



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN
BIOTECNOLOGÍA APLICADA**

**METODOLOGÍAS DE DESARROLLO DE
BIOSENSORES BASADOS EN EL USO DE
NANOPARTÍCULAS METÁLICAS CON
APLICACIONES EN LA DETECCIÓN DE
PATÓGENOS EN ALIMENTOS**

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS EN
BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

M.B.A. MA. ANTONIETA RIOS CORRIPIO

DIRECTOR Y CO-DIRECTOR DE TESIS

**Dr. Marlon Rojas López
Dra. María Eugenia Jaramillo flores**

Marzo 2015



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Tepetitla, Tlaxcala siendo las 12:00 horas del día 2 del mes de Marzo del 2015 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIBA-Tlaxcala para examinar la tesis titulada:
METODOLOGÍAS DE DESARROLLO DE BIOSENSORES BASADOS EN EL USO DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS CON APLICACIONES EN LA DETECCIÓN DE PATÓGENOS EN ALIMENTOS.

Presentada por el alumno:

<u>Ríos</u> Apellido paterno	<u>Corripio</u> Apellido materno	<u>María Antonieta</u> Nombre(s)							
		Con registro: <table border="1" style="display: inline-table; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="padding: 2px 5px;">A</td> <td style="padding: 2px 5px;">1</td> <td style="padding: 2px 5px;">1</td> <td style="padding: 2px 5px;">0</td> <td style="padding: 2px 5px;">0</td> <td style="padding: 2px 5px;">0</td> <td style="padding: 2px 5px;">9</td> </tr> </table>	A	1	1	0	0	0	9
A	1	1	0	0	0	9			


aspirante de:

Doctorado en Ciencias en Biotecnología

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

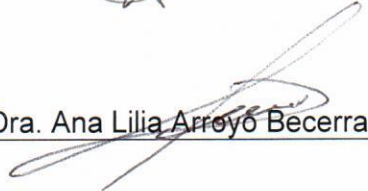
LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis


Dr. Marlon Rojas López


Dra. María Eugenia Jaramillo Flores


Dra. María del Carmen Cruz López


Dra. Ana Lilia Arroyo Becerra


Dra. Blanca Estéla García Pérez

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES


Dr. David Guillermo Pérez Sivarra
Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada



Lardizábal, Tlaxcala a 2 de marzo de 2015.

ACUERDO CONFIDENCIALIDAD

En el presente documento se hace constar que los profesores que suscriben: Dra. María del Carmen Cruz López, Dra. María Eugenia Jaramillo Flores, Dra. Analilia Arroyo Becerra, Dra. Blanca Estela García Pérez, y Dr. Marlon Rojas López

(profesores investigadores, del CIBA-TLAXCALA del Instituto Politécnico Nacional (IPN), reconocen que con motivo de su participación en la Asesoría y Dirección de Tesis de la alumna de Doctorado en Ciencias en Biotecnología, la C. María Antonieta Ríos Corripio, hemos tenido acceso y conocemos el Trabajo de tesis desarrollado por la alumna y cuyo título se denomina "Metodologías de desarrollo de biosensores basados en el uso de nanopartículas metálicas con aplicaciones en la detección de patógenos en alimentos" desarrollado (s) en esta escuela, conocemos su naturaleza, características, los métodos o procesos de producción y finalidades de sus productos y demás información del proyecto convenido con la empresa, toda clasificada como "INFORMACIÓN CONFIDENCIAL", la cual es propiedad del IPN.

Enterados de que las acciones para su adecuada protección intelectual están en proceso ante las autoridades correspondientes y de las ventajas que la confidencialidad le significa al IPN, me obligo a guardar y preservar la confidencialidad de los datos, documentos (protocolos y técnicas), características de los procesos, alcances, detalles de experimentos, incluyendo la información en cuyo desarrollo haya participado en cumplimiento de mis funciones, es decir de toda la "INFORMACION CONFIDENCIAL" a que tenga acceso; no usarla, revelarla, divulgarla y/o hacerla accesible a algún tercero por medio impreso, verbal, electrónico, conferencias, publicidad, o cualquier otra forma o medio conocido o por conocerse; y no exportarla, comercializarla, venderla o licenciarla, ya sea en parte o en su conjunto, debiendo observar lo anterior tanto en México como en el extranjero.

La obligación señalada en el párrafo anterior, será durante (nuestra relación laboral, mi participación, mi colaboración, etc.) y subsistirá después de concluida, hasta que el IPN nos notifique en forma expresa el cese de dicha obligación.

RJDM/EPIC
EXT. 87816

SEP

SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
CENTRO DE INVESTIGACION EN
BIOTECNOLOGIA APLICADA TLAXCALA




"80 Aniversario de la Escuela Superior de Ingeniería Textil"
"65 Aniversario de la Escuela Superior de Ingeniería Química e Industrias Extractivas"
"50 Aniversario del Centro Nacional de Cálculo"
"50 Aniversario del CECyT 7 Cuauhtémoc"


Manifestamos tener conocimiento de la utilización de la "INFORMACION CONFIDENCIAL" de forma ilícita, impropia o sin autorización, causa perjuicio al IPN ya que son actos que constituyen delitos previstos en el artículo 223 de la ley de la Propiedad Industrial ; y que independientemente de las sanciones penales a los infractores, prevén a favor de su titular el pago de daños y perjuicios.

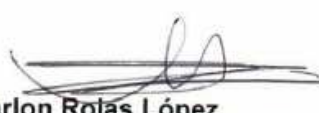
CENTRO DE INVESTIGACION EN BIOTECNOLOGIA APLICADA
UNIDAD TLAXCALA

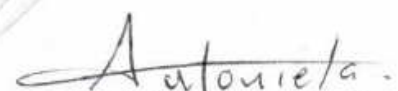

Dra. María del Carmen Cruz López


Dra. María Eugenia Jaramillo Flores


Dra. Analilia Arroyo Becerra


Dra. Blanca Estela García Pérez


Dr. Marlon Rojas López


Alumna María Antonieta Ríos Corripio

RJIM/EPIC
EXT. 87816

Carretera Estatal Santa Inés Tecuexcomac- Tepetitla Km.1.5 (Ex - Hacienda San Juan Molino). Tepetitla de Lardizábal, Tlaxcala
C.P. 90700. Tels.: 015557296000 Ext. 87816 Directo 01248 48 707 62

AGRADECIMIENTOS

Primero y antes que nada, dar gracias a **Dios**, por estar conmigo en cada paso que doy, por acompañarme siempre en todo momento de dificultad, permitirme terminar satisfactoriamente mis estudios, por llenar mi vida de dicha y bendiciones, por fortalecer mi corazón, iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.

Esta tesis está dedicada a mis Padres, a quienes agradezco de todo corazón por su apoyo sin condiciones ni medida, amor, cariño y comprensión.

Mi más sincero agradecimiento a mi director de tesis Dr. Marlon Rojas López por haberme orientado y corregido en mi labor científica con un gran interés y entrega por su paciencia y apoyo brindados desde siempre y sobre todo por esa gran amistad que me brindó y me brinda, por escucharme y aconsejarme siempre, gracias también por brindarme su ayuda cuando más la necesitaba, por ser una persona con la que puedo contar siempre, por el cariño y los ánimos que me da, por los momentos en los que más que un profesor se comportó como un amigo. Gracias.

A mis sinodales:

Dra. Blanca Estela García Pérez

Dra. Carmen Cruz López

Dra. Ana Lilia Arroyo Becerra

Dr. María Eugenia Jaramillo Flores

Por brindarme su apoyo, ánimo y colaboración en todo momento y sus valiosas enseñanzas.

Agradezco al Instituto Politécnico Nacional y al Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada por abrirme sus puertas para poder realizar mis estudios de Maestría y Doctorado.

Agradezco a CONACYT por el apoyo económico durante mis estudios de Doctorado.

En general quisiera agradecer a todas y cada una de las personas que han vivido conmigo la realización de esta tesis, con sus altos y bajos y que no necesito nombrar porque tanto ellas como yo sabemos que desde los más profundo de mi corazón les agradezco el haberme brindado todo el apoyo, colaboración, ánimo y sobre todo cariño y amistad.

Gracias a todos. Antonieta.

INDICE

CAPITULO I

ANTECEDENTES.....	14
1.1 Biosensor.....	14
1.1.1 Clasificación de Biosensores.....	16
1.1.1.2 Elementos Biológicos de Reconocimiento Molecular.....	16
1.1.1.3 Sistema de Transducción.....	17
1.2 Características y propiedades de biosensores.....	17
1.3 Aplicaciones de Biosensores en el Área de los alimentos.....	20
1.3.1 Seguridad Alimentaria.....	21
1.3.2 Microorganismos Patógenos.....	21
1.4 Microorganismos patógenos más comunes en alimentos.....	22
1.4.1 <i>Salmonella</i>	22
1.4.1.1 Métodos tradicionales de detección de <i>Salmonella</i>	23
1.4.1.1.1 Modificaciones en el método de cultivo.....	24
1.4.1.1.2 Inmunoensayos.....	24
1.4.1.1.3 Inmunoprecipitación.....	24
1.4.1.1.4 Enzimoinmunoensayo (ELISA).....	25
1.4.1.1.5 Separación inmunomagnética (IMS).....	25
1.4.1.1.6 Sistemas de aglutinación en porta.....	26
1.4.1.1.7 Inmunodifusión.....	26
1.4.1.1.8 Métodos de detección mediante citometría de flujo.....	26
1.4.1.1.9 Métodos moleculares.....	26
1.4.1.1.9.1 Hibridación in situ fluorescente (FISH, fluorescent in situ hybridization).....	27
1.4.1.1.9.2 Técnicas basadas en amplificación PCR	27
1.4.1.1.9.2.1 PCR a tiempo real.....	28
1.4.1.1.9.2.2 Tendencia actual del uso de la PCR a tiempo real.....	29
1.5 Tendencias en la Tecnología de Biosensores en el área de Alimentos.....	29
1.6 Nanotecnología.....	31
1.6.1 Nanopartículas.....	32
1.6.1.1 Características generales de las nanopartículas de oro.....	32
1.6.1.2 Síntesis de nanopartículas de oro.....	33
1.6.1.3 Caracterización de las nanopartículas.....	36
1.6.1.3.1 Espectrofotometría UV-Visible.....	36
1.6.1.3.2 Microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	37
1.6.1.3.3 Microscopía de fuerza atómica (AFM).....	37
1.6.1.3.4 Espectroscopia infrarroja (FTIR).....	38
1.6.1.3.5 Espectroscopia Raman.....	39

1.6.1.4 Estabilidad de las nanopartículas.....	40
1.7 Conjugación de las nanopartículas de oro con diferentes clases de Biomoléculas.....	41
1.7.1 Funcionalización de Proteína A sobre la superficie de las nanopartículas de oro.....	42
1.7.2 Conjugación de las nanopartículas con anticuerpos.....	45
1.7.3 Bioconjugación de las nanopartículas conjugadas con el analito.....	48
1.8 Detección del analito (Efecto SERS <i>Surface-Enhanced Raman Scattering</i>).....	48
1.8.1 Detección del analito mediante Espectroscopia de Fluorescencia.....	50
1.8.1.1 Fluoróforos.....	51
1.9 Nanopartículas funcionalizadas con moléculas fluorescentes.....	52
Hipótesis.....	53
Justificación.....	54
Objetivo General.....	54
Objetivos Particulares.....	54
CAPITULO II	
MATERIALES Y METODOS.....	56
2.1.Materiales.....	56
2.2. Métodos.....	57
2.2.1 Síntesis de nanopartículas de oro.	57
2.2.2 Conjugación de proteína A a la superficie de las nanopartículas de oro.....	57
2.2.3 Bioconjugacion del anticuerpo anti- <i>Salmonella</i> sin marcar y marcado con Isotiocianato de fluoresceína (FITC) a la superficie del sistema nanopartículas de oro-Proteína A.	58
2.2.4 Preparación bacteria <i>Salmonella</i>	58
2.2.4.1 Preparación de las diluciones de <i>Salmonella</i> para la determinación del limite de detección.....	59
2.2.5 Caracterización de nanopartículas de oro, conjugados con proteína A, anticuerpo anti- <i>Salmonella</i> y el antígeno <i>Salmonella</i>	59
2.2.5.1 Espectrofotometría UV-visible.....	59
2.2.5.2 Microscopia de fuerza atómica (AFM).....	60
2.2.5.3 Microscopia electrónica de transmisión (TEM).....	60
2.2.5.4 Espectroscopia RAMAN.....	60
2.2.5.5 Espectroscopia infrarroja (FTIR).....	60
2.2.6 Mediciones SERS de la Conjugación del anticuerpo anti- <i>Salmonella</i> a la superficie del sistema nanopartículas de oro-Proteína A.....	61
2.2.7 Mediciones de Microscopia de Fluorescencia del anticuerpo anti- <i>Salmonella</i> marcado con FITC a la superficie del sistema nanopartículas de oro-Proteína A para la detección del patógeno <i>Salmonella</i>	61

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSION.....	62
3.1 Síntesis de nanopartículas de oro.....	62
3.1.1 Caracterización de nanopartículas de oro (UV-Visible).....	63
3.1.2 Caracterización de nanopartículas de oro (Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM), Microscopia de fuerza atómica (AFM), Analizador de Tamaño de Partículas Zetasizer.....	64
3.2 Estabilidad de las nanopartículas de oro.....	68
3.3 Caracterización de la proteína A mediante Espectroscopia FTIR y UV-Visible.....	70
3.4 Conjugación de proteína A a la superficie de las nanopartículas de oro y caracterización por UV-Visible.....	71
3.4.1 Validación proteína A a la superficie de las nanopartículas de oro.....	73
3.4.2 Caracterización del conjugado (AuNP's-Proteína A) mediante Espectroscopia FTIR.....	78
3.4.3 Estabilidad de los conjugados AuNP's-Proteína A.....	79
3.5 Adherencia del anticuerpo anti- <i>Salmonella</i> sobre el Conjugado AuNP's -Proteína A y caracterización por UV-Visible.....	80
3.5.1 Caracterización del anticuerpo anti- <i>Salmonella</i> mediante Espectroscopia FTIR.....	83
3.5.2 Caracterización mediante FTIR del sistema AuNP's-Proteína A con el anticuerpo anti- <i>Salmonella</i>	84
3.6 Preparación de la cepa <i>Salmonella</i>	87
3.6.1 Caracterización FTIR de la bacteria <i>Salmonella</i>	87
3.7 Dispersion Raman y SERS (Surface-Enhanced Raman Scattering).....	89
3.8 Detección de <i>salmonella</i> mediante Microscopía de fluorescencia.....	92

CAPITULO IV

RESUMEN DE LOS RESULTADOS MÁS IMPORTANTES OBTENIDOS.....	110
CONCLUSIONES.....	111
BIBLIOGRAFIA.....	111
APENDICE A.1 ARTÍCULO.....	117

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Esquema de un biosensor y fundamento de su funcionamiento.....	15
Figura 2.	Fases del método tradicional de cultivo para realizar la detección de <i>Salmonella</i> según la norma ISO 6479-2002.....	23
Figura 3.	Ilustración esquemática de la Resonancia de Plasmones de Superficie.....	33
Figura 4.	Mecanismo de la sucesiva reducción de los iones de oro y síntesis de nanopartículas.....	35
Figura 5.	Espectro UV / VIS de nanopartículas de oro diferentes tamaños y formas.....	36
Figura 6.	Vibraciones de tensión: a) simétrica y b) asimétrica.....	38
Figura 7.	Vibraciones de flexión: a) balanceo en el plano, b) tijereteo en el plano, c) aleteo fuera del plano y d) torsión fuera del plano.....	39
Figura 8.	Nanopartícula de oro la cual se encuentra unida a su superficie diferentes elementos de reconocimiento.....	42
Figura 9.	Estructura tridimensional de la proteína A.....	44
Figura 10.	Unión de la proteína a la superficie de la nanopartícula puede ocurrir a través de varios tipos de interacciones.....	45
Figura 11.	Estructura general de un anticuerpo.....	46
Figura 12.	Ventajas de la conjugación de los anticuerpos a la superficie de las nanopartículas.....	46
Figura 13.	Tres tipos de interacción potenciales nanopartícula-anticuerpo.....	47
Figura 14.	Proteína A unida a la superficie de la nanopartícula de oro para la detección de antígenos en células o secciones de tejido.....	48
Figura 15.	Estrategia de detección de un Microorganismo patógeno de interés mediante espectroscopia SERS y nanopartículas de oro.....	50
Figura 16.	Diagrama de Jablonski simplificado.....	51
Figura 17.	Marcadores fluorescentes convencionales.....	51
Figura 18.	Esquema de un inmunoensayo usando nanopartículas funcionalizadas con moléculas fluorescentes.....	52
Figura 19.	Imagen de fluorescencia de <i>E. coli</i> O157:H7 incubada con nanopartículas conjugadas con anticuerpo.....	53
Figura 20.	Diseño experimental implementado para desarrollar biosensores basados en nanopartículas metálicas con aplicaciones en la detección de patógenos en alimentos.....	54
Figura 21.	Preparación del inóculo para la detección de <i>Salmonella</i>	55
Figura 22.	Esquema de medición SERS del arreglo nanopartículas de oro-Proteína A y anticuerpo anti- <i>salmonella</i>	56
Figura 23.	Diagrama esquemático del proceso de síntesis de nanopartículas Metálicas.....	62
Figura 24.	Proceso de síntesis de nanopartículas de oro por el método de reducción química.....	63
Figura 25.	Espectro típico de absorción UV-Vis de un sistema coloidal de nanopartículas de oro.....	64
Figura 26.	Micrografía TEM de nanopartículas de oro sintetizadas por el método de reducción química. Se muestran imágenes TEM a diferentes escalas.....	66

Figura 27.	Imagen topográfica AFM de nanopartículas de oro inmovilizadas sobre sustratos de silicio.....67
Figura 28.	Grafica de distribución de tamaño para un sistema de nanopartículas de oro.....68
Figura 29.	Esquema donde se muestra la agregación y la estabilización de las nanopartículas con NaCl y en ausencia y presencia de proteína.....69
Figura 30.	Espectro UV-Vis de un sistema coloidal de nanopartículas de oro, sistema coloidal de nanopartículas de oro agregadas mediante el uso de NaCl69
Figura 31.	Espectro FTIR de proteína A y sus principales bandas de absorción FTIR70
Figura 32.	Espectro UV-Visible de nanopartículas de oro y proteína A71
Figura 33.	Espectro UV-Visible de nanopartículas de oro, y del recubrimiento de la superficie de la nanopartícula de oro con proteína A72
Figura 34.	Parámetros que afectan la estructura y actividad de la proteína.....73
Figura 35.	Espectros de absorción UV-Visible a diferentes concentraciones de proteína A funcionalizadas a la superficie de nanopartículas de oro.....75
Figura 36.	Imágenes TEM de nanopartículas de oro con exceso de proteína A.....76
Figura 37.	Imágenes TEM de nanopartículas de oro.....77
Figura 38.	Imagen TEM de nanopartículas de oro unidas a la superficie de una bacteria.....77
Figura 39.	Estructura química del citrato de sodio.....78
Figura 40.	Espectro FTIR de AuNP's de oro, Estándar de proteína A y AuNP's-Proteína A79
Figura 41.	Absorción de (AuNP's) contra concentración de proteína A ($\mu\text{g/ml}$) durante tres meses.....80
Figura 42.	Esquema de unión del conjugado nanopartícula-proteína A a la región Fc del anticuerpo.....81
Figura 43.	Espectros UV-Visible de nanopartículas con y sin proteína A y conjugadas con anticuerpo anti- <i>salmonella</i>81
Figura 44.	Espectro UV-Visible de AuNP's , AuNP's-Prot A , diferentes concentraciones de Ab-Anti- <i>salmonella</i> en AuNP's-Prot A82
Figura 45.	Espectro UV-Visible de AuNP's, AuNP's-Proteína A, diferentes concentraciones de Ab-Anti- <i>salmonella</i> marcado con fluoresceína.....83
Figura 46.	Espectro FTIR de anticuerpo anti- <i>Salmonella</i>84
Figura 47.	Espectros FTIR de AUNP's , AUNP's- proteína A y AuNP's-Ab anti- <i>Salmonella</i> diferentes concentraciones 1-8 $\mu\text{gr/ml}$85
Figura 48.	Espectros FTIR de AUNP's, conjugado AUNP's- proteína A, estándar Proteína A, arreglo AUNP's- proteína A-ab, estándar anticuerpo anti- <i>Salmonella</i> , arreglo AUNP's- proteína A-ab- <i>salmonella</i>86
Figura 49.	Cepas de <i>Salmonella</i> en Agar Soya Trypticaseína.....87
Figura 50.	Espectro típico FTIR de una bacteria Gram-negativa <i>Salmonella</i>88
Figura 51.	Espectro Raman de AUNP's, estándar proteína A, ab anti- <i>Salmonella</i> y espectros SERS de el conjugado (AUNP's- proteína A), arreglo (AUNP's- proteína A-ab).....91
Figura 52.	a) <i>Salmonella</i> a una concentración de 3×10^9 UFC/ml. b) Prueba serológica de precipitación diferentes concentraciones de anticuerpo anti- <i>Salmonella</i> fueron usadas.....92
Figura 53.	Fotos del procedimiento de la preparación de muestras del sistema AUNP's- proteína A con anticuerpo anti- <i>Salmonella</i> marcado con fluoresceína y bacteria <i>Salmonella</i>93
Figura 54.	Imágenes de microscopia de fluorescencia usando con anticuerpo anti- <i>Salmonella</i> marcado con fluoresceína, en verde antígeno <i>Salmonella</i>94
Figura 55.	Imágenes de microscopia de fluorescencia a) <i>Salmonella</i> 3×10^9 UFC/ml, b)

