



Universidad de Oviedo

Universidá d'Uviéu

University of Oviedo

MÁSTER EN CIENCIAS ANALÍTICAS Y BIOANALÍTICAS

Trabajo Fin de Máster

ESTRATEGIAS NANO-ANALÍTICAS PARA LA DETECCIÓN COLORIMÉTRICA DE ALÉRGENOS EN ALIMENTOS

DARÍO SÁNCHEZ GONZÁLEZ

Oviedo, Julio 2024

Agradecimientos

Finalmente, como resultado de meses de duro esfuerzo y dedicación el presente Máster de Ciencias Analíticas y Bioanalíticas finaliza, cerrando un año completo de conocimiento.

Antes que nada, me gustaría agradecer desde mi más profunda sinceridad el apoyo incondicional de mis tutoras del TFM, Ana Belén Soldado Cabezuelo e Inmaculada Ortiz Gómez, por sus horas de dedicación, por haberme apoyado en los momentos de mayor presión, por brindarme su ayuda cuando la he necesitado, y por supuesto, por intentar transmitirme sus consejos debido a su gran experiencia.

Así mismo, y no por ello menos importante, quisiera agradecer también el apoyo al resto de compañeros que han experimentado sus respectivos trabajos paralelamente al mío, y que han hecho mucho más amenas las horas de trabajo. Además, quisiera agradecer el apoyo recibido por parte de mis familiares y amigos a lo largo de este último año, ya que sin ellos, todo hubiese sido más difícil.

Darío Sánchez González

ÍNDICE DEL CONTENIDO

1. Resumen.....	5
2. Introducción.....	5
2.1 Alergia alimentaria.	5
2.1.1 Definición de alergia alimentaria.....	5
2.2 Sésamo: Un alérgeno en crecimiento.	5
2.2.1 Importancia de detectar el sésamo en productos alimentarios.....	5
2.2.2 Componentes alérgenos del sésamo.	6
2.3 Adulteración y contaminación alimentaria.....	6
2.4 Alternativas analíticas para detección de alérgenos en alimentos.	7
2.4.1 Métodos directos.	7
2.4.2 Métodos indirectos.	8
2.5 Biosensores.	10
2.5.1 Definición de biosensor.....	10
2.5.2 Empleo de nanomateriales para la construcción de biosensores.....	10
2.6 Empleo de nanopartículas de oro para el desarrollo de sensores colorimétricos.	11
2.6.1 Propiedades de las nanopartículas de oro.	11
2.6.2 Tipos de bioconjugaciones de las nanopartículas de oro con ADN. .	11
2.6.3 Bioconjugación de las nanopartículas de oro con ADN para el desarrollo de sensores colorimétricos.	12
2.6.4 Absorción del plasmón superficial.	13
2.6.5 Amplificación de la señal con el empleo de MNAszymes.....	14
2.7 Análisis de color mediante softwares de edición de imágenes.	15
2.7.1 Espacios de color.	15
2.7.2 “Image J” para el procesado de imágenes.	16
2.7.3 Software Quimiométrico “The Unscrambler X” para el análisis de las imágenes de color.....	16
3. Objetivo.	17
4. Materiales.....	17

4.1 Reactivos.....	17
4.2 Instrumentación y equipos.....	18
5. Procedimiento experimental.....	19
5.1 Preparación de disoluciones.....	19
5.2 Caracterización de las nanopartículas de oro comerciales.....	19
5.2.1 Medidas de absorbancia de las nanopartículas de oro.....	20
5.2.2 Medidas de carga en DLS de las nanopartículas de oro.....	20
5.3 Preconcentración de las nanopartículas de oro comerciales.....	20
5.4 Bioconjugación de las nanopartículas de oro.....	21
5.5 Optimización del método.....	23
5.5.1 Optimización de la concentración de Linker.....	23
5.5.2 Optimización de la concentración de MgCl ₂	24
5.6 Calibrado con las nanopartículas de oro de 15 nm con ADN de sésamo.....	26
5.7 Análisis del color.....	27
5.7.1 Análisis RGB.....	27
5.8 Análisis quimiométrico.....	28
5.8.1 Análisis de los componentes principales (PCA).....	28
6. Resultados.....	29
6.1 Caracterización de las nanopartículas de oro.....	29
6.1.1 Medidas de absorbancia.....	29
6.1.2 Medida de la carga de las nanopartículas de oro.....	30
6.2 Preconcentración de las nanopartículas de oro comerciales.....	31
6.3 Bioconjugación de las nanopartículas de oro.....	31
6.3.1 Nanopartículas de oro de 20 nm de 100 nM.....	31
6.3.2 Nanopartículas de oro de 15 nm de 2000 nM.....	32
6.4 Optimización del método.....	34
6.4.1 Optimización del Linker.....	34
6.4.2 Optimización de la concentración de MgCl ₂	36
6.5 Calibrado con nanopartículas de oro de 15 nm con ADN de sésamo.....	38

6.6 Análisis quimiométrico del calibrado con las nanopartículas de oro.	39
6.6.1 PCA de las componentes del color RGB conjuntas en 2D.	40
6.6.2 PCA de las componentes del color RGB individualmente en 2D.	41
6.6.3 PCA de las componentes del color RGB conjuntas en 3D.	43
7. Conclusiones.....	44
8. Trabajos futuros.	44
9. Bibliografía.	45
Anexos.	i

ÍNDICE DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

Agg 1/ Agg 4.....	Oligonucleótidos 1/ Oligonucleótidos 4.
AuNPs.....	Nanopartículas de oro.
DLS.....	“Dynamic light scattering”.
ELISA.....	Enzyme-Linked Inmunosorbent Assay.
FASTER.....	Ley de Seguridad, Tratamiento, Educación e Investigación sobre Alergias Alimentarias.
IUIS.....	Unión Internacional de Sociedades Inmunológicas.
LFIA.....	Inmunoensayos de flujo lateral.
MNAzymes.....	Enzimas de ácido nucleico multicomponente.
OMS.....	Organización Mundial de la Salud.
PBS.....	Buffer fosfato salino.
PCA.....	Análisis de componentes principales.
PCR.....	Reacción en cadena de la polimerasa.
SPR.....	Resonancia de plasmones de superficie localizada.
TBE.....	Tris-Borato-EDTA.
TCHB.....	Buffer HCl trisodio citrato.
TLC.....	“Thin-layer chromatography”.
UV-VIS.....	Ultravioleta visible.

1. Resumen.

El presente trabajo fin de máster pretende desarrollar una estrategia de detección colorimétrica del alérgeno sésamo mediante análisis espectrofotométricos, visuales y quimiométricos. El interés en la detección de este alérgeno radica en la creciente expansión del mismo por diversos continentes, incrementando el porcentaje de alergias sufridas por las diferentes poblaciones. La presencia inesperada de sésamo en productos alimentarios puede provocar graves problemas de salud, por lo que detectar trazas de este alérgeno en productos susceptibles de ser adulterados o contaminados con la presencia del mismo es un objetivo de gran interés en seguridad alimentaria. Ante la presencia de diversos métodos convencionales para la detección de alérgenos, bien sean métodos directos que detectan las proteínas causantes de la alergia, como los inmunoensayos ELISA, los inmunoensayos de flujo lateral (LFIA) y la espectrometría de masas, o métodos indirectos que detectan fragmentos de ADN codificantes de proteínas alérgicas, surge el interés por disponer de técnicas de análisis rápidas, económicas, sensibles, selectivas, sencillas y que permitan llevar a cabo análisis in-situ, destacando con estas características los biosensores con el empleo de nanopartículas.

2. Introducción.

2.1 Alergia alimentaria.

2.1.1 Definición de alergia alimentaria.

Se define como alergia alimentaria a la reacción producida por el sistema inmunológico debida a la presencia de alérgenos [1]. El concepto de alérgeno hace referencia al antígeno que provoca la reacción. Normalmente, los antígenos se corresponden con proteínas presentes en los alimentos, las cuales tienen la capacidad de resistir al proceso de digestión y cocinado [2].

2.2 Sésamo: Un alérgeno en crecimiento.

2.2.1 Importancia de detectar el sésamo en productos alimentarios.

Debido a la extensión de la alergia al sésamo en diferentes países, y a la implantación de la Ley de Seguridad, Tratamiento, Educación e Investigación sobre Alergias Alimentarias (FASTER) en 2021, Estados Unidos se unió a la Unión Europea, Australia y Canadá con el objetivo de que se etiquete el sésamo como un alérgeno alimentario. Hoy en día, el sésamo está considerado como un alérgeno común, hasta

tal punto que, es considerado como el cuarto alérgeno alimentario que más se manifiesta en la población infantil en Australia, por lo que el interés en detectar trazas y ADN de sésamo en productos alimentarios se ha incrementado. Además, se conoce que, en Francia, la alergia al sésamo presenta un porcentaje del 2,1 de las alergias sufridas por la población infantil y del 5,8 de las sufridas por la población adulta [3].

2.2.2 Componentes alérgenos del sésamo.

El sésamo es un cultivo de semillas oleaginosas que se caracteriza por ser una fuente de aceite, proteínas, fibra, carbohidratos, minerales y vitaminas. La Organización Mundial de la Salud y la Unión Internacional de Sociedades Inmunológicas (OMS/IUIS) ha reconocido 7 alérgenos entre los componentes del sésamo. Entre los alérgenos específicos del sésamo se encuentran las albúminas 2S (Ses i 1 y Ses i 2), la globulina similar a la vicilina 7S (Ses i 3), las olesinas (Ses i 4 y Ses i 5) y las globulinas 11S (Ses i 6 y Ses i 7). Sin embargo, entre todos los alérgenos mencionados, las principales proteínas causantes de la alergia al sésamo son las albúminas 2S y las globulinas 11S. Además, en algunas ocasiones se consideran las profilinas del sésamo como un alérgeno más (Ses i 8), aunque no está reconocido por la OMS/IUIS, y lo mismo sucede con el sesamol, la sesamolina y la sesamina [4].

2.3 Adulteración y contaminación alimentaria.

Se conoce como fraude alimentario a la actividad de adulterar un alimento con fines económicos, de forma que se reduzcan costes en la producción del mismo y se aumenten las ganancias. Normalmente, los productos que son atractivos desde el punto de vista de la adulteración son aquellos que presentan una elevada demanda o que han sufrido unos incrementos de precio considerables. Uno de los productos que se encuentra en el foco de la adulteración es el aceite de oliva, el cual ha sufrido un gran incremento de precio a lo largo de los últimos años. Por ello, es común la adulteración del aceite de oliva con otros aceites de calidad y precio inferior, como por ejemplo los aceites de semillas de sésamo, lo que afecta a la calidad del producto y a la salud del consumidor [5]. Sin embargo, existen ocasiones en las que se detecta la presencia de sésamo en alimentos, pero no bajo la intencionalidad de cometer un fraude, sino debido a contaminaciones, algo común en las cadenas alimentarias que comparten fases del proceso de producción para varios tipos de alimentos. Queda de manifiesto la importancia que tiene detectar la presencia de adulteraciones y contaminaciones, en

este caso que involucren la presencia de sésamo, ya que la presencia de este alérgeno encubierto podría ocasionar graves problemas de salud a los consumidores.

2.4 Alternativas analíticas para detección de alérgenos en alimentos.

La detección e incluso la cuantificación de los alérgenos alimentarios puede llevarse a cabo a través de diversas técnicas analíticas, siendo unas más apropiadas que otras en función del tipo de muestra y de los requerimientos de sensibilidad y especificidad requeridos. Por un lado, se encuentran los métodos directos, los cuales se caracterizan por detectar las proteínas causantes de la alergia, y por otro, los métodos indirectos, los cuales se basan en detectar aquellos fragmentos de ADN que codifican las proteínas anteriores [1].

2.4.1 Métodos directos.

➤ Inmunoensayos.

El ensayo ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) es un ensayo enzimático, y es uno de los ensayos más empleados para la cuantificación de proteínas alérgicas, debido a su buena especificidad. Este ensayo enzimático se caracteriza por la interacción de la proteína alérgica de interés con anticuerpos. Sin embargo, como desventajas, estos ensayos carecen de una buena reproducibilidad, y a menudo, la interacción entre antígeno y anticuerpo se ve afectada por la reactividad cruzada de las propias proteínas o por cambios en la conformación de las mismas [6]. Existen varios tipos de técnicas ELISA, destacando el ensayo competitivo indirecto y el ensayo tipo sándwich. De ellos, el ensayo más comúnmente utilizado es el de tipo sándwich, debido a que es una técnica rápida y sencilla que proporciona buenos resultados [1]. Véase en la *figura 1* un esquema del ensayo ELISA tipo sándwich.

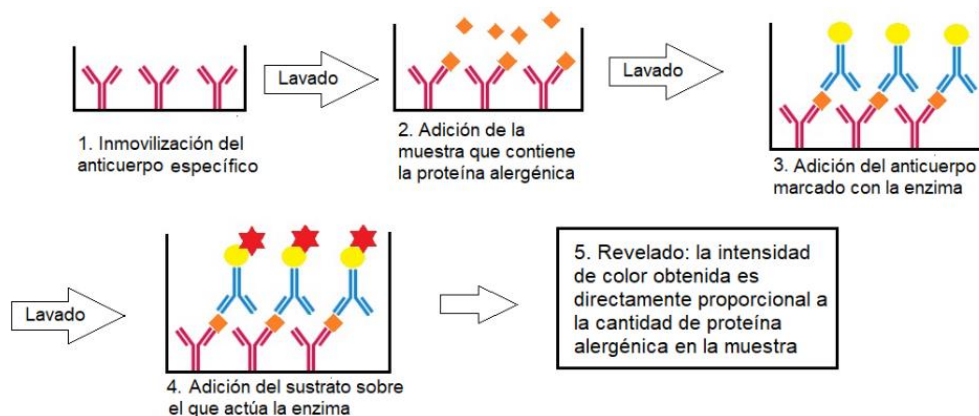


Figura 1: Esquema de un ensayo ELISA tipo sándwich. Reproducido de referencia [1].

Otro tipo de inmunoensayos utilizados para los análisis cualitativos y semicuantitativos son los inmunoensayos de flujo lateral (LFIA) [6]. Estos inmunoensayos se caracterizan por ser tiras de membranas de nitrocelulosa, polivinil fluoruro, o nylon, sobre las que están depositados anticuerpos específicos marcados. El marcaje de los anticuerpos se suele realizar mediante el empleo de enzimas o de fluorocromos. De este modo, una vez que se haya depositado la muestra a analizar sobre la tira, si la proteína de interés (antígeno) se encuentra en la muestra tendrá lugar la formación del complejo antígeno-anticuerpo, el cual alcanzará mediante el fenómeno de la capilaridad a otro anticuerpo depositado sobre la tira, cuya función es retener el complejo formado. Por lo tanto, ante un resultado positivo se observará una línea coloreada, y ante la ausencia del antígeno no se observará nada [1]. No obstante, estos últimos ensayos no son apropiados para análisis cuantitativos [6].

➤ **Espectrometría de masas.**

Existen otros tipos de métodos directos no inmunológicos, entre los que destaca la espectrometría de masas, el cual es un método altamente selectivo. A diferencia de los ensayos inmunológicos, la espectrometría de masas es un método de análisis independiente de la conformación de la proteína, y su fundamento se basa en un análisis proteómico basado en la secuencia de aminoácidos que componen la proteína de interés. Además, este método no presenta inconvenientes de reactividad cruzada, y es capaz de realizar la cuantificación de diversas proteínas con una elevada confianza a través de una única medida. El principal inconveniente es el elevado costo para la adquisición de la instrumentación, además de requerir de personal cualificado para su uso capaz de comprender los complejos procedimientos [6].

2.4.2 Métodos indirectos.

➤ **Técnicas de detección de ADN.**

Los métodos de detección de ADN son métodos indirectos, y se caracterizan por la búsqueda de fragmentos de ADN característicos del genoma del alérgeno. El objetivo es seleccionar marcadores, que en estas ocasiones son genes que codifican la proteína de interés. Los métodos de detección del ADN se basan comúnmente en la realización de amplificaciones de ácidos nucleicos a través de técnicas como la PCR, o en la realización de amplificaciones isotérmicas, o en procesos de hibridación de ADN. La principal ventaja de estos ensayos es su gran sensibilidad y especificidad, además de la mayor estabilidad del ADN frente a la proteína. Sin embargo, el principal

inconveniente de estos métodos es la necesidad de disponer de un personal cualificado, el elevado coste de la instrumentación, y los largos tiempos de análisis [6].

