

“Síntesis y Caracterización de Nanopartículas de Oro y su Funcionalización con Sondas Específicas de DNA de Achlya sp. y Escherichia coli”

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS E INGENIERÍA AMBIENTALES

PRESENTA:

M. en C. BLANCA ESTELA CHÁVEZ SANDOVAL

MATRÍCULA: 2123805365

ASESORA:

DRA. MARÍA TERESA CASTAÑEDA BRIONES

Junio de 2015

ÍNDICE

Dedicatoria	VII
Abreviaturas y Acrónimos	1
Resumen	3
Abstract	4
Capítulo I	5
Introducción	5
1 Introducción	6
Capítulo II	8
2. Estado del Arte	9
2.1 La nanotecnología	9
2.2 Síntesis de nanopartículas	11
2.3 Síntesis química de nanopartículas de oro	11
2.4 Síntesis biológica de nanopartículas de oro	14
2.5 Caracterización de AuNPs	15
2.5.1 Espectroscopía UV-Vis	15
2.5.2 Microscopía electrónica de barrido	17
2.5.3 Microscopía de fuerza atómica	17
2.5.4 Microscopía electrónica de transmisión	19
2.5.5 Espectrometría infrarroja con transformada de Fourier	20
2.6 Biosensores	22
2.6.1 Genosensores	24
2.6.1.1 La molécula del ácido desoxirribonucleico	24
2.6.2 Genosensores electroquímicos	26
2.7 Funcionalización de AuNPs	28
Capítulo III	31
Antecedentes	31
3. Antecedentes	32
Capítulo IV	36

4. Hipótesis	36
Capítulo V	38
5.1 Objetivo general	39
5.2 Objetivos específicos	39
Capítulo VI	40
Justificación	40
Capítulo VII	42
Materiales y métodos	42
7.1 Materiales y equipos	43
7.2 Reactivos y Soluciones	43
7.3 Síntesis Química de AuNPs	44
7.4 Biosíntesis de AuNPs	45
7.5 Caracterización de AuNPs	47
7.6 Diseño de Sondas Específicas de DNA	47
7.6.1 Funcionalización de AuNPs con Estreptavidina	51
7.6.2 Sondas de DNA biotiniladas	52
Capítulo VIII	53
Resultados y discusión	53
8.1 Síntesis Química de AuNPs	54
8.2 Síntesis Biológica de AuNPs	54
8.3 Síntesis de AuNPs con ácido málico	55
8.4 Caracterización por espectroscopía UV-Vis de las AuNPs obtenidas por síntesis química	56
8.4.1 Caracterización por TEM de las AuNPs obtenidas por síntesis química	57
8.4.2 Caracterización por AFM de las AuNPs obtenidas	57
8.5 Caracterización por espectroscopía UV-Vis de las AuNPs obtenidas por Biosíntesis	58
8.6.1 Caracterización UV-Vis de la síntesis química utilizando diferente pH.	59
8.6.3 Caracterización por AFM de la síntesis química a diferente pH	61
8.6.4 Biosíntesis a diferente pH	62
8.6.4.1 Biosíntesis con extracto de nopal	62
8.6.4.2 Biosíntesis con extracto de cebolla	63
8.6.4.3 Biosíntesis con extracto de café	65

8.6.4.4 Biosíntesis con extracto de laurel	67
8.6.4.5 Biosíntesis con extracto de pera	68
8.7 Comparación de las AuNPs biosintetizadas	70
8.7.1 Análisis Estadístico de los datos	71
8.8. Espectrometría Infrarroja con transformada de Fourier	72
8.9 Caracterización UV-Vis de la síntesis de AuNPs con ácido málico	76
8.10 Diseño de Sondas	77
8.10.1 Obtención de <i>Achlya sp.</i>	77
8.10.2 Extracción de DNA	78
8.10.3 Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)	80
8.10.4 Secuenciación de los productos de PCR	81
8.10.5 Análisis Bioinformático	83
8.10.6 Secuencia de las Sondas	84
8.11 Funcionalización de las AuNPs	85
8.11.1 AuNPs de citrato de sodio pH 7	86
8.11.2 AuNps de laurel pH 6.5	86
8.11.3 AuNPs de nopal pH 5	87
8.11.4 AuNPs de cebolla a pH 5	88
8.11.5 AuNPs de café a pH 9	88
Capítulo IX	89
Conclusiones y Recomendaciones	89
Capítulo X	92
Referencias	92
Anexos	98

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Algunas unidades básicas de la vida de tamaño nanométrico.</i>	9
<i>Figura 2. Tamaño, forma y distribución de las NPs.</i>	10
<i>Figura 3. a) Espectros UV-Vis de AuNPs de diferente tamaño. b) AuNPs sintetizadas.</i>	12
<i>Figura 4. Espectro de absorción UV-Vis obtenido para la síntesis de AuNPs utilizando citrato de sodio como agente reductor a diferente pH.</i>	13
<i>Figura 5. Ejemplo de un espectrofotómetro UV/Vis.</i>	15
<i>Figura 6. Espectro de Absorción UV-Vis de AuNPs de un tamaño aproximado de 20 nm.</i>	16
<i>Figura 7. A) Imágenes AFM, B) Componentes generales del microscopio de fuerza atómica.</i>	18
<i>Figura 8. Configuraciones del microscopio electrónico de transmisión.</i>	20
<i>Figura 10. Regiones básicas de un espectro de infrarrojo. Vibración de moléculas al suministrar luz infrarroja</i>	21
<i>Figura 10. Regiones básicas de un espectro de infrarrojo.</i>	22
<i>Figura 11. Principio básico de un biosensor electroquímico.</i>	23
<i>Figura 12. Imagen del DNA que se encuentra en el núcleo de las células.</i>	25
<i>Figura 13. A. Hibridación. B. Transcripción.</i>	26
<i>Figura 14. Bases del DNA y sus sitios electroactivos.</i>	27
<i>Figura 15. AuNP funcionalizada. (a) Tiolada, (b) Interacciones electrostáticas,</i>	29
<i>Figura 16. Síntesis química de AuNPs.</i>	44
<i>Figura 17. Extractos utilizados en la biosíntesis de AuNPs.</i>	45
<i>Figura 18. Biosíntesis</i>	46
<i>Figura 19. Reacción en Cadena de la Polimerasa.</i>	49
<i>Figura 20. En el tubo de la izquierda se observa la sal de oro, a la derecha las AuNPs</i>	54
<i>Figura 21. AuNPs sintetizadas con ácido málico como agente reductor.</i>	55
<i>Figura 22. Espectro UV-Vis de las AuNPs sintetizadas en este trabajo.</i>	56
<i>Figura 23. Imágenes TEM de las AuNPs obtenidas experimentalmente de forma esférica, la barra de escala de izquierda a derecha es de 20, 10 y 5 nm.</i>	57
<i>Figura 24. Imágenes topográficas de AFM correspondientes a las AuNPs sintetizadas en este trabajo con citrato de sodio. La escala de tamaño es de 0 a 30 nm.</i>	57
<i>Figura 25. Espectros de absorción UV-Vis de las AuNPs biosintetizadas.</i>	59
<i>Figura 26. Espectro de absorción UV-Vis de las AuNPs obtenidas utilizando citrato de sodio como agente reductor, a diferente pH.</i>	60
<i>Figura 27. Imágenes TEM de las AuNPs sintetizadas con citrato de sodio.</i>	61
<i>Figura 28. Imágenes AFM de las AuNPs sintetizadas con citrato de sodio.</i>	61
<i>Figura 29. Espectro UV-Vis de las AuNPs obtenidas utilizando extracto de nopal como agente reductor a diferente pH</i>	62
<i>Figura 30. Imágenes TEM de las AuNPs sintetizadas con extracto de nopal.</i>	63
<i>Figura 31. Imágenes AFM de las AuNPs sintetizadas con extracto de nopal.</i>	63
<i>Figura 32. Espectro UV-Vis de las AuNPs obtenidas utilizando extracto de cebolla como agente reductor, a diferente pH.</i>	64
<i>Figura 33. Imágenes TEM de las AuNPs sintetizadas con extracto de cebolla. .</i>	64
<i>Figura 34. Imágenes AFM de las AuNPs sintetizadas con extracto de cebolla..</i>	65
<i>Figura 35. Espectro de absorción UV-Vis de las AuNPs obtenidas utilizando extracto de café como agente reductor, a diferente pH.</i>	66
<i>Figura 36. Imágenes TEM de las AuNPs sintetizadas con extracto de café.</i>	66
<i>Figura 37. Imágenes AFM de las AuNPs sintetizadas con extracto de café.</i>	67

<i>Figura 38. Espectro de absorción UV-Vis de las AuNPs obtenidas utilizando extracto de laurel como agente reductor, a diferente pH.</i>	67
<i>Figura 39. Imágenes TEM de las AuNPs sintetizadas con extracto de laurel.</i>	68
<i>Figura 40. Imágenes AFM de las AuNPs sintetizadas con extracto de laurel A) pH 6.5,</i>	68
<i>Figura 41. Espectro de absorción UV-Vis de las AuNPs obtenidas utilizando extracto de Pera como agente reductor, a diferente pH.</i>	69
<i>Figura 42. Imágenes TEM de las AuNPs sintetizadas con extracto de pera A) pH 4.5,</i>	69
<i>Figura 43. Imágenes AFM de las AuNPs sintetizadas con extracto de pera A) pH 4.5, B) pH 7 y C) pH 9.</i>	70
<i>Figura 44. Análisis de Varianza (ANOVA) de los datos de tamaño y pH de AuNPs</i>	71
<i>Figura 45. Espectro IR obtenido del extracto de nopal.</i>	73
<i>Figura 46. Espectro IR del extracto de cebolla.</i>	74
<i>Figura 47. Espectro IR del extracto de café.</i>	74
<i>Figura 48. Espectro IR del extracto de laurel.</i>	75
<i>Figura 49. Espectro IR del extracto de pera.</i>	75
<i>Figura 50. Espectro de absorción UV-Vis de las AuNPs obtenidas utilizando extracto de ácido málico como agente reductor</i>	76
<i>Figura 51. A). Achlya sp. aislado de los canales de Xochimilco en la Ciudad de México, se encuentra sobre alimento de peces. B) Achlya sp. sobre una libélula.</i>	77
<i>Figura 52. A y B son micrografías a 40 X, tomadas al microcultivo de Achlya sp.</i>	78
<i>Figura 53. Geles de agarosa al 0.8% A) Extracción realizada con el Kit QUIAGEN DNAeasy.</i>	79
<i>Figura 54. Gel de agarosa al 0.8%. Extracción de DNA con el Kit MoBio UltraClean™ soil DNA.</i>	79
<i>Figura 55. Gel de agarosa al 1.2%. Muestra los productos de PCR obtenidos. M, marcador molecular Kapa. 1-3 producto de PCR con DNA de: 1-2 Achlya sp. 3. Aspergillus 4, blanco.</i>	80
<i>Figura 56. Gel de agarosa al 1.2%. M, marcador molecular Kapa. 1-3 PCR de Achlyasp 4 PCR Aspergillus sp.</i>	80
<i>Figura 57. Fragmento del cromatograma obtenido de la secuenciación del producto de PCR con DNA de Achlya sp.</i>	82
<i>Figura 58. Fragmento del cromatograma obtenido de la secuenciación del producto de PCR con DNA de Aspergillus sp.</i>	82
<i>Figura 59. Alineación de la secuencia obtenida de Aspergillus sp., número de acceso: HQ850370.1.</i>	83
<i>Figura 60. Alineación de la secuencia obtenida de Achlya sp.</i>	84
<i>Figura 61. UV-Vis de las AuNPs de citrato de sodio a pH 7 sin funcionalizar y funcionalizadas.</i>	86
<i>Figura 62. Espectros de absorción UV-Vis de las AuNPs de laurel a pH 6.5 sin funcionalizar y funcionalizadas.</i>	86
<i>Figura 63. Espectros de absorción UV-Vis de las AuNPs de pera a pH 7, sin funcionalizar y funcionalizadas.</i>	87
<i>Figura 64. Espectros de absorción UV-Vis de las AuNPs de nopal a pH 5, sin funcionalizar y funcionalizadas.</i>	87
<i>Figura 65. Espectros de absorción UV-Vis de las AuNPs de la cebolla a pH 5, sin funcionalizar y funcionalizadas.</i>	88
<i>Figura 66. Espectros de absorción UV-Vis de las AuNPs de café a pH 9, sin funcionalizar y funcionalizadas.</i>	88

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Efecto de la temperatura sobre el citrato de sodio.</i>	13
<i>Tabla 2. Efectos de la concentración del citrato de sodio en la solución.</i>	13
<i>Tabla 3. Secuencia de los Espaciadores internos transcritos (ITS) del DNAr</i>	50
<i>Tabla 4. Reactivos y cantidades para PCR de cada muestra</i>	50
<i>Tabla 5. Sondas diseñadas y sintetizadas</i>	52
<i>Tabla 6. pH de los extractos de las diferentes plantas utilizados como agente reductor en la síntesis biológica de AuNPs.</i>	55
<i>Tabla 7. Extractos de las diferentes plantas utilizados como agente reductor en la síntesis biológica de AuNPs y su longitud de onda máxima.</i>	58
<i>Tabla 8. Comparación de la longitud de onda, tamaño y forma de las AuNPs sintetizadas.</i> 6060	
<i>Tabla 9. Comparación de la longitud de onda, tamaño y forma de las AuNPs.</i>	70
<i>Tabla 10. Prueba de Fisher</i>	72
<i>Tabla 11. Secuencia de las sondas diseñadas.</i>	83
<i>Tabla 12. AuNPs funcionalizadas.</i>	84

DEDICATORIA

A MIS PADRES

José Manuel Chávez García

Estela Sandoval Gómez

A MI ESPOSO

Francisco García Franco

A MIS HERMANOS

Ulises

Homero

Magda

Flor

Aura

Cipac

A MIS SOBRINOS

Beli

Uli

Liz

A MIS ALUMNOS

A MIS AMIGOS

Abreviaturas y Acrónimos

A	Adenina
AFLP	Polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados
AFM	Microscopía de fuerza atómica
AgNPs	Nanopartículas de plata
AuNPs	Nanopartículas de oro
BLAST	Bioinformática para el alineamiento de bases nucleotídicas
C	Citosina
CTAB	Bromuro de cetiltrimetilamonio
DAF	Amplificación de huellas del DNA
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAr	DNA ribosomal
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato
DPV	Voltametría de pulso diferencial
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
FTIR	Espectrometría infrarroja con transformada de Fourier
G	Guanina
GNRs	Nanobarras de oro
HRTEM	Microscopio electrónico de transmisión de alta resolución
Hz	Hertz
IME	Impedancia con microelectrodo
IR	Infrarrojo
LV	Voltametría linear
LSV	Voltametría linear cuadrada
m	metro
M-GECE	Electrodo de compuesto grafito-epoxi con imán integrado
miRNAs	micro RNA
MP-PCR	PCR iniciada con microsatélites
NIR	Infrarrojo cercano

nm	Nanómetros
NPs	Nanopartículas
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pH	Potencial Hidrógeno
PT	Proyecto terminal
PVP	Polivinilpirrolidona
RAPD	ADN polimórfico amplificado al azar
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	PCR en tiempo real
SDS	Dodecil sulfato sódico
<i>S. typhi</i>	<i>Salmonella typhi</i>
SEM	Microscopía Electrónica de Barrido
SPM	Scanning Probe Microscope
T	Timina
TEM	Microscopía Electrónica de Transmisión
UAM-A	Universidad Autónoma Metropolitana-Azcapotzalco
UV-Vis	Ultravioleta visible

RESUMEN

El auge por la utilización de nanopartículas (NPs) de metales nobles en diversos campos, ha derivado en la síntesis inorgánica de NPs metálicas, sin embargo las metodologías utilizadas para su obtención son generalmente costosas e involucran el uso de químicos peligrosos, es por ello que recientemente ha aumentado el desarrollo de alternativas sustentables y amigables con el ambiente.

Sintetizar AuNPs biológicamente es un procedimiento simple, poco costoso y menos perjudicial para el ambiente. El uso de extractos de plantas para la síntesis de nanomateriales aún no se ha explorado completamente, sin embargo representa una buena alternativa ya que además de las ventajas antes mencionadas se obtienen NPs estables de diferente tamaño y forma.

En este trabajo se realizó la síntesis y caracterización de AuNPs, así como su funcionalización con sondas específicas de DNA de dos microorganismos de interés ambiental *Achlya sp.* y *Escherichia coli* (*E. coli*). *Achlya sp.* es un hongo que infecta peces en piscifactorías, acuarios y embalses naturales; *E. coli*, es una bacteria patógena para los humanos y constituye una fuente de contaminación en alimentos y agua.

La sonda o secuencia blanco diseñada para *Achlya sp.* es: 5'GCACCGGAAGTACAGACCAA3' y para *E. coli*: 5'TTGCTTTGGCAAGTCCTCCT 3'

Las AuNPs obtenidas por síntesis química y por síntesis biológica a partir de extractos de laurel, nopal, cebolla, pera y café, fueron funcionalizadas con DNA de *Achlya sp.* y *E. coli* y pueden ser utilizadas en el diseño y construcción de biosensores ambientales para detectar a los microorganismos antes mencionados, excepto las NPs de café a pH 9, ya que estas no mostraron mediante caracterización por UV-Vis, una buena funcionalización.

Por otro lado se propone que para la síntesis biológica, el ácido málico puede estar actuando como agente reductor y el grupo amino como agente estabilizador.

Los genosensores permiten monitorear, prevenir y corregir aspectos que causan desequilibrios ecológicos en ambientes acuáticos. Estos nuevos dispositivos analíticos proporcionan información de forma rápida, simple y de bajo costo, comparada con las técnicas de análisis convencionales.

ABSTRACT

The pick in the use of noble metal nanoparticles (NPs) in various fields has resulted in inorganic synthesis of metal NPs, however the methodologies used for their preparation are generally expensive and involve the use of hazardous chemicals, is why has recently increased the development of sustainable and environmentally friendly alternatives.

Synthesize biologically AuNPs is easy, inexpensive and is less damaging to the environment. The use of plant extracts for the synthesis of nanomaterials has not yet been fully explored, however represents a good alternative as well as the aforementioned advantages are obtained stable NPs of different size and shape.

In this work the synthesis and characterization of AuNPs was performed, and their functionalization with specific DNA probes of two microorganisms of environmental interest *Achlya sp.* and *Escherichia coli* (*E. coli*). *Achlya sp.* is a fungus that infects fish farms, aquariums and natural reservoirs; *E coli* is a bacteria pathogenic to humans and is a source of contamination in food and water.

The DNA probe or target sequence designed to *Achlya sp.* is:

5' GCACCGGAAGTACAGACCAA 3'

and *E. coli*: 5'TTGCTTTGGCAAGTCCTCCT 3'

The AuNPs obtained by chemical synthesis and biological synthesis extracts from laurel, nopal, onion, pear and coffee were functionalized with DNA *Achlya sp.* and *E. coli* and can be used in the design and construction of biosensors for detecting environmental microorganisms before mentioned, except NPs coffee at pH 9, as these do not show a good functionalization.

Furthermore it is proposed that for the biological synthesis, malic acid may be acting as a reducing agent and the amino group as a stabilizing agent.

Finally the genosensors allow monitoring, preventing and correcting issues that cause ecological imbalances in aquatic environments. These new analytical devices provide information quickly, simple and inexpensive compared with conventional analysis techniques.

Capítulo I

Introducción



1 Introducción

Las nanopartículas (NPs) de metales nobles han despertado un gran interés en diversos campos del conocimiento científico, especialmente en los estudios de las áreas biomédica y ambiental (Castro-Ortíz, 2007; Wei *et al.*, 2010; Díaz *et al.*, 2011). La integración de la nanotecnología en combinación con la Biología Molecular y la Electroquímica, han creado una gran expectativa debida al desarrollo de nuevas estrategias de detección de ácidos nucleicos basadas en nanomateriales y que constituyen herramientas importantes en genómica, diagnóstico médico, farmacogenética, patología, criminología, seguridad alimentaria, monitoreo ambiental, entre otros (Wang, 2003; Erdem, 2007).

Los biosensores son dispositivos analíticos que proveen información cuantitativa o semicuantitativa utilizando un elemento biológico de reconocimiento que está en contacto directo con un transductor. El elemento biológico puede ser una enzima, un anticuerpo, ácidos nucleicos, células e inclusive tejidos. Dependiendo del elemento de reconocimiento se definen como sensores enzimáticos, inmunosensores, genosensores, entre otros (Upadhyayula, 2012).

En este trabajo se realizó la síntesis y caracterización de nanopartículas de oro (AuNPs), así como su funcionalización con sondas específicas de DNA (ácido desoxirribonucleico) de dos microorganismos de interés ambiental *Achlya sp.* y *E. coli*. *Achlya sp.*, es un hongo que infecta peces en piscifactorías, acuarios y embalses naturales; *E. coli*, es una bacteria patógena para los humanos y puede ser fuente de contaminación en alimentos y agua.

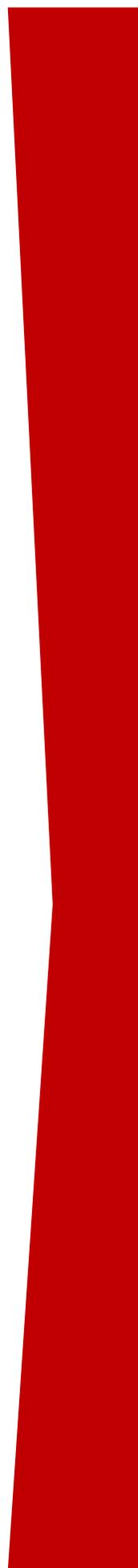
Las AuNPs funcionalizadas con DNA pueden ser utilizadas en el diseño y construcción de biosensores ambientales para detectar a los microorganismos antes mencionados, permitiendo monitorear, prevenir y corregir aspectos que

causen desequilibrios ecológicos en ambientes acuáticos tales como los canales de Xochimilco, hábitat del pez endémico *Girardinichtys viviparus*, que se encuentra en peligro de extinción (Navarrete-Salgado *et al.*, 2004), debido a la sobreexplotación, contaminación con descargas de aguas residuales y la consecuente infección de *Achlya sp.*

Estos nuevos dispositivos analíticos (genosensores) proporcionan información de forma rápida, simple y de bajo costo, comparada con las técnicas convencionales de análisis de DNA.

Capítulo II

Estado del Arte



2. Estado del Arte

2.1 La nanotecnología

La nanotecnología se refiere tanto a la investigación como a la tecnología desarrollada a escala atómica, molecular y macromolecular (Erdem, 2007). Las NPs de metales nobles, y específicamente, las AuNPs, exhiben excelentes propiedades físicas, químicas y biológicas, que son intrínsecas a su tamaño (Saifuddin *et al.*, 2009).

La investigación del comportamiento de la materia en la escala nanométrica abre una prometedora perspectiva de nuevos conocimientos. Las propiedades físicas de estas partículas son muy distintas de las que se observan en un sólido de tamaño normal o macroscópico con la misma composición química. Hoy día comienzan a utilizarse de modo habitual técnicas experimentales que permiten fabricar, caracterizar y manipular este tipo de partículas. Un aspecto de relevancia es la coincidencia de escala de tamaño, el nanómetro (1×10^{-9} m) con las unidades básicas de la vida. Los cromosomas, un virus o una molécula tienen tamaño nanométrico (Figura 1); esta convergencia de escala ha conducido el aterrizaje de la nanotecnología en la Biofísica (Hernando, 2007).



Figura 1. Algunas unidades básicas de la vida de tamaño nanométrico. Modificada de (google imagens).

Las NPs metálicas les confieren a los vitrales sus intensas y coloridas tonalidades, en las que AuNPs están presentes en los vidrios de color rojo y NPs de plata (AgNPs), en los amarillos (Cheang-Wong, 2005).

Las propiedades de las NPs, en particular las propiedades ópticas dependen fundamentalmente del tamaño, la forma y la distribución espacial de éstas en la muestra (Wolfgang *et al.*, 2007), (Figura 2).

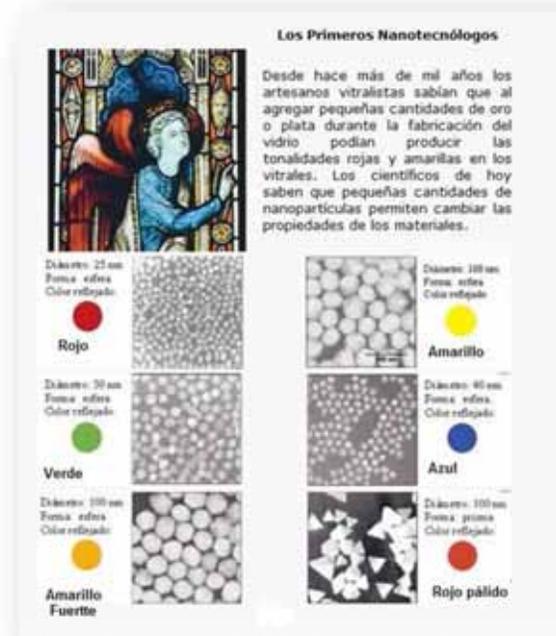


Figura 2. Tamaño, forma y distribución de las NPs. Modificada de Cheang-Wong, (2005).

Las NPs de metales nobles han sido estudiadas durante los últimos 15 años; para su correcta utilización los protocolos especifican la importancia de su tamaño y su forma, que puede ser de esfera, de barra, de cubo, de triángulo, etc. (Turkevich *et al.*, 1951; Sun y Xia, 2002; Kimling *et al.*, 2006; Castañeda *et al.*, 2007; De la Escosura *et al.*, 2011).

2.2 Síntesis de nanopartículas

Para sintetizar las NPs se habían utilizado principalmente métodos físicos, químicos y procesos mecánicos, sin embargo recientemente se están incluyendo métodos biológicos (Shankar *et al.*, 2004; Cheang-Wong, 2005., Rico-Moctezuma *et al.*, 2010; Narayanany Sakthivel, 2011). Con estos métodos se obtienen NPs de tamaño desde 1-100 nm y se utilizan en muchos campos incluyendo electrónica, fotónica, biomedicina y ciencias ambientales, entre otras (Tokonami *et al.*, 2012).

2.3 Síntesis química de nanopartículas de oro

El método estándar más utilizado para la síntesis química de AuNPs es el descrito por Turkevich *et al.*, en 1951. AuNPs con tamaño de 2-100 nm de diámetro pueden ser obtenidas por reducción controlada de cloruro de oro usando distintas condiciones. Faraday fue el primero en preparar en 1857 oro coloidal por reducción del cloruro de oro con fósforo, atribuyendo el color rojo resultante a la obtención de partículas de tamaño muy pequeño. Mie en 1908 corroboró que el color del oro coloidal es dependiente del tamaño (Bohren y Huffman, 1983); desde entonces y especialmente durante los últimos años, se han dirigido importantes esfuerzos a la preparación por reducción de sales de oro utilizando generalmente citrato de sodio como agente reductor y en presencia de agentes estabilizantes que previenen la aglomeración de AuNPs prácticamente monodispersas y de tamaño controlado (Figura 3).

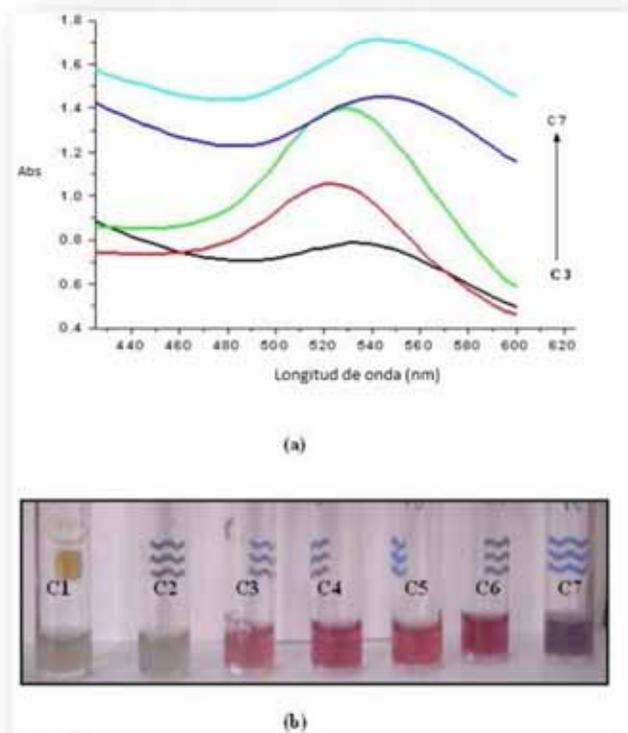


Figura 3. a) Espectros UV-Vis de AuNPs de diferente tamaño. b) AuNPs sintetizadas. C1 más pequeñas-C7 más grandes. Modificada de Bohren y Huffman, (1983).

