



Universidad de Oviedo

MÁSTER EN CIENCIAS ANALÍTICAS Y BIOANALÍTICAS

Trabajo Fin de Máster

**SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y BIOCONJUGACIÓN DE NANOCLÚSTERES DE
PLATA PARA SU APLICACIÓN A LA DETERMINACIÓN DE METALOTIONEÍNA III
EN TEJIDOS BIOLÓGICOS POR FLUORESCENCIA**

Adrián Sánchez Visedo

Julio 2016, Oviedo



Rosario Pereiro García, Profesora del Departamento de Química Física y Analítica de la Facultad de Química de la Universidad de Oviedo.

CERTIFICA:

Que el presente Trabajo, titulado **“Síntesis, caracterización y bioconjugación de nanoclústeres de plata para su aplicación a la determinación de Metalotioneína III en tejidos biológicos por fluorescencia”** ha sido realizado por el alumno **Adrián Sánchez Visedo** bajo mi dirección, constituyendo su Trabajo Fin de Máster del Máster Internacional en Ciencias Analíticas y Bioanalíticas de la Universidad de Oviedo en el curso académico 2015-16, y cuya presentación autorizo.

Oviedo, 6 de Julio de 2016

Fdo: Rosario Pereiro García



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a María Cruz Alonso todo el apoyo que me ha brindado, tanto por su ayuda e implicación en el laboratorio, ya que sin ella no hubiese sido posible el desarrollo de todo el presente Trabajo fin de Máster, así como por todos los conocimientos que gracias a ella he aprendido a lo largo de estos últimos meses.

Agradecer a mi directora la Dra. Rosario Pereiro García su apoyo e implicación en la corrección y análisis de resultados del Trabajo fin de Máster. Ha sido un placer haberla tenido de profesora en el Máster y un honor haber podido colaborar con ella en la línea de investigación del presente TFM.

Gracias también a todos mis compañeros de laboratorio, Mario, Diego, Fran, Silvia e Isabel, por guiarme y aconsejarme durante todas las horas pasadas en el laboratorio, haciendo esos momentos mucho más llevaderos y divertidos.

Por último, agradecer a todos mis compañeros de clase por este año lleno de momentos inolvidables, y en especial a mis “Vecinitos” Raúl, Laura, Raquel y Sara. Gracias a vosotros por todo vuestro apoyo y compañía a lo largo de estos meses, por esas cenas en las que me habéis hecho desconectar del estrés diario, y por todo lo que me habéis hecho aprender como “no químico” y como persona. Espero que éste último año juntos sea el primero de muchos años de amistad.

RESUMEN

El actual interés hacia los Nanomateriales viene precedido por el gran crecimiento y desarrollo que ha tenido en las últimas décadas la Nanociencia y Nanotecnología. Concretamente, los Nanoclústeres metálicos se presentan como uno de los nuevos tipos de nanomateriales con características particulares, que les otorgan fotoluminiscencia y que los convierten en una herramienta compatible con numerosas aplicaciones relacionadas con la biología. En concreto, muestran especial interés en su aplicación como sustitutos de fluoróforos orgánicos para el marcaje biológico en la detección de determinadas moléculas biológicas, mediante el empleo de inmunoensayos. Dentro de los Nanoclústeres, son de especial relevancia los Nanoclústeres de plata, ya que poseen una línea de investigación bastante activa, debido a sus propiedades ópticas y a su elevada biocompatibilidad.

A su vez, existen estudios que demuestran la relación directa entre la sobreexpresión de determinadas moléculas biológicas con la aparición de ciertas enfermedades, como es el caso de la sobreexpresión de la proteína Metalotioneína III en tejidos cerebrales y su relación con la aparición de la enfermedad de Alzheimer. Por todo ello, se llevó a cabo un estudio para la síntesis, caracterización y bioconjugación de Nanoclústeres de plata para su posible aplicación en la detección de MT-III en tejidos biológicos por fluorescencia, mediante el uso de diferentes técnicas analíticas como la espectroscopía UV-VIS y de fluorescencia, espectrometría de masas (ICP-MS), y análisis mediante microscopía electrónica de transmisión (HR-TEM) y microscopía láser confocal.

Los resultados obtenidos en este estudio muestran una síntesis con un elevado rendimiento (92.77 %) y una intensidad de fluorescencia muy elevada, mostrando por otro lado una estabilidad reducida con exposición a la luz de un máximo de 5.5 horas, y estabilidades mayores en el caso de su almacenamiento a oscuridad de hasta 15 días. Estos resultados fueron obtenidos al mantener los AgNCs en la disolución reguladora HEPES. Respecto a su análisis estructural, los AgNCs presentan un tamaño promedio de 2.69 ± 0.77 nm, con una distribución de tamaños bastante homogénea.

Por otro lado, se determinó una concentración de AgNCs en disolución de $7.98 \cdot 10^{14}$ NCs/mL, lo que nos permitió alcanzar una relación molar óptima Ab:AgNCs en el proceso de bioconjugación de 1:5, mediante la caracterización de la fluorescencia emitida y la funcionalidad del anticuerpo.

Por último, se desarrolló un inmunoensayo competitivo para la detección de MT-III con el que fue posible un primer ensayo para la creación de una recta de calibrado que nos permita cuantificar MT-III en muestras o tejidos de concentración desconocida.



ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Nanociencia y Química Analítica	2
1.2. Nanomateriales	3
1.3. Técnicas de Caracterización de Nanomateriales	5
1.4. Nanoclústeres metálicos: Definición y Propiedades	5
1.5. Aplicaciones Analíticas de los Nanoclústeres	8
1.5.1. Sensores.....	8
1.5.2. Marcaje fluorescente en bioensayos	8
1.5.3. Aplicación en análisis de imágenes biológicas (<i>imaging</i>).....	8
1.6. Nanoclústeres de Plata	9
1.7. Inmunoensayos	10
1.7.1. Tipos de inmunoensayos	11
1.8. Metalotioneínas	12
1.8.1. Definición y localización de las metalotioneínas	12
1.8.2. Funciones de las metalotioneínas	13
1.8.3. Metalotioneína III y enfermedad de Alzheimer	13
2. OBJETIVO	15
3. MATERIALES Y MÉTODOS	16
3.1. Instrumentación	16
3.2. Materiales	16
3.3. Reactivos	17
3.4. Procedimientos experimentales	18
3.4.1. Síntesis AgNCs	18
3.4.2. Purificación y caracterización de los nanoclústeres de plata	18
3.4.3. Bioconjugación de nanoclústeres de plata.....	19
3.4.4. Purificación y caracterización de la bioconjugación	20
3.4.5. Inmunoensayo competitivo.....	21
3.4.6. Inmunoensayo espectrofotométrico	21
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
4.1. Síntesis, purificación y caracterización de AgNCs	23
4.1.1. Caracterización por fluorescencia	23
4.1.2. Caracterización de AgNCs mediante ICP-MS.....	25
4.1.3. Caracterización de AgNCs mediante Microscopía electrónica de transmisión de alta resolución.....	26
4.1.4. Cálculo de la concentración de AgNCs en disolución	28
4.1.5. Estudios de estabilidad de AgNCs.....	29
4.2. Optimización y caracterización de la bioconjugación	38
4.2.1. Espectros de excitación/emisión e intensidad de fluorescencia	38
4.2.2. Inmunoensayo espectrofotométrico en placa ELISA.....	40
4.3. Inmunoensayo competitivo para la determinación de MT-III	44
5. CONCLUSIONES	47
BIBLIOGRAFÍA	48
ANEXO I	I

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema escala nanométrica [5].....	2
Figura 2. Esquema clasificación nanoestructuras en función de su dimensionalidad [8].....	3
Figura 3. Esquema metodologías de fabricación de nanomateriales (Modificado de [9]).....	4
Figura 4. Esquema de los diferentes niveles energéticos para las diferentes estructuras metálicas y sus escalas [5].....	6
Figura 5. Nanoclúster de plata funcionalizado con DHLA.....	10
Figura 6. Esquema reacción del proceso de síntesis de los NCs de plata.	18
Figura 7. Esquema del proceso de bioconjugación mediante la reacción de la carbodiimida.....	19
Figura 8. Esquema procedimiento Inmunoensayo competitivo.	22
Figura 9. Espectros de excitación y emisión obtenidos para la síntesis de AgNCs con una λ_{exc} de 404 nm y λ_{em} de 655 nm. A) AgNCs sin fluorescencia. B) AgNCs con fluorescencia.....	23
Figura 10. Imágenes obtenidas por HR-TEM de la síntesis de AgNCs.	26
Figura 11. Histograma de la distribución de los diferentes tamaños de los AgNCs [D_c (nm)] y su abundancia [$N(D_c)$].	27
Figura 12. Evolución de la intensidad de fluorescencia emitida a 655 nm de los AgNCs en H_2O con exposición a la luz solar a lo largo del tiempo.	29
Figura 13. Evolución de la intensidad de fluorescencia emitida a 655 nm por los AgNCs en H_2O a lo largo del tiempo con una excitación constante a 404 nm.	30
Figura 14. Evolución de la intensidad de fluorescencia emitida a 655 nm de los AgNCs en H_2O en oscuridad a lo largo del tiempo.	31
Figura 15. Evolución de la intensidad de fluorescencia emitida a 655 nm de los AgNCs en PBS en oscuridad a lo largo del tiempo.	32
Figura 16. Evolución de la intensidad de fluorescencia emitida a 655 nm de los AgNCs en BBS en oscuridad a lo largo del tiempo.	33
Figura 17. Evolución de la intensidad de fluorescencia emitida a 655 nm de los AgNCs en HEPES con exposición a la luz solar a lo largo del tiempo.....	34
Figura 18. Evolución de la intensidad de fluorescencia emitida a 655 nm por los AgNCs en HEPES a lo largo del tiempo con una excitación constante a 404 nm.....	35
Figura 19. Evolución de la intensidad de fluorescencia emitida a 655 nm de los AgNCs en HEPES en oscuridad a lo largo del tiempo.....	36
Figura 20. Influencia del pH en la intensidad de emisión fluorescente de los AgNCs.....	37
Figura 21. Intensidad medida en unidades de absorbancia de los espectros de excitación y emisión para la relación molar 1:15 del bioconjugado Ab:AgNCs y los AgNCs sin bioconjugar.	39
Figura 22. Relación de la intensidad de fluorescencia medida para las diferentes relaciones molares del bioconjugado Ab:AgNCs.....	40
Figura 23. Esquema del procedimiento empleado en el inmunoensayo espectrofotométrico.....	41
Figura 24. Portaobjetos donde se observa la posición de las diferentes relaciones molares de Ab:AgNCs.....	42
Figura 25. Imágenes obtenidas por microscopía láser confocal para las diferentes relaciones molares (Ab:AgNCs) de bioconjugado. 1A) Relación 1:3 sin fondo. 1B) Relación 1:3 con fondo. 3A) Relación 1:5 sin fondo. 3B) Relación 1:5 con fondo. 5A) Relación 1:7 sin fondo. 5B) Relación 1:7 con fondo. 7A) Relación 1:10 sin fondo. 7B) Relación 1:10 con fondo.	43
Figura 26. Portaobjetos donde se observa la posición de las diferentes relaciones Bioconjugado:MT-III.....	44
Figura 27. Curva de calibrado obtenida para el inmunoensayo competitivo.	45



Figura 1. Anexo I. Espectros de excitación AgNCs purificados con diferentes “slits”.....	I
Figura 2. Anexo I. Espectros de emisión AgNCs sin purificar con diferentes “slits”.....	I
Figura 3. Anexo I. Espectros de emisión AgNCs purificados con diferentes “slits”.....	II
Figura 4. Anexo I. Comparación espectros de emisión AgNCs purificados y sin purificar.....	II
Figura 5. Anexo I. Estabilidad AgNCs en H ₂ O con exposición a la luz 1.....	III
Figura 6. Anexo I. Estabilidad AgNCs en H ₂ O con exposición a la luz 2.....	III
Figura 7. Anexo I. Estabilidad AgNCs en H ₂ O a oscuridad.....	IV
Figura 8. Anexo I. Estabilidad AgNCs en PBS con exposición a la luz.....	IV
Figura 9. Anexo I. Estabilidad AgNCs en PBS a oscuridad.....	V
Figura 10. Anexo I. Estabilidad AgNCs en BBS a oscuridad.....	V
Figura 11. Anexo I. Estabilidad AgNCs en HEPES con exposición a la luz 1.....	VI
Figura 12. Anexo I. Estabilidad AgNCs en HEPES con exposición a la luz 2.....	VI
Figura 13. Anexo I. Estabilidad AgNCs en HEPES a oscuridad.....	VII
Figura 14. Anexo I. Estabilidad AgNCs con gradiente de pH.....	VII
Figura 15. Anexo I. Intensidad de fluorescencia de las diferentes relaciones molares Ab:AgNCs.	VIII
Figura 16. Anexo I. Imágenes obtenidas por microscopía láser confocal para las diferentes relaciones molares Ab:AgNCs. 1) y 2) 1:3. 3) y 4) 1:5. 5) y 6) 1:7. 7) y 8) 1:10.....	VIII
Figura 17. Anexo I. Imágenes obtenidas por microscopía láser confocal del inmunoensayo competitivo para el blanco sin marcar y las diferentes concentraciones de MT-III unidas a una concentración fija de bioconjugado (1 µg/mL). B) Blanco sin marcaje. 1) MT-III 0 ng/mL. 3) MT-III 10 ng/mL. 6) MT-III 100 ng/mL. 8) MT-III 1000 ng/mL.....	IX

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Técnicas de caracterización de nanomateriales y la información obtenida para cada una de.....	5
Tabla 2. Reactivos utilizados.....	17
Tabla 3. Valores medidos para el cálculo del QY de los AgNCs.....	24
Tabla 4. Valores de rendimiento de síntesis y concentración de plata (ppm) y milimoles para cada una de las disoluciones analizadas por ICP-MS.....	25
Tabla 5. Resultados de absorbancia del Inmunoensayo Espectrofotométrico.....	41
Tabla 6. Valores de intensidad de AgNCs bioconjugados sacados de las diferentes imágenes del confocal.....	45



1. INTRODUCCIÓN

Durante la última década ha habido un crecimiento que se podría calificar casi como de exponencial en el uso y aplicación de los nanomateriales, dando lugar a una verdadera revolución científica. Este hecho justifica que la Nanociencia y la Nanotecnología se hayan situado como áreas de investigación punteras, cuyas aplicaciones están produciendo un gran impacto sobre nuestra sociedad, considerando a esta ciencia como “La Revolución Industrial del Siglo XXI” [1-3].

El primero en darse cuenta de esta nueva realidad y poner el foco de atención sobre esta nueva ciencia fue el premio Nobel Richard Feynman quien, el 29 de diciembre de 1959, en el encuentro anual de la Sociedad de Física Americana (American Physical Society), impartió una conferencia con el título “*There is a plenty of room at the bottom*” (“*Hay mucho sitio en el fondo*”), en la cual indicaba la existencia de un territorio inexplorado dentro de una escala intermedia entre lo microscópico y lo atómico, donde existe un punto de encuentro entre la física de los fenómenos cuánticos, atómicos y subatómicos, y la física macroscópica. Feynman afirmó que, extrapolar los conocimientos de las leyes de la física, seríamos capaces (mediante el uso de las herramientas presentes en la naturaleza) de controlar la materia en el rango de la escala nanométrica, destacando los beneficios que supondría para la sociedad la capacidad de construir y manipular la materia, átomo a átomo o molécula a molécula [3, 4].

Actualmente se pueden encontrar numerosas definiciones de los conceptos de Nanociencia y Nanotecnología que difieren en pequeños matices unas de otras. Aquí seleccionaremos las que consideramos como más acertadas y completas.

El concepto de **Nanociencia** se puede definir como “*La ciencia de la síntesis, análisis y manipulación de materiales a nivel atómico o molecular, donde las características o propiedades físicas o químicas son sustancialmente diferentes a las presentadas por el mismo material a una escala mayor (micro o macro)*” [2].

La **Nanotecnología** trata de las aplicaciones derivadas de la Nanociencia mediante las cuales somos capaces de manipular átomos y moléculas individuales para producir materiales nanoestructurados, situados dentro de la escala de los nanómetros (nm) o nanoescala (1 nm equivale a 10^{-9} m), y objetos de dimensiones “sub-micron” que poseen aplicaciones para el mundo real. La nanotecnología engloba la producción y aplicación de sistemas físicos, químicos y biológicos a unas escalas de átomos o moléculas individuales en el rango por debajo de los 100 nm, así como la integración de las resultantes nanoestructuras en sistemas mayores [1-4]. A continuación, en la Figura

Se observan las dimensiones de diferentes objetos y organismos y su situación con respecto a la escala métrica y nanométrica.

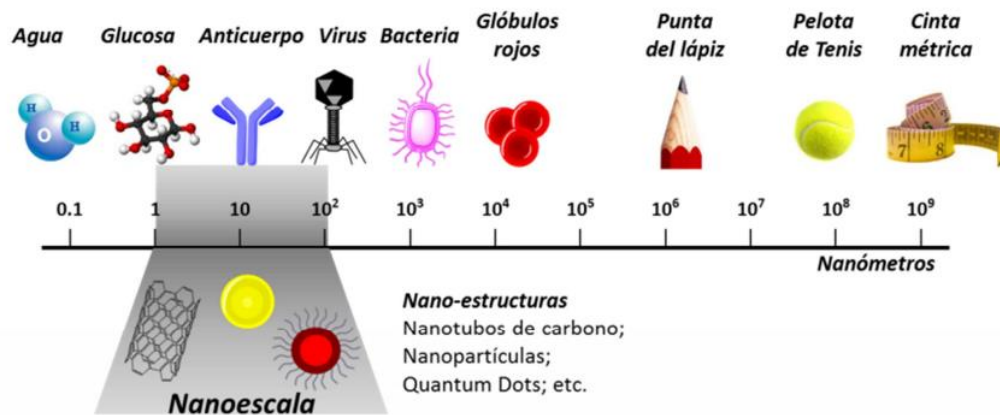


Figura 1. Esquema escala nanométrica [5].

Las investigaciones dentro del campo de la nanotecnología prometen profundizar en numerosos campos debido a su carácter transversal y multidisciplinar, como son el campo de los materiales, la nanoelectrónica, medicina, energía, biotecnología, tecnologías de la información e incluso logística militar [1, 2].

1.1. Nanociencia y Química Analítica

La Nanociencia y la Nanotecnología poseen un elevado carácter multidisciplinar, por lo que existe una relación de retroalimentación entre estas disciplinas y la Química analítica. Por un lado, la Química analítica permite la determinación y caracterización de los diferentes tipos de nanomateriales, incluyendo técnicas analíticas dedicadas a la detección y/o cuantificación de los mismos en todo tipo de muestras, así como el desarrollo de estrategias analíticas que permitan una caracterización química de esta nueva generación de nanomateriales. A su vez, es posible el empleo de diferentes materiales nanoestructurados como herramientas para la mejora de procesos (bio)químicos de medida, llevando a cabo un aprovechamiento de las propiedades de dichos nanomateriales, empleándolos en la mejora de nuevas metodologías analíticas.

Por todo ello, la química analítica contribuye de manera decisiva al creciente desarrollo de nuevos materiales y estrategias para su caracterización química. Pese a esto, es conveniente destacar que para realizar aplicaciones analíticas de dichas nanoestructuras, es necesario que éstas presenten una composición y un comportamiento estable en el proceso analítico [6].

1.2. Nanomateriales

El concepto de **Nanomateriales** comprende todos los materiales que presentan al menos una de sus dimensiones dentro de la escala nanométrica. Cuando las dimensiones de estos nanomateriales son del orden, o menores, que magnitudes físicas críticas como la longitud de Fermi del electrón, la longitud de un monodominio magnético o el radio atómico de Bohr, pueden aparecer propiedades en los nanomateriales con características muy diferentes al material original [1-3].

Para clasificarlos se pueden emplear diferentes criterios atendiendo a sus diferentes propiedades. En primer lugar, se pueden clasificar según su “**homogeneidad**”, considerando nanoestructuras homogéneas aquellas que poseen una composición química y dimensional similar. Hay que tener en cuenta que, pese a que determinadas nanoestructuras puedan presentar una composición química parecida, la variación del componente dimensional puede provocar grandes diferencias en cuanto a las propiedades que presentan. Otra manera de clasificarlas sería en función de su “**naturaleza**” o composición química, ya sean estas nanoestructuras de origen inorgánico (ej. nanopartículas de oro, Quantum Dots, etc.), orgánico (ej. nanotubos de carbono, dendrímeros, etc.) e incluso una mezcla mixta de ambos [2,6].

Por último, un criterio muy utilizado en la clasificación de los nanomateriales es en función de su “**dimensionalidad**” (Figura 2). Los nanomateriales en este caso se catalogan en función del número de dimensiones que presentan dentro de la escala nanométrica, existiendo cuatro categorías [1, 2, 4-7]:

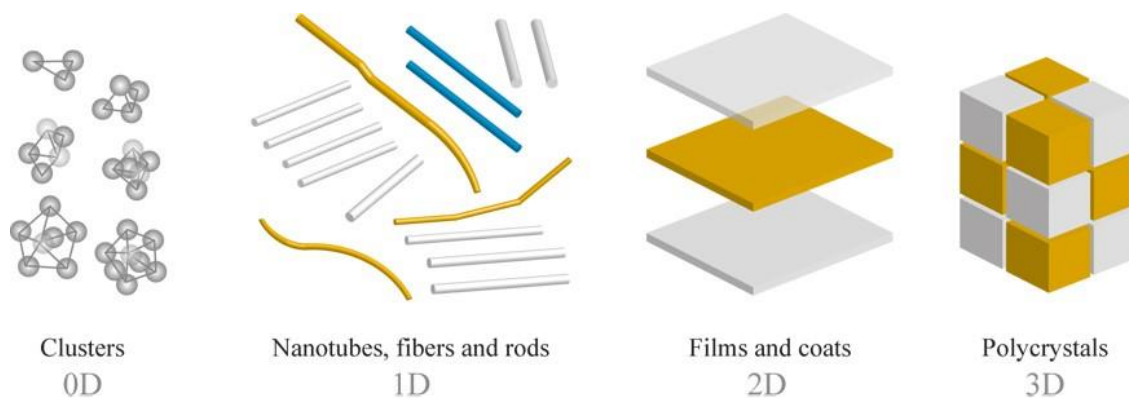


Figura 2. Esquema clasificación nanoestructuras en función de su dimensionalidad [8].

- **Nanoestructuras 0D:** Son aquellos nanomateriales que se encuentran nanoestructurados con todas sus dimensiones dentro de la escala nanométrica. Un ejemplo son las nanopartículas metálicas, óxidos metálicos, quantum dots y agregados atómicos (nanoclústeres) con un tamaño inferior a los 100 nm.

- **Nanoestructuras 1D:** Únicamente una de las dimensiones es de tamaño micro/macrométrico, las otras dos se encuentran dentro de la escala nanométrica. Pueden ser fibras o estructuras tubulares con diámetros inferiores a los 100 nm como los nanotubos o los nanohilos.
- **Nanoestructuras 2D:** Contienen dos dimensiones fuera de la escala nanométrica. Un ejemplo son las estructuras que se utilizan en los recubrimientos de superficies o películas finas en los que sólo su grosor es de orden nanométrico.
- **Nanoestructuras 3D:** Las tres dimensiones del material son superiores a 100 nm, pero están formados por un conjunto de nanoestructuras de los grupos anteriores. Se trata de nanoestructuras ensambladas formando bloques de tamaño micro/macrométrico.

En la síntesis de estos nanomateriales existen dos vías fundamentales: “**Top-Down**” (de arriba hacia abajo) y “**Bottom-Up**” (de abajo hacia arriba) [2, 4, 6].

La primera de estas técnicas *top-down* se basa en la construcción de estructuras pequeñas a partir de estructuras más grandes. Por otro lado, la técnica *bottom-up* busca la creación de nanoestructuras a partir de elementos funcionales atómicos y moleculares, de modo similar a la creación de vida. Una de las ventajas que presenta la creación de materiales nanoestructurados mediante rutas sintéticas ascendentes o *bottom-up* es que permiten un grado de control del tamaño y las propiedades del material muy superior difícil de alcanzar con técnicas físicas de reducción de tamaño *top-down* [2, 4]. A continuación, en la Figura 3 se representa un esquema de los dos métodos de fabricación de nanomateriales.

