

**FUNCIONALIZACIÓN DE NANOPARTICULAS DE ORO (AuNPs) CON  
PIRIMIDINAS SUSTITUIDAS CON POTENCIAL ANTIMICROBIANO  
FRENTE A LA *Escherichia coli* O157:H7**

**SANDRA VIVIANA VALCÁRCEL MÉNDEZ**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE QUÍMICA  
BUCARAMANGA  
2015**

**FUNCIONALIZACIÓN DE NANOPARTICULAS DE ORO (AuNPs) CON  
PIRIMIDINAS SUSTITUIDAS CON POTENCIAL ANTIMICROBIANO  
FRENTE A LA *Escherichia coli* O157:H7**

**SANDRA VIVIANA VALCÁRCEL MÉNDEZ**

**Tesis de pregrado para optar al título de  
Química**

**Director:**

**Dr. ENRIQUE MEJÍA OSPINO**

**Co-director:**

**M.Sc. YULY ANDREA PRADA VARGAS**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE QUÍMICA  
BUCARAMANGA  
2015**

*A mi hijo Daniel David...*

## AGRADECIMIENTOS

A Dios misericordioso por darme la vida, por darme salud y colocarme en mi camino a personas y situaciones que han hecho posible mi crecimiento personal y mi formación académica.

A mi hijo Daniel David y mi esposo Fabián. Por ser el motor que impulsó este logro, por su amor, apoyo constante e incondicional.

A mis padres, Martha y William. Porque están siempre a mi lado, por apoyarme incondicionalmente con su amor y consejos, deseándome siempre lo mejor a lo largo de mi vida.

A mis amigos,

Jorge Quintero, por su amistad, consejos y aportes.

Laura Acevedo, Solecito Castellanos, Johanna Gómez, Viviana Meléndez y demás del Laboratorio de Espectroscopía Atómica y Molecular. Porque con su valiosa amistad y experiencias compartidas me apoyaron para culminar esta tesis.

A mis queridos formadores,

El Dr Enrique Mejía Ospino. Por su dedicación, orientación y conocimientos que han sido fundamentales para mi formación profesional.

A Yuly Andrea Prada. Por su amistad, esfuerzo, consejos, paciencia y dedicación en la codirección de este trabajo porque con su apoyo y conocimientos se hizo posible el avance de esta investigación.

## TABLA DE CONTENIDO

	pág.
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>16</b>
<b>1. MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>19</b>
<b>1.1 NANOPARTÍCULAS DE ORO .....</b>	<b>19</b>
1.1.1 Resonancia plasmónica superficial (SPR) .....	20
1.1.2 Carga superficial de las AuNPs .....	20
<b>1.2 MÉTODOS DE SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE ORO.....</b>	<b>22</b>
1.2.1 Reducción química .....	23
1.2.2 Sonoquímica.....	25
1.2.3 Micelas inversas .....	25
1.2.4 Reducción fotoquímica (fotólisis) y radiólisis .....	25
1.2.5 Síntesis electroquímica .....	26
1.2.6 Ablación láser .....	26
<b>1.3 PIRIMIDINAS.....</b>	<b>26</b>
<b>1.4 FUNCIONALIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ORO .....</b>	<b>27</b>
<b>1.5 MICROORGANISMOS PATÓGENOS .....</b>	<b>30</b>
1.5.1 Escherichia coli.....	30
<b>1.6 TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN.....</b>	<b>31</b>
1.6.1 Dispersión de luz dinámica (DLS): .....	31
1.6.2 Potencial zeta: .....	31
1.6.3 Espectroscopia UV-Vis: .....	32

1.6.4 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM):.....	32
<b>2. ESTADO DEL ARTE .....</b>	<b>33</b>
<b>3. DESARROLLO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>39</b>
<b>3.1 MATERIALES .....</b>	<b>39</b>
<b>3.2 MÉTODOS .....</b>	<b>39</b>
3.2.1 Síntesis de AuNPs .....	40
3.2.2 Caracterización de AuNPs .....	41
3.2.3 Funcionalización de nanopartículas de oro. ....	43
3.2.4 Determinación de la CMI de los sistemas AuNPs@ 2MP y AuNPs @ 4,6-D-2MP y AuNPs frente a la E. coli O157:H7 .....	45
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>46</b>
<b>4.1 SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE AuNPs .....</b>	<b>46</b>
<b>4.2 FUNCIONALIZACIÓN .....</b>	<b>49</b>
4.2.1 Análisis del estudio del efecto de la relación volumétrica .....	49
4.2.2 Análisis UV-Vis de tiempo de interacción AuNPs@ 2MP en el ultrasonido. .	53
4.2.3 Análisis UV-Vis y DLS del Análisis del efecto de la concentración .....	55
4.2.4 Estudio del efecto del pH en la funcionalización AuNPs@2MP .....	61
4.2.5 Estudio del efecto del pH en la funcionalización AuNPs@4,6-D-2MP .....	67
<b>4.3 Evaluación de la actividad antimicrobiana de AuNPs, pirimidinas (2MP y 4,6-D-2MP) y de AuNPs@Pirimidinas. ....</b>	<b>69</b>
4.3.1 Actividad antimicrobiana de las AuNPs.....	69
4.3.2 Actividad antimicrobiana de la 2MP Y 4,6-D- .....	70
4.3.3 Actividad antimicrobiana de los sistemas AuNPs@2MP Y AuNPs@4,6-D-2MP.....	71

**5. CONCLUSIONES.....74**  
**6. RECOMENDACIONES.....75**  
**BIBLIOGRAFIA.....76**  
**ANEXOS .....81**

## TABLA DE FIGURAS

	pág.
<b>Figura 1.</b> Potencial zeta o Potencial Electrocinético. ....	22
<b>Figura 2.</b> Síntesis de nanopartículas de oro usando como agente reductor el citrato de sodio, mediante el método convencional de Turkevich. ....	24
<b>Figura 3.</b> Estructuras moleculares de la 4,6-diamino-2-mercapto pirimidina (4,6-D-2MP) y 2- mercaptopirimidina (2MP).....	27
<b>Figura 4.</b> Representación gráfica del proceso de formación de AuNps y posterior funcionalización con pirimidinas.....	29
<b>Figura 5.</b> Esquema de metodología implementada en la funcionalización AuNPs-pirimidina .....	39
<b>Figura 6.</b> Montaje experimental. <b>A)</b> Montaje de la síntesis. <b>B)</b> Nanopartículas de oro formadas. ....	40
<b>Figura 7.</b> Celdas para la medición de tamaño de partícula y potencial zeta. <b>A)</b> Celda para medición de potencial zeta. <b>B)</b> Celda para medición de tamaño de partícula.....	42
<b>Figura 8.</b> Representación esquemática del estudio del efecto de la concentración de 2MP y 4,6-D-2MP en la funcionalización de las AuNPs .....	44
<b>Figura 9.</b> Espectro UV-Vis de AuNPs estabilizadas por aniones citrato, pH 5.0. ...	46
<b>Figura 10.</b> Distribución de tamaño y potencial zeta de AuNPs <b>(A)</b> y <b>(C)</b> Distribución de tamaño de partícula promedio de AuNPs. <b>(B)</b> Potencial zeta de las AuNPs sintetizadas.....	47
<b>Figura 11.</b> Imagen SEM de las AuNPs sintetizadas .....	48

<b>Figura 12.</b> Espectros UV-Vis del análisis del efecto de la relación volumétrica en la funcionalización AuNPs@ 2MP. ....	50
<b>Figura 13.</b> Fotografías del cambio de coloración para la funcionalización de AuNPs con 2 MP a diferentes relaciones volumétricas. ....	53
<b>Figura 14.</b> Espectros UV-Vis del análisis del efecto del tiempo de funcionalización en el ultrasonido del sistema .....	54
<b>Figura 15.</b> Estudio del tiempo en la funcionalización de AuNPs con 2MP a una relación volumétrica 20:1. ....	55
<b>Figura 16.</b> Espectros UV-Vis del análisis del efecto de la concentración en la funcionalización AuNPs@ 2MP. ....	56
<b>Figura 17.</b> Fotografías del cambio de coloración para las AuNPs funcionalizadas con 2 MP y 4,6-D-2MP .....	57
<b>Figura 18.</b> Potencial zeta para las concentraciones de 2MP usadas en la funcionalización de AuNPs <b>(A)</b> 2mM <b>(B)</b> 1mM <b>(C)</b> 100 µM. ....	58
<b>Figura 19.</b> Distribución de tamaño de partícula promedio para las concentraciones de 2MP usadas en la funcionalización de AuNPs <b>(A)</b> 2mM <b>(B)</b> 1mM <b>(C)</b> 100µM. .	59
<b>Figura 20.</b> Imagen SEM del sistema AuNPs@2MP.....	60
<b>Figura 21.</b> Espectros UV-Vis de AuNPs@2MP. <b>(A)</b> AuNPs@2MP pH 7.0 <b>(B)</b> AuNPs @ 2MP pH 8.0. ....	61
<b>Figura 22.</b> Estudio del pH en los sistemas AuNPs@2 MP y 4,6-D-2MP <b>(A)</b> AuNPs <b>(B)</b> AuNPs@2MP a pH 7.0 <b>(C)</b> AuNPs@4,6-D-2MP a pH 7.0 <b>(D)</b> AuNPs@2MP a pH 8.0 <b>(E)</b> AuNPs@4,6-D-2MP a pH 8.0 .....	62
<b>Figura 23.</b> Comportamiento iónico de la 2MP en función del pH. ....	63
<b>Figura 24</b> Descripción general de los procesos de funcionalización, agregación y precipitación de sistemas AuNPs@2MP .....	64

<b>Figura 25.</b> Estudio del pH en el sistema AuNPs@2 MP <b>(A)</b> AuNPs@4,6-D-2MP a pH 7.0 <b>(B)</b> AuNPs@4,6-D-2MP a pH 8.0. ....	67
<b>Figura 26.</b> Comportamiento iónico de la 4,6-D-2MP en función del pH .....	68
<b>Figura 27.</b> Cinética de crecimiento de la E.coli O157:H7 en presencia de las AuNPs funcionalizadas con pirimidinas .....	71

## ANEXOS

pág.

<b>Anexo A.</b> Análisis por DLS y de potencial zeta del estudio del efecto de la relación volumétrica AuNps a 2MP 20:1	81
<b>Anexo B.</b> Análisis por DLS y de potencial zeta del estudio del efecto de la relación volumétrica AuNps a 2MP 10:1.	82
<b>Anexo C.</b> Espectros UV-Vis del estudio del efecto de la concentración en la funcionalización AuNPs@2MP para el día 2.	83
<b>Anexo D.</b> Espectros UV-Vis del análisis del efecto de la concentración en la funcionalización AuNPs@ 4,6-D-2MP para los días 1 y 2	84
<b>Anexo E.</b> Análisis DLS y de potencial zeta del sistema AuNPs@2MP a pH 7.0.	85
<b>Anexo F.</b> Análisis DLS y de potencial zeta del sistema AuNPs@2MP a pH 8.0.	86
<b>Anexo G.</b> Análisis DLS y de potencial zeta del sistema AuNPs@4,6-D-2MP a pH 7.0.	87
<b>Anexo H.</b> Análisis DLS y de potencial zeta del sistema AuNPs@4,6-D-2MP a pH 8.0.	88
<b>Anexo I.</b> Gráfica de la cinética de crecimiento de la <i>E. coli</i> O157:H7 en presencia de las AuNPs.	89
<b>Anexo J.</b> Gráfica de la cinética de crecimiento de la <i>E. coli</i> O157:H7 en presencia de la 2MP.	90
<b>Anexo K.</b> Gráfica de la cinética de crecimiento de la <i>E. coli</i> O157:H7 en presencia de la 4,6-D-2MP.	91

## RESUMEN

**TÍTULO:** FUNCIONALIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE ORO (AuNPs) CON PIRIMIDINAS SUSTITUIDAS CON POTENCIAL ANTIMICROBIANO FRENTE A LA *Escherichia coli* O157:H7\*.

**AUTOR:** SANDRA VIVIANA VALCÁRCEL MÉNDEZ \*\*.

**PALABRAS CLAVES:** Nanopartículas de oro, funcionalización de nanopartículas, mercapto pirimidinas, Actividad antimicrobiana, *Escherichia coli* O157:H7

### DESCRIPCIÓN:

Se realizó la síntesis de AuNPs mediante el método de reducción química de una sal precursora de oro,  $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , usando como agente reductor citrato de sodio, se obtuvo nanopartículas monodispersas de tamaño hidrodinámico promedio alrededor de 15 nm, morfología esférica y termodinámicamente estables.

Las AuNPs fueron funcionalizadas con pirimidinas sustituidas, como la 2- mercaptopirimidina (2MP) y la 4,6- diamino-2-mercaptopirimidina (4,6-D-2MP), mediante el método convencional sonoquímico. Para obtener sistemas estables, se estudiaron condiciones experimentales como relación volumétrica AuNPs a pirimidinas, concentración de pirimidinas, tiempo de interacción en el ultrasonido y pH del medio. Tanto las AuNPs como sus conjugados productos de la funcionalización, AuNPs@2MP y AuNPs@4,6-D-2MP, fueron caracterizados mediante técnicas espectroscópicas como Espectroscopía ultravioleta visible (UV-Vis), técnica que permitió obtener la banda de resonancia plasmónica de las AuNPs y observar los efectos batocrómicos producto de las funcionalizaciones; Por medio de técnicas ópticas como Dispersión de la luz Dinámica (DLS) se obtuvieron los tamaños hidrodinámicos promedios de las AuNPs y los sistemas de conjugación; y potencial zeta, que evidenció la estabilidad de los sistemas. Finalmente, los productos de la funcionalización se evaluaron frente a la cepa bacteriana *Escherichia coli* O157:H7 para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) utilizando el método de microdilución en caldo partiendo de un inóculo de la cepa. La cinética de crecimiento bacteriano se realizó por mediciones de densidad óptica empleando un espectrofotómetro lector de microplacas ELISA (Biorad, imarck) a 595 nm.

---

\* Trabajo de grado

\*\* Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Director: Enrique Mejía Ospino, Ph.D., Codirectora: Yuly Andrea Prada Vargas, M.Sc.

## SUMMARY

**TITLE:** FUNCTIONALIZATION OF GOLD NANOPARTICLES (AuNPs) WITH SUBSTITUTED PYRIMIDINES WITH ANTIMICROBIAL POTENTIAL AGAINST *Escherichia coli* O157:H7\*.

**AUTHOR:** SANDRA VIVIANA VALCÁRCEL MÉNDEZ \*\*.

**KEYWORDS:** Gold nanoparticles, nanoparticles assembly, mercapto pyrimidine, antimicrobial activity, *Escherichia coli* O157:H7.

### DESCRIPCIÓN:

Gold nanoparticles (AuNPs) synthesis was carried out by using a chemical reduction method employing  $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , as a precursor gold salt, and sodium citrate as a reducing agent. In this case, monodisperse AuNPs were successfully obtained with an average hydrodynamic size of 15nm, spherical morphology and thermodynamically stable.

Subsequently, AuNPs were functionalized replacing pyrimidines, such as the 2-mercaptopyrimidine (2MP) and the 4,6-diamino-2-mercaptopyrimidine (4,6-D-2MP), using the conventional sonochemical method. Experimental conditions, such as volumetric ratio AuNPs to pyrimidines, concentration of pyrimidines, time of interaction into ultrasound and pH, were studied in order to obtain stable systems against precipitation. AuNPs as well as its conjugated (AuNPs@2MP y AuNPs@4,6-D-2MP) were characterized by using UV-Visible spectroscopy (UV-Vis), which allowed us to obtain the AuNPs plasmon resonance band and to observe the bathochromic effects resulting of the functionalization. Finally, using optical techniques such as Dynamic Light Scattering (DLS), were obtained the average hydrodynamic size of the AuNPs and the conjugation systems; and zeta potential, it became evident the stability of the systems. Finally, AuNPs functionalized with 2MP (AuNPs@2MP) and 4,6-D-2MP (AuNPs@4,6-D-2MP) were evaluated against the bacterial strain *Escherichia coli* O157:H7 to determine the minimum inhibition concentration (MIC) employing the broth microdilution method, using an inoculum of the strain. The kinetics of bacterial growth was performed by measurement of optical density with an ELISA spectrophotometer microplate reader (Biorad, imarck) at 595 nm.

---

\* Degree work

\*\* Faculty of sciences. School of Chemistry. Adviser: Enrique Mejía Ospino, Ph.D., Co-adviser: Yuly Andrea Prada Vargas, M.Sc.

## INTRODUCCIÓN

La nanotecnología ha permitido la creación de materiales nanoestructurados para múltiples aplicaciones; entre las que sobresale el uso de nanopartículas metálicas dadas sus propiedades fisicoquímicas y optoelectrónicas únicas. Lo cual permite su utilización en campos como la medicina, bioquímica, biotecnología y ciencia de materiales. En el campo de la medicina han sido empleadas como agentes terapéuticos contra células cancerígenas, en el transporte y vectorización selectiva de fármacos, en el diagnóstico por imágenes y como agentes antibióticos frente a diferentes patógenos.

Entre las nanopartículas metálicas de gran interés, se destacan las nanopartículas de oro (AuNPs); ya que particularmente exhiben actividad biológica de tipo antiparasitaria, antiviral, antibacteriana, antifúngica y antitumoral, presentando baja toxicidad y alta biocompatibilidad en sistemas *in vitro* e *in vivo*. Por tanto, la obtención de las AuNPs ha sido ampliamente estudiada así como las condiciones que permiten controlar su morfología, tamaño y carga superficial ya que estas características determinan en gran medida su comportamiento fisicoquímico y biológico. Las AuNPs, sin embargo son inespecíficas lo que ha llevado a modificar su superficie mediante procesos de funcionalización con una variedad de moléculas tales como agentes poliméricos, fármacos, anticuerpos, ácidos nucleicos, aminoácidos, péptidos, proteínas que puedan dar reconocimiento y versatilidad a estos sistemas nanoestructurados. Estos procesos de conjugación han permitido el diseño y creación de nuevos materiales a escala nanométrica altamente específicos y estables que posibilitan su ingreso a sitios de la célula antes inaccesibles (Astruc y Boisselier, 2009).

Es así como el uso de nanopartículas desde el punto de vista biomédico se ha convertido en una herramienta terapéutica no solo frente a células cancerígenas, también para combatir enfermedades causadas por microorganismos, virus y parásitos. Actualmente, diferentes sistemas a partir de AuNPs conjugadas a antibióticos son implementadas para mejorar el efecto antimicrobiano frente a bacterias como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, y *Pseudomona aeruginosa*. Siendo *Escherichia coli* (*E.Coli*) una de las bacterias más estudiadas y uno de los patógenos asociados al síndrome urémico hemolítico. Ya que el serotipo aislado más frecuente es la *E. coli* O157:H7 asociado en la mayoría de los casos a este tipo de infecciones, representando un serio problema a la salud pública en los países en vía de desarrollo.

Comúnmente las afecciones son sufridas por niños con edades comprendidas entre 0-8 años, ancianos e individuos inmunosuprimidos. Entre el 30-40% de los casos son causados por este patógeno y la probabilidad de que un niño muera antes de los 7 años por gastroenteritis aguda asociada a esta infección es del 50%. En Colombia el riesgo de contraer la infección por *E.coli* O157:H7 es alto y es la segunda causa de morbilidad y mortalidad infantil (Mattar *et al.*, 2003). En consecuencia, este tipo de infecciones ha ocasionado el uso frecuente, e irracional, de antibióticos lo que ha generado mecanismos de resistencia frente a este tipo de fármacos por parte de las bacterias. Por esta razón el tratamiento de estas infecciones se ha convertido en una ardua tarea. Esto ha creado la necesidad de desarrollar nuevos agentes para combatir estos patógenos. Es así como estudios recientes involucran el uso de nanopartículas funcionalizadas con pirimidinas para su uso como agentes antibacteriales y bactericidas sobre la *E. coli*, siendo las pirimidinas compuestos químicos poco tóxicos que exhiben actividad antibiótica. Los resultados obtenidos evidencian la presencia de actividad antibacterial sin el desarrollo de mecanismo de defensa por parte de microorganismos comparado con los antibióticos convencionales. Las AuNPs pueden actuar a nivel de la membrana

bacteriana a través de interacciones electrostáticas lo cual modifica el potencial de membrana y afecta directamente el flujo de iones (Zhao *et al.*, 2010).

Con el presente trabajo se logró la síntesis de sistemas nanoestructurados mediante la funcionalización de AuNPs con pirimidinas sustituidas, la 4,6-diamino-2-mercaptopirimidina (4,6-D-2MP) y la 2-mercaptopirimidina (2MP). Finalmente, los productos de la funcionalización se evaluaron frente a la cepa bacteriana *Escherichia coli* O157:H7 para determinar la concentración mínima de inhibición (CMI) utilizando el método de microdilución en caldo partiendo de un inóculo de la cepa. La cinética de crecimiento bacteriano se realizó por mediciones de densidad óptica empleando un espectrofotómetro lector de microplacas ELISA (Biorad, imarck) a 595 nm.

## 1. MARCO TEÓRICO

Las nanopartículas (NPs) están definidas de acuerdo con el glosario de términos usados en toxicología de la IUPAC (International Unión of Pure and Applied Chemistry) (Duffus *et al.*, 2007), como una partícula microscópica cuyo tamaño se mide en nanómetros a menudo restringida a las partículas de tamaño nano entre 1 a 100 nm. Las NPs pueden ser obtenidas a partir de metales nobles como: níquel, cobalto, plata, cadmio, oro, platino y también de polímeros y compuestos orgánicos.

### 1.1 NANOPARTÍCULAS DE ORO

En los últimos años las AuNPs han sido objeto de investigación debido a sus propiedades fisicoquímicas y su biocompatibilidad con sistemas biológicos, por lo cual reciben múltiples aplicaciones en bioquímica y medicina. Las AuNPs se caracterizan por presentar actividad antibiótica frente a diferentes patógenos por lo que también son empleadas en tratamiento fototerapéutico contra el cáncer, artritis reumatoide, psoriasis y lupus erimatoso. Adicionalmente, las AuNPs son utilizadas en la fabricación de dispositivos electrónicos (Al-Qadi y Remuñán, 2013).

Las AuNPs se caracterizan por formar suspensiones coloidales en medios hidrofílicos, donde la fase dispersa corresponde a las AuNPs y el medio dispersante generalmente es agua. La naturaleza hidrofóbica de las AuNPs hace que el sistema se comporte de manera inestable. Es decir, si el potencial de repulsión electrostático de las NPs no es suficiente para vencer las fuerzas atractivas de Van der Waals, las nanopartículas tienden a aglomerarse hasta sedimentar. En algunos casos esta inestabilidad generada por la superficie interfacial hace necesaria la adición de agentes estabilizantes de naturaleza polimérica o surfactantes que ejercen una estabilización de tipo estérico ya que estas moléculas son muy voluminosas y se

adhieren a los centros metálicos generando una barrera estérica que ocasiona que los centros metálicos estén separados unos de otros ( Villarroya, 2002).

