



EMPLEO DE NANOPARTÍCULAS
METÁLICAS PARA LA DETECCIÓN
DE TENSIOACTIVOS Y
BIOMOLÉCULAS

Lourdes Vergara O'Neale

Facultad de Farmacia



Universidad de Sevilla

Facultad de Farmacia

Trabajo de Fin de Grado

Grado en Farmacia

“EMPLEO DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS PARA LA DETECCIÓN DE TENSIOACTIVOS Y BIOMOLÉCULAS”

Lourdes Vergara O’Neale

Tutora: Elia María Grueso Molina

Departamento de Química Física

Tipología del trabajo: Bibliográfico

Portada (Adaptada de Railsback et cols., 2012).

Agradecimientos

Mi agradecimiento a la Dra. Elia M^a Grueso Molina, profesora contratada doctora de la Universidad de Sevilla, por guiarme en la elaboración de este trabajo.

A mis padres, por su incondicional apoyo durante todos estos años.

INDICE

RESUMEN	6
INDICE DE ABREVIATURAS.....	7
1.- INTRODUCCIÓN.....	11
1.1.- Nanopartículas	11
1.2.- Tensioactivos	17
1.3.- Biomoléculas	22
1.3.1.- Ácidos nucleicos: ADN y ARN	22
1.3.2.- Lisozima	23
2.- OBJETIVOS.....	26
2.1 Objetivo principal.....	26
2.2. Objetivos específicos.....	26
3.- METODOLOGÍA.....	27
4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
4.1.- Empleo de Nanopartículas Metálicas para la detección de Tensioactivos.....	28
4.1.1.- Empleo de Nanopartículas Metálicas para la detección de Tensioactivos Catiónicos	32
4.1.2.- Empleo de Nanopartículas Metálicas para la detección de Tensioactivos Aniónicos.....	38
4.1.3.- Empleo de Nanopartículas Metálicas para la detección de Tensioactivos No Iónicos	38
4.2.- Empleo de Nanopartículas Metálicas para la detección de Biomoléculas	39
4.2.1. Tipos de Nanopartículas empleadas para la detección de Biomoléculas	39
4.2.2. Modos de unión de las nanopartículas con los ácidos nucleicos y proteínas ...	42
4.2.3. Termodinámica de la Interacción de nanopartículas con los ácidos nucleicos y proteínas	49

4.2.4. Aplicaciones de las nanopartículas como biosensores	50
4.3.- Empleo de sistemas tensioactivos/nanopartículas metálicas para la detección de biomoléculas	53
5.- CONCLUSIONES	55
BIBLIOGRAFÍA	57

RESUMEN

Actualmente, las nanopartículas juegan un papel muy importante en el campo de la investigación científica debido a la gran variedad de aplicaciones en distintas áreas tales como la farmacología, la medicina, la industria alimentaria, la tecnología, o la biología. Las nanopartículas más estudiadas con este fin son aquellas formadas por materiales metálicos. De entre todos los metales nobles, el oro destaca por sus interesantes propiedades ópticas, magnéticas, eléctricas, catalíticas, biocidas y antimicrobianas.

Dentro del grupo de las nanopartículas metálicas pueden encontrarse nanopartículas de distinto tamaño, funcionalizadas con un amplio abanico de ligandos (anticuerpos, polímeros, sondas de diagnóstico, fármacos, material genético...). Por todo ello, las nanopartículas despiertan un gran interés y resultan especialmente prometedoras.

En este trabajo de revisión bibliográfica, analizaremos en primer lugar las propiedades más interesantes de las nanopartículas, así como de los principales tensioactivos y biomoléculas. Por otro lado, estudiaremos la eficacia de los métodos colorimétricos basados en nanopartículas metálicas para la detección de tensioactivos y biomoléculas, en comparación con otras técnicas de análisis más tradicionales. Finalmente, se describe la eficacia de los sistemas que combinan nanopartículas y tensioactivos para la detección de biomoléculas.

PALABRAS CLAVES: Nanopartículas, Tensioactivos, ADN, Análisis colorimétrico, Sensor.

INDICE DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

ARNr: ARN ribosómico

ARNt: ARN transferente

AgNO₃: Nitrato de plata

AgNPs: Nanopartículas de plata

AuNPs: Nanopartículas de oro

Au@AO-TEG: Nanopartícula de oro recubierta por naranja de acridina y trietilenglicol

Au@AO-PEG: Nanopartícula de oro recubierta por naranja de acridina y polietilenglicol

Au@citrato: Nanopartícula de oro recubierta por citrato

Au@CALNN: Nanopartícula de oro recubierta por cisteína-alanina-leucina-asparagina-asparagina

Au@malato: Nanopartícula de oro recubierta por malato

Au@tartrato: Nanopartícula de oro recubierta por tartrato

Au@tiopronin: Nanopartícula de oro recubierta por tiopronina

BMLs: Biomoléculas

BZKB: Bromuro de benzalconio

C₁₀TAB: Bromuro de deciltrimetilamonio

C₁₈TAB: Bromuro de octadeciltrimetilamonio

CE: Electroforesis capilar

CMC: Concentración Micelar Crítica

CPC: Cloruro de cetilpiridino

CTAB: Bromuro de cetiltrimetilamonio

DBA: Aptámero de unión a la dopamina

DDAB: Bromuro de didodecildimetilamonio

ds-poli-AT: ARN de doble cadena de pares de bases adenina-timina.

DTAB: Bromuro de dodeciltrimetilamonio

ELISA: Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

FeCl₃: Cloruro de hierro

GC-MS: Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución

HAuCl₄: Ácido tetracloroáurico

LAS: Sulfonato de dodecibenceno de sodio

NaBH₄: Borohidruro sódico

NAG: N-acetilglucosamina

NAM: Ácido N-acetilmurámico

NaOH: Hidróxido de sodio

NIR: Espectroscopía de Infrarrojo cercano

NMR: Resonancia Magnética Nuclear

NPs: Nanopartículas

OTA: Ochratoxin A

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PfLDH: *Plasmodium falciparum* Lactato deshidrogenasa

PvLDH: *Plasmodium vivax* Lactato deshidrogenasa

PPA@Fe₃O₄ NP: Nanopartículas magnéticas recubiertas con poli (ácido acrílico) de magnetita

SELEX: Evolución sistemática de ligandos mediante enriquecimiento exponencial

SERS: Espectroscopía Raman Amplificada en Superficie

SDBS: Dodecil benzeno sulfonato de sódio

SDS: Dodecil sulfato sódico

SPR: Resonancia del plasmón de superficie

T4L: Lisozima codificada por el bacteriófago T4

TTAB: Bromuro de tetradeciltrimetilamonio

WHO: Organización Mundial de la Salud

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- Nanopartículas

Las **nanopartículas metálicas** se definen como agregados aislados de átomos de tamaño comprendido entre 1-100 nm. Dentro de este grupo de nanopartículas podemos encontrar nanopartículas desnudas (“naked nanoparticles”) y nanopartículas funcionalizadas con diferentes ligandos (“functionalized nanoparticles”). Una de las funciones fundamentales del ligando que recubre el centro metálico en dichas nanopartículas funcionalizadas es la de proteger y estabilizar la nanopartícula frente a la agregación (Schmid, 1990). Teniendo en cuenta el tipo de capa protectora que estabiliza las nanopartículas, se distingue entre estabilización:

- Electroestática
- Estérica
- Electroestérica
- Por ligandos orgánicos y por disolventes

A continuación se pasan a describir los diferentes tipos de estabilizaciones mencionadas anteriormente:

Los compuestos iónicos debido a su carga eléctrica (haluros, carboxilatos o polioxoaniones) disueltos en una disolución generalmente acuosa, pueden causar una **estabilización electroestática** (véase Figura 1A).

La presencia de estos compuestos iónicos, sobre la superficie de las nanopartículas y sus respectivos contraiones, genera una doble capa con cargas opuestas a su alrededor. Esto origina una interacción de tipo electroestático entre las nanopartículas y evita la agregación siempre que la diferencia de potencial en la doble capa sea lo suficientemente alta (Roucoux et cols., 2002).

La **estabilización estérica**, también llamada estabilización polimérica, es un proceso generado para aislar partículas coloidales con aditivos que evitan la aglomeración entre los coloides en suspensión (Hornyak et cols., 2008). Este proceso se efectúa por la adsorción de ligandos o moléculas que recubren la superficie metálica de las partículas formando una capa, que induce la formación de una barrera estérica, la cual evita el contacto entre las partículas (Mostafa y Sayed, 2001). Así, cuando dos partículas coloidales con carga

superficial neta se aproximan entre sí (véase Figura 1B), inducen una superposición de las capas difusas de sus correspondientes dobles capas eléctricas, originando fuerzas electrostáticas repulsivas (Schmid, 2004).

Para mantener las nanopartículas metálicas estables en disolución se puede combinar la estabilización electrostática y la estérica (**estabilización electroestérica**). Un ejemplo de estabilizador electroestérico lo constituyen los agentes tensioactivos iónicos, ya que contienen un grupo polar capaz de generar una doble capa eléctrica y una capa lipofílica capaz de proporcionar la repulsión estérica necesaria (Roucoux et cols., 2002).

La **estabilización por ligandos** estabilizadores fue introducida en los años 80 (Vargaftik y cols., 1985). Estos ligandos orgánicos, por lo general portan átomos donadores de P, N y S, como son las fosfinas, las aminas, los alcanotioles y los tioéteres (Schmid y Corain, 2003). Un ejemplo de ello lo constituyen las nanopartículas de oro. Los ligandos que estabilizan y recubren el centro de oro pueden funcionalizarse de diversas formas, dando lugar a una amplia variedad de sistemas. Además, al estar constituidas por núcleos metálicos inorgánicos en la escala nano y por una capa estabilizadora, esto les permite dispersarse en el disolvente apropiado. Cuando son compatibles con sistemas acuosos, se les da el nombre de hidrofílicas y cuando se dispersan en un disolvente orgánico reciben el nombre de hidrofóbicas (Kim y cols., 2005). Sin embargo, si se dispersan en ambos medios, se denominan anfifílicas (Mayer y Mark, 1997).

La selección de un buen agente estabilizante es muy importante no solo para evitar procesos de agregación, sino porque también permite determinar la forma, el tamaño y la composición de las nanopartículas sintetizadas.

Por otro lado, las nanopartículas no funcionalizadas no están rodeadas de una cápsula protectora o estabilizadora y por tanto tienden a agregarse entre sí y fusionarse. Éstas presentan un área superficial muy grande con respecto a su masa, por lo que tienen un exceso de energía libre superficial en comparación a su energía de formación, haciéndolas termodinámicamente inestables (Friederici, 2013).

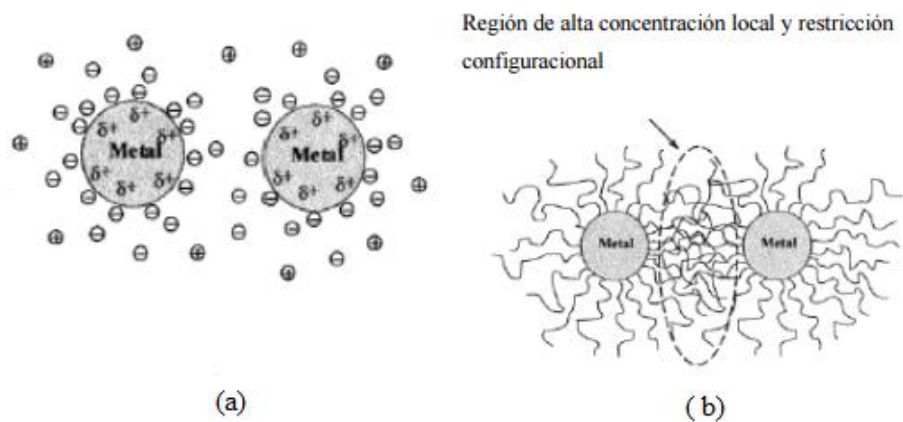


Figura 1. Tipos de estabilización de nanopartículas y coloides metálicos. (a) Estabilización electrostática; (b) Estabilización estérica (Rodríguez, 2007).

En la actualidad, las nanopartículas son un área de investigación científica preferente, debido a una amplia variedad de aplicaciones potenciales en los campos biomédicos, ópticos y electrónicos (Karunaratne, 2007).

En el ámbito de la investigación farmacéutica la importancia de la nanotecnología para la terapia con fármacos reside en la posibilidad de suministrar tanto fármacos de bajo peso molecular como macromoléculas tales como los péptidos, proteínas y genes, de manera localizada o dirigida, hacia un cierto tejido de interés o diana.

Las ventajas del uso de nanopartículas en la administración de fármacos se deben, fundamentalmente, a su pequeño tamaño y su biocompatibilidad (Panyan y Labhasetwar, 2003). Así, estos sistemas podrían utilizarse para:

- 1.- Dirigir la administración de fármacos hacia un tipo de célula o tejido específico.
- 2.- Mejorar la biodisponibilidad oral.
- 3.- Sostener el efecto de fármacos o genes en un tejido seleccionado.
- 4.- Solubilizar fármacos para una administración intravascular.
- 5.- Mejorar la estabilidad de los agentes terapéuticos frente a la degradación enzimática.

Así, las nanopartículas son capaces de imitar o modificar procesos biológicos y pueden dar soluciones a viejos problemas relacionados con la solubilidad, biodisponibilidad, inmunocompatibilidad y citotoxicidad de muchos de los medicamentos de uso tradicional (Goldberg, 2007).

Una de las ventajas más importantes que ofrecen las nanopartículas en relación con la administración de fármacos es su poder de selección de tejidos infectados o enfermos. De esta forma, cuando un fármaco, o molécula biológicamente activa, se administra de forma convencional (comprimido, inyectable, etc.), éste es liberado rápidamente al medio biológico, y su comportamiento en el organismo es completamente dependiente de su estructura química. Dicha estructura determina las propiedades fisico-químicas de la molécula activa (lipofilia, ionización etc.), las cuales condicionan su absorción a través de membranas y su distribución en el organismo. Una vez distribuidas, las moléculas de fármaco son capaces de llegar al tejido enfermo. Sin embargo, al mismo tiempo, alcanzan también regiones o tejidos sanos, provocando efectos secundarios o indeseables.

En cambio, cuando la administración de la molécula activa se hace mediante el uso de las nanopartículas, son las propiedades fisico-químicas de éstas (tamaño, características superficiales...) las que determinan la distribución de la nanomedicina dentro del organismo, y su concentración en su lugar de acción. Una vez alcanzada la región enferma, las nanopartículas transportadoras de fármaco deben controlar la liberación de su contenido. Al poder concentrar el fármaco en su lugar de acción o de absorción se consiguen minimizar los efectos secundarios y aumentar el índice terapéutico de la molécula en cuestión. Esto último es de suma importancia en el desarrollo de nuevos medicamentos para el tratamiento del cáncer, así como en la mejora de los tratamientos actuales, o para la administración por vía oral de ciertos antitumorales (Jain, 2003).

Las nanopartículas más estudiadas con este fin son aquellas formadas por materiales metálicos (como el oro), semiconductores (como los calcogenuros de cadmio, arseniuro de galio o fosforo de indio) o aislantes (como el óxido de hierro o de titanio) (Cobo, 2012).

De entre todos los metales nobles, el oro destaca por sus interesantes propiedades ópticas, magnéticas, eléctricas, catalíticas, biocidas y antimicrobianas, teniendo aplicación en distintas áreas tales como la farmacología, la medicina, la industria alimentaria, la tecnología, o la biología (Cao, 2004).

Cuando el tamaño de los materiales se reduce hasta la escala nanométrica, se pueden apreciar dos fenómenos importantes:

1.- Alta relación superficie/volumen

Las nanopartículas contienen un mayor número de ligandos sobre su superficie, y por tanto una mayor densidad superficial, para un mismo volumen, que los componentes que la constituyen por separado. Cabe destacar que las reacciones en fase sólida se desarrollan fundamentalmente en la superficie. Por tanto, esta propiedad hace que sean mucho más reactivas, y en consecuencia, tiendan a agregarse unas con otras para disminuir su energía superficial. Esta característica de las nanopartículas se emplea en muchas aplicaciones tales como la catálisis. (Remuñan y Al-Qadi, 2009).

