

NANOESTRUCTURAS COMO MARCADORES FLUORESCENTES

**Síntesis de Nanoclusters de oro (AuNCs) como un Marcador Fluorescente de  
*Staphylococcus Aureus* Resistente a Meticilina (SARM)**

**Ingrid Jasney Rincón Valdivieso**

**Trabajo de grado para optar el título de química**

**Director**

**Enrique Mejía Ospino.**

**Doctor en Ciencias Químicas**

**Co-directora**

**Yuly Andrea Prada Vargas.**

**Maestría en Química**

**Universidad Industrial de Santander**

**Escuela de Química**

**Facultad de Ciencias**

**Bucaramanga**

**2019**

### **Agradecimientos**

A mi padre Luis Antonio y mi madre Graciela por enseñarme que el esfuerzo, el trabajo arduo y la dedicación nos llevan a alcanzar objetivos.

A mis hermanos Julieth y Santiago por su comprensión y compañía.

A mis compañeros del laboratorio LEAM.

A mi Co-directora por su confianza y liderazgo

A mis compañeros de Universidad Karen, Angélica, Alberto y Anderson por su apoyo incondicional.

Al laboratorio de Espectroscopia Atómica y Molecular – (LEAM)

Al Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología – (GIBIM)

Al Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales (CINTROP).

Al Laboratorio de Síntesis de Péptidos en el Núcleo de Biotecnología Curauma (NBC)

A la Universidad Industrial de Santander

## Tabla de Contenido

Introducción.....	11
1. Marco Teórico.....	13
1.1 Nanocluster de Oro (AuNCs).....	13
1.2. Síntesis de AuNCs .....	14
1.3. Funcionalización de AuNCs .....	15
1.4. Péptidos antimicrobianos (PAM).....	16
1.5. Propiedades fisicoquímicas de AuNC .....	17
1.5.1. Tamaño:.....	17
1.5.2. Potencial Zeta ( $\zeta$ ) .....	17
1.6. Propiedades fotoluminiscentes.....	18
1.6.1. AuNCs fluorescentes.....	19
1.7. Rendimiento Cuántico ( $\phi$ ).....	20
1.8. Microscopía de Fluorescencia.....	21
1.9. Aplicaciones biológicas .....	22
1.10. Bioimágenes .....	23
1.11. <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina (SARM).....	23
1.12 Antecedentes.....	24
2. Materiales y Métodos.....	27
2.1 Materiales .....	27
2.2 Métodos .....	27
2.2.1 Síntesis de AuNCs. ....	27
2.2.2 Funcionalización de AuNCs con péptido antimicrobiano	
2.2.3 Caracterización de los sistemas nanoestructurados .....	29
2.2.4 Rendimiento cuántico .....	31
2.2.5 Cultivo de SARM. ....	31
2.2.6 Obtención de bioimágenes de SARM empleando los AuNC@NBC2254.....	32
2.2.7 Análisis por Microscopia de barrido electrónico SEM.....	33
3. Resultados y análisis .....	34
3.1 Síntesis y Funcionalización de AuNC.....	34
3.2 Caracterización fisicoquímica de los AuNCs y AuNC@NBC2254 .....	35
3.2.1 Tamaño hidrodinámico y Potencial zeta de los sistemas de oro nanoestructurados .....	35

3.3 Rendimiento cuántico de AuNC@NBC2254.....	40
3.4 Rendimiento cuántico de AuNC@NBC2254.....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
3.5 Obtención de imágenes SARM mediante microscopía electrónica de barrido-SEM.....	44
4. Conclusiones.....	46
Referencias bibliográficas.....	47
Apéndices .....	56

### Lista de Figuras

Figura 1. Potencial Zeta, tomado de (Y. Zhang et al., 2008), editado por el autor. ....	18
Figura 2. Diagrama de Jablonski, tomado de (Marisol Faralds, 2002), editado por el autor. ....	19
Figura 3. Diagrama de nivel de energía de Kohn-Sham, (los HOMO-1 a HOMO-5 se construyen principalmente a partir de los orbitales atómicos 5d10), tomado de (Muhammed & Pradeep, 2010), editado por el autor. ....	20
Figura 4. Formación de AuNCs en solución de BSA, tomado de (J. Xie, Lee, Wang, & Ting, 2007), editado por autor. ....	25
Figura 5. A) Modificación de los AuNCs empleando SPDP. B) Estrategia de funcionalización de los AuNCs al péptido. ....	29
Figura 6. Obtención de AuNCs usando BSA. A) Inicio de la reducción de $Au^{3+} \rightarrow Au^0$ . B). AuNCs formados. ....	34
Figura 7. AuNC@NBC2254 A) Líquidos B) Liofilizados ....	35
Figura 8. Análisis por DLS del tamaño hidrodinámico de A)AuNCs y b)AuNC@NBC2254. ....	36
Figura 9. Espectro de UV-Vis de AuNC. ....	38
Figura 10. Fluorescencia de AuNC excitados con láser de 340 nm. ....	39
Figura 11. Espectros de emisión de fluorescencia de los AuNC a diferentes $\lambda$ de excitación. ....	39
Figura 12. Espectro de Fluorescencia de Rodamina B y AuNC@NBC2254 ....	40
Figura 13. Regresión lineal entre intensidad de fluorescencia integrada y absorbancia A). Rodamina B. B). AuNC-NBC2254 ....	41
Figura 14. A) Imagen obtenida mediante microscopia óptica del preinóculo de SARM marcada con AuNC@NBC2254 [25 mg/mL] B) Imagen de microscopia de fluorescencia de muestra del preinóculo de SARM marcada con AuNC@NBC2254 [25mg/mL] C) Imagen de microscopia de fluorescencia de dilución 1/10 del preinóculo de SARM marcada con AuNC@NBC2254 [25mg/mL. D). Imagen de microscopia de fluorescencia de muestra del preinóculo de SARM marcada con AuNC@NBC2254 [12mg/mL]. Todas las muestras se incubaron por 10 minutos Escala: 50 $\mu$ m. ....	43
Figura 15. Análisis por Microscopía de Barrido Electrónico de SARM marcado con diferentes concentraciones de AuNC@NBC2254. A) Muestra de SARM sin AuNC@NBC2254 B) Muestra de SARM marcado con AuNC-NBC2254 [100 $\mu$ g/mL] C) Muestra de SARM marcado con AuNC-NBC2254 [12mg/mL]. D) Muestra de SARM marcado con AuNC-NBC2254 [25mg/mL]. ....	45

**Lista de Apéndice**

Apéndice A. Potencial Zeta AuNC .....	56
Apéndice B. Potencial Zeta AuNC@NBC2254 .....	56
Apéndice C. Espectro de excitación de AuNC@NBC2254 .....	57
Apéndice D. Espectro UV-Vis de AuNC@NBC2254, con el eje de absorbancia modificado en escala logarítmica.....	57
Apéndice E. Espectros de absorción de A) soluciones de rodamina B. B) soluciones de AuNC-NBC2254 .....	58
Apéndice F. Espectros de fluorescencia excitando a 380 nm de A) soluciones de rodamina B. B) soluciones de AuNC-NBC2254.....	59
Apéndice G. Datos para realizar curva de calibración. Tabla 1. Absorbancia a 380 nm e intensidad de fluorescencia de soluciones de Rodamina B medido en la ventana espectral de 503-650nm. Tabla 2. Absorbancia a 380 nm e intensidad de fluorescencia de soluciones de AuNC@NBC2254 medido en la ventana espectral de 560-707nm.....	60
Apéndice H. Imágenes de microscopia de fluorescencia de SARM marcada con Hoechst 33342 [0,5 mg/mL] y AuNC@NBC2254 [12 mg/mL] vista en A) filtro para ventana espectral del rojo. B) filtro para ventana espectral del azul. ....	61
Apéndice I. Análisis semicuantitativo por EDS de Preinóculo de SARM marcado con AuNC-NBC2254 [3,84 x10 <sup>-4</sup> M].....	62

## Resumen

**Título:** SÍNTESIS DE NANOCLUSTERS DE ORO (AuNCs) COMO UN MARCADOR FLUORESCENTE DE *Staphylococcus aureus* RESISTENTE A METICILINA (SARM)\*

**Autor:** Ingrid Jasney Rincón Valdivieso\*\*

**Palabras claves:** Bioimágenes; fotolumiscencia; nanoclusters de oro; péptidos; SARM

**Descripción:** Los AuNC son estructuras ultrafinas de átomos de oro reducidos que se caracterizan por exhibir fotoluminiscencia en el rango visible, son fotoestables y presentan baja toxicidad. Pese a la dificultad para su obtención, una vez sintetizados pueden ser fácilmente funcionalizados con ligandos como péptidos, proteínas y otras moléculas bioactivas, lo cual les otorga selectividad y especificidad por un *target* seleccionado. Recientes estudios han mostrado su versatilidad como marcadores fluorescentes en la obtención de bioimágenes de agentes patógenos como células cancerígenas, hongos y bacterias. Tanto la detección como la identificación de cepas bacterianas es muy importante en la práctica clínica, ya que muchas de ellas son altamente virulentas y resistentes a fármacos convencionales como es el caso del *staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM).

El presente trabajo permitió el uso de nanoestructuras de oro fluorescentes para obtener imágenes de SARM empleando la técnica óptica de Microscopia de fluorescencia. Los AuNC fueron sintetizados usando  $\text{HAuCl}_4$  (10 mM) como precursor metálico y albumina de suero bovino (50 mg/mL) como agente reductor y estabilizante. La presencia de anillos aromáticos, residuos de tirosina y cisteína en la BSA permitieron la formación de *clústers* de átomos de oro reducidos y estabilizados a través de enlaces Au-S. Posteriormente estos AuNCs fueron funcionalizados con un péptido sintético (NBC2254) activo frente a SARM usando [3- (2-piriditiol)-propionato]-N-succinimida (SPDP) como agente entrecruzante bifuncional. Finalmente, los AuNC@NBC2254 con emisión a 631 nm ( $\lambda_{\text{excitación}}$  380 nm) y rendimiento cuántico de 9.94 %, registraron un potencial Zeta igual a 4,59 mV y un tamaño hidrodinámico alrededor de 6,15 nm, los cuales se lograron implementar como marcador fluorescente en la obtención de bioimágenes de SARM por Microscopia de Fluorescencia.

---

\* Trabajo de grado

\*\* Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ciencias, Escuela de Química. DIRECTOR: Enrique MEJÍA.  
CO-DIRECTOR: Yuly A. PRADA

### Abstract

**Title:** SYNTHESIS OF GOLDEN NANOCCLUSERS (AuNCs) AS A FLUORESCENT MARKER OF METICILIN-RESISTANT *Staphylococcus aureus* (MRSA)\*

**Author:** Ingrid Jasney Rincón Valdivieso\*\*

**Keywords:** Bioimages; photoluminescence; gold nanoclusters; peptides; MRSA

**Description:** The AuNC are ultrafine structures of reduced gold atoms which are characterized by exhibiting photoluminescence in the visible range. They are photostable and have low toxicity. Once synthesized, the AuNCs can be easily functionalized using different ligands such as peptides, proteins, and other bioactive molecules which give them selectivity and specificity for the selected target. Recent studies have shown that the AuNC can use as a fluorescent label for bio-images application in the detection of pathogens such as cancer cells, fungi, and bacteria. Thus, the detection and identification of bacterial strains are very important in clinical practice since many of them are highly virulent and resistant to conventional drugs such as methicillin-resistant staphylococcus aureus (MRSA).

In this work, we used the fluorescent gold nanostructures to obtain MRSA images using Fluorescence Microscopy. First, the AuNC were prepared using  $\text{HAuCl}_4$  (10 mM) as a metallic precursor and bovine serum albumin (50 mg / mL) which acts as a reduction agent and stabilizing agent. The presence of aromatic rings and tyrosine and cysteine residues in the BSA allowed the formation of clusters from the reductions and the stabilized of the reduced gold atoms through Au-S bonds. Subsequently, the AuNCs were functionalized with a synthetic peptide (NBC2254) active against MRSA using [3- (2-pyridithiol) -propionate]-N-succinimide (SPDP) as a bifunctional crosslinking agent. Moreover, the AuNC@NBC2254 with emission at 631 nm ( $\lambda_{\text{exc}}$  380 nm) and a quantum yield of 9.94%. The Zeta potential was equal to 4.59 mV and the hydrodynamic size was around 6.15 nm. Finally, implemented as a fluorescent marker in obtaining bio-images of MRSA by Fluorescence Microscopy.

---

\* Bachelor Thesis

\*\* Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ciencias, Escuela de Química. Research advisor: Enrique MEJÍA, Yuly A. PRADA

## Introducción

Las infecciones causadas por bacterias multirresistentes son consideradas una de las amenazas más importantes en Salud Pública, ya que representan una elevada morbilidad y mortalidad así como un aumento de gastos clínicos y la necesidad terapias invasiva (Castro-Orozco, Villafañe-Ferrer, Rocha-Jiménez, & Alvis-Guzmán, 2018). La prevalencia e incremento de dichas afecciones han sido atribuidas al uso inadecuado de antibióticos, comorbilidad, deficiencias en la asepsia y estancias prolongadas en unidades de cuidados intensivos (Holden et al., 2013).

Dentro del grupo de bacterias multirresistentes se encuentra *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM), la cual posee una elevada capacidad de adaptabilidad y supervivencia, ya que es capaz de evadir el efecto antimicrobiano de la generación de antibióticos betalactámicos. A esta cepa son atribuidas un amplio rango de infecciones nosocomiales, que van desde ulceraciones en la piel y tejidos blandos, osteomielitis, endocarditis, síndrome de shock toxico y sepsis. (Greenlee-Wacker, DeLeo, & Nauseef, 2015). Debido a la alta incidencia de esta bacteria y los efectos negativos que tienen sobre el hombre y el ambiente, su detección e identificación es de vital importancia, siendo necesaria la implementación de nuevos métodos de detección que permitan el reconocimiento e identificación de SARM de una forma rápida y eficiente.

Bajo estas consideraciones el campo de la nanobiotecnología ha permitido diseñar estrategias tanto para la detección in vitro de SARM, así como tratamientos terapéuticos sobre diferentes dianas biológicas antes improbables. Estas estrategias combinan el uso de sistemas nanoestructurados funcionalizados con distintas biomoléculas, que otorgan selectividad y especificidad por un blanco seleccionado. El presente trabajo describe el diseño y síntesis de AuNCs funcionalizados con un péptido sintético, que en estudios previos mostró actividad

antibiótica frente a SARM. Estos AuNCs fotoluminiscentes fueron caracterizados empleando las técnicas de espectroscopia de UV-Vis y fluorescencia, así como técnicas ópticas como dispersión de la luz en modo dinámico para conocer la distribución de tamaño en escala nanométrica. Finalmente, los análisis empleando microscopia de fluorescencia y microscopia de barrido electrónico de estos AuNCs funcionalizados y su interacción con la bacteria, confirmaron que dichos sistemas de nanoestructuras pueden ser una alternativa eficiente en la detección selectiva de SARM a través de bio-imágenes.