A continuación, a modo de resumen se recogen en la *tabla 1* las principales ventajas e inconvenientes de las técnicas convencionales mencionadas con anterioridad.

Tabla 1: Ventajas e inconvenientes de las técnicas convencionales para detección de alérgenos en alimentos.

Técnicas convencionales	Inmunoensayo ELISA	Inmunoensayo de flujo lateral (LFIA)	Espectrometría de masas	Detección de ADN
Ventajas	- Especificidad -Análisis cuantitativo	-Análisis cualitativos -Análisis semicuantitativo	-Alta selectividad -No reactividad cruzada -Análisis cuantitativos	-Alta sensibilidad -Alta especificidad -Alta estabilidad del ADN -Amplificación de la señal
Inconvenientes	-Mala reproducibilidad -Reactividad cruzada -Cambios conformacionales de las proteínas	-No adecuados para análisis cuantitativos	-Elevado coste instrumental -Personal cualificado -Procedimientos complejos	-Personal cualificado -Largos tiempos de análisis -Elevado coste instrumental

En base a las ventajas y desventajas de las técnicas convencionales surge la necesidad de disponer de técnicas con menor coste instrumental, con una velocidad de análisis superior, y sin la obligación de disponer de personal calificado para su empleo, destacando entre ellas los biosensores con el empleo de nanopartículas.

2.5 Biosensores.

2.5.1 Definición de biosensor.

Se define un biosensor como un dispositivo analítico que consta de un receptor bioquímico (enzimas, anticuerpos o ácidos nucleicos), el cual interacciona con el analito, un sistema de transducción, el cual transforma la señal biológica en una señal cuantificable de carácter físico-químico, y finalmente por un procesador y un amplificador de la señal. Los biosensores se caracterizan por obtener señales basadas en variaciones de carga, pH, color, masa, transferencia electrónica o variaciones de las propiedades ópticas [1]. Véase en la *figura 2* el esquema de un biosensor.

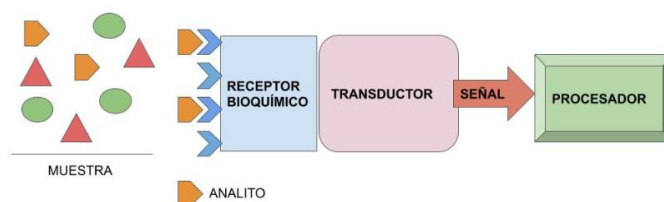


Figura 2: Partes principales que componen un biosensor. Reproducido de referencia [1].

2.5.2 Empleo de nanomateriales para la construcción de biosensores.

Sin embargo, en los últimos años destaca el empleo de los nanomateriales en el diseño de los biosensores. Estos nanomateriales aportan unas ventajas sobre el resto de las técnicas convencionales, entre las que destaca un menor tiempo de análisis, una buena sensibilidad y selectividad, un bajo coste, así como bajos límites de detección. Además, estos biosensores basados en el empleo de nanomateriales se caracterizan por ser capaces de realizar análisis múltiples de muestras con relativa complejidad, y con un sencillo pretratamiento de muestra [1]. El verdadero interés de estas técnicas radica en la posibilidad de análisis rápidos in-situ. Sin embargo, estas técnicas presentan una estabilidad reducida y en ocasiones no son tan sensibles ni selectivas como otras técnicas convencionales, como por ejemplo, la espectrometría de masas, por lo que siempre se deben de utilizar como técnicas complementarias a las convencionales. Véase la *tabla 2* en la que se recogen las principales ventajas e inconvenientes de los biosensores basados en el empleo de nanomateriales.

Tabla 2: Ventajas e inconvenientes de los biosensores basados en el empleo de nanomateriales.

Ventajas	Inconvenientes
Cortos tiempos de análisis	Menor robustez frente a las técnicas convencionales

Análisis in-situ	
Análisis múltiples de muestras complejas	
Pretratamiento de muestra sencillo	
Buena sensibilidad y selectividad	
Bajos límites de detección	
Bajo coste	

2.6 Empleo de nanopartículas de oro para el desarrollo de sensores colorimétricos.

2.6.1 Propiedades de las nanopartículas de oro.

Las nanopartículas de oro (AuNPs) son una de las nanopartículas más estables, además de ser fácilmente sintetizables y funcionalizables. Entre las características de estas nanopartículas se encuentra su elevada relación superficie-volumen, la baja toxicidad, la elevada biocompatibilidad, las buenas propiedades redox y catalíticas, y la elevada conductividad. Sin embargo, la propiedad principal de estas nanopartículas es la absorción del plasmón superficial [6].

2.6.2 Tipos de bioconjugaciones de las nanopartículas de oro con ADN.

Se conoce como bioconjugación al proceso en el cual se inmovilizan determinadas moléculas sobre la superficie de las nanopartículas. El término “bio” implica una biomolécula, la cual puede ser una proteína, un lípido, un carbohidrato, un ácido nucleico etc. El proceso de inmovilización puede llevarse a cabo a través de diferentes tipos de uniones, bien sean enlaces covalentes, no covalentes, o procesos de adsorción física, las cuales a su vez dependerán de la reactividad entre los grupos funcionales presentes en la superficie de las nanopartículas de oro y los grupos funcionales del ligando. El proceso de bioconjugación consta de dos pasos principales [7]:

1. Funcionalización de las nanopartículas: la superficie de las nanopartículas puede contener diversidad de grupos funcionales, los cuales pueden ser grupos tiol, amino, carboxilo, aldehído, cetona, hidroxilo e hidrógeno [8]. Uno de los requisitos fundamentales para que tenga lugar la bioconjugación es el tratamiento de las secuencias de ADN para desproteger los grupos de los extremos de las hebras [7]. En el presente trabajo los grupos de los extremos de las secuencias de ADN son

grupos tiol, y la desprotección se realizará mediante el empleo de citrato de sodio tribásico dihidratado (TCHB).

2. Bioconjugación: Una vez que los grupos de los extremos de las hebras se encuentran desprotegidos puede llevarse a cabo el proceso de bioconjugación, mediante estrategias como la formación de enlaces covalentes, interacciones electrostáticas, enlaces de afinidad, o adsorciones físicas [7].

Normalmente, las bioconjugaciones se realizan mediante enlaces covalentes con el objetivo de disponer de enlaces que no sean débiles y obtener además una adecuada orientación de los ligandos. Los enlaces covalentes suelen tener lugar entre los siguientes grupos [9]:

- Dos grupos tiol.
- Dos aminas primarias.
- Un ácido carboxílico y una amina primaria.
- Una amina primaria y un aldehído.
- Una hidrazina y un aldehído.
- Una maleimida y un tiol.

2.6.3 Bioconjugación de las nanopartículas de oro con ADN para el desarrollo de sensores colorimétricos.

En los últimos años, se han desarrollado estrategias para enlazar covalentemente ADN a la superficie de nanopartículas, que en esta ocasión serán nanopartículas de oro, con el objetivo de diseñar un biosensor capaz de detectar la presencia de un ADN de interés mediante cambios de color. Estas estrategias se caracterizan por el empleo de dos AuNPs funcionalizadas con ADN, de forma que, los extremos de ambos fragmentos de ADN son parcialmente complementarios a los extremos del sustrato. Lo que ocurre es que, en ausencia del alérgeno, es decir, de la secuencia diana, se tienden a formar agregados de AuNPs, observándose un color azul. Por el contrario, ante la presencia de la secuencia diana de interés, tiene lugar la activación de la MNzyme y se produce una escisión del sustrato, observándose un color rojo correspondiente a las AuNPs dispersas. Las ventajas del empleo de nanopartículas radican en la sencillez, ya que no se requiere personal cualificado para estos análisis cualitativos. Sin embargo, la sencillez de estas estrategias provoca una alta variabilidad, ya que la subjetividad de cada individuo para distinguir pequeños cambios de color es un factor importante [10].

2.6.4 Absorción del plasmón superficial.

Las nanopartículas de oro presentan una propiedad óptica conocida como la absorción del plasmón superficial, la cual es una propiedad ausente a escalas macroscópicas y atómicas. La absorción del plasmón superficial es propia de las nanopartículas debido a que el tamaño de las mismas restringe el movimiento de los electrones [6]. Cuando las nanopartículas que presentan un tamaño aproximado a 100 nm, y cercano al del electrón, son irradiadas con una radiación, se producen una serie de oscilaciones electrónicas en la superficie de las mismas, conocidas como resonancia de plasmones de superficie localizada (SPR). Lo que ocurre es que estas oscilaciones descritas entran en resonancia con la radiación en la zona del visible, originándose así una banda de absorción de plasmón propia alrededor de 520 nm [11] [12].

Esta propiedad de las nanopartículas de oro se ve afectada por factores como el tamaño de las nanopartículas o la agregación de las mismas, ya que el aumento del tamaño implica un aumento del coeficiente de extinción, y en consecuencia un desplazamiento en la banda de absorción del plasmón superficial. Del mismo modo, una agregación de nanopartículas conlleva la formación de una banda de absorción a mayores longitudes de onda (de 520 a 650 nm) debido a los acoplamientos entre los diferentes plasmones [11] [12].

Las nanopartículas de oro son comúnmente utilizadas con una amplificación catalítica de MNAszymes, debido a la propiedad de resonancia de plasmón de superficie localizada que ofrecen [10]. La resonancia de plasmón de superficie localizada proporciona la información relevante en los espectros de absorbancia, ya que, en caso de observarse un ensanchamiento carente de homogeneidad, se debería a la no homogeneidad de tamaño y forma de las propias nanopartículas. La característica más empleada de la banda de resonancia de plasmón de superficie localizada es la dependencia de la posición a la que se encuentra con el tamaño de las nanopartículas, ya que la interacción entre la luz y la superficie de las nanopartículas genera efectos de retardo en función del tamaño de las mismas [13]. Debido justamente a este fenómeno de resonancia de plasmón de superficie localizada, pueden detectarse cambios de color en función de la agregación o no agregación de las nanopartículas [10]. Los cambios de color pueden estudiarse desde una perspectiva visual o desde un estudio espectrofotométrico.

Por lo tanto, es común el empleo de amplificaciones de la señal, y la utilización de aplicaciones basadas en el procesamiento y en el análisis del color de imágenes,

para lograr obtener de este modo una sensibilidad moderada además del resto de ventajas ya descritas de los biosensores.

2.6.5 Amplificación de la señal con el empleo de MNazymes.

La amplificación de la señal en los biosensores puede llevarse a cabo mediante el empleo de MNazymes, el cual es un sistema compuesto por un fragmento de ADN con capacidad de reconocer una secuencia complementaria, es decir, las MNazymes actúan como una enzima. El funcionamiento de las MNazymes se basa en la hibridación de diferentes cadenas de ADN, que provoca la activación de las MNazymes cuando el analito de interés está presente. Una vez que se ha producido la activación de la MNazyme, se produce la escisión del Linker, es decir, del sustrato, y como consecuencia de ello, el Linker se libera, y el MNazyme queda libre, adquiriendo la capacidad de realizar una hibridación nueva con otro Linker. La amplificación tiene lugar ya que únicamente se requiere la presencia de una cadena de analito para producir la rotura de un número elevado de Linkers [14].

Para llevar a cabo la amplificación descrita, se requiere disponer de AuNPs bioconjugadas con fragmentos de ADN complementarios al Linker. De este modo, si el ADN de interés está presente, no se producirá una agregación de las AuNPs, ya que tendría lugar la escisión. Por el contrario, ante la ausencia del ADN, la MNazyme no se activará, por lo que no tendrá lugar la escisión del Linker. En el caso de producirse la escisión del Linker, este se fragmenta dando lugar a dos fragmentos [14]. Véase en la *figura 3* un esquema del ensayo de escisión que tendría lugar ante la presencia del ADN de interés.

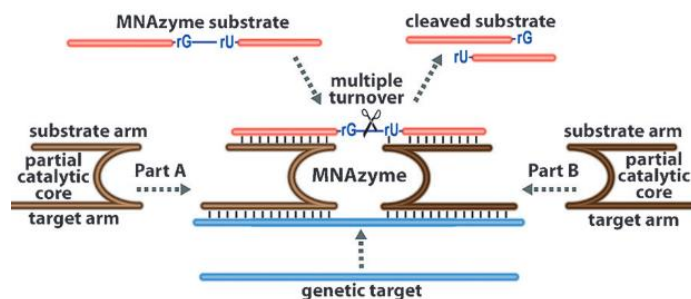


Figura 3: Esquema del ensayo de escisión del Linker en presencia del ADN de interés.

Reproducido de referencia [15].

La amplificación de la señal mediante el empleo de MNazymes, es una metodología sencilla y rápida que permite diseñar biosensores con elevada selectividad para detectar la presencia de un ADN de interés [14].

2.7 Análisis de color mediante softwares de edición de imágenes.

2.7.1 Espacios de color.

Los espacios de color se definen como los modelos que definen un color. A través de los espacios de color es posible obtener la información presente en una imagen digital. Existen diversos espacios de color para el procesado de imágenes, aunque los más empleados son los espacios RGB, YIQ, HSI, CMY, y CMYK. De todos ellos, el espacio de color más reconocido es el RGB. Véase a continuación las características de cada espacio de color [16]:

- Espacio de color HSI: realiza una codificación del color con las características de tono, luminancia, saturación o intensidad [16].
- Espacio de color YIQ: es una recodificación del espacio RGB, de modo que la componente Y refleja la luminancia, y las componentes I y Q, las cuales están desacopladas, muestran información acerca del color. Además, este modelo está situado en un sistema coordenado cartesiano tridimensional, el cual es un poliedro convexo [16].
- Espacio de color CMY y CMYK: el espacio de color CMY es un modelo en el cual los colores primarios vienen definidos por el cian, el magenta y el amarillo, y en este modelo, el negro se genera por un mezclado de todos los colores, mientras que el blanco, es la ausencia de color. Al agregarse la tinta negra por mezclado de colores se obtiene el espacio CMYK. Ambos espacios de color se fundamentan en la absorción de luz, basándose en el hecho de que el color mostrado por un objeto referencia la luz no absorbida por él [16].
- Espacio de color RGB: el espacio de color RGB se caracteriza por ser un subespacio del espacio euclidiano, el cual está conformado por el cubo unitario que se muestra en la *figura 4* [16].

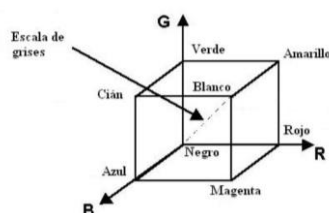


Figura 4: Cubo unitario de color que representa el espacio de color RGB. Reproducido de referencia [16].

En este espacio de color, los colores se muestran en función de las componentes de rojo (R), verde (G) y azul (B), y el resto de los colores se muestran como diferentes coordenadas de los anteriores. De esta forma, en las imágenes digitales las componentes del color rojo, verde y azul vienen representadas por números enteros desde el 0 hasta el 255, hecho que genera un abanico de 16.777.216 colores [16].

2.7.2 *“Image J” para el procesamiento de imágenes.*

El creciente desarrollo del análisis de imágenes de color, ha fomentado la creación de programas de procesamiento de imágenes como *“Image J”*, el cual está programado en Java. Este programa permite llevar a cabo análisis y procesados de imágenes personalizados mediante el empleo de un editor incluido en el propio *“Image J”* y un compilador Java [17]. Como el color es subjetivo, un análisis visual no siempre indica si un resultado es positivo o negativo. Por lo tanto, se utilizará *“Image J”* para seleccionar un área determinada de una imagen y realizar un procesamiento del color de forma numérica transformando el color en un número a través de los espacios de color. Entre todos los espacios de color, el más extendido es el espacio RGB. De esta forma, a través de un amplio análisis RGB de los píxeles del área seleccionada de varias muestras, se podría diferenciar si existe o no agregación en aquellas muestras en las que la interpretación visual no es tan obvia.

