

DERIVATIZACIÓN Y CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA DE UN BIOPOLÍMERO A BASE DE *L*-LISINA CON ANÁLOGOS DE LA *D*-BIOTINA: *CO*-POLI(*L*-LISINA)-*GRAFT*-(ϵ -*N*-[*X-D*-BIOTINIL]-*L*-LISINA)

Flavio Dolores Martínez-Mancera y José Luis Hernández-López*

Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica, S.C., Parque Tecnológico Querétaro S/N, P.O. Box 064, Pedro Escobedo, Querétaro, 76703 México

Recebido em 24/06/2015; aceito em 11/09/2015; publicado na web em 11/11/2015

DERIVATIZATION AND SPECTROSCOPIC CHARACTERIZATION OF A BIOPOLYMER BASED ON *L*-LYSINE WITH *D*-BIOTIN ANALOGS: *CO*-POLY(*L*-LYSINE)-*GRAFT*-(ϵ -*N*-[*X-D*-BIOTINYL]-*L*-LYSINE). We report the single-step derivatization reaction of a biopolymer based on *L*-lysine with *D*-biotin analogs: *Co*-poly(*L*-lysine)-*graft*-(ϵ -*N*-[*X-D*-biotinyl]-*L*-lysine) (PLL-*X*-Biotin). The valeric acid carboxylate of *D*-biotin is activated to an NHS ester for direct modification of amine groups in proteins and other macromolecules. NHS esters react by nucleophilic attack of an amine in the carbonyl group, releasing the NHS group, and forming a stable amide linkage. NHS-*X*-Biotin is the simplest biotinylation reagent commercially available. In contrast with *D*-biotin, it has a longer spacer arm off the valeric acid side chain allowing better binding potential for avidin or streptavidin probes. Derivatization of poly(*L*-lysine) (PLL) with NHS-*X*-Biotin led to a copolymer PLL-*X*-Biotin. UV-Visible, IR-FT and ¹H NMR characteristics derived from synthesis are briefly discussed.

Keywords: biopolymer; derivatization; poly(*L*-lysine); NHS-*X*-Biotin; spectroscopic characterization.

INTRODUCCIÓN

Los polímeros policatiónicos a base de poli(*L*-lisina) (PLL) y modificaciones realizadas a su estructura han sido aprovechados hoy en día en numerosas aplicaciones relacionadas con ciencia de materiales, polímeros, bioquímica molecular y celular,¹ diseño de vectores no-víricos para la liberación controlada de genes,² liberación controlada de fármacos antitumorales,³ nanotecnología,⁴ biotecnología⁵ y biomedicina.⁶ Dentro de las modificaciones realizadas a su estructura, los derivatizados conteniendo las fracciones ϵ -*N*-[*D*-biotinil]-*L*-lisina⁷ y ϵ -*N*-[*X-D*-biotinil]-*L*-lisina⁸⁻¹¹ han sido ampliamente utilizados en estudios biofísicos y fisicoquímicos de superficie, en los cuales la orientación y adsorción específica de biomoléculas, desempeñan un papel trascendental. En el reporte original,⁹ este tipo de copolímero fue sintetizado pero ningún dato sobre su rendimiento ni caracterización química fue evidenciado. Extendiendo nuestros intereses de investigación en este campo, hemos introducido con éxito la interacción biomolecular específica avidina/biotina¹² en la molécula objeto de estudio¹³ al formar películas delgadas sobre distintos tipos de sustratos.^{14,15} NHS-LC-Biotina es un derivado de la *D*-biotina conteniendo un brazo espaciador alejado de la cadena lateral del ácido valérico, terminando en un éster de NHS. El compuesto también es conocido como succinimidil-6-(biotinamido)hexanoato o NHS-*X*-Biotina. El espaciador del ácido 6-aminocaproico provee una longitud más grande en el caso de presentarse una molécula modificada covalentemente y los anillos de biotina bicíclica. La distancia total desde una molécula ligada a la componente de biotina es aproximadamente 22.4 Å, la cual es significativamente más grande que la longitud de 13.5 Å de la molécula de NHS-Biotina sin un brazo espaciador.⁷ Este incremento en distancia puede resultar en un mejor potencial de enlace para sondas conteniendo avidina o estreptavidina, porque los sitios de enlace en este tipo de proteínas generalmente se encuentran localizados en el interior de su contorno superficial.