Se comprobó que la relación de citrato/oro, la temperatura y la velocidad de adición del agente reductor pueden influir en el tamaño de las AuNPs obtenidas; también el pH de la solución tiene un papel fundamental en la velocidad de la reacción así como sobre el tamaño y distribución de las NPs (Doyen *et al.*, 2013) (Figura 4). El efecto de la temperatura se observa en la tabla 1, y el efecto de la concentración del citrato de sodio en la tabla 2.

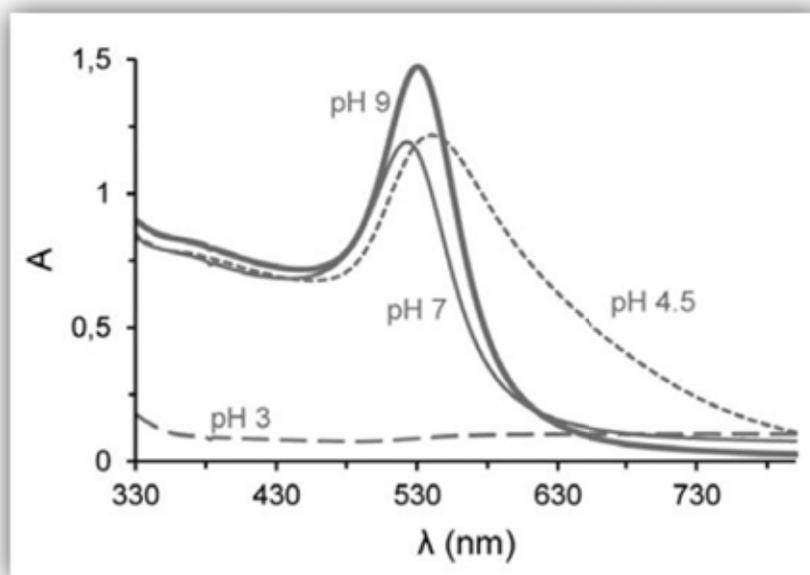


Figura 4. Espectro de absorción UV-Vis obtenido para la síntesis de AuNPs utilizando citrato de sodio como agente reductor a diferente pH.
Modificada de Doyen *et al.*, (2013).

Tabla 1. Efecto de la temperatura sobre el citrato de sodio.
Modificada de: Turkevich *et al.*, (1951).

Temperatura en °C	Tiempo en min	Tamaño de NP en nm
Para completar la reacción		
100	5	20
80	25	16.5
70	45	18

Tabla 2. Efectos de la concentración del citrato de sodio en la solución.
Modificada de: Turkevich *et al.* (1951).

Citrato (mg)	Tiempo en min	Tamaño de NP en nm
Para completar la reacción		
50	5	20
25	5	14.5
10	2	16.5
5	1.2	24
3.75	2	Conglomerados sucios
2.5	2	Conglomerados sucios

2.4 Síntesis biológica de nanopartículas de oro

La utilización de NPs de metales nobles en diversos campos, ha derivado en la síntesis inorgánica de NPs metálicas mediante radiación ultravioleta, tecnologías en aerosol y ablación láser, entre otras, sin embargo, estas metodologías son costosas e involucran el uso de químicos peligrosos, es por ello que recientemente ha aumentado el desarrollo de metodologías alternativas sustentables y amigables con el medio ambiente (Kumar *et al.*, 2008; Rico-Moctezuma *et al.*, 2010; Narayanan y Sakthivel, 2011; Philip, 2010).

Sintetizar AuNPs biológicamente es un procedimiento simple, poco costoso y es menos perjudicial para el ambiente, comparado con la síntesis química. El uso de extractos de plantas para la síntesis de nanomateriales aún no se ha explorado completamente, sin embargo representa una buena alternativa ya que además de las ventajas antes mencionadas se obtienen NPs estables de diferente tamaño y forma (Philip, 2010). Un factor importante a ser considerado es el pH de la solución ya que estudios recientes han demostrado que es un parámetro crítico en el tamaño y distribución de las NPs (Doyen *et al.*, 2013).

Las AuNPs pueden ser producidas con distintos tamaños y formas y ser fácilmente funcionalizadas con un amplio abanico de ligandos, tales como: anticuerpos, polímeros, sondas de diagnóstico, fármacos, material genético, inclusive para la detección de amenazas químicas y biológicas (Upadhyayula, 2012).

2.5 Caracterización de AuNPs

La caracterización de las AuNPs es necesaria para determinar tamaño, forma y propiedades, la cual se realiza mediante diferentes técnicas; a continuación se describen algunas.

2.5.1 Espectroscopía UV-Vis

En un análisis espectrofotométrico se aprovecha la absorción selectiva que tiene una sustancia sobre una longitud de onda específica del total del espectro. La absorción de las radiaciones ultravioleta, visibles e infrarrojas depende de la estructura de las moléculas, y es característica para cada sustancia química. Se puede analizar el espectro de radiación que absorbe la molécula, con lo que se tendrá un espectro de absorción, o se puede estudiar el espectro de la radiación que emite, para obtener un espectro de emisión. Cuando se realiza un análisis espectrofotométrico se emplea la longitud de onda de máxima absorción, pues así se tiene una mayor sensibilidad en el método (Skoog *et al.*, 2006; Jentoft, 2009).

Un espectrofotómetro es un equipo conformado generalmente de una fuente de radiación, un monocromador, un contenedor de la muestra (porta celdas), un fotodetector y el dispositivo de lectura (Figura 5).



Figura 5. Ejemplo de un espectrofotómetro UV/Vis.

Las fuentes de radiación empleadas para la región visible son filamentos incandescentes (tungsteno o tungsteno – halógeno) que suministran la energía radiante necesaria para el análisis y mantienen la energía y densidad de flujo de la luz durante el tiempo de operación. Para el espectro de luz ultravioleta se emplean lámparas de descarga de hidrógeno o deuterio, que operan a bajas presiones y voltajes reducidos (40 V aprox.) y que trabajan muy bien en el rango de 380 – 160 nm (Skoog *et al.*, 2006).

Las AuNPs pueden caracterizarse por la banda de absorción que se presenta en la región del visible, en donde la longitud de onda del máximo de absorción está relacionada con el tamaño de la nanopartícula e incluso puede utilizarse para determinar también la concentración de una forma simple y rápida (Haiss *et al.*, 2007; Wolfgang *et al.*, 2007). La figura 6, muestra el espectro de absorción de las AuNPs en la región visible. Es posible observar el espectro característico a la longitud de onda máxima, que se ubica alrededor de 522 nm para partículas de un diámetro de aproximadamente 20 nm (Mendoza, 2011).

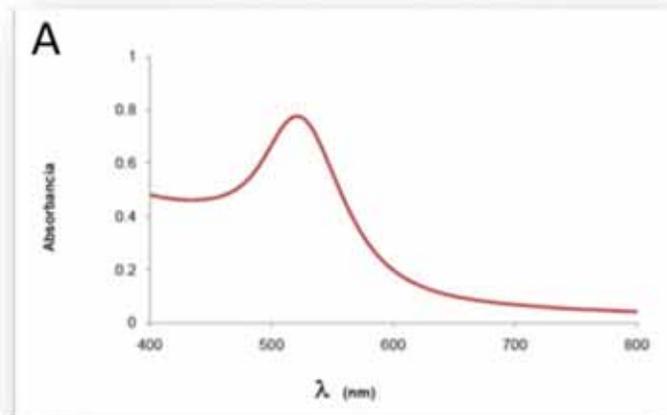


Figura 6. Espectro de Absorción UV-Vis de AuNPs de un tamaño aproximado de 20 nm.
Fuente: Mendoza, 2011

2.5.2 Microscopía electrónica de barrido

Es una herramienta muy utilizada para la examinación ultra estructural de las NPs. Utiliza un haz de electrones en lugar de un haz de luz para formar una imagen, tiene una gran profundidad de campo, produce imágenes de alta resolución y la preparación de las muestras es relativamente fácil ya que la mayoría de los microscopios electrónicos de barrido sólo requieren que éstas sean conductoras. La Microscopía electrónica es más ventajosa que el UV-Vis por la longitud de onda del electrón $\lambda=0.005$ nm, con un voltaje de 50 kV, mientras que con UV-Vis la $\lambda=400-700$ nm (Stadtländer, 2007).

Para caracterizar las AuNPs con este tipo de microscopía primero deben ser adsorbidas en una superficie de silicón funcionalizada de la siguiente manera: la superficie de silicón es limpiada con una solución de H_2SO_4 y H_2O_2 en un baño ultrasónico seguido de una adsorción de moléculas de hidrocarbano con silano y grupos amino los que se unirán de forma muy fuerte a la superficie del oro. Todo lo anterior facilita el análisis de las NPs en cuanto a tamaño y forma (Gai *et al.*, 2011).

2.5.3 Microscopía de fuerza atómica

Este tipo de microscopía es otra herramienta importante para el estudio de la forma y tamaño de las AuNPs. Entra en la familia de las microscopías de sondas de barrido donde una sonda puntiaguda barre la superficie de una muestra monitorizando las interacciones que ocurren entre la punta y la muestra, por ello también se le considera un perfilador en 3D. Durante el barrido se crea una imagen y la medida de ésta se representa con contraste de color. La microscopía AFM sondea la superficie de una muestra con una punta muy aguda, de un par de micras de largo y menos de 10 nm de diámetro. La punta se localiza al final del brazo del cantilever de 100 a 200 micras de largo. La fuerza entre la punta y la superficie de la muestra hace que el cantilever se doble o flexione mientras un

detector mide esta flexión que ocurre conforme la punta barre la superficie y con ello se obtiene un mapa topográfico. La figura 7 muestra algunas imágenes AFM, así como los componentes de un microscopio de fuerza atómica. Este tipo de microscopía puede ser aplicada a materiales aislantes, semiconductores o conductores (Hussain *et al.*, 2005).

Para observar las AuNPs en este tipo de microscopio también se deben adsorber en una mica, dejándolas secar durante 24 horas.

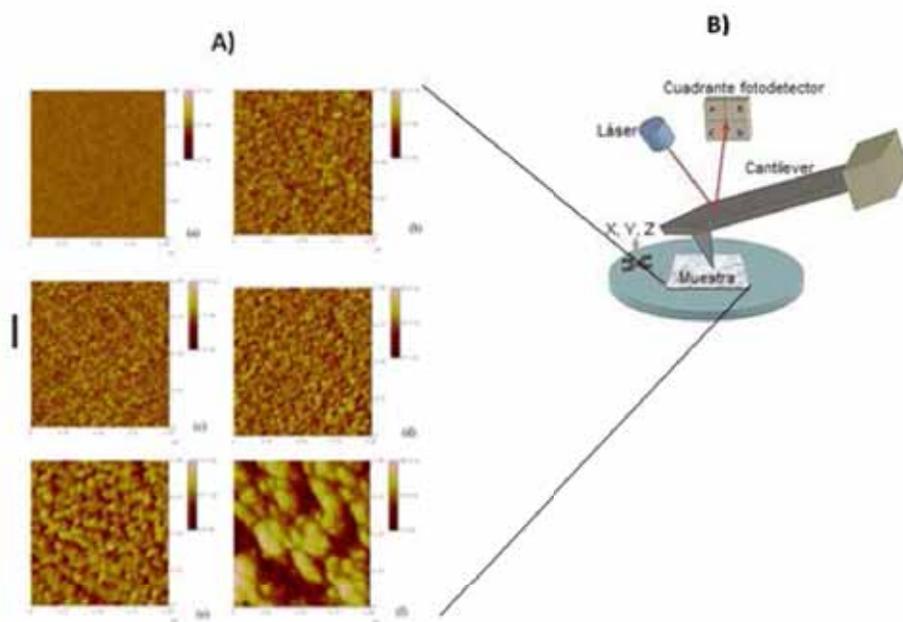


Figura 7. A) Imágenes AFM, B) Componentes generales del microscopio de fuerza atómica. Modificada de (google imagens).

2.5.4 Microscopía electrónica de transmisión

En esta microscopía, a diferencia de SEM y AFM, el microscopio electrónico de barrido no explora superficies, sino que el haz de electrones incidente atraviesa la muestra, y la sombra de detalles finos se observa en una pantalla fosforescente con propiedades de emisión de luz (Figura 8). Para que se produzca la transmisión de electrones a través de la muestra es necesario que ésta sea delgada, es decir, transparente a los electrones, por lo que es recomendable no utilizar muestras de más de 100 nm de grosor ya que cuanto menor sea el espesor de la muestra mejor calidad de imágenes se puede obtener (Hernández, 2010).

La preparación de la muestra incluye por ejemplo fijar, deshidratar, cortar, embeber, entre otras; dependiendo de la muestra a analizar, esta preparación de múltiples pasos debe ser realizada con extremo cuidado a fin de evitar interferencias y contar con una adecuada interpretación de las imágenes obtenidas (Stadtländer, 2007).



Figura 8. Microscopio electrónico de transmisión. Modificada de Hernández, (2010).

2.5.5 Espectrometría infrarroja con transformada de Fourier

Esta técnica proporciona un espectro de reflexión de las bandas de los grupos funcionales característicos de las sustancias inorgánicas y orgánicas, por lo cual es posible realizar una identificación cualitativa de las moléculas presentes en el material. Se fundamenta en la absorción de la radiación IR por las moléculas en vibración (Figura 9), la molécula comienza a vibrar de una determinada manera gracias a la energía que se le suministra mediante luz infrarroja (Morrison y Boyd 1987; Jentoft, 2012).



Figura 10. Regiones básicas de un espectro de infrarrojo. Tomada de: Morrison y Boyd (1987)

En la zona del espectro electromagnético IR con longitudes de onda del infrarrojo medio (entre 4000 y 1300 cm^{-1}) se suelen observar una serie de bandas de absorción provocadas por las vibraciones entre únicamente dos átomos de la molécula. Estas vibraciones derivan de grupos que contienen hidrógeno o de grupos con dobles o triples enlaces (Morrison y Boyd, 1987; Jentoft, 2012).

En la zona del espectro electromagnético IR con longitudes de onda comprendidas entre 1300 y 400 cm^{-1} (infrarrojo lejano), la asignación de las bandas de absorción a vibraciones moleculares es más difícil de realizar, debido a que cada una de ellas está generada por absorciones individuales sumadas (multiplicidad de las bandas). Es la denominada zona de la huella dactilar (flexión de enlaces CH, CO, CN, CC, entre otros). En esta zona de longitudes de onda, pequeñas diferencias en la estructura y constitución de las moléculas dan lugar a variaciones importantes en los máximos de absorción (Figura 10) (Morrison y Boyd, 1987).

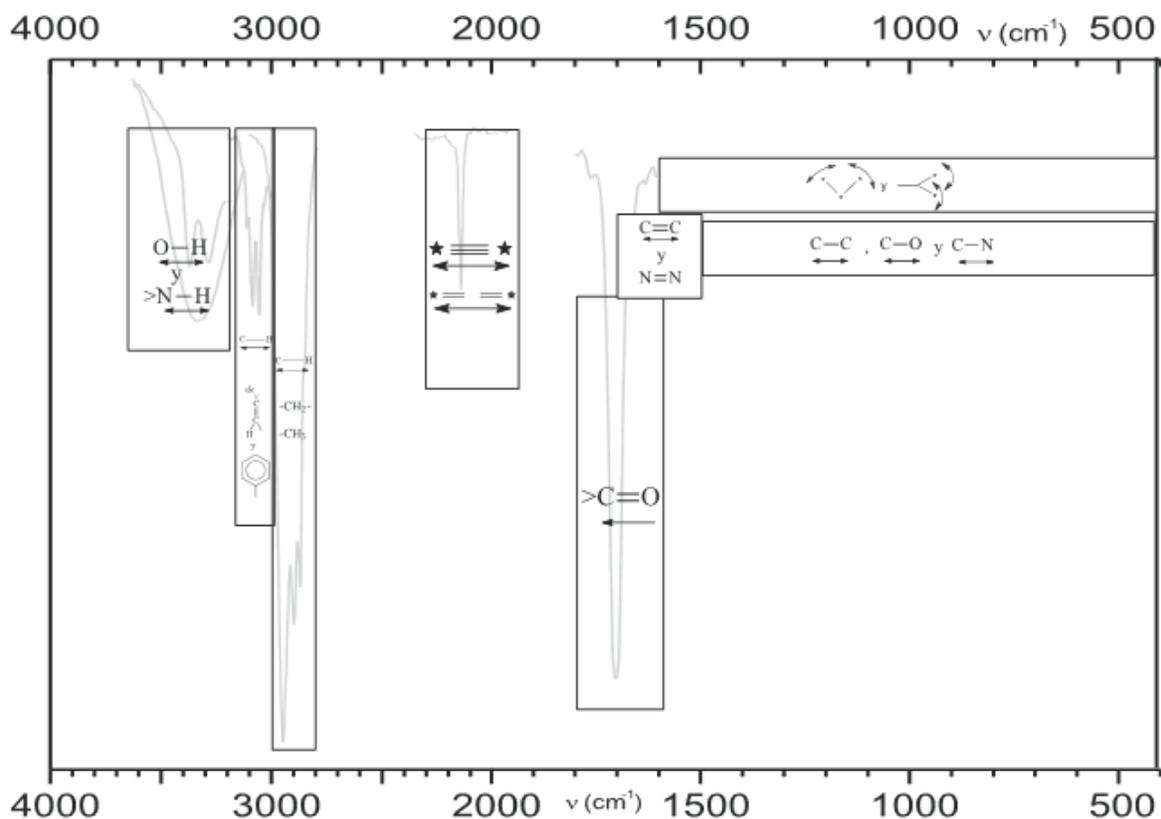


Figura 10. Regiones básicas de un espectro de infrarrojo.
 Modificada de http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/TablasIR_15437.pdf

Esta técnica es de gran utilidad en química orgánica ya que proporciona información acerca de los grupos funcionales de moléculas de estructura desconocida. Muestras con altos niveles de pureza, con pocos enlaces activos al IR proporcionan espectros nítidos. Se observan más bandas de absorción cuando se tienen estructuras moleculares más complejas, sin embargo cabe mencionar que con esta técnica se han podido caracterizar muestras muy complejas (Morrison y Boyd, 1987).

2.6 Biosensores

Un biosensor es un dispositivo analítico que combina un elemento biológico de reconocimiento (anticuerpos, enzimas, ácidos nucleicos, células, entre otros) con un transductor (Figura 11). Se consideran los sustitutos de análisis convencionales en diagnóstico médico, análisis de alimentos y monitoreo ambiental (Torsi, 2013).

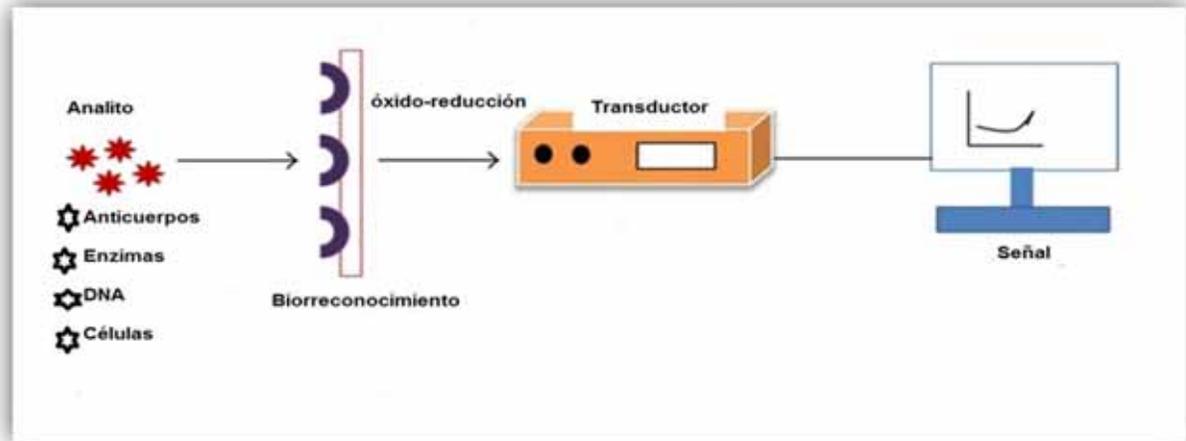


Figura 11. Principio básico de un biosensor electroquímico
 Modificada de Dhull et al., (2013).

Los biosensores se pueden clasificar dependiendo de la naturaleza del material biológico y en función del sistema de transducción utilizado.

Por la naturaleza del material biológico se clasifican en:

- Biosensores catalíticos

Sus receptores pueden ser enzimas, tejidos o células. Estos son los biosensores mejor conocidos y los más aplicados.

- Biosensores de afinidad

Los receptores son anticuerpos (inmunosensores), ácidos nucleicos (genosensores), entre otros.

Por su sistema de transducción se clasifican en:

- Electroquímicos
- Ópticos
- Piezoeléctricos
- Termométricos
- Nanomecánicos (Togawa et al., 1997).

2.6.1 Genosensores

Son dispositivos basados en el ácido desoxirribonucleico como elemento de biorreconocimiento.

2.6.1.1 La molécula del ácido desoxirribonucleico

El DNA se encuentra en los cromosomas dentro de los núcleos de todas las células; esta molécula provee el código genético que determina todas las características individuales de un organismo, por ello se le conoce también como la molécula de la herencia (Figura 12). Las unidades básicas de información del DNA son las Purinas: Adenina (A) y Guanina (G), y las Pirimidinas: Citosina (C) y Timina (T) las cuales se unen siempre de manera complementaria en la hebra de DNA: A siempre se unirá con T, y C siempre se unirá con G; a la combinación de una base con su complementaria se la conoce como par de bases (Yamanaka *et al.*, 2009).

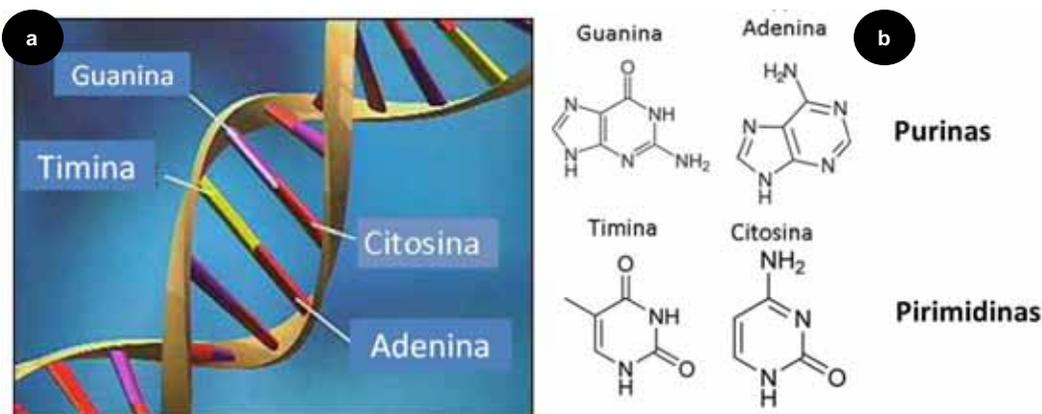


Figura 12. (a): Imagen del DNA que se encuentra en el núcleo de las células de todo organismo vivo, (b): Estructuras de las purinas y pirimidinas. Modificada de (google imagens).

Los análisis convencionales de una secuencia genética específica, se basan en metodologías de secuenciación y de hibridación del DNA. En las técnicas basadas en la hibridación del DNA, la secuencia de interés o analito es identificada por una sonda u oligonucleótido (secuencia pequeña de DNA de no más de 50 bases), cuya secuencia es complementaria a dicho analito; esta reacción de hibridación ocurre con gran afinidad y especificidad (Wang, 2003; Erdem, 2007).

Las sondas de DNA utilizadas en genosensores deben estar marcadas, ya que las “marcas” serán las responsables de proporcionar una señal analítica para cuantificar el evento de hibridación (Yamanaka *et al.*, 2009). El uso de DNA asociado a diferentes transductores es un nuevo campo de investigación. La detección de DNA es de particular interés en genética, patología, criminología, monitoreo ambiental, entre otros (Wang, 2003; Erdem, 2007).

El diseño de las sondas se basa en la complementariedad de los ácidos nucleicos de la sonda diseñada y su analito correspondiente; la sonda puede ser de DNA o RNA, unidas a través de puentes de hidrógeno formados entre las bases: adenina–timina (DNA) o uracilo (RNA) y citosina-guanina (DNA y RNA). Este apareamiento da lugar a una doble cadena en la cual una de ellas tiene la

orientación opuesta a la otra con respecto al esqueleto azúcar-fosfato, y que es leída de 5' a 3' (Majed *et al.*, 2012).

La secuencia blanco (target) se une a su secuencia complementaria durante la hibridación. Existe una relación entre la doble cadena de DNA y su transcrito a RNA. La transcripción usa la cadena líder como plantilla y genera una secuencia idéntica (Majed *et al.*, 2012) (Figura 13).

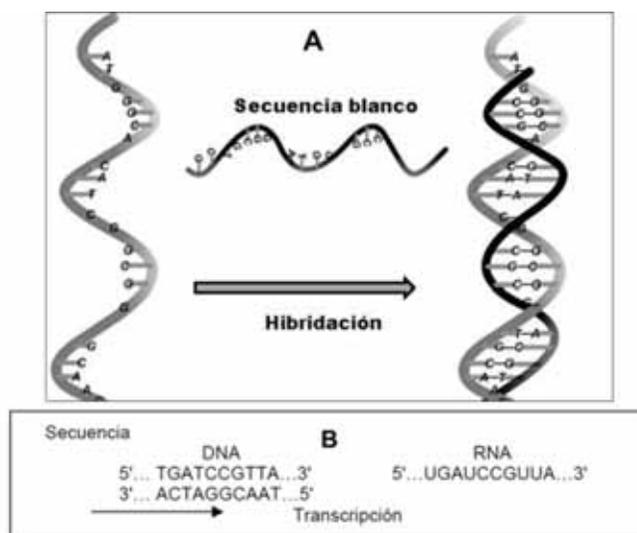


Figura 13. A. Hibridación. B. Transcripción.
Modificada de Majed *et al.*, (2012).

2.6.2 Genosensores electroquímicos

Los genosensores electroquímicos convierten el evento de hibridación, en una señal electroquímica. Los avances en la síntesis y caracterización de materiales nanoestructurados han producido grandes cambios en el diseño y capacidades de los sensores ya que se han desarrollado dispositivos con propiedades eléctricas, ópticas y mecánicas (Erdem, 2007).

Estos dispositivos se emplean para determinar la posible interacción de fármacos y DNA, así como en el diagnóstico temprano y preciso de agentes infecciosos en diversos ambientes. Para ello se utilizan diferentes técnicas electroquímicas: Voltametría de pulso diferencial (DPV), Voltametría linear (LV),

Voltametría lineal cuadrada (LSV), entre otras combinadas con diferentes transductores electroquímicos (Erdem, 2007).

Los protocolos desarrollados mediante el uso de AuNPs como marca, funcionalizadas con moléculas biológicas, han demostrado ser una herramienta eficiente en la detección electroquímica del DNA basada en la señal electroactiva de sus bases (Figura 14), por ejemplo mediante la técnica de DPV con la que se han observado límites de detección del orden de 9.68 fmol/mL (Erdem *et al.*, 2006).

