



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

MÁSTER EN CIENCIAS ANALÍTICAS Y BIOANALÍTICAS

Trabajo Fin de Máster

Bioconjugación de nanopartículas para la detección óptica de sarna sarcóptica

Mario Figueiras González

Oviedo, Julio, 2023

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AFM: "Atomic Force Microscopy"
Microscopía de Fuerza Atómica

AF4: "Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation"
Fraccionamiento de flujo de campo

APTES: 3-aminopropiltrióxido de silano

AuNP's: "Gold Nanoparticles"
Nanopartículas de Oro

BSA: *Bovine Serum Albumin* (albúmina de suero bovino)

CVD: "Chemical Vapor Deposition"
Deposición Química en fase Vapor

DLS: "Dynamic Light Scattering"
Dispersión de Luz Dinámica

DTPA: Ácido dietilentriaminopentaacético

DSC: "Differential Scanning Calorimetry"
Calorimetría de barrido diferencial

DVS: Divinilsulfona

EDC: N-(3-Dimetilaminopropil) -N'-etilcarbodiimida

FeMNPs: "Iron magnetic nanoparticles"
Nanopartículas Magnéticas de Hierro

FTIR: "Fourier Transform Infrared"
Espectroscopía de Infrarrojo por Transformada de Fourier

GST: Glutatión S-Transferasa

HPLC: "High Performance Liquid Chromatography"
Cromatografía Líquida de Alta Resolución

HRTEM: "High Resolution Transmission Electron Microscopy"
Microscopía de Transmisión Electrónica de Alta Resolución

ICP-MS: "Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry"
Plasma de Acoplamiento Inductivo con detección por Espectrofotometría de Masa

MES: Ácido 2-morfolinoetanosulfónico

NHS: N-hidroxisuccinimida

NP: Nanopartícula

PBS: *Phosphate Buffer Saline*

PDI: "Polydispersity Index" Índice de Polidispersidad

QD: "Quantum Dot"
Punto cuántico

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

SDS: "Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis"
Electroforesis en gel de poliácridamida con dodecilsulfato sódico.

SEM: "Scanning Electron Microscope",
Microscopía de Barrido Electrónico

SiND's: "Silicon NanoDots" Puntos Cuánticos de Silicio

TBE: "Tris Borate EDTA" Buffer compuesto por Tris Borato y EDTA

TEM: "Transmission Electron Microscopy"
Microscopía Electrónica de Transmisión

TGA: "Termogravimetric Analysis" Análisis Termogravimétrico

XPS: "X-Ray Photoelectron Spectroscopy"
Espectroscopía fotoelectrónica de Rayos X

AGRADECIMIENTOS

Quería agradecer el apoyo y la compañía que he tenido durante toda la etapa académica y en especial durante este Máster que tantos conocimientos y experiencias me han aportado.

En primer lugar, a mis padres, por sostenerme y ser mi muleta derecha y mi muleta izquierda durante muchos años de esfuerzo y sacrificio. También a aquellos amigos de la infancia, del colegio o de la carrera que han seguido conmigo. Sin olvidar a todos los compañeros de piso con los que he tenido la suerte de convivir y hacer casa en cualquier sitio, en especial a Ismael, Alberto y Fran.

Más centrado en el máster, quería expresar mi agradecimiento a todos y cada uno de los profesores de Química Analítica que han dedicado su tiempo y esfuerzo en introducirme en el maravilloso mundo del análisis y dando respuestas a tantas preguntas que cualquiera tendríamos.

Agradecer a mis compañeros del máster, por haber cumplido aquello que nos dijo Costa el primer día: “En el máster hacéis muy buenos amigos y muy buenas relaciones”. En especial a Paloma, Samuel, Paco, Miguel, Marta, Sergio y Lucía por haberme ayudado a disfrutar aún más este año, tanto dentro como fuera de los “terrenos de juego” y permitirme saber que Madrid, Aranda, Murcia, Vitigudino o Toledo son casas para mí.

Por último, quería agradecer a la Profesora Ana Soldado por haberme dado la oportunidad de desarrollar este trabajo y conocer más acerca de como aquello que ni siquiera vemos, puede cambiarnos la vida a mejor. También por estar cuando se te ha necesitado, ser un apoyo constante y transmitirme todo aquello que sabes de una forma excepcional, con paciencia y siempre dando ánimos.

Tras Ana, agradecer a Inma Ortiz, quizá el mayor artífice de todo este trabajo. Siendo aún más nueva que yo en la facultad, fue capaz de acercarse a todos los compañeros y transmitirnos ese salero y talento andaluz e integrarse en un nuevo sitio, geográficamente opuesto a su lugar de origen en un tiempo récord. Además de tener una paciencia infinita y luchar contra sí misma (es una persona algo impaciente, sí) aguantando mis sinsentidos, mis comprensiones lentas o en ocasiones mi desorden mental, pero siempre sabiendo explicarme todo en cada momento y demostrando que tiene una carrera investigadora increíble a sus espaldas y un camino por recorrer que promete mucho, se dedique a lo que se dedique.

Y para redondear, agradecer a José Manuel Costa, coordinador del máster, por darme la oportunidad de ser representante de la comisión, de unirme a su estupendo grupo de investigación como es GEAB y de ser siempre, junto con Ana, un “padre” académico, guiándome en decisiones difíciles como las que he tenido que tomar este último mes, cambiando mi vida por completo, pero siempre dando sus mejores consejos, comprendiendo a la perfección mis sentimientos y demostrando que todo lo que ha logrado no ha sido por casualidad.

Para finalizar este apartado más personal, agradecer a aquello que me puso en Asturias, por haber tenido la oportunidad de residir en un paraíso de verdad durante 7 años de mi vida, en mi periodo de desarrollo personal y haber conseguido todos mis logros personales más destacados y haber conocido un sinfín de personas que me han dado un poquito de ellos y que me los llevo a cualquier lado.

Muchas gracias a todos.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN	6
1.1. Nanociencia y nanotecnología	6
1.2. Nanopartículas objeto de estudio	7
1.3. Principales métodos de síntesis de nanopartículas	10
1.4. Caracterización de nanomateriales	12
1.4.1. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	12
1.4.2. Dispersión dinámica de la luz (DLS)	12
1.4.3. Espectroscopía de radiación UV/VIS	13
1.4.4. Electroforesis en gel	15
1.5. Bioconjugación de nanopartículas	16
1.6. Aplicaciones de las nanopartículas en análisis clínicos	20
2. OBJETIVOS	21
3. MATERIAL Y MÉTODOS	22
3.1 Instrumentación y equipos de laboratorio	22
3.2 Reactivos	23
3.3 Nanopartículas	23
3.3.1. Nanopartículas magnéticas (MNPs)	24
3.3.2. Silicon nanodots (SiNDs)	26
3.3.3. Nanopartículas de oro (AuNPs)	27
4. Resultados y discusión	30
4.1. Nanopartículas magnéticas	30
4.1.1. Caracterización previa	30
4.1.2. Proceso de bioconjugación	31
4.1.3. Electroforesis en gel	32
4.2. Silicon Nanodots (SiNDs)	33
4.2.1. Espectro de excitación-emisión	33
4.2.2. Estudio de estabilidad SiNDs	34
4.2.3. Estudio de la influencia del pH	35
4.2.4. Estudio de la influencia de la fuerza iónica	37

4.3. Nanopartículas de oro (AuNP's)	39
4.3.1. Caracterización de las nanopartículas de oro.	39
4.3.2. Electroforesis en gel para evaluar el proceso de bioconjugación.	41
4.3.3. Caracterización de las AuNPs bioconjugadas mediante DLS.	42
5. Inmunoensayo para la detección óptica de sarna sarcóptica	43
6. Conclusiones.	48
7. Bibliografía	49

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. Nanociencia y nanotecnología.

La Química Analítica es una de las principales ramas de la química y ha experimentado un auge exponencial en los últimos años llevando consigo la necesidad de un avance en todas sus disciplinas. En el siglo XXI, una de las disciplinas que más ha progresado es la nanociencia. Se define la nanociencia como la disciplina encargada del estudio e investigación de todos aquellos fenómenos relacionados con los materiales a escala nanométrica, incluyendo las propiedades del nanomaterial, el estudio de su estructura o de su reactividad.¹ Si bien es cierto, en el análisis químico no todo el campo de estudio presenta dimensiones nanométricas, ha surgido la posibilidad de reducirlo a estas dimensiones, lo que confiere enormes cambios en las propiedades fisicoquímicas de muchas sustancias.

Junto con el avance de la tecnología informática, las técnicas analíticas se han visto en la necesidad de progresar y la aparición de la nanotecnología ha permitido mejorar de forma muy eficiente los procesos mediante automatización, miniaturización, simplificación e incluso implementación de nuevos sistemas de calidad en laboratorios de rutina e investigación al aprovechar los materiales nanométricos para el desarrollo de nuevas aplicaciones. En términos analíticos, es una de las ramas que estudia y aprovecha los beneficios y ventajas de las herramientas de la dimensión "nano" para caracterizar, detectar y determinar analitos con alta sensibilidad y poco consumo de reactivos y recursos.¹

Los nanomateriales se pueden definir como aquellos cuyos principales constituyentes tienen, al menos, una dimensión del orden entre 1 y 100 nm. Pueden clasificarse por dimensión o por tipo de material nanoestructurado. En la **Figura 1** se adjunta un esquema de esta clasificación de los nanomateriales atendiendo a la forma de clasificarlos junto con diferentes ejemplos.

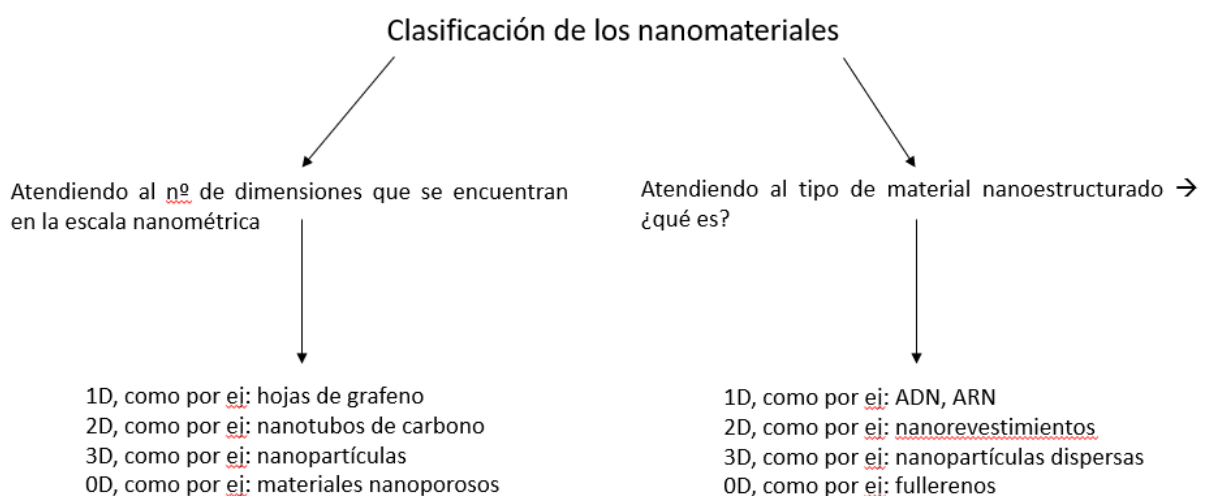


Figura 1 Clasificación de los nanomateriales. Imagen adaptada de la Referencia 1.

Los materiales agrupados en la escala nanométrica son caracterizados mediante una gran variedad de técnicas. De forma general, las técnicas de caracterización de los nanomateriales se clasifican atendiendo a la tipología del nanomaterial en base a su:

A) Tamaño: este grupo abarca las diferentes técnicas microscópicas como la microscopía electrónica de transmisión (TEM) o la microscopía electrónica de barrido (SEM). También podemos destacar otras técnicas como la dispersión dinámica de la luz (DLS), las técnicas electroforéticas (como electroforesis en gel de agarosa o SDS PAGE) o la cromatografía por exclusión de tamaños (SEC) entre otras.

B) Composición química: dentro de las técnicas empleadas para arrojar información acerca de la composición de un nanomaterial podemos resaltar el análisis elemental, espectrometría de infrarrojo mediante transformada de Fourier (FTIR), técnicas espectroscópicas como la espectroscopía de rayos X foto electrónica (XPS) o la espectroscopía Raman entre otras.

C) Estructura: el estudio de la estructura de los nanomateriales se lleva a cabo mediante el empleo de técnicas como la difracción de rayos X o la microscopía de fuerza atómica (AFM), técnicas que aportan resoluciones a nivel atómico del nanomaterial.

1.2. Nanopartículas objeto de estudio.

La dimensión “nano” aporta una serie de ventajas y propiedades distintivas a los materiales debido principalmente a dos rasgos característicos²:

- Mayor área superficial relativa: lo que conlleva mayor reactividad química y resistencia debido al aumento del número de átomos en la superficie.
- Nuevos efectos cuánticos: lo que se traduce en diferentes comportamientos ópticos, eléctricos y magnéticos con respecto al material en la escala macro.

Estas características sitúan a las nanopartículas en una posición ventajosa para ser empleadas en multitud de aplicaciones tanto industriales como a nivel de investigación. Algunos ejemplos son el empleo de nanomateriales en aplicaciones biomédicas o medioambientales como catalizadores o agentes de contraste, en el desarrollo de biosensores para la detección de diferentes analitos de interés en el campo clínico, medioambiental y alimentario, entre otras aplicaciones.²

A continuación, se detallan los aspectos o características más relevantes de tres tipos diferentes de nanopartículas como son las magnéticas, las silicon nanodots y las nanopartículas de oro, debido a que son los materiales empleados en el desarrollo del presente TFM.

A. Nanopartículas magnéticas de hierro (FeMNP's): Recientemente han suscitado interés en el campo de la nanotecnología debido a sus propiedades físicas y químicas como sus características eléctricas, ópticas, catalíticas, térmicas y magnéticas además de su bajo coste.³

Se han descrito multitud de aplicaciones dentro de las cuales se han empleado las FeMNPs. Se pueden destacar áreas como el diagnóstico de cáncer, desarrollo de biosensores, catálisis o agricultura y medioambiente. Además, se ha demostrado que presentan gran eficacia como alternativas terapéuticas asociadas al transporte de fármacos.⁴ En la **Figura 2** se describen las aplicaciones asociadas a este tipo de nanopartículas (NPs).

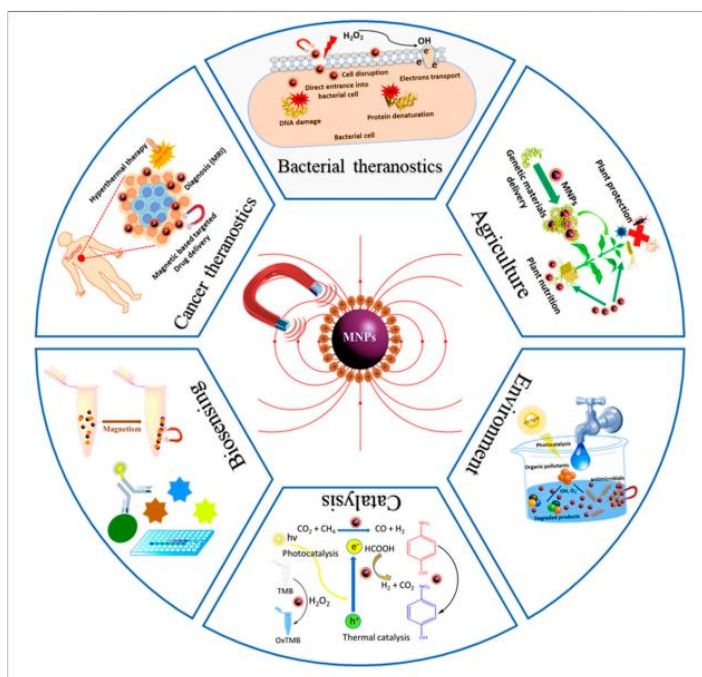


Figura 2 Campos de aplicación de las nanopartículas magnéticas. Imagen extraída de la Referencia 3.

B. Quantum Dots (QD's) de Silicio (SiNDs): un punto cuántico (*QuantumDot*) es un tipo de nanomaterial semiconductor con propiedades electrónicas relacionadas con tamaño y forma del cristal. Han ganado importancia debido a sus características ideales como fluoróforos.⁵ Centrando el estudio, los puntos cuánticos de silicio son nanomateriales fluorescentes que presentan propiedades muy aptas para sus fines, como son su comportamiento inerte, la posibilidad de modificación de su superficie, alta capacidad luminiscente, fotoestabilidad y alta biocompatibilidad debido a su baja toxicidad.⁶ Su caracterización requiere el uso de microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM) debido a su reducido tamaño (1-4 nm).⁷ En la **Figura 3** se incluye un esquema representativo de la composición del núcleo y los grupos funcionales de la superficie del SiNDs.

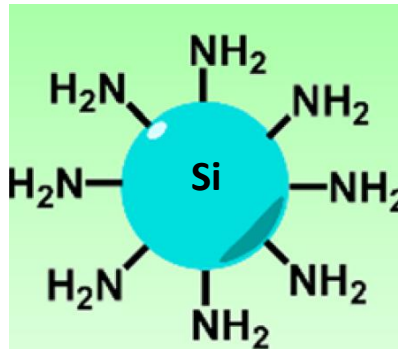


Figura 3 Esquema de un SiNDs con superficie recubierta de grupos aminos. Imagen extraída de la Referencia 5.

En la **Figura 4**, se muestra la imagen HRTEM. La direccionalidad de las nanoestructuras se ha llevado a cabo mediante el empleo de un ciclotrón en el seno de un campo magnético.

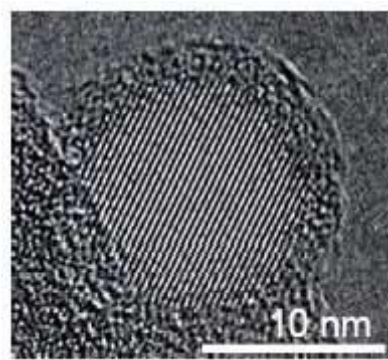


Figura 4 Imagen de un Quantum Dot de Silicio obtenido mediante HRTEM. Imagen extraída de la Referencia 8.

C. Nanopartículas de oro (AuNP's): dentro del amplio espectro de nanopartículas metálicas, las de oro han ganado importancia debido a sus propiedades excepcionales entre las que podemos destacar la elevada estabilidad y la posibilidad de amplificación de las señales (característica muy importante en la realización de ensayos colorimétricos). Las nanopartículas de oro son nanomateriales biocompatibles y fáciles de bioconjugar con multitud de agentes biológicos entre los que se incluye el material genético así como con proteínas/anticuerpos de diverso tipo y se emplean en variedad de aplicaciones analíticas como el desarrollo de sensores y biosensores en aplicaciones biomédicas, agente terapéutico en el transporte de fármacos o aplicaciones industriales o medioambientales.⁸ En la **Figura 5** se adjunta un esquema de este modelo de nanopartícula.