## 1. Marco Teórico

### 1.1 Nanocluster de Oro (AuNCs)

Los nanoclusters (NCs) son nanoestructuras ultrafinas que incluyen un cascarón metálico formado por pocos átomos metálicos y un ligando, tienen un diámetro  $< 2$  nm y se consideran eslabones entre átomos de metal único y nanopartículas metálicas plasmónicas. Debido a la confinación de electrones a tales dimensiones y los niveles de energía discreta, estos NCs metálicos exhiben propiedades ópticas, electrónicas y químicas particulares, incluyendo fotoluminiscencia fuerte, excelente fotoestabilidad, buena biocompatibilidad y tamaño subnanométrico; haciéndolos materiales muy prometedores en las aplicaciones de biomarcación, biodetección, y bioimagen. (Y. Zheng, Lai, Liu, Jiang, & Wang, 2017)

Las propiedades físicas y químicas, especialmente las propiedades optoelectrónicas de los metales dependen en gran medida de su tamaño. De esta forma, al variar su tamaño su comportamiento pasa por varias transiciones notables. Los metales a granel son buenos reflectores ópticos y conductores eléctricos, porque poseen niveles de energía continuos y bandas de energía que son el resultado de la combinación de un número infinito de orbitales energéticamente muy similares. (L. Zhang & Wang, 2014)

Cuando el tamaño de los metales se reduce hasta convertirse en nanopartículas metálicas, el movimiento de los electrones se ve limitado por el tamaño de la nanopartícula, y se espera que las interacciones sean principalmente con la superficie, por lo tanto, las nanopartículas metálicas mostrarán colores intensos debido al efecto de resonancia de plasmón superficial. Sin embargo, cuando las nanopartículas de metal reducen aún más su tamaño hasta llegar a nanoclusters

metálicos (NCs), los niveles de energía se discretizan y las transiciones electrónicas producidas por la interacción con la luz generan fotoluminiscencia. (L. Zhang & Wang, 2014)

## 1.2. Síntesis de AuNCs

Reducción química:

Comúnmente los AuNCs con propiedades fotoluminiscentes se preparan a partir de compuestos precursores de iones  $\text{Au}^{3+}$ , un agente reductor fuerte y un agente estabilizante. El ácido cloroáurico ( $\text{HAuCl}_4$ ) se usa generalmente como precursor de iones  $\text{Au}^{3+}$  que en presencia de los agentes reductores principalmente borohidruro de sodio ( $\text{NaBH}_4$ ), citrato, hidrato de hidrazina, cloruro de tetrakis(hidroximetil)fosfonio (THPC) y ácido ascórbico se obtienen átomos de Au, que posteriormente se estabilizan para la obtención de AuNCs fotoluminiscentes y de alta calidad. Esta estabilización puede ser de tipo electrostática, donde se adsorben iones a la superficie metálica, creando una multicapa que genera repulsión entre agregados individuales, o tipo estabilización estérica que se obtiene rodeando el centro metálico con ligandos voluminosos, proporcionando una barrera estérica que impide el contacto cercano entre los agregados. (Aiken & Finke, 1999) (Y. Zheng et al., 2017)

La estabilización puede ser controlada por compuestos tiolados que generen fuertes interacciones de tipo covalente entre átomos Au y S; por dendrímeros y polímeros que actúan como protectores muy efectivos debido a su estructura uniforme, capacidad de captar iones en solución, solubilidad sintonizable y reactividad superficial o controlada por biomoléculas como albúmina sérica bovina (BSA), que posee residuos de tirosina y cisteína permitiéndole actuar como agente reductor y estabilizante simultáneamente. Además, mejora sus propiedades biológicas y

disminuye el impacto medioambiental. (Luo et al., 2012) (Esumi, Suzuki, Yamahira, & Torigoe, 2000) (Sun & Jin, 2014)

Mediante técnicas como XAFS se estudió las interacciones de los átomos de oro en la síntesis de nanopartículas. Evidenciando la disminución de la intensidad en la señal que corresponde al enlace Au-Cl, conforme aparece y se intensifica la señal del enlace Au-Au propio de Nanoclusters. Esto se debe al aumento del tamaño de partícula por la nucleación de átomos de oro, que a su vez disminuye el efecto de unión al ligando (Yao et al., 2010). En estos sistemas, la nucleación de átomos de oro inicia con la formación de dímeros de  $\text{Au}_2\text{Cl}_6$  y posterior formación de trímeros, a continuación, se produce un proceso de reducción que conduce a la formación de grupos de oro más grandes, a través de mecanismos como la coalescencia o maduración de Ostwald, dependiendo del pH en el que transcurra la reacción. (Thanh, Maclean, & Mahiddine, 2014)

### **1.3. Funcionalización de AuNCs**

Los procesos de funcionalización tienen lugar cuando se modifica la superficie de las nanoestructuras, ya sea por un intercambio de ligandos, bioconjugación covalente o interacciones electrostáticas, con el fin de mejorar sus propiedades fisicoquímicas y biológicas. (Y. Zheng et al., 2017)

La bioconjugación corresponde a la unión covalente de oligonucleótidos, proteínas o péptidos a los AuNCs y resulta ser el camino más efectivo para proporcionar funciones adicionales en los sistemas nanoestructurados como lo son la reactividad, reconocimiento, selectividad y especificidad por un objetivo seleccionado, lo cual en términos biológicos es altamente relevante. (J. Li, Zhu, & Xu, 2014). Por otra parte, las interacciones no covalentes se basan en un proceso de transferencia de fase, inducido por la reacción de emparejamiento de iones entre los

cationes hidrofóbicos y los AuNCs fluorescentes hidrofílicos; este tipo de funcionalización se usa cuando se requieran uniones más flexibles como interacciones electrostáticas, fuerzas de Van der Waals e interacciones hidrofóbicas, especialmente cuando los sistemas nanoestructurados se diseñan como plataformas de entrega de fármacos. (Vigderman & Zubarev, 2013). En cuanto al intercambio de ligandos, se ha considerado una ruta eficiente para modificar propiedades optoelectrónicas y morfológicas (Kluenker, Mondeshki, Nawaz Tahir, & Tremel, 2018)

#### **1.4. Péptidos antimicrobianos (PAM)**

Los péptidos antimicrobianos son cadenas aminoacídicas de 12-40 residuos y pueden ser tanto catiónicos como aniónicos, siendo los catiónicos los que reportan un amplio espectro de acción y mayor presencia en el sistema inmune (Hancock & Diamond, 2000) . Aunque estos péptidos se encuentran en la naturaleza, también pueden ser obtenidos sintéticamente en un laboratorio, empleando diferentes metodologías de síntesis química y basadas principalmente en la secuencia primaria de proteínas y polipéptidos, cuya actividad biológica es conocida y ha sido verificada experimentalmente. (G. Wang et al., 2015).

Estas biomoléculas pese a su corta longitud de cadena, pueden adoptar una conformación secundaria desde hoja  $\beta$ , que ocasionalmente contienen un tramo corto  $\alpha$ -helicoidal, estabilizados por puentes disulfuro, hasta péptidos que poseen una conformación plegada  $\alpha$ -hélices anfipáticas. Los PAM actúan sobre la membrana bacteriana, cuyo mecanismo incluye la inyección y posterior traslocación del péptido al interior de la bacteria ocasionando daños a la membrana, interrupción en la síntesis de membrana, inhibición en la síntesis de proteínas entre otros... (Bradshaw, 2003) (Glukhov, Stark, Burrows, & Deber, 2005) (Matsuzaki, 2009)

Durante décadas se conoce que los péptidos participan en las vías de señalización y transducción celular, y en los procesos de reconocimiento y respuesta a agentes patogénicos; también pueden ser empleados como bioreceptores y marcadores moleculares en el diagnóstico y detección de enfermedades (Laakkonen & Vuorinen, 2010) (Zhou et al., 2018).

## 1.5. Propiedades fisicoquímicas de AuNC

**1.5.1. Tamaño:** Según la Organización Internacional de Normalización se define como nanopartículas a los materiales que tengan dimensiones a nanoescala en el intervalo entre 1 y 100 nm y debido a su tamaño presentan propiedades físicas y químicas significativamente diferentes a sus correspondientes materiales a mayor escala. («IUPAC Glossary of Terms Used in Toxicology, 2nd Edition IUPAC Recommendations», 2007)

**1.5.2. Potencial Zeta ( $\zeta$ ):** Es una medida de la magnitud de la repulsión o atracción electrostática entre las partículas y se utiliza comúnmente para caracterizar la carga superficial de las nanopartículas. Este parámetro fundamental se relaciona con la estabilidad coloidal y se mide en milivoltios (mV); las nanopartículas con  $+30 \text{ mV} < \zeta < -30 \text{ mV}$  han demostrado ser estables en suspensión. (Honary & Zahir, 2013) (Malvern Instruments., 2004)

La fuente de estabilidad de los coloides es la existencia de carga sobre la superficie de las nanopartículas, debido a átomos de oro que no se redujeron y a causa de esta carga tienden a adherirse iones de carga opuesta formando una capa iónica. (Figura 1). Esta superficie cargada para mantener la neutralidad eléctrica debe disponer de un número de iones con carga positiva igual que el número de iones con cargas negativas, formándose una doble capa eléctrica, y el potencial de esta doble capa es lo que se conoce como potencial zeta. (Y. Zhang et al., 2008) (Shao et al., 2015)

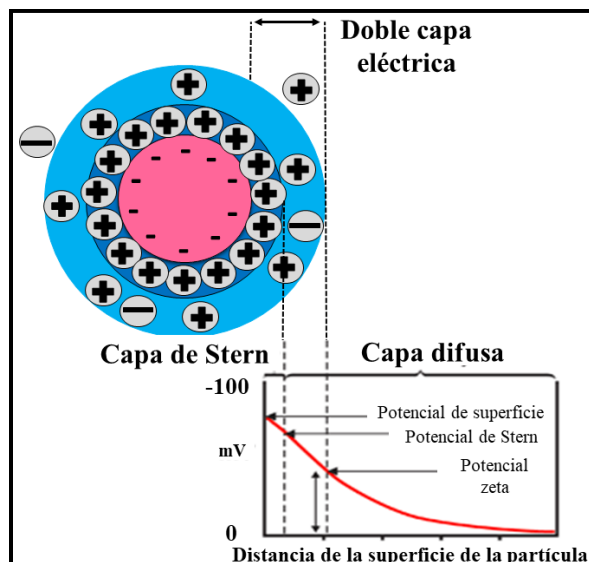


Figura 1. Potencial Zeta, tomado de (Y. Zhang et al., 2008), editado por el autor.

### 1.6. Propiedades fotoluminiscentes

El proceso de luminiscencia consiste en la absorción y posterior emisión radiativa de energía en forma de fotones por parte de una molécula conocida como fluoróforo. La fluorescencia ocurre cuando una molécula que ha alcanzado el estado vibracional menor del primer estado singlete excitado ( $S_1$ ) y por un proceso de relajación, esta regresa finalmente al estado fundamental ( $S_0$ ), emitiendo energía en forma de fotones. (**Figura 2**). La emisión del fluoróforo es independiente de la longitud de onda de la fuente de excitación, aunque la intensidad esté en función de la energía de excitación. En la fluorescencia, no se requiere cambio de multiplicidad de espín y es un proceso que ocurre en tiempos de  $10^{-9} - 10^{-12}$  s.

La fluorescencia se ve afectada por factores estructurales del analito como tipo de cromóforos, tipo y posición de sustituyentes, simetría, rigidez y planaridad de la molécula además por propiedades fisicoquímicas de la preparación como fuerza iónica, pH, polaridad del entorno,

temperatura, unión covalente a ligandos, interacciones no covalentes con otras moléculas y presencia de moléculas activadoras o desactivadoras. (Marisol Faraldos, 2002)

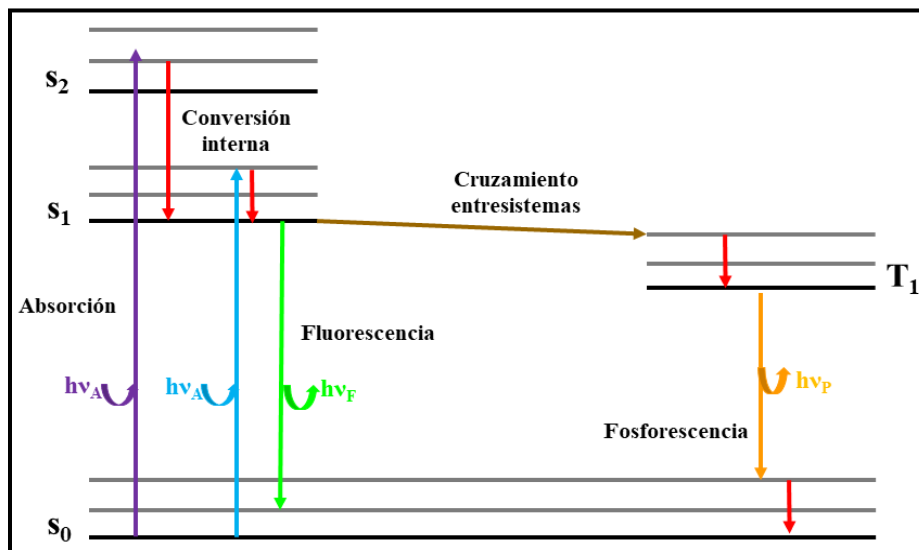


Figura 2. Diagrama de Jablonski, tomado de (Marisol Faralds, 2002), editado por el autor.

**1.6.1. AuNCs fluorescentes:** Los AuNCs son un tipo particular de fluoróforos a nanoescalas, que se diferencian de nanopartículas más grandes por el decrecimiento del efecto de resonancia plasmonica superficial (SPR) en la medida en que disminuye el tamaño alcanzando la escala sub-nanométrica. Es en esta medida, en que la fotoluminiscencia de estos clústers tsurge como resultado del confinamiento cuántico en estructuras ultrafina de cerca de 1.0 nm, que es igual a longitud de onda de De Broglie de los electrones de conducción en donde las bandas electronicas se resuelven en bandas discretas semejante a los sistemas moleculares (J. Zheng, Zhou, Yu, & Liu, 2012a). La figura 3, representata la emisión se origina a partir de transiciones intrabandas radiativas dentro de las bandas “s-p” a través del espacio HOMO-LUMO que se representan en el diagrama de niveles de energía de orbitales de Kohn-Sham para clústers de oro de 25 átomos (Au<sub>25</sub>) (Muhammed & Pradeep, 2010).

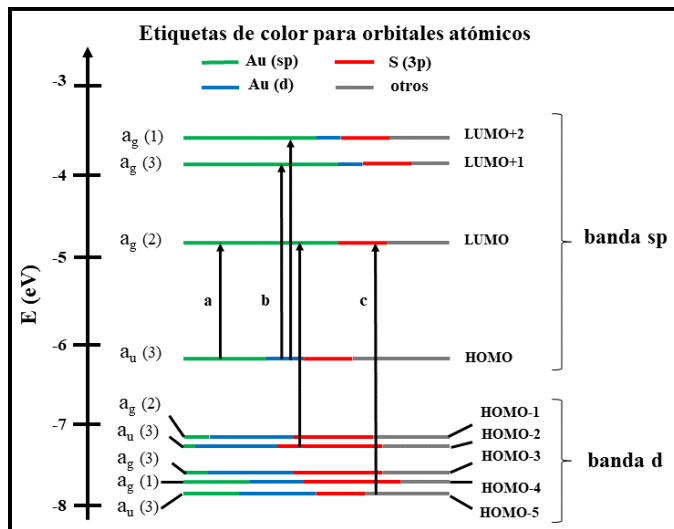


Figura 3. Diagrama de nivel de energía de Kohn-Sham, (los HOMO-1 a HOMO-5 se construyen principalmente a partir de los orbitales atómicos 5d10), tomado de (Muhammed & Pradeep, 2010), editado por el autor.

### 1.7. Rendimiento Cuántico ( $\phi$ )

El rendimiento cuántico de fluorescencia es la relación entre el número de fotones emitidos y el número de fotones absorbidos. Se puede calcular de la relación entre la constante de velocidad de desactivación radiante ( $k_r$ ) y la suma de las constantes de velocidad de todos los procesos de desactivación, radiantes y no radiantes ( $k_{nr}$ ): (Otero, 2007)

$$\Phi = \frac{\text{Numero de fotones emitidos}}{\text{Numero de fotones absorbidos}} = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}}$$

**Ecuación 1.** Ecuación de rendimiento cuántico.

Este parámetro puede ser medido respecto a una sustancia de referencia, donde la respuesta de fluorescencia de un fluoróforo desconocido se compara con un fluoróforo de eficiencia conocida y con perfiles de absorción/emisiones similares a la muestra desconocida. Puede calcularse según

la ecuación 2 a partir de los espectros de absorción y emisión de soluciones diluidas de los dos fluoróforos bajo las mismas condiciones experimentales. (Álvarez, 2007)

$$\Phi_x = \Phi_s \frac{m_x}{m_s} * \frac{n_x^2}{n_s^2} * 100$$

**Ecuación 2.** Determinación del porcentaje de rendimiento cuántico.

Donde:

$\Phi_x$ : Rendimiento cuántico muestra desconocido

$\Phi_s$ : Rendimiento cuántico muestra referencia.

$m_x$ : Pendiente de emisión de fluorescencia integrada vs absorbancia de la muestra desconocida

$m_s$ : Pendiente de extraída de la gráfica de emisión de fluorescencia vs de la muestra referencia.

$n_x$ : índice de refracción muestra desconocida.

$n_s$ : índice de refracción muestra referencia.

### **1.8. Microscopía de Fluorescencia**

Esta técnica permite visualizar moléculas que están mas allá del límite de resolución de la microscopia óptica convencional, utilizando las propiedades fotoluminiscentes de los fluoróforos. La emisión de fluorescencia puede ser intrínseca (propia de la muestra) o extrínseca (sondas fluorescentes) y a partir de dicha emisión se obtienen bioimágenes; que son útiles en el diagnóstico clínico ya que proporcionan información acerca de la dinámica estructural y molecular de las células (Studer et al., 2012). Aunque la microscopia de fluorescencia se basa en los mismos principios de la microscopía óptica convencional, presenta diferencias en el manejo y diseño del equipo para la generación y transmisión de longitudes de ondas, que deben ser adecuadas a los fluoróforos que se quieren visualizar (Carter, Young, & Palmer, 2014).