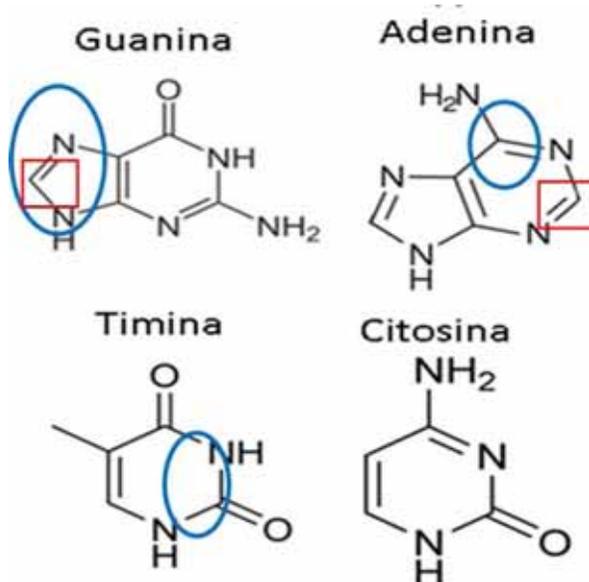


Figura 14. Bases del DNA y sus sitios electroactivos. En el círculo se encuentran los grupos que se reducen y en el cuadro los grupos que se oxidan. Modificada de Erdem, (2007).

2.7 Funcionalización de AuNPs

Las NPs se utilizan en un amplio rango de aplicaciones, por lo que su funcionalización provee el sitio de unión específico con la biomolécula de reconocimiento que puede ser una proteína o DNA, entre otras.

El sistema estreptavidina-biotina ha sido utilizado durante muchos años en diferentes aplicaciones, debido a sus versátiles ventajas con énfasis en ensayos inmunológicos y de ácidos nucleicos. Una vez funcionalizadas las AuNPs con estreptavidina, y biotinilizadas las sondas de DNA correspondientes, se unirán ambas mediante el sistema Estreptavidina-Biotina para conseguir la funcionalización de las AuNPs ya que la interacción de la estreptavidina con la biotina es de alta afinidad y permite que una vez formado no se desestabilice el complejo, ni por cambios en el pH ni por los múltiples lavados cuando el complejo es inmovilizado (Diamandis y Christopoulos, 1991).

En los últimos 10 años las AuNPs se han desarrollado para la detección de muchos blancos incluyendo: compuestos orgánicos, células, proteínas, ácidos nucleicos, entre otros (Figura 15) (Wang y Ma, 2009).

Los recientes avances en cuanto a tecnologías basadas en biosensores y nanomateriales han dado como resultado el desarrollo de sensores con importantes aplicaciones en diversos campos como química analítica o la industria biomédica (Erdem, 2007; Wang y Ma, 2009).

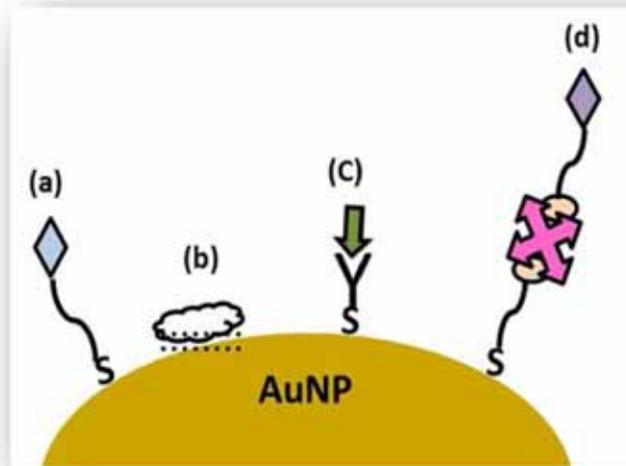


Figura 15. AuNP funcionalizada. (a) Tiolada, (b) Interacciones electrostáticas, (c) Antígeno-Anticuerpo y (d) Estreptavidina-Biotina. Modificada de Erdem, (2007).

Las NPs han sido utilizadas en biotecnología durante los últimos 40 años como sondas inmunocitoquímicas, conjugados de nanopartículas-biopolímeros con gran potencial para el diagnóstico de enfermedades y gran impacto en química bioanalítica (Wang, 2003), sin embargo en la última década ha crecido el interés por utilizarlas en la detección de ácidos nucleicos debido a su sensibilidad y selectividad. Funcionalizar las NPs con DNA ha permitido desarrollar nuevos sistemas de biodetección con muchas ventajas en relación con las pruebas convencionales (Electroforesis, PCR, RT-PCR, ELISAs, Microarrays) (Thaxton *et al.*, 2006).

La combinación de la nanotecnología con la química, biología, física y medicina para el desarrollo de métodos ultra sensitivos está en aumento. Particularmente el uso de AuNPs funcionalizadas para eventos de biorreconocimiento. Las potenciales aplicaciones de las AuNPs en ciencias biológicas incluyen sensores químicos y de imagen, por ejemplo por colorimetría se puede saber que una

cadena de DNA simple (ssDNA) ha detectado su secuencia complementaria (Wang y Ma, 2009).

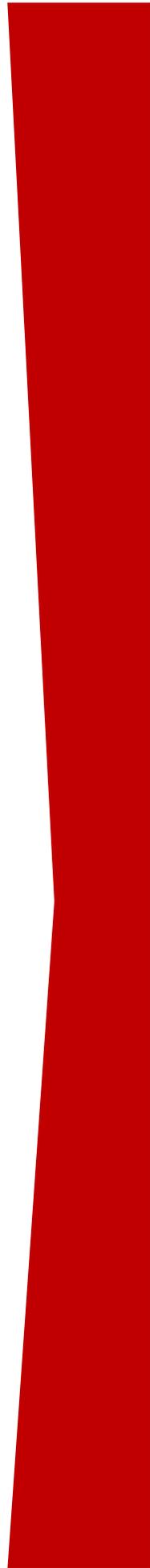
Wei *et al.* (2010) realizaron la funcionalización de AuNPs con grupos tiol para ser utilizadas en un sistema dinámico de agregación-dispersión fotosensible. En cuanto al análisis de genes (Taton *et al.*, 2000) prepararon conjugados de AuNPs con oligonucleótidos mediante la reacción de grupos tiol, mientras que Diamandis y Christopoulos (1991) lo hicieron mediante el sistema Estreptavidina-Biotina. Las AuNPs pueden ser estabilizadas con citrato, fosfinao mediante grupos maleimido (Alivasatos *et al.*, 1996; Pumera *et al.*, 2005; Gilaki, 2010; Zanella, 2012).

Sin embargo el sistema Estreptavidina-Biotina es una técnica ampliamente utilizada para facilitar la localización, identificación e inmovilización de moléculas biológicas. La estreptavidina es una proteína aislada de la bacteria *Streptomyces avidinii*.

Este sistema posee la capacidad de unir hasta cuatro moléculas de la vitamina biotina con la misma afinidad aproximadamente y con una fuerza de unión comparable a un enlace tipo covalente. Este enlace, posee una elevada estabilidad a cambios de pH y temperatura. Una gran variedad de moléculas como proteínas, enzimas, polisacáridos, ácidos nucleicos y oligonucleótidos, pueden fácilmente ser modificados con biotina, sin variar su funcionalidad biológica (Diamandis y Christopoulos, 1991).

Capítulo III

Antecedentes



3. Antecedentes

Hace más de 1000 años los artesanos que trabajaban el vidrio y el decorado de la cerámica eran, sin saberlo, los primeros nanotecnólogos ya que sintetizaban NPs metálicas, que son las que confieren las intensas tonalidades a los vitrales y pinturas (Chen *et al.*, 2008).

Fue hasta 1857 cuando Faraday publicó un estudio sobre la preparación y las propiedades del oro coloidal (Faraday, 1857), desde entonces una gran variedad de métodos se han descrito en la literatura para sintetizar AuNPs, por ejemplo mediante la reducción de tetrabromoaurato de tetraoctilamonio con borohidruro de sodio en presencia de dodecanotiol desarrollada por Brust *et al.* (1994) y la reducción secuencial de Au (III) a Au (0) por medio de tioles y disulfuro de sodio (Whetten *et al.*, 1999), así como también la utilización de citrato de sodio como agente reductor; sin embargo el método más utilizado hasta la fecha es el de Turkevich *et al.* (1951), con el cual se obtienen partículas con un diámetro promedio de 20 nm.

Se comprobó que la naturaleza de la fuente de iones oro, del reductor, así como del medio de reacción tienen, junto con el procedimiento experimental de síntesis, una importante repercusión en el tamaño de partícula y en la estabilidad de las mismas (Hostetler *et al.*, 1998).

Acerca de la síntesis biológica de NPs utilizando extractos de plantas, Narayanan y Sakthivel, 2011 mencionan que es más sostenible y renovable que la síntesis química, además de que el uso de plantas y sus productos es más ventajoso que el uso de microorganismos ya que éstos necesitan metodologías costosas para el mantenimiento del cultivo microbiano y del proceso de síntesis

Recientemente se han obtenido NPs de diferentes tamaños y formas a partir de crisantemo, nopal, sábila, hibisco, entre otras (Shankar *et al.*, 2004; Philip, 2010; Rico-Moctezuma *et al.*, 2010; Narayanan y Sakthivel, 2011).

La funcionalización de las AuNPs mediante el sistema estreptavidina-biotina ha sido usada durante muchos años en múltiples aplicaciones. Diamandis y Christopoulos (1991), lo utilizaron en ensayos de reacción inmunológica y de hibridación de ácidos nucleicos.

La funcionalización de AuNPs provee biosensores selectivos para la detección de una gran variedad de analitos, incluyendo compuestos orgánicos, proteínas, DNA, RNA, células, entre otros, basados en sus propiedades, ópticas, eléctricas, o señales electroquímicas (Nguyen *et al.*, 2011).

Mirkin *et al.* (1998) desarrollaron un nuevo ensayo para DNA utilizando las propiedades ópticas de partículas de oro modificadas con oligonucleótidos.

Park *et al.* (2001) modificaron AuNPs con proteínas y oligonucleótidos; utilizaron la N-glicanasa (PNGasa), proteína que se ha encontrado desde levaduras hasta mamíferos, esta enzima tiene un papel crucial en el metabolismo (desglicosilación). Sus resultados sugieren que la enzima es necesaria para la degradación (catabolismo), rompe las cadenas de oligosacáridos de glicopéptidos y glicoproteínas. Por lo que analizar su secuencia es de gran importancia en proteómica.

Wang *et al.* (2001) reportan la detección electroquímica del gen BRCA1 asociado a cáncer de mama y ovario. Este fue el primer reporte de detección electroquímica de DNA con AuNPs funcionalizadas con estreptavidina.

El aumento de la preocupación sobre seguridad alimentaria y medioambiental ha impulsado el desarrollo de métodos rápidos, concretos, robustos y altamente sensibles para la detección de microorganismos con el fin de garantizar la salud pública.

Mendoza, (2011) construyó un biosensor basado en nanoestructuras, mediante el uso de DNA como molécula de biorreconocimiento (genosensor), utilizando AuNPs como marca, para la detección electroquímica de *E. coli*, mediante el evento de hibridación, sin embargo las secuencias genéticas utilizadas fueron tomadas de la literatura.

Alvarado, (2012) construyó un biosensor electroquímico de afinidad usando un anticuerpo como molécula de reconocimiento (inmunosensor), basado en AuNPs como marca y utilizando partículas super paramagnéticas como plataforma para la inmovilización del anticuerpo (anti- *E. coli*), todo ello sobre un electrodo de compuesto grafito-epoxi con un imán integrado (M-GECE) que actuó como electrodo de trabajo, para la detección de *E. coli* en agua.

Un grupo de la Escuela de Ingeniería de la Comunicación e Información Electrónica de Corea del Sur, realizó un estudio con un inmunosensor de nanobarras de oro (GNRs) en donde se inmovilizaron los anticuerpos anti *E. coli* sobre las nanobarras de oro, aumentando así la sensibilidad de los electrones en la superficie del oro para detectar a la bacteria (Nyeon-Sik, 2010).

En la Universidad de Lincoln, USA Majed *et al.* (2012) construyeron un biosensor (inmunosensor) de impedancia con microelectrodo interdigitado (IME), de oro para la detección de *E. coli*.

Los biosensores electroquímicos basados en DNA son dispositivos interesantes ya que convierten la hibridación de esta molécula en una señal analítica. El evento de hibridación del DNA en NPs funcionalizadas puede ser medido por la señal de oxidación de sus bases, mediante un sensor electroquímico para detectar secuencias específicas de DNA, de manera selectiva, barata y en menos tiempo que las técnicas convencionales (Erdem. 2007).

Campuzano *et al.* (2014) reportan la detección electroquímica de cáncer asociado a micro RNA (miRNAs), mientras que Rolim *et al.* (2015) construyeron un genosensor para el diagnóstico temprano de la hipertensión. Finalmente, Barroso

et al. (2015) diseñaron un genosensor para la detección de maíz transgénico MON810.

De Marcos M. (2013) construyó un genosensor ambiental nanoestructurado para detectar *Aspergillus sp.* en muestras contaminadas con aceite usado de motores diésel, mientras que Abrica (2013), desarrolló un genosensor para detectar *S. typhi* en muestras de agua. En ambos trabajos se diseñaron y utilizaron sondas específicas de DNA.

Baeumner *et al.*, 2004 reportan un genosensor universal utilizando oligonucleótidos para la rápida (30 min tiempo de ensayo total) y altamente sensible (1 nM) detección de secuencias de ácido nucleico específicas para *E. coli*, *Bacillus anthracis* y *Cryptosporidium parvum*. El genosensor consiste en una membrana universal y una vesícula liposomal, dos oligonucleótidos: un reportero y la sonda de captura, que pueden hibridar específicamente con la secuencia blanco. Las vesículas liposomales tienen una secuencia de oligonucleótidos genérica sobre su superficie. Las sondas indicadoras constan de dos partes: el extremo 3' es complementario al oligonucleótido liposomal genérico, y el extremo 5' es complementario a la secuencia blanco.

En cuanto al diseño de sondas específicas de DNA (oligonucleótidos) para *Achlya sp.* no se encontró ningún trabajo en la literatura que lo reporte.

Capítulo IV

Hipótesis

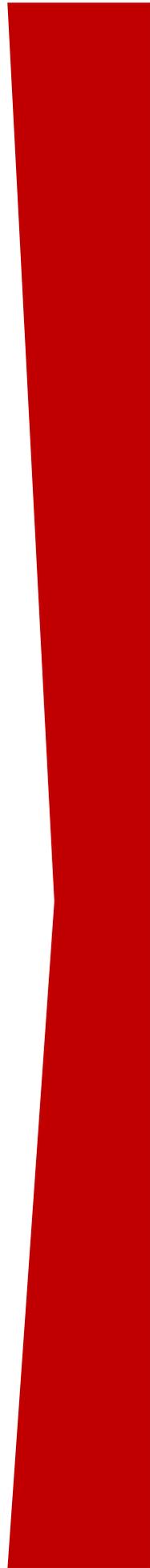


4. Hipótesis

Si las AuNPs biosintetizadas pueden ser funcionalizadas con sondas específicas de DNA de *Achlya sp.* y *E. coli*, entonces, se podrán utilizar de igual manera que las AuNPs sintetizadas químicamente, para detectar la presencia de estos microorganismos en ambientes acuáticos, mediante el uso de genosensores.

Capítulo V

Objetivos



5.1 Objetivo general

Sintetizar química y biológicamente AuNPs, caracterizarlas mediante diferentes técnicas, para utilizarlas en el marcaje de sondas específicas de DNA de *Achlya sp.* y *E. coli*.

5.2 Objetivos específicos

- Caracterizar las AuNPs sintetizadas mediante UV-Vis, Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) y Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)
- Amplificar el DNA de *Achlya sp.* y *E. coli*
- Diseñar sondas específicas de DNA de *Achlya sp.* y *E. coli*
- Realizar la funcionalización de las AuNPs con las sondas específicas diseñadas.

Capítulo VI

Justificación



El bienestar y la prosperidad de la humanidad dependen en gran parte de su dominio sobre los microorganismos, mediante el manejo ambiental, la biotecnología y el control de las enfermedades que producen, ya que tienen un gran efecto sobre el desarrollo y mantenimiento de todos los ambientes, por lo que es muy importante desarrollar métodos de detección, identificación, y cultivo de microorganismos para su estudio en el laboratorio, tales como los tradicionales (bioquímicos y morfológicos), así como los más actuales: biosensores y a nivel de DNA (genosensores), ya que la hibridación del DNA es altamente sensible y selectiva.

Los biosensores son fáciles de usar, disminuyen los tiempos de detección y son adaptables a diferentes análisis por lo que son una excelente herramienta para el uso en laboratorios o en sitios de prueba para investigar rápidamente y cuantificar cualquier la secuencia de ácido nucleico de interés.

Por otra parte las AuNPs se pueden preparar de manera relativamente sencilla, obteniéndose sistemas coloidales monodispersos estables con un tamaño de entre 1 a 100 nm, además presentan propiedades muy peculiares que pueden ser modificadas mediante su funcionalización con múltiples ligandos para ser utilizadas en una gran variedad de aplicaciones terapéuticas y medioambientales, además de que hasta el momento, se consideran de baja toxicidad. Por otra parte, la biosíntesis de AuNPs permitirá obtener estos materiales de forma amigable con el ambiente, atenuando su toxicidad.

Por lo expuesto anteriormente, en este trabajo se diseñaron sondas específicas de DNA de *Achlya sp.* y *E.coli*; también se llevó a cabo síntesis y biosíntesis de AuNPs, así como su caracterización y finalmente la funcionalización de estas NPs con las sondas diseñadas.

Capítulo VII

Materiales y métodos



7.1 Materiales y equipos

Las imágenes AFM fueron obtenidas mediante un SPM (Scanning Probe Microscope) marca Digital Instruments. Las imágenes TEM fueron tomadas usando un microscopio de alta resolución HRTEM Jeol 2100 F. Los espectros FT-IR se obtuvieron mediante un equipo Varian 3600, Excalibur Series. Para las incubaciones se utilizó un agitador térmico (TS-100 ThermoShaker). Las mediciones de temperatura se realizaron con un termómetro digital infrarrojo marca Traceable, las mediciones espectroscópicas UV-Vis se efectuaron usando un Espectrofotómetro Shimadzu Modelo UV-1800, con un rango de longitud de onda de 190-700 nm. Todas las centrifugaciones se realizaron en una Centrifuga Thermo Scientific Micro CL 21R. El pH de las soluciones y buffers usados se ajustó usando un Medidor de pH (Mettler Toledo MPC 227). Para la PCR se utilizó un termociclador MultiGeneOptimax de Labnet, Inc. Las imágenes de geles de agarosa se visualizaron con un equipo Alphamager 2000.

7.2 Reactivos y Soluciones

El tetracloroaurato (III) de hidrógeno trihidratado ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 99.99%) (520918), el citrato de sodio dihidratado ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), la agarosa, los cebadores (primers), dNTPs 10mM (nucleótidos), el PCR Buffer 10X, cloruro de magnesio 25 mM (Cl_2Mg) el marcador molecular Kapa y la cepa de *E. coli* O157:H7, fueron adquiridos de Sigma-Aldrich, el ácido clorhídrico (HCl) e hidróxido de sodio (NaOH) se adquirieron de Merck, la resina Formvar 15/95, rejillas de cobre de 75 mesh (GilderGrids Cu) y la Mica Muscovita V-1 Quality, se adquirieron de Electron Microscopy Sciences. El kit de extracción de DNA (DNAeasy) se adquirió de Quiagen y un segundo Kit MicrobialMobio se adquirió de Progenes. Todos los reactivos utilizados fueron grado analítico y todas las soluciones se prepararon empleando agua doblemente desionizada (Milli-Q, 18MW cm) de un sistema de purificación Millipore.

7.3 Síntesis Química de AuNPs

Para llevar a cabo la síntesis de las AuNPs se utilizó el método descrito en Turkevich *et al.* (1951), con algunas modificaciones. Se usó material de vidrio, lavado con agua regia y agua doblemente desionizada para remover cualquier traza de oro que pudiera interferir durante el proceso de síntesis. En un matraz Erlenmeyer de 250 mL se colocaron 500 μ L de tetracloroaurato de hidrógeno al 1% (25 mM) en 50 mL de agua doblemente desionizada (Milli-Q), el cual se tapó con un vidrio de reloj y se colocó sobre una parrilla de calentamiento con agitación, hasta alcanzar la ebullición. Posteriormente se agregó el citrato de sodio al 1%, el cual actuó como agente reductor y estabilizador. Una vez añadido el citrato de sodio se mantuvieron la agitación y el calentamiento por no más de 15 minutos durante los cuales se fueron observando los cambios de coloración hasta alcanzar el color rojo vino característico de las AuNPs de tamaño aproximado a los 20 nm. Finalmente se dejaron enfriar a temperatura ambiente manteniendo la agitación y se guardaron en un frasco estéril a 4 °C para su posterior caracterización (Figura 16).

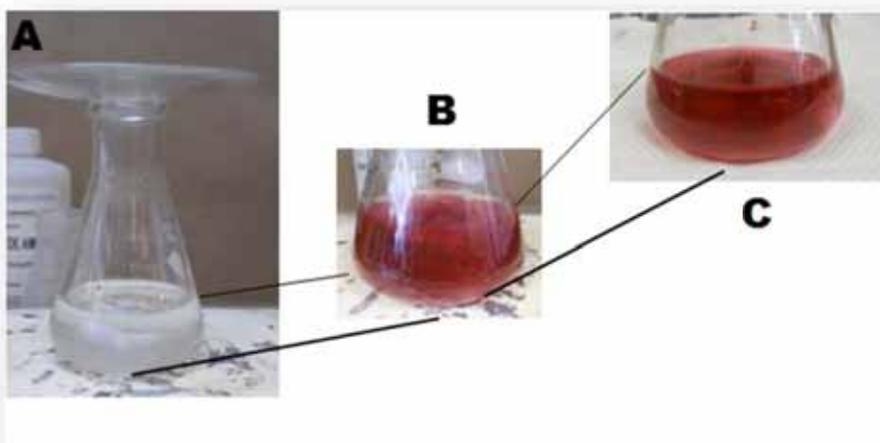


Figura 16. Síntesis química de AuNPs. A). Solución de sal de oro con calentamiento y agitación. B). 5 minutos después de añadir el citrato de sodio. C). AuNPs sintetizadas.

7.4 Biosíntesis de AuNPs

Se utilizó un método que mezcla el descrito en Turkevich *et al.* (1951) y el de Rico-Moctezuma *et al.*, 2010: Se usó material de vidrio, lavado con agua regia y agua doblemente desionizada. En un matraz Erlenmeyer de 250 mL se colocaron 500 μ L de tetracloroaurato de hidrógeno al 1% (25 mM) en 50 mL de agua doblemente desionizada (Milli-Q), el cual se tapó con un vidrio de reloj y se colocó sobre una parrilla de calentamiento con agitación, hasta alcanzar la ebullición. Posteriormente se agregó extracto de cada planta (Figura 17), para obtenerlo se hirvió la planta durante 10 minutos al cabo de los cuales el líquido se filtró tres veces con papel Watman No. 5 al vacío. El extracto así obtenido actuó como agente reductor y estabilizador. Una vez añadido el extracto se mantuvieron en agitación y calentamiento por no más de 15 minutos durante los cuales fueron observados los cambios de coloración (Figura 18).

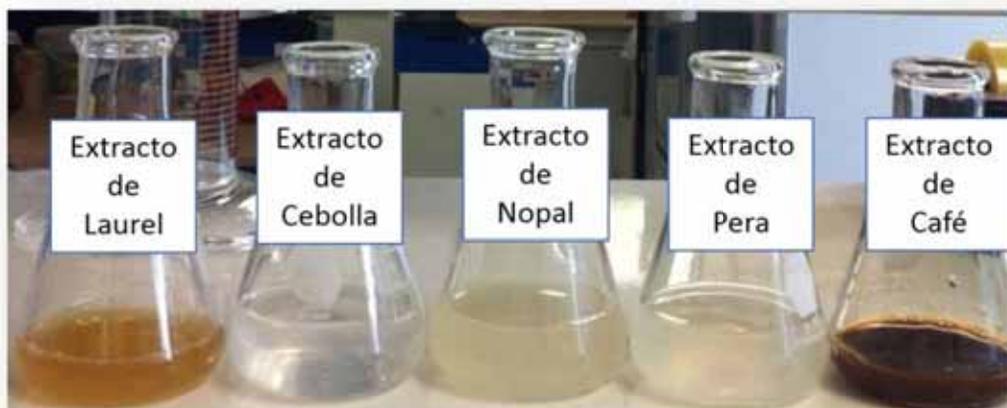


Figura 17. Extractos utilizados en la biosíntesis de AuNPs.

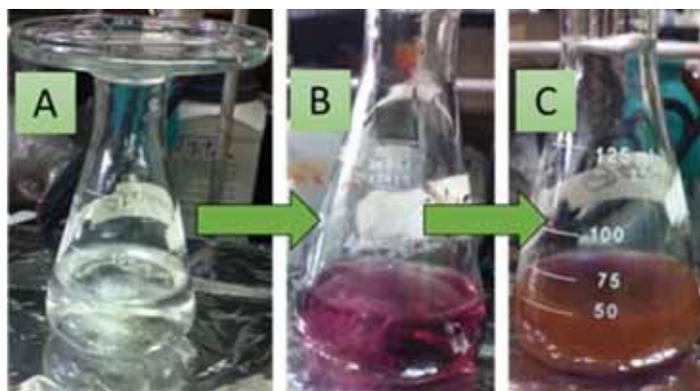


Figura 18. Biosíntesis: A). Solución de sal de oro con calentamiento y agitación. B). 5 minutos después de añadir extracto. C). AuNPs obtenidas.

Posteriormente se realizó otra biosíntesis para que a partir de un mismo extracto, con diferente pH se obtuvieran AuNPs, con el fin de estudiar el efecto del pH en la obtención de AuNPs. El pH de la solución que se utiliza como agente reductor tiene un papel fundamental en la velocidad de la reacción así como sobre el tamaño y distribución de las NPs ya que determina muchas características de la estructura y actividad de las moléculas y biomoléculas, por lo que siempre que se utilicen valores de pH neutros o cercanos a la neutralidad, se logran obtener AuNPs concentradas y uniformes (Doyen *et al.*, 2013).

Se realizó la síntesis química y biosíntesis de AuNPs con los extractos de cada planta con el pH al que se obtuvieron, posteriormente el mismo extracto se llevó primero a un pH neutro (7) y después a un pH básico (9), realizándose nuevamente la síntesis en cada caso. Todos los ensayos se realizaron a una misma temperatura, con un mismo tiempo de reacción y el mismo día, para evitar variables de confusión.

7.5 Caracterización de AuNPs

Las AuNPs obtenidas se caracterizaron por UV-Vis en un equipo modelo Shimadzu, en el Laboratorio de Microbiología Ambiental de la UAM-Azcapotzalco, por Microscopía de Fuerza Atómica con un microscopio SPM (Scanning Probe Microscope) marca Digital Instruments, en el laboratorio de Física de la UAM-Azcapotzalco y por Microscopía Electrónica de Transmisión en la UAM-Iztapalapa, mediante un microscopio de alta resolución HRTEM Jeol 2100 F.

7.6 Diseño de Sondas Específicas de DNA

Para la obtención de las sondas específicas de DNA de *Achlya sp.* se procedió de la siguiente manera:

Muestreo. Se tomaron muestras de agua de los canales de Xochimilco en la Ciudad de México, las cuales se procesaron de inmediato con el fin de evitar cambios en los parámetros de pH, temperatura, oxígeno, entre otros, que pudieran causar alteraciones en los patógenos presentes, producción de bacterias y formación de hongos externos a la muestra (Arcos *et al.*, 2005).

Por otra parte, se obtuvieron muestras de peces de la especie *G. viviparus* infectados por el hongo *Achlya sp.* mediante un raspado superficial de la epidermis con asa de siembra, tomando el material a partir de la parte media lateral del cuerpo. El material así obtenido se colocó en 100 mL de agua estéril.

