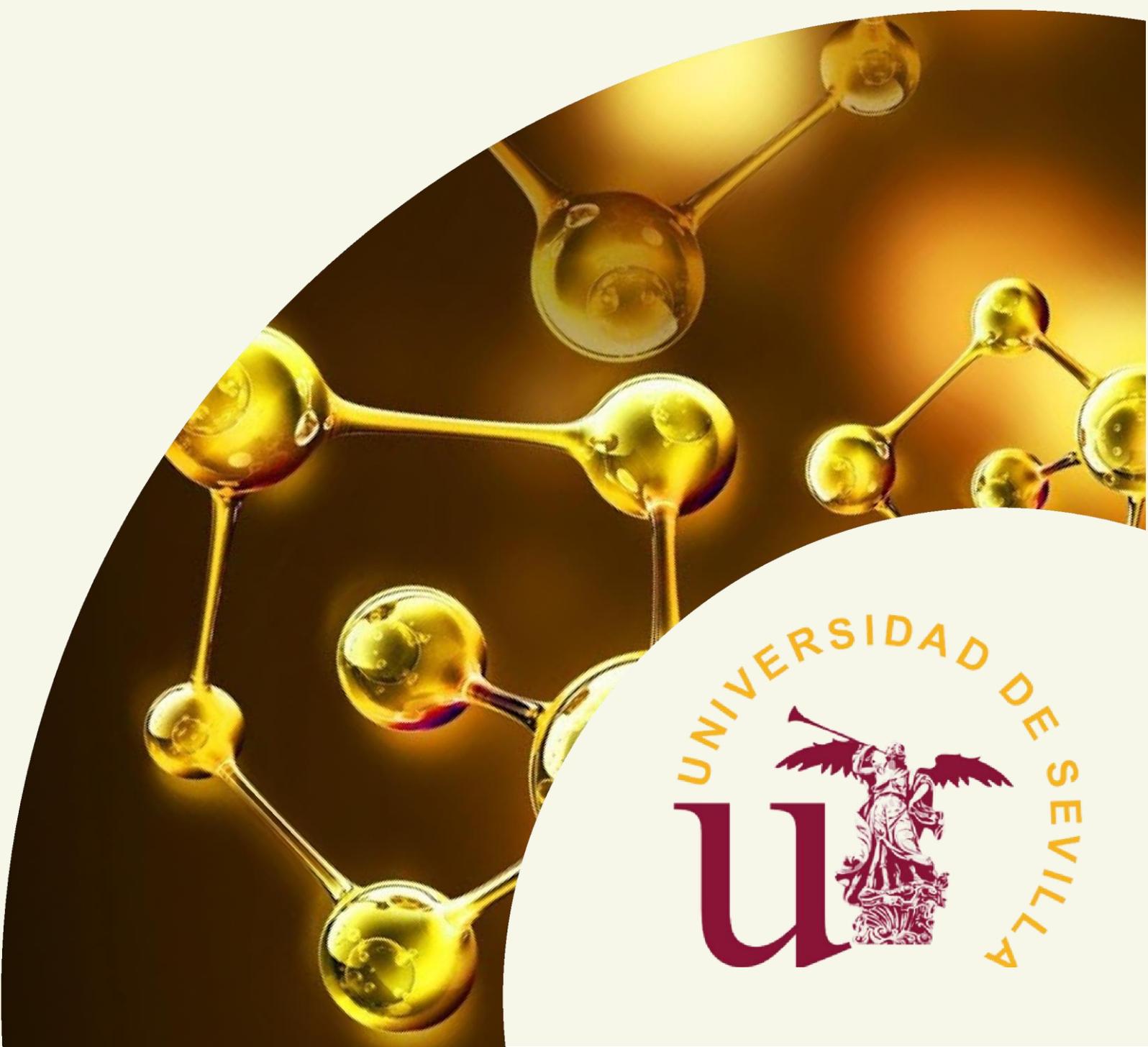


# NANOPARTÍCULAS DE ORO PARA DETECTAR LISOZIMAS EN PACIENTES CON LEUCEMIA

**Natividad Álvarez Calvo de León**

Facultad de Farmacia

Universidad de Sevilla





UNIVERSIDAD DE SEVILLA. FACULTAD DE FARMACIA.

Grado en Farmacia.

Trabajo Fin de Grado. Revisión bibliográfica.

# **NANOPARTÍCULAS DE ORO PARA DETECTAR LISOZIMAS EN PACIENTES CON LEUCEMIA.**

**Alumna: Natividad Álvarez Calvo de León.**

**Tutor: Rafael Prado Gotor.**

Departamento Química Física.

*Sevilla, a 5 de Julio de 2022.*

## **RESUMEN.**

La Biotecnología es la ciencia en la que se trabaja con la materia en unas dimensiones de 1-100 nm. En el transcurso del tiempo, desde el discurso de Feynman en 1959, el campo de la biotecnología ha producido multitud de avances en el ámbito de la tecnología y la investigación médica y farmacéutica entre otros.

El oro es uno de los metales más utilizados a lo largo de la historia de la humanidad, tanto en su tamaño macroscópico como en el nanométrico presenta variadas propiedades a las que se ha dado uso tanto con fines médicos como ornamentales.

Desde hace años las nanopartículas de oro se han convertido en las protagonistas por multitud de razones. Su síntesis fácil y económica, sus propiedades fototérmicas, químicas y ópticas han sido aplicadas para el direccionamiento de fármacos, así como el uso como marcadores y biosensores entre otros.

Las lisozimas son enzimas presentes en distintos fluidos biológicos. Se han llevado a cabo distintos estudios a partir de los cuales se determina una relación entre la alta aparición de lisozimas en orina y suero, y pacientes con leucemia. Ante estas evidencias se establece la posibilidad de utilizar la detección de lisozimas como diagnóstico de esta enfermedad.

Basándose en la gran manejabilidad de las nanopartículas de oro y sobre todo en una de sus características más preciadas, la resonancia de plasmón de superficie, se ha descubierto y patentado un método en el que se usan nanopartículas de oro para detectar lisozimas en orina en pacientes con leucemia. Esta investigación supone un importante avance con numerosas ventajas frente a los métodos actuales de detección de la enfermedad. Se trata de un método muy rentable económicamente y que proporciona rapidez y sencillez en la determinación, lo que conlleva asimismo a una mayor accesibilidad a multitud de pacientes sin necesidad de emplear grandes equipos, ni personal especializado, ni muestras de suero sanguíneo.

Palabras clave: biotecnología, nanopartículas de oro, resonancia de plasmón de superficie, lisozima, leucemia.

1.	INTRODUCCIÓN.....	5
1.1.	NANOPARTÍCULAS.....	5
1.1.1.	Nacimiento de la nanotecnología.....	5
1.1.2.	Síntesis.....	7
1.1.3.	Aplicaciones.....	9
1.2.	NANOPARTÍCULAS DE ORO.....	10
1.2.1.	El oro que más reluce.....	10
1.2.2.	Pasado, presente y futuro.....	12
1.3.	LISOZIMAS.....	14
1.3.1.	Su lugar en la historia.....	14
1.3.2.	Características.....	15
1.4.	LEUCEMIA.....	15
1.4.1.	Descripción.....	15
1.4.2.	Situación actual.....	16
2.	OBJETIVOS DE LA REVISIÓN.....	17
3.	METODOLOGÍA.....	17
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	18
4.1.	Antecedentes históricos.....	18
4.2.	Resonancia del plasmón de superficie.....	20
4.3.	Aplicaciones de las Nanopartículas de oro.....	21
4.4.	Lisozimas y leucemia.....	24
4.5.	Detección de lisozimas con nanopartículas de oro.....	25
4.6.	Caracterización de AuNPs.....	28
4.7.	Ventajas frente al sistema de obtención actual.....	29
5.	CONCLUSIONES.....	30
6.	BIBLIOGRAFÍA.....	31

# 1. INTRODUCCIÓN.

## 1.1. NANOPARTÍCULAS.

### 1.1.1. Nacimiento de la nanotecnología.

Aunque podríamos considerar que las nanopartículas surgen con el Big Ban con la formación de innumerables partículas de distintos tamaños, es en las últimas décadas cuando ha tomado una mayor importancia. Fue Richard Feynman, ganador del Premio Nobel de Física en el año 1965, cuya ponencia "*Plenty of Room at the Bottom*" en la American Physical Society en el año 1959 introdujo en forma de predicción que en un futuro haríamos cosas con mayor control y precisión si las construíamos de abajo hacia arriba (bottom-up), refiriéndose con esto a un trabajo a nivel molecular. (Stylios, 2013)

La palabra "nano" es un prefijo que usamos para cambiar el orden de la magnitud y compararla con otra dada y fijada por el Sistema Internacional (SI), al igual que usamos otros como "pico-", "micro-", "mili-", etc. En este caso "nano-" se corresponde con un valor de  $10^{-9}$ m (metros) Pero... ¿qué es la nanotecnología? Encontramos numerosas definiciones en la bibliografía, una forma simple de definirla sería: la ciencia que investiga y manipula la materia a un nivel entre 1 y 100 nm.

