



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS DE POSGRADO



**SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE HIDRÓXIDOS
DOBLES LAMINARES PARA LA ADSORCIÓN DE UNA
PROTEÍNA MODELO COMO PROTOTIPO DE
NANOVACUNA**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIA EN INGENIERÍA QUÍMICA**

P R E S E N T A:

I.Q. EMILIO SEBASTIÁN MENDOZA PÉREZ

D I R E C T O R E S:

DRA. ERIKA PADILLA ORTEGA

DR. MARIANO DE JESUS GARCÍA SOTO

SAN LUIS POTOSI, S.L.P. JULIO 2022

El programa de Maestría en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí pertenece al Programa de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 00896, en el Nivel Consolidado.

CVU de la beca otorgada por CONACYT: 1080908

El presente trabajo recibió apoyo financiero por parte del CONACYT (Proyecto 848290 de la Convocatoria Ciencia de Frontera).



Síntesis de nanopartículas de hidróxidos dobles laminares para la adsorción de una proteína modelo como prototipo de nanovacuna by Emilio Sebastian Mendoza Perez is licensed under a [Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS DE POSGRADO



**SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE HIDRÓXIDOS DOBLES
LAMINARES PARA LA ADSORCIÓN DE UNA PROTEÍNA MODELO
COMO PROTOTIPO DE NANOVACUNA**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIA EN INGENIERÍA QUÍMICA**

**PRESENTA:
I.Q. EMILIO SEBASTIÁN MENDOZA PÉREZ**

**DIRECTORES:
DRA. ERIKA PADILLA ORTEGA
DR. MARIANO DE JESUS GARCÍA SOTO**

SINODALES

Dra. Erika Padilla Ortega

Dr. Mariano de Jesús García Soto

Dr. Sergio Rosales Mendoza

Dr. Omar González Ortega

Dr. Raúl Ocampo Pérez

Dra. María de Lourdes Betancourt
Mendiola

SAN LUIS POTOSI, S.L.P. JULIO 2022

Comité Académico del Posgrado en Ciencias en Ingeniería Química
Facultad de Ciencias Químicas

Presente:

Por medio de la presente comunicamos que la tesis llevada a cabo por el alumno de maestría I. Q. Emilio Sebastián Mendoza Pérez, titulada “SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE HIDRÓXIDO DOBLES LAMINARES PARA SU USO COMO NANOVACUNAS CON UNA PROTEÍNA MODELO”, ha sido concluida y aprobada por el comité tutorial para iniciar los trámites correspondientes para su titulación, la cual tendrá lugar el próximo día 20 de Julio del 2022 a las 8:00 horas en la sala de exámenes profesionales de la facultad.

SINODALES

Dra. Erika Padilla Ortega
Directora de tesis
Facultad de Ciencias Químicas

Dr. Mariano de Jesús García Soto
Director de tesis
Facultad de Ciencias Químicas

Dr. Sergio Rosales Mendoza
Asesor
Facultad de Ciencias Químicas

Dr. Omar González Ortega
Asesor
Facultad de Ciencias Químicas

Dr. Raúl Ocampo Pérez
Asesor
Facultad de Ciencias Químicas

Dra. María de Lourdes Betancourt
Mendiola
Asesora
Facultad de Ciencias Químicas

Agradecimientos

El desarrollo y conclusión de este trabajo no fue nada fácil, sin embargo, a lo largo del tiempo de este trabajo hasta su conclusión puedo afirmar que disfruté de cada momento que viví en esta experiencia, y no fue porque simplemente me dispuse de que así fuera, fue porque mi familia siempre estuvo ahí, fue porque la vida misma me demostró que de las cosas y actos que yo realicé, serán los mismos que harán conmigo.

Agradezco del gran apoyo familiar que tuve, que confiaron en mi para culminar una meta más en mi trayectoria académica, ya que no es nada fácil estar a la distancia de mis seres queridos.

A la Dra. Erika Padilla Ortega por darme un lugar dentro de su grupo de investigación y por ese acercamiento a un material tan interesante como las arcillas, las cuales tienen mucho potencial para futuras investigaciones científicas en el área de los nanomateriales.

Al Dr. Sergio Rosales Mendoza que ha muy temprana edad me mostró el trabajo y vida que lleva el ser un investigador científico y ser parte importante en mi toma de decisiones para lograr culminar mis metas personales de vida, así como ese acercamiento tan importante con personas a fines, de las cuales se aprende de las experiencias individuales de cada una de ellas para finalmente tener un mejor criterio y decisiones de vida.

A mi Codirector, Dr. Mariano de Jesús García Soto por su tiempo y disposición de apoyarme en la culminación de este proyecto y aportar conocimientos críticos para el logro de un trabajo de calidad. Por ser una gran persona y asesorarme en el proceso de la parte experimental y darme una imagen ideal de los detalles que involucra el mundo de la investigación.

Al Dr. Omar González Ortega por permitirme realizar la mayor parte de mi trabajo experimental en su laboratorio de investigación, en donde los impedimentos y recursos para la conclusión de este trabajo fueron nulos. Por ser una persona con un carácter especial, formador de conocimiento clave y de calidad para el desarrollo conocimiento científico.

Agradecimientos por apoyo técnico

Al Dr. Omar González Ortega por permitirnos el uso de las instalaciones del laboratorio de Bioseparaciones durante el desarrollo de este proyecto, así como de material, equipo y conocimiento indispensable en el proyecto.

Al Dr. Sergio Rosales Mendoza por permitirnos el uso de las instalaciones del laboratorio de Biofarmacéuticos Recombinantes, en donde se llevaron a cabo experimentos iniciales del proyecto.

A la Dra. Alma Gabriela Palestino por el uso de las instalaciones del laboratorio de Biopolímeros y Nanoestructuras, para la determinación del tamaño hidrodinámico y potencial ζ de NP HDL.

A la Dra. Erika Padilla Ortega por el apoyo de aportación intelectual indispensable e insumos claves para el desarrollo del proyecto.

Al Dr. Mariano de Jesús García Soto por el apoyo en la capacitación de equipos de caracterización fisicoquímica (DLS y UV-vis), así como, conocimiento clave para el desarrollo del proyecto.

A la Dra. Angélica Aguilar Aguilar por su tiempo y apoyo técnico en el uso del infrarrojo.

A la Dra. María de Lourdes Betancourt Mendiola por el apoyo en el uso del TGA, así como en el análisis de los termogramas de las muestras. También por el apoyo en una parte experimental el proyecto como lo fue la cuantificación de grupos amina en la superficie de las NP HDL.

Al Dr. Cesar Fernando Azael Gómez Duran por el apoyo técnico y disponibilidad del Zetasizer, para la determinación del tamaño hidrodinámico y potencial ζ de NP HDL.

A la MC. Alejandra Elizabeth Liñán González por su aportación en gran parte experimental del proyecto como lo fue la síntesis de las NP HDL, así como al análisis y discusión de resultados.

Al comité evaluador por su tiempo, disposición y comentarios en la construcción y finalización de un proyecto de calidad, donde se afrontaron muchos retos en el transcurso del mismo.

Agradecimiento a la Institución

Centro de Investigación y Estudios de Posgrado

Facultad de Ciencia Químicas

Universidad Autónoma de San Luis Potosí

Resumen

La exploración de alternativas en el campo de materiales nanoestructurados, incluyendo nanoarcillas, es de interés como una opción hacia aplicaciones biológicas, incluyendo vacunas, para revolucionar el área médica y las limitaciones que presentan los bioconjugados actuales. En este trabajo se sintetizaron arcillas sintéticas tipo hidróxidos dobles laminares (HDL) como nanoacarreadores alternativos, con potencial como adyuvantes de biomoléculas específicas en aplicaciones médicas. En particular, como prototipo de nanovacuna considerando la adsorción pasiva de albumina de suero bovino (BSA) como proteína antígeno modelo.

Mediante la coprecipitación de nitrato de magnesio y de aluminio con hidróxido de sodio seguida de una hidrólisis térmica (1, 2, 4, 8, 16 y 32 h) resultaron nanopartículas (NP) hexagonales con tamaños menores a 100 nm, estables y reproducibles, para relaciones de precursores 3:1 y 2:1 Mg^{+2}/Al^{+3} . Adicionalmente, la coprecipitación en metanol (MetOH) con 1 h de hidrólisis térmica, permitió producir NP HDL menores a las obtenidas sin el uso de este solvente. En el mejor de los casos el tamaño obtenido para una relación de 75:25 % v/v MetOH/H₂O fue de 66.1 ± 3 nm.

En el primer estudio de conjugación por adsorción pasiva con tres tamaños de NP HDL (92.5, 124.5 y 169.1 nm) y diferentes tiempos de adsorción (0.5, 4 y 24 h) las NP más grandes adsorbieron una menor cantidad de BSA. El empleo de HDL de 169.1 nm y una relación molar 5:1 de BSA/HDL resultó en conjugados BSA-HDL con un tamaño final de 280.6 ± 61.7 nm y un potencial ζ de -23.8 ± 2.97 mV como propiedades deseables para futuras aplicaciones.

En el segundo estudio con NP HDL con un tamaño de 89.5 nm para la bioconjugación de BSA se obtuvieron capacidades máximas de adsorción con valores de Q_{max} de 0.236 ± 0.06 , 0.273 ± 0.02 y 0.290 ± 0.24 mg BSA/ mg HDL (medición directa), y 0.353 ± 0.04 , 0.406 ± 0.02 , 0.506 ± 0.09 mg BSA/ mg HDL (medición indirecta) después de 0.5, 4 y 24 h, respectivamente, después de ajustar los datos experimentales a isothermas de adsorción de Langmuir.

Finalmente, los prototipos de nanovacuna BSA-HDL obtenidos en este proyecto para ambos casos de estudio de bioconjugación (efecto del tamaño de NP HDL y tiempo de adsorción), resultaron en tamaños nanométricos, con baja polidispersidad, estables y con la capacidad de proporcionar una dosis mínima de BSA (≥ 5 μ g de antígeno) para una posible inmunización en un modelo murino en etapas posteriores del proyecto.

Palabras clave: HDL, Nanoacarreadores, Bioconjugación pasiva.

Abstract

The exploration of alternatives in the field of nanostructured materials, including nanoclays, is of interest as an option toward biological applications, including vaccines, to revolutionize medical areas and the limitations that current bioconjugates present nowadays. In this work, we synthesized synthetic clays, specifically layered double hydroxides (LDH) as an alternative nanocarriers, with potential as adjuvants of specific biomolecules in medical applications. In particular, as a nanovaccine prototype considering the passive adsorption of bovine serum albumin (BSA) as a model protein antigen.

After the coprecipitation of magnesium nitrate and aluminum nitrate with sodium hydroxide followed by a thermal hydrolysis (1, 2, 4, 8, 16 and 32 h) we obtained hexagonal nanoparticles (NP) with sizes less than 100 nm, stable and reproducible, using precursor ratios of 3:1 and 2:1 Mg^{+2}/Al^{+3} . Additionally, the coprecipitation in methanol (MeOH) with 1 h of thermal hydrolysis allowed to produce NP LDH with lower sizes than those obtained without the use of this solvent. In the best case the size obtained with 75:25 % v/v MeOH/H₂O was 66.1 ± 3 nm.

In a first conjugation study exploring passive adsorption with three sizes of LDH NP (92.5, 124.5, and 169.1 nm) and different adsorption times (0.5, 4, and 24 h), the larger NP adsorbed a lesser amount of BSA. The use of LDH of 169.1 nm and a 5:1 BSA/HDL mass ratio resulted in BSA-LDH conjugates with a final size of 280.6 ± 61.7 nm and a ζ potential of -23.8 ± 2.97 mV as desirable properties for future applications.

In a second study with LDH NP of 89.5 nm for the bioconjugation of BSA we obtained maximum adsorption capacities with values for Q_{max} of 0.236 ± 0.06 , 0.273 ± 0.02 , and 0.290 ± 0.24 mg BSA/ mg LDH (direct measurement), and 0.353 ± 0.04 , 0.406 ± 0.02 , 0.506 ± 0.09 mg BSA/ mg LDH (indirect measurement) for 0.5, 4, and 24 h, respectively, after adjusting the experimental data to Langmuir adsorption isotherms.

Finally, the BSA-LDH nanovaccine prototypes obtained in this project for both study cases on bioconjugation (effect of the LDH particle size and adsorption time), resulted in conjugates of nanometric sizes, with low polydispersity, stable, and with a capacity to provide more than a minimum dose of BSA (≥ 5 μ g antigen) for a possible immunization in murine models in future stages of this project.

Keywords: LDH, Nanocarriers, Passive bioconjugation

Índice

1	Introducción.....	1
2	Antecedentes	3
2.1	Arcillas.....	3
2.1.1	Estructura de las arcillas	3
2.1.2	Clasificación de las arcillas	6
2.1.3	Propiedades de las arcillas	6
2.1.4	Arcillas aniónicas sintéticas	7
2.1.4.1	HDL.....	7
2.1.4.2	Propiedades de HDL	10
2.1.4.3	Métodos de síntesis	11
2.2	Vacunas.....	13
2.2.1	Tipos de vacunas	13
2.2.2	Materiales como vehículos de entrega y adyuvantes.....	14
2.3	Bioconjugación	17
2.3.1	Aplicaciones	19
2.3.2	Proteínas modelo	19
2.3.2.1	Albúmina de suero bovino (BSA).....	20
2.4	Antecedentes bibliográficos.....	21
3	Justificación	22
4	Hipótesis	23
5	Objetivos	23
5.1	Objetivo general.....	23
5.1.1	Objetivos específicos	23
6	Metodología.....	24
6.1	Materiales.....	24
6.2	Equipos	24
6.3	Métodos	25
6.3.1	Arcillas sintéticas.....	25
6.3.1.1	Síntesis de NP HDL	25

6.3.1.2	Concentración relativa de NP HDL	27
6.3.2	Bioconjugación.....	27
6.3.2.1	Efecto del tamaño de NP HDL.....	27
6.3.2.2	Cinética de adsorción	28
6.3.3	Caracterización fisicoquímica	29
6.3.3.1	Potencial ζ y diámetro hidrodinámico.....	29
6.3.3.2	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier.....	30
6.3.3.3	Análisis termogravimétrico	30
6.3.3.4	Microscopía electrónica de transmisión.....	31
6.3.3.5	Electroforesis.....	31
6.3.3.6	Cuantificación de BSA en solución	32
7	Resultados y Discusión.....	34
7.1	Síntesis de NP HDL.....	34
7.1.1	Efecto de la relación molar Mg^{+2}/Al^{+3}	34
7.1.2	Relación 3:1 vs 2:1 Mg^{+2}/Al^{+3}	45
7.1.3	Punto de carga cero.....	47
7.1.4	Microscopía electrónica de transmisión	49
7.1.5	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier	51
7.1.6	Análisis termogravimétrico	53
7.2	Síntesis de NP HDL 3:1 Mg^{+2}/Al^{+3} en MetOH/H ₂ O	55
7.2.1	Diámetro hidrodinámico y potencial ζ	56
7.2.2	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier	58
7.3	Bioconjugación	59
7.3.1	Efecto del tamaño de NP HDL.....	59
7.3.1.1	Cuantificación directa de BSA.....	66
7.3.2	Efecto del tiempo de adsorción	68
7.3.2.1	Cuantificación directa e indirecta de BSA sobre NP HDL _{89.45nm}	68
7.3.2.2	FTIR del bioconjugado BSA/HDL _{89.45nm}	75
8	Conclusiones	79
9	Referencias bibliográficas.....	81

10	Anexos	89
10.1	Índice de Tablas	89
10.2	Índice de Figuras.....	90
10.3	Información suplementaria	92
10.4	Perspectivas	94
11	Glosario	95

1 Introducción

Actualmente la nanotecnología en el ámbito biológico ha tomado una gran relevancia con el uso de nanodispositivos con el objetivo de mejorar las técnicas de diagnóstico, así como las de imágenes médicas y tratamientos actuales contra diversas patologías. En este último ámbito el uso de nanoconjugados se ha propuesto como una alternativa para aumentar la biodisponibilidad de los fármacos y mejorar su eficacia, a la vez que se reduce la dosis y la frecuencia de administración, dando lugar a modelos de tratamientos más efectivos y menos agresivos para los pacientes (Slowing, et al., 2008).