A partir de las muestras de agua y raspados de peces se prepararon diluciones con solución salina amortiguadora de fosfatos estéril (PBS 1X), a fin de aislar e identificar el hongo *Achlya sp.* de acuerdo a la norma oficial mexicana (NOM-111-SSA1-1994). Para tal efecto, alícuotas de 25 mL se sembraron por extensión

sobre la superficie de medio de papa dextrosa agar (PDA) en caja Petri y fueron incubadas a 28 °C. Transcurridas 120 horas se realizaron preparaciones en fresco (KOH al 10% y azul algodón) para ser observadas al microscopio óptico (Arcos *et al.*, 2005).

Una vez aislados los microorganismos se procedió a su identificación mediante técnicas microbiológicas convencionales y de Biología Molecular (Chen, 2008).

Se realizaron microcultivos a partir de los hongos aislados, y fueron incubados a 28 °C durante 48-72 h, y después de este periodo se observó el crecimiento mediante el microscopio óptico, utilizando objetivos seco débil, y seco fuerte. (Castañeda, 2004).

Para la identificación molecular, se utilizó la técnica de PCR, la cual se basa en la amplificación de fragmentos de DNA a partir de secuencias de oligonucleótidos denominadas “cebador” o “primer”, que son capaces de reconocer una secuencia blanco para la cual es complementaria (Schmittgen y Livak, 2008; Santos *et al.*, 2010) (Figura 19).

Reacción en Cadena de la Polimerasa

30 a 40 ciclos 3 pasos:

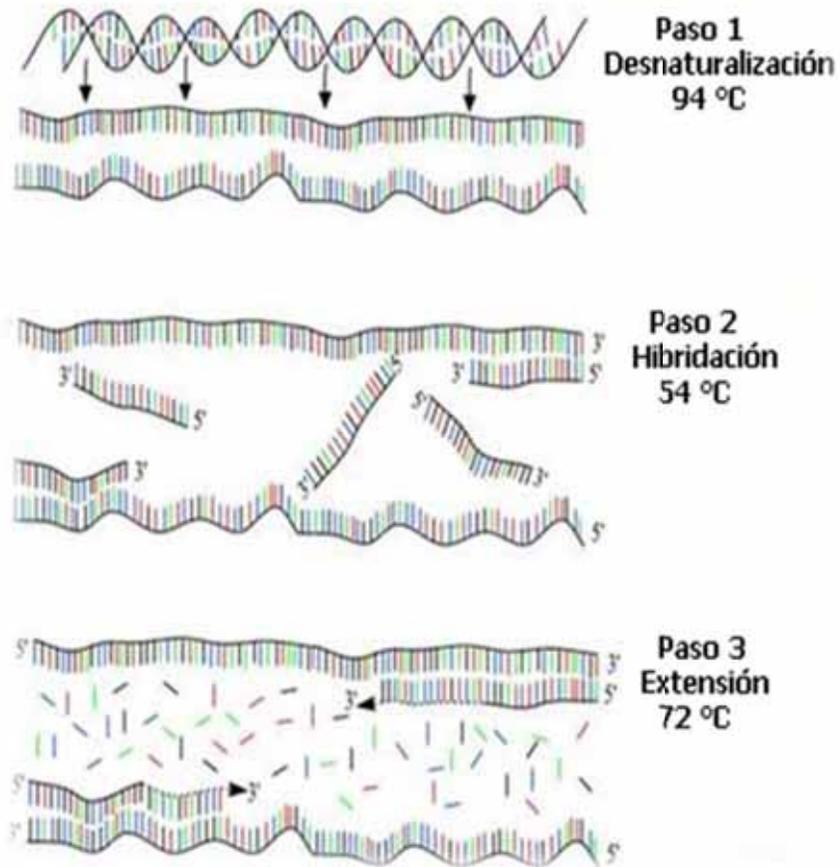


Figura 19. Reacción en Cadena de la Polimerasa.
Modificada de (google imagens).

Como primers se utilizaron espaciadores internos transcritos (ITS) del DNA ribosomal (DNAr) (White *et al.* 1990) tabla 3.

Tabla 3. Secuencia de los Espaciadores internos transcritos (ITS) del DNAr.

Región Genómica	Secuencia
ITS5	5' GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG 3'
ITS4	5'TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'

Los principales pasos de la PCR fueron los siguientes: se extrajo el DNA del material a analizar, se separó la molécula del DNA en dos hebras a una temperatura de 95 °C durante 5 min (desnaturalización), se indujo el alineamiento o reconocimiento del cebador (primer) con la secuencia blanco, a una temperatura de 57 °C y la extensión a 72 °C. Este proceso se realizó en un termociclador, que se encargó de realizar los cambios de temperatura necesarios para que se desarrollaran las etapas o ciclos anteriormente mencionados. El proceso se llevó a cabo en 30 ciclos (Solís-Ramos y Andrade-Torres, 2005). En la tabla 4 se muestra la reacción para la PCR.

Tabla 4. Reactivos y cantidades para PCR de cada muestra.

Reacción para PCR	
DNA	1 µL
Buffer*	5 µL
Primer 1 (ITS 4)	1 µL
Primer 2 (ITS 5)	1 µL
Enzima <i>Taq Polimerasa</i>	0.5 µL
Agua	16.5 µL
Total	25 µL

*El buffer ya contenía Mg

Las PCRs se llevaron a cabo en un termociclador *MultiGeneOptiMax*, Labnet International Inc.

El producto de PCR se envió al servicio de secuenciación del Laboratorio de Bioquímica Molecular de la FES Iztacala-UNAM.

Una vez obtenidas las secuencias de cada producto de PCR se diseñaron las sondas con 15 a 25 nucleótidos, utilizando bioinformática (Ye *et al.*, 2012) para asegurar que la secuencia del analito (target) correspondiera a una porción del genoma de *Achlya sp.* o de *E. coli* en su caso; finalmente se solicitó la síntesis de las sondas diseñadas, así como su modificación con biotina, a la casa comercial *Alpha DNA* en Ottawa, Canadá.

7.6.1 Funcionalización de AuNPs con Estreptavidina

La estreptavidina fue resuspendida en agua Milli-Q estéril para obtener una concentración de 0.1 mg/mL.

Las AuNPs sintetizadas junto con la solución de estreptavidina se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 mL en una relación de 1:1 (v/v). Posteriormente, se incubaron en un termo agitador (Thermo-Shaker MS-100), durante 30 min a 650 rpm y a 25 °C.

Inmediatamente después de terminada la incubación, se centrifugaron durante 20 min a 14000 rpm y a una temperatura de 4 °C. Se desechó el sobrenadante y se agregó 1 mL de solución buffer de fosfatos PBS, para mantener el pH estable (Mendoza, 2011).

7.6.2 Sondas de DNA biotiniladas

Las sondas diseñadas en este trabajo se conforman de 20 nucleótidos y están modificadas con biotina en el extremo terminal 3' o 5', en la tabla 5 se muestra la secuencia diseñada.

Tabla 5. Sondas diseñadas y sintetizadas.

Nombre	Secuencia 5'-3'	Modificación
Ach-Sonda de captura	GATCAATACGCCGGTCTCCG	3' Biotina
Ach-Blanco	CGGAGACCGGCGTATTGATC	5' Biotina
Ach-Blanco 1 Error	CGGAGACCGGCGTCTTGATC	5' Biotina
Ach-Blanco 3 Errores	CGGAGACAAACGTCTTGATC	5' Biotina
Ach-No Complementaria	AATTCTGCGTGCATACAGCG	5' Biotina
Ec-Sonda de Captura	GCACCGGAAGTACAGACCAA	3' Biotina
Ec-Blanco	CGTGGCCTTCATGTCTGGTT	5' Biotina
Blanco 1 Error	CGTAGCCTTCATGTCTGGTT	5' Biotina
Ec-Blanco 3 Errores	CGTATACTTCATGTCTGGTT	5' Biotina
Ec-No Complementaria	ATGCTAAGGGTCCCAGAACC	5' Biotina

Ach *Achlya* sp.
Ec. *Escherichia coli*

Capítulo VIII

Resultados y discusión



8.1 Síntesis Química de AuNPs

Las AuNPs fueron sintetizadas por el método de Turkevich *et al.* (1951), con algunas modificaciones, este método es sencillo y relativamente rápido. En la figura 20 se observan las AuNPs sintetizadas.



Figura 20. En el tubo de la izquierda se observa la sal de oro, a la derecha las AuNPs sintetizadas por el Método propuesto por Turkevich *et al.*, (1951).

Por el color de la solución (vino tinto) se sabe que se han obtenido AuNPs. Este color rojo es típico de un espectro UV-Vis de aproximadamente una $\lambda = 520$ nm. Una vez sintetizadas se conservaron a 4 °C para su posterior caracterización.

8.2 Síntesis Biológica de AuNPs

La síntesis biológica de AuNPs se realizó mediante una combinación de técnicas, la de Turkevich *et al.*, 1951 y la de Rico-Moctezuma *et al.*, 2010. Se utilizó extracto de *Opuntia sp.* (nopal), *Allium sp.* (cebolla), *Pyrus sp.* (pera), *Coffea sp.* (café) y *Laurus sp.* (laurel), como agente reductor; en la tabla 6, se observan los extractos obtenidos y la longitud de onda de las AuNPs sintetizadas.

Tabla 6. pH de los extractos de las diferentes plantas utilizados como agente reductor en la síntesis biológica de AuNPs, también se observa la temperatura y el tiempo de reacción para la biosíntesis.

Plantas	pH de los extractos			Temperatura (°C)	Tiempo de reacción (min)
<i>Nopal</i>	4.8	7	9	83 °C	15 min
<i>Cebolla</i>	5.3	7	9	83 °C	15 min
<i>Pera</i>	4.7	7	9	83 °C	15 min
<i>Café</i>	5.0	7	9	83 °C	15 min
<i>Laurel</i>	6.5	7	9	83 °C	15 min.

8.3 Síntesis de AuNPs con ácido málico

Debido a que los análisis de los extractos de las plantas utilizadas en la biosíntesis de AuNPs, con FT-IR indicaron que el ácido málico podría estar involucrado en la reducción de iones oro, se realizó una síntesis utilizando ácido málico en lugar de citrato de sodio y se corroboró la obtención de AuNPs de color morado con una longitud de onda máxima de aproximadamente 560 nm, lo que indica que son de tamaño mayor a 30 nm o que se encuentran agregadas (Figura 21).

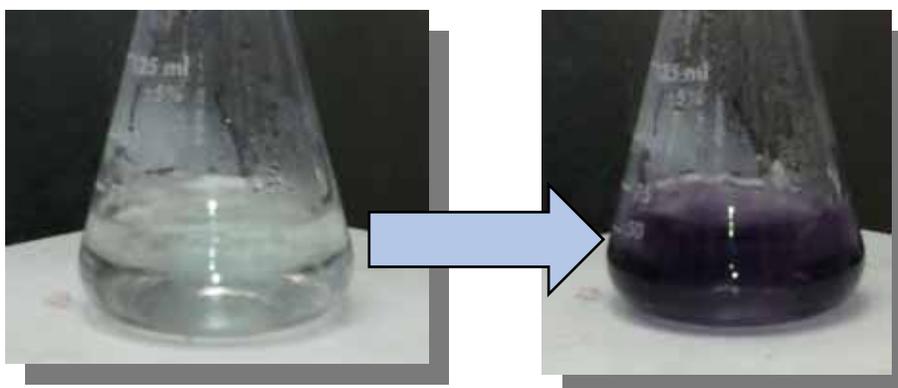


Figura 21. AuNPs sintetizadas con ácido málico como agente reductor.

8.4 Caracterización por espectroscopía UV-Vis de las AuNPs obtenidas por síntesis química

Con esta caracterización (Figura 22) se observó una longitud de onda máxima de absorción de las AuNPs sintetizadas químicamente de 519.5 nm, lo cual indica que se cuenta con AuNPs de aproximadamente 20 nm, ya que en la literatura se reporta un espectro de longitud de onda máxima de 520 nm para las mismas (Carralero, 2009).

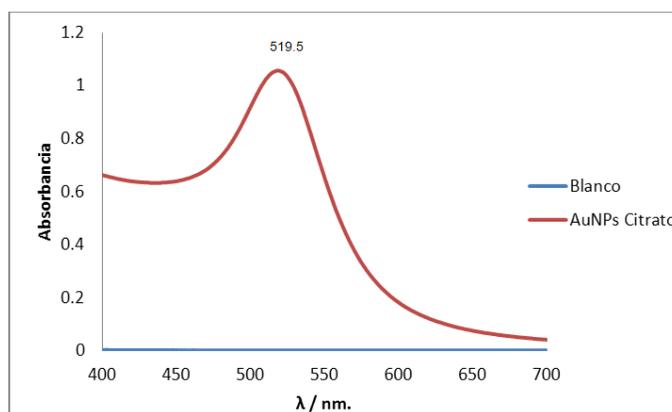


Figura 22. Espectro UV-Vis de las AuNPs sintetizadas en el que se observa una longitud de onda máxima de 519.5 nm.

8.4.1 Caracterización por TEM de las AuNPs obtenidas por síntesis química

La figura 23 corresponde a las imágenes TEM de las AuNPs sintetizadas, las cuales muestran que se obtuvieron nanopartículas dispersas, esféricas y de aproximadamente 20 nm.

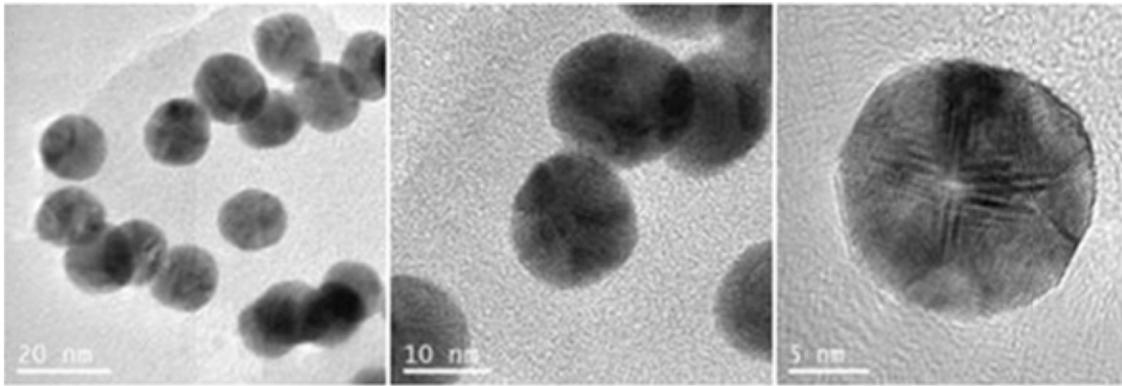


Figura 23. Imágenes TEM de las AuNPs obtenidas experimentalmente de forma esférica, la barra de escala de izquierda a derecha es de 20, 10 y 5 nm.

8.4.2 Caracterización por AFM de las AuNPs obtenidas

Las imágenes AFM obtenidas corroboran el tamaño de las AuNPs sintetizadas, las cuales son de un diámetro de aproximadamente 20 nm y de forma esférica (Figura 24).

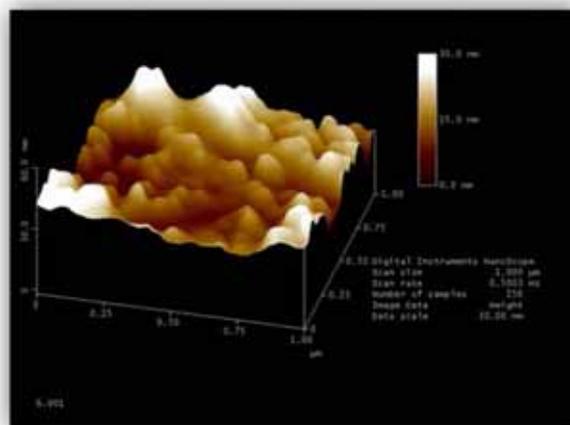


Figura 24. Imágenes topográficas de AFM correspondientes a las AuNPs sintetizadas en este trabajo con citrato de sodio. La escala de tamaño es de 0 a 30 nm.

8.5 Caracterización por espectroscopía UV-Vis de las AuNPs obtenidas por Biosíntesis

En la tabla 7 se muestran los extractos y la longitud de onda máxima de las AuNPs obtenidas con éstos. La longitud de onda varía desde 527 nm para las NPs obtenidas con extractos de *Allum sp.* (Cebolla) y *Coffea sp.* (Café) hasta 537 para las obtenidas con extracto de *Laurus sp.* (Laurel). Esta diferencia en las longitudes de onda indica que se tienen AuNPs de diferentes tamaños y formas.

En la figura 25 se observan los espectros UV-Vis de las AuNPs biosintetizadas con cada uno de los extractos.

Tabla 7. Extractos de las diferentes plantas utilizados como agente reductor en la síntesis biológica de AuNPs y su longitud de onda máxima.

Extracto	λ (nm)
<i>Opuntia sp.</i> (Nopal)	531
<i>Allum sp.</i> (Cebolla)	527
<i>Pyrus sp.</i> (Pera)	528
<i>Coffea sp.</i> (Café)	527
<i>Laurus sp.</i> (Laurel)	537

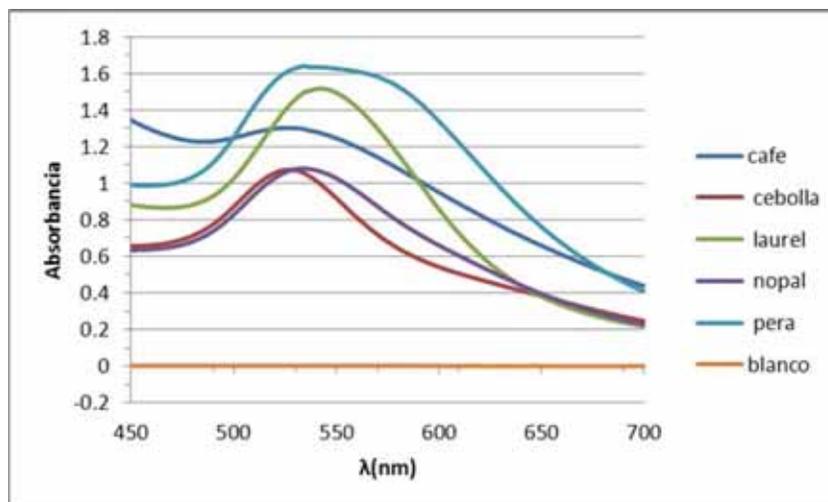


Figura 25. Espectros de absorción UV-Vis de las AuNPs biosintetizadas.

8.6 Síntesis de AuNPs utilizando diferente pH del agente reductor

Se realizó la síntesis química y biosíntesis de AuNPs a diferente pH (3 ácido, 7 neutro y 9 básico) para estudiar su efecto en el tamaño y dispersión de las NPs, las cuales fueron caracterizadas por las técnicas que se describen en los siguientes apartados:

8.6.1 Caracterización UV-Vis de la síntesis química utilizando diferente pH.

La caracterización UV-Vis de las AuNPs obtenidas mediante síntesis química a diferentes pHs mostró diferencias en éstas; la longitud de onda a un pH de 3 utilizando citrato de sodio como agente reductor fue de 564 nm, a un pH de 7 de 520 nm y aun pH de 9 de 525 nm (Tabla 8), lo que indica que se tienen AuNPs de diferente tamaño, en especial a un pH de 3, siendo el pH neutro el mejor para obtener NPs de forma homogénea y dispersas. Los espectros de absorción obtenidos, así como su longitud de onda correspondiente, se pueden observar en la figura 26.

Tabla 8. Comparación de la longitud de onda, tamaño y forma de las AuNPs sintetizadas según el pH.

Síntesis	pH	λ (nm)	(nm)
Citrato	3	564	5, 20
Citrato	7	520	20
Citrato	9	525	20

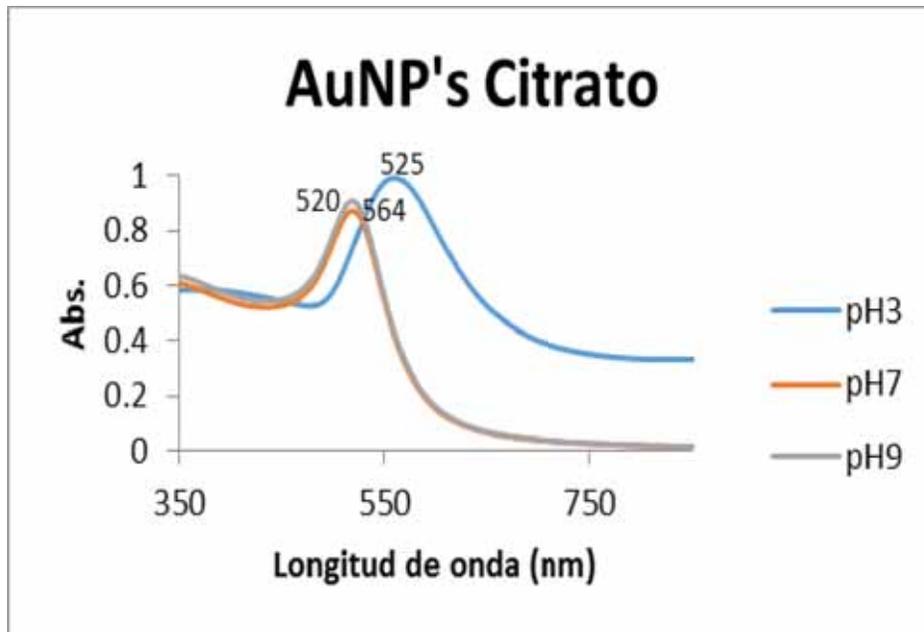


Figura 26. Espectro de absorción UV-Vis de las AuNPs obtenidas utilizando citrato de sodio como agente reductor, a diferente pH.

8.6.2 Caracterización por TEM de la síntesis química a diferente pH

La caracterización por TEM confirma que se obtuvieron NPs de diferente tamaño; a un pH de 3 se observan de un tamaño de alrededor de 5 a 20 nm, a pH 7 su tamaño es homogéneo y de aproximadamente 20 nm y a pH 9 son de tamaño homogéneo y de aproximadamente 15 nm (Figura 27 A-C).

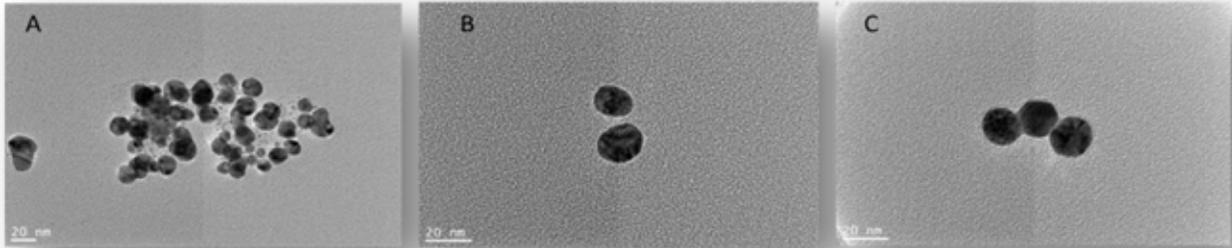


Figura 27. Imágenes TEM de las AuNPs sintetizadas con citrato de sodio: A) pH 3, B) pH 7 y C) pH 9.

8.6.3 Caracterización por AFM de la síntesis química a diferente pH

Así mismo mediante la caracterización por AFM, corrobora que se obtuvieron NPs de diferente tamaño, como se describió en el apartado anterior (Figura 28 A-C).

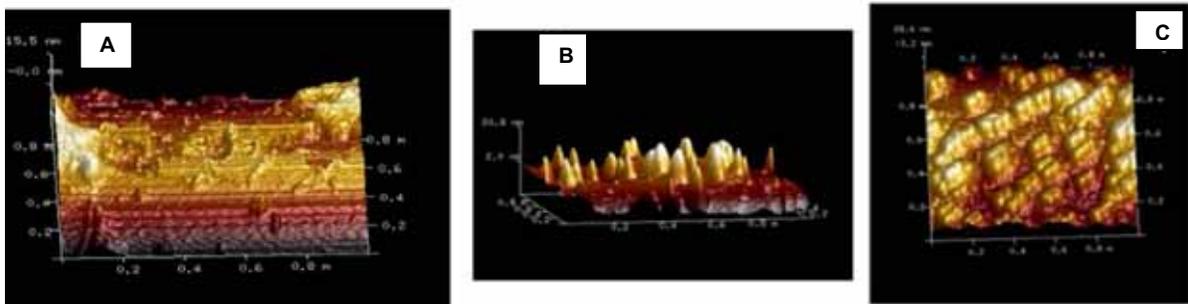


Figura 28. Imágenes AFM de las AuNPs sintetizadas con citrato de sodio: A) pH 3, B) pH 7 y C) pH 9.

8.6.4 Biosíntesis a diferente pH

Los resultados obtenidos al sintetizar AuNPs con extractos de diferentes plantas se presentan en las figuras 29 a 43, se observa que la biosíntesis a pH neutro es en general donde se obtienen Nps de tamaño menor a 30 nm, excepto para las AuNPs de café donde utilizando el pH neutro se obtuvieron AuNPs de 100 nm.

8.6.4.1 Biosíntesis con extracto de *Opuntia* sp. (Nopal)

En la figura 29 se presenta la caracterización UV-Vis de las AuNPs sintetizadas con extracto de nopal a diferente pH, donde se observa que las longitudes de onda varían, siendo de 549 nm a pH 4.8, 555 nm a pH 7 y 560 nm a pH 9. La campana en cada uno de los espectros es amplia, lo que indica que se obtuvieron diferentes formas y tamaños.

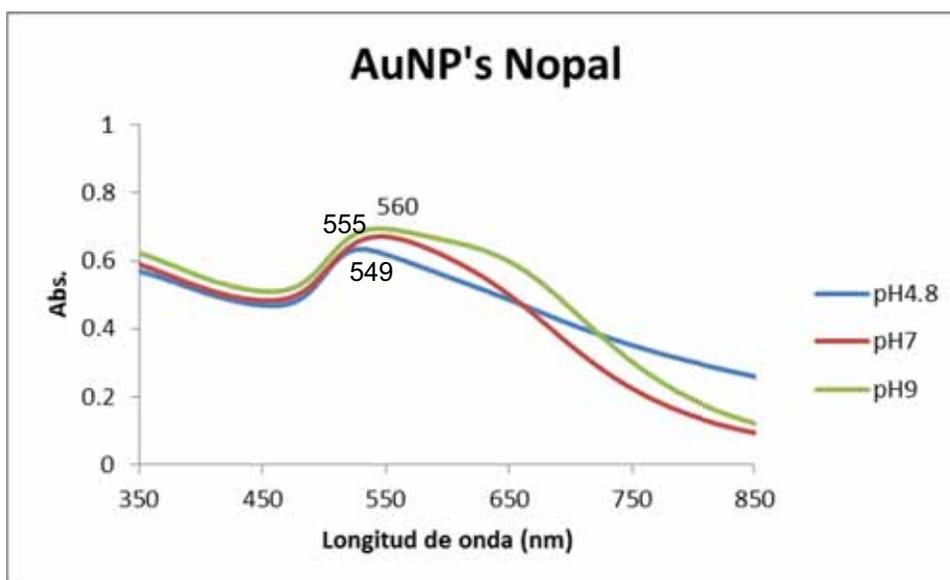


Figura 29. Espectro UV-Vis de las AuNPs obtenidas utilizando extracto de nopal como agente reductor a diferente pH.

La caracterización por TEM (Figura 30 A-C) corrobora las diferentes formas y tamaños, observándose que a pH 4.8 (A) presentan un tamaño de

aproximadamente 10 nm, y a pH 7 (B) y 9 (C) se obtuvieron NPs de aproximadamente 20 nm. Las AuNPs obtenidas fueron de diversas formas.

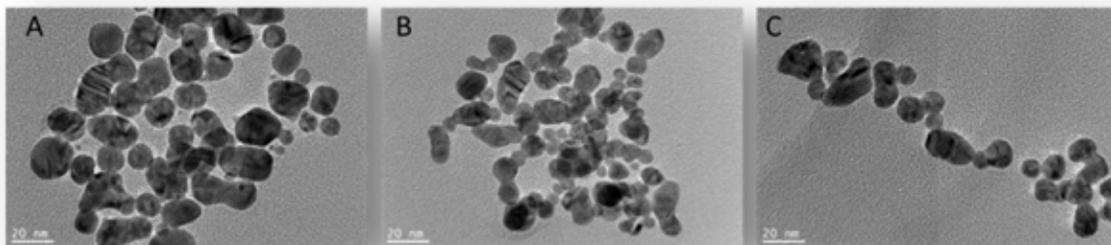


Figura 30. Imágenes TEM de las AuNPs sintetizadas con extracto de nopal: A) pH 4.8, B) pH 7 y C) pH 9.

