

SÍNTESIS DE GLICO-NANOPARTÍCULAS DE ORO PARA SU POTENCIAL EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

**Guillermo Rocael Vázquez Martínez¹,
Marco Antonio Meraz-Ríos²,
José Abraham Balderas-López^{1*}**

¹Instituto Politécnico Nacional, Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, Departamento de Ciencias Básicas, Ciudad de México. CP 07340, México.

²Instituto Politécnico Nacional, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, Departamento de Biomedicina Molecular, Ciudad de México. CP 07360, México.

*abrahambalderas@hotmail.com

Vázquez Martínez, G. R., Meraz-Ríos, M. A., Balderas-López, J. A. (2021). Síntesis de glico-nanopartículas de oro para su potencial en el sistema nervioso central. En E. San Martín-Martínez (Ed.), *Avances de investigación en Nanociencias, Micro y Nanotecnologías. Volumen III* (pp. 81-100). Barcelona, España: Omniascience.

Resumen

La nanomedicina ha tenido un gran impacto en los últimos años, principalmente con el uso de las nanopartículas de oro (AuNPs) en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades, para este fin, las AuNPs deben ser biocompatibles y de fácil biodistribución. La incorporación de recubrimientos post-síntesis a base de polímeros de carbohidratos de alto peso molecular ha sido una estrategia para alcanzar estas condiciones, sin embargo, hasta ahora su función se ha limitado a mejorar la biocompatibilidad y la biodistribución de la nanopartícula, ya que no se les reconoce algún efecto directo sobre los blancos terapéuticos asociados a padecimientos del sistema nervioso central (SNC), particularmente las enfermedades neurodegenerativas. En este trabajo se propone un método fácil y rápido para sintetizar nanopartículas de oro de 5-10 nm con recubrimiento de disacáridos reductores y no reductores, con la finalidad de incorporar las propiedades terapéuticas de los disacáridos a las nanopartículas.

Palabras clave: Neuronanomedicina, nanopartículas de oro, disacárido reductor/no reductor.

1. Introducción

Las nanopartículas de oro (AuNPs) son cada vez más relevantes en el diagnóstico y tratamiento de distintas enfermedades, por ejemplo, se investiga su potencial como biosensores para la detección de moléculas asociadas a enfermedades [1], así como para la identificación rápida de patógenos en el organismo [2]; por otro lado, también se han propuesto como agentes contrastantes en imagenología [3], así como potenciadores de las fototerapias [4] y acarreadores de fármacos [5].

El éxito de las AuNPs en estas áreas se debe principalmente a sus efectos en los sistemas biológicos, principalmente baja toxicidad [6] y poca inmunogenicidad [7], en comparación con otros tipos de nanopartículas que pueden provocar daños severos a nivel celular y tisular, y finalmente, por sus peculiares características ópticas y térmicas [8].

Una de las propiedades más relevantes de las AuNPs y que se ha explotado en los últimos años, es su capacidad multifuncional para enlazar moléculas de interés fisiológico, tales como anticuerpos, péptidos, aminoácidos, ácidos nucleicos, aptámeros, polímeros y moléculas pequeñas, lo cual ha permitido desarrollar una gran variedad de nanocomplejos con objetivos terapéuticos.

Al igual que los fármacos, las AuNPs también pueden ser administradas en el organismo por diferentes vías, incluyendo la vía oral, vía respiratoria, o bien, por inyección intravenosa. Su distribución/retención en el organismo se ha estudiado en modelos murinos y ha permitido determinar que, independientemente de la vía de administración y del tamaño de partícula, las AuNPs se concentran preferentemente en los órganos altamente irrigados: hígado, bazo, riñón y pulmón [9, 10, 11, 12]. Por el contrario, en el cerebro, a pesar de ser también un órgano altamente irrigado, la cantidad de AuNPs que ingresan es 50 veces más baja que en otros órganos, lo que indica que el tamaño de partícula representa una limitante para atravesar los mecanismos de protección de éste importante órgano, sobre todo para partículas de tamaños mayores a 10 nm. Es importante mencionar que en el caso del tejido cerebral la retención de AuNPs aumenta cuando son administradas por vía respiratoria, en comparación con otras vías de administración [13].

La barrera hematoencefálica (BHE) es una estructura compleja que regula selectivamente el tráfico de moléculas (oxígeno, glucosa, aminoácidos y otros nutrientes esenciales) desde la red capilar hacia el parénquima cerebral. En general, atravesar esta barrera es uno de los principales retos en el diseño de

neurofármacos, y así mismo, para los nanoacarreadores que transportan moléculas terapéuticas hasta las células cerebrales. En el caso de las AuNPs, el uso de recubrimientos o “cappings” (en inglés) ha mejorado esta condición aumentando la cantidad de nanopartículas que llegan a las células cerebrales en comparación con las que no los tienen [14]. Se han reportado diferentes recubrimientos ayudadores de naturaleza proteica, como el glutatión [15], la insulina [16], la transferrina [17], la caseína [18] y algunos anticuerpos [19]; otros de naturaleza lipídica, como la lecitina [20], el ácido dihidrolipoico [21] y los exosomas reducidos por extrusión [22]. Por otro lado, los recubrimientos de naturaleza polimérica también se han empleado con la misma finalidad, como, por ejemplo, el polietilenglicol [23] y el ácido poli(láctico-co-glicólico) o PLGA por sus siglas en inglés [24], siendo este último el único polímero sintético aprobado por la FDA para la liberación de fármacos en sistemas biológicos. No obstante, existen polímeros naturales como los polímeros de carbohidratos, que también han presentado un efecto similar en las AuNPs, tales como el alginato [25], el ácido hialurónico [26] y el quitosano [27]. Sin embargo, a pesar de que los polímeros de carbohidratos tienen un gran potencial para ayudar a las AuNPs a atravesar la BHE, hasta ahora su función se ha limitado a mejorar la biocompatibilidad y biodistribución de la nanopartícula, ya que hasta el momento no se ha reportado algún efecto directo sobre los blancos terapéuticos asociados a las enfermedades neurodegenerativas, por ello, ha sido necesario enlazar químicamente o adsorber el neurofármaco o la molécula terapéutica en la superficie de las AuNPs recubiertas.