Empleando un enfoque modernista basado en la filosofía de la química verde,¹⁶ se presenta en este trabajo la derivatización y

dilucidación de la estructura química de un biopolímero a base de *L*-lisina y análogos de la *D*-biotina: *Co*-poli(*L*-lisina)-*graft*-(ϵ -*N*-[*X-D*-biotinil]-*L*-lisina) (PLL-*X*-Biotina). Brevemente, la química verde plantea el diseño de productos o procesos que reduzcan o eliminen el uso o la producción de sustancias peligrosas,¹⁷ así como prevenir la contaminación al ofrecer alternativas de mayor compatibilidad ambiental, comparadas con los productos o procesos disponibles actualmente, cuya peligrosidad es mayor.¹⁸ Se reportan detalles estructurales sobre la caracterización espectroscópica basada en los espectros UV-Visible, IR-FT y RMN ¹H.

EXPERIMENTAL

Materiales y reactivos

Succinimidil-6-(biotinamido)hexanoato 98% (NHS-*X*-Biotina, PM = 454.54 Da), hidrobromuro de poli(*L*-lisina) \geq 99.9% (PLL, PM = 12000 Da), NaHCO₃ 99.95%, D₂O, DMSO \geq 99%, DMSO-D₆ \geq 99.96% y albúmina de suero bovino (BSA) fueron adquiridos de *Sigma-Aldrich* (EUA); kit HABA-Avidina para la cuantificación de biotina, reactivo de Bradford (colorante azul de Coomassie), cassettes de diálisis (membrana de corte de peso molecular, MWCO = 3.5 kDa) y buffer de fosfatos salino (PBS) BupH™ Packs (0.1 mol/L Na₃PO₄, 0.15 mol L⁻¹ NaCl, pH 7.2) fueron adquiridos de *Thermo Scientific* (EUA). Agua desionizada tipo I (ρ = 18.2 MΩ cm; TOC \leq 10 ppb) fue suplida por un sistema dispensador de agua *EMD Millipore* (EUA) *Simplicity*. Todas las disoluciones preparadas se esterilizaron por medio de filtración usando filtros de membrana hidrofílica (0.22 μm) adquiridos de *Millipore* (EUA).

Síntesis y purificación del *co*-poli(*L*-lisina)-*graft*-(ϵ -*N*-[*X-D*-biotinil]-*L*-lisina)

Derivatización de la PLL con análogos de la *D*-Biotina

La reacción de derivatización para producir **3** fue realizada de acuerdo a la referencia 9 con modificaciones (véase Esquema 1). El procedimiento es el siguiente: 1.67 mg mL⁻¹ (0.003 mmol) de

*e-mail: jhernandez@cideteq.mx

NHS-X-Biotina (**1**), disueltos en una mezcla de DMSO/H₂O DI al 10% v/v, fue esterilizada por filtración. Posteriormente, ésta fue adicionada rápidamente a una disolución que contiene 1.0 mg mL⁻¹ de PLL (**2**) en buffer de NaHCO₃ 50 mmol L⁻¹ (0.012 mmol de residuos de lisina) manteniendo la agitación en un Vórtex durante 15 min a temperatura ambiente. Finalmente, el producto obtenido se resguardó de la luz en un tubo cónico de plástico.¹³

Purificación de la PLL-X-Biotina

El subproducto de síntesis de **3** (NHS) fue removido de la mezcla de reacción por medio de diálisis de alto desempeño. Para ello, se utilizaron cassettes de diálisis con membrana de corte MWCO = 3.5 kDa y como buffer de elución NaHCO₃ 5.0 mmol L⁻¹, pH = 8.0. La diálisis fue mantenida bajo agitación constante, a temperatura ambiente, haciendo recambio de buffer cada 2 h. En el segundo, y último recambio de buffer, la agitación prosiguió por 12 h y la temperatura se ajustó a 4 °C.¹³

Determinación del nivel de biotinylación y concentración total de aminoácido de la PLL-X-Biotina

El contenido de biotina de la PLL-X-Biotina se determinó usando la metodología basada en el reactivo HABA (ácido 4'-hidroxiazobenceno-2-carboxílico) (Pierce® Biotin Quantitation Kit; *Thermo Scientific*).¹⁹ Brevemente, los residuos de biotina presentes en las cadenas terminales de **3** interactúan con la avidina presente en el complejo HABA-avidina, desplazando al reactivo HABA, debido a la gran afinidad existente en la interacción avidina-biotina ($K_a = 1 \times 10^{15}$ mol⁻¹ L). La fracción de biotina presente en **3** se obtiene por diferencia en el decremento del valor de absorbancia registrada a una longitud de onda de 500 nm (véase Figura 1).^{13,19} Para determinar la concentración total de aminoácido presente en el compuesto **3** se empleó la versión estándar del método de Bradford micrométrico.²⁰ Este ensayo se fundamenta en la unión específica entre el colorante azul de Coomassie y ciertos aminoácidos presentes en la muestra de proteína que se analiza, i.e., arginina (R), lisina (K) e histidina (H).^{13,20}

Caracterización espectroscópica de la PLL-X-Biotina

Los espectros de absorción fueron registrados en un espectrofotómetro *Cintra* 101 GBS usando los siguientes parámetros instrumentales: tamaño de paso = 0.16 nm, velocidad de escaneo = 400 nm min⁻¹ y ancho de paso de banda = 2 nm. Los espectros IR-FT fueron registrados entre 4000 y 400 cm⁻¹ en un espectrómetro *Bruker* Vector 33, las muestras de los precursores (compuestos **1** y **2**) fueron tomadas del envase correspondiente, colocando los sólidos directamente en un portamuestras de ATR. Para el caso del producto **3** un volumen suficiente de muestra se depositó sobre el portamuestras y se dejó secar a temperatura ambiente protegiendo de la luz hasta el momento del análisis.