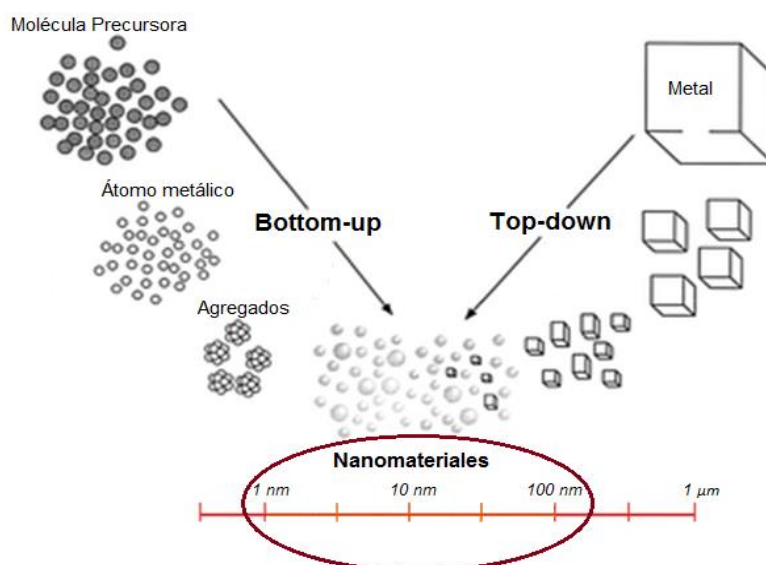


Figura 3. Esquema metodologías de fabricación de nanomateriales (Modificado de [9]).

1.3. Técnicas de caracterización de Nanomateriales

Cuando los nanomateriales constituyen la diana de un proceso analítico, y debido a que presentan unas propiedades y características diferentes a las que presentarían los mismos materiales en la escala macrométrica, existe la necesidad de llevar a cabo una caracterización de los mismos mediante diferentes métodos físico-químicos. Estos métodos pueden utilizarse para el análisis de su composición, la morfología y el tamaño que presentan, así como para la evaluación de sus propiedades ópticas y electrónicas y su estabilidad [2, 10]. A continuación, se recoge en la Tabla 1 un resumen de las técnicas más utilizadas para la caracterización de nanomateriales así como los parámetros obtenidos para cada una de ellas.

Tabla 1. *Técnicas de caracterización de nanomateriales y la información obtenida para cada una de las técnicas [2, 10].*

TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN	INFORMACIÓN
TÉCNICAS MICROSCÓPICAS	
Microscopía Electrónica de Transmisión de Alta Resolución (HR-TEM)	Forma y tamaño, homogeneidad en forma y tamaño, cristalinidad, grado de cobertura de la superficie, agregación y dispersión.
Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)	
Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	
TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS	
Espectroscopía UV-VIS	Eficiencia cuántica, concentración.
Espectroscopía de fluorescencia (PL)	Eficiencia cuántica de fluorescencia.
Espectroscopía de resonancia magnética Nuclear (RMN)	Tamaño (análisis indirecto), estructura, composición, pureza, identidad química, tipo de enlace.
Difracción de Rayos-X (XRD)	Tamaño, forma y estructura cristalina.
Dynamic Light Scattering (DLS)	Distribución y tamaño hidrodinámico.
Espectroscopía de energía dispersiva de rayos-X (EDX)	Composición química y estructural.
Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)	Composición química y estructural.
Espectroscopía Fotoelectrónica de Rayos-X (XPS)	Composición química y estructural.
TÉCNICAS DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS	
Espectrometría de masas molecular (MALDI-, ESI-MS)	Peso molecular, composición química y estructural, propiedades superficiales (secondary ion MS).
Espectrometría de masas elemental (ICP-MS)	

1.4. Nanoclústeres metálicos: Definición y Propiedades

La gran mayoría de los metales presentan unas buenas propiedades conductoras de la electricidad debido al movimiento libre de los electrones deslocalizados en la banda de conducción [5]. Estas propiedades electrónicas van a depender fundamentalmente de su tamaño, siendo especialmente diferente cuando éste es muy reducido y se encuentra dentro del rango de los nanómetros. Al reducir el tamaño de estructuras metálicas a esta escala, se pueden encontrar dos

dominios conocidos como nanopartículas y nanoclústeres [11, 12]. Entre estas estructuras existen diferencias fundamentales, presentando distintas propiedades en función de sus dimensiones.

En el caso de las nanopartículas metálicas, sus dimensiones son similares o menores que el recorrido libre medio de un electrón, por lo que el movimiento de los electrones comienza a estar limitado por el tamaño de la nanopartícula y se espera que las interacciones con la luz se produzcan principalmente con la superficie del material. Esto da lugar al fenómeno de la Resonancia del plasmón superficial, en el cual las propiedades ópticas se determinan por la oscilación colectiva de los electrones de conducción, resultantes de la interacción con la luz. De este modo, las nanopartículas plasmónicas se caracterizan por ser fuertes absorbentes de la luz, pero no presentar luminiscencia [5].

Por otro lado, cuando el tamaño de la nanopartícula comienza a ser comparable con la longitud de onda de Fermi de un electrón, la estructura en bandas se rompe en niveles discretos de energía debido a que, en este momento, no solo el tamaño sino el número de átomos comienza a ser limitado [5, 6]. Cuando las nanopartículas son de una escala tan reducida se les denomina **nanoclústeres metálicos** y están constituidos de unos pocos a varios cientos de átomos [14]. En este caso ya no presentan propiedades conductoras como consecuencia de la separación de sus niveles de energía. En la Figura 4 se observan los niveles energéticos para las diferentes estructuras metálicas y sus escalas.

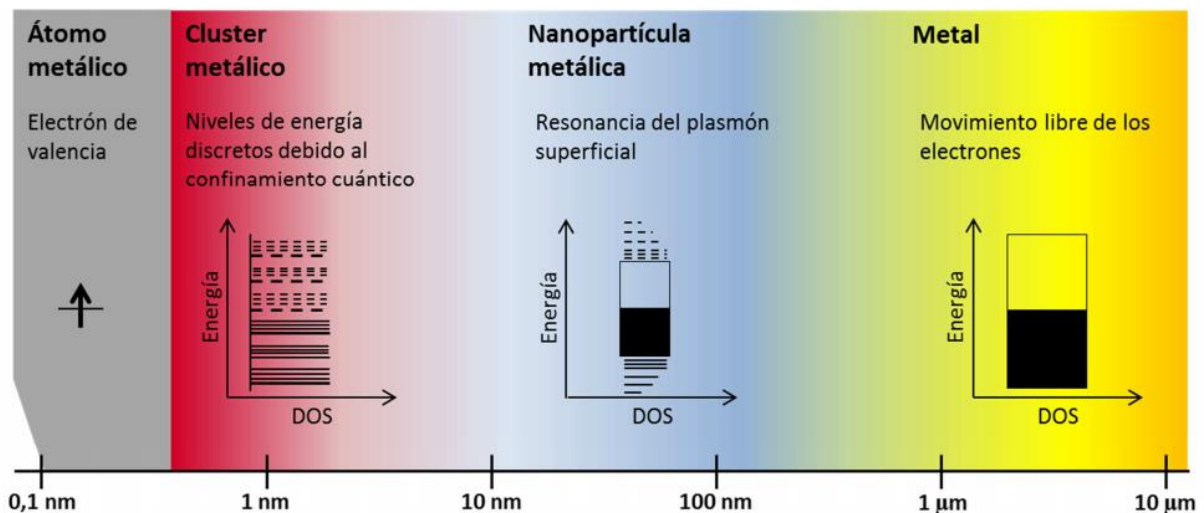


Figura 4. Esquema de los diferentes niveles energéticos para las diferentes estructuras metálicas y sus escalas [5].

Por otro lado, como la oscilación colectiva de los electrones en el caso de los nanoclústeres se encuentra impedida, no presentan la banda de plasmón superficial típica de las nanopartículas. Debido a todo esto, los nanoclústeres metálicos conforman una especie nueva en la que las



interacciones con la radiación electromagnética todavía son posibles a través de las transiciones electrónicas entre los distintos niveles energéticos [5, 14].

El estudio de los nanoclústeres metálicos ha despertado un gran interés en los últimos años debido a que presentan unas propiedades ópticas, electrónicas y químicas completamente diferentes a las especies conocidas hasta la fecha y que son puente entre los átomos aislados y las nanopartículas, o incluso el metal macroscópico. Entre sus propiedades cabe destacar una fuerte emisión fluorescente modulable en cuanto a la naturaleza del metal, el tamaño del clúster, el ligando y medio en el que se encuentra solubilizado, una elevada fotoestabilidad, largos desplazamientos de Stokes, ausencia de intermitencia en la emisión fluorescente, rendimientos cuánticos de fluorescencia aceptables, una relación superficie-volumen elevada y una baja toxicidad [5, 13-15].

Todas estas propiedades convierten a los nanoclústeres en una alternativa al uso de fluoróforos orgánicos convencionales y quantum dots, solucionando y mejorando limitaciones como son la baja estabilidad de los fluoróforos orgánicos, o la alta toxicidad de determinados quantum dots (suelen estar compuestos normalmente por átomos de metales pesados como el Cd). Por ello, los nanoclústeres metálicos se postulan como una herramienta de aplicación en el campo de los biosensores, la optoelectrónica, catálisis, técnicas de imagen molecular y biológica, y nanomedicina [11, 13, 14, 16].

Sin embargo, actualmente los procesos que dan lugar a la aparición de la fuerte emisión fluorescente en este tipo de nanomateriales no están totalmente aclarados. Existen diversos mecanismos que pueden explicar el fenómeno de fluorescencia en estos nanomateriales, ya se produzcan transiciones electrónicas interbanda [17, 18], relajaciones radiativas dentro de la banda de conducción (transiciones intrabanda) [18], transferencias de energía entre los átomos metálicos del propio nanoclúster y el ligando que los recubre, interacciones entre átomos metálicos [20]; incluso el propio ligando protector podría jugar un papel muy importante en la fluorescencia de los NCs [21]. Por tanto, es posible que no exista un mecanismo general que explique este fenómeno de fluorescencia, si no que ésta podría ser diferente para cada tipo de NCs, variando sus características en función del material utilizado, su tamaño, así como el ligando y la ruta sintética utilizada [14, 16]. Todo esto proporciona otra ventaja importante a los NCs metálicos, ya que es posible obtener NCs con absorciones y emisiones modulables a diferentes longitudes de onda [16].

Actualmente se han propuesto numerosas rutas de síntesis de NCs metálicos, variando la composición del material empleando diferentes metales como oro, plata, cobre o platino entre otros [13, 15].

1.5. Aplicaciones Analíticas de los Nanoclústeres

1.5.1. Sensores

Iones de metales pesados como el mercurio (Hg^{2+}), plomo (Pb^{2+}) y cadmio (Cd^{2+}), entre otros, son contaminantes altamente tóxicos para el medio ambiente y el ser humano, debido a que la bioacumulación de estos iones metálicos en el organismo a través de la ingesta pueden inducir la aparición de diferentes enfermedades. Para detectar estos contaminantes es posible el uso de NCs metálicos, ya que, debido a sus propiedades luminiscentes, es posible la creación de sensores basados en el “quenching” o desactivación de la fluorescencia, provocado por la agregación o la pérdida del ligando protector del NCs, debido a su interacción con los iones contaminantes. El empleo de este tipo de técnica puede llegar a alcanzar niveles de sensibilidad de rangos de concentración de nM [22-24].

A su vez, también es posible el empleo de NCs para la detección de biomoléculas tales como la cisteína o la homocisteína, que participan en funciones celulares del organismo de elevada importancia como son la desintoxicación y el metabolismo, actuando como biomarcadores importantes para el diagnóstico de numerosas enfermedades [14]. La detección de estas biomoléculas es posible debido a que contienen grupos tiol, capaces de crear enlaces con la parte metálica (plata, oro, etc.) de los NCs, provocando la inhibición de la fluorescencia y alcanzando niveles de sensibilidad del orden nM [16].

1.5.2. Marcaje fluorescente en bioensayos

Los NCs metálicos pueden ser utilizados para la detección de un amplio rango de moléculas biológicas, desde cadenas de ADN hasta proteínas [16]. La unión de los NCs a aptámeros o anticuerpos (es decir, moléculas que poseen propiedades de reconocimiento específicas) permite realizar la determinación de proteínas y ácidos nucleicos a través de bioensayos (inmunoensayos y ensayos de ADN) [14].

1.5.3. Aplicación en análisis de imágenes biológicas (*imaging*)

La obtención de imágenes (*imaging*) con marcas fluorescentes ofrece una serie de ventajas únicas sobre otras técnicas de imagen, como son una mejora de la sensibilidad, capacidad de realizar una detección múltiple de diferentes analitos y la disminución de costes. A su vez, los NCs metálicos presentan un tamaño menor que otros fluoróforos, así como una emisión fluorescente mayor y más

estable, y una buena biocompatibilidad, haciéndolos muy atractivos para su uso como biomarcas en el análisis por *imaging* de tejidos biológicos [22].

1.6. Nanoclústeres de Plata

Los nanoclústeres metálicos, y más en concreto los nanoclústeres de plata (AgNCs), poseen un conjunto de propiedades que complementan y mejoran las características de los fluoróforos orgánicos y los quantum dots, ya que su elevada emisión fluorescente y su tamaño ultra-pequeño los convierte en una herramienta muy útil para su aplicación como sondas fluorescentes en marcaje biológico [25].

Actualmente existen diferentes metodologías para la síntesis de AgNCs, entre las cuales, la más utilizada es la metodología “bottom-up” (de abajo hacia arriba), mediante la reducción directa del precursor o precursores de la plata. En este caso el precursor de plata, normalmente nitrato de plata, se puede tratar con una gran diversidad de moléculas o “grupos protectores” a los que se les denomina ligandos. Se han propuesto una gran variedad de ligandos, desde dendrímeros y pequeños polímeros orgánicos, hasta moléculas más complejas como pueden ser hebras de ADN y pequeños péptidos o proteínas, los cuales poseen grupos funcionales (grupos tiol, carboxilo, aminas, etc.) que permiten, tanto la unión a la superficie del metal para así estabilizar el NCs metálico, como su funcionalización para conseguir una posterior bioconjugación con diferentes moléculas biológicas [16, 23, 25].

Una vez sintetizados los nanoclústeres de plata, su estructura final se compone de un núcleo metálico con un determinado número de átomos de plata, recubierto en la superficie con una capa de ligandos. Debido a que existen gran variedad de ligandos, estos pueden hacer variar el tamaño final del NCs, así como sus propiedades fotoluminiscentes, variando los tiempos de estabilidad y los rangos de emisión y absorción de luz [14, 16, 23, 25]. A continuación, en la Figura 5 se muestra un ejemplo de un AgNC funcionalizado con una molécula de ácido lipoico (LA) en su forma reducida, denominada ácido dihidrolipoico (DHLA).

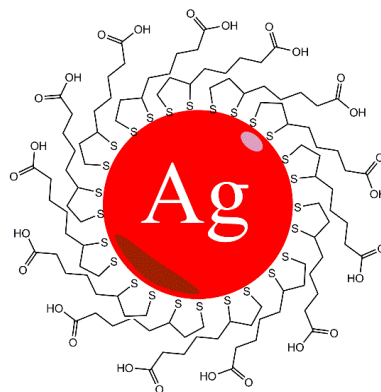


Figura 5. Nanoclúster de plata funcionalizado con DHLA.

1.7. Inmunoensayos

Los inmunoensayos consisten en el empleo de técnicas analíticas que se llevan a cabo mediante el uso de complejos o moléculas provenientes del sistema inmune, como son los antígenos y los anticuerpos (Ab), aprovechando que son capaces de unirse entre ellos con una alta afinidad mediante reconocimiento molecular, para así realizar la cuantificación de determinados analitos [26, 27].

Los anticuerpos son glicoproteínas de un peso molecular aproximado de 150 kDa, que poseen zonas de reconocimiento molecular o unión a otras biomoléculas específicas. Son producidos en organismos vivos, en concreto en los linfocitos B, debido a la activación de una respuesta inmune provocada por la intrusión de un inmunógeno en el organismo. Los inmunógenos son moléculas, normalmente extrañas al organismo, que son capaces de producir una respuesta inmune; es decir, al entrar en contacto con el organismo éstas provocan una serie de reacciones que dan lugar a la producción de anticuerpos [26].

Los anticuerpos son un subgrupo de proteínas (globulinas séricas) presentes en el plasma sanguíneo que poseen propiedades de unión específicas, denominadas como Inmunoglobulinas (Ig). Estas inmunoglobulinas están compuestas por dos cadenas polipeptídicas ligeras, cada una con un peso molecular aproximado de 25 kDa, y dos cadenas polipeptídicas pesadas de aproximadamente de 50 kDa. Las cuatro cadenas se encuentran unidas mediante enlaces disulfuro conformando una estructura en forma de “Y” característica de los anticuerpos. Existen varios tipos de anticuerpos, donde la secuencia de aminoácidos presentes en la cadena pesada de cada uno de ellos es la encargada de determinar el tipo de anticuerpo, existiendo IgG, IgM, IgA, IgE, y IgI. Los anticuerpos de diferentes clases o tipos pueden poseer las mismas propiedades de unión sobre un antígeno en concreto, pero presentar funciones diferentes [26-28].



Existen varios tipos de antígenos, ya que no todos son necesariamente generadores de una respuesta inmune por sí mismos (inmunógenos). Un ejemplo son los haptenos, moléculas con un bajo peso molecular que por sí solos no producen una respuesta inmune en el organismo [26].

Las interacciones de reconocimiento de los anticuerpos con los antígenos o haptenos se caracterizan por ser altamente selectivas y específicas, llevándose a cabo dicha unión mediante múltiples enlaces no covalentes entre el antígeno y los distintos aminoácidos de las cadenas del anticuerpo. Se pueden dar fuerzas de unión de diferentes tipos como los puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals, interacciones hidrofóbicas e interacciones electrostáticas, otorgando todas ellas un carácter sinérgico a esta unión, creando un enlace altamente resistente [26, 28]. Debido a estas características de elevada afinidad y selectividad en la unión antígeno-anticuerpo, los ensayos inmunoquímicos son una herramienta altamente eficiente que permite la cuantificación de compuestos presentes en fluidos biológicos a concentraciones muy reducidas.

1.7.1. Tipos de inmunoensayos

La clasificación de los diferentes métodos empleados en un inmunoensayo puede hacerse de diferentes maneras: ya sean **homogéneos**, sin un paso de separación previo a la realización de la medida, o **heterogéneos**, cuando es necesario una etapa de separación tras la reacción de reconocimiento para realizar la medida de la señal; con especies marcadas o sin marcar; y en función del tipo de marca utilizada [27].

Algunos inmunoensayos no requieren marcadores, y se dividen en: inmunoprecipitación, inmunolectroforesis, ensayos de aglutinación, medidas de turbidez y ensayos de fijación del complemento [26].

Para la mayoría de los métodos cuantitativos se precisan el uso de marcas. Estas marcas son moléculas o complejos que se unen covalentemente al antígeno o el anticuerpo para visualizar la unión entre ambos. La marca utilizada debería presentar una serie de propiedades como tener un bajo coste económico, ser estable sin alterar la funcionalidad de la biomolécula marcada, presentar un procedimiento de unión con el anticuerpo/antígeno sencillo, y que sea fácilmente diferenciable de aquellas marcas que no se encuentran unidas con el analito sin procedimientos de separación adicionales [27, 29].

Dentro de los **inmunoensayos con marcas**, se pueden diferenciar varios tipos en función del tipo de marca utilizada [27, 30-32]:



- **Radioinmunoensayos (RIA).** La marca empleada es un isótopo radioactivo (Ej: ^{14}C , ^3H , ^{125}I , etc.).
- **Fluoroimmunoensayos.** En este caso la marca empleada es un fluoróforo (Ej: fluoresceína, rodamina, quelatos de tierras raras, etc.). Existen gran variedad de formatos, siendo el ensayo en placa ELISA el más utilizado.
- **Enzimoimmunoensayos (EIA).** La marca empleada es una enzima (Ej: Fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano silvestre, etc.).
- Inmunoensayos mediante **marcas elementales.** Se emplea como marca heteroátomos, isótopos estables enriquecidos o nanopartículas para su posterior detección mediante ICP-MS.

También es posible clasificar los inmunoensayos en función de que sean competitivos o no competitivos. En un **inmunoensayo competitivo** el analito compite con un antígeno/anticuerpo marcado por un número limitado de sitios de unión. En este proceso se mide la cantidad de antígeno/anticuerpo marcado sin conjugar, que se considera es inversamente proporcional al analito. Por otro lado, en un **inmunoensayo no competitivo** o **tipo sándwich**, el antígeno de la muestra reacciona con dos anticuerpos diferentes que se fijan a distintas zonas del antígeno. Uno de los anticuerpos generalmente está en un soporte sólido para facilitar la separación de la fracción ligada, y el otro anticuerpo lleva la marca. En este caso la señal analítica viene dada por la cantidad de marcador presente, con una relación directamente proporcional a la cantidad de analito (antígeno) presente en la muestra [27].

1.8. Metalotioneínas

1.8.1. Definición y localización de las metalotioneínas

Las metalotioneínas (MT) son una familia de proteínas ricas en cisteína con un peso molecular reducido de 6-7 kDa capaces de unirse a determinados metales. Existen cuatro isoformas diferentes (MT-I, MT-II, MT-III, MT-IV) presentes en numerosos organismos, donde la variación en su estructura conformacional es mínima. Las isoformas MT-I y MT-II se encuentran expresadas en casi todos los tejidos del organismo, siendo especialmente importante su presencia en órganos parenquimáticos como el hígado, riñón, intestino, pulmón, corazón y cerebro. En el caso de la MT-III su expresión se localiza fundamentalmente en el cerebro. La expresión de la MT-IV se encuentra localizada principalmente en zonas del epitelio escamoso y en la lengua. La expresión de los diferentes tipos de metalotioneínas se encuentra asociada al tipo de células y a un gran rango de fenómenos fisiológicos y patológicos [33-36].

1.8.2. Funciones de las metalotioneínas

Las diferentes isoformas de la MT poseen diversas funciones fisiológicas y antioxidantes sobre el organismo. En primer lugar, cabe destacar que el Zn es un cofactor importante dentro de las enzimas, participando en la neurotransmisión y el desarrollo cerebral, por lo que su regulación intracelular es muy importante. La función principal de la MT es la de mantener la homeostasis intracelular del Zn, ya que un exceso de éste puede causar muerte neuronal. Las MT participan en esta homeostasis del Zn mediante procesos de metabolismo y transporte, facilitando el movimiento del Zn liberándolo hacia moléculas diana, y permitiendo que este metal se encuentre disponible para otros orgánulos celulares [33, 35, 36].

Por otro lado, las MT poseen una función antioxidante. El estrés oxidativo se refiere a las consecuencias citopatológicas de un desajuste en el balance entre la producción de radicales libres y la habilidad de la célula a defenderse de ellos. La MT puede ser inducida en respuesta al estrés oxidativo, actuando como protección. Ésta participa en el proceso debido a que contiene un gran número de grupos tioles en su estructura, los cuales reaccionan con gran afinidad ante la presencia de radicales libres [33, 36].

Por tanto, la síntesis por parte del organismo de las MT se debe principalmente a la inducción en su transcripción por factores como la presencia de metales pesados, estímulos químicos, drogas y la presencia de radicales libres que originan un elevado estrés oxidativo celular [33].

1.8.3. Metalotioneína III y enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer es una de las causas de demencia más común actualmente. Se trata de un trastorno neurodegenerativo relacionado con la edad y se caracteriza por presentar un deterioro progresivo de las funciones mentales superiores y las funciones cognitivas, desencadenando en una demencia severa. Neuropatológicamente esta enfermedad se caracteriza por la acumulación de dos tipos de materiales fibrosos en el cerebro: el péptido β -amiloide extracelular y ovillos fibrosos compuestos por la proteína *tau* anormal e hiperfosforilada [33].

Se ha considerado que la presencia de estos complejos en el tejido cerebral, especialmente del péptido β -amiloide, origina un estrés oxidativo en las células de los tejidos, lo que provoca la aparición de procesos de inflamación. Existen a su vez estudios que relacionan concretamente la sobreexpresión del isómero MT-III en tejidos cerebrales con la enfermedad de Alzheimer, ya que como hemos mencionado, una de las funciones principales de estas proteínas es la de proteger del



estrés oxidativo mediante mecanismos compensatorios que involucran la regulación de iones metálicos [33].

