

ESTUDIO POR VOLTAMPEROMETRÍA DE PUENTES DE HIDRÓGENO EN  
ÁCIDO FÓLICO LIBRE Y BIOCONJUGADO EN PUNTOS CUÁNTICOS DE CdTe

MÓNICA JUDITH MENDOZA CASTRO

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE QUÍMICA  
BUCARAMANGA  
2017

ESTUDIO POR VOLTAMPEROMETRÍA DE PUENTES DE HIDRÓGENO EN  
ÁCIDO FÓLICO LIBRE Y BIOCONJUGADO EN PUNTOS CUÁNTICOS DE CdTe

MÓNICA JUDITH MENDOZA CASTRO

Trabajo de grado modalidad proyecto de investigación para optar al título de  
Químico

Directores

ÁNGEL MANUEL MELÉNDEZ REYES

Dr. en Ciencias Químicas

CARLOS EDUARDO FRONTANA VÁZQUEZ

Dr. en Ciencias (Química)

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA

BUCARAMANGA

2017

## DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado

A mis padres

La Sra. Hercília Castro Vesga y el Sr. Jesús María Mendoza Amaya

El más profundo e infinito agradecimiento a ustedes, absolutamente nada de este logro habría podido ser sin la ayuda y guía que me han dado a lo largo de estos años.

De ustedes aprendí que la vida se construye con esfuerzo y sacrificio, que la mayor recompensa está en siempre entregar lo mejor en cada empresa que se emprenda. Ustedes me enseñaron lo importante de hacer las cosas bien y con amor.

*“No es grande el que siempre triunfa, sino el que jamás se desanima “*

A mi hermano

Jesús Hernán Mendoza Castro

Lo quiero, gracias por el ejemplo de vida, los consejos y el constante apoyo, nos espera un mundo por descubrir, experimentar, amar y conocer.

*“La gente envejece cuando abandona sus ideales”*

*“Todo es flujo, nada es estacionario”*

HERÁCLITO

*“Tú mismo haces el tiempo. Tu reloj son los sentidos”*

ANGELUS SILESIUS

## AGRADECIMIENTOS

El más especial y sincero agradecimiento a mi padre académico Ángel Manuel Meléndez Reyes, por confiar en mí y siempre animarme, por demostrarme que la mayor riqueza es hacer las cosas con pasión y entrega, disfrutando cada momento. Porque más que un asesor lo considero un padre, amigo y compañero.

A los compañeros del camino Erika Godoy (juntas contra el mundo), Silvia Escobar, Orlando Burgos, Michelle Cedeño, Juan Sebastian Ceballos (Chanchan), Alejandra Flórez, Sandra Corzo, Sandra Pinto, Mario Quiroz, Edgar Pinzón, Isaías Rentería, Kimberly Lázaro, Leonardo Castellanos, Jose Herrera y Angelica Pérez. Especialmente a mis compañeros del Laboratorio de Electroquímica (el 304) porque más que compañeros son amigos, se hacía ameno querer llegar al laboratorio a trabajar, cariño mil. A todos los profesores que aportaron a mi formación durante estos años, gracias por cada una de sus enseñanzas. Especialmente a David Miranda, Rosa Claudia, Fernando Martínez, Cristian Blanco, Marianny Cobarinza, Elena Stashenko, Daniel Molina, Angela Carreño y José Antonio Henao.

A mi compañero del asiento contiguo en el autobús Julio Aguirre, por la compañía y el apoyo en la aventura México/Querétaro/CIDETEQ. Así mismo a Alberto Romero, Claudia Peña y Karen Rodríguez, sin ustedes no habría construido tan bellos recuerdos. Conocí sitios y viví momentos inimaginables.

Al Dr. Carlos Eduardo Frontana y Dra. Linda González del Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica (CIDETEQ) por todo su valioso apoyo en el desarrollo de este proyecto, sin su colaboración no se habría podido desarrollar exitosamente. Al Dr. Vladimir Koutnetsov y MSc. Carlos Martínez, por compartir su conocimiento y darme su apoyo en la síntesis de los puntos cuánticos modificados. De igual forma a los integrantes de LQOBio, por su compañía Duván Rodríguez y Cristian Forero.

Al Centro de Investigación Científica y Tecnológica en Materiales y Nanociencias (CMN) y los laboratorios de Difracción de Rayos X, Hornos y CICAT por su colaboración para el desarrollo de este trabajo.

## CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN.....	17
1. ANTECEDENTES .....	19
1.1. EL ÁCIDO FÓLICO Y EL RECEPTOR FOLATO .....	19
1.2. LOS PUENTES DE HIDRÓGENO Y SU CARACTERIZACIÓN ELECTROQUÍMICA.....	22
1.3. EL PAPEL DEL SOLVENTE EN LA CARACTERIZACIÓN ELECTROQUÍMICA DE PUENTES DE HIDRÓGENO .....	26
1.4. ELECTROACTIVIDAD DEL ÁCIDO FÓLICO.....	26
1.5. RECONOCIMIENTO DEL ÁCIDO FÓLICO Y SENSORES .....	27
2. OBJETIVOS .....	30
3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL .....	31
3.1. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES.....	31
3.1.1. Soluciones no acuosas de ácido fólico.....	31
3.1.2. Soluciones no acuosas de quinonas .....	31
3.2. MEDIDAS ELECTROQUÍMICAS .....	31
3.3. SIMULACIÓN DE VOLTAMPEROGRAMAS.....	32

3.4.	SÍNTESIS DE PUNTOS CUÁNTICOS DE CdTe BIOCONJUGADOS CON ÁCIDO FÓLICO .....	32
3.4.1.	Síntesis de puntos cuánticos de CdTe modificados superficialmente .....	32
3.4.2.	Síntesis del bioconjugado puntos cuánticos-ácido fólico.....	33
3.5.	CARACTERIZACIÓN DEL BIOCONJUGADO .....	33
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	36
4.1.	FORMACIÓN DE PUENTES DE HIDRÓGENO EN ÁCIDO FÓLICO LIBRE .....	36
4.1.1.	El ácido fólico como receptor de puentes de hidrógeno.....	37
4.1.2.	El ácido fólico como donador de puentes de hidrógeno.....	38
4.2.	FORMACIÓN DE PUENTES DE HIDRÓGENO EN ÁCIDO FÓLICO BIOCONJUGADO .....	42
4.2.1.	Síntesis del bioconjugado ácido fólico/puntos cuánticos de CdTe .....	42
4.2.2.	Reconocimiento de ácido fólico bioconjugado por puentes de hidrógeno.	45
5.	CONCLUSIONES.....	50
6.	RECOMENDACIONES .....	51
	BIBLIOGRAFÍA.....	52
	ANEXOS.....	57

## LISTA DE TABLAS

	Pág.
<b>Tabla 1.</b> Constantes de asociación para las quinonas 1, 2 y 4 con CTAF, determinadas en un intervalo de concentración de $1.49 \times 10^{-5}$ a 0.0011 M. .....	48
<b>Tabla 2.</b> Puntos de isopotencial en los voltamperogramas de la figura 4 para cada especie donadora de protones.....	58
<b>Tabla 3.</b> Condiciones experimentales a los cuales se observan los estados protonados del AF.....	58
<b>Tabla 4.</b> Parámetros alimentados en el software DigiElch para simular los voltamperogramas de antraquinona.....	60
<b>Tabla 5.</b> Valores establecidos para las concentraciones de donador de protones en incrementos logarítmicos proporcionales. ....	63

## LISTA DE FIGURAS

Pág.

- Figura 1.** Estructura química del ácido fólico. Los fragmentos que componen la molécula se indican en la parte inferior de la figura. ....20
- Figura 2.** Representación de la interacción del ácido fólico (negro) con el sitio activo en el receptor folato (azul). ....21
- Figura 3.** Voltamperogramas cíclicos ( $v = 0.1 \text{ Vs}^{-1}$ ) obtenidos sobre un electrodo de carbón vítreo para 1 mM de ácido fólico en a) acetonitrilo, b) DMSO, c) diclorometano/DMSO, y d) DMSO más 1 eq.  $\text{N}(\text{Bu})_4\text{OH}$ . Electrolito soporte: 0.1 M de  $\text{n-Bu}_4\text{NPF}_6$ . ....36
- Figura 4.** Voltamperogramas cíclicos ( $v = 0.1 \text{ Vs}^{-1}$ ) obtenidos sobre un electrodo de carbón vítreo para ácido fólico 2 mM desprotonado (curva negra) y concentraciones crecientes (curvas azul-roja: 0.05, 0.08, 0.13, 0.21, 0.32, 0.55, 0.88, 1.43, 2.35, 3.75 mM) de los donadores de protones: a) ácido salicílico, b) ácido benzoico, c) dimetilurea y d) agua. Electrolito soporte:  $\text{n-Bu}_4\text{NPF}_6$  0.1 M; disolvente: DMSO. Las flechas verticales indican la disminución  $\uparrow$  o el aumento  $\downarrow$  de la corriente de pico al incrementar la concentración de los donadores de protones. ....38
- Figura 5.** Estructura de (1) antraquinona, (2) 1-aminoantraquinona, (3) 1,4-diaminoantraquinona, (4) 1,2-dicloronaftoquinona y (5) 2,5-diclorobenzoquinona. 39
- Figura 6.** Voltamperogramas cíclicos ( $v = 0.1 \text{ Vs}^{-1}$ ) obtenidos sobre un electrodo de carbón vítreo para a) antraquinona b) 1,4-diaminoantraquinona, c) aminoantraquinona, d) 2,3-dicloronaftoquinona y e) 2,5-diclorobenzoquinona 1 mM (curva negra), en presencia de concentraciones crecientes a de ácido fólico (curvas azul-roja). Electrolito soporte:  $\text{n-Bu}_4\text{NPF}_6$  0.1 M; disolvente: DMSO. Las flechas verticales  $\downarrow$  indican la disminución de la corriente de pico al incrementar la concentración de ácido fólico. ....40

<b>Figura 7.</b> Difractograma de los puntos cuánticos sintetizados. Los planos cristalográficos del CdTe se indican en cada uno de los picos de difracción asignados. ....	43
<b>Figura 8.</b> Espectros de A) infrarrojo y B) UV-Vis de a) puntos cuánticos de CdTe, b) ácido fólico y c) puntos cuánticos de CdTe bioconjugados con ácido fólico. C) Espectros de fluorescencia para puntos cuánticos de CdTe a) sin modificar y c) bioconjugados con ácido fólico. D) Fotografías de puntos cuánticos de CdTe suspendidos en agua a) sin modificar y b) bioconjugados con ácido fólico. c) Estos últimos se muestran precipitados y secos. Iluminación: lámpara UV ( $\lambda = 265 \text{ nm}$ ). ....	44
<b>Figura 9.</b> Representación de los puntos cuánticos de CdTe modificados con ácido tioglicólico. ....	45
<b>Figura 10.</b> Representación de los puntos cuánticos de CdTe bioconjugados con ácido fólico. ....	45
<b>Figura 11.</b> Voltamperogramas cíclicos ( $v = 0.1 \text{ Vs}^{-1}$ ) obtenidos sobre un electrodo de carbón vítreo para a) antraquinona, b) 1-aminoantraquinona y c) 2,3-dicloronaftoquinona 1 mM (curva negra) y en presencia de concentraciones crecientes de folato bioconjugado con puntos cuánticos de CdTe (curvas azul-roja). Electrolito soporte: $n\text{-Bu}_4\text{NPF}_6$ 0.1 M; disolvente: DMSO. ....	46
<b>Figura 12.</b> Voltamperogramas cíclicos ( $v = 0.1 \text{ Vs}^{-1}$ ) simulados en Digielch para antraquinona, 1 mM (curva negra) y en presencia de concentraciones crecientes de folato bioconjugado con puntos cuánticos de CdTe (curvas azul-roja).....	49
<b>Figura 13.</b> Voltamperogramas cíclicos ( $v = 0.1 \text{ Vs}^{-1}$ ) obtenidos sobre un electrodo de carbón vítreo para a) 1,4-diaminoantraquinona b) 1-aminoantraquinona, c) antraquinona y d) 2,3-dicloronaftoquinona 1 mM. Electrolito soporte: $n\text{-Bu}_4\text{NPF}_6$ 0.1 M; disolvente: DMSO.....	59
<b>Figura 14.</b> Voltamperogramas cíclicos ( $v = 0.1 \text{ Vs}^{-1}$ ) simulados en Digielch para a) 1-aminoantraquinona y b) 2,3-dicloronaftoquinona 1 mM (curva negra) y en presencia de concentraciones crecientes de folato bioconjugado con puntos cuánticos de CdTe (curvas azul-roja). ....	60

**Figura 15.** Potenciales de media onda ( $E_{1/2}$ ) en función de la concentración de folato bioconjugado con puntos cuánticos de CdTe adicionado a disoluciones  $0.001 \text{ molL}^{-1}$  de: a) antraquinona, b) 2,3-dicloronaftoquinona y c) 1-aminoantraquinona. .... 62

**Figura 16.** Voltamperogramas cíclicos ( $v = 0.01 \text{ Vs}^{-1}$ ) obtenidos sobre electrodos de pasta de carbono a) sin modificar, b) con puntos cuánticos de CdTe y c) con puntos cuánticos de CdTe bioconjugados con ácido fólico, ambos dispersos en la pasta de carbono. Electrolito soporte: NaOH  $0.1 \text{ M}$  y  $\text{Na}_2\text{S}$   $1 \text{ Mm}$ ; disolvente: agua..... 65

## LISTA DE ANEXOS

	Pag.
<b>Anexo A.</b> Ácido fólico como receptor de puentes de hidrógeno .....	59
<b>Anexo B.</b> Voltamperogramas del radical anión .....	61
<b>Anexo C.</b> Voltamperogramas simulados .....	62
<b>Anexo D.</b> Ajuste al modelo de asociaciones sucesivas .....	64
<b>Anexo E.</b> Cálculo adiciones logarítmicas de donadores de protones .....	65
<b>Anexo F.</b> Respuesta electroquímica de puntos cuánticos de CdTe .....	67

## RESUMEN

**TÍTULO:** ESTUDIO POR VOLTAMPEROMETRÍA DE PUENTES DE HIDRÓGENO EN ÁCIDO FÓLICO LIBRE Y BIOCONJUGADO EN PUNTOS CUÁNTICOS DE CdTe\*

**AUTORES:** Mendoza Castro, Mónica Judith\*\*

**PALABRAS CLAVES:** Ácido fólico, puentes de hidrógeno, solventes no acuosos, puntos cuánticos, calcogenuros, reconocimiento molecular

**DESCRIPCIÓN:** El ácido fólico es una forma sintética de folato, el cual debe ser reducido por la enzima metilentetrahidrofolato reductasa para que sea biológicamente activo. El ácido fólico está involucrado en el desarrollo de enfermedades como el cáncer, por lo que se ha empleado bioconjugado en materiales inorgánicos para detectar o tratar esta enfermedad. El reconocimiento biológico del folato se realiza por puentes de hidrógeno, interacciones que deben modificarse al realizar su bioconjugación. En este trabajo se estudió electroquímicamente la asociación por puentes de hidrógeno en el ácido fólico libre y bioconjugado en puntos cuánticos fluorescentes de telururo de cadmio, empleando diferentes quinonas para emular al receptor folato en un medio no acuoso de dimetilsulfóxido. En el caso del ácido fólico libre, la interacción es tan fuerte que sólo se identifican transferencias de protón. El folato bioconjugado forma complejos estables de asociación por puentes de hidrógeno con los radicales aniones y dianiones formados a partir de las quinonas seleccionadas. Se determinaron las constantes de asociación cuyos valores se encuentran entre 100 y 150 M<sup>-1</sup>. De las quinonas estudiadas, la antraquinona presenta el mejor comportamiento como receptor, mostrando que es una molécula capaz de reconocer selectivamente y asociarse con folato reducido, la especie que es biológicamente activa. Estos resultados indican que la antraquinona podría emplearse como receptor para estudiar el reconocimiento de moléculas biológicamente activas. Así mismo, el material sintetizado es una alternativa atractiva para emplearse como sonda en sensores quimioluminescentes o electroquimioluminescentes.

---

\*Proyecto de grado (modalidad: proyecto de investigación)

\*\* Facultad de Ciencias. Escuela Química.

Director: Prof. Dr. Ángel Manuel Meléndez Reyes. Codirector: Prof. Dr. Carlos Eduardo Frontana Vázquez.