Los espectros de RMN ¹H (300 MHz) fueron registrados en un espectrómetro *Varian* Unity-Plus. Dichos espectros fueron procesados y editados con ayuda del software *MestReC 4.9.9.9*. Las mediciones fueron realizadas a temperatura ambiente en tubos de 5 mm de diámetro empleando dos diferentes disolventes: 1) mezcla al 20% v/v de D₂O/agua DI y 2) DMSO-D₆, respectivamente. Para la caracterización del compuesto **3** en estado sólido fue necesario preconcentrar la muestra por medio del proceso de liofilización en una trampa de vapor refrigerado (Refrigerated Vapor Trap, Modelo RVT 400) y desecador con

ultramicrocentrífuga (SpeedVac SC210A), ambos de la marca *Savant*.

IR (v, cm⁻¹): Compuesto **1** (*NHS-X-Biotina*): 3290 (combinación de los estiramientos amida y amina NH); 1660 y 1540 [bandas Amida I (estiramiento C=O) y Amida II (doblaje N-H + estiramiento C-N), respectivamente]; 1067 (enlace C-N del grupo amino); 2862 y 2930 (bandas de estiramiento que corresponden al grupo metileno en su forma simétrica y asimétrica, respectivamente); 1817 (grupo éster del NHS); 867 (banda de estiramiento del enlace N-O, de la NHS); 1788 y 1741 (bandas de estiramiento, simétrica y asimétrica, asignadas al grupo carbonilo del NHS, respectivamente); 1707 (banda de estiramiento muy intensa del grupo carbonilo ureído de la biotina); ~ 650 (banda vibracional de estiramiento del enlace C-S presente en el anillo heterocíclico de la molécula de biotina); 1240 (modo vibracional de una urea cíclica).¹³ Compuesto **2** (*PLL*): 3410 (corresponde al estiramiento del enlace O-H, debido a un enlace de hidrógeno intermolecular); 3260 (combinación de los estiramientos amida y amina NH); 1650 y 1540 (Amida I y Amida II del polipéptido PLL, respectivamente); 2865 y 2923 (estiramiento del grupo metileno en su forma simétrica y asimétrica, respectivamente); 1150 (banda de doblaje en el plano (δ) del grupo metileno); 1250-1000 (señales características de la vibración del enlace C-N del grupo amino que no reacciona en la molécula de PLL); 692 (banda vibracional de meneo (ω) del grupo amino).¹³ Compuesto **3** (*PLL-X-Biotina*): 3290 (combinación de los estiramientos amida); 2862 y 2930 (bandas de estiramiento del grupo metileno en su forma simétrica y asimétrica, respectivamente); 1707 (grupo carbonilo ureído de la biotina); 1660 (modo vibracional del estiramiento C=O, Amida I); 1540 (doble N-H + estiramiento C-N, Amida II); ~ 1200 (modo vibracional de la urea cíclica de la biotina); 1067 (C-N amino); ~ 650 (C-S anillo heterocíclico de la biotina).¹³

RMN ¹H (δ, ppm): Compuesto **3** (*PLL-X-Biotina*): 8.405 (s, 1H, H_A, PLL); 7.766 (d, J = 5.36 Hz, 1H, H₇, biotina); 4.394 (m, 1H, H_{6a}, biotina); 4.243 (m, 1H, H_{3a}, biotina). Se observaron señales características en el intervalo 1.00 – 3.00 ppm, propias de los grupos metileno 4.308 (s, 1H, H_B, PLL); 1.760 (dd, J = 7.80, 14.90 Hz, 2H, H_C, PLL); 1.670 (dd, J = 14.71, 7.20 Hz, 2H, H_D, PLL); 1.430 (dt, J = 15.28, 15.16, 7.77 Hz, 2H, H_E, PLL); 3.004 (t, J = 7.48 Hz, 2H, H_F, PLL), de la PLL y 3.083 (dd, J = 12.06, 6.32 Hz, 1H, H₄, biotina); 2.84 (d, J = 5.84 Hz, 1H, H_{6x}, biotina); 2.80 (d, J = 5.55 Hz, 1H, H_{6y}, biotina); 2.650 (t, J = 7.460 Hz, 2H, H₂, biotina); 1.497 (dd, J = 13.66, 6.36 Hz, 2H, H₅, biotina); 1.298 (dd, 8.51, 4.38 Hz, 2H, H₄, biotina); 1.497 (dd, J = 13.66, 6.36 Hz, 2H, H₃, biotina); 2.043 (t, J = 7.260 Hz, 2H, H₂, biotina), del precursor NHS-X-Biotina.¹³