2.7.3 *Software Quimiométrico “The Unscrambler X” para el análisis de las imágenes de color.*

La existencia de múltiples variables dificulta la clasificación del estado de agregación de las AuNPs, requiriéndose el empleo de herramientas de análisis multivariante que permitan reconocer la variabilidad existente en un conjunto de muestras y reducir a un número inferior de dimensiones dichas variables. Una de estas herramientas es el análisis de componentes principales (PCA), el cual se puede llevar a cabo mediante el empleo de diferentes softwares quimiométricos. En lo que respecta a este trabajo, hemos empleado el software *“The Unscrambler X”*, puesto que permite llevar a cabo el análisis multivariante, mediante la posibilidad de trabajar con gráficos de varianza, de influencia, de puntuaciones, y de los pesos o mapa de variables [18].

La utilidad del análisis mediante PCA se encuentra en la capacidad de determinar las diferencias existentes entre las muestras, las variables que provocan esas diferencias, y la existencia de correlaciones entre dichas variables. Para ello, el análisis PCA trabaja con unas nuevas variables, conocidas como componentes principales, de forma que el primer componente principal explica el porcentaje de variabilidad más elevado, y a medida que vamos incrementando el número de componentes principales cada uno de ellos explica un porcentaje de variabilidad cada vez más reducido, pero no por ello menos importante para llevar a cabo la diferenciación o clasificación de los espacios de color estudiados. El resultado de la PCA se muestra

gráficamente en función de los “scores” o “loadings”, los cuales explican patrones de comportamiento entre muestras y correlaciones entre variables respectivamente [19].

3. Objetivo.

El presente trabajo refleja como objetivo principal la detección colorimétrica de sésamo mediante el empleo de herramientas de análisis de color y quimiométricas, como es en este último caso el análisis de componentes principales (PCAs). Para ello, se emplearán como herramientas informáticas el programa “Image J” y el Software “The Unscrambler X”. Además, se compararán los resultados con los obtenidos a través de forma visual, mediante análisis de color, y por análisis espectrofotométrico. Para llevar a cabo el objetivo principal, se establecieron los siguientes objetivos particulares:

- 1) Caracterización de la carga de nanopartículas de oro de dos tamaños mediante DLS, y medidas espectrofotométricas.
- 2) Bioconjugación de las nanopartículas de oro.
- 3) Optimización de la concentración de Linker y de la sal MgCl₂.
- 4) Evaluación de los resultados mediante análisis de color y tratamiento quimiométrico.

4. Materiales.

4.1 Reactivos.

- Nanopartículas de oro (AuNPs) de 15 nm, casa comercial Thermo Scientific, referencia J67141.AC.
- Nanopartículas de oro (AuNPs) de 20 nm, casa comercial Thermo Scientific, referencia J67318.AC.
- Soluciones Stock de oligonucleótidos de 100 μM, casa comercial BioBasic (Mark-ham, Ontario, Canadá):
 - ✓ Agg 1: HS-5'-AAA AAA ACC TAT CGA CCA TGC T-3'
 - ✓ Agg 4: 5'-GCG CTA GAG TCG TTT AAA AAA AAA A-3'-SH
- Solución Stock de Linker de 100 μM, casa comercial BioBasic (Mark-ham, Ontario, Canadá):
 - ✓ 5'- AGC ATG GTC GAT AGG TAA GGT TTC CTC rGrUC CCT GGG CAT AAA CGA CTC TAG CGC-3'
- Solución stock de ADN de sésamo de 100 μM, casa comercial BioBasic (Mark-ham, Ontario, Canadá):

- ✓ AF_Ses2: 5'-TCT TTC AAG CGT GCG AAT GAA CCC TTC AGT GGT ACG GAG TC-3'
- Solución stock de MNAszymes del ADN de sésamo de 100 µM, casa comercial BioBasic (Mark-ham, Ontario, Canadá):
 - ✓ MzSes2/R: 5'-GAC TCC GTA CCA CTG AAG GGA CAA CGA GAG GAA ACC TT-3'
 - ✓ MzSes2/L: 5'-TGC CCA GGG AGG CTA GCT TTC ATT CGC ACG CTT GAA AGA-3'
- Buffer Dulbecco's fosfato salino (PBS), casa comercial Sigma-Aldrich, referencia D8537-500ML.
- RNaseZap™ invitrogen, casa comercial Thermo Fisher Scientific, referencia AM9780, AM9782.
- Tris, clorhidrato, grado de biología molecular, casa comercial EMD Millipore Corporation. 290 Concord Road, referencia 648317-100GM.
- Cloruro de potasio, casa comercial Sigma-Aldrich, referencia número CAS: 7447-40-7.
- Seakem® LE Agarosa, casa comercial Cambrex Bio Science Rockland, Inc, referencia 50004.
- Sacarosa, casa comercial Sigma-Aldrich, referencia número de CAS: 57-50-1.
- mPEG-SH, casa comercial Laysan Bio, Inc, referencia 256-586-9004.
- Tween® 20, casa comercial Sigma-Aldrich, referencia número CAS: 9005-64-5.
- Citrato de sodio tribásico dihidratado (TCHB), casa comercial Sigma-Aldrich, referencia número CAS: 6132-04-3.
- Cloruro de magnesio hexahidratado, casa comercial Sigma-Aldrich, referencia 7791-18-6.
- Tris-Borato-EDTA buffer (TBE) concentración 5x, casa comercial Sigma-Aldrich, referencia T6400.
- Placas TLC sílica gel 60 F₂₅₂, casa comercial Supelco, referencia 1.05554.0001.
- Caja de luz fotográfica, casa comercial PULUZ®.
- H₂O mili Q.

4.2 Instrumentación y equipos.

- Dispensador de H₂O mili Q, casa comercial ELGA, modelo PURELAB flex.
- Balanza analítica, casa comercial OHAUS®, modelo Pioneer™.
- Espectrofotómetro de microplacas UV-VIS, casa comercial Thermo Scientific, modelo MULTISKAN SkyHigh.

- Espectrofotómetro UV-VIS, casa comercial Thermo Scientific, modelo Genesis 10-S.
- Dynamic light scattering (DLS), casa comercial Malvern Instruments Zetasier.
- Termo-agitador, casa comercial Biosan, modelo TS-100C.
- pHmetro, casa comercial Mettler Toledo, modelo FiveEasy.
- Agitador magnético acoplado pHmetro, casa comercial Fisher Scientific, modelo FB15038.
- Baño termostático, casa comercial Trade Raypa®.
- Centrífuga, casa comercial Gyrozen, modelo 1580R.
- MiniSpin, casa comercial Eppendorf.

5. Procedimiento experimental.

5.1 Preparación de disoluciones.

A continuación, se muestran todas las disoluciones empleadas durante el desarrollo del trabajo:

- 50 mL Tween-20 al 0,1% (m/v). Véase los cálculos en el *anexo 1*.
- 50 mL Tween-20 al 0,01% (m/v) a partir de la disolución de Tween-20 0,1%. Véase los cálculos en el *anexo 2*.
- 500 mL TBE 1x a partir de 1000 mL TBE 5x. Véase el procedimiento para la preparación de esta disolución en el *anexo 3*.
- 50 mL MgCl₂ 400 mM. Véase los cálculos en el *anexo 4*.
- 50 mL MgCl₂ 800 mM. Véase los cálculos en el *anexo 5*.
- 50 mL TCHB (buffer HCl trisodio citrato; pH 3; 90 mM). Véase los cálculos en el *anexo 6*.
- 50 mL 10x MNAzyme buffer [0,1M Tris-HCl; 0,5M KCl; pH 8,3]. Véase los cálculos en el *anexo 7*.
- Sacarosa 40% (w/v) en TBE 0,5x. Véase el procedimiento para la preparación de esta disolución en el *anexo 8*.

5.2 Caracterización de las nanopartículas de oro comerciales.

Para llevar a cabo los ensayos se utilizarán AuNPs comerciales de 15 y 20 nm 0,1 mM en PBS, las cuales se caracterizarán con el fin de confirmar sus propiedades y calidad.

5.2.1 Medidas de absorbancia de las nanopartículas de oro.

Inicialmente, se procedió a realizar las medidas de absorbancia de las nanopartículas de oro. Para ello, se midió en primer lugar un blanco de PBS, ya que era el disolvente de las AuNPs, en el rango comprendido entre 200 y 800 nm de 5 en 5 nm. Posteriormente, se procedió a la medida de las disoluciones de AuNPs, para lo cual se diluyeron las mismas disolviendo 100 μ L de AuNPs en 1900 μ L de PBS, es decir, se realizó una dilución 1:20. Posteriormente se midió la absorbancia de las AuNPs en las mismas condiciones que el blanco. Para las medidas de absorbancia se utilizó una cubeta de cuarzo con dos caras esmeriladas.

5.2.2 Medidas de carga en DLS de las nanopartículas de oro.

Mediante la técnica de la dispersión dinámica de la luz se realizan medidas de la carga de las nanopartículas comerciales. Para ello, se debe de indicar el disolvente, que en esta ocasión es PBS, y el tipo de partícula que se pretende medir, es decir, las nanopartículas de oro comerciales. El PBS tiene un pH neutro. Normalmente, se pretenderá trabajar a un pH básico, para observar la carga negativa del citrato, la cual evita la agregación de las nanopartículas. Para la medida de la carga se requirió de una cubeta desechable de plástico, la cual poseía dos electrodos integrados.

5.3 Preconcentración de las nanopartículas de oro comerciales.

Para llevar a cabo la preconcentración de las AuNPs comerciales se debe de añadir previamente Tween-20 0,1%, para que la concentración del mismo sea 0,01%. El Tween-20 evita la agregación de las AuNPs.

Posteriormente, se procede a centrifugar las AuNPs a 10000g durante 30 minutos y a 4°C. El objetivo es preconcentrar las AuNPs a 100 nM. Cuando haya finalizado el primer ciclo de preconcentración se vuelve a realizar otro ciclo con los sobrenadantes obtenidos (PBS), empleando las condiciones descritas anteriormente. Mientras, se introducen los pellets en hielo. Posteriormente, se vuelve a realizar un último ciclo de preconcentración en la centrífuga con los sobrenadantes del segundo ciclo, y empleando de nuevo las condiciones anteriores. Los pellets recogidos de este segundo ciclo de preconcentración se añaden sobre los anteriores, y se dejan en hielo. Finalmente, se recogen los pellets del tercer ciclo de preconcentración con los anteriores, y se descartan los sobrenadantes obtenidos. Las AuNPs preconcentradas deben mantenerse en hielo.

Para conocer la concentración de las AuNPs preconcentradas se procede a la medida de la absorbancia de las mismas. Para la medida de la absorbancia se utilizaron cubetas de cuarzo con dos caras esmeriladas. Inicialmente se midió un blanco de PBS, entre 200 y 800 nm, de 5 en 5 nm. Posteriormente, se realizó una dilución de las AuNPs preconcentradas 1:100 en PBS en 2 Eppendorfs (uno para las AuNPs de 15 nm y otro para las AuNPs de 20 nm), de forma que se disuelven 10 μL de AuNPs preconcentradas en 990 μL de PBS. Conociendo la absorbancia máxima de las AuNPs diluidas, la longitud de onda del máximo de absorbancia, el tamaño, y la dilución de las mismas, se calcula la concentración de las AuNPs en las disoluciones. Para medir la absorbancia se seleccionaron 300 μL , y se midió en las mismas condiciones que el blanco.

5.4 Bioconjugación de las nanopartículas de oro.

A continuación, se detalla el procedimiento experimental individual llevado a cabo para realizar la bioconjugación de las AuNPs de 15 nm de 2000 nM y de las AuNPs de 20 nm de 100 nM. En primer lugar, se debe de limpiar el área de trabajo con etanol y un kit de RNaseZap™ con el objetivo de descontaminar dicho área de RNasas, para posteriormente preparar en hielo los siguientes ratios con los oligonucleótidos Agg 1 y Agg 4. Los Agg deben descongelarse previamente y someterlos a un spin en la centrífuga. Véase en la *tabla 3* las cantidades y reactivos necesarios para preparar los siguientes ratios, y en el *anexo 9* los cálculos para preparar 20 μL de los Agg 1 y Agg 4, de concentración 25 μM , a partir de los Agg 1 y Agg 4 de concentración 100 μM .

Tabla 3: Ratios moleculares evaluados en la bioconjugación de las AuNPs de 15 nm.

Ratio ADN:AuNP	Vial	[Agg]_{inicial} μM	[Agg]_{final} μM	V.final μL	V[Agg]_{inicial} μL	H₂O mili Q μL
300:1	1	100	30	10	3	7
250:1	2	100	25	20	5	15
200:1	3	100	20	10	2	8
150:1	4	100	15	10	1,5	8,5
100:1	5	25	10	10	4	6
50:1	6	25	5	10	2	8
25:1	7	25	2,5	10	1	9
0	8	100	0	10	0	10

A partir de cada ratio anterior se preparan 8 Eppendorfs con cada Agg para realizar las bioconjugaciones según se muestra en la *tabla 4*.

Tabla 4: Preparación de disoluciones a partir de los ratios anteriores.

Reactivo	Volumen (µL)
AuNPs 15 nm 2000 nM/ AuNPs 20 nm 100 nM	5
Tween-20 0,1%	2
H ₂ O mili Q	3
30 a 0 µM ADN-SH	5
Incubar en hielo durante 5 minutos antes de añadir TCHB	-
Buffer TCHB 90 mM	5
Volumen total	20

Los Eppendorfs con Agg 1 y Agg 4 se mantienen en agitación durante un tiempo de 2 horas a 650 rpm y a 20°C en un termoagitador. Posteriormente, se prepara una disolución de mPEG-SH 2 mM, para lo cual se pesaron 2 mg de mPEG-SH en 1 mL de H₂O mili Q en un Eppendorf. Finalmente, se añadieron 40 µL de la disolución anterior a cada Eppendorf de las AuNPs con los Agg 1 y 4. La función del mPEG-SH es recubrir la superficie de las AuNPs que no haya sido recubierta con los Agg. Por último, después de añadir el mPEG-SH a todos los Eppendorfs, estos se incuban durante 30 minutos a 650 rpm y a 60 °C en un termoagitador.

A continuación, para eliminar el exceso de mPEG-SH, se realizan 3 centrifugaciones a 8000 g durante 30 minutos y a 4°C cada una. Después de cada ciclo de centrifugación se debe de eliminar el sobrenadante, que es donde se encuentra el exceso de mPEG-SH, para realizar el siguiente ciclo de centrifugación con los pellets, redisolviendo los mismos en 60 µL de Tween-20 0,01% para lavarlos. Una vez finalizadas las 3 centrifugaciones se procedió a la preparación de los geles de electroforesis, que nos permitirán confirmar si la bioconjugación se ha llevado a cabo exitosamente.

➤ Preparación de los geles de electroforesis.

Debido al diferente tamaño de las AuNPs empleadas, los geles de las AuNPs de 20 nm deben de poseer un tamaño de poro mayor que los geles de las AuNPs de 15 nm. Por ello, se preparan geles al 1 % de agarosa para las AuNPs de 15 nm y al 0,8 % para las AuNPs de 20 nm, pesando 1 y 0,8 gramos de agarosa respectivamente en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, y añadiendo 100 mL de TBE 0,5x. A continuación, se

calienta el matraz Erlenmeyer sin alcanzar la ebullición, y cuando el gel se vuelva transparente se vierte sobre la cubeta de electroforesis para que solidifique. Posteriormente, se preparan las muestras con 7 μL de las bioconjugaciones y con 7 μL de sacarosa 40% (w/v). La función de la sacarosa es aportar densidad a las muestras para que no se salgan de los pocillos al realizar la electroforesis. Se realizará la electroforesis con un voltaje de 100 V durante 30 minutos.