Un microscopio de fluorescencia generalmente tiene lámparas de xenón, mercurio o láseres como fuente de excitación, además, contiene filtros de excitación para permitir el paso de determinadas longitudes de onda hacia la muestra; un objetivo que cumple las funciones de condensador óptico y colector de fluorescencia emitida y un filtro de barrera que solo deja pasar la luz fluorescente emitida por el fluoróforo (Lichtman & Conchello, 2005).

### **1.9. Aplicaciones biológicas**

En los últimos 10 años los AuNCs han sido empleados como una alternativa innovadora en campos de medicina y bioquímica, ya que exhiben propiedades antibióticas y anticancerígenas (Ahmad et al., 2013) (Cui et al., 2012). Además, debido a su composición híbrida (corel metálico-ligando) también son usados como plataforma en la entrega de fármacos. (G. Han, Ghosh, & Rotello, 2007). Actualmente, el mayor interés y exploración científica de estos sistemas se enfoca en el desarrollo de biosensores ópticos y marcadores fluorescentes, debido a la modulación de sus propiedades fotoluminiscentes al llevar a cabo procesos de bioconjugación a ligandos con actividad biológica, como anticuerpos, péptidos o proteínas. (K. Zheng, Setyawati, Leong, & Xie, 2017).

Los AuNCs funcionan como marcadores en el diagnóstico, monitoreo y localización de células cancerígenas de tipo carcinoma y leucemia. (Chattoraj & Bhattacharyya, 2014). Además, al conjugar AuNCs con péptidos y anticuerpos con fluorescencia inherente y selectividad a células cancerosas o bacterias, mejoran la intensidad de la emisión de fluorescencia del sistema, permitiendo un marcaje más eficiente y facilitando la localización de dichas células. (Yahia-Ammar, Sierra, Mérola, Hildebrandt, & Le Guével, 2016). No obstante, estos sistemas nanoestructurados pueden ser multifuncionales y actuar como agentes de diagnóstico y agentes terapéuticos simultáneamente, ya que se pueden obtener imágenes cerebrales de pacientes con

enfermedades neurodegenerativas y a su vez tienen la capacidad de permear membranas celulares (sin alterar su integridad) para liberación de fármacos. (Nair, Nair, & Shenoy, 2017)

### **1.10. Bioimágenes**

La adquisición de imágenes de material biológico mediante el uso de sondas fluorescentes como nanomateriales o fluoróforos moleculares, se denomina bioimágenes. La imagenología de fluorescencia es una técnica sencilla, no invasiva y altamente sensible que permite estudiar organismos biológicos con alta resolución tridimensional (Wolfbeis, 2015) (Caponetti et al., 2019)

Debido a las propiedades fotoluminiscentes de los AuNCs, a su tamaño hidrodinámico subnanométrico, alta biocompatibilidad, emisión visible sintonizable, emisión fuerte y estable, estos se han convertido en un punto de acceso a la investigación de Bioimágenes y hacen parte de los materiales con potencial de sondas fluorescentes. (Y. Wang, Hu, Li, & Zhu, 2017) (Palmal & Jana, 2014a).

Además los AuNC@BSA se pueden conjugar con elementos de reconocimiento como dianas de células cancerosas que incluyen herceptin y ácido fólico (FA), para lograr Bioimágenes dirigidas a tumores vía microscopia de fluorescencia o conjugarse con materiales como gadolinio y glutatión para obtener imágenes de células cancerígenas, vía tomografía computarizada de fluorescencia (H. Li et al., 2017) (L. Han et al., 2017) (C. Zhang et al., 2013)

### **1.11. *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM)**

SARM es un coco Grampositivos de 0,5 a 1,5  $\mu\text{m}$  de diámetro, que se agrupa de forma irregular, son bacterias inmóviles, no forman esporas, generalmente no poseen cápsula y salvo raras excepciones son facultativas, además, son resistentes a altas temperaturas y pueden crecer en medio con elevada salinidad. (Cervantes-García, García-González, & Salazar-Schettino, 2014)

Como en la mayoría de las bacterias Grampositivas, los componentes fundamentales de la pared celular son el peptidoglicano y ácidos teicoicos. El peptidoglicano representa la mitad del peso de la pared celular proporcionando forma y estabilidad al microorganismo, e interviene en la patogenia de la infección. Por otra parte, los ácidos teicoicos son polímeros compuestos por rivotol y N-acetil-glucosamina, unidos covalentemente al peptidoglicano o ligados a los lípidos de la membrana bacteriana y representan el 40% del peso de la pared (Berga, 2009). Conjuntamente, a la pared celular está asociada la coagulasa, cuya enzima permite a la bacteria coagular el plasma y diferenciarse de otras cepas (Otto, 2014) .

Los efectos de esta bacteria sobre la salud van desde infecciones cutáneas como foliculitis, y forúnculos, hasta bacteremia grave con metástasis en pulmón, huesos o riñón; probablemente debido a que el microorganismo dispone de varias proteínas de superficie que facilitan su adherencia a componentes de la matriz extracelular (Tong, Davis, Eichenberger, Holland, & Fowler, 2015) . Además, este patógeno ha desarrollado resistencia a fármacos convencionales como los betalactámicos, debido a la producción de betalactamasas plasmídicas que se encargan de hidrolizar el enlace amida del anillo betalactámico de estos antibióticos, permitiéndole evolucionar de forma ininterrumpida. (Deresinski, 2005) (Hulme, 2017)

## **1.12 Antecedentes**

La síntesis de nanoclusters a partir de biomoléculas ha sido una estrategia muy útil ya que el disminuye la toxicidad de los NCs metálicos. Xie *et al.* demostraron mediante análisis de FTIR y fluorescencia, que el grupo hidroxilo de los residuos de tirosina en medio básico (pH = 10) presentes en la proteína aislada de *clorella vulgaris*, eran los encargados de la reducción del metal en la síntesis de nanopartículas. Este análisis comparó el espectro FTIR de la proteína antes y

después de la síntesis de las nanopartículas, indicando la presencia de una banda en  $1162\text{ cm}^{-1}$  característica de vibraciones del grupo fenol previo a la síntesis y se registró la ausencia de esta banda en el espectro posterior a la reacción, Así mismo se observó la aparición de una banda en  $1734\text{ cm}^{-1}$ , la cual es atribuida al grupo fenóxido, que se forma por oxidación del grupo hidroxilo. (J. Xie, Lee, Wang, & Ting, 2007)

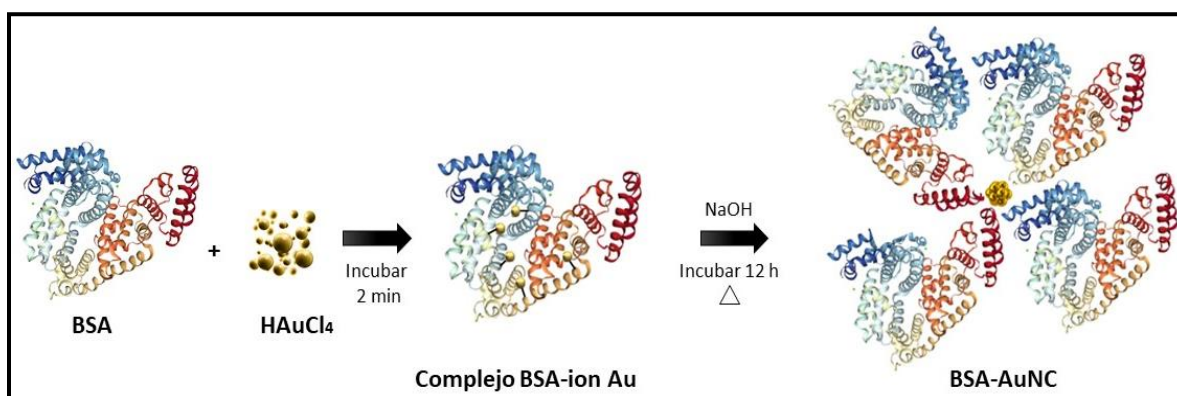


Figura 4. Formación de AuNCs en solución de BSA, tomado de (J. Xie, Lee, Wang, & Ting, 2007), editado por autor.

Ying *et al.* desarrollaron una síntesis verde *in situ* en un paso (**Figura 4**) de AuNCs fluorescente con emisión en el rojo ( $\lambda_{\text{max}} = 640\text{ nm}$ ) y rendimiento cuántico (QY) de 6% a partir de BSA comercial, pH 12 y  $37^\circ\text{C}$ . En este método la BSA capta los iones de  $\text{Au}^{3+}$  y los reduce a  $\text{Au}^0$  progresivamente, debido a la presencia de las cadenas laterales con poder reductor como tioles, anillos aromáticos y la presencia de residuos de tirosina. Posteriormente ocurre la estabilización de estos sistemas a través de la formación de enlaces Au-S, entre los átomos de oro reducidos y los grupos tiol lábiles presentes en los 35 residuos de cisteína. (J. Xie, Zheng, & Ying, 2009a)

Luo *et al* sintetizaron complejos oligoméricos de AuNCs-tiolados a partir del tripéptido glutatión (Glu-Cys-Gly) y  $\text{NaBH}_4$  como agente reductor, obteniendo complejos no luminiscentes con rendimientos cuánticos bajos ( $\text{QY} \leq 15\%$ ); sin embargo las propiedades luminiscentes del

complejo se optimizaron mediante el mecanismo de emisión inducida por agregación, que consistía en la adición de un solvente menos polar que el agua capaz de romper la capa de hidratación y desestabilizar los complejos para formar agregados. Esta emisión podría atribuirse a la transferencia de carga del ligando al metal o transferencia de carga del ligando al metal-metal, es decir transferencia de carga desde el átomo de azufre en los ligandos tiolados hasta los átomos de Au y posteriormente una relajación radiativa. (Luo et al., 2012)

Muchos de los compuestos antimicrobianos basados en AuNCs al internalizarse en la célula tienen la capacidad de modular la producción de especies de oxígeno reactivo (ROS) que eventualmente matan a la célula bacteriana. Esto ocurre porque los AuNCs perturban los genes responsables de la expresión enzimática que regula el proceso de oxidación, induciendo a las enzimas prooxidativas a expresarse intracelularmente mientras que suprime las enzimas reductivas generando una acumulación de ROS intracelular (K. Zheng, Setyawati, Leong, & Xie, 2017b).

Xie *et al.* sintetizaron AuNCs funcionalizados con sales de amonio cuaternario (QA-AuNC) para combatir SARM, observando que los QA-AuNCs se dirigen selectivamente a las bacterias Grampositivas, exhibiendo excelentes efectos terapéuticos contra estas bacterias tanto *in vitro* como *in vivo*, sin ninguna toxicidad asociada o desarrollo de resistencia a los AuNCs; permitiendo hacer recuento de bacterias guiadas por imágenes de microscopía de confocal de fluorescencia, ya que interactúan de manera diferente con bacterias vivas y muertas y con una cinética del tiempo de eliminación similar a los cuatro antibióticos usados comúnmente: ampicilina, oxacilina, linezolid y vancomicina. (Y. Xie et al., 2018)

## 2. Materiales y Métodos

### 2.1 Materiales

El laboratorio de espectroscopia atómica y molecular–LEAM suministró los siguientes reactivos para la síntesis y funcionalización de AuNCs:  $\text{HAuCl}_4$  (>99%), albúmina sérica bovina (BSA) (fracción V de grado analítico), [3-(2-piriditiol)-propionato]-N-succinimida (SPDP) de marca sigma-aldrich y Rodamina B. El péptido sintético anclado a los AuNCs designado como NBC2254 fue suministrado por el Núcleo de Biotecnología de Curauma (Chile). Las cepas de SARM fueron suministradas por el Grupo de Investigación de Bioquímica y Microbiología (GIBIM).

### 2.2 Métodos

**2.2.1 Síntesis de AuNCs:** Los nanocluster de oro se sintetizaron en base a la metodología propuesta por Xie. Se emplearon 5 mL de una solución acuosa de  $\text{HAuCl}_4$  10 mM que fue añadida sobre 5 mL de una solución de BSA 50 mg/mL bajo agitación constante a 500 rpm y 40 °C. Después de dos minutos de transcurrida la reacción, se adicionó 0,5 mL de NaOH 1 M y se incubó la reacción por 12 horas, cubriendo el montaje con papel aluminio para aislarlo de la luz. Posteriormente se purificó los AuNCs por centrifugación usando filtros de 30 KDa por 15 minutos a 12°C.

**2.2.2 Funcionalización de AuNCs con péptido antimicrobiano:** El péptido bioactivo NBC2254 fue diseñado, sintetizado y estudiado durante la ejecución de un proyecto de maestría llevado a cabo por los grupos de Investigación del GIBIM y LEAM previamente. El péptido NBC2254, cuya secuencia aminoacídica fue CALKLTAKRLVRKIGF, con un peso molecular igual a 1944.48 g/mol y carga neta de +7 (pH 7.0), exhibió notable actividad antimicrobiana contra SARM con una concentración mínima inhibitoria ( $\text{CMI}_{50}$ ) igual a  $6.2 \pm 0.02 \mu\text{M}$ . El péptido también mostró elevada especificidad por la bacteria con un índice igual a 9.01 respecto a células eucariotas (Prada et al., 2019)

La conjugación de los AuNCs al péptido se realizó mediante la modificación de los grupo amino presentes en la BSA que protege los átomos de oro, empleando el agente entrecruzante bifuncional [3-(2-piriditiol)-propionato]-N-succinimida (SPDP), de acuerdo con el esquema planteado en la **figura 5A**. Finalmente, se realizó la conjugación covalente del péptido NBC2254 a los AuNCs modificados previamente con el SPDP como se ilustra en la **figura 5B**. A una solución de 5 mL de AuNC se le adicionó 125  $\mu$ L de SPDP (15 mM) en DMFy 250  $\mu$ L de NaOH (1 mM). La reacción transcurrió en 2 horas bajo agitación de 250 rpm y 37°C. Posteriormente, se eliminaron las especies no reactivas y sales mediante una columna G-25 con capacidad de 5 mL. Finalmente se ancló el péptido NBC2254 al sistema AuNCs@SPDP (Figura 5B) adicionando 5 mg de péptido disuelto en 1 mL de agua y 50  $\mu$ L de NaOH 1mM; la reacción transcurrió en 12 horas bajo agitación de 250 rpm y 37° C. El sistema AuNC@NBC2254 fue purificado por centrifugación en amicones de 3 KDa a 12000 rpm por 15 minutos. El producto purificado fue liofilizado y almacenado a 4°C.

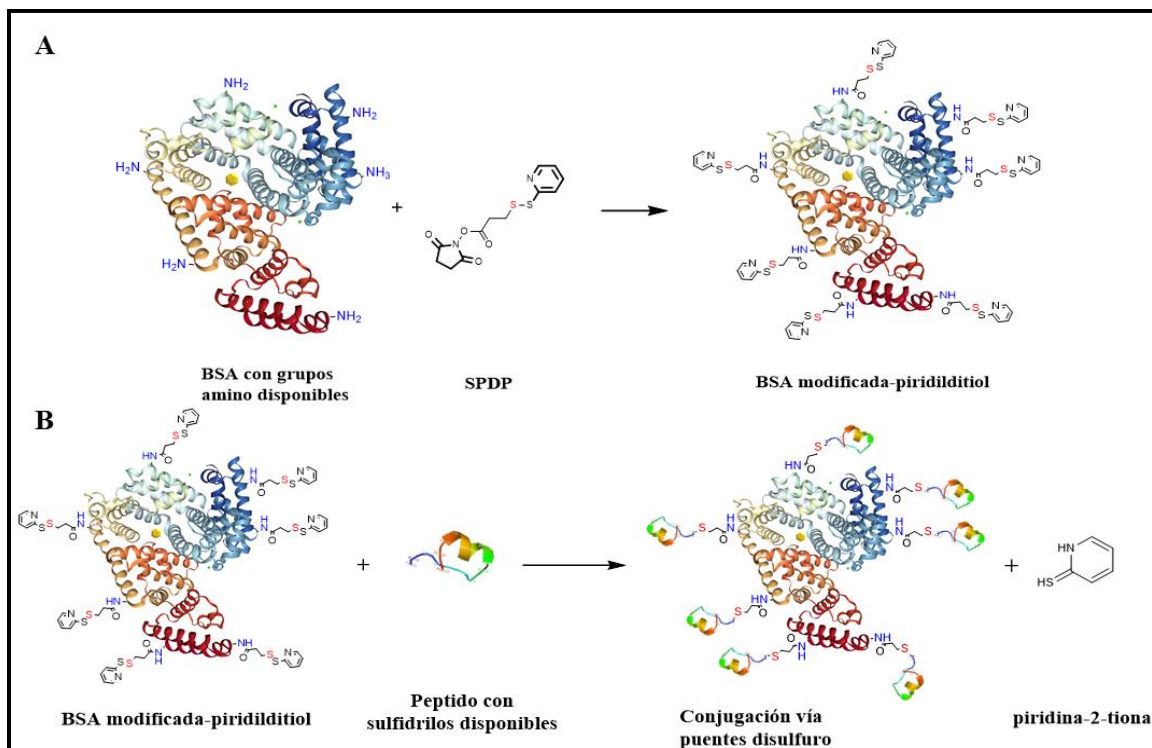


Figura 5. A) Modificación de los AuNCs empleando SPDP. B) Estrategia de funcionalización de los AuNCs al péptido. (Instructions SPDP crosslinkers, s. f.)