Al igual que los polímeros de carbohidratos, los recubrimientos con monosacáridos también han mejorado la captación de nanopartículas a través de la BHE, esto se ha evaluado en modelos *in vitro* con células endoteliales, utilizando recubrimientos de glucosa [28], galactosa [29] y manosa [30]. Resultados similares se han encontrado en modelos murinos *in vivo*, en donde las nanopartículas que atraviesan con mayor facilidad la BHE se encuentran recubiertas con el monosacárido glucosa [31, 32, 33]. Sin embargo, los monosacáridos no únicamente juegan un papel importante en el transporte de las AuNPs a través de la BHE, sino que también parecen tener un efecto en algunos blancos terapéuticos de las enfermedades neurodegenerativas, por ejemplo, en pruebas *in vitro*, se ha encontrado que la glucosa inhibe la formación de fibras del péptido β amiloide, sin embargo, el efecto es más evidente cuando se utiliza en forma de nanopartículas [34].

Recientemente se ha descrito que no únicamente los monosacáridos tienen un efecto importante en las enfermedades neurodegenerativas, sino también

los disacáridos. En modelos *in vitro* de la enfermedad de Alzheimer, por ejemplo, se ha demostrado que nanopartículas de los disacáridos trehalosa, sacarosa y maltosa inhiben la formación de fibras de beta amiloide, incluso con un efecto mayor que los monosacáridos [34]. De estos disacáridos, el más explorado ha sido la trehalosa, debido a que los estudios *in vitro* e *in vivo* demuestran que tiene un efecto en el procesamiento de la proteína precursora de amiloide (APP) [35], además de que también se ha sugerido que actúa como neuroprotector en modelos de enfermedades como Parkinson y Huntington [36, 37, 38]. Por otro lado, también se ha reportado que el disacárido lactulosa, inhibe la agregación de la proteína α -sinucleína, una proteína relacionada con la enfermedad de Parkinson y la demencia difusa de cuerpos de Lewis, lo cual reduce el estrés oxidativo y la neurotoxicidad provocada por su acumulación [39, 40]. Por lo tanto, los disacáridos desempeñan una actividad biológica importante en las enfermedades neurodegenerativas que aún no ha sido explorada por completo, por lo que desarrollar métodos de síntesis que permitan obtener AuNPs con recubrimientos de disacáridos es el punto de partida para encontrar nuevos agentes terapéuticos en el campo de las neurociencias.

Existen diversas estrategias para obtener AuNPs con recubrimiento de carbohidratos o también llamadas Glico-AuNPs (GAuNPs), la más utilizada se basa en la propiedad del oro de formar enlaces estables con moléculas que contienen azufre (tioles o disulfuros) [41]. En el caso de moléculas con grupos tiol, es común utilizar la funcionalización por intercambio de ligando o *ligand exchange* (en inglés), en la cual, la molécula estabilizadora que recubre a las AuNPs es sustituida por otra que posee, en su estructura, al menos un grupo sulfhidrilo (-SH), como es el caso de los azúcares tiolados. En este sentido, la síntesis de las AuNPs con recubrimiento de disacáridos tiolados se ha reportado principalmente con lactosa, en el cual, el grupo hidroxilo anomérico de este azúcar es reemplazado, ya sea por una cadena hidrocarbonada tiolada en el extremo terminal [42]; o bien, por una molécula de hidrazida tiolada [43], para este último ejemplo, además de lactosa también se ha utilizado el disacárido maltosa. En el caso de las moléculas con puentes disulfuro, específicamente con disacáridos, únicamente se ha reportado la síntesis de AuNPs con recubrimiento de trehalosa, para lo cual, una molécula de ácido lipoico (-S-S-) se enlaza al carbono 6' de la trehalosa, y se añade directamente en la reacción antes de iniciar la reducción de la sal de oro (HAuCl_4), por acción del ácido ascórbico [44]. Esta estrategia ha funcionado en cuanto a estabilidad y homogeneidad de

tamaños de partícula; sin embargo, además de que es complicado realizar químicamente la modificación de los disacáridos previamente a la síntesis, no es posible utilizarlas con fines terapéuticos debido a la toxicidad de los reactivos que se utilizan para obtenerlas, tales como la N-lauroilsarcosina, el eterato de trifluoruro de boro, el bromoetanol, el diclorometano, el tiocetato de potasio, la dimetilformamida y el metóxido de sodio.

Por otro lado, existe una estrategia más amigable que se fundamenta en el uso del fosfo-trimero de alanina THPAL ($\text{P}(\text{CH}_2\text{-NHCH}(\text{CH}_3)\text{COOH})_3$) para reducir directamente la sal de oro (HAuCl_4) sin realizar modificaciones en el disacárido, que para este caso se utilizaron lactosa, maltosa y sacarosa; sin embargo, los tamaños de partícula que se obtienen no son homogéneos (3-60 nm), además de que en el estudio no se confirmó la presencia del carbohidrato en las AuNPs [45].

Hasta el momento, no existe un método de síntesis de AuNPs con disacáridos que genere nanopartículas con las características necesarias para su potencial uso terapéutico en las enfermedades neurodegenerativas, por lo cual, este trabajo se orientó a obtener nanopartículas físicamente estables, de tamaño homogéneo y óptimo para atravesar la BHE (≤ 10 nm), sin la modificación de los disacáridos, y sin el uso de intermediarios tóxicos.

2. Materiales y métodos

La experimentación se dividió en dos secciones: a) síntesis de las nanopartículas de oro y b) caracterización de las nanopartículas.

2.1. Síntesis de las AuNPs

La síntesis de AuNPs recubiertas disacáridos, de tamaños de partícula de 2-10 nm, se llevó a cabo a partir de modificaciones de los métodos de Corzo-Lucioni (2012) y Liu y colaboradores (2006), que originalmente fueron diseñados para obtener AuNPs recubiertas con el monosacárido glucosa. A grandes rasgos estas metodologías involucran lo siguiente:

Método de Corzo-Lucioni (2012) 20 mL de una solución 0.25 mM de HAuCl_4 se calienta hasta alcanzar una temperatura de 100 °C, tan pronto como la solución alcanza la temperatura establecida se adiciona 1 mL de una solución de glucosa 17 mM (pH 10, NaOH). La solución se mantiene en ebullición y agitación

vigorosa durante 20 min y finalmente se deja enfriar a temperatura ambiente con agitación lenta durante 40 min [46].