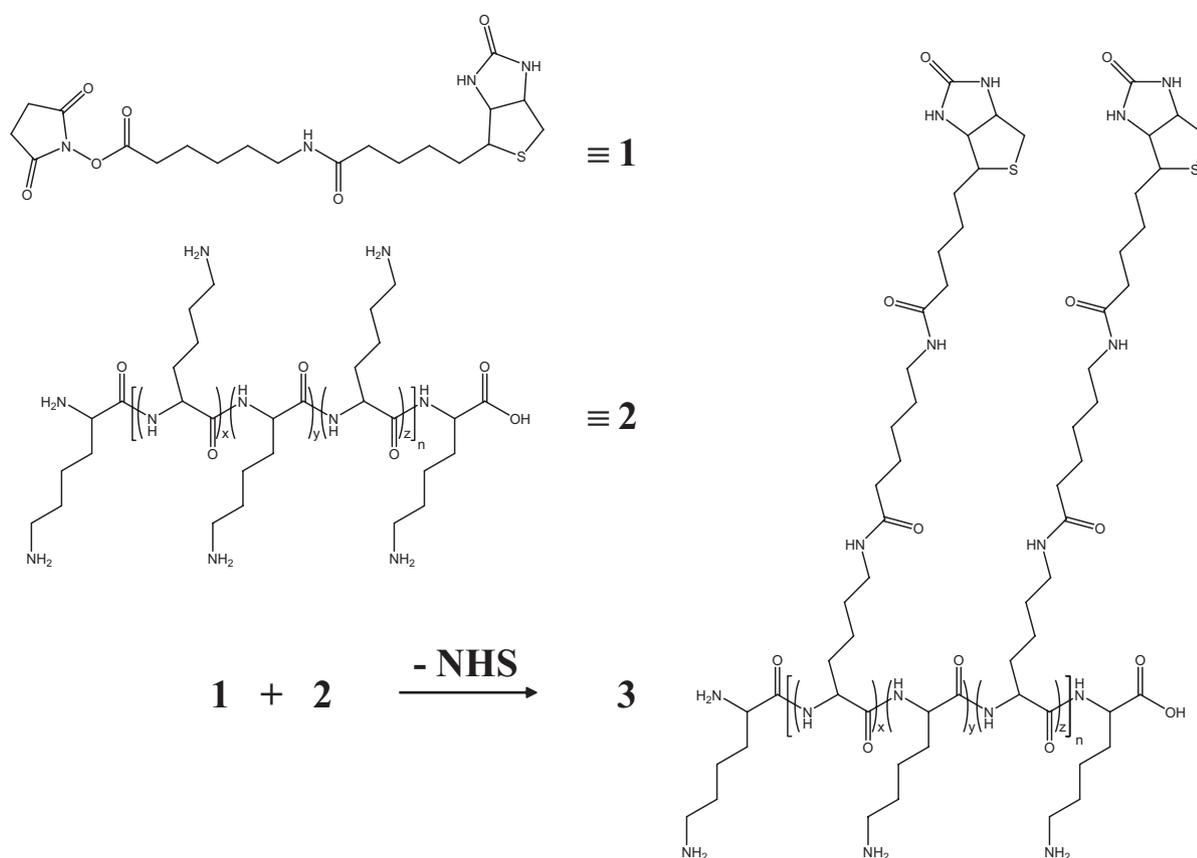
DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Síntesis y purificación del *co-poli(L-lisina)-graft-(ε-N-[X-D-biotinil]-L-lisina)*

La transformación química que sufren los compuestos de acoplamiento (**1**) y (**2**) es resumida en el Esquema 1.