A su vez, existen anticuerpos capaces de reconocer a cada uno de los diferentes isómeros de la MT, por lo que, mediante un fluoroinmunoensayo de tipo competitivo empleando el anticuerpo Anti-MT-III marcado con un fluoróforo sería posible la detección de la sobreexpresión de la MT-III en tejidos cerebrales afectados por la enfermedad de Alzheimer.



2. OBJETIVO

El objetivo principal de este trabajo es la síntesis, caracterización y bioconjugación de Nanoclústeres de plata para su aplicación como marcas fluorescentes en inmunoensayos competitivos para la determinación de MT-III. Este objetivo principal se desarrollará a través de los siguientes objetivos parciales:

- Llevar a cabo una síntesis de AgNCs con una emisión fluorescente elevada y estable con el tiempo, para lo que se evaluará la influencia de diferentes medios acuosos.
- Optimización del proceso de bioconjugación AgNCs/Anti-MT-III buscando una relación molar que proporcione una elevada fluorescencia sin disminuir, en la medida de lo posible, la funcionalidad del anticuerpo.
- Desarrollo de un inmunoensayo competitivo basado en la detección fluorescente de los nanoclústeres plata para la detección de MT-III mediante microscopía láser confocal.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Instrumentación

- Espectrómetro de Luminiscencia Cary Eclipse, de la casa comercial Agilent Technologies, con una lámpara de descarga de Xenón, monocromadores CzernyTurner y tubo fotomultiplicador como detector. Presenta como accesorio un lector de placas ELISA.
- Espectrómetro de Luminiscencia Perkin Elmer Modelo LS-50B, para medir en celda de 1 cm de paso óptico, con una lámpara de Xenón.
- Espectrómetro de Masas de doble enfoque con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS, modelo "Element II" de Thermo Scientific).
- Microscopio de Transmisión Electrónica de alta resolución (HR-TEM) modelo JEOL JEM-2100F que alcanza resoluciones de 1.9 Å entre puntos y 1.0 Å entre líneas. Posee una cámara CCD de alta resolución.
- Microscopio Láser Confocal Espectral Leica TCS-SP8X.
- Lector de placas Vis-UV modelo ELx800 de la casa comercial Bio-Tek.
- Centrifuga Biofuge Stratus (Heraeus, Alemania).
- pHmetro Crison modelo micropH 2000 (Crisol instruments S.A., España).
- Balanza analítica NewClassic MF con precisión de hasta ± 0.01 mg (Mettler Toledo Barcelona, España).
- Granatario SCALTEC con precisión de hasta ± 0.01 g.
- Estufa de laboratorio de la casa Memmert, modelo 100.
- Agitador magnético RCT basic safety control (IKA, Staufen, Alemania).
- Baño ultrasonidos (J.P. Selecta, Barcelona, España).
- Sistemas de purificación de agua ultrapura Milli-Q Advantage A10 (MD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA), acoplado a la unidad Q-POD (Quality-Point-of Delivery) que permite generar agua ultrapura.

3.2. Materiales

- Cubeta de fluorescencia de cuarzo SUPRASIL de Hellma, modelo 114F-QS, con paso óptico de 10 mm y volumen de cámara de 3 mL.
- Cubeta de fluorescencia de cuarzo SUPRASIL de Hellma, modelo 101-QS, con paso óptico de 10 mm y volumen de cámara de 1.5 mL.
- Micropipetas de volúmenes comprendidos entre 1 μ L y 1 mL (Labmate).
- Micropipeta multicanal de volumen comprendido entre 30-300 μ L (Labmate).

- Filtros de ultrafiltración Amicon Ultra con un tamaño de poro de membrana de 10 kDa y 100 kDa (Millipore).
- Placa transparente de poliestireno de titración de 96 pocillos no esterilizada (Sterilin Limited, U.K.).
- Adhesivos de silicona aislantes (Grace bio-labs, USA).
- Tubos Falcon de 50 mL.
- Viales de vidrio de 10 mL.
- Tubos Eppendorf con volúmenes de 0.5, 1.5 y 2 mL.

3.3. Reactivos

Tabla 2. Reactivos utilizados.

	Reactivos	Estado	Fórmula Molecular	Pureza ó Concentración	Casa Comercial	REF.
Síntesis AgNCs	Sal de Plata	Sólido	AgNO ₃	> 99 %	Sigma-Aldrich	36506
	Borohidruro de Sodio	Sólido	H ₄ BNa	≥ 96 %	Sigma-Aldrich	71320
	Ácido Lipoico	Sólido	C ₈ H ₁₄ O ₂ S ₂	> 98 %	Acros Organics	138720050
Bioconjugación	Anticuerpo primario Anti-Human MT-III producido en conejo	Líquido	-	0.1 mg/mL	Sigma-Aldrich	C68373
	Anticuerpo secundario Anti-Rabbit IgG producido en cabra marcado con peroxidasa	Líquido	-	1.39 mg/mL	Sigma-Aldrich	A8275
	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC)	Sólido	C ₈ H ₁₇ N ₃ ·HCl	> 98 %	Acros Organics	171440100
	N-hidroxisuccinimida (NHS)	Sólido	C ₄ H ₅ NO ₃	> 95 %	ThermoFisher Scientific	24510
Inmunoensayos	Metalotioneína-III Humana	Sólido	-	0.5 mg/mL	Sigma-Aldrich	
	Albúmina de suero bovino (BSA)	Sólido	-	> 96 %	Merck	12657
	Polyethylene glycol sorbitan monolaurate (Tween20)	Líquido	-	60 mg/L	Sigma-Aldrich	P9416
	Ácido Sulfúrico	Líquido	H ₂ SO ₄	37%	-	-
	TMB substrate KIT	Líquido	-	0.4 g/L	ThermoFisher Scientific	34028
Disoluciones Reguladoras	PBS (Disolución Reguladora de Fosfatos)					
	Cloruro de Sodio	Sólido	NaCl	98%	VWR Chemical	27800
	Cloruro de Potasio	Sólido	KCl	98%	Panreac	141494
	Hidrogeno Fosfato de Sodio	Sólido	Na ₂ HPO ₄	99%	Merck	119753
	Dihidrógeno Fosfato de Potasio	Sólido	KH ₂ PO ₄	99%	Merck	A215573015
	BBS (Disolución Reguladora de Boratos)					
	Ácido Bórico	Sólido	H ₃ BO ₃	96%	Merck	A015.4260
	Cloruro de Sodio	Sólido	NaCl	99%	VWR Chemical	27800
	Hidróxido de Sodio	Sólido	NaOH	> 97%	Merck	1.064.981.000
	(HEPES) 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid	Sólido	C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S	≥ 99.5%	Sigma-Aldrich	H3375

3.4. Procedimientos experimentales

3.4.1. Síntesis AgNCs

En un vial protegido de la luz se añaden 5.26 mg de ácido lipoico (LA) junto a 2 mL de H₂O Milli-Q. A esta mezcla insoluble se le adicionan 0.24 mg de borohidruro de sodio para mantener una proporción LA:NaBH₄ de 4:1, para a continuación mantener en agitación. En este caso el LA es reducido en agua para formar ácido dihidrolipoico (DHLA). Una vez obtenida la disolución de DHLA se añaden 100 µL de una disolución acuosa de AgNO₃ 25 mM y se deja agitar durante 1 minuto. A esta mezcla se le añade lentamente un ligero exceso de una disolución acuosa de borohidruro sódico. Se continúa con la agitación durante 2 horas [23]. A continuación, en la Figura 6 se observa el esquema de las reacciones que tienen lugar en el proceso de síntesis.

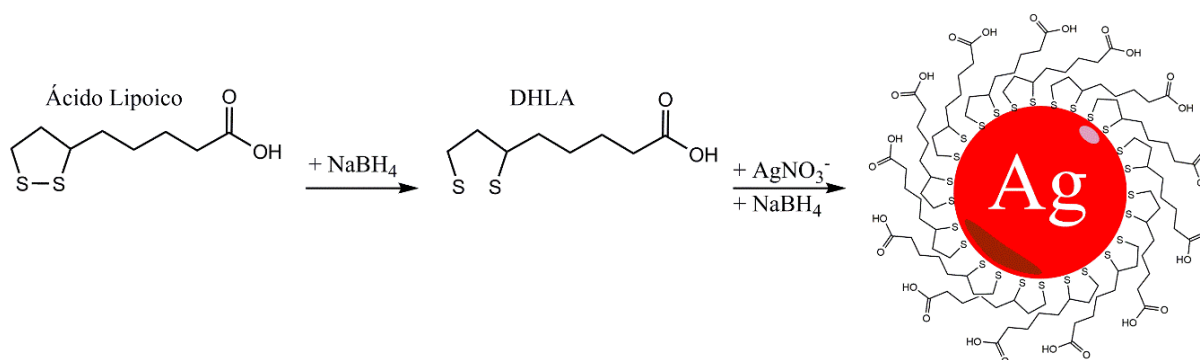


Figura 6. Esquema reacción del proceso de síntesis de los NCs de plata.

3.4.2. Purificación y caracterización de los nanoclústeres de plata

Posteriormente a la síntesis de los AgNCs se realiza su purificación, eliminando el exceso de ligando y de agente reductor, además de eliminar subproductos de la reacción. La purificación se realiza mediante ultrafiltración, utilizando filtros de membrana con un tamaño de poro de 10 kDa. Se lleva a cabo empleando los siguientes ciclos de lavado:

- I. Un ciclo de centrifugado a 1600 g durante 5 min.
- II. Un segundo ciclo de centrifugado a 1600 g durante 10 min.
- III. Tres lavados con H₂O a 1600 g durante 10 min.

Una vez purificado se lleva la disolución al volumen inicial de 2.5 mL por pesada con H₂O Milli-Q. La disolución final se almacena a temperatura ambiente y protegida de la luz.

Los AgNCs se caracterizan midiendo su fluorescencia estableciendo los siguientes parámetros de medida en el equipo Perkin Elmer:

- Modo barrido
- Rendijas de excitación/emisión: 7/7 nm
- Velocidad de barrido: 300 nm/min
- Se aplica una longitud de onda de excitación (λ_{exc}) de 404 nm, recogiendo la emisión en un rango de λ entre 454 nm y 800 nm.

3.4.3. Bioconjugación de nanoclústeres de plata

La bioconjugación del nanoclúster con una biomolécula, en este caso con un anticuerpo, se realiza mediante el método de la carbodiimida [37]. En este método de síntesis orgánica, se establece un enlace covalente entre el nanomaterial y la biomolécula a través de la formación de un enlace amida entre los grupos carboxilo y amino presentes en cada una de las moléculas, respectivamente. Un esquema del proceso de bioconjugación se recoge en la Figura 7.

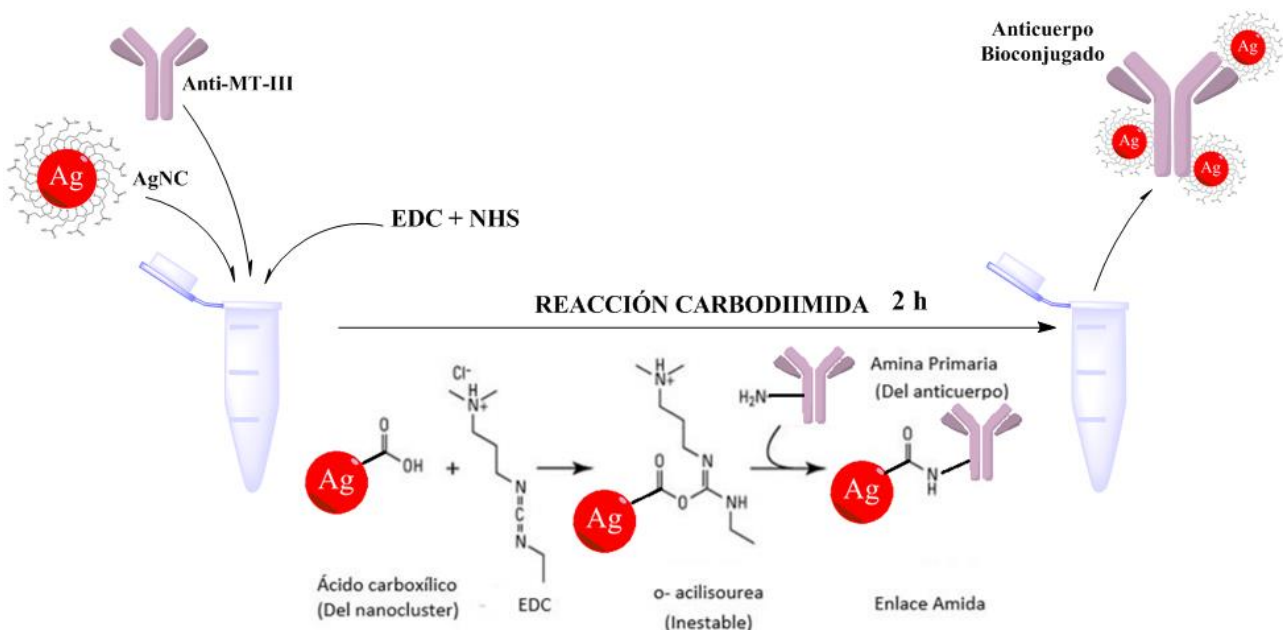


Figura 7. Esquema del proceso de bioconjugación mediante la reacción de la carbodiimida.

La bioconjugación se lleva a cabo en un Eppendorf con agitación constante, a temperatura ambiente y en oscuridad. De esta manera se introducen en el Eppendorf 100 μ L de una concentración de 100 μ g/mL de anticuerpo, en este caso Anti-MT-III, y se añade la cantidad necesaria de AgNCs. En los estudios llevados a cabo se han ensayado diferentes relaciones molares Anticuerpo:Nanoclúster con el objeto de optimizar el

proceso de bioconjugación de manera que la relación óptima no afecte a la funcionalidad del anticuerpo y a su vez tampoco afecte a las propiedades luminiscentes del NCs. Las cantidades estudiadas de AgNCs en el proceso de la bioconjugación fueron las siguientes:

- I. Para un bioconjugado 1:1 se añaden al vial 50.31 μL de la disolución de AgNCs.
- II. Para un bioconjugado 1:3 se añaden al vial 150.94 μL de la disolución de AgNCs.
- III. Para un bioconjugado 1:5 se añaden al vial 251.56 μL de la disolución de AgNCs.
- IV. Para un bioconjugado 1:7 se añaden al vial 352.18 μL de la disolución de AgNCs.
- V. Para un bioconjugado 1:10 se añaden al vial 503.12 μL de la disolución de AgNCs.
- VI. Para un bioconjugado 1:15 se añaden al vial 754.68 μL de la disolución de AgNCs.

Una vez añadidos tanto el anticuerpo como los AgNCs se comienza la agitación. Posteriormente, se añade el EDC y NHS, los cuales han sido puestos en disolución de HEPES 0.1 M. El EDC está en exceso, en una relación molar de Ab:EDC de 1:1500. La cantidad de NHS está relacionada con la cantidad de EDC, de manera que se encuentren en una relación molar EDC:NHS de 2:1. Al añadir la disolución que contiene EDC y NHS, comienza la reacción de manera que se mantiene la agitación durante 2 horas.

3.4.4. Purificación y caracterización de la bioconjugación

Una vez transcurridas las dos horas de reacción de bioconjugación, ésta se da por finalizada y es necesario recurrir a una etapa de purificación para eliminar el exceso de reactivos y subproductos de la reacción. Como anteriormente se ha procedido con los AgNCs, dicha purificación se realiza recurriendo a un procedimiento de ultrafiltración, empleando filtros de membrana de 100 kDa, de manera que se retiene en el filtro el anticuerpo marcado (los AgNCs no bioconjugados pasarán a través de la membrana de filtración). Las disoluciones resultantes se conservan en tubos cerrados en la oscuridad y en la nevera. Los ciclos de limpieza-purificación que se han realizado son los siguientes:

- I. Dos lavados con H_2O a 700 g durante 7 min.
- II. Un ciclo de centrifugado a 700 g durante 7 min.

Finalmente se lleva a cabo una primera caracterización del bioconjugado registrando la emisión de fluorescencia, utilizando los parámetros anteriormente descritos para la caracterización de los NCs. Con este estudio se pretende comprobar que la reacción de bioconjugación no afecta a las propiedades ópticas de las marcas seleccionadas (AgNCs).

3.4.5. Inmunoensayo espectrofotométrico

Al realizar la bioconjugación de los NCs con anticuerpos es primordial saber si la funcionalidad del anticuerpo se mantiene, de manera que el anticuerpo sea aún capaz de reconocer específicamente a su antígeno. Para comprobar dicha funcionalidad se realizó un inmunoensayo espectrofotométrico empleando un anticuerpo secundario marcado con peroxidasa de rábano silvestre (HRP) [38].

En una placa de ELISA se inmoviliza el antígeno, en nuestro caso MT-III (1 µg/mL) añadiendo 100 µL/pocillo y manteniendo en estufa a 38 °C durante 6 h. Pasadas las 6 horas se bloquea con BSA al 1% (200 µL/pocillo) y se mantiene a 4°C durante 12 h. Se realizan varios lavados con PBS-Tween20 (200 µL/pocillo). Posteriormente se añade el anticuerpo Anti-MT-III marcado con AgNCs (100 µL/pocillo) y se incuba en estufa a 38 °C durante 2 h. Pasadas las 2 horas se realiza lavados de igual manera que la etapa de lavado anterior y se añade el anticuerpo marcado con peroxidasa anti-Goat IgG-HRP (100 µL/pocillo), con una dilución 1:1000 en un buffer de PBS-BSA-Tween20. Se deja incubar (a 38 °C en estufa durante 2 h) y se elimina el exceso de reactivo. Por último, se realiza la etapa de revelado con el Kit “TMB substrate”, el cual contiene los substratos de la enzima peroxidasa:

- Disolución de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) 0.4 g/L.
- Disolución de peróxido de hidrógeno al 0.02% en una disolución reguladora de ácido cítrico.

Se prepara una mezcla 1:1 de estas dos disoluciones que se añaden a la placa ELISA (100 µL/pocillo), de tal manera que donde haya anticuerpo anti-MT-III activo se generará una coloración azul, comprobándose si mantiene su funcionalidad. Para detener la reacción enzimática se añaden 100 µL/pocillo de ácido sulfúrico 2 M, provocando un cambio de color de azul a amarillo. La medida de la señal se realiza en un lector de placas de absorbancia Elix 800 a 450 nm.

3.4.6. Inmunoensayo competitivo.

En el inmunoensayo de tipo competitivo desarrollado, el analito inmovilizado en la placa y el analito presente en la muestra en disolución compiten por los sitios de unión limitados del anticuerpo bioconjugado. El procedimiento es el siguiente (Figura 8) [39]:

- I. **Tapizado:** se añaden 150 µL en cada uno de los pocillos de la placa, de una disolución de MT-III con una concentración de 1 µg/mL junto a 15 µL de una disolución 0.0001 M de EDC (relación EDC:MT-III de 1:1500). Se procede a la incubación a 38 °C durante 6 horas.

- II. **Bloqueo:** se añaden en cada pocillo 200 μL de una disolución de bloqueo de BSA al 1%. Se procede a la incubación a temperatura ambiente durante 2 horas.
- III. **Lavado 1:** se añaden a cada uno de los pocillos 200 μL , de una disolución de PBS-Tween20. Esta etapa se realiza tres veces, eliminando el líquido de lavado entre cada una de las repeticiones.
- IV. **Incubación Ab/MT-III:** antes de que finalice la etapa de bloqueo, se lleva a cabo la incubación del anticuerpo (75 μL) con las diferentes concentraciones de MT-III (75 μL) durante media hora y en agitación.
- V. **Reacción inmunológica:** se añade a cada pocillo 150 μL la mezcla previamente incubada Ab/MT-III y se incuba la placa a 38 $^{\circ}\text{C}$ durante 2 horas.
- VI. **Lavado 2:** se lleva a cabo del mismo modo que el primer lavado.
- VII. **Detección:** se realiza la medida de fluorescencia en un lector de placas o por microscopía láser confocal.

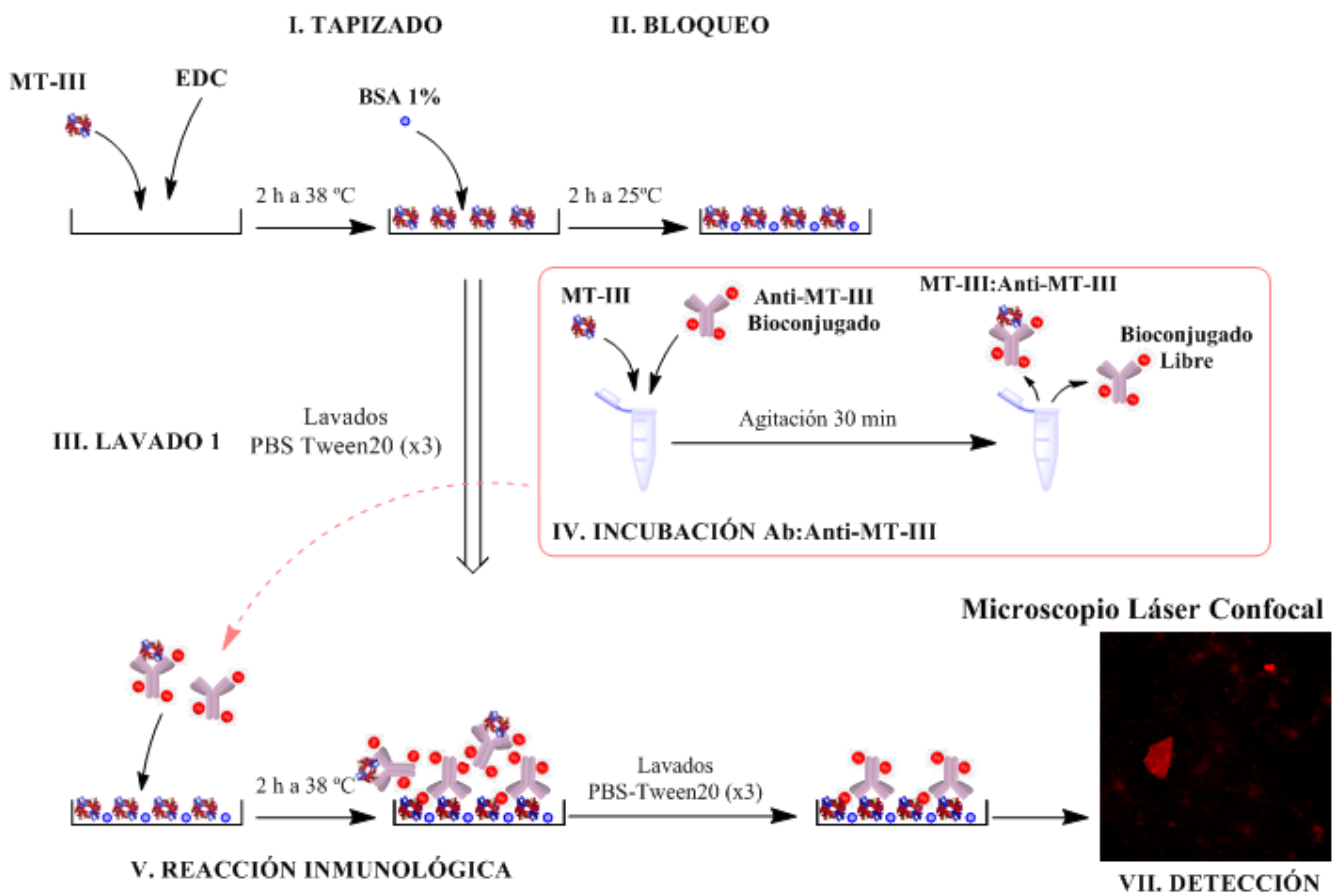


Figura 8. Esquema procedimiento Inmunoensayo competitivo.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Síntesis, purificación y caracterización de AgNCs

Una vez llevada a cabo la síntesis de los nanoclústeres de plata se llevó a cabo su caracterización midiendo diferentes factores como son:

- Caracterización de la fluorescencia emitida seleccionando las longitudes de onda óptimas tanto para el rango de excitación como el de emisión, así como el cálculo del rendimiento cuántico de fluorescencia o “*Quantum Yield*” (QY).
- Caracterización de AgNCs mediante HR-TEM para conocer tanto el diámetro como su distribución de tamaños.
- Análisis mediante ICP-MS para conocer la concentración de plata y por tanto de AgNC final en disolución, así como el rendimiento molar de la síntesis.
- Estudio de la estabilidad de los nanoclústeres de plata a lo largo del tiempo bajo diferentes condiciones, como la presencia o no de luz, o el medio en el que se encuentran.