Método de Liu y colaboradores (2006). 50 mL de una solución de glucosa 50 mM se mezcla con 200 μ L de H₂AuCl₄ 50 mM para obtener una concentración final de la sal de oro de 0.2 mM, después de 15 min en agitación, la solución resultante se hace reaccionar con 600 μ L de una solución de borohidruro de sodio (NaBH₄) 50 mM [47]. En este trabajo la glucosa fue reemplazada por los disacáridos trehalosa y lactosa. La trehalosa se usó como ejemplo de homodímero no reductor (α Glu-Glu, 1 \rightarrow 1) y la lactosa como heterodímero no reductor (Gal-Glu, β 1 \rightarrow 4). Aunque los antecedentes muestran al disacárido lactulosa (Galactosa-Fructosa) con funciones biológicas en las enfermedades neurodegenerativas, se decidió utilizar lactosa en lugar de éste, debido a que su estructura molecular es muy similar y además contiene galactosa. Finalmente, como controles se utilizaron nanopartículas de oro “desnudas” (control negativo) y con glucosa (control positivo), que fueron sintetizadas bajo las mismas condiciones que las AuNPs con los disacáridos. Para fines prácticos, primero se estableció la síntesis de las nanopartículas de oro con el disacárido lactosa, y una vez obtenidas, se aplicaron las mismas condiciones de síntesis a la trehalosa y a los controles, tal como se muestra en la Tabla 1.

2.2. Caracterización de las AuNPs

La caracterización de las AuNPs se llevó a cabo empleando Microscopía de Transmisión de Electrones (TEM), para determinar el tamaño y la forma de partícula. Espectroscopía UV, para verificar preliminarmente la presencia del disacárido en la nanopartícula de oro, y finalmente se utilizó el método fenol-sulfúrico para confirmar el recubrimiento de carbohidrato [48].

2.2.1. Microscopía de Transmisión de Electrones

Se colocaron 20 μ l de cada muestra en rejillas de cobre de 200 mallas, recubiertas previamente con una membrana de Formvar, se dejó reposar durante 1 min y se retiró el exceso de líquido con papel filtro para su visualización en el Microscopio electrónico (Jeol Mod. JEM 1010). Para determinar el tamaño de partícula se analizaron las imágenes obtenidas con ayuda de la herramienta informática ImageJ [49], para ello se analizaron campos ópticos conteniendo más de 100 nanopartículas, y finalmente los datos se graficaron en un histograma (tamaño vs. frecuencia).

2.2.2. Espectroscopía UV-Visible

Se colocaron 3 mL de cada muestra en celdas de cuarzo utilizando agua Mili-Q, como blanco, para la calibración del equipo. Se obtuvieron absorbancias en el rango de 400-600 nm utilizando, para ello, un equipo Perkin Elmer (Lambda 25 UV VIS spectrometer).

2.2.3. Detección de carbohidratos por el método Fenol-Cloroformo

Previo a la determinación de carbohidratos, los nanocomplejos carbohidrato-AuNPs se purificaron para remover el carbohidrato libre que no se integró a las nanopartículas, además de eliminar la sal de oro y el exceso del agente reductor. Para ello, se utilizó el método de diálisis con el kit D-Tube™ Dializer Mega, el cual contiene una membrana que permite separar solutos con un peso molecular límite (MWCO por sus siglas en inglés) de 6-8 KDa. Para ello, 15 mL de nanopartículas se colocaron en el tubo Dializer Mega y éste se sumergió en

Tabla 1. Condiciones de síntesis de las AuNPs

Método	HAuCl ₄ (mM)	mL	Azúcar (mM)		mL	NaBH ₄ (M)	NaBH ₄ Final (mM)
Corzo-Lucioni, 2012 (Método 1)	0.25	20	Glucosa	17	1	---	---
Liu et al., 2006 (Método 2)	50	0.2*	Glucosa	50	50	0.050	0.6
Método 1 con modificacione	0.25	20	Lactosa	17	1	---	---
	0.25	20	Lactosa	25-200	1	---	---
	0.25	20	Trehalosa	200	1	---	---
Método 2 con modificacione	10	1	Lactosa	50	50	1 [†]	0.6
						4.2	
						13.2	
	10	1	Trehalosa	50	50	1	13.2
+ 10	1	Glucosa	50	50	1	13.2	
- 10	1	---	---	50	1	13.2	

*En el caso del método 2, la concentración final de HAuCl₄ fue 0.2 mM por esa razón se utilizó una alícuota de 1 mL de HAuCl₄ 10 mM para lograr la concentración final original. † Se utilizaron diferentes alícuotas de NaBH₄ 1M, pero cada alícuota fue ajustada a 0.66 mL antes de agregarla en la reacción.

un vaso de precipitado de 1L con agua destilada en agitación y a temperatura ambiente; después de 24 h se reemplazó el agua y se repitió el proceso una vez más (tiempo total: 48 h).

Para el método fenol-sulfúrico se siguieron las modificaciones propuestas por Masuko y colaboradores (2005), estas involucran el establecimiento de las condiciones precisas para cuantificar carbohidratos en placas para ELISA de 96 pozos. Para ello, se colocaron 50 μL de los nanocomplejos carbohidrato-AuNPs en cada pozo, se añadieron 150 μL de H_2SO_4 (96 %), gota a gota para evitar contaminación de pozos, después, la placa se colocó en un agitador durante 30 min y posteriormente se adicionaron 30 μL de una solución de fenol al 5 %, para finalmente ser incubada a 90 °C, en baño maría durante 5 min. Las mediciones de absorbancia se llevaron a cabo a una longitud de onda de 490 nm.