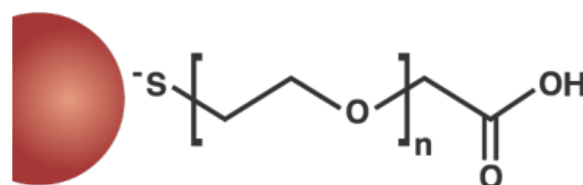


Figura 5 Esquema de nanopartículas de oro empleadas en el desarrollo de este trabajo. Imagen extraída de casa comercial Cytodiagnosics.

En la **Figura 6** se muestra una imagen de microscopía electrónica de barrido (TEM) de AuNPs con un tamaño de 40 nm. La imagen nos aporta una idea visual acerca de su geometría y tamaño.

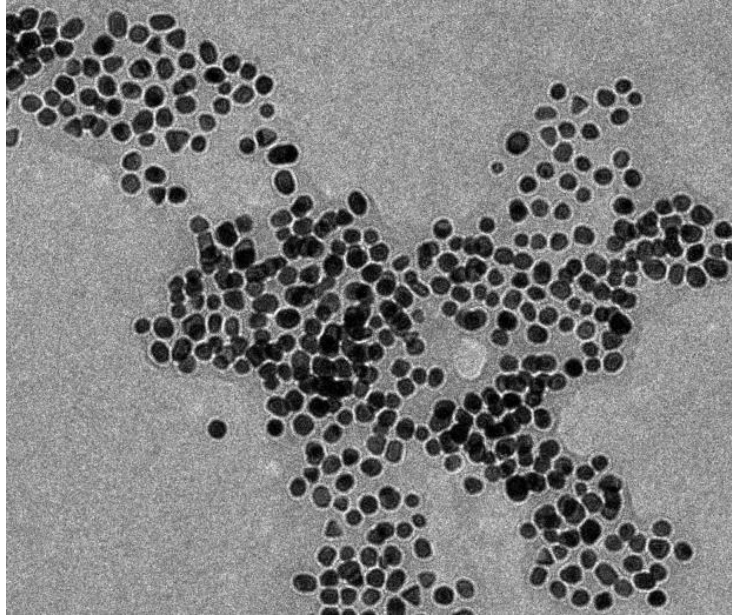


Figura 6 Nanopartículas de oro vistas utilizando el TEM. Imagen extraída de la Referencia 10.

1.3. Principales métodos de síntesis de nanopartículas.

Las nanopartículas se pueden sintetizar mediante diferentes procesos entre los que podemos citar la evaporación térmica, la deposición química en fase vapor (CVD), síntesis hidrotermal o el método sol-gel entre otros. De forma general, tal y como se muestra en la **Figura 7** podemos clasificar las estrategias de síntesis en:

-Síntesis Top-Down: método a través del cual, mediante métodos físicos o químicos se va disminuyendo el tamaño del material hasta alcanzar el previsto para la NP. Ejemplos de este tipo de métodos son la ablación láser o procesos de pirólisis.

-Síntesis Bottom-Up: en este caso las nanopartículas se sintetizan a partir de sus precursores. Estos precursores son moléculas pequeñas como ácido cítrico o la etilendiamina, que aportan átomos de carbono y nitrógeno en la formación del nanomaterial. Los métodos *Bottom-Up* se consideran hidrotermales porque se llevan a cabo en medios acuosos. Son los más empleados debido a su disponibilidad y reducido precio, así como la posibilidad de dotar a la nanopartícula de grupos funcionales con los que bioconjugan o funcionalizar.

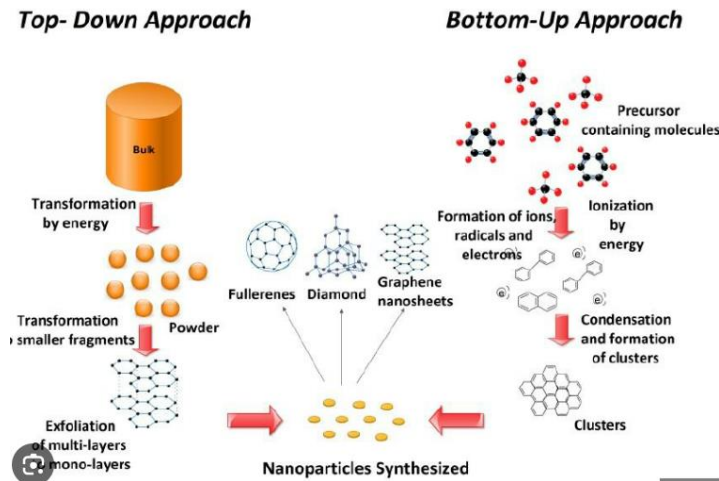


Figura 7 Esquema explicativo de los diferentes métodos de síntesis de nanopartículas. Imagen extraída y adaptada de diferentes motores de búsqueda.

En ella podemos ver como el método *Top Down* parte de un precursor macroscópico, el cual se transforma en fragmentos inferiores y a partir de ellos tiene lugar la síntesis de las nanopartículas. Por otra parte, en el método *Bottom Up* los precursores son pequeñas moléculas que son expuestas a diferentes procesos como ionización generando radicales, iones o electrones, así como procesos redox, que se traducen en la formación de las nanopartículas.

A la hora de seleccionar uno u otro método se deben tener en cuenta las principales características en términos de ventajas y desventajas. En la **Tabla 1** se muestran a nivel comparativo las ventajas y desventajas de ambas metodologías.

Tabla 1 Ventajas y desventajas de los diferentes métodos de síntesis de nanopartículas expuestos en el presente trabajo. Imagen adaptada de diferentes fuentes bibliográficas citadas en la memoria.

	Método Top-Down	Método Bottom-Up
Ventajas	<ul style="list-style-type: none"> • Producción a gran escala • Permite la deposición en sustratos • No requieren métodos de purificación 	<ul style="list-style-type: none"> • Genera nanopartículas ultra-finas • Permite controlar los parámetros de la etapa de deposición • Tamaños de 1-20 nm posibles
Desventajas	<ul style="list-style-type: none"> • Gran variedad de formas de partícula y tamaños • Dificultad en el control de parámetros de deposición 	<ul style="list-style-type: none"> • Difícil producción a gran escala • Requiere métodos de purificación • Precio: puede ser mayor por requerimientos energéticos para generar las nanopartículas

En base a estas características se debe poner siempre un compromiso a la hora de seleccionar el método empleado para la síntesis de las nanopartículas, de manera que se escoja la más adecuada para el objetivo a lograr.

1.4. Caracterización de nanomateriales.

Para caracterizar una nanopartícula existen una amplia variedad de técnicas en función de la información a determinar (propiedades ópticas, morfología, estructura...) como se ha comentado previamente.

Atendiendo a las nanopartículas objeto de estudio en el desarrollo del presente TFM, a continuación, se detallan los aspectos más relevantes de las técnicas de caracterización de nanopartículas que se han empleado en el mismo.

1.4.1. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Es una técnica microscópica basada en la generación de imágenes de una muestra al iluminarlas con un haz de electrones a gran velocidad y en condiciones de alto vacío. La dispersión de los electrones en diferentes trayectorias define la estructura del nanomaterial observado. Para la caracterización de materiales de tamaños muy reducidos (inferiores a 10 nm) se puede acudir al HRTEM.

1.4.2. Dispersión dinámica de la luz (DLS).

Es una técnica muy utilizada en el estudio del comportamiento de moléculas en disolución, principalmente sus procesos de difusión. En el caso de las NPs nos permite establecer la distribución de tamaño de aquellas que se han estudiado. El coeficiente en el que una molécula difunde, así como su radio hidrodinámico (que es la suma del propio radio de la nanopartícula en este caso y su radio de difusión) son funciones del tamaño y forma del elemento objeto de estudio y es por ello por lo que la técnica de dispersión dinámica de la luz (DLS) aporta una caracterización de la nanopartícula.⁹

La forma de determinación de estos parámetros se basa en la medida de las diferentes fluctuaciones que sufre la luz dispersada a lo largo del tiempo conforme las nanopartículas presenten uno u otro tamaño. Las partículas se encuentran en movimiento y dispersan la radiación, lo que provoca fluctuaciones de intensidad de luz inversamente proporcionales al coeficiente de difusión de las partículas, de hecho, con partículas pequeñas se producirán movimientos más rápidos que en el caso de las grandes, como podemos ver en la **Figura 8**, donde se adjunta un ejemplo este fenómeno para un grupo de nanopartículas de pequeño y de gran tamaño.

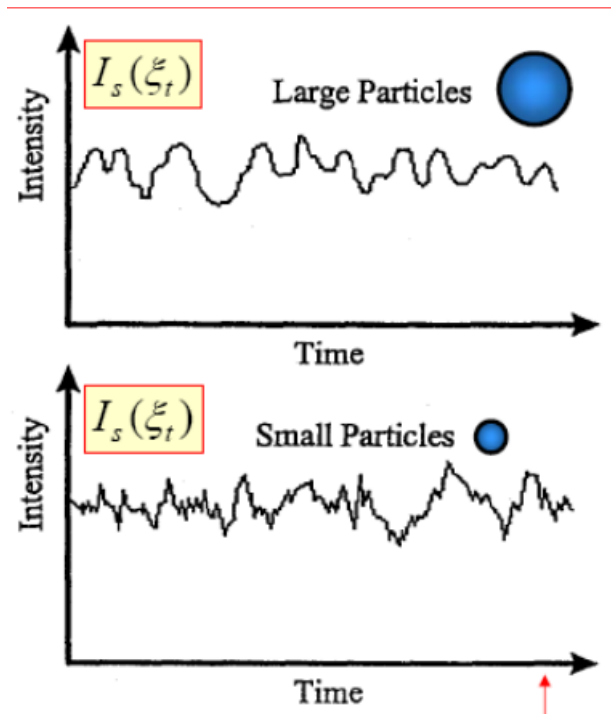


Figura 8 Variación de la intensidad de luz respecto al tiempo para un conjunto de nanopartículas de tamaño grande y pequeño. Imagen extraída de la página web de la empresa Malvern Instruments.

1.4.3. Espectroscopía de radiación UV/VIS.

La fluorescencia molecular es un tipo particular de luminiscencia en la cual una molécula, tras ser excitada con la aplicación de una radiación determinada, regresa al estado vibracional fundamental, emitiendo radiación de menor energía (mayor longitud de onda) que la radiación de excitación. Existen dos tipos de luminiscencia, la fluorescencia y la fosforescencia, las cuales se diferencian en el modo en el que las moléculas excitadas regresan a su estado fundamental ¹⁰:

-Fluorescencia: Proceso por el cual se lleva a cabo una emisión de radiación, producida por una molécula que ha sido excitada mediante radiación electromagnética. La fluorescencia tiene lugar cuando la radiación emitida es la debida al paso, desde el estado vibracional más bajo del estado excitado hacia el estado fundamental (S_0) (ver **Figura 9**). El proceso es rápido con tiempos de vida que oscilan los 10 ns.¹⁰

-Fosforescencia: Proceso por el cual se lleva a cabo una emisión de radiación, producido por una molécula que ha sido excitada con radiación electromagnética. La fosforescencia se produce cuando la radiación emitida se debe al paso desde el estado vibracional más bajo del primer estado triplete (T_1) al estado fundamental (S_0) (ver **Figura 9**). Son procesos lentos y con tiempos de vida superiores a los de la fluorescencia, próximos a los ms.¹⁰

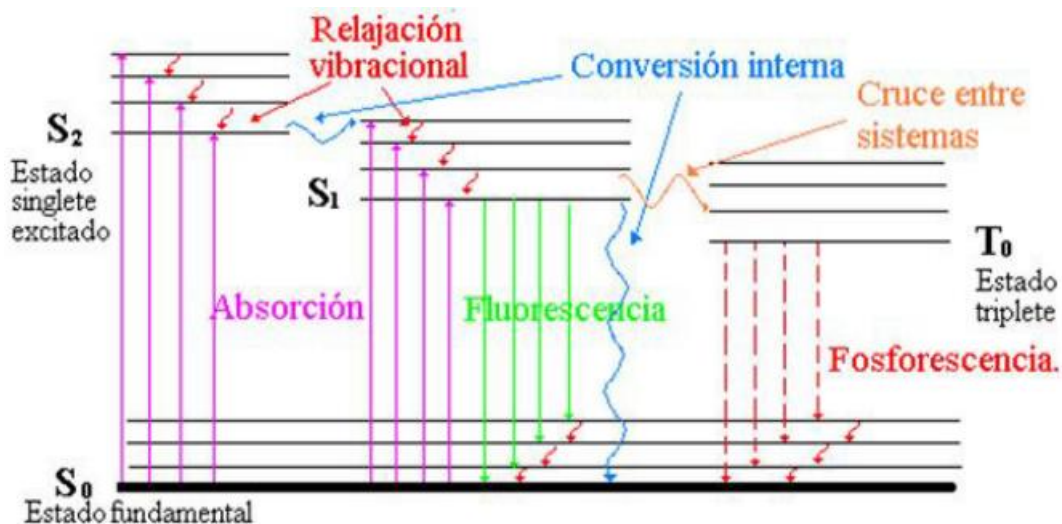


Figura 9 Diagrama de Jablonskii explicativo de los procesos que se producen en la fluorescencia y en la fosforescencia. Imagen adaptada de la Referencia 8.

De acuerdo con el esquema de Jablonskii (**Figura 9**), para que se produzca un fenómeno luminiscente en primer lugar se produce una absorción de radiación por parte de la molécula. Los electrones de las estructuras de estas moléculas absorben energía y promocionan a estados vibracionales excitados como es el S_2 . Posteriormente la molécula pierde el exceso de energía en un proceso denominado relajación vibracional (proceso no radiacional, ya que no emite ningún tipo de radiación durante el mismo), alcanzando el nivel, también excitado, S_1 . En ese punto la molécula puede desactivarse a un nivel fundamental S_0 emitiendo radiación conocida como **fluorescencia** o puede sufrir un proceso no radiacional denominado cruce intersistema en el cual la molécula pasa a otro estado, de menor energía (y por ende de acuerdo con la Ley de *De Broglie*, mayor longitud de onda) denominado triplete. Se produce en este caso un cambio del espín electrónico y por tanto varía la multiplicidad de la molécula, por lo que se considera una transición no permitida. Cuando la molécula se desactiva hacia un nivel fundamental S_0 emitiendo radiación desde el nivel triplete, se conoce como **fosforescencia**.¹⁰

En el presente trabajo se empleará únicamente el concepto de la fluorescencia y por tanto es necesario conocer los principales factores que afectan o influyen en la misma.¹⁰ Se exponen los siguientes:

- Estructura: influye en la capacidad de absorción de las moléculas. El término clave es la rigidez, ya que la fluorescencia se verá favorecida en las moléculas rígidas porque esta característica aumenta la probabilidad de evitar que se lleven a cabo otros mecanismos desactivantes.
- Temperatura: el aumento de temperatura conlleva el aumento de las colisiones y por ello es más sencillo que se produzcan fenómenos de desactivación y, por lo tanto, la disminución de la fluorescencia.

- **Disolvente:** la presencia de átomos pesados disminuye la fluorescencia, así como la viscosidad, que se comporta de forma análoga a la temperatura. Una disminución de la viscosidad provoca mayor probabilidad de colisiones y por tanto desactivaciones que reducen la fluorescencia.
- **pH:** la longitud de onda y la intensidad de emisión se ve influida por el número de estructuras resonantes, ya que a mayor sea este, más estable es el estado excitado y por tanto más probable es observar fluorescencia. El medio ácido o básico influye en dichas estructuras resonantes y explica la influencia del pH.
- **Oxígeno disuelto:** el oxígeno es paramagnético, y esta propiedad hace que se favorezca el cruce intersistema y el paso de las moléculas al estado triplete, lo que se traduce en un efecto de atenuación de la fluorescencia *quenching*.
- **Concentración:** existe una relación de proporcionalidad entre la intensidad de emisión de fluorescencia y la concentración de la especie objeto de estudio utilizando la Ley de *Beer-Lambert* junto a un procedimiento matemático que desemboque en la siguiente ecuación para disoluciones diluidas, del orden de los $\mu\text{g/mL}$ o inferiores.

$$I_F = Kc$$

Siendo k una constante que aglomera los términos de longitud de paso óptico b y coeficiente de extinción molar ϵ y siendo c la concentración de la especie objeto de análisis.

1.4.4. Electroforesis en gel.

Es una de las principales técnicas de separación de moléculas cargadas bajo un campo eléctrico. El sistema es sencillo, representado en la **Figura 10**.

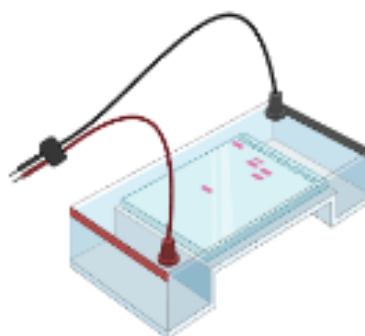


Figura 10 Sistema de electroforesis en gel. Imagen extraída de motor de búsqueda Biorender.

El sistema de electroforesis posee un soporte sobre el cuál se coloca un gel, que se encuentra sumergido en una cubeta que contiene un *buffer* de pH y fuerza iónica establecidas según los analitos a separar. En los extremos de la cubeta se sumergen el ánodo y el cátodo. Se aplica una diferencia de potencial entre ellos y las moléculas cargadas negativamente se dirigirán hacia el polo positivo (ánodo), mientras que las cargadas positivamente al polo negativo (cátodo), por tanto, el mecanismo principal de separación es el desplazamiento

de las especies cargadas. En ocasiones se lleva a cabo la separación electroforética, en condiciones tales que todos los analitos se encuentren cargados negativamente, de forma que todos migran hacia el ánodo a diferente velocidad en función de su carga y tamaño. La diferente movilidad de las moléculas cargadas dependerá de factores como¹¹:

- Voltaje aplicado (V): la migración de las moléculas se verá influida directamente por el mayor o menor voltaje aplicado. En condiciones generales, el rango de separación alcanzado en geles decrece cuanto mayor voltaje se aplique.
- Carga: factor clave de la electroforesis. A mayor valor de carga las partículas adquirirán mayor velocidad de desplazamiento en dirección al polo positivo.
- *Buffer* de electroforesis: influye su fuerza iónica ya que, en ausencia de iones, la conductividad eléctrica se disminuye notablemente y afecta a la migración de las moléculas objeto de separación.
- Concentración de gel agarosa: la concentración del polisacárido determina el tamaño del poro del gel y por tanto la velocidad de migración de las partículas de la muestra. Si se emplean geles con valores muy elevados, se reduce la velocidad de migración debido a que una concentración elevada se traduce en poros pequeños.
- Temperatura: relacionada con el efecto Joule que explica que el paso de corriente eléctrica genera calor que es proporcional a la diferencia de potencial aplicada y a la resistencia. Es por ello de suma importancia el control de temperatura, para evitar su influencia en la muestra.
- Tamaño, forma y conformación del analito: aquellas moléculas que sean de menor tamaño migrarán de forma más veloz y sencilla a través de los poros del gel.