### **1.1.1 Resonancia plasmónica superficial (SPR)**

Las propiedades ópticas y fotoelectrónicas de las AuNPs (las cuales son moduladas por la variación de tamaño y forma de la nanopartícula) son el resultado del fenómeno de resonancia de plasmónes de superficie; los cuales imparten el color visible de la dispersión. El plasmón (definido en 1908 por Mie) se especifica como la oscilación colectiva de los electrones de conducción en la superficie de un metal excitado por el campo eléctrico de la luz. Las bandas de absorción de los plasmónes de superficie no sólo dependen de la partícula, también dependen del medio circundante, de la temperatura y funcionalidad superficial. Por lo tanto el máximo de absorción se ubica en el espectro UV-Vis alrededor de los 520 nm para nanopartículas de oro con un tamaño alrededor de los 20 nm con morfología esférica. La luz transmitida concede el color rojo al coloide (correspondiente al color no absorbido). Cuando las nanopartículas se agregan y aumentan su tamaño, el máximo de absorbancia (520 nm) se desplaza hacia longitudes de onda mayores (efecto batocrómico o corrimiento hacia el rojo) y se desplazan a longitudes de onda menores (corrimiento hacia el azul) cuando las nanopartículas disminuyen su tamaño (Guerrero, 2008).

### **1.1.2 Carga superficial de las AuNPs**

En la reducción de los iones de oro  $\text{Au}^{3+}$  se da la formación de átomos cero valentes ( $\text{Au}^0$ ) y puede dar lugar a la formación de átomos de oro  $\text{Au}^{1+}$  producto de la reducción incompleta. Estos últimos son adsorbidos sobre la superficie de la NP al igual que otros iones negativos presentes en el medio circundante. Esta capa de iones adsorbidos se conoce como capa de Stern. Cuando los iones negativos de la capa exterior son atraídos por la deficiencia electrónica del núcleo metálico, la capa

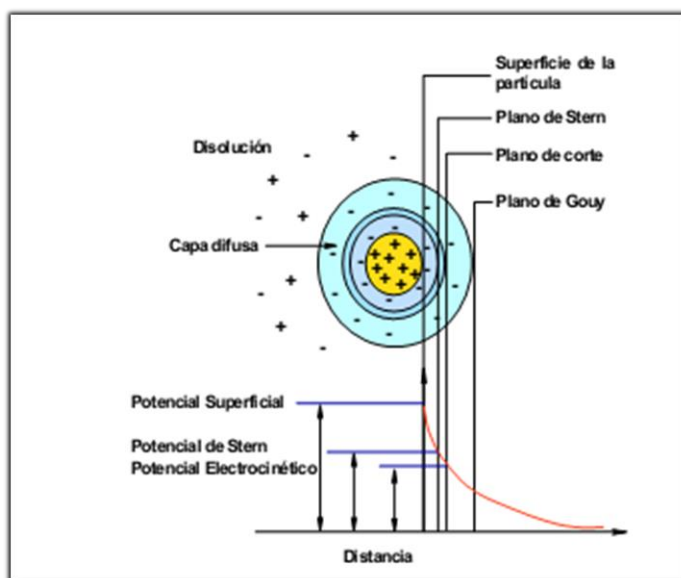
de Stern evita que estos sean adsorbidos debido a la fuerza de repulsión ejercida. En consecuencia, esta nueva capa de iones conforma lo que se conoce como capa difusa o capa de Gouy- Chapman. La capa de Stern (fuertemente adsorbida) y la capa difusa forman la llamada doble capa eléctrica o capa de Helmholtz (Urquijo., 2007). La característica de la capa Helmholtz es la adquisición ordenada, alrededor de las partículas cargadas, de los iones negativos y moléculas del disolvente.

Por otra parte, el potencial zeta ( $\zeta$ ), es una medida de la magnitud de la repulsión o atracción eléctrica entre las partículas que componen el coloide. Su medición confirma el mecanismo de estabilización de un coloide, ya sea electrostático o estérico. Este potencial se observa desde donde termina la capa de Stern y empieza la capa difusa, como se evidencia en la Figura 1. Un potencial zeta de gran magnitud se correlaciona con una buena estabilidad coloidal. Las partículas con un alto potencial zeta tanto positivo como negativo se repelerán unas con otras. Valores de  $\zeta < - 30 \text{ mV}$  o  $\zeta > + 30 \text{ mV}$  son considerados estables (Guerrero, 2008).

El plano de deslizamiento es un tipo de frontera después de la cual los iones no se movilizan junto a la partícula. Y se ubica al final de la doble capa eléctrica.

Debido a la influencia de un campo eléctrico, del movimiento browniano o de una perturbación mecánica, una partícula coloidal se desplazará. Adicionalmente, su doble capa junto con algunas moléculas del disolvente, presentes en la capa difusa, se moverán con la partícula como una unidad (Viudez, 2011).

**Figura 1.** Potencial zeta o Potencial Electrocinético. Es el potencial en la superficie de corte, el cual determina la velocidad de desplazamiento de la partícula en un campo eléctrico.



[Tomado de A.VIUDEZ, Córdoba, 2011]

## 1.2 MÉTODOS DE SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE ORO

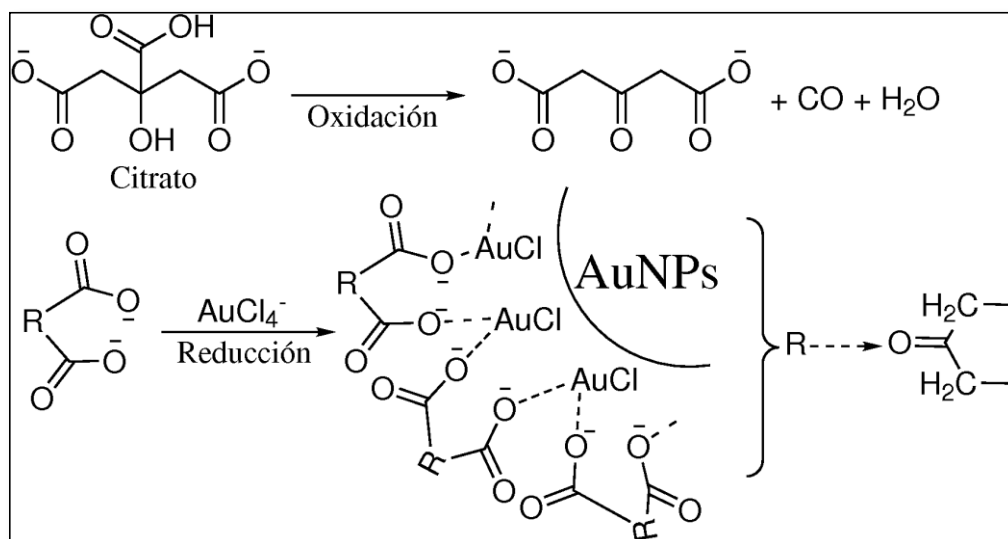
Dentro de los métodos de síntesis se pueden distinguir dos tipos, el primero de ellos conocido como *top down* que se caracteriza por partir del material a granel, el cual es roto mediante una fuerza energética (e.g. irradiación de iones en el aire o descarga de arco en el agua) para generar AuNPs. El segundo método, llamado *bottom up*, parte de componentes moleculares que son reducidos por medios químicos o biológicos. En estos métodos tienen lugar procesos de nucleación y crecimiento *in*

*situ*. Por el contrario, cuando estos procesos son observados por separado se denomina crecimiento de semilla.

### **1.2.1 Reducción química**

La obtención de nanopartículas de oro mediante reducción química, consiste en la reducción de una sal de oro, como por ejemplo  $\text{HAuCl}_4$ , empleando un agente reductor de los cuales se destacan el citrato de sodio (ver Figura 2), borohidruro de sodio, cloruro de hidroxilamina y etilendiamina. Esta reducción resulta en la formación de nanopartículas de oro (Turkevich *et al.*, 1951). Así pues, la reducción química constituye un tipo de síntesis *bottom up*, en el que se presenta crecimiento de las de semillas de nanopartículas de oro con el tiempo. Representa uno de los procedimientos de mayor facilidad de ejecución ya que las variables que determinan el tamaño y la morfología de las nanopartículas como lo son la relación de concentraciones entre los reactivos, tiempo de agitación, temperatura, relación volumétrica, velocidad de adición, entre otras variables que pueden ser controladas durante la reacción (Valizadeh *et al.*, 2013).

**Figura 2.** Síntesis de nanopartículas de oro usando como agente reductor el citrato de sodio, mediante el método convencional de Turkevich.



La síntesis envuelve tres pasos: nucleación, crecimiento y terminación por el agente reductor o ligando; en este caso por citrato de sodio. La síntesis se da a través de la reducción de iones Au<sup>3+</sup>, de la sal H<sub>3</sub>AuCl<sub>4</sub> llevada a cabo por el agente reductor, dicarboxi acetona, formado en la reacción. La reducción del oro no es un proceso directo y se forma un producto intermedio entre la dicarboxi acetona y el AuCl antes de las reducciones a Au<sup>1+</sup> y Au<sup>0</sup>, ver Figura 2.

El control de tamaño y morfología de las NPs se da mediante el balance entre la velocidad de nucleación y la degradación de la dicarboxi acetona. Factores que igualmente se ven influenciados a través de la repulsión electrostática que ejerce los aniones citratos adsorbidos sobre la superficie de las NPs, incrementando el valor de potencial electrocinético y favoreciendo la estabilidad de la solución coloidal (Rodríguez, 2007; Viudez, 2011).

### **1.2.2 Sonoquímica**

La sonoquímica resulta del fenómeno de cavitación acústica, mediante el uso de ultrasonido (20-100 kHz), y consiste en la formación, crecimiento y colapso implosivo de burbujas en un medio líquido liberando la energía concentrada dentro de la burbuja dentro de un corto periodo de tiempo cuya proporción de calentamiento y enfriamiento es de  $> 10^{10}$  K.s<sup>-1</sup>. Esta implosión cavitacional es localizada y alcanza temperaturas de ~5000 K y presiones de ~1000 bar (Suslick y Bang, 2010). Usando estas condiciones extremas varios tipos de nanopartículas y materiales nanoestructurados han sido sintetizados, así como ha sido utilizado para acelerar un amplio número de reacciones orgánicas (Li et al., 2007; Stefani y Cella, 2009).

### **1.2.3 Micelas inversas**

El uso de microemulsiones (agua-aceite) utiliza gotas de agua soportada sobre una fase orgánica mediante un surfactante. Al interior de esta gota ocurre el proceso de reducción de la sal disuelta en el interior obteniéndose así las nanopartículas cuyo tamaño y morfología dependerá de la cantidad de precursor al interior de la micela (Buendia, 2009).

### **1.2.4 Reducción fotoquímica (fotólisis) y radiólisis**

Ambas emplean una síntesis limpia en las que se observa ausencia de impurezas cuando se utiliza reductores químicos. La fotólisis utiliza energías por debajo de 60 eV, de radiación UV-Vis. La sal precursora de las nanopartículas es disuelta en agua, alcohol o solventes orgánicos. La radiólisis utiliza energías entre 10<sup>3</sup>-10<sup>4</sup> eV que hacen que el solvente o cualquier otro soluto añadido actúen como agente reductor (Zanella, 2012).

### 1.2.5 Síntesis electroquímica

Utiliza un precursor metálico en estado sólido el cual se coloca en una celda electroquímica como ánodo para generar los cationes metálicos los cuales se mueven hacia el cátodo. En este método se forman ya sea deposiciones o precipitación de átomos metálicos cero valentes (Buendia, 2009).

### 1.2.6 Ablación láser

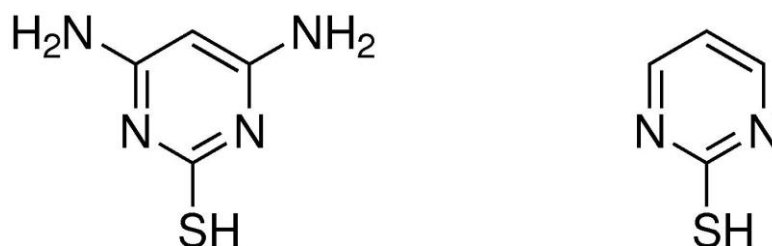
La síntesis de NPs mediante ablación láser es un método mecánico o *top-down*. El cual consiste en sintetizar nanopartículas a partir de una placa metálica de alta pureza por acción de un láser incidente de determinada longitud de onda sobre la superficie metálica. Comúnmente se emplea un láser de Nd: YAG operado a 10 Hz en el primer y segundo armónico, 1064 nm y 532 nm respectivamente. Las nanopartículas de oro formadas son recibidas en una solución acuosa en presencia o ausencia de agentes estabilizantes (Kondow, 2001).

## 1.3 PIRIMIDINAS

Son compuestos heterocíclicos que contienen nitrógeno y carbono. Las pirimidinas constituyen las bases nucleicas en el ADN y ARN, por lo cual tienen gran importancia en el estudio de sistemas *in vivo* por su biocompatibilidad y poca citotoxicidad. Dada su reactividad pueden obtenerse diferentes derivados empleando grupos sustituyentes como amino, tiol, hidroxilo, carboxilo, entre otros. Las pirimidinas sustituidas conforman un grupo bastante amplio de moléculas farmacológicamente activas debido a sus bondades terapéuticas como anti-inflamatorios, analgésicos, anticancerígenos y por presentar actividad antibiótica frente a bacterias, hongos y virus (Patel *et al.*, 2011).

En la Figura 3, La 4,6-diamino-2-pirimidintiol (4,6-diamino-2-mercaptopirimidina o 4,6-D-2MP) es un derivado de la pirimidina y análogo de la 2- pirimidintiol (2-mercaptopirimidina o 2MP) que está presente en el tARN de la *Escherichia coli*. Por tanto, este derivado actúa como agente inhibidor de la síntesis de tARN en la bacteria. A pesar que la 4,6-D-2MP no tiene propiedades farmacéuticas, ha sido usado como agente de inicio para el desarrollo de fármacos antibacteriales (Zhao *et al*, 2010).

**Figura 3.** Estructuras moleculares de la 4,6-diamino-2-mercapto pirimidina (4,6-D-2MP) y 2- mercaptopirimidina (2MP).



#### 1.4 FUNCIONALIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ORO

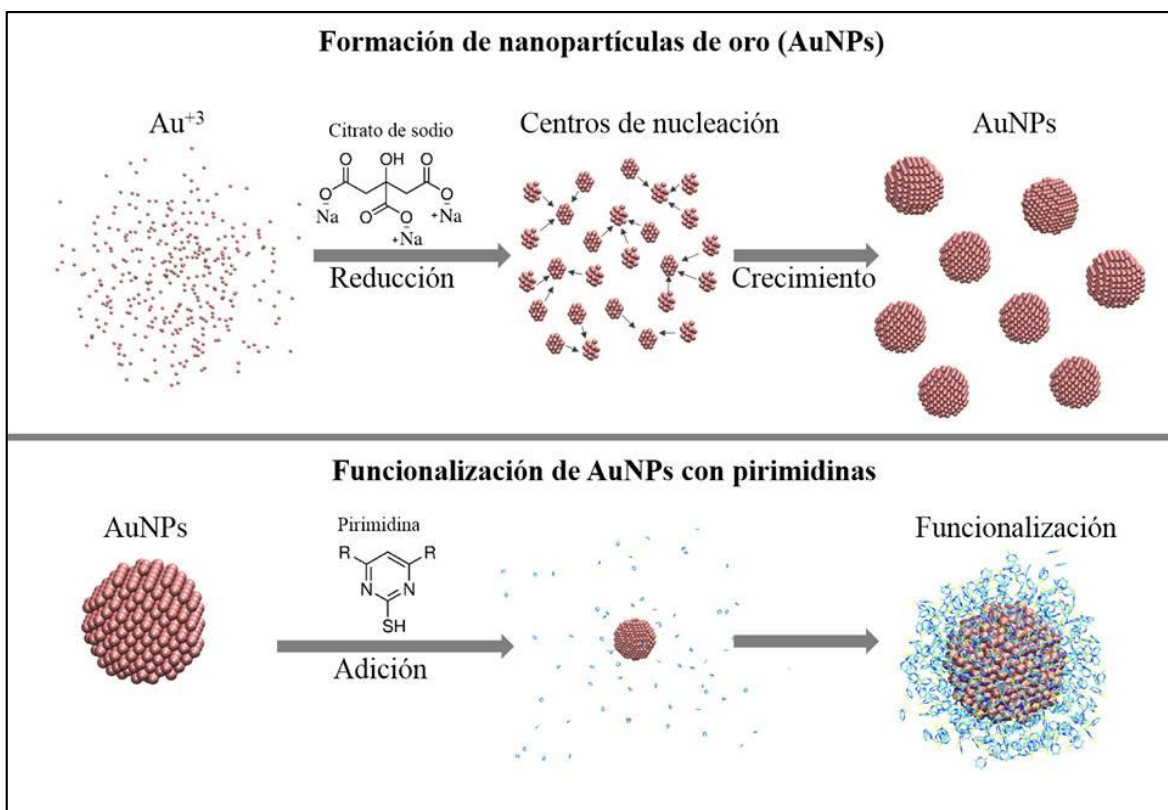
La síntesis de coloides de oro mediante el uso de citrato de sodio como agente reductor permite el reemplazo del ligando citrato con otras moléculas que han tenido gran impacto sobre aplicaciones biomédicas.

Las AuNPs presentan una elevada área superficial lo que permite su conjugación o funcionalización con diferentes moléculas, las cuales no reaccionan con la superficie del oro. Por el contrario, forman enlaces débiles de tipo Van der Waals,

lo que permite la creación de nuevos materiales nanoestructurados con propiedades ópticas, electrónicas y bioquímicas novedosas (Al-Qadi y Remuñan, 2013).

La funcionalización de las nanopartículas de oro, frecuentemente, se realiza usando como ligando grupos tioles debido a la afinidad que posee el oro por el sulfuro (Moodley, 2014); aunque también muestran afinidad por grupos que las estabilizan en solución acuosa como son los grupos amino, fosfito, bisulfito, ácidos carboxílicos presentes en péptidos y proteínas (Al-Qadi y Remuñan, 2013). Cuando el enlace es Au-S (oro-azufre) de tipo  $\sigma$  el azufre actúa como donador de densidad electrónica; mientras que el átomo de oro es el aceptor. Sin embargo, cuando el enlace es de tipo  $\pi$  los electrones del metal están parcialmente deslocalizados en los orbitales moleculares formados entre los orbitales d llenos del metal y el orbital d vacío del azufre (Amendola, 2008). El proceso de conjugación además de conferir especificidad y funcionalidad a las NPs también ejerce un efecto de estabilización, ver Figura 4.

**Figura 4.** Representación gráfica del proceso de formación de AuNps y posterior funcionalización con pirimidinas.



## 1.5 MICROORGANISMOS PATÓGENOS

La patogenicidad microbiana hace referencia a los mecanismos bioquímicos por medio de los cuales los microorganismos causan enfermedades. Siendo considerada enfermedad a la infección que causa daño significativo en el huésped y a la infección como la persistencia exitosa del patógeno sobre o dentro del huésped. Los diferentes mecanismos de defensa que poseen las bacterias como su pared celular, producción de proteínas que atacan linfocitos, la adherencia y la presencia de mecanismos de resistencia desarrollados por esta conllevan a que las bacterias se aseguren de un sitio dentro de un huésped, evada los mecanismos de defensa del mismo y multiplicarse dentro del mismo (Molina *et al.*, 1998). El uso indiscriminado de antibióticos es uno de los factores que mayor influencia tiene en el desarrollo de resistencia por parte de los microorganismos; los mecanismos de resistencia son variados y van desde la producción de proteínas que metabolizan los antibióticos como la creación de barreras de permeabilización que impiden su internalización a la célula bacteriana. Existe un grupo extenso de bacterias que son consideradas las causantes de enfermedades infecciosas con alta morbilidad y mortalidad entre ellas están: *S. aureus*, *S.epidermidis*, *E. faecium*, *E.coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*.

### 1.5.1 *Escherichia coli*

La *E.coli* es una bacteria Gram-negativa dado que no retiene la tinción de Gram. Es un microorganismo con un tamaño de 2  $\mu\text{m}$  de longitud y cerca de 1  $\mu\text{m}$  de diámetro (Collado y Moreno., 2013). Se caracteriza porque presenta una pared celular rígida y porosa que le confiere forma y protección. Posee también una membrana externa compuesta por lipopolisacáridos y una membrana interna conformada por peptidoglicanos. Esta bacteria habita en el intestino de los mamíferos formando parte de la flora intestinal bacteriana. Sin embargo se ha

aislado un serotipo altamente patógeno designado como E. coli O157:H7 al cual es atribuido el síndrome urémico hemolítico (SUH) y es causal de deshidratación, deficiencia plaquetaria, trombopatía y en algunos casos puede ser mortal. Este es un problema de salud pública, reconocido en 1982 después de un brote en los Estados Unidos de América (OMS., 2013) y en 1996 se reportó por primera vez su presencia en Colombia (Mattar *et al.*, 2001). *E.coli* O157:H7 es el serotipo de EHEC más importante, sin ser la única variedad serológica que integra el grupo, es fácilmente diferenciada bioquímicamente de otras cepas de E.coli ya que no fermenta el sorbitol y no posee actividad  $\beta$ -glucuronidasa (Mattar *et al.*, 2001). Esta infección se transmite por consumo de agua o alimentos contaminados, como productos cárnicos deficientemente cocidos y leche cruda.

## 1.6 TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN

**1.6.1 Dispersión de luz dinámica (DLS):** Es una técnica óptica que permite medir el movimiento browniano correlacionándolo con el tamaño de las partículas. Esta se basa en el análisis de la intensidad las fluctuaciones de la luz dispersada cuando las partículas son irradiadas por un haz de luz a un ángulo determinado. Esta técnica mide características pertenecientes a las partículas como: tamaño de partícula, peso molecular (Malvern, 2004).

**1.6.2 Potencial zeta:** Es una técnica que mide la movilidad electroforética de las partículas cuando un campo eléctrico es aplicado. Los coloides cargados migran en el campo y su movimiento y dirección están relacionados con el potencial zeta. Por tanto si se conoce la velocidad de la partícula, el campo eléctrico y con el uso de otras constantes de la muestra como viscosidad y constante dieléctrica, se puede obtener el potencial zeta de dichas partículas.

**1.6.3 Espectroscopia UV-Vis:** Utiliza luz en los rangos visible y UV e IR cercano, en esta región del espectro electromagnético ocurren transiciones electrónicas en los átomos o en las moléculas. Es la técnica por excelencia para la caracterización de las nanopartículas, ya que en esta región se observa la banda característica de los plasmónes de superficie de las nanopartículas de oro que ocurre alrededor de los 520 nm, sin embargo el corrimiento de este está influenciado por el tamaño, forma y medio en el que se encuentre la nanopartícula.

**1.6.4 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM):** Es una de las técnicas más usadas en la caracterización de nanomateriales ya que genera información sobre la morfología y composición química superficial de la muestra. La imagen generada por SEM se obtiene por la interacción de un haz de electrones que examina un área determinada sobre la superficie de la muestra dando lugar a fenómenos espectroscópicos que posteriormente se emplean para obtener información sobre la naturaleza de la muestra.

## 2. ESTADO DEL ARTE

En la antigüedad algunos metales eran usados ecológicamente para propósitos curativos y artísticos. El oro coloidal era empleado en la fabricación de vidrio y cerámicas coloridas. Es probable que apareciera alrededor del siglo IV d.C, cuando se observaron en el material de la copa Lycurgus, el cual transmite el color rubí rojo y refleja el color verde, esto es causado por la excitación de los plasmónes de superficie de las nanopartículas de oro. En 1676 Johaan Kunckels concluyó que el oro metálico en estos sistemas acuosos con tonalidades rosadas, se encontraba en estado neutro y que su tamaño podría no ser visible al ojo humano. Hacia 1718 Hans Helcher reportó que el uso de almidón cocido en la preparación de oro en solución mejoraba su estabilidad. Posteriormente se realizó un nuevo estudio el cual fue reportado en 1857 por Michael Faraday, quien al sintetizar nanopartículas de oro por reducción de una solución acuosa de cloro aurato ( $\text{AuCl}_4^-$ ) usando fósforo en disulfuro de carbono ( $\text{CS}_2$ ), en un sistema de dos fases obtuvo soluciones coloidales de oro con coloración rojizo profundo. Estas nanopartículas aún permanecen estables (Astruc y Daniel, 2004).