A través de la nanotecnología se han creado nanomateriales a partir de modificaciones en moléculas ya existentes. Esto supone la apertura de un campo de investigación muy amplio que conlleva una revolución en el ámbito científico, tecnológico e industrial. (Editorial Etecé, 2020) A esta escala, las partículas poseen características y propiedades totalmente distintas a las de los materiales a los que dan lugar, es decir, a escala macroscópica. Este es el punto más importante de las nanopartículas como se verá a lo largo del presente Trabajo de Fin de Grado.



**Figura 1.** Recreación de una intervención a nivel molecular gracias a la Nanotecnología. (Nanotecnología - Concepto, función, aplicaciones y ejemplos, n.d.)

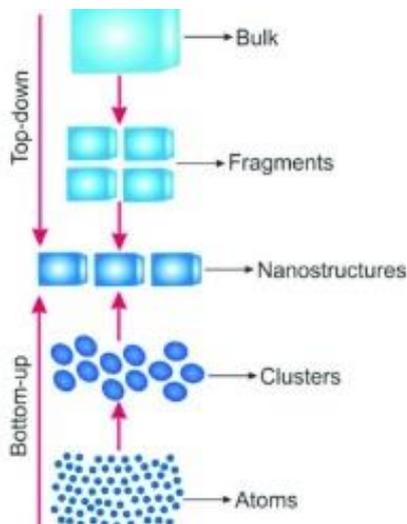
Aunque Feynman es considerado el padre de la nanotecnología y Norio Taniguchi profesor de la Tokio University of Science acuña el termino nano-tecnología en 1974, es el ingeniero Kim Eric Drexler el que con su libro *“Engines of Creation: The Coming Era of Nanotechnology”* en 1986 quien difunde y asienta las bases de lo que conocemos en la actualidad sobre esta ciencia. Drexler toma como inspiración dos puntos principales: La conferencia de R. Feynman por un lado y la observación de las células usando máquinas moleculares nanométricas que con gran precisión ensamblan materia a la misma vez que se autorepican (sería el caso de los ribosomas, por ejemplo).

Más tarde en 1991 obtuvo el primer doctorado en Nanotecnología por el Massachussets Institute of Technology, el cual un año después fue revisado y publicado en su libro *“Nanosystems: Molecular Machinery Manufacturing and Computation”*. A lo largo de las últimas décadas sus ideas han sido duramente criticadas por no tener un fundamento científico en base a las condiciones actuales de la ciencia sino más bien a una visión futura de la Nanotecnología. Lo cierto es que, a pesar de las polémicas, la idea principal de la nanotecnología según Drexler se sigue sosteniendo. (Hernández García, 2014)

### 1.1.2. Síntesis.

La síntesis de nanopartículas es un punto fundamental ya que según el tamaño de las mismas estas poseerán unas características y propiedades ópticas, químicas, magnéticas y electrónicas distintas a las de las mismas partículas en una escala mayor. Por lo tanto, este proceso es la clave para seguir investigando en nuevas propiedades y en consecuencia en futuras aplicaciones en el campo científico. (Beer and Singh, n.d.)

Hay dos grupos de técnicas para llevar a cabo la síntesis: Bottom-Up (de abajo a arriba) y Top-Down (de arriba hacia abajo).



**Figura 2.** Esquema de las técnicas de síntesis de las Nanopartículas. (Introducción a la nanotecnología – Asociación de Estudiantes de Biociencias de España, n.d.)

En la Top-Down partimos del material a gran escala y tendremos que ir degradándolo hasta llegar al tamaño de partícula que buscamos, suelen ser métodos físicos, el principal problema ante el que nos encontramos en este grupo de técnicas es que las partículas no se obtienen con una precisión perfecta en cuanto a su estructura superficial lo que afecta directamente a las propiedades de las nanopartículas. Además, es un proceso económicamente costoso debido a que la mayoría de la instrumentación es compleja. (Beer and Singh, n.d.)

Entre los métodos más destacados se encuentran:

- La molienda. Por medio de molinos de alta eficiencia y la posterior clasificación por medios físicos, recuperando las partículas de tamaño nanométrico.
- Implantación de iones en un sólido al que se le cambiarán las propiedades físicas y químicas, así como las características estructurales.
- Evaporación térmica de un material que se deposita sobre una lámina fría, llevando un control en el crecimiento para no modificar las características morfológicas de la misma.
- Depósito químico en fase de vapor, es la descomposición en compuestos volátiles que darán lugar a las nanopartículas sobre la superficie de un sólido.
- Clusters gaseosos. Usando un láser pulsado de alta potencia se obtienen vapores atómicos que son transportados en un gas inerte para después depositarlos en un sustrato. (Zanella, 2021)

Sin duda son las técnicas que abarcan la aproximación Bottom-Up las que más se usan. En los últimos años se ha comprobado que se abren infinitas posibilidades a la materialización de máquinas moleculares que lleven a cabo determinadas funciones específicas. (Balzani, 2005) Los siguientes métodos son algunos de los más usados:

- Sol-Gel. Proceso químico en el que tiene lugar reacciones de hidrólisis y policondensación formando una dispersión coloidal en la que se obtendrá un gel tras una lenta polimerización.
- Irradiación con microondas. Es un método uniforme, rápido y efectivo en el que se producen nanopartículas con una baja dispersión de tamaño.
- Método Coloidal. Disolvemos en una fase continua una sal del precursor metálico, un reductor y un estabilizante que actuará como tal y/o reductor.
- Reducción fotoquímica y radioquímica. La Fotólisis usa energías por debajo de los 60eV y la Radiólisis entre 103 y 104 eV. Producen nanopartículas a baja temperatura, en estado sólido y de gran pureza.

- Uso de Dendrímeros. Alterando la naturaleza de los dendrímeros mediante la modificación de sus grupos terminales con grupos carboxilos, hidróxidos...
- Síntesis Solvotermal. Un precursor metálico disuelto en un líquido, normalmente agua, se calienta por encima de su punto de ebullición generando una presión mayor a la atmosférica. (Zanella, 2021)

### 1.1.3. Aplicaciones.

Son muchos los campos relacionados con el estudio y desarrollo de las nanopartículas, el auge que está teniendo la nanotecnología en las últimas décadas está conllevando a una amplificación de su potencial. Por nombrar algunas de sus aplicaciones actuales serían:

- Como antiaglomerantes que mantienen las propiedades de flujo de los polvos en alimentos como purés o sopas instantáneas. Es el caso de nanopartículas de sílice amorfa, conocidas como el aditivo E551.
- Nanopartículas de óxido de zinc y dióxido de titanio son usadas en cosmética como filtros solares. Son incoloras y dispersan la luz ultravioleta de manera más eficaz que otras partículas de mayor tamaño. (Heiligtag and Niederberger, 2013)
- La Diabetes Mellitus es una de las enfermedades con mayor incidencia hoy día, un paciente que la padece tiene una concentración de vapor de acetona de 1.8-10 ppm mientras que en un paciente sano gira por debajo de 0.8ppm. A través de la funcionalización de nano hilos de  $\text{In}_2\text{O}_3$  con nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  se ha obtenido una gran sensibilidad y selectividad en la detección del vapor de acetona.

No sólo en la detección de la diabetes se usan NPs, igualmente en el tratamiento tanto oral como a través de sensores de glucosa (acoplados a sistemas de liberación de insulina). Esta insulina va encapsulada al haber modificado la estructura de la nanopartícula y será liberada en respuesta a los niveles de glucosa plasmática. (Soler Beatty and Soler Beatty, n.d.)

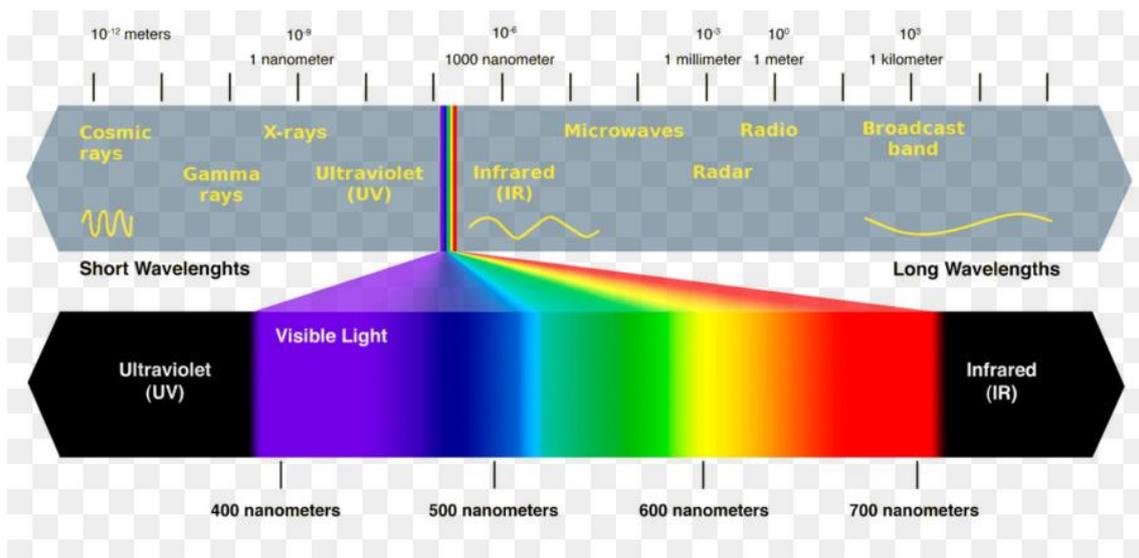
- En la industria textil ya se utilizan nanopartículas de plata (AgNPs) como bactericidas para evitar malos olores, de hecho. A pesar de que la plata no es tóxica para el ser humano si lo es para los organismos acuáticos y aún se está investigando la posibilidad de que no sea tan fácil su desprendimiento en cada lavado, el ácido tánico podría ser clave en ello. (INQUIMAE - Investigación - Nanotecnología, n.d.)(Richardson et al., 2022)