1.5. Bioconjugación de nanopartículas.

Se define el proceso de bioconjugación como un proceso que permite inmovilizar moléculas en superficies donde una de ellas, al menos, es una biomolécula como por ejemplo un ácido nucleico, proteína o un carbohidrato. Estos procesos pueden producirse mediante interacciones electrostáticas, adsorción física o enlaces covalentes entre la biomolécula y la superficie a bioconjugar. En el caso de ciertas proteínas como los anticuerpos, cabe destacar que no es sencilla. Una de las principales dificultades reside en su conformación, la estructura de los anticuerpos debido a que la zona en la que se produzca la unión se ve influida por la estructura que presentan en el momento en el que tiene lugar la reacción de bioconjugación. Es por ello la importancia de controlar de estos factores conformacionales para permitir eficiente y viable el reconocimiento del antígeno por parte del anticuerpo.¹²

Las técnicas de modificación y bioconjugación dependen de dos químicas interrelacionadas: la reactividad de los grupos funcionales de la molécula objetivo (como puede ser un anticuerpo o un conjunto de

oligonucleótidos) y la reactividad de los "linkers" utilizados para dichos procesos. Por tanto, este proceso se lleva a cabo de la siguiente forma:

1. Funcionalización de la nanopartícula objeto de estudio: las nanopartículas presentan una superficie que contiene diferentes grupos funcionales como pueden ser los carboxilos, los aminos o los grupos tiol. En la **Figura 11** se muestra a modo de ejemplo una nanopartícula de oro con varios de los grupos que pueden ser utilizados para llevar a cabo la bioconjugación. Hay que señalar además que para poder llevar a cabo la bioconjugación, es necesario que la superficie de la nanopartícula se encuentre activada para que pueda reaccionar con los grupos funcionales correspondientes de la biomolécula.

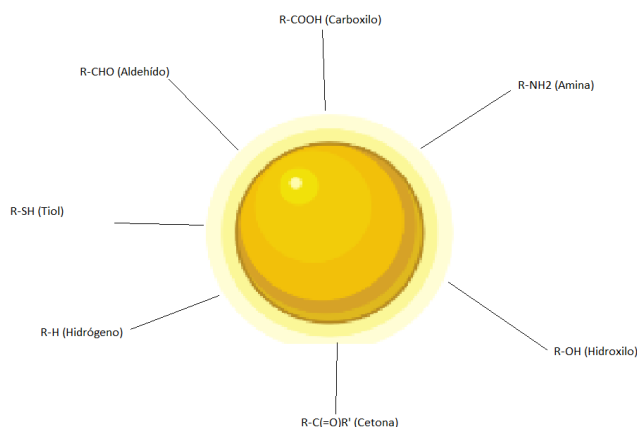


Figura 11 Esquema de nanopartícula de oro con diferentes grupos funcionales. Imagen adaptada de motores de búsqueda genéricos.

2. Proceso de bioconjugación: La nanopartícula con la superficie activa es sometida a la bioconjugación y para ello se pueden utilizar diferentes estrategias como son la adsorción física, la formación de enlaces covalentes que pueden ser directos o de forma indirecta mediante agentes como la estreptavidina, enlaces no covalentes como serían los enlaces de afinidad y las interacciones electrostáticas. En la **Figura 12** se muestra un ejemplo de estos procesos aplicados a un anticuerpo.¹³

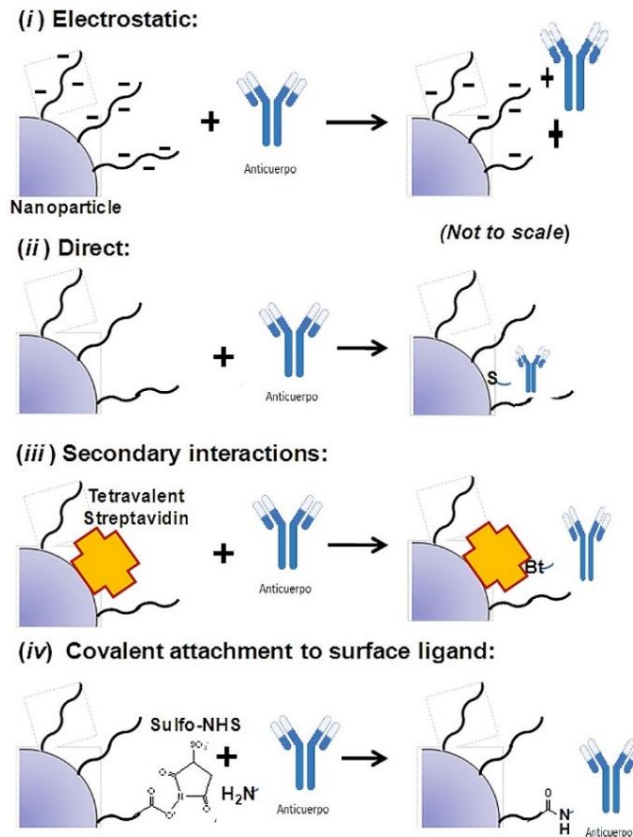


Figura 12 Procesos de bioconjugación de una nanopartícula con un anticuerpo. Figura extraída y adaptada de la Referencia 10.

Dado que en el presente trabajo se llevará a cabo la bioconjugación de anticuerpos a nanopartículas mediante unión covalente, estas se detallan a continuación. Las metodologías de bioconjugación a emplear serán las siguientes: N-(3-Dimetilaminopropil)-N-etilcarbodiimida (EDC)/ N-hidroxisuccinimida (NHS) y el empleo de divinilsulfona (DVS). En la **Figura 13** se adjunta un ejemplo genérico de la química empleada en la bioconjugación con EDC/NHS.¹⁴

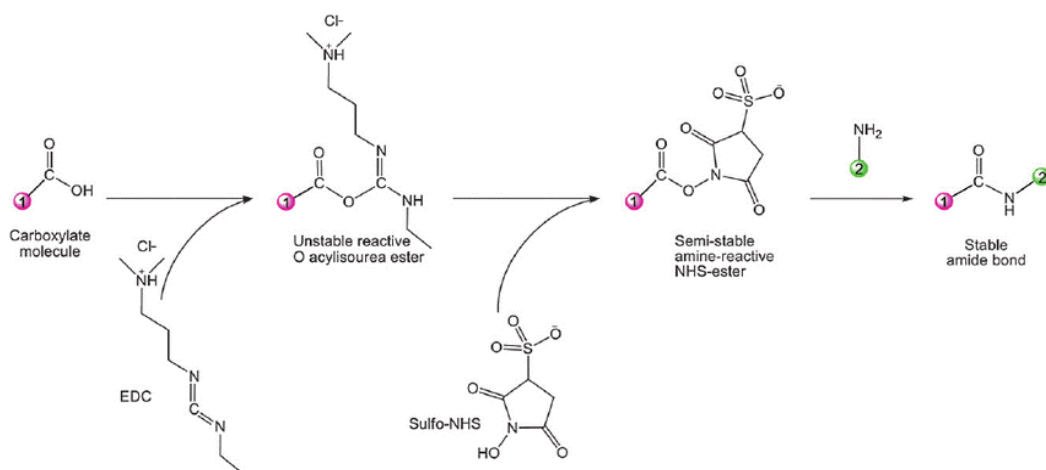


Figura 13 Proceso de bioconjugación de una molécula genérica, en este caso una carboxilada empleando la química EDC/NHS. Imagen extraída de la Referencia 12.

Como se observa en la **Figura 13** en un primer paso, los grupos carboxilos de la molécula, en nuestro caso la nanopartícula, son activados con la adición de EDC, formando un intermedio reactivo que reacciona con NHS para formar una amina reactiva con grupo carboxilo reactivo, el cuál reacciona con el grupo amino de los anticuerpos que queremos bioconjuguar a la nanopartícula para formar un enlace amida estable.

El otro agente empleado es la divinilsulfona (DVS). El empleo de DVS permite llevar a cabo uniones covalentes entre grupos amino e hidroxilo en condiciones de pH básico. No presenta fuerte carácter electrófilo, pero aporta acoplamientos suficientemente eficientes.¹⁵ En la **Figura 14** se adjunta un ejemplo de bioconjugación de nanopartículas mediante una vinilsulfona.

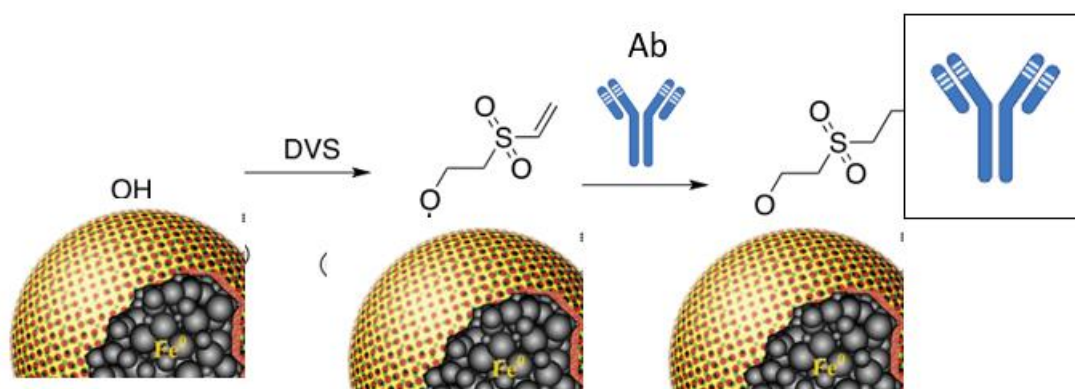


Figura 14 Protocolo de bioconjugación de nanopartículas de hierro con anticuerpo empleando DVS. Imagen adaptada de la Referencia 16.

Como podemos ver en la imagen, la superficie funcionalizada de la nanopartícula de hierro reacciona con la DVS, generando un intermedio que a su vez reacciona con los grupos amino del anticuerpo para producir la bioconjugación y poder llevar a cabo los posteriores ensayos de detección.

Abordando en concreto el caso de las nanopartículas, se debe tener en cuenta la influencia de factores como los presentes en la **Tabla 2**.¹³

Tabla 2 Factores influyentes en el proceso de bioconjugación de nanopartículas con diferentes agentes biológicos como proteínas o material genético. Información extraída de la Referencia 11.

Intrínsecos de la nanopartícula	Intrínsecos del medio de reacción	Interfase sólido-líquido	Interfase nanopartícula-agente biológico en cuestión
Tamaño, forma, área superficial	Moléculas de agua	Procesos de hidratación o deshidratación	Interacciones de membrana
Carga, porosidad, rugosidad	Ácidos y bases	Adsorciones	Interacciones receptor-ligando
Valencia y estado de oxidación	Sales e iones multivalentes	Formación de doble capa eléctrica	Procesos de transferencia de energía
Ligandos	Presencia de materia orgánica	Impedimentos estéricos	Cambios conformacionales

Cristalinidad y defectos estructurales	Surfactantes	Interacciones electrostáticas	Estrés oxidativo en biomoléculas
Carácter hidrófobo e hidrófilo	Polímeros	Agregación o dispersión	Interacciones inespecíficas
Grupos funcionales	Electrolitos	Interacciones hidrofílicas e hidrofóbicas	Efectos estructurales y efectos funcionales

Una vez se ha llevado a cabo la bioconjugación de la nanopartícula, es necesario realizar una caracterización de esta etapa, de manera que se pueda asegurar la eficiencia de esta. Diferentes parámetros tales como el tamaño, la forma y la carga de las nanopartículas tras la bioconjugación nos pueden aportar información sobre la eficiencia de ésta. En la **Tabla 3** se resumen una serie de ejemplos de diferentes técnicas de caracterización que se pueden emplear para corroborar la bioconjugación, algunas de las cuales han sido detalladas en el apartado 1.2.¹³

Tabla 3 Diferentes técnicas utilizadas para la caracterización y confirmación de la eficiencia bioconjugación de nanopartículas con agentes biológicos. Información extraída de la Referencia 11.

Tipo de técnica	Información obtenida	Ejemplos
Separación	-Confirma la bioconjugación -Radio dinámico, tamaño y distribución -Estado de agregación, aglomeración o dispersión -Pureza	HPLC, Separación por tamaños, Electroforesis, Ultracentrifugación, AF4-MS
Dispersión	-Confirma la bioconjugación -Estructura, morfología, tamaño y radio hidrodinámico -Estado de agregación o aglomeración	DLS, Difracción Rayos X, Raman
Microscopía	-Tamaño y forma -Caracterización de la composición de forma individual	SEM, TEM, AFM
Espectroscopía	-Confirma la bioconjugación -Relación media de bioconjugación -Concentración	UV/VIS, RMN
Térmicas	-Determina la cantidad de biomolécula bioconjugada y la estabilidad térmica	TGA, DSC

1.6. Aplicaciones de las nanopartículas en análisis clínicos.

Uno de los principales campos de aplicación de las nanopartículas está asociado al desarrollo de biosensores con fines de diagnóstico clínico. Muchos de ellos basados en el desarrollo de inmunoensayos selectivos

partiendo de NPs conjugadas como el que se recoge en el presente trabajo. Es por ello por lo que en la **Tabla 4** se recogen las aplicaciones centradas en el diagnóstico clínico y basadas en inmunoensayos.

Tabla 4 Diferentes tipos de inmunoensayos existentes clasificados según la necesidad de emplear o no marcadores.

Inmunoensayos sin marcadores	Inmunoensayos con marcadores
Inmunoprecipitación: en gel, doble inmunodifusión o radial	Fluoroimmunoanálisis homogéneo Enzimoimmunoanálisis homogéneo
Inmunoelectroforesis: simple, contrainmuno, bidimensional y tipo <i>rocket</i>	RIA (<i>Radioimmunoassay</i>): existen no competitivos y competitivos
Ensayos de aglutinación: directa, por inhibición o pruebas de Coombs	IRMA: ensayo de inhibición
Medidas de turbidez: inmunonefelometría e inmunturbidimetría	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA): puede ser directo, indirecto, sándwich, sándwich indirecto o competitivo
Ensayos de fijación del complemento: en una etapa mediante determinación del complemento o en dos etapas mediante determinación de Ag o Ab	Ensayo de flujo lateral

Se han desarrollado aplicaciones en técnicas de diagnóstico, producción farmacéutica, implantes o tratamientos con elevada toxicidad como quimioterapias.¹⁶

El avance de los tratamientos sanitarios y el surgimiento de nuevas enfermedades han propiciado la necesidad de la aparición de nuevas soluciones tecnológicas que permitan agilizar trámites, reducir costes y mejorar los diagnósticos de diferentes patologías clínicas con el objetivo de reducir la carga en los Sistemas de Salud. Con esta premisa la nanotecnología ha adquirido influencia en el campo de la medicina, permitiendo crear diferentes tipos de *tests* inmunológicos rápidos, baratos, sencillos y fáciles de utilizar.

2. OBJETIVOS.

Teniendo en cuenta las consideraciones anteriormente descritas, el presente trabajo se centra en la evaluación de diferentes nanopartículas para llevar a cabo la detección de la sarna sarcóptica. Esta es una enfermedad causada por el ácaro de la familia *Sarcoptidae* muy contagiosa que afecta a gran variedad de animales tanto domésticos como salvajes. Este ácaro puede transmitirse a humanos si están en contacto estrecho con el animal enfermo y puede desembocar en irritación de piel intensa debida a la hipersensibilidad de esta. Su contagio está relacionado con factores de predisposición como los económico-sociales además de la higiene. Aunque actualmente hay métodos analíticos que nos permiten la detección de este tipo de enfermedades, es

importante el estudio y desarrollo de nuevas metodologías de análisis que permitan el diagnóstico serológico para la detección de anticuerpos específicos frente a sarna sencillos, con alta sensibilidad y especificidad.¹⁷

En este sentido en el desarrollo de este TFM se ha buscado diseñar una estrategia de detección de anticuerpos de sarna mediante el desarrollo de un inmunoensayo con la evaluación de tres tipos de nanopartículas: magnéticas, fluorescentes de silicio y nanopartículas de oro.

Para la consecución de este objetivo general ha sido necesario llevar a cabo las siguientes actividades:

1. Evaluación y optimización de diferentes estrategias de bioconjugación de nanopartículas diferentes.
2. Aplicar diferentes técnicas analíticas para la caracterización estructural, morfológica y óptica de las nanopartículas.
3. Desarrollar un inmunoensayo modelo para su posterior aplicación a la detección cualitativa de sarna sarcóptica.

3. MATERIAL Y MÉTODOS.

A continuación, se detalla el equipamiento, materiales y reactivos utilizados en este trabajo:

3.1 Instrumentación y equipos de laboratorio.

- La realización de medidas volumétricas de diferentes cantidades para llevar a cabo los ensayos se realizó utilizando micropipetas Eppendorf de 10, 100 y 1000 μ L, 1, 5 y 10 mL.
- Los análisis de la eficacia de bioconjugación mediante electroforesis en gel se llevó a cabo utilizando un sistema de electroforesis BIO-RAD PAC300.
- Los procesos de ultrasonificación empleados en los protocolos de bioconjugación de nanopartículas de oro se llevaron a cabo mediante sistema de ultrasonidos PSELECTA.
- Los procesos de calentamiento y agitación aplicados en la fabricación de gel de agarosa, así como la preparación de *buffers* se llevaron a cabo utilizando un agitador-calefactor PSELECTA.
- Las medidas de absorbancia realizadas en los diferentes análisis se llevaron a cabo utilizando un espectrofotómetro Genesys 10s UV-VIS Thermo Scientific con Software VisionLite.
- Las medidas de absorbancia en los ensayos para la detección de sarna sarcóptica en placa de 96 pocillos de marca Thermo se realizaron utilizando un lector de placas MultiScan Sky High Thermo Scientific con Software SkanIt RE-6.1.1.
- Las medidas de fluorescencia, así como el registro de los espectros de emisión y excitación se llevaron a cabo utilizando cubetas de modelo Fisher Scientific y un espectrofotómetro de fluorescencia Cary Eclipse utilizando el Software homónimo.

- La realización de etapas de centrifugado se llevó a cabo utilizando la centrífuga mini-Spin-Eppendorf.
- La agitación de disoluciones se llevó a cabo utilizando el sistema vortex VELP-SCIENTIFICA
- Las etapas de incubación con agitación se llevaron a cabo utilizando un agitador Thermo-Shaker TS-100C bioSan.
- Las medidas y ajustes de pH en la preparación de *buffers* y en el estudio de la influencia del pH se realizaron utilizando un pHmetro Mettler Toledo Five-Easy.
- La pesada de reactivos, patrones y/o muestras se llevó a cabo utilizando una balanza analítica Mettler Toledo ME204.

3.2 Reactivos.

Los reactivos empleados en el presente trabajo son de pureza analítica y los *buffers* preparados se han llevado a cabo utilizando agua ultrapura Milli-Q. Además, se han empleado:

- Carbonato de sodio (Na_2CO_3), Cloruro sódico (NaCl), Cloruro potásico (KCl), Hidrogenofosfato de sodio (Na_2HPO_4), Hidrogenofosfato de potasio (K_2HPO_4), Tris-(hidroximetil)-aminometano, Ácido bórico, Ácido Etilendiamíntetracético (EDTA) empleados para la preparación de diferentes *buffers* pertenecen a Sigma-Aldrich.
- Agarosa ($\text{C}_{24}\text{H}_{38}\text{O}_{19}$) y Sacarosa ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$) empleados para los geles de electroforesis de Seakem y Sigma-Aldrich respectivamente.
- Divinilsulfona (DVS), N-hidroxisuccinimida (NHS) y N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC) empleados para los procesos de funcionalización y bioconjugación fueron suministrados por Sigma-Aldrich.
- Anticuerpo Anti-Mouse IgG (γ -chain specific)-Peroxidase Ab y Anticuerpo Monoclonal Anti-Glutathione-S-Transferase Ab, y Antígeno GST empleados en los procesos de bioconjugación y realización del ensayo fueron suministrados por Sigma-Aldrich.
- Ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), 3-aminopropiltriétoxissilano (APTES) utilizados para la síntesis de SiNDs de Sigma-Aldrich.
- Fluoresceína ($\text{C}_{20}\text{H}_{12}\text{O}_5$) empleada junto con los anteriormente mencionados EDC y NHS para el marcaje de anticuerpo fue suministrada por la empresa Sigma-Aldrich.