## ABSTRACT

**TITLE:** VOLTAMMETRIC STUDY OF HYDROGEN BONDS IN FREE FOLIC ACID AND BIOCONJUGATED WITH CdTe QUANTUM DOTS\*

**AUTHORS:** Mendoza Castro, Mónica Judith\*\*

**KEYWORDS:** Folic acid, hydrogen bonds, non-aqueous solvents, quantum dots, chalcogenides, molecular recognition

**DESCRIPTION:** Folic acid is a synthetic form of folate. It must be enzymatically reduced by methylenetetrahydrofolate reductase to make it biologically active. Folic acid is associated with disease development such as cancer, for that reason it has been used bioconjugated in inorganic materials to detect or treat that disease. Biological recognition of folate is by hydrogen bonds, these interactions must be modified when the folate is bioconjugated. In this research, it was electrochemically studied the association by hydrogen bonds between folic acid (free or bioconjugated in CdTe fluorescent quantum dots) and quinones that emulate folate receptor in a non-aqueous solvent, dimethyl sulfoxide. In free folic acid the interaction is strong that just proton transfer processes are identified. The conjugated folate forms stable association complexes by hydrogen bonds with radical anions and dianions formed from the selected quinones. The association constants calculated are between 100 and 150 M<sup>-1</sup>. From quinones studied, anthraquinone has a good behavior as a receptor, indicating that is a capable molecule to selectively recognize and associate with reduced folate, the biologically active species. These results show that the anthraquinone could be used as a receptor to study the recognition of biologically active molecules. Also, the synthesized material is an attractive alternative to be use as a probe in electrochemiluminescence or chemiluminescent sensors.

---

\*Degree project (modality: research project)

\*\* Facultad de Ciencias. Escuela Química.

Adviser: Prof. Dr. Ángel Manuel Meléndez Reyes. Coadviser: Prof. Dr. Carlos Eduardo Frontana Vázquez.

## INTRODUCCIÓN

El reconocimiento molecular es muy importante debido a sus implicaciones en el desarrollo de sensores, máquinas y dispositivos moleculares; sin embargo, es muy difícil encontrar receptores que sean selectivos<sup>1,2</sup>. En particular el reconocimiento del ácido fólico (AF) por el receptor folato ha recibido una gran atención, ya que está relacionado con varios tipos de cáncer<sup>3,4</sup>. Recientemente, se determinó por difracción de rayos X de monocristal que el reconocimiento molecular del AF se establece a través de puentes de hidrógeno con el sitio activo del receptor folato<sup>5</sup>. Aunque este hallazgo representa un gran avance desde el punto de vista estructural, una limitante para entender más a fondo las interacciones a nivel molecular es que no aborda la forma biológicamente activa del AF, que es su forma reducida como 5-metiltetrahidrofolato<sup>6</sup>.

La electroquímica molecular ofrece una alternativa para caracterizar las reacciones de transferencia electrónica que están acopladas a la transferencia de protones<sup>7</sup>, por ejemplo, como aquí se aborda, la reducción del AF a folato seguida de la formación de puentes de hidrógeno. Sin embargo, además del reto que exige encontrar las condiciones experimentales adecuadas para determinar interacciones vía puente de hidrógeno (por ejemplo, la determinación del disolvente, el

---

<sup>1</sup>LEHN, Jean-Marie. From supramolecular chemistry towards constitutional dynamic chemistry and adaptive chemistry. *Chem. Soc. Rev.* 2007, Vol. 36, No 2, p. 151-160.

<sup>2</sup>LEHN, Jean-Marie. Toward complex matter: Supramolecular chemistry and self-organization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2002, Vol. 99, No 8, p. 4763-4768.

<sup>3</sup>ANTONY, A.C, UTLEY, C, VAN HOME, K.C. y KOLHOUSE J.F. (1981) Isolation and characterization of a folate receptor from human-placenta, *J. Biol. Chem.* 256 (18), 9684-9692.

<sup>4</sup>KELEMEN, Linda E. The role of folate receptor  $\alpha$  in cancer development, progression and treatment: cause, consequence or innocent bystander. *Int. J. Cancer*, 2006, Vol. 119, No 2, p. 243-250.

<sup>5</sup>CHEN, Chen, *et al.* Structural basis for molecular recognition of folic acid by folate receptors. *Nature*, 2013, Vol. 500, No 7463, p. 486-489.

<sup>6</sup>PIETRZIK, Klaus; BAILEY, Lynn; SHANE, Barry. Folic acid and L-5-methyltetrahydrofolate. *Clin. Pharmacokinet.* 2010, Vol. 49, No 8, p. 535-548.

<sup>7</sup>HAMMES-SCHIFFER, Sharon; STUCHEBRUKHOV, Alexei A. Theory of coupled electron and proton transfer reactions. *Chem. Rev.* 2010, Vol. 110, No 12, p. 6939-6960.

establecimiento de la condición de acidez, entre otros), la dificultad de esta metodología consiste en encontrar una molécula que promueva estas interacciones.

Desde el punto de vista de la aplicación del AF en sensores, otro reto es lograr bioconjugarlo en un material inorgánico. Así, con la perspectiva de desarrollar un sensor electroquimioluminiscente, se bioconjugó ácido fólico en la superficie de puntos cuánticos de CdTe, de tal manera que no perdiera sus propiedades fluorescentes<sup>8</sup>. Por tanto, con el propósito de encontrar un receptor de puentes de hidrógeno que emule al receptor folato, y que además permita cuantificar esta interacción desde el punto de vista termodinámico, a través de la constante de asociación con el AF o folato, se estudiaron una serie de quinonas como receptoras de puentes de hidrógeno, en vista de su participación en procesos biológicos que involucran reacciones transferencia electrónica acopladas a transferencia de protón<sup>9</sup>.

---

<sup>8</sup> MOROSINI, Vincent, *et al.* Quantum dot–folic acid conjugates as potential photosensitizers in photodynamic therapy of cancer. *Photochem. Photobiol.* 2011, Vol. 10, No 5, p. 842-851.

<sup>9</sup> OKAMURA, M. Y.; FEHER, G. Proton transfer in reaction centers from photosynthetic bacteria. *Annu. Rev. Biochem.* 1992, Vol. 61, No 1, p. 861-896.

## 1. ANTECEDENTES

El reconocimiento molecular hace referencia a la interacción específica entre receptores moleculares y determinados sustratos que se enlazan vía interacciones no covalentes, que pueden ser puentes de hidrógeno, enlaces de coordinación o fuerzas de van der Waals<sup>1</sup>. Estas interacciones son de gran interés debido a que ocurren en muchos procesos biológicos, como el caso del folato y el receptor folato, para los cuales el reconocimiento ocurre por formación de puentes de hidrógeno.

### 1.1. EL ÁCIDO FÓLICO Y EL RECEPTOR FOLATO

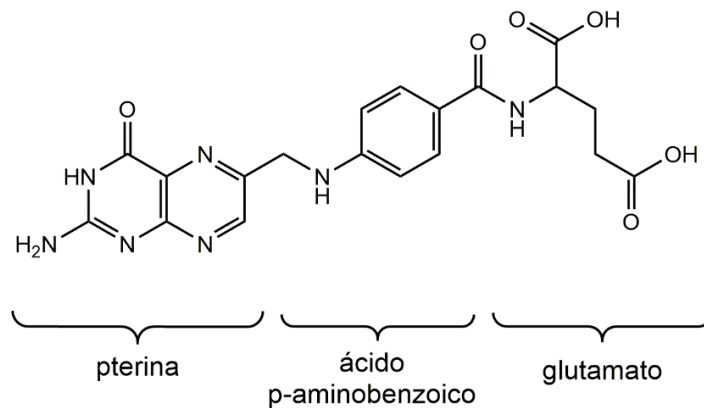
El AF (vitamina B9), al ser necesario para el funcionamiento del cuerpo humano y no ser biosintetizado por el mismo, ha sido objeto de numerosos estudios para establecer su metabolismo y bio reconocimiento, ya que se ha mostrado que tiene una influencia en enfermedades cardiovasculares, anemia, cáncer, y otros tipos de afecciones<sup>3,4,10,11</sup>. Ciertamente, el AF es en realidad una forma sintética de folato, que deber ser reducido biológicamente por la enzima metilentetrahidrofolato reductasa para volverse biológicamente activo<sup>6</sup>. El AF es una molécula compuesta estructuralmente por un anillo de pterina y un residuo de glutamato vinculados por el ácido p-aminobenzoico (Fig. 1).

---

<sup>10</sup> GLYNN, Simone A.; ALBANES, Demetrius. Folate and cancer: a review of the literature. *Nutrition and cancer*, 1994, Vol. 22, No 2, p. 101-119.

<sup>11</sup> WILCKEN, David EL, *et al.* Folic acid lowers elevated plasma homocysteine in chronic renal insufficiency: possible implications for prevention of vascular disease. *Metabolism.*, 1988, Vol. 37, No 7, p. 697-701.

**Figura 1.** Estructura química del ácido fólico. Los fragmentos que componen la molécula se indican en la parte inferior de la figura.

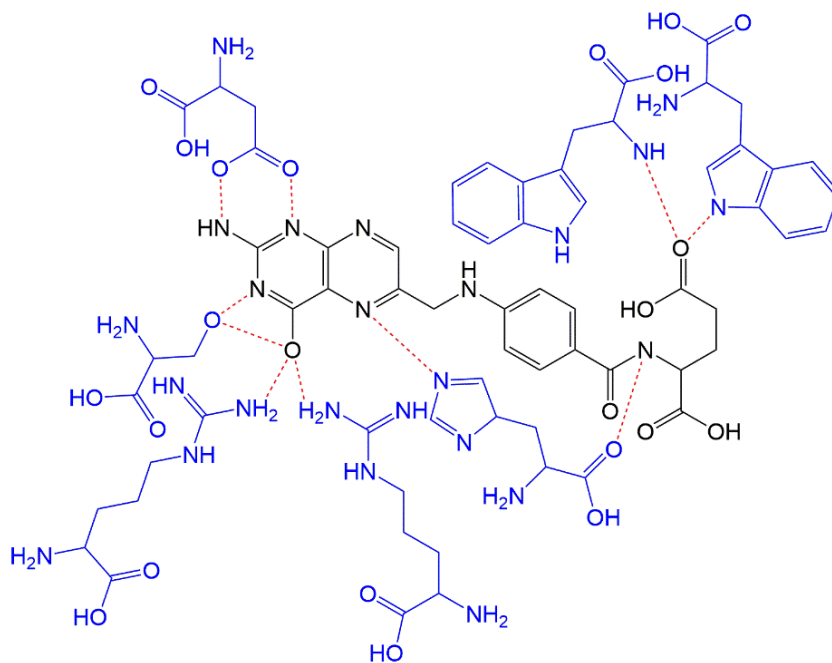


El AF es reconocido selectivamente por los receptores folato, que son glicosilfosfatidilinositoles conjugados con proteínas de membrana. Aunque hay tres tipos de receptores folato ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ), sólo el receptor  $\alpha$  puede reconocer el folato reducido, que es la forma biológicamente activa y más abundante, que se forma enzimáticamente a partir del AF obtenido por medio de la alimentación<sup>6</sup>. Así, la interacción del AF con los receptores folato promueve la formación de un endosoma que lo transporta al medio intracelular<sup>3</sup>. Las células normales tienen niveles de receptores folato muy limitados pero las cancerosas presentan una sobreexpresión de esta proteína, esto implica que el AF puede ser empleado como biomarcador para distinguir entre células normales y células cancerígenas. El alto nivel de receptores folato en las células cancerosas se debe a que el metabolismo del AF está acoplado al ciclo celular, en las rutas metabólicas de síntesis de ADN y metilaciones biológicas, jugando un papel importante en la formación de metionina, purina y pirimidina, precursores de los ácidos nucleicos<sup>4,12</sup>.

---

<sup>12</sup> WU, Marietta; GUNNING, William; RATNAM, Manohar. Expression of folate receptor type  $\alpha$  in relation to cell type, malignancy, and differentiation in ovary, uterus, and cervix. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 1999, Vol. 8, No 9, p. 775-782.

**Figura 2.** Representación de la interacción del ácido fólico (negro) con el sitio activo en el receptor folato (azul).



Los puentes de hidrógeno están involucrados en el reconocimiento de agonistas y antagonistas en receptores<sup>13,14,15,16</sup>, tal es el caso del par AF/receptores folato, que se ha demostrado por difracción de rayos X que se reconocen a través de la formación de puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas (Fig. 2). Estos enlaces estabilizan la molécula y la fijan durante el transporte del medio extracelular al intracelular (endocitosis), dentro de la célula el AF es liberado debido al pH ácido del endosoma<sup>17</sup>.

---

<sup>13</sup> DANNENBERG, J. J. An Introduction to hydrogen bonding, *J. Am. Chem. Soc.* 1998, Vol. 120, No. 22, p. 5604–5604.

<sup>14</sup> JEFFREY, George A.; SAENGER, Wolfram. Hydrogen bonding in biological structures. Berlín, Springer Science & Business Media, 2012.

<sup>15</sup> AAKERÖY, Christer B.; SEDDON, Kenneth R. The hydrogen bond and crystal engineering. *Chem. Soc. Rev.* 1993, Vol. 22, No 6, p. 397-407.

<sup>16</sup> NIEMZ, Angelika; ROTELLO, Vincent M. From enzyme to molecular device. Exploring the interdependence of redox and molecular recognition. *Acc. Chem. Res.* 1999, Vol. 32, No 1, p. 44-52.

<sup>17</sup> CHEN, Chen. *Structural basis for molecular recognition of folic acid by folate receptors*. Singapur, 2014. Trabajo de grado (Doctorado). National University of Singapore.

## 1.2. LOS PUENTES DE HIDRÓGENO Y SU CARACTERIZACIÓN ELECTROQUÍMICA

Los puentes de hidrógeno son interacciones débiles formadas entre un hidrógeno y un átomo electronegativo<sup>18</sup>. La fuerza de esta interacción puede variar desde 4 hasta 40 kcal/mol en función del carácter de la interacción (covalente o iónica)<sup>18,19</sup>. La naturaleza electrostática de los puentes de hidrógeno permite que la fuerza de su interacción pueda modificarse por transferencia electrónica, proceso que es conocido como “control electroquímico de enlaces vía puentes de hidrógeno” (ECHB, por sus siglas en inglés)<sup>18,20</sup>. El estado de carga de las especies involucradas en la formación del puente de hidrógeno puede ser alterado reduciendo al aceptor del puente de hidrógeno, lo que aumenta la densidad electrónica sobre el átomo receptor y lo convierte en un mejor aceptor, dando lugar a la formación de un complejo de asociación por puente de hidrógeno (esquema 1), el cual es un intermediario en la reacción de transferencia de protón<sup>21</sup>. Por otro lado, el donador del protón puede ser oxidado, de modo que la densidad electrónica sobre el grupo funcional donador disminuya y así la especie se convierte en un mejor donador<sup>22</sup>. Recientemente, ha incrementado el interés en la manipulación de

---

<sup>18</sup> Smith, D.K. *Electrochemically controlled H-bonding. Electrochemistry of functional supramolecular system*. John Wiley & Sons Inc. Nueva Jersey, 2010.

<sup>19</sup> COSTENTIN, Cyrille; ROBERT, Marc; SAVÉANT, Jean-Michel. Update 1 of: Electrochemical approach to the mechanistic study of proton-coupled electron transfer. *Chem. Rev.* 2010, vol. 110, no 12, p. PR1-PR40.

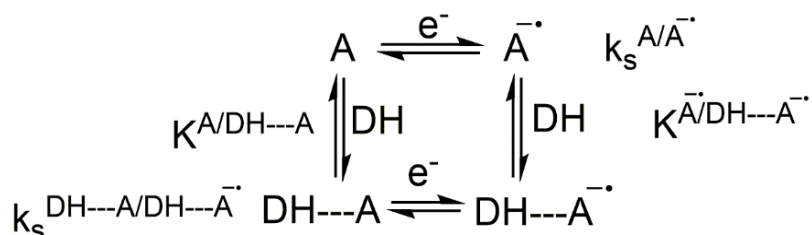
<sup>20</sup> BU, Jingjing, *et al.* Electrochemically controlled hydrogen bonding. Nitrobenzenes as simple redox-dependent receptors for arylureas. *J. Am. Chem. Soc.* 2005, Vol. 127, No 17, p. 6423-6429.

<sup>21</sup> MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, Eduardo; FRONTANA, Carlos. Influence of the Electron Transfer Rate on Electrochemically Controlled Hydrogen Bonding. *Procedia Chemistry*, 2014, Vol. 12, p. 108-114

<sup>22</sup> COSTENTIN, Cyrille. Electrochemical approach to the mechanistic study of proton-coupled electron transfer. *Chem. Rev.* 2008, Vol. 108, No 7, p. 2145-2179.

puentes de hidrógeno para desarrollar fármacos<sup>23</sup>, sintetizar receptores<sup>24</sup> y optimizar la síntesis de materiales en estado sólido<sup>25,26</sup>.

**Esquema 1.** Representación de las reacciones que ocurren en los procesos de transferencia de electrones acoplados a la formación de puentes de hidrógeno, donde A representa la especie oxidada, A<sup>-</sup> la especie reducida y DH un donador de protones<sup>27</sup>.