	<i>Salmonella</i> 3X10 ⁷ UFC/ml, c) <i>Salmonella</i> 3X10 ⁵ UFC/ml, d) <i>Salmonella</i> 3X10 ⁴ UFC/ml, e) <i>Salmonella</i> 3X10 ³ UFC/ml, f) <i>Salmonella</i> 3X10 ² UFC/ml con nanoparticulas de oro funcionalizadas con anticuerpo anti- <i>Salmonella</i> marcado con FITC.....97
Figura 56.	Imágenes de microscopia de fluorescencia a una concentración de bacteria <i>Salmonella</i> 3X10 ⁷ UFC/ml, con nanoparticulas de oro funcionalizadas con anticuerpo anti- <i>Salmonella</i> marcado con FITC.....101
Figura 57.	Imágenes de microscopia de fluorescencia de una mezcla entre bacteria <i>Salmonella</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> , con nanoparticulas de oro funcionalizadas con anticuerpo anti- <i>Salmonella</i> marcado con FITC y anticuerpo anti- <i>Staphylococcus aureus</i> marcado con rodamina.....104
Figura 58.	Imágenes de microscopia de fluorescencia de bacteria <i>Salmonella</i> a una concentración de 3x10 ⁸ UFC/ml, con nanoparticulas de oro funcionalizadas con anticuerpo anti- <i>Salmonella</i> marcado con FITC.....109

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Criterios de clasificación de los biosensores.....	16
Tabla 2.	Comparativa general entre biosensores y técnicas analíticas.....	18
Tabla 3.	Características sobresalientes que deben presentar los biosensores.....	19
Tabla 4.	Principales áreas de aplicación de las tecnologías de biosensores dentro del campo agroalimentario	20
Tabla 5.	Biosensores utilizados en la detección de microorganismos patógenos.....	22
Tabla 6.	Biosensores basados en nanopartículas para la detección de bacterias patógenas.....	31
Tabla 7.	Regiones en las que se divide el espectro infrarrojo.....	38
Tabla 8.	Contenido de aminoácidos de la proteína A.....	43
Tabla 9.	Asignación de los grupos funcionales asociados con una mayor vibración de las bandas en el FTIR de la bacteria.....	89
Tabla 10.	Resumen de los diferentes modos de vibración Raman de la proteína A, anticuerpo IgG y de la interacción que se da entre ellos.....	91

Resumen

Los alimentos pueden causar enfermedades si no han sido elaborados bajo normas de higiene adecuadas. Este tipo de enfermedades se conocen con el nombre ETAs. *Salmonella* es uno de los patógenos alimentarios más importantes a nivel mundial y causante de enfermedades gastroentéricas en humanos. La presencia de *Salmonella* en un alimento, sea en la cantidad que sea, se considera peligroso y por lo tanto no será apto para el consumo humano. Por ello, los controles microbiológicos rutinarios en la cadena alimentaria son de vital importancia para no comprometer la salud del consumidor. El método tradicional de detección de *Salmonella* comprende cuatro fases: una primera fase de pre enriquecimiento no selectivo, una segunda fase de enriquecimiento selectivo, un paso adicional de aislamiento en medios sólidos selectivos, y una última fase de confirmación mediante pruebas bioquímicas y serológicas. Estos procesos tradicionales de cultivo son laboriosos y alargan la obtención de los resultados hasta una semana. Debido a esto, surge la necesidad de desarrollar nuevos tipos de biosensores. En este trabajo se diseñó y generó una metodología experimental para la elaboración de un biosensor basado en nanopartículas de oro las cuales fueron sintetizadas mediante el método de reducción química obteniendo partículas quasi-esféricas de un tamaño promedio entre 15-30 nm. Posteriormente estas nanopartículas de oro fueron bio-funcionalizadas con proteína A para así garantizar la conjugación orientada del anticuerpo policlonal anti-*Salmonella*. Se llevo a cabo un método de validación para obtener la concentración mínima necesaria de proteína A y anticuerpo para conferirle estabilidad y especificidad a esta nano-estructura. Se emplearon diferentes técnicas de caracterización en cada etapa de la elaboración de esta nano-estructura (espectroscopias FTIR, UV-visible, dispersión Raman y microscopias TEM y AFM). Sin embargo la detectividad y selectividad de este biosensor se probó en soluciones y alimentos contaminados intencionalmente con la bacteria patógena *Salmonella*, empleando microscopia de fluorescencia. Este biosensor o nano-inmuno-sensor puede ser usado como un selectivo y practico método para la detección de *Salmonella* en alimentos y agua contaminados con este microorganismo.

Abstract

Food can cause illness if they have been manufactured under appropriate standards of hygiene. These diseases are known by the name ETAs. *Salmonella* is one of the most important foodborne pathogens worldwide causing gastroenteric diseases in humans. The presence of *Salmonella* in food, either in the amount it is considered dangerous and therefore will not be fit for human consumption. Therefore, routine microbiological controls in the food chain are vital to avoid endangering the health of consumers. The traditional method of detecting *Salmonella* comprises four phases: the first phase of pre nonselective enrichment, a second phase of selective enrichment, an additional step of isolation on selective solid media, and a final phase confirmation by biochemical and serological tests. These traditional culture processes are laborious and extend the results obtained up to a week because of this, the need to develop new types of biosensors. This work was designed and created an experimental methodology for the development of a biosensor based on gold nanoparticles which were synthesized by chemical reduction method to obtain quasi-spherical average particle size of 15-30 nm. Subsequently these gold nanoparticles were functionalized bio-protein to guarantee oriented conjugation of polyclonal anti-*Salmonella*. A validation method was carried out to obtain the minimum concentration required for protein and antibody to confer stability and specificity of this nano-structure. Different characterization techniques were used at each stage of the development of this nano-structure (FTIR spectroscopy, UV-visible, and Raman scattering microscopy, TEM and AFM). However the detectivity and selectivity of this biosensor was tested in solutions and intentionally contaminated with pathogenic bacteria *Salmonella*, food using fluorescence microscopy. This biosensor or nano-immuno-sensor can be used as a selective and practical method for the detection of *Salmonella* in food and water contaminated with this organism.

CAPITULO I

ANTECEDENTES

1.1 Biosensor.

Durante la última década, recientes avances en el campo de la biotecnología y la microelectrónica han impulsado la tecnología de los biosensores. Estas herramientas de monitorización y control, llamadas a revolucionar la biotecnología analítica, proporcionan información en tiempo real sobre parámetros clave en procesos de muy distintas áreas (agricultura, medicina, medio ambiente, etc.) Ante este contexto, es de esperar que un futuro próximo se realicen grandes avances en la investigación y desarrollo de biosensores adaptados a las necesidades de estas áreas.

En el ámbito de la industria alimentaria factores tales como la legislación reciente sobre seguridad alimentaria unido al énfasis en los nuevos sistemas de aseguramiento de la calidad y a la protección del medio ambiente han desencadenado un crecimiento de la demanda de sistemas de monitorización y control de materias primas, procesos y productos finales que permitan obtener una respuesta rápida y fiable (Sadik, 2009). En este sentido los sensores son dispositivos que pueden realizar medidas tanto de variables físicas como químicas.

Un biosensor se define como un dispositivo o arreglo compacto de análisis el cual incorpora un elemento de reconocimiento biológico (ácido nucleico, enzima, anticuerpo, receptor, tejido, célula) asociado a un sistema de transducción que permite procesar la señal producida por la interacción entre el elemento de reconocimiento y el analito. Esta señal fisicoquímica es traducida en una señal eléctrica, óptica o de otra índole, que puede ser amplificada y procesada en la forma adecuada (Venugopal, V. 2002). El principio de detección de un biosensor está basado en la interacción específica entre el compuesto o microorganismo de interés y el elemento de reconocimiento (Figura1). Como resultado de esta interacción específica, se producen cambios en una o varias propiedades fisico-químicas (pH, transferencia de electrones, transferencia de calor, cambio de potencial, de masa, variación de las propiedades ópticas, etc.) que detecta el transductor. Este sistema transforma la respuesta del elemento de reconocimiento en una señal electrónica indicativa de la presencia del analito sometido a estudio o proporcional a su concentración en la muestra (Velasco et al., 2003).

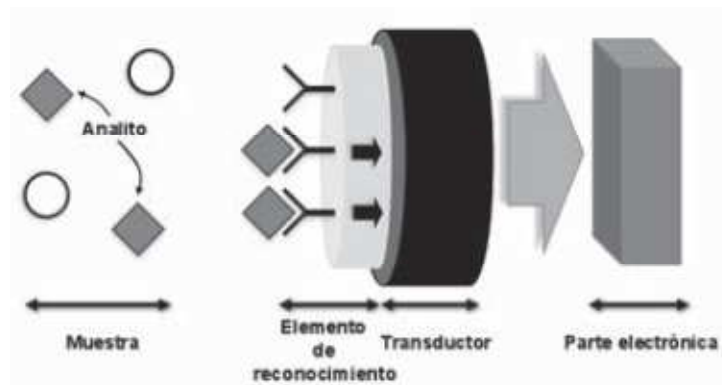


Figura 1. Esquema de un biosensor y fundamento de su funcionamiento.

El término biosensor aparece en la literatura científica a finales de los años 70, aunque el concepto básico e incluso la comercialización comenzaron antes. El primer biosensor fue un analizador de glucosa desarrollado por Clark y Lyons en 1962 y comercializado a partir de 1975 por Yellow Springs Instrument Company. Este biosensor se denominó “enzyme electrode” y consistía en una enzima glucosa oxidasa acoplada a un electrodo para oxígeno. La enzima oxida la glucosa y como consecuencia se produce un descenso proporcional de la concentración de oxígeno en la muestra, que es detectado por el electrodo. En los años siguientes se desarrollaron electrodos enzimáticos para distintas sustancias de interés clínico mediante la unión de enzimas apropiadas a sensores electroquímicos.

A partir de 1977 se desarrolló el primer dispositivo utilizando microorganismos vivos inmovilizados en la superficie de un electrodo sensible a amonio. Este dispositivo se utilizaba para detectar el aminoácido arginina y sus creadores lo denominaron “sensor bio-selectivo”. Posteriormente para acortar, se denominó “biosensor” y este término ha permanecido desde entonces para designar la unión entre un material biológico y un transductor físico. A partir de ese momento el diseño y las aplicaciones de los biosensores en distintos campos de la química analítica han continuado creciendo.

El desarrollo de los biosensores desde entonces ha estado centrado principalmente en el campo del diagnóstico clínico (con un gran éxito de los biosensores para glucosa) y existe un interés más reciente en los campos medioambiental, químico, farmacéutico y militar. En el campo agroalimentario, su interés se centra en el análisis de la composición de los alimentos, en la seguridad alimentaria (detección de compuestos contaminantes, alérgenos, anti-nutrientes, toxinas y microorganismos patógenos) y en el control de procesos on line.

El número de publicaciones científicas, revisiones y patentes sobre biosensores desarrollados en los últimos años es muy elevado, lo que refleja el gran interés que despierta este tema en la comunidad científica. A pesar de este interés, la salida de estos dispositivos del laboratorio al mercado agroalimentario ha sido lenta (Velasco et al., 2003). Los biosensores presentan un gran potencial en la industria alimentaria

pues representan una alternativa que ofrece especificidad en la respuesta, simplicidad y rapidez. En las últimas décadas se han realizado grandes progresos en la investigación y el desarrollo de biosensores, apoyados en los avances tecnológicos, especialmente la microelectrónica, la nano-fabricación, el desarrollo de nuevos materiales y la computarización. Sin embargo, su aplicación al campo de la industria alimentaria así como su comercialización a gran escala es un reto aun pendiente. La industria alimentaria presenta una serie de características entre ellas la diversa composición química de los alimentos así como los diversos procesos y variaciones físicas a las que son sometidos, todas estas características suponen un desafío a la hora de desarrollar biosensores.

1.1.1 Clasificación de Biosensores.

Como indica la siguiente tabla estos dispositivos pueden clasificarse en función del tipo de interacción que se establece entre el elemento de reconocimiento y el analito; el método utilizado para detectar dicha interacción; la naturaleza del elemento de reconocimiento; o del sistema de transducción.

Tabla 1. Criterios de clasificación de los biosensores.

Tipo de interacción	Detección de la interacción
Biocatalítica	Directa
Bioafinidad	Indirecta
Elemento de reconocimiento	Sistemas de transducción
Enzima	Electroquímico
Organulo, tejido o célula completa	Óptico
Receptor biológico	Piezoeléctrico
Anticuerpo	Termométrico
Ácidos nucleídos	Nanomecánico
PIM, PNA, aptamero	

Existen múltiples elementos de reconocimiento y sistemas de transducción, la elección del transductor está condicionada por el tipo de elemento de reconocimiento elegido, ya que éste determina cuál será la variación en las propiedades fisico-químicas que ocurra como consecuencia de la interacción.

1.1.1.2 Elementos Biológicos de Reconocimiento Molecular.

Las moléculas utilizadas en los biosensores como elementos de reconocimiento deberán cumplir con ciertos criterios fundamentales para poder ser empleadas como unidades sensoras. En primer lugar tienen que poseer afinidad hacia el elemento objeto del reconocimiento, que deberá ser suficientemente selectiva para reconocer a

este elemento en presencia de otros compuestos y además deberá permanecer estable a lo largo del tiempo.

El reconocimiento molecular puede conllevar simplemente el enlace entre el elemento receptor y la molécula reconocida (antígeno-anticuerpo) o bien la interacción puede ser de naturaleza catalítica (enzima-sustrato-producto). Éste es el principal criterio que se utiliza en la clasificación de los biosensores como biocatalíticos o de bioafinidad.

1.1.1.3 Sistema de Transducción.

El sistema de transducción o transductor es el elemento que convierte las variaciones de las propiedades físicas o químicas que se producen por la interacción entre el elemento de reconocimiento y el analito en una señal que puede ser amplificada, almacenada y registrada. La señal generada por el transductor en algunos casos no puede ser interpretada directamente y es necesaria la utilización de un software para su procesamiento.

Existen varios tipos de transductores: electroquímicos, ópticos, piezoeléctricos (máscicos, gravimétricos, acústicos), termométricos y nano-mecánicos. Dependiendo de la naturaleza de la interacción entre el elemento de reconocimiento y la especie de interés se puede utilizar un tipo de transductor u otro (Gerard et al., 2002).

1.2 Características y propiedades de biosensores.

Los dos constituyentes del biosensor (receptor biológico y transductor) están integrados conjuntamente, confiriendo a los dispositivos biosensores sus especiales características de selectividad y sensibilidad. Aunque sin duda la característica más importante de todo biosensor, en comparación con las técnicas de análisis estándar (cromatografía), es la posibilidad de realizar el análisis de la sustancia a determinar en tiempo real y de forma directa, a diferencia de cualquier análisis biológico o clínico en el cual siempre se requiere la utilización de algún marcador molecular (ya sea colorimétrico, quimio-luminiscente, quimio-fluorescente o radioactivo). Estas características confieren a los biosensores la posibilidad de realizar, no sólo un análisis cualitativo y cuantitativo, sino también la posibilidad de evaluar la cinética de la interacción (constante de afinidad, asociación, disociación) y por tanto, elucidar los mecanismos fundamentales de dicha interacción. Pocas técnicas biotecnológicas permiten la evaluación en tiempo real de la cinética de la interacción, razón por la cual las técnicas biosensores se están imponiendo en todas aquellas áreas donde es fundamental conocer en detalle la cinética de la interacción biomolecular, como por ejemplo, en la evaluación de fármacos.

Aunque existen multitud de biosensores distintos, cada uno con sus ventajas e inconvenientes, muchos de estos ofrecen también la ventaja de la facilidad de manejo, el pequeño tamaño y la portabilidad, lo que posibilita su utilización en lugares inviables para una técnica analítica convencional, como el hogar o la consulta del médico (por ejemplo los sensores electroquímicos de glucosa (Wang, 2001). Otro aspecto destacable es la necesidad de una cantidad de muestra relativamente baja para hacer el análisis (del orden de micro a nano-litros), lo que es importante cuando se trata de análisis de sangre o de ADN, o si la muestra es cara o difícil de conseguir. Dependiendo también del tipo de biosensor empleado, generalmente, el coste por dispositivo suele ser bajo, y con las modernas técnicas de micro o nano-fabricación también es posible disponer de sistemas multi-biosensores que permitan la medida simultánea de diversos analitos con la misma cantidad de muestra. A modo de resumen, la Tabla 2 incluye las ventajas e inconvenientes generales más importantes de los biosensores frente a las técnicas de análisis convencional.

Tabla 2. Comparativa general entre biosensores y técnicas analíticas.

TÉCNICAS CONVENCIONALES	BIOSENSORES
Largos tiempos de análisis	Análisis rápido (en tiempo real)
Manejo por parte de personal especializado	Fáciles de usar
Algunas técnicas son caras	Varios sistemas son baratos
Técnicas que operan en laboratorio	Portátiles, miniaturizables y automatizables
Multi-analito	En su mayoría mono-analito
Pequeño volumen de muestra	Muy reducido volumen de muestra
Requiere pre-tratamiento de la muestra	Mínimo pre-tratamiento de muestra
Sensibles, precisos y fiables	Sensibles, precisos y fiables
Algunas técnicas requieren reactivos	La mayoría no usa reactivos

En la Tabla 3 se presentan las características más importantes de un biosensor ideal, a las cuales deben sumarse el ser portátiles, sencillos de manejar, automáticos y susceptibles de ser usados como dispositivos remotos (Alcalá 2002, Farré et al. 2005).

Tabla 3. Características sobresalientes que deben presentar los biosensores.

CARACTERISTICA	DESCRIPCION
SENSIBILIDAD	Alta para ciertos analitos como los xenobióticos con efectos sobre la salud, incluso a concentraciones de partes por billón ($\mu\text{g/L}$).
SELECTIVIDAD	Alta , para que el dispositivo interaccione exclusivamente con el compuesto de interés y no con otros. Mediante elementos de reconocimiento específicos.
CONFIABILIDAD	Alta , los sistemas de transducción se diseñan de manera que no puedan ser alterados (o lo sean mínimamente) por la muestra.
TIEMPO DE VIDA	Largo , que no obligue al empleo del dispositivo por cortos periodos desde su fabricación ni a sustituciones frecuentes del mismo. Lo que depende de su estabilidad química, física y mecánica.
COSTO DE PRODUCCIÓN, OPERACIÓN Y MANTENIMIENTO	Bajo , en general, pueden fabricarse a escala industrial, lo cual redundaría en un abaratamiento de los costos de producción. Asimismo, sus costos de operación y de mantenimiento deberán ser bajos
PRETRATAMIENTO DE LA MUESTRA	Evitable , ahorrando tiempo materiales y reactivos. Aunque, en ciertas determinaciones son imprescindibles las etapas de concentración y purificación, eliminando interferencia para asegurar la presencia de una cantidad suficiente del analito.
TIEMPO DE ANÁLISIS	Corto , con capacidad de medir en tiempo real o muy reducido, posibilitando una actuación rápida, controlando parámetros importantes de manera inmediata y automática.

Existe una amplia variedad de biosensores distintos y no todos poseen cada una de las características citadas anteriormente. La combinación de varias de ellas podría situar a muchos de estos dispositivos en una posición ventajosa frente a las técnicas de análisis convencionales (cromatografía, espectrometría, etc.). Además, permiten que sean aplicables a la monitorización en tiempo real de procesos industriales (Patel, 2002).

1.3 Aplicaciones de Biosensores en el Área de los alimentos.

Como se muestra en la Tabla 4 las aplicaciones actuales de los biosensores en el ámbito de los alimentos se orientan hacia las siguientes áreas principales: la seguridad alimentaria, la calidad alimentaria y el control de procesos industriales.

Tabla 4. Principales áreas de aplicación de las tecnologías de biosensores dentro del campo agroalimentario

Seguridad alimentaria	Calidad alimentaria
Compuesto xenobióticos	Composición del alimento
Aditivos.	Azúcares.
Fármacos.	Aminoácidos.
Plaguicidas y fertilizantes.	Alcoholes.
Otros contaminantes (dioxinas, PCBs, HAPs, metales pesados)	Ácidos orgánicos.
	Colesterol.
Biotoxinas	Vida útil
Toxinas bacterianas.	Polifenoles y ácidos grasos (enranciamiento).
Micotoxinas.	Azúcares y ácidos orgánicos (madurez).
Toxinas marinas.	Aminas biógenas (índice de frescura).
Microorganismos patógenos	Compuestos aromáticos
Virus.	Aliína (ajo y cebolla).
Bacterias.	
Protozoos.	
Control de procesos	Otras aplicaciones
Azúcares (fermentación y pasteurización).	OMGs.
Alcoholes (fermentación alcohólica).	Ciclo reproductivo animal.
Aminoácidos (fermentación).	
Ácido láctico (elaboración de quesos).	

1.3.1 Seguridad Alimentaria.

El concepto de seguridad alimentaria implica garantizar la producción y comercialización de alimentos que no supongan un riesgo potencial para la salud del consumidor. En este campo los biosensores se utilizan para detectar:

- Compuestos xenobióticos, es decir, sustancias externas al producto alimenticio que no han sintetizado los seres vivos (aditivos, fármacos, plaguicidas,...).
- Ciertos componentes del alimento (alérgenos y antinutrientes).
- Toxinas de diversos orígenes (toxinas bacterianas, micotoxinas y toxinas marinas).
- Microorganismos patógenos que afectan al hombre, al ganado y a los cultivos.

1.3.2 Microorganismos Patógenos.

El aumento en los últimos años de toxi-infecciones producidas por bacterias patógenas ha incrementado la necesidad de métodos de detección más rápidos, sensibles y específicos. En la actualidad se utilizan métodos basados en anticuerpos y en ADN, que han permitido acortar el tiempo de análisis pero no una detección en tiempo real (Leonard et al., 2003)

Frente a estos métodos de análisis, los biosensores tienen el potencial de que permiten la detección en tiempo real, pero presentan como inconveniente que, en caso de un número bajo de microorganismos, es necesario hacer un pre-enriquecimiento o una concentración de la muestra, con el consiguiente aumento del tiempo de análisis.