Durante décadas se han reportado diferentes formas de obtener nanopartículas de oro en las cuales se destacan los métodos químicos de reducción, como el realizado por Turkevich y colaboradores en 1951 en el que reduce  $\text{HAuCl}_4$  con citrato de sodio, método que es posteriormente modificado por Frens hacia 1973, en el que amplía el rango de tamaño de obtención de las nanopartículas. Hacia 1979, Creighton y colaboradores sintetizaron nanopartículas de oro por reducción con  $\text{NaBH}_4$  y en 1994 Brust y Schrifin estabilizaron nanopartículas de oro mediante ligandos tiol. Por tanto, se han realizado diferentes investigaciones en búsqueda de nuevas aplicaciones y es por esto, que ha surgido el interés de funcionalizarlas con diferentes moléculas, las cuales confieran especificidad por la creación de nuevos materiales con novedosas propiedades y que adicionalmente, se logre su

estabilización termodinámica y permitan controlar la dispersión de tamaños y la carga superficial, ya que tales características determinan en gran medida su aplicación.

El método de reducción química es el método de síntesis de coloides de oro más empleado. De esta manera Ji y colaboradores, estudiaron el papel del citrato como mediador de pH en el crecimiento y morfología de los nanocristales de oro, siendo posible obtener AuNPs monodispersas con tamaños de 20 a 40 nm (Ji *et al.*, 2007). Posteriormente, Corzo en el 2012 estudió el método de reducción química para la preparación de nanopartículas de oro usando tres agentes de reducción: citrato de sodio ( $\text{Na}_3\text{C}_3\text{H}_5\text{O}(\text{COO})_3$ ), tartrato de sodio y potasio ( $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) y borohidruro de sodio ( $\text{NaBH}_4$ ). El citrato de sodio, el tartrato de sodio y potasio son agentes quelantes que disminuyeron la dispersión de las nanopartículas al ser añadidos rápidamente; por otra parte el borohidruro no tiene capacidad quelante pero es un buen agente reductor. De este estudio se estableció que al aumentar la concentración de la sal y al mantener constante la concentración del agente reductor se forman aglomerados de nanopartículas que tienden a aumentar su tamaño. Por otra parte, se estableció que el pH es una de las variables más influyentes en los procesos de nucleación y crecimiento cristalino.

En cuanto a la estabilización de nanopartículas, Zhang y colaboradores, en el 2003 estabilizaron nanopartículas de oro empleando moléculas de mercaptanos como la 2-mercaptopirimidina, 4-mercaptopiridina y 2-mercaptopiridina las cuales forman moléculas con carga positiva para su posterior uso en nanoestructuras autoensambladas en 3D y nanomarcado de moléculas biológicas. Los autores estudiaron el posible tautomerismo (tione-tiol) que adoptan cuando son adsorbidas sobre la superficie de la nanopartícula. La caracterización la realizaron por microscopía electrónica de transmisión (TEM), espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR), espectroscopia UV-Vis y espectroscopia de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS). La 2-mercaptopiridina se usó como agente estabilizante permitiendo la obtención de tamaños de partícula uniforme. Los

autores sugieren que la 4-mercaptopiridina muestra una tendencia a la formación de agregados en 3D, y su inestabilidad se atribuye al entrecruzamiento entre grupos de azufre con partículas vecinas. Cuando las nanopartículas están en estado policristalino, la forma predominante es el grupo tiona mientras que la forma de la molécula adsorbida en la superficie es la conformación tiol.

El interés por la estabilización de las nanopartículas de oro es debido a sus propiedades únicas en el ámbito físico, químico, electrónico; lo cuales se asocian a sus dimensiones nanométricas y también a la necesidad de desarrollar nuevas estrategias para el diseño de nuevos agentes antibacteriales contra diferentes patógenos, entre ellos la bacteria *E. coli*.

El tamaño de las NPs determina la eficiencia antimicrobial y lo demuestra Zhang y colaboradores en el 2008, quienes estabilizaron nanopartículas de oro y plata con polímeros hiperramificados poli (metilen bisacrilamida-aminoetil piperazina) con grupos dimetilamina (HPAMAM-N (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), para su posterior evaluación antimicrobiana contra bacterias como las *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella mobilis* y hongos como la *Aspergillus niger* y *Penicillium citrinum*. Los nanocompuestos hiperramificados liberan nanopartículas de oro y plata en el ambiente patogénico, mediante la unión a la superficie celular o internalización en la célula bacteriana, siendo atribuido al tamaño de las nanopartículas metálicas. Por tanto, la eficiencia antibiótica mejora cuando las nanopartículas tienen un tamaño pequeño.

Arshi y colaboradores en el 2010 investigaron el efecto de la temperatura en el tamaño. Sintetizaron nanopartículas de oro mediante irradiación de microondas, estableciendo las condiciones adecuadas para obtener una disminución en las dimensiones de la nanopartícula con el aumento del tiempo de irradiación. Al evaluar la actividad antibacteriana sobre la bacteria *E. coli* deducen que la AuNP al poseer mayor área superficial disponible para la interacción con la célula bacteriana,

podrá ejercer un mayor efecto electrónico mejorando la reactividad de la nanopartícula.

En el 2009, Cella y Stefani emplearon diferentes técnicas en aras de disminuir el tamaño de partícula y mejorar las propiedades de estas para su posterior aplicación, como lo es el uso de ultrasonido para promover y acelerar reacciones químicas así como también en la preparación de micro y nanomateriales y en la síntesis y funcionalización de compuestos heterocíclicos.

Li y colaboradores en el 2007, recubrieron Nanopartículas de oro con líquido iónico funcionalizado [1-(2',3'-dimercaptoacetoxipropil)-3-metilimidazol, 3''-mercapto-1''-ácido propanosulfónico (TFIL)] usando peróxido de hidrógeno como agente reductor y ultrasonido, el cual acelera la formación de nanopartículas de oro y ayuda a la dispersión de estas en TFIL. Posteriormente fueron caracterizadas por TEM e FT-IR.

Otro estudio realizado en el 2011 por Chen y colaboradores, demostró que el ultrasonido es una técnica poderosa para la reducción del tamaño de partícula comparada con la agitación magnética. Llevaron a cabo la síntesis de nanofluidos de oro en un rango de tamaño de 10-300 nm a diferentes tiempos para controlar el tamaño y forma de las nanopartículas de oro en un rango de 10-20 nm. Los resultados obtenidos fueron caracterizados por espectroscopia de difracción de Rayos -X, microscopia de escaneo electrónico (SEM), DLS y TEM.

Dada la versatilidad de los materiales nanoestructurados, recientes estudios han demostrado su eficiencia en el campo biomédico para el tratamiento de enfermedades bacterianas. El desarrollo de resistencia a fármacos convencionales ha llevado a investigar nuevas alternativas terapéuticas usando sistemas biológicos a escala manométrica.

En el 2010, Zhao y colaboradores sintetizaron nanopartículas funcionalizadas con pirimidinas: 4,6-D-2MP, 2,4-diamino-6-pirimidintiol (un isómero del 4,6-D-2MP, i4, 6-

D-2MP); 4-amino-2-pirimidintiol (APT); 4,6-dihidroxi-2-pirimidintiol (DHPT). Estos sistemas bioconjugados exhibieron actividad antimicrobiana contra *E.coli* y *P.aeruginosa* mejorando el efecto antibiótico que presentan las AuNPs por sí solas.

En este trabajo se evidenció un mecanismo de inhibición en el crecimiento bacteriano relacionado con la quelación de iones  $Mg^{2+}$ ; Causando la desestabilización de la membrana celular de la bacteria y por tanto un aumento en la permeabilidad de esta. El mecanismo muestra que la permeabilidad de la *E.coli* incrementa con la Au\_4,6-D-2MP y permite la salida de ácidos nucleicos desde la célula. Las moléculas con carga positiva (Au\_4,6-D-2MP, Au\_APT, Au\_i4, 6-D-2MP) inhiben la proliferación de la bacteria, mientras que la Au\_DHPT (con carga negativa) fue menos activa contra la bacteria. Usando el análisis por TEM, se evidenció que la Au\_4,6-D-2MP puede internalizarse y localizarse en la membrana externa, en la capa de peptidoglicanos, en la membrana citoplasmática y en el citoplasma; también puede diferenciar el enlace entre Au\_4,6-D-2MP, los ribosomas y cromosomas. El ensayo de electroforesis en gel revela la inhibición de síntesis de proteínas, mostrando los mejores resultados con la Au\_4,6-D-2MP. Así como los ensayos de resistencia bacteriana demostraron que la bacteria tiene pocas probabilidades de desarrollar resistencia a los sistemas Au@Pirimidinas.

Adicionalmente, Lobo y colaboradores en el 2012, lograron obtener derivados de las 4,6-diamino pirimidinas análogos de la citosina. Las NPs funcionalizadas con estos análogos presentaron actividad antimicrobiana frente a organismos Gram-positivos y Gram-negativos como *S. aureus*, *B. cereus*, *E.coli* y *P. aeruginosa*.

En el mismo año, Cui y colaboradores demostraron que los sistemas conjugados AuNPs@Pirimidinas como la 4,6-diamino-2-mercaptopirimidina, intervienen en la síntesis de proteínas por inhibición de la t-ARN y de ATP una vez ingresan a través de la membrana bacteriana. Los sistemas conjugados fueron estables y biocompatibles con las células mamíferas al no evidenciarse formación de especies reactivas de oxígeno. Finalmente, se deduce que las nanopartículas de oro ofrecen

sistemas con notable estabilidad y baja citotoxicidad y se han convertido en una alternativa novedosa para combatir diferentes microorganismos, ya que exhiben diferentes mecanismos de acción que la bacteria no logra reconocer, impidiendo que esta desarrolle resistencia.

### 3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

#### 3.1 MATERIALES

Los reactivos 2-mercaptopirimidina (2MP), 4,6-diamino-2-mercaptopirimidina (4,6-D-2MP), el hidróxido de sodio (NaOH, 99%) y el citrato trisódico dihidratado ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) fueron adquiridos de Merck. El ácido clorhídrico (HCl 36.5-38.0%) marca EM science; el ácido tetracloroaurico trihidratado ( $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  >99.9%) y el caldo Luria Bertani de Sigma-Aldrich; El agua tipo I procesada en un equipo MilliQ con resistividad eléctrica de 18.2 mΩ fue adquirida en el laboratorio de Instrumentación Química de la Universidad Industrial de Santander.

#### 3.2 MÉTODOS

La metodología desarrollada para la realización del presente trabajo de investigación se encuentra ilustrada en el siguiente esquema (Figura 5).

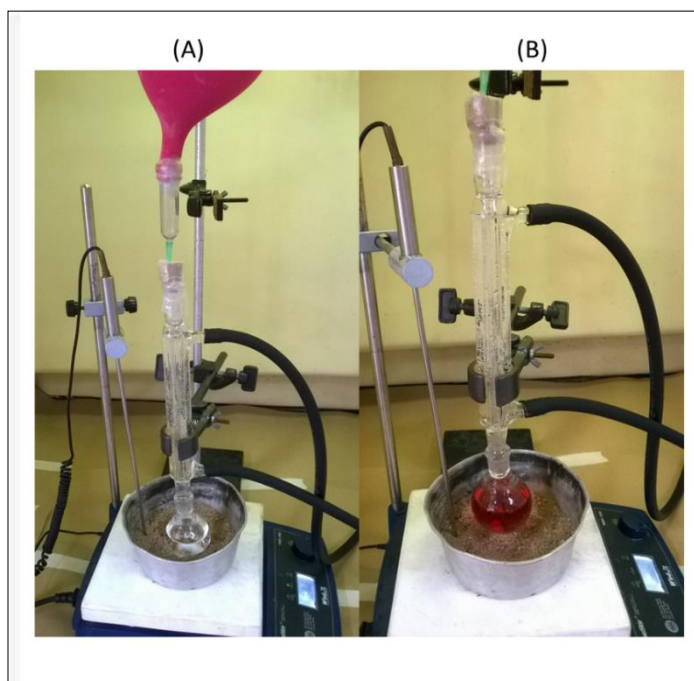
**Figura 5.** Esquema de metodología implementada en la funcionalización AuNPs-pirimidina



### 3.2.1 Síntesis de AuNPs

Se prepararon nanopartículas de oro por el método de reducción química de una solución precursora 0.1 M de  $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  usando como agente reductor citrato de sodio ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ). Se preparó una solución acuosa de citrato de sodio a una concentración 1% p/V y una solución  $2 \times 10^{-4}$  M de  $\text{HAuCl}_4$  en agua la cual fue calentada a reflujo en atmosfera de argón. Al observar burbujeo, se adicionó rápidamente 1000  $\mu\text{L}$  de la solución de citrato de sodio previamente preparada. La reacción se llevó a cabo bajo agitación magnética con velocidades aproximadas de 500 rpm y sobre un baño de arena. Al observarse la coloración rojo vino característica de los coloides de oro, se retiró el calentamiento manteniendo la agitación hasta alcanzar la temperatura ambiente (ver Figura 6). Todas las soluciones fueron preparadas en agua tipo I.

**Figura 6.** Montaje experimental. **A)** Montaje de la síntesis. **B)** Nanopartículas de oro formadas.



## **3.2.2 Caracterización de AuNPs**

### **3.2.2.1 Espectroscopia ultravioleta visible (UV-Vis)**

La obtención de los espectros UV-Vis se llevó a cabo mediante adición de 3 ml de las AuNPs en una cubeta de cuarzo (serie 104-QS). El equipo utilizado fue un espectrofotómetro marca SHIMADZU modelo UV-2401 PC, con lámpara de deuterio y un fotomultiplicador R-928; operado en un rango entre 200-800 nm con ancho de banda espectral de 1.0 *slit*. La absorción máxima mostrada por el espectro obtenido alrededor de 520 nm permitió conocer la longitud de onda máxima de la resonancia de plasmón superficial característica para nanopartículas de oro.

### **3.2.2.2 Dispersión de la luz en modo dinámico (DLS)**

Las medidas de tamaño de partícula se llevaron a cabo en un equipo Zetasizer Nano Series ZS90 marca Malvern Instrument mediante la adición de 1.5 ml de nanopartículas en una cubeta de cuarzo (serie 104-QS) ilustrada en la Figura 7. Manteniendo las condiciones de la Tabla 1.

### **3.2.2.3 Potencial zeta**

En una celda capilar para potencial zeta (Ref: DTS1070) se depositó la solución de AuNPs, como se ilustra en la Figura 7 y bajo los parámetros presentados en la Tabla 1, empleando un equipo Zetasizer Nano Series marca Malvern Instrument.

**Tabla 1.** Parámetros de medición de AuNPs para tamaño y potencial zeta.

<b>Número de mediciones</b>	<b>3</b>
<b>Número de corridas</b>	Mínimo 50 ; máximo 100
<b>Temperatura</b>	25°C
<b>Dispersante</b>	Agua
<b>Índice de refracción del dispersante</b>	1.333

**Figura 7.** Celdas para la medición de tamaño de partícula y potencial zeta. **A)** Celda para medición de potencial zeta. **B)** Celda para medición de tamaño de partícula.



### **3.2.3 Funcionalización de nanopartículas de oro.**

La funcionalización de AuNPs se llevó a cabo mediante el método convencional sonoquímico (20-100 kHz). Las AuNPs fueron conjugadas con las pirimidinas sustituidas, la 2MP y 4,6-D-2MP, se estudiaron los parámetros: concentración de pirimidina, relación volumétrica AuNPs a pirimidina, Cambio de pH del sistema y tiempo de interacción en el ultrasonido (marca Branson 1510, 42 kHz) como se representa en la Figura 5.

#### **3.2.3.1 Estudio del efecto de la relación volumétrica**

Se realizó la funcionalización mediante el uso de US con una concentración de 2.07 mM para la 2MP (concentración máxima que se pudo preparar por la baja solubilidad de la molécula en agua) manteniendo la concentración y volumen de solución de NPs fijas ( $2 \times 10^{-4}$  M, 3 ml respectivamente). De esta manera se procedió a estudiar las relaciones volumétricas AuNPs a 2MP de la siguiente manera 1:1, 2:1, 10:1, 20:1, 100:1. Para el sistema conjugado no fue posible realizar el estudio de tiempo de interacción sin el uso de ultrasonido, ya que sin este la reacción es muy lenta. De acuerdo al resultado obtenido se escogió la relación volumétrica 20:1 para trabajar el estudio del tiempo de interacción en ultrasonido. Se caracterizan los sistemas por UV-Vis y DLS.

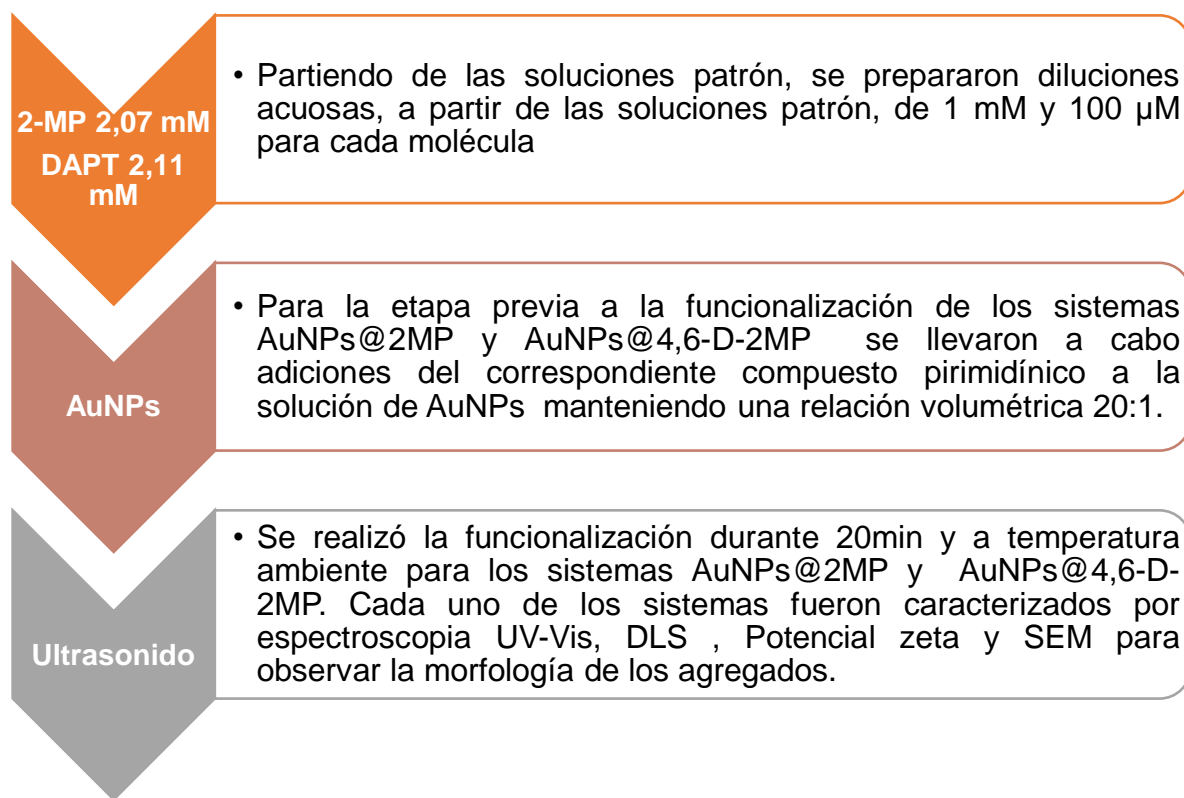
#### **3.2.3.2 Estudio de tiempo de interacción AuNPs@ 2MP en el ultrasonido.**

Se recolectaron espectros UV-Vis durante un tiempo de 80 min cada 10 min con una relación volumétrica de AuNPs a 2MP de 20:1 con el fin de obtener las condiciones para la formación de un sistema más estable y que evidencie la posible funcionalización para posteriormente ajustar esas condiciones al sistema AuNPs@4,6-D-2MP.

### 3.2.3.3 Estudio del efecto de la concentración

Se prepararon soluciones de 2MP con concentraciones 100  $\mu$ M, 1 mM, 2.07 mM; mientras que para el caso de la 4,6-D-2MP se prepararon soluciones con concentraciones 100  $\mu$ M, 1 mM, 2.11 mM manteniendo la relación volumétrica 20:1 para ambos sistemas. Cada una de las soluciones anteriormente descritas se usaron para la funcionalización de las AuNPs de acuerdo al procedimiento de la Figura 8. En este punto debe considerarse que en todos los ensayos se observó interacción, siendo la concentración, aproximada, 2mM la escogida para ambos sistemas, debido a que evidenció un espectro con mayor definición en los picos.

**Figura 8.** Representación esquemática del estudio del efecto de la concentración de 2MP y 4,6-D-2MP en la funcionalización de las AuNPs



### **3.2.3.4 Estudio del efecto del pH**

Se estudió el efecto del pH sobre las nanopartículas de oro funcionalizadas con pirimidinas (2MP y 4,6-D-2MP), para tal fin se prepararon soluciones de 2MP y 4,6-D-2MP de concentración aproximada 2mM y posterior a ello se procedió a la funcionalización, en ultrasonido durante 20 min, de las AuNPs manteniendo la relación volumétrica (AuNPs a pirimidinas) 20:1. Se ajustó el pH con NaOH 0.1 M y HCl 0.1 M hacia valores de 7 y 8 puesto que son valores cercanos al  $PKa_2$  (7.2) de la molécula 2MP, así como para observar sus comportamientos en un rango de pH fisiológico (7.3).

### **3.2.4 Determinación de la CMI de los sistemas AuNPs@ 2MP y AuNPs @ 4,6-D-2MP y AuNPs frente a la *E. coli* O157:H7**

Para determinar el efecto antimicrobiano de los productos de conjugación AuNPs@ 2MP y AuNPs @ 4,6-D-2MP, se empleó el método de microdilución en caldo.

Inicialmente se preparó un preinóculo de *E. Coli* O157:H7 empleando como medios de cultivo Luria-Bertani. El preinóculo se dejó en incubación durante 12 horas a 37°C y agitación de 200 rpm. La cinética de crecimiento se realizó adicionando 100 µL de la bacteria a microplacas de ELISA de 96 pozos que previamente contenían diluciones conocidas de las pirimidinas 2MP y 4,6-D-2MP (2.5, 5, 7.5, 12.5, 25,35 y 50 µM), de las AuNPs (2.5, 5, 7.5, 12.5, 25,35 y 50 µM) y de los sistemas conjugados AuNPs@Pirimidinas (2.5, 5, 12.5, 25,35 y 50 µM). Las medidas de densidad óptica fueron realizadas en un espectrofotómetro lector de microplacas ELISA marca Biorad-Imarck a 595 nm cada hora durante 7 horas.