La interacción por puentes de hidrógeno puede ser tan fuerte que se desplace hacia la transferencia de protón (PT). Este tipo de sistemas se conocen como procesos de transferencia de electrones acoplados a procesos de transferencia de protones (PCET, por sus siglas en inglés)<sup>19,20</sup>. Se han informado 3 posibles rutas por las cuales puede llevarse a cabo un PCET (esquema 2), una contempla la transferencia de protón posterior a la transferencia electrónica, en otra los dos procesos suceden en el orden contrario y una ruta adicional en que los dos procesos ocurren de manera concertada<sup>18</sup>. La formación de puentes de hidrógeno entre nitrocompuestos

<sup>23</sup> ABRAHAM, Michael H., *et al.* Hydrogen bonding. Part 9. Solute proton donor and proton acceptor scales for use in drug design. *J. Chem. Soc. Perkin Transactions 2*, 1989, No 10, p. 1355-1375.

<sup>24</sup> GE, Yu; SMITH, Diane K. Development of chemical sensors based on redox-dependent receptors. Preparation and characterization of phenanthrenequinone-modified electrodes. *Anal. Chem.* 2000, Vol. 72, No 8, p. 1860-1865

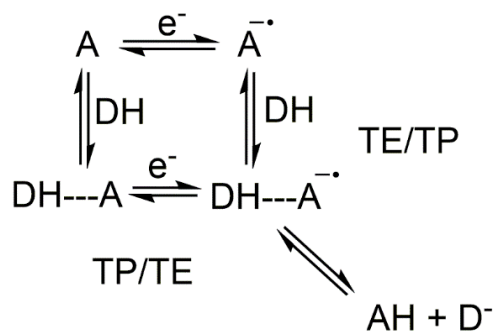
<sup>25</sup> CONN, M. Morgan; REBEK, Julius. Self-assembling capsules. *Chem. Rev.* 1997, Vol. 97, No 5, p. 1647-1668.

<sup>26</sup> PRINS, Leonard J.; REINHOUDT, David N.; TIMMERMAN, Peter. Noncovalent synthesis using hydrogen bonding. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2001, Vol. 40, No 13, p. 2382-2426.

<sup>27</sup> MARTÍNEZ, Eduardo. *Análisis de los efectos de la estructura química sobre el proceso de formación de puentes de hidrógeno controlado electroquímicamente*. 2014, México. Trabajo de grado (Maestría). Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica.

o quinonas y derivados de urea (que actúan como especies donadoras) son los casos más estudiados, en los cuales se han encontrado diferentes mecanismos de asociación y transferencia de protón<sup>18,20,28,29</sup>. El par quinona/hidroquinona es uno de los sistemas rédox orgánicos más estudiados, ya que participa en diversos procesos biológicos; además, es uno de los sistemas mejor comportados desde el punto de vista electroquímico, ya que se presenta procesos reversibles sucesivos y transferencias monoelectrónicas<sup>30,31</sup>.

**Esquema 2.** Representación de las reacciones que ocurren durante los procesos de transferencia de electrones acoplados a procesos de transferencia de protón. A representa la especie oxidada, A<sup>-•</sup> un radical anión, DH un donador de protones, DH---A un complejo de asociación por puente de hidrógeno, AH la especie protonada, D<sup>-</sup> el donador desprotonado. TE y TP representan la transferencia de electrón y protón, respectivamente.



<sup>28</sup> MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, Eduardo, et al. Competition between hydrogen bonding and proton transfer during specific anion recognition by dihomooxalix [4] arene bidentate ureas. *J. Org. Chem.* 2016, Vol. 81, No 15, p. 6329-6335.

<sup>29</sup> MARTINEZ-GONZALEZ, Eduardo; FRONTANA, Carlos. Employment of Electrodonating Capacity as an Index of Reactive Modulation by Substituent Effects: Application for Electron-Transfer-Controlled Hydrogen Bonding. *J. Org. Chem.* 2014, vol. 79, no 3, p. 1131-1137.

<sup>30</sup> GUPTA, Neeraj; LINSCHITZ, Henry. Hydrogen-bonding and protonation effects in electrochemistry of quinones in aprotic solvents. *J. Am. Chem. Soc.* 1997, vol. 119, no 27, p. 6384-6391.

<sup>31</sup> OLUWAFEMI, S. O.; REVAPRASADU, N.; RAMIREZ, A. J. A novel one-pot route for the synthesis of water-soluble cadmium selenide nanoparticles. *J. Cryst. Growth*, 2008, Vol. 310, No 13, p. 3230-3234.

La formación de puentes de hidrógeno entre especies neutras se caracteriza generalmente por técnicas de resonancia magnética nuclear, resonancia paramagnética electrónica, difracción de rayos X de monocristal, espectroscopia Raman, entre otras<sup>18,27</sup>. La desventaja de estas técnicas es que no es posible estudiar sistemas donde las especies involucradas en la formación del puente de hidrógeno son cargadas y de difícil aislamiento, tal es el caso del ácido fólico reducido, que es la especie que reconoce el receptor folato<sup>32</sup>. Ante esta dificultad, la voltamperometría cíclica es una alternativa para estudiar la formación de puentes de hidrógeno, a través de la formación de radicales *in situ* en presencia de un donador de protones; así, la formación de los puentes de hidrógeno es detectada debido al efecto estabilizante de la asociación entre el donador y los radicales electrogenerados. De esta manera, al adicionar el donador y formar el complejo de asociación, disminuye la barrera energética que debe superar el electrón para reducirse. En consecuencia, ocurren desplazamientos en la curva voltamperométrica de la especie electroactiva hacia potenciales menos negativos, que a su vez producen cambios en los potenciales de media onda  $E_{1/2}$ <sup>18,27,33</sup>. Cuando el donador interactúa con mayor fuerza con la especie oxidada, la barrera energética aumenta, y con ello los potenciales de media onda se hacen más negativos<sup>18,33</sup>.

En electroquímica molecular, la validación de los mecanismos de reacción se confirma mediante simulaciones de los voltamperogramas. Para lo cual se requiere especificar el mecanismo de reacción propuesto y proporcionar las constantes de

---

<sup>32</sup> AKBAR, S.; ANWAR, A.; KANWAL, Q. Electrochemical determination of folic acid: A short review. *Anal. Biochem.* 2016, Vol. 510, p. 98-105.

<sup>33</sup> GÓMEZ, Martín; GONZÁLEZ, Felipe J.; GONZÁLEZ, Ignacio. A model for characterization of successive hydrogen bonding interactions with electrochemically generated charged species. The quinone electroreduction in the presence of donor protons. *Electroanalysis*, 2003, Vol. 15, No 7, p. 635-645.

transferencia electrónica y de equilibrio, los potenciales de pico, el intervalo de potencial y la velocidad de barrido.

### **1.3. EL PAPEL DEL SOLVENTE EN LA CARACTERIZACIÓN ELECTROQUÍMICA DE PUENTES DE HIDRÓGENO**

Uno de los factores más importantes al realizar un experimento electroquímico de ECHB es la elección del solvente apropiado, ya que se ha demostrado que los solventes próticos generan una competencia con el donador de protones; por esta razón se prefiere experimentar en solventes apróticos anfóteros de tipo protófilico, los cuales tienen una cierta afinidad para aceptar protones<sup>18,34</sup>. Por otra parte, la molécula empleada como receptor del puente de hidrógeno debe ser una especie que experimente procesos redox reversibles, y preferiblemente que tenga la posibilidad de formar equilibrios de transferencia electrónica sucesivos<sup>18</sup>. Desde el punto de vista electroquímico, un proceso reversible es aquel en que la separación de los potenciales de oxidación y reducción en una curva voltamperométrica es de 0.060 V, para un proceso en el cual se transfiere un electrón<sup>35</sup>.

### **1.4. ELECTROACTIVIDAD DEL ÁCIDO FÓLICO**

El comportamiento electroquímico del AF ha sido estudiado en agua en diferentes condiciones de acidez, y sus procesos de reducción son de tipo irreversible. Existe una controversia en la interpretación de los resultados obtenidos, ya que se ha propuesto que el ácido fólico se reduce a ácido 5,8-dihidrofólico seguido de una ruptura reductiva, lo cual no corresponde con lo informado por otros

---

<sup>34</sup> TOCHER, J. H.; EDWARDS, D. I. Electrochemical Characteristics of Nitro-Heterocyclic Compounds of Biological Interest: I. The Influence of Solvent. *Free Rad. Res. Comms.* 1988, vol. 4, no 5, p. 269-276.

<sup>35</sup> BARD, Allen J., et al. *Electrochemical methods: fundamentals and applications*. New York: wiley, 2001.

investigadores<sup>32,36,37</sup>. Una alternativa para observar procesos reversibles, que hasta donde se sabe no se ha explorado, es la evaluación de la reactividad del AF en medios no acuosos amortiguados, ya que debido a su naturaleza anfótera tiene varios pKa asociados a los grupos amino y carboxilo<sup>32,38</sup>, lo cual podría contribuir a desacoplar la reacción de transferencia de protón de la electrónica<sup>39,40</sup>.

El agua se puede comportar como ácido o base y reaccionar consigo misma, cuantitativamente esta reacción es descrita por la constante de autoprotólisis<sup>40,41</sup>. El comportamiento antes descrito también ocurre en otros solventes, por lo cual es posible controlar la cantidad de protones presentes en un medio cambiando el pH de la solución, independientemente de la naturaleza del solvente. En estos términos, el pH representa la concentración de iones lyonium (cationes del solvente) en solución y se define como  $pH = -\log(c_H/c^0)$  donde  $c_H$  es la concentración de iones hidrógeno (o lyonium) en mol/dm<sup>-3</sup> y  $c^0$  equivale a 1 mol/ dm<sup>-3</sup> (concentración estándar). Por tanto, el pH es definido en términos de la actividad relativa de los iones lyonium en solución<sup>42</sup>.

## 1.5. RECONOCIMIENTO DEL ÁCIDO FÓLICO Y SENSORES

Actualmente, en el campo del bioanálisis el desarrollo de sensores para detectar cáncer ha avanzado aceleradamente. Estos dispositivos requieren un mecanismo

---

<sup>36</sup>GURIRA, R. C.; MONTGOMERY, C.; WINSTON, R. Electrochemical reduction of folic acid reconsidered. *J. Electroanal. Chem.* 1992, Vol. 333, No 1-2, p. 217-233.

<sup>37</sup> DRYHURST, Glenn. *Electrochemistry of biological molecules*. Nueva York, Elsevier, 2012.

<sup>38</sup> SZAKÁCS, Zoltán; NOSZÁL, Béla. Determination of dissociation constants of folic acid, methotrexate, and other photolabile pteridines by pressure-assisted capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 2006, Vol. 27, No 17, p. 3399-3409.

<sup>39</sup> QUAN, May, et al. Voltammetry of quinones in unbuffered aqueous solution: reassessing the roles of proton transfer and hydrogen bonding in the aqueous electrochemistry of quinones. *J. Am. Chem. Soc.* 2007, Vol. 129, No 42, p. 12847-12856.

<sup>40</sup> POPOVYCH, Orest. Estimation of Medium Effects for Single Ions and Their Role in the Interpretation of Nonaqueous pH. *Anal. Chem.* 1966, Vol. 38, No 4, p. 558-563.

<sup>41</sup> KOLTHOFF, I. M. Acid-base equilibria in dipolar aprotic Solvents. *Anal. Chem.* 1974. Vol. 46, No. 13, p. 1992-2003.

<sup>42</sup> HARVEY, David. *Modern analytical chemistry*. New York: McGraw-Hill, 2000.

de reconocimiento biológico, como el ácido fólico conectado en serie a un transductor<sup>36</sup>. El entendimiento del reconocimiento molecular es fundamental para el correcto diseño y desarrollo de sensores. En el caso de los sensores electroquimioluminiscentes, el AF es inmovilizado sobre un material inorgánico fluorescente, que al suministrarle un potencial determinado se genera una emisión de radiación en el intervalo visible e infrarrojo<sup>43</sup>. Este tipo de sensores pueden ser desarrollado a través de la síntesis de puntos cuánticos de calcogenuros, especialmente de CdTe, ya que presentan un alto coeficiente de absorción molar ( $0.5-5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), característica necesaria para ser usados en sensores ultrasensibles<sup>44</sup>. Los puntos cuánticos de CdTe han sido usados para la detección electroquimioluminiscente de compuestos orgánicos<sup>45</sup> y de células cancerosas, empleando un vidrio conductor modificado con puntos cuánticos de CdTe y funcionalizado con AF<sup>46</sup>.

Cuando el AF se inmoviliza en puntos cuánticos ocurren pérdidas en sus grados de libertad, y en consecuencia deben ocurrir cambios en el mecanismo de reconocimiento molecular, lo cual debe impactar en la formación de puentes de hidrógeno. Aprovechando que las interacciones entre el AF y el receptor folato son por puentes de hidrógeno y que estos, a su vez, pueden estudiarse electroquímicamente alterando el estado de carga de moléculas orgánicas electroactivas<sup>18</sup>, se plantea la siguiente hipótesis: *Es posible evaluar electroquímicamente las propiedades de interacción del ácido fólico inmovilizado*

---

<sup>43</sup> FORSTER, Robert J.; BERTONCELLO, Paolo; KEYES, Tia E. Electrogenated chemiluminescence. *Annu. Rev. Anal. Chem.* 2009, Vol. 2, p. 359-385.

<sup>44</sup> HOSHINO, Akiyoshi, et al. Physicochemical properties and cellular toxicity of nanocrystal quantum dots depend on their surface modification. *Nano Letters*, 2004, vol. 4, no 11, p. 2163-2169.

<sup>45</sup> LIU, Xuan, et al. Anodic electrochemiluminescence of CdTe quantum dots and its energy transfer for detection of catechol derivatives. *Anal. Chem.* 2007, vol. 79, no 21, p. 8055-8060.

<sup>46</sup> JIANG, Hui; WANG, Xuemei. Label-free detection of folate receptor (+) cells by molecular recognition mediated electrochemiluminescence of CdTe nanoparticles. *Anal. Chem.* 2014, vol. 86, no 14, p. 6872-6878.

*sobre un material inorgánico con una molécula que emule al receptor folato, mediante la formación controlada de puentes de hidrógeno.*

## 2. OBJETIVOS

### Objetivo general

Evaluar electroquímicamente la formación de puentes de hidrógeno en ácido fólico libre y bioconjugado con puntos cuánticos de CdTe y sus implicaciones en el desarrollo de un biosensor.

### Objetivos específicos

- Determinar las condiciones experimentales para establecer la formación de puentes de hidrógeno en ácido fólico.
- Obtener un material fotoactivo de puntos cuánticos de CdTe bioconjugados con ácido fólico.
- Evaluar electroquímicamente con radicales aniones electrogenerados la formación de puentes de hidrógeno en el ácido fólico en solución y bioconjugado con puntos cuánticos.

### 3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

#### 3.1. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

**3.1.1. Soluciones no acuosas de ácido fólico.** Soluciones de AF 2 mM en (1) acetonitrilo, (2) una mezcla diclorometano:DMSO (10:90) y (3) dimetil sulfóxido (DMSO, anhidro y sobre tamiz molecular) fueron preparadas conteniendo 0.1 M de hexafluorofosfato de tetrabutilamonio ((nBu)<sub>4</sub>NPF<sub>6</sub>, secado a 105°C) y 1 mM de ferroceno. En el caso de (3), se prepararon 4 soluciones adicionales a distintas condiciones de acidez; 2 de ellas amortiguadas a pH 11.0 y 6.7 con ácido benzoico y ácido salicílico 30 mM adicionando hidróxido de tetrabutilamonio (Bu<sub>4</sub>NOH), de tal manera que su concentración en la solución fuera 15 mM; las otras 2 soluciones se prepararon adicionando, ya sea 30 mM de agua o 30 mM de dimetil urea.

**3.1.2. Soluciones no acuosas de quinonas.** Soluciones 1 mM de cada una de las siguientes quinonas: (1) antraquinona, (2) 1-aminoantraquinona, (3) 1,4-diaminoantraquinona, (4) 1,2-dicloronaftoquinona y (5) 2,5-dicorobenzoquinona fueron preparadas en DMSO, conteniendo ferroceno 1 mM y hexafluorofosfato de tetrabutilamonio 0.1 M.

#### 3.2. MEDIDAS ELECTROQUÍMICAS

Todos los experimentos se realizaron en una celda convencional de tres electrodos, con una capacidad de 5 mL. Los experimentos fueron realizados en un potencióstato AUTOLAB PGSTAT 302N con el software Nova 1.11. El electrodo de trabajo fue un electrodo de disco de carbón vítreo (diámetro: 1.0 mm), se empleó una referencia interna de ferroceno respecto a un alambre de platino, y un alambre de platino como electrodo auxiliar. La solución inicial (volumen = 1 mL) fue burbujeada con nitrógeno (grado 5.0) durante 15 min para desplazar el oxígeno disuelto, entre cada experimento la solución fue burbujeada por 2 min. En todas las medidas la caída óhmica fue compensada con un valor de resistencia determinado por el método de retroalimentación positiva (Ru ~1900 Ω).