Los biosensores que existen para detectar microorganismos patógenos en alimentos (Tabla 5) son principalmente de tipo inmunológico combinados con transductores piezoeléctricos, ópticos, bioluminiscentes o de impedancia, que permiten una detección directa sin marcaje de la interacción antígeno-anticuerpo (Venugopal, 2002).

Existen también biosensores que permiten una detección indirecta de los microorganismos, entre los que se incluye detección mediante marcaje con fluorescencia, detección de metabolitos microbianos y detección electroquímica.

Tabla 5. Biosensores utilizados en la detección de microorganismos patógenos.

Sistema de transducción	Elemento de reconocimiento	Microorganismo
Electroquímico	Anticuerpos	<i>S. typhimurium</i> , <i>E. coli</i> 0157:H7 <i>Campylobacter</i> , <i>S. aureus</i>
Light-addressable potentiometric sensor (LAPS)	Anticuerpos	<i>S. typhimurium</i> , <i>E. coli</i> 0157:H7 <i>B. subtilis</i> , <i>Y. Pestis</i> , <i>Neisseria meningitidis</i> , <i>Brucella melitensis</i>
Impedimétrico		<i>Salmonella</i> , <i>Proteus vulgaris</i>
Piezoeléctrico tipo QCM	Anticuerpos receptores proteína A	<i>Vibrio cholerae</i> , <i>S. enteritidis</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Campylobacter</i> , <i>E. coli</i> , <i>Shigella dysenteriae</i> , <i>Yersinia pestis</i> , <i>Proteus</i> , <i>Serratia</i> , <i>Klebsiella</i>
Piezoeléctrico tipo SAW	Anticuerpos	<i>E. coli</i> , <i>Legionella</i> , <i>Salmonella</i>
Nanoelectromecánico	Anticuerpos	<i>E. coli</i> 0157:H7
SPR	Anticuerpos	<i>E. coli</i> 0157:H7, <i>Salmonella enteritidis</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>B. subtilis</i>
Resonancia de espejos	Anticuerpos	<i>S. aureus</i>
Bioluminiscencia	Anticuerpos	<i>Mycobacterium avium</i> , <i>M. paratuberculosis</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Listeria</i>
FIA (Fluorescent Anticuerpos immunoassays)	Anticuerpos	<i>S. typhimurium</i> , <i>Yersinia</i> , <i>V cholerae</i> , <i>E. coli</i>
Interferometría óptica	Anticuerpos	<i>Salmonella typhimurium</i>
Fibra óptica	Anticuerpos	<i>E. coli</i> 0157:H7, <i>S. aureus</i>

1.4 Microorganismos patógenos más comunes en alimentos.

Los microorganismos, y en concreto las bacterias, son la principal causa de enfermedades causadas por el consumo de alimentos contaminados. Se habla de cómo evitar su presencia, de sus consecuencias sanitarias y socioeconómicas, pero a menudo no se conoce lo suficiente. De acuerdo a la FAO (Organización para la Alimentación y la Agricultura) los principales microorganismos patógenos son: *Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens*, *E. coli* 0157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* y *Toxoplasmodium gondi*, estas bacterias transmitidas por alimentos son las más relevantes para la salud humana, bien por su elevada incidencia como por sus devastadoras consecuencias en el organismo, debido a estas características hemos elegido a *salmonella* para su evaluación mediante las metodologías propuestas en este trabajo.

1.4.1 *Salmonella*.

Salmonella es una de las bacterias más mediáticas y conocidas gram-negativa. A ella se le atribuyen muchas de las toxi-infecciones alimentarias. Se trata de una enterobacteria que puede llegar a contaminar el agua y los alimentos de origen animal especialmente huevos, aves y cárnicos, y que al multiplicarse en condiciones

adecuadas de crecimiento durante el tiempo suficiente alcanza una dosis tal que al ingerirse produce una patología llamada salmonelosis. Sólo a través del control de alimentos en origen y de unas buenas prácticas de manipulación en toda la cadena se puede reducir la incidencia y llegar a su erradicación (Tothill, 2001).

1.4.1.1 Métodos tradicionales de detección de *Salmonella*

Detección de *Salmonella* en alimentos está basada en la norma ISO 6579:2002. Este método nos ofrece unos resultados de presencia/ausencia de la bacteria normalmente en 25 gr de alimento

El proceso de detección de *Salmonella* mediante el método tradicional de cultivo puede durar **desde 5 hasta 7 días, es decir, aproximadamente se tarda una semana en obtener los resultados**. En la figura 2 se muestra de manera esquemática el protocolo del método tradicional de detección de *Salmonella*.

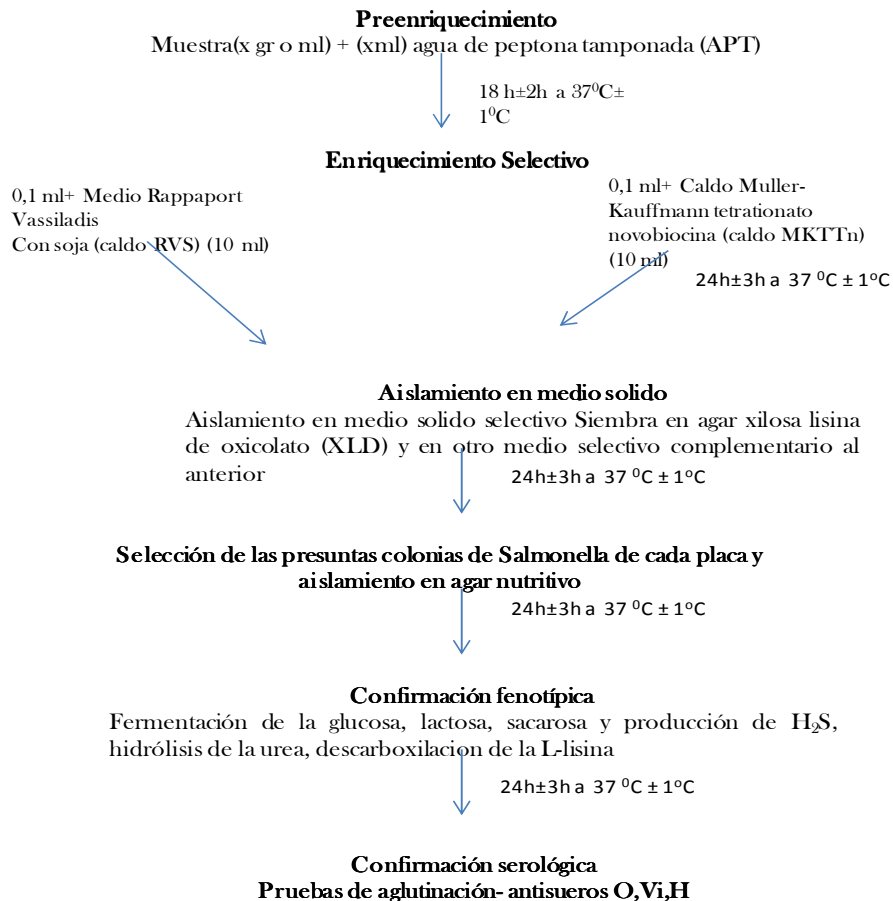


Figura 2.- Fases del método tradicional de cultivo para realizar la detección de *Salmonella* según la norma ISO 6479-2002.

Se han desarrollado métodos alternativos para facilitar todas las fases del método tradicional de detección, desde logrando una disminución en el tiempo de incubación necesario para los cultivos, hasta desarrollando técnicas moleculares (Feng P, 2001; Jasson V et al., 2010).

1.4.1.1.1 Modificaciones en el método de cultivo.

Los adelantos se han centrado especialmente en la capacidad de ahorrar tiempo en los pasos de enriquecimiento, de este modo, se han desarrollado diferentes medios de cultivo que permiten realizar el enriquecimiento en un solo paso, reduciendo el tiempo total de enriquecimiento.

Los medios cromogénicos también han sido un gran avance, son medios de cultivo en los que se han incluido sustratos cromogénicos que permiten detectar actividades enzimáticas. Esto permite realizar una identificación inmediata de los principales microorganismos que estén presentes en la muestra, ya que cada especie dará colonias de un color característico.

Ejemplo de estos avances es el SESAME *Salmonella* Test de Biokar (Biokar Diagnostics, France) que incluye un medio que disminuye el tiempo de enriquecimiento, un segundo paso de detección en agar semisólido que permite diferenciar los microorganismos móviles de los no móviles y un paso de confirmación en agar cromogénico. Otro ejemplo es el RAPID *Salmonella* Short Protocol de Bio-Rad (Hercules, CA, USA), que al igual que en el test anterior, gracias a la adición de un suplemento de enriquecimiento que se añade al agua de peptona tamponada la fase de enriquecimiento se reduce a un solo paso, y posteriormente se siembra en agar cromogénico que permite detectar presuntas colonias de *Salmonella*.

1.4.1.1.2 Inmunoensayos.

Los inmunoensayos se basan en la unión específica de antígenos con anticuerpos. El factor determinante de estos métodos es la elección de un anticuerpo apropiado. Los resultados positivos que se obtengan con estos métodos siempre son considerados como presuntos positivos, por lo tanto, siempre requieren confirmación. **El límite de detección se encuentra entre 10^4 - 10^5 UFC/ml.** Existen diferentes métodos inmunológicos aplicables al diagnóstico alimentario.

1.4.1.1.3 Inmunoprecipitación.

Estos métodos son rápidos, de uso sencillo y fáciles de interpretar. Normalmente están compuestos por una membrana, habitualmente de nitrocelulosa, donde está

inmovilizado el anticuerpo que específicamente une y captura el antígeno específico de la bacteria si está presente en la muestra, formándose una línea visible por ejemplo a la utilización de partículas de látex coloreadas. Para *Salmonella* existen por ejemplo el test VIP for *Salmonella* de BioControl (WA, USA) o el Reveal® de Neogen (MI, USA) entre otros.

1.4.1.1.4 Enzimoinmunoensayo (ELISA).

En el ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay), que es uno de los formatos basados en anticuerpos más utilizados para el análisis de patógenos en alimentos, se utiliza un anticuerpo unido a una matriz sólida que captura los antígenos presentes en el cultivo enriquecido. Un segundo anticuerpo conjugado con una enzima es el que se utiliza para realizar la detección. En presencia del sustrato la enzima catalizará una reacción colorimétrica. Las paredes de los pocillos de las placas de microtitulación son el soporte sólido más utilizado en este tipo de ensayos. Existen gran variedad de kits en formato ELISA para la detección de *Salmonella*. Hoy en día muchos de estos test se proporcionan como sistemas automatizados y robotizados que ahorran tiempo gracias a la disminución del trabajo manual, pero además, aumentan la reproducibilidad y la estandarización de cada paso. Ejemplos de estos sistemas para *Salmonella* son el RayAL *Salmonella* (RayAl, Nottinghamshire, UK), los sistemas 3M™ Tecra™ (3M, St.Paul, Minnesota, USA) o el TRANSIA® PLATE *Salmonella* Gold (BioControl).

Los métodos anteriormente mencionados se basan en la utilización de sustratos cromogénicos para realizar la detección, pero la enzima puede también catalizar una reacción fluorescente. Son métodos basados en la tecnología ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay). El sistema VIDAS® y su versión compacta miniVIDAS de BioMerieux son sistemas multiparamétricos que utilizan esta metodología ELFA y que además están completamente automatizados.

1.4.1.1.5 Separación inmunomagnética (IMS).

Este método está diseñado para separar el organismo diana directamente de una suspensión compleja como es por ejemplo una muestra de alimento. A la suspensión se le añaden partículas magnéticas las cuales están recubiertas de un anticuerpo específico del microorganismo que se va a detectar. Se incuban para facilitar la unión de las células de interés a los anticuerpos y se aíslan los complejos del resto de la muestra mediante magnetismo. Los complejos se pueden utilizar después para hacer más pruebas, como por ejemplo inocular otro cultivo, transferir a medios selectivos, o pueden ser utilizados en reacciones de PCR o en ensayos de ELISA.

1.4.1.1.6 Sistemas de aglutinación en porta.

Son uno de los métodos inmunológicos más sencillos. El más utilizado es la aglutinación en látex (LA), en el que las partículas de látex son unidas a los anticuerpos específicos que en contacto con los antígenos específicos del microorganismo diana produce una reacción de aglutinación que es detectada visualmente. Para *Salmonella* existen varios test de aglutinación, como por ejemplo *Salmonella* Latex Test (Oxoid, Basingstoke, UK) o Microgen® *Salmonella* Rapid Test (Microgen Bioproducts, Surrey, UK). Normalmente estos test son utilizados en la última fase del método tradicional de detección de *Salmonella*, es decir, en la confirmación serológica.

1.4.1.1.7 Inmunodifusión.

La inmunodifusión es una técnica de precipitación que se basa en el movimiento de las proteínas en una agarosa en la cual está presente el anticuerpo específico. Si al añadir la muestra el antígeno específico está presente en ésta, se formarán complejos antígeno-anticuerpo generando una línea de precipitación.

Para *Salmonella* existe el 1-2 Test de BioControl, en el cual el anticuerpo utilizado es específico para el antígeno flagelar de *Salmonella*, por lo que no se detectarán *salmonellas* no móviles.

1.4.1.1.8 Métodos de detección mediante citometría de flujo.

La citometría de flujo puede detectar cada una de las células de una suspensión de manera individual por lo que podría ser un método utilizado en la detección de patógenos. Aun así no es un método muy empleado ya que no es una técnica lo suficientemente sensible. Mediante citometría de flujo no se pueden detectar cantidades menores a **10³-10⁴ células/ml**. Una fase previa de enriquecimiento es esencial antes de utilizar la citometría de flujo para aumentar la cantidad de bacterias en la muestra hasta niveles detectables por esta técnica. En vez de utilizar citometría de flujo, también se pueden visualizar y detectar células teñidas mediante un microscopio de epifluorescencia.

1.4.1.1.9 Métodos moleculares.

En los métodos moleculares son esenciales tanto la selección de una secuencia de ADN que sea específica, así como unas adecuadas condiciones de amplificación. Estos son los factores determinantes de la especificidad de los métodos moleculares.

1.4.1.1.9.1 Hibridación in situ fluorescente (FISH, fluorescent in situ hybridization).

Dentro de las técnicas moleculares no basadas en PCR, esta técnica es la más frecuente. Generalmente se utilizan sondas oligonucleotídicas que reconocen el ARN ribosómico (ARNr). Las células bacterianas son tratadas con diversos fijadores y después, se realiza la hibridación con los oligonucleótidos en condiciones muy restrictivas, bien en superficie de cristal o bien en solución. Las sondas suelen tener un tamaño de entre 15 y 25 nucleótidos y están marcadas covalentemente en el extremo 5' con una molécula fluorescente. Después de unos lavados para retirar las sondas que no se hayan unido, las células que estén marcadas gracias a la unión con las sondas, serán detectadas mediante un microscopio de epifluorescencia. **El límite de detección de esta técnica suele estar en torno a 10^4 UFC/ml, por lo que se necesita un paso previo de enriquecimiento para alcanzar esos valores.** En el mercado existe el kit VIT-*Salmonella* comercializado por Vermicon (Munich, Germany) que se basa en la técnica FISH.

1.4.1.1.9.2 Técnicas basadas en amplificación PCR.

La reacción de PCR, polymerase chain reaction, es una técnica in vitro que se basa en la capacidad de la ADN polimerasa en copiar una cadena de ADN (Mullis KB y Faloona FA, 1987). Mediante esta técnica un fragmento específico de ADN se amplifica debido a la utilización de dos oligonucleótidos sintéticos (iniciadores), normalmente de entre 20 y 30 nucleótidos, cuyas secuencias coinciden con los extremos del fragmento de interés. El ADN se amplifica mediante un proceso cíclico que consta de tres pasos: primero el ADN molde de doble cadena es desnaturalizado a altas temperaturas convirtiéndolo en ADN de cadena sencilla. Después, los dos oligonucleótidos sintéticos (iniciadores) se anillan en hebras opuestas del ADN a una temperatura que solo permite la hibridación con la diana correcta. Por último, se sintetiza una nueva hebra de ADN utilizando los oligonucleótidos como iniciadores para la ADN polimerasa y utilizando el ADN diana como molde. De este modo se genera otra vez ADN de doble cadena. En los siguientes ciclos los iniciadores se unirán tanto al ADN original como al de nueva síntesis, por lo que el número de copias del fragmento comprendido entre los dos iniciadores aumentará de forma exponencial (Olsen JE et al., 1995). Aun habiendo una única copia de ADN molde en la mezcla de reacción de PCR, en unas horas se pueden generar millones de copias (Hanna SE et al., 2005).

Los resultados de la PCR se detectan tradicionalmente (PCR convencional) mediante electroforesis en geles de agarosa seguido de la tinción del gel con algún agente intercalante, como el bromuro de etidio, o mediante tinción fluorescente, como GelRed™ (Biotium, Hayward, CA, USA). Uno de los principales inconvenientes que tiene la técnica de PCR es que en ocasiones, y sobre todo en condiciones poco

estrictas, pueden ocurrir amplificaciones no específicas por la unión de los iniciadores a otras zonas del ADN problema. También se pueden formar dímeros de los iniciadores, que se detectan como productos no específicos. Por otro lado, al tener que visualizar los resultados mediante electroforesis en geles de agarosa, pueden ocurrir contaminaciones entre los productos de PCR (Hanna SE et al., 2005). Aunque mediante PCR se pueden detectar los ácidos nucleicos de un único organismo, el volumen de 1-10 µl de muestra que normalmente se utiliza en la reacción **restringe el límite de detección a 10³ células/ml** (Olsen JE et al., 1995). Normalmente los patógenos alimentarios están presentes en los alimentos a concentraciones muy bajas, por lo tanto, la detección directa es prácticamente imposible. Por eso, se realizan grandes esfuerzos en intentar desarrollar métodos de extracción capaces de concentrar los microorganismos diana, de separarlos de la matriz alimentaria y solucionar posibles inhibiciones de la reacción de PCR causadas por sustancias presentes en los alimentos.

1.4.1.1.9.2.1 PCR a tiempo real.

La PCR a tiempo real es una técnica que permite realizar la detección y visualización de los resultados a medida que el proceso de amplificación va progresando. El proceso de amplificación es monitorizado a tiempo real mediante el uso de fluorescencia, que se corresponde con un incremento en el producto de PCR en cada ciclo de amplificación. Es una técnica rápida, fácil de realizar y que disminuye las posibilidades de contaminación ya que se elimina el análisis post-amplificación que hay que realizar en la PCR convencional.

Los resultados de la PCR a tiempo real se visualizan mediante curvas de amplificación. Durante la fase exponencial se produce un aumento exponencial de la fluorescencia que se corresponde con un aumento de la cantidad de producto amplificado. El valor umbral es un nivel de fluorescencia a partir del cual la señal fluorescente alcanza un valor por encima del ruido de fondo, y el ciclo de amplificación en el cual la fluorescencia sobrepasa el umbral se conoce como ciclo umbral o Ct (threshold cycle). Se considera que la amplificación es positiva si la curva de amplificación sobrepasa ese umbral, y que es negativa si la curva se mantiene por debajo de él. La PCR a tiempo real se puede utilizar tanto para detección básica como para cuantificación. Cuanta más cantidad de ADN haya en la muestra, la fluorescencia alcanzará antes el nivel de fluorescencia umbral. El Ct obtenido en una muestra se puede comparar con el de una curva estándar generada a partir de diluciones seriadas con cantidades conocidas de ADN. De este modo se puede cuantificar la cantidad de ADN de una muestra.

1.4.1.1.9.2.2 Tendencia actual del uso de la PCR a tiempo real.

En los métodos de PCR para detectar patógenos en alimentos se recomienda realizar una fase previa de enriquecimiento **de entre 6h a 24h** para aumentar el número de células diana, ya que en la extracción del ADN se utiliza un volumen pequeño de muestra. También se recomienda la utilización de un control interno en la reacción de PCR para descartar posibles inhibiciones (Malorny B et al., 2003).

Los métodos basados en PCR son muy útiles para realizar screening de muestras, pero en caso de obtener algún resultado positivo siempre se debe confirmar con el método tradicional de cultivo.

Hoy en día existen una gran variedad de kits comerciales validados para realizar la detección de *Salmonella* en alimentos mediante PCR a tiempo real, entre ellos:

Kit Comercial

IQ-Chek[™] Salmonella II
LightCycler[®] foodproof Salmonella Detection kit
SalmoFast
BAX[®] System PCR Assay for Salmonella
ADIAFOOD Salmonella kit
TaqMan[®] Salmonella enterica Detection kit
MicroSEQ[®] Salmonella spp. Detection kit
R.A.P.I.D.[®] LT real-time PCR system
Assurance-GDS[™] Salmonella
Authentigen[®] Salmonella

Casa Comercial

Bio-Rad (Hercules, CA)
Roche (Indianapolis, USA)
Microbial (Girona, España)
Du Pont (Delaware, USA)
AES Chemunex (Brux, France)
Applied Biosystems (Foster City, USA)
Applied Biosystems (Foster City, USA)
Idaho Technology (Utah, USA)
BioControl (WA, USA)
Sistemas Genómicos (Valencia, España)

1.5 Tendencias en la Tecnología de Biosensores en el área de Alimentos.

El aumento en los últimos años de toxiinfecciones producidas por bacterias patógenas ha incrementado la necesidad de métodos de detección más rápidos, sensibles y específicos. En la actualidad se utilizan métodos basados en anticuerpos y en ADN, que han permitido acortar el tiempo de análisis pero no una detección en tiempo real (Leonard, P., 2003). Frente a estos métodos de análisis, los biosensores podrían tener el potencial y la capacidad de detección en tiempo real, pero presentan algunos inconvenientes tales como: débil respuesta ante un número bajo de microorganismos, y es necesario hacer un pre-enriquecimiento o una concentración de la muestra, con el consiguiente aumento del tiempo de análisis. Este es un factor crucial, ya que incluso una sola célula puede dar lugar a graves riesgos, por lo que la investigación en biosensores bacterianos tiene como objetivo lograr una detección ultrasensible de agentes infecciosos en complejas matrices biológicas. Los enfoques actuales de la nanociencia y la nanotecnología en biosensores prometen grandes promesas para abordar las necesidades de análisis en el área de los alimentos (Sanvicens et al., 2008).