### 2.2.3 Caracterización de los sistemas nanoestructurados:

**2.2.3.1 Ultravioleta visible:** Una muestra de AuNCs y AuNCs@NBC2254 de concentración igual [1mg/mL] fueron analizados en un espectrofotómetro SHIMADZU Modelo UV-600, equipado con una lámpara de deuterio, un sistema monocromador sencillo y doble haz, operado con un ancho de banda espectral de 0.1 nm, en un rango de 300-700 nm. El equipo está adscrito al Laboratorio de Espectroscopia Atómica y Molecular (LEAM) de la Universidad Industrial de Santander. Los espectros fueron adquiridos usando una microcelda de cuarzo de 400  $\mu\text{L}$  y paso óptico de 0,5 cm.

**2.2.3.2 Dispersión dinámica de la luz:** El tamaño hidrodinámico de las nanoestructuras se midió usando un equipo Zetasizer Z90 (Malvern) equipado con un láser de Nd-YAG de 635 nm a un ángulo de 90°; usando como parámetro el índice de refracción de los AuNCs (0.004). El equipo se encuentra adscrito al Laboratorio de Espectroscopía del Parque Tecnológico Guatiguará. Para este análisis, se depositó 500 µL de solución de cada uno de los nanocluster de oro en una celda de polipropileno. La medición se realizó por triplicado con tiempo de espera entre medida de 10 segundos y acumulaciones de máximo 50 scans.

**2.2.3.3 Potencial zeta:** Este parámetro se midió en un zetámetro, el cual se encuentra incorporado en el Zetasizer Z90 descrito en el inciso 3.2.3.2. Se usó una celda de polipropileno DT1070 de 1 mL de capacidad y se aplicó una diferencia de potencial de 21 mV.

**2.2.3.4 Espectroscopía de fluorescencia:** Se obtuvieron los espectros de emisión de los AuNCs y AuNCs@NBC2254 empleando un espectrofluorímetro Photon Technology International Modelo PTI3211 y lámpara de xenón con potencia máxima de 75W; controlado por el software FeliX32 Spectroscopy, adscrito al laboratorio de espectroscopía atómico y molecular del Parque Tecnológico Guatiguará. Los espectros se adquirieron con tiempo de integración de 2 segundos en un microcelda de cuarzo de 400 µL con paso óptico de 0,5 cm. Los espectros de emisión para AuNC@NBC2254 se tomaron en un rango de 550 nm y 700 nm con un barrido de longitudes de onda ( $\lambda_{exc}$ ) de excitación (310 – 395 nm).

**2.2.4 Rendimiento cuántico:** El rendimiento cuántico se midió utilizando el espectrofotómetro descrito en el numeral 3.2.3.1 y el espectrofluorímetro descrito en el numeral 3.2.3.4. usando como patrón de referencias la Rodamina B (RoB), la cual emite en el mismo rango de emisión de los AuNCs@NBC2254. Los pasos metodológicos se describen a continuación:

1. Se preparó una solución de RoB en etanol a una concentración de  $1,1 \times 10^{-3}$  M y se adquirió su espectro de absorción para conocer su  $\lambda_{\text{Máx}}$  absorción en el rango de 300- 700 nm.
2. Se preparó una solución de AuNC@NBC2254 en agua a una concentración de  $1,1 \times 10^{-3}$  M y se registró su espectro de absorción para conocer su  $\lambda$  máxima de absorción en el rango de 300–700 nm a su vez se registró su espectro de excitación en el rango de 300-500 nm.
3. Debido a la ausencia de bandas de en el espectro de absorción y el espectro de excitación de los AuNC@NBC2254 no se pudo superponer los espectros de absorción de RoB y los AuNC@NBC2254 para encontrar el punto de intersección entre los de ambas muestras. Por lo tanto, se usaron los valores del barrido de longitudes de onda de excitación mencionados en el numeral 2.2.3.4 para seleccionar  $\lambda_{\text{máx}}$  de absorción.
4. Se tomaron los espectros de absorción y emisión de diferentes disoluciones seriadas de RoB ( $1 \times 10^{-6}$  M,  $2 \times 10^{-6}$  M,  $3 \times 10^{-6}$  M,  $4 \times 10^{-6}$  M,  $5 \times 10^{-6}$  M y  $6 \times 10^{-6}$  M). Se fijó un rango de 350-650nm como ventana espectral para los espectros de absorción y de 503-650 nm para los espectros de emisión con una  $\lambda_{\text{máx}}$  de excitación a 380 nm.
5. Finalmente, se adquirieron los espectros de absorción y emisión de los AuNC@NBC2254 a las mismas concentraciones de RoB. Se fijó un rango de 300-700nm como ventana espectral para los espectros de absorción y de 560 a 707 nm con una longitud de onda de excitación a 380 nm.

**2.2.5 Cultivo de SARM:** La cepa bacteriana de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) utilizada en el estudio, fue suministrada por el Laboratorio de Bioquímica y Microbiología (GIBIM) perteneciente a la Universidad Industrial de Santander. Inicialmente se tomaron de 2 a 3 unidades formadoras de colonia (UFC) de un cultivo fresco de SARM. Posteriormente se realizó el preinóculo en medio de cultivo Mueller Hinton (MH) durante 12 horas, a 37°C y 200 rpm en un agitador orbital Thermo Scientific MaxQ4450. Después de las 12 horas de incubación se utilizó el preinóculo puro y una dilución 1/10 del preinóculo bacteriano en medio MH estéril, luego se midió a 595 nm en un Equipo Lector de Microplacas de ELISA BioRad iMark hasta tener una concentración aproximada de  $7 \times 10^8$  UFC/mL en la dilución 1/10.

**2.2.6 Obtención de bioimágenes de SARM empleando los AuNC@NBC2254:** Las bioimágenes se tomaron en un Microscopio de fluorescencia Olympus BX51, con una lámpara de xenón de potencia 75W para luz reflejada y fluorescencia y está equipado con una lámpara halógena de 30W de potencia y un voltaje de 6V que cuenta con preselección de la intensidad y ventana espectral en el rango del rojo y platina mecánica con superficie cerámica que permite ajuste de tensión y movimiento en los ejes XY.

- I. Se tomó 1 alícuota de 500  $\mu$ L del preinóculo SARM y 1 alícuota de 500  $\mu$ L del preinóculo diluido 1/10, con el fin de determinar la concentración de bacterias adecuada para el ensayo sin variar drásticamente la concentración del medio de cultivo que favorece el crecimiento óptimo. Las alícuotas fueron centrifugadas durante 15 minutos a 3500 rpm, se descartó el sobrenadante y el pellet fue lavado tres veces con 500  $\mu$ L de solución salina al 0.9%. A continuación, se retiró todo el sobrenadante de los lavados y se agregó a cada pellet 300  $\mu$ L AuNC@NBC2254 [25 mg/mL].
- II. Se tomaron dos alícuota de 500  $\mu$ L de preinóculo SARM, las cuales se centrifugaron y se lavaron con solución salina 0.9% a las mismas condiciones anteriores. Sobre el pellet de

bacterias de una alícuota fueron adicionados 300  $\mu\text{L}$  de AuNC@NBC2254 [12 mg/mL] y sobre el pellet de la otra alícuota se adicionaron 300  $\mu\text{L}$  de Hoechst 33342 [0,5mg/mL] y posterior a 3 lavados con solución salina 0,9% se adicionó 300  $\mu\text{L}$  de AuNC@NBC2254 [12 mg/mL].

- III. Las cuatro alícuotas fueron mezcladas con los AuNC@NBC2254 suavemente e incubadas durante 10 minutos a 37°C. Las muestras fueron centrifugadas durante 15 minutos a 3500 rpm y lavadas con solución salina al 0.9% (tres veces).
- IV. Finalmente, cada pellet fue resuspendido en 500  $\mu\text{L}$  de solución salina y se tomaron 10  $\mu\text{L}$  de cada muestra, los cuales se depositaron y fijaron en un portamuestras para microscopio.

**2.2.7 Análisis por Microscopia de barrido electrónico SEM:** Las muestras se recubrieron con oro y se obtuvieron las imágenes usando el microscopio electrónico de barrido QUANTA FEG 650 en alto vacío, con voltaje de aceleración de 15 kV, detector *Everhart Thornley* (ETD) y un detector *back scattered electron* (BSED) para observar variaciones de composición, el cual permitió observar morfología de SARM antes y después del tratamiento con los nanoclústers de oro. Adicionalmente, se realizó un análisis elemental por la técnica de energía dispersiva de Rayos-X (EDX). El software EDX Genesis incorporado al QUANTA FEG 650 fue usado para analizar los datos y obtener información semicuantitativa de los elementos químicos.

Para la obtención de imágenes por SEM se realizó un protocolo de marcaje similar al descrito en el inciso 3.2.6 con las siguientes variaciones:

1. Se tomaron cuatro alícuotas de 500  $\mu\text{L}$  de preinóculo de SARM. Una de estas alícuotas se usó como patrón.

2. Las concentraciones de AuNC-NBC2254 usadas para los tres marcajes fue 100 $\mu$ g/mL, 12 mg/mL y 25 mg/mL respectivamente.
3. Se depositaron y se fijaron 10  $\mu$ L de cada muestra sobre portamuestras de vidrio recubiertas con oro.

### 3. Resultados y análisis

#### 3.1 Síntesis y Funcionalización de AuNC

Siguiendo la ruta sintética descrita por Xie et al, se lograron obtener los AuNCs. En los sistemas nanométricos los cambios de coloración son un indicador de la modificación de sus propiedades ópticas en función del tamaño. En la **figura 6A**, se observa la apariencia amarillenta propia de la solución de iones  $\text{Au}^{3+}$  al inicio de la reacción y como este color se torna naranja oscuro al cabo de las 12 horas de proceso de reducción y formación de los AuNCs como se evidencia en la **figura 6B**.

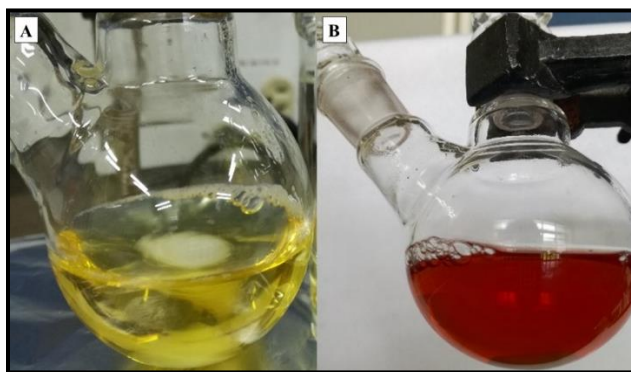


Figura 6. Obtención de AuNCs usando BSA. A) Inicio de la reducción de  $\text{Au}^{3+} \rightarrow \text{Au}^0$ . B). AuNCs formados.

Posteriormente, se realizó la purificación de los AuNCs, seguida de su modificación superficial usando el crosslinker (SPDP), el cual se unió covalentemente a los grupos amino disponibles en la superficie de la BSA, que protege los átomos de Au reducidos. Finalmente, se realizó la funcionalización del NBC2254 a través de un enlace disulfuro S-S formado por la reacción entre el grupo tiol del residuo de cisteína presente en el extremo C-terminal del péptido y el grupo 2-mercapto-piridina altamente reactivo previamente introducido en la superficie de los AuNCs al modificar la BSA con el SPDP. En la **figura 7**, se puede observar que la coloración y apariencia de los sistemas AuNCs@NBC2254 no cambia respecto a los AuNC.

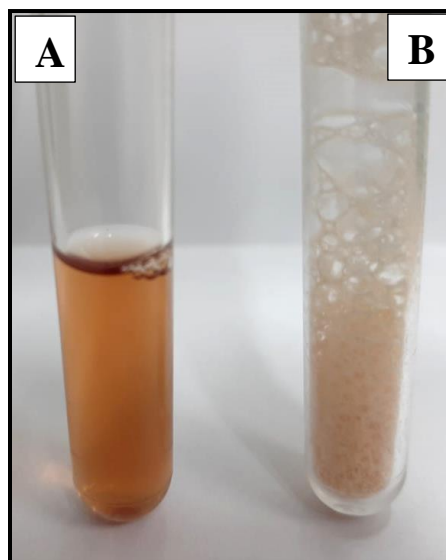


Figura 7. AuNC@NBC2254 A) Líquidos B) Liofilizados

### 3.2 Caracterización fisicoquímica de los AuNCs y AuNC@NBC2254

El análisis por DLS del tamaño hidrodinámico de los AuNCs y los AuNC@NBC2254 arrojó como resultado un diámetro igual a  $2.43 \pm 0,54$  nm en el caso de los AuNCs no funcionalizados y de  $6.15 \pm 0,85$  nm para los AuNC@NBC2254 como se muestra en la **figura 8**. Este notable aumento en el tamaño nanométrico puede estar no solo relacionado con la conjugación del péptido sobre la

superficie de los AuNCs, además es de considerar la aparición de agregados producto de las interacciones no covalentes y reacciones de entrecruzamiento entre los nanoclústers modificados con el SPDP (AuNC-SPDP) antes de la adición del péptido. Sin embargo, como se evidencia más adelante en el análisis por espectroscopia de fluorescencia, este aumento de tamaño no afectó las propiedades fotoluminiscentes de los nanoclústers de oro ya que el aumento el diámetro es debido a cambios en la superficie y no en el corel metálico de Au<sup>0</sup>.

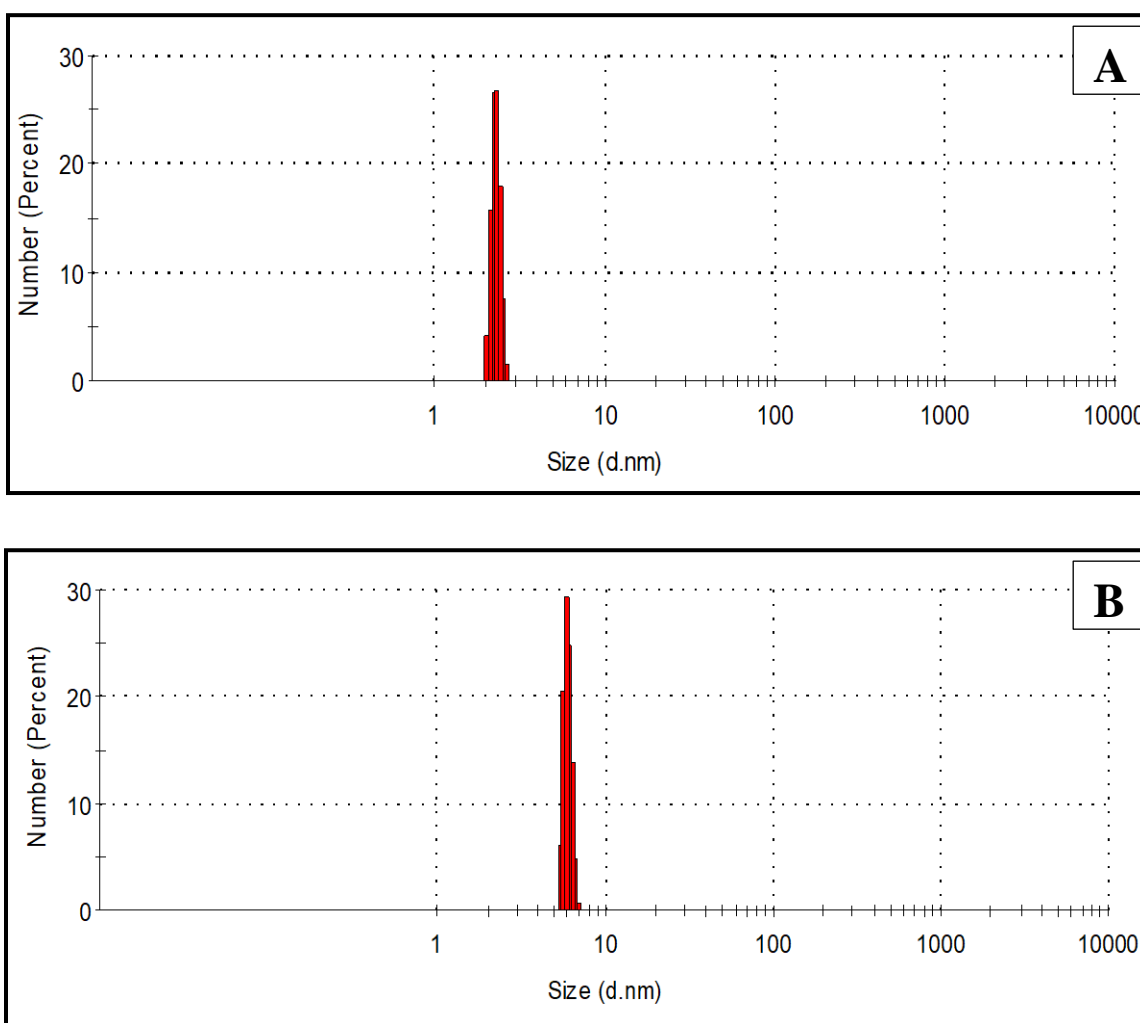


Figura 8. Análisis por DLS del tamaño hidrodinámico de A)AuNCs y b)AuNC@NBC2254.