## **1.2. NANOPARTÍCULAS DE ORO.**

### **1.2.1. El oro que más reluce.**

El metal máspreciado en la sociedad no sólo tiene una importancia por su valor económico y estético, sus increíbles propiedades químicas, físicas y biológicas elevan su interés en la actualidad en distintos campos como son el farmacéutico, médico y tecnológico entre otros. Dentro de las nanopartículas todas estas interesantes características van de la mano con su tamaño, que será clave a la hora de sintetizarlas. Por otro lado, la facilidad que presentan a la hora de su funcionalización con distintos tipos de ligandos es útil para sus distintas aplicaciones en el diagnóstico y tratamiento de infinidad de patologías.

Las nanopartículas de oro son capaces de irradiar calor después de haber sido estimuladas con una fuente de calor concreta a una frecuencia determinada, esta propiedad fototérmica les confiere la capacidad de ser potencialmente muy eficaces en la terapia contra el cáncer, ya que podrían ser direccionadas hacia un tumor y destruirlo. (Huang et al., 2006) También pueden irradiar luz (Mie Scattering) permitiendo realizar un diagnóstico por imágenes, gracias a la que es sin duda la característica más especial de las AuNPs, la resonancia del plasmón de superficie, que una vez más va a depender del tamaño de la nanopartícula, así como de su forma. Las nanopartículas de oro se mueven dentro del rango de luz visible. Conforme aumenta el tamaño va variando la longitud de onda del espectro visible que absorben y por tanto cambia el color de la luz que reflejan, lo que otorga a las AuNPs de una propiedad ideal para su uso en determinaciones colorimétricas. Es decir, son un excelente biosensor, cualidad que va a ser el gran pilar de la revisión bibliográfica que se presenta.



**Figura 3.** Esquema con longitudes de onda del espectro de luz visible. (La Luz, Espectro Visible, Espectro Electromagnético imagen png - imagen transparente descarga gratuita, n.d.)

La toxicidad que pueden presentar las nanopartículas de oro (AuNPs) siempre va a depender de distintos aspectos: la toxicidad intrínseca de la partícula, los factores dependientes de la administración en sí como son la dosificación, la vía de administración, la duración a la exposición...y por último la idiosincrasia del individuo expuesto. En estudios realizados se ha comprobado que la toxicidad de la partícula en sí misma está relacionada con el tamaño: a mayor tamaño de la partícula su actividad biológica disminuye. No sólo el tamaño influirá, también la forma de las partículas, siendo las esféricas las de menor toxicidad. Actualmente hay gran controversia pues, aunque estudios in vitro han determinado su inocuidad y su gran biocompatibilidad, existen otros en los que la respuesta citotóxica es clara en determinadas circunstancias. Lo cierto es que, aunque no hay estudios concluyentes en cuanto a la toxicidad de las AuNPs, cabe esperar que la supuesta toxicidad sea debida a los ligandos más que a la partícula en sí, ya que según *Connor y col.* los núcleos de oro son inertes y no tóxicos, (Connor et al., 2005). Es necesario profundizar en los estudios hasta conseguir unos resultados más esclarecedores. (Mateo et al., 2013)

### 1.2.2. Pasado, presente y futuro.

El uso del oro a nivel medicinal data de tiempos inmemoriales; ya en el 2500 a.C. se usaba en la medicina china y en el S.XIII se tienen referencias de la preparación de *aurum potabile*, es decir, un oro potable para ser ingerido que se hacía introduciendo placas de oro caliente en la copa de vino. Es dudoso que tuviese algún tipo de partículas de oro, pero lo cierto es que durante los siguientes siglos se siguió usando, incluyendo a Paracelso en el S.XVI que lo recomendaba “para la melancolía porque alegraba el corazón”. Desgraciadamente el alquimista no dejó claro cuál era el método de preparación de este *aurum potabile* por lo que no podemos saber con seguridad si contenía realmente oro y de hacerlo, si estaba en una forma activa. (Higby, 1982)

A principios del S.XVII el oro aparece en la *London Pharmacopoeia of 1618*, en una lista de componentes para determinar el grado de pureza de distintas sustancias y preparaciones descritas en el Formulario y en la Materia Medica. (By and Hunter Lane, n.d.)

En 1929 Jacques Forestier fue pionero en un tratamiento de la artritis reumatoide con sales de oro, la inflamación remitía, así como los dolores y el estado en general, pero en pacientes de larga duración no eran capaces de reconstruir los elementos anatómicos parcialmente destruidos. Los efectos secundarios iban desde reacciones locales con fiebre hasta reacciones sistémicas más graves. Pero se siguió investigando y en los años 40 se comenzó a inyectar soluciones de tiomolato sódico de oro con gran efectividad. (Healy et al., 2009) Las AuNPs, su gran biocompatibilidad, la facilidad de su síntesis y conjugación con distintos ligandos, su poder antioxidante que permite combatir la formación de radicales libres y por el efecto antiangiogénico al unirse al factor de crecimiento endotelial vascular, son clave una vez más en el tratamiento de una patología como la artritis reumatoide. Su unión al medicamento Tocilizumab y a un complejo con Hialuronato ha llevado a obtener magníficos resultados en el tratamiento tanto in vitro como in vivo. (Lee et al., 2014)

En 1987 Masatake Haruta, profesor de la Tokio Metropolitan University and Dalian Institute of Chemical Physics descubrió que las nanopartículas de oro con un tamaño

inferior a 5 nm catalizan a temperaturas incluso muy bajas reacciones de oxidación de CO a CO<sub>2</sub> por lo que su uso como descontaminante cobra importancia. (Haruta et al., 1987) Haruta llegó a fundar su propia empresa de catalizadores con oro.

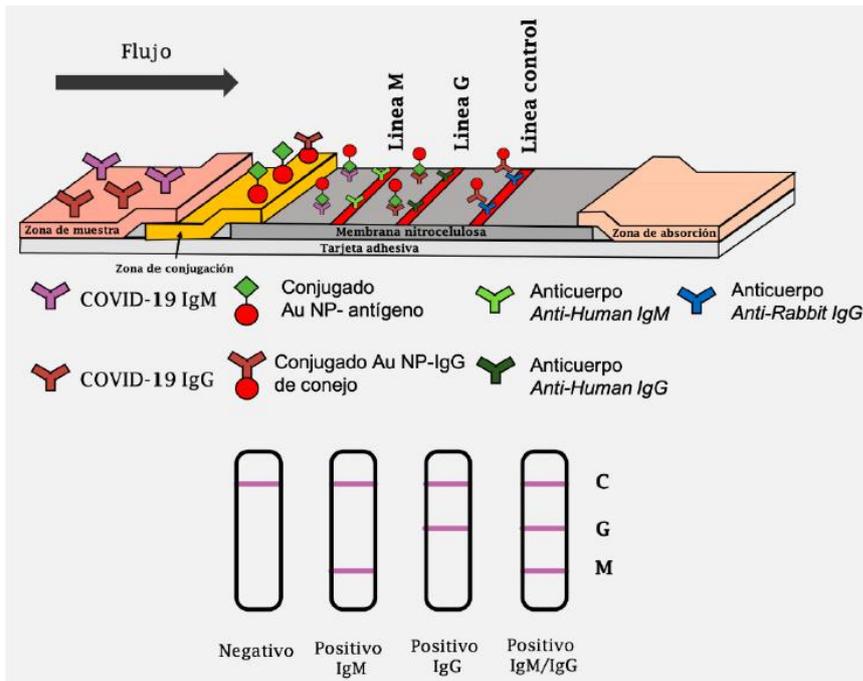
Actualmente es importante destacar el papel de las AuNPs en la terapia génica. Son un vehículo excepcional para poder transportar el material genético evitando su degradación física, química y/o enzimática. Reduciendo la toxicidad y favoreciendo de esta manera la transfección intracelular. (Han et al., 2006)

Por otro lado, mencionar un uso de bastante actualidad como es en los test de antígenos frente al Covid 2019. Ya se encontraban presentes en los test de embarazo, pero en los dos últimos años con la obligada familiarización a la que nos hemos visto sometidos a causa de la pandemia por SARS-CoV-2 se han hecho más notable a la vista de la población estas nanopartículas de oro en el embalaje de los test.



**Figura 4.** Foto realizada por Natividad Álvarez de algunos de los test de detección de antígenos del SARS-CoV-2 que se comercializan en la actualidad.