2.- Confinamiento cuántico

En cuanto a las propiedades de las nanopartículas metálicas podemos destacar sus propiedades ópticas y electrónicas.

Las nanopartículas metálicas, se caracterizan por poseer una banda característica denominada banda de resonancia de plasmón superficial (“**SPR, Surface Plasmon Resonance**”), que es responsable de las propiedades ópticas y fototérmicas de las nanopartículas de oro (AuNP's) (García y cols, 2005). Cuando una partícula metálica se expone a la luz, el campo electromagnético alternante de la luz incidente interactúa con la partícula e induce una oscilación o excitación colectiva de los electrones libres del metal con cierta frecuencia (electrones de la banda de conducción) denominadas plasmón. Todo ello se traduce en la absorción de la radiación electromagnética por parte de las nanopartículas en una determinada zona del espectro (Cruz y cols, 2012). Esta oscilación se debe a la diferencia de carga neta que se genera sobre los bordes de las partículas que actúa como una fuerza restauradora. Así, la proporción de átomos en la superficie de la nanopartícula es muy superior a la del metal volumétrico. Al reducir el tamaño de la partícula, se produce un incremento en el espaciado entre los niveles de energía electrónicos, por lo que los electrones libres superficiales vibran al incidir sobre ellos un haz de luz y se crea una zona con carga positiva y otra con carga negativa, como se ve reflejado en la Figura 2 (Hammond y cols., 2014). Como consecuencia de la excitación de estos electrones, se genera una partícula híbrida que es el resultado del fuerte acoplamiento

entre el haz de luz y los electrones en la superficie de la nanopartícula (Criado y cols., 2007). El hecho de tener estos sistemas un espacio reducido para el movimiento de los electrones, hace que las propiedades electrónicas cambien drásticamente, dando lugar a nuevas aplicaciones de gran interés (Astruc y Didier, 2004).

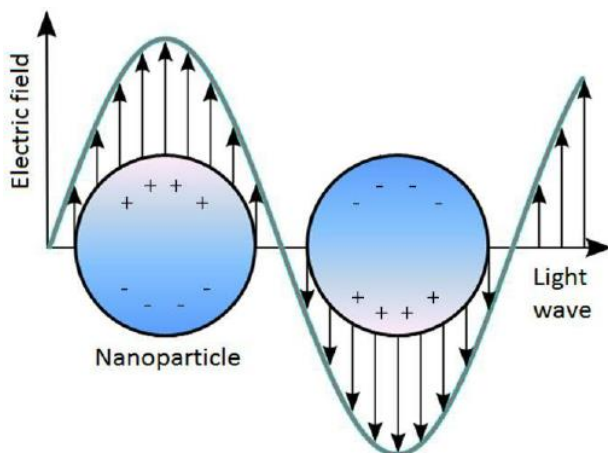


Figura 2. Imagen representativa de la orientación de los electrones de los átomos de la superficie de la nanopartícula como consecuencia de la incidencia de luz de una determinada frecuencia (Hammond y cols., 2014).

La oscilación dipolar está entonces en resonancia con la radiación incidente a una frecuencia específica que depende tanto del tamaño, como de la forma de las nanopartículas. La región de longitudes de onda a la que se obtiene dicha resonancia se la conoce como banda de absorción o resonancia plasmónica (Cao, 2004).

Para algunos metales como el cobre, oro o plata, la frecuencia de resonancia del plasmón aparece en el rango visible del espectro, y ésta es la razón por la que las disoluciones coloidales de estos metales muestran colores espectaculares e intensos.

Por otro lado, las nanopartículas de metales de transición exhiben propiedades catalíticas frente a muchas reacciones orgánicas con alta actividad y selectividad, utilizándose en disolución (catálisis homogénea) o adsorbidas sobre un soporte sólido, como sílica o alúmina (catálisis heterogénea). Su alta eficiencia catalítica se explica en función de su alta relación superficie/volumen en comparación con otros sistemas como mencionamos anteriormente (Li y cols, 2011) (Durand y cols, 2008).

1.2.- Tensioactivos

Los tensioactivos llamados también surfactantes o agentes de superficie activa, se definen como sustancias que reducen la tensión superficial de un líquido, y que sirven como agente humectante o detergente. El término surfactante, es un anglicismo del termino anglosajón “**Surface Active Agent**” (Agente Activo de Superficie). Del mismo modo, se define tensión superficial como la acción de las fuerzas moleculares, en virtud de la cual, la capa exterior de los líquidos tiende a contener el volumen de estos dentro de la mínima superficie.

En cuanto a su estructura la constitución química de un tensioactivo comprende grupos hidrofílicos y grupos hidrofóbicos (Myers, 1998), véase Figura 3.

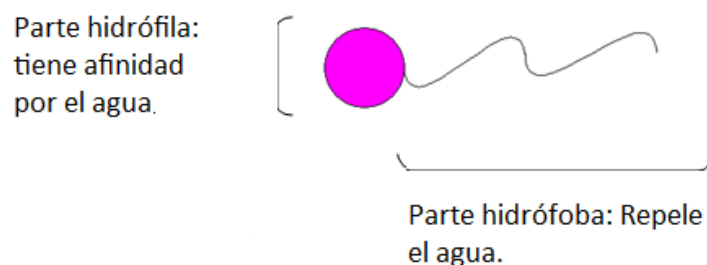


Figura 3. Esquema general de la estructura química de un tensioactivo.

En disolución acuosa, la parte hidrofílica de la molécula interacciona más favorablemente con medios polares, mientras que la parte hidrofóbica lo hace con moléculas apolares.

Atendiendo a la naturaleza de su grupo hidrófilo, los tensioactivos se pueden clasificar en no iónicos, catiónicos, aniónicos y anfóteros (Cantarero, 2010).

Los **tensioactivos aniónicos** son aquellos que en disolución se ionizan, quedando cargados negativamente. Se emplean en la formulación de detergentes de uso doméstico e industrial. Son del tipo: sulfonato, sulfato, fosfato, sulfosuccinato, sulfoacetato, derivados de aminoácidos, etc.

Los **tensioactivos no iónicos** en disolución acuosa no se ionizan, ya que poseen grupos hidrófilos del tipo alcohol, fenol, éter o amida. Algunos de estos surfactantes pueden

tornarse relativamente hidrofílicos por la presencia de una cadena poliéter del tipo polióxido de etileno. El grupo hidrófobo suele ser un radical alquilo o alquil- benceno y a veces una estructura de origen natural como un ácido graso, sobre todo cuando se requiere una baja toxicidad.

Los tensioactivos no iónicos gracias sus características se pueden usar como materias primas, como base para la formulación de diversos productos para la industria de la agricultura, curtido, látex, textiles, procesos de metales, pinturas en emulsión, petróleo, pulpa y papel, limpiadores.

Los **tensioactivos catiónicos** son aquellos que en disolución se ionizan, y el grupo hidrófobo queda cargado positivamente. Generalmente, están formados, al menos, por una cadena de 8 a 25 átomos de carbono, derivada de ácidos grasos o de un derivado petroquímico, un nitrógeno cargado positivamente. Además, suelen estar constituidos por una cadena larga de sales de amonio cuaternarias o sales de alquilaminas. Son muy relevantes en la industria por su eficiencia bactericida, germicida, algicida, etc. Algunos ejemplos son: metosulfato, derivados de imidazolina, óxidos de amina y sales de aminas.

Los tensioactivos **anfóteros** resultan de la combinación dentro de una misma molécula de dos caracteres: aniónico y catiónico. Algunos de estos tensioactivos son insensibles al pH, otros son catiónicos a pH ácido, y otros de tipo aniónico a pH alto. Estos tensioactivos son en general bastante caros, por lo que su ámbito de aplicación es más reducido. Algunos ejemplos de ellos son aquellos que contienen aminoácidos, betaínas o los fosfolípidos en su estructura.

Hace más de tres décadas surgieron los **tensioactivos poliméricos** que se sintetizan por asociación de estructuras polimerizadas de tipo hidrofílico o lipofílico, en forma de bloques o de injertos. Se suelen utilizar en procesos donde están involucradas macromoléculas naturales como en la deshidratación del petróleo (Salaguer, 2002).

Respecto a las propiedades generales de los tensioactivos es importante destacar las siguientes (Cantarero, 2010):

1.- Compuestos anfífilicos

Son aquellos que contienen en su molécula uno o varios grupos polares y uno o varios grupos no polares, que suelen ser cadenas hidrocarbonadas solubles en disolventes

orgánicos; y un grupo iónico soluble en agua. Debido a su estructura, cuando se pone en contacto una cantidad muy pequeña de tensioactivo con el agua aparecen dos tendencias opuestas; por una parte, el grupo hidrofílico del tensioactivo tiende a situarse en el interior del medio acuoso; y por otra, las moléculas de agua tienden a expulsar del medio acuoso las cadenas hidrófobas.

2.- Humectabilidad

Constituye un mecanismo fundamental que interviene en la mayor parte de las aplicaciones que implican a los agentes tensioactivos. Es una característica que depende de las propiedades superficiales.

3.- Poder espumante

La espuma se puede definir como un conjunto de celdas gaseosas separadas por láminas delgadas de líquido. La formación de espuma depende también de las propiedades superficiales de las disoluciones de los agentes tensioactivos.

4.- Formación de micelas

Cuando un compuesto anfifílico se encuentra en disolución acuosa, para evitar la interacción desfavorable entre la parte hidrófoba y el disolvente, además de adsorberse en la interfaz, existe otra alternativa que es la de asociarse entre sí formando agregados moleculares, iónicos o mixtos llamados micelas, que se forman por encima de una cierta concentración, denominada concentración micelar crítica (C.M.C.) (Cantarero, 2010).

Existen diferentes tipos de micelas, cuyas estructuras van a depender del balance entre la parte hidrófila y lipófila que prevalezca en la molécula del tensioactivo. Así, encontramos, **micelas inversas**, en las que las colas de hidrocarburos (región hidrofóbica) están orientadas hacia la fase oleosa, mientras que los grupos polares (región hidrofílica) se encuentran en el interior de la micela, disueltos en agua u otro disolvente polar confinado en su interior (véase figura 4a).

O bien, podemos encontrar las **micelas directas**, en las que la parte hidrofílica está en contacto con la disolución, mientras que la parte hidrofóbica lo hace hacia el interior de la estructura micelar (Cruces, 1998) (véase figura 4b).

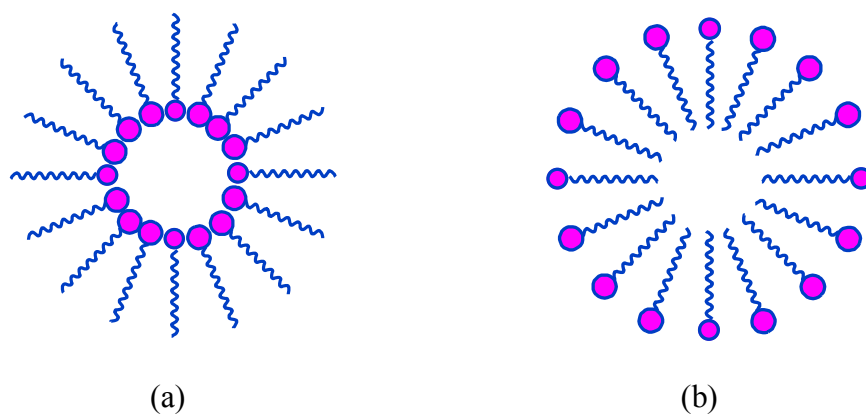


Figura 4. (a) Micela inversa formada en un disolvente orgánico apolar. Los grupos polares del tensoactivo se orientan en el interior acuoso, mientras que sus cadenas hidrofóbicas están en contacto con el disolvente apolar (externo). (b) Micela directa formada en una disolución acuosa. Los grupos polares de las moléculas del tensoactivo están en la superficie en contacto con la fase acuosa y las regiones hidrocarbonadas, se encuentran en el interior de la micela.

Existen múltiples usos y aplicaciones para los tensoactivos, entre los cuales destacan las siguientes recogidas en la Tabla 1:

APLICACIONES Y USOS DE LOS TENSOACTIVOS	
Emulsificantes	Teñido
Dispersantes	Blanqueado
Mojado	Suavizantes
Espumado o rompimiento de espuma	Lubricantes
Impermeabilizantes	Humectante
Germicidas	Detergencia
Insecticidas	Engrase y desengrase

Tabla 1. Algunos usos y aplicaciones de los tensoactivos (Solé, 2014).

Por último, es interesante hacer una pequeña mención a los tensoactivos geminis. Los tensoactivos geminis constituyen un grupo de sustancias anfífilas que poseen dos o más grupos polares, y dos o más cadenas hidrófobas. Mientras que las moléculas de los tensoactivos convencionales contienen una o dos cadenas hidrocarbonadas unidas a un

mismo grupo polar. Algunas características estructurales de los tensioactivos geminis son las siguientes (Antelo, 2008):

- 1.- Todos los tensioactivos geminis poseen al menos dos cadenas hidrófobas y dos grupos iónicos o polares.
- 2.- El puente entre dichas cadenas puede ser corto (dos grupos metileno) o largo (doce grupos metileno); rígido (benceno) o flexible (cadena de metilenos); polar (poliéter) o no polar (alifático, aromático), y puede servir para unir las cabezas polares o átomos de carbono de la cadena hidrocarbonada próximos a ellas.
- 3.- El grupo polar puede ser positivo (amonio), negativo (fosfato, sulfato, carboxilato), no iónico (poliéter, azúcar) o zwitteriónico. La mayor parte de los tensioactivos geminis poseen moléculas simétricas, es decir, con los grupos polares iguales, e idénticos grupos no polares. Sin embargo, también se han sintetizado tensioactivos geminis con distintos grupos polares y con cadenas hidrocarbonadas diferentes (véase Figura 5).

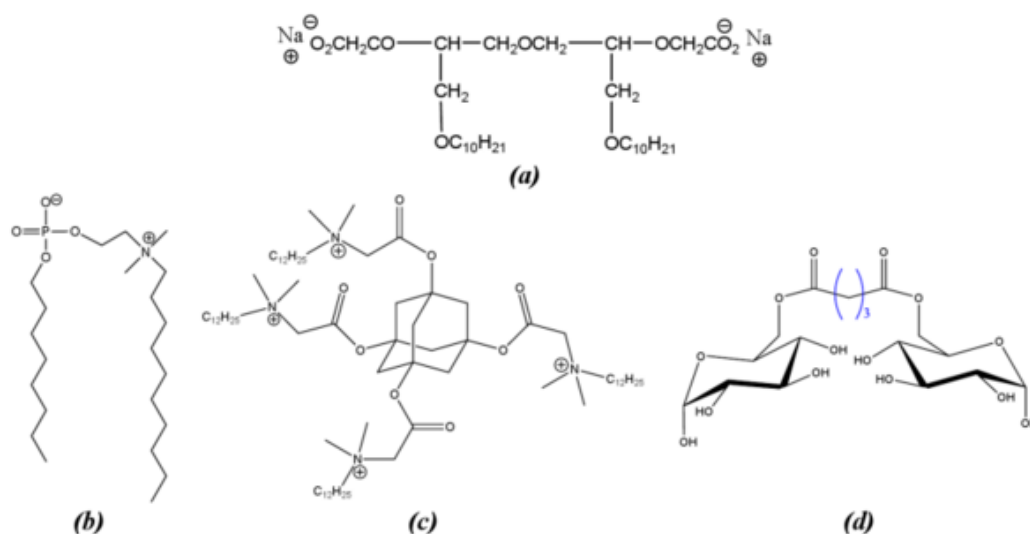


Figura 5. Algunos ejemplos de surfactantes tipo gemini sintetizados hasta la actualidad: (a) tensioactivo gemini aniónico, (b) tensioactivo gemini zwitterionico, (c) tensioactivo gemini tetramero catiónico, (d) tensioactivo gemini no iónico (Antelo, 2008).