3. Resultados y discusión

3.1. Caracterización de los coloides obtenidos por el método de Corzo-Lucioni

Los coloides mostraron una coloración rojiza, característica de la formación de AuNPs (Figura 1a). La turbidez de los productos de las reacciones fue aumentando a medida que se incrementó la concentración del disacárido, pero después de 1 hora de agitación, todas las soluciones se volvieron transparentes y con sedimentos (Figura 1b, 1c), con excepción de las reacciones en donde se utilizó lactosa 200 mM (Figura 1d) y un tiempo de agitación de 15 min; en estas últimas, se obtuvieron soluciones coloidales que se mantuvieron estables sólo durante una semana. Resultados completamente opuestos, se obtuvieron cuando se involucró

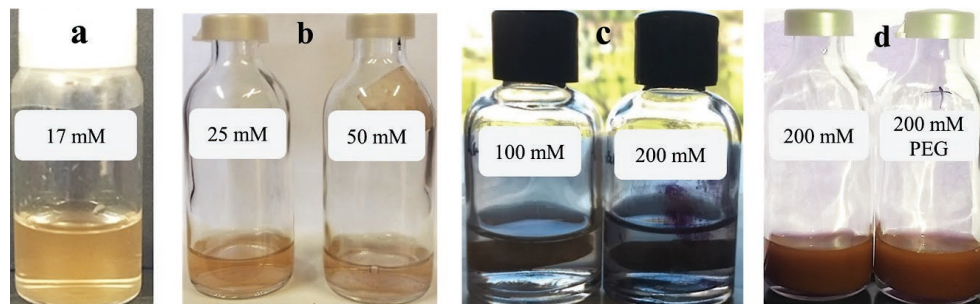


Figura 1. Coloides obtenidos utilizando el método de Corzo-Lucioni con modificaciones. Coloides obtenidos con diferentes concentraciones de lactosa (a-d) y recubiertos o no con polietilenglicol (PEG) (d).

el disacárido trehalosa ya que no se observaron cambios de coloración, ni sedimentos, lo que indica que la síntesis de los nano-complejos no se llevó a cabo. Esto podría estar relacionado con la naturaleza no reductora de este carbohidrato, ya que la estructura molecular de la trehalosa carece de un carbono anomérico libre, debido a su enlace O-glucosídico $\alpha(1\rightarrow1)\alpha$.

En el análisis por espectroscopía UV-visible, los coloides de lactosa presentaron bordes de absorción máxima entre 550-575 nm, lo que confirma la formación de AuNPs (Figura 2). Los bordes de absorción máxima aumentaron conforme se incrementó la concentración de lactosa, siendo 200 mM la concentración con el pico de absorción más alto, y, por lo tanto, la más adecuada para obtener los nanocomplejos (Figura 2a). Por otro lado, el tiempo de agitación fue un factor que influyó en la síntesis, ya que las reacciones con un tiempo de agitación de 15 min dieron por resultado productos con bordes de absorción más altos que las correspondientes a tiempos de agitación de 60 min, lo cual sugiere que las AuNPs se agregan con la agitación prolongada (Figura 2b). Finalmente, ya que las AuNPs se agregaron después de una semana, se probó la adición de polietilenglicol (PEG-SH) como recubrimiento secundario para evitar este fenómeno; sin embargo, a pesar de que el espectro UV-Visible mostró que el recubrimiento se integró a las AuNPs, no fue posible evitar su agregación más allá de una semana. Debido a su baja estabilidad, estas nanopartículas no fueron incluidas en los estudios posteriores.

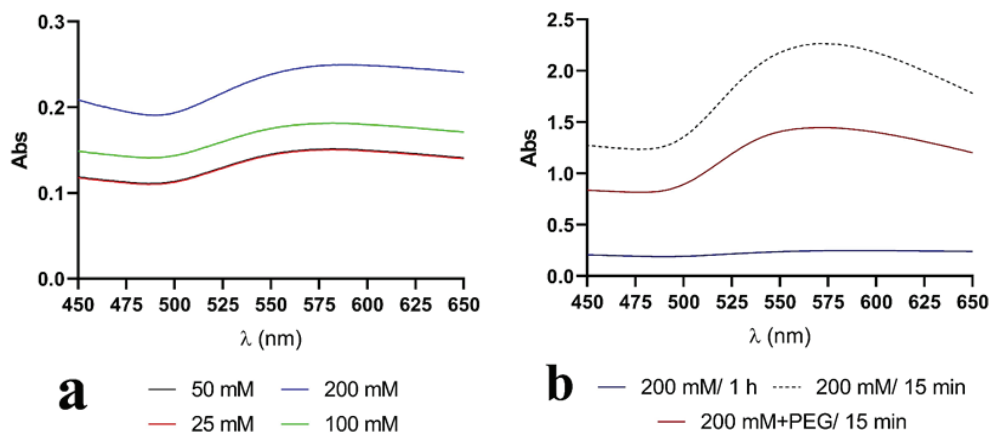


Figura 2. Espectros UV-visible de los coloides obtenidos utilizando el método de Corzo-Lucioni con modificaciones. Usando concentraciones de lactosa 50-200 mM (a) y diferentes tiempos de agitación 15 min-1h (b).

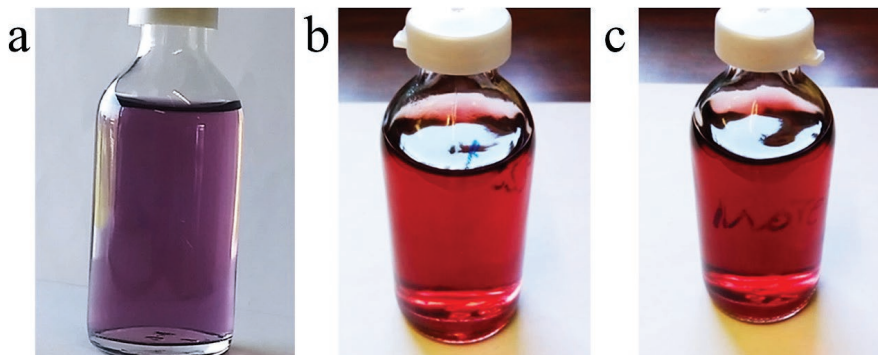


Figure 3. Coloides obtenidos a partir del método 2 utilizando diferentes concentraciones de agente reductor: NaBH_4 0.6 mM (a), 4.14 mM (b) and 12.54 mM (c).