4.1.1. Caracterización por fluorescencia

A continuación, se presentan los resultados obtenidos de la caracterización por espectrofotometría de fluorescencia de los AgNCs sintetizados. En la Figura 9 se muestran representados los espectros de excitación y emisión obtenidos.

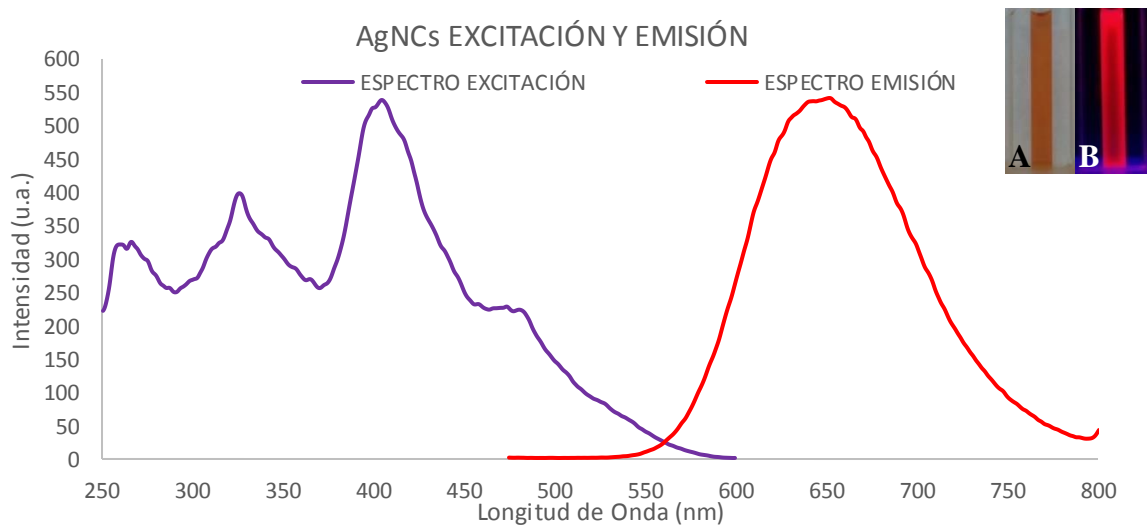


Figura 9. Espectros de excitación y emisión obtenidos para la síntesis de AgNCs con una λ_{exc} de 404 nm y λ_{em} de 655 nm. A) AgNCs sin fluorescencia. B) AgNCs con fluorescencia.

El espectro de emisión de los AgNCs se obtuvo realizando una excitación en primer lugar a una λ_{exc} de 425 nm según la bibliografía de referencia [23], obteniéndose un máximo de fluorescencia a una longitud de onda de 655 nm. Posteriormente, conociendo la zona exacta de emisión de nuestros NCs se realizó el espectro de excitación con una longitud de onda de emisión (λ_{em}) a 655 nm, obteniendo un valor máximo de λ_{exc} a 404 nm. Ambos valores de intensidad son bastante elevados ya que en un principio se tuvo que cerrar las rendijas o *slits* del fluorímetro (de 10:20 a 7:7) debido a que se daba una saturación de la señal en las primeras medidas llevadas a cabo, como puede observarse en el ANEXO I en las Figuras 1, 2, 3 y 4.

Cálculo del rendimiento cuántico de Fluorescencia o “Quantum Yield”

El rendimiento cuántico de fluorescencia (Φ_F) o *Quantum Yield (QY)* se define como el porcentaje de fotones absorbidos que dan lugar a un fotón emitido por fluorescencia. Es decir, este rendimiento da información de la probabilidad de que el estado excitado de un fluoróforo se desactive por la emisión fluorescente de un fotón en lugar de cualquier otro mecanismo no radiativo [40].

Por tanto, a partir de la emisión fluorescente es posible calcular el rendimiento cuántico de fluorescencia mediante el empleo de un estándar de referencia con un valor conocido de *QY*, empleando la siguiente fórmula:

$$QY_t = QY_s \cdot \frac{(I_t/A_t)\eta_t^2}{(I_s/A_s)\eta_s^2}$$

Donde *I* es el área integrada del pico de emisión, *A* es la absorbancia medida a la longitud de onda de excitación, y η es el índice de refracción del disolvente. A su vez, “*t*” hace referencia a la muestra problema y “*s*” al estándar utilizado. En el caso de los AgNCs con una longitud de onda de excitación a 404 nm y emisión a 655 nm, se empleó *Acridina Amarilla* como estándar de referencia ($QY_s = 0.47$ en etanol), ya que presenta una longitud de onda de excitación parecida (460 nm) a la de la muestra de nanoclústeres de plata [23]. Los AgNCs fueron medidos en H₂O, y la Acridina en etanol. Se obtuvieron los resultados presentes en la Tabla 3.

Tabla 3. Valores medidos para el cálculo del *QY* de los AgNCs.

	<i>I</i>	<i>A</i>	η	<i>QY (%)</i>
AgNCs	11720.27	0.18	1.33	1.36
Acridina	23368.14	0.01	1.36	47.00

Como se puede observar en la Tabla 3, se obtiene un valor de QY experimental para los AgNCs del 1.36 %. Este valor, aunque es ligeramente inferior, concuerda con el valor obtenido en la misma síntesis realizada por Zhang y Wang, obteniendo un QY del 2 % [23]. Aunque este rendimiento cuántico es bastante bajo, como se ha podido ver en el apartado anterior, los AgNCs ofrecen una intensidad de fluorescencia bastante elevada.

4.1.2. Caracterización de AgNCs mediante ICP-MS

Mediante el empleo de la Espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) se llevó a cabo la determinación de la cantidad de plata presente tanto en la síntesis de AgNCs, como en el desecho obtenido de la purificación de la misma. De esta manera, mediante este análisis se consigue determinar el rendimiento de la síntesis de AgNCs así como llevar a cabo una estimación de la concentración de AgNCs en la disolución.

Se realizó la determinación por ICP-MS del contenido en plata en tres disoluciones:

- Una disolución madre, la cual contiene la disolución precursora de la síntesis (la sal de nitrato de plata) en el mismo volumen final al que se lleva a cabo la síntesis.
- Disolución de AgNCs purificada.
- Desecho o filtrado recogido durante el proceso de purificación.

Se lleva a cabo el análisis de la cantidad de plata total, obteniendo por un lado la cantidad de plata presente inicialmente, por otro lado, la plata presente en los AgNCs purificados, y finalmente la plata que se pierde en la purificación (desecho o filtrado) para realizar el balance de masas y obtener así el rendimiento de la síntesis de los AgNCs. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 4.

Tabla 4. Valores de rendimiento de síntesis y concentración de plata (ppm) y milimoles para cada una de las disoluciones analizadas por ICP-MS.

Muestra	Concentración Ag (ppm)	Ag (miliMoles)
Síntesis AgNCs	85.187919	0.001966
Desecho Filtrado	1.549124	0.000036
Sal de Plata	89.790344	0.002119
Rendimiento %		92.77

A partir de los datos presentados en la Tabla 4, se calcula la relación de moles entre los moles de síntesis de AgNCs y los moles perdidos presentes en el deshecho o filtrado, con lo que se obtiene un rendimiento de síntesis bastante elevado del **92.77 %**.

4.1.3. Caracterización de AgNCs mediante Microscopía electrónica de transmisión de alta resolución

A continuación, se presentan los resultados obtenidos para la caracterización de los nanoclústeres de plata mediante el uso de la Microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HR-TEM). En nuestros experimentos se emplea HR-TEM ya que permite llegar a niveles de resolución mayores que el TEM, generando imágenes de la muestra hasta un nivel de átomos.

En la Figura 10 se observan las imágenes obtenidas por HR-TEM de las muestras de la síntesis de los nanoclústeres de plata.

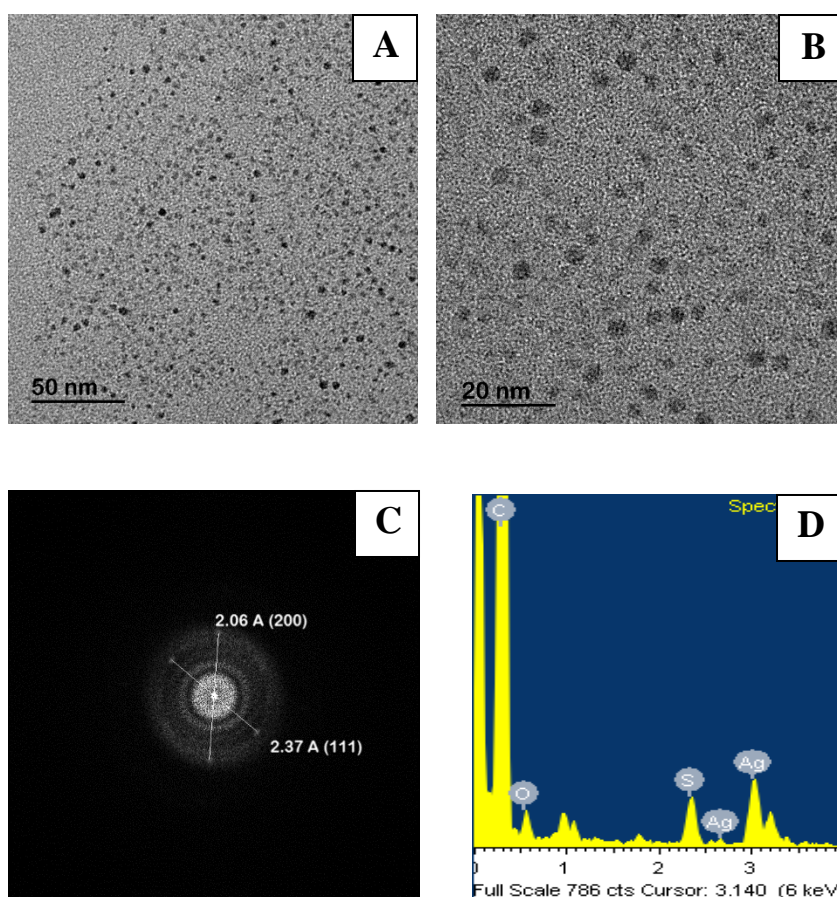


Figura 10. *Imágenes obtenidas por HR-TEM de la síntesis de AgNCs.*

En primer lugar, tanto en la Figura 10 A, como en la 10 B se observa que los nanoclústeres de plata presentan una distribución de tamaños bastante homogénea, con una forma esférica y sin presentar agregados entre ellos. La Figura 10 C es una imagen SAED Pattern, o patrón de difracción de área seleccionada. Se trata de una técnica cristalográfica obtenida a través del TEM, mediante la cual una lámina delgada de muestra se somete a un haz de electrones de alta energía, haciéndolos pasar a través de la muestra fácilmente. De esta manera, los átomos de la muestra actúan como una red de difracción de los electrones con dirección a unos ángulos particulares, lo que proporciona información de la estructura cristalina del material. Por tanto, los AgNCs presentan una estructura cúbica centrada en las caras de los átomos de plata.

Por último, en la Figura 10 D aparecen representados los resultados obtenidos mediante el uso de un detector de difracción de rayos X. En este caso se llevó a cabo el análisis de la muestra con un microanalizador por energía de rayos X dispersados (EDX), permitiendo la cuantificación de los elementos presentes en la muestra. Los elementos mayoritarios que se encontraron en la muestra son el carbono con un 91.67 % perteneciente a las cadenas carbonadas del ligando del NCs y a posible contaminación, oxígeno (0.56 %), azufre (1.54 %) y plata (6.23 %). Todos estos elementos concuerdan con la composición elemental de los AgNCs, siendo el carbono, oxígeno y azufre (enlaces tiol ligando/plata) parte del ligando protector del nanoclúster, y la plata perteneciente al núcleo metálico del mismo, no encontrando impurezas.

Por otro lado, mediante las imágenes obtenidas se realizó una estimación de la distribución de tamaños y del diámetro promedio de los nanoclústeres de plata. Para ello se realizaron 710 medidas del diámetro de los AgNCs obtenidas de diferentes fotografías tomadas con HR-TEM de la misma muestra, obteniendo un valor de tamaño promedio de 2.69 ± 0.77 nm, y una distribución de tamaños representada en la Figura 11.

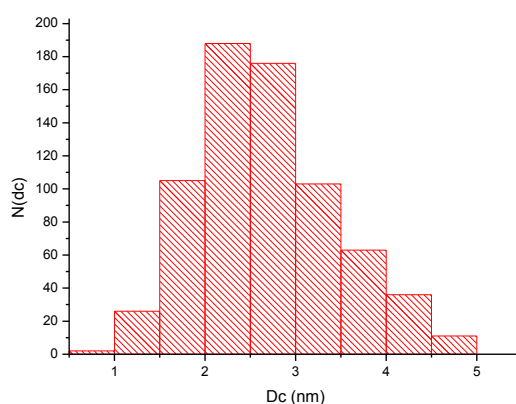


Figura 11. Histograma de la distribución de los diferentes tamaños de los AgNCs [D_c (nm)] y su abundancia [$N(d_c)$].

En la Figura 11 se observa una distribución de tamaños para los AgNCs que oscila entre unos valores de 1-5 nm, teniendo unos diámetros predominantes en torno a los 2-3 nm.

4.1.4. Cálculo de la concentración de AgNCs en disolución

Conociendo el radio experimental de los NCs (1.34 nm) y sabiendo que su estructura cristalina está centrada en las caras, es posible calcular el volumen experimental de AgNCs:

$$Volumen\ experimental = \frac{4 \cdot \pi \cdot 1.34^3}{3} = 7.61\ nm^3$$

y, por tanto, el volumen ocupado por una celda unitaria, conociendo el peso molecular de la plata (197 g/mol), su densidad (10.49 g/cm³) y la masa de una celda unidad (7.16·10⁻²² g/celda):

$$Volumen\ celda\ unitaria = 6.83 \cdot 10^{-23} \frac{cm^3}{celda}$$

A continuación, si se dividen los volúmenes anteriores, se obtiene el número de redes cristalinas que hay en cada AgNCs, obteniendo un valor de 149 redes/NCs. Debido a que una estructura cúbica centrada en las caras posee 4 átomos reales de plata, se puede determinar que cada nanoclúster contiene 596 átomos de plata.

Habiendo calculado el número de átomos de plata por cada NC es posible, mediante el número de Avogadro, determinar los moles de Ag que hay en cada NCs. Una vez se tienen los moles de Ag que hay en cada NCs, junto a los datos de concentración de la Ag obtenidos mediante el análisis de ICP-MS de la muestra de AgNCs purificados, se calcula la concentración de NCs presente en la síntesis (en disolución), obteniendo un valor de concentración de Ag de 0.79 mM. Relacionando el número de moles de Ag que se encuentran en disolución con el número de moles de Ag que hay en cada NCs, se obtiene una concentración final de AgNCs de:

$$7.98 \cdot 10^{14} \frac{NCs}{mL}$$

Una vez calculado el valor de concentración de NCs de plata en disolución es posible realizar la bioconjugación de estos NCs a diferentes biomoléculas, ya que se conocen las relaciones molares de ambos compuestos.

4.1.5. Estudios de estabilidad de AgNCs

Se llevó a cabo el estudio de la estabilidad de la fluorescencia de los AgNCs a lo largo del tiempo en diferentes condiciones de exposición a la luz y en oscuridad, y en diferentes medios de disolución como agua y en disoluciones reguladoras de PBS, BBS y HEPES. Esto último se llevó a cabo llevando al volumen final de síntesis después del proceso de purificación con cada uno de los diferentes medios de disolución.

Estabilidad AgNCs en H₂O con exposición a la luz

Al medir la fluorescencia de la muestra en agua con exposición a la luz solar se observa (ver Figura 5 del ANEXO I) que los nanoclústeres de plata presentan una baja estabilidad perdiendo toda su fluorescencia en menos de un día.

Para determinar de manera más exacta el tiempo que tardan en perder esta fluorescencia se realizó otro estudio de la estabilidad a la luz midiendo la fluorescencia de la muestra cada 10 minutos a lo largo del tiempo representado en la Figura 12 (ver espectros en la Figura 6 del ANEXO I).

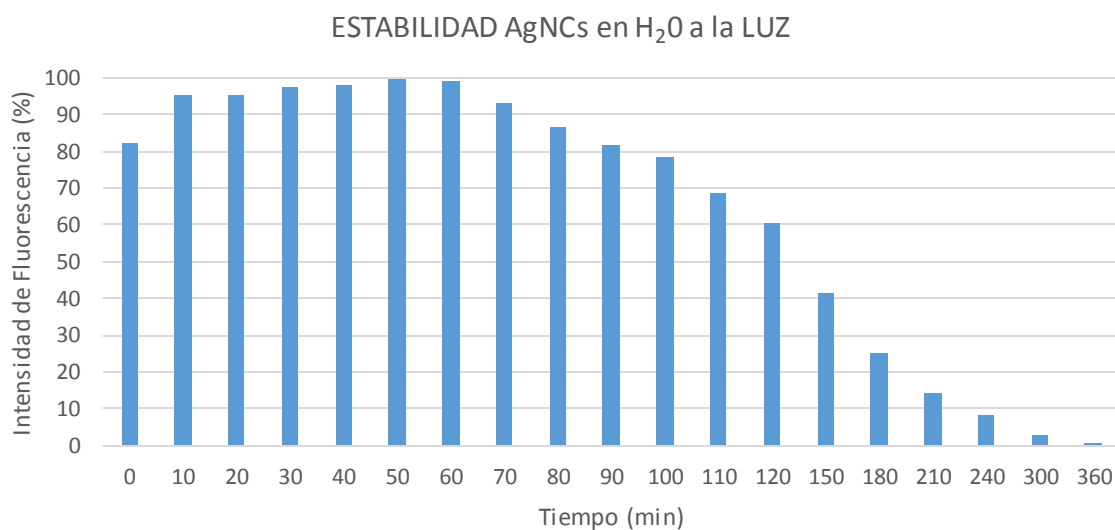


Figura 12. Evolución de la intensidad de fluorescencia emitida a 655 nm de los AgNCs en H₂O con exposición a la luz solar a lo largo del tiempo.

Se observa en la Figura 12 que la fluorescencia medida cada 10 min bajo la exposición a la luz solar permanece estable durante la primera hora de exposición, observándose una caída de la misma hasta valores del 60 %, transcurridas dos horas de exposición. A partir de ese tiempo la fluorescencia decae drásticamente hasta que se pierde completamente a un tiempo de 360 min, es

decir, pasadas 6 horas de exposición de los AgNCs a la luz solar. Esto revela una elevada sensibilidad a la luz de la fluorescencia de los nanoclústeres de plata.

Asimismo, se realizó el estudio de la estabilidad de la emisión fluorescente a lo largo de un tiempo continuado de excitación a 404 nm, en el cual se midió el decaimiento de la intensidad de fluorescencia con una emisión a 655 nm durante 120 min tomando medidas cada 0.5 s (Figura 13).

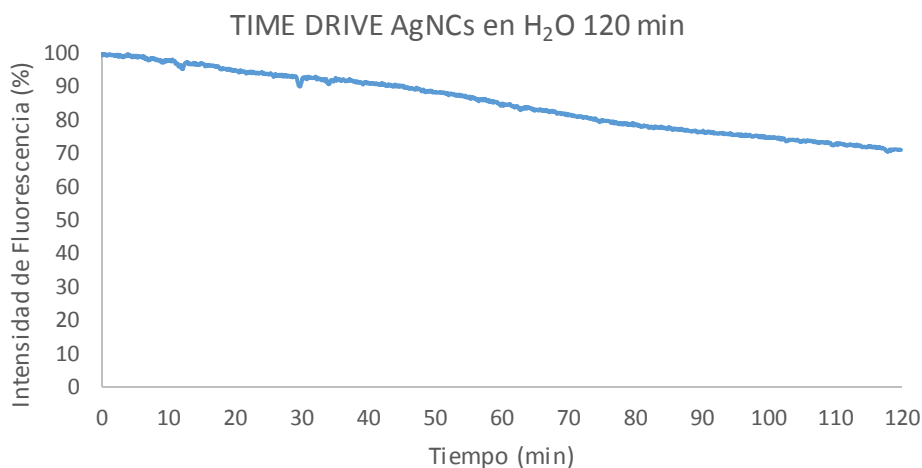


Figura 13. Evolución de la intensidad de fluorescencia emitida a 655 nm por los AgNCs en H₂O a lo largo del tiempo con una excitación constante a 404 nm.

Como se puede observar en la Figura 13, tiene un decaimiento de la intensidad de fluorescencia a lo largo de los 120 min de exposición hasta un valor por encima del 70 % de la intensidad de fluorescencia inicial, lo que indica que, pese a que existe un decaimiento en la intensidad de fluorescencia de los AgNCs debido a la excitación continuada de la muestra, esta mantiene una intensidad elevada por encima del 70 % pasadas dos horas.

Estabilidad AgNCs en agua a oscuridad

Al comprobar que los AgNCs presentan una estabilidad de fluorescencia bastante reducida en presencia de luz se llevó a cabo un estudio de la estabilidad manteniendo la muestra en oscuridad y a temperatura ambiente, realizando medidas cada 24 horas, representado en la Figura 14 (ver espectros en Figura 7 del ANEXO I).

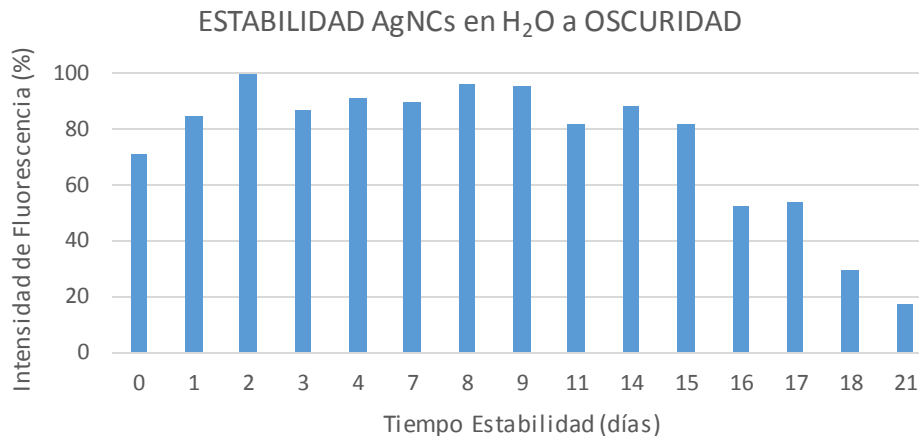


Figura 14. Evolución de la intensidad de fluorescencia emitida a 655 nm de los AgNCs en H₂O en oscuridad a lo largo del tiempo.

Como se observa en la Figura 14, la fluorescencia permanece estable a lo largo del tiempo con valores por encima del 80 % del máximo de fluorescencia registrado durante los primeros 15 días del almacenamiento a oscuridad y a temperatura ambiente. Durante los días posteriores la fluorescencia se ve reducida considerablemente al 50 % pasados 17 días, y por debajo del 20 % de la fluorescencia transcurridos 21 días de almacenamiento.

Estabilidad de AgNCs en diferentes disoluciones reguladoras

Se llevó a cabo el estudio de la estabilidad de la fluorescencia empleando diferentes disoluciones reguladoras PBS, BBS y HEPES. Se midió la estabilidad de igual manera que en el caso del estudio en H₂O: en presencia de luz y almacenados a oscuridad. Se realizó este estudio ya que en etapas posteriores se llevará a cabo la bioconjugación de los AgNCs con anticuerpos para su empleo en inmunoensayos, por lo que es necesario trabajar con disoluciones reguladoras que mantengan un pH estable en el medio próximo al pH fisiológico.

○ Reguladora PBS con exposición a la luz

En primer lugar, se caracterizó la influencia en la estabilidad de la fluorescencia al emplear PBS como disolución reguladora para el almacenamiento de los AgNCs con exposición a la luz (ver Figura 8 en el ANEXO I). De igual manera que ocurría con el almacenamiento de los AgNCs con exposición a la luz solar en agua, la fluorescencia en PBS desaparece antes del primer día.