Las arcillas son materiales comúnmente utilizados en la industria farmacéutica, ya sea como excipientes o sustancias activas. En especial, una de sus recientes aplicaciones se enfoca en la liberación de biomoléculas. Las arcillas pueden ser funcionalizadas con alguna otra molécula a través de un enlace covalente o por adsorción pasiva sobre su superficie, para crear un complejo formado por ambas moléculas unidas entre sí. En la mayoría de los casos, al menos una de las moléculas es de origen biológico o es un fragmento derivado de una biomolécula. En otros, el conjugado que se forma es totalmente sintético, pero su uso se dirige hacia aplicaciones biológicas o biomédicas (Aguzzi, et al., 2007)

Estas interacciones pueden ser utilizadas para lograr ventajas tecnológicas y biofarmacéuticas en cuanto al control de la liberación de biomoléculas específicas. En este sentido, las formulaciones empleando arcillas naturales y sintéticas, recientemente resultan prometedoras para retardar, extender o vectorizar la liberación de fármacos. En consecuencia, esto aumenta la biodisponibilidad de biomoléculas específicas, disminuye efectos secundarios y/o potencia el efecto terapéutico del fármaco (Levis & Deasy, 2002).

Los hidróxidos dobles laminares (HDL) también conocidos como arcillas aniónicas o "similares a la hidrotalcita" tienen características interesantes. Entre estas, morfología laminar, una elevada área superficial (20 a 85 m²/g) respecto a otros minerales y una estructura hexagonal u octaédrica formada por hojas octaédricas comparada con la estructura de la brucita (Mg(OH)₂). Los HDL también tienen una densidad de carga positiva debido a los cationes trivalentes parcialmente sustituidos cationes divalentes. Esto los hace atractivos como un compuesto anfitrión o nanoacarreador de biomoléculas cargadas negativamente mediante fisisorción o bioconjugación pasiva (Martínez & Carbajal, 2012; Osipov, 2012; Christidis, 2011).

Los HDL pueden ser sintetizados por diferentes métodos, incluyendo tratamiento hidrotérmico, sol-gel o coprecipitación, sólo por mencionar algunos ejemplos, donde el principal reto se encuentra en la obtención de tamaños nanométricos, ya que comúnmente en las rutas de síntesis

reportadas, obtienen tamaños de partículas en el orden de micras. En este estudio se empleará un método de síntesis por coprecipitación, seguido de un tratamiento hidrotérmico para la obtención de nanopartículas HDL estables y reproducibles. Por otra parte, la elección de esta ruta de síntesis, resulta del uso de una ruta de síntesis económica y escalable principalmente (Choy & Park, 2004). En este trabajo se usó para la síntesis de HDL Al^{+3} como catión trivalente y como catión divalente Mg^{+2} .

Por otro lado, los HDL son solubles a pH menor a 4, lo cual pueden actuar rápidamente y liberar el fármaco en una forma molecular apropiada para la absorción. Las partículas HDL tienen características viscoelásticas similares a la mucina gástrica y puede permitirse la protección de la mucosa por su capacidad de mantener o imitar las propiedades de barrera del gel de moco gástrico (Nogueira, et al., 2016; Vasti, et al., 2017).

Con las ideas anteriores, surge la innovación por el uso de HDL como nanoacarreadores de biomoléculas, donde se tiene información muy limitada sobre la adsorción pasiva empleando HDL y más aún sobre adsorción activa que resulta en retos de mayor magnitud, así como la falta de exploración en el ámbito de la nanomedicina. Es por ello que se ha convertido en un nanomaterial sintético candidato en aplicaciones como nanoacarreador de biomoléculas. Se tiene evidencia de la obtención de NP HDL con las técnicas de ruta seleccionadas en este trabajo, sin embargo, no se tienen claras las ideas sobre la obtención de las mismas, así como los fenómenos que resultan en el transcurso de la misma. Por otro lado, se identificó que la idea sobre tener una propuesta de prototipo de nanovacuna empleando BSA/HDL no está aterrizada en tener una formulación final con las mejores características como lo es el tamaño, estabilidad y cantidad de antígeno modelo mínima para una posible inmunización, así como la pureza del sistema coloidal resultante.

Este trabajo se enfocará en el potencial como nanoacarreador para futuras aplicaciones biológicas empleando nanopartículas (NP) HDL, principalmente por la densidad de carga positiva, así como sus propiedades fisicoquímicas que conllevan como lo es su punto de carga cero (PZC) a un pH de 11.2 (Liñán González & Padilla Ortega, 2020), lo cual presentó diversas ventajas y desventajas para la síntesis de un bioconjugado final empleando Albumina de Suero Bovino (BSA) como proteína modelo para obtener un prototipo de nanovacuna. Se evaluará los parámetros de síntesis como lo es el tiempo de hidrólisis térmica, así como el uso de solventes y relación de sales 3:1 y 2:1 Mg^{+2}/Al^{+3} , para posteriormente sintetizar mediante una bioconjugación pasiva un bioconjugado BSA/HDL en escala nanométrica, estable y con la proteína necesaria para futuras aplicaciones en un modelo murino y así definir el potencial como nanoacarreador de NP HDL.

2 Antecedentes

2.1 Arcillas

Las arcillas son minerales de origen natural que se encuentran en la superficie de la tierra, definidas como granos finos con un diámetro menor a $2\ \mu\text{m}$. Las arcillas incluyen diferentes especies de minerales como silicatos, óxidos y/o carbonatos. Por otra parte, además de pertenecer a la familia de los filosilicatos, están compuestas de materiales que aportan o no plasticidad y dureza (Bergaya & Lagaly, 2006).

Actualmente han sido de interés en diferentes aplicaciones en el sector industrial, por ejemplo, en la fabricación de materiales de construcción y agregados, fabricación de papel, producción de pinturas, preparación de fármacos, como catalizadores, entre otras (Obaje, et al., 2013).

2.1.1 Estructura de las arcillas

Las arcillas al igual que otros filosilicatos, están formadas por dos unidades fundamentales en su estructura, basada en apilamientos de iones hidroxilo y oxígeno (tetraedros y octaedros), y compuestas principalmente de silicio, aluminio, oxígeno e hidrógeno (Murray, 2006).

La unidad fundamental *tetraédrica* (T), está constituida por átomos de Si^{+4} , O^{-2} y OH^{-} ; en donde el átomo de Si^{+4} en ocasiones es intercambiado por cationes trivalentes como Al^{+3} o Fe^{+3} . El átomo de Si^{+4} se encuentra en el centro de cada tetraedro, rodeado por cuatro átomos de O^{-2} u OH^{-} de manera equidistante, de tal forma que se genera la estructura tetraédrica. Cada tetraedro se une entre sí de manera repetitiva compartiendo tres de sus vértices de oxígeno para formar un patrón bidimensional hexagonal de hojas tetraédricas de $(\text{SiO}_4)^{-4}$ o $(\text{AlO}_4)^{-5}$, donde el cuarto átomo de oxígeno (oxígeno apical) queda libre (**Figura 1**) (Bergaya & Lagaly, 2006).

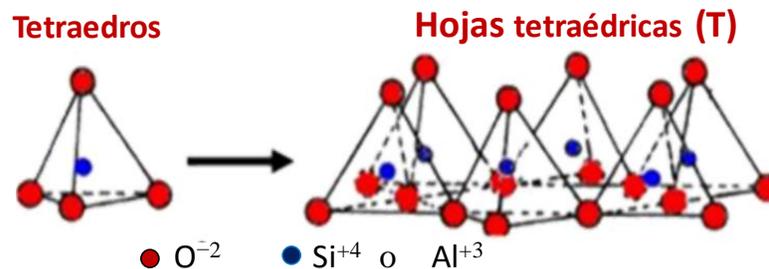


Figura 1. Unidad fundamental de tetraedros y hojas tetraédricas.

Por otro lado, la unidad fundamental *octaédrica* (O) está constituida por átomos de Al^{+3} , O^{-2} y OH^{-} ; en donde el átomo de Al^{+3} en ocasiones es intercambiado por cationes divalentes como Mg^{+2} , Fe^{+2} , Cu^{+2} , o cationes trivalentes como Fe^{+3} y Cr^{+3} . El átomo de Al^{+3} se encuentra en el centro de cada octaedro, rodeado de seis átomos de O^{-2} u OH^{-} de manera equidistante al igual que la estructura tetraédrica. Las hojas octaédricas se forman compartiendo las aristas de cada octaedro con átomos de aluminio adyacentes para formar la red de octaedros (**Figura 2**). Cuando en el centro de las hojas octaédricas se tienen cationes trivalentes se les denomina *di-octaédricas*, es decir, solo se ocupan dos tercios de los posibles sitios para equilibrar las cargas. En consecuencia, cuando se tienen cationes divalentes en el centro de las hojas octaédricas se les denomina *tri-octaédricas* lo que requiere que se ocupen los tres sitios disponibles para balancear la carga (Velde & Meunier, 2008).

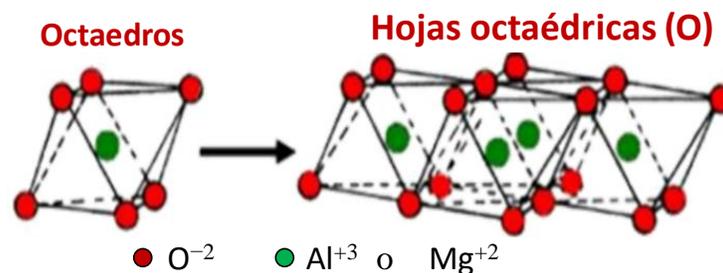


Figura 2. Unidad fundamental de octaedros y hojas octaédricas.

La estructura de las arcillas está formada en base a la unión de las dos unidades fundamentales mencionadas anteriormente, para así formar las diferentes clases de las arcillas. La unión de estas hojas se puede efectuar mediante átomos de oxígeno apicales de ambas hojas (tetraédricas y octaédricas), es decir, el átomo de oxígeno estará coordinado con dos átomos de Al^{+3} y con un átomo de Si^{+4} . De esta manera se pueden encontrar estructuras de arcillas tipo 1:1, 2:1 o 2:2, donde la capa 1:1 (conocida como T:O) está integrada por una hoja tetraédrica y una octaédrica (**Figura 3A**). La estructura 2:1 también denominada como T:O:T, está formada por una hoja octaédrica, rodeada por dos hojas tetraédricas (**Figura 3B**) (Velde, 1992).

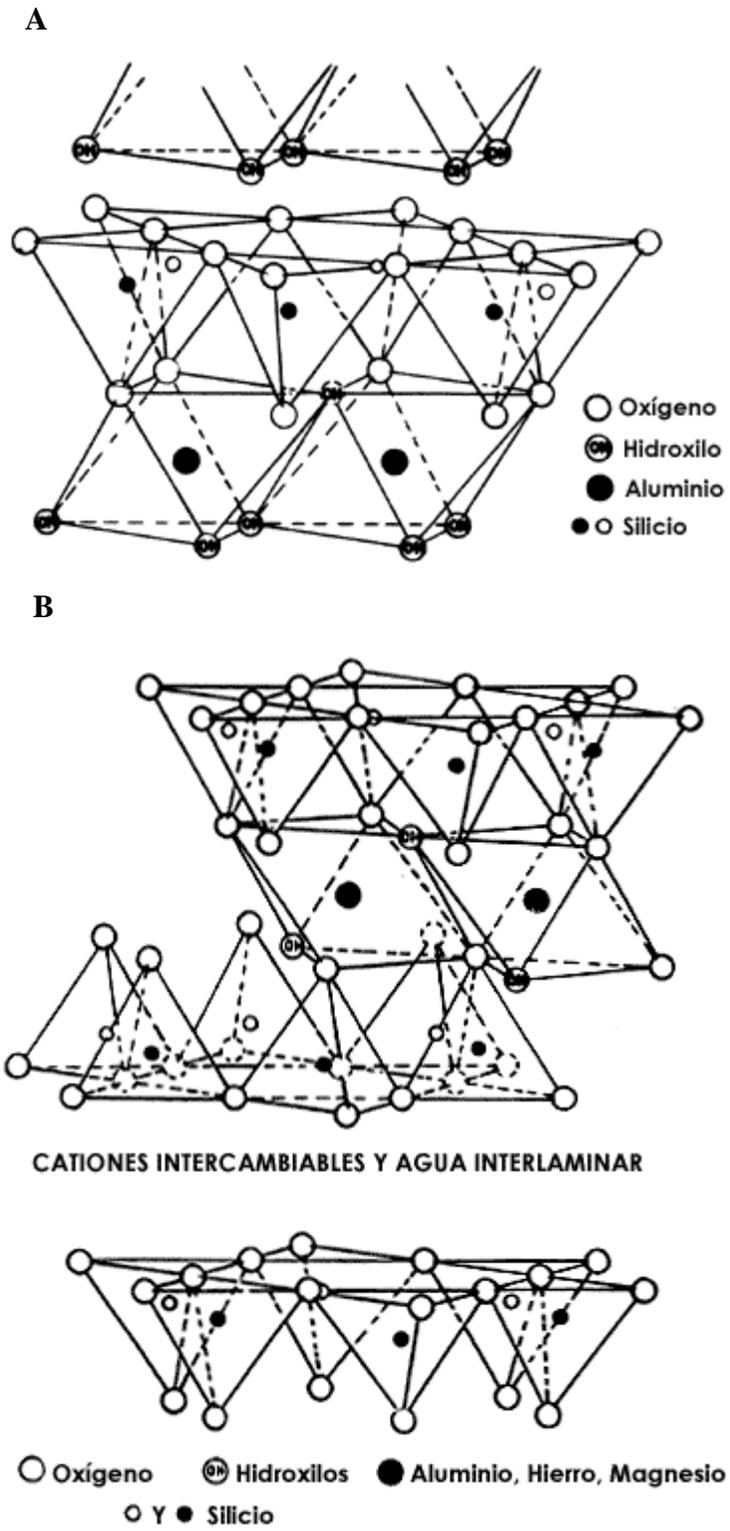


Figura 3. A) Estructura tipo 1:1; B) Estructura tipo 2:1.

2.1.2 Clasificación de las arcillas

Las arcillas se pueden clasificar en función de su estructura, dioctaédricos o trioctaédricos y bilaminares (T:O) o trilaminares (T:O:T), en la **Tabla 1** se muestra su clasificación:

Tabla 1. Clasificación de las arcillas en función de su estructura (García Romero & Suárez Barrios, 2008).

	Dioctaédricos		Trioctaédricos	
Bilaminares T:O 1:1	Canditas:	Caolinita	Serpentina:	Antigorita
		Nacrita		Crisolito
		Dickita		Lizardita
		Halloysita		Bertierina
Trilaminares T:O:T 2:1	Pirofilita		Talco	
	Esmectitas:	Montmorillonita	Esmectitas:	Saponita
		Beidellita		Hectorita
		Nontronita		
	Vermiculitas		Vermiculitas	
Illitas				
Micas:	Moscovita	Micas:	Biotica	
	Paragonita		Flogotipa Lepidolita	
T:O:T:O 2:1:1	Cloritas			
Fibrosos	Paligorskita		Sepiolota	

2.1.3 Propiedades de las arcillas

Las propiedades de las arcillas están directamente relacionadas con su estructura. De manera general, (Bergaya & Lagaly, 2006) han reportado que estos minerales están formados por capas con dimensiones nanométricas, tal es el caso de la capa T:O (1:1) de aproximadamente 0.7 nm

y 0.1 nm para la capa T:O:T (2:1). Las propiedades más relevantes de estos minerales son las siguientes:

- Capacidad de intercambio catiónico y aniónico.
- Plasticidad.
- Capacidad de hinchamiento.
- Tixotropía.
- Alta superficie específica.
- Diversidad de morfología: laminar, tubular o cilíndrica y fibrosa.
- Presenta carga residual debido a sustituciones isomorfas.

Cuando el silicio de las hojas tetraédricas se intercambia por cationes de menor valencia, se genera una carga negativa la cual, para equilibrarse, atrae cationes. De igual forma, la carga negativa se puede equilibrar con cationes intercambiables divalentes (Mg^{+2} , Mn^{+2} , Fe^{+2} , etc.) o trivalentes (Al^{+3} , Mn^{+3} , Cr^{+3} , etc.).

Las características químicas de estos cationes intercambiables determinan muchas de las propiedades fisicoquímicas de las arcillas. Por ejemplo, estos cationes son capaces de adquirir capas de hidratación completas o parciales, las cuales generan la propiedad hidrofílica de las arcillas. Cuando el sodio es el catión interlamina, se presenta la capacidad de hinchamiento, la cual es debida a la capacidad de adsorber moléculas de agua u otros iones polares en su espacio interlamina (Velde & Meunier, 2008).