A diferencia del caso anterior, los biosensores basados en nanopartículas pueden ser capaces de detectar una sola célula, organelo o microorganismo, sin hacer un pre-enriquecimiento de la muestra.

En este contexto, las nanopartículas (AuNPs) han creado grandes expectativas con respecto a generar mejoras en la señal/ruido, la reducción de los tiempos de respuesta. El uso de nanopartículas en biosensores es relativamente una nueva área de investigación. Sin embargo, la literatura ya muestra numerosos ejemplos de la incorporación de nanopartículas en biodispositivos (Ligler, 2009). Hasta el momento, hay nano-biosensores para la detección específica de moléculas (por ejemplo, ácidos nucleicos (Litos et al., 2009), proteínas (Hu et al., 2009) enzimas (Hong et al., 2009) y a veces para la detección de enfermedades de agentes infecciosos (Liu et al., 2007).

Los biosensores basados en nanopartículas metálicas, o *biosensores plasmónicos*, el elemento de reconocimiento está formado por compuestos orgánicos adheridos químicamente a la superficie metálica de la nanopartícula por un extremo, mientras que por el otro se une selectivamente al analito de interés. Esta interacción específica se ve reflejada como un cambio en sus propiedades ópticas tales como: aumento en su emisión fluorescente, absorción UV-visible e infrarroja, así como en su dispersión Raman.

En la Tabla 6 se ofrece una visión general de los avances recientes en el uso y aplicación de nanopartículas como biosensores tanto en óptica, electroquímica o magnéticos para la detección de bacterias patógenas (Sanvicens et al., 2009).

Tabla 6. Biosensores basados en nanopartículas para la detección de bacterias patógenas.

Transduction	Nanoparticle (NP)	NP function	Pathogen	LOD	Advantages
Optical	Au NPs	Signal amplification	<i>E. coli</i>	58.2 ± 1.37 pg/mL	LOD decreased 5500-fold compared to that without Au NP
	Au-Ag NPs	Biosensing system	<i>S. aureus</i>	7 × 10 ³ CFU/mL	–
	Au NPs	Biosensing system	<i>S. aureus</i> enterotoxin B	0.1 ng/mL	–
	Au NPs	Biosensing systems	<i>B. subtilis</i> genomic DNA	2.5 fM	–
	Magnetic NPs	Biosensing systems	<i>S. Enteritidis</i> insertion-element gene	1 ng/mL	–
	CdSe/ZnS core/shell dendron nanocrystals	Biosensing system	<i>E. coli</i> O157:H7	2.3 CFU/mL	More sensitive than similar published systems
	Dye-doped silica NPs	Biosensing system	<i>E. coli</i> O157:H7	1 CFU/mL	Assay time 30 min
	PAMAM-OH dendrimer	Signal amplification	<i>P. aeruginosa</i>	–	High sensitivity
	PAMAM-NH ₂ dendrimer	Signal amplification	<i>E. coli</i>	1 × 10 ⁴ CFU/mL	Assay time 20 min
	Liposome	Signal amplification	RNA sequences from <i>B. anthracis</i> , <i>C. parvum</i> , <i>E. coli</i>	10–1000 fmoL	350% sensitivity increase compared to that without PAMAM-OH
Magnetic	Superparamagnetic NPs	Biosensing system	<i>E. coli</i> nucleic acid, <i>Salmonella</i> antibiotic-resistant genes	4–250 pM	Assay time 3 min
	Superparamagnetic NPs	Biosensing system	<i>E. coli</i> O157:H7	1 × 10 ⁵ CFU/mL	Minimized noise and interferences
	Paramagnetic NPs	Biosensing system	<i>E. coli</i>	10 CFU/mL	Long-term stability
	Magnetic NPs	Signal amplification	<i>S. aureus</i>	1 × 10 ³ CFU/mL	More sensitive than biosensors based on the self-assembled multilayer system
Electrochemical	Au NP-modified screen-printed carbon electrodes	Signal amplification	<i>E. coli</i> O157:H7	6 CFU/strip	Measurements of turbid samples with no preparation steps
	Pt NP-coated gold nanoporous film	Signal amplification	<i>E. coli</i>	10 CFU/mL	Sample volumes (5–10 µL)
	Au NP-based graphite epoxy composite	Signal amplification	<i>Salmonella</i> sp. ssDNA	9 fmoL	Assay time 15 min
	Polyaniline-coated magnetic NPs	Biosensing system	<i>B. anthracis</i> endospores	4.2 × 10 ² CFU/mL	–
	Potassium ferrocyanide-encapsulated liposomes	Biosensing system	<i>Cholera</i> toxin	10 ⁻¹⁵ g/mL	Assay time 16 min
	Magnetic NP-coated carbon-nanotube nanocomposite	Biosensing system	<i>E. coli</i>	10 CFU/mL	–
	Nanogold/chitosan-multi-walled carbon nanotubes	Biosensing system	<i>S. aureus</i> enterotoxin B	0.5 ng/mL	–
	Single-walled carbon nanotubes	Biosensing system	<i>S. infantis</i>	100 CFU/mL	Assay time 1 h
	Single-walled carbon nanotubes	Biosensing system	<i>E. coli</i>	–	Label-free system

1.6 Nanotecnología.

Richard Feynman sugirió en 1959, que los dispositivos y los materiales se podrían fabricar algún día con especificaciones atómicas (Feynman R., 1959). La materialización de la visión de Feynman es el campo de la Nanotecnología, como se le conoce actualmente, una disciplina que abarca el trabajo en la escala del nanómetro (1nm = 10⁻⁹m), proporciona la posibilidad para controlar la estructura de la materia en el nivel molecular. Como tal, la nanotecnología, se ve como la frontera tecnológica más significativa que se explora actualmente.

La nanotecnología se define como la rama de la tecnología que se ocupa de la fabricación y el control de estructuras de tamaño minúsculo, a escala nanométrica. Las aplicaciones nanotecnológicas están adquiriendo cada vez más protagonismo en el sector de la alimentación ya que podría revolucionar el control y la seguridad de los productos de consumo.

1.6.1 Nanopartículas.

La utilización práctica de coloides metálicos tiene siglos de historia, lo cual se debe a sus fascinantes propiedades ópticas. Sin embargo, el primer estudio sistemático sobre la síntesis y el color del oro coloidal fue realizado por Michael Faraday en 1857. El estudio de nanopartículas (de oro y de muchos otros materiales) se ha reactivado enormemente desde hace un par de décadas, con el nacimiento de la llamada Nanotecnología.

Las nanopartículas son agrupaciones de átomos o moléculas en partículas que son medidas fácilmente en la escala nanométrica, son solubles en agua, muy estables y se pueden usar en experimentos “in vivo”.

Las partículas metálicas son un sistema particularmente interesante, en la nanoescala, debido a la facilidad con la cual pueden ser sintetizadas y ser modificadas químicamente (Feldheim D. et al, 2002). Además, ofrecen una ventaja sobre otros sistemas, debido a sus características ópticas ya que se diferencian de las del metal en bulto (Hainfield J. et al, 2002). Las primeras nanopartículas de metal bajo estudio, fueron las de plata (Ag), cobre (Cu) y oro (Au). Las nanopartículas del oro han sido extensamente investigadas debido a sus características físicas y químicas únicas, y a sus amplios usos potenciales como son: estabilidad a largo plazo, compatibilidad biológica Roldughin V., 2002). El uso de las nanopartículas metálicas como biosensores es relativamente nuevo en el área de la investigación, sin embargo la literatura ya muestra numerosos ejemplos de incorporación de las nanopartículas dentro de bio-dispositivos (Sadik et al, 2009).

1.6.1.1 Características generales de las nanopartículas de oro.

Las nanopartículas de metales nobles, especialmente las de oro, han despertado un gran interés debido a las interesantes propiedades estructurales, electrónicas, magnéticas, ópticas, y catalíticas de estos materiales. Estas propiedades dependen en gran medida de su tamaño y de su forma, los cuales vienen determinados por las condiciones experimentales empleadas en su obtención. Así, se producen cambios considerables en las propiedades ópticas del material al disminuir el tamaño de partícula a escala nanométrica. Por ejemplo, las disoluciones coloidales de nanopartículas de oro presentan un color rojo característico, color rubí, derivado de las dimensiones de las partículas del metal. Este efecto se debe a que las nanopartículas del metal exhiben una fuerte absorción en el rango UV-visible atribuida a la *Resonancia de Plasmón Superficial*, bandas en el espectro visible originadas por las oscilaciones electrónicas (Rasooly, 2001).

El efecto físico de la absorción de la luz por las nanopartículas metálicas en los líquidos es la oscilación coherente de los electrones de la banda de conducción en respuesta a la interacción con el campo electromagnético, como se muestra en la Figura 3 y es conocida como Resonancia de Plasmones de Superficie (RPS). Esta característica óptica, es de hecho un efecto de tamaño, porque está ausente tanto en los átomos individuales como en los materiales en bulto. La presencia de esta banda en la región visible del espectro es responsable de los atractivos colores de las soluciones coloidales de algunas partículas metálicas.

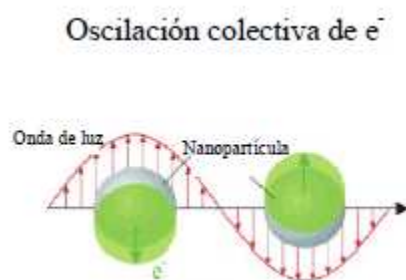


Figura 3. Ilustración esquemática de la Resonancia de Plasmones de Superficie.

A un nivel fundamental, los espectros de absorción óptica proporcionan información sobre la densidad electrónica, tamaño y estructura. Así, para estas nanopartículas metálicas, la espectroscopia UV-Vis es una herramienta indispensable para iniciar su caracterización. La forma de las nanopartículas, el ambiente dieléctrico, y la distancia entre partículas, son probablemente los parámetros más importantes que determinan la frecuencia del plasmón (o plasmón de superficie), puesto que las oscilaciones de los electrones libres son fuertemente dependientes del espacio disponible. Mientras que la forma de oscilar de las esferas metálicas tiene muy poca variabilidad, los electrones en nanotubos pueden oscilar de una manera transversal o longitudinal, la cual permite la formación de dos picos bien definidos debidos al plasmón de superficie.

El comportamiento plasmónico de las nanopartículas de oro viene también determinado por su funcionalización, pudiendo emplearse la medida de la absorbancia del plasmón para caracterizar las nanopartículas (Carralero Sanz, 2009).

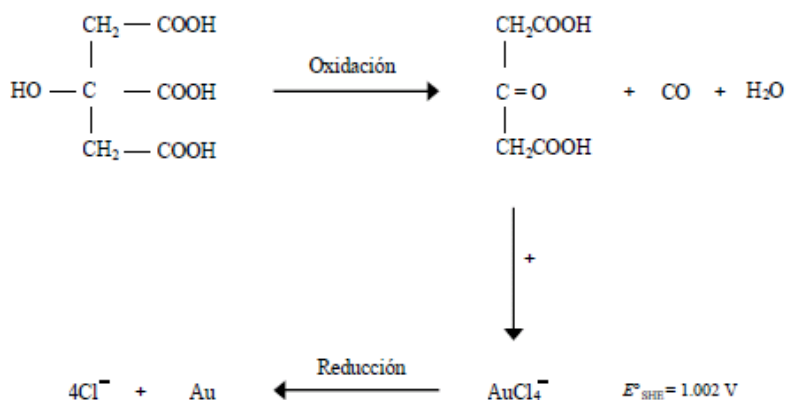
1.6.1.2 Síntesis de nanopartículas de oro.

En la literatura existen gran cantidad de métodos que permiten la síntesis de nanopartículas metálicas con diversas geometrías (esféricas, cilíndricas, prismáticas, poliédricas) y con tamaños controlados. Estos métodos pueden ser físicos, químicos y biológicos, presentan una serie de ventajas y desventajas respecto a los demás y son empleados dependiendo del material que se desea obtener, del medio en el cual se desea dispersar el material obtenido, de los recursos disponibles, etc.

En este trabajo se utilizó *el método de reducción química*, el cual es ampliamente utilizado en la síntesis de nanopartículas, ya que presenta algunas ventajas como son: sencillez, se puede trabajar a temperatura ambiente y presión atmosférica, no requiere de equipo costoso y proporciona buenos resultados. Se basa en el uso de citrato de sodio como reductor, además, es de gran importancia destacar que las partículas sintetizadas por reducción con citrato pueden considerarse esferas monodispersas, cuyo tamaño puede ser controlado fijando la concentración de citrato empleada (Figura 4). Antes de añadir el reductor, sólo hay iones oro en la disolución. Inmediatamente después de adicionar el reductor, se produce un crecimiento brusco en el número de átomos de oro en disolución, hasta alcanzar una situación de sobresaturación. Después de este proceso tiene lugar el crecimiento de las partículas formadas en el proceso de nucleación, dando lugar a la aparición de agregados. La cantidad de reductor adicionada determina el número y el tamaño de las partículas de oro obtenidas.

Las condiciones de preparación óptimas implican la formación rápida y simultánea de las partículas iniciales, de modo que su crecimiento es exactamente el mismo, obteniéndose así nanopartículas de oro del mismo tamaño (monodispersas).

La reducción de los iones de oro ocurre a través del siguiente mecanismo de reacción:



En esta aproximación, el ácido dicarboxílico acetona juega el papel de reductor. La primera etapa es la oxidación del citrato en ácido dicarboxílico acetona seguido por la reducción de los iones de oro en átomos con valencia cero. La molécula del ácido dicarboxílico acetona tiene dos grupos por unidad molecular, la cual puede presentar una gran afinidad para formar enlaces con los iones de oro. En efecto, la reducción del oro no es un proceso directo y un producto intermedio es formado antes de posteriores reducciones.

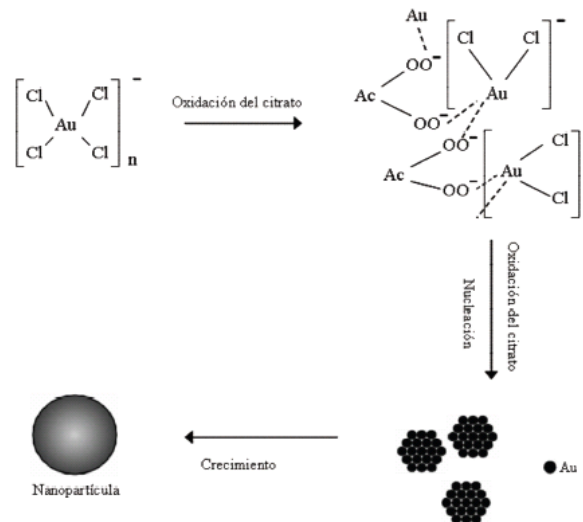


Figura 4. Mecanismo de la sucesiva reducción de los iones de oro y síntesis de nanopartículas.

Las propiedades de los coloides están estrechamente relacionadas con el método de preparación. El tamaño, la distribución de tamaño y la forma de las nanopartículas metálicas dependen de algunos parámetros importantes, tales como:

- Método de síntesis.
- Agente reductor
- Tiempo de reacción
- Temperatura de síntesis.
- Concentración del reductor
- pH

Se puede verificar la obtención de nanopartículas metálicas mediante su absorción UV-visible, como se muestra en la figura 5. A partir de este efecto es posible obtener información estructural. Como se puede observar, la longitud de onda de absorción dependerá del tamaño de esas estructuras, la homogeneidad de tamaño con el ancho del pico, la intensidad de absorción dependerá de la concentración del reductor utilizado, mientras que el número de picos está asociado a la forma de la nanopartícula. Por otra parte, la posición de la banda del plasmón varía con la funcionalización de las nanopartículas. Este fenómeno puede aprovecharse para la caracterización de las nanopartículas sintetizadas.

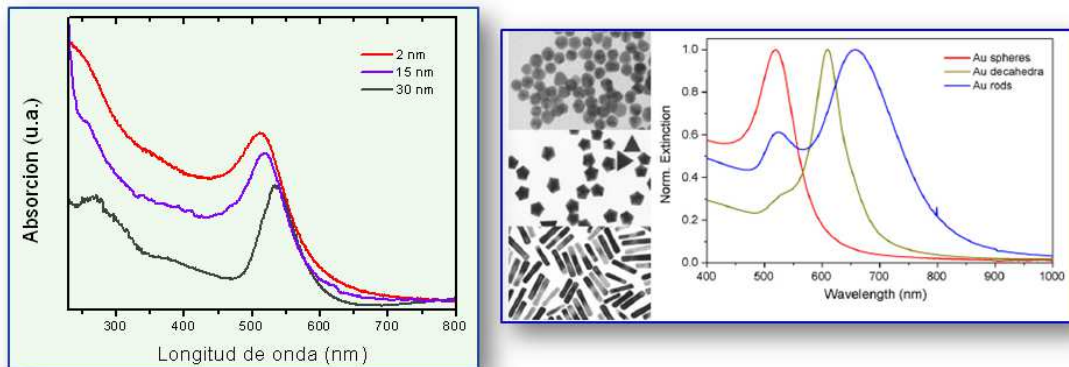


Figura 5. Espectro UV / VIS de nanopartículas de oro diferentes tamaños y formas.

1.6.1.3 Caracterización de las nanopartículas.

Entre las técnicas utilizadas para la caracterización de las nanopartículas de oro se encuentran la espectroscopia UV-Visible, espectroscopia FTIR, dispersión RAMAN y microscopia electrónica de transmisión (TEM), microscopia de fuerza atómica (AFM), a continuación se presenta un resumen de ellas, dando una perspectiva del uso de las diferentes técnicas para el estudio de las nanopartículas metálicas.

1.6.1.3.1 Espectrofotometría UV-Visible.

La absorción de radiación UV-Visible provoca una excitación de los electrones de orbitales de más baja energía a orbitales de más alta energía en una molécula. La máxima absorción UV-Visible ocurre en una longitud de onda característica de la estructura de la molécula y se puede determinar a partir de una gráfica de intensidad de absorción (absorbancia) contra longitud de onda de la radiación absorbida (Moore et al., 2000).

Es una técnica ampliamente utilizada en el área de los nano-materiales ya que permite saber si el proceso de síntesis ha concluido con la formación de las nanopartículas. Sirve para caracterizar nanopartículas metálicas, permite una medición in situ, brinda información sobre la concentración, tamaño y homogeneidad de tamaño de las nanopartículas. Las nanopartículas de oro presentan una banda de absorción en el rango de 500-540 nm y esta se relaciona generalmente con el tamaño de la nanopartícula, el pico de absorción tiende a ubicarse hacia longitudes de onda mayores a medida que el tamaño de la nanopartícula aumenta, mientras que la homogeneidad de tamaño se asocia con el ancho del pico. La agregación de las

nanopartículas provoca una disminución en la intensidad del pico y la aparición de hombros en longitudes de onda mayores, el número de picos de resonancia disminuye con el incremento de la simetría de la nanopartículas. De acuerdo con la teoría de Mie, solo una banda simple de resonancia de plasmón superficial se presenta en espectros de absorción de nanopartículas esféricas, mientras que en partículas anisotrópicas se pueden presentar dos o más bandas, dependiendo de la forma de las partículas (Pal et al., 2007).

1.6.1.3.2 Microscopia electrónica de transmisión (TEM).

La microscopia electrónica es la herramienta preferida para la visualización directa de las partículas nanométricas (Boutonnet et al., 1986). Es la técnica más importante para caracterizar nanopartículas metálicas ya que permite determinar el tamaño (distribución de tamaño), forma, estructura interna a través de difracción de electrones. En un (TEM) un haz de electrones es dirigido hacia la superficie de una muestra, los electrones penetran la muestra son dispersados a medida que la atraviesan son enfocados por la lente objetivo y son amplificados por la lente magnificadora y finalmente la imagen deseada es producida (Poole y Owens, 2003). Dos tipos de imagen pueden ser obtenidas campo oscuro y campo claro. Las imágenes en campo claro son producidas por los electrones que se propagan a través de la muestra. En campo oscuro la imagen es producto de los electrones difractados (Baker et al., 2004).

En equipos de alta resolución se pueden obtener resoluciones de 0.1nm o menos. La imagen es formada de los electrones que se transmiten a través del material analizado. Los patrones de difracción de electrones permiten determinar las constantes de redes de las partículas lo que ayuda a la identificación de la especie. La preparación de la muestra para su observación en TEM consiste en realizar una dispersión de nanopartículas en un solvente y dejarlas secar sobre una rejilla de cobre con recubrimiento de carbono. Una ventaja de este método se debe a la observación relativamente directa de la forma morfológica real y capacidad de análisis detallado de fotografías digitalizadas utilizando un software de análisis de la imagen. Una desventaja es que no es útil in situ.

1.6.1.3.3 Microscopia de fuerza atómica (AFM).

El microscopio de fuerzas atómicas (AFM), *Atomic Force Microscope*, pertenece a la familia de los microscopios de escaneo con punta, en inglés *Scanning Probe Microscopes* (SPMs), se basa en la interacción entre una punta muy fina y la superficie de la muestra que superan la resolución de los microscopios ópticos y evitan los efectos destructivos de otros métodos de alta resolución basados en haces de

electrones. En los SPMs la muestra es escaneada por un sensor con la ayuda de piezoeléctricos. Son una familia de instrumentos utilizados para estudiar propiedades de las superficies de los materiales desde el nivel atómico hasta las micras.

1.6.1.3.4 Espectroscopia infrarroja (FTIR).

La región del espectro infrarrojo abarca la radiación con números de onda comprendidos entre 12800 y 10 cm^{-1} , que corresponden a longitudes de onda de 0.78 a 1000 μm . Tanto desde el punto de vista de las aplicaciones como de la instrumentación, es conveniente dividir el espectro infrarrojo en tres regiones denominadas infrarrojo cercano, medio y lejano (Skoog y Leary, 1994). La Tabla 7 muestra los límites aproximados de cada una de ellas.