**3.2.1. Estudio del ácido fólico como aceptor de puentes de hidrógeno.** Los experimentos de voltamperometría cíclica se realizaron en soluciones de AF de distinta acidez (sección 3.1.1.), iniciando el barrido de potencial en dirección negativa desde el potencial a circuito abierto (OCP), a una velocidad de barrido de 0.1 V/s. En el caso de las soluciones de AF sin amortiguación, se realizaron mediciones con adiciones logarítmicas de las soluciones amortiguadores (ácido benzoico/benzoato o ácido salicílico/salicilato) o, ya sea, agua o dimetil urea.

**3.2.2. Estudio del ácido fólico como donador de puentes de hidrógeno.** Los experimentos de voltamperometría cíclica se realizaron en soluciones de quinonas en DMSO (sección 3.1.2), iniciando el barrido de potencial en dirección negativa desde el OCP, a una velocidad de barrido de 0.1 V/s. Se realizaron mediciones con adiciones logarítmicas de una solución 3mM de ácido de fólico o el folato bioconjugado en los puntos cuánticos de CdTe en DMSO, de tal manera que se mantuviera constante la concentración de la quinona, el electrolito soporte y la referencia interna. En el anexo E se describe el cálculo de las adiciones logarítmicas.

### **3.3. SIMULACIÓN DE VOLTAMPEROGRAMAS**

Los voltamperogramas obtenidos experimentalmente para el bioconjugado fueron simulados en el programa Digielch. Las ecuaciones diferenciales asociadas a la obtención de la curva son resueltas y optimizadas por el programa, de modo que para obtener el voltamperograma se suministra el mecanismo y se alimentan los parámetros que se muestran en el Anexo C.

### **3.4. SÍNTESIS DE PUNTOS CUÁNTICOS DE CdTe BIOCONJUGADOS CON ÁCIDO FÓLICO**

**3.4.1. Síntesis de puntos cuánticos de CdTe modificados superficialmente.** Puntos cuánticos de CdTe fueron sintetizados en solución acuosa, según el procedimiento descrito en la referencia 31, con algunas modificaciones que se

describen a continuación. En un matraz de fondo redondo de tres bocas se disolvieron 4 mmol de  $\text{CdCl}_2$  en 200 mL de agua bidestilada y desgasificada en vacío, seguido de la adición de ácido tioglicólico (TGA) bajo agitación vigorosa. Simultáneamente se preparó en atmósfera de Ar al precursor de telurio, mezclando con agitación vigorosa Te,  $\text{NaBH}_4$  y agua (5 mL por cada 0.2 mmol de Te) durante 3 h. Se inyectó la solución de  $\text{NaHTe}$  a la solución de Cd que previamente había sido ajustada a pH 10.0. La mezcla se calentó a 100 °C por 4 h para promover la nucleación de los puntos cuánticos. Así, la síntesis se realizó en una relación molar 1/0.05/1.3/0.15 para  $\text{Cd}^{2+}/\text{Te}/\text{TGA}/\text{NaBH}_4$ , respectivamente. Trascurrido el tiempo de reacción, la mezcla fue llevada a temperatura ambiente y se precipitaron los QD adicionando acetona, los cuales se purificaron por centrifugación (5000 rpm/15 min) y fueron secados con una bomba de vacío.

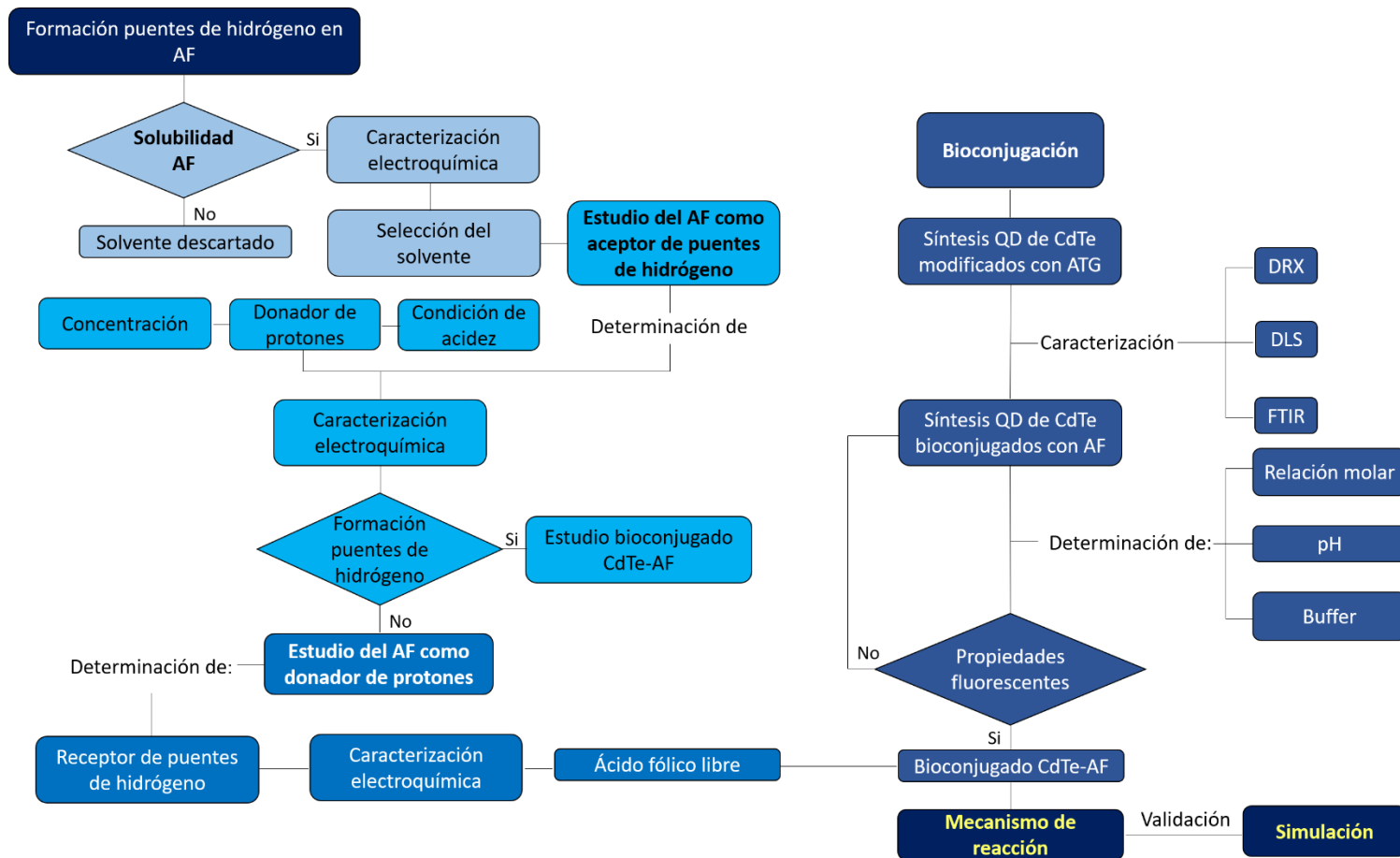
**3.4.2. Síntesis del bioconjugado puntos cuánticos-ácido fólico.** Los puntos cuánticos fueron bioconjugados según la metodología reportada en la referencia 8 con algunas modificaciones. Una cantidad equimásica de puntos cuánticos (100 mg) a la cantidad de AF agregado fue resuspendida en un buffer de boratos ( $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ) 0.5 M y pH 9.0, y esta mezcla se mantuvo bajo agitación por 2 h. Posteriormente fueron adicionados clorhidrato de 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropil)carbodiimida (EDC), *N*-hidroxisuccinimida (NHS) y AF en una relación molar 2/2/1 para EDC/NHS/FA, respectivamente; esta mezcla se mantuvo en agitación durante 24 h. Los puntos cuánticos bioconjugados se precipitaron con acetona, se purificaron por centrifugación y fueron secados con una bomba de vacío.

### **3.5. CARACTERIZACIÓN DEL BIOCONJUGADO**

Las muestras de CdTe modificadas con ácido tioglicólico y bioconjugado con ácido fólico fueron caracterizadas por espectroscopía UV-Vis e IR, fluorescencia y XRD. En el caso de la espectroscopia IR, la muestra se diluyó en KBr y se elaboró una pastilla; los espectros se obtuvieron en un equipo Lumex Infracum-FT con

transformada de Fourier. Para las medidas de UV/Vis y fluorescencia se disolvieron los puntos cuánticos sintetizados en agua y el AF en DMSO en una concentración  $1 \times 10^{-4}$  M usando un vórtex por 5 min. Las medidas de UV-Vis se realizaron en un espectrofotómetro 2600, Shimadzu, empleando el software UVprobe 2.5, mientras que los espectros de fluorescencia se obtuvieron en un espectrofotómetro Agilent Cary Eclipse, con el programa Cary Eclipse Scan Application 1.2. Para las mediciones de difracción de rayos X, la muestra fue depositada mediante la técnica de llenado frontal en un porta muestras de polimetilmetacrilato. Los difractogramas se obtuvieron con un equipo D8 Advance (Bruker) con geometría DaVinci de muestras policristalinas modo polvo. El intervalo de medición fue de  $5^\circ$  a  $80^\circ$  en  $2\theta$  y la radiación usada fue  $\text{CuK}\alpha 1$ .

A continuación, se muestra un diagrama de la metodología seguida para la investigación.

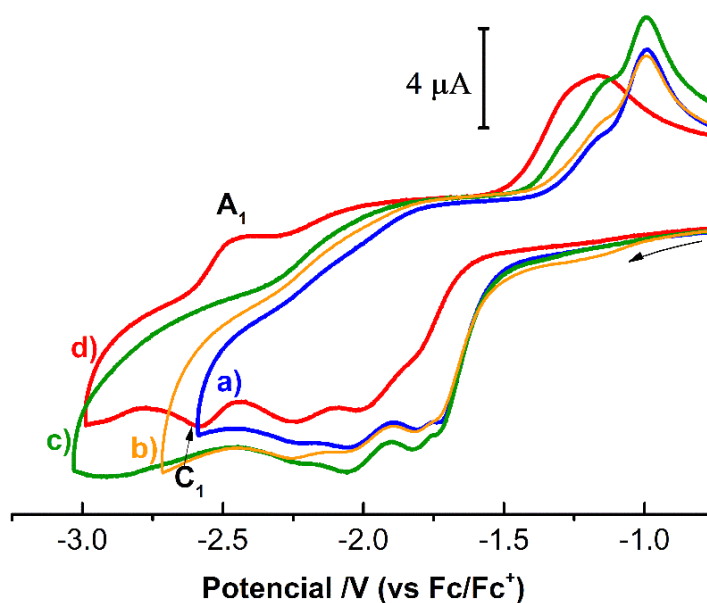


## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. FORMACIÓN DE PUENTES DE HIDRÓGENO EN ÁCIDO FÓLICO LIBRE

Con la finalidad de seleccionar el disolvente apropiado para estudiar electroquímicamente la formación de puentes de hidrógeno en AF, se estudió su compartimiento en acetonitrilo, DMSO, y una mezcla diclorometano/DMSO en una proporción 10:90. En la Fig. 3 se muestra que el comportamiento electroquímico del AF es similar en los disolventes estudiados.

**Figura 3.** Voltamperogramas cíclicos ( $v = 0.1 \text{ Vs}^{-1}$ ) obtenidos sobre un electrodo de carbón vítreo para 1 mM de ácido fólico en a) acetonitrilo, b) DMSO, c) diclorometano/DMSO, y d) DMSO más 1 eq.  $\text{N}(\text{Bu})_4\text{OH}$ . Electrolito soporte: 0.1 M de  $\text{n-Bu}_4\text{NPF}_6$ .



Teniendo en cuenta que en DMSO: 1) el potencial de descomposición del solvente es más negativo ( $\sim -3.0 \text{ V vs Fc/Fc}^+$ ), 2) los picos de reducción presentan mayor definición y 3) el AF es más soluble en DMSO, se eligió realizar los estudios posteriores en este solvente. Debido a la ausencia de procesos electroquímicos de tipo reversible, los cuales son necesarios para determinar la formación de puentes

de hidrógeno, y considerando que el AF puede actuar como receptor o donador de puentes de hidrógeno, se adicionó la base fuerte hidróxido de tetrabutilamonio,  $N(\text{Bu})_4\text{OH}$ , con el fin de identificar procesos de autoprotonación<sup>47</sup>.

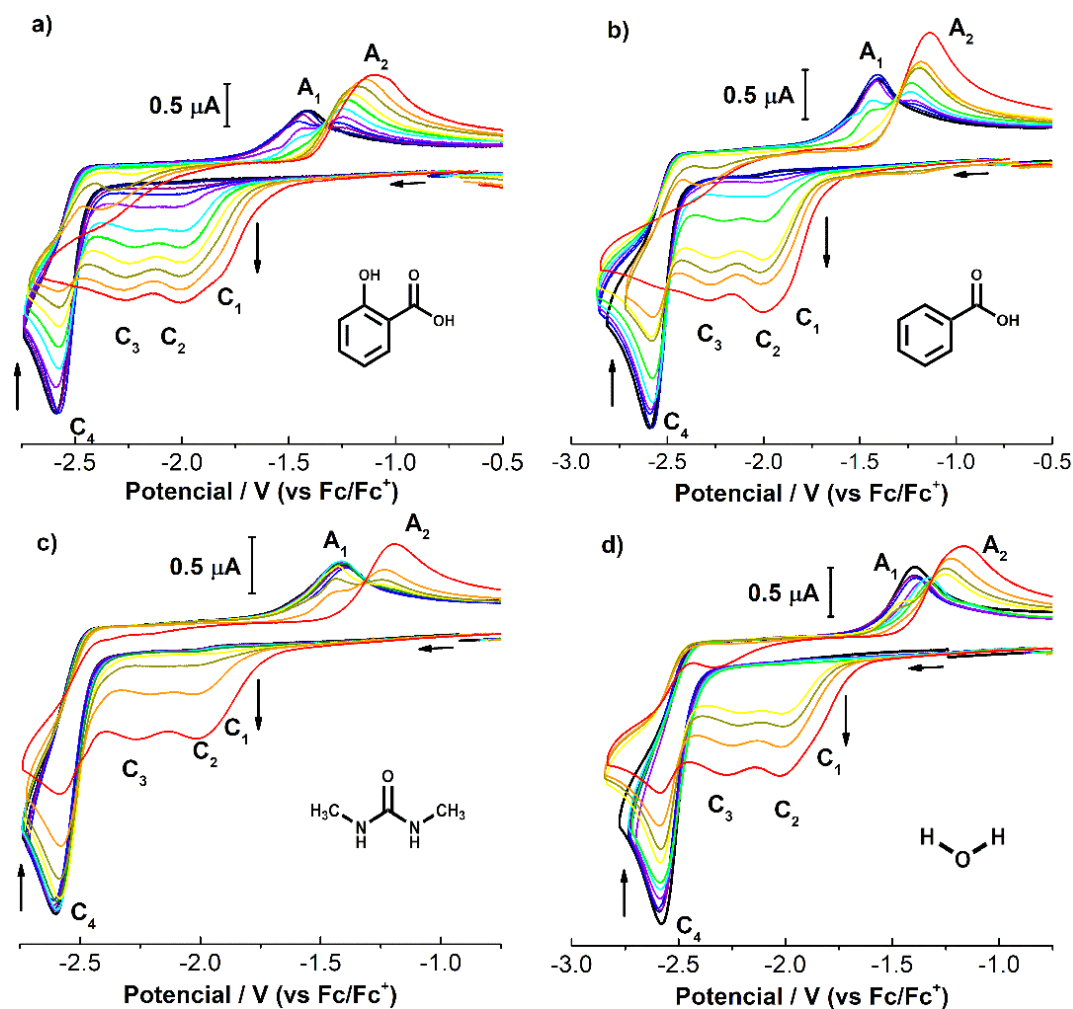
**4.1.1. El ácido fólico como receptor de puentes de hidrógeno.** En la Fig. 3d se muestra que al adicionar  $N(\text{Bu})_4\text{OH}$  a la solución de AF en DMSO se registra un proceso cuasireversible ( $C_1/A_1$ ) en aproximadamente -2.6 V, lo que sugiere que el AF se autoprotona actuando como una especie donadora de protones. De esta manera, una alternativa para estudiar electroquímicamente la formación de puentes de hidrógeno en AF fue considerándolo como receptor. Para ello se estableció una condición inicial muy básica en la solución de AF y progresivamente se incrementó la acidez. De esta manera, el pH de la solución se impuso con adiciones logarítmicas de a) soluciones amortiguadoras de ácido salicílico/salicilato o benzoico/benzoato, o b) los donadores de protones dimetil urea o agua. Al aumentar la concentración de protones, un criterio de diagnóstico para determinar la formación de un complejo estable de asociación por puentes de hidrógeno es si se observa un desplazamiento del potencial de media onda de un par reversible<sup>48</sup>; sin embargo, con ninguno de los donadores de protones usados se observó este comportamiento (Fig. 4). En el Anexo A se describe el comportamiento voltamperométrico de los sistemas antes mencionados, los cuales esencialmente muestran la formación sucesiva de las especies protonadas del AF. Debido a que la protonación es una etapa posterior a la formación de puentes de hidrógeno, en lugar de seguir estudiando al AF como receptor de puentes de hidrógeno, se optó por estudiarlo como donador empleando una serie de quinonas modelo como receptor de puentes de hidrógeno.