3.3 Nanopartículas.

Tres tipos de nanopartículas fueron evaluadas para su posible aplicación en el desarrollo del inmunoensayo para la detección cualitativa de sarna sarcóptica: nanopartículas magnéticas, nanopartículas fluorescentes y nanopartículas de oro.

3.3.1. Nanopartículas magnéticas (MNPs).

Gracias a la colaboración con el grupo de investigación NanoBioAp (Nanoparticles for Bioapplications) se evaluó la posibilidad de utilizar nanopartículas magnéticas de hierro sintetizadas por dicho grupo como alternativa para el desarrollo del inmunoensayo de detección de anticuerpos sarna sarcóptica. En primer lugar, se llevó a cabo la caracterización morfológica de estas nanopartículas. Para ello se utilizó la técnica de DLS de manera que se puede, de forma preliminar, conocer el tamaño de las NPs sintetizadas. Posteriormente se utilizó el microscopio electrónico de transmisión, TEM, para conocer tamaño, forma y distribución.

A continuación, se planteó un protocolo de bioconjugación de las nanopartículas mediante la inmovilización covalente de un anticuerpo genérico (IgG) empleando DVS para la bioconjugación del anticuerpo a la nanopartícula. Para evaluar el proceso de bioconjugación se prepararon diferentes geles de electroforesis.

El proceso de bioconjugación se llevó a cabo en viales de vidrio de 500 μL de aforo. Para ello se incuban 200 μL de MNPs de concentración 13 μM junto a 2.5 μL de DVS 99% en *buffer* de carbonato a pH 12 con una concentración de 0.5M. La incubación se realizó a temperatura ambiente, siguiendo un protocolo que exige 6 horas de agitación constante empleando para ello un agitador orbital rotatorio. Las nanopartículas magnéticas presentan tendencia a agregarse, perdiendo su estabilidad, por lo tanto, se adicionó a los viales una cantidad de 25 μL de Tween 20 al 0.05 % con el objetivo de reducir la agregación magnética de las nanopartículas y favorecer su bioconjugación. Posteriormente se realizó un lavado de las MNPs empleando un *buffer* de PBS 10 mM a pH 7.4. Para ello se posibilita su retención utilizando una gradilla magnética. El sobrenadante se elimina y se adicionan 200 μL de *buffer* salino de fosfato (PBS). Este proceso se repite tres veces. Se ensayaron diferentes relaciones de anticuerpo/nanopartículas para llevar a cabo la bioconjugación de 3:1, 5:1 y 10:1. Una vez finaliza la incubación, las MNPs se lavan tres veces con PBS 10 mM a pH 7.4 empleando una gradilla magnética lo que facilitó la retirada de sobrenadante entre cada lavado. Finalmente, las MNPs bioconjugadas se resuspendieron en un volumen final de 200 μL del *buffer* PBS 10 mM de idéntico pH al anterior. Este proceso se muestra en la **Figura 15**.

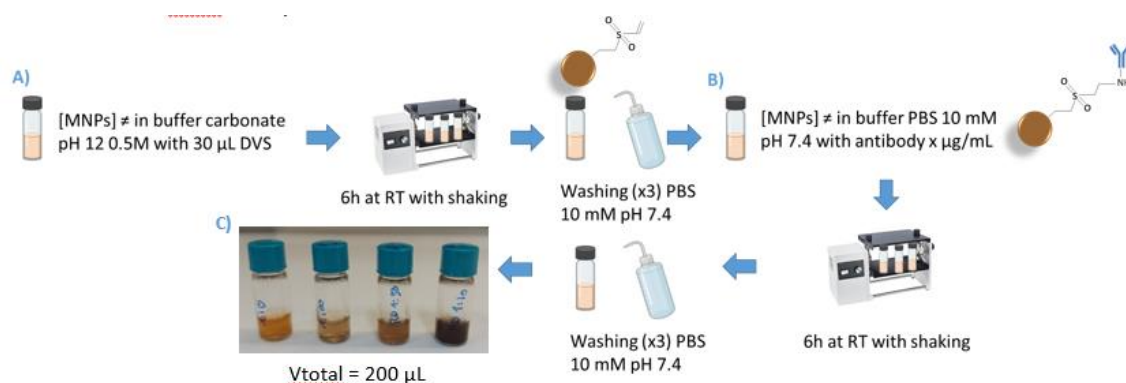


Figura 15 Protocolo de bioconjugación de MNPs a anticuerpo empleado en el presente TFM.

La eficiencia de la bioconjugación de las nanopartículas se evaluó mediante gel de electroforesis. Para realizarlo, se preparó un gel con 1% de agarosa y *buffer* tris borato-EDTA (TBE) 0.5 x a pH 8.2 como *buffer* del proceso de electroforesis. Se aplicó un voltaje de 150 V durante 30 minutos con inyección de 7 μ L de muestra por pocillo. Finalizado el tiempo de electroforesis se compararon los desplazamientos de las MNPs sin bioconjugar, funcionalizadas con DVS y bioconjugadas con el anticuerpo con el objetivo de comprobar una diferencia de desplazamiento entre las diferentes muestras. El proceso llevado a cabo no aportó suficiente información como para asegurar la bioconjugación debido a las propiedades magnéticas de las nanopartículas, que derivaron en una tendencia a la formación de agregados en los diferentes pocillos y presentar diferentes avances similares bajo la aplicación de un campo eléctrico.

Con el objetivo de solucionar este inconveniente se propuso realizar un marcaje del anticuerpo utilizando fluoresceína de manera que se pueda apreciar si se encuentra bioconjugado con las nanopartículas o libre, apreciando diferentes bandas en cada caso.

Este ensayo se realizó utilizando anticuerpo genérico IgG de concentración 0.25 mg/mL. Para ello se pesaron 0.1 mg de fluoresceína y se disolvieron en 1 mL de PBS 10 mM a pH 7.4. Posteriormente se realiza una dilución 1:10 de fluoresceína para realizar el marcaje del anticuerpo.

A continuación, se pesaron 19 mg de EDC y 22 mg de NHS, reactivos encargados del proceso de marcaje del anticuerpo con fluoresceína. Luego se adicionó la disolución de fluoresceína sobre el EDC y se mantuvo en agitación controlada por un tiempo de 15 minutos. Es conveniente llevar a cabo estas etapas de forma rápida para evitar la hidrólisis de los reactivos.

Finalizada la agitación, se adicionaron los 22 mg de NHS, se agitó vigorosamente con un vórtex y se adicionaron 100 μ L de anticuerpo genérico de concentración 0.25 mg/mL. La disolución se dejó mediante agitación durante un tiempo aproximado de 1 hora a temperatura ambiente.

Una vez se ha llevado a cabo el marcaje del anticuerpo, se llevó a cabo su bioconjugación siguiendo el protocolo descrito anteriormente y esquematizado en la **Figura 15**. Con el fin de evaluar la eficiencia de la bioconjugación se llevó a cabo una separación electroforética, siendo necesario optimizar los parámetros de porcentaje de agarosa, tiempo, voltaje, concentración y/o volumen de nanopartículas como paso previo a la separación de las NPs bioconjugadas de las que no.

Las condiciones más adecuadas para la separación de estas NPs de Fe fueron las que se detallan a continuación: se preparó un gel con 1% de agarosa en TBE 0.5x, *buffer* de TBE 1x durante 30 minutos y 100 voltios y se inyectaron 7 μ L de muestra en los pocillos del gel tal y como se muestra en la **Figura 16**.

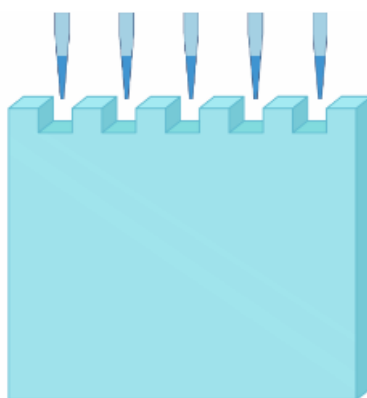


Figura 16 Modo de operación de electroforesis en gel realizada mediante la inyección de diferentes volúmenes. Imagen extraída de Biorender.

A continuación, se muestra la forma de llevar a cabo este proceso:

Tabla 5 Cantidades y compuestos empleados en la realización del gel de electroforesis para demostrar la eficacia del proceso de bioconjugación y del marcado de anticuerpo con fluoresceína.

POCILLO	COMPUESTO Y CANTIDAD INYECTADA
1	7 μ L de fluoresceína 0.1 mg/mL
2	
3	7 μ L de MNP's (13 μ M) + 2.5 μ L de DVS
4	(99%)
5	7 μ L de IgG (0.25 mg/mL) marcado
6	
7	7 μ L de MNP's (13 μ M) + 2.5 μ L de DVS
8	(99%) + 100 μ L de IgG marcado (0.25 mg/mL)

3.3.2. Silicon nanodots (SiNDs).

Otro tipo de nanopartículas evaluadas en este trabajo para su posible utilización en el desarrollo del inmunoensayo para la detección de anticuerpos de sarna sarcóptica fueron los SiNDs. Se decidió utilizar este tipo de nanopartícula fluorescente por su fácil síntesis y su buen rendimiento cuántico.

En primer lugar, se llevó a cabo la síntesis de los SiNDs atendiendo al protocolo descrito en la bibliografía.¹⁸

Para ello se pesaron 0.193 g de ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), agente que aporta carbono a la estructura de la nanopartícula y se disuelven en un volumen de 8 mL de H₂O ultrapura. Esta disolución se somete a corriente de N₂ de modo que se produzca la desoxigenación de esta durante 30 minutos.

Posteriormente se añadieron 2 mL de 3-aminopropiltriethoxisilano (APTES) a la disolución, agente que aporta el silicio y grupos amino a la superficie de la nanopartícula. A continuación, se agita la mezcla resultante durante 10 minutos con atmósfera de N₂.

La síntesis de las nanopartículas se produce en una bomba hidrotermal de 50 mL de capacidad y tiene lugar mediante calentamiento a 160 °C durante 12 horas en un horno. Tras esta etapa, se lleva a cabo la purificación de las nanopartículas. Para ello, las nanopartículas se dializan empleando una membrana de diálisis de 1 KDa durante un proceso de diálisis de 24 horas produciéndose la ósmosis a través de la membrana.

Para la caracterización de los SiNDs se ha centrado el trabajo en realizar un estudio del pH, de la fuerza iónica y un estudio de estabilidad. Los resultados se muestran en el apartado 4.2.1, 4.2.2, 4.2.3 y 4.2.4 respectivamente.

3.3.3. Nanopartículas de oro (AuNPs)

La tercera alternativa evaluada en este trabajo fue la de utilizar nanopartículas de oro comerciales para el desarrollo del inmunoensayo. En este caso se planteó el uso de nanopartículas de oro de un tamaño de 30 nm. Se decidió emplear unas nanopartículas comerciales para asegurar la reproducibilidad de los experimentos. Las nanopartículas adquiridas fueron de la casa comercial *Cytodiagnosics*.

En primer lugar, se comprobó que las nanopartículas estaban en condiciones adecuadas para su uso, y los valores de las diferentes características eran coherentes con la certificación del producto. Para ello se comprobó mediante medida por DLS que el tamaño de las AuNPs era de 30 nm y que durante su envío y almacenamiento en el laboratorio hasta su uso no se habían agregado. Mediante DLS se comprobó el radio hidrodinámico y el índice de polidispersidad de las AuNPs. Para ello se emplea una cubeta de 4 caras, agua MiliQ y un equipo de DLS con Software ZetaSizer. Como dispersante se utiliza el agua y se mantienen las condiciones por defecto del equipo salvo la celda, que se elige en función de la que se emplee. Se obtiene un radio hidrodinámico lineal de 55.05 nm y un índice de polidispersidad (PDI) de 0.111, valores muy próximos a los aportados por el fabricante, lo que permite asegurar que el estado de las nanopartículas es correcto y preparadas para su utilización. También se registró el espectro de absorbancia de las nanopartículas. El espectro de absorbancia se obtiene registrando un blanco como *Baseline* empleando H₂O ultrapura (ya que es el disolvente en el que se han sintetizado las nanopartículas). Se establece un rango de medida entre 400 y 800 nm por intervalos de 5 nm en 5 nm. El valor obtenido es de 525 nm, idéntico al aportado por el fabricante. De esta manera se contrastaron los datos aportados por el fabricante.

A continuación, se estudió la estrategia de bioconjugación de las nanopartículas de oro. En primer lugar, se realiza la preparación de los siguientes *buffers*:

A. Buffer de PBS 1x: a partir de una disolución de PBS existente 5x, se realizan los cálculos correspondientes y se preparan 50 mL de *buffer* PBS 1x.

B. Buffer de PBS 1x con Tween20 0.05%: se prepara una disolución de PBS 1x y se añade un volumen de 25 μ L de Tween20.

Ambos *buffers* se deben ajustar a un pH de 7.4.

C. Buffer de ácido 2-N-morfolinoetanosulfónico (MES): para realizar este *buffer* en un volumen de 50 mL se miden aproximadamente 35 mL de H₂O MiliQ y se adicionan 97,6 mg de MES. Se ajusta el pH a 5.5 y se enrasa a un volumen final de 50 mL.

D. Buffer de PBS con albúmina de suero bovino (BSA) 1%: se trata de un *buffer* creado para utilizar la BSA como agente bloqueante evitando interacciones inespecíficas. Para ello, se pesan 0.5 g de BSA y se disuelven en un volumen de 50 mL de agua Mili-Q. Esta disolución es aconsejable prepararse al realizar el protocolo.

Se prepara una disolución de EDC (33 mg/mL) y NHS (36 mg/mL) en MES. Posteriormente en tubos Eppendorf de 1.5 mL se resuspenden 10 μ L de AuNP's en 10 μ L de esta disolución. La mezcla se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente y con buena agitación (aproximadamente 800 rpm).

Finalizada la incubación, se adiciona 1 mL de PBS con Tween 20 al 0.05% preparado anteriormente y se agita vigorosamente mediante vórtex. La mezcla se centrifuga a 8900 rpm durante 30 minutos.

A continuación, se procede a retirar el sobrenadante de manera que se eliminen los reactivos empleados en la bioconjugación que estén en exceso. Se adicionan 10 μ L de Anticuerpo Anti-GST (Glutación S-Transferasa) de concentración 1 mg/mL. Este anticuerpo se va a utilizar durante toda la optimización de la bioconjugación ya que el anticuerpo de la sarna no es comercial y su disponibilidad es limitada. La mezcla se incuba a temperatura ambiente durante 4 horas y agitación constante a 800 rpm.

Pasado el tiempo de incubación, se adiciona de nuevo 1 mL de PBS con Tween 20 al 0.05% y se procede a realizar un segundo lavado. Se centrifuga durante 30 minutos a 8200 rpm y se elimina el sobrenadante.

El pellet de AuNPs resultante se resuspende en 500 μ L de PBS-BSA 1% y se deposita en nevera listo para su empleo. El PBS-BSA 1% se utiliza para bloquear la superficie de las nanopartículas y evitar uniones inespecíficas.

Este procedimiento se realiza de manera análoga tanto para la bioconjugación del anticuerpo como para el antígeno.

A modo resumen se adjunta en la **Figura 17** un esquema representativo del proceso de bioconjugación realizado.

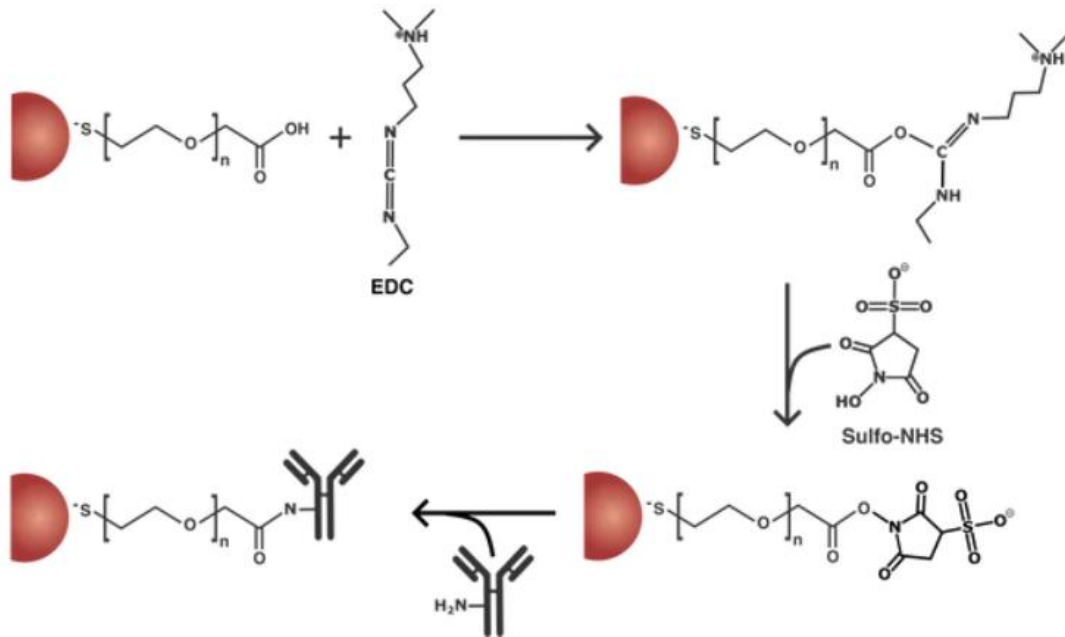


Figura 17 Esquema del procedimiento de bioconjugación llevado a cabo en las nanopartículas comerciales. Imagen extraída de la casa comercial Cytodiagnosics.

Con el objetivo de obtener una demostración de que el proceso de bioconjugación llevado a cabo es efectivo se realiza una electroforesis en gel de agarosa.

Para ello, se prepara el gel de agarosa 1% en TBE 0.5x a pH 8.2 de manera que 1 gramo de agarosa se disuelve en un volumen de 100 mL de TBE y se coloca bajo agitación-calefacción. Posteriormente se pone en marcha la electroforesis con las condiciones de colocar el gel en *buffer* TBE 1x, 100 voltios y un tiempo de 45 minutos.

Para llevar a cabo este inmunoensayo se utiliza una placa de 96 pocillos que se muestra en la **Figura 18**.