Con AFM (Figura 31 A-C) se confirman los tamaños observados en TEM. En la figura 30-A, aunque las NPs son de aproximadamente 10 nm, la escala que se muestra es de 50 nm, lo cual es debido a que estas NPs se encuentran aglomeradas.

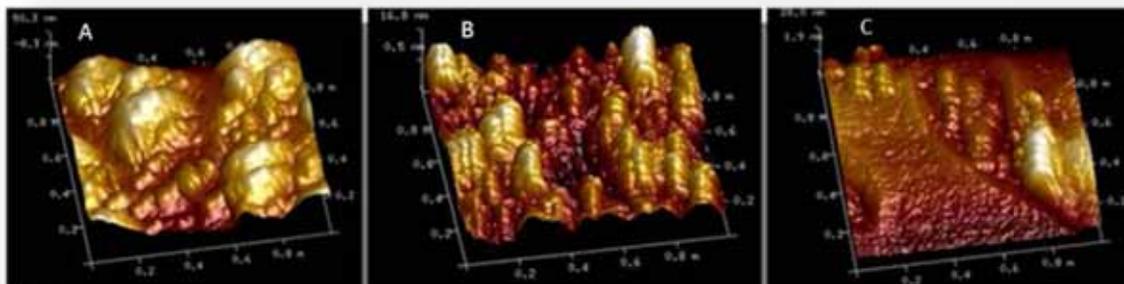


Figura 31. Imágenes AFM de las AuNPs sintetizadas con extracto de nopal A) pH 4.8, B) pH 7 y C) pH 9.

8.6.4.2 Biosíntesis con extracto de *Allum sp.* (Cebolla)

En la figura 32, se observa el espectro UV-Vis de las AuNPs sintetizadas con extracto de cebolla.

La caracterización por UV-Vis muestra que en general la diferencia radica en la absorbancia lo que indica que difieren en cuanto a concentración y tamaño. La longitud de onda máxima a un pH 5 es de 540 nm, a pH 7 de 545 nm y a pH 9 de 543 nm.

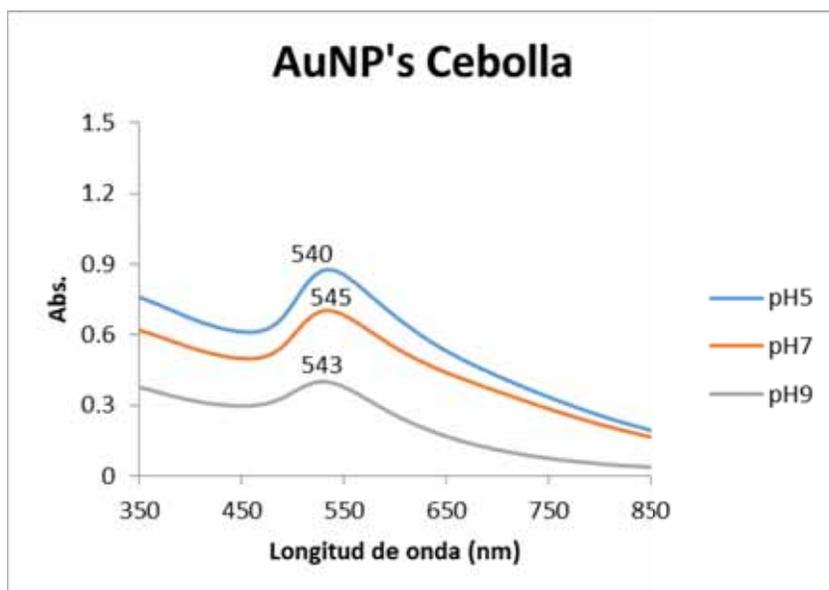


Figura 32. Espectro UV-Vis de las AuNPs obtenidas utilizando extracto de cebolla como agente reductor, a diferente pH.

En las imágenes TEM (Figura 33 A-C) se observan NPs de tamaños entre 10 y 20 nm aproximadamente a pH 5 y pH 7, sin embargo el tamaño de las NPs disminuye cuando se sintetizan a un pH 9.

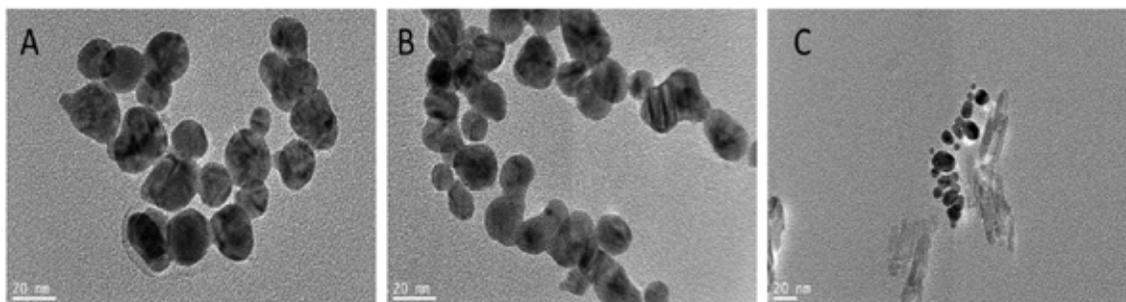


Figura 33. Imágenes TEM de las AuNPs sintetizadas con extracto de cebolla A) pH 4.8, B) pH 7 y C) pH 9.

En las imágenes AFM (34 A-C) se observan NPs de tamaños entre 10 y 20 nm aproximadamente a pH 5 y pH 7, sin embargo el tamaño de las NPs disminuye cuando se sintetizan a un pH 9. En la figura 34-C, no se observan tan claramente las AuNPs como en las figuras 34-A y 34-B, quizá debido a la presencia de impurezas en la muestra.

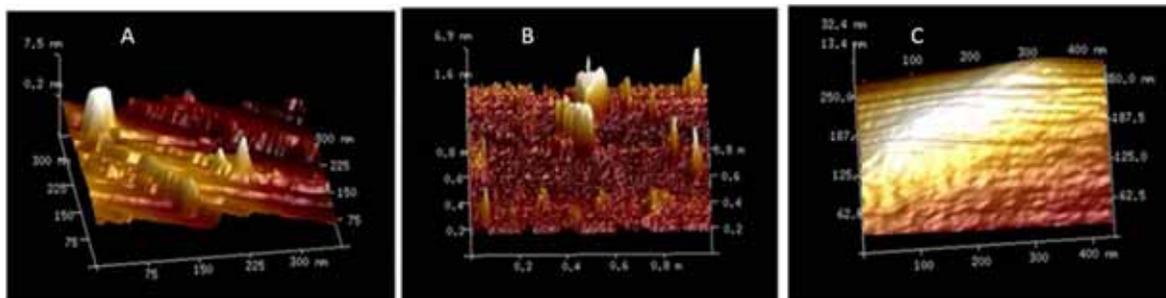


Figura 34. Imágenes AFM de las AuNPs sintetizadas con extracto de cebolla A) pH 4.8, B) pH 7 y C) pH 9.

8.6.4.3 Biosíntesis con extracto de *Coffea sp.* (Café)

En la figura 35 se muestra el espectro UV-Vis de las NPs sintetizadas con extracto de café; se observan diferencias en cuanto a la absorbancia de las NPs sintetizadas a un pH 5 y pH 9 con respecto a las sintetizadas a un pH 7. La longitud de onda fue de 539 para las NPs sintetizadas a un pH de 5, de 532 para las sintetizadas a un pH de 7 y de 530 para las sintetizadas a un pH de 9.

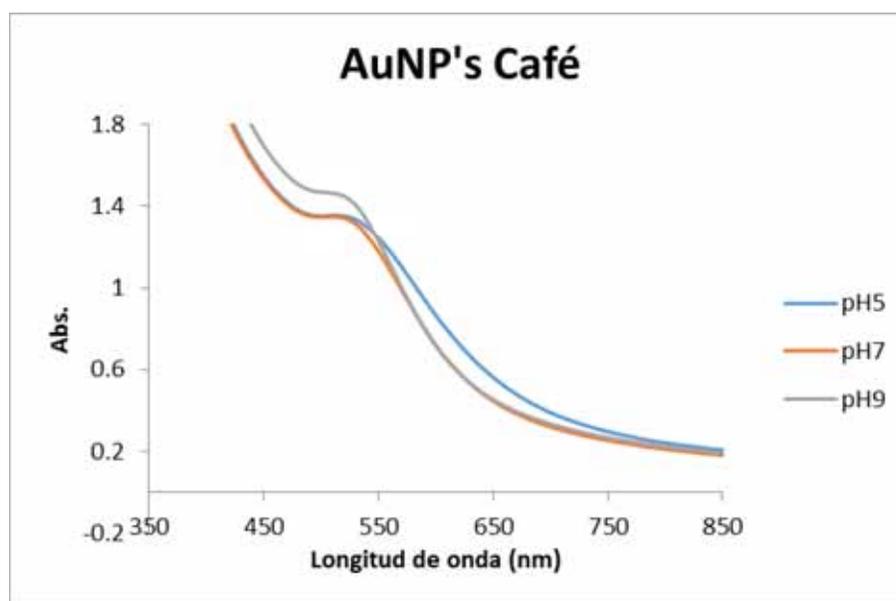


Figura 35. Espectro de absorción UV-Vis de las AuNPs obtenidas utilizando extracto de café como agente reductor, a diferente pH.

En la caracterización por TEM (Figura 36 A-C); a pH 5 se observan NPs con tamaños variados (5-30 nm) a pH 7 se obtuvieron NPs muy grandes de aproximadamente 100 nm y a pH 9 se observan NPs de tamaño de 10-20 nm.

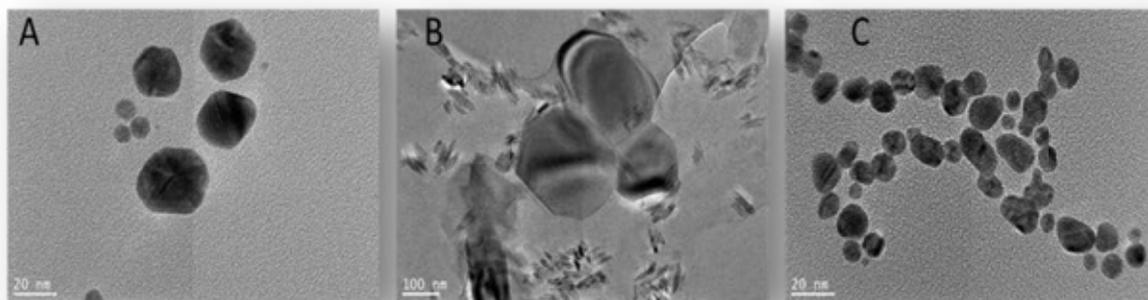


Figura 36. Imágenes TEM de las AuNPs sintetizadas con extracto de café. A) pH 4.8, B) pH 7 y C) pH 9.

En la caracterización por AFM (37 A-C) se corrobora lo observado en el apartado anterior. Es importante señalar que la síntesis de estas NPs a pH 7 se comporta de manera diferente a todas las demás realizadas en este trabajo, en las que en general a pH neutro se obtienen NPs de tamaño no mayor a 30 nm.

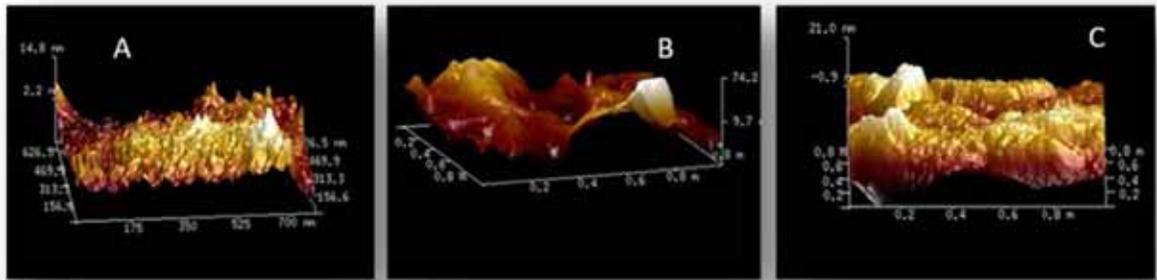


Figura 37. Imágenes AFM de las AuNPs sintetizadas con extracto de café A) pH 4.8, B) pH 7 y C) pH 9.

8.6.4.4 Biosíntesis con extracto de *Laurus sp.* (Laurel)

En cuanto a las NPs sintetizadas con extracto de laurel en la caracterización por UV-Vis se observan pequeñas diferencias en la absorbancia (Figura 38) ya que la longitud de onda máxima resultó ser de 535 nm a un pH de 6.5 y pH 7 y de 537 nm a pH 9.

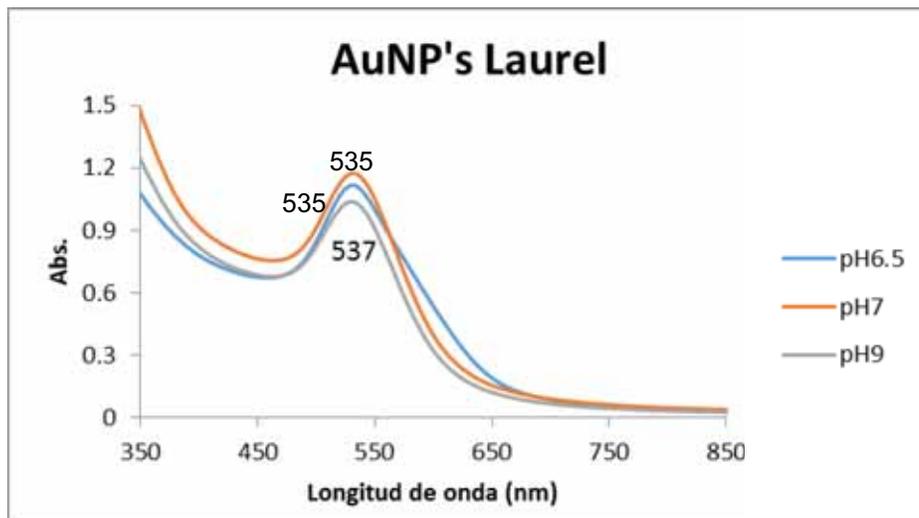


Figura 38. Espectro de absorción UV-Vis de las AuNPs obtenidas utilizando extracto de laurel como agente reductor, a diferente pH.

Con la caracterización por TEM (Figura 39 A-C) se observan NPs de diferentes formas (pentágonos, triángulos, esferas) a pH 6.5 y a pH 7, esta similitud se debe tal vez a que el pH 6.5 es muy cercano a la neutralidad. A pH 9 se observan NPs de diferente tamaño y menos dispersas con respecto a las de pH 6.5 y 7.

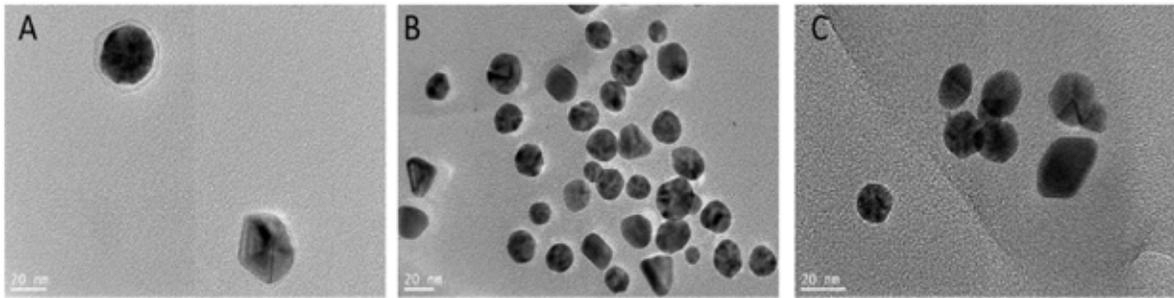


Figura 39. Imágenes TEM de las AuNPs sintetizadas con extracto de laurel A) pH 6.5, B) pH 7 y C) pH 9.

Con la caracterización por AFM (Figura 40 A-C) se corrobora lo expuesto en el párrafo anterior.

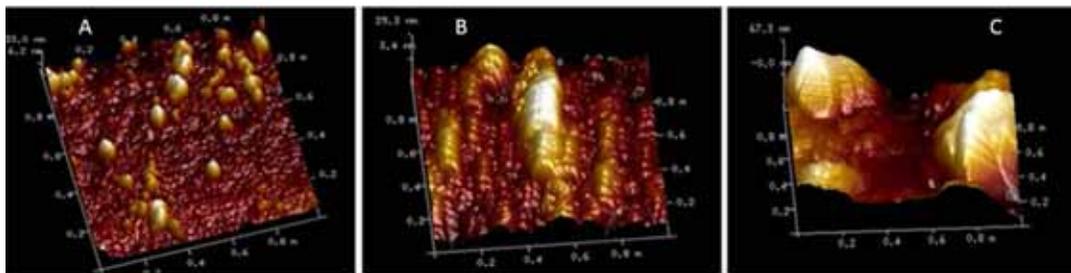


Figura 40. Imágenes AFM de las AuNPs sintetizadas con extracto de laurel A) pH 6.5, B) pH 7 y C) pH 9.

8.6.4.5 Biosíntesis con extracto de *Pyrus sp.* (Pera)

Para las NPs obtenidas a partir de extracto de pera con la caracterización por UV-Vis se observan ligeras diferencias en la absorbancia; las longitudes de onda son de 537 para un pH 5, 533 para un pH 7 y de 536 para un pH 9 (Figura 41).

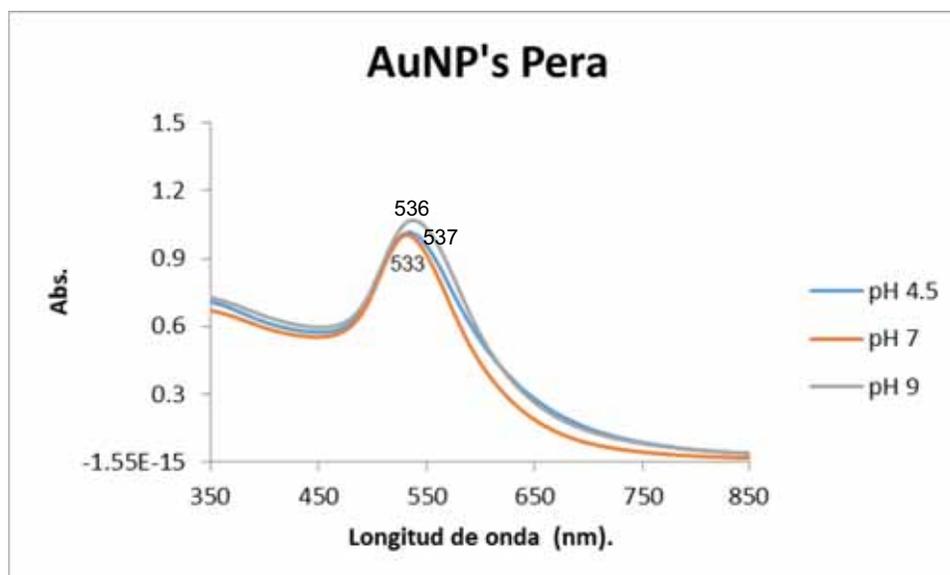


Figura 41. Espectro de absorción UV-Vis de las AuNPs obtenidas utilizando extracto de Pera como agente reductor, a diferente pH.

Con la caracterización por TEM (Figura 42 A-C) se observan NPs dispersas y de tamaño uniforme tanto a pH 5 como a pH 7, mientras que a pH 9 se distinguen NPs más grandes y de diferentes formas, apreciándose triángulos, esferas, cuadriláteros y hexágonos, entre otras.

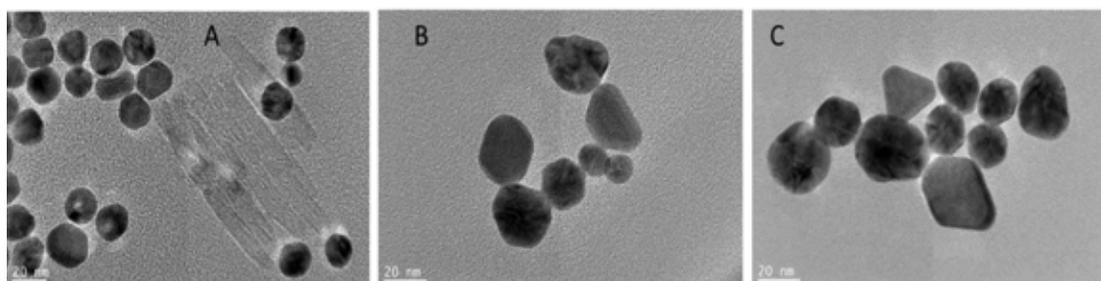


Figura 42. Imágenes TEM de las AuNPs sintetizadas con extracto de pera A) pH 4.5, B) pH 7 y C) pH 9.

La caracterización mediante AFM (Figura 43 A-C) se corrobora lo mencionado en el párrafo anterior en cuanto a tamaño.

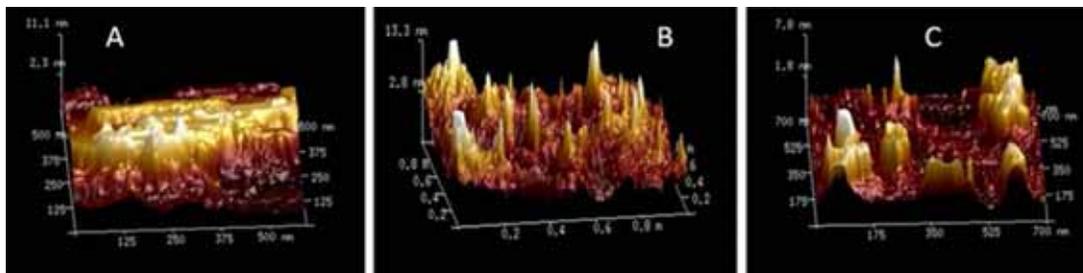


Figura 43. Imágenes AFM de las AuNPs sintetizadas con extracto de pera A) pH 4.5, B) pH 7 y C) pH 9.

8.7 Comparación de las AuNPs biosintetizadas

En la tabla 9 se presenta una comparación de la longitud de onda máxima, tamaño en nm y forma de las AuNPs obtenidas, de acuerdo con el pH del agente reductor.

Tabla 9. Comparación de la longitud de onda, tamaño y forma de las AuNPs.

Biosíntesis	pH	$\lambda_{\text{máx}}$	Tamaño (nm)	Forma
<i>Nopal</i>	4.8	549	10 y 20	Esféricas, triangulares, ovaladas
<i>Nopal</i>	7	555	10 y 20	Esféricas, triangulares, ovaladas
<i>Nopal</i>	9	560	20	Esféricas, triangulares, ovaladas
<i>Cebolla</i>	5.3	540	10 y 20	Hexagonales, esféricas, ovaladas
<i>Cebolla</i>	7	545	10 y 20	Hexagonales, esféricas, ovaladas
<i>Cebolla</i>	9	543	5 y 10	Hexagonales, esféricas, ovaladas
<i>Café</i>	5.0	539	5,10,20,30	Esféricas, heptagonales, hexagonales
<i>Café</i>	7	532	100	Esféricas, heptagonales, hexagonales
<i>Café</i>	9	530	10 y 20	Esféricas, heptagonales, hexagonales
<i>Laurel</i>	6.5	535	20	Triangulares, cuadrangulares, esféricas,
<i>Laurel</i>	7	535	20	Triangulares, cuadrangulares, esféricas,
<i>Laurel</i>	9	537	20 y 30	Triangulares, cuadrangulares, esféricas,
<i>Pera</i>	4.7	537	20	Triangulares, hexagonales, esféricas
<i>Pera</i>	7	533	20 y 30	Triangulares, hexagonales, esféricas
<i>Pera</i>	9	536	20 y 30	Triangulares, hexagonales, esféricas

Los resultados reportados en este trabajo indican que al sintetizar AuNPs con el proceso químico, el tamaño y forma de las NPs es controlable; sin embargo, al

utilizar los extractos de nopal, cebolla, café, laurel y pera, éstos contienen compuestos que actúan como reductores y estabilizadores con los que se obtienen NPs de diferente forma y tamaño, siendo el pH neutro el que se considera mejor para obtener AuNPs de hasta 30 nm.

Para tener un proceso más eficiente que controle el tamaño y la forma de las NPs tal vez sea necesario añadir un surfactante (CTAB, SDS, PVP, bromuro de cetiltrimetilamonio, dodecilsulfato sódico, polivinil pirrolidona, repectivamente), que ayude a controlar el crecimiento de la NP, para que sea isotrópico y no anisótropico, como el que se tiene, ya que las propiedades ópticas de las AuNPs dependen del tamaño, forma, grado de agregación y de los grupos funcionales en su superficie, lo que determina sus propiedades y aplicaciones (Kumar *et al.*, 2012; Zanella R, 2012).

8.7.1 Análisis Estadístico de los Datos

Se realizó un análisis estadístico de los datos obtenidos de la síntesis y biosíntesis de AuNPs (ANOVA y prueba de significancia de Fisher), utilizando el programa STATISTICA 12, los resultados del ANOVA se presentan en la figura 44 y de la prueba de Fisher en la tabla 10.

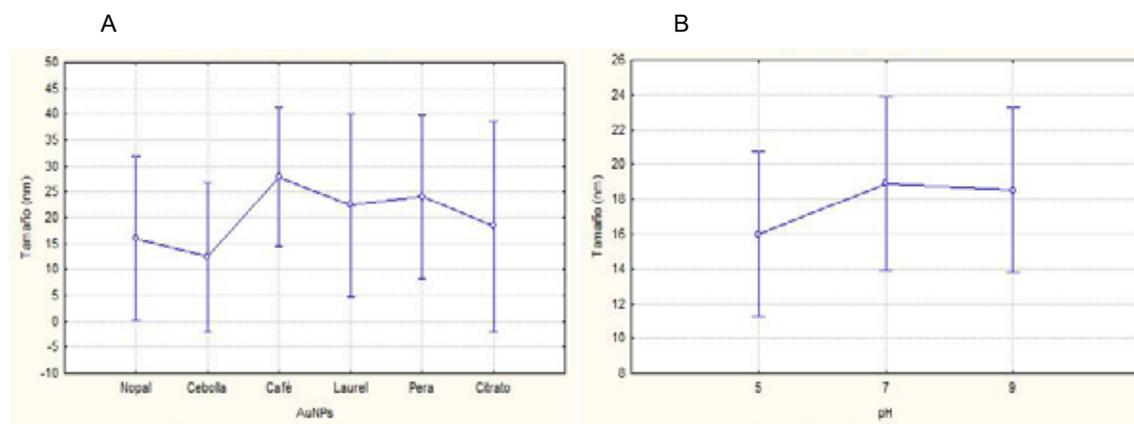


Figura 44. Análisis de varianza, A) del tamaño de AuNPs ($P=0.6613$) y B) del tamaño, según el pH ($P=0.6418$).

El ANOVA, no mostró diferencias significativas ni en cuanto a tamaño de AuNPs obtenidas, independientemente de que sean sintetizadas químicamente o biosintetizadas, ni en cuanto al pH de los extractos utilizados para la biosíntesis. Por lo anterior, las AuNPs biosintetizadas se podrían utilizar de igual manera que las AuNPs sintetizadas químicamente.

Tabla 10. Prueba de Fisher

Prueba LSD; Variable: tamaño de NPs (nm) Probabilidades para la prueba, Error: MS = 43.968, g.l. = 21.000					
Nopal		0.375298	0.966030	0.143225	0.059957
Cebolla	0.375298		0.375831	0.023656	0.006844
Café	0.966030	0.375831		0.119832	0.045978
Laurel	0.143225	0.023656	0.119832		0.729692
Pera	0.059957	0.006844	0.045978	0.729692	
Citrato	0.621979	0.209727	0.585573	0.402262	0.237161

LSD. Mínima diferencia significativa

g.l. Grados de libertad

MS. Mínimos cuadrados

La prueba de Fisher es una distribución de probabilidad continua, representa la distribución nula del análisis de varianza y nos permitió comprobar que si existen diferencias entre las AuNPs de laurel con respecto a las de cebolla ($P=0.023$), las de pera con respecto a las de cebolla ($P= 0.068$) y café ($P=0.045$), sin embargo no existieron diferencias significativas en comparación con las de citrato.