2.1.4 Arcillas aniónicas sintéticas

2.1.4.1 HDL

Los HDL son también conocidos como “arcillas aniónicas o arcillas sintéticas” dentro del grupo de los filosilicatos, con fórmula general $[M^{+2}_{1-x}M^{+3}_x(OH)_2]^{x+}(A^{n-})_{x/n} \cdot mH_2O$. Donde M^{+2} es un catión divalente como Ca^{+2} , Mg^{+2} , Zn^{+2} , Co^{+2} o Ni^{+2} ; M^{+3} es un catión trivalente como Al^{+3} , Cr^{+3} o Fe^{+3} ; y A^{n-} es un anión como Cl^- , NO_3^- , CO_3^{-2} o SO_4^{-2} . Sin embargo la relación molar $x = M^{+3}/(M^{+3} + M^{+2})$ se encuentra confinada entre 0.2 y 0.4.

Es una arcilla que presenta una estructura laminar y capacidad de intercambio catiónico, ésta última debido a la presencia de aniones interlaminares que balancean las cargas positivas de los hidróxidos metálicos de las láminas. Los HDL tienen diversas aplicaciones, como adsorbente, catalizador, compósito con material polimérico para la liberación de fármacos o capacitor, entre otras (Martínez & Carbajal, 2012; Centi & Perathoner, 2007). En la **Figura 4** se muestran la gran variedad de aplicaciones que ha tenido recientemente este tipo de materiales.



Figura 4. Aplicaciones de HDL.

Los HDL tienen en su espacio interlaminar una estructura cristalina hexagonal u octaédrica con aniones intercambiables (**Figura 5**). Presentan variaciones isomórficas de capas tipo brucita $Mg(OH)_2$ cuando se sustituyen cationes Mg^{+2} por cationes Al^{+3} , proporcionando carga positiva a las láminas. La hidrotalcita es en tipo de HDL el cual es el nombre aplicado a los materiales que forman estas laminas, en el cual el carbonato es el anión predominante (Gu, et al., 2015).

Por otro lado, es importante el tamaño de los cationes metálicos, puesto que la sustitución es más eficiente en iones con radio iónico similar. El rango de admisión en la estructura para los cationes trivalentes es de 0.67 \AA a 0.93 \AA , fuera de este rango la estructura se hace cada vez más inestable. Otras fuentes verifican también que todos los cationes trivalentes son un radio mayor a 0.5 \AA pueden formar HDL (Martínez & Carbajal, 2012). En la **Tabla 2** se muestran ejemplos de cationes trivalentes y divalentes con su respectivo radio iónico.

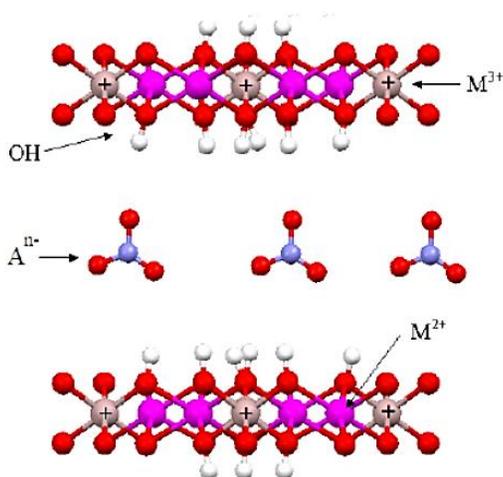


Figura 5. Estructura de HDL (Martínez & Carbajal, 2012) .

Tabla 2. Radios de cationes di- y trivalentes (Martínez & Carbajal, 2012).

Me ^(II)	r (Å)	Me ^(III)	r (Å)
Fe	0.61	Fe	0.55
Co	0.65	Co	0.55
Mg	0.72	Al	0.54
Ni	0.68	V	0.74
Cu	0.73	Cr	0.62
Zn	0.74	Ga	0.62
Cd	0.97	In	0.80

Por otro lado, en la **Tabla 3** se muestran las propiedades más destacables de HDL.

Tabla 3. Propiedades de HDL (Ramírez-Llamas, et al., 2015; Liñán González & Padilla Ortega, 2020).

Mineral	Morfología	Capacidad de intercambio catiónico (meq/100g)	Área superficial (m ² /g)	Formula química	Iones de intercambio
HDL (aniónica)		5 a 150	20 a 85	$[M^{+2}_{1-x}M^{+3}_x(OH)_2]_{x^+}(A^{n-})_{x/n} \cdot mH_2O$	Cl ⁻ , NO ₃ ⁻ , CO ₃ ⁻² o SO ₄ ⁻²

2.1.4.2 Propiedades de HDL

Algunas de las propiedades más interesantes de las arcillas tipo HDL son una alta área superficial de 20 a 85 m²/g, hidratación e hinchamiento, estabilidad térmica, efecto de memoria y buena capacidad de intercambio aniónico. La propiedad de memoria de los HDL se refiere a que, aunque la arcilla sea calcinada a altas temperaturas (de 500 a 800 °C), estos pueden recuperar su estructura laminar en contacto con soluciones aniónicas y agua (Rives, 2001; Cavani, et al., 1991).

Los HDL presentan interés en diversas áreas de aplicación, incluyendo su empleo como carga de polímeros, como sustrato para cromatografía, como antiácido, como soporte o agente para la liberación controlada de fármacos y pesticidas, como sustrato para inmovilización de enzimas, como precursores de materiales magnéticos o de catalizadores, como adsorbentes de colorantes, captadores de especies contaminantes, fluoruros, ácidos y gases como el dióxido de carbono y óxidos de azufre y de nitrógenos, así como en la protección contra la corrosión (Gu, et al., 2015).

En la **Figura 6** se muestra un estudio de difracción de rayos X (XRD, *X-ray diffraction*) y un estudio de microscopía electrónica de transmisión (MET) por (Giraldo Osorio, et al., 2015). En este utilizaron una relación molar de Mg/Al 2:2, en el que se evidenció la fase pura de HDL similar a la fase hidrotalcita, donde los planos cristalinos se encuentran en los ángulos 2θ de 11°, 22°, 35°, 39° y 60°, correspondiente a los planos (003), (006), (009), (012) y (110), respectivamente. El espaciamento basal calculado fue de 0.89 nm, que corresponde a la señal más intensa de difracción asociada a la difracción del plano (003), es consistente con la presencia de nitratos en la región interlaminar.

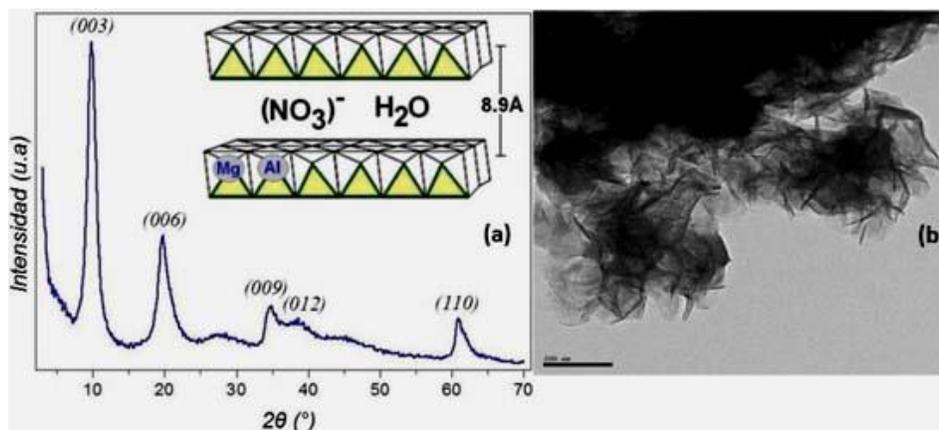


Figura 6. Estudio de HDL con una relación molar de Mg/Al 2:2. A) Estudio DRX. B) Imagen TEM (Giraldo Osorio, et al., 2015).

Una explicación más a detalle de las propiedades más interesantes de los HDL son las siguientes:

- Estabilidad química: Está relacionada con la solubilidad del agua. La estabilidad incrementa en el orden $Mg^{+2} < Mn^{+2} < CO^{+2} \approx Ni^{+2} < Zn^{+2}$ para cationes divalentes y, $Al^{+3} < Fe^{+3}$ para cationes trivalentes.
- Estabilidad térmica: La descomposición térmica de los HDL tienen tres etapas diferenciadas:
 - I: Tiene lugar la pérdida de agua superficial e interlaminar.
 - II: Descomposición de la estructura con la pérdida de grupos hidroxilo y descomposición a mayores temperaturas.
 - III: Los óxidos reaccionan formando carbonatos de transición que se descomponen a mayores temperaturas.
- Efecto memoria: Uno de los más característicos. Al producirse la deshidroxilación y decarbonatación la estructura de la hidrotalcita colapsa, pero es posible recuperar la estructura laminar al rehidratar el material con una solución que contenga aniones. Estos pueden ser los originales o sustancias contaminantes que quieran eliminarse de medios acuosos. En la **Figura 7** se muestra el proceso de rehidratación de este material.
- Capacidad de intercambio iónico: Otra de las características relevantes de estos materiales en su capa intermedia, el orden de preferencia de los aniones para quedarse retenidos entre las capas catiónicas en el siguiente: $NO^{-3} < Br^{-} < Cl^{-} < F^{-} < OH^{-} < MoO_4^{-2} < SO_4^{-2}$. Hay preferencia por los aniones multivalentes ya que intervienen fuerzas electrostáticas más fuertes (Chen, et al., 2018; Carrado, et al., 1998).

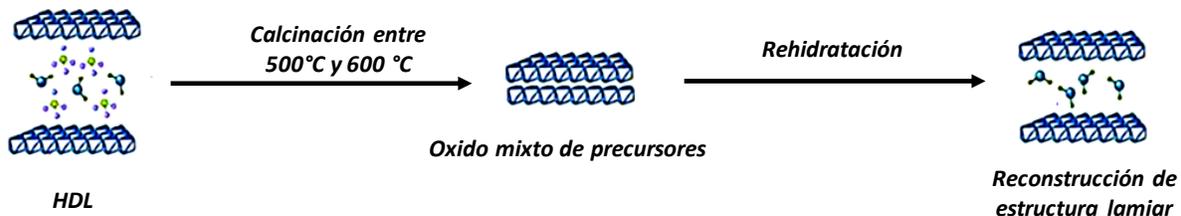


Figura 7. Proceso de rehidratación de HDL (Vergara Arenas, 2013).

2.1.4.3 Métodos de síntesis

El método de coprecipitación es el más común para la síntesis de HDL, el cual consiste en la adición de cationes divalentes y trivalentes a un pH constante para asegurar una alta homogeneidad química con soluciones base como hidróxido de sodio (NaOH) e hidróxido de potasio (KOH) (Bergaya & Lagaly, 2006). Por otra parte, destacan algunos otros métodos de síntesis como el método de sol-gel y actualmente se ha desarrollado un método hidrotermal.

Una de la diferencia entre los métodos es que en el de coprecipitación las estructuras de los HDL son más cristalinas, pero con un menor rango de estabilidad térmica (Gu, et al., 2015; Dupin, et al., 2004).

El método de sol-gel parte de precursores moleculares como alcóxidos metálicos o sales inorgánicas. En este se obtiene un esqueleto del óxido mediante reacciones de hidrólisis y polimerización a baja temperatura. Esto permite la síntesis de fases metaestables del óxido e incluso de sólidos mixtos órgano-inorgánicos. Las especiales características de los soles y geles permiten la síntesis de fibras, láminas, cadenas, geles y polímeros tridimensionales. Una característica particular del proceso sol-gel es la posibilidad controlar el proceso de síntesis desde el precursor molecular hasta el producto, lo cual supone la viabilidad de sintetizar nuevos materiales órgano-inorgánicos (Luisa, 2012).

En la **Figura 8** se ilustra el método de coprecipitación, el cual es el más común para la síntesis de HDL y se observan los parámetros que pueden involucrarse en el control de la síntesis.

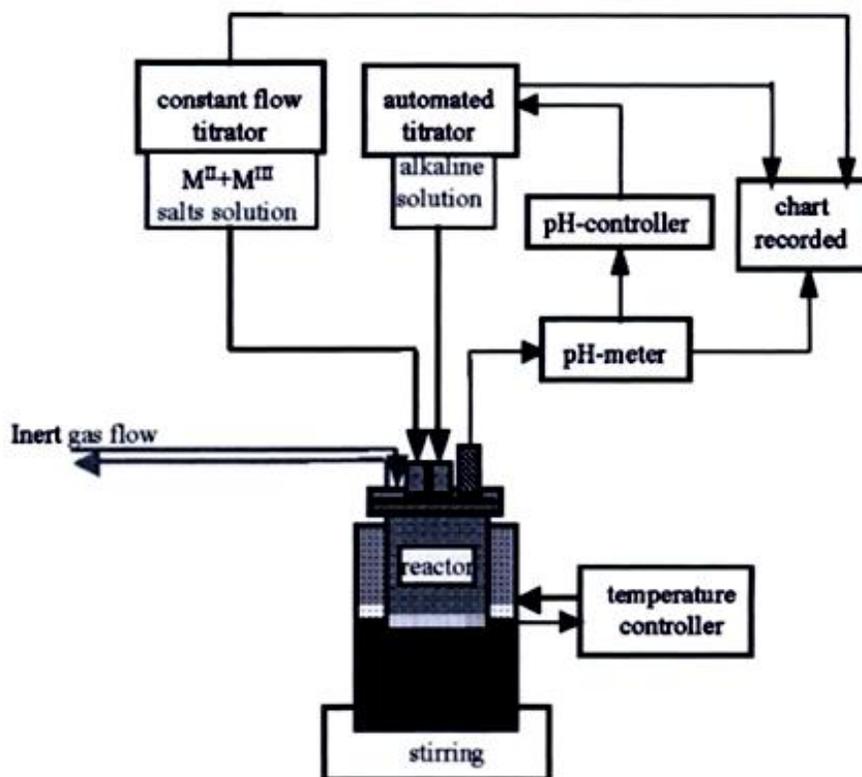


Figura 8. Esquema experimental para la preparación de HDL por el método de coprecipitación (Bergaya & Lagaly, 2006).

2.2 Vacunas

Una vacuna es cualquier formulación farmacéutica que tiene el objetivo de generar efectos profilácticos o terapéuticos en contra de una patología determinada mediante la inducción de respuestas inmunes adaptativas (Chen, et al., 2016). Puede tratarse, por ejemplo, de una suspensión de microorganismos muertos o atenuados, o de productos o derivados de microorganismos, o bien autoantígenos (**Tabla 4**). Actualmente, el método para administrar las vacunas comúnmente es la inyección, aunque algunas veces se puede administrar vía nasal u oral (HHS, 2021).

2.2.1 Tipos de vacunas

Existen distintos tipos de vacunas de acuerdo con la fuente de los antígenos que contiene (Plotkin, et al., 2013; Philadelphia, 2018) y las cuales se mencionan a continuación:

Organismos vivos atenuados: La atenuación del microorganismo se lleva a cabo mediante pases sucesivos en distintos huéspedes animales o medios de cultivo, de esta manera se garantiza la eliminación de la capacidad de inducir enfermedad. Este tipo de vacunas poseen una gran inmunogenicidad que conduce a protección a largo plazo y con un mínimo de dosis. Generalmente inducen una respuesta inmune, celular y humoral, aunque con menor intensidad a la provocada por la infección natural.

Inactivadas o muertas: Formuladas con microorganismos inactivados, térmica o químicamente, sin la capacidad de reproducirse, y por ello, incapaces de producir la enfermedad en el huésped o de transmitirse a otro sujeto. Generalmente son de alta inmunogenicidad, pero menor a la de las vacunas atenuadas.

Toxoides: Se obtienen de toxinas bacterianas que se purifican a partir de cultivos bacterianos y se detoxifican por el efecto del calor, o empleando glutaraldehído o formol. En general, estas vacunas no previenen la infección, pero neutralizan los efectos de esta dado que los anticuerpos inducidos neutralizan los efectos de las toxinas.

Subunitaria: Estas vacunas se formulan con antígenos purificados o sintetizados de determinados componentes (proteínas, péptidos, carbohidratos, toxinas, etc.) de microorganismos. Su desventaja es que generalmente son de baja inmunogenicidad.

A continuación en la **Tabla 4** se muestran ejemplos de los tipos de vacunas mencionadas anteriormente:

Tabla 4. Ejemplos de tipos de vacunas contra enfermedades/patologías específicas (HHS, 2021).