Tabla 7. Regiones en las que se divide el espectro infrarrojo.

Región	Intervalo de longitud de onda (μm)	Intervalo de número de onda (cm^{-1})
Cercano	0.78 a 2.5	12800 a 4000
Medio	2.5 a 50	4000 a 200
Lejano	50 a 1000	200 a 10
La más utilizada	2.5 a 15	4000 a 670

La espectroscopia FTIR utiliza la interacción de la radiación infrarroja con la materia para obtener información sobre la estructura molecular. Tanto la espectroscopia de infrarrojo como espectroscopia raman están basadas en las transiciones vibracionales discretas que tienen lugar en el estado electrónico de las moléculas. Las posiciones relativas de los átomos en una molécula no son exactamente fijas, sino que fluctúan continuamente como consecuencia de una multitud de tipos de vibraciones y rotaciones diferentes alrededor de los enlaces en la molécula. Pueden distinguirse dos categorías básicas de vibraciones: de tensión (Figura 6) y de flexión (Figura 7).

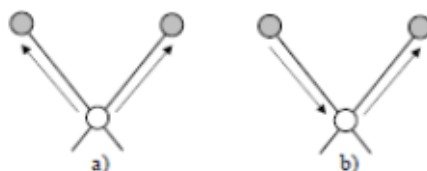


Figura 6. Vibraciones de tensión: a) simétrica y b) asimétrica

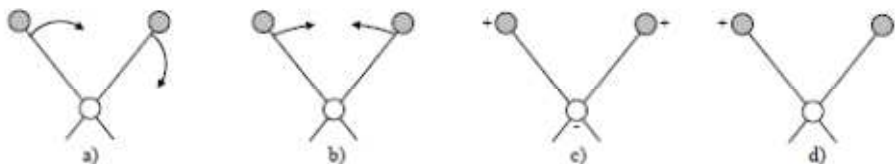


Figura 7. Vibraciones de flexión: a) balanceo en el plano, b) tijereteo en el plano, c) aleteo fuera del plano y d) torsión fuera del plano

Utiliza la interacción de la radiación infrarroja con la materia para obtener información sobre la estructura de la molécula vía vibraciones moleculares. El principal uso de FTIR en la caracterización de nanopartículas metálicas es para detectar especies químicas unidas a la superficie y para monitorear reacciones también en la superficie. Esta técnica es sensible a grupos funcionales tales como: O-H, C-O, N-H y C=O.

1.6.1.3.5 Espectroscopia Raman.

La dispersión Raman involucra la excitación de una molécula con un fotón de luz el cual es posteriormente dispersado con un cambio en su energía, el cual se debe a que la longitud de onda de una pequeña fracción de la radiación dispersada por ciertas moléculas, difiere de la del haz incidente y además, que los desplazamientos de longitud de onda dependen de la estructura química de las moléculas responsables de la dispersión. Este fenómeno está relacionado con el mismo tipo de cambios vibracionales cuánticos que se producen en la absorción infrarroja (Skoog y Leary, 1994).

Aunque los mecanismos básicos dependen de los mismos modos vibracionales, corresponden a procesos muy diferentes. La absorción infrarroja requiere que un modo de vibración de la molécula experimente un cambio en el dipolo o la distribución de carga asociados y, solamente entonces, la radiación de la misma frecuencia puede interactuar con la molécula y promoverla a un estado vibracional excitado. Por lo contrario la dispersión implica una distorsión momentánea de los electrones distribuidos alrededor de un enlace de la molécula, seguida por la reemisión de la radiación cuando el enlace vuelve a su estado electrónico fundamental.

La intensidad de un pico Raman depende de la polarizabilidad de la molécula, de la intensidad de la fuente y de la concentración de grupos activos. Los grupos no polares como C=C, C-C y S-S aparecen con mayor intensidad en los espectros Raman (Ma y Phillips, 2002).

Una de las mayores limitaciones de la espectroscopia Raman convencional es la señal de fondo que proviene de la fluorescencia de la muestra o de las impurezas que contiene. La espectroscopia Raman de transformada de Fourier elimina la

fluorescencia de fondo y hace posible el uso de la fuente láser de Nd:YAG que emite radiación sólo en el infrarrojo cercano a 1064 nm. Esta radiación no es suficientemente energética como para producir la excitación electrónica de las moléculas y de este modo se impide la fluorescencia.

Una ventaja importante de la espectroscopia Raman, con respecto a la de infrarrojo, es el hecho de que el agua no interfiere y por lo tanto es posible obtener espectros Raman de disoluciones acuosas (Skoog y Leary, 1994). Otro punto importante es que las muestras no necesitan ser ópticamente claras, y por lo tanto es posible obtener espectros raman de muestras opacas (Ma y Phillips, 2002).

La dispersión Raman es una técnica espectroscópica usada en química y física altamente específica y permite el análisis de muestras integradas por varios componentes. Presenta la ventaja de un análisis de manera directa y un requerimiento mínimo de la muestra, pero presenta la desventaja de una baja intensidad de la señal aun siendo usada con laceres potentes. En presencia de las nanopartículas de oro la señal raman se intensifica hasta niveles suficientes como para detectar una molécula individual. La excitación resonante de los plasmones producen una enorme intensificación del campo electromagnético en la proximidad de la superficie de la nanopartícula, Las intensidades Raman son proporcionales a la intensidad del campo electromagnético por esta razón la espectroscopia SERS está actualmente reconocida como una técnica de detección extremadamente sensible con altos niveles de especificidad molecular.

1.6.1.4 Estabilidad de las nanopartículas.

Las partículas de tamaño nanométrico tienen una fuerte tendencia a la aglomeración, debido a las interacciones de Van der Waals y a la ausencia de fuerzas electrostáticas repulsivas entre partículas. Es por lo tanto importante desarrollar modos sintéticos por los cuales las partículas puedan ser estabilizadas, esto es, donde las fuerzas repulsivas puedan proporcionar un equilibrio de atracción entre las partículas.

La preparación de nanopartículas de oro generalmente implica la reducción química de una sal de oro en medio acuoso u orgánico, en presencia de un agente estabilizante o protector adecuado, el cual se une a la superficie de las nanopartículas aumentando su estabilidad y neutralizando las fuerzas electrostáticas. Las dispersiones de las nanopartículas preparadas en presencia de un estabilizador son estables a temperatura ambiente durante largo tiempo, no observándose precipitación del coloide al cabo de varios meses (Carralero Sanz, 2009). Para la estabilidad de la nanopartículas diferentes agentes protectores son utilizados un ejemplo de ellos son los polielectrolitos estos compuestos son moléculas que presentan varias cargas eléctricas descompensadas es decir presentan simultáneamente ambos signos de carga: positiva y negativa estas cargas se encuentran fijas en distintas posiciones

moleculares por lo que no pueden anularse mutuamente. Normalmente se trata de grandes moléculas orgánicas de tipo polimérico como las proteínas. Entre otras sustancias utilizadas para pasivar la superficie de las nanopartículas se encuentran la polivinilpirrolidona PVP, el quitosano, almidón, celulosa y gelatina.

En este trabajo se utilizara la proteína A, la cual presenta características importantes para llevar a cabo “el recubrimiento” de la superficie de la nanopartícula de oro, todo esto con el objetivo de garantizar la estabilidad de las nanopartículas además de obtener una superficie compatible al elemento de reconocimiento (anticuerpo) que se utilizara para la bioconjugación.

1.7 Conjugación de las nanopartículas de oro con diferentes clases de Biomoléculas.

La utilización de nanopartículas metálicas como marcadores biológicos viene determinada por la posibilidad de conjugación con diferentes clases de biomoléculas.

Una gran variedad de moléculas biológicas pueden ser conjugadas a la superficie de las nanopartículas de oro por ejemplo: anticuerpos, enzimas, lecitinas, lipoproteínas, glicoproteínas, polímeros, hormonas, carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos etc.

El desarrollo de inmunosensores se basa en la inmovilización de biomateriales (p.e. anticuerpos) sobre una superficie transductora, para su posterior interacción con el analito de interés (p.e. antígenos). La inmovilización de las biomoléculas, implica unión covalente, adsorción o atrapamiento del biomaterial en la matriz.

Se ha llegado a pensar que cuando las biomoléculas se adsorben en la superficie de las nanopartículas de oro se genera su desnaturalización o pérdida de su bioactividad. Sin embargo, se ha demostrado que macromoléculas, tales como anticuerpos, antígenos y enzimas, retienen su actividad cuando son inmovilizadas sobre superficies modificadas con nanopartículas, ya que éstas proporcionan un ambiente similar a su entorno natural. Además las partículas metálicas actúan como medio de conducción electrónico, facilitando la transferencia electrónica, permitiendo alcanzar elevados niveles de estabilidad y sensibilidad (Luo, 2004^a).

Las nanopartículas de oro presentan una elevada área superficial, por lo que pueden ser fácilmente conjugadas y bioconjugadas, modificando sus propiedades superficiales por todo ello, las nanopartículas metálicas despiertan un gran interés en el campo de la biotecnología (Figura 8).

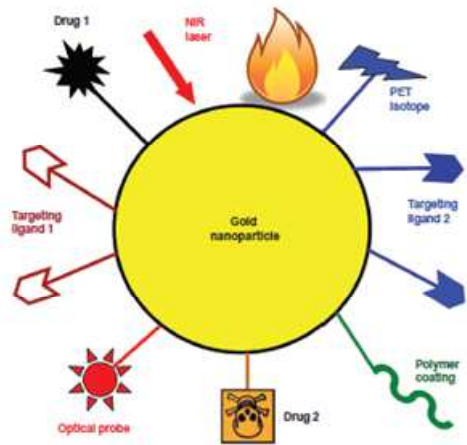


Figura 8. Nanopartícula de oro la cual se encuentra unida a su superficie diferentes elementos de reconocimiento.

1.7.1 Funcionalización de Proteína A sobre la superficie de las nanopartículas de oro.

Incorporar proteínas con nano-materiales es un camino efectivo para mejorar la estabilidad y función de la proteína, las nanopartículas de oro son biocompatibles, estables y no tóxicas.

Muchos ligandos en moléculas de proteínas como aminas, tioles, carboxilatos y disulfuros son capaces de interactuar con las nanopartículas de oro y formar enlaces químicos con similar fuerza a los enlaces covalentes (Astruc, 2004), además la resonancia del plasmon superficial de las nanopartículas hace que ellas muestren un fuerte y estable color rojo después de la unión con proteína. Proteínas son usualmente incorporadas con nanomateriales a través de múltiples interacciones, especialmente fuerzas electrostáticas y mediante uniones de enlace de hidrógeno.

Interacciones electrostáticas son las más comunes interacciones entre nanopartículas y proteínas (I. Lynch, et al., 2008), Algunas proteínas son moléculas anfipáticas, mientras que las superficies de las nanopartículas pueden ser modificadas con grupos funcionales cargados positivamente o negativamente. Al ajustar el valor del pH del medio ambiente, las proteínas y los nano-materiales podrían ser cargados opuestamente. La fuerza de la electricidad estática resultante hace que las proteínas se unan estables y fuertemente a los nano-materiales. **El enlace de hidrógeno** es una atractiva interacción electromagnética de un átomo de hidrógeno y un átomo electronegativo, tal como el nitrógeno o el oxígeno que proviene de otro grupo químico. Los puentes de hidrógeno proporcionan la mayor parte de las interacciones de dirección en que se basa el plegamiento de proteínas, la estructura de proteínas y el reconocimiento molecular (Hubbard & Kamran, 2010). En contacto con

los nanomateriales ricos en grupos funcionales, las proteínas podrían ser fácilmente incorporadas en los nano-materiales a través de enlace de hidrógeno.

Por todo lo anterior se decidió trabajar con la proteína A esta es altamente estable con un peso molecular de 42 KDa y una estructura altamente asimétrica. Es una proteína de superficie que se encuentra en la pared celular de *Staphylococcus aureus* y es capaz de reconocer moléculas de la matriz extracelular. Precipita inmunoglobulinas de varias especies, vía interacción directa con sitios en la región Fc. Presenta propiedades hidrodinámicas. La conformación de la proteína es muy estable sobre un largo intervalo de pH. Altas concentraciones de iones hidrogenos (pH 0.99) o iones hidroxilo (pH 11.8) no afectan la cadena polipeptídica. Proteína A contiene 50% α -helice estructura y 10-20 % β estructura (Figura 9). Es ampliamente usada en bioquímica por su capacidad de reconocimiento de anticuerpos, es capaz de interactuar con la cadena pesada y unirse a la porción Fc de inmunoglobulinas, especialmente IgGs, de un gran número de especies (M. Graille, et al, 2000).

La estructura de la proteína A contiene 509 aminoácidos se compone de cinco dominios homologos de unión IgG. Cuenta con un punto isoeléctrico de 5.1. Proteína A contiene 9 cadenas laterales de tirosilo, 14 residuos de fenilalanina y no contiene residuos de triptófano ni cisteína (Ingvar ,1975). (Tabla 8).

Tabla 8.Contenido de aminoácidos de la proteína A (Uhlen et al., 1984).

Amino acido	Proteína A
Lisina	69
Histidina	7
Arginina	6
Acido Aspartico	105
Treonina	10
Serina	25
Acido Glutamico	78
Prolina	31
Glicina	33
Alanina	42
Valina	15
Metionina	6
Isoleucina	18

Leucina	41
Tirosina	9
Fenilalanina	14
Total	509

El análisis de secuencia de aminoácidos revela dos regiones funcionalmente distintas en la molécula ambas regiones cuentan con remarcables estructuras repetitivas. La parte NH₂-terminal contiene cinco homólogas regiones de unión a IgG unidades compuestas de aproximadamente 58 aminoácidos cada una. La parte COOH-terminal que se cree que se une a la pared celular de *Staphylococcus aureus* se compone de varias repeticiones de un octapéptido (Glu-Asp-Gly-Asn-Lys-Pro-Gly- Lys) que se repite 12 veces (Lindmark et al., 1977).

La proteína A actúa como absorbedor de afinidad para evitar la conexión directa de los anticuerpos a la superficie de las nanopartículas de oro además proporciona una conjugación orientada del anticuerpo para así garantizar la actividad completa del anticuerpo hacia el antígeno de interés.

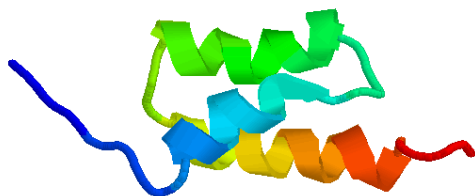


Figura 9. Estructura tridimensional de la proteína A.

La adsorción de las proteínas en la superficie de las nanopartículas es un proceso no covalente basado en tres separados pero dependientes fenómenos (Figura 10): a) interacción iónica entre la carga negativa de la superficie de la nanopartícula y la carga positiva en los sitios de la proteína, b) atracción hidrofóbica entre la proteína y la superficie del metal; c) unión dativa entre el metal y los electrones de conducción de los átomos de nitrógeno y azufre de la proteína (Thobhani et al., 2010).

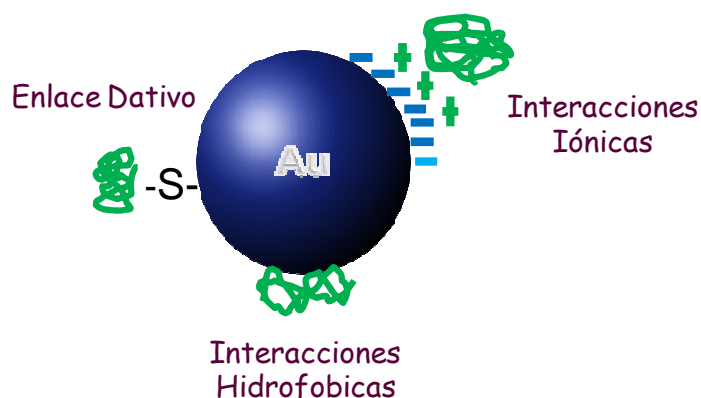


Figura 10. Unión de la proteína a la superficie de la nanopartícula puede ocurrir a través de varios tipos de interacciones.

La actuación de las nanopartículas en inmunoensayos depende de las propiedades químicas de las nanopartículas de oro así como de la bioactividad de la proteína. Algunas proteínas pueden adsorberse fuertemente en la superficie de las nanopartículas para formar conjugados estables reteniendo sus propiedades biológicas.

1.7.2 Conjugación de las nanopartículas con anticuerpos.

Los anticuerpos (también conocidos como inmunoglobulinas, abreviado Ig) son glicoproteínas del tipo gamma globulina. Pueden encontrarse de forma soluble en la sangre u otros fluidos corporales de los vertebrados, disponiendo de una forma idéntica que actúa como receptor de los linfocitos B y son empleados por el sistema inmunitario para identificar y neutralizar elementos extraños tales como bacterias, virus o parásitos, constituyen uno de los más importantes mecanismos específicos de defensa. Todos ellos tienen una estructura similar en forma de Y (Figura 11), tienen dos dominios idénticos de reconocimiento para el antígeno (Fab fragmento), y dos dominios idénticos con funciones efectoras (Fc fragmento). La región de unión al antígeno es altamente específica y varía entre los anticuerpos. Miles de millones de diferentes anticuerpos pueden ser generados cada uno con distinta especificidad.

Los anticuerpos tienen dos cadenas ligeras idénticas de 24-25 kD y dos cadenas pesadas también idénticas de 55-70 kD unidas por puentes disulfuro (Lesk and Chothia, 1982). El tipo de inmunoglobulina generada depende del tipo de cadena pesada y, por lo tanto, en animales vertebrados cinco clases o isotipos de inmunoglobulinas (IgG, IgE, IgD, IgA y IgM) se pueden distinguir, cada uno con una distinta funcionalidad. Además de los puentes disulfuro entre las cadenas, hay puentes disulfuro intracatenarios que proporcionan estabilidad a la molécula (Burton

et al., 1986). La cadena ligera (L) está formada por dos dominios de alrededor de 100 residuos, conocidos como el dominio variable (VL), en su extremo amino terminal, y el dominio constante (CL). La cadena pesada (H) contiene un dominio variable (VH) y tres o cuatro dominios constantes (CH1, CH2, CH3, CH4), dependiendo del isotipo (Alberts et al., 1989). Las regiones variables son las zonas de la molécula implicadas en la unión al antígeno.

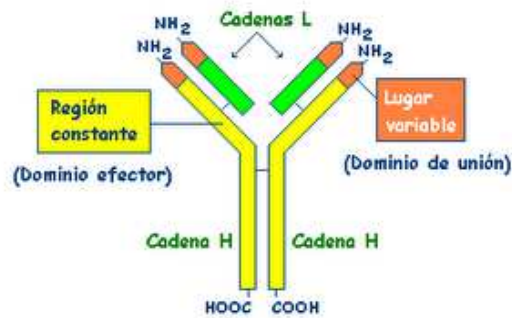


Figura 11. Estructura general de un anticuerpo

Como ya se ha mencionado las nanopartículas de oro presentan una elevada área superficial, por lo que pueden ser fácilmente conjugadas, modificando sus propiedades superficiales. La conjugación de los anticuerpos a la superficie de las nanopartículas de oro puede generar un producto que combina las propiedades de ambos, por ejemplo se puede combinar el pequeño tamaño de las nanopartículas y las capacidades de los anticuerpos tales como el reconocimiento específico y selectivo. El producto híbrido mostrara versatilidad y especificidad (Figura 12).

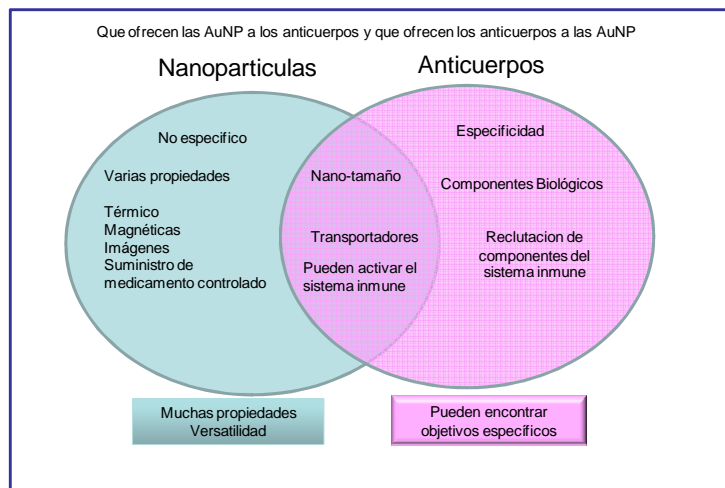


Figura 12. Ventajas de la conjugación de los anticuerpos a la superficie de las nanopartículas.

Una vez que se lleva a cabo la síntesis, estabilización y caracterización de las nanopartículas de oro con y sin proteína, el siguiente paso es unir a la superficie de la nanopartícula al elemento de reconocimiento biológico, a esta unión se le conoce como conjugación. En este trabajo de tesis los elementos de reconocimiento serán anticuerpos, para este análisis se utilizarán anticuerpos policlonales, la utilización de la proteína A tiene como objetivo evitar la conexión directa de los anticuerpos a la superficie de las nanopartículas.

Para la conjugación de anticuerpos a la superficie de las nanopartículas ambas técnicas de inmovilización de manera covalente y no covalente pueden llevarse a cabo. La primera técnica que se usa es una adsorción espontánea del anticuerpo sobre la superficie de la nanopartícula en este proceso pueden existir tres tipos de interacción que pueden tomar lugar: interacciones hidrofóbicas, interacciones iónicas y uniones dativas. Las interacciones hidrofóbicas son debidas a la atracción entre las partes hidrofóbicas del anticuerpo y la superficie del metal, resultando en la formación de un enlace no covalente. Grupos cargados positivamente son abundantes en anticuerpos por ejemplo aminoácidos cargados positivamente y el N-terminal. Interacciones iónicas son formadas entre estos grupos y la carga negativa de la superficie de las nanopartículas. Unión dativa es la formación de un enlace covalente entre la nanopartícula de oro y los grupos sulfidrilo libres del anticuerpo. Estos tres tipos de interacciones potenciales son ilustrados en la Figura 13.