La medición del potencial zeta para ambos sistemas registró un  $\zeta$  igual a -39.4 mV (**Anexo A**) para los AuNCs como resultado de la carga negativa atribuida a la BSA que a pH neutro se encuentra mayoritariamente desprotonada, considerando que su punto isoeléctrico (pI) es 4.5. Este valor garantiza un sistema nanoestructurado altamente estabilizado por repulsión electrostáticas como se ha reportado en estudios previos (Vogel et al., 2017). Por otra parte, los AuNC@NBC2254 registraron un valor de 4.59 mV (**Anexo B**). Este valor positivo en el potencial después de la funcionalización de los AuNC con el péptido catiónico es una evidencia importante de la eficiencia del proceso de funcionalización ya que ahora el equilibrio en la doble capa de iones tiende a ser positiva luego de la unión covalente del péptido a la superficie. Es de mencionar que algunas moléculas de péptido pueden haberse ligado por atracción electrostática, sin embargo, este nuevo sistema es efectivamente estabilizado no solo por fenómenos de atracción/repulsión sino también por impedimentos estéricos que evitan que los AuNCs@NBC2254 convalezcan. Es notable que un potencial zeta positivo en los AuNCs@NBC2254 asegura las interacciones electrostáticas con la membrana bacteriana, en el caso de SARM dicha interacción es favorecida por la presencia de ácidos teicoicos que otorgan una densidad de cargada negativa a la pared celular de la bacteria. (Webster & Seil, 2012) (Huh & Kwon, 2011).

En la **figura 9**, se presenta el espectro de absorción y de excitación (Ver **Anexo C**) se observó la ausencia de bandas de definidas. Sin embargo, se evidencia el decaimiento de una banda desde 300-450 nm, la cual es atribuida a las transiciones electrónicas  $n \rightarrow \pi^*$  y  $\pi^* \rightarrow \pi$  del enlace peptídico en la proteína. Es conocido que las nanopartículas de oro y las superficies ultradelgadas de metales nobles presentan una banda de resonancia plasmónica, cuya observación preliminar evidencia la naturaleza química del metal en la nanoestructura; en el caso de los plasmones de oro aparece alrededor de los 540 nm; la ausencia de dicha banda en este tipo de nanoclusters se debe

principalmente a que las estructuras ultrafinas de átomos Au<sup>0</sup> son del orden sub-nanomético (< 2.0 nm) y a esta escala dichos sistemas tienden a comportarse como sistemas moleculares en la medida que pierden su carácter metálico. (J. Zheng, Zhou, Yu, & Liu, 2012)

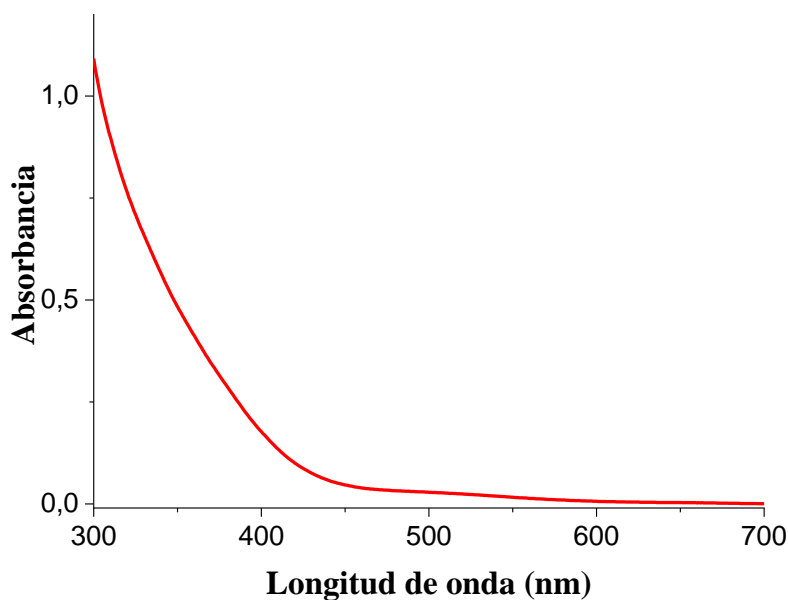


Figura 9. Espectro de UV-Vis de AuNC.

En la **figura 10**, se observan los AuNCs irradiados con una fuente láser portátil de 340 nm. El tamaño sub-nanométrico del *core* metálico inmerso y protegido por la BSA otorga a estas nanoestructuras propiedades fotoluminiscentes altamente estables como fue corroborado por el análisis de espectroscopia de fluorescencia. Para el estudio de las propiedades optoelectrónicas de los AuNCs y los AuNCs@NBC2254 se realizó un barrido de longitudes de onda de excitación entre 310-390 nm. En este barrido de longitudes de onda de excitación se encontró que la máxima emisión se logra al excitar a 380 nm. Para corroborar este resultado, se cambió a escala logarítmica el eje Y del espectro de absorción, con lo cual se evidencia una banda no resuelta a 380 nm (Ver **Anexo D**).

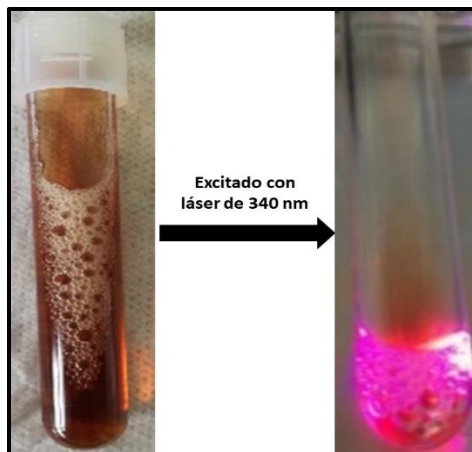


Figura 10. Fluorescencia de AuNC excitados con láser de 340 nm.

En la **figura 11** se observan los espectros de emisión con una  $\lambda_{\text{máxima}}$  de emisión a 631 nm tanto para los AuNCs como para los AuNCs@NBC2254, lo cual evidencia que el proceso de biofuncionalización no afectó las propiedades luminiscentes y que la emisión es debida de los agregados atómicos de Au<sup>0</sup>.

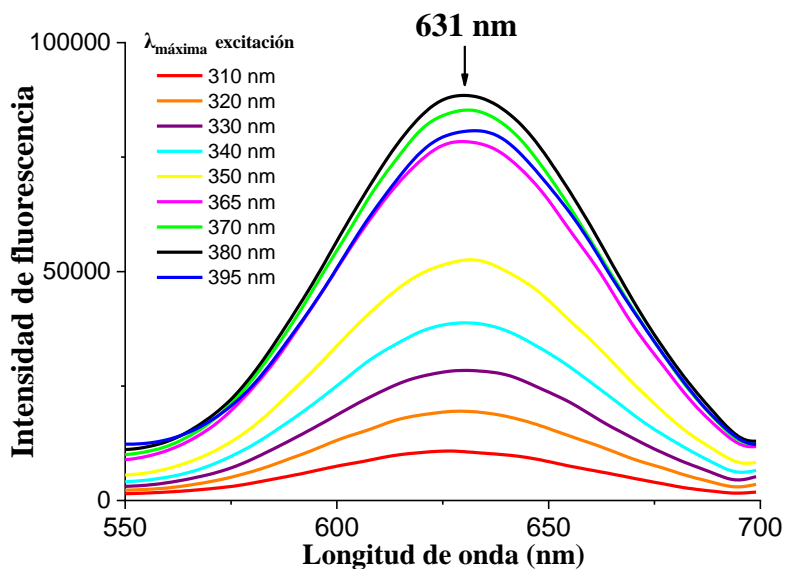


Figura 11. Espectros de emisión de fluorescencia de los AuNC a diferentes  $\lambda$  de excitación.

### 3.3 Rendimiento cuántico de AuNC@NBC2254

Para la determinación del rendimiento cuántico de los AuNCs, se utilizó como patrón de referencia RoB ya que su  $\lambda_{\text{máx}}$  de emisión se encuentra en una región espectral cercana al  $\lambda_{\text{máx}}$  de emisión de los AuNCs (**Figura 12**) (Knoll, 2000).

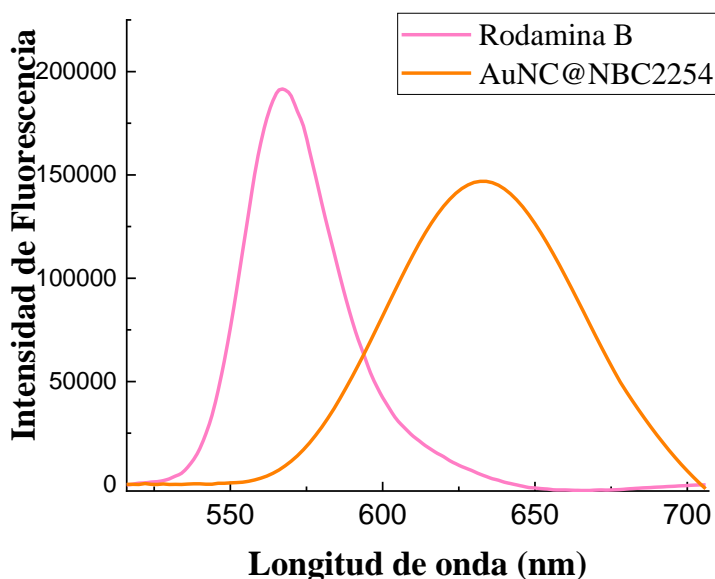


Figura 12. Espectro de Fluorescencia de Rodamina B y AuNC@NBC2254

A partir del análisis de los espectros de UV-Vis de la Rodamina B y de los AuNC@NBC2254 mostrado en el **Anexo E**, se escogió 380 nm como longitud de onda de excitación para adquirir los espectros de fluorescencia de la referencia y de la muestra; estos espectros son recopilados en los **Anexo F-G**. Se construyeron gráficas de emisión de fluorescencia integrada Vs Absorbancia, para finalmente determinar la pendiente de cada recta por un ajuste de regresión lineal que se observa en la **Figura 13**.

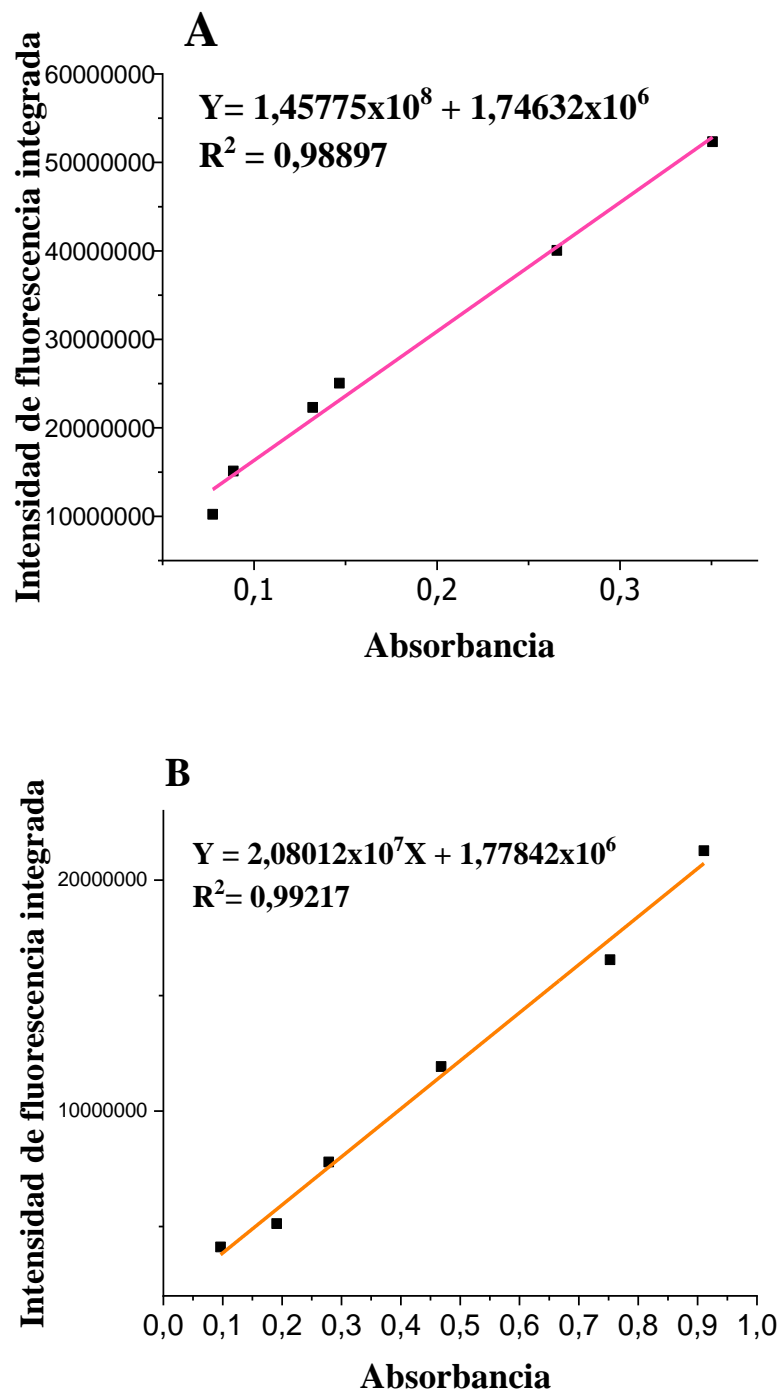


Figura 13. Regresión lineal entre intensidad de fluorescencia integrada y absorbancia A). Rodamina B. B). AuNC-NBC2254

Los valores de las pendientes fueron  $1,45775 \times 10^8$  para la Rodamina B y  $2,08012 \times 10^7$  para los AuNC@NBC2254. Estos valores fueron reemplazados en la **ecuación 2** para calcular el rendimiento cuántico de AuNC@NBC2254 (Couch, Meyer, Heller, & Johnson, 2018)

$$\Phi_x = \Phi_s * \left(\frac{m_x}{m_s}\right) * \left(\frac{n_x}{n_s}\right)^2 * 100$$

$$\Phi_{\text{AuNC}} = 0,73 * \left(\frac{20801200}{145775000}\right) * \left(\frac{1,333}{1,361}\right)^2 * 100$$

$$\% \Phi_{\text{AuNC}} = 9,94\%$$

El rendimiento cuántico obtenido para los AuNC@NBC2254 fue de 9,94%, dicho valor se estima que es un resultado óptimo en comparación a los reportes de rendimiento cuántico de que se han realizado en la obtención de este tipo de nanoestructuras. Además, se infiere que en estos sistemas, el proceso de emisión de fluorescencia supera a los procesos de desactivación no radiante (J. Xie, Zheng, & Ying, 2009) (Palma & Jana, 2014).