El funcionamiento es simple puesto que se trata de una cromatografía, en un soporte fijamos AuNPs con anticuerpos que al entrar en contacto con una muestra en la que haya presencia de antígenos favorecerá la unión Ag-Ac-AuNPs y gracias a las propiedades colorimétricas de las AuNPs podremos ver una línea roja marcada que determinará la presencia del virus.



**Figura 5.** Esquema Inmunocromatografía lateral de un test de detección de antígenos COVID-19. (Recomendaciones FACME para el diagnóstico de la respuesta inmune de COVID-19 Cómo es la respuesta inmunitaria frente a SARS-CoV-2, n.d.)

Es difícil predecir el límite en cuanto a las aplicaciones de las nanopartículas de oro, pero sin duda se trata de un campo muy prometedor. En esta revisión se expondrán las bases de lo que se espera que sea un avance en el diagnóstico de una enfermedad tan grave como la leucemia empleando disoluciones de oro coloidal estables en el tiempo y monodispersas.

### 1.3. LISOZIMAS.

#### 1.3.1. Su lugar en la historia.

Año 1921, Alexander Fleming se encuentra en su laboratorio analizando muestras de un paciente con coriza aguda. Se cultivan muestras de secreción nasal en placas de agar sangre y durante los tres primeros días no se observa ningún tipo de crecimiento a excepción de algunas colonias de *Staphylococcus*. Tras varios experimentos nombró a las lisozimas y observó que inhibía el crecimiento de numerosos microorganismos,

patógenos y no patógenos. Las lisozimas se encontraban presentes en distintos fluidos corporales como son los mocos, saliva, esputo y lágrimas (más tarde se descubriría su presencia también en la clara de huevo) y poseían una actividad lítica e inhibitoria bastante notable. (On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions, 1922)

### **1.3.2. Características.**

La lisozima o muramidasa consta de una cadena polipeptídica con 130 aminoácidos y un peso molecular de 14.70 KDa, siendo el punto isoeléctrico fisiológico de 9,28. Su estructura consta de 4 hélices alfa, una doble hoja beta plegada antiparalela y cuatro espirales aleatorias, se pliega en una estructura terciaria globular y compacta con una larga hendidura en la superficie. (Wu et al., 2017) Son enzimas que catalizan la hidrólisis del enlace  $\beta$  (1-4) entre la N-acetilglucosamina y el ácido N-acetilmurámico en dos pasos, poseen en su enlace glicosídico dos residuos de ácido carboxílico, glutamato-35 y aspartato-52 que son claves para su actividad. (Jana et al., 2017) Son catiónicas a pH 7 y con propiedades hidrofóbicas y hay estudios que demuestran que su estructura es parte importante de su actividad bactericida, ya que incluso desnaturalizándolas parcial o completamente siguen siendo eficaces contra bacterias Gram + y Gram -, a pesar de ser inactivas enzimáticamente, por lo que cambios conformacionales son los responsables de su actividad antimicrobiana. (Ibrahim et al., 2001)

## **1.4. LEUCEMIA.**

### **1.4.1. Descripción.**

Se trata de un cáncer de células primitivas productoras de sangre. Normalmente el crecimiento anormal se produce en la médula ósea que es donde se forman los glóbulos rojos, blancos y plaquetas afectando principalmente a la formación de glóbulos blancos que son los encargados de combatir las posibles infecciones que puedan afectar al

organismo. Dentro de estos se pueden ver afectados los linfocitos o bien las células mieloides y será aguda o crónica dependiendo de la velocidad de crecimiento del tumor.

#### **1.4.2. Situación actual.**

En la actualidad se conocen cuatro tipos de leucemia en base a los factores nombrados anteriormente:

- Leucemia linfocítica aguda.
- Leucemia linfocítica crónica.
- Leucemia mielógena aguda.
- Leucemia mielógena crónica.

(Leucemia: MedlinePlus en español, n.d.)

El diagnóstico de la leucemia se basa en distintos tipos de pruebas, entre ellas se pueden citar:

- Hemograma completo incluyendo un frotis sanguíneo periférico en el que se podrá observar si hay alguna anomalía celular.
- Biopsia de la médula ósea.
- Análisis del líquido cefalorraquídeo mediante punción lumbar.
- Estudios genéticos, moleculares y citológicos.
- Tomografía por emisión de positrones. Se introduce un isótopo con glucosa que va a ser captado por las células tumorales quedando estas marcadas.
- Gammagrafía ósea. Se introduce un isótopo radiactivo que se fija en el hueso oscureciéndose las zonas con mayor actividad que serán aquellas en las que haya una proliferación celular.
- TAC, TC o Escáner.

(Cómo Detectar la Leucemia: Todas las Pruebas de Diagnóstico | AECC, n.d.)

## **2. OBJETIVOS DE LA REVISIÓN.**

El principal objetivo de esta revisión bibliográfica es presentar el uso de las nanopartículas de oro como un excelente biosensor en el diagnóstico de diversas patologías, concretamente en el ámbito de la leucemia. Por ello el trabajo se centra en el descubrimiento y continuado estudio que lleva a cabo el grupo de investigación FQM-386 para conseguir los resultados más óptimos del kit de detección de una proteína modelo como es la lisozima que guarda, como se indica a lo largo de la memoria, una relación directa con su excreción en la orina por pacientes que padecen la enfermedad.

Para abordar con éxito este objetivo, se analizan y estudian las propiedades ópticas de las nanopartículas de oro, incidiendo en sus aplicaciones como biosensores de biomoléculas en disolución y describiendo sus propiedades colorimétricas en el espectro visible en función de los parámetros que caracterizan tanto al nanoclúster como en función de los parámetros del medio en los que se encuentra.

## **3. METODOLOGÍA.**

Para llevar a cabo este trabajo de fin de grado se ha realizado una búsqueda de artículos científicos en distintas bases de datos: ScienceDirect, Web of Science y PubMed.

Las búsquedas se han realizado ocasionalmente en español y mayoritariamente en inglés debido a que el resultado de artículos de interés era mucho mayor en este último idioma. Las palabras clave empleadas han sido las siguientes: nanotechnology, gold nanoparticles, surface plasmon resonance (SPR), lysozyme, leukemia.

Con el fin de evitar cualquier error a la hora de traducir artículos se ha recurrido puntualmente al traductor de Google. Así mismo se ha consultado, cuando procedía, el Diccionario de la Real Academia de la lengua española (RAE) con el fin de obtener un vocabulario más amplio y correcto.

El profesor Don Rafael Prado Gotor como responsable del grupo de investigación FQM-386 "Síntesis y FísicoQuímica de Nanopartículas" ha facilitado documentación referente a informes de su proyecto para la redacción de esta revisión.

Se ha realizado un curso ofertado por el Centro de Recursos para el Aprendizaje y la Investigación (CRAI) Antonio Ulloa sobre la utilización del gestor bibliográfico Mendeley. Su uso ha facilitado la elaboración de esta memoria, almacenando los numerosos artículos de interés y pudiendo referenciarlos durante la redacción del presente trabajo de fin de grado.

## **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.**

### **4.1. Antecedentes históricos.**

Del S.IV a.C., durante el Imperio Romano, nos llega el primer vestigio del uso de nanopartículas de oro: la Copa de Lycurgus. Es un ejemplar de *diatretum* o copa en forma de jaula cuya particularidad radica además de en el fabuloso tallaje del cristal con distintas figuras labradas, en el cambio de color según incida la luz desde un ángulo u otro pasando del color verde jade al rojo. En los años 50 el Museo Británico decide llevar a cabo una restauración de algunos daños que presentaba la copa y mediante diversos estudios incluyendo análisis cualitativos espectrográficos deciden enviar muestras a The General Electric Company Ltd (GEC) para esclarecer el colorante usado mediante microanálisis. Las conclusiones fueron que el color procedía de la combinación de los pigmentos de los distintos metales y de la coloración óptico-física de los metales coloidales. Posteriormente con análisis de rayos X se determinó la presencia de un 0,5% de Manganeso (Mn), 400 ppm de Oro (Au) y 300 ppm de Plata (Ag), siendo el tamaño de las nanopartículas entre 50-100 nm y la proporción de Au: Ag de 7:3. Un 0.3% de Antimonio (Sb) que en la época se usaba como decolorante y opacificante del vidrio podría ser el agente reductor para la formación de nanopartículas. Las características ópticas excepcionales se debían a la presencia de oro coloidal en el cristal, que producían la dispersión de la luz dando lugar al color rojo, mientras que la presencia de Ag era la responsable del color verde. (Freestone et al., 2008)



**Figura 6.** Copa Lycurgus. Imagen tomada por British Museum y obtenida por m.facebook.com

Es paradójico pensar que con los conocimientos en el trabajo del cristal de la época no se debiese su uso a algo fruto del azar, sin embargo, es un proceso muy preciso y controlado en el que el tamaño de partícula y la cantidad de ellas es bastante exacto por lo que se cree que los romanos tenían un conocimiento bastante amplio en el uso de partículas a nivel coloidal para poder aprovechar esas propiedades ópticas. (Cómo la asombrosa copa de Licurgo demuestra que los romanos fueron pioneros en nanotecnología - BBC News Mundo, n.d.)