8.8. Espectrometría Infrarroja con transformada de Fourier

Se realizaron mediciones de FTIR a los extractos de las plantas utilizadas en la biosíntesis, con el fin de identificar las biomoléculas implicadas en la reducción de los iones oro, observándose bandas de IR a una longitud de onda de 3369 cm^{-1} en el extracto de laurel, de 3368 cm^{-1} en el extracto de pera, 3365 cm^{-1} en los extractos de nopal y café y de 3350 cm^{-1} en el extracto de cebolla, las cuales corresponden al agua presente en la muestra. Se tiene también una banda intensa de 1642 cm^{-1} en los extractos de laurel, cebolla, nopal y pera, y de 1630 cm^{-1} en el

extracto de café, que corresponden al grupo del ácido carboxílico (C=O) que tiene una señal intensa de 1540 a 1740 cm^{-1} ; esto indica que posiblemente los extractos contienen ácido málico, ya que es uno de los ácidos más abundantes en la naturaleza que se encuentra en frutas y verduras. El ácido málico es fácilmente metabolizable y es primordial para el ciclo de Krebs. En la industria alimenticia se utiliza como acidulante junto con el ácido cítrico (Brown *et al.*, 2000).

Las bandas medianas cerca de 2000 cm^{-1} , corresponden al grupo amino, también las presentes en 3300 cm^{-1} a 3500 cm^{-1} corresponden a aminas primarias y secundarias (Morrison y Boyd, 1987). Sin embargo, estas pudieran estar enmascaradas con la banda correspondiente al agua, por lo que no se descarta su presencia en las muestras (Figuras 45-49).

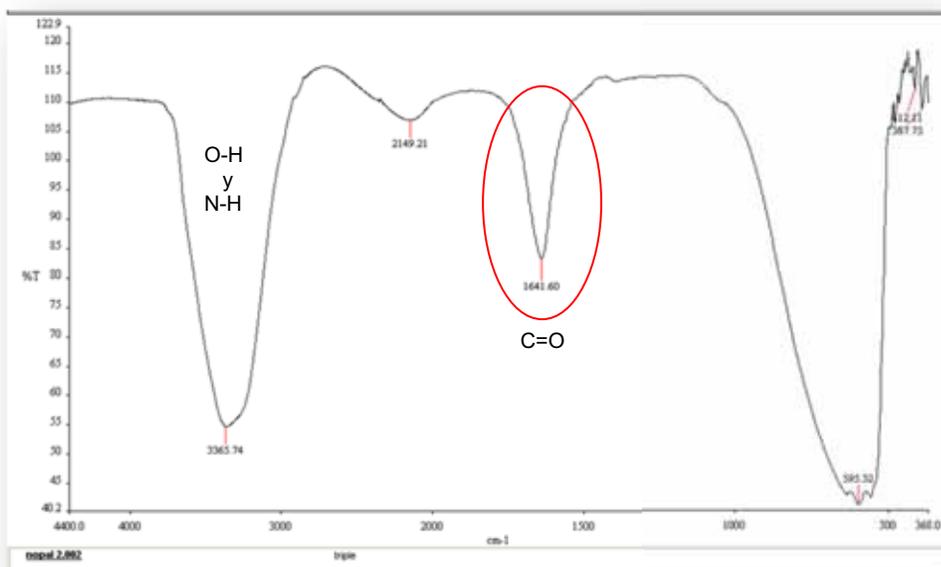


Figura 45. Espectro IR obtenido del extracto de nopal.

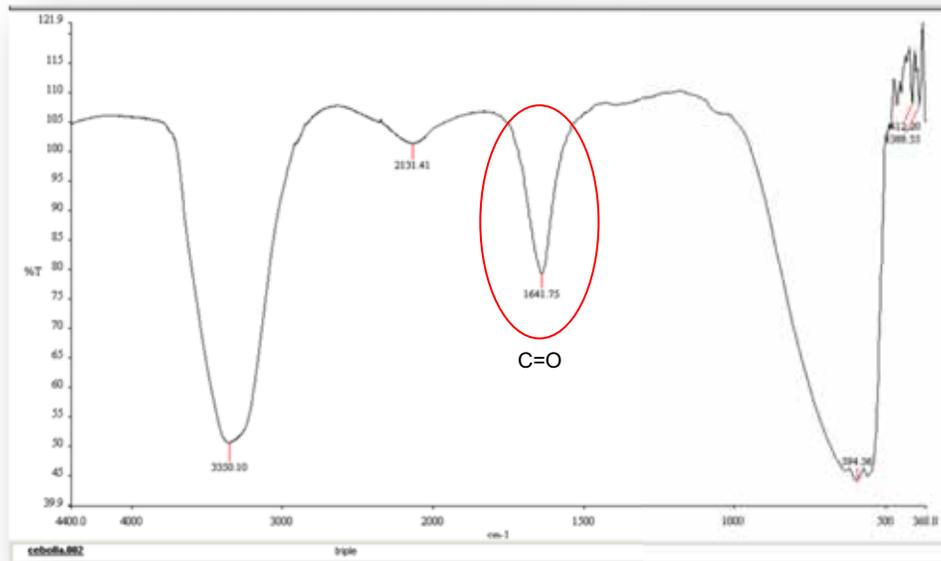


Figura 46. Espectro IR del extracto de cebolla.

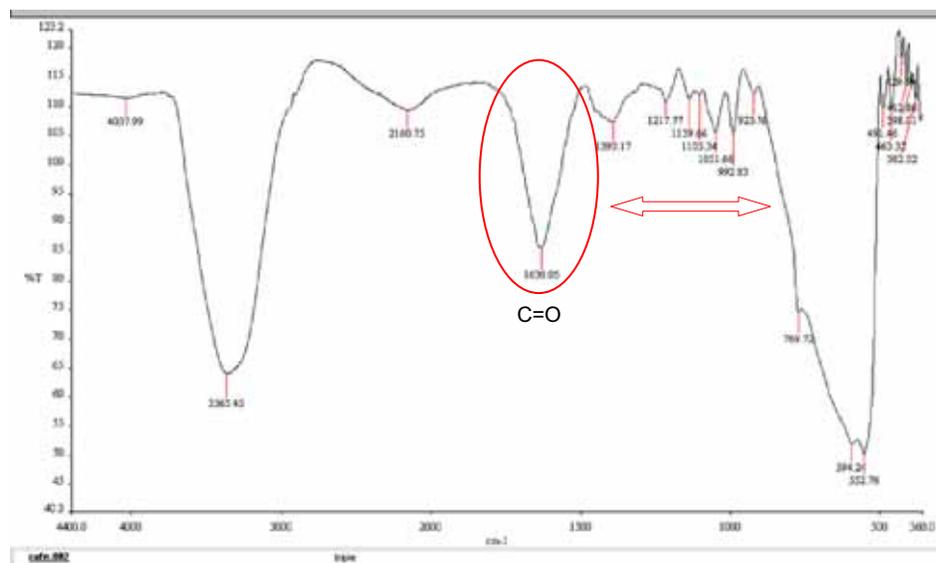


Figura 47. Espectro IR del extracto de café.

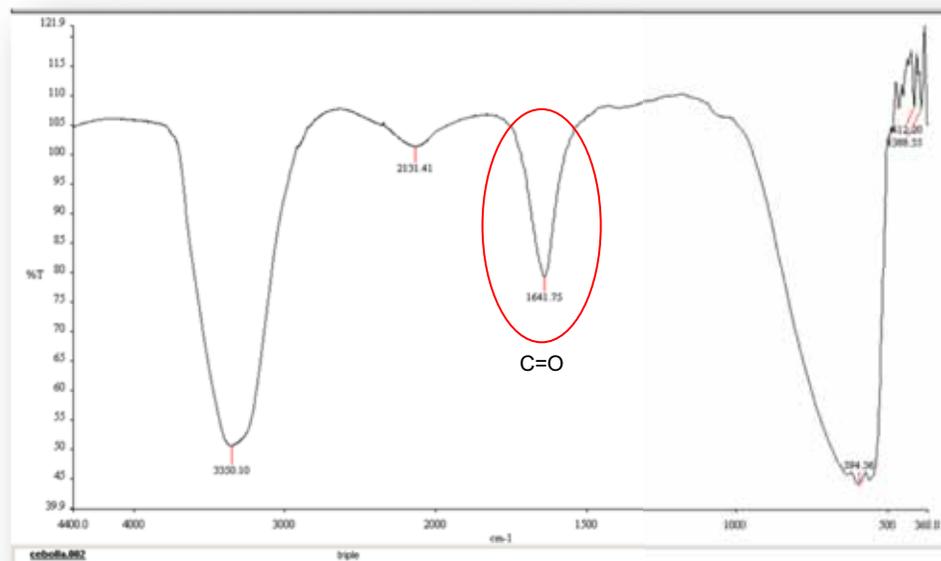


Figura 48. Espectro IR del extracto de laurel.

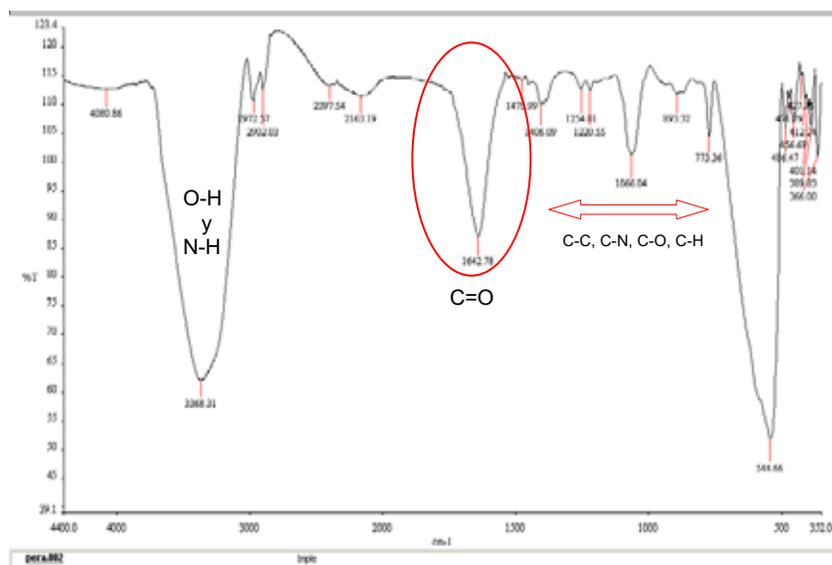


Figura 49. Espectro IR del extracto de pera.

Los espectros IR correspondientes a los extractos de café, laurel y pera presentan más grupos funcionales que los espectros IR de los extractos de nopal y cebolla. En el extracto de café (Figura 46) abundan de los 1300 a 900 cm^{-1} , justo se observan en la denominada zona de la huella dactilar y corresponden a flexión de enlaces CH, CO, CN, CC, entre otros (Morrison y Boyd, 1987).

8.9 Caracterización UV-Vis de la síntesis de AuNPs con ácido málico

Por los resultados obtenidos con el análisis FT-IR, se realizó una síntesis de AuNPs con ácido málico como agente reductor, se obtuvieron AuNPs de color morado y se caracterizaron por UV-Vis, observándose una longitud de onda máxima de 560 nm (Figura 50). Estos resultados indican que efectivamente el ácido málico puede estar actuando como agente reductor y el grupo amino como agente estabilizador.

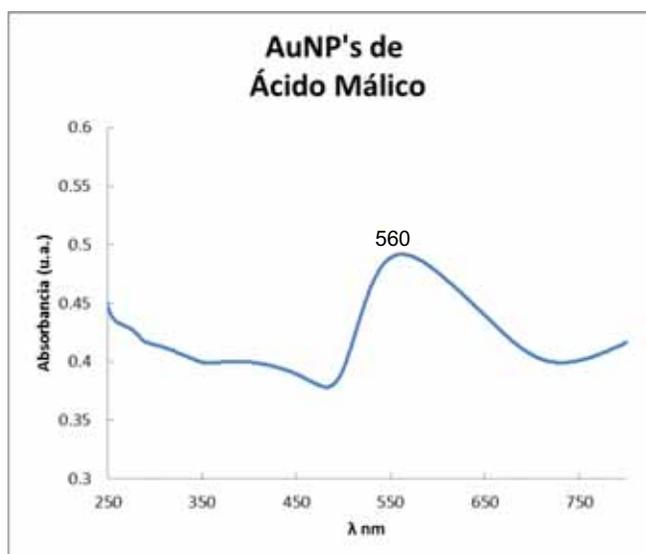


Figura 50. Espectro de absorción UV-Vis de las AuNPs obtenidas utilizando ácido málico como agente reductor.

8.10 Diseño de Sondas

8.10.1 Obtención de *Achlya* sp.

El microorganismo *Achlya* sp. se colectó de los canales de Xochimilco, en la Ciudad de México. En la figura 51 se observa la comparación macroscópica, la cual consistió en contrastarlo morfológicamente con imágenes de *Achlya* sp. obtenidas de internet.

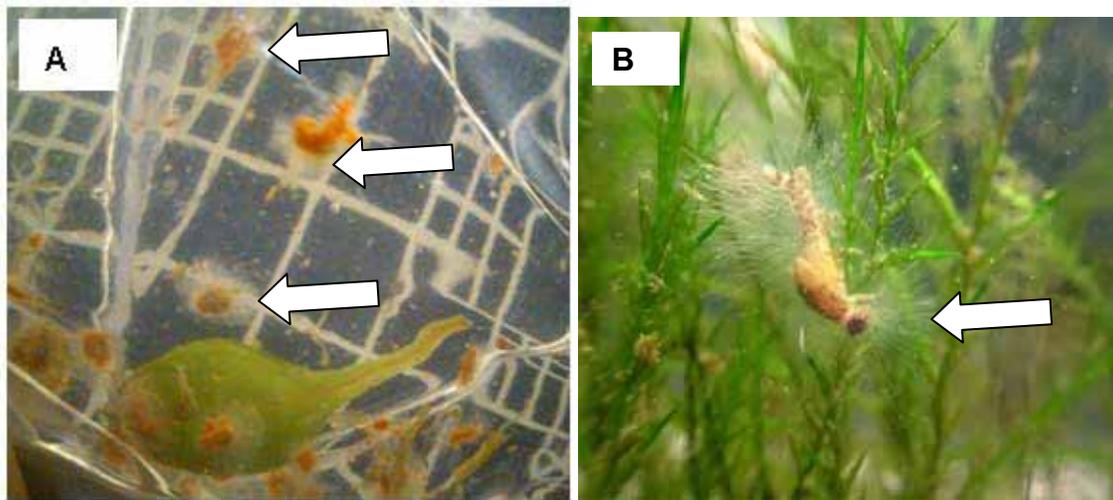
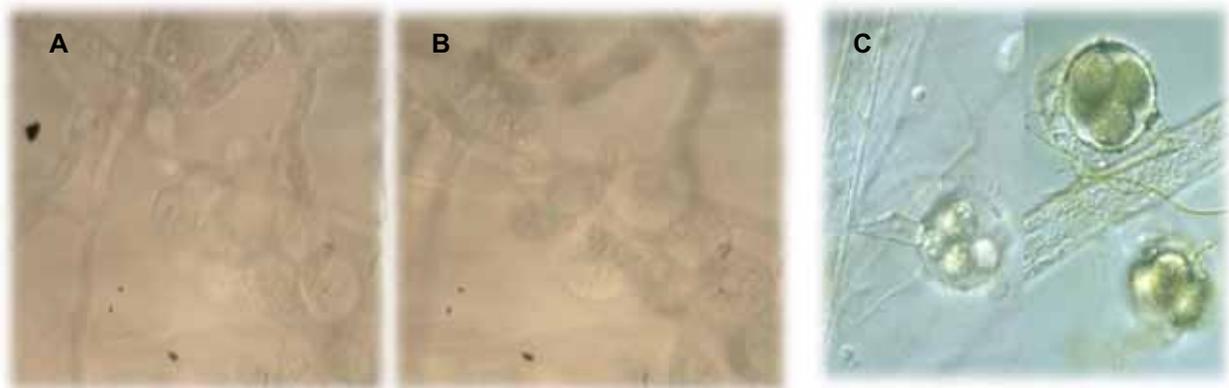


Figura 51. A). *Achlya* sp. aislado de los canales de Xochimilco en la Ciudad de México, se encuentra sobre alimento de peces. B) *Achlya* sp. sobre una libélula. Obtenida de (google imagens).

La caracterización Microscópica consistió en realizar resiembras del microorganismo en agar extracto de malta hasta asegurar la pureza del cultivo, a partir del cual se procedió a preparar un microcultivo, que fue observado con un microscopio óptico, figura 52.



<http://protist.i.hosei.ac.jp/pdb/Images/Eumycota/Achlya/index.html>

Figura 52. A y B son micrografías a 40 X, tomadas al microcultivo de *Achlya sp.*
C) micrografía de *Achlya sp.*
Tomada de la liga que se indica.

Para el diseño de las sondas específicas se utilizaron técnicas de Biología Molecular que incluyen, Extracción de DNA, amplificación del DNA mediante PCR, secuenciación y análisis bioinformático de las secuencias obtenidas.

8.10.2 Extracción de DNA

Se realizó la extracción de DNA al hongo-*Achlya sp.* y a 2 muestras de cultivo joven de *E. coli*, con el Kit QUIAGEN DNAeasy, con el Kit MoBioUltraClean™soil DNA así como utilizando el protocolo de extracción corta para plantas, descrito en Dellaporta *et al.* (1983). Con el kit QUIAGEN se obtuvieron alrededor de 25 ng/μL para *E. coli* y 15 ng/μL para *Achlya sp.*, mientras que con el protocolo de extracción corta para plantas, se obtuvieron 50 ng/μL, este protocolo sólo se utilizó para extraer DNA de *Achlya sp.* y *Aspergillus sp.*, este último como referencia para las PCRs. Finalmente con el Kit MoBioUltraClean™soil DNA se logró obtener hasta 75 ng/μL. El DNA obtenido durante todas las extracciones, se visualizó en geles de agarosa al 0.8% al teñirlos con bromuro de etidio. Estos resultados se pueden observar en las figuras 53 y 54.

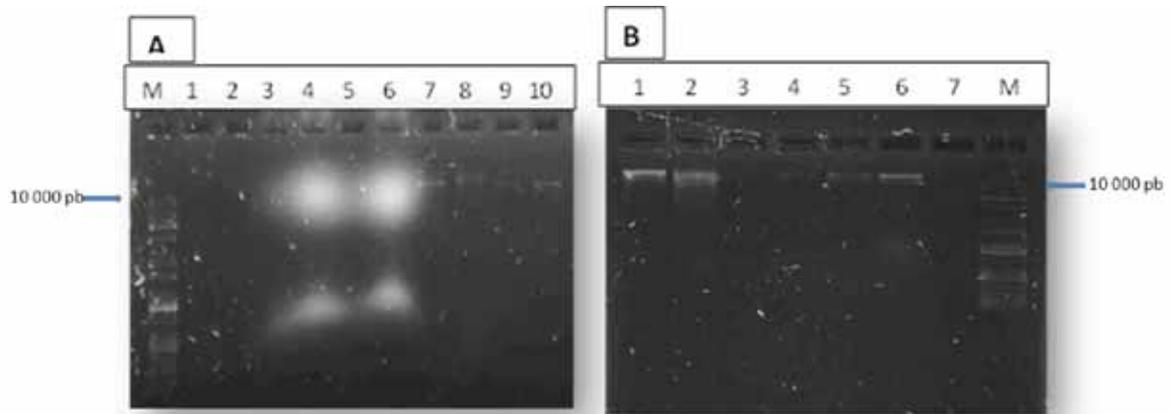


Figura 53. Geles de agarosa al 0.8% A) Extracción realizada con el Kit QUIAGEN DNAeasy. 1-3 *Achlya sp.* 4-6 *Aspergillus sp.*, 7-10 DNA de *E. coli*. B) Extracción realizada con el método de Dellaporta et al., 1983. 1-3 *Achlya sp.* 4-6 *Aspergillus sp.* 7 blanco. M, marcador molecular Kapa.

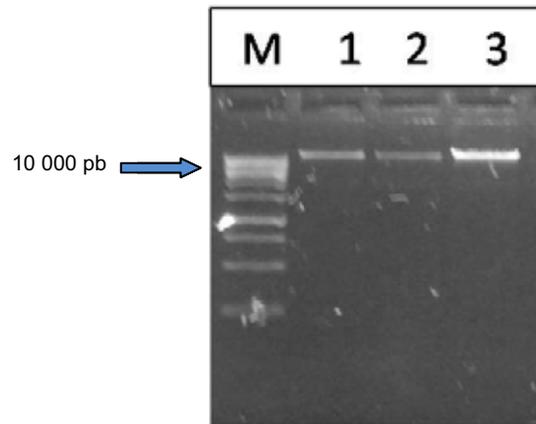


Figura 54. Gel de agarosa al 0.8%. Extracción de DNA con el Kit MoBio UltraClean TMsoil DNA.

De acuerdo a los resultados obtenidos el Kit MoBioUltraCleanTMsoil DNA, es el más eficaz en la extracción de DNA para *Aspergillus sp.* y *Achlya sp.*, y también resulta más eficiente que el método de Dellaporta et al., 1983.

8.10.3 Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

Con el DNA obtenido se realizó PCR, utilizando los primers ITS4 e ITS5, se obtuvo una banda de 600 pares de bases (pb), el resultado se puede observar en la figura 55 y en la 56.

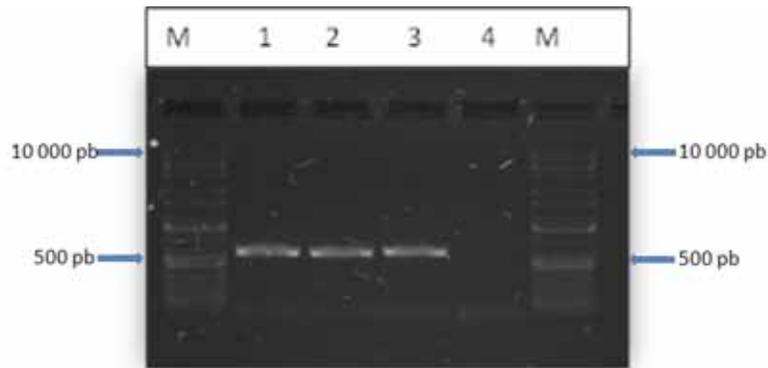


Figura 55. Gel de agarosa al 1.2%. Muestra los productos de PCR obtenidos. Marcador molecular Kapa, M; producto de PCR con DNA de *Achlya* sp., 1-2; producto de PCR con DNA de *Aspergillus* sp., 3; blanco, 4.

Se realizó la PCR con el DNA obtenido de la extracción con el Kit MoBioUltraClean™soil DNA con las mismas condiciones que la PCR realizada previamente y se obtuvo la misma banda correspondiente de 600 pb.

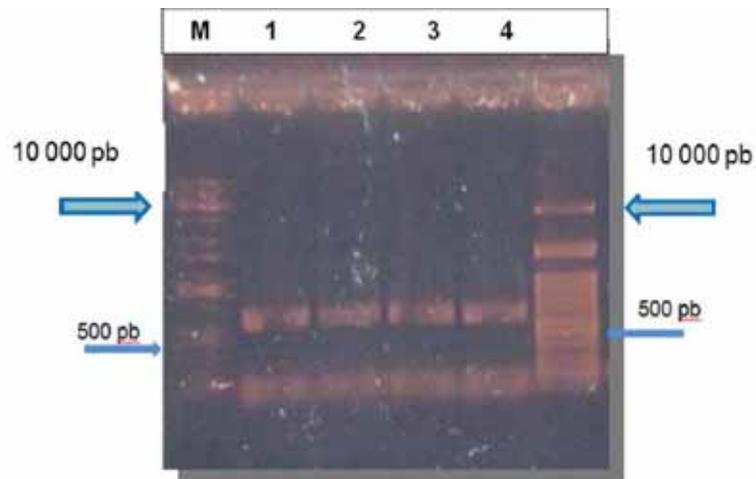


Figura 56. Gel de agarosa al 1.2%. M, marcador molecular Kapa. (1-3) PCR de *Achlya* sp (4) PCR *Aspergillus* sp.

8.10.4 Secuenciación de los productos de PCR

La secuencia de *E. coli* se obtuvo de GeneBank, por lo que ya no fue necesario realizar la secuenciación.

Los productos de PCR de *Achlya sp.* y *Aspergillus sp.* como referencia, se enviaron a secuenciación y se obtuvieron cromatogramas muy claros y sin ruido que se observan en las figuras 57 y 58.

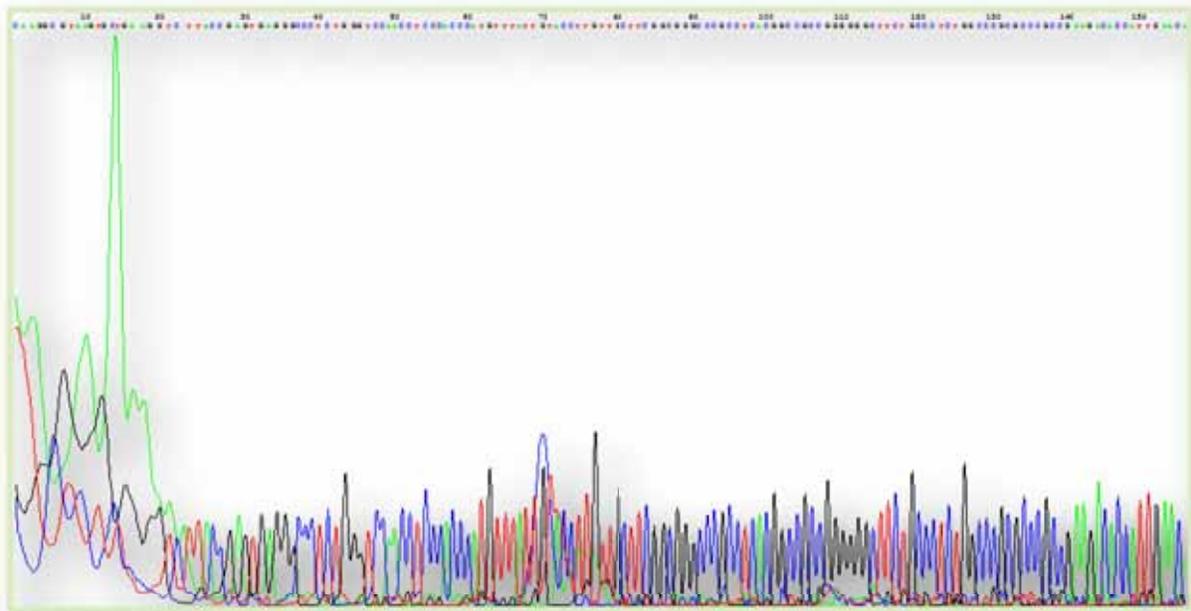


Figura 57. Fragmento del cromatograma obtenido de la secuenciación del producto de PCR con DNA de *Achlya sp.*

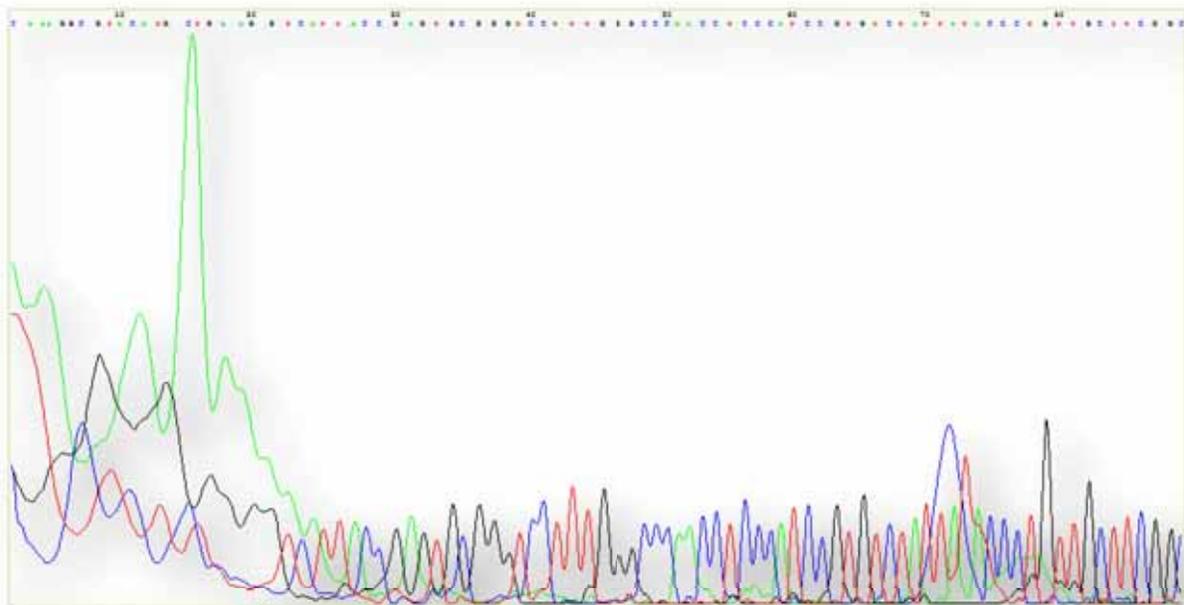


Figura 58. Fragmento del cromatograma obtenido de la secuenciación del producto de PCR con DNA de *Aspergillus sp.*

8.10.5 Análisis Bioinformático

Las figuras 59 y 60 muestran los resultados de las alineaciones con el programa Blast de NCBI. La secuencia de DNA del hongo *Aspergillus sp.*, alinea al 99% de identidad con *Aspergillus niger*. La secuencia del hongo *Achlya sp.*, alinea al 85% de identidad con *Achlya sp.*

La caracterización molecular de los microorganismos *Achlya sp.* y *Aspergillus sp.* permitió identificar a nivel de especie al primero, para el segundo sería necesario continuar secuenciando otro fragmento hasta obtener la especie, sin embargo no es el objetivo del presente trabajo de investigación, por lo que una vez obtenida la secuencia de *Achlya sp.* se procedió al diseño de las sondas.