- Reguladora PBS mantenida en oscuridad

Al comprobar que los AgNCs presentan una estabilidad de fluorescencia bastante reducida en presencia de luz de igual manera que ocurre en el caso del H₂O, se realizó el estudio de la estabilidad manteniendo la muestra en oscuridad y a temperatura ambiente, realizando medidas cada 24 horas, representado en la Figura 15 (ver espectros en Figura 9 del ANEXO I).

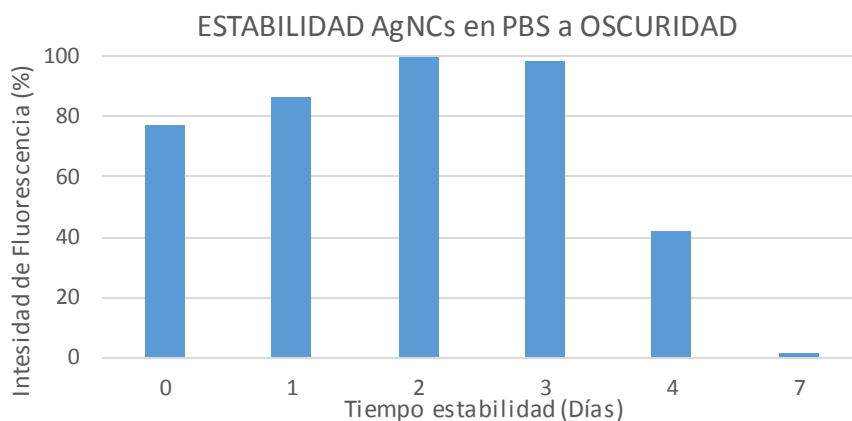


Figura 15. Evolución de la intensidad de fluorescencia emitida a 655 nm de los AgNCs en PBS en oscuridad a lo largo del tiempo.

Como se observa en la Figura 15, la fluorescencia permanece estable a lo largo del tiempo con valores por encima del 80 % del máximo de fluorescencia registrado durante los primeros 3 días del almacenamiento a oscuridad y a temperatura ambiente. A partir del cuarto día de almacenamiento a oscuridad la fluorescencia de los AgNCs en PBS decae bruscamente (un 42 %), hasta llegar a los 7 días de almacenamiento donde la fluorescencia es prácticamente cero. A la vista de los resultados obtenidos, el empleo de PBS como disolución reguladora provoca un empeoramiento de la estabilidad de los AgNCs con respecto al H₂O, por lo que se hace necesaria la búsqueda de otras disoluciones reguladoras que presenten una estabilidad igual o mayor a la que presentan los AgNCs en agua.

- Reguladora BBS a oscuridad

Se realizó el estudio de la estabilidad en BBS manteniendo la muestra en oscuridad y a temperatura ambiente, realizando medidas cada 24 horas, representado en la Figura 16 (ver espectros en Figura 10 del ANEXO I).

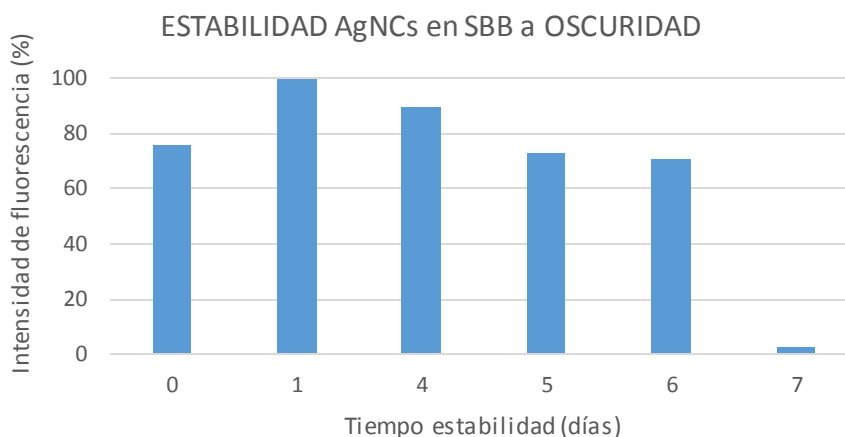


Figura 16. Evolución de la intensidad de fluorescencia emitida a 655 nm de los AgNCs en BBS en oscuridad a lo largo del tiempo.

Como se observa en la Figura 16, la fluorescencia permanece estable a lo largo del tiempo con valores por encima del 80 % del máximo de fluorescencia registrado durante los primeros 4 días del almacenamiento a oscuridad y a temperatura ambiente. A partir del quinto y sexto día de almacenamiento a oscuridad la fluorescencia decae ligeramente en valores por encima del 70 %. Pasados 7 días de almacenamiento la fluorescencia prácticamente desaparece. Cabe destacar que el empleo de BBS como solución reguladora otorga una estabilidad a los AgNCs ligeramente superior (6 días) con respecto a la que presentan en PBS (3 - 4 días). Aun así, los resultados obtenidos de estabilidad continúan muy por debajo de los 15 días de estabilidad que presentan los AgNCs en agua.

- Reguladora HEPES con exposición a la luz

En este caso se caracterizó la influencia en la estabilidad de la fluorescencia al emplear HEPES como disolución reguladora para el almacenamiento de los AgNCs con exposición a la luz, (ver espectros en Figura 11 del ANEXO I) la cual se mantuvo menos de un día. A su vez se realizó otro estudio de la misma clase midiendo durante 8 horas, representado en la Figura 17 (ver espectros en Figura 12 del ANEXO I).

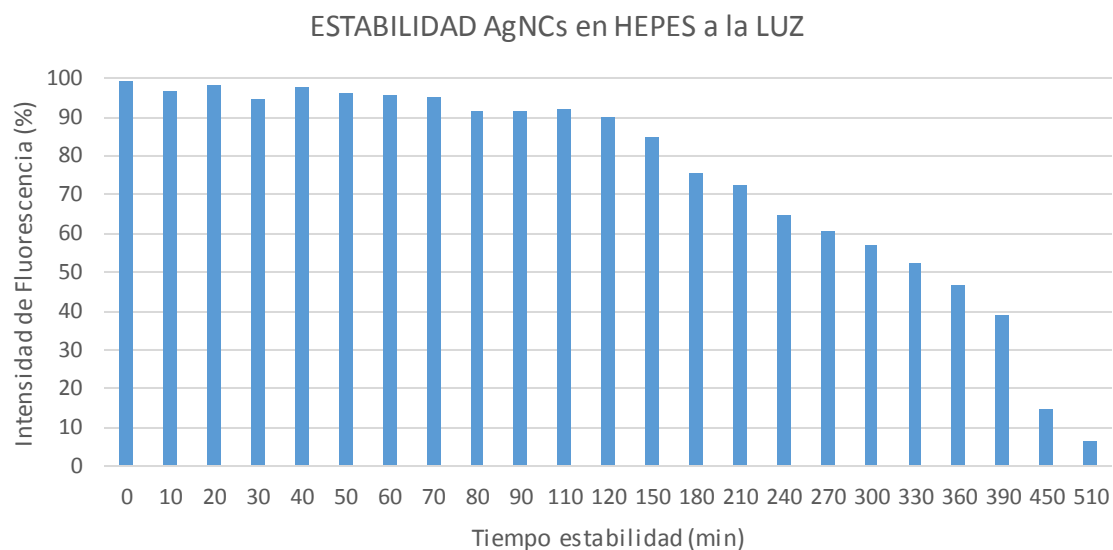


Figura 17. Evolución de la intensidad de fluorescencia emitida a 655 nm de los AgNCs en HEPES con exposición a la luz solar a lo largo del tiempo.

Se observa en la Figura 17 que la fluorescencia medida cada 10 min bajo la exposición a la luz solar permanece estable durante las primeras 2 horas de exposición con valores superiores al 90 % de la fluorescencia máxima medida a lo largo del tiempo. Pasadas estas dos horas, la fluorescencia empieza a decaer ligeramente hasta llegar a unos valores por encima del 50 % al cabo de 5 horas y media (330 minutos) de exposición a la luz. Posteriormente la estabilidad sigue bajando hasta unos valores del 15 % a las 8 horas de medida. Como se puede observar, el empleo de HEPES como medio de disolución para los AgNCs proporciona un incremento en la estabilidad de la fluorescencia en presencia de luz solar con respecto a la estabilidad que presentan los AgNCs en H₂O (Figura 11), ya que estos últimos, pasadas 2 horas su fluorescencia decae por debajo del 50 %, permaneciendo en el caso del HEPES por encima de este valor durante 5 horas y media.

A su vez, se realizó el estudio de la estabilidad de la emisión fluorescente a lo largo de un tiempo continuado de excitación a 404 nm, en el cual se midió el decaimiento de la intensidad de fluorescencia con una emisión a 655 nm durante 120 minutos tomando medidas cada 0.5 segundos (Figura 18).

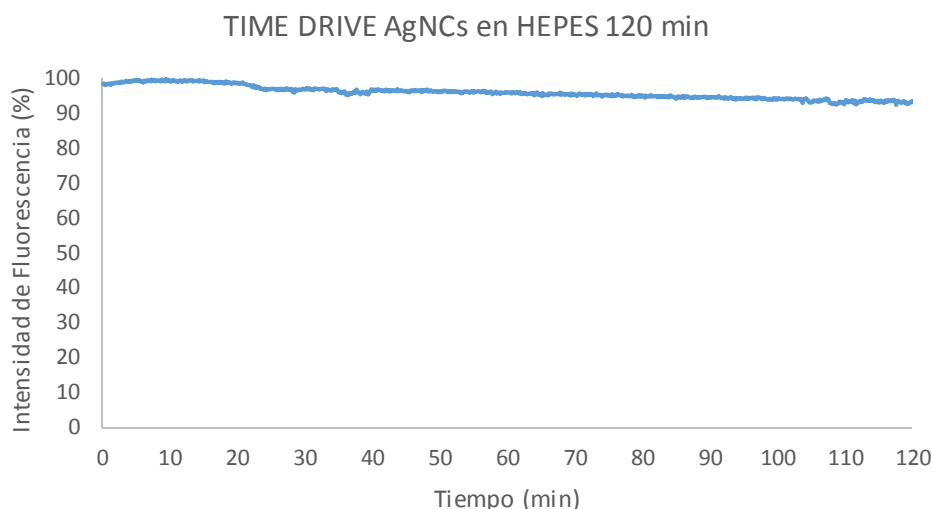


Figura 18. Evolución de la intensidad de fluorescencia emitida a 655 nm por los AgNCs en HEPES a lo largo del tiempo con una excitación constante a 404 nm.

Como se puede observar en la Figura 18, la intensidad de fluorescencia que presentan los AgNCs en HEPES, a lo largo de 120 min de exposición a una longitud de onda fija de 404 nm, se mantiene estable por encima del 93 % de la fluorescencia medida inicialmente. De igual manera que en uso de H₂O como medio de disolución, al aplicar una longitud de onda concreta de 404 nm, los AgNCs se mantienen más estables que ante la exposición continuada a todo el espectro de luz visible. Por otro lado, los AgNCs en HEPES presentan una estabilidad a esta exposición mucho mayor que en H₂O (70 %), ya que la disminución de la fluorescencia en HEPES resulta mínima transcurrido un tiempo de 2 horas.

- Reguladora HEPES a oscuridad

Se llevó a cabo la medida de estabilidad de los AgNCs en disolución reguladora HEPES manteniendo la muestra en oscuridad y a temperatura ambiente, realizando medidas cada 24 horas, representado en la Figura 19 (ver espectros en Figura 13 del ANEXO I).

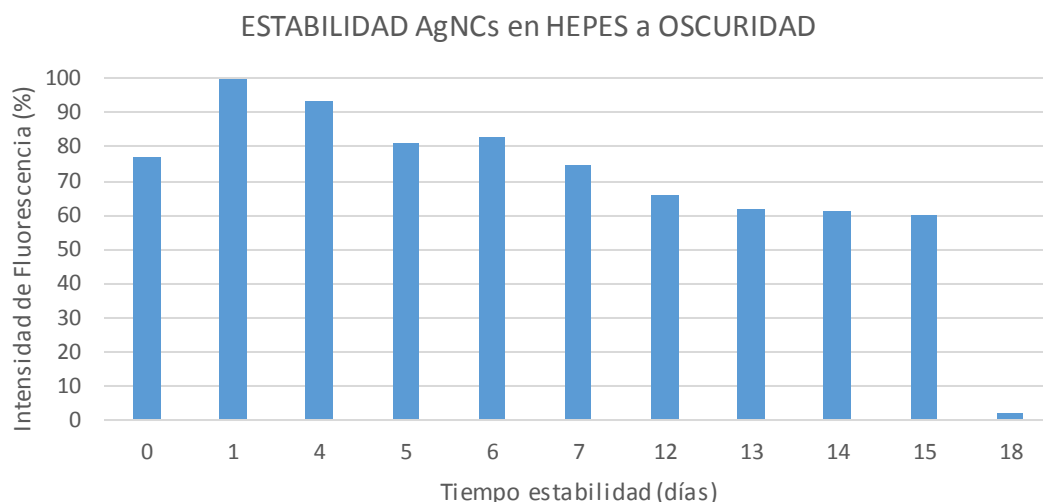


Figura 19. Evolución de la intensidad de fluorescencia emitida a 655 nm de los AgNCs en HEPES en oscuridad a lo largo del tiempo.

Como se observa en la Figura 19, la fluorescencia permanece estable a lo largo del tiempo con valores por encima del 80 % del máximo de fluorescencia registrado durante los primeros 6 días del almacenamiento a oscuridad y a temperatura ambiente. Durante los días posteriores la fluorescencia se reduce levemente a valores superiores al 60 % hasta los 15 días de almacenamiento. Pasados 15 días la fluorescencia decae hasta valores donde resulta prácticamente inapreciable.

Influencia del pH en la estabilidad de AgNCs

A continuación, se llevó a cabo el estudio de la influencia del pH del medio en la estabilidad de fluorescencia de los AgNCs. Este estudio se llevó a cabo modificando el pH de las muestras, ajustándolo mediante el uso de disoluciones diluidas de HCl y NaOH, a unos valores representativos de todo el rango de pH. Los pH estudiados fueron 1.80, 4.00, 7.01, 10.70 y 12.90, para los cuales se midió su fluorescencia, representada en la Figura 20 (ver espectros en Figura 14 del ANEXO I).

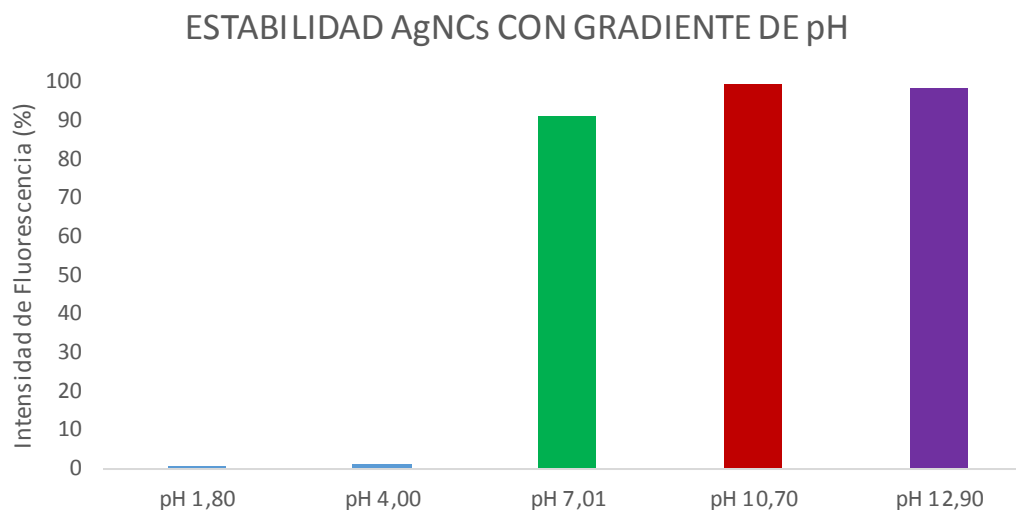


Figura 20. *Influencia del pH en la intensidad de emisión fluorescente de los AgNCs.*

Se puede observar en la Figura 20 que la presencia de pH ácidos provoca una pérdida prácticamente total de la fluorescencia de los AgNCs. Por otro lado, esta fluorescencia se mantiene estable a pH neutro y básico. Se observa una fluorescencia mayor a pH más básicos de 10.70 y 12.90, que en presencia de un pH neutro, aunque esta diferencia resulta bastante leve.

Discusión acerca de la estabilidad de los AgNCs

A lo largo del estudio de estabilidad de los AgNCs en presencia de luz y oscuridad, en diferentes medios y a diferentes pH se puede extraer lo siguiente:

Como se ha visto los AgNCs presentan una elevada sensibilidad a la luz, perdiendo toda su fluorescencia en menos de un día, independientemente del medio en el que se encuentren, ya sea H₂O, PBS, BBS o HEPES. A su vez, se pudo apreciar que el empleo de disolución reguladora HEPES como medio de disolución para los AgNCs incrementa sustancialmente el tiempo que estos permanecen estables a la luz solar con respecto al resto de medios, con valores por encima del 50 % de la fluorescencia máxima durante 5 horas y media.

En el caso de la estabilidad en oscuridad se obtuvieron diferentes resultados para los diferentes medios de disolución, donde tanto la reguladora PBS como el BBS obtenían una estabilidad muy por debajo de la obtenida para el H₂O o el HEPES, en las que se obtuvieron estabilidades similares de hasta 15 días por encima del 60 % de la fluorescencia máxima. Esto puede estar debido a la presencia en PBS y BBS de fosfatos y boratos, respectivamente, los cuales pueden perjudicar a la estabilidad de la unión de los enlaces tiol del ligando con la superficie metálica del nanoclúster.

También se ha observado que la estabilidad de los AgNCs es bastante superior cuando el pH del medio es superior a 7. Esto puede deberse a que, a pH neutro y ácido, el medio se encuentra protonado en mayor medida que a pH básicos. Estos protones pueden interaccionar con los enlaces tiol que unen el ligando con la plata, propiciando la pérdida de este ligando y produciendo la precipitación de la plata. Este fenómeno podría magnificar el efecto negativo de los fosfatos y boratos en el caso de las reguladoras PBS y BBS, ya que éstas se encuentran a un pH fisiológico de 7.4.

4.2. Optimización y caracterización de la bioconjugación

En este apartado se pretende llevar a cabo la bioconjugación de una marca fluorescente, con una biomolécula, de manera que tanto la biomolécula como la marca mantengan su estructura y propiedades iniciales intactas. En concreto, la bioconjugación se lleva a cabo entre AgNCs y un anticuerpo (Anti-MT-III) mediante el método de la carbodiimida, según el procedimiento descrito en la Figura 7 de la sección experimental.

Para optimizar el proceso de bioconjugación, se llevó a cabo la unión con diferentes relaciones molares de anticuerpo y nanoclústeres de plata (Ab:AgNCs) de 1:1, 1:3, 1:5, 1:7, 1:10 y 1:15. En este proceso se optimizaron dos parámetros, en primer lugar se caracterizaron las longitudes de onda de excitación y emisión de fluorescencia del conjugado Ab:AgNCs, así como las intensidades registradas para cada relación molar, y por otro la funcionalidad del anticuerpo después de unirse a estas marcas fluorescentes.

4.2.1. Espectros de excitación/emisión e intensidad de fluorescencia

A continuación se presentan los espectros de excitación y emisión de una de las relaciones molares Ab:AgNCs (1:15) en comparación con los espectros de emisión y excitación de los nanoclústeres de plata sin bioconjugar (Figura 21).

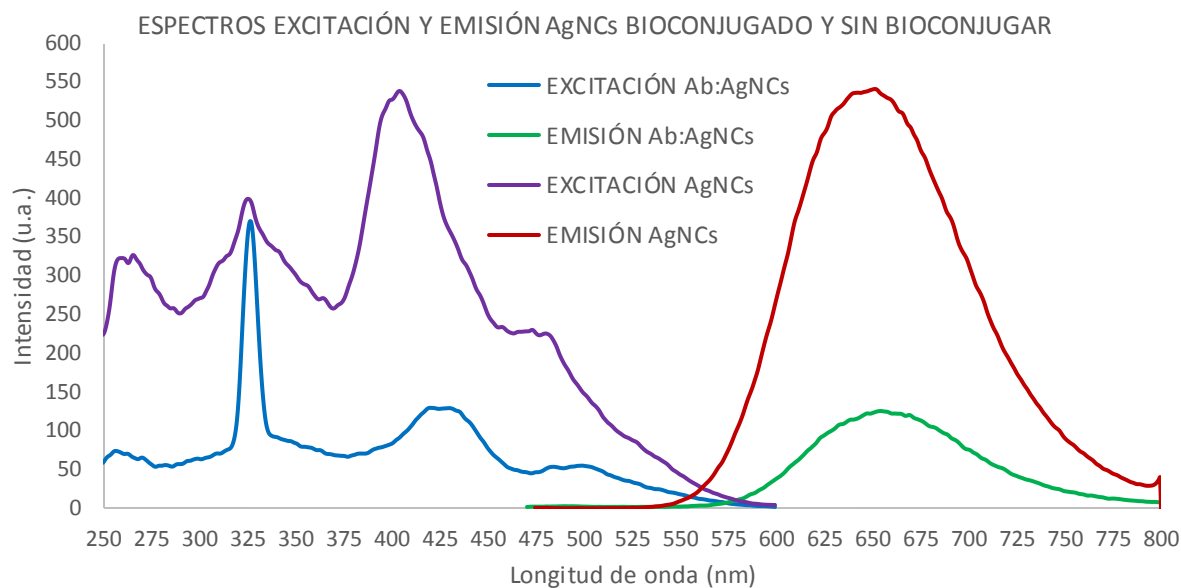


Figura 21. Intensidad medida en unidades de absorbancia de los espectros de excitación y emisión para la relación molar 1:15 del bioconjugado Ab:AgNCs y los AgNCs sin bioconjugar.

En la Figura 21 se puede observar una comparativa de las intensidades obtenidas de los espectros de excitación y emisión para el par conjugado Ab:AgNCs y los AgNCs sin bioconjugar. En primer lugar, cabe destacar la gran diferencia entre las intensidades de fluorescencia tanto en excitación como en emisión del bioconjugado y sin bioconjugar, siendo mayor esta última, debido a que la muestra bioconjugada se encuentra diluida con respecto a la disolución inicial de AgNCs para obtener una disolución final con una concentración de Ab de 10 $\mu\text{g/mL}$.

Con relación al espectro de excitación se observan dos diferencias principales. En primer lugar, se observa un incremento en la intensidad de uno de los picos que presentaban los AgNCs ($\lambda = 330$ nm) con respecto al pico de excitación máximo con una λ_{exc} de 404 nm. Este aumento de la intensidad se debe a la aparición de la banda de dispersión de Rayleigh; ésta no perjudica de ninguna manera al espectro de excitación ya que se encuentra lejos de la λ de excitación empleada en este caso. Por otro lado, los picos máximos de excitación/emisión medidos para el bioconjugado presentan un leve desplazamiento de 404 a 420 nm en excitación, y de 655 a 660 nm en emisión.

Una vez optimizados los máximos de excitación y emisión ($\lambda_{\text{exc}} = 420$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 660$ nm) del bioconjugado Ab:AgNCs se procede a evaluar la intensidad de fluorescencia medida para cada una de las diferentes relaciones molares seleccionadas. En la Figura 22 se observan las intensidades de fluorescencia medidas para cada una de las diferentes relaciones molares Ab:AgNCs 1:1, 1:3, 1:5, 1:7, 1:10 y 1:15 (ver espectros en Figura 15 del ANEXO I).