La CMI fue determinada como la mínima concentración necesaria de agente antimicrobiano para causar inhibición en el crecimiento bacteriano.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

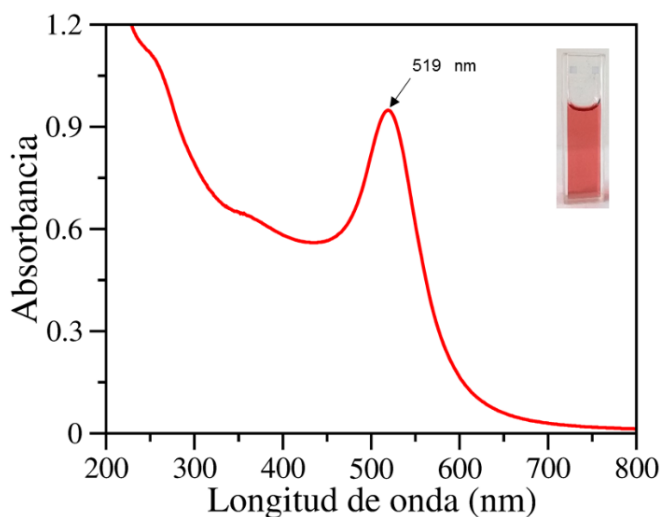
### 4.1 SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE AuNPs

Se obtuvo un coloide color rojo (Figura 9) la cual permaneció estable durante un mes bajo protección de la luz y almacenadas a 4°C.

El espectro de absorción UV-Vis para las AuNPs obtenidas, evidencia la presencia de la banda de resonancia plasmónica para coloides de oro alrededor de 520 nm de acuerdo con lo reportado en la literatura (Horvath, 2009). Este comportamiento es resultado de la interacción con el campo eléctrico de la luz dando lugar a la oscilación colectiva de los electrones confinados en la superficie de materiales a escala nanométrica. El máximo de absorbancia tiene lugar a 519 nm con un valor de 0,92 unidades.

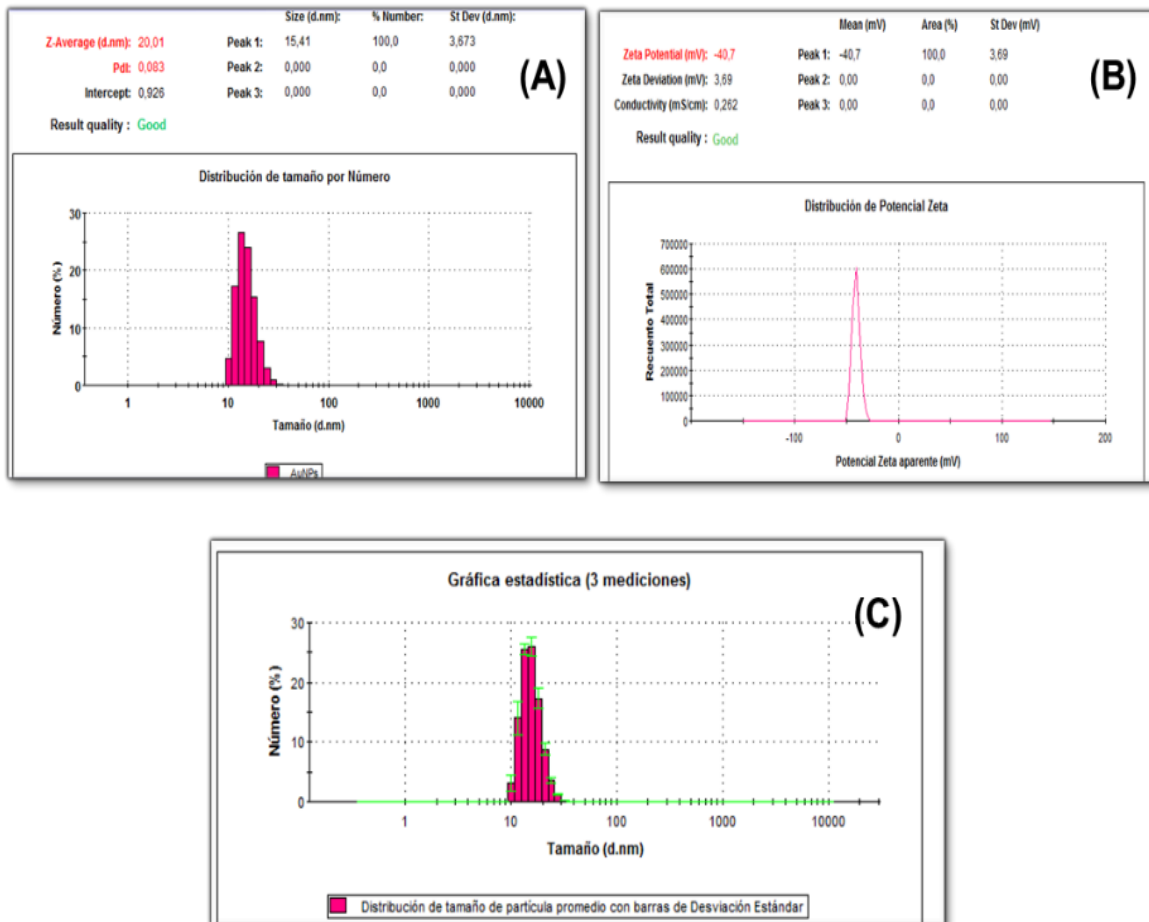
Esté análisis sugiere la formación de nanopartículas de morfología esférica, con un color rojo característico, y de diámetro de partícula entre 5-20 nm el cual fue corroborado más adelante en los análisis por DLS y SEM (estas últimas suministradas por el laboratorio de Microscopía de la Universidad Industrial de Santander) .

**Figura 9.** Espectro UV-Vis de AuNPs estabilizadas por aniones citrato, pH 5.0.

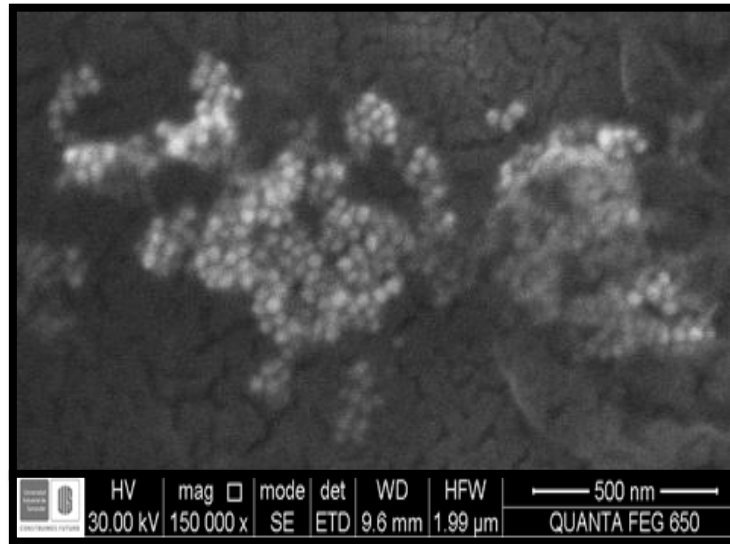


Los análisis por DLS y SEM confirmaron la formación de partículas monodispersas con un tamaño hidrodinámico de  $15,41 \pm 0.083$  nm (100%) y de morfología esférica (Figuras 10 y 11).

**Figura 10.** Distribución de tamaño y potencial zeta de AuNPs (A) y (C) Distribución de tamaño de partícula promedio de AuNPs. (B) Potencial zeta de las AuNPs sintetizadas.



**Figura 11.** Imagen SEM de las AuNPs sintetizadas



El potencial zeta medido para estos sistemas fue de -40 mV, demostrando una alta estabilidad termodinámica debido a la carga negativa de gran magnitud alrededor de los coloides formados lo cual ejerce alta repulsión electrostática entre las nanopartículas y por tanto evita la agregación (Figura 10-B). Las AuNPs que se obtuvieron en este trabajo evidenciaron un pH 5.0 y teniendo en cuenta que el citrato de sodio es un ácido triprótico que posee tres pKa (pKa<sub>1</sub>: 3.28, pKa<sub>2</sub>: 4.76, pKa<sub>3</sub>: 6.4), se espera que las AuNPs adsorban la especie citrato di-aniónico, ejerciéndose por consiguiente una repulsión electrostática suficiente para mantener la dispersión estable (Viudez, 2011). Desde el punto de vista cinético la velocidad de agregación de estas nanopartículas obtenidas es muy baja ya que las fuerzas de repulsión electrostáticas que deben vencer para acercarse y agregarse son muy altas y están comprendidas entre  $\zeta < -30$  mV o  $\zeta > +30$  mV (Guerrero, 2008; Rodríguez, 2007).

## 4.2 FUNCIONALIZACIÓN

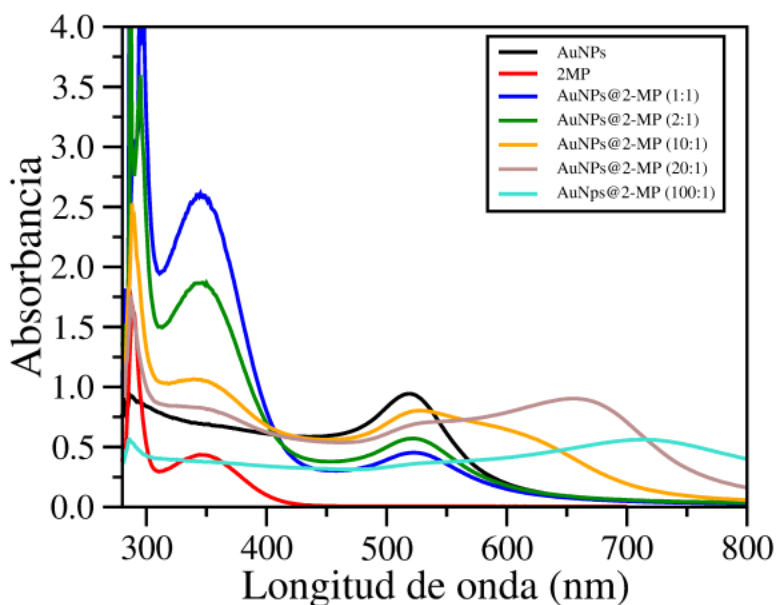
El proceso de conjugación de las AuNPs a las pirimidinas sustituidas está influenciado por diferentes variables con las cuales se obtienen sistemas funcionalizados lo suficientemente estables (frente a procesos de agregación – precipitación) entre estas variables: i) efecto de la relación volumétrica AuNPs a pirimidina; ii) tiempo de interacción AuNPs@Pirimidinas en el ultrasonido; iii) efecto de la concentración; iv) efecto del pH. A continuación se presentan los resultados obtenidos del estudio de cada una de ellas en la funcionalización de la AuNPs con la 2MP; las mejores condiciones para este proceso de funcionalización fueron adoptadas para posteriormente conjugar las AuNPs a la 4,6-D-2MP.

### 4.2.1 Análisis del estudio del efecto de la relación volumétrica

En la Figura 12 se presentan los espectros UV-Vis correspondientes a la funcionalización de AuNPs con 2MP a una concentración de 2.07 mM empleando diferentes relaciones volumétricas AuNPs a 2MP, esta concentración se fijó ya que es a la máxima en la que es soluble la molécula en agua . Se observó para todos los casos los picos máximos de absorción alrededor de 279 nm y 347 nm para las transiciones electrónicas que tienen lugar en las moléculas 2MP; mientras que para el rango espectral comprendido entre 500 nm y 750 nm se observaron cambios significativos, como ensanchamiento y corrimiento de las bandas, a medida que aumentaba la relación volumétrica AuNPs a 2MP como se evidencia en los espectros de la Figura 12. Comparando el espectro UV-Vis de las AuNPs con los diferentes casos de funcionalización se identificaron las siguientes características: i) para las relaciones volumétricas 1:1 y 2:1 se observó un corrimiento de 1 nm hacia el rojo con disminución de sus respectivas absorbancia en dichos corrimientos, comparados con las AuNPs (ver Tabla 2). ii) para las relaciones volumétricas 10:1

y 20:1 se observó un corrimiento hacia el rojo de 9 nm de la banda máxima de resonancia de plasmónes (SPR) con disminución de sus respectivas absorbancias así como también la aparición de una segunda banda a 603 nm para la relación 10:1 y 655 nm para la relación 20:1 (ver Tabla 2). iii) para la relación volumétrica 100:1 se observó una sola banda del SPR a 714 nm (ver Tabla 2).

**Figura 12.** Espectros UV-Vis del análisis del efecto de la relación volumétrica en la funcionalización AuNPs@ 2MP.



Con base en lo anterior, la interacción de moléculas de 2MP con nanopartículas de oro da lugar a dos procesos altamente dinámicos. El primero de ellos en el cual ocurre la funcionalización de las AuNPs con la 2MP que puede ser observado por un ligero corrimiento de la banda de resonancia plasmónica de las AuNPs. Esta situación se observó en todos los casos; siendo más significativa el proceso de funcionalización para las muestras con relación 10:1 y 20:1. El segundo, correspondiente a la agregación de nanopartículas de oro funcionalizadas con la 2MP como se observó para las relaciones volumétricas 10:1, 20:1 y 100:1. Este fenómeno ha sido ampliamente descrito en la literatura; en la cual se relaciona el

corrimiento hacia el rojo (aparición de una banda a partir de 600 nm) de la SPR con la formación de agregados (Rotello *et al.*, 2008; Viudez, 2011).

**Tabla 2.** Análisis UV-Vis del estudio de la relación volumétrica AuNPs a 2MP en la funcionalización AuNPs@2MP

Ensayo	$\lambda_1$ (nm)	Abs	$\lambda_2$ (nm)	Abs
<b>AuNps</b>	519	0.944	-	-
<b>AuNPs@ 2MP. Relación 1:1</b>	520	0.452	-	-
<b>AuNPs@ 2MP. Relación 2:1</b>	520	0.569	-	-
<b>AuNPs@ 2MP. Relación 10:1</b>	528	0.803	603	0.667
<b>AuNPs@ 2MP. Relación 20:1</b>	528	0.707	655	0.903
<b>AuNPs@ 2MP. Relación 100:1</b>	714	0.562	-	-

En la funcionalización se observó un cambio de coloración, después de un tiempo, al adicionar la 2MP fenómeno que se da debido al cambio en el ambiente químico de la nanopartícula (Figura 13). Esta propiedad es usada como indicativo para establecer ya sea un proceso de funcionalización o de agregación (Meenan *et al.*, 2011). El cambio de color inducido por agregación de NPs es usado para detectar si hubo o no interacción entre los distintos núcleos de funcionalización. Es decir, observando la diferencia de colores entre las AuNPs dispersas (rojo) y las agregadas (azul púrpura o azul); generando un desplazamiento hacia el rojo en la región visible del espectro electromagnético (Zhao *et al.*, 2010).

Los resultados para las distintas relaciones volumétricas, mencionadas anteriormente, se presentan en la Figura 13. Como se puede observar, para las relaciones volumétricas 1:1 y 2:1 no hubo cambios significativos de color pero si un ligero corrimiento (de aprox. 1 nm) en la banda de resonancia plasmónica y que corresponden a un proceso de funcionalización (ver Tabla 2); mientras que para las relaciones volumétricas 10:1, 20:1 y 100:1 los cambios de coloración fueron evidentes (desde una coloración roja para las AuNPs antes de funcionalizar hasta una coloración azul luego de funcionalizar) y se correlaciona con la aparición de una banda de resonancia plasmónica, a partir de los 603 nm, 655 nm y 714 nm respectivamente (ver Tabla 2), correspondiente a un proceso de agregación como se mencionó anteriormente. El aumento de la proporción de AuNPs sobre el medio de funcionalización incrementa la cantidad de AuNPs posibilitando la saturación de la superficie de estas (Meenan *et al.*, 2011).

El análisis por DLS y las mediciones de potencial zeta para los ensayos cuyas muestras son adecuadas para su medición (20:1 y 10:1), es decir sin formación de aglomerados visibles, estos últimos incluidos en la sección de anexos A Y B respectivamente. Los resultados del tamaño de partícula promedio evidenciaron un aumento del diámetro hidrodinámico de  $56.49 \pm 0.27$  nm para el ensayo con relación volumétrica 20:1, comparado con las AuNPs de referencia, resultado que podría indicar la adhesión de la 2MP sobre la superficie de las AuNPs; lo cual coincide con lo reportado por otros autores (Meenan *et al.*, 2011). Por el contrario, para el ensayo con relación volumétrica 10:1 su índice de polidispersión (PDI) es 0.715 con un diámetro hidrodinámico de 1.641 nm indicando una disminución en su tamaño (anexo B). Para un PDI > 0.5, la muestra es considerada polidispersa compuesta por partículas de varios tamaños y con agregados visibles (Malvern, 2004). Por lo anterior el resultado obtenido conduce a mediciones poco confiables

que seguramente se dan por la polidispersión presente en la muestra ya que la presencia de partículas más grandes interfiere con la señal de dispersión de la luz.

**Figura 13.** Fotografías del cambio de coloración para la funcionalización de AuNPs con 2 MP a diferentes relaciones volumétricas.

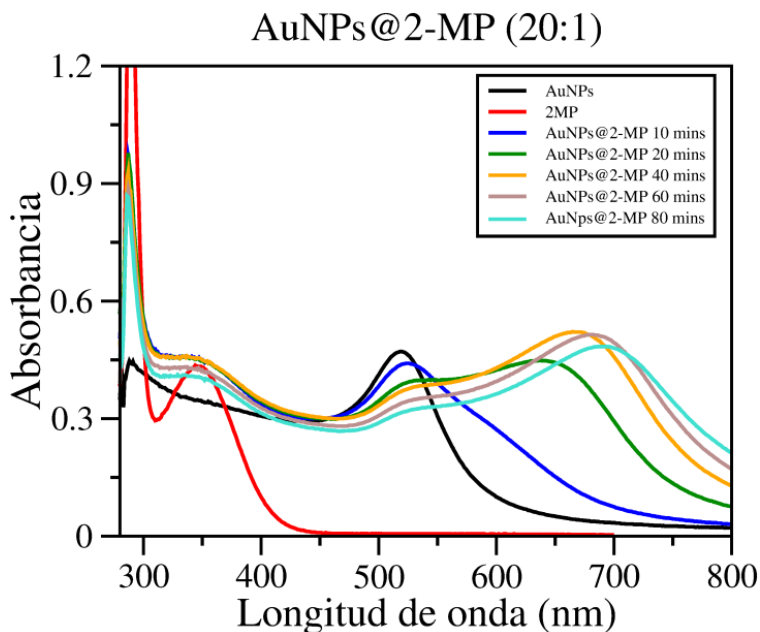


De acuerdo con el análisis realizado a los espectros UV-Vis y a los resultados del DLS se escogió la relación volumétrica 20:1, ya que se lograron resultados más confiables y acordes con una interacción AuNPs@2MP.

#### **4.2.2 Análisis UV-Vis de tiempo de interacción AuNPs@ 2MP en el ultrasonido.**

La relación volumétrica 20:1 fue usada para realizar el estudio del tiempo de sonicación para la funcionalización de AuNPs con 2MP. Esto se llevó a cabo con el objetivo de obtener sistemas más estables en términos de la formación de agregados que no se precipiten; los cuales no son adecuados para ser utilizados en las pruebas de actividad biológica. Teniendo en cuenta lo anterior, se procedió a funcionalizar las AuNPs usando ultrasonido durante un periodo total de 80 minutos. Para monitorear la evolución de la funcionalización AuNPs@2MP, se tomaron muestras del sistema de reacción a los 10 minutos, 20 minutos, 40 minutos, 60 minutos y 80 minutos y se obtuvieron los correspondientes espectros UV-Vis. Los resultados se presentan en la Figura 14.

**Figura 14.** Espectros UV-Vis del análisis del efecto del tiempo de funcionalización en el ultrasonido del sistema.



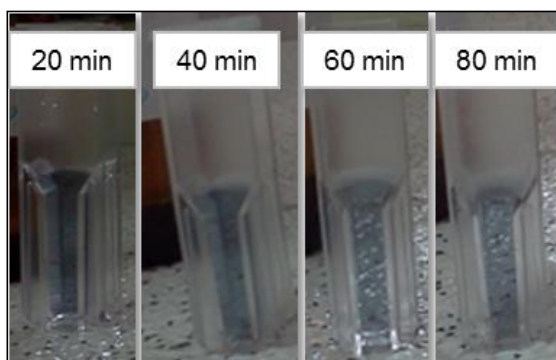
Como se puede observar en la Figura 14, los resultados obtenidos de la funcionalización de AuNPs con 2MP (AuNPs@2MP), transcurrido los primeros 10 minutos se evidenció un ligero corrimiento de la SPR y ensanchamiento de esta como producto de la agregación causada por la conjugación de la 2MP a los núcleos AuNPs (Blakey *et al.*, 2013)

El efecto más notorio en el estudio de tiempo de funcionalización fue a los 20 minutos de adicionada la 2MP como se observa en la Figura 14 a partir de este tiempo se observan dos bandas de resonancia plasmónica. La primera con un corrimiento hacia el rojo, a medida que aumentaba el tiempo de exposición de las muestras en ultrasonido. La segunda banda de resonancia aparece a partir de los 650 nm aproximadamente y progresivamente se desplaza hacia el rojo en el espectro UV-Vis a medida que aumenta el tiempo de sonicación; indicando que adicionalmente ocurría la agregación de los núcleos AuNPs@2MP.

En adición, la Figura 15 muestra los registros fotográficos de los cambios de coloración para los distintos tiempos de sonicación. Claramente se puede observar que a los 20 minutos las muestras presentaron una coloración azul confirmando lo anteriormente descrito. Estos resultados sugieren que un mayor tiempo de sonicación aumenta la velocidad de asociación de núcleos AuNPs@2MP y finalmente la precipitación; como se refleja en la segunda banda de resonancia plasmónica de los espectros UV-Vis de la Figura 14.

Con base en estos resultados, se escogió 20 minutos de sonicación para la funcionalización de AuNPs con 2MP; ya que para este periodo de tiempo en el ultrasonido se obtuvieron mejores resultados en cuanto a la formación de AuNPs@2MP vs agregación-precipitación de AuNPs@2MP.

**Figura 15.** Estudio del tiempo en la funcionalización de AuNPs con 2MP a una relación volumétrica 20:1.



#### 4.2.3 Análisis UV-Vis y DLS del Análisis del efecto de la concentración

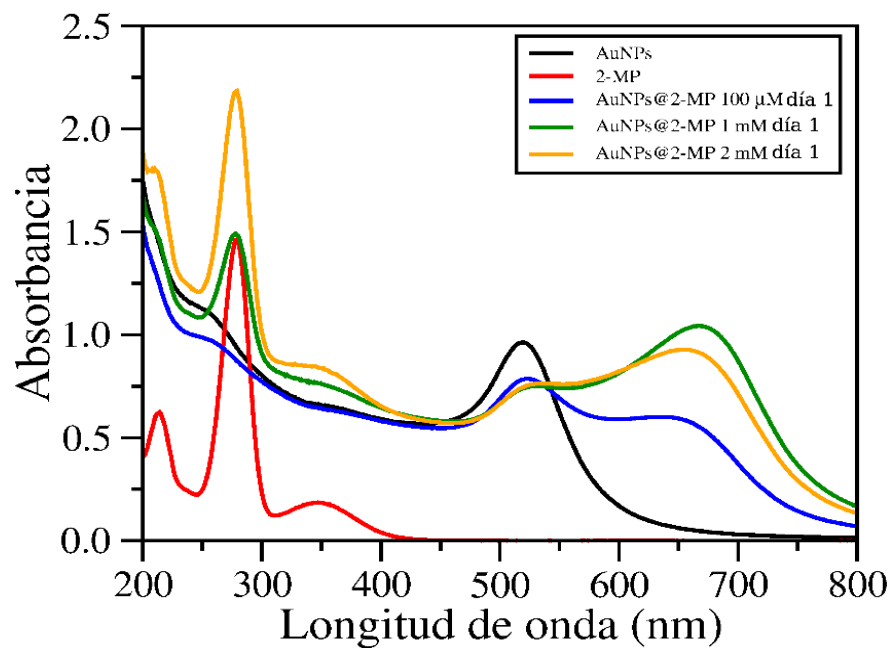
Este estudio consistió en establecer el efecto de la concentración de la 2MP o la 4,6-D-2MP tanto en la formación de AuNPs@2MP o AuNPs@4,6-D-2MP como en su estabilidad y verificar que la concentración previamente usada (aproximadamente 2mM, de acuerdo a la solubilidad en agua de la 2MP) es la más adecuada para los estudios de estabilización.