Atenuadas	Influenza, varicela, fiebre amarilla, rotavirus, sarampión.
Inactivadas	Poliomielitis, hepatitis A, rabia, polio (solo vacuna inyectable).
Toxoides	Difteria, tétanos.
Subunitaria/ Conjugada	Hepatitis B, herpes zóster, Haemophilus influenzae B, infección neumocócica, meningitis meningocócica, tos ferina, virus del papiloma humano (HPV).

2.2.2 Materiales como vehículos de entrega y adyuvantes

El empleo de nanopartículas (NP) ha tenido un gran interés en últimos años tanto a nivel industrial como en investigación científica. En informes de la OCDE (Organización para la Cooperación y el Desarrollo) es evidente un notable incremento del uso de NP en diferentes aplicaciones en ambos campos, reportando particularmente en aplicaciones de investigación científica un incremento del 0.1 % en 2013 hasta un 15 % en 2015 (Bavasso, et al., 2016).

Los nanomateriales han surgido como una plataforma prometedora para administrar vacunas, por ejemplo, como adyuvantes para vacunas de subunidad, con menos inconvenientes y efectos secundarios indeseables en comparación con adyuvantes comerciales tales como Alum, QuilA y emulsiones de aceite (adyuvante incompleto de Freund). De las nanopartículas de uso común, las nanopartículas de sílice, de copolímeros de ácido láctico/glicólico (PLGA) y de arcillas como HDL y hectorita, han surgido como plataformas prometedoras de administración de vacunas con adyuvantes (Yan, et al., 2014; Zhang, et al., 2021; Navarro-Tovar, et al., 2018).

La alta densidad de carga superficial de NP HDL y hectorita permite transportar grandes cantidades de moléculas biológicas como ácidos nucleicos y proteínas, mediante interacción electrostática, que. Esta función como transportadores de biomoléculas es esencial para el desarrollo de nanovacunas. Anteriormente, se había demostrado que NP HDL y hectorita de tamaño optimizado para ser potentes adyuvantes mediante la estimulación continua de células inmunes y la liberación sostenida de antígenos, que podrían inducir respuestas inmunes fuertes, a largo plazo y equilibradas contra el antígeno intimina β de *E. coli* (Chen, et al., 2016; Deng, et al., 2013).

Las NP HDL tienen carga positiva, que se puede usar para atraer electrostáticamente moléculas biológicas cargadas negativamente (como oligonucleótidos, ADN, ARN y proteínas) para su transporte y entrega a nivel celular. Las NP HDL han demostrado baja citotoxicidad y una excelente biocompatibilidad, así como el uso para una liberación controlada. Como resultado, las NP HDL han sido ampliamente investigadas para aplicaciones médicas y clínicas, ya que los datos de citotoxicidad demuestran claramente que los nanomateriales de arcilla no son tóxicos y son adecuados para la aplicación transdérmica o la administración oral. Recientemente, las NP HDL se investigan como adyuvantes para mejorar la respuesta inmune a ciertos antígenos (siRNA, BSA, OVA, AfB1, 5-FU, Intimin β y algunos antígenos para el tratamiento de linfoma) (Yan, et al., 2014; Williams, et al., 2014; Chen, et al., 2016; Zuo, 2017; Zhang, et al., 2021; Wong, et al., 2010).

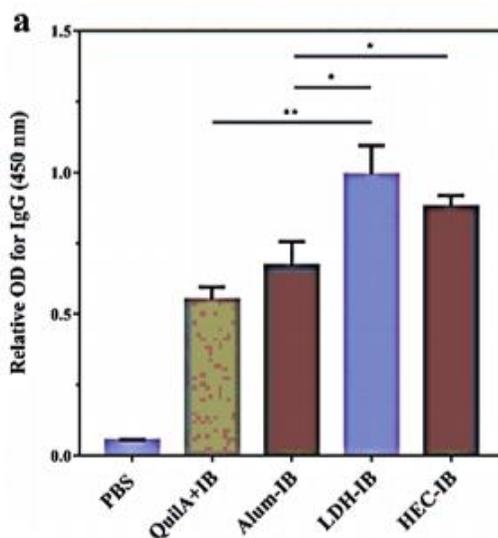


Figura 9. Eficiencia específica de respuestas inmunes humorales estimuladas por adyuvantes de nanopartículas de arcilla (LDH, hectorita) comparadas con adyuvantes típicos (QuilA, Alum) y PBS como control. a) Nivel de Absorbancia anti-IB IgG en suero de ratones femeninos C57BL/6J ($n = 5$) medido a los 49 días (Chen, et al., 2018).

Otros nanomateriales, como las partículas tipo virus carentes de ácidos nucleicos (VLPs) y liposomas (vesículas artificiales formadas a partir de fosfolípidos y colesterol), han sido también empleados como adyuvante de vacunas para la malaria (Sheng, et al., 2018). Muchos de estos materiales son capaces de ser internalizados por las células presentadoras de antígeno por diferentes vías, dando lugar a una regulación de la respuesta inmune dirigida hacia el antígeno de interés. Además, los nanomateriales también pueden ser empleados en la entrega de vacunas a través de las mucosas (Gregory, et al., 2013).

De estas arcillas, NP HDL y hectorita, como nanomateriales de interés, se desconoce con precisión el mecanismo por el cual estimulan el sistema inmunológico. Sin embargo, se ha

demostrado que complejos de antígeno-NP HDL y antígeno-hectorita forman aglomerados disueltos en medio de cultivo y en suero similar a fluido corporal. También forman nódulos con estructuras dispersas en el tejido después de la inyección subcutánea, donde actúan como depósito hasta por 35 días (**Figura 10**). Más importante aún, las nanopartículas de arcilla reclutan células inmunitarias hasta por un mes, y estimulan respuestas inmunitarias más fuertes que los adyuvantes Alumbre y QuilA aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) (**Figura 9**).

Se observa una liberación sostenida de antígenos en depósitos de nanopartículas de arcilla, con un 50 a 60 % de antígenos liberados después de 35 días. Por el contrario, el adyuvante Alumbre se ha reportado que muestra una liberación de antígena mínima del depósito. Por otro lado, las NP HDL y hectorita han demostrado promover una mejor proliferación de células T de memoria, es por ello que estas arcillas son un candidato potencial como plataformas activas de vacunas y detonador de respuesta inmunológica (Chen, et al., 2018; Cunha, et al., 2016; Niikura, et al., 2013).

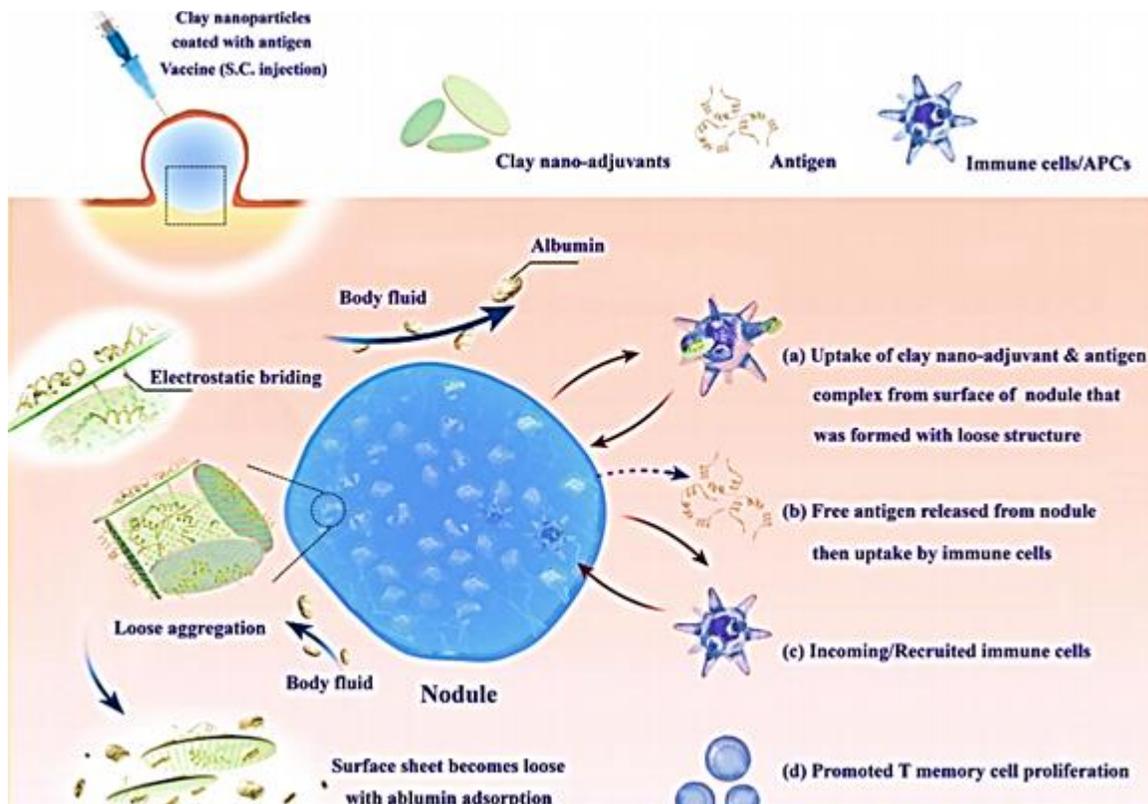


Figura 10. Esquema de nanoadyuvantes de arcillas con antígeno en la cual se forman nódulos con agregados laxos en el sitio de inyección, seguido del mecanismo de respuesta inmunológica por células T de memoria (Chen, et al., 2018).

2.3 Bioconjugación

La unión de una molécula con otra, generalmente por un enlace covalente es conocida como *bioconjugación activa*, formándose un complejo por ambas moléculas unidas entre sí. En la **Figura 11** se muestra un esquema de la formación de un bioconjugado entre una molécula A y B (Hermason, 2013).



Figura 11. Formación de un conjugado mediante la reacción entre dos moléculas y un agente de reactivo, unidos covalentemente.

Normalmente en la formación de un bioconjugado una de las moléculas es de origen biológico, con la finalidad de utilizarle en aplicaciones biológicas o médicas. El propósito de estos bioconjugados es doble: buscar un compuesto en donde las proporciones de ambos sean casi iguales y otra donde son diseñados para obtener más moléculas de uno que de otro (Hermason, 2013).

Actualmente el impacto de la bioconjugación es muy relevante y discreto al mismo tiempo. Conlleva el descubrimiento de nuevas moléculas, la elucidación de procesos biológicos complejos, y de avances en las áreas de medicina, microelectrónica y ciencias de los materiales. Por otra parte, la formulación de fármacos depende en gran medida de la creación de bioconjugados altamente específicos con eficacia terapéutica hacia ciertas células, tejidos o estados de enfermedad. Con el avance en las técnicas de bioconjugación se ha logrado tener una invención e innovación en el área médica principalmente (Eiros, et al., 2018; Nogueira, et al., 2016).

La bioconjugación se puede apreciar de una manera muy sencilla si se cuenta con los conceptos básicos de los mismos, para llegar a tener procesos controlables a través de la elección adecuada de reactivos, reacciones y condiciones. En la **Figura 12** se muestran algunas de las diferentes bioconjugaciones que se pueden llevar a cabo entre dos moléculas (Hermason, 2013).

El proceso de bioconjugación se lleva a cabo típicamente usando agentes reactivos de reticulado o agentes activadores secundarios para acoplarse con grupos funcionales de las especies en una o más de las moléculas a conjugar.

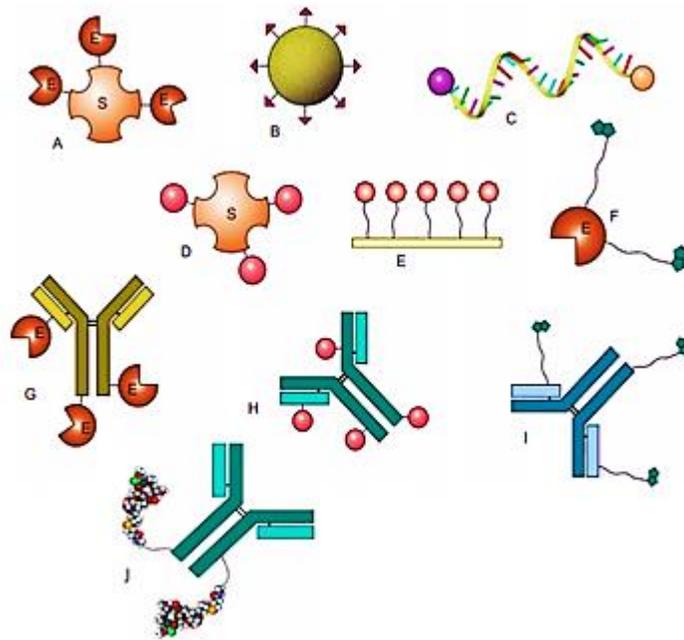


Figura 12. Ejemplos de algunas conjugaciones comunes en áreas biológicas: **A)** conjugado estreptavidina-enzima, **B)** un ligando de afinidad inmovilizado en una partícula, **C)** un oligómero que contiene dos marcadores fluorescentes, **D)** estreptavidina marcada con fluorescencia, **E)** un ligando de afinidad unido a una superficie, **F)** una enzima biotinilada, **G)** un conjugado anticuerpo-enzima, **H)** un anticuerpo marcado con fluorescencia, **I)** un anticuerpo biotinilado, **J)** conjugado anticuerpo-fármaco (Hermason, 2013).

Por otro lado, tenemos la **bioconjugación pasiva**, donde se tienen interacciones más débiles como electrostáticas (entre cadenas laterales ionizadas, con carga de signo opuesto), hidrofóbicas (entre cadenas laterales apolares), fuerzas de van der Waals o hidrofílicas (entre cadenas laterales polares) y fuerzas de polaridad (interacciones dipolo-dipolo). Por ejemplo, en este caso las proteínas con una alta estabilidad interna se adsorben sobre superficies hidrofílicas ya que el uso de plataformas hidrofóbicas tiende a causar cambios estructurales de la proteína. En este tipo de adsorción se aprovecha las características fisicoquímicas superficiales del adsorbente y del adsorbato como es la carga electrostática y la capacidad de atraer o repeler moléculas de agua en su superficie. Este tipo de bioconjugación requiere menos pasos para llevarse a cabo, debido a que en la bioconjugación covalente requiere de agentes reactivos y estabilizantes como el uso de 3-Aminopropyl)triethoxysilane (APTES) o Glutaraldeído respectivamente (Vermonden, et al., 2001; Kondo, et al., 1991; Majoul, et al., 2015).

Finalmente es importante considerar la hidrofobicidad o la hidrofiliidad de las biomoléculas de estudio, ya que es una limitante muy importante a considerar, debido a que limita el medio acuoso a realizar la bioconjugación del sistema, así como las interacciones controlantes del

mismo y el plegamiento de la proteína en la superficie del adsorbente. Por ejemplo, las interacciones entre moléculas hidrofóbicas favorecen los puentes de hidrogeno (Rodil, 2009; Hermason, 2013).

2.3.1 Aplicaciones

La aplicación de las diferentes técnicas y estrategias de bioconjugación son muy diversas, entre ellas se encuentran seis áreas principales: (1) ensayo y cuantificación; (2) detección, seguimiento e imágenes; (3) purificación, captura y barrido; (4) catálisis y modificación química; (5) terapéutica y diagnóstico in vivo; y (6) vacunas y modulación inmune (Hermason, 2013).

Dentro de estas aplicaciones, las vacunas y la modulación inmune son de las más impactantes actualmente. Las vacunas son agentes terapéuticos diseñados para estimular al sistema inmunitario a reconocer y atacar a un patógeno invasor o a una célula específica para producir anticuerpos contra antígenos. Los agentes inmunogénicos han sido una forma original y en avance de las vacunas que consisten en virus inactivados o atenuados o células bacterianas. Por ejemplo, en la vacuna contra el cólera, los tratamientos han progresado significativamente hasta el uso de conjugados inmunogénicos que utilizan acarreadores de ayuda con secuencias peptídicas o epítopes antigénicos de virus o bacterias (Dra, 2012; Eiros, et al., 2018).

Las vacunas conjugadas se han comenzado a utilizar para prevenir o tratar ciertos tipos de cáncer. La inmunoterapia contra este tipo de neoplasias es una alternativa novedosa y potente a los tratamientos convencionales como lo es la radioterapia y quimioterapia. La finalidad de estos nuevos enfoques es utilizar biomarcadores específicos para causar una respuesta inmunitaria para destruir células malignas (Chaudhuri, et al., 2009).