Finalmente, cabe mencionar algunas propiedades de este tipo particular de surfactantes: (i) la CMC de los tensioactivos geminis es menor que la de los tensioactivos ordinarios homólogos en uno o dos órdenes de magnitud. Una de las posibles razones de

esta disminución en el valor de la CMC es que se ha encontrado que hay un mayor empaquetamiento de los grupos hidrófobos de los gemini en la interfase aire-agua con respecto a los surfactantes convencionales; (ii) por otra parte, los tensioactivos geminis poseen una capacidad para disminuir la tensión superficial del agua que es de hasta tres órdenes de magnitud superior a la de los tensioactivos ordinarios. Cuando el grupo que actúa como puente es pequeño o hidrófilo, el acomodamiento de los grupos lipófilos en la interfase aire-agua es más compacto que en los tensioactivos convencionales y, por lo tanto, la concentración del tensioactivo en esa interfase es mayor, lo que causa una mayor disminución de la tensión superficial (Antelo, 2008).

1.3.- Biomoléculas

1.3.1.- Ácidos nucleicos: ADN y ARN

Los ácidos nucleicos se pueden definir como biopolímeros de elevado peso molecular formados por otras subunidades estructurales o monómeros denominados nucleótidos. Son las biomoléculas portadoras de la información genética (Burriel, 2010). De acuerdo a la composición química, los ácidos nucleicos se clasifican en ácidos ribonucleicos (ARN) y en ácidos desoxirribonucleicos (ADN), que se encuentran en todos los tipos celulares.

Los nucleótidos son las unidades básicas que forman los ácidos nucleicos como se mencionó anteriormente. Cada nucleótido está constituido por tres componentes:

- 1.- Una molécula de pentosa (polisacárido con 5 átomos de carbono). El ADN contiene en su estructura la **desoxirribosa**, mientras que el ARN está formado por **ribosa**.
- 2.- Una molécula de ácido fosfórico.
- 3.- Una base heterocíclica nitrogenada. Éstas últimas son las responsables a través de la secuencia y de los acoplamientos, de la conservación y transmisión de la información genética. Las bases nitrogenadas se clasifican en **púricas** y **pirimidínicas**. En el ADN, las bases púricas son la adenina y la guanina, mientras que las bases pirimidínicas son la citosina y la timina; en el ARN, el uracilo sustituye a la timina (Burriel, 2010).

Los átomos de oxígeno y de nitrógeno de las bases pueden actuar como donadores o aceptores, y formar puentes de hidrógeno, interacción fundamental que mantiene unida la doble hélice.

Los ácidos nucleicos pueden formar diferentes estructuras en el ADN. La estructura primaria está definida por su estructura de enlaces covalentes y la secuencia de nucleótidos. Ésta determina la configuración de la macromolécula. Por otra parte, la estructura secundaria y terciaria establece la configuración de la macromolécula.

La doble hélice se mantiene estable, principalmente, por dos tipos de fuerzas: (i) los enlaces de hidrógeno entre pares de bases complementarias de las dos cadenas; y (ii) las interacciones de apilamiento de las bases (interacciones “ π -stacking”), a través de las cuales los pares de bases se encuentran parcialmente superpuestos, de forma que esta disposición favorece las interacciones de apilamiento de parejas de base situadas entre planos vecinos (Robertazzi y cols., 2006).

En la actualidad, el ADN juega un papel muy importante en la tecnología, y se ha convertido en un mecanismo para estudiar y entender los procesos de la vida, en la medicina, biología y en otras ramas de la ciencia.

Por otro lado, el ARN interviene junto al ADN en la síntesis de proteínas y del traslado de la información genética del ADN. El ARN copia la información de cada gen del ADN y luego esta pasa al citoplasma, donde se une al ribosoma para dirigir la síntesis proteica.

Existen diferentes tipos de ARN: el ARN mensajero (ARNm), conocido como ARN codificante, posee el código genético que determina el esquema de los aminoácidos para formar una proteína; el ARN transferencia (ARNt) se encarga de llevar los aminoácidos a los ribosomas con el fin de incorporarlos al proceso de síntesis proteica, asimismo, se encarga de codificar la información que posee el ARN mensajero a una secuencia de proteínas; y por último, el ARN ribosómico (ARNr) que forma parte de los ribosomas y actúa en la actividad enzimática, encargándose de crear los enlaces peptídicos entre los aminoácidos del polipéptido en el proceso de síntesis de proteínas (Gómez-Jarabo, 2012).

1.3.2.- Lisozima

La **lisozima**, también conocida como muramidasa (N-acetil muramidaglicano hidrolasa, E. C. 3. 2.1. 17), fue descubierta en 1922 por Alexander Fleming (Carrillo, 2013), véase figura 6.

La lisozima de clara de huevo (HEW) fue la primera proteína que fue secuenciada y que tenía los veinte aminoácidos convencionales, además de ser también la primera de la

que se obtuvo un análisis cristalográfico completo, y de la que se proporcionó un mecanismo de reacción detallado. Desde su descubrimiento esta proteína ha jugado un papel muy importante en los modelos enzimáticos, y en muchos aspectos de la biología moderna, incluyendo la química de proteínas, cristalografía, resonancia magnética nuclear (NMR), inmunología y plegamiento de proteínas.(Carrillo, 2013).

La lisozima se encuentra en muchos organismos vivos. En los humanos, la lisozima juega un papel muy importante en la defensa frente a las infecciones. Por ejemplo, en las lágrimas se encuentra en cantidades comprendidas entre 3.000 y 5.000 $\mu\text{g/mL}$, y protege frente a bacterias y virus. En la saliva protege frente una gran variedad de microorganismos como bacterias, virus y hongos de diferentes especies de *Candida*.

Además de la actividad antibacteriana, se han descrito muchas otras actividades biológicas de la lisozima como su actividad antiviral. La lisozima administrada por vía oral y cutánea previene enfermedades de la piel, como el herpes simple y la varicela, debido a su actividad antiinflamatoria (Carrillo, 2013).

Organismos internacionales como la FAO/WHO y muchos países como Alemania, Austria, Australia, Bélgica, Dinamarca, España, Finlandia, Francia, Italia, Japón y Reino Unido tienen reconocida a la lisozima de clara de huevo como una proteína no tóxica, y por ello es utilizada para fines alimentarios, farmacológicos y terapéuticos. Así, se estima que más de 100 toneladas de lisozima se emplean anualmente para estos propósitos (Carrillo, 2013).

En la industria farmacéutica, se emplea en el tratamiento de enfermedades bronco pulmonares, pastas dentales para prevención de caries, y en cremas de aplicación tópica. (Namba y cols, 1981).

La lisozima es de la clase de enzimas que destruye las paredes celulares de ciertas bacterias Gram-positivas por ruptura del enlace β (1-4) entre el ácido N-acetilmurámico (NAM) y N-acetilglucosamina del peptidoglicano (NAG), debilitando así la pared celular (Carrillo, 2013).

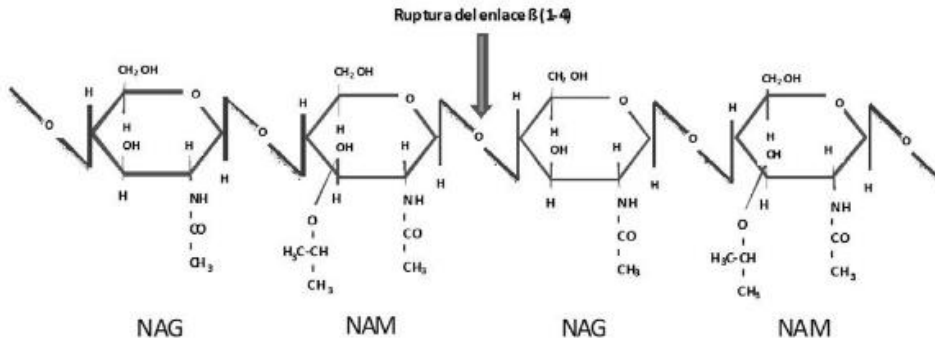


Figura 6. Se muestra el sitio de corte de la lisozima en el peptidoglicano de la pared celular de las bacterias (Carrillo, 2013).

El resultado es la penetración de agua en la célula que se hincha y acaba por estallar, teniendo lugar un fenómeno denominado lisis. En cambio, la lisozima es casi inactiva frente a microorganismos Gram-negativos, debido a la dificultad para acceder al peptidoglicano, que se encuentra protegido por la membrana externa. Esta propiedad de hidrolizar el peptidoglicano se conoce como actividad neuraminidasa o muramidasa.

De acuerdo con Jollés y Jollés (1984), las lisozimas se pueden clasificar en los siguientes tipos (Diez, 2014):

- 1.- **Lisozima tipo C (“Chicken-type”)**: aunque las lisozimas más representativas de este tipo se encuentran en la clara de huevo de ciertas aves (pollo, pato) (véase Figura 7), en este grupo también pueden englobarse la lisozima procedente de la leche humana, de rata, etc. Todas ellas poseen alrededor de 130 aminoácidos, con cuatro puentes disulfuro. Poseen una cierta actividad de quitinasa, lo que posibilita la hidrólisis de polímeros compuestos únicamente de NAG.
- 2.- **Lisozima tipo G (“goose-type”)**: esta clase de lisozimas tienen unos 185 aminoácidos y no dan reacción inmunológica cruzada con las de tipo C. También poseen cuatro puentes disulfuro.
- 3.- **Lisozimas procedentes de bacteriofagos**: el ejemplo más representativo lo constituye la lisozima codificada por el bacteriofago T4 (T4L). Esta lisozima tiene 164 aminoácidos y su secuencia no es homologa con las de las enzimas de tipo C.

4.- ***Lisozimas procedentes de bacterias y hongos***: la enzima lítica producida por el hongo Chalara (lisozima Ch), además de ser una muramidasa, posee actividad de beta-1,4-N-(6-O-diacetil) muramidasa, por lo que es capaz de hidrolizar las paredes de *S. aureus*. Su secuencia y tamaño difieren del resto de lisozimas conocidas.

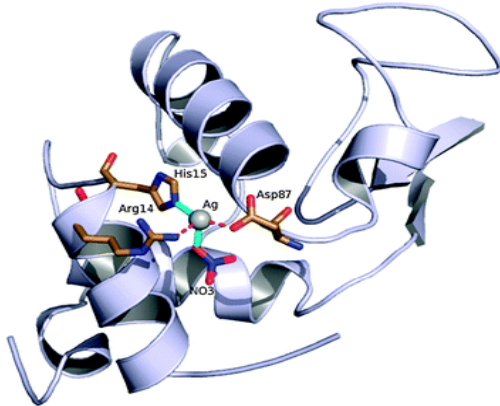


Figura 7. Estructura típica de la lisozima (Panzner y cols., 2011).

2.- OBJETIVOS

2.1 *Objetivo principal*

En este trabajo de revisión bibliográfica se pretende evaluar la eficiencia de los sistemas colorimétricos basados en nanopartículas metálicas en la detección de tensioactivos y biomoléculas.

2.2. *Objetivos específicos*

1.-Determinar cuáles son los sistemas de nanopartículas metálicas más convenientes, en cuanto a tamaño, característica del ligando protector y centro metálico, para detectar tensioactivos tanto en forma de micelas como de monómero.

2.-Determinar cuáles son los sistemas de nanopartículas metálicas más convenientes, en cuanto a tamaño, característica del ligando protector y centro metálico, para detectar diferentes biomoléculas (ácidos nucleicos como el ADN, o el ARN, y proteínas como la lisozima).

3.-Evaluar las ventajas e inconvenientes que tendría el uso del método colorimétrico basado en nanopartículas metálicas para la detección de diferentes ligandos, en comparación con otros métodos tradicionales de análisis.

4.-Evaluar la eficacia de sistemas nanopartícula/tensioactivo combinados en la detección de biomoléculas.

3.- METODOLOGÍA

En la elaboración de este trabajo, se realizó una búsqueda bibliográfica empleando las siguientes bases de datos: “Web of Science”, “PubMed” y Google académico.

Las palabras claves empleadas para la búsqueda fueron empleadas en inglés. Estas fueron: “Nanoparticle”, “Gold nanoparticle”, “Surfactant”, “Biomolecule”, “Biosensor” and “Detection”. En general, se seleccionaron aquellos artículos relacionados con la determinación de nanopartículas metálicas para la detección de tensioactivos y biomoléculas.

Las estrategias de búsqueda fueron en todo caso restringidas a la búsqueda combinada de las palabras claves anteriormente mencionadas incluidas en el título (“TI”) del artículo, haciendo hincapié en las revisiones bibliográficas. Así, se llevaron a cabo las siguientes búsquedas combinadas:

- “Gold nanoparticle” “AND” “surfactant”; “Nanoparticle*” AND “surfactant” . Se obtuvieron 586 resultados.

- “Gold nanoparticle” “AND” “biomolecule*”; “Nanoparticle*” AND “biomolecule*”. Al refinar la búsqueda añadiendo la palabra clave “biomolecule” se obtuvieron 12 resultados

- “Nanoparticle*” AND “biosensor”. Al añadir en la búsqueda el término “biosensor”, sólo se obtuvo un resultado.

El colocar el asterisco (*) al final de la palabra, nos permite ampliar la búsqueda a toda la familia léxica de dicho término.

En el caso de las búsquedas con resultados más numerosos, estas fueron restringidas posteriormente empleando la palabra clave adicional “detection” o “sensor” para seleccionar así, más restrictivamente, los artículos y/o revisiones relacionadas con este trabajo. También, se seleccionaron preferentemente las revisiones bibliográficas sobre el

tema. Es de destacar, en el caso de la interacción nanopartícula/tensioactivo que estas fueron muy escasas debido a la actualidad de la temática.

La búsqueda se restringió a artículos y revisiones bibliográficas con acceso a texto completo, publicados desde el año 1980 hasta la actualidad.

Por otro lado, para la realización de algunas figuras y esquemas dentro del texto se ha utilizado el software ChemBioDraw Ultra 12.0, ya que cuenta con una gran variedad de herramientas, símbolos y posibilidades para poder representar casi cualquier sistema químico.

4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Esta revisión se centrará principalmente en el empleo de nanopartículas metálicas para la detección de tensioactivos y biomoléculas.

En primer lugar, estudiaremos en profundidad la detección de tensioactivos y a continuación, la localización de biomoléculas, empleando nanopartículas metálicas. Posteriormente, se revisarán los últimos avances existentes hasta la fecha en relación con el empleo de sistemas que combinan nanopartículas y tensioactivos para la detección de biomoléculas.

4.1.- Empleo de Nanopartículas Metálicas para la detección de Tensioactivos

Tradicionalmente, entre los métodos de detección de diferentes tensioactivos en disolución destacan la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) o la electroforesis capilar (CE). Sin embargo, estas son técnicas que requieren un equipo costoso y sofisticado para el procesamiento de la muestra, y por tanto, suponen una pérdida de tiempo adicional en la preparación de la muestra antes del análisis instrumental (Shrivastava et cols., 2015). Además, el análisis de tensioactivos mediante estas técnicas no está exento de diferentes dificultades. Por ejemplo, en el caso de las técnicas cromatográficas, la separación de la muestra puede ser dificultosa debido a la formación de micelas en la columna.

Un método alternativo, simple, rápido y de bajo coste que se puede aplicar en muestras para la determinación de tensioactivos es el método colorimétrico, empleando nanopartículas metálicas. Esta nueva metodología tiene como ventaja fundamental que la

molécula diana se puede controlar a simple vista sin un instrumento complejo, y no es necesaria la presencia de analistas expertos para llevar a cabo la determinación. El inconveniente es que es una técnica generalmente menos sensible en comparación con las técnicas analíticas sofisticadas (Zheng et cols., 2014).