Las concentraciones evaluadas fueron 100  $\mu$ M, 1 mM y 2.07 mM para la 2MP; mientras que para la 4,6-D-2MP se usaron las concentraciones 100  $\mu$ M, 1 mM y

2.11 mM. Todos Los ensayos se llevaron a cabo con una relación volumétrica 20:1 y un tiempo en el ultrasonido de 20 min de acuerdo con lo mencionado en el apartado 4.2.1 y 4.2.2. Los espectros UV-Vis se obtuvieron al primer y segundo día de la funcionalización.

En la Figura 16 se muestran los espectros UV-Vis del primer día y en anexo C los del segundo día de funcionalización para el sistema AuNPs@2MP.

**Figura 16.** Espectros UV-Vis del análisis del efecto de la concentración en la funcionalización AuNPs@ 2MP.



En la Figura 16 se evidencia un corrimiento hacia el rojo de la banda desde (desde 519 nm hasta 525 nm, comparadas con la banda de resonancia plasmónica de las AuNPs) para las concentraciones 2 mM y 1mM. Adicionalmente se observó la aparición de segundo hombro hacia longitudes de onda que van hasta los 662 nm; y hacia más de 700 para la concentración 100 μM correspondiente a la agregación de núcleos AuNPs@2MP.

Fijando las condiciones anteriores y considerando que las pirimidinas tienen propiedades estructurales y químicas semejantes, tales como su baja solubilidad en agua, se tomaron las condiciones establecidas con la 2MP para funcionalizar las AuNPs con la 4,6-D-2MP. Para este caso los espectros UV-Vis se consignan en el anexo D. Claramente se puede observar que para las distintas concentraciones de 4,6-D-2MP, empleando la relación volumétrica 20:1 con el uso de ultrasonido durante 20 minutos (anexo D, figura A), contempló una significativa disminución de la absorbancia de la SPR de la funcionalización. Como consecuencia de esto, se realizó un procedimiento similar sin el uso de ultrasonido. Sin embargo, no se obtuvieron mejores resultados (anexo D, figura B). Esto sugiere que las condiciones empleadas para este caso, si bien no son completamente adecuadas para obtener sistemas AuNPs@4,6-D-2MP los suficientemente estables, el uso del ultrasonido permite obtener sistemas funcionalizados con menores fenómenos de precipitación

En la Figura 17 se presentan los registros fotográficos de los cambios de coloración obtenidos luego de la funcionalización para el sistema AuNPs@2MP; así como también para el sistema AuNPs@4,6-D-2MP. Cabe resaltar que el pH final de los sistemas estuvo entre 5-6, teniendo en cuenta que las AuNPs solas están en pH 5.0. Estos resultados están bien correlacionados con los mostrados en la Figura 16.

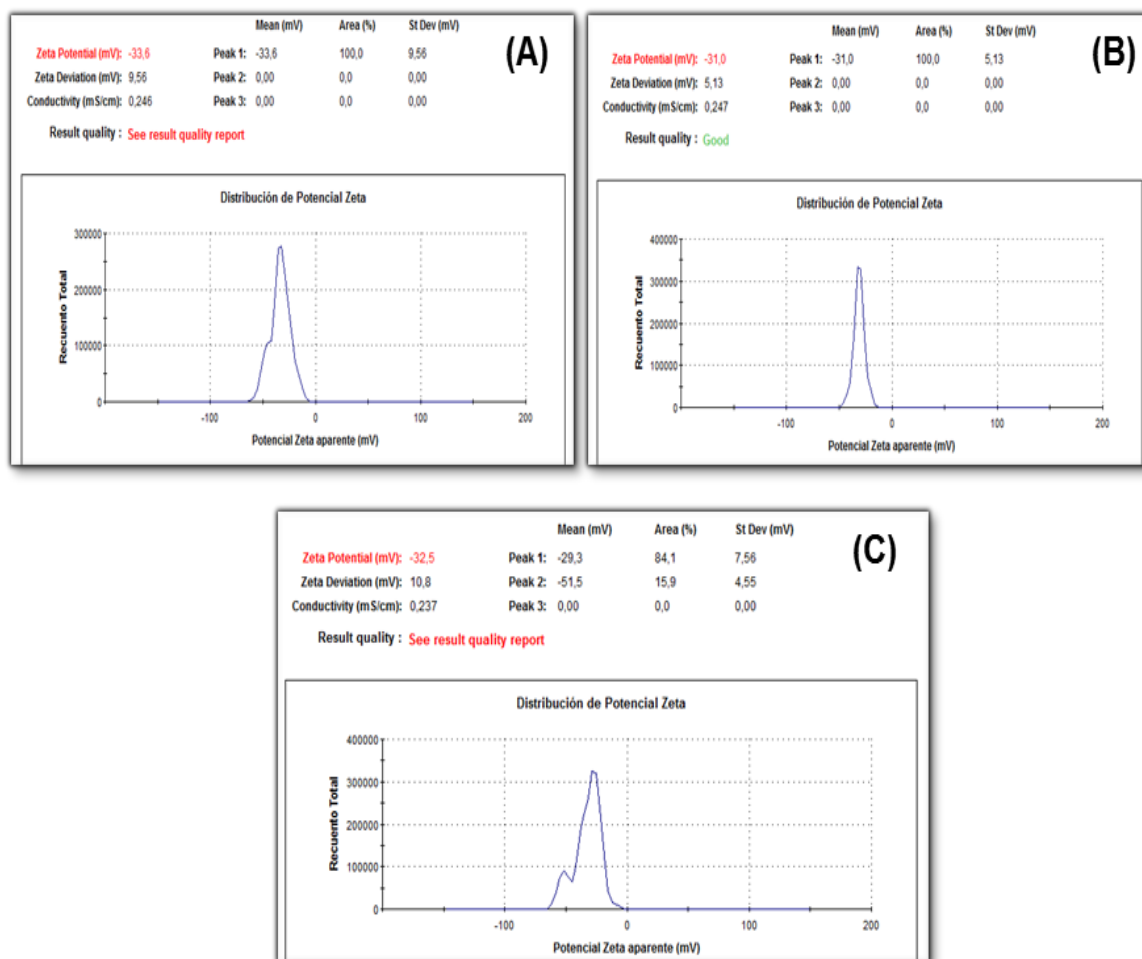
**Figura 17.** Fotografías del cambio de coloración para las AuNPs funcionalizadas con 2 MP y 4,6-D-2MP



El desplazamiento y ensanchamiento de la primera banda SPR, en la Figura 16 posiblemente se debe por la interacción entre el grupo tiol de la 2MP y la superficie de las AuNPs ya se mediante un proceso de adsorción, por desplazamiento del grupo citrato presente en la superficie lo que genera un cambio de la carga global o

ambiente dieléctrico de estas (Amendola, 2008). Lo cual se verificó por mediciones del potencial zeta para los tres casos (ver Figura 18).

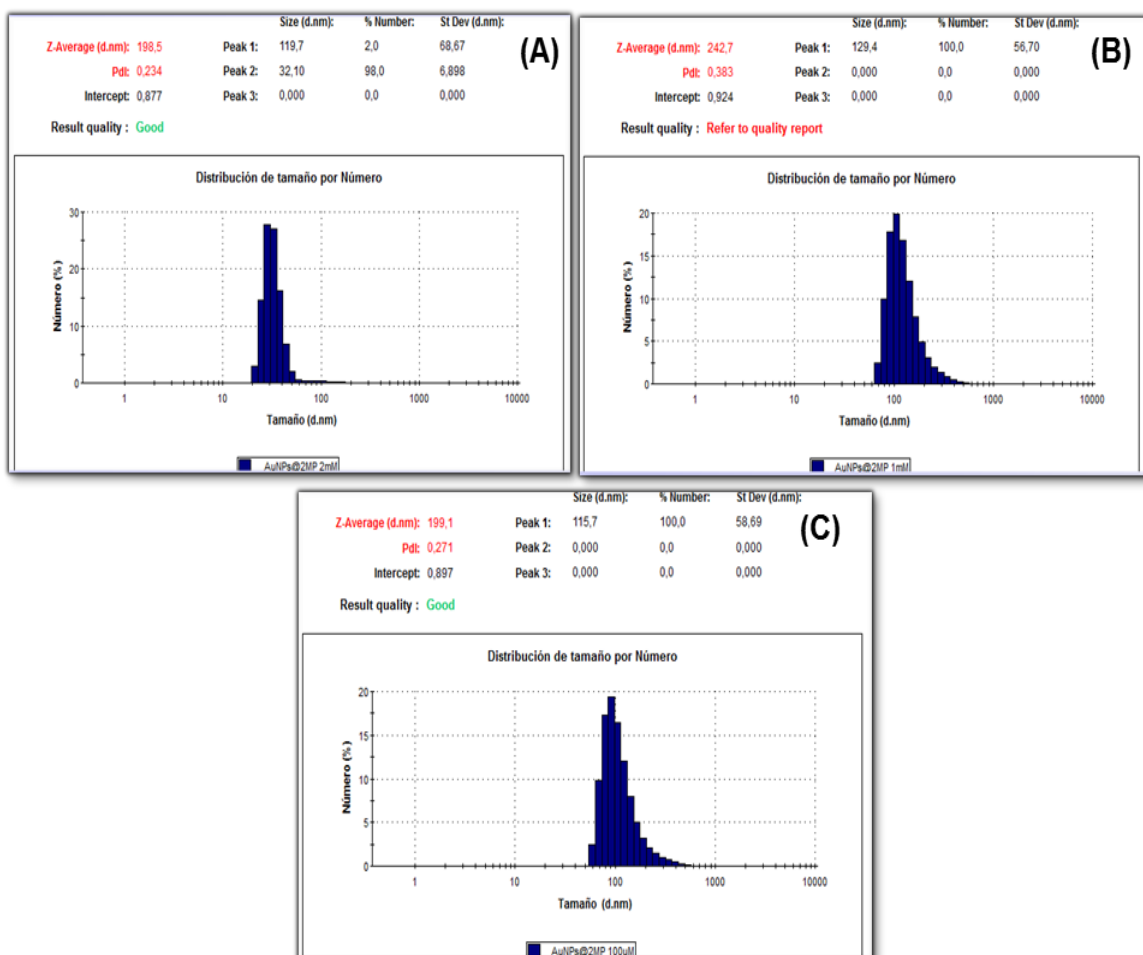
**Figura 18.** Potencial zeta para las concentraciones de 2MP usadas en la funcionalización de AuNPs **(A)** 2mM **(B)** 1mM **(C)** 100  $\mu$ M.



El control cinético en el tamaño de partícula se forma entre el crecimiento de los núcleos de oro y la formación de una monocapa de tiol, fenómeno que da lugar a la formación de un amplio rango de tamaños. Esto se observa en los DLS obtenidos para la funcionalización con la 2MP, ver Figura 19. La obtención de los DLS y

potencial zeta para la funcionalización con 4,6-D-2MP no se llevó a cabo satisfactoriamente ya que las muestras presentaron precipitación.

**Figura 19.** Distribución de tamaño de partícula promedio para las concentraciones de 2MP usadas en la funcionalización de AuNPs **(A)** 2mM **(B)** 1mM **(C)** 100µM.

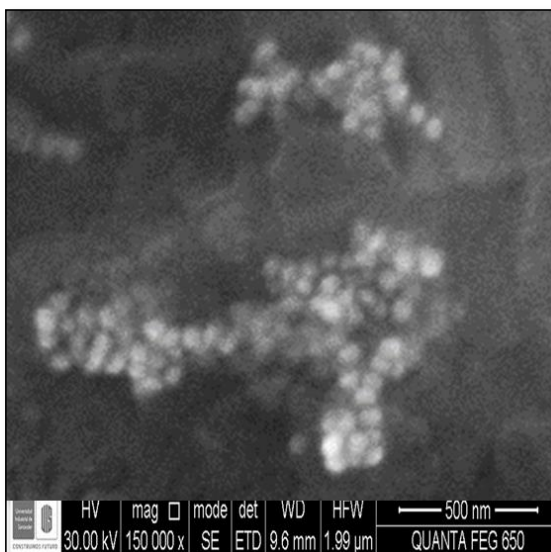


Los análisis realizados sugieren que el agente de funcionalización, en este caso la 2MP y la 4,6-D-2MP, puede cambiar significativamente las propiedades opto-electrónicas de las nanopartículas. Esto debido a la formación de un enlace Au-S (Ralston et al., 2007; Zhao *et al.*, 2010). Sin embargo, los cambios en el espectro

de absorbancia como el ensanchamiento de la banda de SPR y su disminución también pueden estar relacionados con el cambio en su morfología, tamaño y ambiente químico más no solo por la adsorción de sustratos, en este caso las pirimidinas (Amendola, 2008).

El análisis de los espectros UV-Vis permitió establecer y verificar que la concentración de 2.07 mM para la 2MP es la más adecuada para el proceso de funcionalización (esta concentración se usó en previos estudios ya que es la máxima que se logró obtener usando agua como solvente) debido a que se observa un menor corrimiento batocrómico indicando la disminución del tamaño de partícula coherente con los resultados del DLS. Para la funcionalización con 4,6-D-2MP se escogió 2.11 mM, porque presentaba el mismo comportamiento. Adicionalmente se realizaron los análisis correspondientes para el sistema AuNPs@2MP por la técnica SEM. Las micrografías SEM, ilustran la presencia de nanopartículas de morfología esféricas (ver Figura 20).

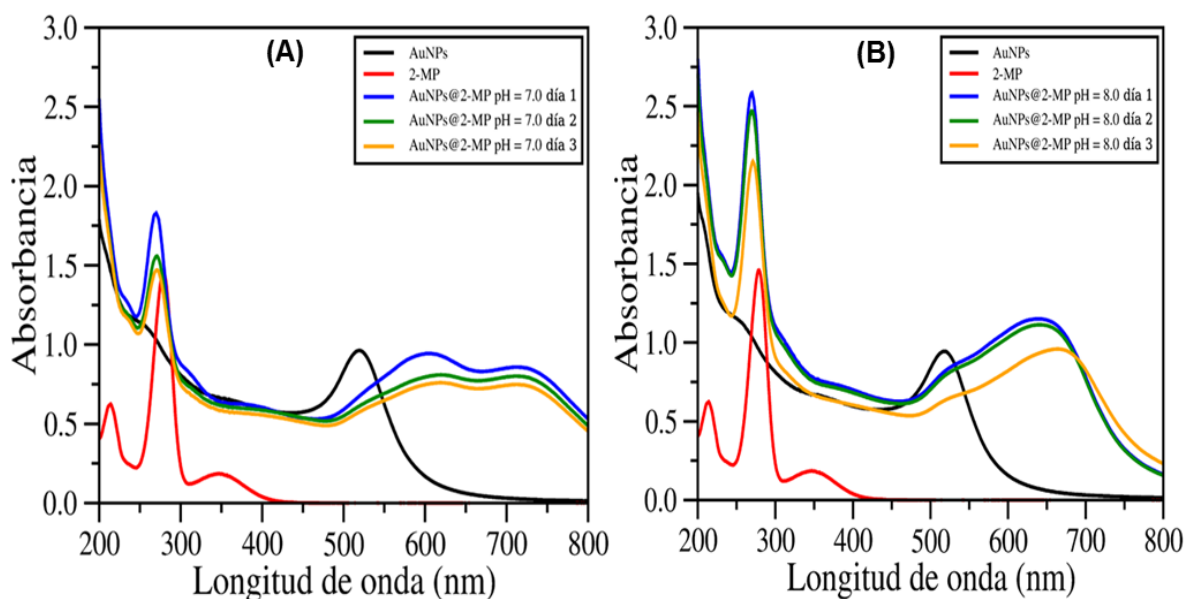
**Figura 20.** Imagen SEM del sistema AuNPs@2MP



#### 4.2.4 Estudio del efecto del pH en la funcionalización AuNPs@2MP

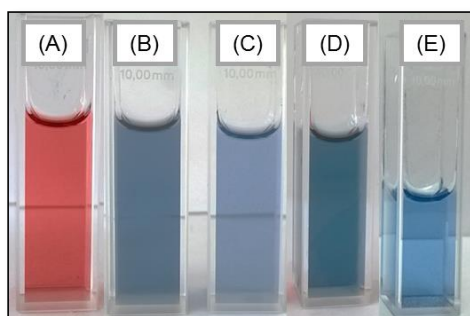
A continuación se describe el estudio de la influencia del pH sobre la estabilidad de las AuNPs@2MP por análisis de UV-Vis y DLS. La funcionalización de AuNPs con 2MP y 4,6-D-2MP se llevó a cabo bajo las condiciones de concentración de pirimidina, relación volumétrica y tiempo de funcionalización obtenidas en los ensayos previos. El valor de pH de los productos AuNPs@2MP y AuNPs@4,6-D-2MP estuvo en un rango de 5-6. El pH fue ajustado con soluciones acuosas de NaOH 0.1 M y HCl 0.1 M hasta obtener productos AuNPs@2MP y AuNPs@4,6-D-2MP de pH 7.0 y pH 8.0, los espectros son agrupados en la Figura 21 y 24.

**Figura 21.** Espectros UV-Vis de AuNPs@2MP. **(A)** AuNPs@2MP pH 7.0 **(B)** AuNPs @ 2MP pH 8.0.



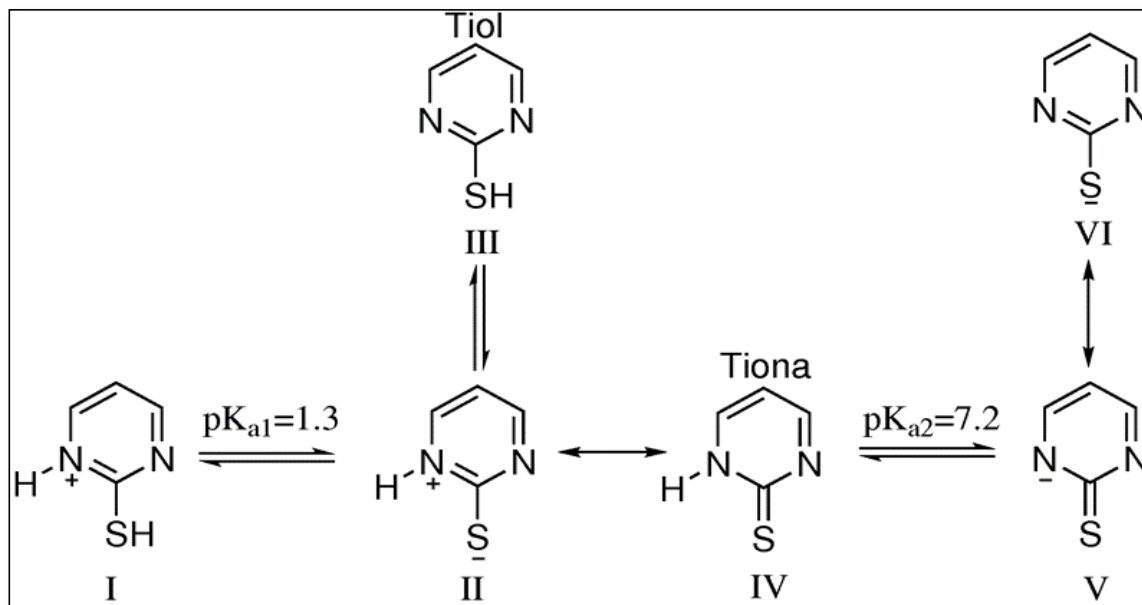
En la Figura 22 se muestra el registro fotográfico de la coloración obtenida para las distintas muestras usadas, para llevar a cabo la funcionalización AuNPs@2MP y AuNPs@4,6-D-2MP; y a valores de pH 7.0 y 8.0.

**Figura 22.** Estudio del pH en los sistemas AuNPs@2 MP y 4,6-D-2MP **(A)** AuNPs **(B)** AuNPs@2MP a pH 7.0 **(C)** AuNPs@4,6-D-2MP a pH 7.0 **(D)** AuNPs@2MP a pH 8.0 **(E)** AuNPs@4,6-D-2MP a pH 8.0



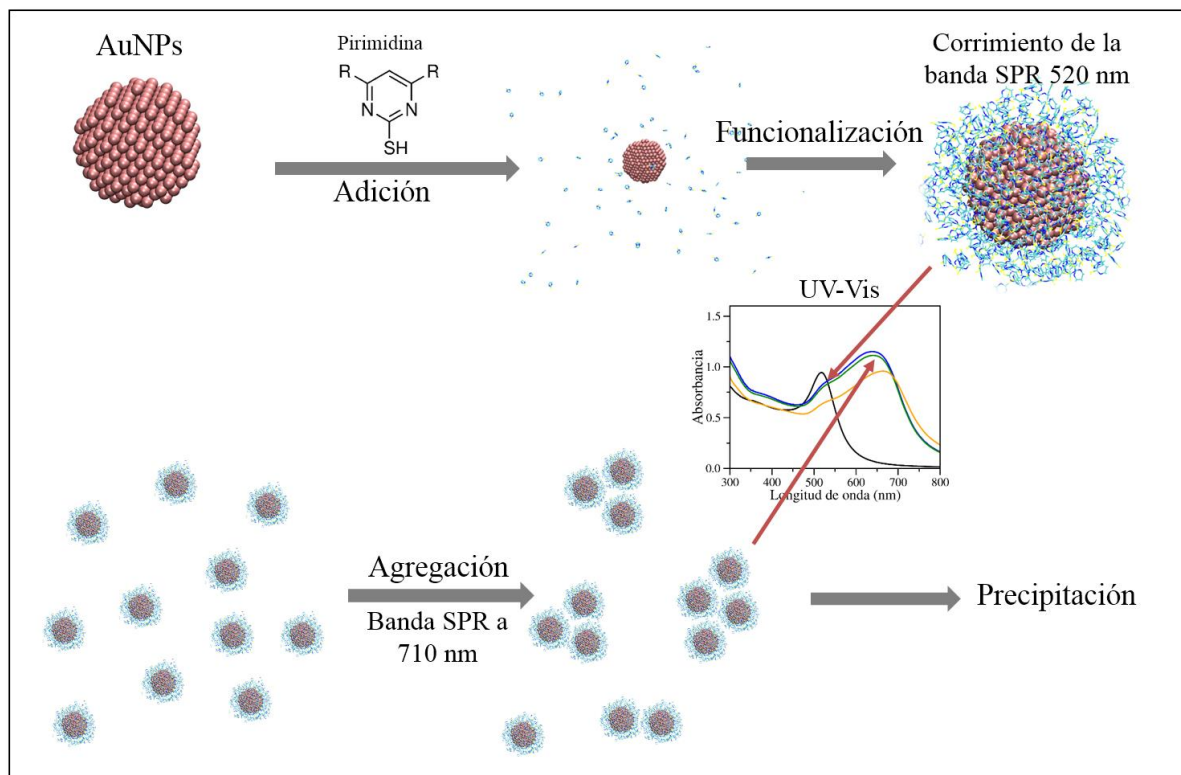
Para el caso de la funcionalización de las AuNPs con la 2MP, cabe resaltar que los valores de pH estudiados están alrededor del segundo pKa de la 2MP ( $pK_a = 7.14$ ). En la Figura 23 se presentan las estructuras tautoméricas iónicas que varían en función del pH para la 2MP. En la forma neutra de la 2MP (forma III) el hidrógeno del tiol puede migrar hacia cualquiera de los nitrógenos presentes en el anillo pirimidínico obteniéndose la forma tiona (forma IV). Estudios experimentales y teóricos han demostrado que bajo condiciones de pH menores al  $pK_{a2}$  y medio acuoso predomina la forma tiona (Fierro et al., 2003; Pang et al., 1998).