2.3.2 Proteínas modelo

Recientemente ha comenzado a incrementar el interés de la adsorción de biomoléculas sobre plataformas solidas en el campo de la nanomedicina y nanotecnología. Algunas de las principales aplicaciones de la nanomedicina incluyen la producción de vacunas, terapias antitumorales y la regeneración ósea y dental, con el empleo de nanomateriales como NP, liposomas, micelas, entre otras (Garzón, 2019; Chen, et al., 2018). Actualmente se ha obtenido gran avance en esta área con la síntesis de nanovacunas como las vacunas de Pfizer y de Moderna contra el SARS-CoV-2 con el empleo de liposomas (Rosales-Mendoza, et al., 2020). Por otro lado, el empleo de proteínas modelo como BSA y Ovoalbúmina (OVA) son empleadas comúnmente para definir el potencial como nanoacarreadores de nanomateriales para futuras

aplicaciones médicas, por las características específicas de ambas proteínas, incluyendo su bajo costo y alta disponibilidad (Nogueira, et al., 2016).

Existen diferentes factores que afectan la adsorción de una proteína. Los más relevantes incluyen las propiedades fisicoquímicas de la proteína, su tamaño y carga, y las condiciones de adsorción. La estabilidad de las proteínas son clave en el proceso de adsorción. Las proteínas con una alta estabilidad interna se adsorben por bioconjugación pasiva sobre superficies hidrofílicas y el uso de plataformas hidrofóbicas tiende a causar cambios estructurales de la proteína. Por otro lado, las proteínas que tienen una estabilidad interna baja, se adsorben sobre cualquier plataforma independientemente de las interacciones que se estén favoreciendo debido a un cambio de entropía favorable causado por los grandes cambios estéricos resultados de la adsorción (Vermonden, et al., 2001; Kondo, et al., 1991).

La adsorción de una biomolécula en medio acuoso está regida principalmente por el transporte de la biomolécula desde el resto de la solución hasta la superficie de la plataforma sólida, seguido por la fijación de la biomolécula en la superficie y los cambios estéricos de la biomolécula por las fuerzas de adsorción presentes en el sistema (Luensmann & Jones, 2008; Vorobyov & Allen, 2011).

2.3.2.1 Albúmina de suero bovino (BSA)

BSA se obtiene a partir de sangre bovina como subproducto de la industria ganadera. Algunas de sus principales propiedades son: está formada por 583 residuos de aminoácidos, tiene un pI a pH 4.8, su peso molecular es de 66.5 kDA, sus dimensiones son de 4 nm × 4 nm × 14 nm y es una proteína hidrofílica. Como BSA es una proteína de bajo costo y de alta disponibilidad, tiene numerosas aplicaciones como marcador para cuantificación indirecta de otras biomoléculas, y se utiliza como nutriente en cultivos celulares y microbianos (Parés, et al., 2011; Carter & Ho, 1994; Hirayama, et al., 1990).

BSA ha sido evaluada en diferentes materiales con distintos enfoques de aplicación. Hay evidencia de su uso en silicio mesoporoso, titania y algunos minerales arcillosos como sepiolita (Santos, et al., 2016; Cengiz, et al., 2012; Ellingsen, 1991). Recientemente el uso de minerales inorgánicos, especialmente las NP HDL han tomado gran relevancia por las propiedades fisicoquímicas que esta posee y su potencial para adsorber biomoléculas con aplicaciones en nanomedicina. En 2016 reportaron el estudio de la bioconjugación BSA-HDL en donde se evaluó la influencia de la composición química del material, así como las condiciones de adsorción como el pH (Nogueira, et al., 2016). Finalmente, en un estudio reciente, reportaron una de las primeras evidencias de formulación de un prototipo de nanovacuna terapéutica

utilizando como plataforma NP HDL y BSA como antígeno modelo, aunque la vía de administración fue intravenosa y no subcutánea como comúnmente se realiza, considerando la inmunidad antitumoral limitada que puede presentar (Zhang, et al., 2021).

2.4 Antecedentes bibliográficos

El empleo del HDL es asignado usualmente a partículas que no cumplen la escala nanométrica en sus tres dimensiones, sin embargo, la tendencia en la nanomedicina apunta hacia el uso de NP HDL, las cuales cumplen la escala nanométrica en sus tres dimensiones y han resultado ser atractivas para esta área de investigación (Bavasso, et al., 2016). Las nuevas investigaciones se dirigen hacia el uso de NP HDL como un candidato nanoacarreador de biomoléculas, gracias a la carga superficial positiva que estas presentan (Nogueira, et al., 2016).

El futuro de las NP HDL, actualmente se enfoca en la propuesta de prototipos de nanovacunas con antígenos modelos como es el caso de BSA, OVA o intimin β , entre otros, donde los esfuerzos se concentran en entender los fenómenos de adsorción, estabilidad coloidal, tamaño del bioconjugado y cantidad de antígeno modelo adsorbida en la superficie, ante una posible inmunización en un modelo murino, entre otros casos de estudio (Wong, et al., 2010; Xu & Lu, 2006; Chen, et al., 2016). De esta manera se evaluaría el impacto de NP HDL como un nanoacarreador, utilizando un antígeno específico como segunda opción.

La obtención de NP HDL se ha reportado con el uso de un tratamiento hidrotermal, en donde en función del tiempo de tratamiento y/o temperatura de operación, entre otras variables, se controla el tamaño de NP, resultando atractivas para pruebas de adsorción (Xu, et al., 2006). Por otra parte, se ha reportado la obtención de concentraciones elevadas para NP HDL (mayor a 3 mg/mL) ya que en muchos casos para proponer un nanoacarreador, resulta en una de las limitantes para una futura formulación de prototipos de nanovacunas (Dong, et al., 2015). Una alta concentración de la suspensión coloidal de NP, proporciona la oportunidad de caracterizar fisicoquímicamente el nanoacarreador, así como sus posibles bioconjugaciones con proteínas modelo y entender los fenómenos que se presenten, así como entender los resultados obtenidos en el trayecto de cualquiera de los proyectos en aplicaciones biológicas que puedan surgir.

El objetivo principal en la comunidad científica para prototipos de nanovacunas, es obtener tamaños nanométricos de un posible bioconjugado para favorecer la incorporación intracelular y potenciar una respuesta inmunológica empleando nanoacarreadores como NP HDL (Jaber, et al., 2018). Por otra parte, la adsorción de proteínas modelo es atractivo ya que no se limita la cantidad de masa respecto a un antígeno específico y una vez comprendiendo el comportamiento con estas proteínas modelo, se podrá extrapolar hacia antígenos más específicos.

3 Justificación

Las vacunas son una de las intervenciones de salud pública más exitosas para prevenir y controlar enfermedades infecciosas. En este sentido, la problemática en México es la falta de tecnología propia y la dependencia de suministros y vacunas extranjeras (universal, 2021).

Es por ello que surge la necesidad de producir vacunas o nanovacunas en el país para hacer frente a pandemias actuales o futuras. Así, se requiere proponer nanomateriales como futuros adyuvantes de biomoléculas y probar en sistemas *in vivo* para generar diferentes prototipos de nanovacunas que puedan competir contra adyuvantes comerciales (soluciones oleosas y sales de alumbre) en términos de la respuesta inmunológica generada (Záyago-Lau & Foladori, 2010).

Las principales problemáticas para adyuvantes comerciales son críticas y de particular interés ya que desencadenan efectos secundarios graves, como hemólisis para el caso del adyuvante completo de Freund. Este tipo de reacciones adversas genera el interés por innovar con nuevos vehículos de entrega para evitar efectos secundarios, pero sin perder el potencial inmunogénico del antígeno.

Los nanomateriales han sido ampliamente probados como adyuvantes de vacunas de nueva generación, pero pocos provocan inmunorreacciones eficientes. Las nanopartículas de arcilla, por ejemplo, NP de HDL han demostrado su potente potencial adyuvante para generar respuestas inmunitarias efectivas y duraderas, además de presentar ventajas como su bajo costo de síntesis, superficie funcionalizable y nula toxicidad. Sin embargo, el mecanismo por el cual los nanoacarreadores de arcilla estimulan el sistema inmunológico aún no está bien entendido. Hay reportes que indican que una vez inmunizado un complejo con este nanomaterial, este forma nódulos en el tejido que actúan como depósito hasta por 35 días, liberando así un 50 a 60 % del antígeno en estudio. Se ha reportado NP HDL como plataforma de vacunas activas para respuestas inmunitarias sostenidas y potente, estimula respuestas inmunitarias más fuertes que otros adyuvantes aprobados por la FDA.

Con lo anterior, se han obtenido resultados favorables enfocados a usar arcillas sintéticas como un nanoacarreador potenciador de una respuesta inmunológica. Sin embargo, aún falta información sobre el material y las condiciones óptimas para lograr obtener un bioconjugado final prometedor utilizando un antígeno más específico. Los propósitos de este trabajo fueron explorar condiciones de síntesis para producir HDL en escala nanométrica y evaluar el efecto del tamaño y las condiciones de bioconjugación pasiva para obtener un prototipo de nanovacuna utilizando BSA como antígeno modelo. La información recopilada servirá como base para el uso de un péptido como segunda opción para futuras aplicaciones en nanomedicina.

4 Hipótesis

El estudio del tiempo de reacción hidrotermal, así como el uso de solventes y la relación de los metales 3:1 y 2:1 de Mg^{+2} y Al^{+3} en la síntesis de NP HDL, afectará el tamaño nanométrico del material y la estabilidad de las NP HDL en medio acuoso. La estabilidad del bioconjugado propuesto (BSA/HDL) estará restringido por el tamaño de las NP, así como por la cantidad de BSA que se adsorba en la superficie. La cantidad de antígeno modelo adsorbido sobre la superficie de las NP HDL alcanzará la dosis mínima requerida ($\geq 5 \mu\text{g}$ de antígeno) para realizar estudios de inmunización vía subcutánea en estudios posteriores.

5 Objetivos

5.1 Objetivo general

Síntesis de HDL de tamaño nanométrico y su bioconjugación pasiva con BSA como prototipo de nanovacuna.

5.1.1 Objetivos específicos

1. Evaluar una ruta de síntesis de NP HDL para obtener tamaños menores a 100 nm y rendimientos mayores a 3 mg/mL, evaluando las variables siguientes: tiempo de hidrólisis térmica (1, 2, 4, 8, 16 y 32 h), relación de los metales precursores Mg:Al (3:1 y 2:1) y relación de solventes MetOH/H₂O % v/v (0:100, 25:75, 50:50, 75:25 y 100:0).
2. Obtener las isothermas del equilibrio de adsorción pasiva de BSA sobre NP HDL. Cuantificar la BSA en suspensión y en sólido mediante espectrofotometría ultravioleta-visible (UV-vis) y electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE), respectivamente y comparar.
3. Caracterizar fisicoquímicamente las NP HDL mediante dispersión dinámica de luz (DLS), potencial zeta (PZ), análisis termogravimétrico (TGA), microscopía electrónica de transmisión (MET) y espectrofotometría infrarroja con transformada de Fourier (FTIR).

6 Metodología

6.1 Materiales

Nitrato de magnesio hexahidratado ($Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$), nitrato de aluminio nohidratado ($Al(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$) y albúmina de suero bovino (BSA) fueron de Sigma-Aldrich (St Louis, MO). Hidróxido de sodio (NaOH) y metanol (MetOH) fueron de PQF (Xalostoc, México). Ácido clorhídrico (HCl) fue de PQM-Fermont (Monterrey, Nuevo León).

6.2 Equipos

Tabla 5. Equipos esenciales en el desarrollo y caracterización de NP HDL y bioconjugado BSA/HDL.

Equipo	Modelo	Compañía Ciudad País	Aplicación
Sonicador de punta	Vibra-Cell VCX 750	Sonics & Materials Inc., Newtown, CT	Dispersion de suspension coloidal
Sonicador de inmersión	Bransonic CPX-1800H-E	Branson Corp., Danbury, CT	Dispersion de suspension coloidal
Centrifuga para microtubos	Prism C2500	Labnet International Inc., Edison, NJ	Lavados de NP
Reactor de acero inoxidable 304 con cámara de politetrafluoroetileno (PTFE) de 100 mL	ZQ-857	Baoshishan, Shenzhen, China	Hidrolisis térmica
Zetasizer	Nano ZS	Malvern Ltd., Malvern, UK	Tamaño de NP, PDI y potencial ζ
pH-metro o potenciómetro	Bante920	Bante Instruments, Shanghai, China	Mediciones de pH.
Difractómetro de rayos X	D8 Advance	Bruker Corp., Billerica, MA	Estudio DRX
Espectrómetro FTIR-ATR	Nicolet iS 10	Thermo-Fisher Sci., Waltham, MA	Estudio FTIR

Analizador para termogravimetría	TGA 550	TA Instruments Inc., New Castle, DE	Estudio TGA
Microscopio electrónico de transmisión	JEM-2100	Jeol Limited, Tokyo, Japan	Micrografías MET
Sistema de electroforesis	miniProtean Tetra Handcast	Bio-Rad Inc., Hercules, CA	Cuantificación directa de BSA
Espectrofotómetro UV-Vis	Genesys 50	Thermo-Fisher, Waltham, MA	Cuantificación indirecta de BSA
Membrans para filtración de nitrato de celulosa de con un tamaño de poro de 0.45 μm	131135012E	Whatman Ltd., Maidstone, UK	Filtración de sobrenadante BSA/HDL
Celdas capilares plegadas	DTS1070	Malvern Ltd	Medición de tamaño y potencial ζ
Celdas de cuarzo	QS	Hellma GmbH, Jena, Germany	Medición de absorbancia

6.3 Métodos

6.3.1 Arcillas sintéticas

6.3.1.1 Síntesis de NP HDL

La ruta de síntesis de NP HDL consistió en dos etapas, inicialmente una coprecipitación seguida de un método hidrotermal, similar a lo reportado por (Xu, et al., 2006). Las NP HDL se sintetizaron variando la relación de $\text{Mg}^{+2}/\text{Al}^{+3}$ (3:1 y 2:1), el solvente (soluciones de metanol/agua, 0/100, 25/75, 50/50, 75/25, 100/0 % v/v) y tiempos de tratamiento hidrotermal (1, 2, 4, 8, 16 y 32 h); las condiciones para cada experimento se indican en la **Tabla 6**. La metodología se describe a continuación:

Inicialmente, para la coprecipitación, en 10 mL de solvente, se mezcló cierta masa de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y de $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (**Tabla 6**) y después se agregaron 15 mL de una solución de NaOH 0.4M. Esta solución se mantuvo en agitación vigorosa durante 10 min. Una vez pasado este tiempo, el sólido formado se separó por centrifugación y se lavó con 25 mL agua

desionizada. La suspensión con el sólido generado fue sonicada en una punta con 20 % de amplitud por 6 s para resuspender las NP y se centrifugó por 6 min a 21200 RFC (g). Este lavado se repitió una vez más, para asegurar la eliminación de sales precursoras y aglomerados de partículas.

Después, el sólido lavado se sometió a una hidrólisis térmica donde 25mL de la suspensión de NP HDL se colocaron en un reactor de acero inoxidable a 100°C y se dejó a temperatura constante en un baño con aceite mineral durante un tiempo dado.

Finalmente, se retiró la suspensión del reactor y por centrifugación se separó de la solución y las NP se lavaron 3 veces con la solución de metanol/agua de estudio, utilizando un sonicador de inmersión se resuspendieron las NP y se centrifugaron a 21200 RFC (g) durante 40 min para tiempos cortos de tratamiento hidrotérmico y disminuyendo 20 min para tratamiento hidrotérmico a partir de 8 h en cada uno de los lavados.

En la **Figura 13** se muestra un esquema del proceso de síntesis para las NP HDL.

Tabla 6. Relación de precursores en la síntesis de NP HDL.