Las nanopartículas metálicas poseen unas excelentes propiedades físicas y químicas, que son intrínsecas a su tamaño nanométrico, motivo por el cual tienen numerosas aplicaciones en diferentes campos científicos como la biología y la medicina.

Destaca el uso de nanopartículas como sensores para diferentes tipos de analitos (iones, gases) en el medio ambiente, muestras biológicas y farmacéuticas. Más concretamente, en este trabajo se profundizará en su empleo como sondas para determinar la concentración de tensioactivos en diferentes productos.

Entre los diferentes tipos de nanopartículas metálicas, se observa un mayor empleo de las nanopartículas de oro (AuNPs) y de plata (AgNPs), ya que estas presentan una diversidad de propiedades interesantes, que dependen de su morfología y tamaño, entre las cuales destacan las eléctricas, catalíticas y ópticas (Belmares-Perales et cols., 2013). Sin embargo, las AuNPs son las más empleadas ya que confieren ciertas ventajas sobre las AgNPs. Algunas de ellas son:

- a) La mayor estabilidad de las nanopartículas de oro, ya que su superficie es fácilmente oxidable.
- b) El elevado coeficiente de extinción, comparado con las análogas de plata, que permite que el ensayo colorimétrico, por ejemplo, sea extremadamente sensible.
- c) Su alta biocompatibilidad con biomoléculas como el ADN o las proteínas (Zheng et cols., 2014).

Dentro de las nanopartículas de oro más estudiadas destacan las de Au@citrato cuya preparación es bastante sencilla.

El oro y la plata son metales que reflejan muy bien longitudes de onda dentro del espectro UV-visible (entre 380 nm y 780 nm). Las longitudes de onda de las radiaciones que una molécula puede absorber y la eficiencia con la que se absorben dependen de la estructura atómica y de las condiciones del medio (pH, temperatura, fuerza iónica, constante dieléctrica), por lo que dicha técnica constituye un valioso instrumento para la determinación y caracterización de biomoléculas.

La técnica de espectroscopía de absorción se basa en la capacidad de las moléculas para absorber radiaciones, entre ellas las radiaciones dentro del espectro UV-visible. Generalmente, el empleo de esta técnica, para la detección y cuantificación de diferentes compuestos, implica la preparación de diferentes disoluciones patrón de la muestra a analizar a partir de una disolución concentrada del compuesto a analizar, cuyas banda/s de absorción se encuentran comprendidas en la región de UV-vis del espectro (200- 800 nm). Una vez determinado el valor de longitud de onda (λ) al que el compuesto presenta la mayor absorbancia ($\lambda_{\text{máx}}$), para cada disolución se mide la absorbancia correspondiente a dicho $\lambda_{\text{máx}}$ frente a un blanco que contenga el disolvente de la disolución de la muestra a caracterizar, obteniéndose la recta de calibrado del sistema. Esta recta permitirá la determinación cuantitativa de una muestra de concentración desconocida de dicho compuesto, midiendo su absorbancia correspondiente e interpolando en la recta de calibrado. Sin embargo esta técnica requiere que el compuesto problema absorba de forma significativa en la región UV-visible, característica que por lo general no poseen la mayor parte de los tensioactivos estudiados. Así, en la siguiente sección se describirá un método alternativo para la determinación de tensioactivos no coloreados basado en la técnica espectroscopía de absorción fundamentado en el uso de nanopartículas metálicas.

Por otro lado, como ya se indicó en la introducción, los tensioactivos son compuestos orgánicos que contienen grupos hidrófilos e hidrófobos, cuya estructura puede variar en función de las características de la cabeza polar y de la cola apolar, así como en función de su carga. Algunos ejemplos de los tensioactivos, cuya presencia en disolución está siendo detectada con más frecuencia en presencia de nanopartículas, se muestran en la Tabla 2. Así mismo, la figura 8 recoge como ejemplo algunas de las estructuras químicas de estos tensioactivos.

Nótese que los tensioactivos catiónicos, así como aquellos que poseen cadenas carbonadas en su estructura frente a los tensioactivos que poseen grupos aromáticos y tensioactivos géminis, son los que aparecen con mayor frecuencia en dicha tabla.

CÓDIGO	TIPO DE TENSIOACTIVO	REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA
TENSIOACTIVOS CATIÓNICOS		
C.1	Bromuro de deciltrimetilamonio (C ₁₀ TAB)	(Kuong et cols., 2007)
C.2	Bromuro de dodeciltrimetilamonio (DTAB)	(Shrivias et cols., 2015) (Zheng et cols.,2014) (Kuong et cols., 2007)
C.3	Bromuro de tetradecilmetilamonio (TTAB)	(Zheng et cols.,2014) (Kuong et cols., 2007)
C.4	Bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB)	(Shrivias et cols., 2015) (Zheng et cols.,2014) (Kuong et cols., 2007)
C.5	Bromuro de octadeciltrimetilamonio (C ₁₈ TAB)	(Kuong et cols., 2007)
C.6	Bromuro de benzalconio (BZKB)	(Zheng et cols.,2014)
C.7	Cloruro de cetilpiridino (CPC)	(Shrivias et cols., 2015)
TENSIOACTIVOS ANIÓNICOS		
A.1	Dodecil sulfato sódico (SDS)	(Shrivias et cols., 2015) (Kuong et cols., 2007)
A.2	Dodecil benzeno sulfonato de sódio (SDBS)	(Shrivias et cols., 2015)
A.3	Sulfonato de dodecilbenceno de sodio (LAS)	(Wei y Mo, 2014)
TENSIOACTIVOS NO IÓNICOS		
N.1	Tween 20	(Kuong et cols., 2007)
N.2	Brij-35	(Shrivias et cols., 2015)
N.3	Tritón-X100	(Shrivias et cols., 2015)
N.4	Tritón-X114	(Shrivias et cols., 2015)

Tabla 2. Relación de algunos de los tensioactivos más estudiados empleando nanopartículas metálicas y las referencias bibliográficas donde se encuentran.

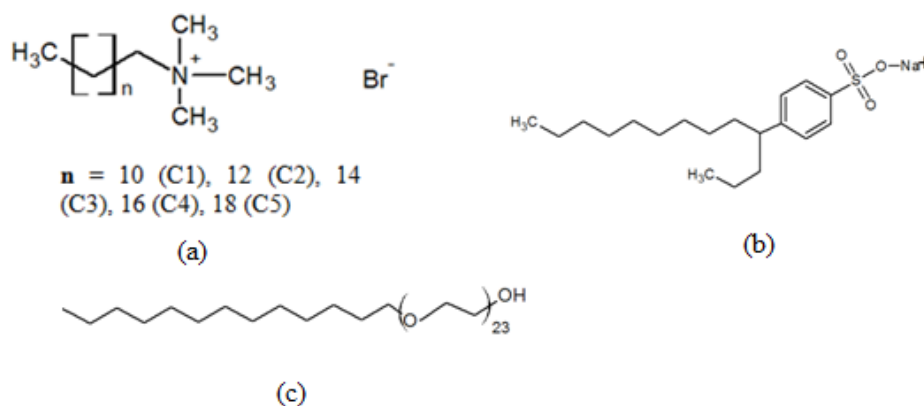


Figura 8. Estructura de algunos de los tensioactivos recogidos en la tabla 2.

(a) Estructura química general de bromuro de alquitrimetilamonio (tensioactivos catiónicos), (b) Estructura química del tensioactivo aniónico Sulfonato de dodecilbenceno de sodio (LAS), (c) Estructura química del tensioactivo no iónico Brij-35.

En primer lugar, se muestran los resultados relativos a la detección de tensioactivos catiónicos empleando nanopartículas metálicas.

4.1.1.- Empleo de Nanopartículas Metálicas para la detección de Tensioactivos Catiónicos

Como fue indicado anteriormente, el empleo de la técnica de espectroscopía de absorción UV-vis para la detección cuantitativa de diferentes analitos implica la determinación cuantitativa de la absorbancia de la muestra a una longitud de onda determinada a la que absorbe el analito, previo calibrado del sistema. Este es por tanto un método directo de cuantificación (véase la figura 9a). En cambio, cuando se extrapola este procedimiento a la detección de tensioactivos no coloreados, empleando nanopartículas metálicas, se procede mediante una determinación indirecta. Es decir, en lugar de seguir la banda del tensioactivo (en la mayoría no detectable por UV-visible, excepto en el caso de tensioactivos con grupos aromáticos en su estructura), es necesario seguir los cambios que se producen en banda SPR de la nanopartícula, así como en la longitud de onda del máximo, como consecuencia de la interacción de esta con el tensioactivo (véase figura 9b). Las características de la banda SPR de la nanopartícula depende del tipo de centro metálico, el tipo de ligando protector o estabilizante, del tamaño de las mismas y del medio (sales o codisolventes) que las rodean.

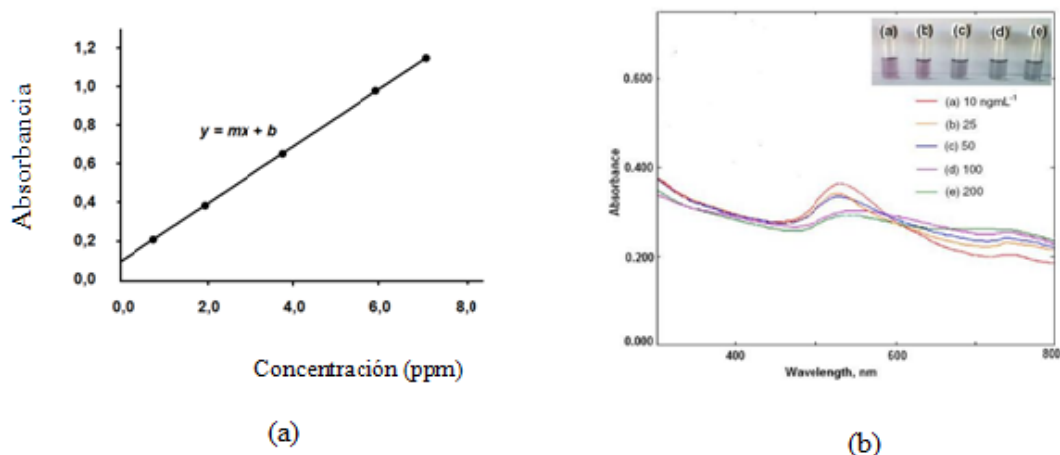


Figura 9. (a) Gráfico representativo de la recta de calibrado de un analito coloreado cualesquiera para su determinación directa (Adaptada de Castellanos, 2013). (b) Espectros de absorción UV-vis del sistema Au@tartrato/CTAB, en función de la concentración de CTAB, empleados para la determinación indirecta del tensioactivo (Adaptada de Shrivastava et cols., 2015).

Las nanopartículas empleadas para la detección de tensioactivos catiónicos son, por lo general, de carácter aniónico, es decir, su carga neta es negativa. En cuanto a su síntesis, desde un punto de vista químico, las nanopartículas en disolución (disolución coloidal) requieren del empleo de métodos que permitan obtener un control preciso sobre el tamaño y la forma de las nanopartículas para así obtener un conjunto de partículas monodispersas que presenten una propiedad determinada.

En general, la síntesis de nanopartículas metálicas en disolución se lleva a cabo mediante el empleo de los siguientes componentes:

- a) Precursor metálico
- b) Agente reductor
- c) Agente estabilizante

Destacan las de Au@citrato, cuya síntesis se basa en la reducción del ácido tetracloroáurico (HAuCl_4) con el ligando protector, generalmente citrato trisódico, en medio acuoso. Las AuNPs obtenidas por este método tienen una cubierta de iones citrato en su superficie que puede ser fácilmente reemplazados o intercambiados por otro ligando. Otro método de síntesis habitual es la reducción de la mezcla Au/citrato, en las proporciones adecuadas, empleando NaBH_4 como agente reductor, en presencia o no de un agente estabilizador como pueda ser el alcohol polivinílico. Además, son también frecuentes las nanopartículas de Au@malato y Au@tartrato cuya síntesis es equivalente (Shrivastava et cols., 2015).

Tanto la distribución de tamaño como el tamaño de la AuNPs pueden ser controlados por parámetros experimentales tales como el pH, la concentración de HAuCl_4 y la relación de concentraciones Au/ligando.

En el caso de las nanopartículas de plata existen dos métodos de síntesis característicos, que son: el método Lee-Meisel y el método Creighton. El primero consiste en una variación del método de obtención de nanopartículas de oro, en el que se emplea AgNO_3 en lugar de HAuCl_4 como precursor metálico, y citrato de sodio como agente reductor. Mediante este método se obtienen nanopartículas de plata con una distribución amplia de tamaño de partícula (polidispersas).

El método Creighton consiste en la reducción de AgNO_3 con el agente reductor NaBH_4 . Este método es el más utilizado en la actualidad y da lugar a la obtención de

nanopartículas de plata de aproximadamente 10 nm y con una distribución estrecha de tamaños (monodispersas) (Monge, 2009).

La detección colorimétrica usando AuNPs se basa en la distancia de la resonancia del plasmón de superficie de AuNPs. Es por eso, que las AuNPs dispersas poseen un color que tiende más al rojo (amarillo, rosa, rojo) y un máximo de absorción alrededor de 520 nm, mientras que las AuNPs agregadas tienen un color más próximo al azul (verde, azul o púrpura), y la intensidad de absorción de la muestra a longitudes de onda superiores se incrementa. Por tanto, es fundamental en la detección colorimétrica lograr una interacción selectiva entre el analito y las AuNPs que induzca la agregación/desagregación del sistema. Existen dos estrategias básicas que han sido empleadas en dicha detección: (a) la agregación y (b) la desagregación inducida por el analito. La figura 10 muestra un esquema representativo de ambas estrategias.

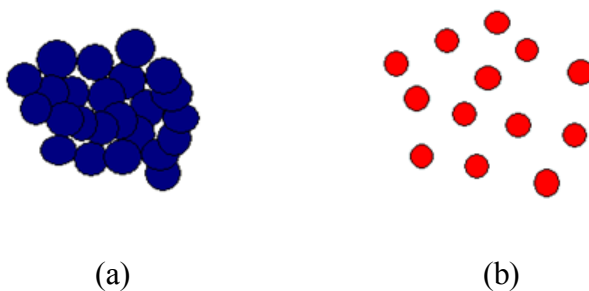


Figura 10. (a) Esquema representativo de un sistema de nanopartículas en estado agregado (b) Esquema de un sistema de nanopartículas en estado desagregado.

A continuación, en la Tabla 3 se expone una comparativa entre el tamaño de las nanopartículas, el incremento de la longitud de onda observado y las CMC teóricas y experimentales de los diferentes tipos de tensioactivos más utilizados en diferentes estudios realizados hasta la fecha.

Tipo de Nanopartícula /Referencia	Diámetro NPs (nm)	Tensioactivo (T)	$\Delta\lambda_{\text{máximo}}$ (nm)	$[T]_{\Delta\lambda_{\text{máximo}}}$ (mM)	CMC_{exp} (mM)	CMC_t (mM)/ Referencia
Au@citrato (Kuong et cols., 2007)	(23 ± 3)	C ₁₀ TAB	255.5	5.0	50 - 100	65 (Lee, 2011)
Au@citrato (Kuong et cols., 2007)	(23 ± 3)	DTAB	253.7	0.5	10 - 50	14.6–16.0 (Aguiar et cols.,2003)
Au@citrato (Kuong et cols., 2007)	(23 ± 3)	TTAB	226.5	0.1	1.0 – 5.0	3.60–3.72 (Aguiar et cols.,2003)
Au@citrato (Kuong et cols., 2007)	(23 ± 3)	CTAB	201.3	0.01	0.5 – 1.0	0.92–1.00 (Aguiar et cols.,2003)
Au@citrato (Kuong et cols., 2007)	(23 ± 3)	C ₁₈ TAB	201.3	0.01	0.1 - 0.5	0.21 (Islam et cols., 2015)
Au@citrato (Zheng et cols.,2014)	17	DTAB	-	0.01	< 0.1	14.6–16.0 (Aguiar et cols.,2003)
Au@citrato (Zheng et cols.,2014)	17	CTAB	-	0.001	0.1	0.92–1.00 (Aguiar et cols.,2003)
Au@citrato (Zheng et cols.,2014)	17	BZKB	-	0.003	0.1	4.80 (Mahmood et cols., 2016)
Au@tartrato (Shrivastava et cols., 2015)	(4.4 ± 1.0)	CTAB	194	0.00137	< 0.00137	0.92–1.00 (Aguiar et cols.,2003)
Au@tartrato (Shrivastava et cols., 2015)	(4.4 ± 1.0)	CPC	210	0.00056	<0.00056	1.24 (Ontiveros et cols.,2011)
Au@tartrato (Shrivastava et cols., 2015)	(4.4 ± 1.0)	DTAB	202	0.00097	<0.00097	14.6–16.0 (Aguiar et cols.,2003)

Tabla 3. Análisis comparativo de distintos parámetros para la detección de algunos de los tensioactivos más comunes en diferentes estudios, donde CMC_{exp} y CMC_t corresponden a la concentración micelar crítica experimental y teórica.