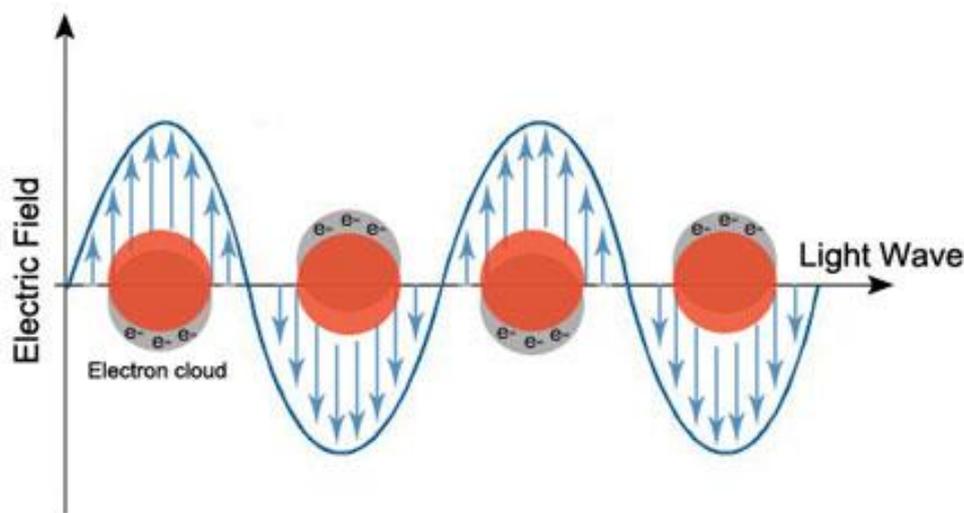
Durante los S.VI-XV la edificación de numerosas Iglesias y Catedrales trajo consigo el uso de maravillosas vidrieras en las que se volvían a usar partículas de oro en tamaño nanométrico. En los S.IX-XVII se conservan escritos medievales islámicos en los que se menciona el uso de oro para producir cristal rojo. (Nanotechnology Timeline | National Nanotechnology Initiative, n.d.)

En 1856 Michael Faraday deja constancia de lo que él llama “el oro rubí coloidal”, descubrimiento accidental al estar trabajando con pan de oro que le permite observar las características especiales que observó en una muestra de oro coloidal puro que preparó al reducir una solución de cloruro de oro con fósforo y que denominó “oro activado”. (Oro coloidal HistoriayPropiedades físicas, n.d.) Gustav Mie fue quien

posteriormente investigó las causas de estas variaciones de color en las partículas nanométricas de oro y plata según la frecuencia de la luz incidente sobre las mismas. (La nanotecnología - Pedro A. Serena Domingo - Google Libros, n.d.)

#### 4.2. Resonancia del plasmón de superficie.

La peculiar propiedad óptica que supone este cambio de color descrito, en comparación con el color del oro macroscópico es debido a la resonancia del Plasmón de superficie (SPR), que no es más que un conjunto de ondas que se propagan por la superficie de un conductor, en este caso el oro. El conductor posee en su superficie electrones en forma libre que interaccionan con las ondas de luz. Durante la interacción estos electrones responden conjuntamente oscilando en resonancia con la luz incidente. Esa interacción resonante entre el campo electromagnético de la luz y la oscilación de la carga superficial es lo que constituye el plasmón de superficie. (Barnes et al., 2003)



**Figura 7.** Esquema del comportamiento de las nanopartículas metálicas y sus electrones al incidir la luz (LSPR). (Archivo:LSPR in gold nanoparticles.jpg - Wikipedia, la enciclopedia libre, n.d.)

Las longitudes de onda que son absorbidas y dan lugar al SPR por parte del oro a escala macroscópica que se usa en joyería, tienen lugar en el infrarrojo (IR) por lo que se refleja la mayor parte de la luz y es brillante para el ojo humano. No obstante, las NPs tienen

mayor área superficial y provocan una SPR en la región del visible. (BIOSENSORES DE NANOPARTÍCULAS DE ORO Jessica Winter Rev. 3 05/23/ PDF Descargar libre, n.d.)

Según el tamaño de la AuNP la luz que absorbe y refleja a una determinada longitud de onda va a variar de tal forma que, con una longitud de onda dentro del rango visible que va desde los 400 nm a los casi 600 nm, las AuNPs de pequeño tamaño van a absorber la luz azul y verde reflejando un color rojo que va a ser el que el ojo humano perciba. Según su tamaño aumenta y la longitud de onda absorbida varíe de 600 nm hasta los 700 nm absorberán los colores naranja y rojo, reflejando los tonos que van del verde al azul. Esto convierte a las AuNPs en unos excelentes biosensores puesto que conociendo el tamaño exacto de ellas se observará un cambio de color al producirse una agregación con otras partículas, es más, si el tamaño de partícula sigue aumentando, las longitudes de onda del SPR llegarían al infrarrojo por lo que la solución coloidal se volvería traslúcida ya que las longitudes de onda del visible serían totalmente reflejadas. Esto se suma al hecho de que las AuNPs poseen un alto coeficiente de extinción molar por lo que van a poder detectarse por medidas de absorción incluso a concentraciones muy bajas.

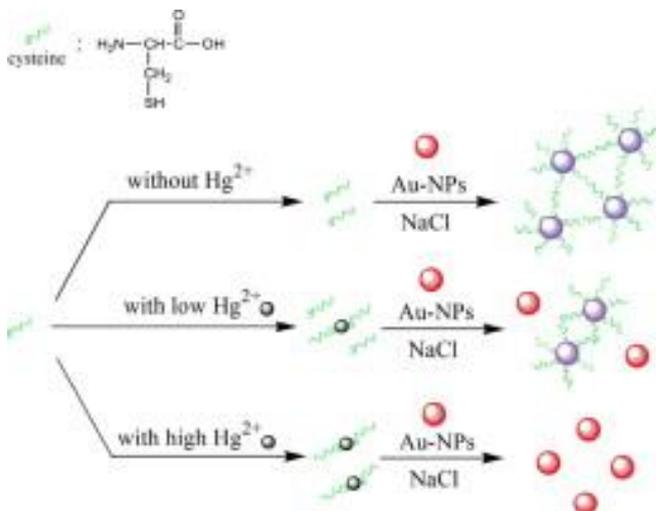
#### 4.3. Aplicaciones de las Nanopartículas de oro.

En la literatura se encuentran numerosos ejemplos de aplicaciones actuales para la detección de proteínas, aminoácidos, ligandos y biomoléculas con biosensores formados por AuNPs. Algunos de estos estudios de investigación son los siguientes:

- Sensor colorimétrico basado en la antiagregación de AuNPs para detectar Hg <sup>+2</sup>. El mercurio es un metal pesado muy contaminante cuyo uso en la industria médica, farmacéutica y electrónica está bastante extendido. Los mayores emisores de mercurio suelen ser las centrales térmicas y los volcanes, entre otros responsables de la contaminación ambiental que lleva a la ingesta de mercurio a través del agua y alimentos. Ding y col. desarrollaron este método sencillo para detectar la presencia del metal en agua y se hicieron las correspondientes mediciones en agua corriente para comprobar su efectividad. Ventaja: el costo es menor en comparación con los métodos

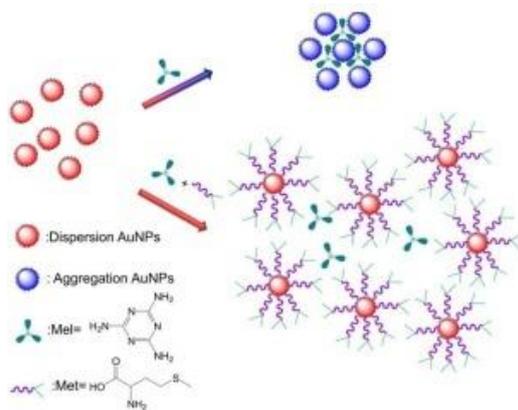
que se venían empleando hasta la fecha cuya instrumentación es sofisticada y no es económica.