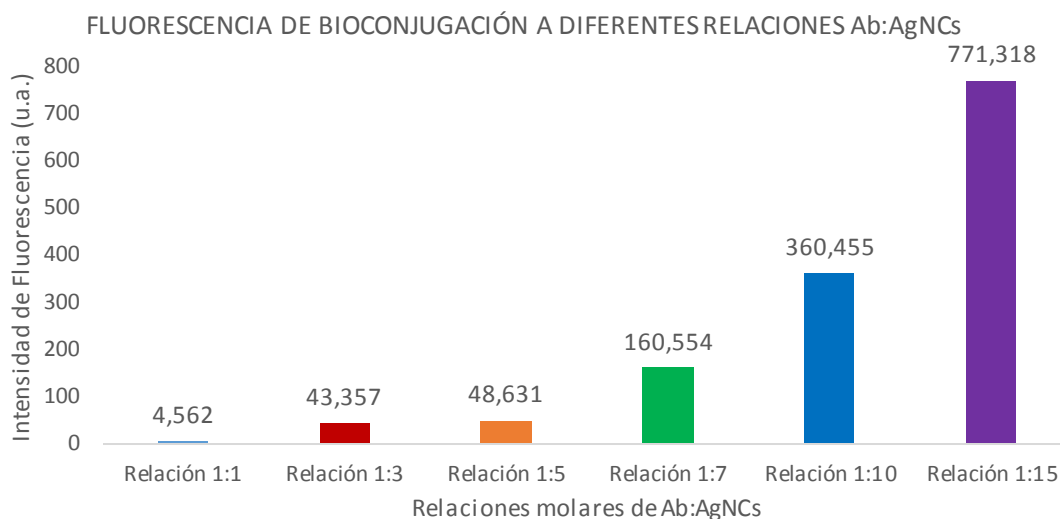


Figura 22. Relación de la intensidad de fluorescencia medida para las diferentes relaciones molares del bioconjugado Ab:AgNCs.

Se aprecia un aumento de la intensidad de fluorescencia con relación al incremento en la relación molar Ab:AgNCs. Es decir, la intensidad de fluorescencia aumenta consecuentemente ya que en cada una de las relaciones molares la cantidad de AgNCs aumenta, obteniendo una fluorescencia máxima para una relación molar Ab:AgNCs de 1:15. En el caso de una relación 1:1 de anticuerpo y AgNCs se observa una intensidad de fluorescencia muy baja, por lo que esta relación molar no podría ser usada en un inmunoensayo.

No obstante, es necesario realizar un ensayo con el que poder evaluar la funcionalidad del anticuerpo respecto a las diferentes concentraciones de AgNCs a las que se encuentra bioconjugado, ya que pese a que la relación 1:15 presenta una fluorescencia muy elevada, el anticuerpo puede quedar impedido debido a la alta cantidad de nanoclústeres que se unen, interaccionando con posibles zonas funcionales del anticuerpo. Para ello se lleva a cabo el siguiente inmunoensayo espectrofotométrico.

4.2.2. Inmunoensayo espectrofotométrico en placa ELISA

Como se ha explicado anteriormente, este tipo de ensayo se emplea para evaluar la funcionalidad del anticuerpo bioconjugado a diferentes relaciones molares de Ab:AgNCs, ya que, al añadir concentraciones muy elevadas de AgNCs, es posible que estos ocupen zonas de reconocimiento del anticuerpo, provocando una reducción considerable de la capacidad del mismo de reconocer a su antígeno específico, reduciendo su funcionalidad. En el apartado anterior se obtuvo una señal de fluorescencia máxima para la relación Ab:AgNCs de 1:15, pese a ello, para estudiar la funcionalidad del anticuerpo ante la presencia de diferentes concentraciones de AgNCs se decidió escoger unas relaciones molares de 1:5, 1:7 y 1:10, que también poseen una buena señal de

fluorescencia, excluyendo 1:15, ya que muy probablemente una concentración tan elevada de AgNCs provoque una gran reducción de la funcionalidad del anticuerpo.

Por ello, se lleva a cabo el inmunoensayo espectrofotométrico en placa ELISA, empleando como revelado de la reacción un anticuerpo secundario marcado con peroxidasa (HRP), una enzima que provoca la coloración de la muestra. Esta enzima, en presencia de agua oxigenada y un sustrato adecuado, TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina), se reduce produciendo un producto coloreado (azul). Finalmente se añade una disolución de parada (H_2SO_4 2M) que detiene la reacción provocando un cambio de color (amarillo), como se aprecia en la Figura 23, realizando entonces la medida de absorbancia a 450 nm en un lector de placas de absorbancia.

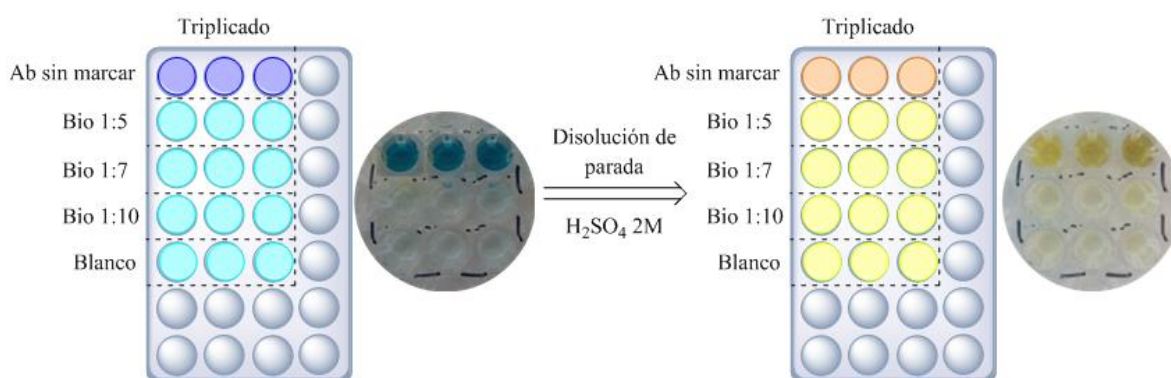


Figura 23. Esquema del procedimiento empleado en el inmunoensayo espectrofotométrico.

Como se observa en la Figura 23, se llevó a cabo el estudio con las diferentes concentraciones antes citadas, junto con una medida del Ab sin marcar, a la misma concentración que el resto de relaciones, y por último un blanco, el cual no contiene el anticuerpo primario (Anti-MT-III) marcado con los AgNCs. Todas las medidas se realizaron por triplicado. Los resultados de absorbancia obtenidos se recogen en la Tabla 5.

Tabla 5. Resultados de absorbancia del Inmunoensayo Espectrofotométrico.

	Absorbancia	
Ab sin marcar	2.27	± 0.18
Bioconjugación 1:5	0.10	± 0.05
Bioconjugación 1:7	0.10	± 0.04
Bioconjugación 1:10	0.09	± 0.02

La aparición de una señal coloreada más intensa, o lo que es lo mismo, una señal de absorbancia más elevada, implica que una mayor cantidad de anticuerpo secundario marcado con peroxidasa es capaz de unirse al Ab bioconjugado, dándose en mayor medida la reacción enzimática

y por tanto obteniendo una mayor señal colorimétrica. Es decir, valores elevados de absorbancia implican una alta funcionalidad del anticuerpo.

Para los resultados obtenidos recogidos en la Tabla 5, se observa una señal máxima de absorbancia para el anticuerpo sin marcar, por lo que se considera este valor como el máximo de funcionalidad de nuestro anticuerpo. Respecto a las señales de absorbancia obtenidas para las diferentes relaciones molares Ab:AgNCs, cabe destacar que todas presentan una señal considerablemente baja, lo que implica que para todas ellas la concentración de AgNCs es muy elevada, provocando que éstos se unan por todo el anticuerpo ocupando sus zonas de reconocimiento, provocando que su funcionalidad se vea reducida. Entre todas las medidas, la relación 1:10 da lugar a los valores más bajos, seguida de la relación 1:7 y 1:5, que producen valores similares. Estos resultados tienen sentido ya que a mayores concentraciones de AgNCs el anticuerpo encuentra más impedida su habilidad para unirse al anticuerpo secundario.

Debido a que se obtienen unos valores de funcionalidad similares para las relaciones 1:5 y 1:7, se llevó a cabo un estudio para medir la intensidad fluorescente de cada uno de los bioconjugados, mediante el análisis por microscopía láser confocal. Para llevar a cabo este estudio se utilizó un portaobjetos de uso convencional en microscopía óptica recubierto con poli-L-lisina, en el cual se añadieron las diferentes relaciones de Ab:AgNCs (1:3, 1:5, 1:7, 1:10), con una concentración de anticuerpo marcado de 10 $\mu\text{g/mL}$, por duplicado y con un exceso de EDC para provocar su adsorción sobre la superficie del portaobjetos (Figura 24).

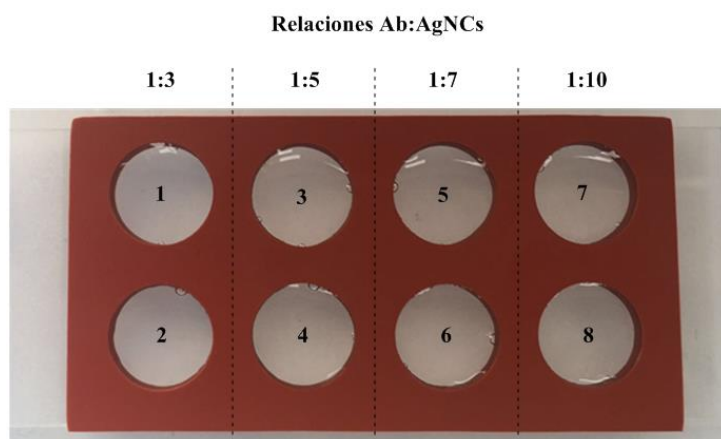


Figura 24. Portaobjetos donde se observa la posición de las diferentes relaciones molares de Ab:AgNCs.

Una vez fijadas las diferentes relaciones de bioconjugado al portaobjetos se procede a medir mediante microscopía láser confocal. En la Figura 25 se observan las imágenes obtenidas para las

posiciones o “pocillos” 1, 3, 5 y 7, representadas en la Figura 24. Las imágenes del resto de posiciones pueden consultarse en la Figura 16 del ANEXO I.

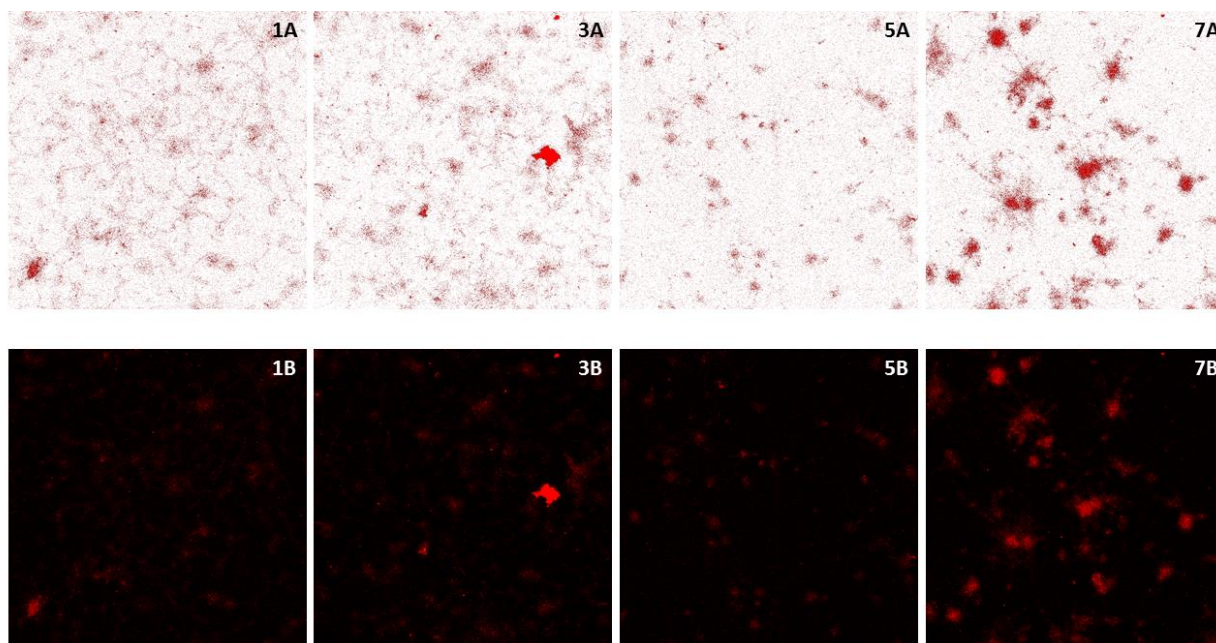


Figura 25. *Imágenes obtenidas por microscopía láser confocal para las diferentes relaciones molares (Ab:AgNCs) de bioconjugado. 1A) Relación 1:3 sin fondo. 1B) Relación 1:3 con fondo. 3A) Relación 1:5 sin fondo. 3B) Relación 1:5 con fondo. 5A) Relación 1:7 sin fondo. 5B) Relación 1:7 con fondo. 7A) Relación 1:10 sin fondo. 7B) Relación 1:10 con fondo.*

Para poder apreciar mejor la distribución e intensidad de fluorescencia para cada relación Ab:AgNCs se trataron las imágenes obtenidas en el microscopio confocal (Figura 25 - 1B, 3B, 5B y 7B) quitándoles el fondo (fondo blanco) (Figura 25 - 1A, 3A, 5A y 7A). Por tanto, se extrae la siguiente información de la comparación de todas las fotos obtenidas.

En primer lugar, en las imágenes con fondo se observa una clara diferencia de intensidad de fluorescencia entre la relación 1:3 (Figura 25 - 1B) y la relación 1:10 (Figura 25 - 7B), presentando esta última una intensidad mayor que el resto. Las relaciones 1:5 y 1:7 (Figura 25 - 3B y 5B, respectivamente) presentan una intensidad de fluorescencia intermedia y muy similar, situada entre las relaciones 1:3 y 1:10.

No obstante, al observar las imágenes sin fondo (Figura 25 - 1A, 3A, 5A y 7A), es cuando se pueden observar mejor las diferencias entre las diferentes muestras. A relaciones mayores (1:10), observamos como el bioconjugado marcado se distribuye formando agregados en zonas concretas del portaobjetos. Según disminuimos a relaciones molares más bajas (1:7, 1:5 y 1:3), a la vez que observamos una disminución en la intensidad de fluorescencia, también se observa como el

bioconjugado se redistribuye mejor por todo el portaobjetos, mostrando un fondo fluorescente más homogéneo.

Por tanto, al comparar la distribución de las relaciones de bioconjugado 1:5 y 1:7 (Figura 25 - 3A y 5A), ante una igualdad en cuanto a su intensidad de fluorescencia, el bioconjugado 1:5 presenta una distribución mucho más homogénea y con menos agregados que en el caso de la relación 1:7. Por todo ello, se escoge una relación molar de bioconjugado 1:5 para llevar a cabo un inmunoensayo competitivo para la detección de Metalotioneina III.

4.3. Inmunoensayo competitivo para la determinación de MT-III

La determinación de MT-III es importante ya que, como se ha explicado en la introducción, constituye un papel importante como biomarcador de la existencia de un estrés oxidativo celular elevado, relacionando su sobreexpresión directamente con la enfermedad de Alzheimer [33].

Por tanto, se evaluó la posibilidad de la aplicación de los AgNCs como marca fluorescente en la detección de MT-III mediante un inmunoensayo de tipo competitivo. De esta manera, se procedió tapizando en un portaobjetos con 8 pocillos diferentes (Figura 26) una misma concentración de MT-III (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) seguido de etapas sucesivas de bloqueo y lavado (ver procedimiento experimental). A continuación, para llevar a cabo el ensayo competitivo se prepararon diferentes disoluciones con una concentración fija del bioconjugado 1:5 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y concentraciones variables de proteína MT-III de 0, 10, 100 y 1000 ng/mL. Estas medidas se realizaron por duplicado.

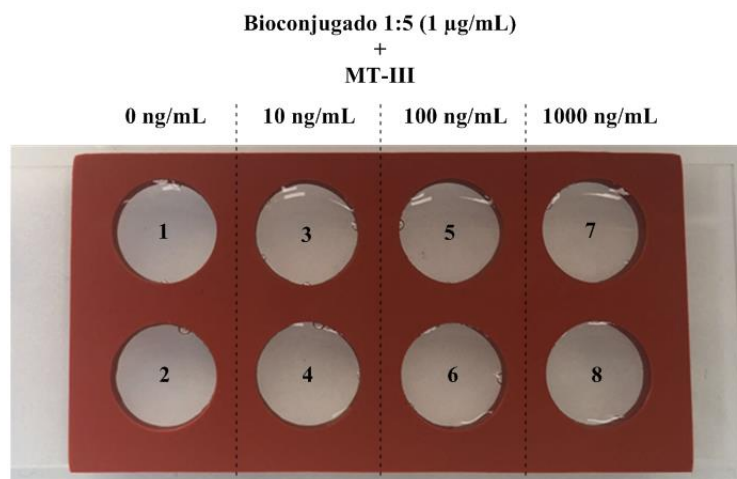


Figura 26. Portaobjetos donde se observa la posición de las diferentes relaciones Bioconjugado:MT-III.

De esta manera, se hace competir el bioconjugado Ab:AgNCs unido a las diferentes concentraciones de MT-III, con la MT-III a concentración constante fijada en cada uno de los pocillos del portaobjetos, obteniendo hipotéticamente, mediante su análisis por microscopía láser confocal, una mayor señal fluorescente en muestras donde la concentración de proteína adicionada es menor, ya que habría más bioconjugado libre capaz de unirse a la MT-III fijada en la placa del portaobjetos. Tanto la concentración constante de MT-III fijada a cada uno de los pocillos, como la concentración máxima adicionada de MT-III deben ser iguales, tanto entre ellas (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) como a la concentración de anticuerpo bioconjugado utilizada para que el ensayo competitivo se realice correctamente. A su vez, se realizó un blanco al cual no se le añadió anticuerpo bioconjugado con marca fluorescente.

A continuación, en la Tabla 6 se exponen los valores de intensidad obtenidos para cada una de las diferentes concentraciones de MT-III adicionadas (0, 10, 100 y 1000 ng/mL). Las imágenes obtenidas, a partir de las cuales se calculó la intensidad de fluorescencia para cada uno de los pocillos, se pueden consultar en la Figura 17 del ANEXO I.

Tabla 6. Valores de intensidad de AgNCs bioconjugados obtenidos en las diferentes imágenes del confocal.

Posición	Intensidad	Concentración MT-III (ng/mL)
Pocillo 1	7577	0
Pocillo 3	7063	10
Pocillo 6	5103	100
Pocillo 8	4616	1000

Como se puede apreciar en la Tabla 6, se consigue la tendencia esperada donde la intensidad de fluorescencia medida disminuye cuanto mayor es la cantidad de MT-III adicionada junto al bioconjugado. De esta forma, al representar los valores obtenidos en el inmunoensayo competitivo (Figura 27), se obtiene una curva de tipo sigmoïdal típica de este tipo de ensayos.

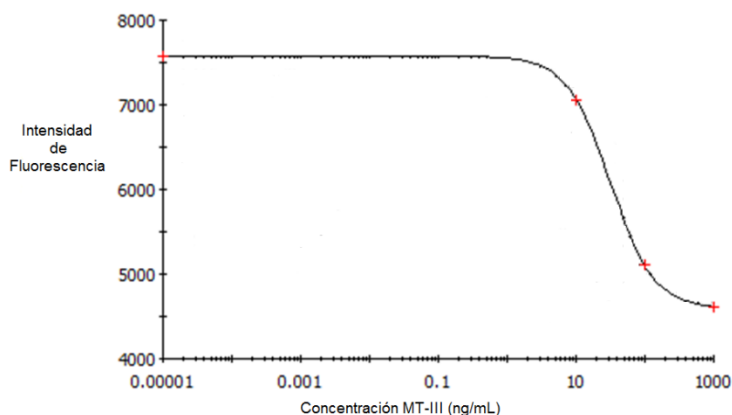


Figura 27. Curva de calibrado obtenida para el inmunoensayo competitivo.



Una vez obtenida la curva de la Figura 27, el siguiente paso sería determinar los límites del intervalo lineal de dicha curva, marcando los valores de fluorescencia máximos, en el caso de no tener analito en la muestra, y mínimos, para una concentración de analito infinitamente grande, entre los que sería posible establecer una recta de calibrado con la que determinar, mediante interpolación, la concentración de MT-III en tejidos de concentración desconocida. Aun así, los puntos resultantes en este caso resultan insuficientes, ya que se realizó una prueba a nivel preliminar de un número limitado de concentraciones, por lo que sería necesario llevar a cabo la medida de un rango más amplio de concentraciones de MT-III con un mayor número de medidas que se encuentren dentro del intervalo lineal de la recta.

Por otro lado, pese a que los resultados del inmunoensayo competitivo son coherentes, hay que destacar que la intensidad de fluorescencia obtenida para todas las muestras es muy baja, ya que en las imágenes realizadas con el microscopio confocal (ver Figura 17 ANEXO I) ésta resulta difícil de apreciar. Esta fluorescencia tan baja puede deberse a que, con respecto al ensayo realizado, en el que se midieron las diferentes relaciones de bioconjugado por microscopía confocal (Figura 25), donde se observa una buena señal de fluorescencia para la relación de bioconjugado 1:5, la concentración del anticuerpo era mayor (10 $\mu\text{g/mL}$) a la utilizada en este caso (1 $\mu\text{g/mL}$). La concentración fue más baja en este caso ya que se trata de un anticuerpo caro cuya disponibilidad en el laboratorio era limitada, por lo que en las últimas etapas de este trabajo no fue posible emplear concentraciones mayores.



5. CONCLUSIONES

A continuación se recogen las principales conclusiones del trabajo:

- 1) Se sintetizaron Nanoclústeres de plata de forma satisfactoria. La caracterización luminiscente mostró una intensidad fluorescente bastante elevada, con una longitud de onda óptima de excitación y emisión de 404 y 655 nm respectivamente, y un rendimiento cuántico de fluorescencia del 1.36%.
- 2) Se llevó a cabo la caracterización de la morfología de los AgNCs mediante HR-TEM, de donde se obtuvo una distribución de tamaños bastante homogénea con un diámetro promedio de 2.69 ± 0.77 nm. Junto a este valor, y gracias al análisis mediante ICP-MS de la concentración de plata presente en la síntesis, fue posible determinar el rendimiento de síntesis (con un valor muy elevado del 92.77%) y la concentración de AgNCs en disolución ($7.98 \cdot 10^{14}$ NCs/mL).
- 3) De los estudios de estabilidad cabe destacar que, independientemente del medio de disolución en el que éstos se encuentren, los AgNCs poseen una sensibilidad a la luz muy elevada, llegando a las 5.5 horas a la mitad de su fluorescencia inicial, en el caso de encontrarse en disolución reguladora HEPES. Esto hace necesario su almacenamiento a oscuridad, donde se pudo comprobar que mantenían una buena señal fluorescente. Esta señal se mantuvo por encima de la mitad de la fluorescencia inicial durante un máximo de 15 días, igualmente en disolución reguladora HEPES y en H₂O. Otro de los parámetros influyentes en la estabilidad de la fluorescencia de los AgNCs es el pH, observándose una disminución de la intensidad de emisión fluorescente a pH ácido y neutro, con respecto a pH más básicos, siendo especialmente drástica la pérdida de fluorescencia a pH ácido, donde desaparece por completo.
- 4) En la caracterización mediante fluorescencia de la bioconjugación de los AgNCs con el anticuerpo, se obtuvo una relación molar óptima Anticuerpo:Nanoclúster de 1:5, para la que se mantenían unos valores, tanto de fluorescencia de los AgNCS como de funcionalidad del anticuerpo, aceptables en comparación al resto de relaciones molares estudiadas.
- 5) Por último, y en relación a los estudios preliminares realizados para el desarrollo de un inmunoensayo competitivo fluorescente basado en el uso de AgNCs para la detección de MT-III, se obtuvieron resultados prometedores mediante microscopía confocal, que harían posible su aplicación a la detección de diferentes concentraciones de MT-III en tejidos biológicos.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Schmid, G. (2004). Nanoparticles from theory to application. Chapter 1: General Introduction, Ed. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Alemania, 2004.
- [2] Carrillo Carrión, C. (2011). Aportaciones de los puntos cuánticos a la nanociencia y nanotecnología analítica. Tesis Doctoral, Universidad de Córdoba.
- [3] Feynman, R.P. (1960). There's plenty of room at the bottom. Caltech Engineering and Science, 23, 5, 22-36.
- [4] Bhushan, B. (2004). Springer handbook of nanotechnology / Bharat Bhushan (ed.). Berlin [etc.]: Springer-Verlag.
- [5] Trapiella Alfonso, L. (2013). Síntesis y evaluación de nanomateriales metálicos fluorescentes como marcadores en el desarrollo de inmunoensayos. Tesis Doctoral, Universidad de Oviedo.
- [6] Jiménez Lamana, J. (2013). Nanometrología analítica: Métodos analíticos para la detección, caracterización y cuantificación de nanopartículas sintéticas. Tesis Doctoral, Universidad de Zaragoza.
- [7] Aitkenrj, Creelyks, Trancl. Nanoparticles: an occupational hygiene review. Research Report 274, UK Health and Safety Executive www.hse.gov.uk/research/rrhtm/rr274.htm.
- [8] Cronejo, L. (2015). Clasificación nanomateriales. Nuevas Tecnologías y Materiales. Accesible en: <http://nuevastecnologiasmateriales.com/clasificacion-de-los-nano-materiales/> [Consultado 19 Junio 2016].
- [9] Zahmakiran, M. & Özkaz, S. (2011). Metal nanoparticles in liquid phase catalysis; from recent advances to future goals. Nanoscale, 3(9), p.3462.
- [10] Lin, P. C., Lin, S., Wang, P. C. & Sridhar, R. (2014). Techniques for physicochemical characterization of nanomaterials. Biotechnology Advances, 32(4), 711–726.
- [11] Zheng, J., Nicovich, P. & Dickson, R. (2007). Highly Fluorescent Noble-Metal Quantum Dots. Annual Review of Physical Chemistry, 58(1), pp.409-431.
- [12] Kreibig, U. & Vollmer, M. (1995). Optical properties of metal clusters. Berlin: Springer.
- [13] Lu, Y. & Chen, W. (2012). Sub-nanometre sized metal clusters: from synthetic challenges to the unique property discoveries. Chemical Society Reviews, 41(9), 3594–3623.
- [14] Shang, L., Dong, S. & Nienhaus, G. (2011). Ultra-small fluorescent metal nanoclusters: Synthesis and biological applications. Nano Today, 6(4), pp.401-418.