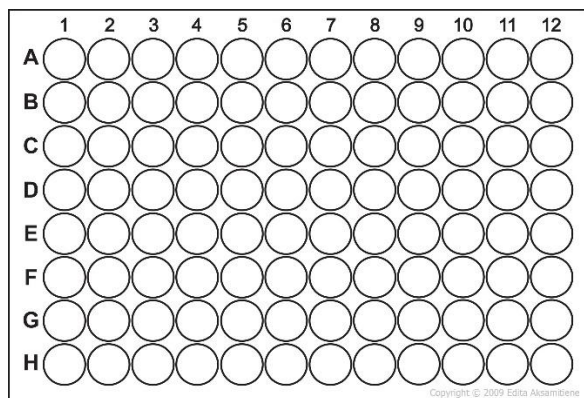


Figura 18 Esquema de placa de 96 pocillos utilizado en el ensayo colorimétrico.

La propuesta metodológica cuando se utilizan AuNPs es un ensayo de agregación colorimétrico en el que se coloquen las nanopartículas bioconjugadas con el antígeno (se utiliza la proteína GST al tener estructura semejante al antígeno de la sarna, pero con mayor facilidad de obtención debido a la disponibilidad comercial tanto de la proteína como de los anticuerpos específicos de GST) y las nanopartículas de oro bioconjugadas con el anticuerpo específico a esta proteína. Se les adiciona anticuerpo policlonal (presenta varios sitios de

unión) en volúmenes crecientes para facilitar la agregación de las nanopartículas. En cuyo caso el espectro de absorbancia se desplazará, afectando a su longitud de onda y por tanto influyendo en el color debido a que cada longitud de onda produce la reflexión de la luz diferente. En este caso el color rojo intenso de las AuNPs sufriría una modificación hacia colores más oscuros como tonos azulados o negros al adquirir un estado de agregación.

4. Resultados y discusión.

4.1. Nanopartículas magnéticas.

4.1.1. Caracterización previa.

Se llevó a cabo una caracterización mediante DLS y TEM para poder asegurar que las condiciones de las nanopartículas eran adecuadas y se podría realizar los consiguientes ensayos. El resultado del TEM se muestra en la **Figura 19**.

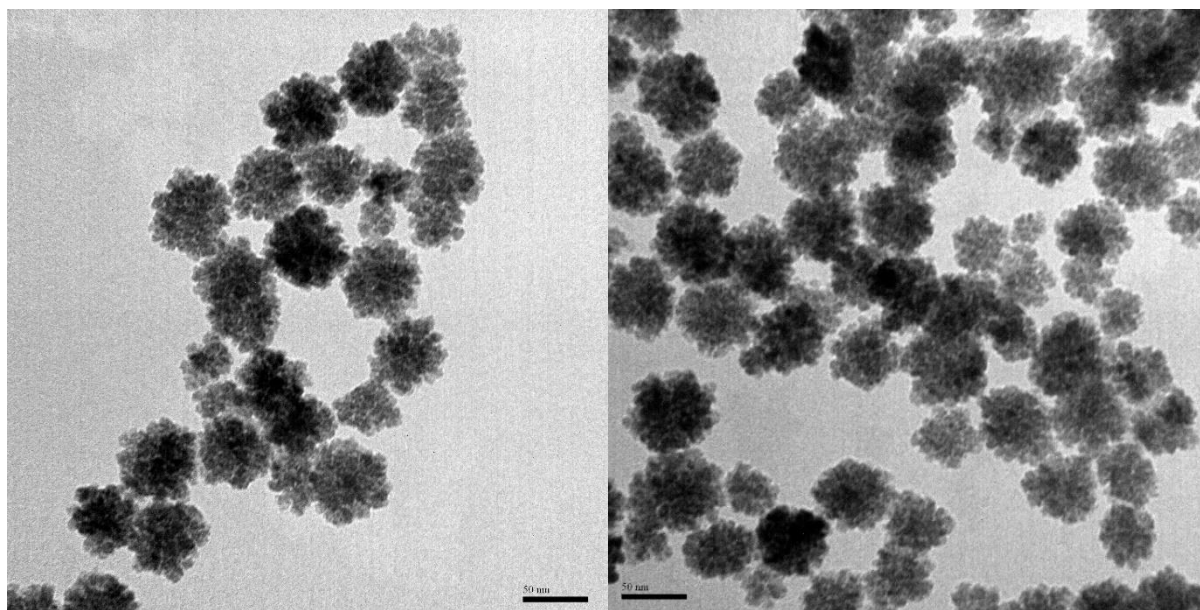


Figura 19 Imagen real obtenida mediante TEM de las nanopartículas magnéticas empleadas en el presente trabajo. Servicios científico-técnicos de la Universidad de Oviedo.

Como podemos ver en la imagen, el tamaño de las nanopartículas empleadas es de 50 nm. Además, se observa que no forman agregados y se mantienen dispersas en la muestra.

A continuación, se analizaron las MNPs mediante DLS. Los resultados obtenidos acerca de la distribución de tamaño respecto a la intensidad se muestran en la **Figura 20**.

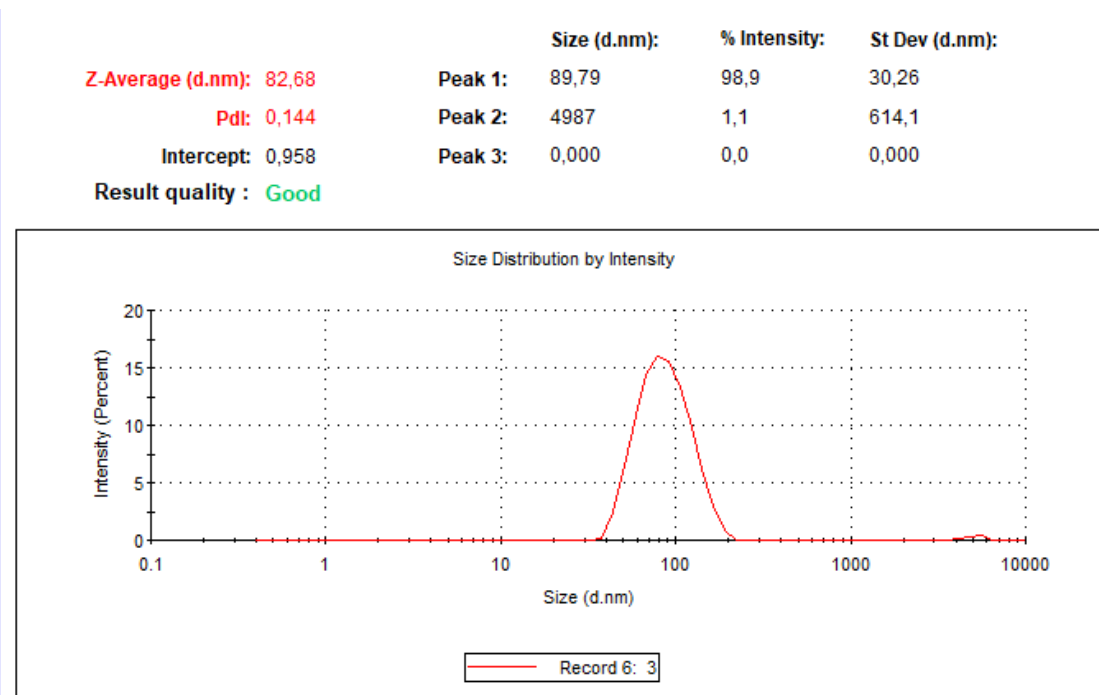


Figura 20 Gráfica obtenida por DLS de las nanopartículas magnéticas empleadas en el presente trabajo.

Estos resultados indican que estos nanomateriales presentan un tamaño medio de 81 nm además de un índice de polidispersidad, PDI de 0.144, considerándose a priori como adecuados para llevar a cabo el proceso de bioconjugación.

4.1.2. Proceso de bioconjugación

El proceso de bioconjugación de las nanopartículas magnéticas se llevó a cabo utilizando el procedimiento empleando DVS.

A 200 μL nanopartículas magnéticas de concentración 13 μM se les añade *buffer* carbonato para asegurar que los grupos hidroxilo de su superficie se encuentran protonados, a continuación, se les añade 30 μL de DVS al 99%, agente empleado para este proceso debido a que aporta un grupo funcional diferente al de mecanismos más comunes como el EDC/NHS. Posteriormente se llevó a cabo la incubación durante 6 horas empleando un agitador orbital rotatorio y se realizaron lavados utilizando PBS para eliminar exceso de nanopartícula o DVS que haya quedado sin bioconjugarse y evitar así interacciones inespecíficas. Una vez se realizaron los lavados correspondientes se adiciona el anticuerpo, en este caso un anticuerpo genérico Anti-GST de concentración 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para llevar a cabo el ensayo y se dispuso una segunda etapa de incubación durante 6 horas con el consiguiente lavado con PBS. Finalmente se obtuvieron 200 μL de las nanopartículas de diferente concentración (lo que explica las diferencias de intensidad de color que se pueden ver en la imagen). Para obtener las diferentes concentraciones se partió de la concentración 13 μM y se realizaron diluciones

correspondientes en PBS. Con el objetivo de demostrar la efectividad del proceso de bioconjugación se llevó a cabo la técnica de electroforesis en gel.

4.1.3. Electroforesis en gel.

Se realizó una electroforesis en gel de las nanopartículas magnéticas tanto bioconjugadas como sin bioconjugar. Los resultados se adjuntan en la **Figura 21**.

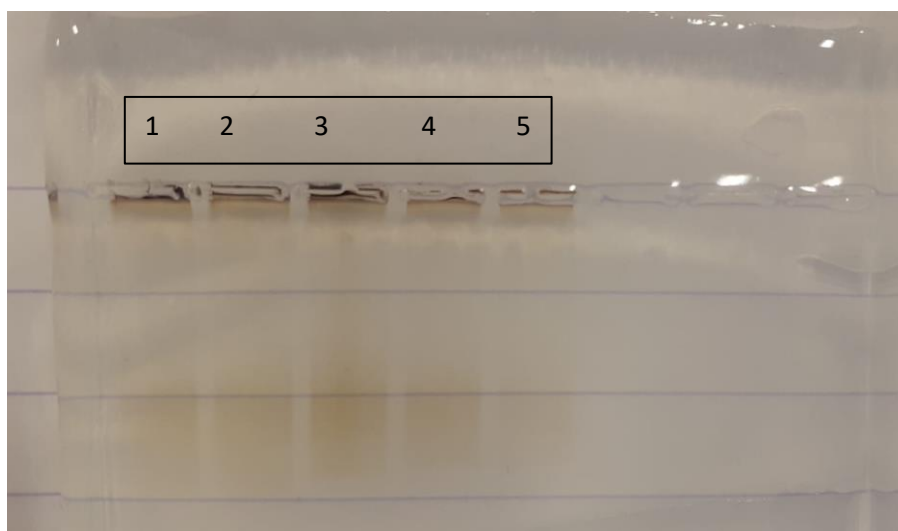


Figura 21 Electroforesis en gel de nanopartículas de diferentes concentraciones sin bioconjugar y bioconjugadas realizado en el laboratorio. De izquierda a derecha: MNPs 13 μ M sin bioconjugar (1 y 2), bioconjugadas (3), MNPs 1 μ M sin bioconjugar (4) y bioconjugadas (5). Fotografía llevada a cabo con teléfono móvil personal.

Como se puede ver en la figura adjunta, las dificultades provenientes de someter una especie con carácter magnético a la acción de campo eléctrico impidieron de forma efectiva poder asegurar que el proceso de bioconjugación fue efectivo, apreciando diferencias muy reducidas que no permiten concluir un resultado aceptable. Para ello la solución fue realizar un marcaje con un compuesto fluorescente, como es la fluoresceína.

El marcaje se realizó de la forma indicada en el apartado 3.3.1. Posteriormente se sometió al mismo proceso de bioconjugación y se realizó una electroforesis en gel de agarosa con las condiciones anteriormente descritas. Los resultados se adjuntan en la **Figura 22**.

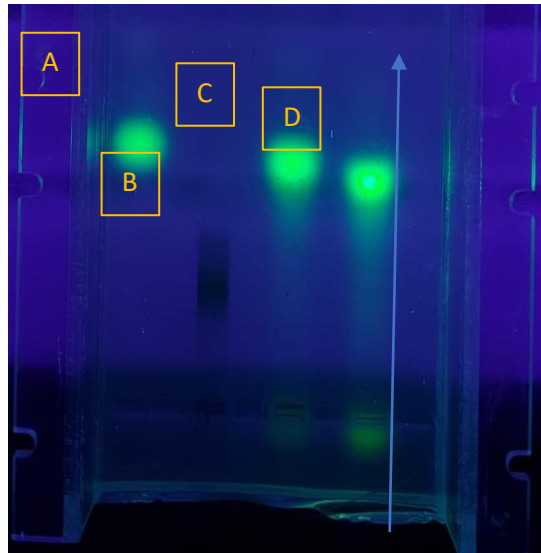


Figura 22 Gel de electroforesis sintetizado en el laboratorio para demostrar la eficacia del proceso de bioconjugación así como del marcado de anticuerpo llevados a cabo. A corresponde a fluoresceína 0,1 mg/mL (B) se trata de nanopartículas magnéticas bioconjugadas con DVS sin marcaje, (C) es el anticuerpo genérico de concentración 0.25 mg/mL y finalmente (D) es la inyección de nanopartículas bioconjugadas con DVS y anticuerpo genérico.

Centrándose en la imagen se pueden apreciar diferencias en el desplazamiento en cada una de las muestras de los diferentes pocillos del gel además de la eficacia del marcado, lo que nos permite ser capaces de vislumbrar mejor los resultados obtenidos. La electroforesis en gel separa los compuestos por tamaño y carga y se puede ver como la fluoresceína ha realizado un avance notable (ver **Figura 22 A**), mientras que el anticuerpo marcado con fluoresceína, al cambiar la carga y el tamaño sufre mayor retención en los poros del gel y realiza un avance menor (ver **Figura 22 C**). En cuanto a las nanopartículas sin marcaje se puede apreciar que los problemas persisten cuando se introducen nanopartículas con propiedades magnéticas en campos eléctricos ya que se desestabilizan y tienden a formar agregados que impiden obtener un avance homogéneo. Las dificultades acaecidas por el uso de nanopartículas magnéticas fueron un problema durante todo el proceso de elaboración del presente trabajo, por lo que se decidió avanzar en la investigación evaluando otro tipo de nanopartículas.

4.2. SiliconNanodots (SiNDs)

4.2.1. Espectro de excitación-emisión

El espectro de absorbancia de los SiNDs presenta un máximo a 313 nm. Del mismo modo el espectro de emisión se registró obteniendo un pico a 435 nm y el de excitación muestra un máximo a 350 nm registró obteniendo un pico a 435 nm y el de excitación sobre 350 nm. Los espectros de excitación y emisión se muestran en la **Figura 23**.

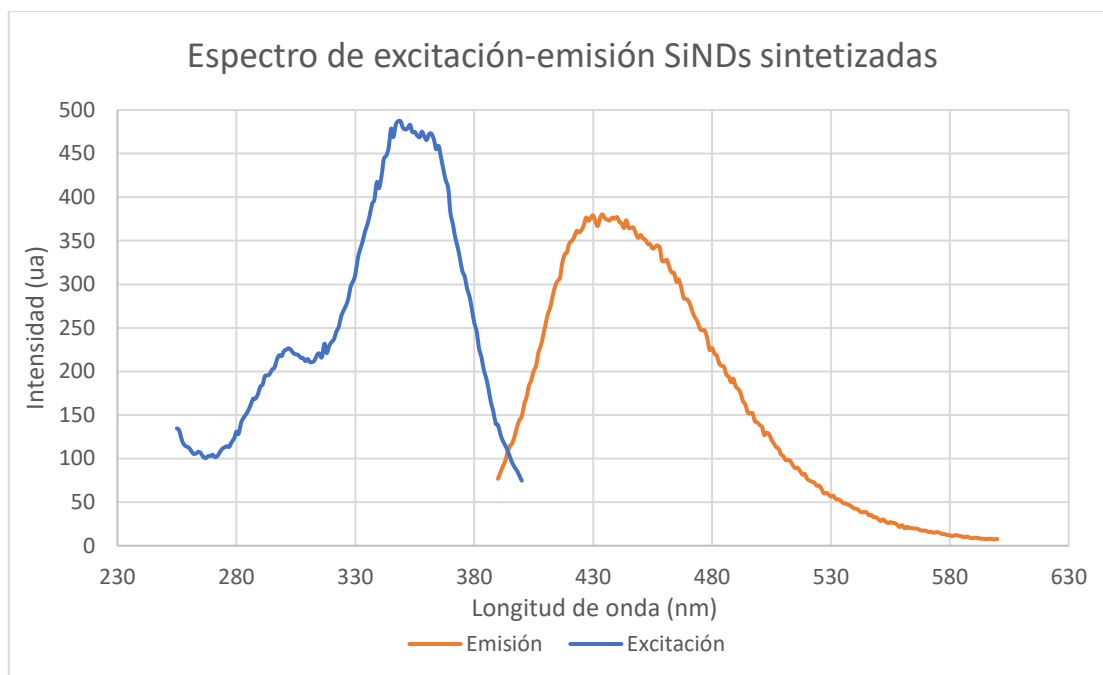


Figura 23 Espectros de excitación-emisión registrados para las SiliconNanoDots sintetizadas en el presente trabajo. Se determina un máximo de excitación en 350 nm y un máximo de emisión en 436 nm.

Como se puede ver, los espectros de excitación-emisión permitieron obtener valores de longitudes de onda de excitación y emisión próximos a los valores teóricos con 350 nm para el máximo del espectro de excitación y 436 nm para el de emisión.

Tras la caracterización fluorescente de las NPs de Si, se procedió a llevar a cabo estudios de estabilidad de las nanopartículas.

4.2.2. Estudio de estabilidad SiNDs

Conociendo el valor de longitud de onda de fluorescencia de los SiNDs se aprovecha el modo “Cycle Mode” y se colocan 50 μ L de SiNDs en un volumen de 1 mL de agua MiliQ para comprobar su estabilidad de fluorescencia con el tiempo. Posteriormente se realizan 30 medidas de fluorescencia de la muestra en un intervalo de 10 minutos cada uno para comprobar su estabilidad durante 30 minutos. Los espectros obtenidos presentan valores de intensidad prácticamente semejantes lo que es indicativo de la estabilidad de fluorescencia este tipo de nanopartículas (de no ser estables, estos valores de intensidad serían variables). Por otro lado, se decidió guardar la solución de nanopartículas en oscuridad para su posterior medida de fluorescencia cada 7 días al objeto de tener mayor conocimiento de la estabilidad de fluorescencia de estas partículas con el tiempo. El espectro obtenido se adjunta en la **Figura 24**. Durante un tiempo total de 4 horas se establecieron medidas y registros del espectro cada 30 minutos, obteniendo un total de 8 medidas en este ensayo.