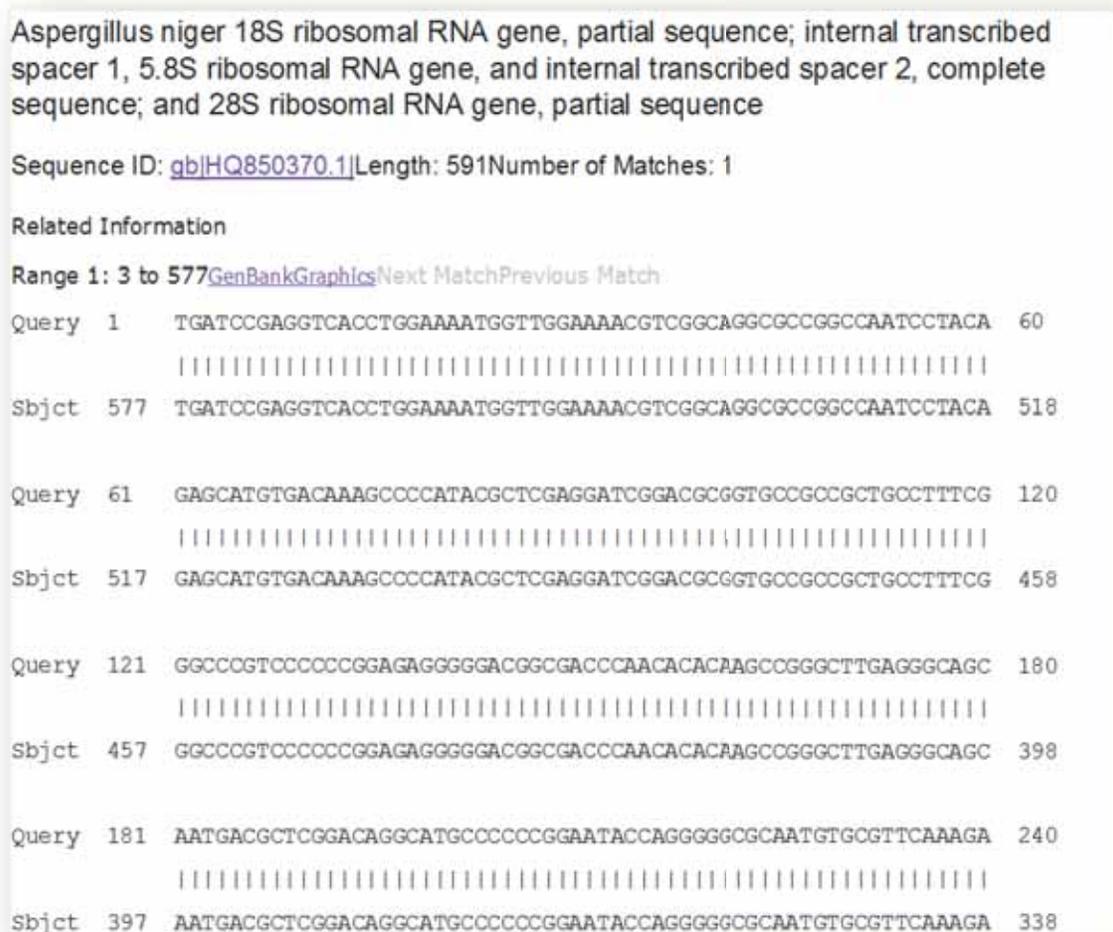


Figura 59. Alineación de la secuencia obtenida de *Aspergillus sp.*, número de acceso: HQ850370.1.

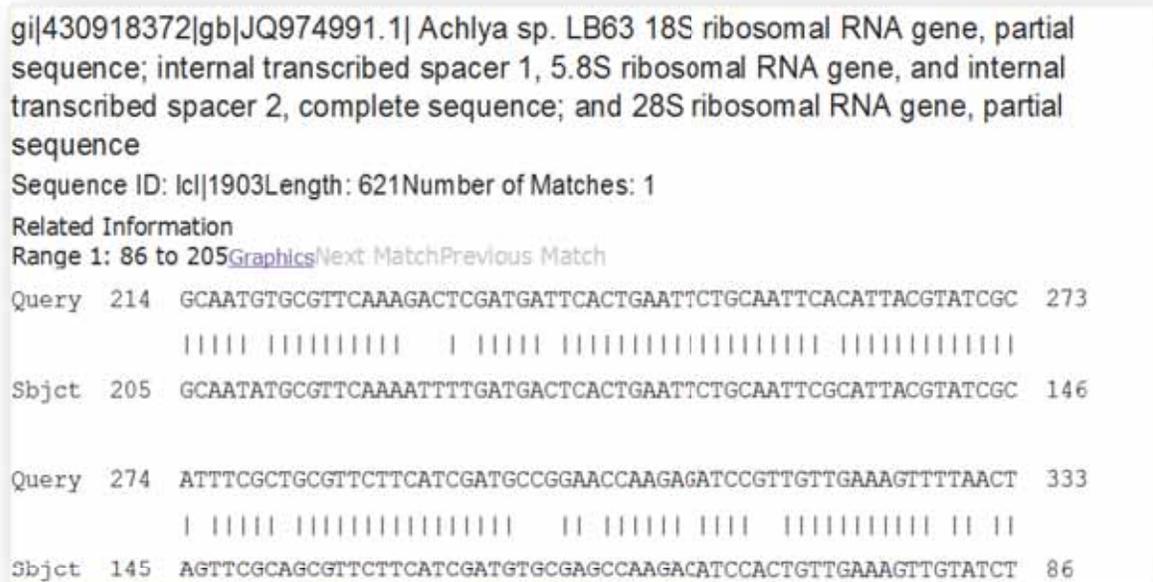


Figura 60. Alineación de la secuencia obtenida de *Achlya sp.*, número de acceso: JQ 974991.1

8.10.6 Secuencia de las Sondas

Una vez que se obtuvieron las secuencias y mediante análisis bioinformático se confirmó que se tenía el microorganismo de interés (*Achlya sp.*), se realizó el diseño de las sondas utilizando el programa Primer Blast (Ye *et al.*, 2012). En la tabla 11 se observa el resultado.

Tabla 11. Secuencia de las sondas diseñadas.

Microorganismo	NCBI/ GeneBank	Sonda Diseñada
<i>Achlya sp.</i>	JQ974991.1	5' GCACCGGAAGTACAGACCAA 3'
<i>E. coli O157:H7</i>	NZ_AERR00000000.1	5' TTGCTTTGGCAAGTCCTCCT 3'

8.11 Funcionalización de las AuNPs

Las AuNPs que se funcionalizaron se eligieron de acuerdo a su dispersión, tamaño y forma, considerando que fueran lo más semejantes a las obtenidas con el uso de citrato a pH 7. Tabla 12.

Tabla 12. AuNPs funcionalizadas.

Agente reductor	pH	Tamaño (nm)	Morfología
Citrato de sodio	7	20	Esféricas
Laurel	6.5	20	Esféricas, triangulares, ovaladas
Pera	7	25	Triangulares, hexagonales, esféricas
Nopal	5	15	Triangulares, esféricas, ovaladas
Cebolla	5	15	Hexagonales, esféricas, ovaladas
Café	9	15	Hexagonales, ovaladas, esféricas

En las figuras 61-66 se muestran las AuNPs funcionalizadas; se observa que sólo las NPs sintetizadas con extracto de café (Figura 65) no muestran una correcta funcionalización, tal vez porque desde el momento de la síntesis estas AuNPs presentaron grupos funcionales en su superficie.

8.11.1 AuNPs de citrato de sodio pH 7

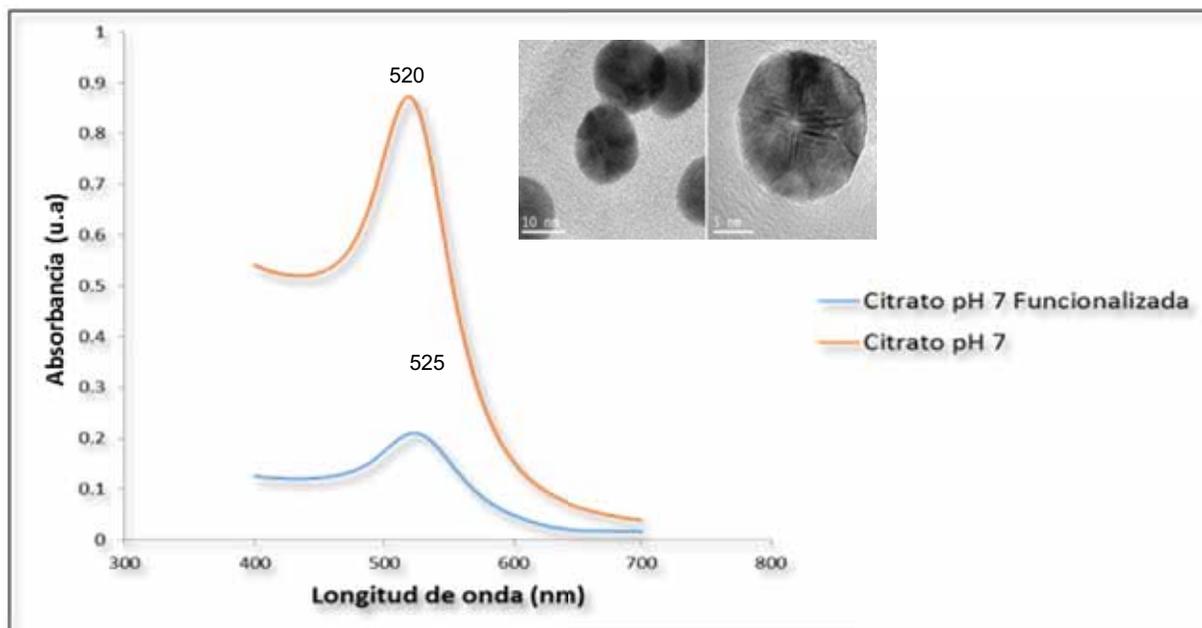


Figura 61. UV-Vis de las AuNPs de citrato de sodio a pH 7, sin funcionalizar (λ 520) y funcionalizadas (λ 525).

8.11.2 AuNPs de laurel a pH 6.5

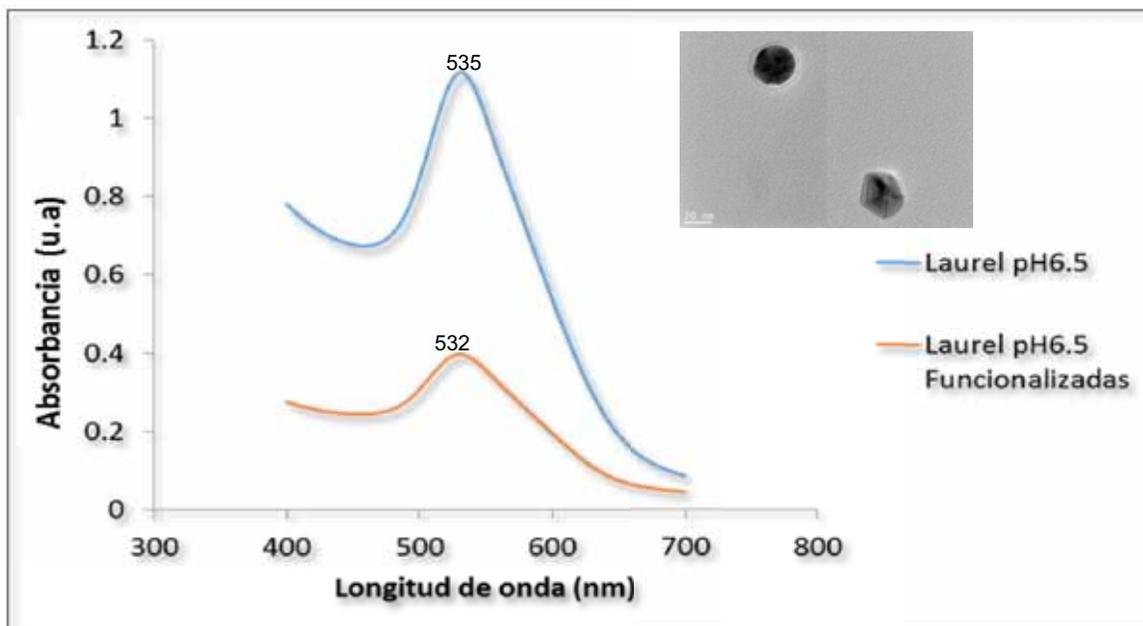


Figura 62. Espectros de absorción UV-Vis de las AuNPs de laurel a pH 6.5, sin funcionalizar (λ 535) y funcionalizadas (λ 532).

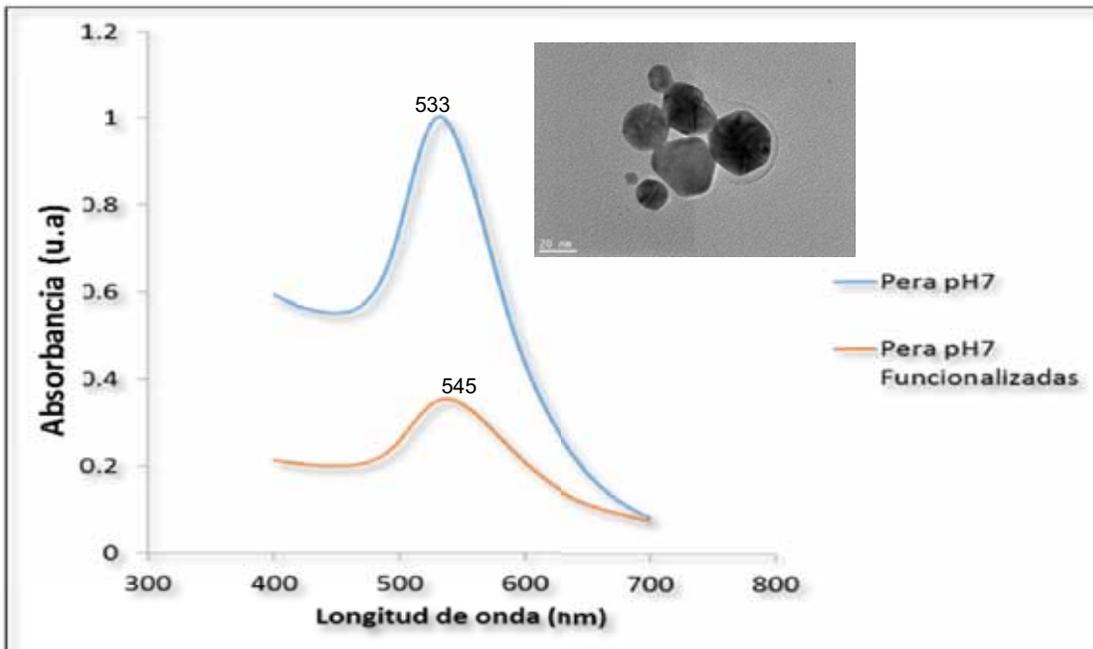


Figura 63. Espectros de absorción UV-Vis de las AuNPs de pera a pH 7, sin funcionalizar (λ 533) y funcionalizadas (λ 545).

8.11.3 AuNPs de nopal a pH 5

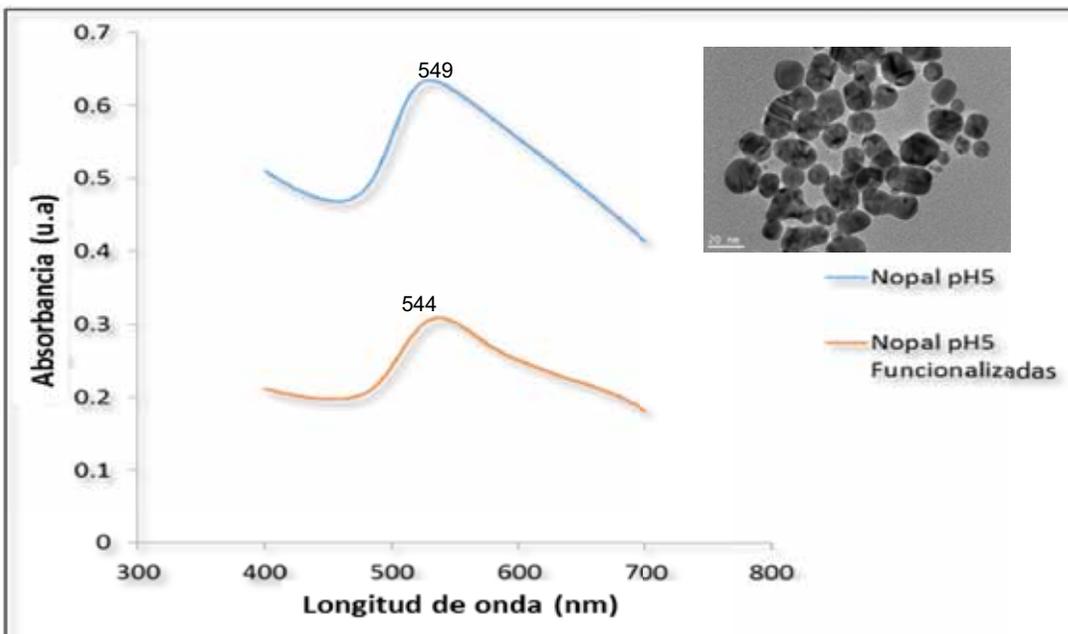


Figura 64. Espectros de absorción UV-Vis de las AuNPs de nopal a pH 5, sin funcionalizar (λ 549) y funcionalizadas (λ 544).

8.11.4 AuNPs de cebolla a pH 5

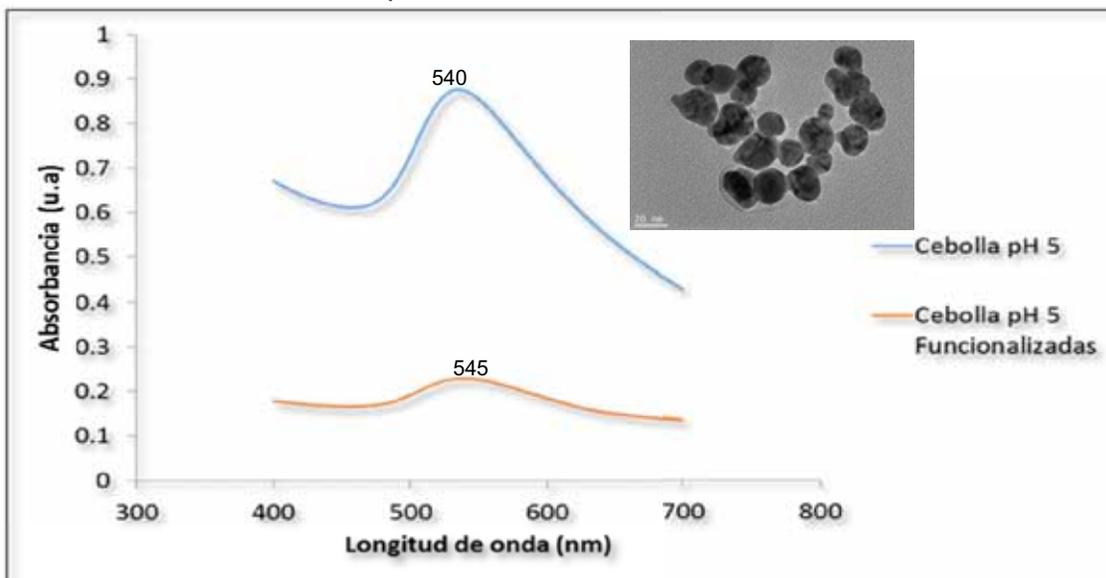


Figura 65. Espectros de absorción UV-Vis de las AuNPs de la cebolla a pH 5, sin funcionalizar (λ 540) y funcionalizadas (λ 545).

8.11.5 AuNPs de café a pH 9

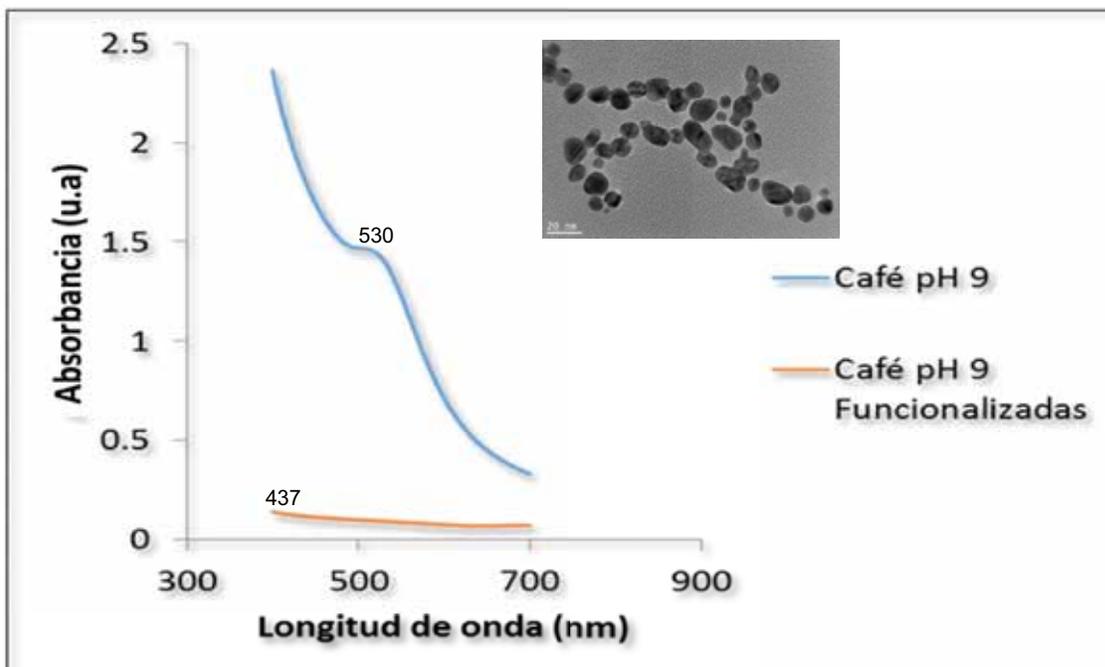
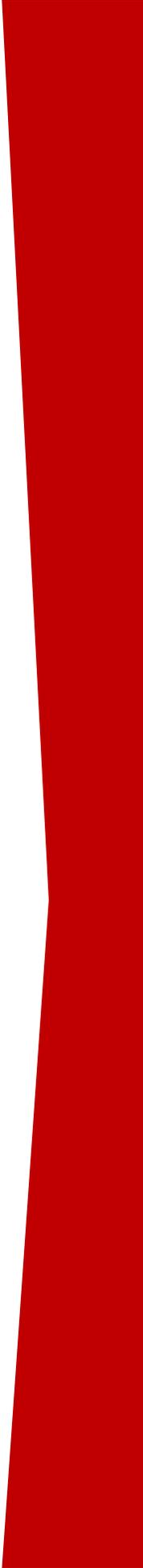


Figura 66. Espectros de absorción UV-Vis de las AuNPs de café a pH 9, sin funcionalizar (λ 530) y funcionalizadas (λ 437).

A thick, solid red vertical bar is positioned on the right side of the page, extending from the top to the bottom. It has a slight taper, being wider at the top and bottom.

Capítulo IX

Conclusiones y Recomendaciones

9. Conclusiones

- La síntesis química y caracterización por UV-Vis, TEM y AFM de las AuNPs muestra que se obtuvieron AuNPs de aproximadamente 20 nm, de forma esférica y monodispersas, las cuales pudieron ser funcionalizadas con DNA.
- Con la biosíntesis de AuNPs a partir de extractos de plantas se obtuvieron NPs de diferentes tamaños y formas que se lograron funcionalizar, igual que las NPs obtenidas por síntesis química, excepto las NPs obtenidas con extracto de café.
- El ANOVA mostró que no existen diferencias significativas entre las AuNPs sintetizadas químicamente y las biosintetizadas, por lo que se podrían usar indistintamente; sin embargo con la prueba de Fisher si se obtuvieron diferencias entre las AuNPs obtenidas.
- Los espectros obtenidos con la caracterización FT-IR de los extractos de nopal, cebolla, laurel, café y pera muestran que todos ellos contienen ácido málico. El extracto de café es uno de los más complejos, además del de pera y laurel.
- En este trabajo se demostró que el ácido málico presente en los extractos utilizados en la biosíntesis de las AuNPs, actúa como agente reductor y quizá el grupo amino como agente estabilizador.
- El pH del agente reductor tiene un papel esencial sobre el tamaño y distribución de las AuNPs, siendo el pH neutro el óptimo para obtener NPs dispersas y de hasta 30 nm de tamaño. Excepto para las AuNPs sintetizadas con extracto de café en las que se obtuvieron NPs de 100 nm, a pH 7.

- Como resultado de las diferentes caracterizaciones realizadas (UV-Vis, TEM y AFM), las AuNPs obtenidas con citrato a pH 7, laurel pH 6.5, nopal pH 5, cebolla pH 5, pera pH 7 y café pH 9, pudieron ser funcionalizadas ya que presentan una buena dispersión, estabilidad contra la agregación, forma y tamaño homogéneos.
- Las AuNPs de citrato a pH 7, laurel pH 6.5, nopal pH 5, cebolla pH 5, pera pH 7 y café pH 9, fueron funcionalizadas. Con excepción de las sintetizadas con extracto de café a pH 9, tal vez debido a que ya presentaban grupos funcionales en su superficie desde el momento de la síntesis. Las otras NPs se funcionalizaron correctamente.
- El análisis bioinformático de las secuencias obtenidas confirmó que el hongo en estudio es *Achlya* sp. y el usado como referencia para la secuenciación es *A. niger*, con un 85% y 99% de identidad respectivamente.