### 3.4 Obtención de imágenes de SARM por microscopía de fluorescencia

De la micrografía del preinóculo de SARM marcado con AuNC@NBC2255 [25mg/mL] se verificó la presencia de estructuras con morfología de cocos y la formación de racimos característicos de *Staphylococcus* como se es mostrado en la **figura 14A**. Estas estructuras emiten en el rango del rojo, demostrando la eficiente unión de AuNC@NBC2254 a la bacteria, lo cual hace posible la adquisición de imágenes. Con la disminución de la concentración de bacterias se obtuvo una imagen del marcaje de SARM con mejor resolución, ya que se pueden observar las células de SARM más espaciadas, evitando la aglomeración y el apagamiento de la fluorescencia inducido por los fenómenos de agregación como se hace evidente en el recuadro **figura 14B**. Finalmente,

se logró ajustar la concentración adecuada de AuNCs a 25 mg/mL y la bacteria ha sido diluida 10 para lograr imágenes distinguibles y con mayor nitidez de la bacteria como se observa en la **figura 14C**.

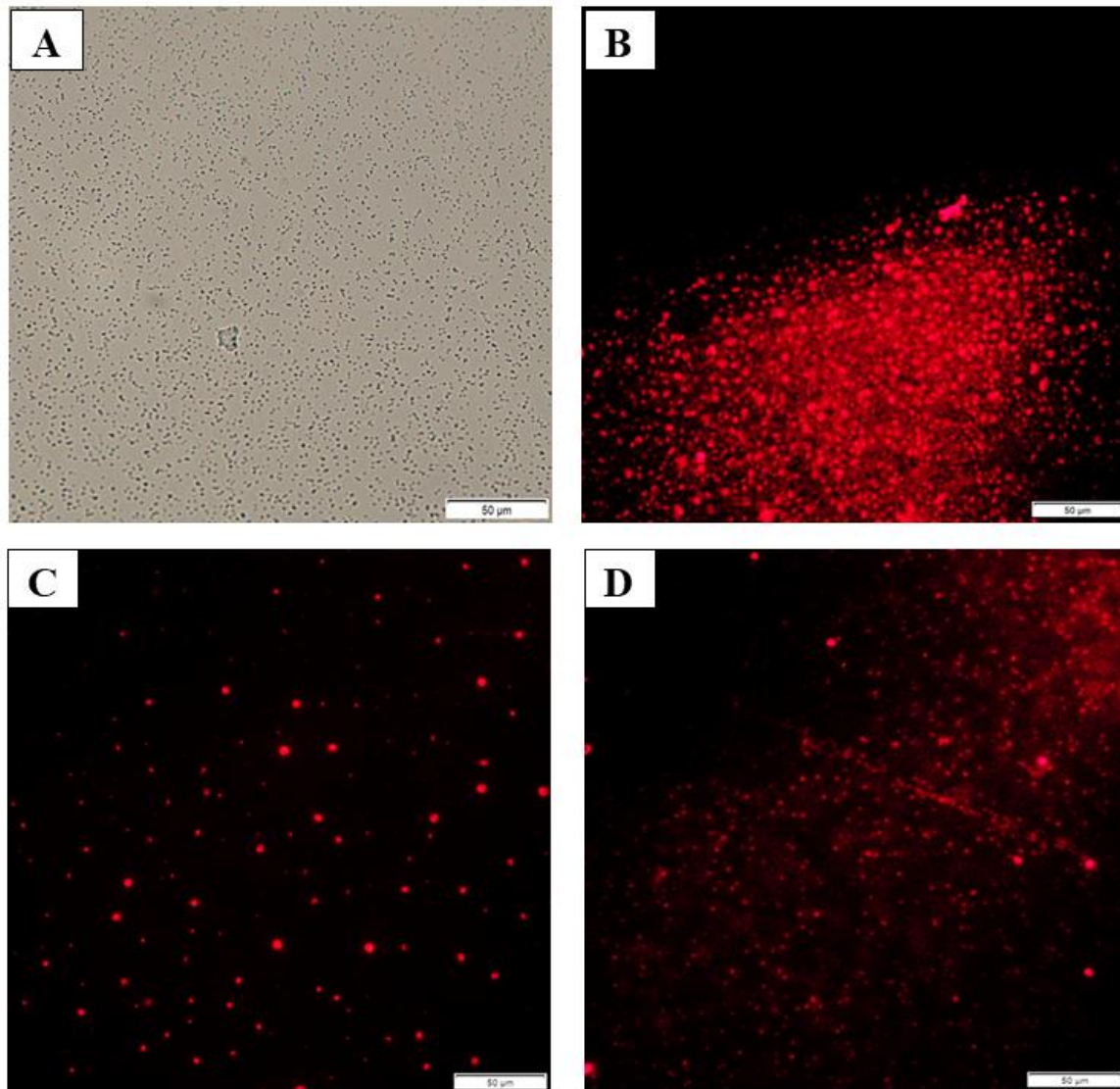


Figura 14. A) Imagen obtenida mediante microscopía óptica del preinóculo de SARM marcada con AuNC@NBC2254 [25 mg/mL] B) Imagen de microscopía de fluorescencia de muestra del preinóculo de SARM marcada con AuNC@NBC2254 [25mg/mL] C) Imagen de microscopía de fluorescencia de dilución 1/10 del preinóculo de SARM marcada con AuNC@NBC2254 [25mg/mL]. D). Imagen de

microscopía de fluorescencia de muestra del preinóculo de SARM marcada con AuNC@NBC2254 [12mg/mL]. Todas las muestras se incubaron por 10 minutos Escala: 50  $\mu$ m.

Adicionalmente, se marco la bacteria SARM con Hoechst 33342 (marcador de material genético con emisión en el azul) y con AuNC@NBC2254, lo cual evidenció que efectivamente el marcaje por parte del sistema nanoestructurado ocurre a nivel de membrana bacteriana.(Imagen mostrada en el **Anexo H**) (Prada et al., 2019)

### 3.5 Obtención de imágenes SARM mediante microscopia electrónica de barrido-SEM

En la **figura 15B**, las microfotografías de SEM evidencian la interacción entre SARM y AuNC@NBC2254, debido a que las nanoestructuras de oro alteran la morfología de la bacteria, expresándose en este caso como turgencia. Esta actividad antibacteriana se atribuye al estrés oxidativo por el incremento de formación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Además, se observan septos o líneas de separación lo que infiere que AuNC@NBC2254 interfiere con la división celular (Webster & Seil, 2012).

En la **figura 15C**, con el aumento de concentración del marcador se observa que las nanoestructuras alteran la integridad de la membrana bacteriana, generando disrupción de la misma; lo cual confirma los resultados previos sobre la acción del péptido en la membrana SARM (Prada et al., 2019) (Cui et al., 2012). Al continuar aumentando la concentración de los AuNC@NBC2254 hasta el doble de la inicial, se observa como las nanoestructuras se van depositando e intercalando en las asociaciones de *cocos* rompiendo las interacciones entre las células de *Staphylococcus* como es notorio en la **figura 15D**. El análisis semicuantitativo EDS de dicha capa depositada sobre la bacteria (**Anexo I**) confirmó la presencia oro el cual proviene de los sistemas AuNC@NBC2254; ya que, al comparar la señal de Au entre la región donde solo se

observan las bacterias y la región de la cobertura blanca, se observa un cambio aproximado desde 0,5 hasta 1,7 Kcnt; dicho resultado confirma la presencia y fijación efectiva del marcador sobre la membrana de SARM.

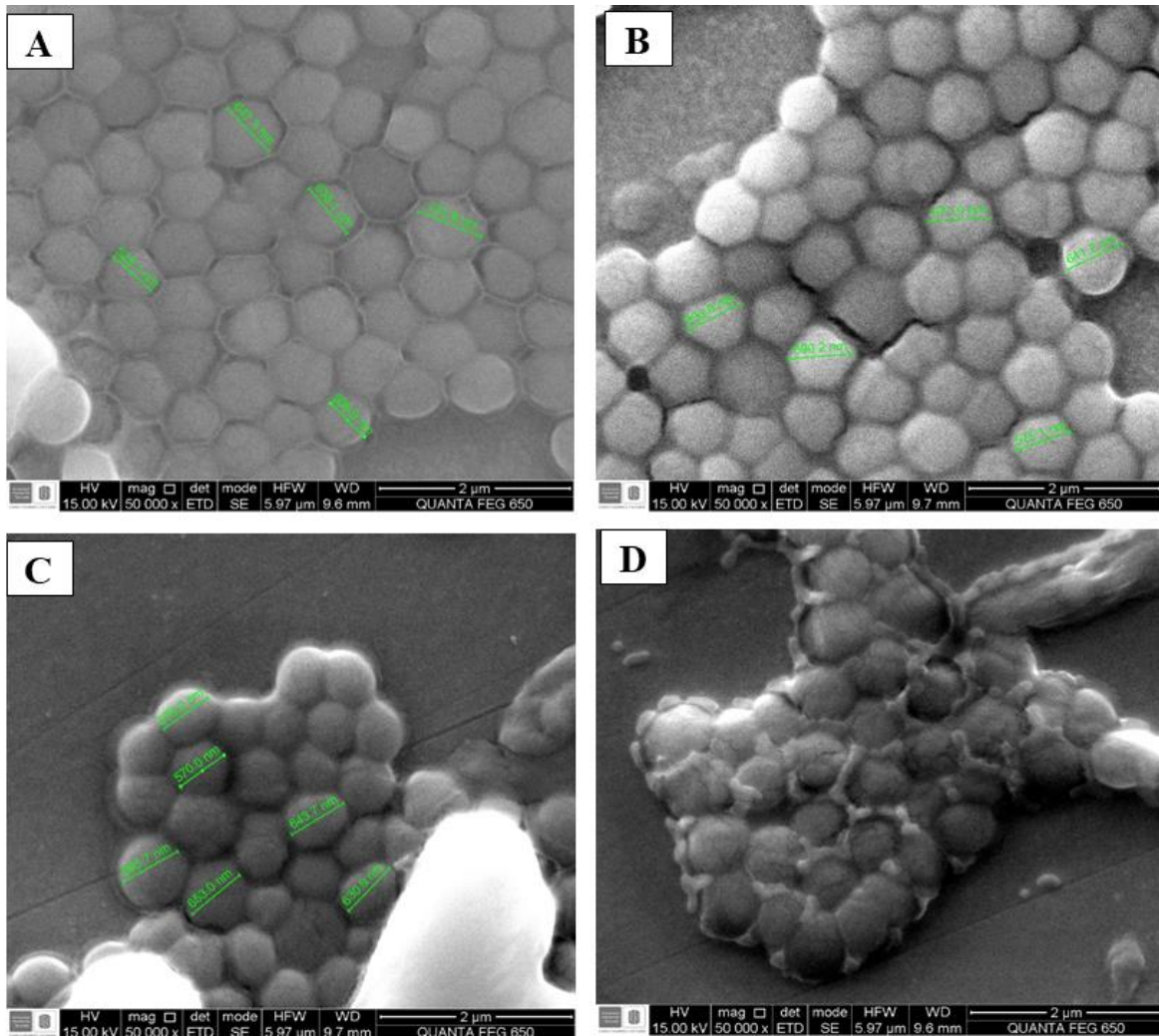


Figura 15. Análisis por Microscopía de Barrido Electrónico de SARM marcado con diferentes concentraciones de AuNC@NBC2254. A) Muestra de SARM sin AuNC@NBC2254 B) Muestra de SARM marcado con AuNC-NBC2254 [100µg/mL] C) Muestra de SARM marcado con AuNC-NBC2254 [12mg/mL]. D) Muestra de SARM marcado con AuNC-NBC2254 [25mg/mL].

#### 4. Conclusiones

Se logró obtener AuNCs de 2,34 nm utilizando albumina de suero bovino como agente reductor y agente estabilizante mediante una técnica verde de *one pot* y funcionalizar este sistema nanoestructurado con el péptido sintético sintético NBC 2254, gracias al uso del agente reticulante bifuncional [3-(2-piriditiol)-propionato]-N-succinimida (SPDP).

La conjugación de los AuNCs con el péptido NBC2254 generó cambios en el tamaño del sistema, sin embargo, no altera las propiedades fotoluminiscentes lo cual garantiza que el *core* metálico se mantiene intacto después de este proceso.

El carácter catiónico del péptido NBC2254, conjugado a las propiedades físicas AuNCs generaron un sistema con tamaño subnanométrico y potencial zeta positivo, activo frente a *Staphylococcus Aureus* resistente a meticilina.

El porcentaje de rendimiento cuántico 9,94 % resalta a los AuNC@NBC2254 como buen marcador frente a otros sistemas nanoestructurados.

Las propiedades fotoluminiscentes del sistema AuNC@NBC2254 permitieron evaluarlo como marcador fluorescente selectivo a SARM y utilizando simplemente microscopia óptica de fluorescencia se obtuvieron imágenes brillantes y nítidas.

Los AuNC@NBC2254 a concentraciones de 100 $\mu$ g/mL puede generar cambios morfológicos en la bacteria y a 25 mg/mL genera disrupción de la membrana bacteriana.

**Referencias bibliográficas**

- Ahmad, T., Wani, I. A., Lone, I. H., Ganguly, A., Manzoor, N., Ahmad, A., ... Al-Shihri, A. S. (2013). Antifungal activity of gold nanoparticles prepared by solvothermal method. *Materials Research Bulletin*, 48(1), 12-20.  
<https://doi.org/10.1016/j.materresbull.2012.09.069>
- Aiken, J. D., & Finke, R. G. (1999). A review of modern transition-metal nanoclusters: Their synthesis, characterization, and applications in catalysis. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 145(1-2), 1-44. [https://doi.org/10.1016/S1381-1169\(99\)00098-9](https://doi.org/10.1016/S1381-1169(99)00098-9)
- Álvarez, M. (2007). *Estructuras supramoleculares generadas por derivados de ácidos biliares y ciclodextrinas*. Univ Santiago de Compostela, Galicia, España.
- Berga, A. P. (2009). Infecciones producidas por *Staphylococcus aureus*. En *Infecciones producidas por Staphylococcus aureus*. MARGE BOOKS.
- Bradshaw, J. P. (2003). Cationic Antimicrobial Peptides. *Biodrugs*, 17(4), 8.
- Caponetti, V., Trzcinski, J. W., Cantelli, A., Tavano, R., Papini, E., Mancin, F., & Montalti, M. (2019). Self-Assembled Biocompatible Fluorescent Nanoparticles for Bioimaging. *Frontiers in Chemistry*, 7. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00168>
- Carter, K. P., Young, A. M., & Palmer, A. E. (2014). Fluorescent Sensors for Measuring Metal Ions in Living Systems. *Chemical Reviews*, 114(8), 4564-4601.  
<https://doi.org/10.1021/cr400546e>
- Castro-Orozco, R., Villafañe-Ferrer, L., Rocha-Jiménez, J., & Alvis-Guzmán, N. (2018). RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN *Staphylococcus aureus* Y *Staphylococcus epidermidis*: TENDENCIA TEMPORAL (2010-2016) Y FENOTIPOS DE

- MULTIRRESISTENCIA, CARTAGENA (COLOMBIA). *Revista Biosalud*, 17(2), 25-36. <https://doi.org/10.17151/biosa.2018.17.2.2>
- Cervantes-García, E., García-González, R., & Salazar-Schettino, P. M. (2014). Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Revista latinoamericana de patología clinica*, 61(1), 13.
- Chattoraj, S., & Bhattacharyya, K. (2014). Fluorescent Gold Nanocluster Inside a Live Breast Cell: Etching and Higher Uptake in Cancer Cell. *The Journal of Physical Chemistry C*, 118(38), 22339-22346. <https://doi.org/10.1021/jp506745p>
- Couch, B., Meyer, A., Heller, B., & Johnson, S. L. (2018). Absolute fluorescence quantum yield determined by photothermal deflection spectroscopy. *Methods and Applications in Fluorescence*, 7(1), 015004. <https://doi.org/10.1088/2050-6120/aae9c9>
- Cui, Y., Zhao, Y., Tian, Y., Zhang, W., Lü, X., & Jiang, X. (2012). The molecular mechanism of action of bactericidal gold nanoparticles on *Escherichia coli*. *Biomaterials*, 33(7), 2327-2333. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.11.057>
- Esumi, K., Suzuki, A., Yamahira, A., & Torigoe, K. (2000). Role of Poly(amidoamine) Dendrimers for Preparing Nanoparticles of Gold, Platinum, and Silver. *Langmuir*, 16(6), 2604-2608. <https://doi.org/10.1021/la991291w>
- Glukhov, E., Stark, M., Burrows, L. L., & Deber, M. (2005). BASIS FOR SELECTIVITY OF CATIONIC ANTIMICROBIAL PEPTIDES FOR BACTERIAL VS. MAMMALIAN MEMBRANES. 26.
- Greenlee-Wacker, M., DeLeo, F. R., & Nauseef, W. M. (2015). How methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* evade neutrophil killing: *Current Opinion in Hematology*, 22(1), 30-35. <https://doi.org/10.1097/MOH.0000000000000096>

- Han, G., Ghosh, P., & Rotello, V. M. (2007). Functionalized gold nanoparticles for drug delivery. *Nanomedicine*, 2(1), 113-123. <https://doi.org/10.2217/17435889.2.1.113>
- Han, L., Xia, J.-M., Hai, X., Shu, Y., Chen, X.-W., & Wang, J.-H. (2017). Protein-Stabilized Gadolinium Oxide-Gold Nanoclusters Hybrid for Multimodal Imaging and Drug Delivery. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 9(8), 6941-6949. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b00246>
- Hancock, R. E. W., & Diamond, G. (2000). The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends in Microbiology*, 8(9), 402-410. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(00\)01823-0](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(00)01823-0)
- Holden, M. T. G., Hsu, L.-Y., Kurt, K., Weinert, L. A., Mather, A. E., Harris, S. R., ... Nubel, U. (2013). A genomic portrait of the emergence, evolution, and global spread of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pandemic. *Genome Research*, 23(4), 653-664. <https://doi.org/10.1101/gr.147710.112>
- Honary, S., & Zahir, F. (2013). Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems—A Review (Part 1). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 12(2). <https://doi.org/10.4314/tjpr.v12i2.19>
- Huh, A. J., & Kwon, Y. J. (2011). “Nanoantibiotics”: A new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. *Journal of Controlled Release*, 156(2), 128-145. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.07.002>
- Hulme, J. (2017). Recent advances in the detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *BioChip Journal*, 11(2), 89-100. <https://doi.org/10.1007/s13206-016-1201-9>
- Instructions SPDP crosslinkers. (s. f.).