- [15] Yuan, X., Luo, Z., Zhang, Q., Zhang, X., Zheng, Y., Lee, J. Y. & Xie, J. (2011). Synthesis of highly fluorescent metal (Ag, Au, Pt, and Cu) nanoclusters by electrostatically induced reversible phase transfer. *ACS Nano*, 5(11), 8800–8808.
- [16] Choi, S., Dickson, R. M. & Yu, J. (2012). Developing luminescent silver nanodots for biological applications. *Chemical Society Reviews*, 41(5), 1867–1891.
- [17] Huang, T. & Murray, R. W. (2001). Visible luminescence of water-soluble monolayer-protected gold clusters. *Journal of Physical Chemistry B*, 105(50), 12498–12502.
- [18] Huang, T. & Murray, R. W. (2003). Luminescence of tiopronin monolayer-protected silver clusters changes to that of gold clusters upon galvanic core metal exchange. *J. Phys. Chem. B.*, 107, 7434–7440.
- [19] Link, S., Beeby, A., FitzGerald, S., El-Sayed, M. A., Schaaff, T. G. & Whetten, R. L. (2002). Visible to infrared luminescence from a 28-atom gold cluster. *Journal of Physical Chemistry B*, 106(13), 3410–3415.
- [20] Huang, C. C., Hung, Y. L., Shiang, Y. C., Lin, T. Y., Lin, Y. S., Chen, C. T. & Chang, H. T. (2010). Photoassisted synthesis of luminescent mannose-Au nanodots for the detection of thyroglobulin in serum. *Chemistry - An Asian Journal*, 5(2), 334–341.
- [21] Wu, Z. & Jin, R. (2010). On the ligand's role in the fluorescence of gold nanoclusters. *Nano Letters*, 10(7), 2568–2573.
- [22] Sun, H. H.-T. & Sakka, Y. (2014). Luminescent metal nanoclusters: controlled synthesis and functional applications. *Science and Technology of Advanced Materials*, 15(1), 014205.
- [23] Zhang, L. & Wang, E. (2014). Metal nanoclusters: New fluorescent probes for sensors and bioimaging. *Nano Today*, 9(1), 132–157.
- [24] Adhikari, B. & Banerjee, A. (2010). Facile synthesis of water-soluble fluorescent silver nanoclusters and HgII sensing. *Chemistry of Materials*, 22(15), 4364–4371.
- [25] Díez, I. & Ras, R. (2011). Fluorescent silver nanoclusters. *Nanoscale*, 3(5), p.1963.
- [26] Mikkelsen, S.R. & Cortón, E. (2004). “Capítulo 5: Antibodies”. *Bioanalytical Chemistry*. John Wiley & Sons, Inc., United States, 86-98.
- [27] Mikkelsen, S.R. & Cortón, E. (2004). “Capítulo 6: Quantitative immunoassays with labels”. *Bioanalytical Chemistry*, John Wiley & Sons, Inc. United States, 99-127.
- [28] Feldkamp, C.S. & Carey, J.L. (1996). “Capítulo 2: Immune function and antibody structure”. *Immunoassay*. Academic Press, Inc. United States, 5-23.



- [29] Ishikawa, E. (1996). “Capítulo 8: Labeling of antibodies and antigens”. *Immunoassay*. Academic Press, Inc. United States, 191-204.
- [30] Chard, T. (1996). “Capítulo 12: Radioimmunoassay”. *Immunoassay*. Academic Press, Inc. United States, 270-284.
- [31] Gosling, J.P. (1996). “Capítulo 13: Enzyme immunoassay”. *Immunoassay*. Academic Press, Inc. United States, 287-305.
- [32] Christopoulos, T.K. & Diamandis, E.P. (1996). “Capítulo 14: Fluorescence immunoassays”. *Immunoassay*. Academic Press, Inc. United States, 309-333.
- [33] Ju, D. (2014). Aspectos funcionales de la metalotioneína en el sistema nervioso central, 19(1), 34-41.
- [34] Hidalgo, J. & Carrasco, J. (1998). Regulation of the synthesis of brain metallothioneins. *NeuroToxicology*, 19(4-5), 661-666.
- [35] Penkowa, M., Giralt, M. & Thomsen, P. S. (2000). The Zinc or copper deficiency-induce impaired inflammatory response to brain trauma may be caused by the concomitant metallothionein changes, 18(4), 447-464.
- [36] Thirumoorthy, N., Shyam Sunder, a, Manisenthil Kumar, K., Senthil Kumar, M., Ganesh, G., & Chatterjee, M. (2011). A review of Metallothionein isoforms and their role in pathophysiology. *World Journal of Surgical Oncology*, 9(1), 54.
- [37] Hermanson, G. T. (2013). “Capítulo 1: Functional Targets” y “Capítulo 2: The Chemistry of Reactive Groups”. *Bioconjugate techniques*. Academic Press, Londres. 1-125, 127-228.
- [38] Procedimiento para inmunoensayo espectrofotométrico, con etapa de revelado con el TMB Substrate Kit. Accesible en: <http://www.piercenet.com/instructions/2160204.pdf> [Consultado 19 Junio 2016]
- [39] Trapiella-Alfonso, L., Costa-Fernández, J. M., Pereiro, R. & Sanz-Medel, A. (2011). Development of a quantum dot-based fluorescent immunoassay for progesterone determination in bovine milk. *Biosensors and Bioelectronics*, 26, 12, 4753-4759.
- [40] Williams, A. T. R., Winfield, S. A. & Miller, J. N. (1983). Relative fluorescence quantum yields using a computer controlled luminescence spectrometer, *Analyst*, 108, 1067.

ANEXO I

FIGURAS

Caracterización por fluorescencia

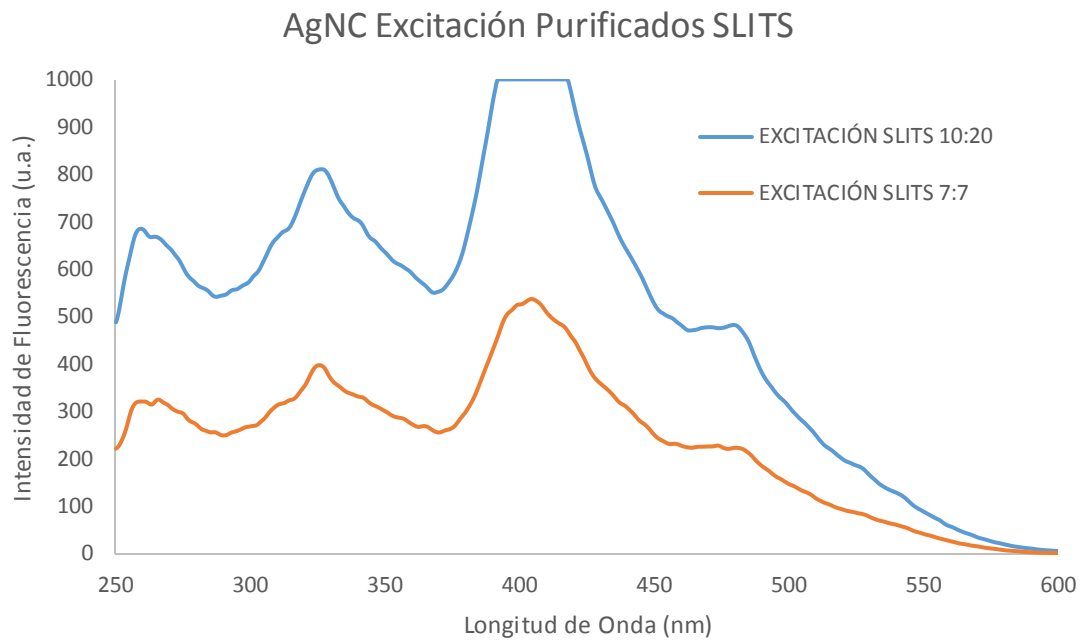


Figura 1. Anexo I. Espectros de excitación AgNCs purificados con diferentes “slits”.

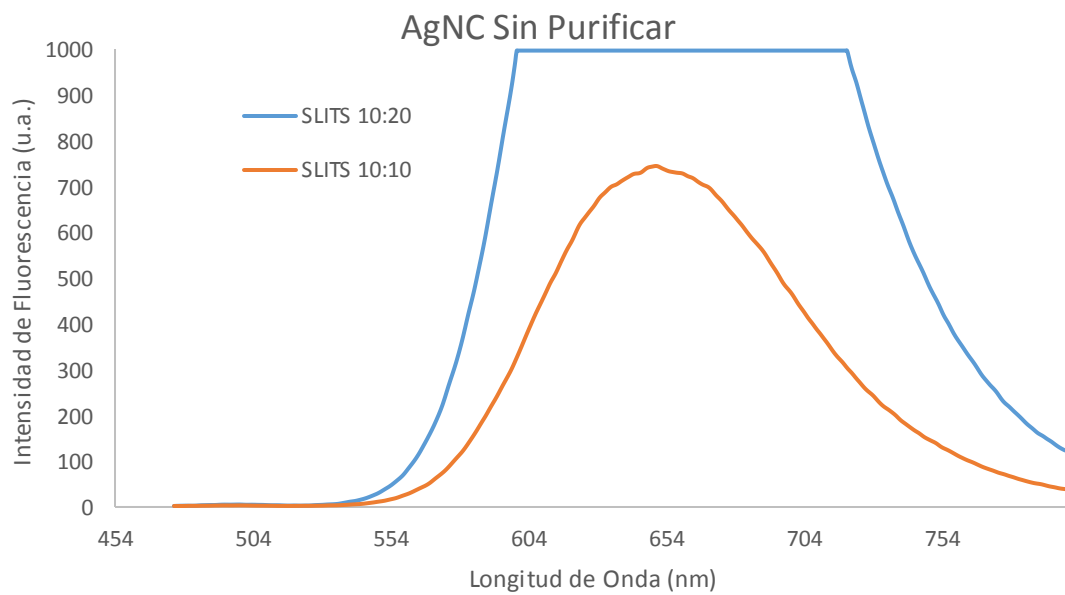


Figura 2. Anexo I. Espectros de emisión AgNCs sin purificar con diferentes “slits”.

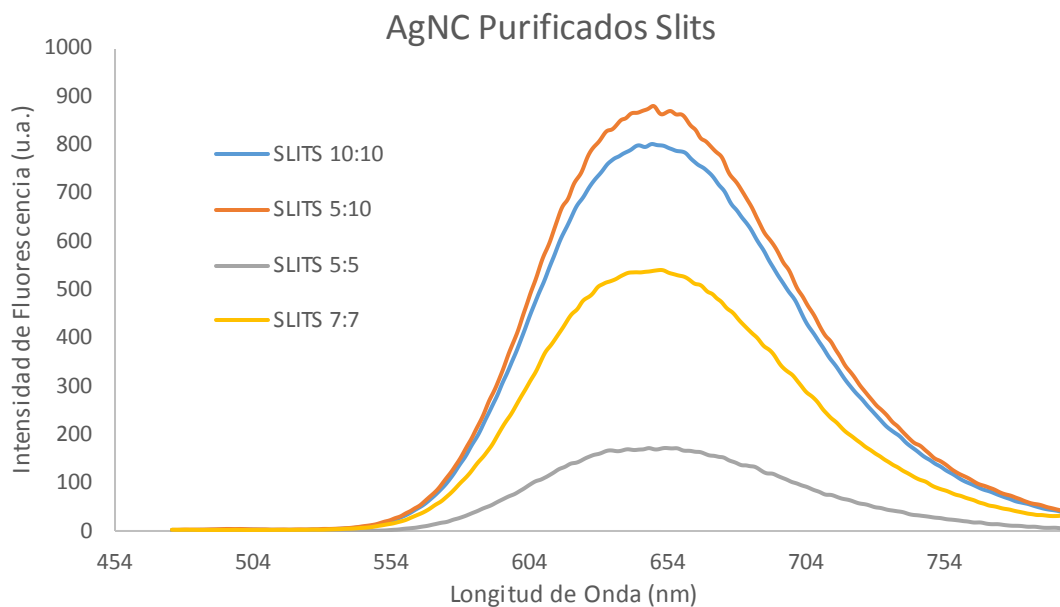


Figura 3. Anexo I. Espectros de emisión AgNCs purificados con diferentes “slits”.

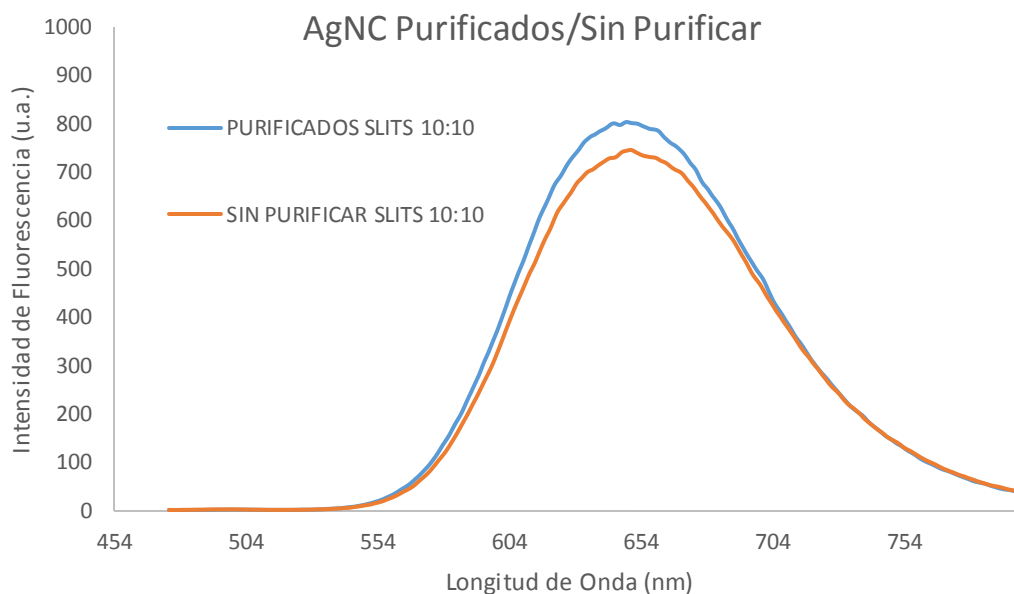


Figura 4. Anexo I. Comparación espectros de emisión AgNCs purificados y sin purificar.

Estudio estabilidad AgNCs

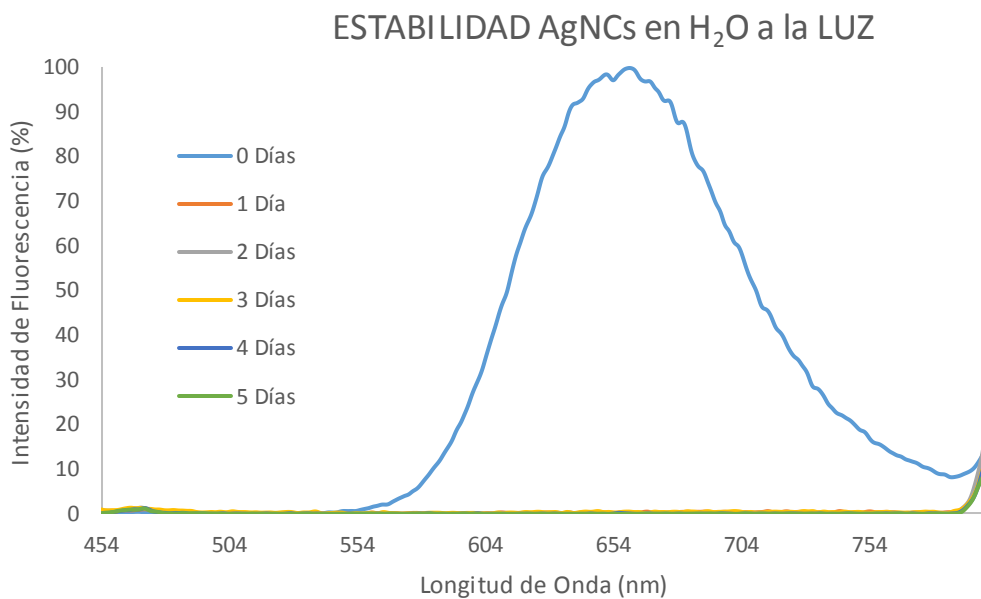


Figura 5. Anexo I. Estabilidad AgNCs en H₂O con exposición a la luz 1.

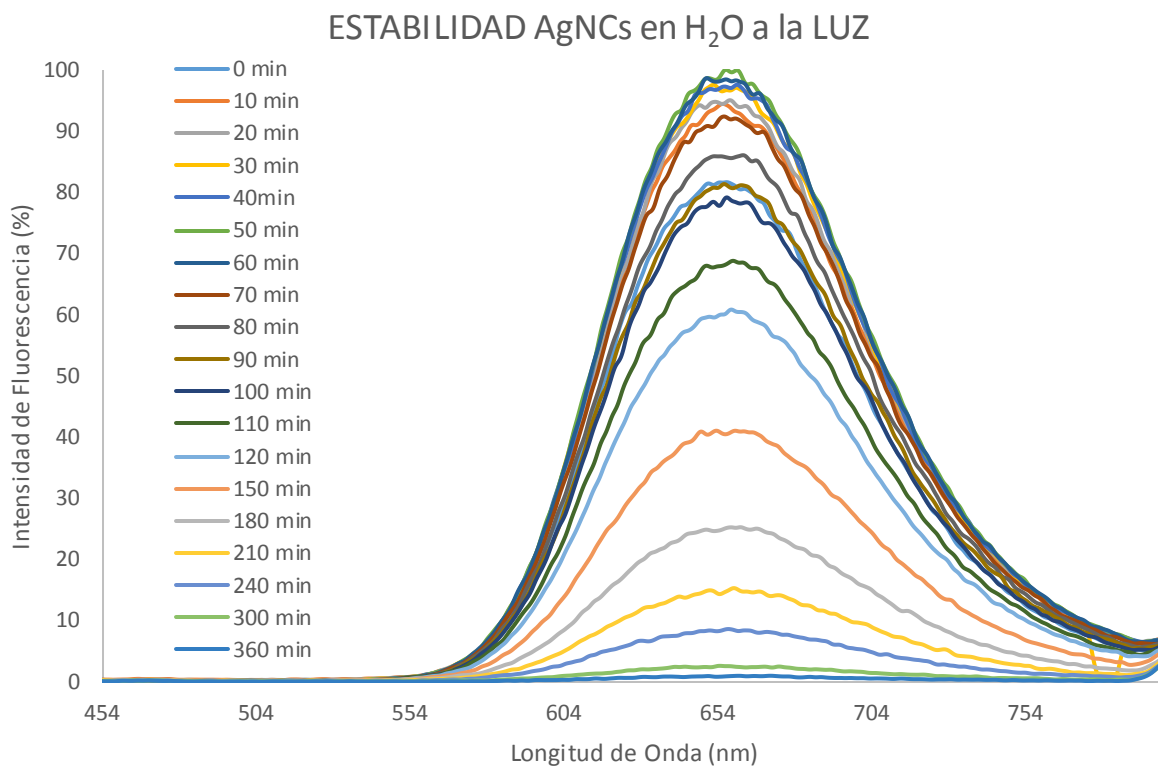


Figura 6. Anexo I. Estabilidad AgNCs en H₂O con exposición a la luz 2.

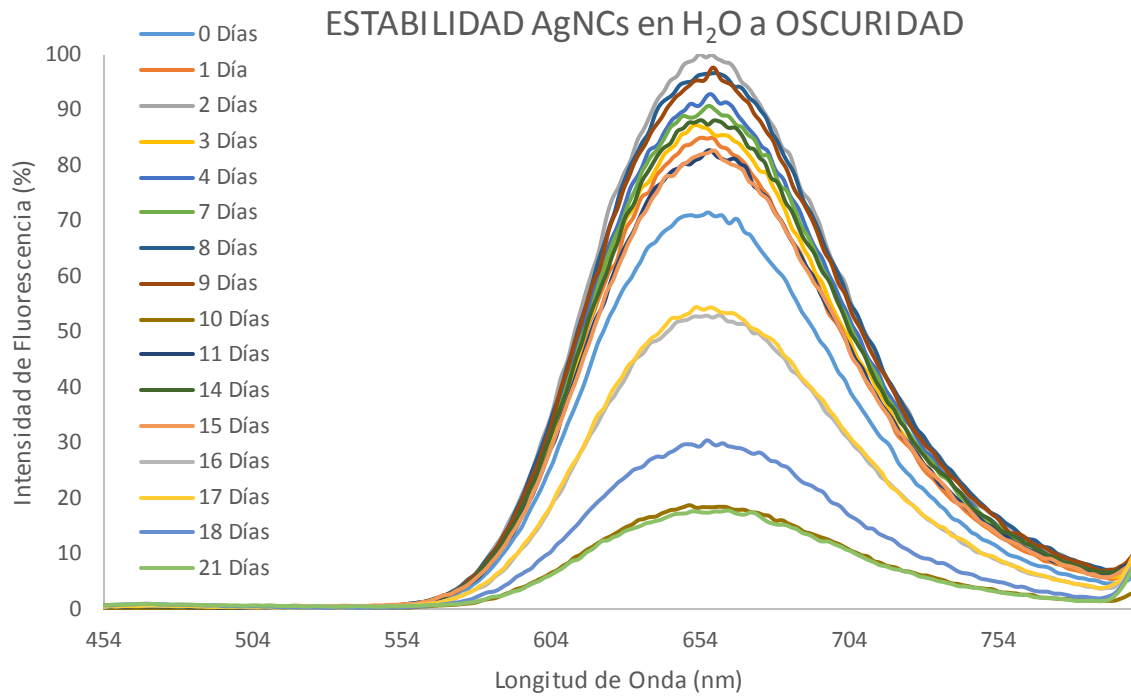


Figura 7. Anexo I. Estabilidad AgNCs en H₂O a oscuridad.