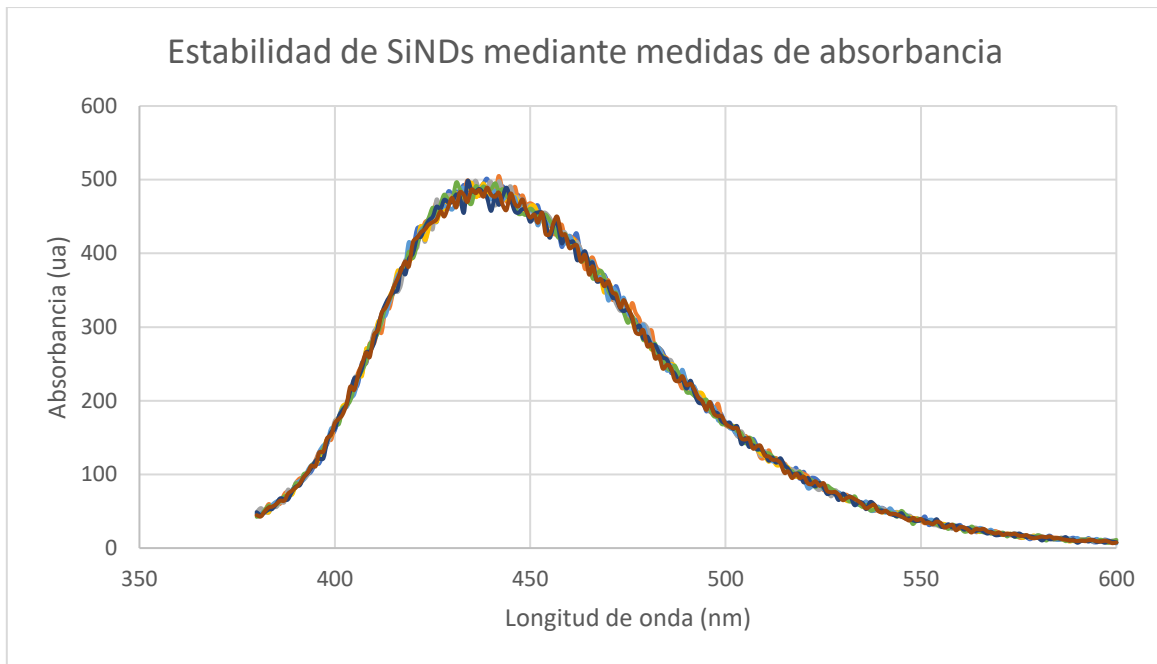


Figura 24 Conjunto de espectros UV/VIS obtenidos para determinar la estabilidad de las SiNDs mediante 8 medidas efectuadas cada 30 minutos durante un intervalo temporal de 4 horas.

En vista a los resultados se alcanzó una conclusión satisfactoria y es que durante, al menos 4 horas, la intensidad de absorbancia máxima no ha variado significativamente, lo que denota una estabilidad de las nanopartículas empleadas y nos permiten considerar que puedan ser empleadas para la realización del ensayo. Es aconsejable realizar este tipo de medidas de estabilidad en largos periodos de tiempo, pero no fue posible debido a limitaciones temporales.

El siguiente paso de caracterización de las SiND's fue estudiar la influencia del pH del *buffer* y de la concentración salina del mismo.

4.2.3. Estudio de la influencia del pH.

Otro parámetro para estudiar en relación con la estabilidad de fluorescencia de los SiNDs sintetizados fue la influencia del pH. Para llevar a cabo este estudio se prepararon *buffers* de PBS 10 mM con diferentes valores de pH entre 5.8 y 8. En concreto *buffers* de 5.8, 6, 6.5, 7.4 y 8 utilizando soluciones de NaOH y ácido clorhídrico para regular el pH.

En la cubeta se adicionó 1 mL de *buffer* PBS a distintos pH y 50 μ L de SiNDs y se registró el espectro de excitación. A continuación, se registraron los espectros de fluorescencia de los SiNDs a distintos pH dentro del rango fisiológico. Se decidió estudiar la estabilidad de las nanopartículas en este intervalo de pH ya que en el desarrollo del inmunosensor se trabajará a pH fisiológico. No obstante, los resultados obtenidos en este estudio de estabilidad revelaron que la intensidad de fluorescencia de las nanopartículas se veía afectada por el pH de trabajo.

Los datos obtenidos en este estudio demuestran que la intensidad de fluorescencia de los SiNDs sintetizadas se ve muy afectada para cambios de pH pequeños. En la **Figura 25** se recoge el espectro registrado a diferentes pH para los SiNDs.

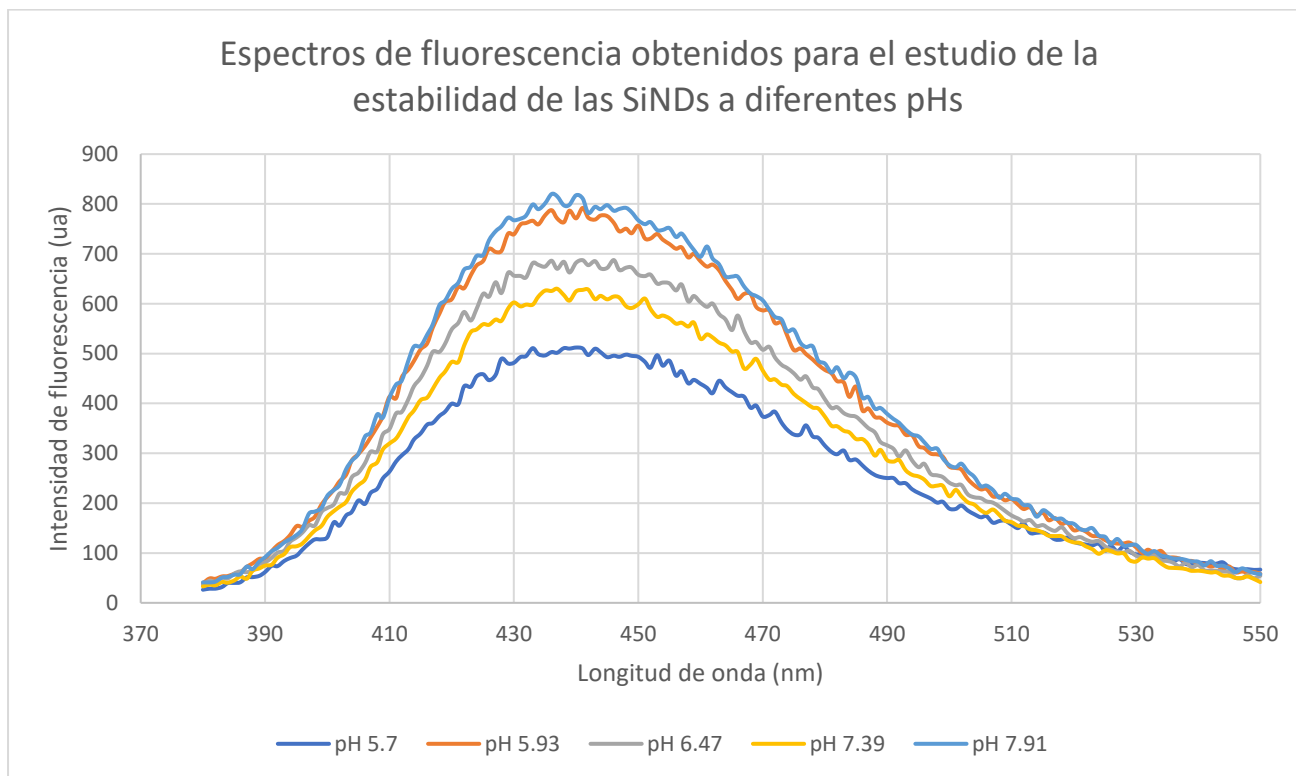


Figura 25 Conjunto de espectros UV/VIS obtenidos tras el estudio de la influencia del pH en los buffers en los que se encuentran los SiND's sintetizados con el objetivo de optimizar el valor óptimo (aquel que arroje un mayor valor de intensidad). La leyenda indica los diferentes valores de pH evaluados.

Los resultados mostrados en la **Figura 25** en la parte superior nos indicaron que el pH óptimo de trabajo para estas nanopartículas es el más básico, a 7.91. También se obtuvo un resultado relativamente anómalo en el valor de pH 5.93, alto para lo que la tendencia arroja la influencia del pH en la fluorescencia de las NPs.

La **Figura 26** muestra a modo de diagrama de barras los cambios ligeros de pH que provocan las diferencias significativas en la intensidad de fluorescencia de las nanopartículas. Esto es indicativo de una baja estabilidad de fluorescencia ya que al variar el pH en un rango pequeño la intensidad de fluorescencia cambia notablemente. Estos resultados nos hacen plantearnos la imposibilidad de utilizar este tipo de nanomateriales para el desarrollo del inmunosensor. Para comprobar estas desviaciones se procedió a estudiar la influencia de otro parámetro como es la fuerza iónica.

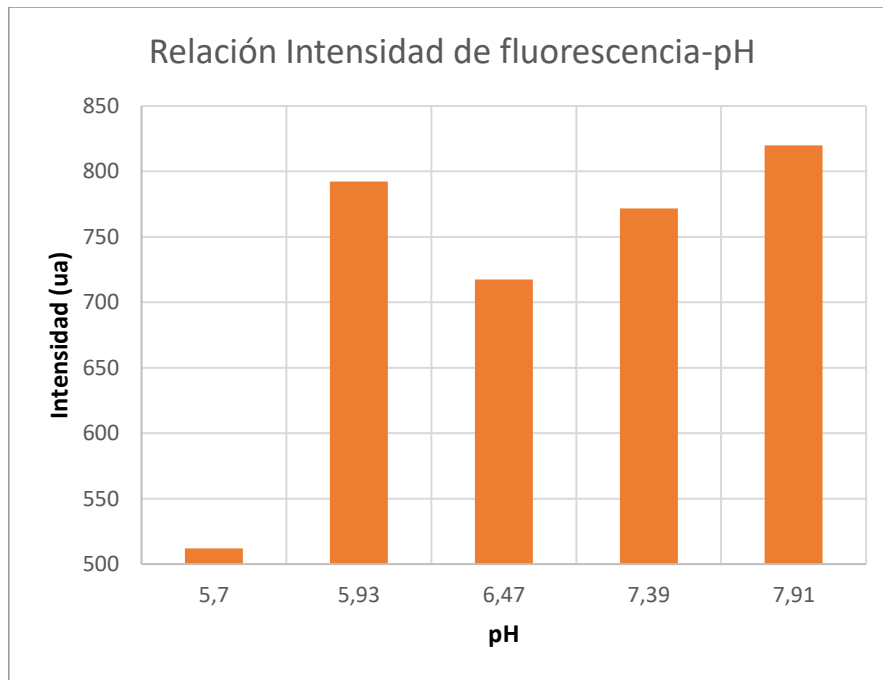


Figura 26 Diagrama de barras que demuestra el aumento lineal de la absorbancia de las SiNDs conforme el pH se torna más básico con la excepción del valor a 5.93.

4.2.4. Estudio de la influencia de la fuerza iónica.

La estabilidad de la fluorescencia de los SiNDs también fue evaluada teniendo en cuenta la fuerza iónica del medio. De idéntico modo al apartado anterior, se prepararon diferentes *buffers* de PBS variando las concentraciones entre 8, 4, 2 y 0.5 g/L de NaCl. Con las disoluciones preparadas se adicionó 1 mL en la cubeta junto a 50 μ L de SiNDs y se registraron los espectros de excitación, anotando los valores de intensidad máxima con los cuales se determina cómo influye la fuerza iónica en la intensidad de fluorescencia de las nanopartículas. Este conjunto de procedimientos se llevó a cabo utilizando cubetas de marca Fisher Scientific y volumen de 1.5 mL además del espectrómetro de absorbancia Genesys 10s UV-VIS Thermo Scientific con Software VisionLite y espectrofotómetro de fluorescencia Cary Eclipse.

Los resultados obtenidos se recogen en la registrado se adjunta en la **Figura 27**. En este caso se puede apreciar que conforme aumenta la concentración de la sal en el buffer empleado disminuye la intensidad de absorbancia salvo en el caso de los 2 g/L, que arroja un resultado anómalo.

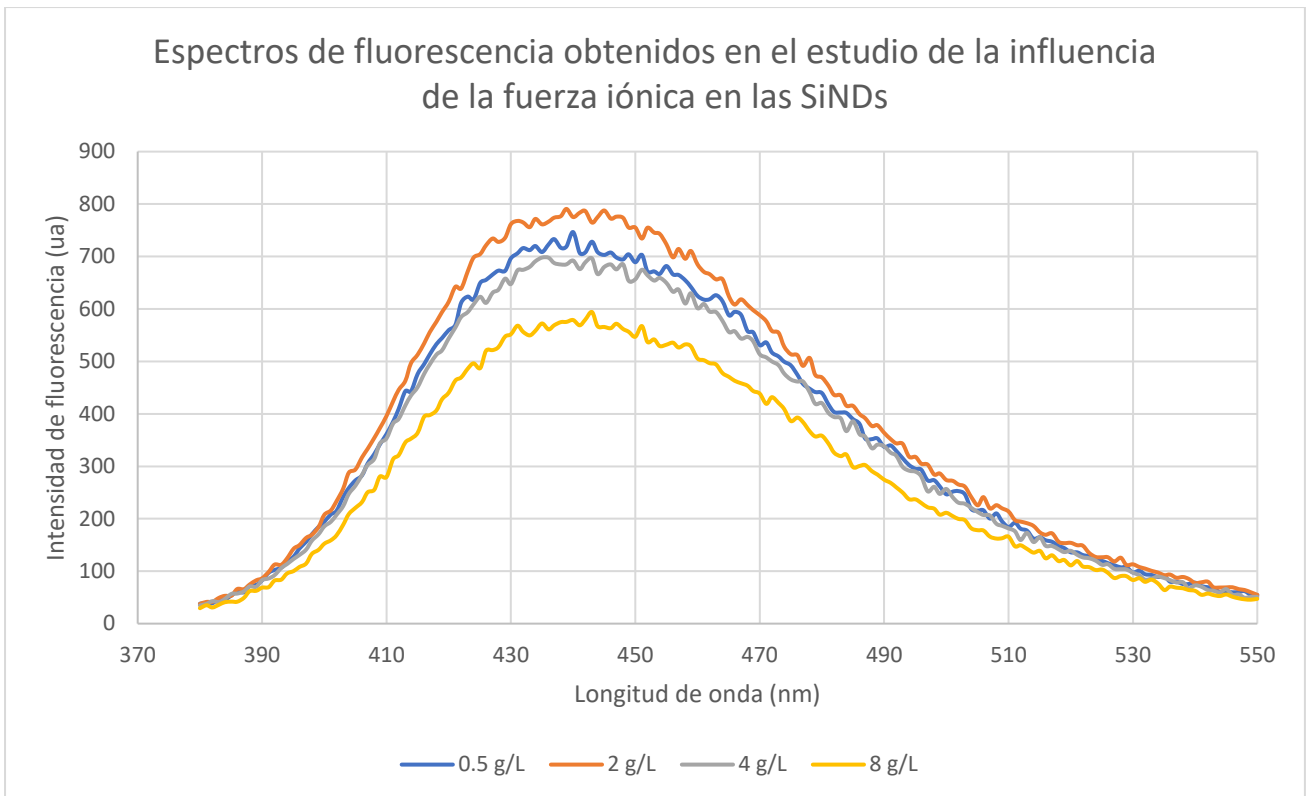


Figura 27 Conjunto de espectros UV/VIS obtenidos para el estudio de la intensidad de fluorescencia de las nanopartículas con diferentes buffers de PBS en los que se cambió la concentración de NaCl de acuerdo con los valores indicados en la leyenda.

Con el objetivo de potenciar estos resultados, se realizó un explicativo diagrama de barras en el que se puede ver cómo se produce esta variación. Se encuentra adjunto en la **Figura 28**.

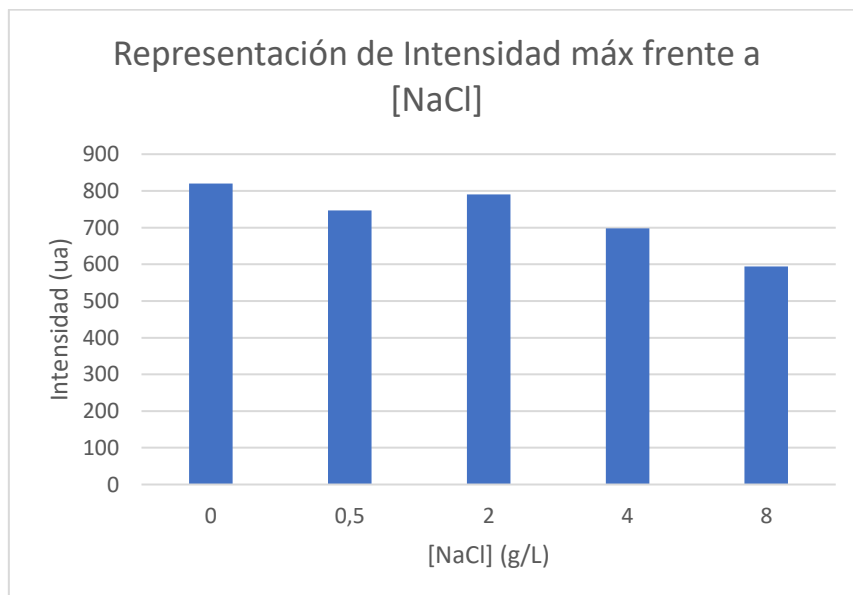


Figura 28 Diagrama de barras explicativo del efecto de la fuerza iónica en la absorbancia de los SiND's empleados en el presente ensayo.

Y en efecto, el aumento de la concentración de cloruro de sodio, que implica un aumento de fuerza iónica se traduce en la pérdida de cargas que conduce al estado de agregación de las nanopartículas que provoca su

disminución de absorbancia. Pero de nuevo se ha obtenido un resultado anómalo, en la concentración de 0.5 g/L que indica posible inestabilidad de las nanopartículas en *buffers* salinos con determinadas concentraciones.

Las SiND's se postularon como un tipo de nanomaterial con excelentes propiedades fluorescentes, sencillas de sintetizar y perfectamente optimizables en términos de diferentes parámetros como el pH o la fuerza iónica pero con desviaciones que suscitaron dudas acerca de su estabilidad a la hora de conseguir llevar a cabo un ensayo en las mejores condiciones, razón por la cual fue necesario evaluar otro tipo de nanopartículas, comerciales y más comúnmente conocidas que podrían permitirnos realizar el ensayo final con resultados más reproducibles y detección óptica por cambio de color. Estos nanomateriales son las nanopartículas de oro, AuNP's.

4.3. Nanopartículas de oro (AuNP's).

4.3.1. Caracterización de las nanopartículas de oro.

Tal y como se comentó anteriormente, se llevó a cabo una caracterización inicial de las nanopartículas de oro comerciales para poder asegurar el cumplimiento de los valores aportados por la casa comercial en términos de longitud de onda máxima de absorción o radio hidrodinámico lineal entre otras características. La importancia de este proceso se debe al protocolo de bioconjugación empleado posteriormente, ya que se utiliza para AuNP's de un tamaño concreto y los valores de concentración de anticuerpo que se bioconjuga están calculados de acuerdo con el tamaño de la nanopartícula.

Se llevó a cabo el registro del espectro de absorbancia de las nanopartículas con el objetivo de corroborar la semejanza del máximo de absorción. Los resultados obtenidos se adjuntan en la **Figura 29**.