- IUPAC Glossary of Terms Used in Toxicology, 2nd Edition IUPAC Recommendations [Product, Program, and Project Descriptions]. (2007). Recuperado 29 de julio de 2019, de <https://envirotoxininfo.nlm.nih.gov/toxicology-glossary-n.html>
- Kluenker, M., Mondeshki, M., Nawaz Tahir, M., & Tremel, W. (2018). Monitoring Thiol–Ligand Exchange on Au Nanoparticle Surfaces. *Langmuir*, *34*(4), 1700-1710. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b04015>
- Knoll, G. F. (2000). *Radiation detection and measurement* (3rd ed). New York: Wiley.
- Laakkonen, P., & Vuorinen, K. (2010). Homing peptides as targeted delivery vehicles. *Integrative Biology*, *2*(7-8), 326. <https://doi.org/10.1039/c0ib00013b>
- Li, H., Huang, H., Wang, A.-J., Feng, H., Feng, J.-J., & Qian, Z. (2017). Simple fabrication of epifibatide stabilized gold nanoclusters with enhanced green fluorescence as biocompatible probe for in vitro cellular imaging. *Sensors and Actuators B: Chemical*, *241*, 1057-1062. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.10.036>
- Li, J., Zhu, J.-J., & Xu, K. (2014). Fluorescent metal nanoclusters: From synthesis to applications. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *58*, 90-98. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.02.011>
- Lichtman, J. W., & Conchello, J.-A. (2005). Fluorescence microscopy. *Nature Methods*, *2*(12), 910-919. <https://doi.org/10.1038/nmeth817>
- Luo, Z., Yuan, X., Yu, Y., Zhang, Q., Leong, D. T., Lee, J. Y., & Xie, J. (2012). From Aggregation-Induced Emission of Au(I)–Thiolate Complexes to Ultrabright Au(0)@Au(I)–Thiolate Core–Shell Nanoclusters. *Journal of the American Chemical Society*, *134*(40), 16662-16670. <https://doi.org/10.1021/ja306199p>
- Malvern Instruments. (2004). *Zetasizer Nano Series User Manual*. Worcestershire.

- Marisol Faraldos. (2002). *Técnicas de análisis y caracterización de materiales*. España: Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
- Matsuzaki, K. (2009). Control of cell selectivity of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1788(8), 1687-1692.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.09.013>
- Muhammed, M. A. H., & Pradeep, T. (2010). Luminescent Quantum Clusters of Gold as Bio-Labels. En A. P. Demchenko (Ed.), *Advanced Fluorescence Reporters in Chemistry and Biology II* (Vol. 9, pp. 333-353). [https://doi.org/10.1007/978-3-642-04701-5\\_11](https://doi.org/10.1007/978-3-642-04701-5_11)
- Nair, L., Nair, R., & Shenoy, S. (2017). Blood Brain Barrier Permeable Gold Nanocluster for Targeted Brain Imaging and Therapy: An in vitro and in vivo Study. *Journal of Materials Chemistry B*, 5(42), 8314-8321. <https://doi.org/10.1039/C5TB02215K>
- Otero, B. R. (2007). *Estudio estructural y dinámico de sistemas organizados mediante sondas fluorescentes*. Univ Santiago de Compostela.
- Otto, M. (2014). Staphylococcus aureus toxins. *Current Opinion in Microbiology*, 17, 32-37.  
<https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.11.004>
- Palmal, S., & Jana, N. R. (2014a). Gold nanoclusters with enhanced tunable fluorescence as bioimaging probes: Gold nanoclusters with enhanced tunable fluorescence. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 6(1), 102-110.  
<https://doi.org/10.1002/wnan.1245>
- Palmal, S., & Jana, N. R. (2014b). Gold nanoclusters with enhanced tunable fluorescence as bioimaging probes: Gold nanoclusters with enhanced tunable fluorescence. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 6(1), 102-110.  
<https://doi.org/10.1002/wnan.1245>

- Prada, Y. A., Guzmán, F., Ortíz, C., Cabanzo, R., Torres, R., & Mejía-Ospino, E. (2019). New Synthetic Peptides Conjugated to Gold Nanoclusters: Antibiotic Activity Against *Escherichia coli* O157:H7 and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *The Protein Journal*. <https://doi.org/10.1007/s10930-019-09840-9>
- Shao, X.-R., Wei, X.-Q., Song, X., Hao, L.-Y., Cai, X.-X., Zhang, Z.-R., ... Lin, Y.-F. (2015). Independent effect of polymeric nanoparticle zeta potential/surface charge, on their cytotoxicity and affinity to cells. *Cell Proliferation*, 48(4), 465-474. <https://doi.org/10.1111/cpr.12192>
- Studer, V., Bobin, J., Chahid, M., Mousavi, H. S., Candes, E., & Dahan, M. (2012). Compressive fluorescence microscopy for biological and hyperspectral imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(26), E1679-E1687. <https://doi.org/10.1073/pnas.1119511109>
- Sun, J., & Jin, Y. (2014). Fluorescent Au nanoclusters: Recent progress and sensing applications. *J. Mater. Chem. C*, 2(38), 8000-8011. <https://doi.org/10.1039/C4TC01489H>
- Thanh, N. T. K., Maclean, N., & Mahiddine, S. (2014). Mechanisms of Nucleation and Growth of Nanoparticles in Solution. *Chemical Reviews*, 114(15), 7610-7630. <https://doi.org/10.1021/cr400544s>
- Tong, S. Y. C., Davis, J. S., Eichenberger, E., Holland, T. L., & Fowler, V. G. (2015). *Staphylococcus aureus* Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(3), 603-661. <https://doi.org/10.1128/CMR.00134-14>

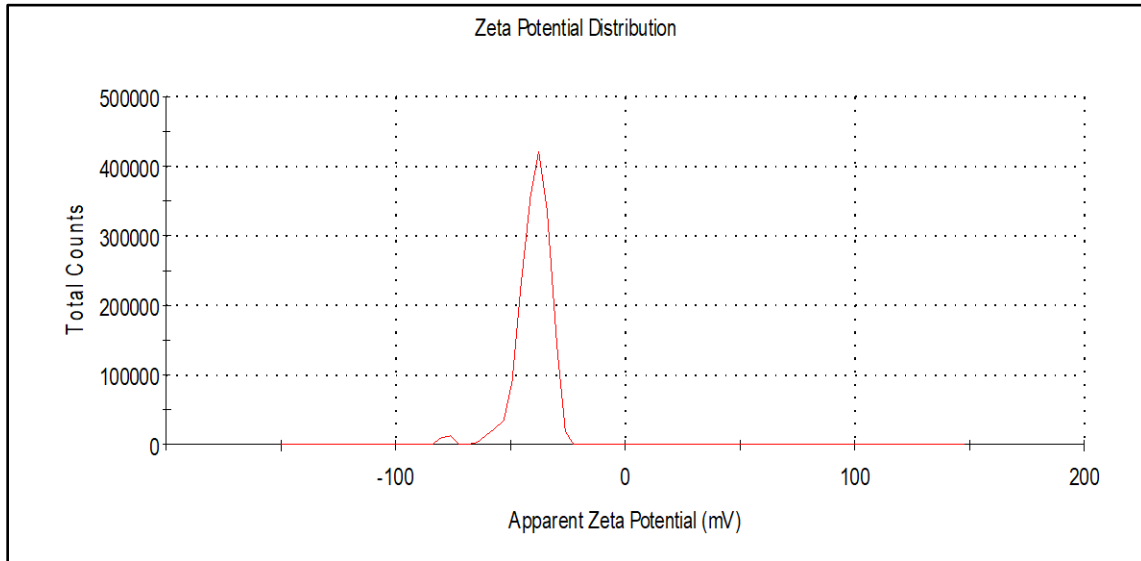
- Vigderman, L., & Zubarev, E. R. (2013). Therapeutic platforms based on gold nanoparticles and their covalent conjugates with drug molecules. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(5), 663-676. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.05.004>
- Vogel, R., Pal, A. K., Jambhrunkar, S., Patel, P., Thakur, S. S., Reátegui, E., ... Broom, M. F. (2017). High-Resolution Single Particle Zeta Potential Characterisation of Biological Nanoparticles using Tunable Resistive Pulse Sensing. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14981-x>
- Wang, G., Mishra, B., Lau, K., Lushnikova, T., Golla, R., & Wang, X. (2015). Antimicrobial Peptides in 2014. *Pharmaceuticals*, 8(1), 123-150. <https://doi.org/10.3390/ph8010123>
- Wang, Y., Hu, L., Li, L., & Zhu, J.-J. (2017). Fluorescent Gold Nanoclusters: Promising Fluorescent Probes for Sensors and Bioimaging. *Journal of Analysis and Testing*, 1(2). <https://doi.org/10.1007/s41664-017-0015-7>
- Webster, T. J., & Seil, I. (2012). Antimicrobial applications of nanotechnology: Methods and literature. *International Journal of Nanomedicine*, 2767. <https://doi.org/10.2147/IJN.S24805>
- Wolfbeis, O. S. (2015). An overview of nanoparticles commonly used in fluorescent bioimaging. *Chemical Society Reviews*, 44(14), 4743-4768. <https://doi.org/10.1039/C4CS00392F>
- Xie, J., Lee, J. Y., Wang, D. I. C., & Ting, Y. P. (2007). Silver Nanoplates: From Biological to Biomimetic Synthesis. *ACS Nano*, 1(5), 429-439. <https://doi.org/10.1021/nn7000883>
- Xie, J., Zheng, Y., & Ying, J. Y. (2009a). Protein-Directed Synthesis of Highly Fluorescent Gold Nanoclusters. *Journal of the American Chemical Society*, 131(3), 888-889. <https://doi.org/10.1021/ja806804u>

- Xie, J., Zheng, Y., & Ying, J. Y. (2009b). Protein-Directed Synthesis of Highly Fluorescent Gold Nanoclusters. *Journal of the American Chemical Society*, *131*(3), 888-889.  
<https://doi.org/10.1021/ja806804u>
- Xie, Y., Liu, Y., Yang, J., Liu, Y., Hu, F., Zhu, K., & Jiang, X. (2018). Gold Nanoclusters for Targeting Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* In Vivo. *Angewandte Chemie International Edition*. <https://doi.org/10.1002/anie.201712878>
- Yahia-Ammar, A., Sierra, D., Mérola, F., Hildebrandt, N., & Le Guével, X. (2016). Self-Assembled Gold Nanoclusters for Bright Fluorescence Imaging and Enhanced Drug Delivery. *ACS Nano*, *10*(2), 2591-2599. <https://doi.org/10.1021/acsnano.5b07596>
- Yao, T., Sun, Z., Li, Y., Pan, Z., Wei, H., Xie, Y., ... Wei, S. (2010). Insights into Initial Kinetic Nucleation of Gold Nanocrystals. *Journal of the American Chemical Society*, *132*(22), 7696-7701. <https://doi.org/10.1021/ja101101d>
- Zhang, C., Zhou, Z., Qian, Q., Gao, G., Li, C., Feng, L., ... Cui, D. (2013). Glutathione-capped fluorescent gold nanoclusters for dual-modal fluorescence/X-ray computed tomography imaging. *Journal of Materials Chemistry B*, *1*(38), 5045.  
<https://doi.org/10.1039/c3tb20784f>
- Zhang, L., & Wang, E. (2014). Metal nanoclusters: New fluorescent probes for sensors and bioimaging. *Nano Today*, *9*(1), 132-157. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2014.02.010>
- Zhang, Y., Yang, M., Portney, N. G., Cui, D., Budak, G., Ozbay, E., ... Ozkan, C. S. (2008). Zeta potential: A surface electrical characteristic to probe the interaction of nanoparticles with normal and cancer human breast epithelial cells. *Biomedical Microdevices*, *10*(2), 321-328. <https://doi.org/10.1007/s10544-007-9139-2>

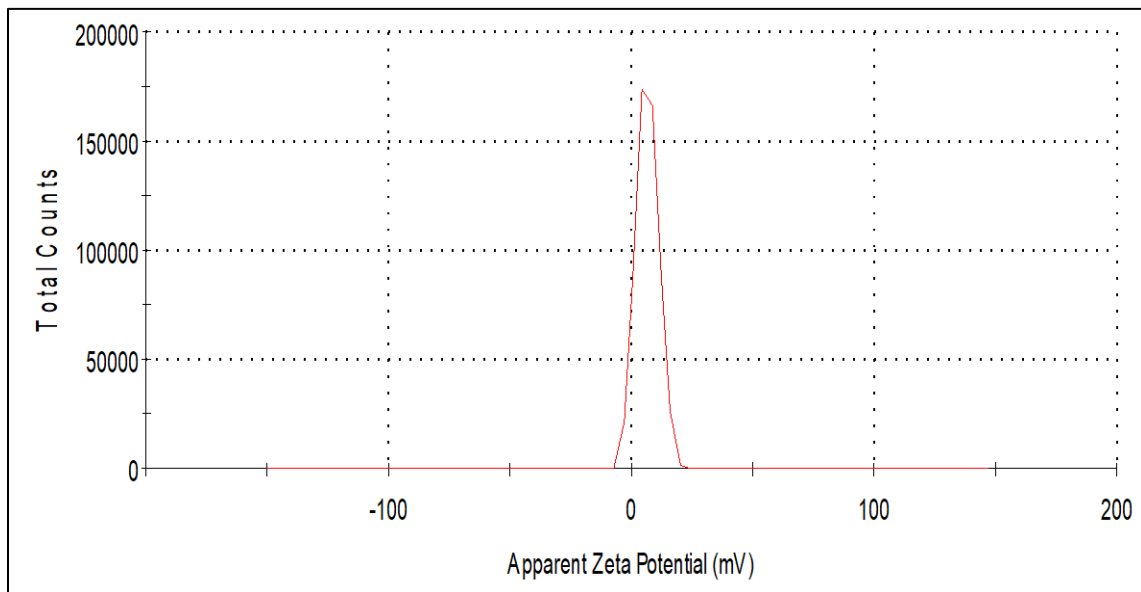
- Zheng, J., Zhou, C., Yu, M., & Liu, J. (2012a). Different sized luminescent gold nanoparticles. *Nanoscale*, 4(14), 4073. <https://doi.org/10.1039/c2nr31192e>
- Zheng, J., Zhou, C., Yu, M., & Liu, J. (2012b). Different sized luminescent gold nanoparticles. *Nanoscale*, 4(14), 4073. <https://doi.org/10.1039/c2nr31192e>
- Zheng, K., Setyawati, M. I., Leong, D. T., & Xie, J. (2017a). Antimicrobial Gold Nanoclusters. *ACS Nano*, 11(7), 6904-6910. <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b02035>
- Zheng, K., Setyawati, M. I., Leong, D. T., & Xie, J. (2017b). Antimicrobial Gold Nanoclusters. *ACS Nano*, 11(7), 6904-6910. <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b02035>
- Zheng, Y., Lai, L., Liu, W., Jiang, H., & Wang, X. (2017). Recent advances in biomedical applications of fluorescent gold nanoclusters. *Advances in Colloid and Interface Science*, 242, 1-16. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.02.005>
- Zhou, S., Sun, Y., Kuang, X., Hou, S., Wang, Z., Qian, Z., & Liu, H. (2018). Mitochondria-homing peptide functionalized nanoparticles performing dual extracellular/intracellular roles to inhibit aminoglycosides induced ototoxicity. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 46(sup2), 314-323. <https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1457041>