Se prepararon AuNPs cargadas positivamente y Cys como agente agregante. El grupo tiol terminal (-SH) de la Cys se une a la superficie de la AuNPs creando el enlace Au-S con un diámetro de 92,5 nm que va a tener el SPR a 545 nm tiñéndose la solución de color púrpura/azul. Pero el grupo -SH de la Cys va tener mayor afinidad por el  $Hb^{+2}$  que por el oro de las nanopartículas por lo que se va a producir la unión entre ellos teniendo lugar un cambio de color de púrpura a rojo. Cuando la concentración de  $Hb^{+2}$  llega a  $1.10^{-5}$  M el SPR es de 520 nm al igual que cuando la AuNP está aislada, sin la adición de ninguna especie y con un diámetro que pasará a ser de 14.1 nm, lo que supone una casi completa recuperación del espectro de absorción y del color de la solución. (Ding et al., 2012)



**Figura 8.** Esquema de detección del  $Hb^{+2}$  en presencia de AuNPs y Cys. (Ding et al., 2012)

- Detección de Metionina en presencia de Melamina. Siguiendo el mismo método de antiagregación de AuNPs científicos de la Universidad de Nanchang en China realizan un ensayo con muestras de suero y orina para detectar Metionina (Met), aminoácido implicado en la aterosclerosis y cuyo déficit contribuye a un deterioro del crecimiento, depresión y parálisis musculares. Melamina (Mel) y Met compiten por la agregación a AuNPs, siendo estas más propensas a la unión con Met. (Huang et al., 2018)



**Figura 9.** Esquema agregación de AuNPs con Mel y Met. (Huang et al., 2018)

- AuNPs como transportadores de Metotrexato. El Metotrexato (MTX) es usado en diversas patologías debido a su capacidad para retardar el crecimiento celular, a dosis altas se emplea como quimioterápico pero su administración en forma soluble hace que se absorba y metabolice rápidamente lo que conlleva una temprana eliminación que por ende se traduce en una disminución de la concentración y actividad, llegando incluso en una forma algo degradada provocando una resistencia de las células hacia el fármaco lo que supone un fracaso terapéutico. Un equipo de investigadores de la Universidad de Taiwán ha desarrollado un estudio en el que usan las AuNPs como transportadores del MTX. El conjugado MTX-AuNPs se forma a través del grupo carboxilo (-COOH) del fármaco, se detecta un aumento del diámetro de 13,2 nm a 14,3 nm y una variación en la absorción de 520 a 530 nm: el SPR se desplaza más hacia el rojo. Los estudios demuestran que la IC50 (concentración de fármaco a la que es capaz de inhibir un proceso biológico en un 50%) pasa de ser de 0,816  $\mu\text{g} / \text{ml}$  del MTX solo a un 0,046  $\mu\text{g} / \text{ml}$  del complejo MTX-AuNPs. Así mismo se registran los efectos citotóxicos in vitro y los antitumorales in vivo. (Chen et al., 2007)

- Detección de serotonina. La Serotonina (5-HT) es un neurotransmisor que se sintetiza en el cerebro e intestinos a partir de triptófano. Tanto su déficit como una alta concentración de ella está relacionada con diversas patologías como depresión, autismo, TOC, tumores intestinales e incluso con la aparición del llamado Síndrome serotoninérgico relacionado con el uso de ciertos medicamentos. El grupo de investigación de T. Godoy desarrolló un sensor colorimétrico difuncionalizando AuNPs

con dos ligandos tiolados que reconocen selectivamente los grupos amino e hidroxilo de la 5-HT. Se trabajó con un tamaño de AuNPs de 15 nm cuyo SPR se presentaba a 521 nm. Al producirse la agregación con una concentración de 5-HT de 100  $\mu$ M la banda se desplazaba a 605 nm y el color de la solución se volvía azul pálido. La selectividad del sensor fue comprobada al añadir otros neurotransmisores similares y observar que la SPR no variaba y que el cambio colorimétrico sólo se producía con la serotonina. (Godoy-Reyes et al., 2018)

#### 4.4. Lisozimas y leucemia.

Siguiendo esta línea de AuNPs como sensores colorimétricos, en el presente TFG se desarrolla la posibilidad de detectar la proteína lisozima para el diagnóstico de leucemia. El grupo de investigación FQM-386 Síntesis y Fisicoquímica de Nanopartículas con el profesor Don Rafael Prado Gotor como responsable de la investigación, ha desarrollado recientemente este sensor colorimétrico aprovechando las numerosas y excepcionales propiedades ópticas de las AuNPs. Así como la biocompatibilidad que presentan que las hacen partículas idóneas a las que multifuncionalizar con numerosos ligandos, el grupo FQM-386 ha conseguido desarrollar un proceso de detección aún más simple sin necesidad de funcionalizar NPs por lo que sumado a que la síntesis de AuNPs es un proceso que se lleva a cabo de forma rápida, sencilla y económica, hacen de este proyecto una opción muy favorable al trabajar con nanopartículas desnudas.

La lisozima es una proteína catiónica a pH fisiológico que se elimina a través de la orina debido a su bajo PM. Normalmente, en individuos sanos, las proteínas en general se encuentran en pequeñas cantidades por lo que la presencia de niveles altos de lisozima en orina, lo que se conoce como lisozimuria, puede indicar diversos desórdenes renales como el Síndrome nefrótico, hipocalcemia y/o infecciones extrarrenales. También es un síntoma distintivo de dos subtipos de Leucemia Mieloide: Leucemia Monocítica y Leucemia Mielomonocítica. (Castillo et al., 2021)

Osserman et al. realizaron un estudio en el que confirman el incremento de lisozima en suero y orina en pacientes diagnosticados con ambos tipos de leucemia. Analizaron muestras de pacientes con diversas patologías e incluso otros tipos de cáncer. Obtuvieron como resultados que en pacientes sanos hay una actividad de lisozimas en suero de 7  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y en orina es apenas detectable. Mientras que para pacientes con leucemia monocítica en suero se obtenían unos valores de 40-150  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y en orina 25-420  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Pacientes con enfermedades renales crónicas como el síndrome nefrótico e infecciones del tracto urinario presentan un incremento en la actividad de la lisozima en la orina, pero era considerablemente más bajo, 3-5  $\mu/\text{ml}$ , comparado con los valores obtenidos en la leucemia monocítica. Aún en investigación se encuentra el hecho de que otras hidrolasas no estuviesen en alta concentración en la orina. Podría ser debido a que la proliferación anormal de leucocitos y macrófagos conllevarse a la producción excesiva de lisozimas únicamente, o bien a que otras enzimas por su mayor tamaño, y/o diferente carga, no fuesen excretadas en la orina. La evidencia actual indica que la lisozima es el principal o único producto en este tipo de leucemias, por lo que es una herramienta muy útil para el diagnóstico de las mismas. (Osserman and Lawlor, 1966)

#### 4.5. Detección de lisozimas con nanopartículas de oro.

Como se viene describiendo a lo largo de la presente revisión bibliográfica, las AuNPs presentan un coeficiente de extinción molar elevado y son un excelente biosensor gracias a sus propiedades ópticas. El grupo de investigación FQM-386 utiliza las AuNPs en sus estudios para detectar y cuantificar lisozimas en orina y agua. Se pretende comercializar un kit compuesto por dos reactivos, uno de ellos compuesto por nanopartículas de oro de un tamaño determinado, que se añadirían a la muestra de orina en un orden indicado, posteriormente se interpretarían los resultados gracias a un patrón que se adjuntaría comparando con el color obtenido para la muestra.

Para la puesta a punto y realización de este proyecto se parte de AuNPs que pueden obtenerse de casas comerciales específicas (Aldrich) o bien sintetizarse en el laboratorio.

Para proceder a su síntesis, siempre un método preferible al ser más económico y conocer perfectamente el posible uso de disoluciones buffers, se lleva a cabo una variante del método de Turkevich. Se requiere una disolución de 97 ml de  $\text{HAuCl}_4$  al 0.01%, calentándola a reflujo a una temperatura de  $90^\circ\text{C}$ . Sobre ella se añaden rápidamente 3 ml de una disolución de citrato trisódico 38.8 mM agitando fuertemente. El citrato actúa como reductor y la disolución que inicialmente es de color amarillenta, pasados 20 minutos se volverá gris y finalmente de un color rojo oscuro que será indicativo de la formación de las NPs. Se obtienen AuNPs de un diámetro medio de 13 nm.



**Figura 10.** Reactivo 1 formado por AuNPS y citrato sódico como estabilizador. Fotografía tomada por el grupo de investigación FQM-386.

El segundo reactivo que forma parte del kit estaría compuesto por una disolución acuosa de sales de cloruro sódico 1M que se va adicionando gota a gota a la solución con 400  $\mu\text{l}$  de AuNPs, 200  $\mu\text{l}$  de citrato de sodio y 200  $\mu\text{l}$  de la muestra de orina hasta observar el cambio de color de rojo a azul. (Castillo et al., 2021)



**Figura 11.** Muestra problema. Fotografía tomada por el grupo FQM-386.

La metodología sólo es válida al añadir los reactivos y la muestra en un determinado orden. Al poner en contacto las AuNPs (reactivo 1) con las sales de cloruro sódico (reactivo 2) se produce la agregación de las AuNPs, por lo que el color rojo característico de ellas pasaría a ser azul. Este es el punto de referencia a tener en cuenta en el estudio, la solución de AuNPs agregadas al entrar en contacto con la sal.

A la hora de tratar de determinar el límite de detección se siguió la siguiente metodología. Se añade el mismo contenido de cloruro sódico que se usa para agregar las AuNPs y generar el punto de referencia a diversas disoluciones con distintas concentraciones de lisozimas a las que previamente se las ha puesto en contacto con las nanopartículas. Se observa que el grado de agregación es mucho menor según aumenta la concentración de lisozimas. Si hacemos una comparación del sistema agregado frente a la solución con las AuNPs sin agregar, se produce un desplazamiento de la banda de plasmones superficiales hacia longitudes de onda más cortas que la correspondiente al sistema agregado en función de una determinada posible concentración de lisozima presente en la muestra, la solución pasaría de un color azul (AuNPs agregadas) al color rojo (AuNPs sin agregar). Este efecto hipsocrómico desde un punto de vista comparativo es debido a que las lisozimas protegen a las AuNPs de una agregación por la presencia de NaCl, por lo que el rango de colores irá variando de rojo a azul según vaya disminuyendo la concentración de lisozimas.