5.5 Optimización del método.

5.5.1 Optimización de la concentración de Linker.

La optimización de Linker se lleva a cabo con los ratios ADN:AuNPs seleccionados (Agg 1 100:1 y Agg 4 150:1). Inicialmente, se prepara una solución madre de Linker 1 μM a partir de la solución de Linker 100 μM , para lo cual se diluyeron 10 μL de Linker 100 μM en 1 mL H_2O mili Q. A continuación, se prepara la *tabla 5*:

Tabla 5: Preparación de disoluciones de concentraciones del Linker comprendidas entre 700 y 0 nM.

[Linker] (nM)	Stock (nM)	V. final (μL)	V.del Stock (μL)	H_2O mili Q (μL)
700	1000	100	70	30
600	1000	100	60	40
500	1000	100	50	50
450	1000	100	45	55
400	1000	100	40	60
300	1000	100	30	70
200	1000	100	20	80
0	1000	100	0	100

A continuación, a partir de los Eppendorfs anteriores se preparan las siguientes disoluciones. Véase la *tabla 6*.

Tabla 6: Preparación de disoluciones para la optimización de Linker.

Reactivo	Volumen (μL)
H_2O mili Q	5
Buffer 10x MNAzyme	1
400 mM MgCl_2	2

Solución 4 μM [AF_Ses2]	0
700-0 nM Linker	2
2000 nM AuNP-Agg 1	5
2000 nM AuNP-Agg 4	5
Volumen total	20

Una vez añadidos los volúmenes indicados en la *tabla 6*, se deben de incubar todas las disoluciones a 50 °C durante 20 minutos para permitir el entrecruzamiento de las AuNPs. Posteriormente, se depositan 20 μL de cada uno de los 8 Eppendorfs en un pocillo de una microplaca de absorbancia para visualizar el pico de resonancia de plasmón superficial (SPR). Se mide la absorbancia en el espectrofotómetro de microplacas entre 400 y 600 nm de 1 en 1 nm, y sin agitar los pocillos, para evitar de este modo la ruptura de enlaces. Por último, se depositan en una placa TLC 5 μL de cada una de las mezclas de los pocillos de la microplaca de absorbancia para visualizar el grado de agregación. Sin embargo, se observó que para concentraciones de Linker desde 700 nM hasta 0 nM no se generaba desplazamiento del máximo de absorbancia, por lo que se repitió el ensayo empleando el doble de concentración de Linker, preparando una disolución intermedia de 1400 nM de 500 μL , a partir de la cual se preparan las demás disoluciones de diferentes concentraciones de Linker. Además, también se procedió a realizar el ensayo empleando concentraciones de Linker de 1600 nM, 1800 nM, 2000 nM, 2500 nM, 3000 nM, 3500 nM, 4000 nM, 4500 nM, y 100000 nM, para lo cual fue necesario preparar una disolución intermedia del Linker de 4500 nM y de 500 μL .

5.5.2 Optimización de la concentración de MgCl_2 .

Una vez optimizada la concentración de Linker, se debe de optimizar la concentración de la sal MgCl_2 , ya que el ion Mg^{2+} actúa como cofactor de las MNAszymes facilitando su actividad [20]. Por lo tanto, se seleccionó una concentración de Linker para la que no se observó agregación, que en esta ocasión fue de 600 nM, ya que de esta forma la agregación será debida a la concentración de la sal MgCl_2 y no a la concentración del Linker. Aunque con la concentración de Linker de 600 nM no debería de producirse agregación, se decidió preparar las mismas muestras con H_2O mili Q en lugar del reactivo Linker, con el objetivo de confirmar que la agregación se deba únicamente a la presencia de la sal MgCl_2 . Para llevar a cabo la optimización de la concentración de la sal MgCl_2 se emplearon diferentes concentraciones de la misma con

el objetivo de evaluar el grado de agregación. La concentración de $MgCl_2$ que se estaba empleando en la optimización de la concentración del Linker era de 40 mM, por lo que se decidieron emplear concentraciones superiores e inferiores. Las concentraciones de $MgCl_2$ seleccionadas fueron de 10,20,30,40,50 y 60 mM.

Como el volumen final de los Eppendorfs del ensayo de agregación es de 20 μL , se prepararon unas disoluciones de diferentes concentraciones de $MgCl_2$ para que al añadir 2 μL de la sal se obtenga la concentración esperada en los Eppendorfs del ensayo de agregación. Por ello, se deben de preparar disoluciones de $MgCl_2$ de concentración 100, 200, 300, 400, 500, y 600 mM. Las disoluciones de 100, 200, y 300 mM se preparan a partir de la disolución de 400 mM, mientras que las disoluciones de 500 y de 600 mM se preparan a partir de la disolución de $MgCl_2$ de 800 mM. Véase los cálculos en el *anexo 10*.

Finalmente, se preparan 12 Eppendorfs con los reactivos que se recogen en la *tabla 7*. Como puede observarse en la *tabla 7*, 6 de ellos contienen los reactivos indicados y el Linker (variando las concentraciones de $MgCl_2$), mientras que los otros 6 se llenaron con los reactivos indicados y con H_2O mili Q en lugar del reactivo Linker (variando también las concentraciones de la sal añadida).

Tabla 7: Preparación de disoluciones con Linker y H_2O mili Q empleando diferentes concentraciones de $MgCl_2$.

Reactivo	Volumen (μL)
H ₂ O mili Q	5
Buffer 10x MNAzyme	1
600, 500, 400, 300, 200 y 100 mM $MgCl_2$	2
Solución 4 μM [AF_Ses2]	0
600 nM Linker/ H_2O mili Q	2
2000 nM AuNP-Agg 1	5
2000 nM AuNP-Agg 4	5
Volumen total	20

Una vez añadidos los volúmenes indicados en la *tabla 7*, de cada uno de los reactivos, se deben de incubar todas las disoluciones a 50 °C durante 20 minutos para permitir el entrecruzamiento de las AuNPs. De nuevo, se depositaron los 20 μL de las mezclas en la microplaca de absorbancia para visualizar el pico de resonancia de plasmón superficial (SPR). No se agitaron los pocillos en el espectrofotómetro de microplacas y se midió la absorbancia entre 400 y 800 nm de 1 en 1 nm. Finalmente, se

pincharon en una placa TLC 5 μL de cada mezcla de la *tabla 7* para visualizar el grado de agregación.

5.6 Calibrado con las nanopartículas de oro de 15 nm con ADN de sésamo.

Para la realización del calibrado se emplearon concentraciones de ADN de sésamo de 0; 0,1; 0,15; 0,2; 0,25; 0,5; 1 y 5 nM. Para trabajar con estas concentraciones se deben de preparar unas disoluciones de ADN de sésamo de forma que al añadir 5 μL de ellas las concentraciones en los 20 μL de mezclas sean las mencionadas anteriormente. Por este motivo, se requiere la preparación de disoluciones con concentraciones de ADN de sésamo de 0,4; 0,6; 0,8; 1; 2; 4 y 20 nM. De nuevo, como se dispone de una solución stock de ADN de sésamo de 40 μL y 100 μM , se requiere la preparación de 1 mL de disoluciones intermedias de 1000, 100, 10, y 1 nM. Finalmente, a partir de la disolución intermedia de 1 nM se preparan las disoluciones de 0,4; 0,6; 0,8 y 1 nM, y a partir de la intermedia de 10 nM se preparan las disoluciones de 2 y de 4 nM. Por último, a través de la disolución intermedia de 100 nM se prepara la disolución de 20 nM. Todas estas últimas disoluciones son de 10 μL . Véase los cálculos en el *anexo 11*.

A continuación, se procede a preparar las muestras para el calibrado con la secuencia de ADN de sésamo AF_Ses2, empleando una solución de Linker de 3000 nM, y una concentración de MgCl_2 de 40 mM (ambas concentraciones se seleccionaron como óptimas en el ensayo experimental). En esta ocasión, se emplearon las AuNPs de 15 nm en concentración 100 nM. Para ello, inicialmente se prepara una solución de Linker de 4500 nM a partir del Stock de 100 μM , y posteriormente la solución de 3000 nM, a partir de la de 4500 nM. Véase la *tabla 8*.

Tabla 8: Preparación de la solución de Linker de 3000 nM.

[Linker] (nM)	Intermedia (nM)	V. final (μL)	V.4500 nM (μL)	H ₂ O mili Q (μL)
4500	100000	500	22,5	477,5
3000	4500	100	66,7	33,3

A continuación, se prepara una solución de 4 μM [MzSes2/R + MzSes2/L]. Para ello, se mezcla en un Eppendorf 5 μL de 100 μM MzSes2/R con 5 μL de 100 μM

MzSes2/L, y se añaden 115 μL de H_2O mili Q. Posteriormente, se preparan las disoluciones para el calibrado que se muestran en la *tabla 9*.

Tabla 9: Preparación de las disoluciones para el calibrado.

Reactivo	Volumen (μL)
Buffer 10x MNAzyme	1
MgCl_2 400 mM	2
Solución de 4 μM [MzSes2/R + MzSes2/L]	1
Linker 3000 nM	2
Solución [AF_Ses2] 20; 4; 2; 1; 0,8; 0,6; 0,4 y 0 nM (H_2O mili Q)	4
AuNP-Agg 1 100 nM	5
AuNP-Agg 4 100 nM	5
Volumen total	20

Una vez añadidos los volúmenes indicados en la *tabla 9*, se deben de incubar todas las disoluciones a 50 $^\circ\text{C}$ durante 60 minutos para permitir la escisión por la activación de las MNAzymes. A continuación, se añadieron los 20 μL de cada una de las disoluciones preparadas en una microplaca de absorbancia para visualizar el pico de resonancia de plasmón superficial (SPR). En el espectrofotómetro de microplacas se midió la absorbancia en esta ocasión entre 400 y 800 nm de 1 en 1 nm. Posteriormente, se depositaron 5 μL de cada muestra de la *tabla 9* en la placa TLC para observar el grado de agregación.

5.7 Análisis del color.

Ante las limitaciones observadas para reconocer la tendencia de agregación, tanto de forma espectrofotométrica como visual, se optó por realizar un análisis del color del calibrado realizado en el *apartado 5.6*, con el objetivo posterior de realizar un análisis estadístico. Para llevar a cabo el análisis del color se empleó la herramienta informática “*Image J*”, a través de la cual se recogieron las imágenes de RGB.

5.7.1 Análisis RGB.

Inicialmente, se requirió la toma de una fotografía de la placa TLC con las muestras del calibrado del *apartado 5.6* junto con otro blanco extra, con el objetivo de poder contrastar mejor los resultados. La fotografía se tomó empleando una caja de luces fotográfica que consta de luces LED blancas en la zona superior, las cuales se

encienden cuando esta se conecta mediante una conexión tipo USB a una computadora. La fotografía se tomó empleando un smartphone desde una altura de 30 cm y con la máxima intensidad luminosa posible. La posibilidad de realizar los análisis químicos empleando un dispositivo móvil permite que el tratamiento de los resultados sea rápido, sencillo, in-situ, en tiempo real y sin la necesidad disponer de personal cualificado. El empleo de la caja de luces es fundamental, ya que se requiere disponer de la mejor calidad posible en términos de luminosidad y tonalidad, para que el posterior tratamiento de la imagen con el programa informático “*Image J*” se pueda realizar teniendo la certeza de que todas las muestras tienen las mismas condiciones de medida, y ninguna de ellas se ve afectada por diferentes sombreados o contrastes.

Posteriormente, a través del propio editor incluido en “*Image J*”, se selecciona un área en la fotografía de 2,1 x 2,1 mm en la zona central de cada muestra. Finalmente, a través del empleo de este programa informático se procesó el color de forma numérica, transformando el color en un número del espacio RGB, obteniéndose 256 píxeles para cada componente R, G y B de cada muestra.

5.8 Análisis quimiométrico.

El análisis del color realizado previamente del calibrado del apartado 5.6 permite llevar a cabo un estudio estadístico de los componentes principales. Para llevar a cabo el análisis de los componentes principales se recurre a la quimiometría mediante el software “*The Unscrambler X*”.

5.8.1 Análisis de los componentes principales (PCA).

Una vez obtenidos los datos con los 256 píxeles de cada una de las componentes del color R, G, y B de todas las muestras, se procede a crear una base de datos. En la base de datos se asumen como valores negativos ambos blancos, y como valores positivos las muestras en las que sí está presente el ADN de sésamo. Posteriormente, empleando el Software “*The Unscrambler X*” y la base de datos creada, se realizan los análisis de los componentes principales (PCAs) del espacio de color RGB completo, y de cada una de las componentes del color R, G y B de cada muestra. El propio Software realiza una validación cruzada de los datos con el objetivo de evaluar la clasificación en el propio análisis de componentes principales de las muestras desconocidas, construyendo un espacio multidimensional con los componentes principales de las muestras seleccionadas y excluyendo las de validación. Posteriormente, a través de representaciones en dos y tres dimensiones de los gráficos

“scores” de los componentes principales obtenidos, se interpretan las semejanzas y diferencias existentes entre las muestras.

6. Resultados.

6.1 Caracterización de las nanopartículas de oro.

6.1.1 Medidas de absorbancia.

Véase en las figuras 5 y 6 los máximos de absorbancia obtenidos para las disoluciones diluidas de AuNPs de 15 y 20 nm. En el espectro de la *figura 5*, se muestra el máximo de absorbancia obtenido a 515 nm. De nuevo, en el espectro de absorbancia de las AuNPs comerciales de 20 nm se observó un máximo de absorbancia de 515 nm. Sin embargo, aunque el tamaño de las AuNPs apenas varía entre las de 15 y 20 nm, se esperaba observar una ligera variación en el máximo de absorbancia. Por lo tanto, como no se apreció ningún cambio en el máximo de absorbancia entre las AuNPs comerciales de 15 y 20 nm, se procedió a volver a medir la absorbancia de las AuNPs comerciales de 20 nm sin diluir, para descartar la presencia de efectos de dilución. Se obtuvo de nuevo un máximo de absorbancia a 515 nm, por lo que se descarta la presencia de estos efectos.

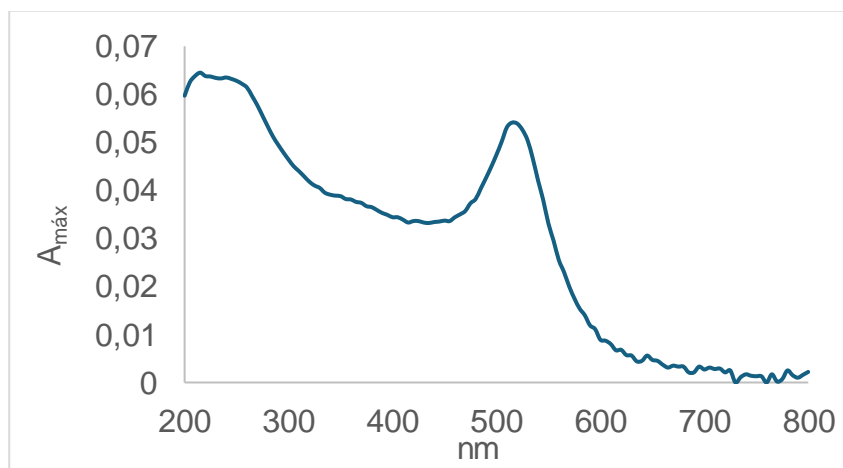


Figura 5: Espectro de absorbancia de las AuNPs comerciales de 15 nm.

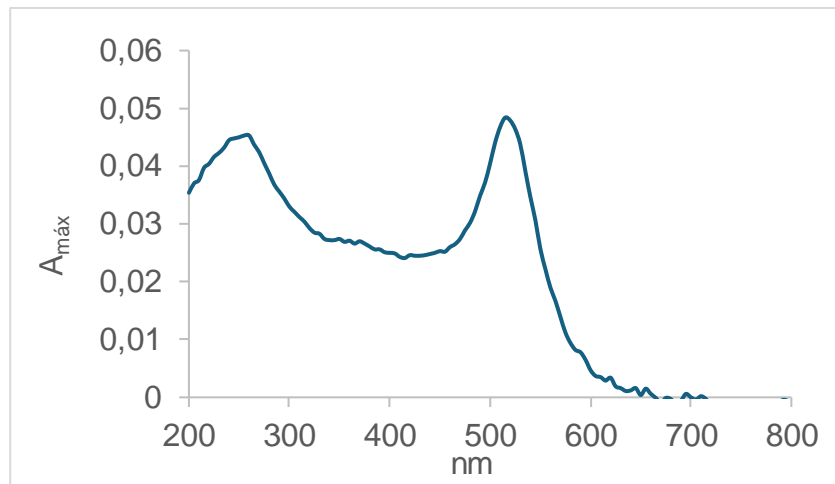


Figura 6: Espectro de absorción de las AuNPs comerciales de 20 nm.