Se obtuvieron aproximadamente 10 mg (% Rendimiento = 85-90%) de un polvo amorfo blanco, de aspecto escarchado, soluble en agua. El resultado de la cuantificación de biotina arrojó un 22% molar de injercción de moléculas de biotina (Figura 1).¹³ La determinación del grado de biotinylación del copolímero se efectuó indirectamente mediante la medición de la disminución en el valor de la absorbancia a 500 nm debida al colorante HABA, los cálculos se condensan como sigue:

$$\frac{\text{mmol Biotina}}{\text{mmol Muestra}_{\text{Biotinilada}}} = \frac{\left[\frac{(0.9 \times A_{500} \text{ HABA} - \text{Avidina}) - (A_{500} \text{ HABA} - \text{Avidina} - \text{Biotina})}{(34000 \times b)} \right] \times 10 \times \text{Factor de dilución}}{\frac{\text{Concentración Muestra}_{\text{Biotinilada}} \text{ (mg mL}^{-1}\text{)}}{\text{Peso molecular Muestra}_{\text{Biotinilada}} \text{ (mg mmol}^{-1}\text{)}}}$$



Esquema 1. Estructura de **3** (PLL-X-Biotina). La biotiniación tiene lugar en los grupos ϵ -amino terminales de la PLL, X corresponde a un espaciador molecular de cadena alifática de 6 C

Donde “*b*”, es la longitud del paso óptico de la celda; “34000”, es el coeficiente de extinción molar del colorante HABA; “10”, corresponde al factor de las diluciones siguiendo la metodología del ensayo y “Factor de dilución”, corresponde al factor de corrección en el caso de que la muestra fuere diluida al inicio del ensayo. El método fue previamente validado ensayando una muestra control positiva y una negativa. Como control positivo se utilizó una muestra de peroxidasa de rábano silvestre conjugada con una molécula de *D*-biotina, siendo el control negativo una muestra de PLL.¹³

La dilucidación estructural del compuesto **3** fue corroborada por medio de espectroscopía UV-Visible, espectroscopía IR-FT y RMN ¹H.

Por otra parte, previo a la realización de los estudios de caracterización espectroscópica, se determinó la concentración total de aminoácido de la PLL-X-Biotina mediante el método de Bradford en su variante de micro-método para ensayo en microplaca; de esta manera, la cantidad de muestra no fue un factor limitante. La concentración de copolímero resultante fue $\approx 3.3 \text{ mg mL}^{-1}$, ésta se obtuvo mediante interpolación en una curva de calibración Absorbancia vs. [BSA]. Para ello, se utilizó BSA (No. de residuos/molécula de BSA: K = 124, H = 4, R = 59) como proteína control a una $c = 1 \text{ mg mL}^{-1}$. Regresión lineal: $Y = 0.0551 X + 0.0431$; $R^2 = 0.989$, en el intervalo de trabajo comprendido entre 0 – 12 mg mL^{-1} .¹³

Caracterización espectroscópica de la PLL-X-Biotina

Evidencia química de la injercción de biotina

En la caracterización por espectroscopía IR-FT (Figura 2) fue observada la presencia de las principales bandas de vibración características atribuidas a los enlaces de los precursores **1** y **2** en **3**: tres bandas características aparecieron a 3290, 1660 y 1540 cm^{-1} , presentes

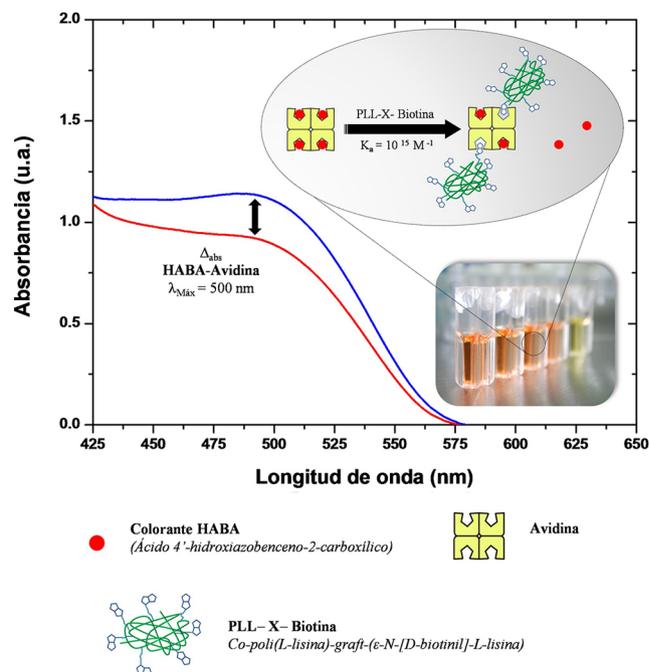


Figura 1. Determinación del porcentaje de biotiniación del compuesto **3** de acuerdo al ensayo HABA-Avidina. El análisis arrojó un 22% molar de injercción de biotina en la cadena principal de la PLL

también en el precursor con biotina (compuesto **2**).

La banda localizada a 3290 cm^{-1} se asignó a una combinación de los estiramientos amida y amina N-H. Las bandas presentes a 1660 y 1540 cm^{-1} se asignaron a las bandas Amida I (estiramiento

C=O) y Amida II (doblaje N-H + estiramiento C-N), las cuales se intensificaron como consecuencia del incremento en el número de enlaces amido formados como resultado de la derivatización.^{7,9,13,21-28}

Una muy intensa banda de estiramiento fue encontrada a 1067 cm^{-1} y se relacionó con el enlace C-N de un grupo amino.