Tras el análisis de la Tabla 3, pueden extraerse una serie de conclusiones interesantes. En primer lugar, la discusión se centrará en la detección del tensioactivo como monómero, y en segundo lugar en la detección de la CMC del tensioactivo, y por tanto, de la formación de estructuras micelares.

Para caracterizar la detección del tensioactivo en forma monómero se han tenido en cuenta dos parámetros: (i) $\Delta\lambda_{\text{máximo}}$, es decir, el incremento entre la longitud de onda del máximo de absorción de la nanopartícula libre (en ausencia de tensioactivo), que proporciona disoluciones de color rojo) y el valor de la longitud de onda del máximo de absorción de la banda, que surge como consecuencia de la interacción del tensioactivo monómero con la nanopartícula en su estado más agregado (disoluciones color azul) (véase figura 11); y (ii) la concentración de tensioactivo a la cual se produce incremento de longitud de onda máximo, anteriormente descrito ($[T]_{\Delta\lambda \text{ máxima}}$).

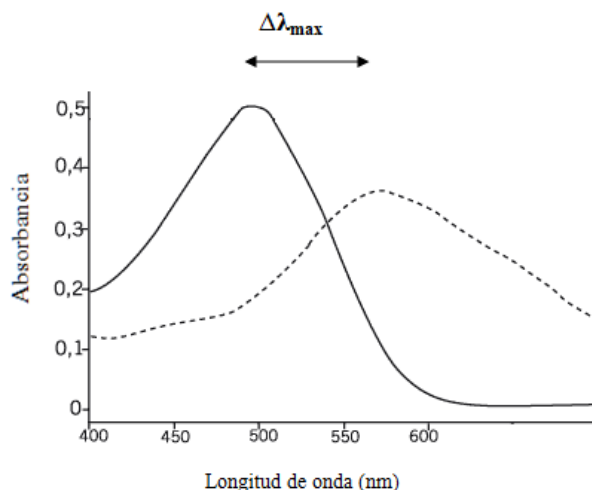


Figura 11. Representación gráfica del incremento de longitud de onda máximo ($\Delta\lambda_{\text{max}}$) (Adaptada de Duymovich et cols., 2005).

Estos dos parámetros dan cuenta de cuál es el sistema de nanopartícula, en cuanto a tamaño, naturaleza del centro metálico y del ligando protector más idóneos para lograr una determinación más sensible del tensioactivo en forma monómero. Teniendo en cuenta estas premisas, y atendiendo a los datos recogidos en la Tabla 3, se puede extraer la siguiente información:

1.-Se deduce que las nanopartículas de Au@citrato de menor tamaño son más sensibles para la detección de los tensioactivos de cadena alifática DTAB y CTAB. Así, las nanopartículas Au@citrato de diámetro (23 ± 3) nm detectan al tensioactivo DTAB y CTAB a una concentración de 0.5 y 0.01 mM, respectivamente, en comparación con la mayor concentración de tensioactivo requerida en el caso de las nanopartículas de estructura equivalente y tamaño inferior (17 nm). Es importante destacar que no es posible extraer información en este caso del incremento de longitud de onda producido al no existir datos disponibles en la bibliografía en el caso de las nanopartículas de Au@citrato de 17 nm.

2.- Cuando se compara el sistema Au@tartrato con el sistema Au@citrato para la detección de DTAB y CTAB, se concluye que el sistema Au@tartrato es más sensible a la detección de estos tensioactivos en forma monómero. De esta forma para incrementos de longitud de onda máximo muy similares en ambos sistemas, se observa el máximo de agregación del sistema a una concentración de tensioactivo dos órdenes de magnitud más pequeña en el caso de las nanopartículas Au@tartrato respecto a la que presenta el sistema Au@citrato. Nótese en este caso que estos sistemas son diferentes en cuanto a las características del ligando protector que recubre el oro, y también en cuanto al tamaño del sistema. Por consiguiente, de nuevo, las nanopartículas de menor tamaño proporcionan límites de detección inferiores.

3.- Por otro lado, haciendo referencia únicamente a los tensioactivos pertenecientes al grupo de los bromuros alquiltrimetilamonio, se observa que para un mismo sistema de nanopartículas, se obtiene un nivel de detección más sensible en el caso de los tensioactivos que poseen una mayor longitud en su cadena carbonada. Así, a medida que aumenta el número de carbonos de la cadena carbonada, el $\Delta\lambda_{\text{máxima}}$ es mayor, a la vez que $[T]_{\Delta\lambda \text{ máxima}}$ disminuye. Esta secuenciación es equivalente independientemente del tamaño de la nanopartícula y de la naturaleza del ligando protector.

4.- Finalmente, en cuanto al cálculo de la CMC, vemos como la CMC experimental, obtenida mediante análisis colorimétrico, se encuentra dentro de los rangos establecidos por la CMC teórica, obtenida por otras técnicas más convencionales de análisis, como HPLC o medidas de conductividad o de tensión superficial, señaladas en las referencias adjuntas a la Tabla. Es importante destacar como los datos de la CMC experimental

obtenidos por el método colorimétrico para las nanopartículas Au@citrato de mayor diámetro son los más próximos al valor de la CMC teórica.

4.1.2.- Empleo de Nanopartículas Metálicas para la detección de Tensioactivos Aniónicos

En este caso se encuentran muy escasas referencias en la bibliografía. Destaca sin embargo, un estudio en el que se demostró que la determinación de los tensioactivos aniónicos en agua, se basa en la formación de pares iónicos de dichos tensioactivos con el colorante azul de metileno ($C_{16}H_{18}N_3ClS$). Se comprobó que las nanopartículas magnéticas recubiertas con poli (ácido acrílico) de magnetita (PPA@Fe₃O₄) podían adsorber el colorante azul en agua rápidamente y se producía un cambio obvio en la absorción óptica que varía de 662 hasta 590 nm, esto muestra la separación espectral entre el tinte y el par de iones. La detección se basa en que el color o la longitud de onda de absorción del azul de metileno cambian cuando se une al carboxilo de las nanopartículas (Wei y Mo, 2014).

En conclusión, los tensioactivos aniónicos en agua pueden ser determinados directamente sin extracción y/o separación mediante el uso del colorante azul de metileno y las nanopartículas magnéticas modificadas.

Las propiedades únicas de las nanopartículas magnéticas, incluyendo el superparamagnetismo y la alta capacidad de adsorción, son una alternativa eficaz a los materiales convencionales utilizados en la preparación de la muestra y la eliminación de contaminantes.

Uno de los métodos de síntesis más común utiliza FeCl₃ como fuente de los átomos de hierro y se descompone con dietilenglicol en presencia de PAA (ácido poliacrílico) y NaOH que cataliza la reacción. La síntesis de las nanopartículas PAA@ Fe₃O₄ tiene una buena dispersabilidad y un tamaño promedio de 9 nm.

El tensioactivo aniónico que se utilizó en este trabajo es el sulfonato de dodecibenceno de sodio (LAS) (Wei y Mo, 2014).

4.1.3.- Empleo de Nanopartículas Metálicas para la detección de Tensioactivos No Iónicos

En la actualidad, no consta bibliografía suficiente para desarrollar este apartado, pero si se mencionan algunos ejemplos de tensioactivos no iónicos en trabajos relacionados

con la detección de tensioactivos catiónicos y aniónicos como Tween 20, Brij-35, Tritón-X100 o Tritón-X114 (Kuong et cols., 2007), (Shrivastava et cols., 2015).

Los tensioactivos no iónicos están formados por una cadena alquílica larga y un grupo sin carga pero muy polar. Los grupos polares más utilizados son: polioles (a veces azúcares naturales), polioxietilenos (éteres de polialcohol), diaminas y aminas etoxiladas.

Estos tensioactivos no producen iones en disolución acuosa y por este hecho son compatibles con cualquier otro tipo de tensioactivos.

4.2.- Empleo de Nanopartículas Metálicas para la detección de Biomoléculas

El empleo de nanopartículas como marcadores o sensores para la detección de biomoléculas en lugar de moléculas o marcadores fluorescentes convencionales es un tema de interés reciente (Tansil y Gao, 2006). Estos avances han conducido a una mejora significativa tanto en selectividad, sensibilidad como en la capacidad de formación de complejos biomolécula-receptor. En este apartado del trabajo de revisión se resumirán los últimos sistemas de nanopartículas empleados en la detección de biomoléculas, así como los diferentes modos de unión de las nanopartículas con biomoléculas como el ADN y el ARN, algunos parámetros termodinámicos de la interacción nanopartícula-biomolécula extraídos de los últimos estudios, y finalmente algunas de las aplicaciones más relevantes estudiadas hasta la fecha.

4.2.1. Tipos de Nanopartículas empleadas para la detección de Biomoléculas

Como se ha mencionado anteriormente en este trabajo, las nanopartículas pueden encontrarse desnudas o sin funcionalizar (“naked nanoparticles”) o funcionalizadas con diferentes tipos de ligandos (“functionalized nanoparticles”).

La funcionalización de las AuNPs con proteínas, péptidos y oligonucleótidos ha permitido el desarrollo de nuevos sensores para la detección altamente sensible de estas biomoléculas y las interacciones biomoleculares. Así en la bibliografía puede distinguirse entre:

1.- Funcionalización de las AuNPs con péptidos y proteínas (Zhang et cols., 2016).

Se estudiaron las cuatro estrategias principales para el enlace de una proteína o un péptido a las AuNPs:

- a) Absorción electrostática.
- b) Conjugación con un ligando en la superficie de la AuNP.
- c) Conjugación a una molécula cofactor pequeña que la proteína puede reconocer y unir.
- d) Conjugación directa a la superficie de la AuNP.

2.- Funcionalización de las AuNPs con ácidos nucleicos (Zhang et cols., 2016).

El uso de ácidos nucleicos en combinación con AuNPs ha abierto nuevos horizontes para la detección de diferentes analitos. Esta metodología se basa normalmente en el estudio del objetivo con aptámeros específicos, es decir, secuencias de ADN individuales o cadenas de ARN, y el cambio de configuración o conformación resultante de los aptámeros.

Cabe mencionar que los aptámeros son ácidos nucleicos de cadena sencilla (ssDNA y RNA) capaces de reconocer de forma específica y con alta afinidad a varios tipos de moléculas diana mediante un plegamiento tridimensional de su cadena. Generalmente son obtenidos mediante su selección desde genotecas de oligonucleótidos combinatoriales, mediante el método SELEX (**Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment**), que permitirá seleccionar aquel oligonucleótido de la genoteca utilizada que se une con más afinidad a la molécula diana. Esta metodología ha sido ampliamente estudiada y ha demostrado ventajas especiales

3.- Funcionalización con otro tipo de ligandos.

La incorporación de un ligando apropiado puede modificar las propiedades físicas del material que forma la nanopartícula y mejorar sus aplicaciones. Bajo este punto de vista los dendrímeros son adecuados para promover ordenamientos definidos de los materiales y mejorar las características físicas (ópticas, magnéticas, etc.) de estos sistemas, debido principalmente a la capacidad de control de su estructura y composición.

Los calixarenos, viológenos dicatiónicos y las α,ω - diaminas alifáticas lineales también son otros ejemplos de ligandos para la funcionalización de las nanopartículas (Guerrini, 2008).

A continuación se muestran algunos ejemplos de pequeñas moléculas e iones que se han detectado mediante un método colorimétrico utilizando AuNPs funcionalizadas con proteínas o ácidos nucleicos (Tabla 4):

Tamaño NPs (nm)	Analito	Detección de la sonda y/o método	Límite de detección (nM)	Referencia
13	Melanina	AuNPs funcionalizadas con HS-oligonucleótido	41.7	(Huang et cols., 2011)
13	Dopamina	(DBA)“Dopamine binding aptamer”, aptámero de unión de la dopamina como un elemento de reconocimiento.	$3.6 \cdot 10^{-4}$	(Zheng et cols.,2011)
20	Cisteína	Nanopartículas de Cisteína combinada con Hg^{2+} , y AuNPs funcionalizadas con oligonucleótidos dispersas	100	(Lee et cols., 2008)
13	Kanamicina	Kanamicina unida al conjugado AuNPs-aptámero	25	(Song et cols., 2011)
13	Ochratoxina A	OTA induce un cambio conformacional en su aptámero	20	(Yang et cols., 2011)
42	Hg^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+}	AuNPs recubiertas con papaína.	200	(Guo et cols., 2011)

Tabla 4. Ejemplos de diferentes analitos detectados haciendo uso del método colorimétrico basado en AuNPs funcionalizadas con proteínas o ácidos nucleicos.

Teniendo en cuenta los datos recogidos en la tabla 4, se procede a comentar una serie de cuestiones, como por ejemplo, que sistema es mejor para detectar biomoléculas, cuál es el tamaño de nanopartícula más adecuado para dicha detección, o como influye el analito.

El límite de detección se define como la cantidad o concentración mínima de sustancia que puede ser detectada con fiabilidad por un método analítico determinado, por tanto, un valor menor del mismo indica una mayor sensibilidad de la técnica de detección.

De los casos propuestos en la tabla 4, la dopamina es el analito con menor límite de detección ($3.6 \cdot 10^{-4}$ nM), y por tanto el que se determina con mayor sensibilidad empleando el método colorimétrico.

Por otra parte, si comparamos el tamaño de las AuNPs con el límite de detección pueden extraerse las siguientes conclusiones:

- En el caso de las AuNPs con un tamaño de 13 nm se observan límites de detección que varían entre $3.6 \cdot 10^{-4}$ nM y 41.7 nM, siendo la dopamina el de menor valor y la melanina el de mayor valor.
- Las AuNPs de mayor tamaño 20 y 42 nm presentan unos valores del límite de detección mucho mayores.
- En cuanto a la influencia de los analitos en la técnica de detección, se observa que los iones Hg^{2+} , Pb^{2+} y Cu^{2+} poseen un mayor límite de detección en comparación con la dopamina o la kanamicina que tienen una estructura mucho mas compleja.

Se concluye por tanto que:

- 1.- Un valor menor del límite de detección indica una mejor técnica de análisis.
- 2.- Las nanopartículas de menor tamaño reflejan un menor límite de detección.
- 3.- Analitos con una estructura molecular voluminosa, y que por tanto ofrecen mayor impedimento estérico, poseen un menor límite de detección.

4.2.2. Modos de unión de las nanopartículas con los ácidos nucleicos y proteínas

Es interesante mencionar las posibles uniones no covalentes de moléculas pequeñas denominadas ligandos con el ADN. La naturaleza de las especies químicas que interaccionan con el ADN varía desde cationes metálicos sencillos hasta ligandos de un grado elevado de complejidad, como el de las entidades supramoleculares que resultan de un proceso de autoensamblaje entre ligandos orgánicos y cationes metálicos. Así, las moléculas de tamaño relativamente pequeño, como las nanopartículas, pueden interaccionar con los ácidos nucleicos de acuerdo con diferentes modos de unión:

- 1.- Interacción electrostática
- 2.- Unión externa
- 3.- Unión al surco
- 4.- Intercalación

1.- Interacciones electrostáticas (Lorente y Fernández, 2008).