6.1.2 Medida de la carga de las nanopartículas de oro.

Mayoritariamente, las AuNPs tienen carga negativa, ya que se encuentran en el buffer de PBS a pH neutro (7,4), y en ese medio los carboxilos del citrato de la superficie de las AuNPs se encuentran cargados negativamente, aunque existen algunas cargas positivas, pero son minoritarias. Se esperaba que la mayoría de las nanopartículas tuvieran carga negativa para evitar las agregaciones de las mismas.

- ✓ AuNPs de 15 nm sin diluir:

En la *tabla 10* se recogen los resultados obtenidos de medir por triplicado las cargas de las AuNPs de 15 nm sin diluir.

Tabla 10: Resultados de las medidas de carga por triplicado para las AuNPs de 15 nm sin diluir.

Tipo	Nombre de la muestra	ZP (mV)
Carga	AuNPs 15 nm 1	-20,2
Carga	AuNPs 15 nm 2	-23,1
Carga	AuNPs 15 nm 3	-21,3

- ✓ AuNPs de 20 nm sin diluir:

En la *tabla 11* se recogen los resultados obtenidos de medir por triplicado las cargas de las AuNPs de 20 nm sin diluir.

Tabla 11: Resultados de las medidas de carga por triplicado para las AuNPs de 20 nm sin diluir.

Tipo	Nombre de la muestra	ZP (mV)
Carga	AuNPs 20 nm 1	-32,1
Carga	AuNPs 20 nm 2	-34,3
Carga	AuNPs 20 nm 3	-30,9

A la vista de los resultados obtenidos, se concluye que la AuNPs de 15 y 20 nm presentaban distribución de cargas negativas en su superficie, lo cual evita la agregación de las mismas.

6.2 Preconcentración de las nanopartículas de oro comerciales.

Conociendo el tamaño de las AuNPs, la longitud de onda del máximo de absorbancia, el máximo de absorbancia de las mismas, y la dilución realizada, se obtuvieron unas concentraciones para las AuNPs de 15 y 20 nm de 1823 y 239 nM respectivamente. A continuación, véase el *anexo 12* donde se calcula el volumen de las AuNPs preconcentradas de 15 y 20 nm necesario para obtener 1 mL de las AuNPs en concentración 100 nM.

6.3 Bioconjugación de las nanopartículas de oro.

Con el fin de evaluar la eficacia de la reacción de conjugación se realizó un análisis de gel de las mismas, de acuerdo con el procedimiento descrito en el *apartado 5.4*.

6.3.1 Nanopartículas de oro de 20 nm de 100 nM.

- Resultados del gel realizado con las AuNPs de 20 nm de 100 nM con los Agg 1.

A continuación, en la *tabla 12* se muestran los ratios de ADN:AuNPs que se adicionaron en cada pocillo para el Agg 1.

Tabla 12: Ratios inyectados en cada pocillo para el Agg 1.

Pocillo	Muestra (Agg 1: AuNPs)
1	0
2	25:1
3	50:1

4	100:1
5	150:1
6	200:1
7	250:1
8	300:1

Se observó, que salvo el blanco (pocillo 1) todos los ratios se desplazaban por igual, observándose escasas diferencias en los desplazamientos de todas las muestras. El desplazamiento de las AuNPs es función del tamaño y de la carga, y en el ensayo el hecho de trabajar con un gel con menor porcentaje de agarosa (0,8%) llevó consigo un aumento del tamaño de poro y se logró evitar la difusión de la banda en el gel, lo que indica que las AuNPs migraron perfectamente en el gel con ese tamaño de poro, y que la bioconjugación se realizó correctamente, recubriéndose la superficie de las AuNPs de manera homogénea con los Agg 1. Véase en la *figura 7* el resultado del gel obtenido.

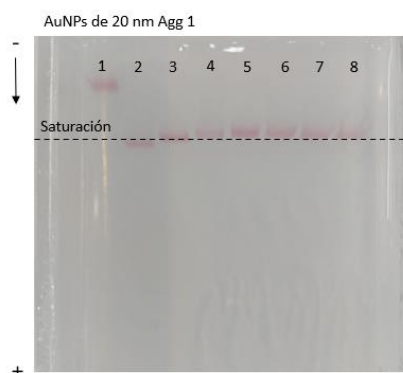


Figura 7: Resultado del gel de electroforesis de las AuNPs de 20 nm 100 nM con los Agg 1.

Ante las escasas diferencias en los desplazamientos de los diferentes ratios ADN:AuNPs, queda de manifiesto la dificultad para seleccionar el ratio óptimo de las AuNPs de 20 nM de 100 nM con el Agg 1, por lo que se decidió centrar el presente trabajo en las AuNPs de 15 nm.

6.3.2 Nanopartículas de oro de 15 nm de 2000 nM.

A continuación, en la *tabla 13* se muestran los ratios de ADN:AuNPs que se inyectaron en cada pocillo para el Agg 1. Se debe de tener en cuenta, que en esta ocasión se inyectó un segundo blanco de electroforesis.

Tabla 13: Ratios inyectados en cada pocillo para el Agg 1.

Pocillo	Muestra (Agg 1: AuNPs)
1	0
2	0
3	25:1
4	50:1
5	100:1
6	150:1
7	200:1
8	250:1

Los pocillos 1 y 2 contenían blancos de AuNPs de 15 nm y el resto distintos ratios Agg:AuNPs. A continuación, en la *tabla 14* se muestran los ratios de ADN:AuNPs que se inyectaron en cada pocillo para el Agg 4.

Tabla 14: Ratios inyectados en cada pocillo para el Agg 4.

Pocillo	Muestra (Agg 4: AuNPs)
1	0
2	0
3	25:1
4	50:1
5	100:1
6	150:1
7	200:1
8	250:1

- Resultados de los 2 geles realizados con las AuNPs de 15 nm de 2000 nM con los Agg 1 y Agg 4.

Cuando la muestra es heterogénea se forman bandas, ya que no toda la superficie de las AuNPs tiene carga negativa, y en consecuencia, la difusión de las AuNPs dentro de cada pocillo es diferente. Por lo tanto, la banda más estrecha es aquella en la que el ratio ADN:AuNP satura y recubre por completo la superficie de las AuNPs. Se observó que las AuNPs migraban una distancia mayor hacia el polo positivo cuanto mayor era la concentración de los Agg empleada. El resultado en ambos geles es el esperado, ya que a mayor concentración de Agg, mayor carga negativa presentan

las AuNPs, y en consecuencia, más atraídas se verán hacia el polo positivo, y mayor será la distancia recorrida respecto del polo negativo. Además, el hecho de observarse un ligero menor avance de las AuNPs con el ratio ADN:AuNP más grande es debido al retardo en el tiempo en el proceso de inyección en el gel, ya que durante el tiempo que transcurre desde la primera a la última inyección las AuNPs bioconjugadas con el ADN comienzan a migrar. A continuación, en la *figura 8* se muestra la comparativa entre los dos geles de electroforesis obtenidos con anterioridad.

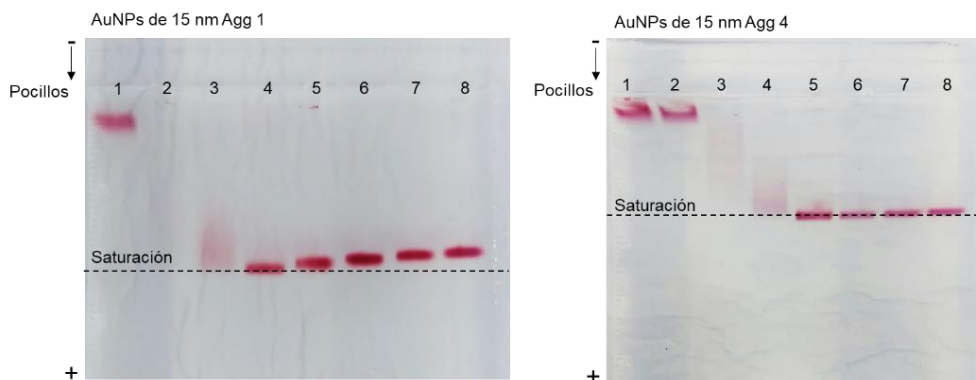


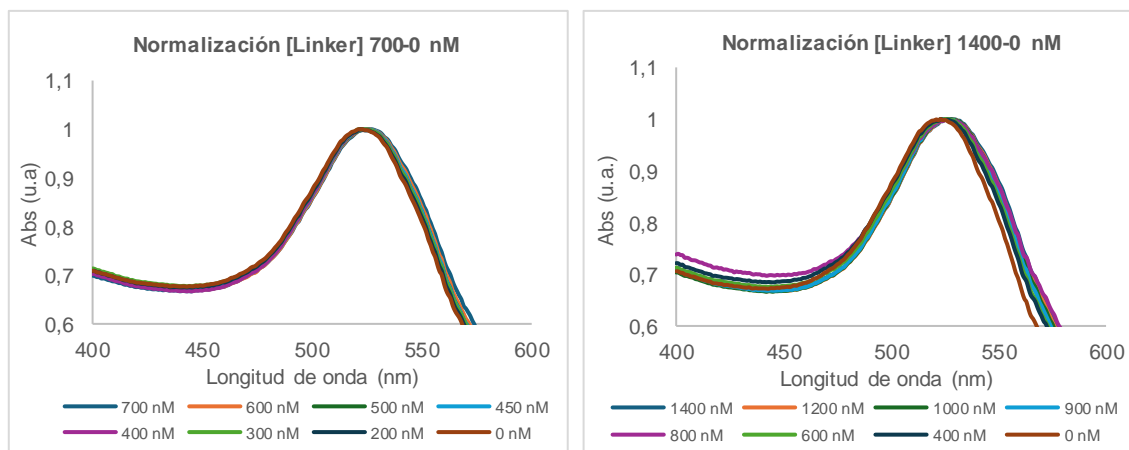
Figura 8: Imágenes de los geles de agarosa al 1% para evaluar cualitativamente la adsorción de las hebras Agg 1 y Agg 4 a las AuNPs de 15 nm. En ambos geles se muestran los resultados para las AuNPs solas, y diferentes relaciones molares de Agg 1:AuNPs y Agg 4:AuNPs de 25:1,50:1, 100:1, 150:1, 200:1 y 250:1. La línea negra discontinua indica el punto de saturación de las nanopartículas.

A la vista de los geles obtenidos se selecciona como ratio óptimo ADN:AuNP para las AuNPs de 15 nm de 2000 nM 100:1 para el Agg 1 y 150:1 para el Agg 4.

6.4 Optimización del método.

6.4.1 Optimización del Linker.

Véase en la *figura 9* los espectros de absorbancia obtenidos para las muestras preparadas con las diferentes concentraciones de Linker.



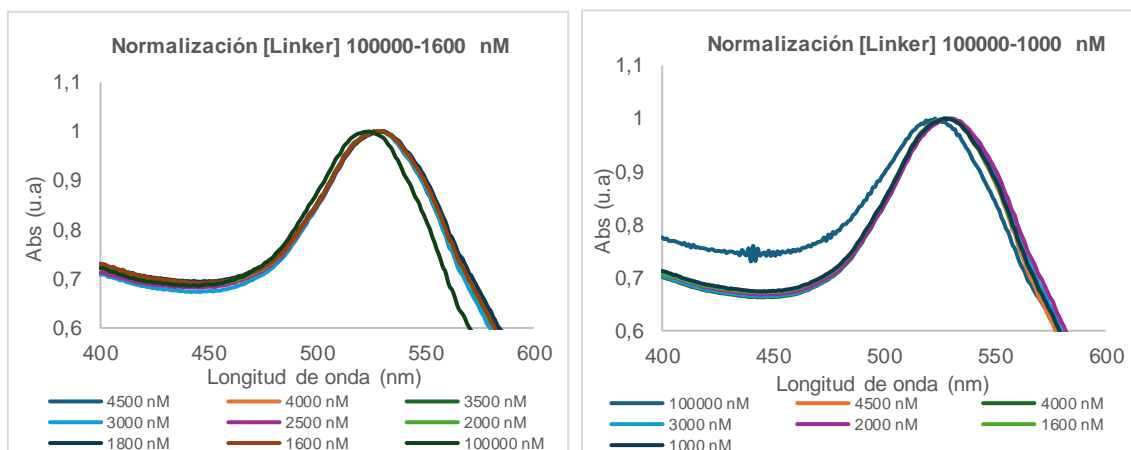


Figura 9: Espectros de absorbancia de las diferentes concentraciones de Linker.

Se observa que para concentraciones de Linker desde 700 nM hasta 0 nM no se genera desplazamiento del máximo de absorbancia. Además, la concentración de Linker a partir de la cual el desplazamiento del máximo de absorbancia comienza a ser evidente es de 1600 nM. Véase la *figura 10* en la que se muestra la optimización de la concentración de Linker desde 0 nM hasta 4000 nM, y en la que se puede apreciar como a partir de 3000 nM, la longitud de onda del máximo de absorbancia no aumenta.

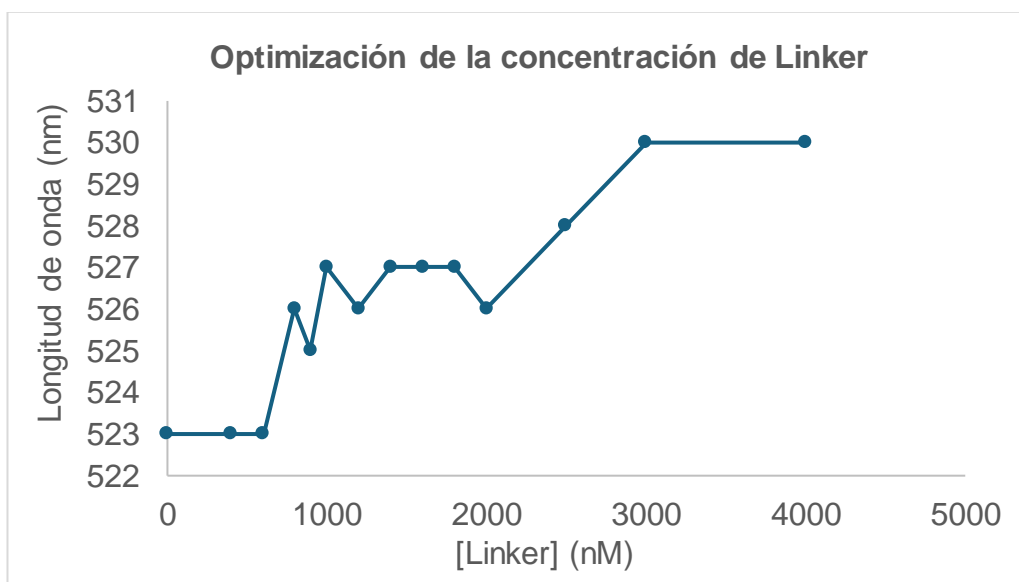


Figura 10: Optimización de la concentración de Linker desde 0 nM hasta 4000 nM.

Por lo tanto, se selecciona como concentración de Linker para la realización del ensayo, aquella que proporciona una saturación, y estabiliza el desplazamiento de las longitudes de onda, siendo esta concentración de 3000 nM. Además del estudio espectrofotométrico realizado, en la *figura 11* se muestra la placa TLC con las diferentes concentraciones nM de Linker empleadas para la optimización.

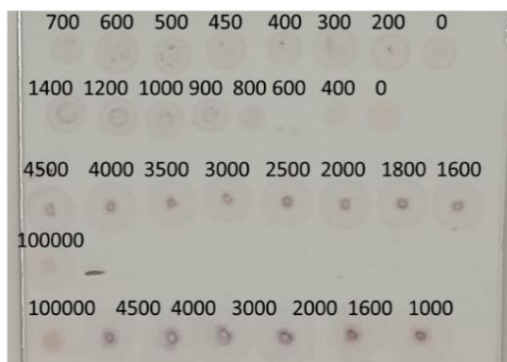


Figura 11: Placa TLC con las concentraciones nM empleadas para la optimización de Linker.