Por otro lado, se observó la aparición de dos bandas de estiramiento que correspondieron al grupo metileno, en su forma simétrica y asimétrica, a 2862 y 2930 cm^{-1} , respectivamente.^{7,13,22}

Adicionalmente, se observó que las bandas debidas a la NHS, 1817 (grupo éster del NHS); 867 (banda de estiramiento del enlace N-O, de la NHS); 1788 y 1741 (bandas de estiramiento, simétrica y asimétrica, asignadas al grupo carbonilo del NHS, respectivamente) ya no son visibles en el espectro IR-FT, lo cual era de esperarse, debido a que la NHS es el grupo saliente en la reacción de derivatización y fue excluida en el proceso de purificación.¹³

A su vez, se observó la presencia de una banda de estiramiento muy intensa a 1707 cm^{-1} la cual se adscribió al grupo carbonilo ureído de la biotina.^{22,28}

Otra señal que también se mantuvo fue la banda vibracional de estiramiento muy acentuada que se presentó a $\sim 650 \text{ cm}^{-1}$ y que se asignó al enlace C-S presente en el anillo heterocíclico de la molécula de biotina.¹⁵ Finalmente, se observó una banda a $\sim 1250 \text{ cm}^{-1}$, la cual ya ha sido reportada como un modo vibracional del grupo ureído de la biotina en su porción cíclica.²⁸

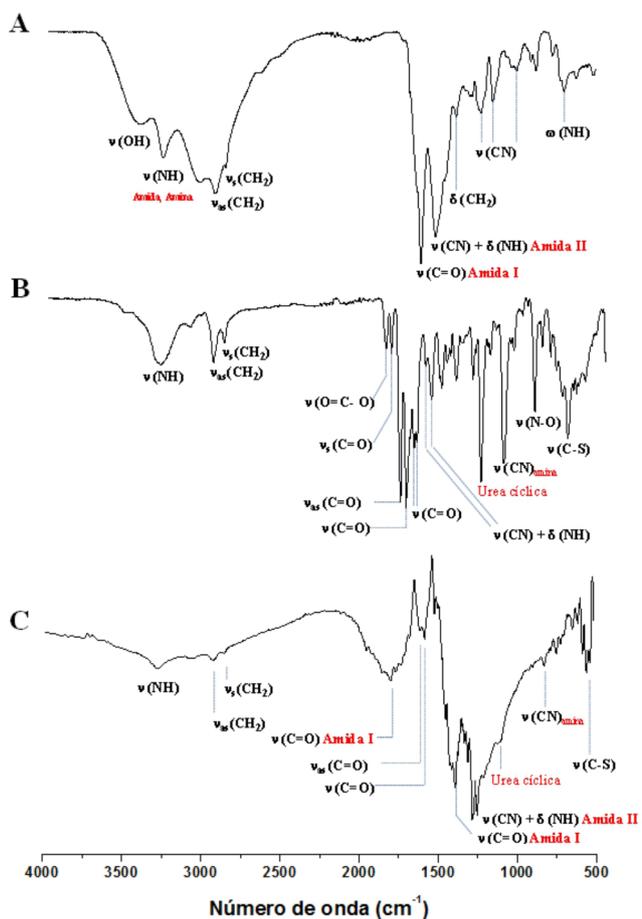


Figura 2. Comparativo mediante espectroscopía IR-FT de: A) NHS-X-Biotina, B) PLL-X-Biotina

El análisis por espectroscopía RMN ^1H (Figura 3) muestra la presencia de una señal muy característica de la molécula de biotina, en la forma de un triplete *ca.* 2.050 ppm, que se asigna a los protones del grupo metileno próximos al enlace amido que une a la PLL con

la biotina.¹³ El grupo biotina de los compuestos **1** y **3** fue identificado a través de los dos protones tipo metino de la estructura cíclica de la biotina, los cuales ocurren a 4.394 ppm y 4.243 ppm, y que visiblemente están ausentes en la PLL.^{13,22,29-36}