#	Relación $\frac{n}{\text{Mg}^{+2}/\text{Al}^{+3}}$	Mg(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O (mg)	Al(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O (mg)	solvente MetOH:H ₂ O % v/v	tiempo hidrotérmico h
A19-37	2:1	256.4	187.5	0:100	1, 2, 4, 8, 16 y 32
E1-18	3:1	384.5	187.5	0:100	1, 2, 4, 8, 16 y 32
M38-40	3:1	384.5	187.5	25:75	1
M41-43	3:1	384.5	187.5	50:50	1
M44-46	3:1	384.5	187.5	75:25	1
M47-49	3:1	384.5	187.5	100:0	1

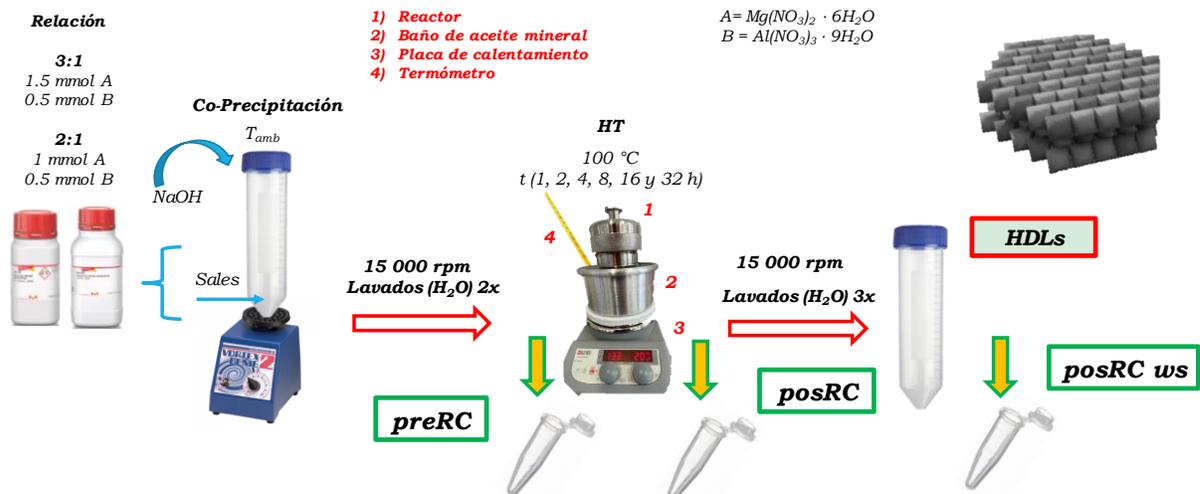


Figura 13. Esquema del sistema de coprecipitación y tratamiento hidrotérmal para la síntesis de NP HDL.

6.3.1.2 Concentración relativa de NP HDL

La concentración relativa de NP HDL en solución se cuantificó tomando una alícuota de 1 mL de la suspensión final y ésta se secó a 70 °C en tubos eppendorf durante 12 h, asegurando la evaporación completa del solvente. Se midió el peso del material final y se calculó la concentración en mg de NP HDL por mL de muestra. Este proceso se realizó en los 3 puntos que se definieron anteriormente para el monitoreo de las NP a lo largo de la síntesis: preRC, posRC y posRC ws.

6.3.2 Bioconjugación

6.3.2.1 Efecto del tamaño de NP HDL

Con la finalidad de evaluar la capacidad de las NP HDL para adsorber de forma pasiva el BSA, se realizaron experimentos de equilibrio de adsorción con 3 tamaños de partícula diferente (92.5, 124.5 y 169.1 nm), a cada tamaño de partícula se evaluaron diferentes concentraciones iniciales de BSA (0.25:1, 0.5:1, 1:1, 5:1 y 10:1).

La adsorción pasiva se llevó a cabo a un pH de 5.7 en H₂O, T = 25°C y V= 0.5 mL. Se siguió la siguiente metodología: en un reactor de lote que consistió en un tubo de centrifuga de 1.5 mL, se contactaron 125, 250, 500, 2500 y 5000 µg de BSA sobre 500 µg de NP HDL de cierto tamaño específico en medio acuoso (H₂O). El adsorbente se mantuvo en agitación constante durante 24 h en un mezclador rotatorio digital tipo disco, tiempo suficiente para alcanzar el equilibrio. Una

vez pasado este tiempo, se separó por centrifugación y el sólido se lavó 3 veces con PBS, centrifugando 5 min a 21200 RFC (g) en cada uno de los lavados. En la **Figura 14** se muestra el esquema de la adsorción pasiva de BSA sobre NP HDL.



Figura 14. Esquema de adsorción pasiva de BSA/HDL.

6.3.2.2 Cinética de adsorción

El tiempo necesario para alcanzar el equilibrio de adsorción de BSA sobre NP HDL se obtuvo generando isotermas de adsorción sobre NP HDL con tamaño de 89.45 nm a diferentes tiempos (0.5, 4 y 24 h). Se investigaron las relaciones BSA/HDL: 0.125:1, 0.25:1, 0.5:1, 1:1, 2:1 y 4:1, a pH de 5.7. Para ello, se agregaron 62.5, 125, 250, 500, 1000, 2000 y 3000 μg de BSA sobre 500 μg de NP HDL en medio acuoso (H_2O). En tubos de 1.5 mL se llevó a cabo el contacto de las NP HDL con BSA para posteriormente agitar las muestras en un mezclador rotatorio digital tipo disco a temperatura ambiente dentro de tubos de 50 mL para mejorar la agitación. Finalmente, la solución remanente se analizó y el bioconjugado se lavó 3 veces con H_2O en una microcentrífuga durante 10 min el lavado inicial y 15 min para los dos últimos lavados a 21200 RFC (g) (**Figura 15**).

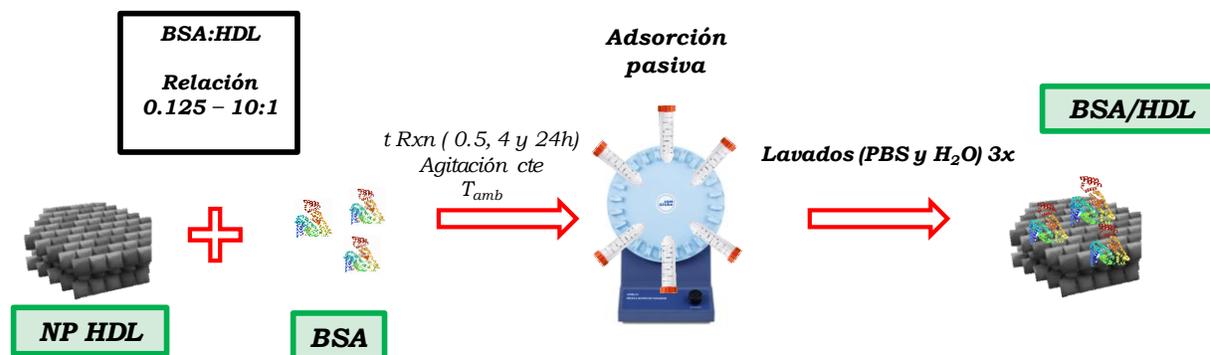


Figura 15. Esquema sobre el estudio del tiempo de adsorción pasiva de BSA/HDL.

6.3.3 Caracterización fisicoquímica

6.3.3.1 Potencial ζ y diámetro hidrodinámico

Se utilizaron estos parámetros para las NP HDL y los bioconjugados durante la medición de potencial ζ y diámetro hidrodinámico por dispersión dinámica de luz (DLS) a 25 °C.

Material:

- NP HDL (RI: 1.714. Absorción: 0.000)
- BSA/HDL (RI: 1.45. Absorción: 0.001)

Dispersante:

- H₂O (Viscosidad: 0.8872 cp. RI: 1.33. Constante dieléctrica: 78.5)
- 0.1× PBS (Viscosidad: 0.8882 cp. RI: 1.33. Constante dieléctrica: 79)

Cuando un medio líquido mueve una partícula dispersa, la mayoría de las veces se adhiere una capa eléctrica dipolar a su superficie, de ahí nace el término “diámetro hidrodinámico”, el cual se define como el tamaño de una esfera hipotética suponiendo una capa de hidratación que rodea la partícula en movimiento. Este parámetro depende de varios factores, entre los cuales la conductividad eléctrica del líquido y la viscosidad son uno de ellos. Este parámetro la mayoría de las ocasiones es mayor al diámetro que se puede medir en un TEM. En consecuencia y derivado de lo anterior, el PDI muestra que tan monodisperso o polidisperso se encuentran los tamaños hidrodinámicos en la suspensión de estudio, en donde valores mayores a 0.7 indican una distribución muy amplia y probablemente no sea apta para técnicas como DLS, finalmente valores cercanos a 0.1 se atribuyen a patrones altamente monodispersos (Mayoral, et al., 2014; Marsalek, 2014).

Por otro lado, el potencial ζ es un parámetro asociado a la estabilidad de la suspensión coloidal de estudio, en este caso, es una medida de la magnitud de la repulsión electrostática entre partículas. Entre más lejanos estén los valores de 0 mV la estabilidad es mejor. Se recomienda el empleo de al menos 1 mM de NaCl para la medición de este parámetro, debido a que se considera la descompensación de carga global, provocado por la interacción de iones Na⁺ y Cl⁻ con la superficie de las partículas, ya que, sin una cantidad mínima de iones controlados, las mediciones se complican (Clogston & Patri, 2011; Bhattacharjee, 2016).

El diámetro hidrodinámico y potencial ζ se midieron en los 3 puntos relevantes definidos en la **Figura 13** con 750 μ L de muestra en una celda capilar para medición de potencial ζ .

La estabilidad de las NP HDL, así como de los cambios en la carga superficial, se midió indirectamente con el potencial ζ . El potencial ζ de NP HDL fue medido en los 3 puntos

relevantes definidos en la **Figura 13** con 750 μL de muestra en una celda capilar para medición de potencial ζ . En principio la carga superficial la registra el equipo en función del movimiento de las NP en solución acuosa cuando se aplica un campo eléctrico, en la cual la velocidad de dichas NP es proporcional a la magnitud de carga eléctrica en su superficie.

Dos parámetros importantes son el punto de carga cero (PZC, *point of zero charge*) de las NP y el punto isoeléctrico (pI) de las biomoléculas, para entender los fenómenos al formar un bioconjugado con NP inorgánicas. El PZC se determina midiendo el potencial ζ en función de los cambios de pH de la suspensión, donde el punto de carga cero o PZC se localiza cuando se tiene un potencial ζ de 0 mV a un pH determinado.

El PZC de NP HDL se obtuvo midiendo el potencial ζ en un intervalo de pH definido, utilizando 1 mM de NaCl y soluciones con fuerza iónica constante de HCl y NaOH de pH 2 a 12, en el cual se utilizó una concentración de NP HDL 0.03 mg/mL. El sistema se dejó en equilibrio durante 9 días a temperatura ambiente, controlando el pH cada día con soluciones 0.1 M de HCl y NaOH. Al terminar este periodo de tiempo se confirmó el pH del sistema y se tomó una alícuota de 750 μL para hacer la medición de potencial ζ en el equipo y obtener la relación de potencial ζ en función del pH.

6.3.3.2 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier

Los grupos funcionales de las NP HDL se identificaron mediante espectroscopía FTIR. Esta técnica se enfoca en la excitación de las moléculas al absorber radiación infrarroja que se incide sobre la superficie. Las moléculas se encuentran en un estado de vibración excitado al absorber la radiación infrarroja, de manera que los enlaces pueden presentar vibraciones por flexión o alargamiento característicos para cada material de estudio. El resultado es un espectro característico para cada compuesto de estudio en donde se observan características específicas de los grupos funcionales presentes ocasionado por las vibraciones a las que son expuestas (Skoog, et al., 2008). Las muestras de NP HDL fueron secadas 24 h a 70 $^{\circ}\text{C}$ y se realizó una molienda previa a la medición con un mortero de ágata para dispersar la muestra y evitar aglomerados. Los resultados fueron tomados por triplicado para tamaños de partícula específicos.

6.3.3.3 Análisis termogravimétrico

El análisis termogravimétrico proporcionó información sobre la estabilidad térmica de las NP HDL, la cual está asociada a su naturaleza estructural, cuando estas son sometidas a un calentamiento de forma automatizada. Esta técnica mide el porcentaje y velocidad de pérdida

de peso en función de la temperatura, debido a la descomposición, sublimación, desorción, reducción o vaporización de una muestra.

Mediante esta técnica se obtuvo la cantidad y tipo de agua presente en las NP HDL, además de evaluar la estabilidad térmica de las mismas respecto al uso de una relación molar 2:1 y 3:1 Mg^{+2}/Al^{+3} durante su síntesis.

Este estudio se realizó con un analizador termogravimétrico en donde se colocó en una charola de platino previamente pesada muestras de NP HDL 2:1 y 3:1 Mg^{+2}/Al^{+3} , poniendo al menos 5 mg. Una vez que el equipo se encontró estabilizado, se comenzó con el análisis en un intervalo de temperatura de 30 a 800 °C, con una velocidad de calentamiento de 10 °C por minuto.

6.3.3.4 Microscopía electrónica de transmisión

Para analizar la morfología y el tamaño de las NP HDL estas fueron visualizadas en un microscopio electrónico de transmisión JEM-JEOL-2100 operado a 200 kV. Con esta técnica se puede obtener información acerca de la configuración, estructura y composición química de las muestras. Para la preparación de las muestras se llevó a cabo una dilución 1 a 100.

6.3.3.5 Electroforesis

La cuantificación directa de BSA adsorbida en NP HDL se llevó a cabo mediante electroforesis. Esta consiste en el movimiento de proteína en relación con un flujo bajo la influencia de un campo eléctrico espacialmente uniforme. De esta manera es posible desplazar la proteína adsorbida sobre la superficie de las NP HDL y cuantificarla comparando con un estándar de la misma proteína con concentraciones conocidas. La composición para los geles utilizados en esta cuantificación se muestra en la **Tabla 7** de acuerdo con el protocolo Tricine-SDS-PAGE (Schägger, 2006). Una vez preparados, los geles fueron inmersos en un buffer para preservarlos hasta su uso.

La preparación de las muestras BSA/HDL para su cuantificación directa consistió primero en calentar 15 μ L de muestra con 5 μ L de buffer de carga a 100 °C durante 15 min. En seguida se adicionó una alícuota de 10 μ L a cada pozo para llevar a cabo la electroforesis, la cual ocurrió durante 2 h a 120 V en la cámara con buffer. Los marcadores colocados en cada gel para la cuantificación por densitometría consistieron en estándar de proteína con 4 puntos: 3, 2, 1 y 0.05 mg/mL.

Una vez terminado el tiempo de electroforesis, se prosiguió a teñir el gel por 30 s de calentamiento en un horno de microondas con cada uno de los reactivos (A, B, C y D), en el orden mencionado anteriormente. Finalmente, el análisis de la cuantificación directa se llevó a cabo por densitometría utilizando ImageJ (NIH, Bethesda, MD) para la obtención de resultados en concentración. Esta relativa a las intensidades de la línea de calibración del estándar de proteína de 4 puntos incluido en cada gel por cada ensayo de adsorción realizado.

Tabla 7. Composición de gel de poliacrilamida para electroforesis (preparación para 2 geles).

Separador	Gel 10 %
AB-3	2 mL
Buffer 3x	3.33 mL
Glicerol	1 g
Agua	10 mL
APS (10 %)	50 μ L
TEMED	5 μ L
Concentrador	Gel 4 %
AB-3	0.33 mL
Buffer 3x	1 mL
Agua	4 ml
APS (10 %)	30 μ L
TEMED	3 μ L

6.3.3.6 Cuantificación de BSA en solución

Mediante esta técnica fue cuantificada indirectamente la adsorción de proteína sobre las NP HDL. En este caso, BSA no adsorbida previa a los lavados finales del bioconjugado para mejorar su pureza. Así, comparando la concentración de BSA inicialmente adicionada a las NP HDL y la concentración de BSA no adsorbida por estas, fue posible obtener una isoterma de adsorción para este sistema. Considerando la isoterma de Langmuir y suponiendo el equilibrio dinámico en el que la velocidad de adsorción de proteína es igual a la velocidad de desorción de proteína adsorbida sobre la superficie del adsorbente, esta es representada por la ecuación:

$$Q_e = \frac{K_e Q_m C_e}{1 + K_e C_e}$$

Donde:

- Q_e : Masa de proteína adsorbida por unidad de masa de NP HDL adsorbente (mg/mg).
 Q_m : Capacidad máxima de adsorción, considerando una monocapa adsorbida (mg/mg).
 K_e : Constante que relacionada a la afinidad entre el adsorbato y el adsorbente (mL/mg).
 C_e : Concentración de proteína en solución en equilibrio (mg/mL).

Este modelo está fundamentado en las siguientes suposiciones:

- La adsorción ocurre en sitios específicos de la superficie y todos los sitios activos son homogéneos.
- En cada sitio se adsorbe sólo una molécula del adsorbato (proteína).
- La energía de adsorción es la misma en cada sitio activo.
- No existen interacciones entre las moléculas adsorbidas adyacentes.

