2032-43.
41. Gonzalez-Perez, O. and A. Alvarez-Buylla, *Oligodendrogenesis in the subventricular zone and the role of epidermal growth factor*. Brain Res Rev, 2011. **67**(1-2): p. 147-56.
42. Kuhn, H.G., et al., *Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain*. J Neurosci, 1997. **17**(15): p. 5820-9.
43. Aguirre, A., et al., *Overexpression of the epidermal growth factor receptor confers migratory properties to nonmigratory postnatal neural progenitors*. J Neurosci, 2005. **25**(48): p. 11092-106.
44. Cohen, S., *Nobel Lecture 1986. Epidermal Growth Factor*. Physiology or Medicine, 1981. **1990**: p. 333-345.
45. El-Sayed, I.H., X. Huang, and M.A. El-Sayed, *Surface plasmon resonance scattering and absorption of anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles in cancer diagnostics: applications in oral cancer*. Nano letters, 2005. **5**(5): p. 829-834.
46. El-Sayed, I.H., X. Huang, and M.A. El-Sayed, *Selective laser photo-thermal therapy of epithelial carcinoma using anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles*. Cancer letters, 2006. **239**(1): p. 129-135.
47. Caprile, L., et al., *Interaction of l-cysteine with naked gold nanoparticles supported on HOPG: a high resolution XPS investigation*. Nanoscale, 2012. **4**(24): p. 7727-7734.
48. Dharanivasan, G., et al., *Gold nanoparticles assisted characterization of amine functionalized polystyrene multiwell plate and glass slide surfaces*. Applied Nanoscience, 2015. **5**(1): p. 39-50.



49. Cowan, J.A., *Bioinorganic Chemistry: A Short Course*. Rosette M. Roat-Malone. Hoboken, NJ: Wiley-Interscience, A John Wiley & Sons Inc. Publication, 2002, 366 pp., \$89.95, softcover. ISBN 0-471-15976-X. *Clinical Chemistry*, 2003. **49**(9): p. 1565-1566.
50. Joshi, H., et al., *Isothermal titration calorimetry studies on the binding of amino acids to gold nanoparticles*. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2004. **108**(31): p. 11535-11540.
51. Arango Ramírez, S. and A.M. Pérez Gómez, *Montaje y estandarización de un método para la determinación de hidrocarburos totales en matrices de agua por medio de las técnicas de infrarrojo y ultravioleta*. 2012.
52. Hidalgo, A.G.A., *EVALUACIÓN DE UN MÉTODO POR ESPECTROSCOPÍA UV-VIS PARA LA DETECCIÓN DE CONTAMINANTES ORGÁNICOS EN AGUA*.
53. Settle, F.A., *Handbook of instrumental techniques for analytical chemistry*. 1997: Prentice Hall PTR.
54. Igarashi, T., et al., *Characterization of Mn<sup>2+</sup> coordination states in ZnS nanocrystal by EPR spectroscopy and related photoluminescence properties*. *Journal of Nanoparticle Research*, 2001. **3**(1): p. 51-56.
55. Wagner, C.D. and G. Muilenberg, *Handbook of X-ray photoelectron spectroscopy*. 1979: Perkin-Elmer.
56. Rather, B. and D. Castner, *Surface Analysis: The Principal Techniques*, ed. by JC Vickerman. 1997, John Wiley and Sons, Chichester.
57. Osipow, L., *Surface chemistry*. 1962: Wiley Online Library.
58. Molière, K., *Low Energy Electrons and Surface Chemistry. Monographs in Modern Chemistry 4*. Von G. Ertl und J. Küppers. Verlag Chemie, GmbH, Weinheim 1974. 1. Aufl., X, 251 S., 152 Abb., 3 Tab., geb. DM 98.00. *Angewandte Chemie*, 1975. **87**(14): p. 525-525.
59. Yacamán, M. and J. Reyes, *Microscopía Electrónica: Una Visión del Microcosmos*, Edit. 1995, Fondo de Cultura Económica-Conacyt 1a. Edición, México.