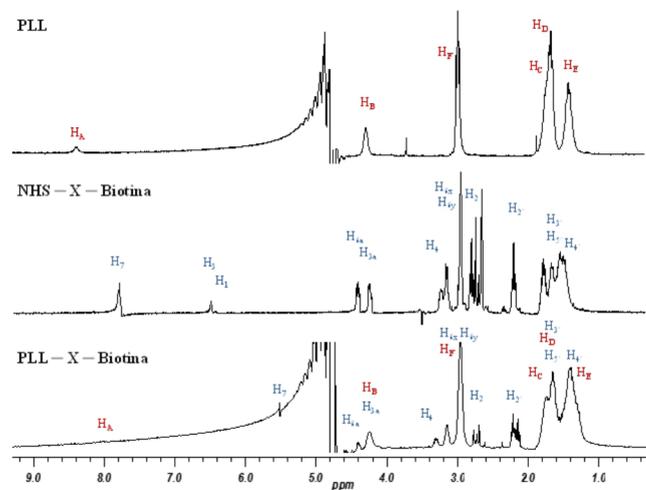


Figura 3. Esquema comparativo donde se presentan los espectros de RMN ^1H de los compuestos precursores **1** y **2**, y del derivatizado **3** (PLL-X-Biotina en D_2O , concentración $\sim 5.0 \text{ mg mL}^{-1}$)

Mientras tanto, los protones tipo urea, de la estructura cíclica de la molécula de biotina, fueron apreciados en el compuesto **1** en *ca.* 6.45 y 6.35 ppm,^{13,22,29-32,36} pero no así en **3**, debido a la supresión del disolvente en el espectro. Se encontraron señales entre 1.00 – 3.00 ppm, propias de los grupos metileno. Una señal singlete *ca.* 4.308 ppm, adscrita al protón más próximo al extremo carboxilo de la PLL; señales tipo multiplete (dd, dt y tt) se observaron en 1.760 ppm, 1.670 ppm, 1.430 ppm y 3.004 ppm, respectivamente; estos corresponden a protones del tipo metileno del precursor **2** (PLL).^{13,22}

Por otro lado, fue posible adscribir las señales propias del precursor **1** (NHS-X-Biotina): multiplete *ca.* 3.083 ppm corresponde al protón más próximo al átomo de azufre dentro la estructura cíclica de la biotina; un grupo de señales centradas en 1.497 ppm, 1.298 ppm, 2.043 ppm, corresponderían a protones tipo metileno de la cadena alifática de la biotina.^{13,22,29-43}

CONCLUSIONES

El copolímero PLL-X-Biotina fue sintetizado de manera simple y eficiente, siguiendo principios de la química verde. La derivatización de las cadenas ϵ -amino laterales de la PLL se efectuó en una reacción de un solo paso con un análogo de la D-Biotina. El porcentaje de injercción de biotina, concentración total de aminoácido así como la dilucidación de la estructura química del copolímero fue determinada exitosamente con ayuda de un kit de ensayo comercial, metodología de Bradford y técnicas espectroscópicas como son UV-Visible, IR-FT y RMN ^1H , respectivamente. Trabajos relacionados con la aplicación exitosa de este compuesto, utilizado como un bloque de construcción nanoscópico en el desarrollo de biosensores de afinidad, serán publicados a su debido curso.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Dr. G. Mendoza-Díaz, División de Ciencias e Ingenierías-Campus León, Universidad de Guanajuato, México, por su asistencia técnica en RMN ^1H ; al Dr. C. A. Leal-Morales, División de Ciencias Naturales y Exactas-Campus

Guanajuato, Universidad de Guanajuato, México, por su valiosa contribución y asistencia técnica en los ensayos de caracterización bioquímica y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico recibido para llevar a cabo esta investigación (FOMIX-QRO-2007-C01, Proyecto No. 78809; CB-2008-C01, Proyecto No. 101701; Salud-2009-01, Proyecto No. 114166).