La medición de absorbancia se fundamenta en la absorción de radiación electromagnética cuando ésta interacciona con diferentes moléculas, en longitudes de onda entre 10 y 750 nm. La absorción en la región ultravioleta (10 a 380 nm) se puede relacionar con la estabilidad y la estructura presente de las biomoléculas de interés (Picollo, et al., 2019; Perkampus, 2013). En la región lejana de UV (180 a 240 nm) corresponde a la adsorción de enlaces peptídicos, por otro lado, en la región cercana a UV (260 a 320 nm) se presentan señales correspondientes a proteínas como lo son sus señales laterales de aminoácidos que dependen del contenido de tirosina y triptófano (y en muy pequeña medida en la cantidad de fenilalanina y enlaces disulfuro) (Kelly & Price, 2000; Aitken & Learmonth, 2009).

Las muestras se obtuvieron justo antes del primer lavado del bioconjugado, donde se recuperó el sobrenadante de las relaciones másicas de BSA /HDL probadas (0.125:1, 0.25:1, 0.5:1, 1:1, 2:1 y 4:1) para posteriormente ser filtradas con filtros de membrana de nitrato de celulosa Whatman de 0.45 μ m. Las muestras se colocaron directamente en celdas de Cuarzo y fueron medidas en el espectrofotómetro de 200 a 330 nm con una velocidad media de medición de 1 s. Para los cálculos necesarios para estimar la capacidad máxima de adsorción de BSA sobre las NP HDL, se utilizó como base la Absorbancia óptica de BSA a 279 nm de 0.667 para un estándar de 1 mg/mL (Sigma-Aldrich, n.d.).

9 Referencias bibliográficas

- Aguzzi, C., Cerezo, P., Viseras, C. & Caramella, C., 2007. Use of clays as drug delivery systems: possibilities and limitations. *Appl. Clay Sci.*, Volume 36, pp. 1-3.
- Aitken, A. & Learmonth, M. P., 2009. *Protein determination by UV absorption*. Pimera ed. Totowa, NJ: Humana Press.
- Anderson, M., Holmes, S., Hanif, N. & Cundy, C., 2000. Hierarchical pore structures through diatom zeolitization. *Angewandte Chemie International Edition*, 39(15), pp. 2707-2710.
- Arai, T. & Norde, W., 1990. The behavior of some model proteins at solid-liquid interfaces 1: Adsorption from single protein solutions. *Colloids Surf*, 51(C), pp. 1-15.
- Arduany Raso, M., 2007. *Síntesis y caracterización de nanocompuestos de poliolefinas e hidróxidos dobles laminares*. Catalunya: Universidad Politecnica de Catalunya.
- Arrondo, J., Muga, A., Castresana, J. & Goni, F., 1993. Quantitative studies of the structure of proteins in solution by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Prog. Biophys Mol. Biol*, Volume 59, pp. 23-56.
- Babić, B., Milonjić, S., Polovina, M. & Kaludierović, B., 1999. Point of zero charge and intrinsic equilibrium constants of activated carbon cloth. *Carbon*, 37(3), pp. 477-481.
- Barral, S., Villa-Garcia, M., Rendueles, M. & Diaz, M., 2008. Interactions between whey proteins and kaolinite surfaces. *Acta Mater*, 56(12), pp. 2784-2790.
- Barth, A., 2007. Infrared spectroscopy of proteins.. *Biochim. Biophys. Acta*, Volume 1767, pp. 1073-1101.
- Barth, A. & Zscherp, C., 2002. What vibrations tell us about proteins.. *Q. Rev. Biophys*, 35(4), pp. 369-430.
- Bavasso, I. et al., 2016. Perspectives in nanotechnology based innovative applications for the environment.. *CHEMICAL ENGINEERING*, p. 47.
- Bellezza, F. et al., 2012. Protein interactions with nanosized hydrotalcites of different composition.. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 106(1), pp. 134-142.
- Bergaya, F. & Lagaly, G., 2006. General Introduction: Clays, Clay Minerals, and Clay Science. *Developments in Clay Science*, Volume 1, pp. 1-18.
- Bhattacharjee, S., 2016. DLS and zeta potential—what they are and what they are not?. *ournal of controlled release*, Volume 235, pp. 337-351.
- Carrado, K., Kostapapas, A. & Suib, S., 1998. Layered double hydroxides (LDHs). *Solid State Ionics*, 26(2), pp. 77-86.
- Carter, D. & Ho, J., 1994. Structure of serum albumin. *Adv Protein Chem*, Volume 45, pp. 153-203.
- Cavani, F., Trifiro, F. & Vaccari, A., 1991. Hydrotalcite-type anionic clay: Preparation, properties and applications. *Catalysis Today*, Volume 11, pp. 173-301.

- Cengiz, S., Cavas, L. & Yurdakoc, K., 2012. Bentonite and sepiolite as supporting media: immobilization of catalase. *Appl Clay Sci*, Volume 65, pp. 114-120.
- Centi, G. & Perathoner, S., 2007. Microporous and Mesoporous Materials. *Catalysis by layered materials*, Volume 107, pp. 3-15.
- Ceseña Quiñonez, J. et al., 2019. Remoción de arsénico del agua para consumo humano empleando un hidróxido doble laminar Mg/Fe. *Acta universitaria*, p. 29.
- Chaudhuri, D., Suriano, R., Mittelman, A. & Tiwari, R., 2009. Targeting the immune system in cancer. *Current pharmaceutical biotechnology*, 10(2), pp. 166-184.
- Chen, M. et al., 2013. Reduction in the size of layered double hydroxide nanoparticles enhances the efficiency of siRNA delivery. *Journal of colloid and interface science*, 390(1), pp. 275-281.
- Chen, W. et al., 2016. Efficient and durable vaccine against intimin β of diarrheagenic E. coli induced by clay nanoparticles.. *Small*, 12(2), pp. 1627-1639.
- Chen, W. et al., 2018. Clay Nanoparticles Elicit Long-Term Immune Responses by Forming Biodegradable Depots for Sustained Antigen Stimulation. *Small*, 14(19), p. 1704465.
- Chen, W. et al., 2018. Clay nanoparticles co-deliver three antigens to promote potent immune responses against pathogenic Escherichia coli. *Journal of Controlled Release*, Volume 292, pp. 196-209.
- Choy, J., Kwak, S., Jeong, Y. & Park, J., 2000. Inorganic layered double hydroxides as nonviral vectors.. *Angewandte Chemie International Edition*, 39(22), pp. 4041-4045.
- Choy, J. & Park, M., 2004. Cationic and anionic clays for biological applications. *In Interface Science and Technology*, Volume 1, pp. 403-424.
- Christidis, G., 2011. *Advances in the characterization of industrial minerals (Vol. 9)*. Great Britain: EMU.
- Clogston, J. & Patri, A., 2011. Zeta potential measurement.. *In Characterization of nanoparticles intended for drug delivery*, pp. 63-70.
- Cunha, V., De Souza, R., Koh, I. & Constantino, V., 2016. Accessing the biocompatibility of layered double hydroxide by intramuscular implantation: histological and microcirculation evaluation. *Scientific reports*, 6(1), pp. 1-10.
- Daly, S., Przybycien, T. & Tilton, R., 2003. Coverage-dependent orientation of lysozyme adsorbed on silica. *Langmuir*, 19(9), pp. 3848-3857.
- de Pablo, L., 1964. Las arcillas. I. clasificacion, identificacion, usos y especificaciones industriales. *Boletín de la sociedad Geológica Mexicana*, pp. 49-91.
- Deng, G. et al., 2013. Nanoparticulated heat-stable (STa) and heat-labile B subunit (LTB) recombinant toxin improves vaccine protection against enterotoxigenic Escherichia coli challenge in mouse.. *Journal of bioscience and bioengineering*, 115(2), pp. 147-153.
- Dijkstra, G., Maas, J. & Smit, A., 1973. Asystematic approach to Ir-analysis of methyl groups. *Fresenius Z. Anal. Chem.*, Volume 264, pp. 200-204.
- Dong, H. et al., 2014. Engineering small MgAl-layered double hydroxide nanoparticles for enhanced gene delivery. *Applied clay science*, Volume 100, pp. 66-75.

- Dong, H., Parekh, H. & Xu, Z., 2015. Particle size-and number-dependent delivery to cells by layered double hydroxide nanoparticles. *Journal of colloid and interface science*, Volume 437, pp. 10-16.
- Dra, T., 2012. Visión panorámica del sistema inmune. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 23(4), pp. 446-457.
- Duarte-Silva, R., Villa-Garcia, M., Rendueles, M. & Diaz, M., 2014. Structural, textural and protein adsorption properties of kaolinite and surface modified kaolinite adsorbents.. *Appl Clay Sci*, Volume 90, pp. 73-80.
- Dupin, J. et al., 2004. Intercalation compounds of Mg–Al layered double hydroxides with dichlophenac: different methods of preparation and physico-chemical characterization. *Applied Clay Science*, 27(1-2), pp. 95-106.
- Eiros, J., Pérez Rubio, A. & Bachiller, M., 2018. La investigación clínica en vacunas: el futuro. *Electronic J Biomed*, p. 1.
- Ellingsen, J., 1991. A study on the mechanism of protein adsorption to TiO₂. *Biomaterials*, Volume 12, pp. 593-596.
- Farfán-Castro, S. et al., 2021. Synthesis and immunogenicity assessment of a gold nanoparticle conjugate for the delivery of a peptide from SARS-CoV-2.. *Nanomedicine*, Volume 34, p. 102372.
- Franks, G. & Meagher, L., 2003. The isoelectric points of sapphire crystals and alpha-alumina powder.. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 214(1-3), pp. 99-110.
- García Romero, E. & Suárez Barrios, M., 2008. *LAS ARCILLAS: PROPIEDADES Y USOS*, Madrid: s.n.
- Gardner, E., Huntoon, K. & Pinnavaia, T., 2001. Direct synthesis of alkoxide-intercalated derivatives of hydrocalcite-like layered double hydroxides: precursors for the formation of colloidal layered double hydroxide suspensions and transparent thin films.. *Advanced Materials*, 13(16), pp. 1263-1266.
- Garzón, M., 2019. Usos terapéuticos de nanomateriales y nanopartículas. *Revista Repertorio de Medicina y Cirugía*, 28(1), p. 1.
- Giraldo Osorio, Ó., Arias Duque, N. & Aguirre Cortés, J., 2015. Propiedades dieléctricas de hidróxidos dobles laminares de Mg/Al. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 81(3), pp. 224-231.
- Gondim, D. et al., 2018. Influence of buffer solutions in the adsorption of human serum proteins onto layered double hydroxide.. *International journal of biological macromolecules*, Volume 106, pp. 396-409.
- Gregory, A., Titball, R. & Williamson, D., 2013. Vaccine delivery using nanoparticles. *Front Cell Infect Microbiol*, Volume 3, p. 13.
- Gu, Z., Atherton, J. & Xu, Z., 2015. Hierarchical layered double hydroxide nanocomposites: structure, synthesis and applications. *Chemical Communications*, Volume 51, pp. 3024-3036.

- Gu, Z. et al., 2008. In vitro sustained release of LMWH from MgAl-layered double hydroxide nanohybrids.. *Chemistry of Materials*, 20(11), pp. 3715-3722.
- Gu, Z. et al., 2015. Pre-coating layered double hydroxide nanoparticles with albumin to improve colloidal stability and cellular uptake. *Journal of Materials Chemistry B*, 3(16), pp. 3331-3339.
- GV, F. & Meagher, L., 2003. The isoelectric points of sapphire crystals and alpha-alumina powder.. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 214(1-3), pp. 99-110.
- Hermason, G., 2013. *Introduction to Bioconjugation, Bioconjugate Techniques (Third Edition)*. UK: Elsevier.
- HHS, 2021. *Tipos de vacunas*. [Online] Available at: <https://www.hhs.gov/inmunizacion/basicos/tipos/index.html> [Accessed 11 01 2022].
- Hirayama, K., Akashi, S., Furuya, M. & Fukuhara, K., 1990. Rapid confirmation and revision of the primary structure of bovine serum albumin by ESIMS and frit-FAB LC/MS. *Biochem Biophys Res Commun*, Volume 173, pp. 639-646.
- Isaacs-Paez, E. et al., 2014. Adsorption of boron on calcined AlMg layered double hydroxide from aqueous solutions. Mechanism and effect of operating conditions. *Chemical Engineering Journal*, Volume 245, pp. 248-257.
- Itaya, K., Chang, H. & Uchida, I., 1987. Anion-exchanged clay (hydrotalcite-like compounds) modified electrodes.. *Inorganic Chemistry*, 26(4), pp. 624-626.
- Jaber, M., Lambert, J. & Balme, S., 2018. Protein adsorption on clay minerals. *In Developments in Clay Science*, Volume 9, pp. 255-288.
- Kelly, S. & Price, N., 2000. The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function.. *Current protein and peptide science*, 1(4), pp. 349-384.
- Kondo, A., Oku, S. & Higashitani, K., 1991. Structural changes in protein molecules adsorbed on ultrafine silica particles. *J Colloid Interface Sci*, Volume 143, pp. 214-221.
- Koo, J. et al., 2013. Pressure-induced protein adsorption at aqueous-solid interfaces. *Langmuir*, 29(25), pp. 8025-8030.
- Ladewig, K. et al., 2010. Efficient siRNA delivery to mammalian cells using layered double hydroxide nanoparticles. *Biomaterials*, 31(7), pp. 1821-1829.
- Levis, S. & Deasy, P., 2002. Characterization of halloysite for use as a microtubular drug delivery system. *International Journal of Pharmaceutics*, Volume 243, pp. 125-134.
- Li, A. et al., 2010. Signalling pathways involved in the activation of dendritic cells by layered double hydroxide nanoparticles. *Biomaterials*, 31(4), pp. 748-756.
- Liñán González, A. & Padilla Ortega, E., 2020. *Síntesis y caracterización de materiales bifuncionales basados en arcillas catiónicas/ aniónicas y su aplicación ambiental*, San Luis Potosí: Universidad Autónoma de San Luis Potosí.
- Li, S. et al., 2013. Cellular uptake and gene delivery using layered double hydroxide nanoparticles.. *Journal of Materials Chemistry B*, 1(1), pp. 61-68.

- Luensmann, D. & Jones, L., 2008. Albumin adsorption to contact lens materials: a review. *Cont Lens Anterior Eye*, Volume 31, pp. 179-181.
- Luisa, R., 2012. *Diseño y síntesis de materiales" a medida" mediante el método SOL-GEL*. Madrid: UNED.
- Majoul, N., Aouida, S. & Bessaïs, B., 2015. Progress of porous silicon APTES-functionalization by FTIR investigations. *Applied Surface Science*, Volume 331, pp. 388-391.
- Marsalek, R., 2014. Particle size and zeta potential of ZnO. *APCBEE procedia*, Volume 9, pp. 13-17.
- Martínez, D. & Carbajal, G., 2012. Hidróxidos dobles laminares: arcillas sintéticas con aplicaciones en nanotecnología. *Avances en Química*, Volume 7, pp. 87-99.
- Mayoral, J., Moreno, A. & Martínez, E., 2014. Potencial zeta en la determinación de carga superficial de liposomas. *Latin-American Journal of Physics Education*, 8(4), p. 19.
- Moerz, S. & Huber, P., 2015. pH-dependent selective protein adsorption into mesoporous silica.. *The Journal of Physical Chemistry C*, 119(48), pp. 27072-27079.
- Mousty, C., Kaftan, O., Prevot, V. & Forano, C., 2008. Alkaline phosphatase biosensors based on layered double hydroxides matrices: role of LDH composition. *Sens Actuators B chem*, Volume 133, pp. 442-448.
- Murray, H., 2006. *Applied clay mineralogy: occurrences, processing and applications of kaolins, bentonites, palygorskitesepiolite, and common clays..* Bloomington, Indiana, USA: Elsevier.
- Navarro-Tovar, G. et al., 2018. Mesoporous Silicon Particles Favor the Induction of Long-Lived Humoral Responses in Mice to a Peptide-Based Vaccine. *Materials*, 11(7), p. 1083.
- Niikura, K. et al., 2013. Gold nanoparticles as a vaccine platform: influence of size and shape on immunological responses in vitro and in vivo. *ACS nano*, 7(5), pp. 3926-3938.
- Nogueira, K. et al., 2016. Adsorption behavior of bovine serum albumin on Zn–Al and Mg–Al layered double hydroxides.. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 80(3), pp. 748-758.
- Obaje, S., Omada, J. & Dambatta, U., 2013. Clays and Their Industrial Applications: Synoptic Review. *International Journal of Science and Technology*, 3(5), pp. 264-270.
- Oh, J. et al., 2009. Inorganic metal hydroxide nanoparticles for targeted cellular uptake through clathrin-mediated endocytosis. *Chemistry—An Asian Journal*, 4(1), pp. 67-73.
- Oh, J., Hwang, S. & Choy, J., 2002. The effect of synthetic conditions on tailoring the size of hydrotalcite particles. *Solid State Ionics*, 151(1-4), pp. 285-291.
- Osipov, V., 2012. Density of clay minerals. *Soil Mechanics and Foundation Engineering*, Volume 48, pp. 231-240.
- Parés, D., Saguer, E. & Carretero, C., 2011. Blood by-products as ingredients in processed meat.. *Processed meats*, pp. 218-242.
- Perkampus, H., 2013. *UV-VIS Spectroscopy and its Applications*. Berlin: Springer Science & Business Media.