**Figura 12.** Resultados colorimétricos obtenidos tras un ensayo realizado en el laboratorio 411 de la Facultad de Química de la Universidad de Sevilla. Fotografía tomada por el grupo FQM-386.

La cuantificación de los resultados obtenidos se llevaría a cabo a través de un patrón que igualmente se facilita en el kit de detección. Este patrón de colores se elabora con minuciosos análisis microscópicos y espectroscópicos comparando con muestras de

lisozimas de concentración conocidas obtenidas in situ en el laboratorio y gracias a la colaboración que mantienen este grupo de investigación y el Hospital Universitario Virgen Macarena de Sevilla.

#### 4.6. Caracterización de AuNPs.

A la hora de caracterizar y estudiar las interacciones de las nanopartículas se efectúan distintas técnicas. El tamaño medio de las AuNPs y su distribución de tamaño se determinan a partir de fotografías obtenidas con un Microscopio de Transmisión Electrónica (TEM). Además, gracias a estas imágenes fotográficas se puede confirmar que el proceso de agregación entre las AuNPs y el NaCl tiene lugar. Las imágenes se analizan con un software informático: Image-Pro Plus y se procesan los tamaños calculados con SigmaPlot. Conociendo el tamaño medio de las partículas se puede determinar la concentración ya que existe una correlación lineal entre el coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ) y el diámetro de las partículas ( $D$ ), siendo esta:

$\ln \epsilon = k \ln D + a$  donde  $k= 3.32$  y  $a= 10.8$ , obteniéndose la concentración a partir de la recta de calibrado gracias a la Ley de Lambert-Beer:  $A = \epsilon l c$

(Liu et al., 2007)

Otra medida fundamental será la llevada a cabo para calcular el Potencial Z, que indicará la carga superficial de las partículas conociendo de este modo si son catiónicas o aniónicas. Si el valor que se obtiene es en valor absoluto igual o superior a  $|25 \text{ mV}|$  es indicativo de que el colide es estable y por tanto las partículas no se van a agregar debido a las fuerzas electrostáticas de repulsión entre ellas. (Gomes et al., 2021)

El estudio de los espectros que se corresponden a las bandas de plasmones superficiales de las AuNPs en presencia y ausencia de lisozima permite establecer la sensibilidad del método presentado y su límite de detección. Por otro lado, gracias a la deconvolución de las bandas de absorción, es posible calcular la proporción de AuNPs asociadas y libres en función de las concentraciones de lisozimas y nanopartículas presentes en cada tipo de muestra.

Con el fin de caracterizar aún más el sistema y el grado de interacción nano-lisozima se pueden llevar a cabo medidas fluorimétricas. La fluorimetría es una técnica más sensible que la espectroscopía UV-visible por lo que su uso es una alternativa para el análisis del grado de interacción nanopartícula-lisozima. La lisozima posee en su estructura primaria hasta seis triptófanos, dos de ellos (Trp 62 y Trp 108) son bastante sensibles a los cambios de polaridad que puedan darse en su entorno hidrofóbico, por lo que serán los responsables de la emisión de fluorescencia de la lisozima. (Escobar et al., n.d.) (Nishimoto et al., 1999)

#### **4.7. Ventajas frente al sistema de obtención actual.**

En comparación con el método descrito hay que señalar que actualmente existe un kit de diagnóstico, de uso hospitalario para muestras de suero sanguíneo in vitro: Human Lysozyme "NL" NANOROID™ Radial Immunodiffusion Kit. Está compuesto por un gel de agarosa en el que se incluyen unos anticuerpos que entrarán en contacto con los antígenos presentes en la muestra de suero. Este método se basa en la medida de los diámetros de los aros de precipitado por la interacción antígeno-anticuerpo. Esto conlleva una serie de inconvenientes: necesidad de personal cualificado para la extracción y procesado de las muestras, los anticuerpos usados son costosos y requieren una conservación entre 2-8°C, los reactivos usados son potencialmente peligrosos, corrosivos e infecciosos, poca sensibilidad a bajas concentraciones y resultados variables dependientes del tiempo de incubación, temperatura y humedad, incluso en el protocolo se especifica los problemas que el método presenta en la medida del aro de precipitado.

El proyecto presentado en esta revisión posee diversas ventajas frente al método anterior: la detección de la lisozima es inmediata, es más, la observación colorimétrica y posterior comparación con el patrón conlleva no sólo la sencillez del método si no también la no necesidad de personal cualificado desde la toma de muestra (es orina y no suero sanguíneo) pasando por el procesado de la misma y la interpretación de los resultados. Los materiales e instrumental son de bajo coste y ninguno es corrosivo ni peligroso, lo que supone una mayor accesibilidad a los mismos. El kit es fácilmente transportable y se conserva a temperatura ambiente. Además, este método permite la

detección nanomolar de la lisozima en orina, superando la sensibilidad del método de detección en suero. (Castillo et al., 2021)

## **5. CONCLUSIONES.**

A lo largo de esta revisión bibliográfica se presentan numerosas aplicaciones presentes y potencialmente futuras de las AuNPs. Es innegable su efectividad en el diagnóstico y tratamiento de múltiples patologías. Sus magníficas propiedades destacando las ópticas, convierten a las AuNPs gracias a su plasmón de resonancia de superficie en el biosensor por excelencia en la última década de trabajos de investigación.

En el caso concreto descrito de la aplicación del oro coloidal como biosensor de la lisozima se constata la relación entre la excreción por vía urinaria de una alta concentración de lisozimas y la presencia de leucemia monocítica y mielomonocítica en las muestras de pacientes analizadas. El método de detección desarrollado por el grupo de investigación FQM-386 es sencillo, rápido, económico y eficaz para el diagnóstico precoz de esos dos tipos de leucemia.

Para finalizar indicar que, dentro de las investigaciones llevadas a cabo por el grupo FQM-386 “Síntesis y Físicoquímica de Nanopartículas” se dejan abiertas como perspectivas futuras dos líneas de estudio:

- La influencia del tamaño de las AuNPs en la mejora del límite de detección. Analizar cómo el efecto del tamaño puede conseguir mejorar la mínima concentración de proteína a detectar buscando siempre el mejor punto de referencia (nanopartículas agregadas) y la mayor estabilidad posible del color conseguido
- Estudios termodinámicos monitorizando directamente la interacción NP-Lisozima. Los datos termodinámicos se obtendrían analizando los espectros al establecer la proporción de lisozima o NP libre y la proporción de lisozima o NP agregada, teniendo en cuenta la influencia del pH, temperatura, fuerza iónica y la naturaleza del disolvente en la termodinámica de las interacciones no covalentes NP-lisozima.

## 6. BIBLIOGRAFÍA.

Archivo:LSPR in gold nanoparticles.jpg - Wikipedia, la enciclopedia libre. n.d. [en línea].

[Consultado en May 2022] Disponible en:

[https://es.m.wikipedia.org/wiki/Archivo:LSPR\\_in\\_gold\\_nanoparticles.jpg](https://es.m.wikipedia.org/wiki/Archivo:LSPR_in_gold_nanoparticles.jpg).

Balzani V. Nanoscience and nanotechnology: a personal view of a chemist. *Small*. 2005; 1(3): 278–83.

Barnes WL, Dereux A, Ebbesen TW. Surface plasmon subwavelength optics. *Nature*. 2003; 424(6950): 824–30.

Beer P, Singh P. TOP-DOWN AND BOTTOM-UP APPROACHES FOR SYNTHESIS OF NANOMATERIALS n.d.

BIOSENSORES DE NANOPARTÍCULAS DE ORO Jessica Winter Rev. 3 05/23/ PDF Descargar libre. n.d. [en línea]. [Consultado en May 2022] Disponible en: <http://docplayer.net/27614117-Gold-nanoparticle-biosensors-jessica-winter-rev-3-05-23-2007.html>.

By JM, Hunter Lane MD. Corresponding Member of the Calcutta Medical and Physical Society; Member of the Royal College of Surgeons, &c.; formerly Presiden of the Royal Medical Society. Medical School. n.d.

Castillo PM, Fernández-Acejo FJ, Carnerero JM, Prado-Gotor R, Jimenez-Ruiz A. Colorimetric, Naked-Eye Detection of Lysozyme in Human Urine with Gold Nanoparticles 2021.

Chen YH, Tsai CY, Huang PY, Chang MY, Cheng PC, Chou CH, et al. Methotrexate conjugated to gold nanoparticles inhibits tumor growth in a syngeneic lung tumor model. *Molecular Pharmaceutics*. 2007; 4(5): 713–22.

Cómo Detectar la Leucemia: Todas las Pruebas de Diagnóstico | AECC. n.d. [en línea]. [Consultado en April 2022] Disponible en: <https://www.contraelcancer.es/es/todo-sobre-cancer/tipos-cancer/leucemias/diagnostico>.

Cómo la asombrosa copa de Licurgo demuestra que los romanos fueron pioneros en nanotecnología - BBC News Mundo. n.d. [en línea]. [Consultado en May 2022] Disponible en: <https://www.bbc.com/mundo/noticias-37790157>.