**Figura 23.** Comportamiento iónico de la 2MP en función del pH.



Con base en lo anterior y teniendo en cuenta los resultados mostrados en la Figura 21, se puede observar que la obtención de los sistemas AuNPs@2MP a pH 7.0 mostraron tanto procesos de funcionalización como de agregación. Ya se ha mencionado previamente que el desplazamiento al rojo de la banda SPR y su ensanchamiento puede deberse a fenómenos de agregación y/o funcionalización. Se evidencia un desplazamiento y ensanchamiento significativo de la banda SPR (comparado con la banda SPR de las AuNPs a 520 nm) dando lugar a un proceso de funcionalización; mientras que para el caso de agregación, la banda de resonancia plasmónica aparece como un hombro a 725 nm aproximadamente. Adicionalmente se observó la precipitación de los agregados en el primer día de control. Aunque la 2MP se funcionalizó de manera efectiva con AuNPs, la rápida precipitación posiblemente se debe a las características electrónicas de la 2MP durante su funcionalización con AuNPs y posterior agregación de núcleos AuNPs@2MP (Figura 24).

**Figura 24** Descripción general de los procesos de funcionalización, agregación y precipitación de sistemas AuNPs@2MP



A un valor de pH 8.0 también se observó corrimiento de la SPR como también la etapa de agregación de núcleos AuNPs@2MP y cuya SPR fue más satisfactoria en comparación con lo obtenido a pH 7.0, con bandas menos anchas y más definidas y sin formación de agregados-precipitados visibles en el primer día, para este caso solo se observó a partir del segundo día. Es decir, la funcionalización AuNPs@2MP presentó una menor velocidad de agregación – precipitación; comparados con el caso de pH 7.0. Por consiguiente, se obtiene un sistema más estable a pH por encima del  $PKa_2$  con distribución de tamaño menor ( $52.01 \pm 0.28$ ) y potencial zeta más estable,  $-45.7$  mV, que a pH 7.0 ( $239.2 \pm 0.36$ ,  $-21$  mV) ver anexos E y F.

Una posible explicación que justifique la razón por la cual la funcionalización AuNPs@2MP a pH 8.0 presentó una mayor estabilidad frente a coagulación, puede

ser propuesta a partir de la manera como la 2MP interacciona con la superficie de las AuNPs ( Figura 24 ) ; así como también de las formas tautoméricas y del estado de protonación de la 2MP. Para el primer caso, si bien no se llevó a cabo un estudio detallado en la manera como la 2MP interacciona con la superficie de las AuNPs, diversos autores han empleado espectroscopia RAMAN para establecer la naturaleza de la interacción entre AuNPs y ligandos que contienen azufre en forma de tiol en combinación con nitrógenos sobre el anillo aromático (Pang et al., 1998). La mayoría de los autores han demostrado que para este tipo de moléculas, la funcionalización con AuNPs ocurre mediante la interacción entre estos átomos (S-Au y N-Au) con la superficie metálica (ligando bidentado coordinando a través del sulfuro y los átomos de nitrógeno presentes en el anillo aromático). La fuerza con la que ocurre dicha interacción S-Au N-Au depende de la distribución de la densidad electrónica sobre estos átomos. Es posible que este fenómeno ocurra de igual manera para el caso AuNPs@2MP. Sin embargo se requieren estudios rigurosos con espectroscopía RAMAN para confirmar el tipo de interacciones que tienen lugar.

Comparando los resultados obtenidos con los distintos valores de pH y teniendo en cuenta la manera en como ocurre la interacción entre la AuNPs@2MP las estructuras de equilibrio y resonancia mostradas en la Figura 23, se puede establecer varios aspectos importantes:

1. Para la funcionalización a pH 7.0 indica que la 2MP se encuentra mayoritariamente en forma neutra (carga total igual a cero); siendo la forma tiona la predominante. En este punto si observamos la tiona (IV), puede generar una estructura de resonancia (II) localizando una carga parcialmente positiva sobre uno de los nitrógenos del anillo aromático y una carga parcialmente negativa sobre el átomo de azufre. Además, el protón del grupo -SH se encuentra enlazado al mismo nitrógeno que contiene la carga parcialmente positiva. Esto sugiere que la interacción entre el nitrógeno con la superficie metálica no es efectiva ya que el protón genera tanto

impedimento estérico como repulsión electrostática. Esto último si consideramos que la superficie metálica contiene una carga parcialmente positiva. Otro factor como consecuencia de lo anterior, es que la densidad electrónica del átomo de azufre en la forma protonada (neutra) y en forma de tiol es menor comparada con la forma aniónica (desprotonada, VI). La combinación de todos los factores mencionados en este caso promovieron la rápida agregación y precipitación.

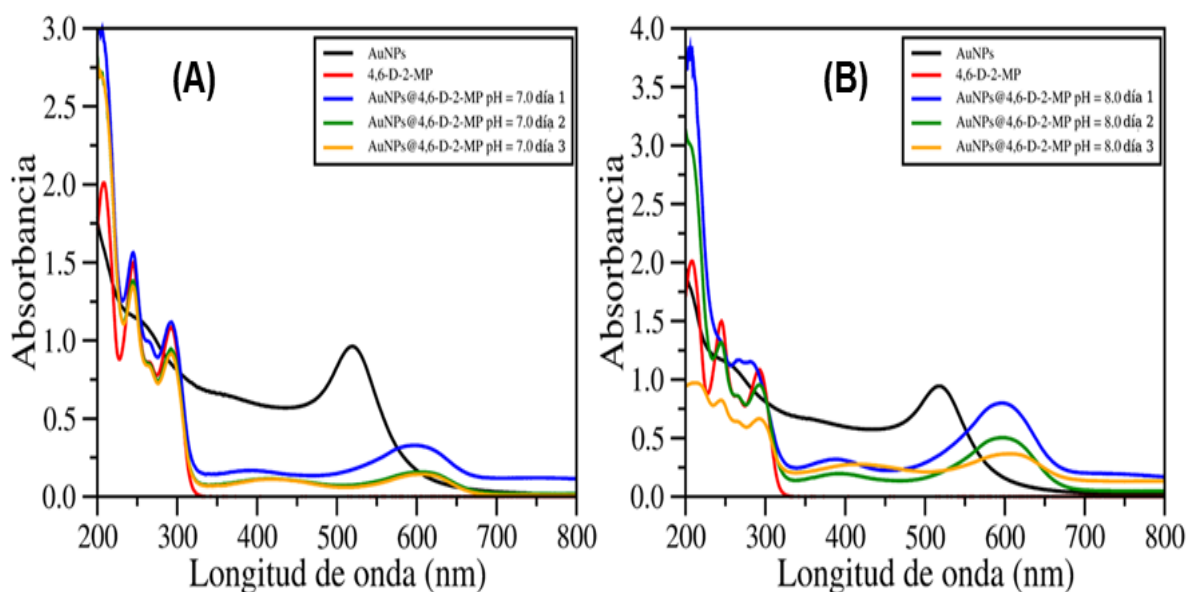
2. Para la funcionalización a pH 8.0, la 2MP se encuentra mayoritariamente en forma aniónica (ver Figura 23); generando las estructuras iónicas (V) y (VI); siendo la ultima la responsable de generar una alta interacción con la superficie de las AuNPs ya que el átomo de azufre posee una mayor densidad electrónica (comparada con la forma neutra). Adicionalmente, la interacción N-Au es favorecida ya que no hay un impediendo estérico por parte del protón que se encontraba en la tiona (IV). Como consecuencia, la coordinación bidentada entre la 2MP y las AuNPs permitieron obtener núcleos AuNPs@2MP mucho más estables frente a procesos de coagulación.

La estabilización del sistema a pH 8.0 fue de vital importancia para el empleo de los núcleos de AuNPs@2MP para su posterior evaluación de la actividad biológica, ya que para este ensayo es necesario obtener sistemas estables, monodispersos y pequeños, si formación de aglomerados visibles lo que asegura que la membrana externa de la bacteria no actué como una barrera permeable excluyendo a las macromoléculas (Amin *et al.*, 2009).

#### 4.2.5 Estudio del efecto del pH en la funcionalización AuNPs@4,6-D-2MP

A continuación se describe el estudio de la influencia del pH sobre la estabilidad de las AuNPs@4,6-D-2MP por análisis de UV-Vis y DLS (Figura 25 y anexo G e H respectivamente).

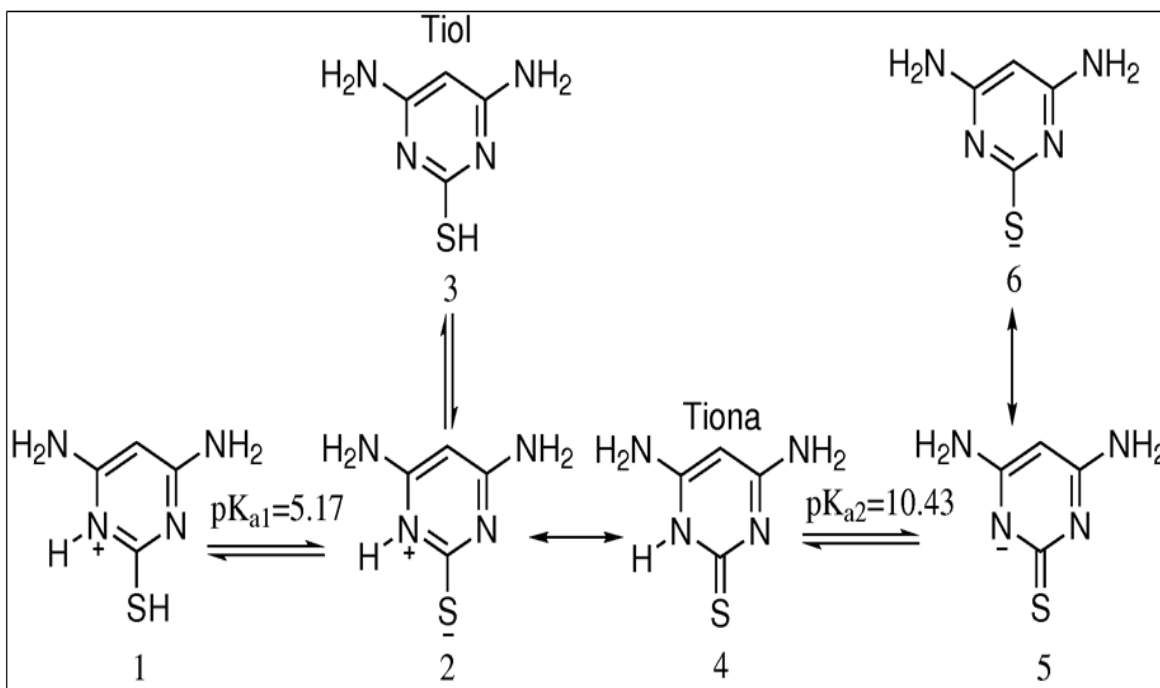
**Figura 25.** Estudio del pH en el sistema AuNPs@2 MP (A) AuNPs@4,6-D-2MP a pH 7.0 (B) AuNPs@4,6-D-2MP a pH 8.0.



Al igual que la funcionalización con la 2MP, este sistema presenta dos  $pK_a$ ,  $pK_{a1} = 5.17$  en el cual se desprotona un nitrógeno del anillo aromático dando lugar a la formación de la especie tautomérica tiona-tiol (ver Figura 26) siendo reportado como más estable el tautómero tiona (Fierro et al., 2003). El segundo  $pK_{a2} = 10.45$ , corresponde a la especie tiolato, que en este caso no es observada debido a que se trabajó en un rango 5-8, menor al  $pK_{a2}$ , puesto que puede afectar específicamente los blancos biológicos. Aun así, se obtienen sistemas más estables

a pH 8.0, aunque con formación de agregados, esto comparando la Figuras 25 (A) y (B) en las que se observa un menor desplazamiento de la SPR confrontado con el sistema a pH 7.0. Dando como resultado la disminución en la distribución de tamaño como se muestra en el análisis por DLS en los anexos G y H. A este pH aumentaría la presencia de especies cargadas adsorbidas en la interfase (carga, pirimidina adsorbida) incrementando la barrera energética de repulsión y por consiguiente favoreciendo la estabilidad del coloide.

**Figura 26.** Comportamiento iónico de la 4,6-D-2MP en función del pH



### **4.3 Evaluación de la actividad antimicrobiana de AuNPs, pirimidinas (2MP y 4,6-D-2MP) y de AuNPs@Pirimidinas.**

La actividad antimicrobiana de las AuNPs, de las pirimidinas sustituidas (2MP y 4,6-D-2MP) y de los sistemas nanoestructurados, AuNPs@Pirimidinas, fue evaluada empleando el método de microdilución en caldo usando un espectrofotómetro para microplacas ELISA, la densidad óptica fue registrada a 595 nm. Se utilizaron los sistemas más estables teniendo en cuenta las diferentes condiciones de reacción como relación volumétrica AuNPs a Pirimidina 20:1, la relación de la concentración 2.07 mM para la 2MP y 2.11 mM para la 4,6-D-2MP, tiempo en el ultrasonido de 20 minutos y pH 8.0 para ambos sistemas.

#### **4.3.1 Actividad antimicrobiana de las AuNPs**

La cinética de crecimiento se construyó por medición de la densidad óptica a 595 nm cada hora, durante 7 horas. El control negativo de crecimiento fue el caldo nutritivo en ausencia de bacteria, el control positivo fue la bacteria en ausencia de las AuNPs. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

En Anexo I, se muestra la cinética de crecimiento de la cepa *E. coli* O157:H7 en presencia de AuNPs, en la cual se evidencia que en presencia de las AuNPs a concentraciones superiores a 25  $\mu$ M y hasta 35  $\mu$ M se observa una disminución en el crecimiento de las bacterias en alrededor del 50 %, por tanto demuestra que las nanopartículas interrumpen en el crecimiento y duplicación de la célula bacteriana, sin embargo la concentración a la cual logran este efecto es significativamente alta comparada a la actividad que exhiben otros agentes como las nanopartículas de plata potencialmente bactericidas (Amin *et al.*, 2009).

La presencia de lipopolisacáridos sobre la membrana externa de la bacteria, incrementa la carga negativa de la membrana celular que la hace susceptible de interaccionar electrostáticamente con moléculas de carga opuesta. Es así como las AuNPs reducidas con citrato que tienen una carga negativa de gran magnitud (-40.7 mV) (Figura 10-B) interaccionan con la membrana exterior de las células bacterianas dando lugar a la repulsión de cargas y por tanto no logra unirse con la superficie de la bacteria disminuyendo la eficiencia antibiótica de las AuNPs (Stoimenov, 2002). Este comportamiento puede ser explicado por varios factores: i) la carga superficial de las nanopartículas de oro es altamente negativa, como se evidenció en el potencial zeta de la Figura 10, por tanto no interaccionan por repulsión electrostática con la membrana. ii.) Estabilidad de las AuNPs. En el sentido de que ocurre agregación con posterior precipitación cuando las NPs interaccionan con el medio en un periodo de tiempo prolongado. Ha sido reportado que exposiciones prolongadas de las AuNps, resulta en un incremento en la acidez debido a el desprendimiento de las moléculas de citrato de la superficie del oro y a la formación de ácido cítrico bajo reacción con el agua (Moodley, 2014). iv) Tamaño de Nanopartículas. La agregación da lugar a un aumento del tamaño de estas, esto evitaría la difusión de las NPs a través de la membrana. Siendo las nanopartículas de menor tamaño las que tienen mayor superficie disponible para la interacción con la superficie, lo que genera alteraciones en algunas funciones de la bacteria.

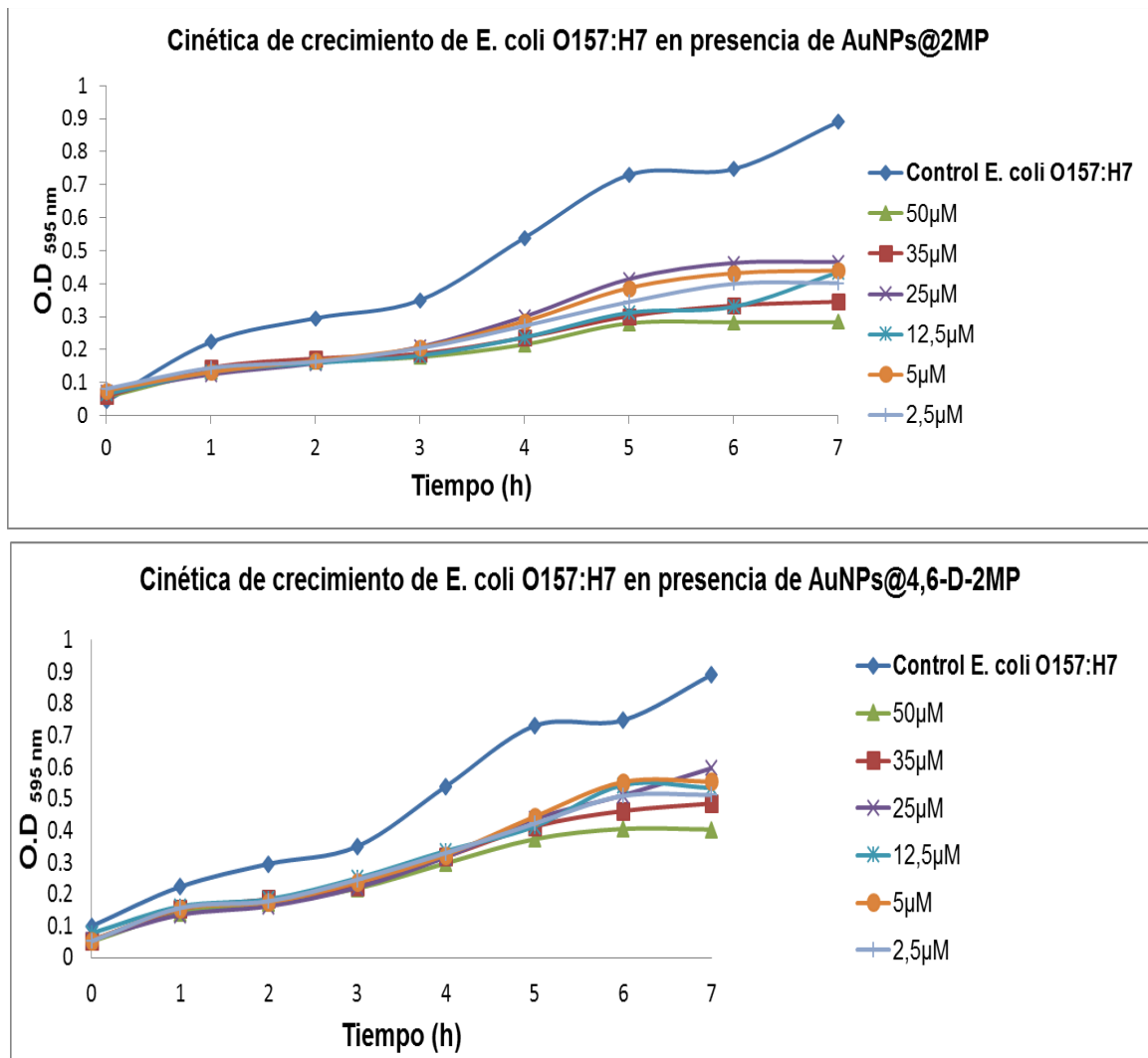
#### **4.3.2 Actividad antimicrobiana de la 2MP Y 4,6-D-2MP**

Se evaluó la cinética de crecimiento de la *E. coli* a diferentes concentraciones de 2MP y 4,6-D-2MP, ver anexo J y K, construida de la misma manera que la de AuNPs frente a *E.coli*. A partir de estas gráficas y de la Tabla 3, se observó que la 4,6-D-2MP exhibe mayor inhibición en el crecimiento de *E. coli* O157:H7 comparado con la respuesta de *E.coli* a la 2MP. La 4,6-D-2MP tiene una CMI<sub>60</sub> de 2.5 µM mientras que para la 2MP la CMI<sub>60</sub> es de aproximadamente 35 µM.

La 4,6-D-2MP es análoga a la 2MP, esta última existe en el tARN de la *E. coli*, por tanto este tipo de moléculas desestabilizan la membrana celular a través de la formación de enlaces con ácidos nucleicos y afectan la síntesis de proteínas a través de la inhibición de actividad de tARN (Zhao *et al.*, 2010).

### 4.3.3 Actividad antimicrobiana de los sistemas AuNPs@2MP Y AuNPs@4,6-D-2MP

**Figura 27.** Cinética de crecimiento de la *E.coli* O157:H7 en presencia de las AuNPs funcionalizadas con pirimidinas



A continuación en la Figura 27 se presenta la cinética de crecimiento de *E. coli* O157:H7 en presencia de los productos de conjugación AuNPs@2MP y AuNPs@4,6D-2MP.

De acuerdo con los resultados mostrados en la Figura 27 y la Tabla 3, se observó que el sistema AuNPs@4,6-D-2MP presentó una menor inhibición en el crecimiento de *E. coli* O157:H7 comparado con el sistema AuNPs@2MP. Un hecho considerable es que el conjugado AuNPs@2MP mostró un porcentaje de inhibición mayor a concentraciones menores (2.5  $\mu$ M, 62.09 % de inhibición) comparado con los resultados obtenidos para la molécula individual (2.5  $\mu$ M, 22.69% de inhibición). Además, se evidenció que con una concentración de 2.5  $\mu$ M se alcanza a inhibir más del 60% del crecimiento de la *E. coli* y a una concentración de 50  $\mu$ M más del 70%.

**Tabla 3.** Porcentaje de inhibición del agente antibacteriano frente a *E. coli* O157:H7.

Agente de inhibición	Concentración	% Inhibición
<b>AuNPs</b>	50 $\mu$ M	45.72 $\pm$ 0.1
	35 $\mu$ M	49.09 $\pm$ 0.2
	2.5 $\mu$ M	31.67 $\pm$ 0.1
<b>2MP</b>	50 $\mu$ M	64.40 $\pm$ 0.1
	35 $\mu$ M	65.84 $\pm$ 0.1
	2.5 $\mu$ M	22.69 $\pm$ 0.3
<b>4,6-D-2MP</b>	50 $\mu$ M	68.41 $\pm$ 0.2
	35 $\mu$ M	67.90 $\pm$ 0.1
	2.5 $\mu$ M	61.75 $\pm$ 0.2
<b>AuNPs@ 2MP</b>	50 $\mu$ M	73.17 $\pm$ 0.1
	35 $\mu$ M	66.18 $\pm$ 0.2
	2.5 $\mu$ M	62.09 $\pm$ 0.1
<b>AuNPs@4,6-D-2MP</b>	50 $\mu$ M	55.36 $\pm$ 0.2
	35 $\mu$ M	45.56 $\pm$ 0.1
	2.5 $\mu$ M	41.76 $\pm$ 0.1

Este tipo de sistemas nanoestructurados mejoran la biodisponibilidad de la pirimidina ya que la superficie de oro disponible da lugar al enlace con un gran número de moléculas pirimidínicas a través de enlaces débiles, tipo van der Waals (Moodley, 2014); permitiendo concentrar las moléculas de pirimidina sobre la superficie de la célula o las lleva a un sitio específico de la célula bacteriana. En este sentido las nanopartículas se comportan como vehículos de transporte efectivos. Se adhieren fuertemente a la membrana celular y en algunos casos logra penetrarla a través de rompimiento (por secuestro de iones calcio y magnesio), causando la fuga de contenido celular e internalizándose para ocasionar la inhibición de ADN y de la síntesis de proteínas (Moodley, 2014). Por tanto puede inferirse que las AuNPs son necesarias para aumentar el efecto de inhibición de la 2MP en el crecimiento de la bacteria.