REFERENCIAS

1. Colville, K.; Tompkins, N.; Rutenberg, A. D.; Jericho, M. H.; *Langmuir* **2010**, *26*, 2639.
2. Martínez-Fong, D.; Mullersman, J. E.; Purchio, A. F.; Armendariz-Borunda, J.; Martínez-Hernández, A.; *Hepatology* **1994**, *20*, 1602.
3. Liu, Y.; Li, J. S.; Liu, F. X.; Zhang, L.; Feng, L. X.; Yu, D. X.; Zhang, N.; *J. Biomed. Nanotechnol.* **2015**, *11*, 613.
4. De, W.; Tianhua, L.; Ning, G.; Huairong, Z.; Nengbing, L.; Futao, H.; Yuting, C.; Qianli, J.; Shan, J.; *Electrochim. Acta* **2015**, *163*, 238.
5. Chen, J.; Jiao, Z. X.; Lin, L.; Guo, Z. P.; Xu, C. N.; Li, Y. H.; Tian, H. Y.; Chen, X. S.; *Chin. J. Polym. Sci.* **2015**, *33*, 830.
6. Colville, K.; Tompkins, N.; Rutenberg, A. D.; Jericho, M. H.; *Langmuir* **2010**, *26*, 2639.
7. Diederich, A. and Lösche, M.; *Adv. Biophys.* **1997**, *34*, 205.
8. Jordan, C. E.; Frey, B. L.; Kornguth, S.; Corn, R. M.; *Langmuir* **1994**, *10*, 3642.
9. Frey, B. L.; Jordan, C. E.; Kornguth, S.; Corn, R. M.; *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 4452.
10. Frey, B. L.; Corn, R. M.; *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 3187.
11. Jordan, C. E.; Corn, R. M.; *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 1449.
12. Green, N. M.; *Adv. Protein Chem.* **1975**, *29*, 85.
13. Martínez-Mancera, F. D.; *Tesis de Licenciatura*, Universidad de Guanajuato, México, 2012.
14. Fernández-Sánchez, G. E.; *Tesis de Maestría*, Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica, S.C., Querétaro, México, 2012.
15. Delgado-Arenas, H. F.; *Tesis de Maestría*, Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica, S.C., Querétaro, México, 2015.
16. Anastas, P. T.; Warner, J. C.; *Green Chemistry, Theory and Practice*, 1st ed., Oxford University Press: New York, 1998.
17. Anastas, P. T.; Heine, L. G.; Williamson, T. C., In *Green Chemical Syntheses and Processes*; Anastas, P. T.; Heine, L. G.; Williamson, T. C., eds.; American Chemical Society: Washington, 2000, Chapter 1, 2000.
18. Li, C. J.; Anastas, P. T.; *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1413.
19. <http://www.thermoscientific.com/pierce>, accesado Junio 2015.
20. Bradford, M. M.; *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248.
21. Wen, X.; He, H.; Lee, L. J.; *J. Immunol. Methods* **2009**, *350*, 97.
22. Silverstein, R. M.; Bassler, G. C.; Morrill, T. C.; *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, 5th ed., Wiley: New York, 1991.
23. Conely, R. T.; *Infrared Spectroscopy*, 1st ed., Allyn&Bacon: Boston, 1966.
24. Colthup, N. B.; Daly, L. H.; Wiberley, S. E.; *Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy*, 3rd ed., Academic Press: San Diego, 1999.
25. Rozenberg, M.; Shoham, G.; *Biophys. Chem.* **2007**, *125*, 166.
26. Kakiuchi, K.; Akutsu, H.; *Biopolymers* **1981**, *20*, 345.
27. Socrates, G.; *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies: Tables and Charts*, 3rd ed., Wiley: West Sussex, 2001.
28. Lapin, N. A.; Chabal, Y. J.; *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 8776.
29. Huang, N. -P.; Vörös, J.; De Paul, S. M.; Textor, M.; Spencer, N. D.; *Langmuir* **2002**, *18*, 220.
30. Ruiz-Taylor, L. A.; Martin, T. L.; Zaugg, F. G.; Witte, K.; Indermuhle, P.; Nock, S.; Wagner, P.; *PNAS* **2001**, *98*, 852.
31. Ruiz-Taylor, L. A.; Martin, T. L.; Wagner, P.; *Langmuir* **2001**, *17*, 7313.
32. Salem, A. K.; Cannizzaro, S. M.; Davies, M. C.; Tendler, S. J. B.; Roberts, C. J.; Williams, P. M.; Shakesheff, K. M.; *Biomacromolecules* **2001**, *2*, 575.
33. Scott, D. W.; Pradip, M. P.; Donald, K. H.; Kent, R. B.; Robert, L.V.; *Bioconjugate Chem.* **1998**, *9*, 813.
34. Yellepeddi, V. K.; Kumar, A.; Palakurthi S.; *Anticancer Res.* **2009**, *29*, 2933.
35. Kang, S.; Mou, L.; Lanman, J.; Velu, S.; Brouillette, W. J.; Prevelige, P. E.; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2009**, *23*, 1719.
36. Clapper, J. D.; Pearce, M. E.; Guymon, C. A.; Salem, A. K.; *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 1188.
37. Tonan, K.; Adachi, K.; Ikawa S.; *Spectrochim. Acta, Part A* **1998**, *54*, 989.
38. Geoffrey, T. C.; Jiang, Y.-L.; *ARKIVOC* **2001**, *7*, 77.
39. Santa María, D.; Claramunt, R. M.; Herranz, F.; Alkorta, I.; Elguero, J.; *J. Mol. Struct.* **2009**, *920*, 323.
40. Gisch, N.; Buske, B.; Heine, H.; Lindner, B.; Zähringer, U.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 3362.
41. Holzinger, M.; Baur, J.; Haddad, R.; Wang, X.; Cosnier, S.; *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 2450.
42. Epand, R. M.; Wheeler, G. E.; Moscarello, M. A.; *Biopolymers* **1974**, *13*, 359.
43. Kar, M.; Malvi, B.; Das, A.; Panneri, S.; Gupta, S. S.; *J. Mater. Chem.* **2011**, *21*, 6690.