- Philadelphia, C. o. P. o., 2018. *The history of vaccines*. [Online] Available at: <https://www.historyofvaccines.org/es/contenido/articulos/diferentes-tipos-de-vacunadas> [Accessed 2021 12 12].
- Piccolo, M., Aceto, M. & Vitorino, T., 2019. UV-Vis spectroscopy. *Physical sciences reviews*, 4(4), pp. 1-5.
- Plotkin, S., Orenstein, W. & Offit, P., 2013. *Vaccines*. New York: Elsevier.
- Ralla, K. et al., 2011. Adsorption and separation of proteins by a synthetic hydrotalcite.. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 87(2), pp. 217-225.
- Ramírez-Llamas, L. et al., 2015. Adsorption of fluoride from aqueous solution on calcined and uncalcined layered double hydroxide. *Adsorption Science & Technology*, 33(4), pp. 393-410.
- Rhodes, K. et al., 2000. Hierarchical assembly of zeolite nanoparticles into ordered macroporous monoliths using core– shell building blocks. *Chemistry of materials*, 12(10), pp. 2832-2834.
- Rives, V., 2001. Study of layered double hydroxides by thermal methods.. *Layered double hydroxides: present and future*, pp. 115-132.
- Rives, V., 2001. *Layered double hydroxides: present and future*. New York: Nova.
- Rives, V., 2002. Characterisation of layered double hydroxides and their decomposition products. *Materials Chemistry and Physics*, 75(1-3), pp. 19-25.
- Rodil, S., 2009. Modificación superficial de biomateriales metálicos. *Revista latinoamericana de metalurgia y materiales*, 29(2), pp. 67-83.
- Rosales-Mendoza, S. et al., 2020. What does plant-based vaccine technology offer to the fight against COVID-19?. *Vaccines*, 8(2), p. 183.
- Santos, S. et al., 2016. The effect of structure modifying agents in the SBA-15 for its application in the biomolecules adsorption. *Microporous Mesoporous Mater*, Volume 232, pp. 53-64.
- Schägger, H., 2006. Tricine–sds-page. *Nature protocols*, 1(1), pp. 16-22.
- Sheng, K. et al., 2018. Delivery of antigen using a novel mannosylated dendrimer potentiates immunogenicity in vitro and in vivo. *Eur. J. Immunol*, Volume 38, pp. 424-436.
- Sigma-Aldrich, n.d. *Merck*. [Online] Available at: <https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/product/sigma/a2153> [Accessed 27 abril 2022].
- Skoog, D., Holler, F. & Nieman, T., 2008. *Principios de análisis instrumental*. Sexta ed. UK: Cengage learning.
- Slowing, I., Vivero-Escoto, J., Wu, C. & Lin, V., 2008. Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers. *Adv Drug Deliv Rev*, 60(11), pp. 1278-88.
- universal, E., 2021. *El universal*. [Online] Available at: <https://www.eluniversal.com.mx/nacion/que-es-el-tercer-mundo-somos-tercermundistas> [Accessed 08 12 2021].

- Vasti, C., Borgiallo, A., Giacomelli, C. & Rojas, R., 2017. Layered double hydroxide nanoparticles customization by polyelectrolyte adsorption: mechanism and effect on particle aggregation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, Volume 533, pp. 316-322.
- Velde, B., 1992. *Introduction to clay minerals: chemistry, origins, uses and environmental significance*. London: Chapman & Hall: Springer.
- Velde, B. & Meunier, A., 2008. *The origin of clay minerals in soils and weathered rocks*. Berlin: Springer Science & Business Media.
- Vergara Arenas, B., 2013. *Preparación de hidrotalcitas Cu/Mg/Al y su evaluación catalítica en la síntesis de 1,2,2-Triazoles*, Mexico D.F.: Universidad Autonoma Metropolitana.
- Vermonden, T., Giacomelli, C. & Norde, W., 2001. Reversibility of structural rearrangements in bovine serum albumin during homomolecular exchange from AgI particles.. *Langmuir*, Volume 17, pp. 3734-3740.
- Villalobos, I. et al., 2020. Manejo en pacientes intoxicados con metanol una breve revisión. *Revista Médica de la Universidad de Costa Rica*, 14(1), pp. 9-18.
- Vorobyov, I. & Allen, T., 2011. On the role of anionic lipids in charged protein interactions with membranes. *Biochim Biophys Acta*, Volume 1808, pp. 1673-1683.
- Williams, G. et al., 2014. Immunity induced by a broad class of inorganic crystalline materials is directly controlled by their chemistry. *Journal of Experimental Medicine*, 211(6), pp. 1019-1025.
- Wong, Y. et al., 2010. Efficient delivery of siRNA to cortical neurons using layered double hydroxide nanoparticles. *Biomaterials*, 31(33), pp. 8770-8779.
- Xu, Z. & Lu, G., 2006. Layered double hydroxide nanomaterials as potential cellular drug delivery agents. *Pure and Applied Chemistry*, 78(9), pp. 1771-1779.
- Xu, Z. et al., 2006. Stable suspension of layered double hydroxide nanoparticles in aqueous solution. *Journal of the American Chemical Society*, 128(1), pp. 36-37.
- Yan, S. et al., 2014. Polarized immune responses modulated by layered double hydroxides nanoparticle conjugated with CpG. *Biomaterials*, 35(35), pp. 9508-9516.
- You, Y., Vance, G. & Zhao, H., 2001. Selenium adsorption on Mg–Al and Zn–Al layered double hydroxides. *Applied Clay Science*, 20(1-2), pp. 13-15.
- Záyago-Lau, E. & Foladori, G., 2010. La nanotecnología en México: un desarrollo incierto. *Economía, sociedad y territorio*, 10(32), pp. 143-178.
- Zhang, L. et al., 2021. Efficient delivery of clay-based nanovaccines to the mouse spleen promotes potent anti-tumor immunity for both prevention and treatment of lymphoma. *Nano Research*, 14(5), pp. 1326-1334.
- Zhang, L. et al., 2018. Efficient co-delivery of neo-epitopes using dispersion-stable layered double hydroxide nanoparticles for enhanced melanoma immunotherapy. *Biomaterials*, Volume 174, pp. 54-66.

Zuo, H., 2017. *Modifying layered double hydroxide nanoparticles with peptide to penetrate blood brain barrier for gene delivery*, Australia: University of Queensland.

10 Anexos

10.1 Índice de Tablas

Tabla 1. Clasificación de las arcillas en función de su estructura	6
Tabla 2. Radios de cationes di- y trivalentes	9
Tabla 3. Propiedades de HDL.....	9
Tabla 4. Ejemplos de tipos de vacunas contra enfermedades/patologías específicas.....	14
Tabla 5. Equipos esenciales en el desarrollo y caracterización de NP HDL y bioconjugado BSA/HDL.	24
Tabla 6. Relación de precursores en la síntesis de NP HDL.	26
Tabla 7. Composición de gel de poliacrilamida para electroforesis.....	32
Tabla 8. Ejemplos de proteínas duras y blandas.....	68
Tabla 9. Parámetros de isothermas Langmuir para cuantificación de BSA directa e indirecta..	74
Tabla 10. Efecto del tiempo de tratamiento hidrotermal y relación de sales precursoras para NP HDL posRC.....	92
Tabla 11. Efecto del tiempo de tratamiento hidrotermal y relación de sales precursoras para NP HDL posRC ws.....	93

10.2 Índice de Figuras

Figura 1. Unidad fundamental de tetraedros y hojas tetraédricas.	3
Figura 2. Unidad fundamental de octaedros y hojas octaédricas.	4
Figura 3. A) Estructura tipo 1:1; B) Estructura tipo 2:1.....	5
Figura 4. Aplicaciones de HDL.....	8
Figura 5. Estructura de HDL (Martínez & Carbajal, 2012)	9
Figura 6. Estudio de HDL con una relación molar de Mg/Al 2:2..	10
Figura 7. Proceso de rehidratación de HDL.	11
Figura 8. Esquema para la preparación de HDL por el método de coprecipitación.....	12
Figura 9. Eficiencia específica de respuestas inmunes humorales estimuladas por adyuvantes de nanopartículas de arcilla (LDH, hectorita) comparadas con adyuvantes típicos (QuilA, Alum) y PBS como control.....	15
Figura 10. Esquema de nanoadyuvantes de arcillas con antígeno.....	16
Figura 11. Formación de un conjugado.	17
Figura 12. Ejemplos de algunas conjugaciones comunes en áreas biológicas.....	18
Figura 13. Esquema del sistema de coprecipitación y tratamiento hidrotermal para la síntesis de NP HDL.	27
Figura 14. Esquema de adsorción pasiva de BSA/HDL.	28
Figura 15. Esquema sobre el estudio del tiempo de adsorción pasiva de BSA/HDL.	28
Figura 16. Evolución de NP HDL 3:1 por etapas.....	36
Figura 17. Efecto de tratamiento hidrotermal de 1 a 32 h en NP HDL 3:1 posRC ws.	38
Figura 18. Reproducibilidad del efecto de HT de 1 a 32h en NP HDL 3:1 posRC ws.....	39
Figura 19. Evolución de NP HDL 2:1 por etapas.....	41
Figura 20. Efecto de tratamiento hidrotermal entre 1 y 32 h en NP HDL 2:1 posRC ws.....	43
Figura 21. Reproducibilidad del efecto hidrotermal en NP HDL 2:1 posRC ws.....	44
Figura 22. Diámetro hidrodinámico de NP HDL 3:1 y 2:1 posRC y posRC ws.....	46
Figura 23. Concentración de NP HDL 3:1 y 2:1 posRC ws.....	46
Figura 24. Resultado de la dispersión de NP HDL.	47
Figura 25. PZC de NP HDL 3:1 Mg^{+2}/Al^{+3} y el efecto del pH en el tamaño de las NP HDL.	49
Figura 26. Imagen TEM de NP HDL 3:1.....	50
Figura 27. Espectros FTIR de diferentes tamaños de NP HDL.	52
Figura 28. Termogramas de NP HDL.	54
Figura 29. Evolución del diámetro hidrodinámico de NP HDL 3:1 Mg^{+2}/Al^{+3} en diferentes proporciones de MetOH/H ₂ O (% v/v) a través del tiempo.....	57
Figura 30. Espectros FTIR de diferentes NP HDL 3:1 Mg^{+2}/Al^{+3} obtenidas a partir del uso de diferentes proporciones de MetOH/H ₂ O (% v/v)	59
Figura 31. Interacción pasiva entre BSA y NP HDL.	60

Figura 32. NP HDL para pruebas de adsorción pasiva.	60
Figura 33. Adsorción pasiva con diferentes relaciones (p/p) de BSA sobre NP HDL 92.5 nm ...	62
Figura 34. Adsorción pasiva con diferentes relaciones (p/p) de BSA sobre NP HDL 124.5 nm ..	64
Figura 35. Adsorción pasiva con diferentes relaciones (p/p) de BSA sobre NP HDL 169.1 nm ..	65
Figura 36. Reproducibilidad del bioconjugado final respecto a las mejores relaciones BSA/HDL	66
Figura 37. Cuantificación de BSA sobre NP HDL mediante Electrophoresis.....	67
Figura 38. Parámetros de BSA/HDL $_{89.5\text{ nm}}$ en función del tiempo de adsorción.....	69
Figura 39. Cuantificación directa de BSA sobre NP HDL $_{89.5\text{ nm}}$ mediante electroforesis, e indirecta a partir de BSA en equilibrio (sobrenadante) mediante	71
Figura 40. Isotherma de Langmuir en función del tiempo de adsorción.....	73
Figura 41. Representación del mecanismo controlante de adsorción para interacciones electrostáticas para 0.5, 4 y 24 h de adsorción BSA/HDL $_{89.5\text{ nm}}$	75
Figura 42. FTIR de bioconjugado final BSA/HDL $_{89.5\text{ nm}}$, 30 min de adsorción.	77
Figura 43. FTIR de bioconjugado final BSA/HDL $_{89.5\text{ nm}}$, 4 h de adsorción.....	77
Figura 44. FTIR de bioconjugado final BSA/HDL $_{89.5\text{ nm}}$, 24 h de adsorción.....	78

10.4 Perspectivas

La cantidad de muestra para la caracterización fisicoquímica de NP HDL fue una limitante en el desarrollo del proyecto, es por ello que en este trabajo no se tiene estudio de técnicas de alto valor en este tipo de estudios como lo es DRX, los cuales son importantes para inferir la formación de una estructura tipo brucita y corroborar los resultados obtenidos mediante los resultados TGA y FTIR principalmente. En particular con las NP HDL sintetizadas con el uso de MetOH, la complementación de los resultados con estudios de DRX y TGA, son algo con una alta relevancia a estudiar en un corto plazo a futuro, por los resultados interesantes que mostraron como lo fue su cambio de apariencia y el menor diámetro hidrodinámico que la síntesis de NP HDL en medio acuoso (H₂O).

En el desarrollo de la parte experimental en la bioconjugación pasiva con BSA, se optimizó de la mejor manera la interacción inicial BSA/HDL, ya que en la literatura se tienen diferentes metodologías de interacción y los resultados varían entre una metodología y otra, los cuales, en comparación con los resultados obtenidos en este trabajo, se logra llegar a una conclusión más precisa sobre las oportunidades de mejora en la interacción de NP HDL con BSA. Es por ello que la adición de NP HDL mediante goteo a la solución de BSA, así como el pH de adsorción, son dos estudios relevantes que se deben contemplar en una etapa inicial de la continuación de este trabajo, así como una mejor caracterización fisicoquímica del bioconjugado BSA/HDL mediante estudios de TGA, TEM, SEM y técnicas viables para elucidar con exactitud los fenómenos observados en este estudio.

El prototipo de nanovacuna propuesto en este trabajo BSA/HDL resultó en un candidato con las características necesarias para realizar pruebas *in vivo* en un sistema murino como una segunda etapa del proyecto, sin embargo, es necesario realizar pruebas de citotoxicidad de las NP HDL. Las NP HDL en caso de resultar potenciadoras de respuesta inmunológica, se tendrá la seguridad de probar con antígenos más específicos y obtener resultados favorables para la comunidad científica con el uso de NP HDL como nanoacarreador de biomoléculas, donde se buscará evitar problemas como efectos secundarios de vacunas convencionales y dosis con concentraciones elevadas, así como otras problemáticas de interés social. Finalmente, el avance en esta investigación, ayudara como base para entender la interacción superficial de un material inorgánico con biomoléculas, el cual actualmente sigue presentando grandes retos para la comunidad científica.

11 Glosario

AB-3	Acrilamida-bisacrilamida
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> Albúmina de suero bovino
C ₂ H ₃ NaO ₂	Acetato de sodio
CIC	Capacidad de intercambio catiónico
DH	Diámetro hidrodinámico
DLS	<i>Dynamic light scattering</i> Dispersión dinámica de luz
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> Administración de Alimentos y Medicamentos
FTIR	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier
H ₂ O	Agua desionizada
HDL	Hidróxido doble laminar
MetOH	Metanol
Na ₂ CO ₃	Carbonato de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
NP	Nanopartículas
O	Octaedros
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> Buffer fosfato salino
PDI	<i>Polydispersity index</i> Índice de polidispersidad
pI	Punto isoeléctrico
PZ	Potencial ζ
PZC	<i>Point of zero charge</i> Punto de carga cero
T	Tetraedros
TEM	<i>Transmission Electron Microscopy</i> Microscopía electrónica de transmisión
TGA	<i>Thermogravimetric analysis</i> Análisis termogravimétrico
UV-vis	Espectrofotometría ultravioleta-visible
XRD	<i>X-ray diffraction</i> Difracción de rayos X