En contraste, el sistema AuNPs@4,6-D-2MP disminuyó los porcentajes de inhibición hasta un 40% (2.5  $\mu$ M, 41.76% de inhibición) para las diferentes concentraciones comparado con los porcentajes de inhibición de la molécula evaluada individualmente (2.5  $\mu$ M, 61.75% de inhibición), ver Tabla 3. Este comportamiento puede estar relacionado con la inestabilidad de estas nanoestructuras dada cuando se pierde la afinidad del enlace AuNPs@4,6-D-2MP, formando precipitados en el medio e interfiriendo con los ensayos de inhibición del crecimiento de la bacteria.

## 5. CONCLUSIONES

La metodología de reducción química usando citrato de sodio como agente reductor, permitió obtener nanopartículas monodispersas con una distribución de tamaño de  $15.41 \pm 0.083$  nm. Los resultados obtenidos por espectroscopia UV-Vis, DLS, Potencial Zeta y SEM indicaron que las AuNPs son estables (en términos de agregación–precipitación) y su morfología mayoritariamente fue esférica.

La funcionalización de AuNPs con 2MP fue llevada a cabo satisfactoriamente, estableciendo como las mejores condiciones de reacción: relación volumétrica AuNPs a 2MP (20:1), concentración de 2MP igual a 2.07 mM, uso de ultrasonido durante 20 min y pH del medio igual a 8.0. Adicionalmente, estas condiciones también fueron empleadas para funcionalizar las AuNPs con 4,6-D-2MP.

El sistema AuNPs@2MP mostró una dependencia entre el pH del sistema y la estabilidad frente a precipitación. A pH alcalinos por encima de 7,2, se favorece las interacciones entre Au-S.

Las moléculas 2MP y 4,6-D-2MP tienen efecto inhibitorio sobre la cepa *E. coli* O157:H7 con una  $CMI_{60}$  de 35  $\mu$ M y 2.5  $\mu$ M respectivamente. El sistema AuNPs@2MP evidenció un mayor efecto antimicrobiano en la bacteria, con una aproximada  $CMI_{60}$  de 2.5  $\mu$ M en comparación con la 2MP libre.

La funcionalización de las AuNPs con la molécula 4,6-D-2MP a las AuNPs no mejoró su actividad antibiótica frente a la cepa *E. coli* O157:H7 respecto al efecto que tiene 4,6-D-2MP por sí sola.

## 6. RECOMENDACIONES

Estudiar el tipo de interacciones que tienen lugar en la funcionalización de los sistemas AuNPs@2MP y AuNPs@4,6-D-2MP mediante técnicas espectroscópicas tales como espectroscopia Raman, Difracción de rayos-X entre otras y así evaluar un posible efecto sinérgico. Adicionalmente, usar técnicas microscópicas como microscopía de transmisión electrónica en las células bacterianas tratadas para corroborar si existe daño a las células y de esta manera elucidar un posible mecanismo de acción.

Realizar un estudio teórico que permita predecir la estabilidad de los sistemas funcionalizados y así tener un conocimiento previo del comportamiento electrónico que tendría lugar en estos procesos.

Estudiar la posible actividad biológica de los sistemas funcionalizados AuNPs@2MP y AuNPs@4,6-D-2MP sobre otras cepas bacterianas y hongos.

Realizar estudios de toxicidad y citotoxicidad empleando líneas celulares de mamíferos para conocer sus efectos adversos, de tal modo que para estudios futuros puedan ser estudiadas como promisorios agentes terapéuticos.

## BIBLIOGRAFIA

AL-QADI, Sonia y REMUÑAN, Carmen. Nanopartículas metálicas: oro. Nanotecnología farmacéutica [on line]. Madrid, España: Real academia nacional de farmacia [citado el 20 de mayo de 2013]. Viable desde el sitio web: <<http://www.analesranf.com/index.php/mono/article/view/994>>.248 p.

AMENDOLA, Vincenzo. Synthesis of gold and silver nanoparticles for photonic applications. Tesis de doctorado. Italia: Universita' Degli Studi di Padova. Facultad de Ciencias. Departamento de Ciencias Químicas, 2008. 265 p.

AMIN, Rehab, *et al.* Rapid and sensitive microplate assay for screening the effect of silver and gold nanoparticles on bacteria. En: Nanomedicine. Agosto, 2009, vol.4, no.6, p. 637-643.

ARSHI, Nishat, *et al.*, Microwave assisted synthesis of gold nanoparticles and their antibacterial activity against *Escherichia coli* (E.coli). En: Current applied physics. Diciembre, 2010, vol.11, p.S360-S363.

ASTRUC, Didier y BOISSELIER, Elodie. Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity. En: Chem. Soc. Rev. Enero, 2009, vol. 38, no.6, p. 1759-1782.

ASTRUC, Didier y DANIEL, Marie-Christine. Gold nanoparticles: Assembly, supramolecular chemistry, Quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. En: Chemical reviews. Agosto, 2004, vol.104, no.1, p. 293-346.

ASTRUC, Didier; ZHAO, Pengxiang y LI, Na. State of the art in nanoparticle synthesis. En: Coordination Chemistry Reviews. Febrero, 2013, vol.257, no.3-4, p. 638- 665.

BLAKEY, Idriss; MERICAN, Zul y THURECHT, Kristofer. A method for controlling the aggregation of gold nanoparticles: tuning of optical and spectroscopic properties. En: Langmuir. Junio, 2013, vol. 29, no.6, p. 8866-8274.

BRUST, Mathias, *et al.* Synthesis of Thiol-derivatised Gold nanoparticles in a two-phase liquid-liquid system. En: J. Chem. Soc. Chem. Commun. Enero, 1994, no.7, p. 801-802.

BUENDÍA ACEVES, S. Síntesis de nanopartículas de hierro con propiedades magnéticas obtenidas vía precursores organometálicos. Tesis de maestría. México: Instituto politécnico nacional. Escuela superior de ingeniería química e industrias extractivas, 2009. 126 p.

COLLADO, Julio y MORENO, Gabriel. *Escherichia coli* en estudios post- genómicos microbianos. Microbios [on line]. Centro de investigación sobre fijación de nitrógeno. [Citado 15-07-2013]. Viable desde el sitio web: <<http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/index.html> > ISBN: 968-36-8879-9.

CORZO, Alberto. Síntesis de nanopartículas de oro obtenidas por reducción de H [AuCl<sub>4</sub>]. En: Rev. Soc. Quím. Perú. Marzo, 2012, vol.78, no.2, p.79-89.

CREIGHTON, Alan; BLATCHFORD, Christopher y ALBRECHT, Grant. Plasma resonance enhancement of Raman Scattering by pyridine adsorbed on silver or gold sol particles of size comparable to the excitation wavelength. En: J. Chem. Soc. Faraday. Trans. 2. 1979, vo.75, p. 790-798.

CELLA, Rodrigo y STEFANI, Hélio. Ultrasound in heterocycles chemistry. Marzo, 2009, vol. 65, no. 13, 2619-2641.

CHEN, Hui-Jiuan Y WEN, Dongsheng. Ultrasonic- aided fabrication of gold nanofluids. En: Nanoscale research letters. Marzo, 2011, vol.6, no. 198, p. 1-8.

CRUZ, Jennifer. Síntesis de nanopartículas de plata funcionalizadas con péptidos análogos de lacto- ferrampinas con potencial antimicrobiano contra *Escherichia coli* O157:H7. Tesis de maestría. Colombia: Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de Química, 2012. 153 p.

CUI, Yang, *et al.* The molecular mechanism of action of bactericidal gold nanoparticles on *Escherichia coli*. En: Biomaterials. Diciembre, 2012, vol.33, no.7, p.2327-2333.

DUFFUS, John; NORDBERG, Monica y TEMPLENTON, Douglas. International Union of Pure and Applied Chemistry. Glossary of terms used in toxicology. En: pure Appl Chem, 2007, vol.79, no.7, p.1153-1344.

FIERRO, Jose. The usefulness of density functional theory to describe the tautomeric equilibrium of 4,6-dimethyl-2-mercaptopyrimidine in solution. En: J. Phys. Chem. A. Agosto, 2003, vol. 107, no. 38, p. 7490-7495.

FRENS, G. Controlled nucleation for the regulation of particle size in monodisperse gold suspensions. En: Nat. Phys.Sci. Enero, 1973, vol.241, p. 20-22.

GUERRERO, Ariel. Explorando la estructura de péptidos conjugados a nanopartículas metálicas. Tesis para optar al título de Químico farmacéutico. Santiago: Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica, 2008. 79 p.

HORVATH, Helmuth. Gustav Mie and the scattering and absorption of light by particles: historic developments and basics. En: Journal of Quantitative Spectroscopy and radiative transfer. Julio, 2009, vol.110, no.11, p. 789-79

Jl, Xiaohui, *et al.*, Size control of gold nanocrystals in citrate reduction: the third role of citrate. En: J. Am. Chem. Soc. Octubre, 2007, vol. 129, no.45, p. 13939-13948.

KONDOW, Tamotsu; TAKEDA, Yoshihiro y MAFUNÉ, Fumitaka. Formation of gold nanoparticles by laser ablation in aqueous solution of surfactant. En: J. Phys. Chem. B. Febrero, 2001, vol. 105, no. 22, p. 5114-5115.

LI, Biaomo, *et al.* Gold nanoparticles prepared by sonochemical method in thiol-functionalized ionic liquid. En: Colloids and surfaces. Marzo, 2007, vol. 302, no. 1-3, p. 366-370.

LOBO, Gricela, *et al.* Síntesis y actividad antimicrobiana de derivados de 4,6-diaminopirimidinas análogos de citosina. En: Avances en Química. Agosto, 2012, vol.7, no.2, p.119-128.

MALVERN INSTRUMENTS LTD. Zeta sizer nano series user manual. MANO317, publicación 2.1. Inglaterra: Malvern instruments ltda, 2004. 288 p.

MÁTTAR, Salim; CUESTA, Joao y PARRA, Miguel. Caracterización molecular de cepas de *E.coli* O157:H7 aisladas de humanos en Bogotá, DC. En: Salud UIS, 2003, vol.35, p. 116-121. ISSN: 0122-0268.

MÁTTAR, S; CUESTA, J y PARRA, M. *E.coli* O157:H7 enterohemorrágico: un agente etiológico de diarrea en Colombia subestimado parte I. En: Revista MVZ Córdoba, 2001, vol.6, no.1, p.15-23.

MEENAN, Brian, *et al.* Polyethylene glycol functionalized gold nanoparticles: the influence of capping density on stability in various media. *En: Gold bulletin*. Junio, 2011, vol.44, no. 2, p. 99- 105.

MOLINA, José; MANJARREZ, Ángel y CRAVIOTO, Alejandro. Patogenicidad bacteriana. *En: Rev.Fac.Med UNAM*. Mayo-junio, 1998, vol.41, no.3, p. 115-119.

MOODLEY, Nivrithi. Antimicrobial activity of ciprofloxacin-coated gold nanoparticles on selected pathogens. Tesis de Maestría. South África: Durban University of Technology. Departamento de biotecnología y tecnología de alimentos, 2014.124 p.

OMS (Organización Mundial de la Salud) [on line]. Suiza (Ginebra): OMS, Diciembre 2011 - [citado 31-07-2013]. Viable desde el sitio web: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs125/es/> >

PANG, Yoon; Hwang, Hyun y KIM, Myung. Adsorption of 2-mercaptopyridine and 2-mercaptopyrimidine on a silver colloidal surface investigated by Raman spectroscopy. *En: Journal of Molecular Structure*. Enero, 1998, vol. 441, no. 1, p. 63- 76.

PATEL, Keshav; META, Kalpesh y PATEL, Yogesh. Studies on synthesis characterization and antimicrobial activity of pyrimidine based derivatives. *En: Int. J. Chem Tech Res*. Octubre-Diciembre, 2011, vol.3, no.4, p.1734-1739.

RALSTON, John. Synthesis and surface structure of thymine- functionalized, self-assembled monolayer- protected gold nanoparticles. *En: Langmuir*. Junio, 2007, vol.23, no.18, p. 9170-9177.

RODRÍGUEZ, Saddy. Obtención de nanopartículas y nano-ordenamientos metálicos empleando la química de los compuestos de inclusión. Tesis doctoral. Santiago: Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, 2007. 170 p.

ROTELLO, Vincent; GOSH, Partha y DE, Mrinmoy. Application of nanoparticles in Biology. *En: Advanced Materials*. Agosto, 2008, vol. 20, no. 2, p. 4225-4241.

SUSLICK, Kenneth y BANG, Jin. Applications of ultrasound to the synthesis of nanostructured materials. *En: Advanced Materials*. Febrero, 2010, vol. 22, no. 10, p. 1039-1059.

TURKEVICH, John; COOPER, Peter y HILLIER, James. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *En: Discuss. Faraday Soc*. Mayo, 1951, vol.11, p. 55-75.

URQUIJO, Jeaneth. Síntesis de nanopartículas magnéticas y su implementación como ferrofluidos. Tesis de maestría. Medellín: Universidad de Antioquia. Facultad de ciencias exactas y naturales. Instituto de Química, 2007. 78 p.

VALIZADEH, Hadi; GHOTASLOU, Reza y KAMIAR, Ali. Preparation, physicochemical characterization and performance evaluation of gold nanoparticles in radiotherapy. En: Advanced pharmaceutical bulletin. Agosto, 2013, vol. 3, no. 2, p. 425-428.

VILLARROYA, Silvia. Oxazolidinonas, paladio, cadenas perfluoradas y nanopartículas: un ejercicio de catálisis. Tesis de doctorado. Barcelona: Universidad autónoma de Barcelona. Departamento de química. Escuela de doctorado, 2002. 241 p.

VIUDEZ, Alfonso. Síntesis, caracterización y ensamblaje de nanopartículas de oro protegidas por monocapas moleculares. Tesis doctoral. Córdoba: Universidad de Córdoba. Departamento de Química Física y Termodinámica aplicada, 2011. 321 p.

ZANELLA, Rodolfo. Metodologías para la síntesis de nanopartículas: controlando forma y tamaño. En: Mundo nano. Enero-junio, 2012, vol.5, no.1, p. 69-81.

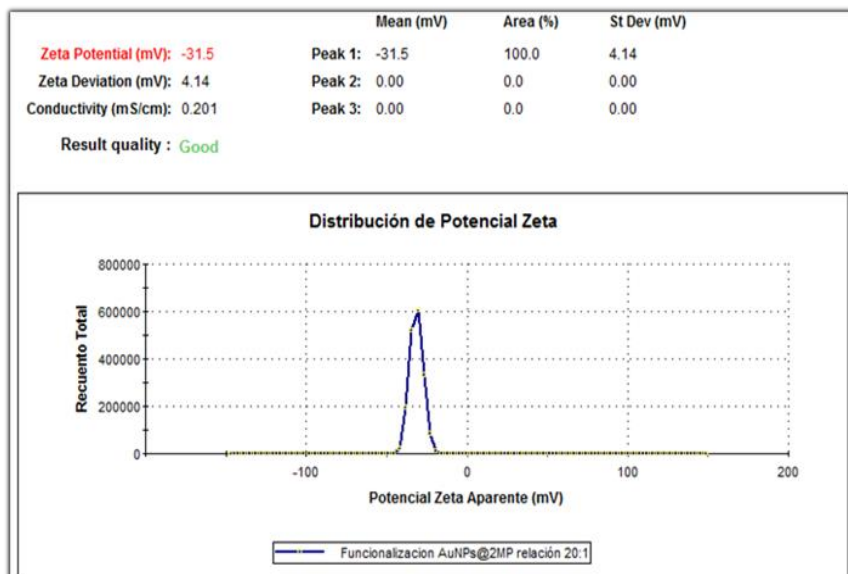
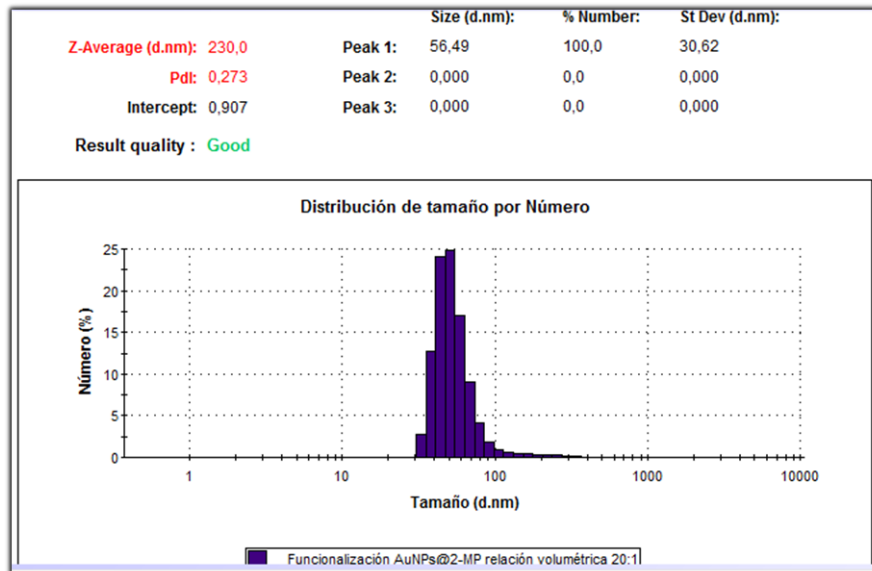
ZHAO, Yuyun, *et al.* Small molecule-capped gold nanoparticles as potent antibacterial agents that target gram-negative bacteria. En: J. Am. Chem. Soc. Agosto, 2010, vol.132, no. 5, p. 12349-12356.

ZHANG, Hao-Li, *et al.* Spectroscopic characterization of gold nanoparticles passivated by mercaptopyridine and mercaptopyrimidine derivatives. En: J. Phys. Chem. B. Febrero, 2003, vol.107, no.25, p. 6087-6095.

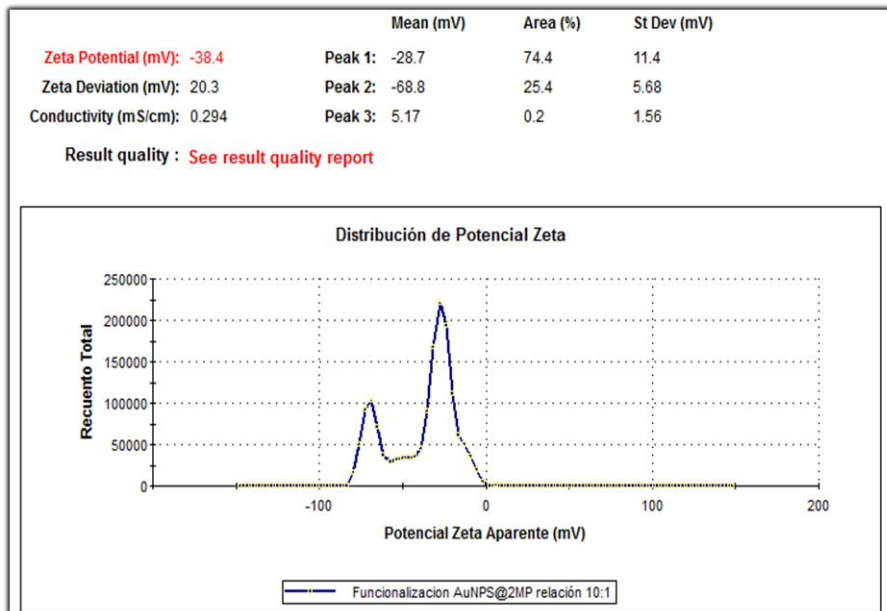
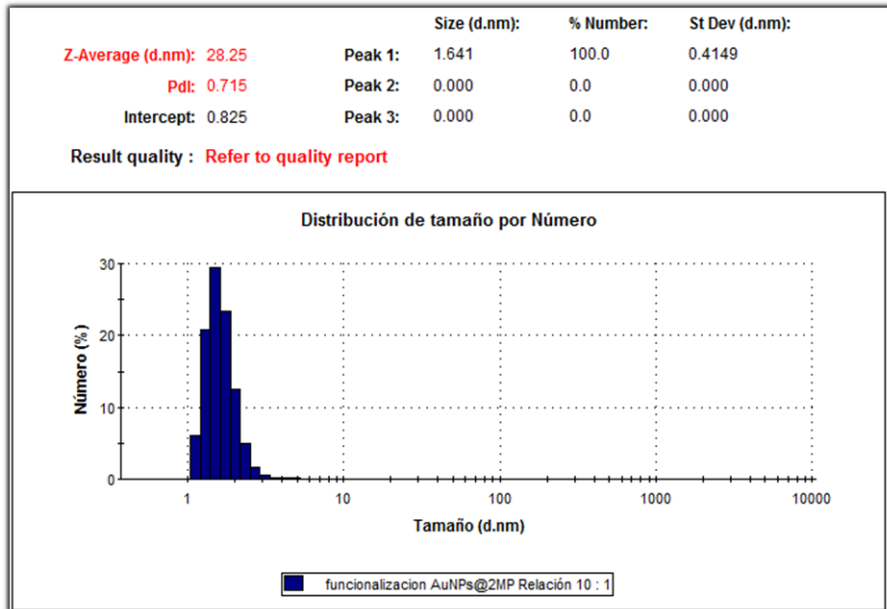
ZHANG, Yongwen, *et al.* Facile preparation and characterization of highly antimicrobial colloid Ag or Au nanoparticles. En: Journal of colloid and interface science. Junio, 2008, vol.325, no.2, p. 371-376.