Connor EE, Mwamuka J, Gole A, Murphy CJ, Wyatt MD. Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity. *Small*. 2005; 1(3): 325–7.

Ding N, Zhao H, Peng W, He Y, Zhou Y, Yuan L, et al. A simple colorimetric sensor based on anti-aggregation of gold nanoparticles for Hg<sup>2+</sup> detection. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2012; 395: 161–7.

Editorial Etecé. Nanotecnología - Concepto, función, aplicaciones y ejemplos.

<https://concepto.de/Nanotecnologia/>. 2020. [en línea]. [Consultado en April 2022] Disponible en: <https://concepto.de/nanotecnologia/>.

Escobar V, Osiris J, Sánchez G, Ángel M, Solís T, Ramón S. Estudio preliminar del mecanismo de apagamiento de la fluorescencia de la lisozima por tetrakis-para-carboxifenil porfirina n.d.

Freestone I, Meeks N, Sax M, Higgitt C. The Lycurgus Cup - A Roman nanotechnology. *Gold Bulletin*. 2008; 40(4): 270–7.

Godoy-Reyes TM, Llopis-Lorente A, Costero AM, Sancenón F, Gaviña P, Martínez-Máñez R. Selective and sensitive colorimetric detection of the neurotransmitter serotonin based on the aggregation of bifunctionalised gold nanoparticles. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2018; 258: 829–35.

Gomes A, Carnerero JM, Jimenez-Ruiz A, Grueso E, Giráldez-Pérez RM, Prado-Gotor R. Lysozyme-AuNPs Interactions: Determination of Binding Free Energy. *Nanomaterials (Basel)*. 2021; 11(8).

Han HY, Ro KE, McPherson BA. Stability of gold nanoparticle-bound DNA toward biological, physical, and chemical agents. *Chem Biol Drug Des*. 2006; 67(1): 78–88.

Haruta M, Kobayashi T, Sano H, Yamada N. The Chemical Society of Japan Novel Gold Catalysts for the Oxidation of Carbon Monoxide at a Temperature far Below 0°C. *CHEMISTRY LETTERS*. 1987: 1987.

Healy ML, Lim KK, Travers R. Jacques Forestier (1890-1978) and gold therapy. *Int J Rheum Dis*. 2009; 12(2): 145–8.

Heiligtag FJ, Niederberger M. The fascinating world of nanoparticle research. *Materials Today*. 2013; 16(7–8): 262–71.

Hernández García A. Bionanotecnología: Eric Drexler y la Nanotecnología: Una Breve Historia. [Http://BionanotecnologiasBlogspotCom/2014/07/Eric-Drexler-y-La-Nanotecnologia-Una.html](http://BionanotecnologiasBlogspotCom/2014/07/Eric-Drexler-y-La-Nanotecnologia-Una.html). 2014. [en línea]. [Consultado en April 2022] Disponible en: <http://bionanotecnologias.blogspot.com/2014/07/eric-drexler-y-la-nanotecnologia-una.html>.

Higby GJ. Gold in medicine: a review of its use in the West before 1900. *Gold Bull*. 1982; 15(4): 130–40.

Huang PC, Gao N, Li JF, Wu FY. Colorimetric detection of methionine based on anti-aggregation of gold nanoparticles in the presence of melamine. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2018; 255: 2779–84.

Huang X, El-Sayed IH, Qian W, El-Sayed MA. Cancer cell imaging and photothermal therapy in the near-infrared region by using gold nanorods. *J Am Chem Soc*. 2006; 128(6): 2115–20.

Ibrahim HR, Matsuzaki T, Aoki T. Genetic evidence that antibacterial activity of lysozyme is independent of its catalytic function. *FEBS Lett*. 2001; 506(1): 27–32.

INQUIMAE - Investigación - Nanotecnología. n.d. [en línea]. [Consultado en April 2022] Disponible en: [http://www.inquimae.fcen.uba.ar/investigacion\\_nano\\_textiles.htm](http://www.inquimae.fcen.uba.ar/investigacion_nano_textiles.htm).

Introducción a la nanotecnología – Asociación de Estudiantes de Biociencias de España. n.d. [en línea]. [Consultado en May 2022] Disponible en: <https://aebespe.es/01062021-3/>.

Jana M, Ghosh A, Santra A, Kar RK, Misra AK, Bhunia A. Synthesis of novel muramic acid derivatives and their interaction with lysozyme: Action of lysozyme revisited. *J Colloid Interface Sci*. 2017; 498: 395–404.

La Luz, Espectro Visible, Espectro Electromagnético imagen png - imagen transparente descarga gratuita. n.d. [en línea]. [Consultado en May 2022] Disponible en: <https://www.freepng.es/png-74112v/>.

La nanotecnología - Pedro A. Serena Domingo - Google Libros. n.d. [en línea]. [Consultado en May 2022] Disponible en: [https://books.google.es/books?id=uRLaDwAAQBAJ&pg=PT30&lpg=PT30&dq=oro+rubi+coloidal+faraday&source=bl&ots=EdiL6IVsZ5&sig=ACfU3U3MUn-Ar7QsuGKxEx2uAATo4PxJ5w&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwjyz7KO4dT3AhVyi\\_0HHb6NCbgQ6AF6BAg5EAM#v=onepage&q=oro%20rubi%20coloidal%20faraday&f=false](https://books.google.es/books?id=uRLaDwAAQBAJ&pg=PT30&lpg=PT30&dq=oro+rubi+coloidal+faraday&source=bl&ots=EdiL6IVsZ5&sig=ACfU3U3MUn-Ar7QsuGKxEx2uAATo4PxJ5w&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwjyz7KO4dT3AhVyi_0HHb6NCbgQ6AF6BAg5EAM#v=onepage&q=oro%20rubi%20coloidal%20faraday&f=false).

Lee H, Lee MY, Bhang SH, Kim BS, Kim YS, Ju JH, et al. Hyaluronate-gold nanoparticle/tocilizumab complex for the treatment of rheumatoid arthritis. *ACS Nano*. 2014; 8(5): 4790–8.

Leucemia: MedlinePlus en español. n.d. [en línea]. [Consultado en April 2022] Disponible en: <https://medlineplus.gov/spanish/leukemia.html>.

Liu X, Atwater M, Wang J, Huo Q. Extinction coefficient of gold nanoparticles with different sizes and different capping ligands. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2007; 58(1): 3–7.

Mateo D, Morales P, Ávalos A, Haza A. Gold nanoparticles: Applications and in vitro cytotoxicity. *Revisión Bibliográfica*. 2013. [en línea]. [Consultado en April 2022] Disponible en: [https://www.toxicologia.org.ar/bibliotecavirtual/acta\\_toxicologica/vol\\_21\\_2/mateo.pdf](https://www.toxicologia.org.ar/bibliotecavirtual/acta_toxicologica/vol_21_2/mateo.pdf).

Nanotechnology Timeline | National Nanotechnology Initiative. n.d. [en línea]. [Consultado en May 2022] Disponible en: <https://www.nano.gov/timeline>.

Nanotecnología - Concepto, función, aplicaciones y ejemplos. n.d. [en línea]. [Consultado en May 2022] Disponible en: <https://concepto.de/nanotecnologia/>.

Nishimoto E, Yamashita S, Yamasaki N, Imoto T. Resolution and characterization of tryptophyl fluorescence of hen egg-white lysozyme by quenching- and time-resolved spectroscopy. *Biosci Biotechnol Biochem*. 1999; 63(2): 329–36.

On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Containing Papers of a Biological Character*. 1922; 93(653): 306–17.

Oro coloidal HistoriayPropiedades físicas. n.d. [en línea]. [Consultado en May 2022] Disponible en: [https://hmong.es/wiki/Gold\\_nanoparticle](https://hmong.es/wiki/Gold_nanoparticle).

Osserman EF, Lawlor DP. Serum and urinary lysozyme (muramidase) in monocytic and monomyelocytic leukemia. *J Exp Med*. 1966; 124(5): 921–52.

Recomendaciones FACME para el diagnóstico de la respuesta inmune de COVID-19 Cómo es la respuesta inmunitaria frente a SARS-CoV-2. n.d.

Richardson JJ, Liao W, Li J, Cheng B, Wang C, Maruyama T, et al. Rapid assembly of colorless antimicrobial and anti-odor coatings from polyphenols and silver. *Scientific Reports*. 2022; 12(1).

Soler Beatty J, Soler Beatty -----Jennifer. Uso de nanopartículas para el diagnóstico y tratamiento de la diabetes n.d.

Stylios GK. There is plenty of room at the bottom, R.P. Feynman. *International Journal of Clothing Science and Technology*. 2013; 25(5).

Wu T, Wu C, Fu S, Wang L, Yuan C, Chen S, et al. Integration of lysozyme into chitosan nanoparticles for improving antibacterial activity. *Carbohydr Polym*. 2017; 155: 192–200.

Zanella R. Metodologías para la síntesis de nanopartículas: controlando forma y tamaño. *Artículo de Investigación*. 2021. [en línea]. [Consultado en April 2022] Disponible en: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S2448-56912012000100069&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S2448-56912012000100069&script=sci_arttext).