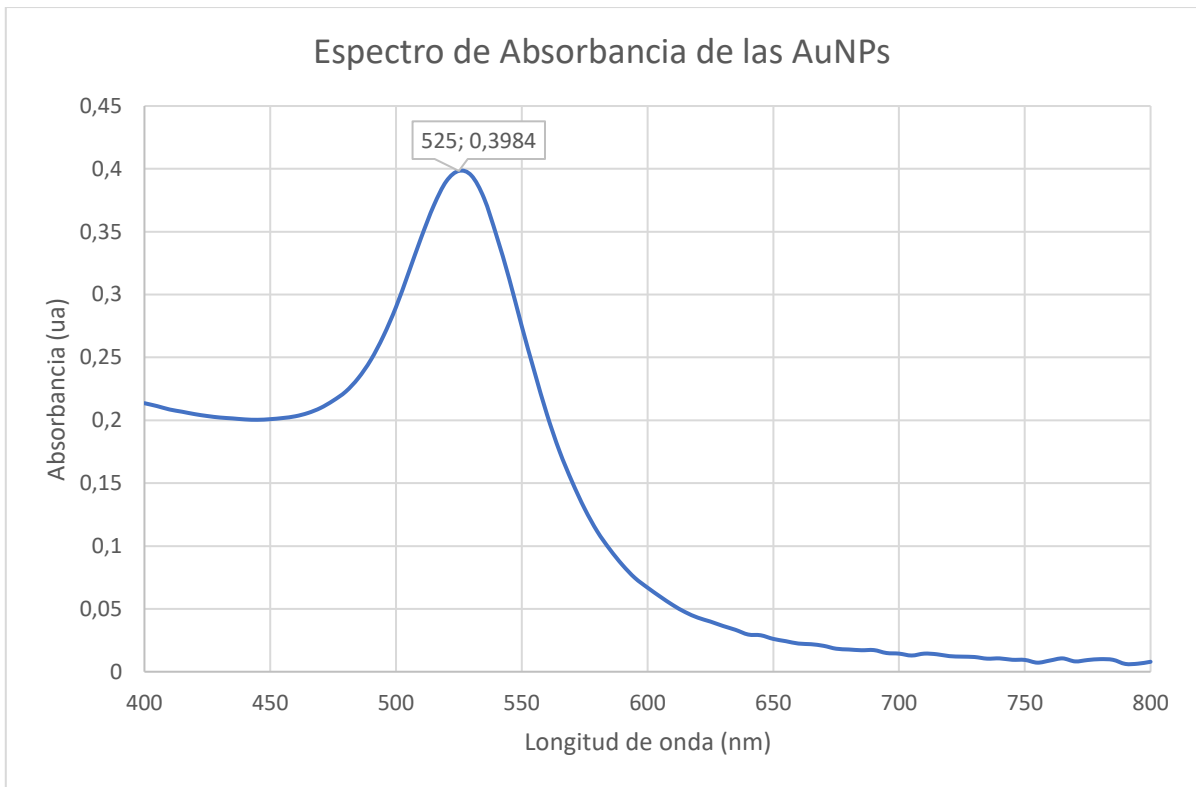


Figura 29 Espectro VIS/UV registrado para las nanopartículas de Au comerciales empleadas en el presente trabajo.

Al registrar el espectro se confirma que el valor del máximo de absorbancia se obtiene en 525 nm, idéntico resultado al aportado por la casa comercial.

El análisis por DLS nos permitió contrastar los datos referentes al diámetro hidrodinámico de las AuNPs- Este, según indicaba el certificado, debería de ser de 52.5 nm. Estas medidas se realizaron por triplicado encontrando como valor medio 52.6 ± 0.22 (PDI 0.100 ± 0.005). Los resultados mostrados en la **Figura 30** de la medida de DLS llevada a cabo corroboran este dato.

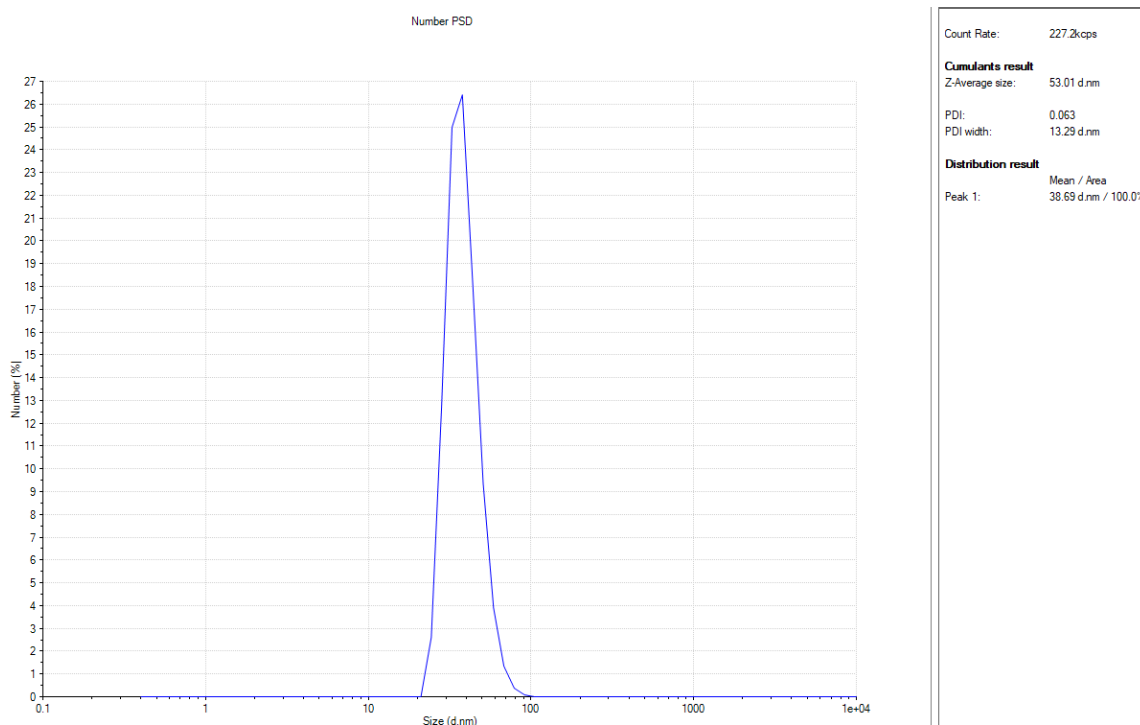


Figura 30 Resultados de DLS para una muestra de nanopartículas de oro.

4.3.2. Electroforesis en gel para evaluar el proceso de bioconjugación.

En un gel similar al utilizado con las MNP's, se cargan en el gel las muestras incluidas lo dispuesto en la **Tabla 6**.

Tabla 6 Gel de electroforesis empleado para estudiar la eficacia del proceso de bioconjugación en nanopartículas de oro.

POCILLO	COMPUESTO Y CANTIDAD INYECTADA
1	14 µL de AuNPs sin bioconjugar.
2	
3	
4	-
5	
6	14 µL de AuNP's bioconjugadas con Ab.
7	
8	

Con el fin de evaluar la eficacia del proceso de bioconjugación se llevó a cabo una electroforesis en gel en las condiciones indicadas en la **Tabla 6**. El gel resultante se adjunta en la **Figura 30**.

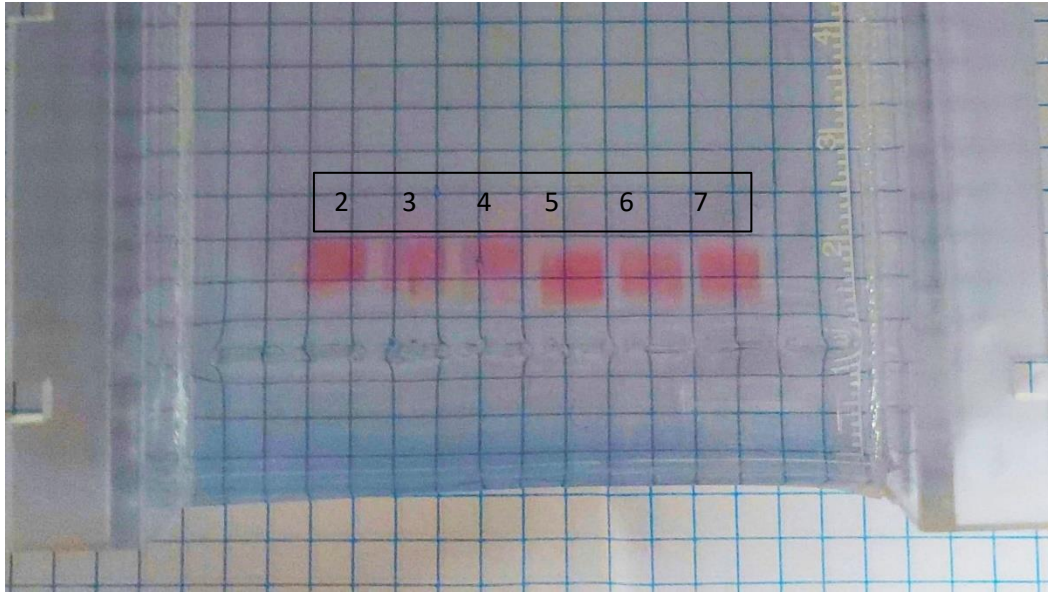


Figura 31 Gel de electroforesis obtenido para las nanopartículas sometidas al proceso de bioconjugación con anticuerpo de concentración 1 mg/mL. Comenzando por la izquierda, las tres primeras marcas corresponden a nanopartículas sometidas al proceso de bioconjugación elegido, pero adicionando 10 μ L de PBS en sustitución de 10 μ L de Ab. Las siguientes tres marcas se corresponden a las nanopartículas bioconjugadas con 10 μ L de Ab.

En efecto se pudo comprobar que el protocolo de bioconjugación descrito resultó satisfactorio y la diferencia de tamaño y carga del aglomerado de las nanopartículas bioconjugadas con el anticuerpo respecto a las que no lo tienen explican la diferencia de desplazamiento de la línea \rightarrow las que presentan anticuerpo se han desplazado menos debido a su diferente masa y carga respecto a aquellas que no se encuentran conjugadas a dicho agente biológico. Para poder apreciarlo, se debe observar la diferencia de las bandas en los pocillos 2,3 y 4 respecto a los pocillos 5, 6 y 7. Los desplazamientos son diferentes y confirma las ideas experimentales para las cuales se realizó el gel.

4.3.3. Caracterización de las AuNPs bioconjugadas mediante DLS.

Una vez llevada a cabo la bioconjugación de las nanopartículas de oro con el Ab y con el Ag (ver **Figura 32 A y B**) el diámetro hidrodinámico cambia alcanzando valores de 56.58 ± 1.3 nm (PDI 0.162 ± 0.016) y 57.19 ± 0.25 nm (PDI 0.174 ± 0.010) respectivamente. **Figura 32** Resultados de DLS para una muestra de AuNPs bioconjugada (A) con Ab y AuNPs bioconjugada (B) con

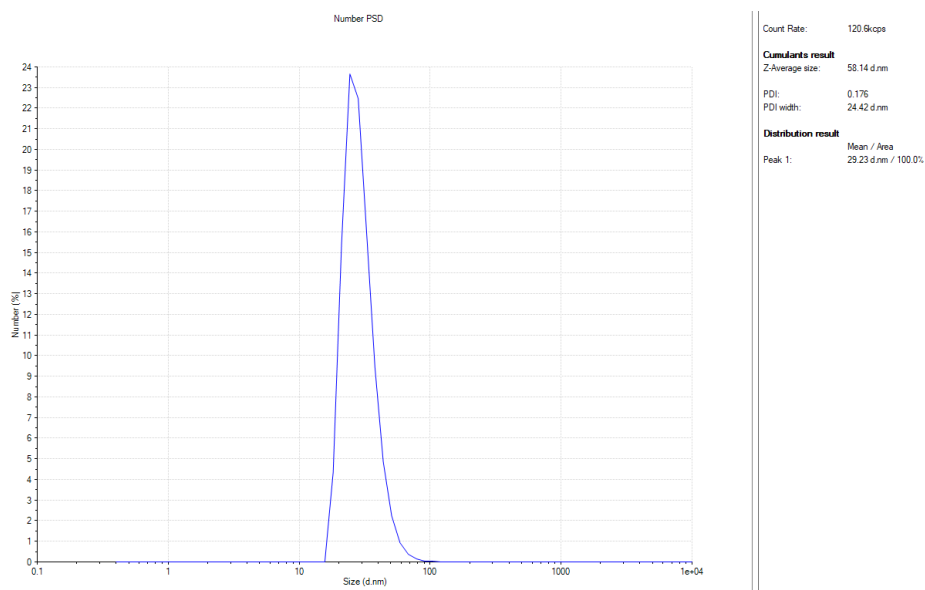


Figura 32 Resultados de DLS para una muestra de AuNPs bioconjugada (A) con Ab y AuNPs bioconjugada (B) con Ag.

Estos resultados nos demuestran que la bioconjugación se ha producido ya que el diámetro de las AuNPs es mayor tras la bioconjugación. Junto con estos resultados de absorbancia y gel de electroforesis podemos confirmar la bioconjugación satisfactoria de las nanopartículas.

Respecto a la carga superficial de las nanopartículas de oro sin bioconjugar y bioconjugadas con Ag y Ab también fueron estudiadas. Los resultados del análisis para estas muestras indicaron que al bioconjugar las AuNPs se producía una disminución en la carga de las nanopartículas. Inicialmente las AuNPs presentaban un valor de -20.7 mV y tras la bioconjugación la carga de las nanopartículas presenta valores de -17.7 mV y -16 mV para la bioconjugación con Ab y Ag, respectivamente. Esta disminución de la carga superficial de las AuNPs puede explicarse por el aumento en el tamaño de estas tras la bioconjugación. No obstante, debemos tener en cuenta que la carga superficial de las nanopartículas de oro tras la bioconjugación también depende del pH de trabajo y la secuencia de aminoácidos que conforma las proteínas a bioconjugar. Los valores medios obtenidos para estas muestras se recogen en la **Tabla 7**.

Tabla 7 Resultados de DLS con relación a la carga superficial para AuNPs sin bioconjugar y bioconjugadas.

Muestra	AuNPs	AuNPs-Anticuerpo	AuNPs-Antígeno
Zeta potencial (mV)	-20.7 ± 2.3	-17.7 ± 2.3	-16.0 ± 2.5

5. Inmunoensayo para la detección óptica de sarna sarcóptica.

Finalmente, y con el proceso de bioconjugación optimizado, se procedió a llevar a cabo el ensayo colorimétrico. Se trabajó empleando proteína GST 10 mg/mL debido a su semejanza en cuanto al tamaño con el antígeno responsable de la sarna sarcóptica, con anticuerpo específico anti GST monoclonal 1 mg/mL y se empleó un anticuerpo policlonal anti GST específico. El objetivo principal es bioconjugar las nanopartículas de oro tanto

con el antígeno (en exceso debido a su menor tamaño, lo que dificulta su adhesión a la superficie de la AuNP respecto al anticuerpo) como con el anticuerpo y adicionar posteriormente el anticuerpo policlonal en volúmenes crecientes. Se producirá la reacción antígeno-anticuerpo (el anticuerpo policlonal, al disponer de más sitios de unión se adherirá a la estructura Au-Ag y Au-Ab), de elevada especificidad, y se formará un aglomerado con las nanopartículas que se traduce en un cambio de color. De manera esquemática, se adjunta en la **Figura 33** el proceso llevado a cabo.

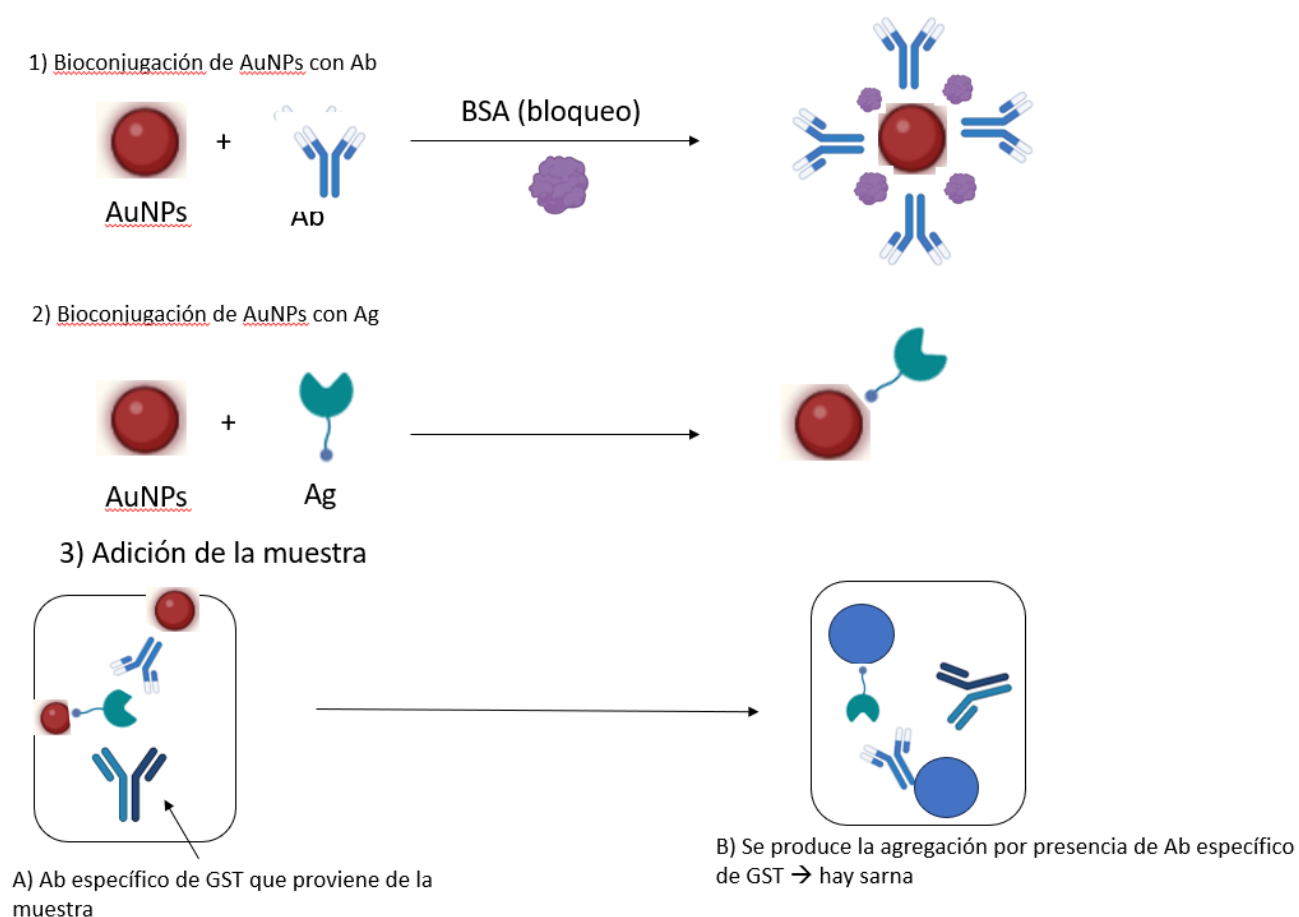


Figura 33 Esquema representativo del proceso llevado a cabo en el ensayo colorimétrico.