---

<sup>47</sup> MALDONADO, Teresita; MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, Eduardo; FRONTANA, Carlos. Intramolecular Hydrogen Bonding/Selfprotonation Processes Modulated by the Substituent Effect in Hydroxyl-substituted Naphthoquinones. *Electroanalysis*, 2016, vol. 28, no 11, p. 2827-2833.

<sup>48</sup> GÓMEZ Manuel. *Efectos de la asociación por puentes de hidrógeno en la reducción electroquímica de quinonas. Análisis cuantitativo en base a medidas de potencial y corriente*. 2004, México. Trabajo de grado (Doctorado) Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

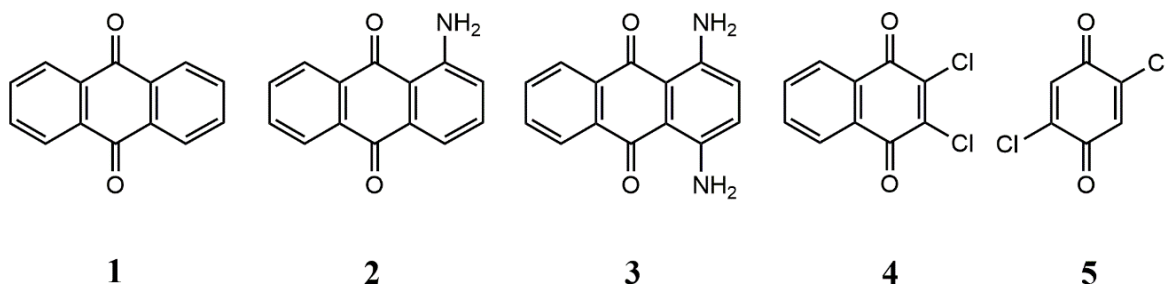
**Figura 4.** Voltamperogramas cíclicos ( $v = 0.1 \text{ Vs}^{-1}$ ) obtenidos sobre un electrodo de carbón vítreo para ácido fólico 2 mM desprotonado (curva negra) y concentraciones crecientes (curvas azul-roja: 0.05, 0.08, 0.13, 0.21, 0.32, 0.55, 0.88, 1.43, 2.35, 3.75 mM) de los donadores de protones: a) ácido salicílico, b) ácido benzoico, c) dimetilurea y d) agua. Electrolito soporte:  $n\text{-Bu}_4\text{NPF}_6$  0.1 M; disolvente: DMSO. Las flechas verticales indican la disminución  $\uparrow$  o el aumento  $\downarrow$  de la corriente de pico al incrementar la concentración de los donadores de protones.



**4.1.2. El ácido fólico como donador de puentes de hidrógeno.** En la Fig. 5 se muestran las quinonas modelo usadas en este estudio, las cuales fueron

seleccionadas teniendo en cuenta que en el sitio activo del receptor folato la interacción más fuerte por puente de hidrógeno es con el residuo de serina, que es estructuralmente similar al grupo quinona<sup>49</sup>.

**Figura 5.** Estructura de (1) antraquinona, (2) 1-aminoantraquinona, (3) 1,4-diaminoantraquinona, (4) 1,2-dicloronaftoquinona y (5) 2,5-diclorobenzoquinona.



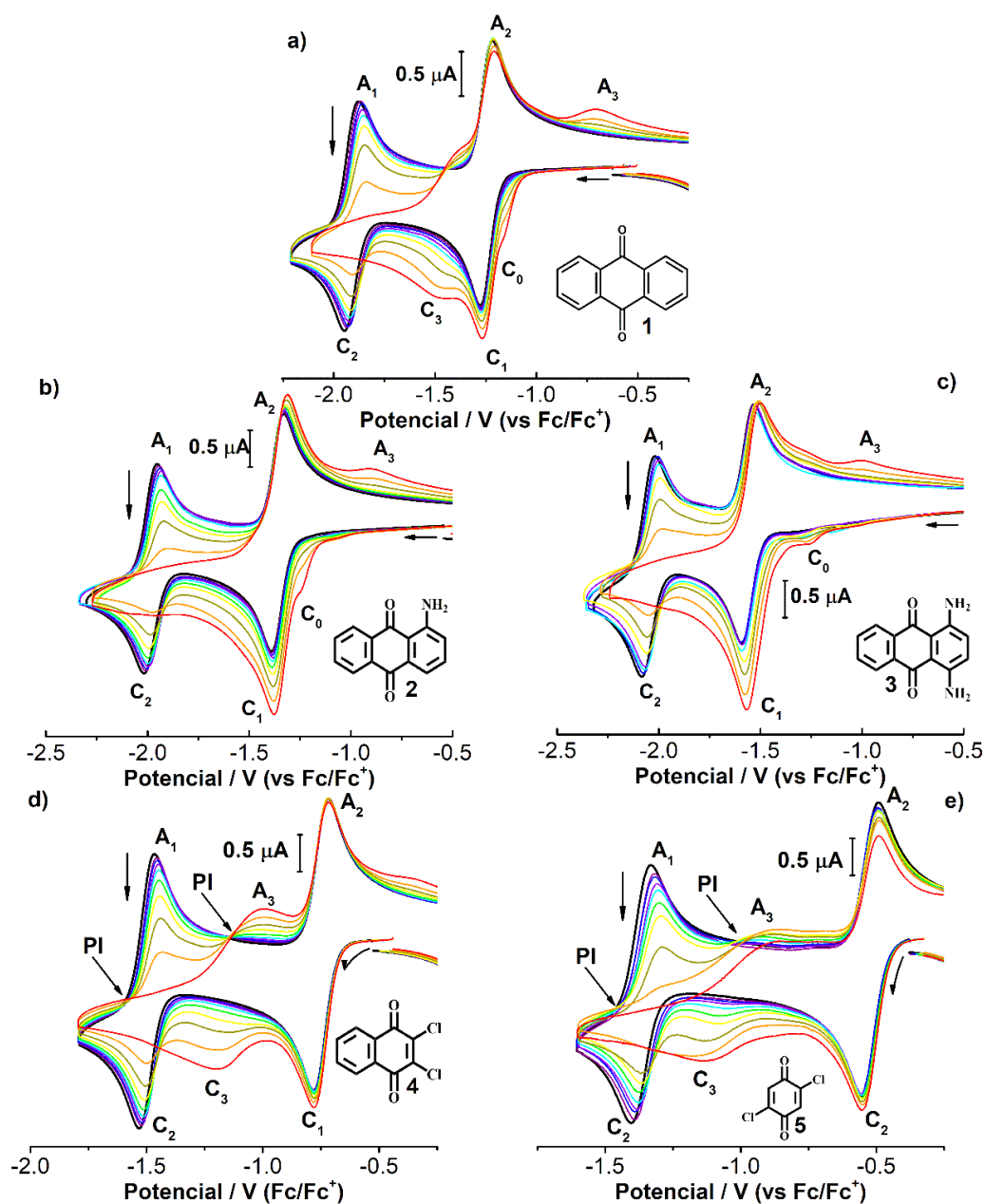
Las curvas voltamperométricas en color negro de la Fig. 6 muestran el comportamiento electroquímico representativo de las quinonas estudiadas. En todos los casos al iniciar la perturbación en dirección negativa se identifican dos picos de reducción, C<sub>1</sub> y C<sub>2</sub>, los cuales corresponden a la formación del radical anión semiquinona (ec. 1) y su posterior reducción para formar un dianión (ec. 2) en un potencial más negativo. Al invertir el barrido de potencial después del pico C<sub>1</sub> (Anexo B), se identificó que el pico A<sub>2</sub> corresponde a la oxidación del radical anión formado en C<sub>1</sub>, mientras que el pico A<sub>1</sub> es asociado a C<sub>2</sub>.




---

<sup>49</sup> NELSON, David L.; COX, Michael M. Lehninger. *Principios de Bioquímica*–6ª Edición, Editorial Omega. 2014.

**Figura 6.** Voltamperogramas cíclicos ( $v = 0.1 \text{ Vs}^{-1}$ ) obtenidos sobre un electrodo de carbón vítreo para a) antraquinona b) 1,4-diaminoantraquinona, c) aminoantraquinona, d) 2,3-dicloronaftoquinona y e) 2,5-diclorobenzoquinona 1 mM (curva negra), en presencia de concentraciones crecientes a de ácido fólico (curvas azul-roja). Electrolito soporte:  $n\text{-Bu}_4\text{NPF}_6$  0.1 M; disolvente: DMSO. Las flechas verticales  $\downarrow$  indican la disminución de la corriente de pico al incrementar la concentración de ácido fólico.



En general se observan dos comportamientos, uno relacionado con las quinonas **4** y **5**, y el otro con las quinonas **2** y **3**, mientras que la quinona **1** muestra un comportamiento intermedio entre estos 2 tipos. Al aumentar la concentración de protones, el principal cambio voltamperométrico que se observa para las quinonas **4** y **5** (Fig. 6d,e) es la desaparición del pico C<sub>2</sub> y la aparición de un nuevo pico C<sub>3</sub>, resultado de la reducción de la especie protonada formada luego del complejo de asociación entre el radical anión y el AF, como se describe por las ecuaciones 3-5. Así, la oxidación de la especie protonada se presenta en el pico A<sub>3</sub>. A continuación se describen los procesos que ocurren entre los picos C<sub>1</sub> y C<sub>3</sub>



donde  $Q^{\bullet-}$  representa un radical anión,  $Q^{2-}$  un dianión,  $DH$  al donador de protones (ácido fólico),  $Q^{\bullet-} \cdots HD$  un complejo de asociación,  $D^{-}$  el donador desprotonado,  $QH^{\bullet}$  una quinona protonada y  $QH^{-}$  una quinona protonada y reducida.

La asociación del radical anión con el AF y posterior formación de la especie protonada se confirma por la disminución de la corriente de pico del par C<sub>2</sub>/A<sub>1</sub>, indicando que el radical anión producido en C<sub>1</sub> es consumida en una reacción de asociación/protonación acoplada para formar una especie protonada. El comportamiento casi invariante en la corriente de pico del par C<sub>1</sub>/A<sub>2</sub> sugiere que, adicionalmente a la reacción acoplada de asociación, se lleva a cabo una reacción de desproporción (ec. 6), que forma una cantidad adicional del radical anión al consumido en C<sub>3</sub> y que es oxidado en A<sub>2</sub>. Este hecho está relacionado con la aparición de los puntos de isopotencial (PI) en -1.625 y -1.138 V para la quinona **4** (Fig. 6d) y -1.018 y -1.462 V en el caso de la quinona **5** (Fig. 6e), los cuales son

asociados con reacciones de transferencia electrónica en solución, SET (Solution Electron Transfer)<sup>50</sup>.

Conforme aumenta la concentración de AF en la solución de trabajo, se presenta una disminución en la corriente del pico  $C_2/A_1$  para las quinonas **2** y **3** (Fig. 6b,c). También se observa la aparición de un pre-pico  $C_0$  que se atribuye a la reducción de un producto de asociación y está relacionado con el pico de oxidación  $A_3$ , el cual aparece en un potencial 0.30 V más positivo que  $C_0$ , lo que muestra la estabilidad del complejo de asociación ( $Q^{\bullet\bullet}DH$ ) formado entre estas quinonas y el AF. La quinona **1** (Fig. 6a) presenta un comportamiento intermedio entre los dos descritos anteriormente, lo que se explica por la región de potencial donde aparecen los potenciales de media onda del radical anión y dianión (-1.25 V y -1.91 V vs Fc/Fc<sup>+</sup>), los cuales se encuentran ubicados comparativamente entre las quinonas estudiadas (Fig. 6a y Anexo B), lo que a su vez se relaciona con una basicidad intermedia de los radicales electrogenerados.

## **4.2. FORMACIÓN DE PUENTES DE HIDRÓGENO EN ÁCIDO FÓLICO BIOCONJUGADO**

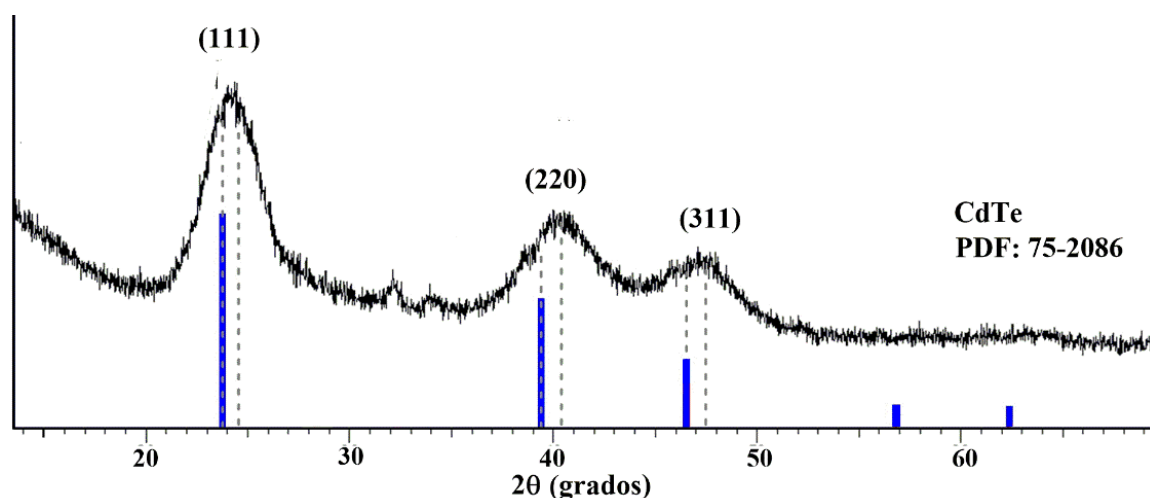
**4.2.1. Síntesis del bioconjugado ácido fólico/puntos cuánticos de CdTe.** Con el propósito de comprobar la bioconjugación del AF con los puntos cuánticos de telururo de cadmio, y además verificar que estos conservan sus propiedades fluorescentes, se realizaron caracterizaciones espectroscópicas por IR, UV-Vis y fluorescencia. Así mismo se realizó la caracterizó por voltamperometría cíclica para determinar su electroactividad, estos resultados de describen en detalle en el anexo F. En la Fig. 7 se presenta el difractograma de los puntos cuánticos funcionalizados con ácido tioglicólico, denominados a partir de aquí CT. Los picos de difracción corresponden a una estructura cúbica de CdTe (PDF 75-2086), el ensanchamiento

---

<sup>50</sup> EVANS, Dennis H. Solution electron-transfer reactions in organic and organometallic electrochemistry. *Chem. Rev.* 1990, vol. 90, no 5, p. 739-751.

de los picos indica que el tamaño del cristalito es de tamaño nanométrico, empleando la ecuación de Scherrer se encontró un tamaño de cristalito de 3.94 nm, como se esperaba.