En la placa TLC se aprecia un color hacia tonalidades más moradas para las disoluciones con concentraciones de Linker superiores a 1600 nM. Este hecho reafirma lo observado en los espectros de absorbancia, en los cuales se comenzaba a observar un desplazamiento del máximo de absorbancia para las disoluciones de concentraciones superiores a 1600 nM. Sin embargo, visualmente no se podría confirmar la concentración a partir de la cual se observa una saturación, aunque con el estudio espectrofotométrico se conoció que la saturación se producía con 3000 nM, siendo esta la concentración de Linker óptima.

6.4.2 Optimización de la concentración de MgCl₂.

A continuación, en las figuras 12 y 13 se muestran los espectros de absorbancia obtenidos durante la optimización de la sal MgCl₂ en presencia y en ausencia de Linker.

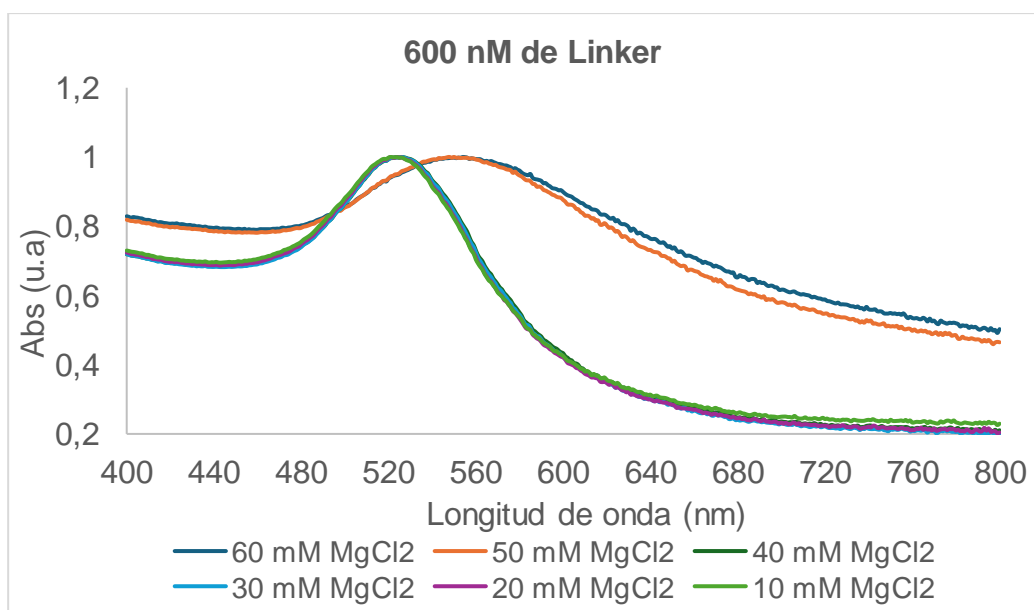


Figura 12: Espectros de absorbancia para las disoluciones de concentraciones de MgCl₂ de 60, 50, 40, 30, 20, y 10 mM, y con concentración de Linker de 600 nM.

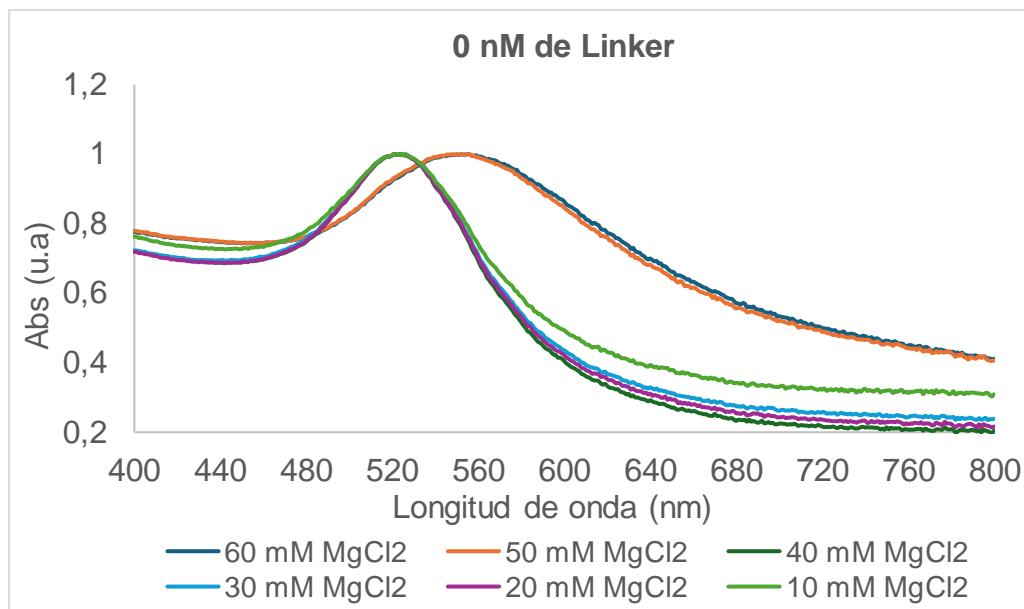


Figura 13: Espectros de absorción para las disoluciones de concentraciones de $MgCl_2$ de 60, 50, 40, 30, 20, y 10 mM, y con concentración de Linker de 0 nM.

En los espectros de absorción obtenidos en el espectrofotómetro de microplacas se observaba un máximo de absorción para 520 nm y otro para 550 nm, en presencia y en ausencia de Linker. Además, en dichos espectros solo se aprecia un desplazamiento del máximo de absorción de las AuNPs de 15 nm con una concentración de la sal de $MgCl_2$ de 60 mM y de 50 mM, por lo que no hay agregación para concentraciones de $MgCl_2$ de 40 mM e inferiores. Por lo tanto, se establece que la concentración de sal que por sí sola produce un desplazamiento a mayores longitudes de onda es de 50 mM, así pues, si se pretende utilizar una concentración de sal máxima pero que no facilite la agregación será la de 40 mM la que cumpla este requisito. De nuevo, además del estudio espectrofotométrico realizado, en la *figura 14* se muestra la placa TLC que se corresponde con las mezclas de Linker o H_2O mili Q a las diferentes concentraciones de $MgCl_2$.

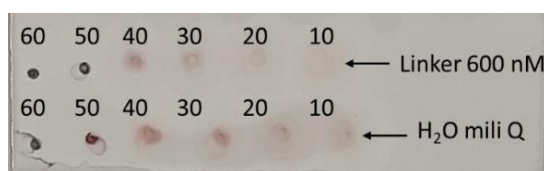


Figura 14: Placa TLC con los pinchazos de las disoluciones de $MgCl_2$ con concentraciones desde 60 hasta 10 mM. Los pinchazos superiores se corresponden con las disoluciones que contienen Linker en concentración de 600 nM, mientras que los inferiores contienen H_2O mili Q.

En la placa TLC se observan unos resultados similares en presencia y ausencia de Linker, ya que se aprecia como las mezclas con concentraciones de sales de 40 mM e inferiores dispersan, observándose un color rojizo/rosado, mientras que a

concentraciones de sales de 50 mM y 60 mM se aprecia una agregación, es decir, un punto pequeño y definido de color morado. De nuevo, los resultados del análisis visual concuerdan con los del análisis espectrofotométrico, estableciéndose 50 mM como la concentración a la cual el desplazamiento a mayores longitudes de onda es debido únicamente a la presencia de $MgCl_2$, independientemente de la presencia de Linker. Por lo tanto, como se pretende observar desplazamientos a menores longitudes de onda en función de la concentración de ADN de sésamo de una serie de muestras, se selecciona como concentración óptima 40 mM, ya que con 50 mM todas las muestras permanecerán agregadas independientemente de la concentración de ADN de sésamo, ya que esta concentración es lo suficientemente elevada como para agregar las AuNPs en ausencia del Linker. Del mismo modo, se decide descartar las concentraciones de $MgCl_2$ de 10, 20, y 30 mM, ya que la optimización de la concentración del Linker se realizó con 40 mM, y en el caso de trabajar con concentraciones inferiores la agregación de las AuNPs se producirá a una concentración de Linker diferente de la optimizada.

6.5 Calibrado con nanopartículas de oro de 15 nm con ADN de sésamo.

Una vez obtenidas las medidas de absorbancia de las muestras preparadas se procedió a representar los espectros normalizados de la absorbancia vs la longitud de onda. Véase a continuación en la *figura 15* los espectros obtenidos.

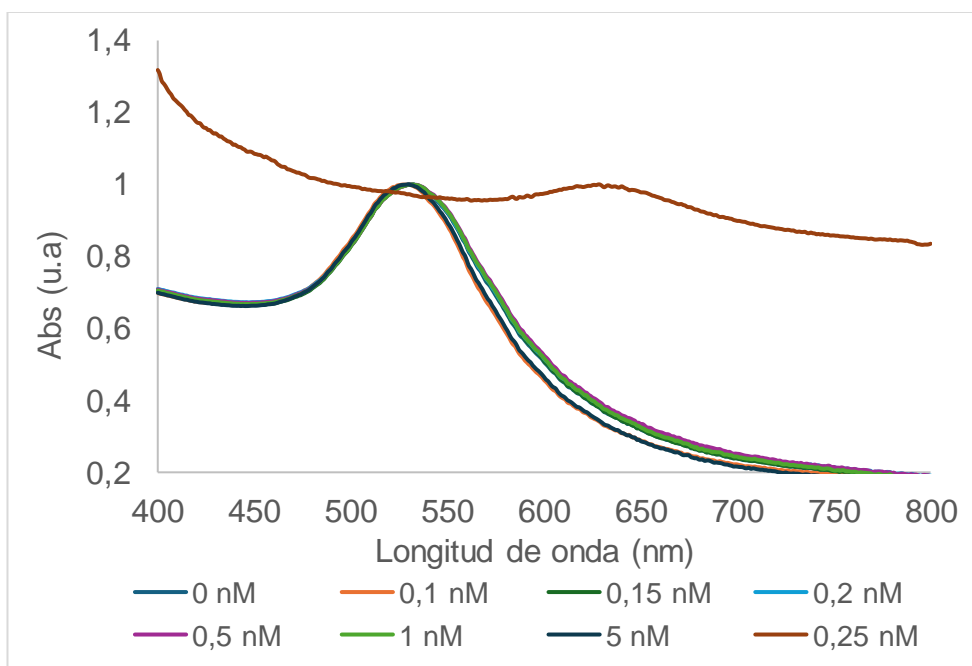


Figura 15: Espectros normalizados del máximo de absorbancia frente a la longitud de onda.

Se debe de tener en cuenta que en los espectros obtenidos la muestra con concentración de 0,25 nM presenta un espectro con un máximo de absorbancia desplazado a mayores longitudes de onda que los demás, exactamente a 628 nm, lo cual posiblemente sea debido a un error experimental. En los espectros de la *figura 15* únicamente se observó un ligero desplazamiento del máximo de absorbancia hacia longitudes de onda de 530 nm para las muestras con concentración de AF_Ses2 de 0,1; 0,2 y 5 nM. Sin embargo, el resto de las muestras no mostraban un desplazamiento, ya que presentaban el máximo de absorbancia a 532 nm. Estos resultados no concuerdan con los esperados teóricamente, ya que el desplazamiento del máximo de absorbancia hacia menores longitudes de onda debido a la escisión del Linker por la activación de los MNazymes debería de producirse con las concentraciones más elevadas de AF_Ses2, por lo que, si se muestra un ligero desplazamiento con las concentraciones de 0,1 y 0,2 nM, también debería de observarse para todas las concentraciones superiores.

Otros estudios han demostrado la existencia de una respuesta lineal entre la longitud de onda del máximo de absorbancia y la concentración de ADN de sésamo, pero únicamente hasta concentraciones de ADN alrededor de 0,5 nM [21]. Sin embargo, los desplazamientos observados son muy ligeros y en ellos no se percibe una tendencia lineal hacia menores longitudes de onda con el aumento de la concentración de ADN. Con el objetivo de visualizar el grado de agregación, se depositaron las muestras sobre una placa TLC. Véase en la *figura 16* la placa TLC con las muestras de calibración con las diferentes concentraciones nM de ADN de sésamo AF_Ses2.

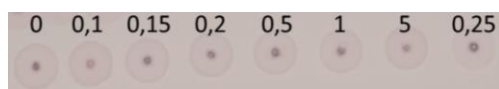


Figura 16: Placa TLC con los pinchazos de las muestras de calibración con las diferentes concentraciones nM de ADN de sésamo AF_Ses2.

Visualmente no se lograron percibir diferencias significativas en las muestras que indiquen la agregación o no de las AuNPs, por lo que no se consiguió identificar visualmente el estado de agregación de las mismas.

6.6 Análisis quimiométrico del calibrado con las nanopartículas de oro.

A la vista de los resultados obtenidos, y teniendo en cuenta la dificultad para identificar las muestras positivas y negativas, se evaluó como alternativa el análisis por componentes principales de las imágenes RGB obtenidas a partir de las TLC. Los gráficos de “scores” obtenidos presentan zonas negativas y positivas para cada una de

las componentes principales. El significado de las diferentes zonas se relaciona con el valor del propio componente principal dentro del conjunto de números reales, y son precisamente estos valores negativos o positivos de los componentes principales los que permiten observar diferencias y semejanzas en las muestras. A continuación, se muestran los resultados de los diferentes análisis PCA realizados. Para comprender los diferentes gráficos obtenidos, véase en la *tabla 15* las concentraciones de ADN de sésamo AF_Ses2 que contiene cada muestra.

Tabla 15: Concentración de ADN de sésamo AF_Ses2 presente en cada muestra.

Muestra	Concentración ADN sésamo AF_Ses2 (nM)
1PC	0
1	0
2	0,1
3	0,15
4	0,2
5	0,5
6	1
7	5
8	0,25

6.6.1 PCA de las componentes del color RGB conjuntas en 2D.

A continuación, en la *figura 17* se muestra la representación en dos dimensiones del primer y segundo componente principal, los cuales representan el 73% de la información sobre la variación de las muestras.

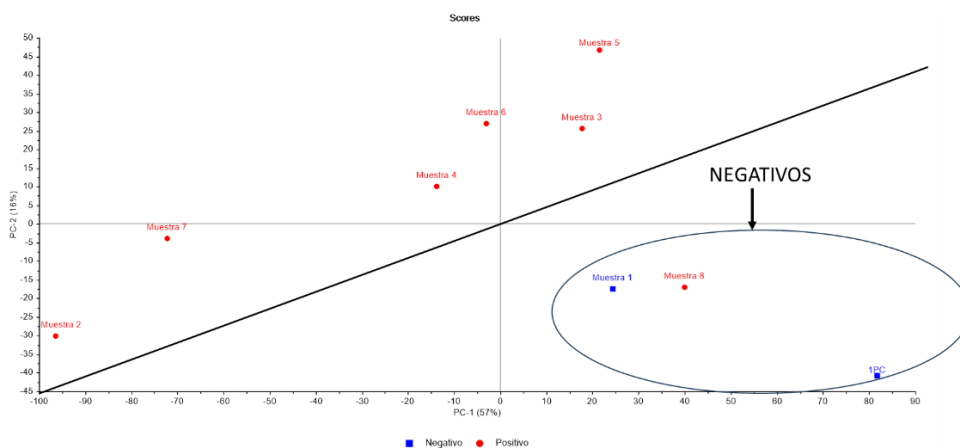


Figura 17: Gráfico del primer y segundo componente principal de las componentes del color RGB conjuntas.