### Apéndices

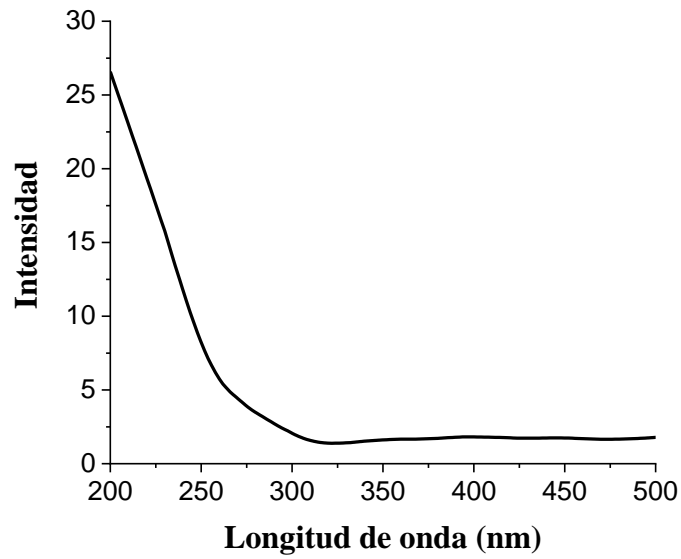
#### Apéndice A. Potencial Zeta AuNC



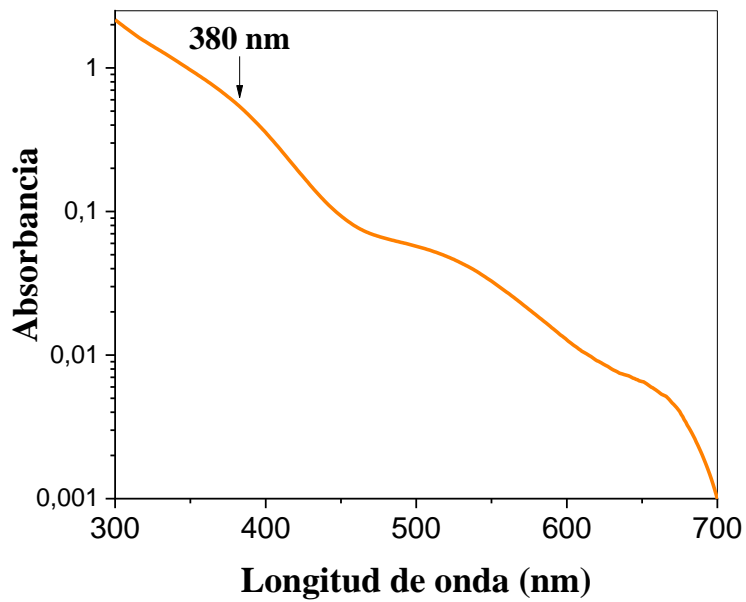
#### Apéndice B. Potencial Zeta AuNC@NBC2254



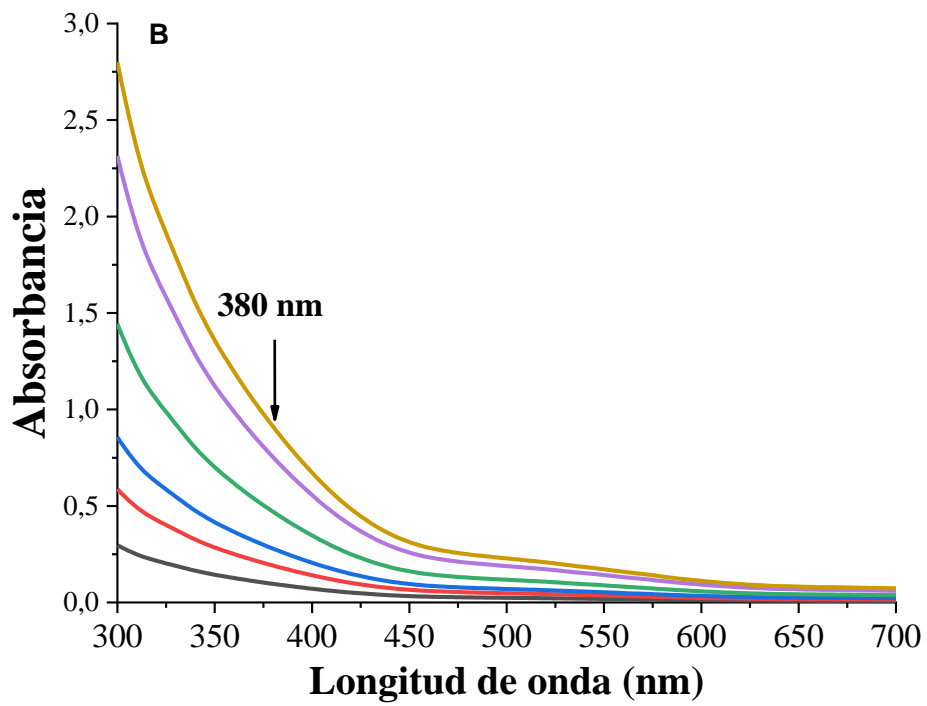
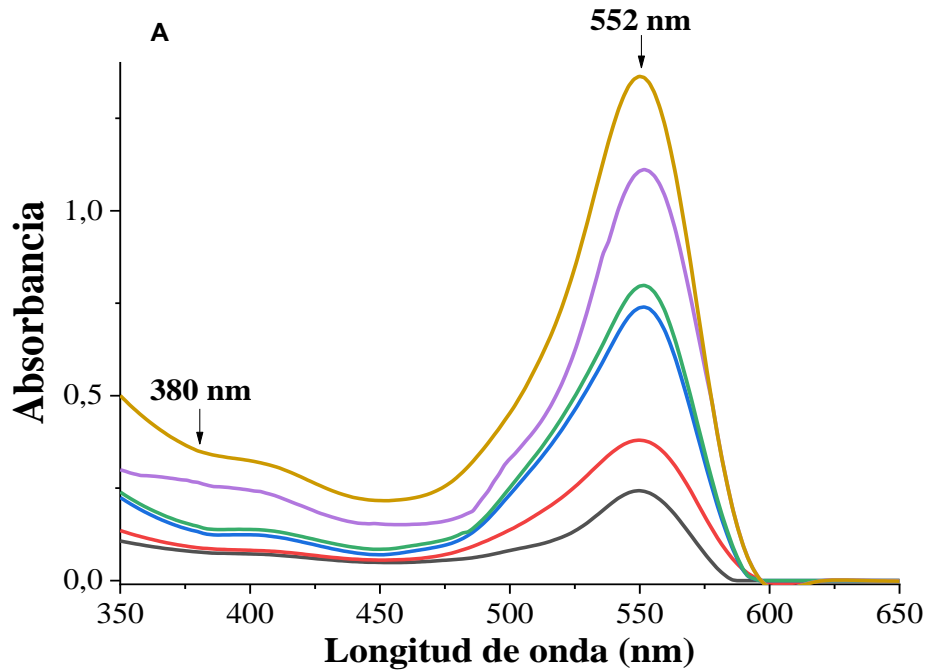
Apéndice C. Espectro de excitación de AuNC@NBC2254



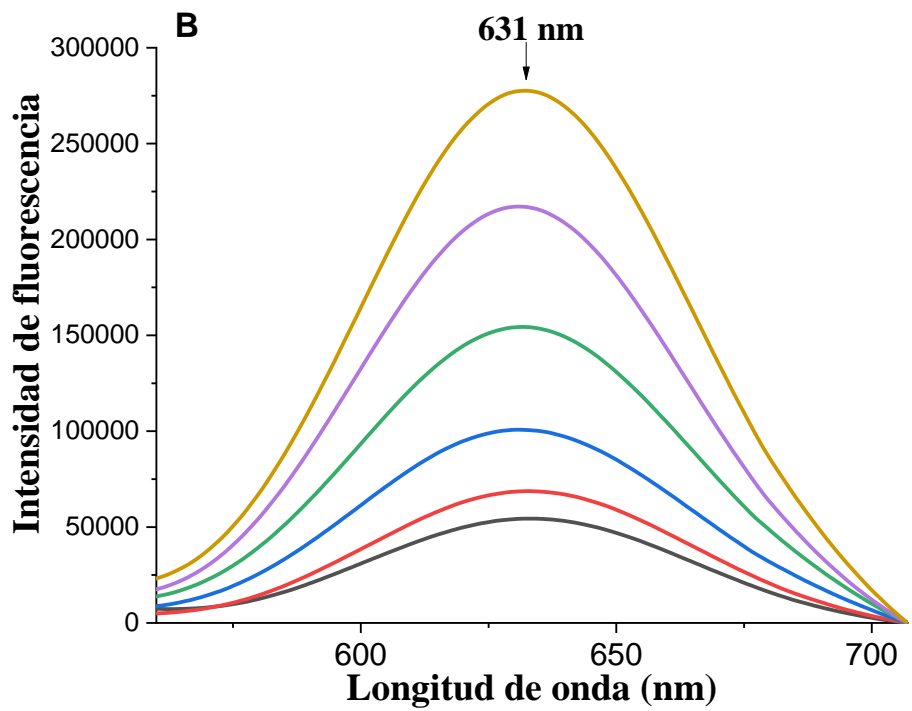
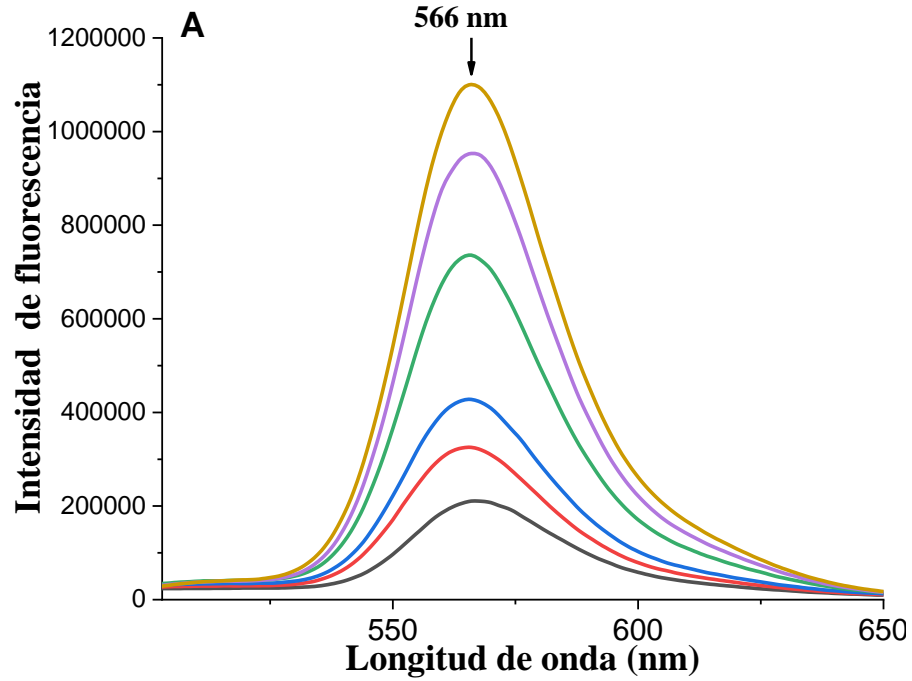
Apéndice D. Espectro UV-Vis de AuNC@NBC2254, con el eje de absorbancia modificado en escala logarítmica



Apéndice E. Espectros de absorción de A) soluciones de rodamina B. B) soluciones de AuNC-NBC2254



Apéndice F. Espectros de fluorescencia excitando a 380 nm de A) soluciones de rodamina B. B) soluciones de AuNC-NBC2254



Apéndice G. Datos para realizar curva de calibración. Tabla 1. Absorbancia a 380 nm e intensidad de fluorescencia de soluciones de Rodamina B medido en la ventana espectral de 503-650nm.

Tabla 2. Absorbancia a 380 nm e intensidad de fluorescencia de soluciones de AuNC@NBC2254 medido en la ventana espectral de 560-707nm

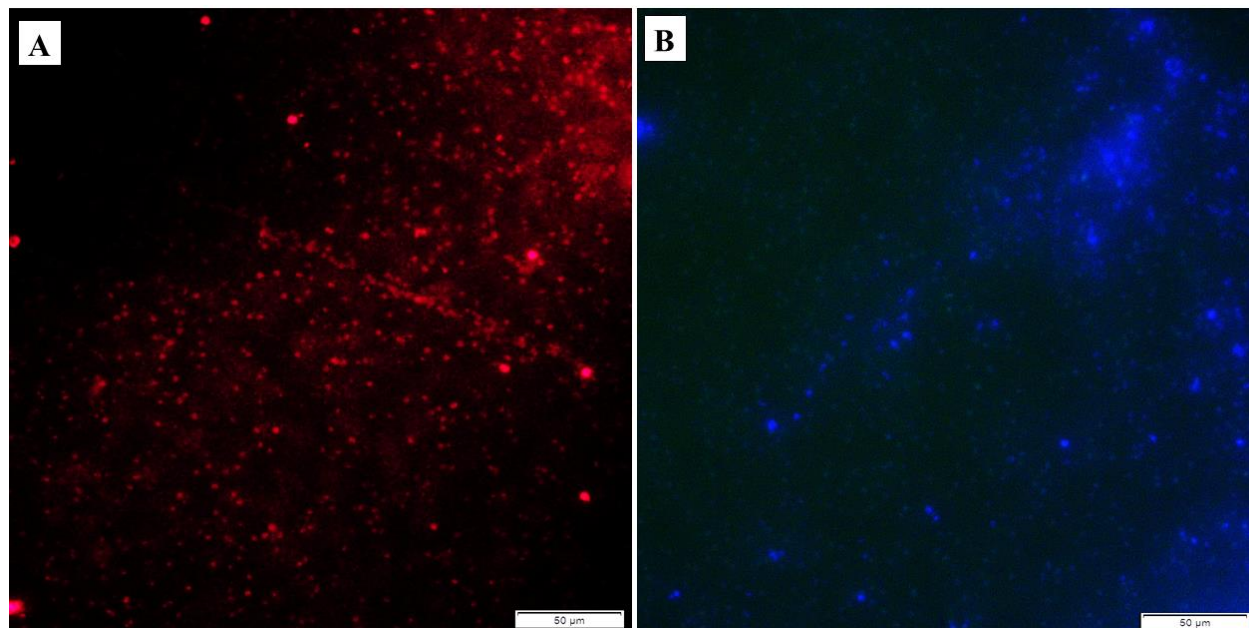
**Tabla 1**

<b>Soluciones de Rodamina B</b>	<b>Absorbancia a 380 nm</b>	<b>Intensidad de fluorescencia Integrada</b>
Solución 1	0,0774	10230100
Solución 2	0,08869	15120500
Solución 3	0,13206	22315800
Solución 4	0,14663	25049700
Solución 5	0,26551	40059700
Solución 6	0,35056	52348000

**Tabla 2**

<b>Soluciones de AuNC-NBC254</b>	<b>Absorbancia a 380 nm</b>	<b>Intensidad de fluorescencia Integrada</b>
Solución 1	0,09647	4113670
Solución 2	0,19102	5127160
Solución 3	0,27867	7794690
Solución 4	0,46794	11924900
Solución 5	0,752639	16551800
Solución 6	0,910678	21267900

Apéndice H. Imágenes de microscopia de fluorescencia de SARM marcada con Hoechst 33342 [0,5 mg/mL] y AuNC@NBC2254 [12 mg/mL] vista en A) filtro para ventana espectral del rojo. B) filtro para ventana espectral del azul.



Apéndice I. Análisis semicuantitativo por EDS del preinóculo de SARM marcado con AuNC-  
NBC2254 [25 mg/mL]