9.1 Recomendaciones

Se sugiere utilizar las sondas diseñadas en este trabajo en genosensores ambientales. Corroborar que se obtienen resultados similares utilizando AuNPs sintetizadas químicamente como las sintetizadas biológicamente y llevar a cabo otros análisis estadísticos que permitan definir de forma más precisa las diferencias entre las AuNPs obtenidas.

Capítulo X

Referencias



10. Referencias

- Ablica, G. P. (2013). Desarrollo de un Genosensor para detectar y cuantificar *Salmonella typhimurium* en agua. Proyecto Terminal de Licenciatura en Ingeniería Ambiental, UAM-Azcapotzalco, Mexico, D. F.
- Alivasatos, A. P., Johnsson, K. P., Peng, X., Wilson, T. E., Loweth, C. J., Bruchez, M. P. Jr, Schultz, P. G. (1996). Organization of 'nanocrystal molecules' using DNA. *Nature* 382: 609-611.
- Alvarado, S. (2012). Biosensor Electroquímico de Afinidad para la Detección de *E. coli* en agua. Proyecto Terminal de Licenciatura en Ingeniería Química, UAM-Azcapotzalco, México, D. F.
- Arcos, P. M. P., Ávila de Navia, S., Torres, S. (2005). Indicadores microbiológicos de contaminación de las fuentes de agua. *NOVA Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Colombia* 3: 69-79.
- Baeumner, A., Pretz, J., Fang, S. (2004). A Universal Nucleic Acid Sequence Biosensor with Nanomolar Detection Limits. *Anal. Chem.* 76: 888-894.
- Barroso, M., Freitas M., Oliveira M. B., De-Los-Santos-Álvarez N., Lobo-Castañón, M. J., Delerue-Matos, C. (2015). 3D-nanostructured Au electrodos for the event-specific detection of MON810 transgenic maize. *Talanta* 134:158-64.
- Bohren, C., Huffman, D. (1983) Absorption and scattering of light by small particles. Nueva York: Edit. John Wiley and Sons Inc.
- Brown, T., LeMay, H., Bursten, B. (2000). Química la Ciencia Central. Quinta edición, Prentice-Hall Hispanoamericana, S. A. pp. 1159.
- Campuzano, S., Pedrero, M., Pingarrón, J. M. (2014). Electrochemical genosensors for the detection of cancer-related miRNAs. *Anal. Bioanal. Chem.* 406: 27-33.
- Carralero, V., (2009). Preparación de biosensores enzimáticos e inmunosensores basados en electrodos modificados con nanopartículas de oro, Universidad Complutense de Madrid, pp. 8-17, 80-84.
- Castañeda, B. M. (2004). Microbiología Aplicada: Manual de Laboratorio. Ciudad de México, Universidad Autónoma Metropolitana, Azcapotzalco.
- Castañeda, M. T., Alegret, S., Merkoçi, A. (2007). Electrochemical Sensing of DNA Using Gold Nanoparticles. *Electroanalysis* 19: 743-753.
- Castro-Ortiz, P. B., Luna, P. V. M., Villalobos, P. R. (2007). Estado del Arte y Perspectivas del uso de biosensores ambientales en México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 23: 35-45.
- Cheang-Wong, J. C. (2005). Ley de Moore, Nanotecnología y nanociencias: síntesis y modificación de nanopartículas mediante la implantación de iones. *Revista Digital Universitaria*, 5-8.
- Chen, M., Chen, F., Yu, Y., Ji, J., Kong, F. (2008). Genetic Diversity of eukaryotic microorganisms in Lake Taihu, a large shallow subtropical lake in China. *Microb. Ecol.* 56: 572-583.

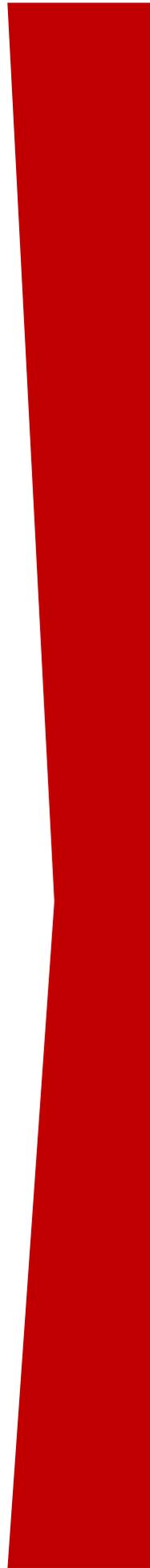
- Cotero, J., Martínez, E., Herrera, E., Cortéz, A., Sánchez, A., Martínez E., Flores, E.(2006). Desarrollo de un biosensor electroquímico de lectura directa de hibridaciones de ADN. *IBERSENSOR 2008*, 6 th Ibero-American Congress on Sensors. Memorias en extenso. pp. 430-434.
- De la Escosura, Muñiz, A., C. Parolo, F. Maranb, A. Merkoçi. (2011). Size-dependent direct electrochemical detection of gold nanoparticles: application in magneto immunoassays. *Nanoscale XX*: 1-8.
- De Marcos, Miñón J. (2013). Construcción de un Genosensor Ambiental Nanoestructurado para Detectar *Aspergillus sp.* en Muestras Contaminadas con Aceite Usado de Motores Diésel. Proyecto Terminal de la carrera en Ingeniería Ambiental, UAM-Azcapotzalco, México, D.F.
- Dellaporta, S., Wood, J., Hicks, J.. (1983). A plant DNA minipreparation. *Molecular Biology Reporter* 1: 19-21.
- Diamandis, E. P., Christopoulos T. K. (1991). The biotin-(Strept) Avidin System: Principles and Applications in Biotechnology. *Clinical Chemistry* 37: 625-636.
- Díaz, J., Fontal, B., Combita, D., Martínez, C., Corma, A. (2011). Síntesis de nano-Au soportados en óxidos metálicos y su actividad catalítica en reacciones de óxido reducción de CO. *Rev. LatinAm. Metal. Mat.* 33: 43-53.
- Doyen, M., Bartik, K., Bruylants, G. (2013). UV-Vis and NMR study of the formation of gold nanoparticles by citrate reduction: Observation of gold-citrate aggregates. *Journal of Colloid and Interface Science* 399: 1-5.
- Dhull, V., Gahlaut, Dilbaghi, N., Hooda V. (2013). Acetylcholinesterase Biosensors for Electrochemical Detection of Organophosphorus Compounds: A Review. *Biochemistry Research International* 2013: 1-18.
- Erdem, A. (2007). Nanomaterial-based electrochemical DNA sensing strategies. *Talanta* 74: 318-25.
- Erdem, A., Pividori, M. I., Lermo, A., Bonanni, A., Del Valle, M., Alegret, S. (2006). Genomagnetic assay based on label-free electrochemical detection using magneto-composite electrodes. *Sens. Actuators B.* 114: 591-598.
- Faraday, M. (1857). Experimental Relations of Gold (and Other Metals) to Light . *Philos. Trans. R. Soc. London* 147: 145-181.
- Gai, P., Yoshida, K., Shute, C., Jia, X., Walsh, M., Ward, M., Dreselhaus, M., Weertman, J., Boyes, E. (2011). Probing Structures of Nanomaterials Using Advanced Electron Microscopy Methods, Including Aberration Corrected Electron Microscopy at the Angstrom Scale. *Microscopy Research and Technique* 74: 664-70.
- Gilaki, M. (2010). Synthesis of Magnetic Al/Au Nanoparticles by Co-Reduction of Au³⁺ and Al³⁺ Metal Salts. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 13: 809-13.
- Haiss, W., Thanh, N. T. K., Aveyard, J., Fernig, D. G. (2007). Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-Vis spectra. *Anal. Chem.* 4215-21.

- Hernando, G. A. (2007). Nanotecnología y Nanopartículas Magnéticas: La Física actual en la lucha contra la enfermedad. *Rev. R. Acad. Cienc. Exact. Fís. Nat.* 101: 321-27.
- Hernández, G., Prin, J. L., Rojas, G. B. (2010). El microscopio electrónico como herramienta para el estudio de los polímeros y otros materiales. *Revista Iberoamericana de Polímeros.* 11: 258-273.
- Hostetler, M. J., Wingate, J. E., Zhong, C. J., Harris, J. E., Vachet, R. W., Clark, M. R., Londono, J. D., Green, S. J., Stokes, J. J., Wignall, G. D., Glish, G. L., Porter, M. D., Evans, N. D., Murray, R. W. (1998). Alkanethiolate Gold Cluster Molecules with Core Diameters from 1.5 to 5.2 nm: Core and Monolayer Properties as a Function of Core Size. *Langmuir* 14:17-30.
- Hussain, M., Agnihotri, A., Siedlecki, C. (2005). AFM imaging of ligand binding to platelets integrin alpha IIb beta3 receptors reconstituted into planar lipid bilayers. *Langmuir* 21: 6979-6986.
- Jentoft, F. C. (2012). Electronic Spectroscopy: Ultraviolet-Visible and Near-IR Spectroscopy, F.C., Characterization of Solid Materials and Heterogeneous Catalysts: From Structure to Surface Reactivity, Eds. M. Che, J. C. Védrine, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, pp. 89-147.
- Jentoft, F. C. (2009). UV-vis-NIR Spectroscopy in Catalysis: Theory, Experiment, Analysis, and Application under Reactive Conditions, *Advances in Catalysis* 52: 129-211.
- Kimling, J., Maier, M., Okenve, B., Kotaidis, V., Ballot, H., Plech, A. (2006). Turkevich Method for Gold Nanoparticle. *J. Phys. Chem. B.* 110: 15700-15707.
- Kumar, S., Peter, Y., Nadeau, J. (2008). Facile biosynthesis, separation and conjugation of gold nanoparticles to doxorubicin *Nanotechnology* 19: 1-10.
- Kumar, D., Mennan, B. J., Mutreja, I., D'sa, R., Dixon, D. (2012). Controlling the size and size distribution of gold nanoparticles: A design of experiment study. *International Journal of Nanoscience* 11: 1-7.
- Liz-Marzán, L. M. (2013). Gold nanoparticle research before and after the Brust-Schiffrin method. *Chem. Commun. (Camb).* 49: 16-18.
- Mendoza, G. G. (2011). Detección electroquímica de *E.coli*, mediante un biosensor basado en nanoestructuras. Proyecto terminal de Licenciatura, UAM-Azcapotzalco, México, D. F.
- Mirkin, C. A., Letsinger, R. L., Mucic, R. C., Storhoff, J. J. (1996). A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials. *Nature* 15: 607-609.
- Morrison, R., Boyd, N. (1987). Organic Chemistry. Quinta Edición. Massachusetts, E.U.A.
- Narayanan, K. B., Sakthivel, N. (2011). Green synthesis of biogenic metal nanoparticles by terrestrial and aquatic phototrophic and heterotrophic eukaryotes and biocompatible agents. *Advances in Colloid and Interface Science* 169: 59-79.
- Navarrete Salgado, N., Contreras Rivero, G., Elías Fernández, G., Rojas Bustamante M. L. (2004). Situación de *Girardinichthys viviparus*, especie que se encuentra en peligro de extinción. *Revista de Zoología Universidad Nacional Autónoma de México* 15: 1-6.

- Nguyen, D. T., Kim, D. J., Kim, K. S. (2011). Controlled synthesis and biomolecular probe application of gold nanoparticles. *Micron*. 42: 207-227.
- Nyeon-Sik, E., Se-Hyuk, Y., Dae-Hyuk, K., Hak-Rin, K., Shin-Won, K. (2010). Enhancement of sensitivity using gold nanorods—Antibody conjugator fordetection of *E. coli O157:H7*. *Sensors and Actuators Bio Chemical* 143: 784-788.
- Park, S.-J., Lazarides, A. A., Mirkin, C. A., Letsinger, R. L. (2001). Directed Assembly of Periodic Materials from Protein and Oligonucleotide-Modified Nanoparticle Building Blocks. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 40: 2909-2912.
- Philip, D. (2010). Green synthesis of gold and silver nanoparticles using Hibiscus rosa sinensis. *Physica E*. 42: 1417-1424.
- Pumera, M., Castañeda, M. T., Pividori, M. I., Eritja, R., Merkoçi, A., Alegret, S. (2005). Magnetically trigged direct electrochemical detection of DNA hybridization using Au67 quantum dot as electrical tracer. *Langmuir*. 21: 9625-9629.
- Rico-Moctezuma, A., Vilchis-Nestor, A. R., Sánchez-Mendieta, V., Ávalos-Borja, M., Camacho-López. (2010). Biosíntesis de nanoparticulas de oro mediante el extracto de *Opuntia ficus indica*. *Superficies y Vacío* 23: 94-97.
- Rolim, T., Cancino, J., Zucolotto, V. (2015). A nanostructured genosensor for the early diagnosis of systemic arterial hypertension. *Biomed Microdevices*. 17: 9911-9921.
- Saifuddin, N., Wong, C., Yasumira, N. (2009). Rapid Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using culture Supernatant of Bacteria with Microwave Irradiation. *E-Journal of Chemistry* 6: 61-70.
- Santos, M. S., Souza, E. S. S., Junior, R. M., Talharim. M., Souza, J. V. (2010). Identification of fungemia agents using the polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *Braz J Med Biol Res*. 43: 712-716.
- Schmittgen, T. D., Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C (T) method. *Nat Protoc*. 3: 1101-1108.
- Shankar, S., Rai A., Ankamwar B., Singh A., Ahmad A., Sastry M. (2004). Biological synthesis of triangular gold nanoprisms. *Nat. Mater*. 3: 482-488.
- Solís-Ramos, L. Y., Andrade-Torres, A. (2005). ¿Qué son los marcadores moleculares? *La Ciencia y el Hombre Universidad Veracruzana XVIII*: 41-46.
- Skoog, D., Holler, J., Crouch, S. (2006). Principios de análisis instrumental. 6a. edición. Ed. Mc Graw-Hill Co. México.
- Stadtländer, C.T.K-H. (2007). Scanning Electron Microscopy and Transmission Electron Microscopy of Mollicutes: Challenges and Opportunities. Editado por A. Mendez-Vilas y J. Diaz. *FORMATEX (Modern Research and Educational Topics in Microscopy)* pp. 122-131.
- Sun, Y., Xia, Y. (2002). Shape-Controlled Synthesis of gold and silver nanoparticles. *Science* 298: 2176-2179.
- Taton, T. A., Mirkin, C. A, Letsinger, R. L. (2000). Scanometric DNA Array Detection with Nanoparticle Probes. *Science* 289: 1757-1760.

- Thaxton, C. S., Georganopoulou, D. G., Mirkin, C. A. (2006). Gold nanoparticle probes for the detection of nucleic acid targets. *Clin. Chim. Acta* 363: 120-126.
- Togawa, T., Tamura, T., Oberg, A. P. (1997). Chemical Measurement. Chapter 7. Biomedical Transducers and Instruments, 366p. Ed. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Tokonami, S., Yamamoto, Y., Shiigi, H., Nagaoka, T. (2012). Synthesis and bioanalytical applications of specific-shaped metallic nanostructures: A review. *al Chim Acta* 24: 76-91.
- Turkevich, P., Cooper, S., Hilier, J. (1951). A Study of the Nucleation and Growth Process in the Synthesis of Collidal Gold. *J. Discuss. Faraday Soc.* 11: 55-75.
- Torsi, L. (2013). Special issue on organic electronic bio-devices. *Biosensors (Basel)*. 28: 116-119.
- Upadhyayula, K., Venkata, K. (2012). Functionalized gold nanoparticle supported sensory mechanisms applied in detection of chemical and biological threat agents. *Analytica Chimica Acta* 715: 1-18.
- Wang, J. (2003). Nanoparticle-based electrochemical DNA detection. *Analytica Chimica Acta* 500: 247-257.
- Wang, Q., Zhang, H., Guerrette, S., Chen, J., Mazurek, A., Wilson, T., Slupianek, A., Skorski, T., Fishel, R., Greene, M. I. (2001). Adenosine nucleotide modulates the physical interaction between hMSH2 and BRCA1. *Oncogene*. 2: 4640-4649.
- Wang, M., Wang, Y., Wang, A., Song, Y., Ma, D., Yang, H., Ma, Y., Lai, R. (2009). Five novel antimicrobial peptides from skin secretions of the frog, *Amolops loloensis*. *Comp Biochem Physiol Biol*. 155: 72-76.
- Wei, Yanhu, I, Shuangbing, H., Jiwon, K., Siowling, S., Bartosz, A. Grzybowski. (2010). Photoswitchable Catalysis Mediated by Dynamic Aggregation of Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* 132: 11018-20.
- White, T., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for Phylogenetics. En *PCR Protocols: a guide to methods an applications*.
- Wolfgang, H., T.K.T. Nguyen, Y. Aveyard, D. G. Ferning. (2007). Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-Vis spectra. *Am.Chem.Soc. Analytical Chemistry* 79: 4215-4221.
- Yamanaka, H., Alegret, S., Pividori, M. I., Pupim F. A. (2009). *Biosensores Electroquímicos*. Barcelona: Letra Boreal.
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya I., Cutcutache, I., Rozen, S., Madden, T. (2012). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 13: 2-11.
- Zanella, R. (2012). Metodologías para la síntesis de nanopartículas: Controlando forma y tamaño. *Mundo Nano* 5: 69-81.

ANEXOS





Sociedad Mexicana de Genética AC
Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias
Universidad de Colima

Otorgan la presente
CONSTANCIA
A

CHÁVEZ-SANDOVAL BE, CASTAÑEDA-BRIDNES MT, GARCÍA-FRANCO F, MARTÍNEZ-GARCÍA M,
CAMPOS-CONTRERAS JE, ALVARADO-VANEGAS S, GALINDO-PÉREZ EJ Y ROSAS OSORIO JC

POR LA PRESENTACIÓN DE SU TRABAJO
**IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LOS MICROORGANISMOS *Aspergillus* sp. Y
Achlya sp. PARA EL DISEÑO DE SONDAS ESPECÍFICAS EN GENOSENSORES**

CONGRESO NACIONAL DE GENÉTICA 2013
Manzanillo, Colima del 2 al 4 de octubre de 2013

M. EN C. INÉS VESILINO VARGAS
DIRECTORA DE COORDINACIÓN Y VINCULACIÓN
INIFAP COLIMA

M.A. JOSÉ EDUARDO HERRÁNDEZ NAVAS
UNIVERSIDAD DE COLIMA

DR. PEDRO RAMÍREZ VAQUERO OLIVERA
PRESIDENTE
SOCIEDAD MEXICANA DE GENÉTICA

Este documento quedó registrado en la Dirección General de Educación Continua en
Libro 3, hoja: 93 No. de registro: 5171 Calif. AC
Colima, Col., México; del 04 de octubre de 2013.
Registro STPS: R6UCO-6209190013





Constancia Bio-inspired Nanotechnologies for Biosensing, Sitges, España



Action TD1003

Bio-inspired Nanotechnologies for Biosensing,
Sitges, May 16, 2013.

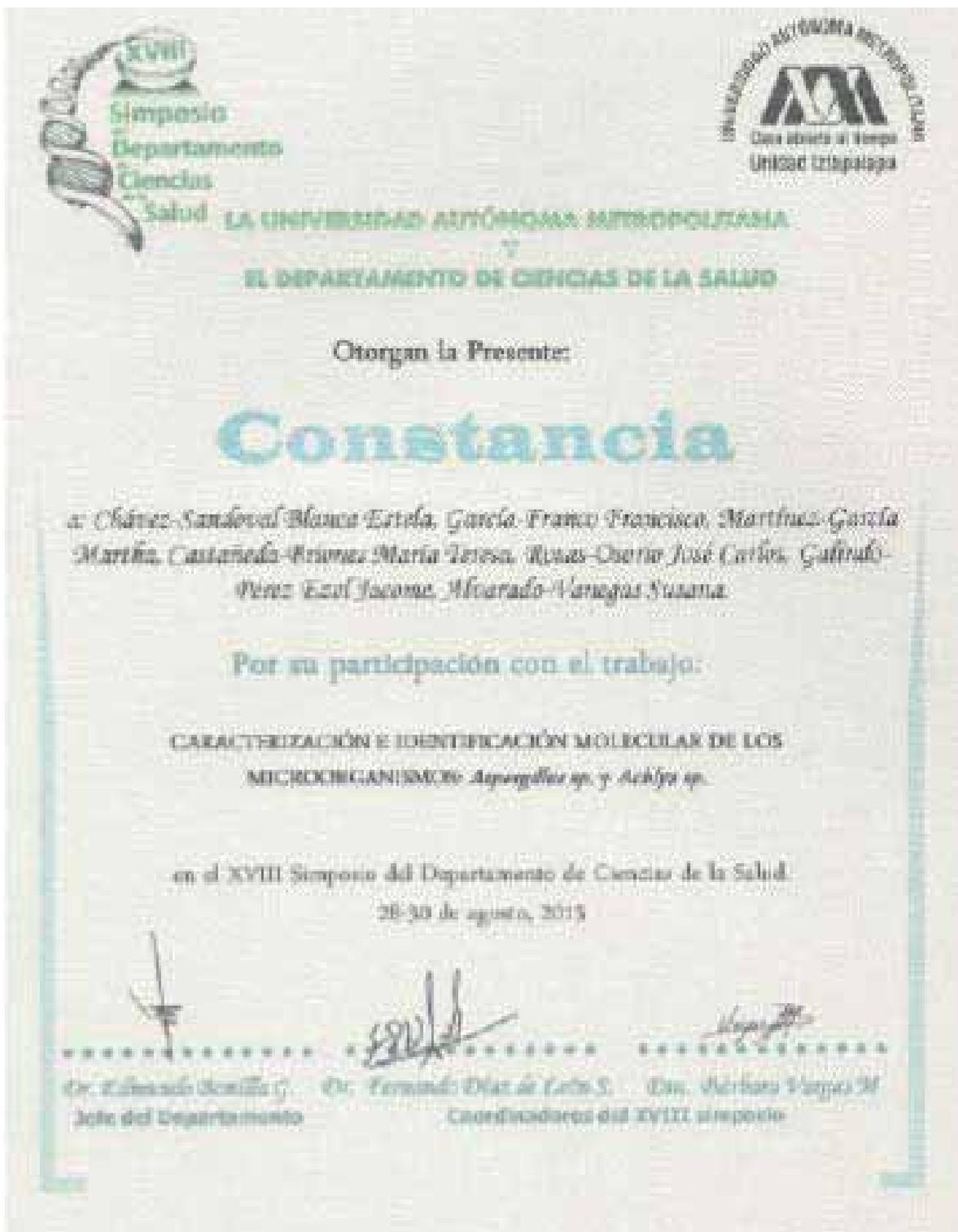
This is to certify that

Dr. María Teresa Castañeda Briones participated to the Workshop held on the 16 May 2013, presenting a work entitled "Voltammetric Detection of Drug by using Biosynthesized Gold Nanoparticles", authors: Blanca E. Chávez-Sandoval, Georgina Alarcón Angeles, Francisco García- Franco, Ana Laura Pérez-Amado, Julieta De Marcos-Miñón, María Teresa Castañeda-Briones.

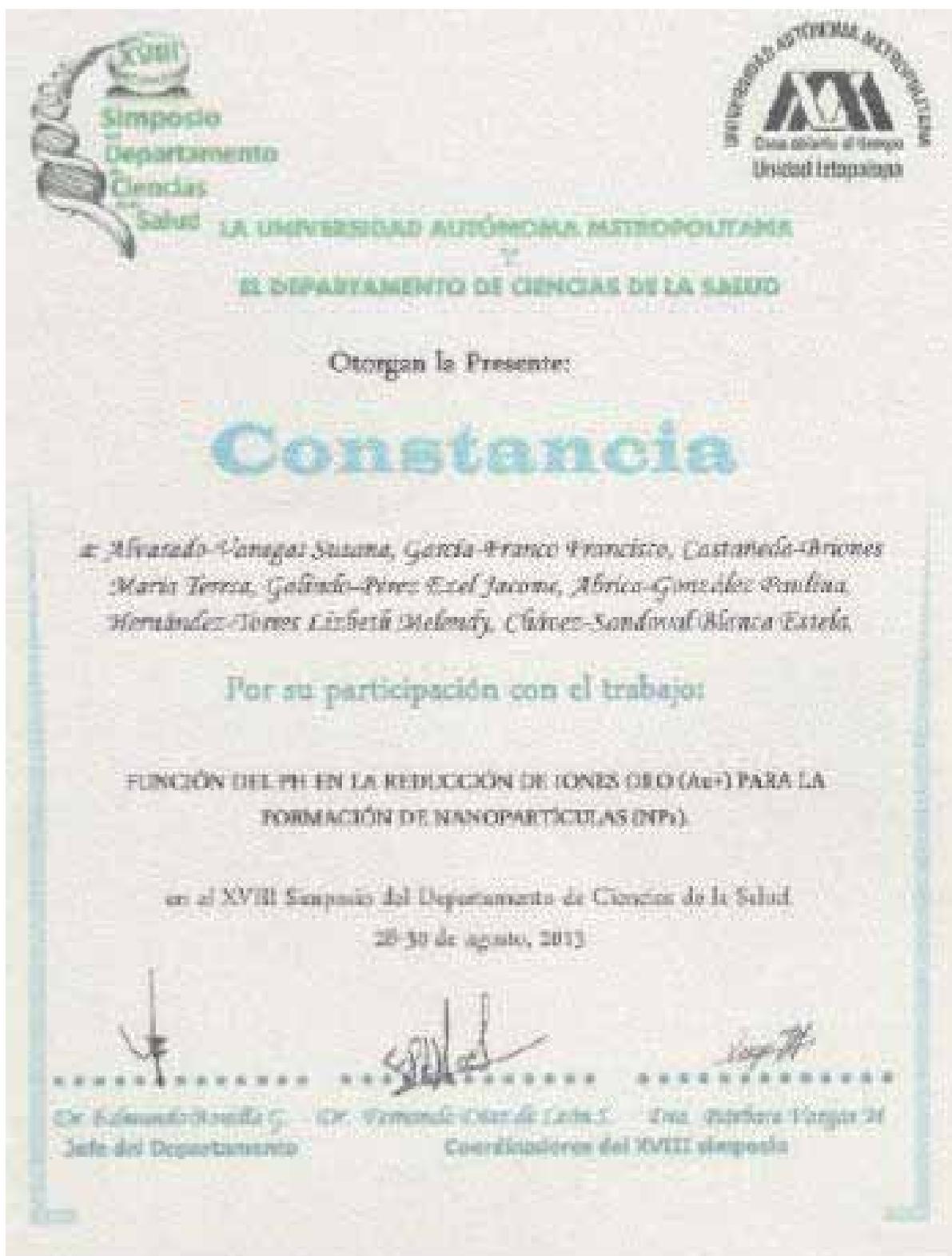
Sincerely

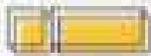
María Minunni
Workshop Chair

Constancia XVIII Simposio de Ciencias de la Salud UAM-Iztapalapa



Constancia XVIII Simposio de Ciencias de la Salud UAM-Iztapalapa





SINSIA
Sistema Nacional de Investigación
del Sector Científico y Tecnológico

La Universidad Autónoma Metropolitana otorga la presente

CONSTANCIA

a: Blanca Estela Chávez Sandoval, Susana Alvarado Vanegas,
Karina Peralta Cirilo, Francisco García Franco y María Teresa Castañeda

por la ponencia: Síntesis biológica y caracterización de nanopartículas de oro, utilizando extracto de epuntilla SP, para reducir iones Au

En el 1er. Simposio Internacional de Innovación en Sistemas Industriales y Ambientales llevado a cabo online el 26 y 27 de Noviembre de 2012 en la Ciudad de México.

Blanca Estela Chávez Sandoval

Dr. Luis Enrique Noreña Franco
Investigador Principal de Ciencias Básicas e Ingeniería

Dra. Brenda Bracho Díaz
Directora del Simposio



AMM **FUNIBER** **CENSA** **UNINI** **INSTITUTO TECNOLÓGICO Y DE INVESTIGACIONES** **UNAM**



CERTIFICATE OF PRESENTATION

We hereby confirm that

M.T. Castañeda Briones

Presented the following poster

Construction of a gold nanoparticles-based genosensor for detection of Salmonella typhimurium in environmental samples

at

Biosensors 2014

27-30 May, 2014, Melbourne, Australia

FOR AND ON BEHALF OF