En el gráfico de la *figura 17* se observa que las muestras negativas, es decir, los blancos, tienden a agruparse en la zona positiva del primer componente principal y en la zona negativa del segundo, separadas del resto de muestras que se agrupan fuera de esta zona, por lo que se pueden considerar como valores atípicos. Además, en dicho gráfico se observa que la muestra 8 de concentración 0,25 nM, es clasificada junto a los blancos, por lo que seguramente se deba a algún error experimental que provoca la agregación de las AuNPs, y que la clasifica como negativa. Esta anomalía encontrada en la muestra 8 se refleja claramente en la información espectral recogida en la *figura 15*, donde se observa que la muestra 8 presenta un desplazamiento del máximo de absorbancia a mayores longitudes de onda que los del resto de muestras, reafirmando la presencia de un error experimental.

6.6.2 PCA de las componentes del color RGB individualmente en 2D.

A continuación, en las *figuras 18, 19, y 20* se muestran las representaciones en dos dimensiones del primer y segundo componente principal de las componentes del color R, G, y B respectivamente, analizados de forma individual.

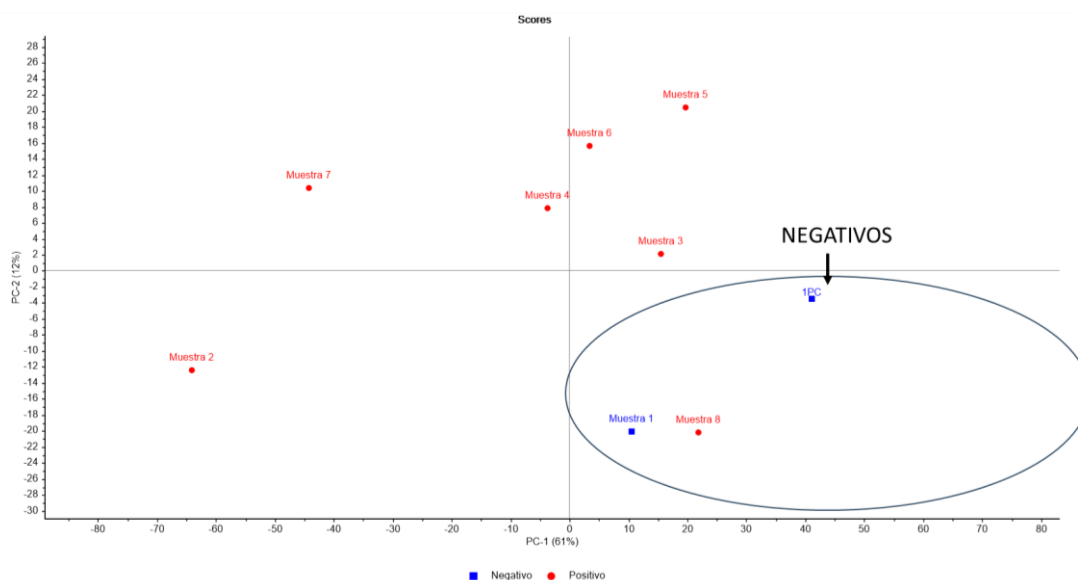


Figura 18: Gráfico del primer y segundo componente principal de la componente del color R.

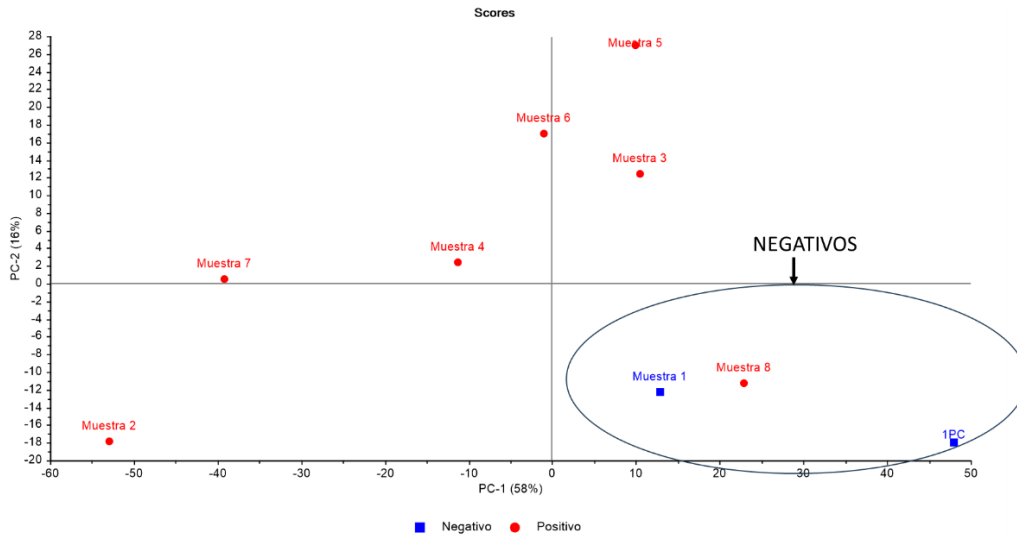


Figura 19: Gráfico del primer y segundo componente principal de la componente del color G.

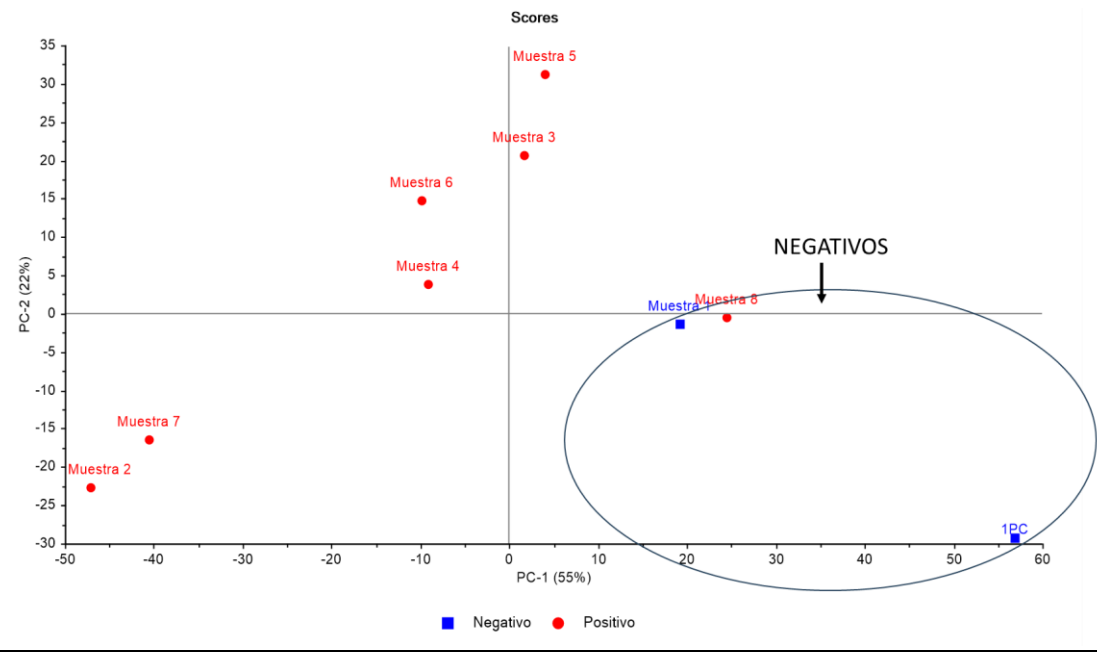


Figura 20: Gráfico del primer y segundo componente principal de la componente del color B.

Se observa que las PCAs realizadas con el primer y segundo componente principal de las componentes del color R, G, y B individualmente abarcan respectivamente el 73 %, el 74 %, y el 77 % de la información sobre la variación de las muestras, por lo que se está considerando la mayoría de las variables existentes en la base de datos creada. Realmente, la información relevante la proporcionan los gráficos de las componentes del color R y B, ya que son los colores rojo y azul los que explican el estado de agregación de las muestras. De cualquiera de los modos, los gráficos obtenidos para cada componente del color individualmente reflejan las mismas

diferencias que el gráfico de las componentes RGB conjuntas, es decir, reflejan una agrupación de la muestra 8 junto con los blancos.

6.6.3 PCA de las componentes del color RGB conjuntas en 3D.

A continuación, en la *figura 21* se muestra la representación en tres dimensiones de la primera, segunda, y tercera componente principal de las componentes del color RGB conjuntas, con el objetivo de disponer de una representación visual que facilite la interpretación de los resultados y abarque mayor cantidad de información, ya que, en esta ocasión, la suma de las tres primeras componentes principales proporciona el 80% de la información sobre la variación de las muestras.

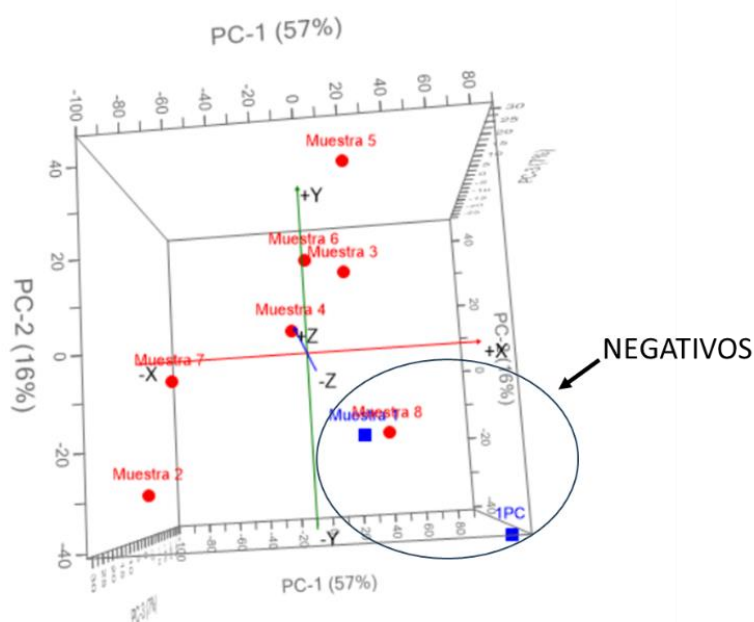


Figura 21: Gráfico en tres dimensiones del primer, segundo, y tercer componente principal de las componentes del color RGB conjuntas.

De nuevo, abarcando también la información contenida en la tercera componente principal, se observa una agrupación de los blancos y de la muestra 8 diferente al resto de las muestras. Por lo tanto, como se conoce que los blancos contienen los mismos reactivos que las muestras, a excepción del ADN de sésamo, se concluye que la muestra 8 presenta agregación de las AuNPs debido a un error experimental, pero el resto de las muestras no. Finalmente, el análisis quimiométrico concluye que, aunque no se observase visualmente un cambio al color rojo en las placas TLC, o un cambio hacia menores longitudes de onda en los espectros de absorbancia correspondiente a la escisión del Linker por la activación de los MNAszymes ante la presencia de ADN de sésamo, las muestras con concentración de ADN de sésamo de

0,1; 0,15; 0,2; 0,5; 1 y 5 nM no presentaban agregación, por lo que se realmente sí que se produjo la activación de los MNAzymes, y en consecuencia, la escisión de Linker.

7. Conclusiones.

En el presente trabajo fin de máster se ha puesto a punto una estrategia analítica para determinar sésamo a bajas concentraciones. Las AuNPs de 15 nm proporcionaron los mejores resultados, y el análisis de componentes principales (PCA) de las componentes del color RGB conjuntas e individuales proporcionaron los mismos resultados. Por lo tanto, se ha comprobado la utilidad del empleo del análisis quimiométrico a través del programa "Image J" y del Software "The Unscrambler X" para identificar semejanzas y diferencias en el estado de agregación de un conjunto de muestras, el cual no presentaba diferencias significativas espectrofotométrica y visualmente. Se podría pensar en la posibilidad de que el error experimental observado en la muestra 8 sea debido a una confusión en la concentración de la sal $MgCl_2$ empleada, y que en lugar de trabajar con 40 mM, se empleara 50 o 60 mM, ya que de este modo el desplazamiento del máximo de absorbancia sería muy superior. Sin embargo, no se puede confirmar que el error sea debido a la concentración de $MgCl_2$, ya que intervienen numerosas variables en la preparación del calibrado.

A pesar de la necesidad de trabajar con una mayor base de datos de muestras, y de disponer de triplicados de las mismas, se puede asumir la validez del análisis de componentes principales (PCA) para diferenciar las muestras no agregadas de las que sí lo están, ya que las diferencias observadas son acordes con lo esperado teóricamente. Por lo tanto, los resultados obtenidos sitúan a la quimiometría como una herramienta de análisis estadístico capaz de diferenciar las muestras agregadas de las no agregadas incluso cuando el ojo humano no percibe cambios de color, ni las medidas espectrofotométricas indican una clara tendencia en los desplazamientos de la banda de absorción del plasmón superficial. Finalmente, cabe resaltar la adquisición de conocimientos quimiométricos y el aprendizaje del manejo de las herramientas informáticas mencionadas anteriormente que ha contribuido a la interpretación de los resultados.

8. Trabajos futuros.

A la vista de los resultados obtenidos, se podría seguir trabajando en la detección colorimétrica de sésamo, aplicando estrategias quimiométricas como alternativa para la

determinación del desplazamiento de la longitud de onda. Una interesante idea para trabajos futuros sería el empleo de la quimiometría sobre un mayor número de muestras, con el objetivo de poder observar mayores diferencias y semejanzas en una base de datos mucho más amplia, y poder predecir una tendencia lineal al estado de no agregación de las nanopartículas con el aumento de la concentración de ADN de sésamo. Así mismo, sería interesante trabajar con triplicados de todas las muestras, para lograr reducir los errores experimentales e incrementar la fiabilidad de los resultados. Además, otra idea para trabajos futuros sería el empleo de nanopartículas de oro de diferentes tamaños. De este modo, se podría realizar una evaluación y comparación de los diferentes resultados obtenidos, y seleccionar como tamaño óptimo para el diseño de biosensores aquel que proporcione la mejor sensibilidad. Otra posible idea para trabajos futuros sería el empleo de muestras reales, en las que puede ser de interés detectar la presencia de sésamo ante sospechas de adulteraciones o contaminaciones, como podría ser el aceite de oliva.

9. Bibliografía.

1. L.G. Campillo. Alérgenos en Alimentos: Métodos Analíticos. [Facultad de Ciencias]: Universidad Nacional de Educación a Distancia; 2021.
2. S.D.L.C. Ares. Desarrollo de técnicas inmunoenzimáticas con anticuerpos recombinantes y de técnicas de PCR en tiempo real para la detección de almendra y nuez de Brasil de alimentos. [Departamento de nutrición, bromatología y tecnología de los alimentos]: Universidad Complutense de Madrid; 2017.
3. S. Weiss, D. Smith. Open sesame: Shedding light on an emerging global allergen, *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 2023;130(1):40, ISSN 1081-1206, <https://doi.org/10.1016/j.anai.2022.08.002>.
(<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1081120622006615>).
4. J. Zeng, F. Ma, L. Zhai, C. Du, J. Zhao, Z. Li and J. Wang. Recent advance in sesame allergens: Influence of food processing and their detection methods, *Food Chemistry*, 2024;448:139058,ISSN0308-8146,<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.139058>.
(<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814624007076>).
5. C. Melendreras, A. Soldado, J.M. Costa-Fernández, A. López, M. Valledor, J.C. Campo and F. Ferrero. An Affordable NIR Spectroscopic System for Fraud Detection in Olive Oil. *Sensors* 2023;23(3):1728. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/s23031728>.