3.2. Caracterización de los coloides obtenidos por el método de Liu y colaboradores

En este caso, todas las reacciones dieron como resultado coloides homogéneos con lactosa (sin sedimentos) y presentaron una coloración rojo-violeta, con excepción de la reacción en la cual se utilizó NaBH_4 0.6 mM (Figura 3). Por otro lado, el análisis por Microscopía de Transmisión de Electrones mostró que las nanopartículas tienen forma esférica y tamaños de partícula entre 6 y 9 nm (Figuras 4a y 4b). En este caso, el tamaño de partícula se vio influenciado por la concentración de NaBH_4 , ya que se obtuvieron nanopartículas de 6.9 ± 1.14 nm al utilizar el agente reductor a 4.2 mM, mientras que al aumentar la concentración a 13.2 mM se obtuvieron nanocomplejos de 9.8 ± 1.44 nm (Figura 4c); para el caso del coloide sintetizado con el agente reductor a 0.6 mM, no fue posible conocer la distribución de los tamaños de las partículas, debido a la presencia de agregados en la muestra. Además, se determinó que la concentración más alta de agente reductor (13.2 mM), da como resultado nanocomplejos homogéneos y sin agregados, a diferencia de los sintetizados con NaBH_4 4.2 mM, en los cuales, a pesar de tener también tamaños homogéneos, se observó una ligera agregación (Figura 3a y 3b).

3.3. Nanocomplejos AuNPs-trehalosa y controles

Las condiciones óptimas de síntesis descritas con anterioridad (AuNPs con lactosa), también se aplicaron para AuNPs con trehalosa, y para los controles positivo y negativo. Se obtuvieron coloides con tonalidades rojizas, homogéneas

y sin agregados (Figura 5a). Los espectros UV-Visible de los productos de síntesis con lactosa, trehalosa y glucosa (control positivo) presentaron bordes de absorción diferentes al control negativo (AuNPs sin carbohidratos), lo que indicó que el carbohidrato ejerce un cambio óptico sobre las AuNPs desnudas (Figura 5b). En el caso del control positivo, el espectro de absorción muestra que, a pesar de modificar las condiciones reductoras citadas por el autor, las modificaciones también permiten obtener AuNPs con recubrimientos de glucosa y muy importante de disacáridos (absorción máxima entre 480-525 nm).

3.4. Detección de carbohidrato en las AuNPs

Con la finalidad de compensar la absorción óptica de las nanopartículas de oro “desnudas” (control negativo) en la longitud de onda seleccionada (490 nm), las absorbancias del control negativo se restaron a los valores obtenidos con los complejos AuNPs-carbohidratos (Figura 6). Los resultados muestran que los coloides analizados contienen carbohidratos, y debido a la exhaustiva purificación

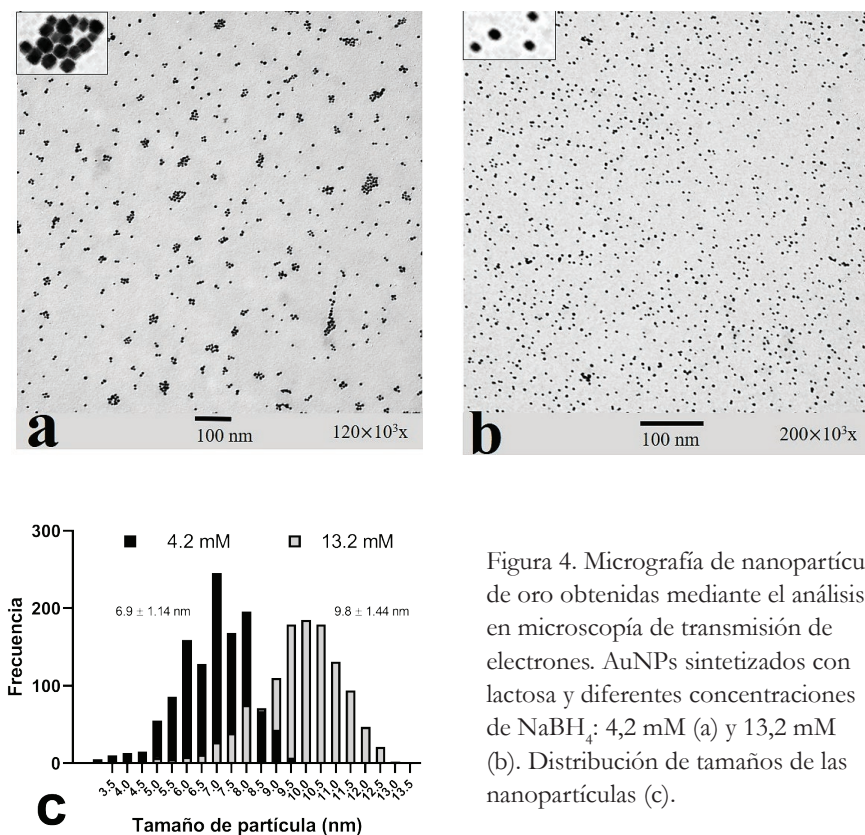


Figura 4. Micrografía de nanopartículas de oro obtenidas mediante el análisis en microscopía de transmisión de electrones. AuNPs sintetizados con lactosa y diferentes concentraciones de NaBH_4 : 4,2 mM (a) y 13,2 mM (b). Distribución de tamaños de las nanopartículas (c).

con el método de diálisis, es muy probable que estos carbohidratos se encuentren unidos en la superficie de las nanopartículas. Por otro lado, los complejos AuNPs-carbohidrato de naturaleza reductora (glucosa y lactosa) presentaron mayor cantidad de carbohidrato con respecto al no reductor (trehalosa), esto podría indicar que las moléculas de trehalosa necesitan un estímulo mayor para unirse a la nanopartícula. En otras palabras, si todas las moléculas de trehalosa se hubiesen unido a la nanopartícula, después de la hidrólisis ácida con H_2SO_4 , se deberían obtener dos moléculas de glucosa por cada molécula de trehalosa; sin embargo, los valores de absorción óptica son mucho menores que los valores obtenidos con las AuNPs con glucosa. Nuestros resultados son muy similares a los obtenidos por Mandal et al. (2017) con relación al tratamiento que involucra un recubrimiento de trehalosa sin ácido lipoico (-S-S-); sin embargo, sus nanopartículas se precipitaron después de 3 días y las nuestras, en cambio, nunca perdieron su estabilidad, incluso después de 6 meses, esto podría deberse al agente reductor utilizado, ya que en este trabajo se utilizó $NaBH_4$ en lugar de ácido ascórbico.