## ANEXOS

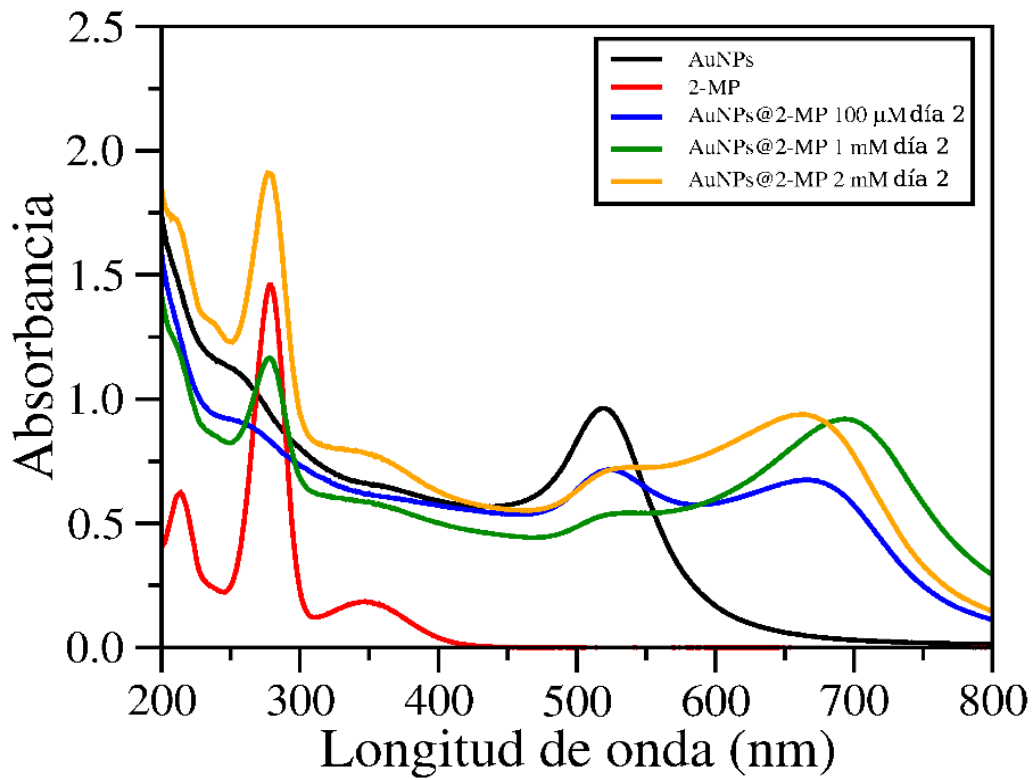
**Anexo A.** Análisis por DLS y de potencial zeta del estudio del efecto de la relación volumétrica AuNps a 2MP 20:1



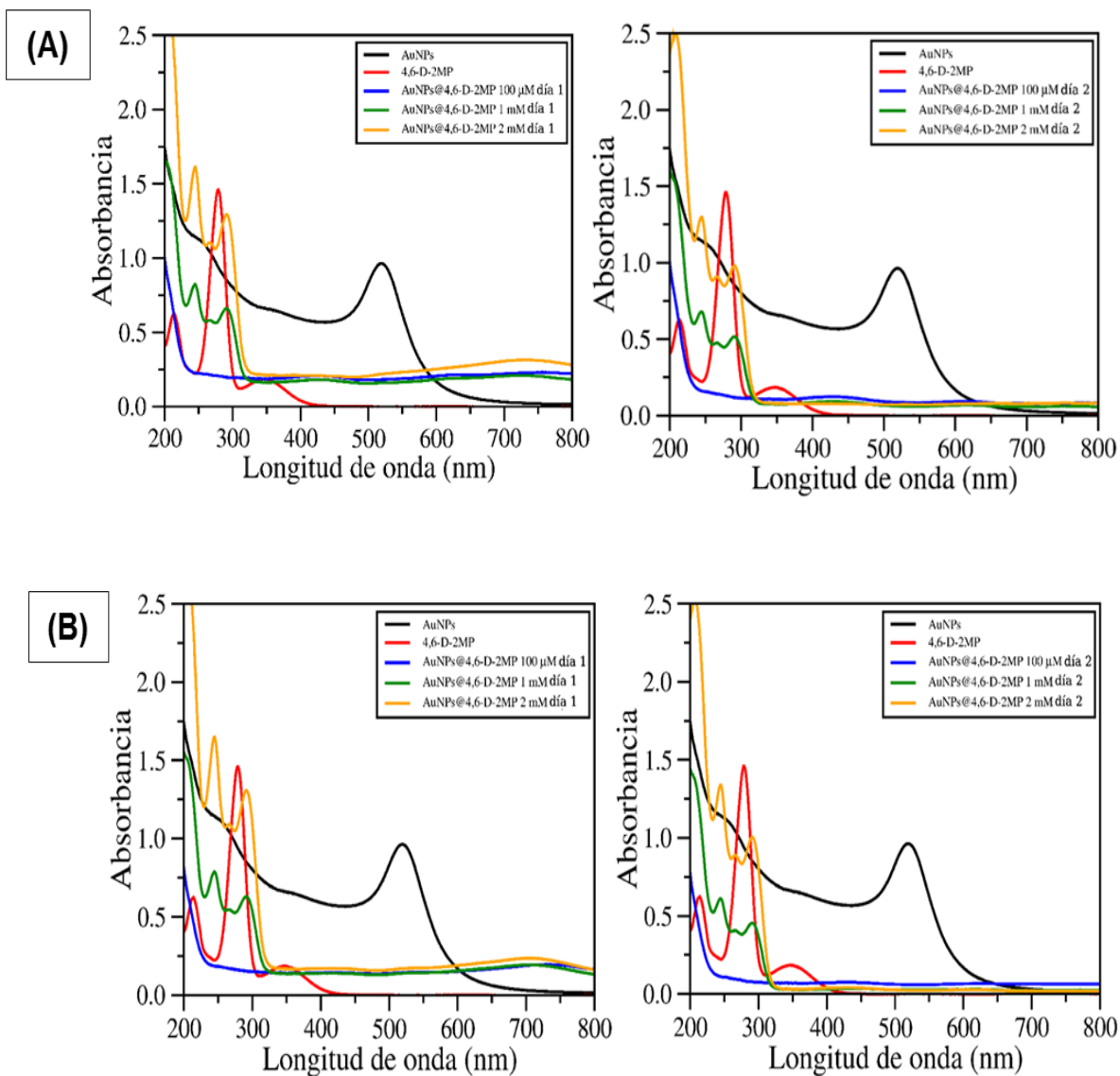
**Anexo B.** Análisis por DLS y de potencial zeta del estudio del efecto de la relación volumétrica AuNps a 2MP 10:1.



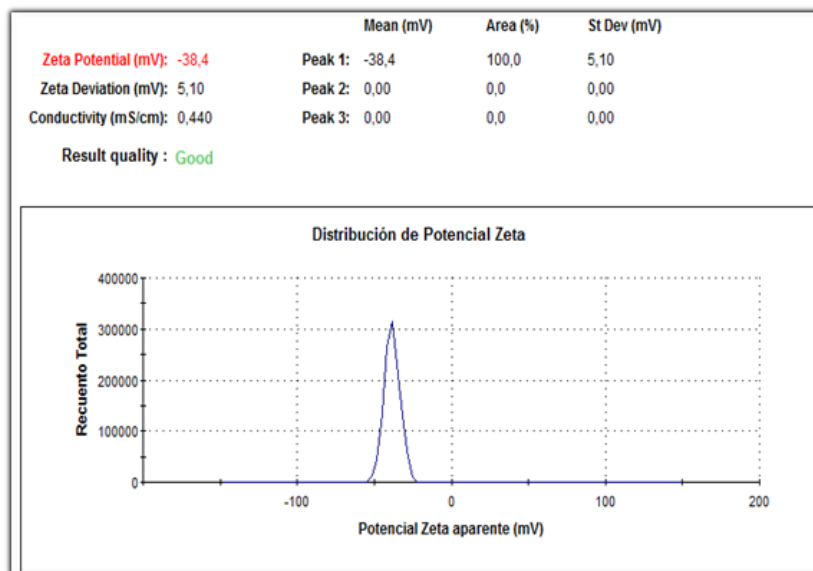
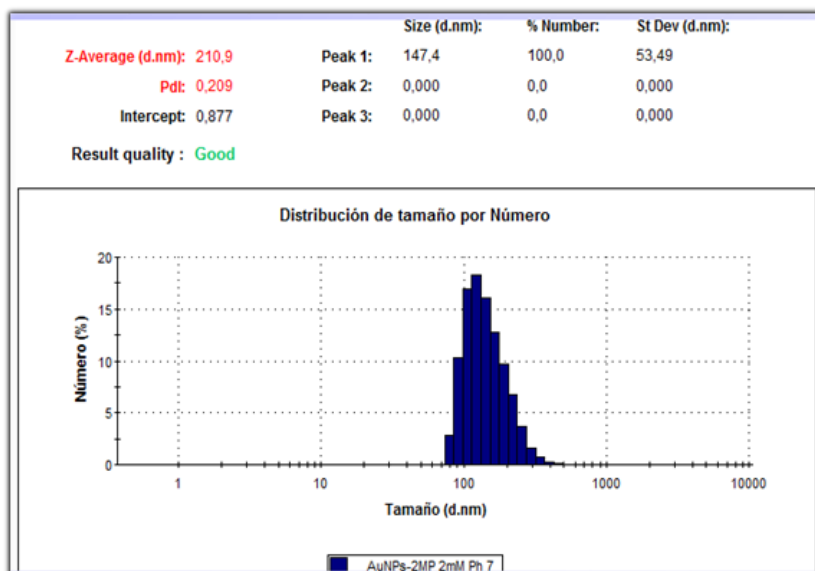
**Anexo C.** Espectros UV-Vis del estudio del efecto de la concentración en la funcionalización AuNPs@2MP para el día 2.



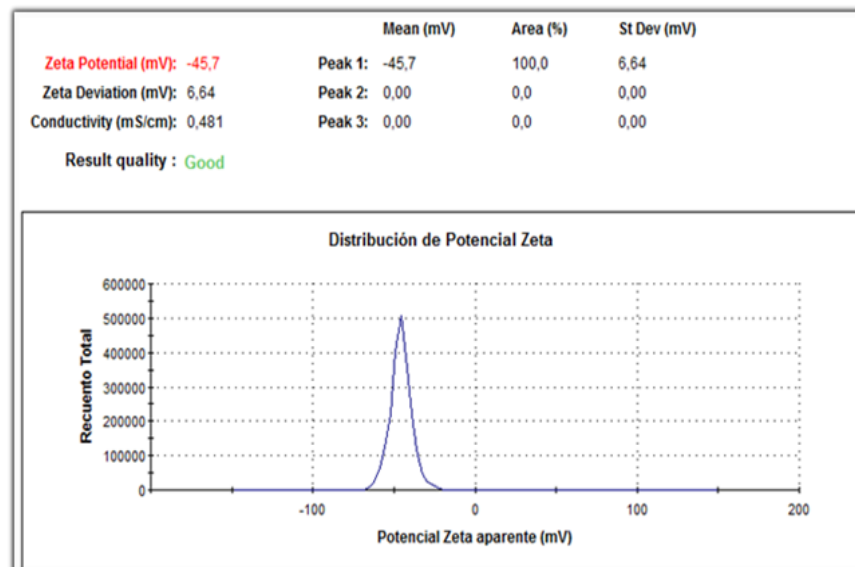
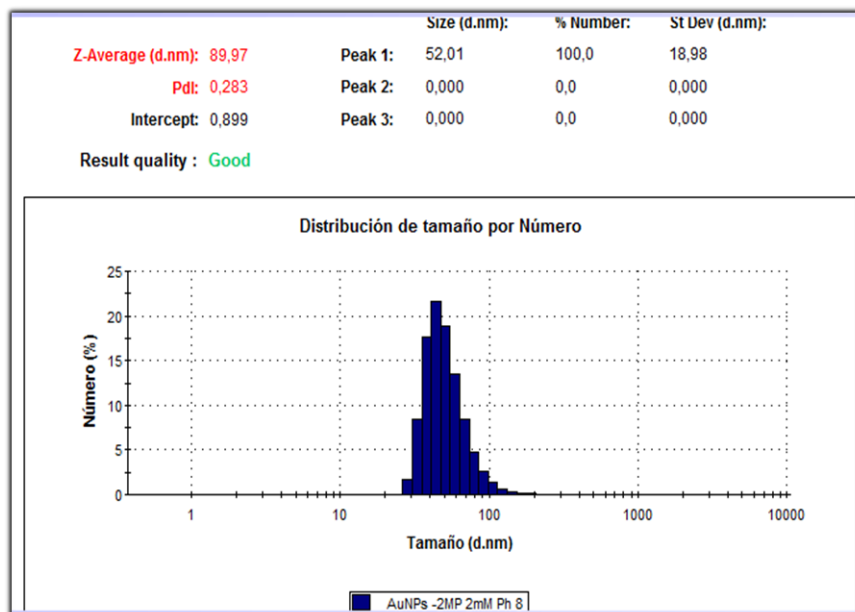
**Anexo D.** Espectros UV-Vis del análisis del efecto de la concentración en la funcionalización AuNPs@ 4,6-D-2MP para los días 1 y 2. **A)** Mediante el uso de ultrasonido **B)** sin el uso de ultrasonido.



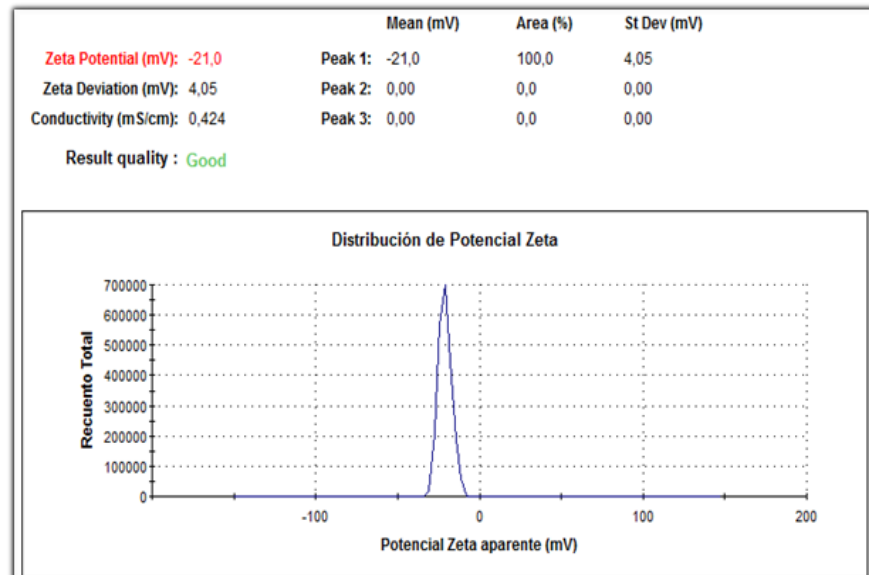
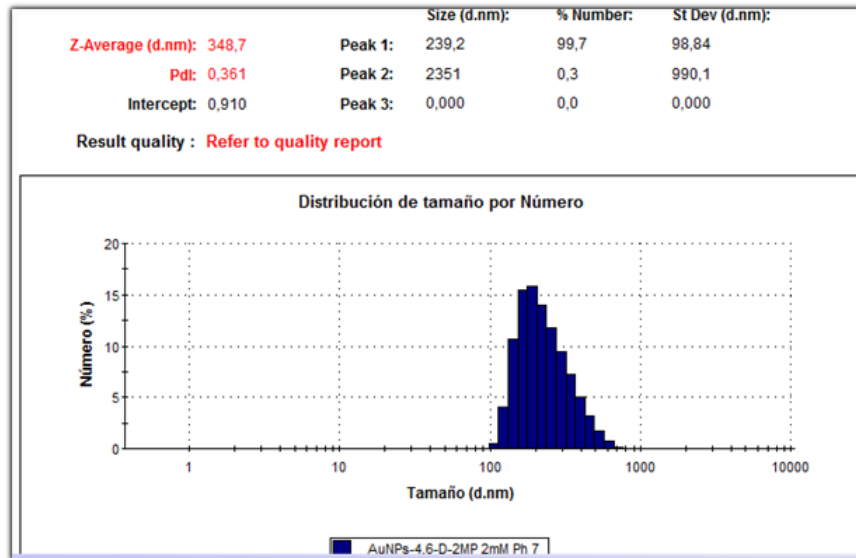
## Anexo E. Análisis DLS y de potencial zeta del sistema AuNPs@2MP a pH 7.0.



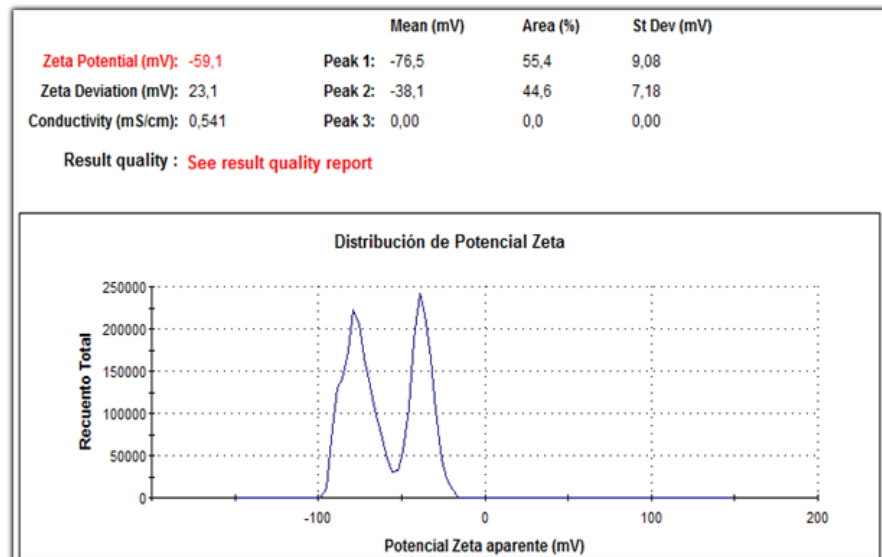
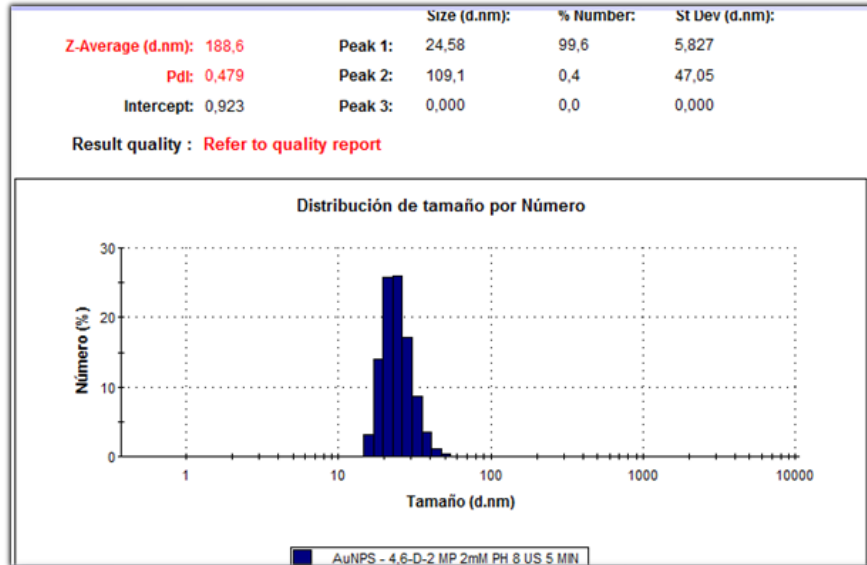
Anexo F. Análisis DLS y de potencial zeta del sistema AuNPs@2MP a pH 8.0.



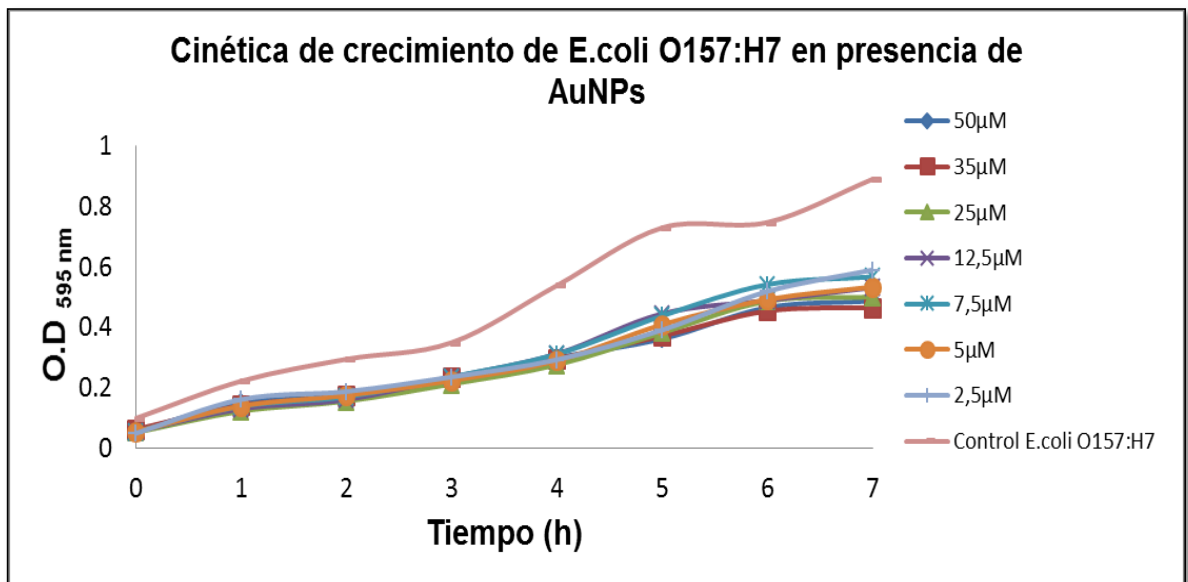
**Anexo G.** Análisis DLS y de potencial zeta del sistema AuNPs@4,6-D-2MP a pH 7.0.



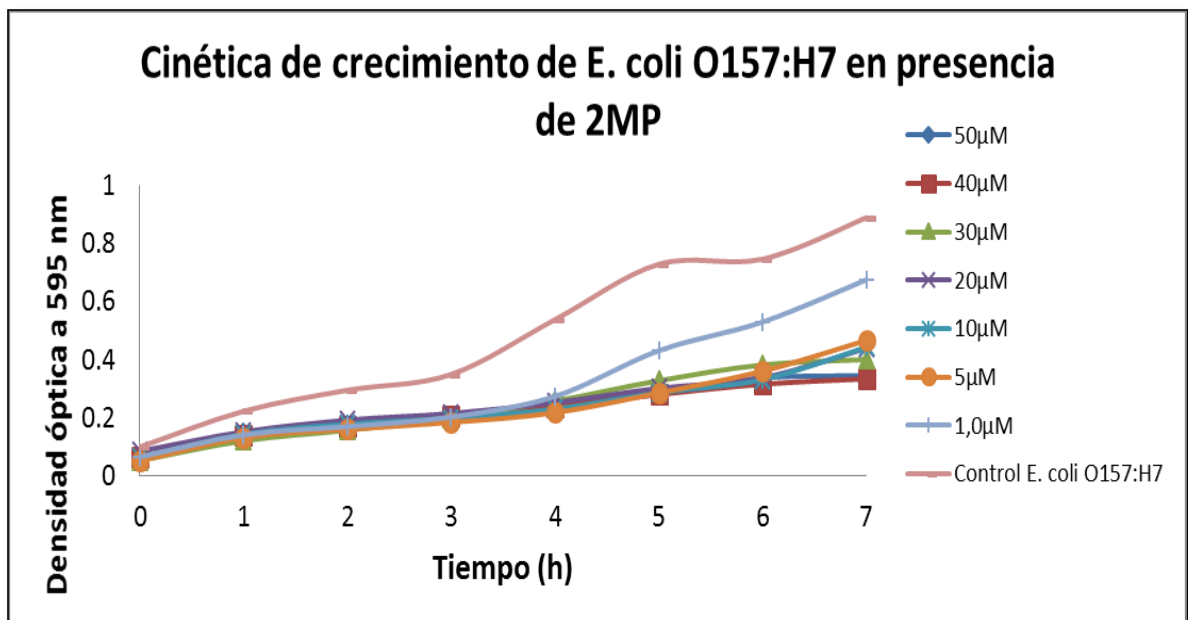
**Anexo H.** Análisis DLS y de potencial zeta del sistema AuNPs@4,6-D-2MP a pH 8.0.



**Anexo I.** Gráfica de la cinética de crecimiento de la *E. coli* O157:H7 en presencia de las AuNPs.



**Anexo J.** Gráfica de la cinética de crecimiento de la *E. coli* O157:H7 en presencia de la 2MP.



**Anexo K.** Gráfica de la cinética de crecimiento de la *E. coli* O157:H7 en presencia de la 4,6-D-2MP.