Las nanopartículas se someten a sendos procesos de bioconjugación tanto a anticuerpo como a antígeno (proteína GST). Posteriormente se adicionan volúmenes crecientes de anticuerpo policlonal anti-GST, cuyos diferentes sitios de unión le va a permitir enlazarse a las nanopartículas y provocar su aglomeración, lo que se traduce a nivel óptico en un cambio de color de rojo a tonos oscuros que se traduce en aumento de absorbancia y desplazamiento del máximo de absorción en términos espectrofotométricos.

Para llevar a cabo un seguimiento de la reacción indicada en la figura anterior, se realizaron medidas de absorbancia y se representó el espectro obtenido para el registro de un blanco, un agregado Au-Ag con Au-Ab y las diferentes adiciones de anticuerpo policlonal. El análisis en placas ELISA se realizó de acuerdo con el siguiente procedimiento expuesto en la **Tabla 8**.

Tabla 8 Volúmenes empleados de diferentes reactivos en el ensayo colorimétrico para la detección de anticuerpos anti-GST.

Pocillo	Volumen de PBS 1x pH 7.4 en μL	Volumen de AuNP's-Ag adicionado (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) en μL	Volumen de AuNPs-Ab adicionado (1 mg/mL) en μL	Volumen de Ab policlonal GST en μL
1-A (blanco)	200	-	-	-
1-B (blanco)	200	-	-	-
1-C (blanco)	200	-	-	-
2-A	190	5	5	-
2-B	190	5	5	-
2-C	185	5	5	5
3-A	190	5	5	-
3-B	190	5	5	-
3-C	180	5	5	10
4-A	190	5	5	-
4-B	190	5	5	-
4-C	175	5	5	20
5-A	190	5	5	-
5-B	190	5	5	-
5-C	140	5	5	50
6-A	190	5	5	-
6-B	190	5	5	-
6-C	90	5	5	100

Estos resultados se adjuntan en la **Figura 34**.

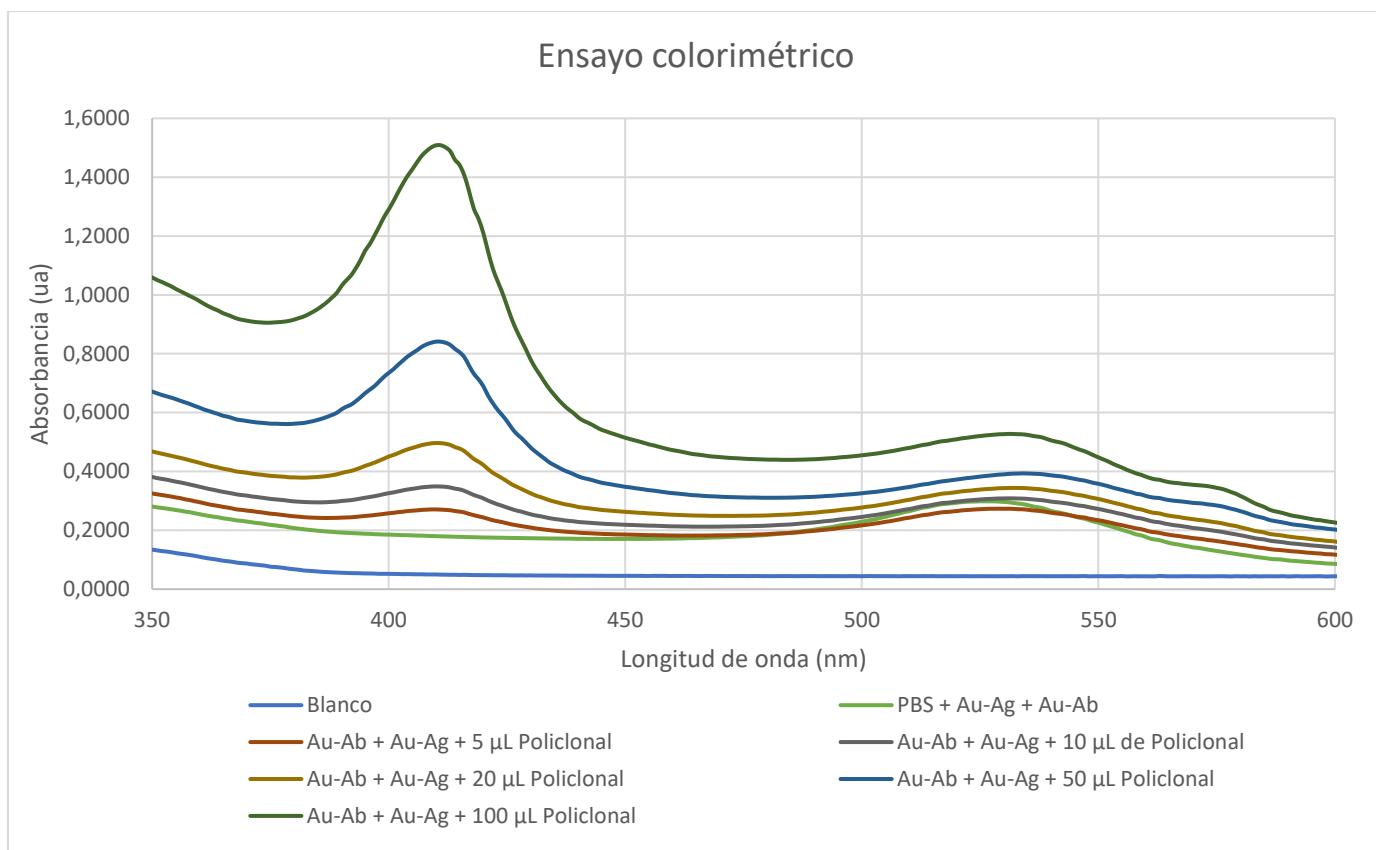


Figura 34 Conjunto de espectros UV-VIS obtenidos en la realización del ensayo para determinar colorimétricamente la presencia de sarna sarcoptica en una muestra de suero.

De este espectro se obtienen dos conclusiones: en primer lugar, la adición de anticuerpo policlonal provoca la aparición de una nueva banda de absorción, en torno a 425 nm que el blanco (línea azul) y el aglomerado Ag-AuNPs y Ab-AuNPs (línea verde) no aparecen. La segunda de las conclusiones, definitiva en términos de asegurar que el ensayo se produce correctamente es el desplazamiento del pico de absorción. Mientras que las nanopartículas sin bioconjugan presentan una banda a 525 nm, ya expuesta en el presente trabajo, el aglomerado descrito en la **Figura 34** provoca un desplazamiento del máximo de banda ligeramente hacia la derecha. Para poder apreciar mejor esta segunda conclusión, se adjunta la **Figura 35**.

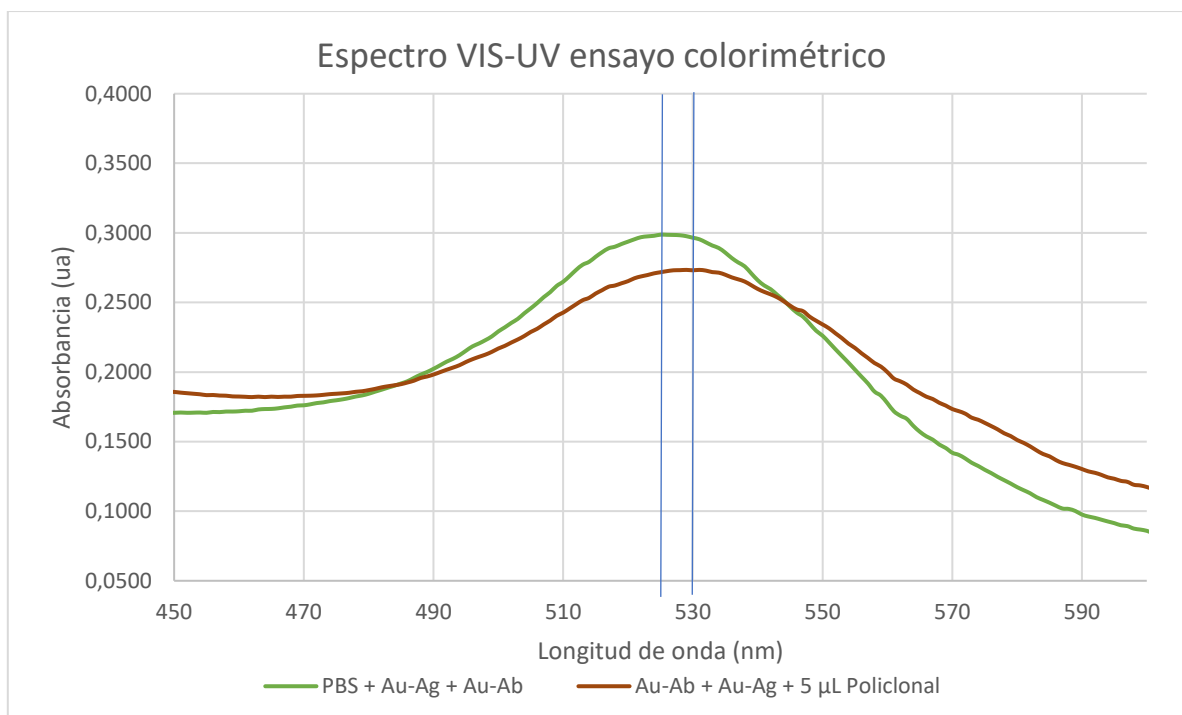


Figura 35 Conjunto de espectros VIS/UV del aglomerado Au-Ag y Au-Ab en PBS (línea verde) y Au-Ag, Au-Ab y Ab Policlonal en PBS (línea roja). Las líneas verticales marcan el máximo de absorción y muestran su diferencia.

En efecto se produce ese desplazamiento en el máximo de absorción que confirma la formación del complejo Ab-AuNPs, Ag-AuNPs y Ab policlonal y por tanto la presencia de antígeno GST, sustituyente de la sarna sarcóptica en el presente trabajo.

La adición de volúmenes crecientes de anticuerpo policlonal también provoca el aumento de la intensidad de absorción máxima del aglomerado, lo que hace entender que cuanto mayor cantidad de antígeno esté presente en la muestra, mayores valores de intensidad se obtendrán y se podrá realizar un ensayo cuantitativo para poder determinar la cantidad de una determinada proteína en una muestra y, de acuerdo con los correspondientes límites clínicos, establecer un diagnóstico precoz y eficiente. En la **Figura 36** se puede apreciar un diagrama de barras explicativo acerca de este efecto.

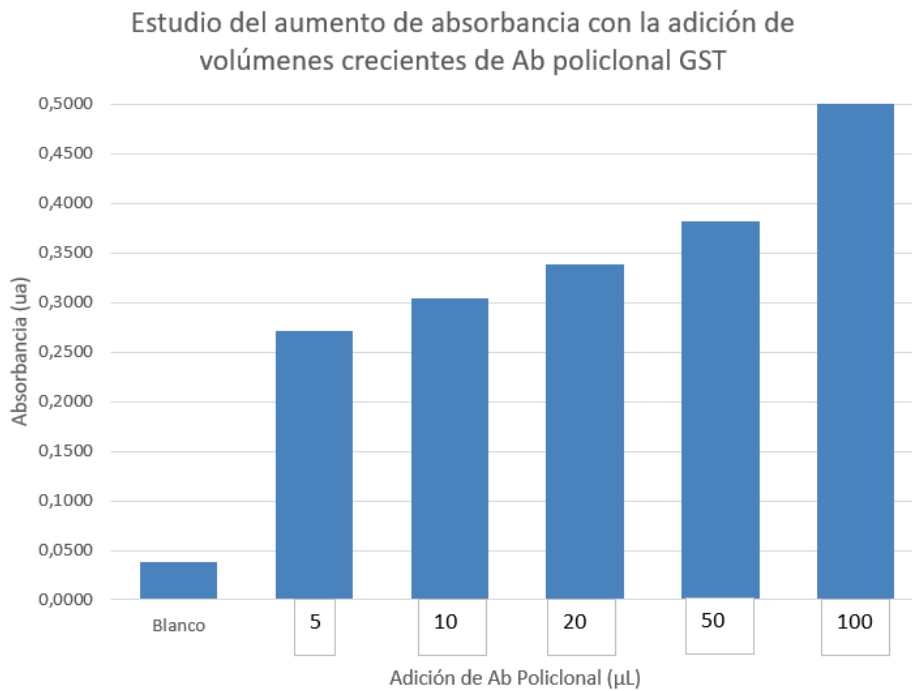


Figura 36 Diagrama de barras que demuestra el aumento de la intensidad de absorbancia en el pico de absorción conforme se añaden volúmenes crecientes de anticuerpo policlonal.

Todos estos resultados arrojan conclusiones prometedoras acerca de la posibilidad de diseñar un sensor rápido, barato, in situ, sencillo de manejar, sensible y con buenas características analíticas para la detección de diferentes agentes biológicos como la sarna, permitiendo realizar un diagnóstico rápido y eficaz con el objetivo de establecer tratamientos para las patologías acaecidas por dicho patógeno.

6. Conclusiones.

La realización tanto experimental como teórica del presente TFM, así como los resultados obtenidos permiten alcanzar las siguientes conclusiones:

- La caracterización de las NPs magnéticas ha puesto de manifiesto que si bien, teniendo en cuenta su tamaño e índice de polidispersidad, podrían ser utilizadas en el inmunoensayo propuesto, las limitaciones en lo que respecta a la evaluación de la bioconjugación mediante la electroforesis en gel ha constituido una limitación en lo que respecta a su empleo en el desarrollo de la alternativa biosensora. Por falta de tiempo se decidió buscar otras alternativas para poder trabajar y obtener resultados satisfactorios.
- Las SiNDs se sintetizan de manera sencilla, su caracterización pone de manifiesto que presentan un tamaño adecuado y poseen excelentes propiedades fluorescentes. Sin embargo, sus limitaciones en lo que respecta a la estabilidad a diferentes pHs y fuerzas iónicas es una limitación en el desarrollo del inmuno ensayo para el análisis de muestras biológicas.

- Haciendo uso de los AuNPs ha sido posible diseñar un inmunoensayo tipo sándwich para la detección cualitativa de la presencia de proteína GST, de estructura similar a la de la sarna sarcóptica, lo que permitiría trasladar la estrategia propuesta a la creación de un sensor que detecte anticuerpos de sarna sarcóptica de forma cualitativa en muestras de suero empleando como detección.

7. Bibliografía

- (1) Laura Soriano, M.; Zougagh, M.; Valcárcel, M.; Ríos, Á. Analytical Nanoscience and Nanotechnology: Where We Are and Where We Are Heading. *Talanta* **2018**, *177*, 104–121. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.09.012>.
- (2) Khan, I.; Saeed, K.; Khan, I. Nanoparticles: Properties, Applications and Toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*. Elsevier B.V. November 1, **2019**, pp 908–931. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.011>.
- (3) Rocha-Santos, T. A. P. Sensors and Biosensors Based on Magnetic Nanoparticles. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. Elsevier B.V. November 1, **2014**, pp 28–36. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.06.016>.
- (4) Ali, A.; Shah, T.; Ullah, R.; Zhou, P.; Guo, M.; Ovais, M.; Tan, Z.; Rui, Y. K. Review on Recent Progress in Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Diverse Applications. *Frontiers in Chemistry*. Frontiers Media S.A. July 13, **2021**. <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.629054>.
- (5) Sharma, B.; Tanwar, S.; Sen, T. One Pot Green Synthesis of Si Quantum Dots and Catalytic Au Nanoparticle-Si Quantum Dot Nanocomposite. *ACS Sustain Chem Eng* **2019**, *7* (3), 3309–3318. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b05345>.
- (6) Cai, Q.; Meng, H.; Liu, Y.; Li, Z. Fluorometric Determination of Glucose Based on a Redox Reaction between Glucose and Aminopropyltriethoxysilane and In-Situ Formation of Blue-Green Emitting Silicon Nanodots. *Microchimica Acta* **2019**, *186* (2). <https://doi.org/10.1007/s00604-018-3189-4>.
- (7) Hippo, D.; Chong, H. J.; Kawata, Y.; Tanaka, A.; Tsuchiya, Y.; Mizuta, H.; Oda, S.; Urakawa, K.; Koshida, N. A New Design of Nanocrystalline Silicon Optical Devices Based on 3-Dimensional Photonic Crystal Structures. In *2005 IEEE International Conference on Group IV Photonics*; **2005**; Vol. 2005, pp 114–116. <https://doi.org/10.1109/GROUP4.2005.1516422>.
- (8) Hegde, M.; Pai, P.; Shetty, M. G.; Babitha, K. S. Gold Nanoparticle Based Biosensors for Rapid Pathogen Detection: A Review. *Environmental Nanotechnology, Monitoring and Management*. Elsevier B.V. December 1, **2022**. <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2022.100756>.
- (9) Stetefeld, J.; McKenna, S. A.; Patel, T. R. Dynamic Light Scattering: A Practical Guide and Applications in Biomedical Sciences. *Biophysical Reviews*. Springer Verlag December 1, **2016**, pp 409–427. <https://doi.org/10.1007/s12551-016-0218-6>.
- (10) Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; Springer, **2006**.
- (11) Isbir, T.; Kirac, D.; Demircan, B.; Dalan, B. Gel Electrophoresis. In *Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition*; Elsevier Inc., **2013**; pp 165–167. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.00580-5>.

- (12) Werengowska-Ciećwierz, K.; Wiśniewski, M.; Terzyk, A. P.; Furmaniak, S. The Chemistry of Bioconjugation in Nanoparticles-Based Drug Delivery System. *Advances in Condensed Matter Physics*. Hindawi Publishing Corporation February 28, **2015**. <https://doi.org/10.1155/2015/198175>.
- (13) Sapsford, K. E.; Algar, W. R.; Berti, L.; Gemmill, K. B.; Casey, B. J.; Oh, E.; Stewart, M. H.; Medintz, I. L. Functionalizing Nanoparticles with Biological Molecules: Developing Chemistries That Facilitate Nanotechnology. *Chemical Reviews*. March 13, **2013**, pp 1904–2074. <https://doi.org/10.1021/cr300143v>.
- (14) *Bioconjugate Techniques 2nd Edition*. ELSEVIER. **2008**
- (15) Ortiz-Gomez, I.; Ortega-Muñoz, M.; Marín-Sánchez, A.; de Orbe-Payá, I.; Hernandez-Mateo, F.; Capitan-Vallvey, L. F.; Santoyo-Gonzalez, F.; Salinas-Castillo, A. A Vinyl Sulfone Clicked Carbon Dot-Engineered Microfluidic Paper-Based Analytical Device for Fluorometric Determination of Biothiols. *Microchimica Acta* **2020**, 187 (7). <https://doi.org/10.1007/s00604-020-04382-9>.
- (16) Haleem, A.; Javaid, M.; Singh, R. P.; Rab, S.; Suman, R. Applications of Nanotechnology in Medical Field: A Brief Review. *Global Health Journal* **2023**. <https://doi.org/10.1016/j.glohj.2023.02.008>.
- (17) Bandi, K. M.; Saikumar, C. Sarcoptic Mange: A Zoonotic Ectoparasitic Skin Disease. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* **2013**, 7 (1), 156–157. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2012/4839.2694>.
- (18) Wei, W.; He, J.; Wang, Y.; Kong, M. Ratiometric Method Based on Silicon Nanodots and Eu³⁺ System for Highly-Sensitive Detection of Tetracyclines. *Talanta* **2019**, 204, 491–498. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.06.036>.