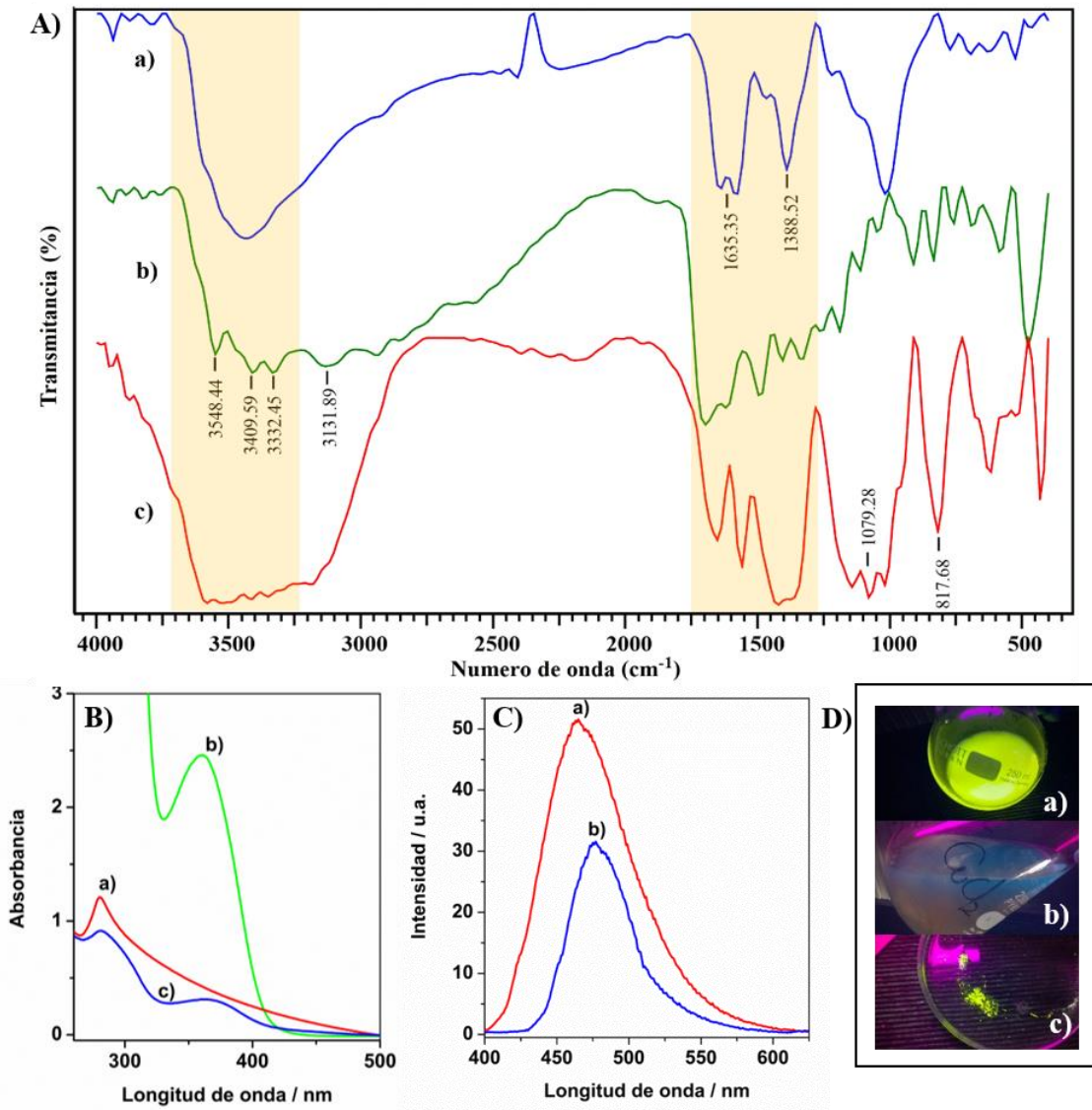
**Figura 7.** Difractograma de los puntos cuánticos sintetizados. Los planos cristalográficos del CdTe se indican en cada uno de los picos de difracción asignados.



En la Fig. 8A se presentan de manera comparativa los espectros de IR para el AF y los puntos cuánticos de CdTe sin modificar y bioconjugados con AF, estos últimos denominados de aquí en adelante como CTAF. En los CT se identificaron las bandas características de la tensión del enlace C=O en  $1388.52$  y  $1635.35\text{ cm}^{-1}$ <sup>8,46</sup>, que corresponden al grupo carboxilo del ácido tioglicólico. Este resultado confirma que el ácido tioglicólico se enlaza al CdTe por el grupo tiol, como se muestra en el esquema de la Fig. 9. En los espectros de IR del AF y el CTAF se identifican las bandas características de las tensiones simétrica y asimétrica del enlace N-H de la amina primaria del fragmento de la pterina, las cuales están centradas en  $3409.59$  y  $3332.45\text{ cm}^{-1}$ . También se observa en  $3548.44\text{ cm}^{-1}$  la banda asociada a la vibración del enlace N-H de las aminas secundarias del fragmento del ácido p-aminobenzoico, mientras que las bandas del grupo carboxilo se encuentran desplazadas a números de onda más altos, lo que indica que la fuerza de vibración

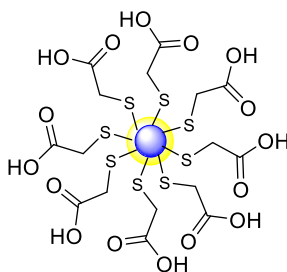
de los enlaces en este grupo funcional disminuye al enlazarse al ácido tioglicólico, como se muestra en el esquema de la Fig. 10.

**Figura 8.** Espectros de A) infrarrojo y B) UV-Vis de a) puntos cuánticos de CdTe, b) ácido fólico y c) puntos cuánticos de CdTe bioconjugados con ácido fólico. C) Espectros de fluorescencia para puntos cuánticos de CdTe a) sin modificar y c) bioconjugados con ácido fólico. D) Fotografías de puntos cuánticos de CdTe suspendidos en agua a) sin modificar y b) bioconjugados con ácido fólico. c) Estos últimos se muestran precipitados y secos. Iluminación: lámpara UV ( $\lambda = 265 \text{ nm}$ ).

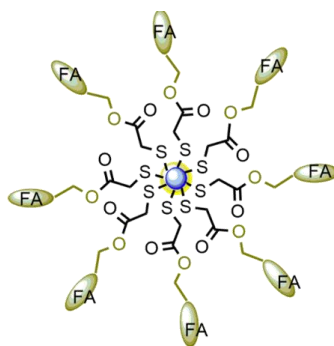


Los espectros de UV-Vis del AF y el CTAF que se presentan en la Fig. 8B confirman que los puntos cuánticos de CdTe fueron bioconjugados, ya que la banda de adsorción en 360 nm característica del anillo aromático del fragmento de pterina del AF se conserva tras la bioconjugación. En la Fig. 8C se presentan los espectros de fluorescencia del CT y el CTAF, en los cuales se aprecia una señal de fluorescencia en 465 y 475 nm, respectivamente; además, se observa una disminución en la intensidad tras la bioconjugación. Estos resultados muestran que se obtuvo un bioconjugado con propiedades fluorescentes (Fig. 8D).

**Figura 9.** Representación de los puntos cuánticos de CdTe modificados con ácido tioglicólico.



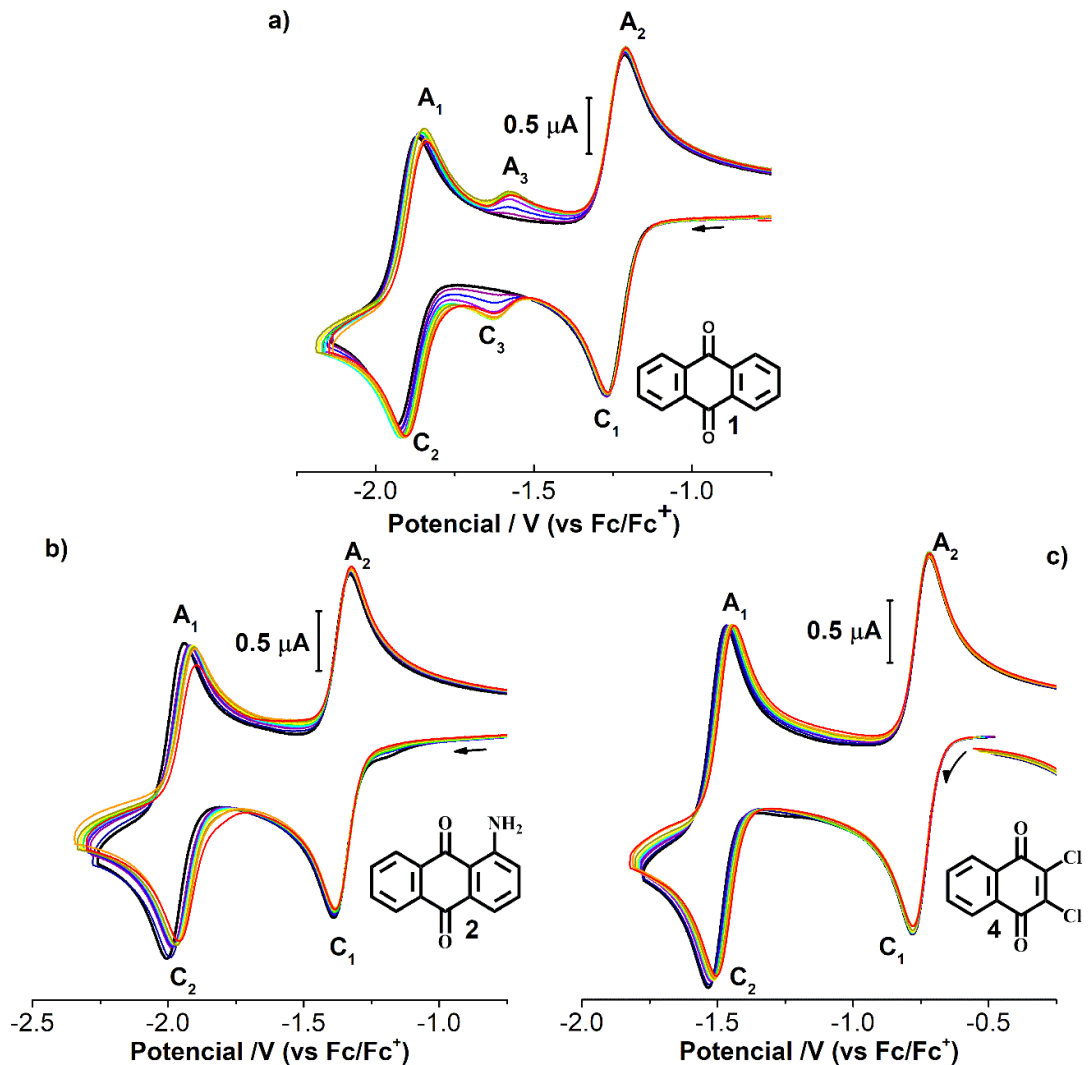
**Figura 10.** Representación de los puntos cuánticos de CdTe bioconjugados con ácido fólico.



**4.2.2. Reconocimiento de ácido fólico bioconjugado por puentes de hidrógeno.** Con el propósito de estudiar la formación de puentes de hidrógeno del folato en el CTAF, se eligieron las quinonas de comportamiento voltamperométrico

intermedio 1 y aquellas de comportamiento más básico 2 y ácido 4 (ver sección 4.1.2.). En la Fig. 11 se presenta el comportamiento voltamperométrico característico de las quinonas 1, 2 y 4, el cual fue descrito al inicio de la sección 4.1.2.

**Figura 11.** Voltamperogramas cíclicos ( $v = 0.1 \text{ Vs}^{-1}$ ) obtenidos sobre un electrodo de carbón vítreo para a) antraquinona, b) 1-aminoantraquinona y c) 2,3-dicloronaftoquinona 1 mM (curva negra) y en presencia de concentraciones crecientes de folato bioconjugado con puntos cuánticos de CdTe (curvas azul-roja). Electrolito soporte:  $n\text{-Bu}_4\text{NPF}_6$  0.1 M; disolvente: DMSO.



Al aumentar la concentración de CTAF en la solución de trabajo se observa que el par  $C_1/A_2$  relacionado con el radical anión permanece invariante, mientras que el potencial de media onda del par  $C_2/A_1$ , relacionado con el dianión, se desplaza hacia potenciales menos negativos; además, las variaciones de corriente de pico de este par no son significativas. Este resultado indica la formación de un complejo de asociación mediante puentes de hidrógeno entre el folato del CTAF y las quinonas estudiadas.

Es importante resaltar que la quinona **1** tiene un comportamiento que difiere de las quinonas **2** y **4**, ya que se observa un proceso adicional  $C_3/A_3$ . Con la finalidad de determinar el mecanismo de reacción, se realizaron simulaciones con el programa Digielch, los cuales se presentan en el Anexo C. Así, se encontró que las quinonas **2** y **4** interactúan siguiendo el mecanismo descrito por las ecuaciones 7-9.



Asumiendo que el proceso de asociación mediante puentes de hidrógeno entre el folato del CTAF y las quinonas estudiadas sigue el modelo de equilibrios sucesivos, considerando que sólo se forma un producto de asociación con estequiometría 1:1, se empleó el modelo propuesto por Gómez y col.<sup>33</sup>. Así, mediante un ajuste logarítmico se obtuvo el valor de las constantes de asociación para cada una de las quinonas, usando la ec. 10, las curvas de los ajustes se muestran en el anexo D.

$$E_{1/2} = E_{Q^{\bullet-}/Q^{2-}}^{\circ} + \frac{RT}{nF} \ln \left( \frac{1 + K^2[DH]}{1 + K^1[DH]} \right) \quad (10)$$

donde  $E_{1/2}$  es el potencial de media onda del par  $C_2/A_1$ ,  $E_{Q^{\bullet-}/Q^{2-}}^{\circ}$  es el potencial de media onda del par  $C_2/A_1$  cuando no se ha realizado ninguna adición de CTAF,  $R$  es la constante universal de los gases ideales,  $T = 298$  K,  $F$  es la constante de Faraday

$96\,485\text{ Cmol}^{-1}$ ,  $n = 1$  es el número de electrones transferidos en el proceso  $C_2$ ,  $K^1$  es la constante de asociación del radical anión,  $K^2$  es la constante de asociación del dianión, y  $[DH]$  es la concentración de CTAF adicionado.

Los potenciales de media onda del par  $C_1/A_2$  no presentaron desplazamientos, lo que muestra que no se formó un complejo de asociación entre el radical anión y CTAF, por lo que  $K^1 = 0$ . Para facilitar el cálculo, se asumió que  $K^2[DH] \gg 1$ <sup>33</sup>, por lo que se despreció la unidad que se suma a este término, de tal manera que la ec. 10 se simplifica a la ec. 11.

$$E_{1/2} = E_{Q^{\bullet-}/Q^{2-}}^{\circ} + \frac{RT}{nF} \ln(K^2[DH]) \quad (11)$$

En la Tabla 1 se presentan los valores obtenidos para las constantes de asociación de las quinonas **1**, **2** y **4**. El valor de la constante de asociación varía en función del tipo de sustituyente en cada quinona. En el caso del cloro se genera un impedimento estérico para la formación del complejo de asociación, mientras que para el grupo amino se genera un dianión más básico, que genera un complejo de asociación más estable.

**Tabla 1.** Constantes de asociación para las quinonas 1, 2 y 4 con CTAF, determinadas en un intervalo de concentración de  $1.49 \times 10^{-5}$  a  $0.0011\text{ M}$ .

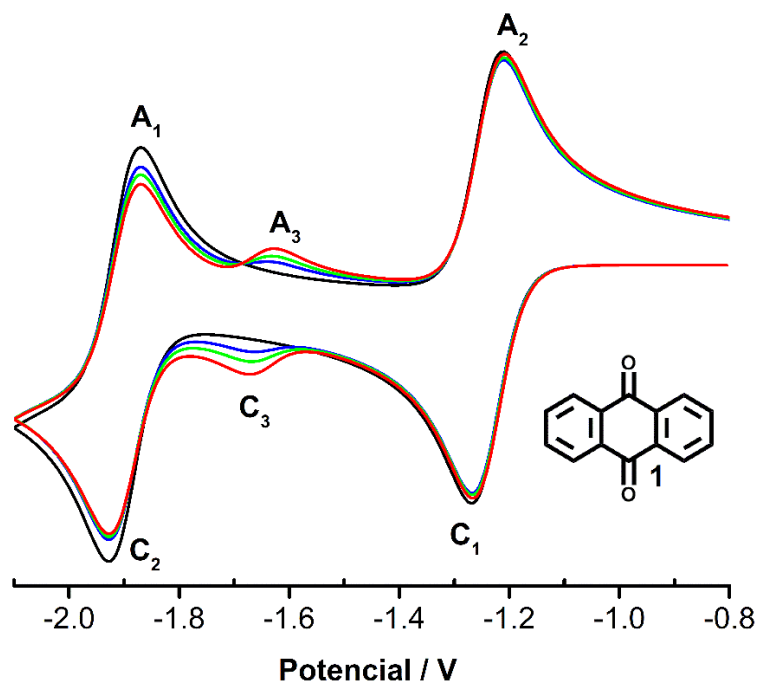
Especie	$K_b [\text{M}^{-1}]$	$r^2$
antraquinona	145.15	0.981
1-aminoantraquinona	150.22	0.984
2,3-dicloronaftoquinona	114.26	0.998

Por otra parte, en el caso de la antraquinona se presentó un proceso cuasireversible adicional  $C_3/A_3$  en  $E_{1/2} = -1.60\text{ V vs Fc/Fc}^+$ . De acuerdo con la simulación mostrada en la Fig. 12, el proceso catódico  $C_3$  corresponde a la reducción de un complejo de asociación, con la particularidad que la reducción ocurre en el fragmento de la

pterina y la asociación en el fragmento del glutamato; por tanto, la antraquinona permite el reconocimiento molecular del folato del CTAF mediante puentes de hidrógeno, que probablemente esté relacionada con su simetría<sup>42</sup>. El mecanismo empleado para simular la respuesta voltamperométrica se describe en las ec. 12-16 y los parámetros introducidos en la simulación en el Anexo C.



**Figura 12.** Voltamperogramas cíclicos ( $v = 0.1 \text{ Vs}^{-1}$ ) simulados en DigiElch para antraquinona, 1 mM (curva negra) y en presencia de concentraciones crecientes de folato bioconjugado con puntos cuánticos de CdTe (curvas azul-roja).