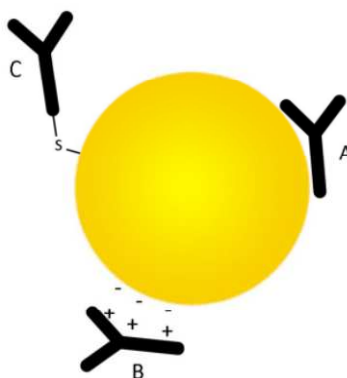


Figura 13. Tres tipos de interacción potenciales nanopartícula-anticuerpo. A) Partes Hidrofóbicas del anticuerpo interaccionan con la superficie del metal. B) Grupos cargados positivamente del anticuerpo son atraídos por la carga negativa de la superficie. C) Una unión covalente es formada debida a la unión dativa (Hermanson, 2008).

1.7.3 Bioconjugacion de las nanopartículas conjugadas con el analito.

Una siguiente etapa después del proceso de conjugación es la interacción de la nanopartícula conjugada con el analito esto se conoce como bioconjugación. Como se muestra en la figura 14. Se presenta un ejemplo de aplicación de una nanopartícula la cual se encuentra unida a su superficie la proteína A esta a su vez se encuentra unida al anticuerpo para así poder detectar antígenos en células o secciones de tejido a través del uso de una proteína que recubre la nanopartícula de oro.

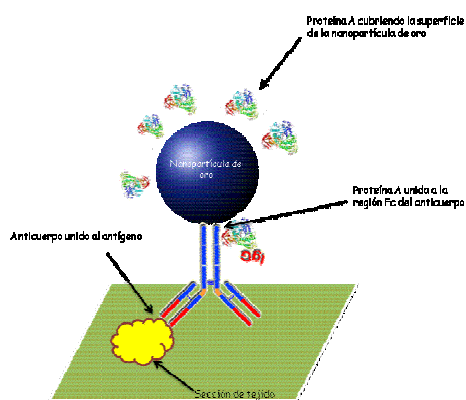


Figura 14. Proteína A unida a la superficie de la nanopartícula de oro para la detección de antígenos en células o secciones de tejido.

1.8 Detección del analito (Efecto SERS Surface-Enhanced Raman Scattering).

Cualquier superficie metálica (plana, esférica, cilíndrica o de cualquier otra forma) genera plasmones superficiales cuando esta es excitada con luz en el rango UV-visible. En partículas metálicas, la longitud de onda a la que existen estos plasmones localizados depende del tipo de metal, del tamaño de la partícula y de la forma de ésta. Para esas longitudes de onda, el campo electromagnético se localiza alrededor de la superficie del metal. Cuando luz con longitud de onda igual a la de los plasmones localizados incide sobre la partícula metálica, se produce un efecto resonante, que lleva asociado un aumento enorme de la intensidad del campo electromagnético en las proximidades de la partícula (por comparación con la intensidad de la luz incidente). Mediante estas resonancias plasmónicas es como se pretende detectar moléculas individualmente. Para ello se recurre a la espectroscopia Raman, así llamada en honor del científico indú que en 1928 descubrió el fenómeno físico en que se basa. Cuando un haz de luz incide sobre una molécula, parte de esa luz se dispersa, y parte es remitida por la molécula. El espectro de emisión de la molécula (es decir, cómo depende la intensidad de la luz emitida con la longitud de onda) difiere de una molécula a otra; podemos, pues, identificarlas.

La espectroscopia Raman es ampliamente empleada para el análisis de los materiales, ya que la información vibracional es muy específica de los enlaces químicos que caracterizan las moléculas, proporcionando verdaderas “huellas dactilares” que permiten la identificación de la especie analizada y de cómo el entorno afecta a su estructura. Además, al contrario que la espectroscopia IR, la señal Raman emitida por el agua es débil, lo que facilita el estudio de disoluciones acuosas. Puesto que hablamos de un tamaño muy pequeño, la señal Raman de una molécula es poco detectable, aun cuando se excite con láseres muy potentes. En condiciones normales, para detectar un tipo de molécula mediante un espectro Raman se requiere la presencia de más de un trillón de moléculas. *Sin embargo hace alrededor de 30 años se descubrió que, cuando las moléculas están adsorbidas sobre la superficie de partículas nanométricas metálicas (por lo general de oro o plata), la señal Raman aumentaba en un factor que a veces llegaba a ser de entre 10 y 15 órdenes de magnitud.* La razón de tal aumento se encuentra en la excitación por parte de la luz incidente de los plasmones superficiales. Dicha excitación provoca que el campo eléctrico que siente la molécula sea mucho mayor que el asociado a la luz incidente. Este aumento extraordinario de la señal ha permitido abordar el estudio del espectro Raman de una molécula adsorbida sobre un conjunto de nanopartículas metálicas (Pendry et al., 2004).

Por esta razón, la espectroscopia Raman amplificada por la superficie (SERS) está actualmente reconocida como una técnica de detección extremadamente sensible con altos niveles de especificidad molecular (Moskovits. M., 2005).

En la Figura 15. Se muestra la estrategia de detección de un microorganismo patógeno de interés mediante el uso de espectroscopia SERS con nanopartículas de oro.

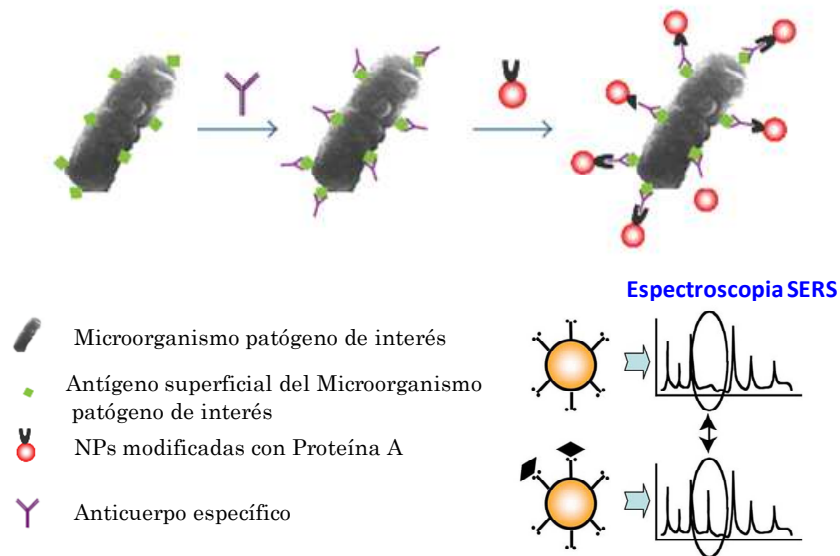


Figura 15. Estrategia de detección de un Microorganismo patógeno de interés mediante espectroscopia SERS y nanopartículas de oro.

1.8.1 Detección del analito mediante Espectroscopia de Fluorescencia.

La fluorescencia es la propiedad de algunas especies químicas de emitir luz al recibir una radiación. Se trata de utilizar un haz de luz, por lo general luz ultravioleta, aunque en algún caso puede ser de rayos X o rayos catódicos, que excita a los electrones de ciertas moléculas y provoca que emitan luz de una menor energía o mayor longitud de onda, generalmente luz visible (aunque no necesariamente).

Ya que las moléculas poseen diferentes estados llamados niveles de energía, en la espectroscopia de fluorescencia se excita la muestra desde su estado electrónico basal (estado electrónico de baja energía), a uno de los diferentes estados vibracionales del estado electrónico excitado mediante la absorción de un fotón de luz. Debido a procesos de desactivación, la molécula excitada pierde energía vibracional y pasa a un estado vibracional más bajo del estado electrónico excitado.

La molécula desciende luego a uno de sus niveles de vibración del estado electrónico basal, emitiendo un fotón en el proceso. Como las moléculas pueden caer a cualquiera de sus niveles de vibración en el estado basal, los fotones emitidos tienen diferentes energías y por tanto diferentes frecuencias.

En la Figura 16 se muestra el Diagrama de Jablonski simplificado en el que se ilustra lo explicado anteriormente.

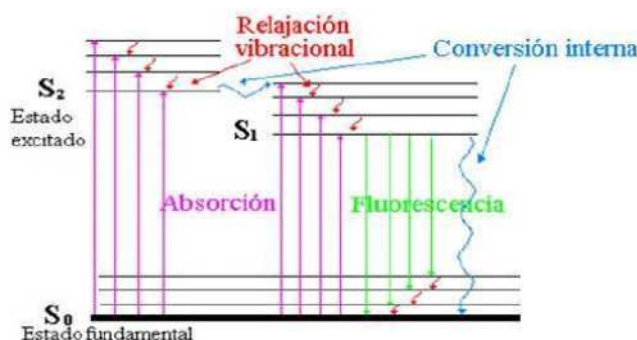


Figura 16. Diagrama de Jablonski simplificado

1.8.1.1 Fluoróforos.

Para poder llevar a cabo esta técnica es fundamental la presencia de algún fluoróforo, que es un componente o grupo de átomos de una especie química que hace que esta sea fluorescente. Absorberá energía de una longitud de onda específica y la volverá a emitir a otra longitud de onda mayor (con menor energía). Los marcadores fluorescentes se han convertido en herramientas fundamentales en el diseño, desarrollo y fabricación de biosensores, especialmente en aquellos que utilizan transducción óptica. En la actualidad existen numerosos marcadores, cuya elección dependerá fundamentalmente de las características de la molécula que requiere ser marcada y especialmente de los grupos funcionales que ésta posea (Figura 17).

Marcadores fluorescente

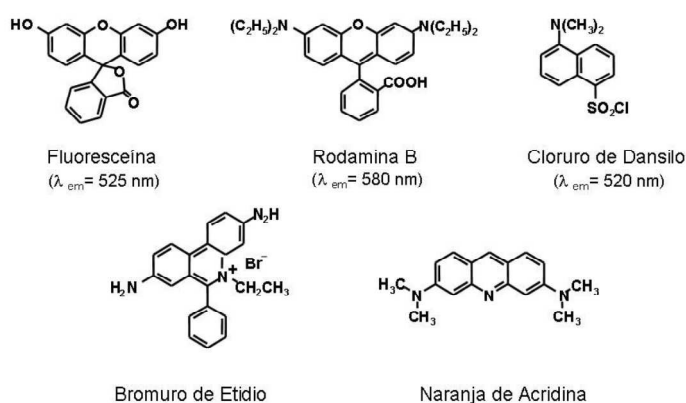


Figura 17. Marcadores fluorescentes convencionales

Existen dos tipos de fluoróforos, los intrínsecos, que pertenecen al sistema objeto de estudio, y los extrínsecos, que son especies que se añaden a un sistema con el fin de facilitar la detección mediante el análisis de su respuesta fluorescente.

Los fluoro-inmunoensayos se llevan a cabo marcando el anticuerpo con un fluorocromo detectándose la formación del complejo Ag-Ac por la fluorescencia emitida.

1.9 Nanopartículas funcionalizadas con moléculas fluorescentes.

En particular las nanopartículas de oro poseen propiedades químicas y físicas únicas que permiten una fácil conjugación con moléculas biológicas, lo cual les da actividad terapéutica, de vector y marcador fluorescente.

Otro método de detección del analito es la utilización de nanopartículas funcionalizadas con moléculas fluorescentes (Figura 18) una de las ventajas es que estas nanopartículas fluorescentes son biocompatibles y fácilmente funcionalizables con moléculas y biomoléculas de interés, utilizables por tanto en ensayos de detección mediante técnicas de fluorescencia. Asimismo destacan por poseer propiedades características de las nanopartículas metálicas (Intenso plasmon de superficie en el visible, capacidad de ser detectadas mediante espectroscopias amplificadas en superficie) como las de los puntos cuánticos o Quantum Dots (Intensa fluorescencia) superando las limitaciones de las actuales técnicas de detección mediante fluorescencia como son una baja relación señal/ruido, la baja fotoestabilidad de los fluoróforos y su elevado photoblinking (aniquilación de la fluorescencia por una luz de alta intensidad). Además el fluoróforo no se desactiva por la proximidad del metal, como ocurre con los fluoróforos orgánicos tradicionales.



Figura 18. Esquema de un inmunoensayo usando nanopartículas funcionalizadas con moléculas fluorescentes.

La detección del analito se realizara de manera similar como se observan los puntos brillantes en los billetes cuando se les ilumina con UV, la detección de patógenos presentes en un producto alimenticio se podría observar a simple vista como “puntos brillantes” cuando se depositan nanopartículas de oro conjugadas sobre el producto alimenticio sin ninguna preparación previa y haciéndole incidir una lámpara UV. De esta manera se realizaría la detección cualitativa. Para la detección cuantitativa se

realizara por Microscopia de fluorescencia (Figura 19), se pone al microscopio de fluorescencia la muestra (con nanopartículas de oro bioconjugadas) y se cuantifica el número de puntos brillantes (sumando el área iluminada) comparada con el área total observada en el microscopio, para determinar la concentración.

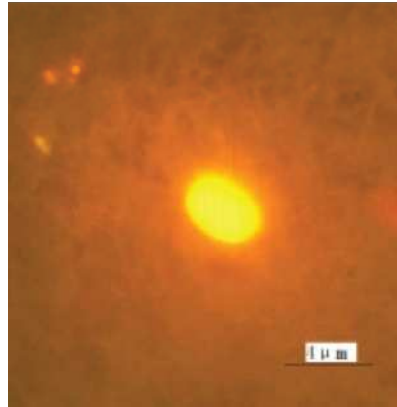


Figura 19. Imagen de fluorescencia de E. coli O157:H7 incubada con nanopartículas conjugadas con anticuerpo. La intensidad de la fluorescencia es fuerte, lo que permite que una sola célula bacteriana pueda ser identificada en solución acuosa.

HIPOTESIS

La sensibilidad a la detección de microorganismos patógenos de un sistema sensor que combina nanopartículas de oro y moléculas biológicas (proteínas y anticuerpos) aumenta con respecto a la que se obtiene sin usar nanopartículas debido a la transferencia de carga eléctrica proveniente de la superficie metálica hacia las moléculas biológicas y el analito (antígeno), el cual está presente en la superficie de la pared celular, cuando el sistema bioconjugado al microorganismo es iluminado con luz laser haciendo posible el aumento de la dispersión Raman (efecto SERS), absorción infrarroja (efecto SEIRA) e intensidad de la emisión fluorescente.

JUSTIFICACIÓN

Los tiempos modernos y la tecnología actual han llevado al ser humano a depender fuertemente de las condiciones de su entorno medioambiental cuya influencia directa en las características de los productos y alimentos de consumo se hace cada vez más presente. Es por lo que la seguridad y la calidad de los alimentos son dos aspectos fundamentales que preocupan y amenazan a la salud humana. Para esto, las tecnologías de los biosensores, las cuales han experimentado un notable avance en los últimos años ofrecen una alternativa a estas problemáticas actuales. Estas tecnologías que inicialmente se originaron para resolver problemas de la salud han ido transfiriéndose de forma horizontal a otros sectores como el medioambiental, y de forma más directa al agroalimentario. En la actualidad los biosensores representan potentes herramientas de análisis, que son necesarias para resolver numerosas problemáticas en la industria agroalimentaria, apoyándose en la biotecnología. En el caso de los biosensores plasmónicos, los cuales están basados en el uso de nanopartículas metálicas, estos ofrecen alternativas interesantes debido a su alta sensibilidad y especificidad, con tiempos de detección cortos y que van ligados a un bajo costo de fabricación. Bajo condiciones no adecuadas de producción o almacenamiento, el sector de los alimentos se podría ver afectado por la presencia de microorganismos patógenos. Debido a esta razón, se ve acrecentada la necesidad de la implementación de dispositivos y metodologías prácticas y económicas que conlleven a la solución de problemáticas alimentarias de este tipo.

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un biosensor basado en nanopartículas metálicas con aplicaciones en la detección de patógenos en alimentos (*Salmonella*)

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Obtener nanopartículas de oro sintetizadas mediante el proceso de reducción química de HAuCl_4 con citrato de sodio.
- Estandarizar las condiciones de síntesis de nanopartículas metálicas (AuNP`s) a fin de controlar el intervalo de tamaño de dichas estructuras.
- Aplicar métodos de validación Nanopartícula-Proteína A para la obtención de un protocolo de determinación de la concentración mínima necesaria de proteína para estabilizar la superficie metálica de la nanopartícula.

- Obtención del arreglo biosensor constituido por el bioconjugado oro-proteína A estabilizado y recubierto por el anticuerpo marcado de *Salmonella*, para ser probado en la identificación de esta bacteria patógena.
- Aplicar métodos de caracterización espectroscópicos (SERS, FTIR, FL, UVvis,) y microscópicos (SEM, TEM y AFM) en diversas etapas de la construcción del arreglo biosensor.
- Obtención de una metodología de elaboración del arreglo biosensor de la bacteria *Salmonella* que incluye procedimientos de síntesis, conjugación y bioconjugación de moléculas biológicas sobre nanopartículas de oro.
- Probar la detectividad y selectividad del arreglo biosensor desarrollado en soluciones contaminadas intencionalmente con la bacteria *Salmonella* y/o mezclas con bacterias diferentes.

CAPITULO II

MATERIALES Y METODOS

La metodología experimental a desarrollar abarca diversos objetivos los cuales pueden resumirse de la siguiente manera:

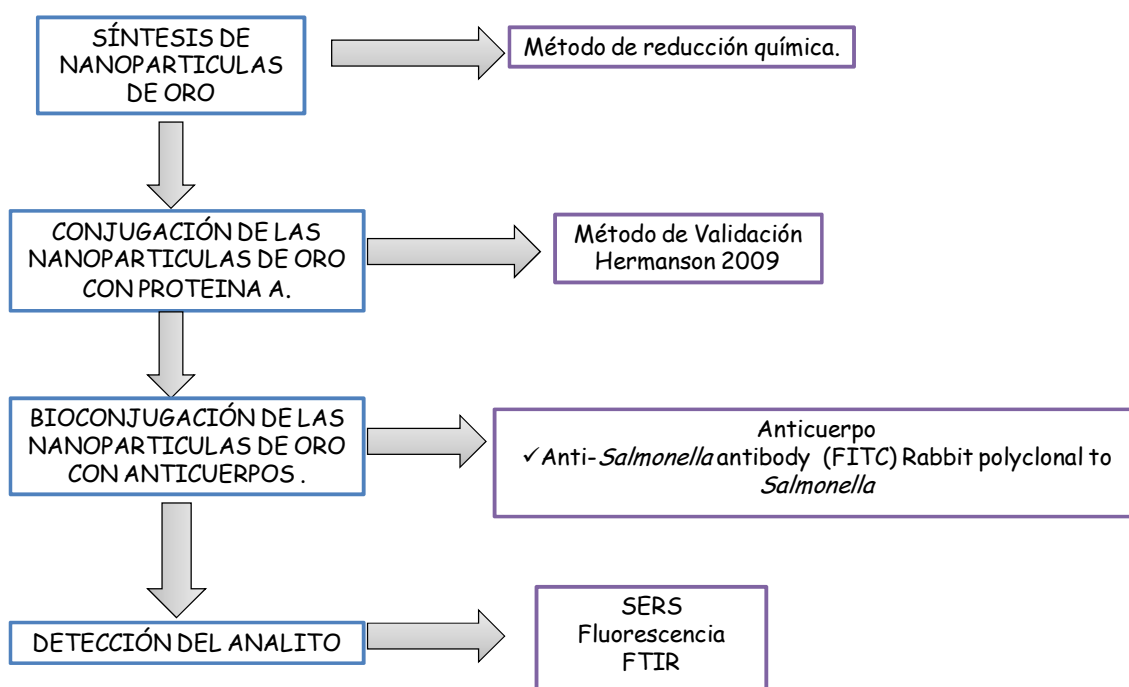


Figura 20. Diseño experimental implementado para desarrollar biosensores basados en nanopartículas metálicas con aplicaciones en la detección de patógenos en alimentos.

2.1 Materiales

Las nanopartículas de oro fueron sintetizadas utilizando ácido tetracloroáurico HAuCl_4 (Sigma-Aldrich) como precursor, citrato de sodio (J.T. Baker) como agente reductor, Proteína A (Sigma-Aldrich) para la estabilización de las nanopartículas y la conjugación orientada del anticuerpo. La proteína se almacena en un buffer PBS (buffer fosfato salino) pH 7.4, 0.01 M, se preparó cloruro de sodio NaCl al 10 % para llevar a cabo el método de validación. En todos los experimentos se empleó agua desionizada y autoclaveada. Por su parte se adquirieron de la empresa abcam los siguientes Anticuerpos marcados y sin marcar: Anti-*Salmonella* antibody (FITC), Rabbit polyclonal to *Salmonella* y Anti-*Salmonella* antibody, Rabbit polyclonal to *Salmonella*.

2.2 Métodos

2.2.1 Síntesis de nanopartículas de oro.

Para la síntesis de las nanopartículas de oro se utilizó el método de reducción química. Este consiste en la reducción de iones de una sal metálica en este caso ácido tetracloroáurico (HAuCl_4), en átomos con valencia cero, mediante el uso de un agente reductor el citrato de sodio en presencia de calor. El procedimiento consistió en la preparación de 1 ml de ácido tetracloroáurico (HAuCl_4) al 4 % en agua desionizada, posteriormente se le agregó .5 ml de esta solución a 200 ml de agua desionizada y se llevó a ebullición, la solución se mantuvo con agitación constante. Una vez que la muestra empezó a ebullición se le agregaron 3 ml de citrato de sodio al 1 %. La solución se dejó ebullición por 30 minutos durante este tiempo se observaron cambios de color en la solución pasando por incolora, azul oscuro hasta llegar a roja, esto nos indica que la solución coloidal de nanopartículas de oro ha concluido, se obtiene un volumen final de 100 ml. Después de que la solución se enfrió se le realizó un lavado es decir las nanopartículas de oro se centrifugaron a 3500 rpm durante 40 min se retiró el sobrenadante y las nanopartículas fueron re suspendidas a 6 ml con agua desionizada y almacenadas a una temperatura de 4 °C. Es de gran importancia destacar que las partículas sintetizadas por reducción con citrato pueden considerarse esferas monodispersas. Para la obtención de las nanopartículas de oro de tamaños entre 15 y 30 nm, se siguió el protocolo desarrollado por Hermanson, 2008.