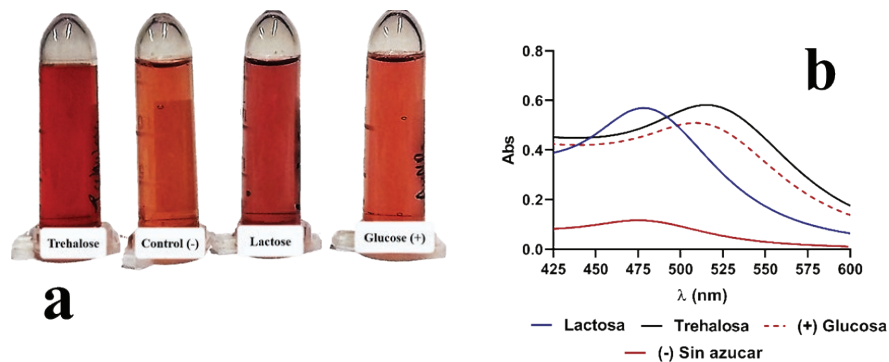


Figura 5. Coloides obtenidos utilizando el método 2 con modificaciones usando diferentes recubrimientos de azúcares (a) y los espectros UV-visible de cada muestra (b).

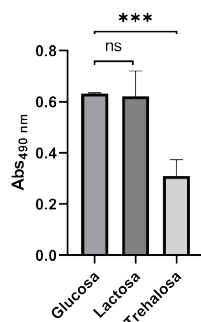


Figura 6. Detección de azúcares en la superficie de las AuNPs usando el método fenol-sulfúrico con las modificaciones de Masu o y colaboradores.

4. Conclusiones

Se establecieron las condiciones generales para obtener nanopartículas de oro estables, utilizando como recubrimiento disacáridos reductores y no reductores, sin la necesidad de realizar modificaciones complejas en los azúcares con tioles o disulfuros, tampoco añadiendo recubrimientos secundarios o la adición de otros agentes reductores o estabilizantes. El método también es lo suficientemente flexible para manipular el tamaño de partícula desde 6 hasta 9 nm, únicamente cambiando la concentración del agente reductor, pero es necesario mantener la correlación entre la concentración de NaBH_4 y el tamaño de partícula. Las características de las GAuNPs obtenidas, de acuerdo con la literatura, podrían presentar una función dual en los sistemas *in vivo*: transportar neurofármacos a través de la barrera hematoencefálica, y por otro lado, tener un efecto directo en los blancos terapéuticos asociados a las enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer y de Parkinson. Sin embargo, aún faltan más pruebas para comprobar esta función dual.

Agradecimientos

Agradecemos al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada durante el doctorado, así como a la Secretaría de Investigación y Posgrado (SIP) y a COFAA del Instituto Politécnico Nacional por los apoyos de beca BEIFI y asistencia a congresos. También agradecemos al grupo de técnicas fototérmicas de la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología (UPIBI-IPN) y al grupo de Enfermedad de Alzheimer del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV-IPN) por la asistencia académica y el apoyo experimental. Agradecemos también a la Central de Instrumentación de Microscopía de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB-IPN) por su asistencia en el análisis de coloides mediante Microscopía Electrónica de Transmisión. Finalmente agradecemos a F. Vazcar y F. Vaznez por su apoyo y sugerencias.

Bibliografía

1. Mirsalari, M., & Elhami, S. (2020). Colorimetric detection of insulin in human serum using GO/AuNPs/TX-100 nanocomposite. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 240, 118617.
<https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.118617>
2. Negahdari, B., Darvishi, M., & Saeedi, A. A. (2019). Gold nanoparticles and hepatitis B virus. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 47(1), 455-461.
<https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1553786>
3. Gupta, A., Mathur, R., Singh, S., Bag, N., Khan, U. A., Ahmad, F. J. et al. (2021). 99mTc-Methionine Gold Nanoparticles as a Promising Biomaterial for Enhanced Tumor Imaging. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 110(2), 888-897.
<https://doi.org/10.1016/j.xphs.2020.11.008>
4. Fan, M., Han, Y., Gao, S., Yan, H., Cao, L., Li, Z. et al. (2020). Ultrasmall gold nanoparticles in cancer diagnosis and therapy. *Theranostics*, 10(11), 4944-4957.
<https://doi.org/10.7150/thno.42471>
5. El-Hallal, R., Lyu, N., & Wang, Y. (2021). Effect of Cetuximab-Conjugated Gold Nanoparticles on the Cytotoxicity and Phenotypic Evolution of Colorectal Cancer Cells. *Molecules*, 26(3), 567.
<https://doi.org/10.3390/molecules26030567>
6. Gerosa, C., Crisponi, G., Nurchi, V. M., Saba, L., Cappai, R., Cau, F. et al. (2020). Gold Nanoparticles: A New Golden Era in Oncology? *Pharmaceuticals*, 13(8), 192.
<https://doi.org/10.3390/ph13080192>
7. Ni, C., Zhou, J., Kong, N., Bian, T., Zhang, Y., Huang, X. et al. (2019). Gold nanoparticles modulate the crosstalk between macrophages and periodontal ligament cells for periodontitis treatment. *Biomaterials*, 206, 115-132.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.03.039>
8. Depciuch, J., Stec, M., Kandler, M., Baran, J., & Parlinska-Wojtan, M. (2020). From spherical to bone-shaped gold nanoparticles—Time factor in the formation of Au NPs, their optical and photothermal properties. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 30, 101670.
<https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.101670>
9. Balasubramanian, S. K., Jittiwat, J., Manikandan, J., Ong, C.-N., Yu, L. E., & Ong, W.-Y. (2010). Biodistribution of gold nanoparticles and gene expression changes in the liver and spleen after intravenous administration in rats. *Biomaterials*, 31(8), 2034-2042.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.11.079>