La estabilidad de las conformaciones plegadas del ADN precisa de las interacciones con cationes metálicos como Na^+ y Mg^{2+} . La interacción de moléculas orgánicas catiónicas con los grupos fosfato cargados negativamente del ADN estabiliza el polímero al evitar las fuerzas repulsivas entre los fosfatos provocando además la liberación de contraiones lo que proporciona una contribución entrópica adicional a la energía libre de enlace. En el caso de los sistemas de nanopartículas cargadas positiva o negativamente, ya sea como consecuencia del pH del medio donde se encuentran o debido a su naturaleza estructural, se produce una estabilización de este tipo. La presencia de sales o contraiones en disolución también puede afectar a dicha interacción.

2.- Unión externa (Lorente y Fernández, 2008).

Estudios recientes han demostrado la existencia de sondas que forman agregados bien definidos con la doble hélice, formados por el apilamiento de la propia sonda en la parte externa del esqueleto de los ácidos nucleicos. En este tipo de compuestos, el ADN actúa como una plataforma que permite la agregación. En principio se creía que la naturaleza de esta interacción era principalmente electrostática, pero posteriormente se demostró que este tipo de asociación ADN-ligando implica cambios en el espectro de absorción del complejo (desplazamiento hacia el azul del espectro de la sonda). Este modo de unión es muy sensible a las características químicas y conformacionales de los polinucleótidos, lo que confirma que otras fuerzas, además de la atracción electrostática, están presentes. Cabe señalar que, tanto la asociación externa como la intercalación, requiere que el ligando sea una molécula plana y aromática, por lo que estos dos modos de unión pueden observarse en un mismo tipo de sonda o ligando. El predominio de un tipo u otro de asociación dependerá de las concentraciones relativas del ligando ($[\text{L}]$) y el receptor ($[\text{ADN}]$), donde el ligando L representa en este caso la nanopartícula en cuestión.

3.- Unión a los surcos (Lorente y Fernández, 2008).

La disposición en doble hélice de las cadenas de ADN hace que se formen unas hendiduras a lo largo del exterior de la hélice donde residen los grupos fosfato de los nucleótidos que son clasificadas según su amplitud. Así, se habla de surco mayor y de surco menor. Estos surcos, debido a su diferente estructura, muestran preferencia por determinados ligandos. Así, ligandos voluminosos o nanopartículas de gran tamaño se unen

preferentemente al surco mayor, mientras que nanopartículas o ligandos de tamaño menor tienen mayor preferencia por el surco menor o secundario. Las fuerzas que intervienen en la unión a los surcos son:

- Efectos hidrófobos
- Interacciones de Van der Waals
- Interacciones electrostáticas
- Enlaces de hidrógeno

4.- Intercalación (Lorente y Fernández, 2008).

Los agentes intercalantes son ligandos que se disponen apilados entre los pares de bases del ADN. Sus interacciones con las bases nitrogenadas son de naturaleza electrostática o de van der Waals, y en ocasiones mediante la formación de enlaces de hidrógeno.

Una característica estructural común de todos los intercalantes es que poseen dentro de su estructura un sistema aromático π -deficiente de con dos o más anillos de seis eslabones que interacciona, aproximadamente, con un par de bases nucleicas.

La intercalación se puede producir en ambos surcos y las fuerzas que operan son:

- Apilamiento (*stacking*)
- Interacciones de transferencia de carga
- Enlaces de hidrógeno e interacciones electrostáticas

Muchos intercalantes son catiónicos a pH 7, y la existencia de cargas positivas en el sistema cíclico o en cadenas unidas a él favorece el proceso de intercalación. Estos intercalantes catiónicos interaccionan con el ADN, generalmente, mediante un proceso que conlleva dos etapas: (i) en primer lugar el ligando, generalmente con carga positiva en su estructura, se une a través de los grupos fosfatos del ADN por interacción electrostática; y (ii) posteriormente, el intercalante se desliza a lo largo de la hélice hasta que encuentra un sitio libre, induciendo un cambio conformacional en la biomoléculas, o apertura de la doble hélice necesaria para que se produzca la intercalación. Estas interacciones pueden alterar la estructura y funciones (replicación y/o transcripción) de los ácidos nucleicos lo que constituye la base para el uso de estos compuestos en biología molecular y como fármacos antitumorales. En el caso de las nanopartículas se han encontrado hasta la fecha determinados sistemas de nanopartículas de oro funcionalizadas (Grueso et cols., 2014) y

de plata no funcionalizadas capaces de unirse a biomoléculas de acuerdo con este modo de unión (Rahban et cols., 2010).

En el caso específico de la interacción nanopartícula/ADN, debido a las características peculiares que poseen las nanopartículas en cuanto a tamaño y estructura en comparación con ligandos más convencionales, existen además tres métodos de interacción bien definidos basados en la relación de tamaño del ADN y la nanopartícula y el cambio conformacional inducido en la biomoléculas: “**adsorption**” (adsorción), “**wrapping**” (enrollamiento), y “**collection**” (acumulación) (véase figura 12).

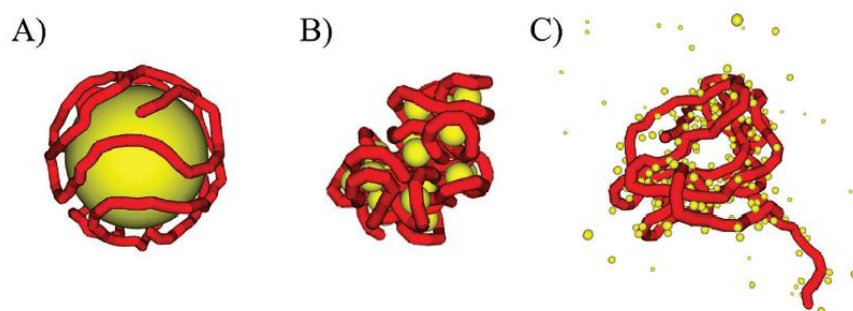


Figura 12. Esquema representativo de los diferentes tipos de interacción del complejo nanopartícula/ADN. (a) “**adsorption**” (adsorción), (b) “**wrapping**” (enrollamiento) y (c) “**collection**” (acumulación) (Zinchenko et cols.,2007).

Para nanopartículas de tamaño muy grande, la cadena de ADN se absorbe al azar en la superficie de las nanopartículas. Este modo de formar complejos se caracteriza por la absorción de una gran cantidad de ADN por un número pequeño de nanopartículas. A este método de formar complejos se le conoce como “adsorption”.

Cuando el tamaño de las nanopartículas es significativamente menor que la longitud de persistencia del ADN (se conoce como la longitud máxima promedio de la cadena que permanece recta), la rigidez del ADN se vuelve significativamente importante y por tanto, la formación de complejos se realiza por el enrollamiento de las cadenas de ADN en paralelo alrededor de las nanopartículas individuales. A este método se le conoce como “wrapping”.

Por último, para nanopartículas de pequeño tamaño, son las nanopartículas las que se adsorben sobre la superficie de la cadena del ADN. Esto se conoce como “collection” (Zinchenko et cols. ,2007).

Finalmente, cabe destacar las diferentes fuerzas intermoleculares que participan en la interacción ADN/oro. Dicha interacción resulta de la combinación de varias fuerzas no covalentes, incluyendo interacciones electrostáticas, fuerzas hidrófobas, y la unión específica entre los grupos químicos de las bases de ADN y el oro. También se ve influenciada por condiciones externas, tales como el pH o la composición del tampón.

A continuación se mencionan los tres tipos de interacciones no covalentes que participan en la interacción ADN/oro (véase figura 13) (Koo et cols., 2015).

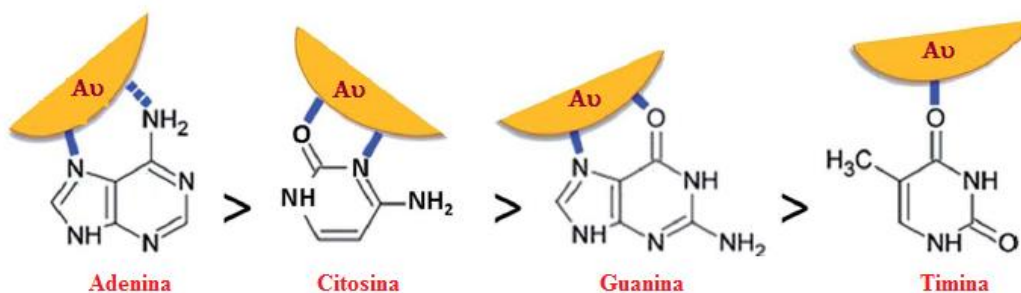


Figura 13. Dibujo representativo de la interacción de las bases del ADN (Adenina, citosina, guanina y timina) con la superficie del oro, principalmente a través de grupos amino y átomos de oxígeno. Las afinidades relativas de las bases de ADN en moléculas de ADN siguen la tendencia A > C > G > T (Adaptada de Koo et cols., 2015).

1.- Interacciones electrostáticas.

Las interacciones electrostáticas son una de las fuerzas más importantes que participan en el proceso de absorción entre el ADN y sus bases y el oro. Esto se debe principalmente a la capacidad de las moléculas de ADN para acercarse a la superficie del oro, en función de las cargas de ambos. En general, el ADN está cargado negativamente y la superficie del oro, especialmente en AuNPs tienden a ser cargada negativamente. Por lo tanto, para lograr una absorción con éxito, las moléculas de ADN tienen que superar las fuerzas de repulsión electrostática entre las moléculas de ADN y las superficies del oro. También van a modular la absorción sobre la superficie de oro, la repulsión electrostática entre las moléculas de ADN vecinas (Koo et cols., 2015).

Por otro lado, las condiciones experimentales tales como el pH y la concentración de sal en disolución de electrolitos pueden alterar las cargas del ADN y por tanto afectar de manera significativa el proceso de absorción ADN/oro (Koo et cols., 2015).

La protonación de las bases del ADN favorecen el proceso de absorción del ADN, presumiblemente debido a una menor repulsión entre las superficies de ADN y el oro, una condición que se ha utilizado ampliamente en aplicaciones de biosensores.

Los contraiones del medio también pueden alterar la carga neta del ADN y modular el proceso de absorción del ADN a través de la repulsión de carga entre (i) las moléculas de ADN vecinas cargadas negativamente, y (ii) las moléculas de ADN frente a las superficies de oro (Koo et cols., 2015)

2.- Fuerzas hidrofóbicas.

Las fuerzas hidrofóbicas pueden afectar a la solvatación de las moléculas de ADN, que a su vez, es fundamental para las interacciones de corto alcance del ADN con el oro.

La interacción entre las bases de ADN y el ion fosfato con moléculas de agua polares son distintas unas de otras. Por lo tanto, la magnitud de la interacción ADN/oro se verá afectada por las condiciones que alteran o bien la fuerza de interacción entre el agua y las bases de ADN, o el tipo de contraiones capaces de interactuar con el esqueleto del ADN (Koo et cols., 2015).

Por ejemplo, la energía de enlace del agua con adeninas protonadas (es decir, adeninas a pH inferior a 4) es significativamente pequeña en comparación con adeninas no protonadas. Por lo tanto, en condiciones que favorecen la protonación, las secuencias con un mayor contenido de adenina son ideales para la adsorción de ADN/oro (Koo et cols., 2015).

Del mismo modo, la composición del tampón y de las sales presentes en el medio, también influye en la unión ADN/oro debido a la naturaleza de los iones, que influirá en la solvatación.

3.-Unión específica entre las bases del ADN y el oro.

La unión química del ADN al oro se origina principalmente a partir de bases de ADN. Las bases de ADN contienen grupos químicos específicos en sus anillos de purina y pirimidina para establecer una unión fuerte con las superficies de oro. Con la excepción de adenina, todas las bases interactúan con el oro a través de fuerzas de absorción física.

La adenina tiene un grupo amino exocíclico situado en la sexta posición y un nitrógeno del anillo en la séptima posición, que permite una alta afinidad de absorción a través de fuerzas de absorción química. La unión tiene lugar a través de un mecanismo de coordinación que implica la interacción directa del nitrógeno del anillo de oro, con la contribución parcial del grupo amino exocíclico (Koo et cols., 2015).

La afinidad de la adenina hacia el oro es tan alta que puede competir eficazmente con la unión estable de Watson-Crick para ds-poli-AT.

Como resultado, en la proximidad de la superficie de oro, las secuencias de poli-A se absorben fuertemente como moléculas de hebra simple a pesar de la presencia de secuencias de poli-T complementarias.

Las bases del ADN también interactúan con el oro a través del anillo aromático (Koo et cols., 2015).

Varios estudios han confirmado que, excepto la adenina, todas las bases tienden a orientarse paralelamente a la superficie. Esta configuración permite la máxima superposición de las densidades electrónicas entre bases y oro para favorecer la transferencia de carga entre el anillo aromático y la superficie de oro (Demers et cols., 2002) (Piana y Bilic, 2006).

4.2.3. Termodinámica de la Interacción de nanopartículas con los ácidos nucleicos y proteínas

		Diámetro NPs (nm)	Modo unión	Tipo BMLs	K_{agua} (M^{-1})	ΔG (kJ)	Método empleado en la cuantificación de K e ΔG	Ref.
Tipo de Nanopartículas	Au@tiopronin	1.4	Intercalación o Enlaces de H.	ADN	7.2×10^5	-33.42	Cinético	(Prado-Gotor y Grueso, 2011)
		1.8	No electrostática	ADN	6.40×10^5	-33.12	Espectroscopía	(Prado-Gotor y Grueso, 2014)
	Au@AO-TEG	11.8±3.4	Intercalación o Unión externa	ADN	(K_1) = 5.4×10^6 (K_2) = 3.3×10^4 (K_2') = 3.8×10^4	-38.40 -25.78 -26.13	K_1 y K_2 : Espectrofotometría K_2' :Espectrofluorometría	(Biver et cols., 2011)
	Au@AO-PEG	3.9±1.0	Intercalación o Unión externa	ADN	(K_1) = $> 10^6$ (K_2) = $< 10^5$ (K_2') = 2×10^4	-24.54	K_1 y K_2 : Espectrofotometría K_2' :Espectrofluorometría	(Biver et cols., 2011)

Tabla 5. Parámetros termodinámicos de la interacción y características de diferentes nanopartículas de oro en su interacción con las biomoléculas.

A continuación se exponen las conclusiones extraídas de la tabla 5. Se realiza una comparativa de los diferentes tipos de nanopartículas, los tamaños de estas, y el modo de unión al ADN. Por otra parte, se comenta cuál es el proceso mas favorecido en función de los valores de incremento de energía libre.

En primer lugar, se observan tres tipos de nanopartículas de oro funcionalizadas con distintos ligandos (tiopronina, naranja de acridina y trietilenglicol o polietilenglicol) que van a

unirse al ADN mediante diferentes modos de unión (intercalación, unión externa...). Las AuNPs presentan distintos tamaños, siendo Au@tiopronina la de menor valor.

Por otro lado, en la tabla 5 se refleja tanto la constante de equilibrio (K) como el incremento de energía libre (ΔG) obtenidos principalmente mediante métodos cinéticos y espectroscópicos. Así cuanto, más negativo es el valor de ΔG , y mayor en valor absoluto, más favorecido está el proceso de formación del complejo nanopartícula/ADN. De acuerdo con este razonamiento se concluye que las nanopartículas de Au@tiopronina son las que se unen más favorablemente al DNA. También podemos concluir, de forma general, que cuanto menor es el tamaño de la nanopartícula, más favorecida en la unión con el ADN.

4.2.4. Aplicaciones de las nanopartículas como biosensores

Las nanopartículas de metales nobles (NPs) están teniendo un papel importante en el desarrollo de nuevos biosensores y / o en la mejora de las técnicas de biosensores existentes para satisfacer la demanda de los diagnósticos biomoleculares más específicos y altamente sensibles.