6. D. P. Cevallos. Desarrollo de una herramienta analítica para la detección rápida de alérgenos basado en nanopartículas de oro y estrategias de amplificación de ADN. [Máster en Ciencias Analíticas y Bioanalíticas]: Universidad de Oviedo; 2020.
7. M. F. González. Bioconjugación de nanopartículas para la detección óptica de sarna sarcóptica. [Máster en Ciencias Analíticas y Bioanalíticas]: Universidad de Oviedo; 2023.
8. K. E. Sapsford, W. R. Algar, L. Berti, K. B. Gemmill, B.J. Casey, E. Oh, M. H. Stewart, and I.L. Medintz. Functionalizing Nanoparticles with Biological Molecules: Developing Chemistries that Facilitate Nanotechnology. *Chemical Reviews*; 2013;113. <https://doi.org/10.1021/cr300143v>.
9. K. Werengowska-CieTwierz, M. WiVniewski, A.P. Terzyk, and S. Furmaniak. The Chemistry of Bioconjugation in Nanoparticles-Based Drug Delivery System. Hindawi Publishing Corporation. 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/198175>.
10. A. L. Larraga-Urdaz, B. Moreira- Álvarez, J. Ruiz Encinar, J. M. Costa- Fernández, M. L Fernández-Sánchez. A plasmonic MNAzyme signal amplification strategy for quantification of miRNA-4739 breast cancer biomarker. *Analytica Chimica Acta*. 2024; Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2023.341999>.
11. N. M. Adams, S. R. Jackson, F. R. Haselton, and D. W. Wright. Design, Synthesis, and Characterization of Nucleic-Acid- Functionalized Gold Surfaces for Biomarker Detection. *Langmuir*. 2012;28(2):1068. <https://doi.org/10.1021/la2028862>.
12. K. Saha, S.S. Agasti, C. Kim, X. Li, and V. M. Rotello. Gold Nanoparticles in Chemical and Biological Sensing. *American Chemical Society*. 2012;112(5):2739. <https://doi.org/10.1021/cr2001178>.
13. J. Kimling, M. Maier, B. Okenve, V. Kotaidis, H. Ballot, and A. Plech. Turkevich Method for Gold Nanoparticle Synthesis Revisited. *Journal of Physical Chemistry B*. 2006;110:15700. <https://doi.org/10.1021/jp061667w>.
14. S.P. Gil. Detección precoz de infecciones en recién nacidos mediante el empleo de nanopartículas y sistemas de amplificación de la señal. [Máster en Ciencias Analíticas y Bioanalíticas]: Universidad de Oviedo; 2023.
15. K. Zagorovsky, W.CW.Chan. A plasmonic DNAzyme strategy for point-of-care genetic detection of infectious pathogens. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2013;52(11):3168. <https://doi.org/10.1002/anie.201208715>.
16. M.A.A. Pérez. Espacios de Color RGB, HSI y sus Generalizaciones a n-Dimensiones. [Tonantzintla, Puebla]: Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica y Electrónica; 2009.
17. A.V. Velásquez y J.P.O Urey. Desarrollo de un método analítico para la determinación de fósforo en medio acuoso, utilizando una aplicación móvil Android

- (app Photometrix). Como alternativa a métodos instrumentales de análisis convencionales. [Facultad de Ciencias y Tecnologías. Departamento de Química]: Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua-León UNAN-León; 2021.
18. L. Mesa-Ramos, O. Gozá-León, M. Uranga-Machado, A. Toledo-Rivero, Y. Gálvez-Torriente. Aplicación del Análisis de Componentes Principales en el proceso de fermentación de un anticuerpo monoclonal. *Finlay Ediciones*.2018;27(1):8. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-028X2018000100002&lng=es&tlng=es.
 19. D. Airado-Rodríguez, M.A.D. Acedo, A.B.B. Cortés. Reducción de la dimensionalidad para el análisis e interpretación afectiva en la práctica educativa. *International Journal of Developmental and Educational Psychology*. 2017;1(3):97. <https://doi.org/10.17060/ijodaep.2017.n1.v4.1031>.
 20. H. Peng, A. M. Newbigging, Z. Wang, J. Tao, W. Deng, X. C. Le, H. Zhang. DNAzyme-Mediated Assay for Amplified Detection of Nucleic Acid and Proteins. *Anal. Chem*. 2018; 90: 190, doi:10.1021/acs.analchem.7b04926.
 21. A. Sánchez-Visedo, B. Gallego-Martínez, L.J Royo, A. Soldado, M. Valledor, J.C. Campo, F.J Ferrero, J.M. Costa-Fernández, M.T. Fernández-Argüelles. MNAzymes and gold nanoparticles as isothermal signal amplification strategy for visual detection of miRNA. *Microchimica Acta*. 2023;190(292):1. <https://doi.org/10.1007/s00604-023-05868-y>.

Anexos.

Anexo 1: Preparación de 50 mL Tween-20 al 0,1% (m/v).

$$50 \text{ mL disolución} \frac{0,1 \text{ g Tween-20}}{100 \text{ mL disolución}} = 0,05 \text{ g Tween-20} = 50 \text{ mg de Tween-20}$$

Se pesaron 53,73 mg de Tween-20. Se recalculó el volumen necesario de H₂O mili Q para que la concentración del Tween-20 fuese de 0,1% (m/v).

$$50 \text{ mg de Tween-20} \rightarrow 50 \text{ mL de H}_2\text{O mili Q}$$

$$53,75 \text{ mg de Tween-20} \rightarrow x \text{ mL de H}_2\text{O mili Q}$$

$$x = 53,75 \text{ mL de H}_2\text{O mili Q}$$

Anexo 2: Preparación de 50 mL Tween-20 al 0,01% (m/v) a partir de la disolución de Tween-20 0,1%.

$$50 \text{ mL disolución} \frac{0,01 \text{ g Tween-20}}{100 \text{ mL disolución}} \frac{100 \text{ mL disolución}}{0,1 \text{ g disolución}} = 5 \text{ mL de Tween-20 0,1\%}$$

Finalmente se enrasó a 50 ml con H₂O mili Q.

Anexo 3: Preparación de 500 mL TBE 1x a partir de 1000 mL TBE 5x.

Se calienta sin hervir 800 mL de H₂O mili Q en una placa agitadora al mismo tiempo que se agita con un imán. Posteriormente, se añade el sobre de sales para obtener el TBE, y cuando se haya disuelto, se añaden otros 200 mL de H₂O mili Q. De esta forma obtenemos 1000 mL de TBE 5x. Finalmente, se cogen 100 mL de esta disolución y se enrasa a 500 mL con H₂O mili Q, para obtener así 500 mL de TBE 1x.

Anexo 4: Preparación de 50 mL MgCl₂ 400 mM.

$$50 \text{ mL disolución} \frac{0,400 \text{ moles MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}}{1000 \text{ mL disolución}} \frac{203,30 \text{ g MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}}{1 \text{ mol MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}} = 4,066 \text{ g de MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$$

Se pesaron 3,974 g de MgCl₂·6H₂O

Finalmente se enrasó a 50 mL con H₂O mili Q.

Anexo 5: Preparación de 50 mL MgCl₂ 800 mM.

$$50 \text{ mL disolución} \frac{0,800 \text{ moles MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}}{1000 \text{ mL disolución}} \frac{203,30 \text{ g MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}}{1 \text{ mol MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}} = 8,132 \text{ g de MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$$

Se pesaron 8,1410 g de $MgI_2 \cdot 6H_2O$

Finalmente se enrasó a 50 mL con H_2O mili Q.

Anexo 6: Preparación de 50 mL TCHB (buffer HCl trisodio citrato; pH 3; 90 mM).

$$50 \text{ mL disolución} \frac{0,09 \text{ moles citrato de sodio tribásico}}{1000 \text{ mL disolución}} \frac{294,10 \text{ g citrato de sodio tribásico}}{1 \text{ mol citrato de sodio tribásico}} = 1,3235 \text{ g de trisodio citrato HCl}$$

Se pesaron 1,3243 g de trisodio citrato HCl. Se disolvieron con H_2O mili Q y se ajustó el pH con HCl comercial diluido en H_2O mili Q. Finalmente se enrasó a 50 mL con H_2O mili Q. Se obtuvo un pH de 2,98.

Anexo 7: Preparación de 50 mL 10x MNAzyme buffer [0,1M Tris-HCl ;0,5 M KCl; pH 8,3].

✓ 50 mL de 0,1 M Tris- HCl.

$$50 \text{ mL disolución} \frac{0,1 \text{ moles Tris-HCl}}{1000 \text{ mL disolución}} \frac{157,60 \text{ g Tris-HCl}}{1 \text{ mol Tris-HCl}} = 0,788 \text{ g Tris-HCl}$$

Se pesaron 0,7909 g Tris-HCl

✓ 50 mL de KCl. pH=8,3.

$$50 \text{ mL disolución} \frac{0,5 \text{ moles KCl}}{1000 \text{ mL disolución}} \frac{74,55 \text{ g KCl}}{1 \text{ mol KCl}} = 1,8638 \text{ g KCl}$$

Se pesaron 1,8723 g KCl

Finalmente, se ajustó el pH añadiendo NaOH 0,5 M. Se logró un pH de 8,29.

Anexo 8: Preparación de sacarosa 40% (w/v) en TBE 0,5x.

Se pesaron 6 g de sacarosa en un tubo Falcon, y se añadieron 15 mL de TBE 0,5x (7,5 mL TBE 1x y 7,5 mL H_2O mili Q), para obtener así una disolución de sacarosa 40% (w/v).

Anexo 9: Preparación de 20 μL de los Agg 1 y Agg 4, de concentración 25 μM , a partir de los Agg 1 y Agg 4 de concentración 100 μM .

$$100 \mu\text{M} \cdot V_1 = 25 \mu\text{M} \cdot 20 \mu\text{L}$$

$$V_1 = 5 \mu\text{L} + 15 \mu\text{L H}_2\text{O mili Q}$$

Anexo 10: Preparación de disoluciones de 10 mL de MgCl_2 de 100 mM, 200 mM, 300 mM, 500 mM, y 600 mM.

- $[\text{MgCl}_2] = 100 \text{ mM}$ en 10 mL.
 $400 \text{ mM} \cdot V_1 = 100 \text{ mM} \cdot 10 \text{ mL} \rightarrow V_1 = 2,5 \text{ mL} + 7,5 \text{ mL H}_2\text{O mili Q}$
- $[\text{MgCl}_2] = 200 \text{ mM}$ en 10 mL.
 $400 \text{ mM} \cdot V_1 = 200 \text{ mM} \cdot 10 \text{ mL} \rightarrow V_1 = 5 \text{ mL} + 5 \text{ mL H}_2\text{O mili Q}$
- $[\text{MgCl}_2] = 300 \text{ mM}$ en 10 mL.
 $400 \text{ mM} \cdot V_1 = 300 \text{ mM} \cdot 10 \text{ mL} \rightarrow V_1 = 7,5 \text{ mL} + 2,5 \text{ mL H}_2\text{O mili Q}$
- $[\text{MgCl}_2] = 500 \text{ mM}$ en 10 mL.
 $800 \text{ mM} \cdot V_1 = 500 \text{ mM} \cdot 10 \text{ mL} \rightarrow V_1 = 6,25 \text{ mL} + 3,75 \text{ mL H}_2\text{O mili Q}$
- $[\text{MgCl}_2] = 600 \text{ mM}$ en 10 mL.
 $800 \text{ mM} \cdot V_1 = 600 \text{ mM} \cdot 10 \text{ mL} \rightarrow V_1 = 7,5 \text{ mL} + 2,5 \text{ mL H}_2\text{O mili Q}$

Anexo 11: Preparación de disoluciones de ADN de sésamo de AF_Ses2.

- Cálculo de la concentración necesaria de unas disoluciones para que al añadir 5 μL de ellas las concentraciones en las mezclas de 20 μL sean de 0,1; 0,15; 0,2; 0,25; 0,5; 1 y 5 nM.

$$0,1 \text{ nM} \cdot 20 \mu\text{L} = 5 \mu\text{L} \cdot C_2 \rightarrow C_2 = 0,4 \text{ nM}$$

$$0,15 \text{ nM} \cdot 20 \mu\text{L} = 5 \mu\text{L} \cdot C_2 \rightarrow C_2 = 0,6 \text{ nM}$$

$$0,2 \text{ nM} \cdot 20 \mu\text{L} = 5 \mu\text{L} \cdot C_2 \rightarrow C_2 = 0,8 \text{ nM}$$

$$0,25 \text{ nM} \cdot 20 \mu\text{L} = 5 \mu\text{L} \cdot C_2 \rightarrow C_2 = 1 \text{ nM}$$

$$0,5 \text{ nM} \cdot 20 \mu\text{L} = 5 \mu\text{L} \cdot C_2 \rightarrow C_2 = 2 \text{ nM}$$

$$1 \text{ nM} \cdot 20 \mu\text{L} = 5 \mu\text{L} \cdot C_2 \rightarrow C_2 = 4 \text{ nM}$$

$$5 \text{ nM} \cdot 20 \mu\text{L} = 5 \mu\text{L} \cdot C_2 \rightarrow C_2 = 20 \text{ nM}$$

- Preparación de disoluciones intermedias de AF_Ses2:
 - ✓ Intermedia de 1000 nM de 1 mL a partir del Stock de $1 \cdot 10^5$ nM.
 $1 \cdot 10^5 \text{ nM} \cdot V_1 = 1000 \text{ nM} \cdot 1000 \mu\text{L} \rightarrow V_1 = 10 \mu\text{L}$
 - ✓ Intermedia de 100 nM de 1 mL a partir de la intermedia de 1000 nM.

$$1000 \text{ nM} \cdot V_1 = 100 \text{ nM} \cdot 1000 \mu\text{L} \rightarrow V_1=100 \mu\text{L}$$

- ✓ Intermedia de 10 nM de 1 mL a partir de la intermedia de 100 nM.

$$100 \text{ nM} \cdot V_1 = 10 \text{ nM} \cdot 1000 \mu\text{L} \rightarrow V_1=100 \mu\text{L}$$

- ✓ Intermedia de 1 nM de 1 mL a partir de la intermedia de 100 nM.

$$100 \text{ nM} \cdot V_1 = 1 \text{ nM} \cdot 1000 \mu\text{L} \rightarrow V_1=10 \mu\text{L}$$

- Preparación de disoluciones de 0,4; 0,6; 0,8; 1; 2; 4 y 20 nM de AF_Ses2.

- ✓ Disolución de 0,4 nM.

$$1 \text{ nM} \cdot V_1 = 0,4 \text{ nM} \cdot 10 \mu\text{L} \rightarrow V_1= 4 \mu\text{L} + 6 \mu\text{L H}_2\text{O mili Q}$$

- ✓ Disolución de 0,6 nM.

$$1 \text{ nM} \cdot V_1 = 0,6 \text{ nM} \cdot 10 \mu\text{L} \rightarrow V_1= 6 \mu\text{L} + 4 \mu\text{L H}_2\text{O mili Q}$$

- ✓ Disolución de 0,8 nM.

$$1 \text{ nM} \cdot V_1 = 0,8 \text{ nM} \cdot 10 \mu\text{L} \rightarrow V_1= 8 \mu\text{L} + 2 \mu\text{L H}_2\text{O mili Q}$$

- ✓ Disolución de 1 nM.

$$1 \text{ nM} \cdot V_1 = 1 \text{ nM} \cdot 10 \mu\text{L} \rightarrow V_1= 10 \mu\text{L} + 0 \mu\text{L H}_2\text{O mili Q}$$

- ✓ Disolución de 2 nM.

$$10 \text{ nM} \cdot V_1 = 2 \text{ nM} \cdot 10 \mu\text{L} \rightarrow V_1= 2 \mu\text{L} + 8 \mu\text{L H}_2\text{O mili Q}$$

- ✓ Disolución de 4 nM.

$$10 \text{ nM} \cdot V_1 = 4 \text{ nM} \cdot 10 \mu\text{L} \rightarrow V_1= 4 \mu\text{L} + 6 \mu\text{L H}_2\text{O mili Q}$$

- ✓ Disolución de 20 nM.

$$100 \text{ nM} \cdot V_1 = 20 \text{ nM} \cdot 10 \mu\text{L} \rightarrow V_1= 2 \mu\text{L} + 8 \mu\text{L H}_2\text{O mili Q}$$

Anexo 12: Cálculo del volumen de las AuNPs preconcentradas de 15 y 20 nm en nM necesario para obtener 1 mL de las AuNPs en concentración 100 nM.

- ✓ AuNPs 20 nm: $239 \text{ nM} \cdot V_1 = 100 \text{ nM} \cdot 1 \text{ mL} \rightarrow V_1 = 0,418 \text{ mL} = 418 \mu\text{L}$

- ✓ AuNPs 15 nm: $1823 \text{ nM} \cdot V_1 = 100 \text{ nM} \cdot 1 \text{ mL} \rightarrow V_1 = 0,055 \text{ mL} = 55 \mu\text{L}$