## 5. CONCLUSIONES

Se propuso una metodología para determinar condiciones experimentales para estudiar electroquímicamente las interacciones por puentes de hidrógeno en el ácido fólico libre y bioconjugado en puntos cuánticos de CdTe. Se obtuvieron puntos cuánticos fluorescentes de CdTe bioconjugados con ácido fólico, en los cuales se determinó que es posible establecer electroquímicamente la formación de puentes de hidrógeno en el folato bioconjugado en los puntos cuánticos de CdTe, empleando como receptores quinonas, las cuales son moléculas estructuralmente sencillas que emulan el sitio activo del receptor folato (serina).

El ácido fólico en su forma libre tiene una interacción fuerte con los radicales aniones electrogenerados a partir de las quinonas, por lo que sólo se pueden asignar transferencias de protón, la etapa posterior a la formación de puentes de hidrógeno. Debido a la modificación estructural que experimenta el AF en la reacción de bioconjugación, la interacción se hace menos fuerte y es posible determinar la formación de un complejo estable de asociación con constantes entre 100 y 150 M<sup>-1</sup>. Por tanto, se estableció que la antraquinona es una molécula capaz de reconocer selectivamente al folato; así, los radicales aniones electrogenerados a partir de antraquinona reconocen la forma reducida del ácido fólico, que es la forma biológicamente activa más abundante. Por tanto, esta metodología puede ser empleada en otros mecanismos de reconocimiento molecular.

Los sensores, son dispositivos capaces de reconocer selectivamente un analito, para lo cual emplean un sistema de reconocimiento selectivo; lo anterior indica que el entendimiento de la interacción a nivel molecular es primordial para el desarrollo de estos dispositivos. Los resultados que aquí se presentan pueden contribuir a comprender el mecanismo de reconocimiento molecular en procesos biológicos, especialmente entre el folato y las células cancerosas. Así mismo, el material bioconjugado propuesto es una opción viable que puede ser usada como sonda de reconocimiento de células cancerosas con aplicación en sensores.

## 6. RECOMENDACIONES

- El bioconjugado CTAF con propiedades fluorescentes es un material atractivo para ser empleado en sensores fotoquímicos o electroquimioluminiscentes, por lo que se recomienda evaluar su posible aplicación como sonda para detectar células cancerosas, haciendo pruebas biológicas con líneas celulares que sobreexpresen el receptor folato.
- Con la finalidad de aprovechar el hallazgo que la antraquinona es un receptor para el reconocimiento molecular en el sistema ácido fólico/receptor folato, se propone investigar estas interacciones en otros sistemas, con el fin de contribuir el entendimiento del reconocimiento molecular en cada uno de ellos.
- Debido a que las quinonas estudiadas pueden interactuar con el ácido fólico, se sugiere estudiar su potencialidad en la cuantificación de ácido fólico.

## BIBLIOGRAFÍA

AAKERÖY, Christer B.; SEDDON, Kenneth R. The hydrogen bond and crystal engineering. *Chem. Soc. Rev.* 1993, Vol. 22, No 6, p. 397-407.

ABRAHAM, Michael H., *et al.* Hydrogen bonding. Part 9. Solute proton donor and proton acceptor scales for use in drug design. *J. Chem. Soc. Perkin Transactions 2*, 1989, No 10, p. 1355-1375.

AKBAR, S.; ANWAR, A.; KANWAL, Q. Electrochemical determination of folic acid: A short review. *Anal. Biochem.* 2016, Vol. 510, p. 98-105.

ANTONY, A.C, UTLEY, C, VAN HOME, K.C. y KOLHOUSE J.F. (1981) Isolation and characterization of a folate receptor from human-placenta, *J. Biol. Chem.* 256 (18), 9684-9692.

BARD, Allen J., *et al.* *Electrochemical methods: fundamentals and applications*. New York: wiley, 2001.

BU, Jingjing, *et al.* Electrochemically controlled hydrogen bonding. Nitrobenzenes as simple redox-dependent receptors for arylureas. *J. Am. Chem. Soc.* 2005, Vol. 127, No 17, p. 6423-6429.

CHEN, Chen, *et al.* Structural basis for molecular recognition of folic acid by folate receptors. *Nature*, 2013, Vol. 500, No 7463, p. 486-489.

CHEN, Chen. *Structural basis for molecular recognition of folic acid by folate receptors*. Singapur, 2014. Trabajo de grado (Doctorado). National University of Singapore.

CONN, M. Morgan; REBEK, Julius. Self-assembling capsules. *Chem. Rev.* 1997, Vol. 97, No 5, p. 1647-1668.

COSTENTIN, Cyrille. Electrochemical approach to the mechanistic study of proton-coupled electron transfer. *Chem. Rev.* 2008, Vol. 108, No 7, p. 2145-2179.

COSTENTIN, Cyrille; ROBERT, Marc; SAVÉANT, Jean-Michel. Update 1 of: Electrochemical approach to the mechanistic study of proton-coupled electron transfer. *Chem. Rev.* 2010, vol. 110, no 12, p. PR1-PR40.

DANNENBERG, J. J. An Introduction to hydrogen bonding, *J. Am. Chem. Soc.* 1998, Vol. 120, No. 22, p. 5604–5604.

DRYHURST, Glenn. *Electrochemistry of biological molecules*. Nueva York, Elsevier, 2012.

EVANS, Dennis H. Solution electron-transfer reactions in organic and organometallic electrochemistry. *Chem. Rev.* 1990, vol. 90, no 5, p. 739-751.

FORSTER, Robert J.; BERTONCELLO, Paolo; KEYES, Tia E. Electrogenerated chemiluminescence. *Annu. Rev. Anal. Chem.* 2009, Vol. 2, p. 359-385.

GE, Yu; SMITH, Diane K. Development of chemical sensors based on redox-dependent receptors. Preparation and characterization of phenanthrenequinone-modified electrodes. *Anal. Chem.* 2000, Vol. 72, No 8, p. 1860-1865.

GLYNN, Simone A.; ALBANES, Demetrius. Folate and cancer: a review of the literature. *Nutrition and cancer*, 1994, Vol. 22, No 2, p. 101-119.

GÓMEZ Manuel. *Efectos de la asociación por puentes de hidrógeno en la reducción electroquímica de quinonas. Análisis cuantitativo en base a medidas de potencial y corriente*. 2004, México. Trabajo de grado (Doctorado) Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

GÓMEZ, Martín; GONZÁLEZ, Felipe J.; GONZÁLEZ, Ignacio. A model for characterization of successive hydrogen bonding interactions with electrochemically generated charged species. The quinone electroreduction in the presence of donor protons. *Electroanalysis*, 2003, Vol. 15, No 7, p. 635-645.

GUPTA, Neeraj; LINSCHITZ, Henry. Hydrogen-bonding and protonation effects in electrochemistry of quinones in aprotic solvents. *J. Am. Chem. Soc.* 1997, vol. 119, no 27, p. 6384-6391.

GURIRA, R. C.; MONTGOMERY, C.; WINSTON, R. Electrochemical reduction of folic acid reconsidered. *J. Electroanal. Chem.* 1992, Vol. 333, No 1-2, p. 217-233.

HAM, Dong, et al. Anodic electrosynthesis of cadmium telluride (CdTe) thin films. *Chem. Mater.* 1989, vol. 1, no 6, p. 619-625.

HAMMES-SCHIFFER, Sharon; STUCHEBRUKHOV, Alexei A. Theory of coupled electron and proton transfer reactions. *Chem. Rev.* 2010, Vol. 110, No 12, p. 6939-6960.

HARVEY, David. *Modern analytical chemistry*. New York: McGraw-Hill, 2000.

HOSHINO, Akiyoshi, et al. Physicochemical properties and cellular toxicity of nanocrystal quantum dots depend on their surface modification. *Nano Letters*, 2004, vol. 4, no 11, p. 2163-2169.

JEFFREY, George A.; SAENGER, Wolfram. Hydrogen bonding in biological structures. Berlín, Springer Science & Business Media, 2012.

JIANG, Hui; WANG, Xuemei. Label-free detection of folate receptor (+) cells by molecular recognition mediated electrochemiluminescence of CdTe nanoparticles. *Anal. Chem.* 2014, vol. 86, no 14, p. 6872-6878.

KELEMEN, Linda E. The role of folate receptor  $\alpha$  in cancer development, progression and treatment: cause, consequence or innocent bystander. *Int. J. Cancer*, 2006, Vol. 119, No 2, p. 243-250.

KOLTHOFF, I. M. Acid-base equilibria in dipolar aprotic Solvents. *Anal. Chem.* 1974. Vol. 46, No. 13, p. 1992-2003.

LEHN, Jean-Marie. From supramolecular chemistry towards constitutional dynamic chemistry and adaptive chemistry. *Chem. Soc. Rev.* 2007, Vol. 36, No 2, p. 151-160.

LEHN, Jean-Marie. Toward complex matter: Supramolecular chemistry and self-organization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2002, Vol. 99, No 8, p. 4763-4768.

LIU, Xuan, et al. Anodic electrochemiluminescence of CdTe quantum dots and its energy transfer for detection of catechol derivatives. *Anal. Chem.* 2007, vol. 79, no 21, p. 8055-8060.

MALDONADO, Teresita; MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, Eduardo; FRONTANA, Carlos. Intramolecular Hydrogen Bonding/Selfprotonation Processes Modulated by the Substituent Effect in Hydroxyl-substituted Naphthoquinones. *Electroanalysis*, 2016, vol. 28, no 11, p. 2827-2833.

MARTÍNEZ, Eduardo. *Análisis de los efectos de la estructura química sobre el proceso de formación de puentes de hidrógeno controlado electroquímicamente*.

2014, México. Trabajo de grado (Maestría). Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica.

MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, Eduardo, et al. Competition between hydrogen bonding and proton transfer during specific anion recognition by dihomooxacalix [4] arene bidentate ureas. *J. Org. Chem.* 2016, Vol. 81, No 15, p. 6329-6335.

MARTINEZ-GONZALEZ, Eduardo; FRONTANA, Carlos. Employment of Electrodonating Capacity as an Index of Reactive Modulation by Substituent Effects: Application for Electron-Transfer-Controlled Hydrogen Bonding. *J. Org. Chem.* 2014, vol. 79, no 3, p. 1131-1137.

MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, Eduardo; FRONTANA, Carlos. Influence of the Electron Transfer Rate on Electrochemically Controlled Hydrogen Bonding. *Procedia Chemistry*, 2014, Vol. 12, p. 108-114.

MOROSINI, Vincent, et al. Quantum dot–folic acid conjugates as potential photosensitizers in photodynamic therapy of cancer. *Photochem. Photobiol.* 2011, Vol. 10, No 5, p. 842-851.

NELSON, David L.; COX, Michael M. Lehninger. *Principios de Bioquímica*–6ª Edición, Editorial Omega. 2014.

NIEMZ, Angelika; ROTELLO, Vincent M. From enzyme to molecular device. Exploring the interdependence of redox and molecular recognition. *Acc. Chem. Res.* 1999, Vol. 32, No 1, p. 44-52.

OKAMURA, M. Y.; FEHER, G. Proton transfer in reaction centers from photosynthetic bacteria. *Annu. Rev. Biochem.* 1992, Vol. 61, No 1, p. 861-896.

OLUWAFEMI, S. O.; REVAPRASADU, N.; RAMIREZ, A. J. A novel one-pot route for the synthesis of water-soluble cadmium selenide nanoparticles. *J. Cryst. Growth*, 2008, Vol. 310, No 13, p. 3230-3234.

PIETRZIK, Klaus; BAILEY, Lynn; SHANE, Barry. Folic acid and L-5-methyltetrahydrofolate. *Clin. Pharmacokinet.* 2010, Vol. 49, No 8, p. 535-548.

POPOVYCH, Orest. Estimation of Medium Effects for Single Ions and Their Role in the Interpretation of Nonaqueous pH. *Anal. Chem.* 1966, Vol. 38, No 4, p. 558-563.

PRINS, Leonard J.; REINHOUDT, David N.; TIMMERMAN, Peter. Noncovalent synthesis using hydrogen bonding. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2001, Vol. 40, No 13, p. 2382-2426.

QUAN, May, et al. Voltammetry of quinones in unbuffered aqueous solution: reassessing the roles of proton transfer and hydrogen bonding in the aqueous electrochemistry of quinones. *J. Am. Chem. Soc.* 2007, Vol. 129, No 42, p. 12847-12856.

Smith, D.K. *Electrochemically controlled H-bonding. Electrochemistry of functional supramolecular system.* John Wiley & Sons Inc. Nueva Jersey, 2010.

SZAKÁCS, Zoltán; NOSZÁL, Béla. Determination of dissociation constants of folic acid, methotrexate, and other photolabile pteridines by pressure-assisted capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 2006, Vol. 27, No 17, p. 3399-3409.

TOCHER, J. H.; EDWARDS, D. I. Electrochemical Characteristics of Nitro-Heterocyclic Compounds of Biological Interest: I. The Influence of Solvent. *Free Rad. Res. Comms.* 1988, vol. 4, no 5, p. 269-276.

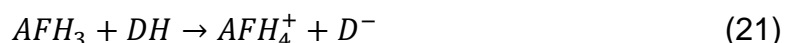
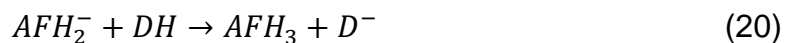
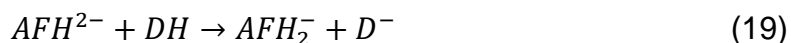
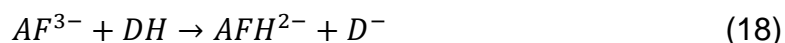
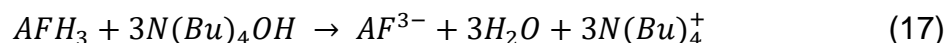
WILCKEN, David EL, et al. Folic acid lowers elevated plasma homocysteine in chronic renal insufficiency: possible implications for prevention of vascular disease. *Metabolism.*, 1988, Vol. 37, No 7, p. 697-701.

WU, Marietta; GUNNING, William; RATNAM, Manohar. Expression of folate receptor type  $\alpha$  in relation to cell type, malignancy, and differentiation in ovary, uterus, and cervix. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 1999, Vol. 8, No 9, p. 775-782.

## ANEXOS

### Anexo A. Ácido fólico como receptor de puentes de hidrógeno

En la Fig. 4 se muestran los voltamperogramas cíclicos obtenidos para el AF tras adicionar: a) soluciones amortiguadoras de ácido salicílico/salicilato o benzoico/benzoato, o b) los donadores de protones dimetil urea o agua. La curva voltamperométrica del AF desprotonado presenta un pico de reducción  $C_4$  en -2.6 V y asociado a este proceso un pico de oxidación  $A_1$ . El pico  $C_4$  puede atribuirse a la reducción del fragmento de pterina, debido a que el radical anión generado se podría estabilizar por la deslocalización de la carga en el sistema aromático de la pterina; sin embargo, sale de los alcances de este trabajo la comprobación de esta explicación. Por otra parte, la corriente del pico  $C_4$  disminuye conforme aumenta la concentración de protones en el medio (adición del donador), mientras que surgen y aumenta la corriente de los picos  $C_1$ ,  $C_2$  y  $C_3$ , los cuales pueden ser atribuidos a las protonaciones sucesivas del AF (ec. 17-21). Simultáneamente, la corriente del pico  $A_1$  disminuye y surge un segundo pico de oxidación  $A_2$  de mayor intensidad, formando un punto de isopotencial (Tabla 2). Los puntos de isopotencial son similares a los puntos isobesticos en espectroscopía, y se relacionan con reacciones acopladas por las cuales se produce la transformación de una especie en otra<sup>50</sup>.



Desde el punto de vista electrostático, las especies protonadas formadas son más fácilmente reducidas en un potencial menos negativo, esto se debe a la presencia

de protones en la estructura, ya que es más fácil estabilizar al electrón por deslocalización.

**Tabla 2.** Puntos de isotencial determinados a partir de los voltamperogramas de la Fig. 4 para las especies donadoras de protones.

<b>Especie donadora</b>	<b>Punto de isotencial</b>
Ácido benzoico / benzoato	-2.55
	-1.29
Ácido salicílico / salicilato	-2.57
	-1.32
Agua	-1.32
Dimetil urea	-1.31

La formación de las especies protonadas del ácido fólico se confirma por la dependencia de la aparición de los picos C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> y C<sub>3</sub> con el aumento en la acidez del sistema a través del donador de protones adicionado. En la Tabla 3 se presentan las concentraciones a las cuales se observa la aparición de los picos antes mencionados, estas se asocian a 3 especies protonadas sucesivamente, para las cuales se requiere una concentración cada vez menor conforme aumenta la acidez de la especie donadora.