Las propiedades fisicoquímicas únicas de estos metales en la nanoescala han llevado al desarrollo de una amplia variedad de biosensores, tales como: (i) nanobiosensores para el diagnóstico de una enfermedad , (ii) nanosondas para detección / formación de imágenes in vivo, el rastreo celular y el seguimiento de la patogénesis de las enfermedades o la monitorización de la terapia y (iii) otras herramientas basadas en la nanotecnología que benefician a la investigación científica sobre la biología básica (Doria et cols., 2012).

Se han desarrollado numerosas técnicas para sintetizar NPs de metales nobles, con inclusión de métodos químicos (por ejemplo, reducción química, reducción fotoquímica, co-precipitación, descomposición térmica, hidrólisis, etc.) y métodos físicos (por ejemplo, deposición de vapor, ablación por láser, pulido, etc. .), cuyo objetivo final es la obtención de las NPs con un buen nivel de homogeneidad y proporcionar un control preciso sobre el tamaño, la forma y las propiedades superficiales, con el fin de aprovechar mejor sus propiedades físico-químicas únicas para los biosensores (Doria et cols., 2012).

Existen una variedad de métodos de biosensores de alta sensibilidad para los ácidos nucleicos, proteínas, anticuerpos, enzimas y otras moléculas biológicas mediante la exploración de diferentes propiedades físicoquímicas de las NPs de metales nobles, tales como **Resonancia del plasmón de la superficie (SPR)**, **Espectroscopía Raman Amplificada en Superficie (SERS)**, la actividad electroquímica, etc. Entre estos métodos biosensores, el enfoque colorimétrico han sido el más explorado y, debido a su simplicidad y portabilidad, es el más prometedor para futuros métodos de diagnóstico.

Las NPs de plata y de oro son las más utilizadas en el desarrollo de técnicas de biosensores, ya que estas presentan propiedades ópticas únicas dentro de la gama de longitudes de onda visibles y son fáciles de sintetizar y funcionalizar. En menor medida las NPs de platino también se han utilizado por sus propiedades eléctricas únicas.

En la tabla 6 se recogen algunos ejemplos de muestras biológicas reales detectadas empleando biosensores basados en nanopartículas de metales nobles de acuerdo con el tipo de NPs y el principio de metodología utilizado (Doria et cols., 2012).

Método	Tipo NPs	Muestra	Referencia
Colorimétrico	Oro	Mutaciones en el gen EGFR del ADN genómico	(Lee et cols., 2010)
		Hepatitis C, virus RNA	(Shawky et cols., 2010)
		Melanina en la leche entera	(Wei et cols., 2010)
	Oro/ aleación Plata	Gen TP53	(Doria et cols., 2010)
		Genes de fusión BCR-ABL	(Baptista et cols., 2011)
NIR	Oro	Células cancerígenas de próstata de ratón	(Agarwal et cols., 2007)
		Ganglios linfáticos en ratones	(Pan et cols., 2010)
		Vasos cerebrales en ratones	(Wang et cols., 2004)
SERS	Oro	Glucosa en rata	(Stuart et cols., 2005)
		ADN del patógeno múltiple en muestras clínicas (líquido cefalorraquídeo, heces, pus y los esputos)	(Kang et cols., 2010)
	Plata	Glucosa en rata	(Yuen et cols., 2010)
	Oro / Núcleo de Plata	Biomarcador de proteína fosfolipasa Cyl en las células cancerosas	(Lee et cols., 2007)
Fluorescencia	Oro	Proteína de choque térmico en cultivos de sangre infectados por <i>Plasmodium falciparum</i>	(Guirgis et cols., 2011)
	Plata	Imágenes de la membrana celular en las líneas celulares	(Zhang et cols., 2010)
Eléctrico/ Electroquímico	Oro	Salmonella spp. en muestras de carne de cerdo	(Yan et cols., 2009)
		IgG humano en suero humano	(Tian et cols., 2009)
		Factor de necrosis tumoral α (TNF- α) en suero humano	(Yin et cols., 2011)
	Plata	α -1-fetoproteína (AFP) en suero humano	(Che et cols., 2010)

Tabla 6. Resumen de los diferentes tipos de muestras biológicas reales que han sido detectados empleando biosensores basados en NPs de metal noble, de acuerdo a su principio de metodología (Adaptada de Doria et cols., 2012).

Una cuestión clave a tener en cuenta en la integración de la plataforma de biosensores es la creciente demanda de una mayor sensibilidad y selectividad a un costo mínimo, y la posibilidad de controlar los biosensores en tiempo real, sobre todo para las plataformas de cuidado, para lo cual también hay que tener en cuenta la simplicidad. Teniendo en cuenta esto, los enfoques colorimétricos y electroquímicos son los más prometedores debido a su simplicidad, alta sensibilidad y especificidad, además del hecho de que en la mayoría de los casos simplemente no requieren instrumentación costosa y compleja para lograr una respuesta adecuada.

4.3.- Empleo de sistemas tensioactivos/nanopartículas metálicas para la detección de biomoléculas

En este último apartado, se proporcionan algunos datos sobre los avances más recientes en el desarrollo de biosensores basados en el empleo de sistemas combinados tensioactivos/nanopartículas para la detección de biomoléculas. Esta técnica está actualmente en desarrollo y se dispone de una escasa bibliografía para su análisis.

Entre ellos destacan dos artículos recientes en los que se pretende desarrollar un biomarcador para la malaria.

La malaria se diagnostica generalmente mediante técnicas convencionales como la microscopía, ELISA, PCR o mediante pruebas de diagnóstico rápido. Sin embargo, cada uno de estos métodos presentan algunas limitaciones. El método de microscopía por ejemplo, requiere de un personal altamente cualificado, con experiencia y el procedimiento para la preparación de las muestras es complicado. Por otra parte, las pruebas de diagnóstico rápido disponibles en el mercado son poco sensibles y resultan inespecíficas a bajas concentraciones de parásitos (Jain et cols.,2016). Además tienen un bajo rendimiento debido a la humedad y a las altas temperaturas empleadas, ya que utilizan anticuerpos como biomarcadores (Lee et cols., 2014).

Debido a estas limitaciones, se propone un nuevo método rápido y eficaz para la detección de la malaria. Los anticuerpos utilizados como biomarcadores serán sustituidos por aptámeros, éstos tienen muchas ventajas como su fácil análisis, una alta especificidad, estabilidad térmica y una sencilla síntesis química.

Los aptámeros como se mencionó anteriormente son oligonucleótidos de cadena simple que se unen de forma específica a la molécula diana y que se seleccionan a partir de una “biblioteca” de secuencias (SELEX) (Jain et cols., 2016).

Se desarrollaron dos tipos de biomarcadores (proteínas recombinantes) para la detección de la malaria: *Plasmodium vivax* LDH (PvLDH) y *Plasmodium falciparum* LDH (PfLDH) mediante el uso de SELEX (Lee et cols., 2014).

En relación con ello, existen varios estudios en los que se desarrolla un aptámero para detectar la presencia de malaria (biomarcador) a través de un ensayo basado en tensioactivos catiónicos, utilizando AuNPs como sondas de detección óptica (Cheung et cols., 2013) (Lee et cols., 2012).

Por un lado, se estudiará el bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB). Este tensioactivo catiónico posee dos características muy útiles, una carga positiva que le permite agregar las AuNPs y la capacidad de ensamblar el ADN para formar supramoléculas con ciertas nanoestructuras (si se trata de ADN de cadena simple formarán nanoestructuras cúbicas, mientras que si se trata de ADN de doble cadena serán hexagonales) (Zhou et cols., 2004).

Por otro lado, se encuentra el cloruro de benzalconio (BCK) que posee un anillo aromático que proporciona una ventaja significativa en la agregación de las nanopartículas. Y finalmente, el bromuro de dodecildimetilamonio (DDAB) que contiene dos cadenas de alquilo largas. De los tres tensioactivos estudiados, el DDAB es el que provoca la agregación completa de las AuNPs libres a una concentración muy baja, seguido de BCK y CTAB. Los cambios de color se experimentaron entre 650 nm y 520 nm (Jain et cols., 2016).

En cuanto a los aptámeros, se utilizaron tres candidatos con una mayor afinidad por PfLDH. Estos fueron P38, P9 y P45, siendo P38 el de mayor afinidad (Jain et cols., 2016). En otros estudios se utilizó el pL1 como elemento de reconocimiento (Lee et cols., 2014).

Los resultados de estos estudios confirman que el cambio de color corresponde con el grado de agregación de las AuNPs causada por la interacción de las AuNPs y el tensioactivo, dependiendo de la concentración del biomarcador.

5.- CONCLUSIONES

Finalmente, de este trabajo de revisión bibliográfica se pueden extraer las siguientes conclusiones generales y más específicas. De forma general puede apuntarse que:

- 1.- Las nanopartículas metálicas pueden ser producidas con distintos tamaños y presentarse no funcionalizadas o “desnudas”, y funcionalizadas con diferentes tipos de ligandos. Su carga global puede variar en función del pH del medio o las características estructurales.
- 2.- Las nanopartículas de oro son las más empleadas como sensores, gracias a sus excelentes propiedades físicas, químicas y biológicas, intrínsecas a su tamaño nanométrico.
- 3.- Hasta la fecha, los sistemas de nanopartículas metálicas para la detección de ADN son los más estudiados.
- 4.- El método colorimétrico, basado en los cambios de la SPR de las nanopartículas, es un método alternativo, simple, rápido y de bajo coste que se puede aplicar en muestras para la determinación de tensioactivos y biomoléculas empleando nanopartículas metálicas.

De forma más específica y en relación a los sistemas estudiados puede concluirse:

- 1.- Las nanopartículas de Au@citrato de menor tamaño son más sensibles para la detección de los tensioactivos de cadena alifática DTAB y CTAB.
- 2.- El sistema Au@tratrato es más sensible a la detección de los tensioactivos DTAB y CTAB cuando se compara con el sistema Au@citrato.
- 3.- Para los tensioactivos pertenecientes al grupo de los bromuros alquiltrimetilamonio, se observa que para un mismo sistema de nanopartículas, a medida que aumenta el número de carbonos de la cadena carbonada, el $\Delta\lambda_{\text{máxima}}$ es mayor, a la vez que $[T]_{\Delta\lambda_{\text{máxima}}}$ disminuye. Por tanto, estos sistemas son más sensibles a la determinación de tensioactivos de mayor tamaño de cadena.
- 3.- Atendiendo a los valores de energía libre, las nanopartículas de oro de menor tamaño son las que presentan mayor afinidad por el ADN, presentado valores mayores de K y ΔG más negativos.
- 4.- Los sistemas compuestos nanopartículas/tensioactivos para la determinación de biomoléculas están en continua investigación, y presentan características muy prometedoras, como una mayor capacidad de agregación/ desagregación en comparación con los sistemas simples. Es necesario por tanto, seguir investigando en esta línea para

mejorar tanto la sensibilidad de la técnica colorimétrica, basada en los cambios en la SPR de las nanopartículas, como el grado de especificidad por las diferentes biomoléculas.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Agarwal A, Huang SW, O'Donnell M, Day KC, Day M, Kotov N, Ashkenazi S. Targeted gold nanorod contrast agent for prostate cancer detection by photoacoustic imaging. *J. Appl. Phys.* 2007, 102.
- [2] Aguiar J, Carpena P, Molina-Bolívar JA, Carnero C. On the determination of the critical micelle concentration by the pyrene 1:3 ratio method. *Journal of Colloid and Interface Science.* 2003, 258:116-122.
- [3] Antelo A., Arquitecturas supramoleculares generadas por nuevos derivados de ciclodextrinas y ácidos biliares. Tesis Doctoral, Universidad de Santiago de Compostela. 2008.
- [4] Astruc D, Didier A. Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications toward Biology, Catalysis and Nanotechnology. *Chem. Rev.* 2004; 104:293-346.
- [5] Baptista PV, Doria G, Conde J. Alloy metal nanoparticles for multicolor cancer diagnostics. *Proc. SPIE* 2011, 7909.
- [6] Belmares-Perales S, Torres-López E, Coparán-Elizondo JL, Arriaga-Garza J, Arriaga-Garza N. Síntesis y caracterización de nanopartículas de oro, plata y hierro por el método de fisicoquímica verde. 3^{er} Foro de Divulgación Científica y Tecnología, Universidad Autónoma de Nuevo León (Nuevo México). 2013.
- [7] Biver T, Eltugral N, Pucci A, Ruggeri G, Schena A, Secco F, Venturini M. Synthesis, characterization, DNA interaction and potential applications of gold nanoparticles functionalized with Acridine Orange fluorophores. *Dalton Trans.* 2011; 40: 4190.
- [8] Burriel V. Estructura y propiedades de ácidos nucleicos. Máster en Ingeniería Biomédica, Universidad de Valencia. 2010.
- [9] Cantarero A. Determinación de tensioactivos aniónicos en matrices ambientales: comportamientos del jabón en una parcela agrícola. Tesis Doctoral, Universidad de Granada. 2010.
- [10] Cao G, Wang Y. *Nanostructure and Nanomaterials.* 2^a ed. USA. Imperial College Press. 2004.
- [11] Carrillo W. Lysozyme: Antibacterial Activity and Allergenicity. Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL-CSIC-UAM) Madrid- España. 2013.

- [12] Che X, Yuan R, Chai Y, Li J, Song Z, Wang J. Amperometric immunosensor for the determination of alpha-1-fetoprotein based on multiwalled carbon nanotube-silver nanoparticle composite. *J. Colloid Interface Sci.* 2010;345:174-180.
- [13] Cheung YW, Kwok J, Law AW, Watt RM, Kotaka M, Tanner JA. Structural basis for discriminatory recognition of Plasmodium lactate dehydrogenase by a DNA aptamer. *PNAS.* 2013; 110(40):15967-15972.
- [14] Cobo E. Síntesis, Propiedades y Funcionalización de Clústeres Metálicos. [ed.] Universidad de Santiago de Compostela. Facultad de Química. Santiago de Compostela. 2012.
- [15] Criado C L, Rodríguez D C, Torres RAR, Juárez BPS, Resénder RM. Fenómenos físicos de las nanopartículas de oro. *Celerinet*, 2013; (Especial) 98-103.
- [16] Cruces C. Electroforesis capilar. Universidad de Almería, Servicio de Publicaciones Almería-España. 1998.
- [17] Cruz D, Rodríguez M, López J, Herrera V, Orive A, Creus A. Nanopartículas metálicas y plasmones de superficie: una relación profunda. *Avances en Ciencias e Ingeniería.* 2012; 3 (2): 67-78.
- [18] Demers LM, Östblom M, Zhang H, Jang NH, Liedberg B, Mirkin CA. A fluorescence-based method for determining the surface coverage and hybridization efficiency of thiol-capped oligonucleotides bound to gold thin films and nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* 2002; 124:11248-11249.
- [19] Díez R. Estudios estructurales y funcionales de las lisozimas CPL-7 del bacteriófago CP-7 de neumococo. Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid. 2014.
- [20] Doria G, Conde J, Veigas B, Giestas L, Almeida C, Assunção M, Rosa J, Baptista PV. Noble Metal Nanoparticles for Biosensing Applications. *Nanotechnology.* 2012;12:1657-1687.
- [21] Doria G, Larginho M, Dias JT, Pereira E, Franco R, Baptista PV. Gold-silver-alloy nanoprobos for one-pot multiplex DNA detection. *Nanotechnology* 2010, 21(25):255101.
- [22] Durand J, Teuma E, Gómez M, Eur J. An Overview of Palladium Nanocatalysts: Surface and Molecular Reactivity. *Inorg. Chem.* 2008; 23: 3577-3586.
- [23] Duymovich C, Acheme R, Sesini S, Mazziotta D. Espectrofotómetros y Fotocolorímetros. Guía práctica de actualización. *SciELO.* 2005, 39 (4): 529-39.