60. Kumar, S., K. Gandhi, and R. Kumar, *Modeling of formation of gold nanoparticles by citrate method*. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2007. **46**(10): p. 3128-3136.
61. Liz-Marzán, L.M., *Nanometals: formation and color*. *Materials today*, 2004. **7**(2): p. 26-31.
62. Auffan, M., et al., *Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective*. *Nature nanotechnology*, 2009. **4**(10): p. 634-641.
63. O'connell, J. and P. Fox, *Heat-induced coagulation of milk*, in *Advanced Dairy Chemistry—1 Proteins*. 2003, Springer. p. 879-945.
64. Kong, J. and S. Yu, *Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures*. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 2007. **39**(8): p. 549-559.
65. Adochitei, A. and G. Drochioiu, *Rapid characterization of peptide secondary structure by FT-IR spectroscopy*. *Rev Roum Chim*, 2011. **56**(8): p. 783-791.
66. Ren, Z., et al., *FTIR, Raman, and XPS analysis during phosphate, nitrate and Cr (VI) removal by amine cross-linking biosorbent*. *Journal of colloid and interface science*, 2016. **468**: p. 313-323.
67. Sun, Z., et al., *Elucidating the interaction of propofol and serum albumin by spectroscopic and docking methods*. *Journal of Molecular Liquids*, 2016. **219**: p. 405-410.
68. Pandey, P., et al., *Amide-I and amide-A bands of  $\delta$ -valerolactam and its dimers: A combined matrix isolation-FTIR spectroscopy and quantum chemistry study*. *Journal of Molecular Structure*, 2010. **975**(1): p. 343-348.
69. Depciuch, J., et al., *Olfactory bulbectomy-induced changes in phospholipids and protein profiles in the hippocampus and prefrontal cortex of rats. A preliminary study using a FTIR spectroscopy*. *Pharmacological Reports*, 2015.
70. Zhao, X., et al., *FTIR spectra studies on the secondary structures of 7S and 11S globulins from soybean proteins using AOT reverse micellar extraction*. *Food Hydrocolloids*, 2008. **22**(4): p. 568-575.
71. Sarmiento, B., et al., *Characterization of insulin-loaded alginate nanoparticles produced by ionotropic pre-gelation through DSC and FTIR studies*. *Carbohydrate Polymers*, 2006. **66**(1): p. 1-7.



72. Deygen, I.M. and E.V. Kudryashova, *New versatile approach for analysis of PEG content in conjugates and complexes with biomacromolecules based on FTIR spectroscopy*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2016.
73. Casals, E., et al., *Time evolution of the nanoparticle protein corona*. ACS nano, 2010. **4**(7): p. 3623-3632.
74. Ivanov, M.R., H.R. Bednar, and A.J. Haes, *Investigations of the mechanism of gold nanoparticle stability and surface functionalization in capillary electrophoresis*. ACS Nano, 2009. **3**(2): p. 386-394.
75. Brewer, S.H., et al., *Probing BSA binding to citrate-coated gold nanoparticles and surfaces*. Langmuir, 2005. **21**(20): p. 9303-9307.
76. Zhou, J.C., et al., *Characterization of gold nanoparticle binding to microtubule filaments*. Materials Science and Engineering: C, 2010. **30**(1): p. 20-26.
77. Roat-Malone, R.M., *Inorganic Chemistry Essentials*. Bioinorganic Chemistry: A Short Course, Second Edition, 2007: p. 1-28.
78. Carré, A., W. Birch, and V. Lacarrière, *Glass substrates modified with organosilanes for DNA immobilization*. Silanes and other coupling agents, 2007. **4**: p. 1-14.
79. Wang, B., et al., *Aptamer induced assembly of fluorescent nitrogen-doped carbon dots on gold nanoparticles for sensitive detection of AFB 1*. Biosensors and Bioelectronics, 2016. **78**: p. 23-30.