10. Betzer, O., Shilo, M., OPOCHINSKY, R., Barnoy, E., Motiei, M., Okun, E. et al. (2017). The effect of nanoparticle size on the ability to cross the blood-brain barrier: An in vivo study. *Nanomedicine*, 12(13), 1533-1546.
<https://doi.org/10.2217/nnm-2017-0022>
11. Hirn, S., Semmler-Behnke, M., Schleh, C., Wenk, A., Lipka, J., Schäffle, M. et al. (2011). Particle size-dependent and surface charge-dependent biodistribution of gold nanoparticles after intravenous administration. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 77(3), 407-416.
<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2010.12.029>
12. Iram, F., Iqbal, M. S., Khan, I. U., Rasheed, R., Khalid, A., Khalid, M. et al. (2020). Synthesis and Biodistribution Study of Biocompatible ¹⁹⁸Au Nanoparticles by use of Arabinoxylan as Reducing and Stabilizing Agent. *Biological Trace Element Research*, 193(1), 282-293.
<https://doi.org/10.1007/s12011-019-01700-y>
13. Han, S. G., Lee, J. S., Ahn, K., Kim, Y. S., Kim, J. K., Lee, J. H. et al. (2015). Size-dependent clearance of gold nanoparticles from lungs of Sprague–Dawley rats after short-term inhalation exposure. *Archives of Toxicology*, 89(7), 1083-1094.
<https://doi.org/10.1007/s00204-014-1292-9>
14. Mahmoud, N. N., Albasha, A., Hikmat, S., Hamadneh, L., Zaza, R., Shraideh, Z. et al. (2020). Nanoparticle size and chemical modification play a crucial role in the interaction of nano gold with the brain: extent of accumulation and toxicity. *Biomaterials Science*, 8(6), 1669-1682.
<https://doi.org/10.1039/C9BM02072A>
15. Porkoláb, G., Mészáros, M., Tóth, A., Szecskó, A., Harazin, A., Szegletes, Z. et al. (2020). Combination of Alanine and Glutathione as Targeting Ligands of Nanoparticles Enhances Cargo Delivery into the Cells of the Neurovascular Unit. *Pharmaceutics*, 12(7), 635.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12070635>
16. Betzer, O., Shilo, M., OPOCHINSKY, R., Barnoy, E., Motiei, M., Okun, E. et al. (2017). The effect of nanoparticle size on the ability to cross the blood-brain barrier: An in vivo study. *Nanomedicine*, 12(13), 1533-1546.
<https://doi.org/10.2217/nnm-2017-0022>
17. Praça, C., Rai, A., Santos, T., Cristovão, A. C., Pinho, S. L., Cecchelli, R. et al. (2018). A nanoformulation for the preferential accumulation in adult neurogenic niches. *Journal of Controlled Release*, 284, 57-72.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.06.013>
18. Javed, I., Peng, G., Xing, Y., Yu, T., Zhao, M., Kakinen, A. et al. (2019). Inhibition of amyloid beta toxicity in zebrafish with a chaperone-gold nanoparticle dual strategy. *Nature Communications*, 10(1).
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-11762-0>

19. Johnsen, K. B., Bak, M., Melander, F., Thomsen, M. S., Burkhart, A., Kempen, P. J. et al. (2019). Modulating the antibody density changes the uptake and transport at the blood-brain barrier of both transferrin receptor-targeted gold nanoparticles and liposomal cargo. *Journal of Controlled Release*, 295, 237-249.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.01.005>
20. Wünsch, A., Mulac, D., & Langer, K. (2021). Lecithin coating as universal stabilization and functionalization strategy for nanosized drug carriers to overcome the blood–brain barrier. *International Journal of Pharmaceutics*, 593, 120146.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.120146>
21. Xiao, L., Wei, F., Zhou, Y., Anderson, G. J., Frazer, D. M., Lim, Y. C. et al. (2020). Dihydrolipoic Acid–Gold Nanoclusters Regulate Microglial Polarization and Have the Potential To Alter Neurogenesis. *Nano Letters*, 20(1), 478-495.
<https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.9b04216>
22. Khongkow, M., Yata, T., Boonrungsiman, S., Ruktanonchai, U. R., Graham, D., & Namdee, K. (2019). Surface modification of gold nanoparticles with neuron-targeted exosome for enhanced blood–brain barrier penetration. *Scientific Reports*, 9(1), 1-9.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-44569-6>
23. Norouzi, M. (2020). Gold Nanoparticles in Glioma Theranostics. *Pharmacological Research*, 156, 104753.
<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.104753>
24. Yi, S., Yang, F., Jie, C., & Zhang, G. (2019). A novel strategy to the formulation of carmustine and bioactive nanoparticles co-loaded PLGA biocomposite spheres for targeting drug delivery to glioma treatment and nursing care. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 47(1), 3438-3447.
<https://doi.org/10.1080/21691401.2019.1652628>
25. Dey, S., Sherly, M. C. D., Rekha, M. R., & Sreenivasan, K. (2016). Alginate stabilized gold nanoparticle as multidrug carrier: Evaluation of cellular interactions and hemolytic potential. *Carbohydrate Polymers*, 136(9), 71-80.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.09.016>
26. Karakocak, B. B., Liang, J., Biswas, P., & Ravi, N. (2018). Hyaluronate coating enhances the delivery and biocompatibility of gold nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, 186(1), 243-251.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.01.046>
27. Seyedebrahimi, R., Razavi, S., & Varshosaz, J. (2020). Controlled Delivery of Brain Derived Neurotrophic Factor and Gold-Nanoparticles from Chitosan/TPP Nanoparticles for Tissue Engineering Applications. *Journal of Cluster Science*, 31(1), 99-108.
<https://doi.org/10.1007/s10876-019-01621-9>