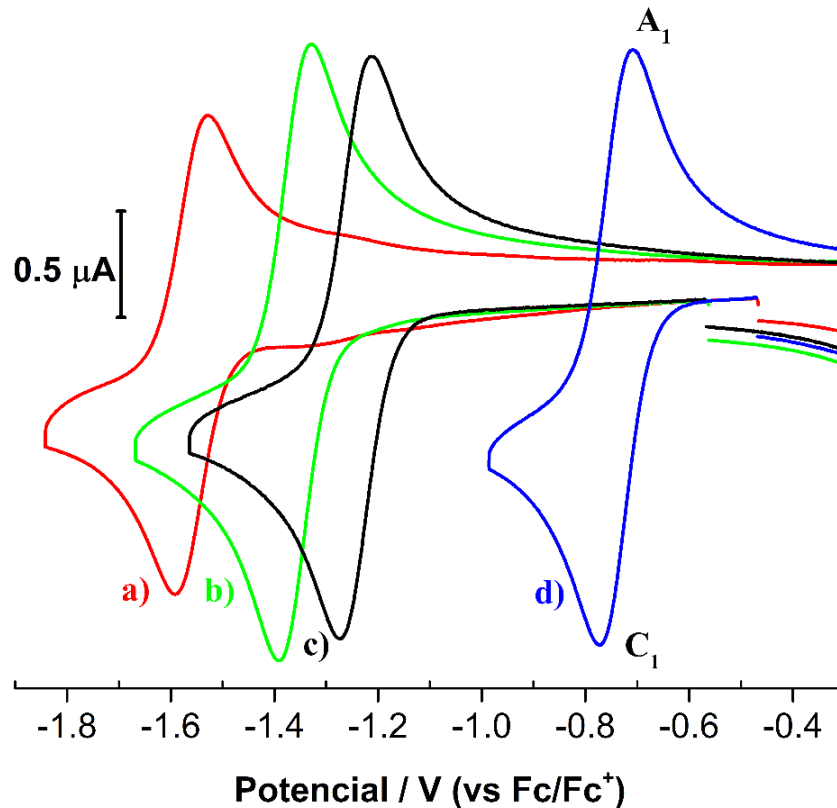
**Tabla 3.** Condiciones experimentales a los cuales se observan los estados protonados del AF.

<b>Especie donadora</b>	<b>Concentración total (M)</b>
Ácido benzoico / benzoato	0.0034
Ácido salicílico / salicilato	0.0025
Agua	0.0144
Dimetil urea	< 0.0144

## Anexo B. Voltamperogramas del radical anión

En los voltamperogramas cíclicos obtenidos para la reducción de las quinonas modelo seleccionadas (Fig. 13), la inversión del potencial se realizó en una condición controlada por difusión después del máximo del pico  $C_1$ . Así, el proceso de oxidación  $A_1$  corresponde a la oxidación de radical anión formado en el pico  $C_1$ .

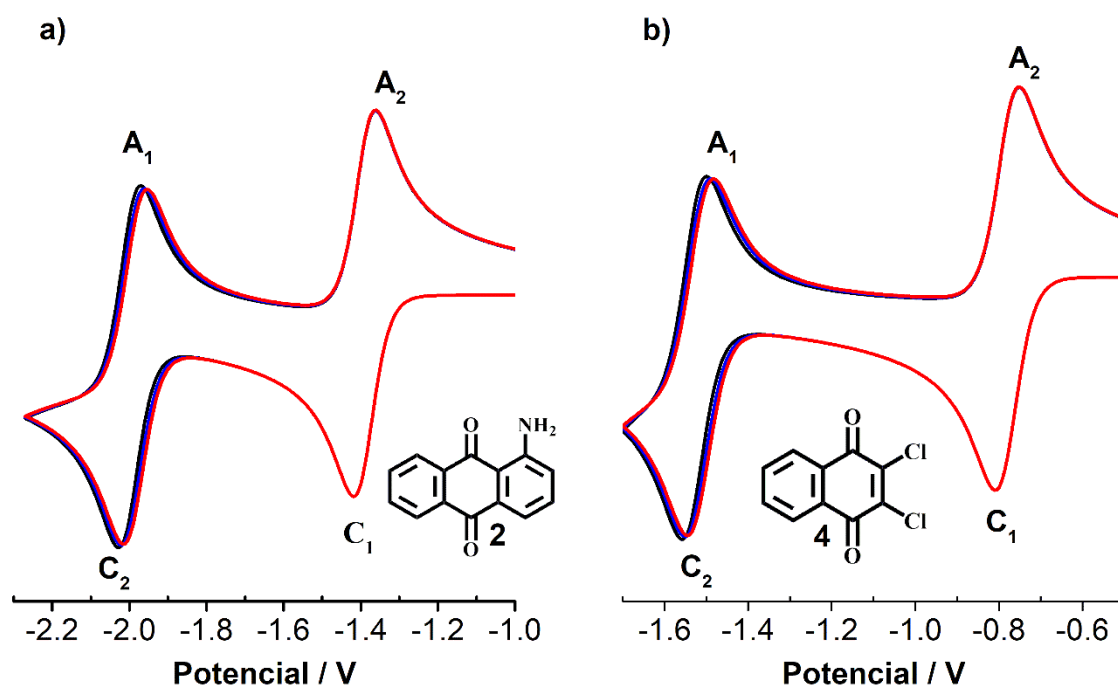
**Figura 13.** Voltamperogramas cíclicos ( $v = 0.1 \text{ Vs}^{-1}$ ) obtenidos sobre un electrodo de carbón vítreo para a) 1,4-diaminoantraquinona b) 1-aminoantraquinona, c) antraquinona y d) 2,3-dicloronaftoquinona 1 mM. Electrolito soporte:  $n\text{-Bu}_4\text{NPF}_6$  0.1 M; disolvente: DMSO.



### Anexo C. Voltamperogramas simulados

En la Fig. 14 se muestran los voltamperogramas cíclicos simulados para las quinonas **2** y **4**, considerando el mecanismo de reacción descrito por las ec. 7-9. En la Tabla 4 se muestran los parámetros de la simulación.

**Figura 14.** Voltamperogramas cíclicos ( $v = 0.1 \text{ Vs}^{-1}$ ) simulados en DigiElch para a) 1-aminoantraquinona y b) 2,3-dicloronaftoquinona 1 mM (curva negra) y en presencia de concentraciones crecientes de folato bioconjugado con puntos cuánticos de CdTe (curvas azul-roja).



**Tabla 4.** Parámetros alimentados en el software DigiElch para simular los voltamperogramas de antraquinona.

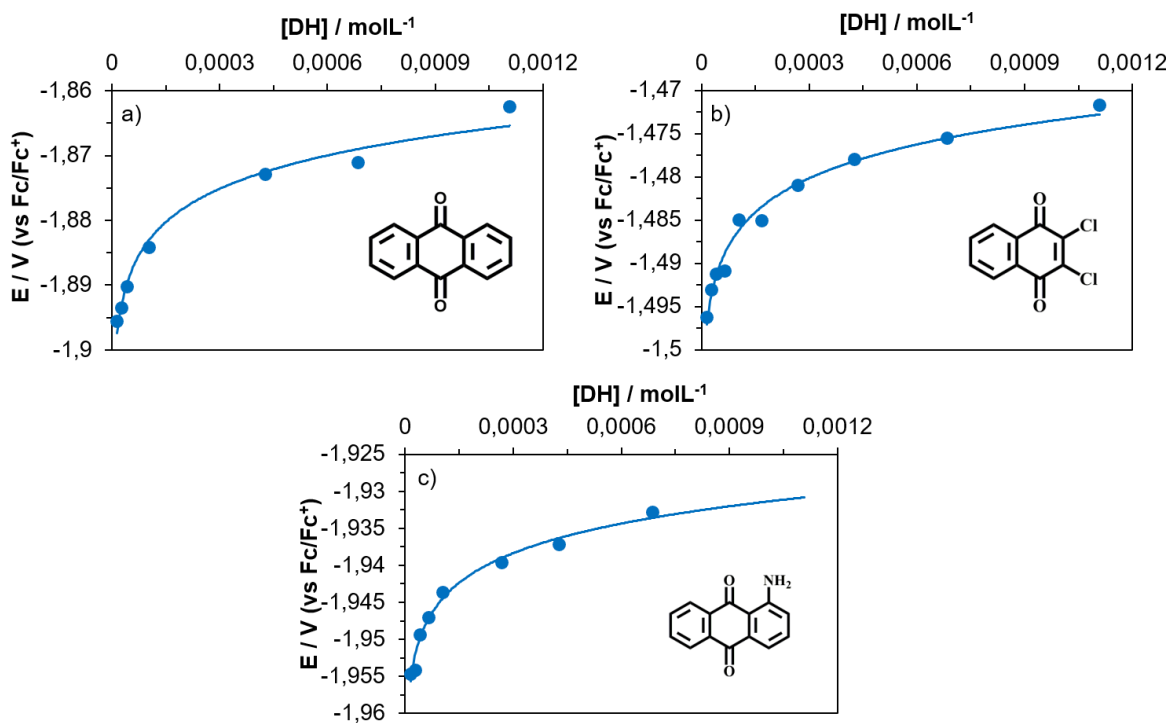
Parámetro	Valor
$K_{eq}$	150
$K_f$	$1 \times 10^8$
Concentración inicial	0.001 M
$\alpha$	0.5

K <sub>s</sub>	10000 cm/s
Velocidad de barrido	0.1 V/s
Potencial inicial	-0.8 V
Potencial final	-2.1 V
Geometría del electrodo	Planar
Área del electrodo	0.0079 cm <sup>2</sup>

## Anexo D. Ajuste al modelo de asociaciones sucesivas

En la Fig. 15 se muestran el ajuste de los datos experimentales al modelo de asociaciones sucesivas descrito por las ec. 10 y 11. Los ajustes se hicieron considerando una estequiometría de asociación 1:1. Con las ecuaciones de los ajustes se calcularon las constantes de asociación, relacionadas en la Tabla 1 con sus correspondientes coeficientes de correlación.

**Figura 15.** Potenciales de media onda ( $E_{1/2}$ ) en función de la concentración de folato bioconjugado con puntos cuánticos de CdTe adicionado a disoluciones  $0.001 \text{ molL}^{-1}$  de: a) antraquinona, b) 2,3-dicloronaftoquinona y c) 1-aminoantraquinona.



### Anexo E. Cálculo adiciones logarítmicas de donadores de protones

Con el fin de determinar los volúmenes a adicionar de una solución stock de concentración  $C_s$ , para alcanzar concentraciones del donador de protones ( $[DH]$ ) en incrementos logarítmicos, se estableció un intervalo amplio de concentración (0.01 mM a 0.075 M). Se determinó el logaritmo natural en los límites y se selecciona un número de puntos, 20 en este caso, y con ello la razón de incremento según la ec. 22, para garantizar que sean adiciones logarítmicas proporcionales. Con la razón de incremento se establece el valor del  $\ln[DH]$  en cada uno de los puntos y así el valor de  $[DH]$ , estos valores se muestran en la tabla 5.

$$i = \frac{\ln(0.00001) + \ln(0.075)}{20} \quad (22)$$

**Tabla 5.** Valores establecidos para las concentraciones de donador de protones en incrementos logarítmicos proporcionales.

Log[DH]	[DH]
-5	0.00001
-4.79605	0.000016
-4.5921	0.000026
-4.38815	0.000041
-4.1842	0.000065
-3.98025	0.000105
-3.7763	0.000167
-3.57235	0.000268
-3.3684	0.000428
-3.16444	0.000685
-2.96049	0.001095
-2.75654	0.001752
-2.55259	0.002802
-2.34864	0.004481
-2.14469	0.007167
-1.94074	0.011462
-1.73679	0.018332
-1.53284	0.02932
-1.32889	0.046893
-1.12494	0.075

Una vez establecidos los valores de [DH] se seleccionaron 10 adiciones cuya concentración final en la solución de trabajo coincida con las concentraciones antes establecidas. Para ello se modifica el valor del volumen adicionado ( $V_{ad}$ ) en la ec. 23 hasta que coincida con el valor de las concentraciones establecidas. Es importante tener en cuenta que la mínima cantidad que se puede adicionar son 5  $\mu$ L, y que los valores de  $V_{ad}$  que se calculan para alcanzar cada una de las concentraciones en incrementos logarítmicos, son los volúmenes que deben ser agregados experimentalmente.

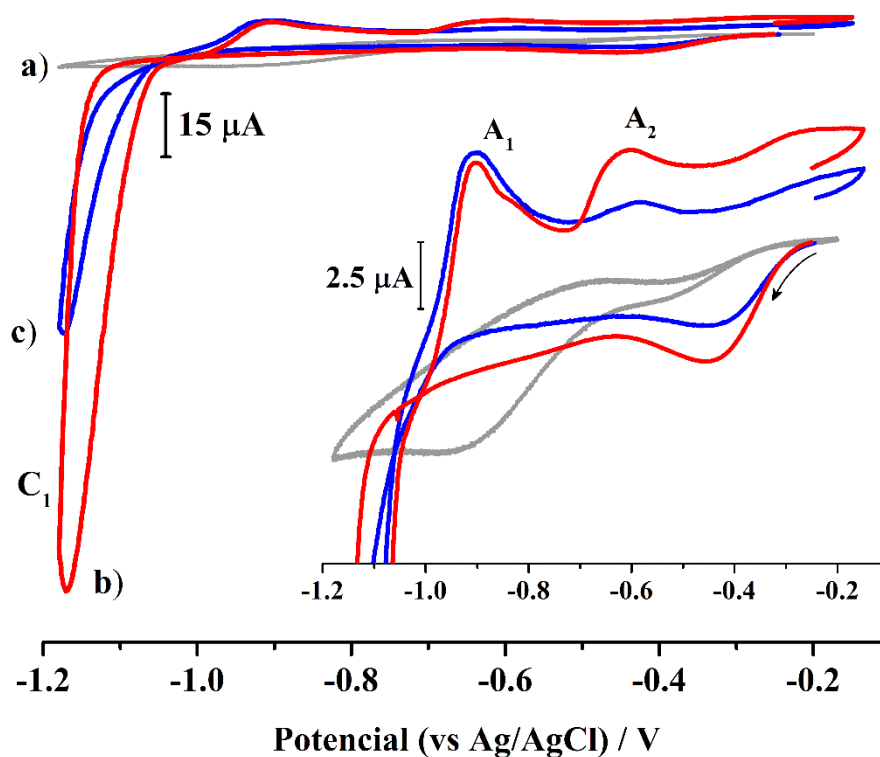
$$C_f = \frac{V_{ad} * C_s}{(V_{st} + V_{ad})} \quad (23)$$

donde  $C_f$  es la concentración del donador de protones [DH] en la solución del trabajo y  $V_{st}$  es el volumen de la solución de trabajo, es importante resaltar que este valor se va modificando con cada adición.

## Anexo F. Respuesta electroquímica de puntos cuánticos de CdTe

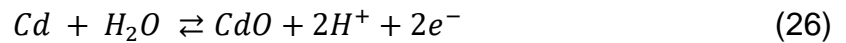
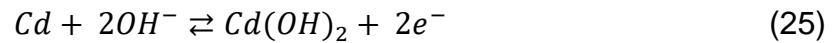
Los puntos cuánticos de CdTe sintetizados y bioconjugados se caracterizaron por voltamperometría cíclica (Fig. 16). Para ello se prepararon electrodos de pasta de carbono, mediante la dispersión homogénea de los puntos cuánticos en una mezcla de carbono (grafito en polvo) con un aglomerante orgánico líquido (aceite de silicón), en una proporción 14/56/30 % respectivamente.

**Figura 16.** Voltamperogramas cíclicos ( $v = 0.01 \text{ Vs}^{-1}$ ) obtenidos sobre electrodos de pasta de carbono a) sin modificar, b) con puntos cuánticos de CdTe y c) con puntos cuánticos de CdTe bioconjugados con ácido fólico, ambos dispersos en la pasta de carbono. Electrolito soporte: NaOH 0.1 M y  $\text{Na}_2\text{S}$  1Mm; disolvente: agua.



El electrodo de pasta de carbono sin modificar no presenta respuesta significativa en el intervalo de potencial estudiado. En el caso de los puntos cuánticos de CdTe se observa un pico de reducción  $C_1$  que inicia en -1.10 V y está asociado a la

reducción de los iones  $Cd^{2+}$  a cadmio metálico (ec. 24). Al invertir el barrido de potencial se identifican dos picos de oxidación  $A_1$  y  $A_2$  los cuales están asociados con la formación de hidróxido de cadmio y óxido de cadmio (ec. 25 y 26) debido la alta concentración de iones hidroxilo en la solución<sup>51</sup>. El bioconjugado entre los puntos cuánticos de CdTe y el AF presentó la misma respuesta electroquímica, pero con una disminución en la magnitud de la corriente, lo cual puede atribuirse a la presencia del AF en la superficie de los puntos cuánticos.



---

<sup>51</sup> HAM, Dong, et al. Anodic electrosynthesis of cadmium telluride (CdTe) thin films. *Chem. Mater.* 1989, vol. 1, no 6, p. 619-625.