2.2.2 Conjugación de proteína A a la superficie de las nanopartículas de oro.

La conjugación se llevó a cabo siguiendo el protocolo de (Slot and Geuze, 1984) para así obtener una aproximación correcta de la cantidad de proteína A que debe de ser agregada para mantener la estabilidad de las nanopartículas de oro. Este protocolo consistió en realizar varias soluciones de proteína A a diferentes concentraciones en un rango de 0.3-9 $\mu\text{g/ml}$. Se agregó un volumen de 25 μl de cada una de estas diferentes concentraciones a 500 μl de nanopartículas de oro después de 3 minutos se les agregó 500 μl cloruro de sodio al 10 % esto con el objetivo de aumentar la velocidad de precipitación de las nanopartículas. La estabilización de las nanopartículas fue monitoreada por un cambio de color de los coloides de rojo a azul oscuro y también mediante un cambio en la disminución de la absorbancia de las nanopartículas a 520 nm mediante espectroscopia UV-visible. Cuando la concentración de proteína A agregada es suficiente para estabilizar las nanopartículas de oro la solución no presenta cambios de color y la absorbancia a 520 nm no disminuye, sin embargo existe un desplazamiento en el número de onda. Finalmente la concentración de proteína A que es capaz de estabilizar a las nanopartículas de oro

se le agrega un 10 % más para ser utilizada en la funcionalización final de proteína con la superficie de la nanopartícula de oro. La concentración final de proteína A que se utilizó fue de 6 µg/ml. A 940 µl de nanopartículas se le adicionaron 60 µl de proteína A, teniendo un volumen final de 1 ml de conjugado.

2.2.3 Bioconjugación del anticuerpo anti-*Salmonella* sin marcar y marcado con Isotiocianato de fluoresceína (FITC) a la superficie del sistema nanopartículas de oro-Proteína A.

Diferentes concentraciones (1-8 µg/ml) de anticuerpo anti-*Salmonella* marcado y sin marcar con Isotiocianato de fluoresceína (FITC) fueron realizadas y conjugadas a la superficie del sistema nanopartículas de oro-proteína A. 450 µl del conjugado se le adicionaron 50 µl del anticuerpo a una concentración de 10 µg/ml posteriormente fueron incubadas a 37 °C por 1 hora. Las muestras posteriormente fueron centrifugadas para quitar el exceso de anticuerpo. Todas las muestras fueron almacenadas a 4 °C antes de las mediciones UV-Visible, SERS, FTIR y Microscopía de Fluorescencia.

2.2.4 Preparación bacteria *Salmonella*.

Las cepas de *Salmonella* fueron obtenidas en el laboratorio de Biotecnología del Tecnológico de Monterrey campus Puebla.

Salmonella se cultivó en placas de agar soya tripticaseína marca Bioxon y se colocaron en una incubadora a 37 ° C durante 24 h, después una sola colonia se transfirió a 4 tubos de cultivo que contenían 20 ml cada uno de caldo de soya tripticaseína, bajo agitación, se incubaron a 37 ° C durante 24 h. Después, los tubos se centrifugaron a 10.000 rpm durante 10 min, para obtener un pellet. Finalmente el caldo de soya tripticaseína fue retirado del tubo y las células se lavaron tres veces con agua estéril para eliminar el medio residual y se resuspendió en 3 ml de agua para los posteriores experimentos (figura 21). El conteo de bacterias se realizó mediante el método de recuento de colonias llamada nefelometría, se obtuvo la concentración de bacterias en el caldo de nutrientes inicial y estimado para ser 3×10^9 unidades formadoras de colonias (UFC)/ml.

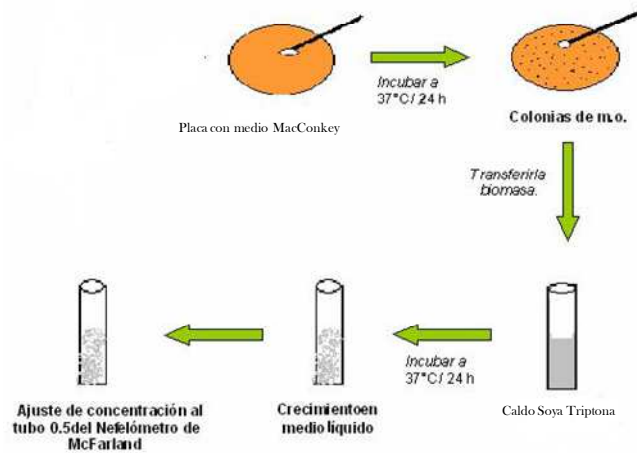


Figura 21. Preparación del inoculo para la detección de *Salmonella*.

2.2.4.1 Preparación de las diluciones de *Salmonella* para la determinación del límite de detección.

Se prepararon diferentes diluciones para obtener diferentes concentraciones de bacterias y así determinar el límite de detección del biosensor. Se partió de una concentración inicial de 3×10^9 UFC/ml, se llevaron a cabo diluciones seriadas con agua estéril las concentraciones que se obtuvieron fueron de 3×10^8 a 3×10^1 UFC/ml. Las diferentes diluciones fueron almacenadas a 4 °C hasta su posterior utilización.

2.2.5 Caracterización de nanopartículas de oro, conjugados con proteína A, anticuerpo anti-*Salmonella* y el antígeno *Salmonella*.

La caracterización de nanopartículas de oro, así como de sus conjugados con proteína A, anticuerpo anti-*Salmonella* y el antígeno *Salmonella* se realiza en este trabajo empleando las siguientes técnicas:

2.2.5.1 Espectrofotometría UV-visible.

Se utilizó un espectrofotómetro UV-Visible, marca Thermo Scientific, modelo Evolution 606 para el registro de la absorción óptica de las soluciones coloidales de nanopartículas y sus conjugados en un rango de longitud de onda de 190-900 nm. Con un volumen de 400 μ l y un tiempo de adquisición de 90 segundos.

2.2.5.2 Microscopia de fuerza atómica (AFM).

Esta es una técnica de microscopia que mide la topografía o relieve de la superficie de una muestra. Su uso en nanopartículas de oro proporciona una medida de su tamaño tanto en forma individual como agregada. La marca del equipo fue Veeco y modelo Multimode.

2.2.5.3 Microscopia electrónica de transmisión (TEM).

Las observaciones TEM se realizaron en un microscopio marca ZEISS modelo EM 900 operando a 80Kv. Las muestras se dejaron evaporar sobre una rejilla de transmisión para posteriormente ser analizadas, con diferentes aumentos.

2.2.5.4 Espectroscopia RAMAN

Los espectros Raman se obtuvieron empleando un espectrómetro Thermo Scientific. La longitud de onda de excitación utilizada fue la línea de 785 nm proporcionada por un diodo laser con una potencia de salida de 10 mW y utilizando una macro-cámara en ángulo recto para medición en modo retrodispersión de luz. Para cada muestra se midieron 100 barridos con una resolución de 4 cm^{-1} . Para la adquisición y manipulación de los espectros se utilizó el programa Vision-Pro.

2.2.5.5 Espectroscopia infrarroja (FTIR).

El equipo utilizado para la obtención de los espectros FTIR de las nanopartículas de oro, Conjugado, arreglo y bioconjugado fue un Espectrómetro Infrarrojo con Transformada de Fourier, marca Bruker Modelo Vertex-70. La técnica de muestreo fue por Reflectancia Total Atenuada (ATR). El espectrómetro está equipado con detector de sulfato de triglicina deuterado (DTGS) que funciona con una resolución de 4 cm^{-1} . Una gota de 3 μl es suficiente para obtener espectros FTIR con referencia con alta razón señal/ruido. Ciento veinte mediciones fueron realizadas para cada espectro en el rango espectral 650–4000 cm^{-1} . Cada espectro se obtuvo y se comparo contra el espectro de línea de base para la obtención del espectro de absorción. Dos mediciones por muestra se realizaron para la reducción de errores. Después de cada medición se lavó la superficie de la celda ATR con agua desmineralizada y se seco con un papel suave.

2.2.6 Mediciones SERS de la Conjugación del anticuerpo anti-*Salmonella* a la superficie del sistema nanopartículas de oro-Proteína A.

Las muestras del sistema nanopartículas de oro-proteína A incubadas con el anticuerpo anti-*Salmonella* a una concentración de 10 µgr/ml fueron inmovilizadas en placas de silicio depositando una cantidad de 3 µl y agregando una cantidad total de 5 gotas por cada muestra inmovilizada dejando secar hasta su completa pérdida de humedad para su posterior medición en RAMAN.

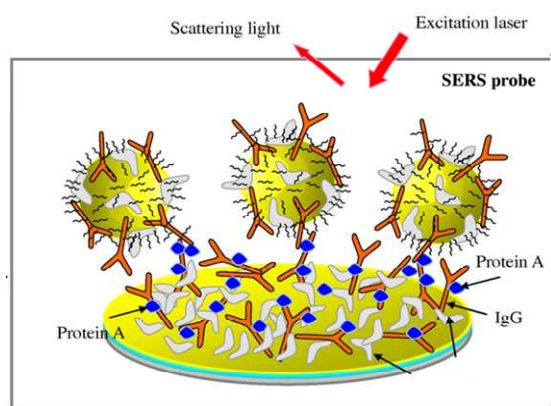


Figura 22. Esquema de medición SERS del arreglo nanopartículas de oro-Proteína A y anticuerpo anti-salmonella.

2.2.7 Mediciones de Microscopia de Fluorescencia del anticuerpo anti-*Salmonella* marcado con FITC a la superficie del sistema nanopartículas de oro-Proteína A para la detección del patógeno *Salmonella*.

Para las primeras mediciones de fluorescencia las preparaciones se montaron con vectashield-DAPI, es un reactivo que permite conservar la fluorescencia y tiene DAPI un fluorocromo que tiñe DNA en color azul, así que en un canal se observó el DAPI, que en este caso marcó a las bacterias y en el otro canal se buscó la marca del anticuerpo (FITC), la tercera imagen corresponderá a la sobreposición de ambos fluorocromos, se utilizó un microscopio de fluorescencia convertido confocal marca Zeiss LSMS Pascal.

En las siguientes mediciones de fluorescencia se trabajó con las siguientes concentraciones de bacteria 3×10^9 , 3×10^8 , 3×10^7 UFC/ml se le adicionó el biosensor construido y se depositaron 3 µl en un portaobjetos se dejó secar la muestra y posteriormente medidos en el microscopio de fluorescencia.

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSION

3.1 Síntesis de nanopartículas de oro.

Para la preparación de las nanopartículas de oro se utilizó el método de reducción química usando al citrato de sodio como agente reductor, este método de síntesis nos permitió obtener nanopartículas de oro monodispersas de un tamaño promedio de 15-30 nm en suspensión acuosa. Este método consistió en la reducción de iones de una sal metálica, en este caso ácido tetracloroáurico HAuCl_4 a átomos con valencia cero como se observa en el esquema de la Figura 23. La formación de núcleos y el sucesivo crecimiento, son dos procesos independientes, en que se basa la síntesis de las partículas nanométricas y son los principales responsables de los cambios en parámetros como estructura, forma, tamaño y composición, y consecuentemente en las propiedades ópticas, térmicas, electrónicas y catalíticas de las nano-estructuras.

Las nanopartículas así preparadas poseen carga superficial negativa como consecuencia de la débil unión al citrato, empleado como reductor. Debido a la carga, las partículas se repelen entre sí, manteniéndose en suspensión. Una suspensión de color púrpura es señal de que se ha producido la agregación de partículas. La uniformidad en el tamaño es esencial en la fabricación de dispositivos basados en el empleo de nanopartículas de oro que proporcionen medidas estables y reproducibles (Carralero Sanz, 2009).

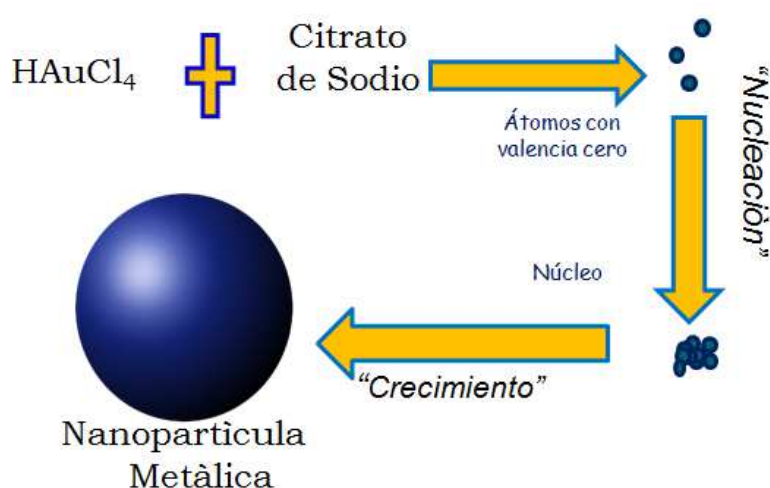


Figura 23. Diagrama esquemático del proceso de síntesis de nanopartículas metálicas

Durante el proceso de síntesis de las nanopartículas de oro, diferentes cambios de color pudieron ser observados partiendo de una solución ligeramente amarilla por la presencia de la sal metálica, posteriormente cuando se le agrego el agente reductor la solución se torno incolora, antes de que se observara un cambio de color hubo un periodo de espera de 1 min, y se debe a la formación del precursor llamado acetona ácido dicarboxílico, un producto de la oxidación del citrato, después la solución presento un color púrpura y posteriormente se torno a un rojo-rubí característico de dispersiones coloidales metálicas de oro en un intervalo aproximado de 15-30 nm. El color de la suspensión obtenida, rojo rubí, es señal de la calidad de las partículas obtenidas en cuanto a forma esférica y tamaño nanométrico. El color de los metales nobles en solución es el resultado de la reflexión y transmitancia de la luz incidente. Estas propiedades están en función de los cambios de la banda de plasmón superficial (J. Pendry et al., 2004).

En la formación de las nanopartículas, el papel organizacional del ácido dicarboxílico acetona es el paso clave para el control del tamaño y forma de las partículas. Las dispersiones así obtenidas son homogéneas Figura 24.



Figura 24. Proceso de síntesis de nanopartículas de oro por el método de reducción química.

3.1.1 Caracterización de nanopartículas de oro (UV-Visible).

Las nanopartículas de oro presentan una banda de absorción del plasmón superficial en el espectro UV-Visible y en el rango de longitud de onda de 510-550 nm. La Figura 25 muestra un espectro típico de absorción UV-Vis obtenido para un sistema coloidal de nanopartículas de oro. Los espectros UV-Vis analizados presentaron una sola banda simétrica de resonancia de plasmón superficial a 520 nm atribuido a la oscilación colectiva de los electrones de conducción 6s en las nanopartículas de oro y esta absorción es característica para nanopartículas de tamaño entre 15 y 30 nm este resultado coincide con el trabajo de Ossi Horovitz et al; 2005. La longitud de onda del pico de absorción depende de varios factores, como el tamaño de las nanopartículas, la distancia entre las partículas, la constante dieléctrica del medio circundante (medio de dispersión), cuanto mayor es el tamaño de las nanopartículas, el pico del plasmón

se desplaza a longitudes de onda mayores. El pH de las nanopartículas de oro se ubico en el rango de 5-6.

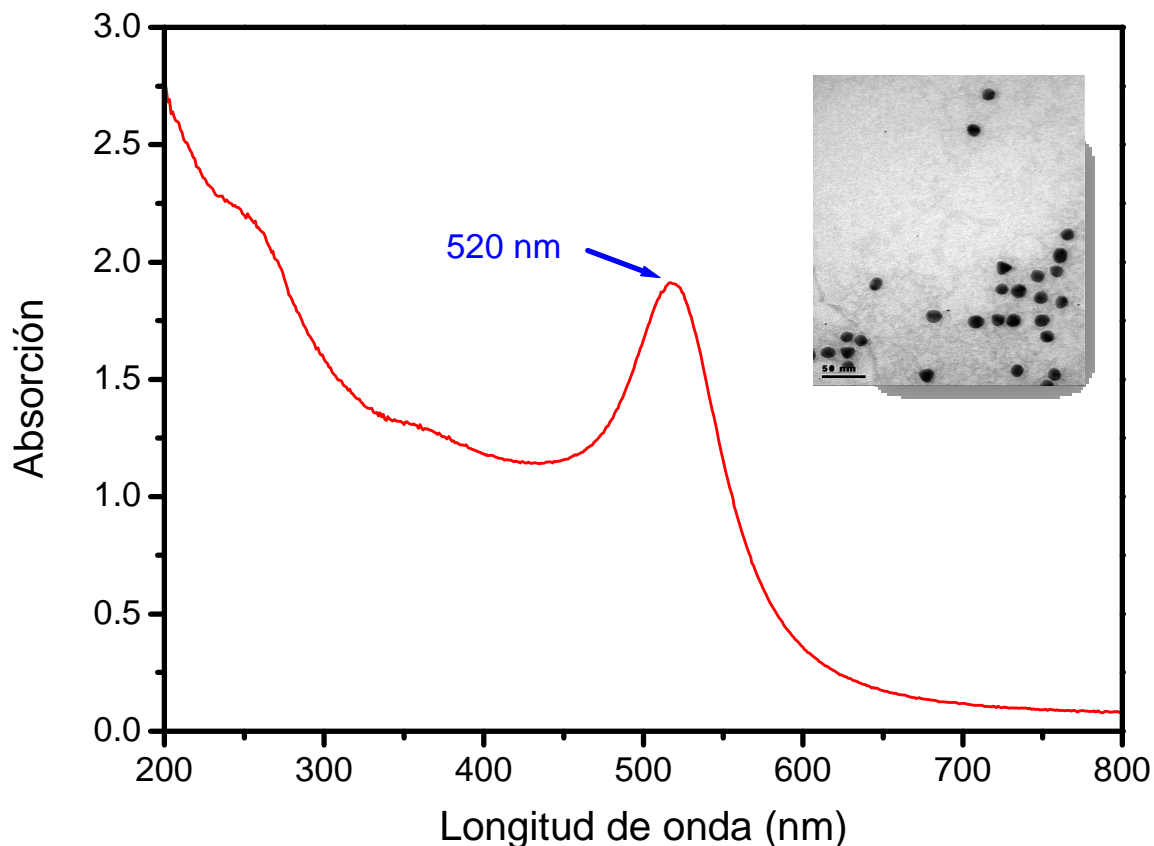


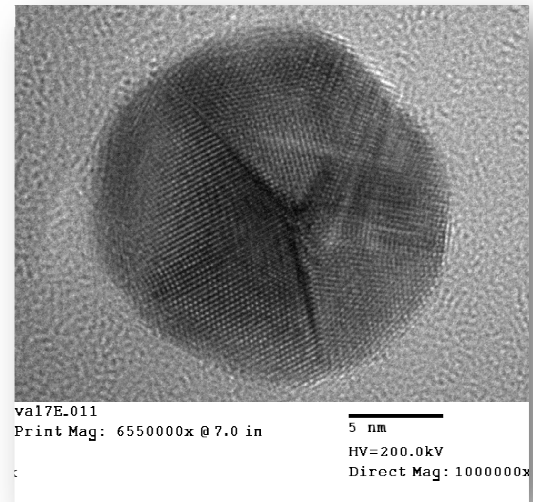
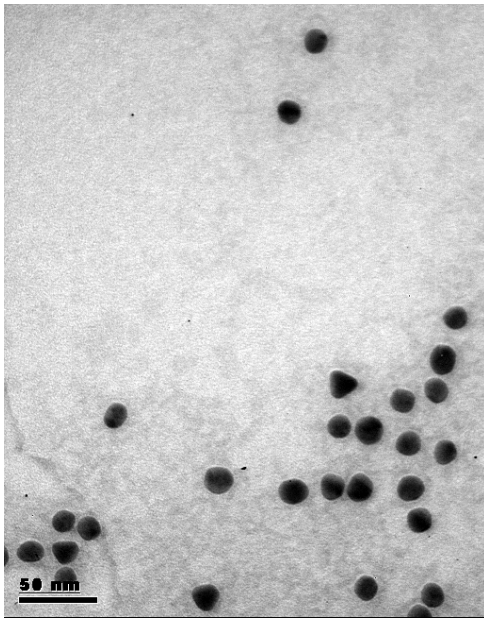
Figura 25. Espectro típico de absorción UV-Vis de un sistema coloidal de nanopartículas de oro.

En este espectro UV-Visible se observa un solo pico el cual nos indica la presencia de nanopartículas esféricas. Se utilizo un método simple y rápido para determinar el tamaño y concentración de las nanopartículas de oro, propuesto por Haiss et al; 2007. Este modelo se basa en la teoría de dispersión multipolar con corrección del índice de refracción de las nanopartículas de oro. Obteniéndose un tamaño promedio de 15 nm mediante el modelo teórico y una concentración de nanopartículas de 1.30×10^{12} (part/ml).

3.1.2 Caracterización de nanopartículas de oro (Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM), Microscopia de fuerza atómica (AFM), Analizador de Tamaño de Partículas Zetasizer.

La microscopia electrónica de transmisión (TEM) es la herramienta más utilizada para la visualización directa de las partículas nanométricas ya que revela varios aspectos de su naturaleza. Es ideal para la medición del tamaño, su distribución, forma,

crystalinidad y estructura de las partículas metálicas (Boutonne M. et. al ,1982). Para determinar el tamaño y forma de las partículas de oro, se realizaron medidas TEM. Una imagen típica de estas partículas se muestra en la Figura 26 presentando formas en su mayoría esféricas modispersas con tamaño aproximado de 15 nm. En microscopía electrónica las nanopartículas aparecen como entidades solidas, oscuras de material denso.