28. Gromnicova, R., Davies, H. A., Sreekanthreddy, P., Romero, I. A., Lund, T., Roitt, I. M. et al. (2013). Glucose-coated gold nanoparticles transfer across human brain endothelium and enter astrocytes *in vitro*. *PLoS ONE*, 8(12).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081043>
29. Fatima, N., Gromnicova, R., Loughlin, J., Sharrack, B., & Male, D. (2020). Gold nanocarriers for transport of oligonucleotides across brain endothelial cells. *PLOS ONE*, 15(9), e0236611.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0236611>
30. Pongrac, I. M., Radmilović, M. D., Ahmed, L. B., Mlinarić, H., Regul, J., Škokić, S. et al. (2019). D-mannose-Coating of Maghemite Nanoparticles Improved Labeling of Neural Stem Cells and Allowed Their Visualization by ex vivo MRI after Transplantation in the Mouse Brain. *Cell Transplantation*, 28(5), 553-567.
<https://doi.org/10.1177/0963689719834304>
31. Frigell, J., García, I., Gómez-Vallejo, V., Llop, J., & Penadés, S. (2014). ⁶⁸Ga-labeled gold glyconanoparticles for exploring blood-brain barrier permeability: Preparation, biodistribution studies, and improved brain uptake via neuropeptide conjugation. *Journal of the American Chemical Society*, 136(1), 449-457.
<https://doi.org/10.1021/ja411096m>
32. Gromnicova, R., Yilmaz, C. U., Orhan, N., Kaya, M., Davies, H., Williams, P. et al. (2016). Localization and mobility of glucose-coated gold nanoparticles within the brain. *Nanomedicine*, 11(6), 617-625.
<https://doi.org/10.2217/nnm.15.215>
33. Min, H. S., Kim, H. J., Naito, M., Ogura, S., Toh, K., Hayashi, K. et al. (2020). Drug Delivery Hot Paper Systemic Brain Delivery of Antisense Oligonucleotides across the Blood – Brain Barrier with a Glucose-Coated Polymeric Nanocarrier Research Articles. *Angewandte Chemie*, 0821(132), 8173-8180.
<https://doi.org/10.1002/ange.201914751>
34. Pradhan, N., Shekhar, S., Jana, N. R., & Jana, N. R. (2017). Sugar-Terminated Nanoparticle Chaperones Are 102-105 Times Better Than Molecular Sugars in Inhibiting Protein Aggregation and Reducing Amyloidogenic Cytotoxicity. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 9(12), 10554-10566.
<https://doi.org/10.1021/acsami.7b01886>
35. Liu, Y., Wang, J., Hsiung, G.-Y. R., & Song, W. (2020). Trehalose Inhibits A β Generation and Plaque Formation in Alzheimer's Disease. *Molecular Neurobiology*, 57(7), 3150-3157.
<https://doi.org/10.1007/s12035-020-01942-1>
36. Sarkar, S., Chigurupati, S., Raymick, J., Mann, D., Bowyer, J. F., Schmitt, T. et al. (2014). Neuroprotective effect of the chemical chaperone, trehalose in a chronic MPTP-induced Parkinson's disease mouse model. *NeuroToxicology*, 44, 250-262.
<https://doi.org/10.1016/j.neuro.2014.07.006>

37. Rodríguez-Navarro, J. A., Rodríguez, L., Casarejos, M. J., Solano, R. M., Gómez, A., Perucho, J. et al. (2010). Trehalose ameliorates dopaminergic and tau pathology in parkin deleted/tau overexpressing mice through autophagy activation. *Neurobiology of Disease*, 39(3), 423-438.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2010.05.014>
38. Lee, J., Kim, S., Mubeen, S., Mulchandani, A., Chen, W., Choa, Y. et al. (2020). Synthesis of gold nanostructures using glycine as the reducing agent. *Nanotechnology*, 31(45), 455601.
<https://doi.org/10.1088/1361-6528/abaa76>
39. Lin, C. H., Wei, P. C., Chen, C. M., Huang, Y. T., Lin, J. L., Lo, Y. S. et al. (2020). Lactulose and Melibiose Attenuate MPTP-Induced Parkinson's Disease in Mice by Inhibition of Oxidative Stress, Reduction of Neuroinflammation and Up-Regulation of Autophagy. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 12, 1-11.
<https://doi.org/10.3389/fnagi.2020.00226>
40. Chen, C. M., Lin, C. H., Wu, Y. R., Yen, C. Y., Huang, Y. T., Lin, J. L. et al. (2020). Lactulose and Melibiose Inhibit α -Synuclein Aggregation and Up-Regulate Autophagy to Reduce Neuronal Vulnerability. *Cells*, 9(5), 1-21.
<https://doi.org/10.3390/cells9051230>
41. Wang, C., Wang, J., Liu, D., & Wang, Z. (2010). Gold nanoparticle-based colorimetric sensor for studying the interactions of β -amyloid peptide with metallic ions. *Talanta*, 80(5), 1626-1631.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.09.052>
42. Zhao, Y., Tong, L., Li, Y., Pan, H., Zhang, W., Guan, M. et al. (2016). Lactose-Functionalized Gold Nanorods for Sensitive and Rapid Serological Diagnosis of Cancer. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 8(9), 5813-5820.
<https://doi.org/10.1021/acsami.5b11192>
43. Vasileva, M. Y., Ershov, A. Y., Baygildin, V. A., Shabsel's, B. M., Lagoda, I. V., & Yakimansky, A. V. (2018). Synthesis of Gold Glyconanoparticles Based on the Condensation Products of D-Lactose and D-Maltose with SH-Containing Hydrazides. *Russian Journal of General Chemistry*, 88(6), 1205-1209.
<https://doi.org/10.1134/S1070363218060257>
44. Mandal, S., Debnath, K., Jana, N. R., & Jana, N. R. (2017). Trehalose-Functionalized Gold Nanoparticle for Inhibiting Intracellular Protein Aggregation. *Langmuir*, 33(49), 13996-14003.
<https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b02202>
45. Katti, K. K., Kattumuri, V., Bhaskaran, S., Katti, K. V., & Kannan, R. (2009). Facile and general method for synthesis of sugar-coated gold nanoparticles. *International Journal of Green Nanotechnology: Biomedicine*, 1(1), 1-8.
<https://doi.org/10.1080/19430850902983848>

46. Lucioni, C. (2012). Síntesis de nanopartículas de oro obtenidas por reducción de $H[AuCl_4]$. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 78(2), 79-90.
http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-634X2012000200003
47. Liu, J., Anand, M., & Roberts, C. B. (2006). Synthesis and extraction of beta-D-glucose-stabilized Au nanoparticles processed into low-defect, wide-area thin films and ordered arrays using CO₂-expanded liquids. *Langmuir*, 22(9), 3964-3971.
<https://doi.org/10.1021/la060450q>
48. Masuko, T., Minami, A., Iwasaki, N., Majima, T., Nishimura, S. I., & Lee, Y. C. (2005). Carbohydrate analysis by a phenol–sulfuric acid method in microplate format. *Analytical Biochemistry*, 339(1), 69-72.
<https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.12.001>
49. Rasband, W. (2018). *ImageJ*. U. S. National Institutes of Health. Bethesda, Maryland, USA: U. S. National Institutes of Health. Repéré à <https://imagej.nih.gov/ij/>