- [24] Friederici Muñoz MG. Nanopartículas de Au y Pd: síntesis, funcionalización y aplicaciones catalíticas. Tesis Doctoral, Universitat de Barcelona, 2013.
- [25] García MA, De la Venta J, Crespo P, Llopis J, Penadés S, Fernández A, Hernando A. Surface plasmon resonance of capped Au nanoparticles. *Physical Review B*. 2005; 72 (24): 1403-14034.
- [26] Goldberg M, Langer R, Jia X. Nanostructured materials for applications in drug delivery and tissue engineering. *J Biomat Sci*. 2007; 18:241-68.
- [27] Gómez- Jarabo G. Tratado multidisciplinar sobre la actividad cerebral, los procesos mentales superiores y nuestro comportamiento. *Biología y Salud Mental*. 2012. [Consultado en Junio de 2016]. Disponible en: <http://www.biopsicologia.net/nivel-3-participaci%C3%B3n-pl%C3%A1stica-y-funcional/3.2.2.-arn:-%C3%A1cido-ribonucl%C3%A9ico> .
- [28] Grueso E, Perez-Tejada P, Prado-Gotor R, Cerrillos C. DNA Strand Elongation Induced by Small Gold Nanoparticle at High Ethanol Content. *J. Phys.Chem .C*.2014; 118(8): 4416-4428.
- [29] Guerri L. Funcionalización de nanopartículas metálicas para la detección de contaminantes orgánicos persistentes mediante espectroscopía Raman intensificada por superficie. Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Madrid. 2008.
- [30] Guirgis BS, Cunha CS, Gomes I, Cavadas M, Silva I, Doria G, Blatch GL, Baptista PV, Pereira E, Azzazy HM, Mota MM, Prudêncio M, Franco R. Gold nanoparticle-based fluorescence immunoassay for malaria antigen detection. *Anal. Bioanal. Chem*.2011; 402(3):1019-27.
- [31] GuoY, Wang Z, Qu W, Shao H, Jiang X. Colorimetric detection of mercury, lead and copper ions simultaneously using protein-functionalized gold nanoparticles. *Elsevier*. 2011; 26: 4064-4069.
- [32] Hammond JL, Bhella N, Rafiee SD, Estrela P. Localized Surface Plasmon Resonance as a Biosensing Platform for Developing Countries. *Biosensor.*, 2014; 4 (2): 172-188.
- [33] Hornyak GL , Dutta K, Tibbals HF, Rao AK. *Introduction to Nanocience*. [ed] USA. CRC Press 2008.

- [34] Huang H, Li L, Zhou G, Liu Z, Ma Q, Feng Y, Zeng G, Tinnefeld P, He Z. Visual detection of melamine in milk samples based on label-free and labeled gold nanoparticles. *Talanta*. 2011;85:1013–1019.
- [35] Islam M, Rezaur M, Islam N. Micellization Behavior and Thermodynamic Properties of N-Alkyl Trimethylammonium Bromide Surfactants in aqueous media at different temperatures. *IJSER*. 2015; 6(1): 1508-1516.
- [36] Jain KK. Recent advances in nanooncology. *Technol Cancer Res Treat* 2003; 7: 1-14.
- [37] Jain P, Chakma B, Singh NK, Kumar N, Patra S, Goswami P. Aromatic Surfactant as Aggregating Agent for Aptamer-Gold Nanoparticle-Based Detection of Plasmodium Lactate Dehydrogenase. *Mol Biotechnol*. 2016; 58:497-508.
- [38] Kang T, Yoo SM, Yoon I, Lee SY, Kim B. Patterned multiplex pathogen DNA detection by Au particle-on-wire SERS sensor. *Nano Lett*. 2010;10: 1189-1193.
- [39] Karunaratne DN. Nanotechnology in medicine. *J. Natn. Sci. Foundation Sri Lanka*, 2007; 35: 149-152.
- [40] Kim SW, Kim S, Tracy JB, Jasanoff A, Bawendi MG. Phosphine Oxide Polymer for Water Soluble Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc*. 2005; 127 (13): 4556-4557.
- [41] Koo KM, Sina AA, Carrascosa LG, Shiddiky M, Trau M. DNA–bare gold affinity interactions: mechanism and applications in biosensing. *Anal. Methods*. 2015;7:7042-7054
- [42] Kounig CL, Chen WY, Chen YC. Semi-quantitative determination of cationic surfactants in aqueous solutions using gold nanoparticles as reporter probes. *Anal Bioanal Chem*. 2007; 387:2091-2099.
- [43] Lee H, Kang T, Yoon KA, Lee SY, Joo SW, Lee K. Colorimetric detection of mutations in epidermal growth factor receptor using gold nanoparticle aggregation. *Biosens. Bioelectron*. 2010, 25, 1669-1674.
- [44] Lee JS, Ulmann PA, Han MS, Mirkin CA. A DNA-Gold Nanoparticle-Based Colorimetric Competition Assay for the Detection of Cysteine. *NanoLett*. 2008;8:529-533.
- [45] Lee S, Kim S, Choo J, Shin SY, Lee YH, Choi HY, Ha S, Kang K, Oh CH. Biological imaging of HEK293 cells expressing PLCgamma1 using surface-enhanced Raman microscopy. *Anal. Chem*. 2007; 79: 916-922.

- [46] Lee S, Manjunatha DH, Jeon W , Ban C. Cationic Surfactant-Based Colorimetric Detection of Plasmodium Lactate Dehydrogenase, a Biomarker for Malaria, Using the Specific DNA Aptamer. Plos One. 2014; 9 (7).
- [47] Lee S, Song KM, Jeon W, Jo H, Shim YB, Ban C. A highly sensitive aptasensor towards Plasmodium lactate dehydrogenase for the diagnosis of malaria. Biosensors and Bioelectronics. 2012; 35: 291–296.
- [48] Lee YS. Self-Assembly and Nanotechnology Systems: Design, Characterization, and Applications. [ed]. USA.2011.
- [49] Li Y, Liu Q, Shen W. An International Journal of Inorganic Chemistry. Dalton Trans. 2011; 40: 5811-5826.
- [50] Lorente A, Fernández MJ. Interacciones no covalentes con el ADN. Real Sociedad Española de Química. 2008. [Consultado en Junio de 2016]. Disponible en: <http://rseq.org/>
- [51] Mahmood K, Shakeel M, Siddiq M, Usman M. Thermodynamic Solution Properties of Benzalkonium Chloride in Aqueous and Ethanolic Media and its Interactions with Organized Assemblies of Anionic Surfactant Sodium Dodecyl Sulphate and Amino Acid. Carl Hanser Publisher. 2016; 53 (2): 195-204.
- [52] Mayer ABR, Mark E. Transition Metal Nanoparticles protected by amphiphilic block copolymers as tailored catalyst systems. Colloid Polym. Sci. 1997; 275 (4): 333-340.
- [53] Monge M. Nanopartículas de plata: métodos de síntesis en disolución y propiedades bactericidas. An. Quím. 2009, 105(1): 33–41.
- [54] Mostafa A, Sayed E. Some interesting Properties of Materials Confined in Time and Nanometer Soace of Different Shapes, Accounts of Chemical Research.2001; 31: 257-264.
- [55] Myers D. Surfactant science and Technology. 2^a ed. VHC publishers, 1998.
- [56] Namba Y, Hidaka Y, Taki K, Morimoto T .Effect of oral administration of lysozyme or digested bacterial cell walls on immunostimulation in guinea pigs. Infection Immunity. 1981; 31(2): 580-583.
- [57] Ontiveros F, Cardenas A, Bullon J. Ultrafiltración de Soluciones Micelares. Mérida-Venezuela.2011.[Consultado en Mayo de 2016]. Disponible en: <http://www.firp.ula.ve/archivos/cuadernos/S463A.pdf>.

- [58] Pan D, Pramanik M, Senpan A, Ghosh S, Wickline S A, Wang L, Lanza GM. Near infrared photoacoustic detection of sentinel lymph nodes with gold nanobeacons. *Biomaterials*.2010; 31: 4088-4093.
- [59] Panyan J, Labhasetwar V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv Drug Deliv Rev*. 2003; 55:329-347.
- [60] Panzner MA, Bilinovich SM, Youngs WJ, Leeper TC. Silver metallation of hen egg white lysozyme: X-ray crystal structure and NMR studies. *Chem. Commun*. 2011, 47:12479-12481.
- [61] Piana S, Bilic A. The Nature of the Adsorption of Nucleobases on the Gold Surface. *J. Phys. Chem. B*. 2006; 110:23467-23471.
- [62] Prado-Gotor R, Grueso E. A kinetic study of the interaction of DNA with gold nanoparticles: mechanistic aspects of the interactionw. *Phys. Chem. Chem. Phys*. 2011;13:1479-1489.
- [63] Prado-Gotor R, Grueso E. Noncovalent Interactions of Tiopronin-Protected Gold Nanoparticles with DNA: Two Methods to Quantify Free Energy of Binding. *The Scientific World Journal*. 2014; 2:1-9.
- [64] Rahban M, Divsalar A, Saboury AA, Golestanis A. Nanotoxicity and Spectroscopy Studies of Silver Nanoparticle: Calf Thymus DNA and K562 as Targets. *J. Phys. Chem.C*. 2010; 114: 5798-5803.
- [65] Railsback JG, Singh A, Pearce RC, McKnight TE, Collazo R, Sitar Z, Yingling YG, Melechko A. Weakly Charged Cationic Nanoparticles Induce DNA Bending and Strand Separation.*Advanced Materials*. 2012; 24: 4261-4265.
- [66] Remuñan C, Al-Qadi S .Nanopartículas metálicas: oro. [ed.] Real academia nacional de farmacia. Madrid .2009. 223-248.
- [67] Robertazzi A, Platts JA. Gas-Phase DNA Oligonucleotide Structures. A QM/MM and Atoms in Molecules Study. *J. Phys Chem A*. 2006;110:3992.
- [68] Rodríguez Llamazares SM. Obtención de nanopartículas y nanoordenamientos metálicos empleando la química de los compuestos de inclusión. Tesis Doctoral, Universidad de Chile. 2007.
- [69] Roucoux A , Schulz J, Patin H. Recoverable Catalysts and Reagents Perspective and Prospective.*Chem. Rev*.2002; 102, 3757-3778.

- [70] Salager JL. Surfactantes Tipos y Usos. Laboratorio de formulación, interfaces reología y procesos, Universidad de los Andes. Mérida-Venezuela.2002.[Consultado en Mayo de 2016]. Disponible en: <http://www.firp.ula.ve/archivos/cuadernos/S300A.pdf>
- [71] Schmid. G. Clusters and colloids: bridges between molecular and condensed material. Endeavour. 1990; 14 (4): 172-178.
- [72] Schmid, G, Corain, B. Nanoparticulated Gold: Syntheses, Structures, Electronics, and Reactivities. Eur. J. Inorg. Chem. 2003, 2003, 3081-3098.
- [73] Shawky SM, Bald D, Azzazy HM. Direct detection of unamplified hepatitis C virus RNA using unmodified gold nanoparticles. Clin. Biochem. 2010, 43, 1163-1168.
- [74] Schmid G. (Ed.) Nanoparticles. From theory to application, Wiley-VCH, 2004.
- [75] Shrivastava S, Sahu S, Ghosh A, Shankar R. Gold nanoparticles-based colorimetric determination of cationic surfactants in environmental water samples via both electrostatic and hydrophobic interactions.2015; 183 (2): 827.
- [76] Solé A. Tensioactivos en la Industria Textil. 3CTecnología.2014; 10 (3):137 – 151.
- [77] Song KM, Cho M, Jo H, Min K, Jeon SH, Kim T, Han MS, Ku JK, Ban C. Gold nanoparticle-based colorimetric detection of kanamycin using a DNA aptamer. Anal. Biochem.2011; 415:175-181.
- [78] Stuart DA, Yonzon CR, Zhang X, Lyandres O, Shah NC, Glucksberg MR, Walsh JT, Van Duyne RP. Glucose sensing using near-infrared surface-enhanced Raman spectroscopy: Gold surfaces, 10-day stability, and improved accuracy. Anal. Chem. 2005; 77:4013-4019.
- [79] Tansil NC, Gao Z. Nanoparticles in biomolecular detection. Nanotoday. 2006; 11 (1): 28-37.
- [80] Tian D, Duan C, Wang W, Li N, Zhang H, Cui H, Lu Y. Sandwich-type electrochemiluminescence immunosensor based on N-(aminobutyl)-N-ethylisoluminol labeling and gold nanoparticle amplification. Talanta 2009; 78:399-404.
- [81] Vargaftik MN, Zagorodnikov VP, Stolyarov IP, Moiseev II, Likholobov VA, Kochubey DI et al. Chem. Soc., Chem. Commun. 1985, 937-939.
- [82] Wang Y, Xie X, Wang, X, Ku G, Gill KL, O'Neal DP, Stoica G, Wang LV. Photoacoustic tomography of a nanoshell contrast agent in the in vivo rat brain. Nano Lett. 2004; 4:1689-1692.

- [83] Wei F, Lam R, Cheng S, Lu S, Ho D, Li N. Rapid detection of melamine in whole milk mediated by unmodified gold nanoparticles. *Appl. Phys. Lett.* 2010, 96 (13): 3702-3706.
- [84] Wei XL, Mo ZH. Modified magnetite nanoparticle for colorimetric sensing of anionic surfactants in water. *IET.* 2014; 9 (4): 239-242.
- [85] Yang C, Wang Y, Marty JL, Yang X. Aptamer-Based Colorimetric Biosensing of Ochratoxin A Using Unmodified Gold Nanoparticle Indicator. *Biosens. Bioelectron.* 2011; 26:2724-2727.
- [86] Yang GJ, Huang JL, Meng WJ, Shen M, Jiao XA. A reusable capacitive immunosensor for detection of *Salmonella* spp. based on grafted ethylene diamine and self-assembled gold nanoparticle monolayers. *Anal. Chim. Acta.* 2009; 647:159-166.
- [87] Yin Z, Liu Y, Jiang LP, Zhu JJ. Electrochemical immunosensor of tumor necrosis factor α based on alkaline phosphatase functionalized nanospheres. *Biosens. Bioelectron.* 2011;26:1890-1894.
- [88] Yuen JM, Shah NC, Walsh, JT, Glucksberg MR, Van Duyne RP. Transcutaneous glucose sensing by surface-enhanced spatially offset Raman spectroscopy in a rat model. *Anal. Chem.* 2010;82:8382-8385.
- [89] Zhang J, Fu Y, Mei Y, Jiang F, Lakowicz JR. Fluorescent metal nanoshell probe to detect single miRNA in lung cancer cell. *Anal. Chem.* 2010;82:4464-4471.
- [90] Zhang Y, Mckelvie ID, Cattrall R, Kolev SP. Colorimetric detection based on localised surface plasmon resonance of gold nanoparticles: Merits, inherent shortcomings and future prospects. Elsevier science publishers b.v. 2016; 152: 410-422.
- [91] Zheng LQ, Yu XD, Xu JJ, Chen HY. Colorimetric detection of quaternary ammonium surfactants using citrate-stabilized gold nanoparticles (AuNPs). *Anal. Methods.* 2014; 6:2031-203.
- [92] Zheng Y, Wang Y, Yang X. Sens. Aptamer-Based Colorimetric Biosensing of Dopamine Using Unmodified Gold Nanoparticle. *ActuatorsB-Chem.* 2011;156:95-99.
- [93] Zhou S, Liang D, Burger C, Yeh F, Chu B. Nanostructures of complexes formed by calf thymus DNA interacting with cationic surfactants. *Biomacromolecules.* 2004;5: 1256-1261.

[94] Zinchenko AA, Sakaue T, Araki S, Yoshikawa K Baigl D. Single-Chain Compaction of Long Duplex DNA by Cationic Nanoparticles: Modes of Interaction and Comparison with Chromatin. *J. Phys. Chem. B.*2007;111:3019-3031.