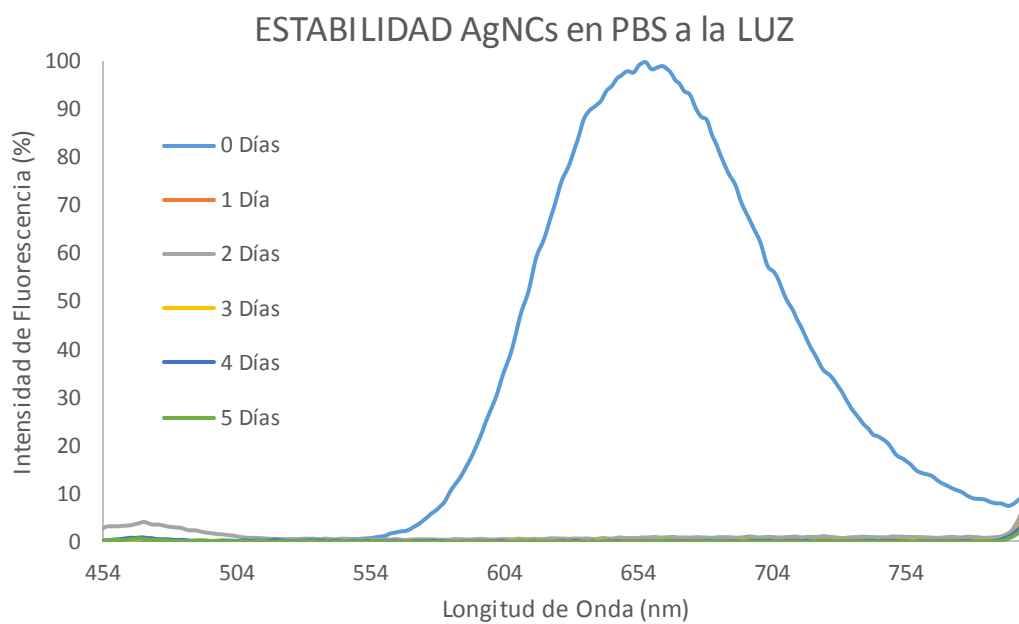


Figura 8. Anexo I. Estabilidad AgNCs en PBS con exposición a la luz.

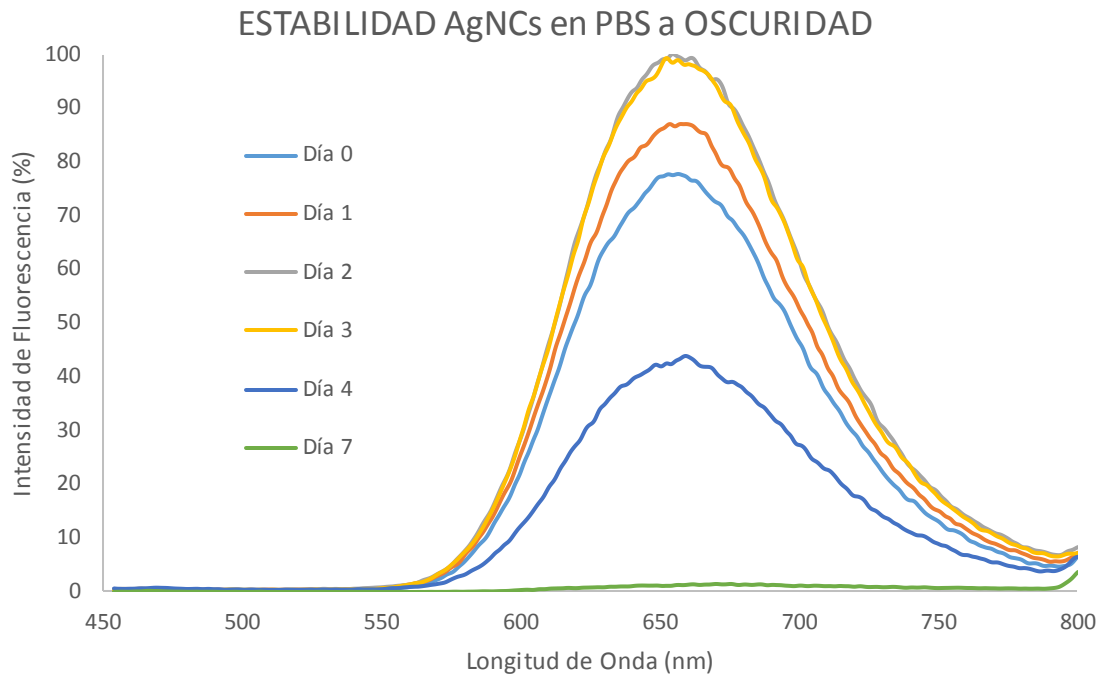


Figura 9. Anexo I. Estabilidad AgNCs en PBS a oscuridad.

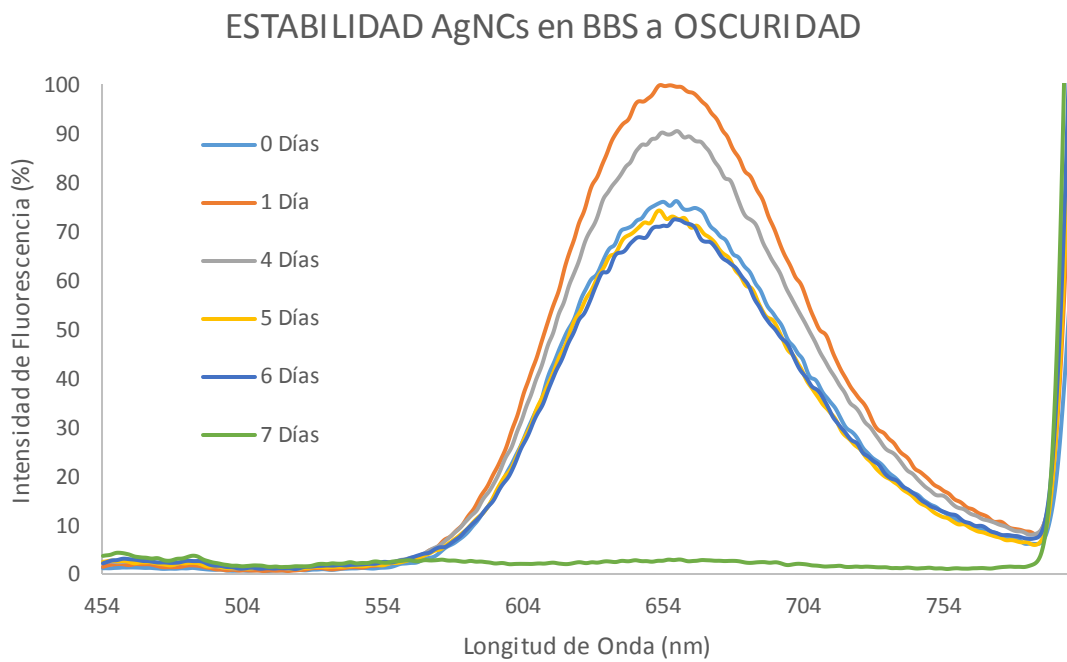


Figura 10. Anexo I. Estabilidad AgNCs en BBS a oscuridad.

HEPES Luz

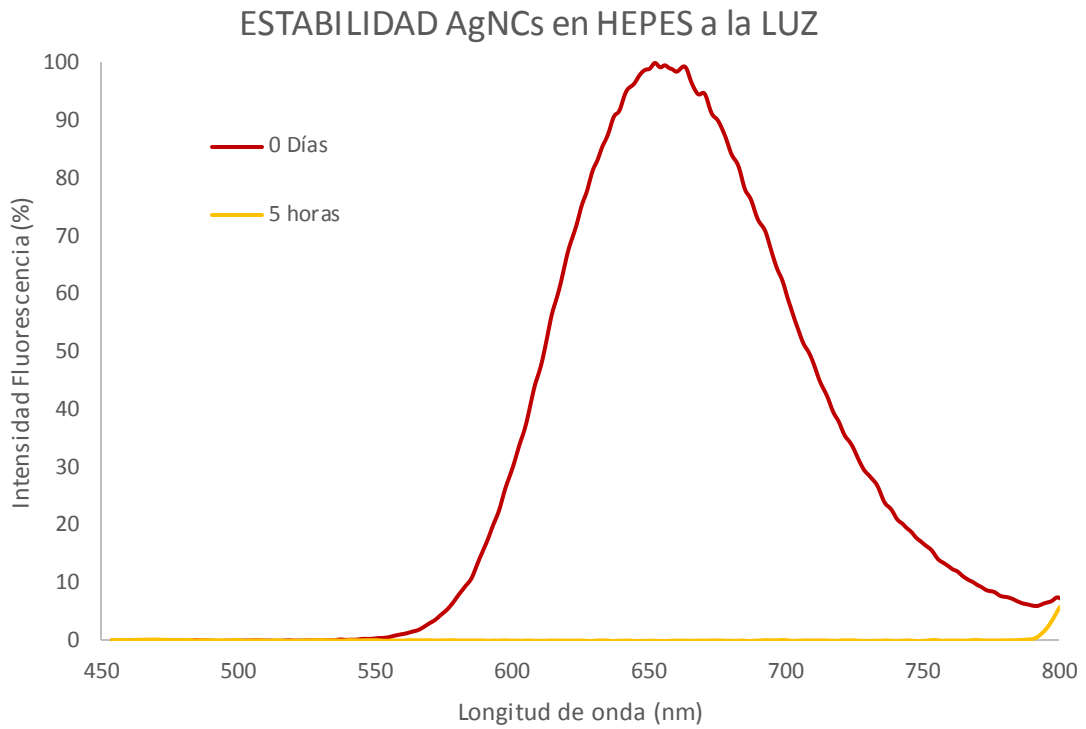


Figura 11. Anexo I. Estabilidad AgNCs en HEPES con exposición a la luz 1.

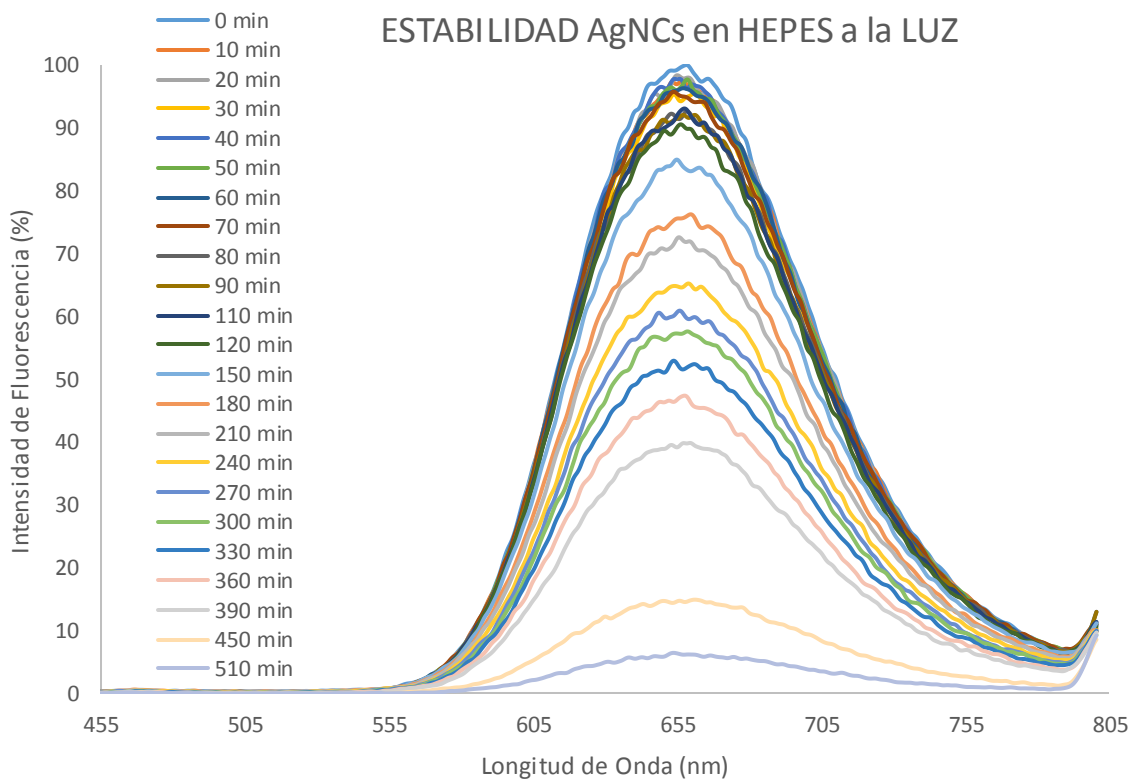


Figura 12. Anexo I. Estabilidad AgNCs en HEPES con exposición a la luz 2.

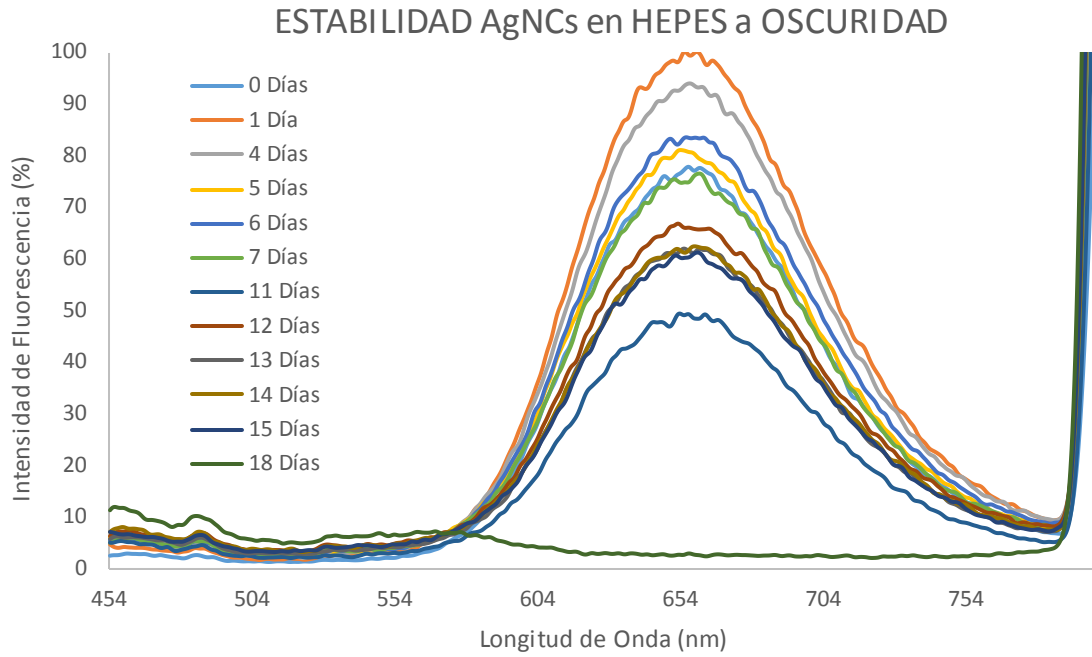


Figura 13. Anexo I. Estabilidad AgNCs en HEPES a oscuridad.

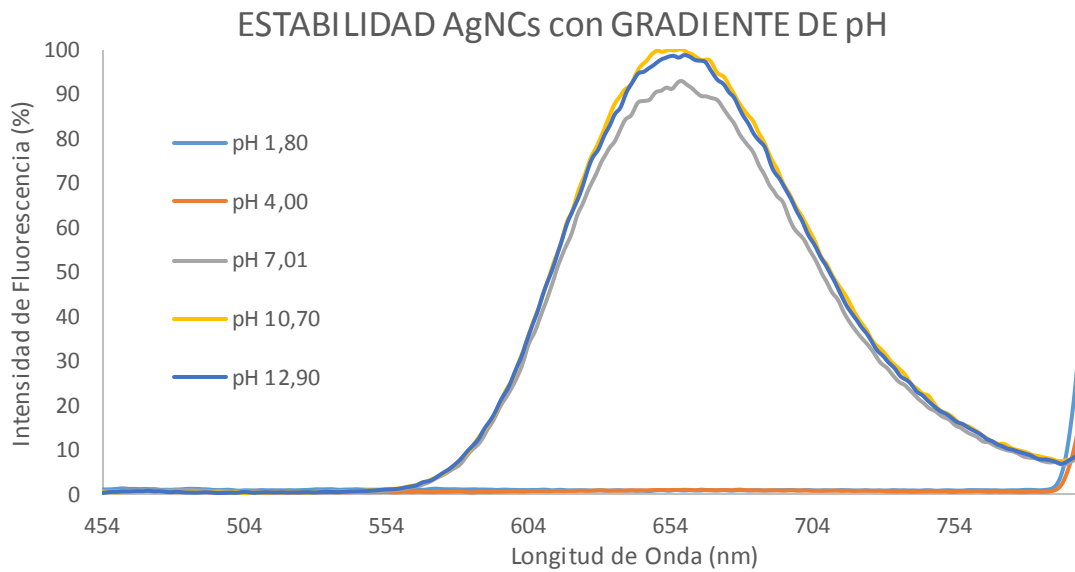


Figura 14. Anexo I. Estabilidad AgNCs con gradiente de pH.

Caracterización de la Bioconjugación

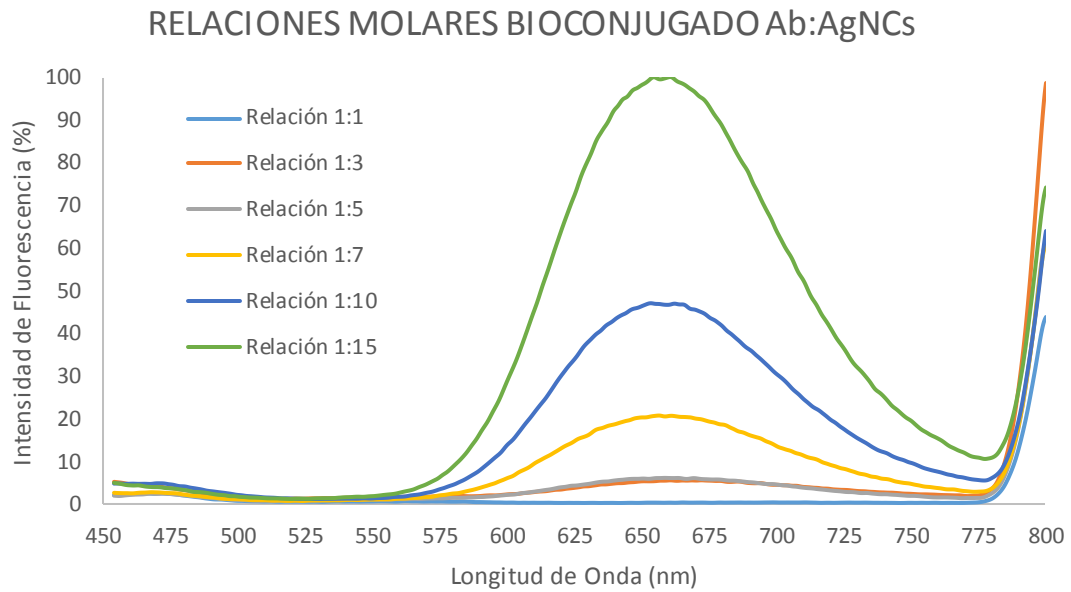


Figura 15. Anexo I. Intensidad de fluorescencia de las diferentes relaciones molares Ab:AgNCs.

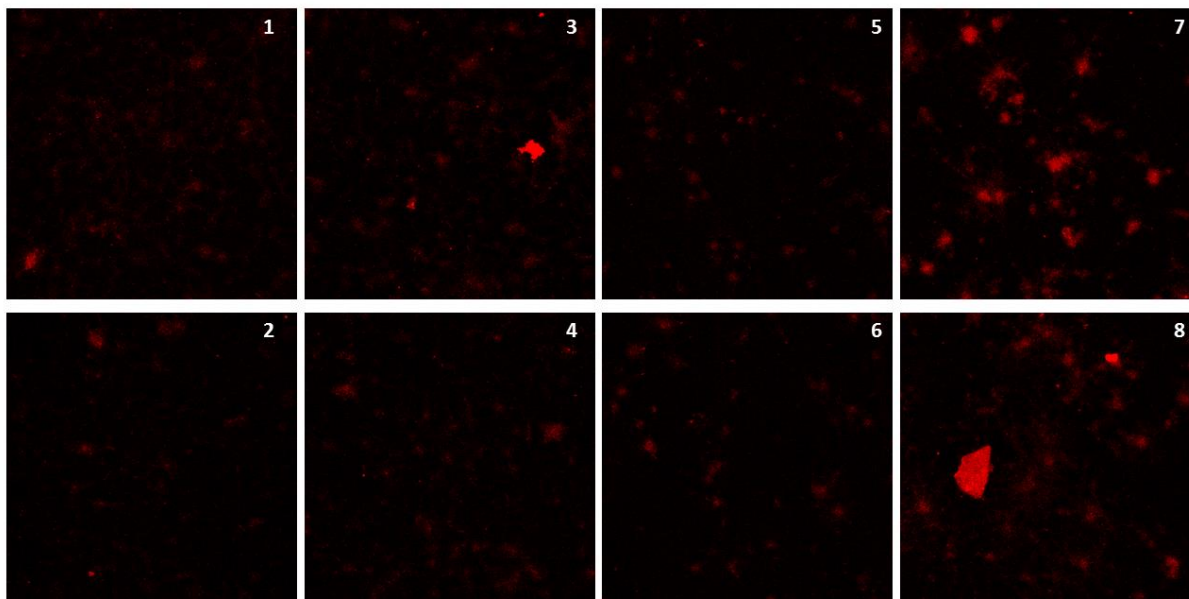


Figura 16. Anexo I. Imágenes obtenidas por microscopía láser confocal para las diferentes relaciones molares Ab:AgNCs. 1) y 2) 1:3. 3) y 4) 1:5. 5) y 6) 1:7. 7) y 8) 1:10.

Inmunoensayo Competitivo

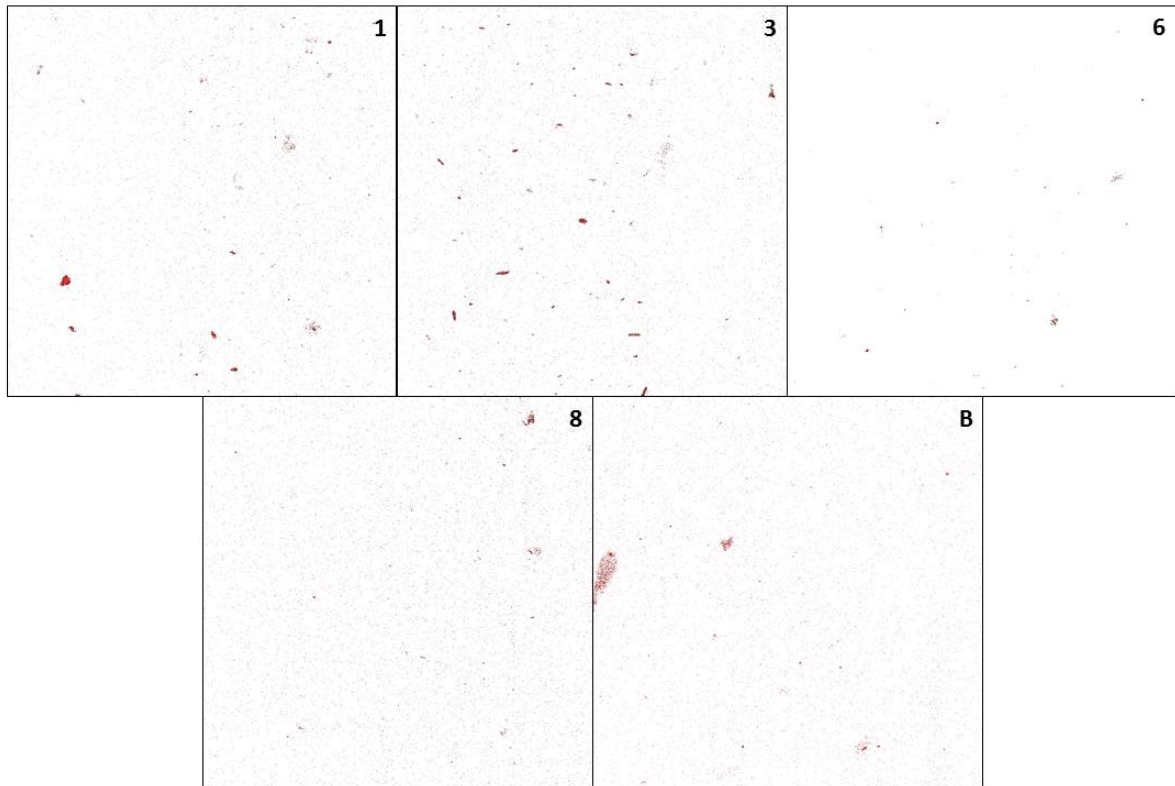


Figura 17. Anexo I. *Imágenes obtenidas por microscopía láser confocal del inmunoensayo competitivo para el blanco sin marcar y las diferentes concentraciones de MT-III unidas a una concentración fija de bioconjugado (1 $\mu\text{g/mL}$). **B**) Blanco sin marcaje. **1**) MT-III 0 ng/mL. **3**) MT-III 10 ng/mL. **6**) MT-III 100 ng/mL. **8**) MT-III 1000 ng/mL.*