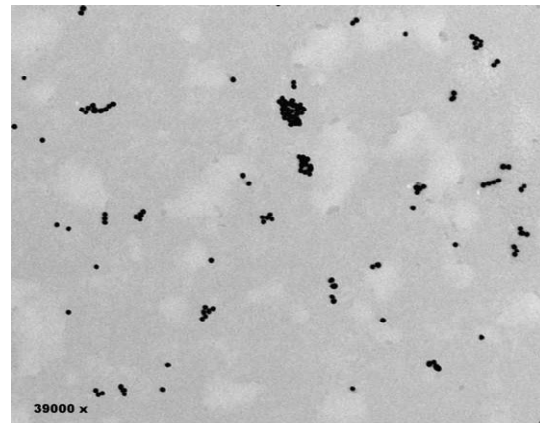
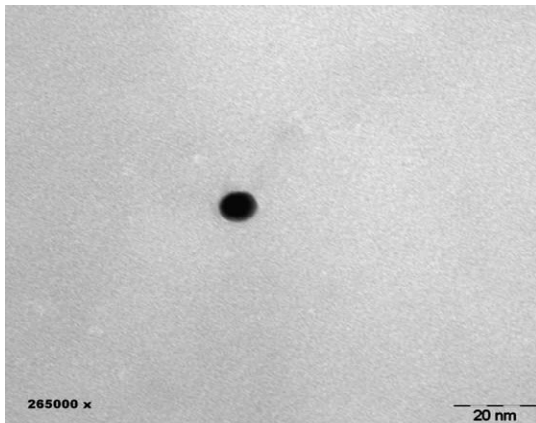
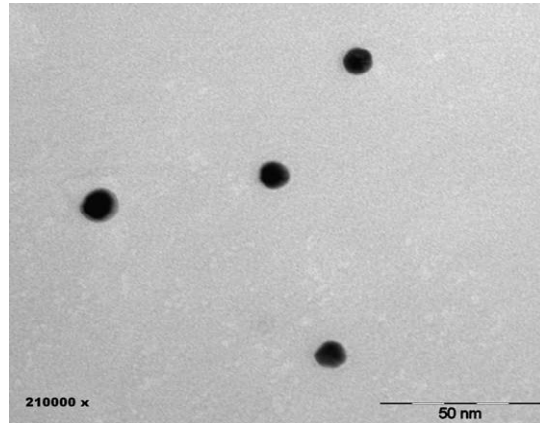
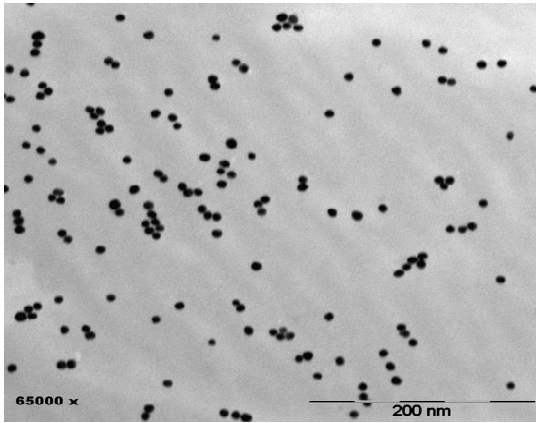


Figura 26. Micrografía TEM de nanopartículas de oro sintetizadas por el método de reducción química. Se muestran imágenes TEM a diferentes escalas.

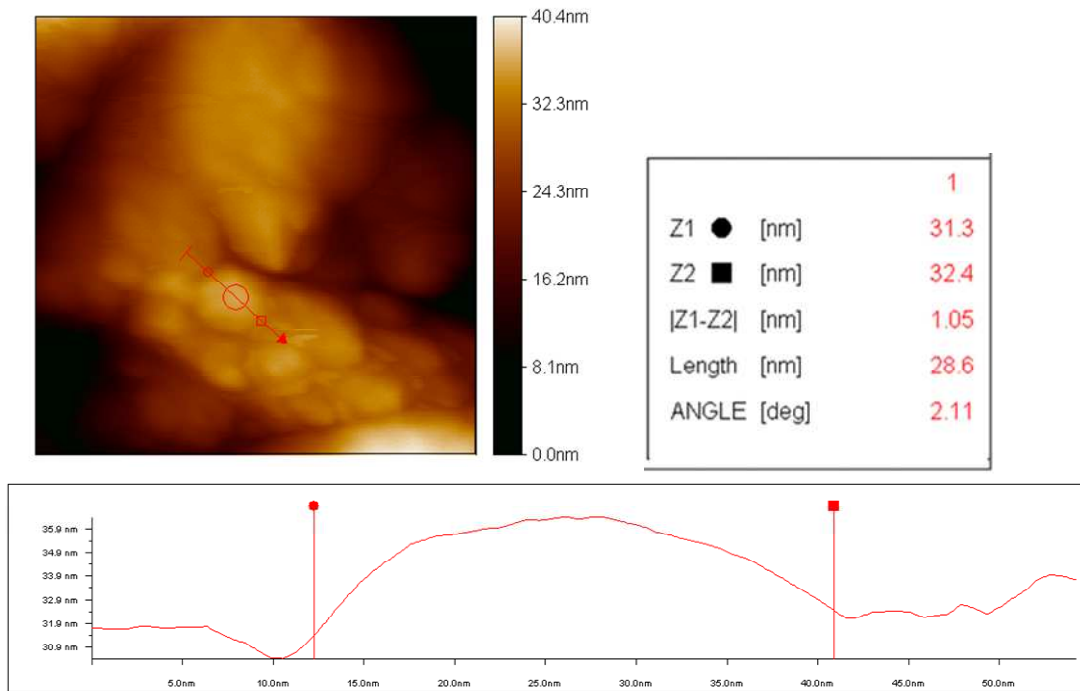


Figura 27. Arriba: Imagen topográfica AFM de nanopartículas de oro inmovilizadas sobre sustratos de silicio. Abajo: Perfil tomado a lo largo de la línea indicada en la imagen. En este caso se trata de nanopartículas de tamaño aproximado 30 nm.

La imagen AFM (Microscopia de fuerza atómica) muestra que las nanopartículas de oro contienen efectivamente partículas esféricas de oro de tamaño aproximado a 30 nm para este caso (Figura 27). El tamaño de las nanopartículas se estimó por la altura de la imagen AFM topográfica. En esta imagen las nanopartículas de oro se observan en forma agregada debido a que fueron inmovilizadas y secadas sobre un sustrato de silicio.

En la Figura 28 se muestra la grafica de distribución de tamaño de partícula, obtenida por dispersión laser para este sistema de nanopartículas de oro, obtenido mediante un analizador de tamaño de partícula. Es importante destacar que en esencia se observan solo 2 tamaños, es decir se ven las nanopartículas de alrededor de 30 nm con un porcentaje del 49.2 %, Así como de los agregados de 235 nm con un porcentaje del 48 %. Con esto corrobora que las nanopartículas de oro son monodispersas, ya que se muestra solo un tipo de tamaño para las nanopartículas individuales.

	Diam. (nm)	% Intensity	Width (nm)
Z-Average (d.nm): 43,93	Peak 1: 34,60	49,2	15,28
Pdl: 0,811	Peak 2: 235,3	48,0	120,5
Intercept: 0,904	Peak 3: 4638	2,8	815,2

Result quality : POOR - see result quality report

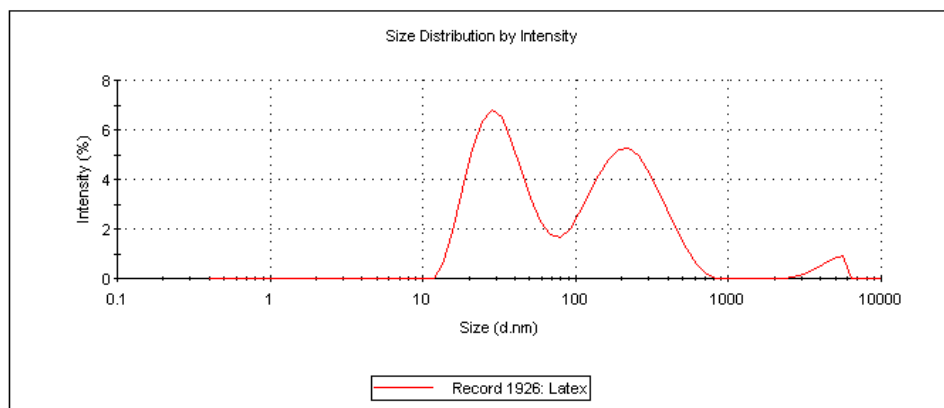


Figura 28. Grafica de distribución de tamaño para un sistema de nanopartículas de oro.

3.2 Estabilidad de las nanopartículas de oro.

La prevención de la agregación durante la conjugación, bioconjugación y almacenamiento de los coloides es muy conveniente, ya que la presencia de agregados y/o conjugados pobres se traducirá en una reducción de inmunoreactividad y malos resultados de las pruebas en que las nanopartículas de oro se van a utilizar.

Sin un proceso de funcionalización las nanopartículas de oro no son estables en comparación cuando se lleva a cabo su funcionalización. La funcionalización de nanopartículas de oro con proteínas nos permite la estabilización del sistema (Casas & Li, 2012).

Las nanopartículas son mantenidas en suspensión por fuerzas electrostáticas repulsivas entre las partículas con carga negativa debido al citrato reductor adsorbido (Derjaguin Landau, 1941). La agregación puede ser inducida por la adición de electrolitos, por ejemplo NaCl, este apantalla las cargas negativas de las nanopartículas causando un desequilibrio entre las fuerzas repulsivas y atractivas permitiendo que las nanopartículas neutralicen su carga y formen agregados.

Este fenómeno se puede visualizar a través del cambio de color de las nanopartículas de oro, pasando de rojo a azul (Figura 29). En caso de agregación, el espectro visible presenta un nuevo pico a longitudes de onda mayores (~560 nm) con una disminución en la intensidad de la absorbancia del plasmón y aparición de hombros (Figura 30). Las nanopartículas de oro se pueden estabilizar empleando un modificador superficial, Si macromoléculas como las proteínas están presentes en la suspensión coloidal la concentración de electrolitos se eleva para poder superar los efectos de

repulsión negativa, la adsorción se produce con las moléculas de proteína en lugar de las nanopartículas de oro ya que su adsorción en la superficie de oro inhibe otras partículas de oro vinculantes (Thobhani et al., 2010). Así, en lugar de agregación y el colapso de la suspensión se produce la estabilización.

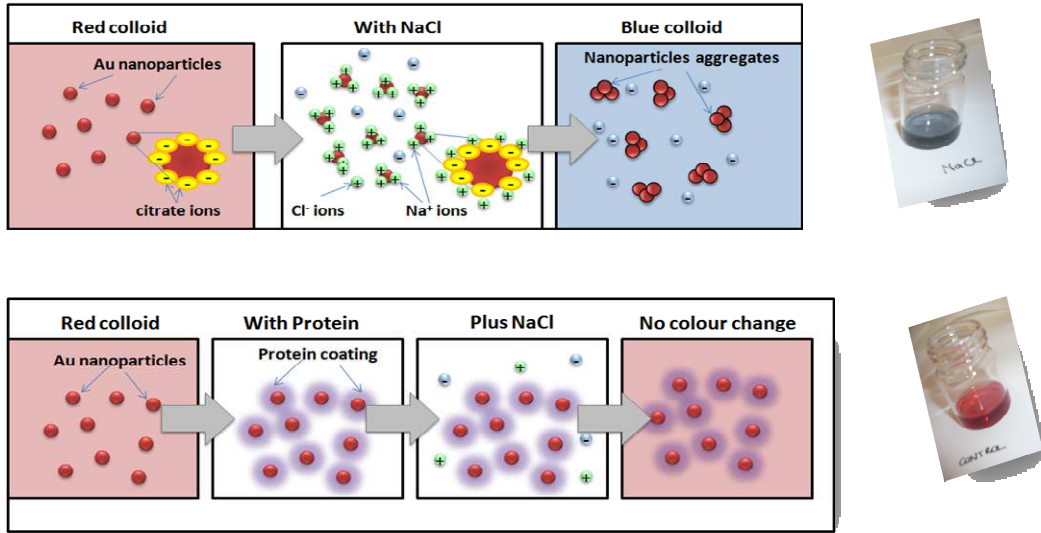


Figura 29. Esquema donde se muestra la agregación y la estabilización de las nanopartículas con NaCl y en ausencia y presencia de proteína.

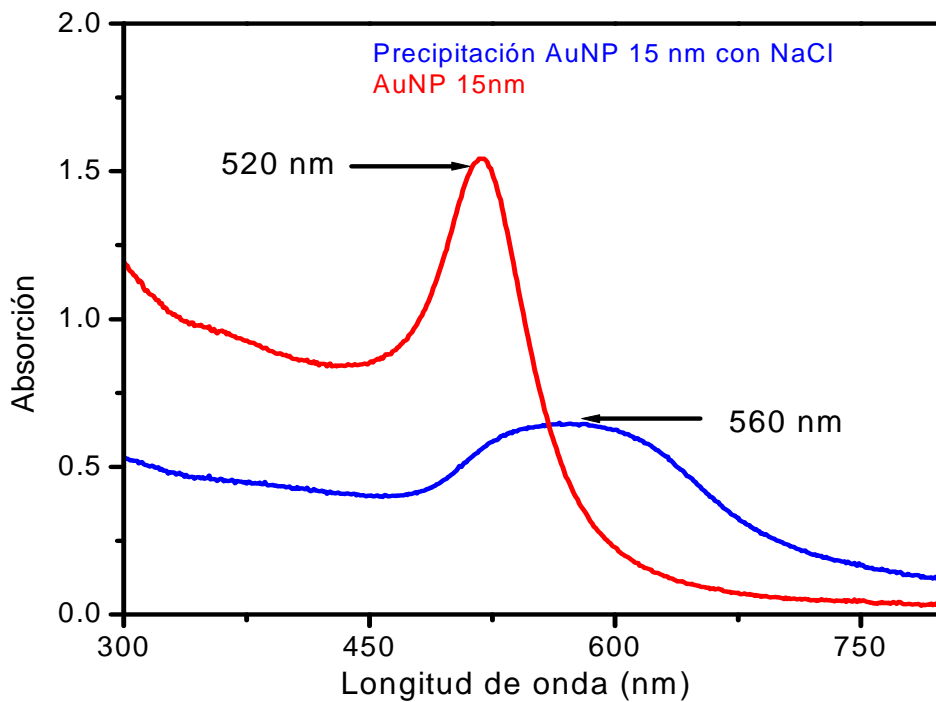
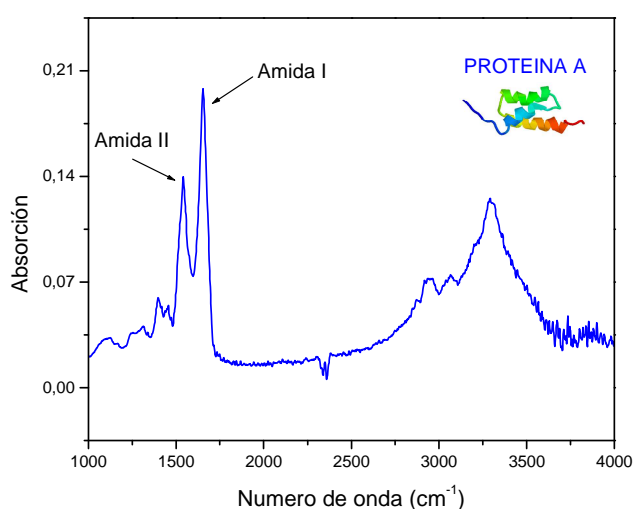


Figura 30. Espectro UV-Vis de un sistema coloidal de nanopartículas de oro (rojo), sistema coloidal de nanopartículas de oro agregadas mediante el uso de NaCl (azul).

3.3 Caracterización de la proteína A mediante Espectroscopia FTIR y UV-Visible.

En la Figura 31 se observa un espectro FTIR típico de proteína A en la región entre 4000 y 1400 cm^{-1} . En donde están presentes claramente la banda Amida I y Amida II. La banda Amida I es la más intensa de las bandas de absorción en proteínas, entre 1600 y 1700 cm^{-1} está asociada principalmente con la vibración de tensión del C=O (70-85%) y está directamente relacionada con la conformación del esqueleto polipeptídico y el patrón de enlaces de H. La banda Amida II entre 1480 y 1575 está relacionada con la vibración de flexión del enlace N-H (40-60% de la energía potencial), con la vibración de tensión de los enlaces C-N (18-40%) y del C-C (10%). La banda Amida A, sobre 3500 cm^{-1} y la banda amida B, sobre 3100 cm^{-1} , se originan por resonancia Fermi entre el primer armónico o sobre todo de la banda Amida II y la vibración de tensión del enlace N-H. Este modo de vibración no es dependiente de la conformación pero es muy sensible a la fuerza del enlace de H; así la banda A cae entre 3225 y 3280 cm^{-1} para longitudes de enlace de H entre 2.69 y 2.85 Å. Amida III y IV son bandas muy complejas que tienen su origen en una mezcla de desplazamientos de coordenadas. Las bandas amida V, VI y VIII están asociadas a movimientos fuera del plano peptídico. Estas bandas son de menos utilidad. Se debe de considerar el problema de la interferencia del agua ya que el agua absorbe fuertemente en la región donde caen importantes grupos, incluyendo las bandas Amida I y Amida II, lo que hace prácticamente imposibles estudiar los espectros de proteínas en su presencia, por esta situación las mediciones se llevaron a cabo teniendo en cuenta esta situación.



DESIGNACION	FRECUENCIA APROXIMADA (cm^{-1})	DESCRIPCION
Amida A	3300	NH Stretching
Amida B	3100	NH Stretching
Amida I	1600-1690	C=O Stretching
Amida II	1480-1575	CN Stretching NH bending
Amida III	1229-1301	CN Stretching NH bending
Amida IV	625-757	OCN bending
Amida V	640-800	Out-of plane NH bending
Amida VI	537-606	Out of-plane C=O bending
Amida VII	200	Skeletal torsion

Figura 31. Espectro FTIR de proteína A y sus principales bandas de absorción FTIR (cada espectro es el promedio de tres replicas).

También se caracterizó la proteína A mediante espectroscopia UV-Visible, esta proteína contiene 9 cadenas laterales de tirosilo las cuales presentan absorción en el UV-cercano entre 275 y 285 nm (Ingvar, 1975). En la Figura 32 se muestra el espectro de absorción de la proteína A centrada en 276 nm lo que nos indica la presencia de la tirosina en la proteína. El espectro de UV-lejano (200-100 nm) de proteínas es extremadamente sensible a la estructura de la proteína, mientras que el espectro del UV-cercano (320 y 200 nm) refleja las contribuciones de las cadenas laterales aromáticas y puentes disulfuro.

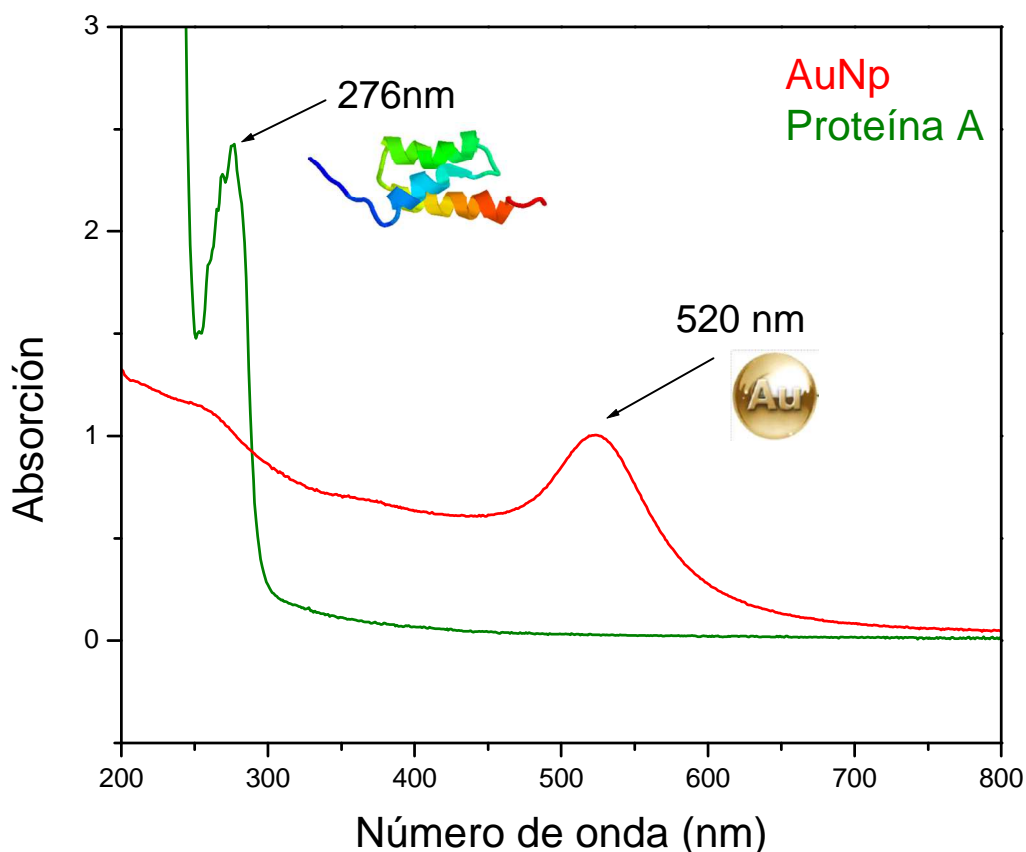


Figura 32. Espectro UV-Visible de nanopartículas de oro (rojo) y proteína A (verde).

3.4 Conjugación de proteína A a la superficie de las nanopartículas de oro y caracterización por UV-Visible

Espectrofotometría UV-visible, además de determinar la concentración y homogeneidad de tamaño, en el caso de los conjugados proteína-nanopartículas de oro, permite observar un desplazamiento en la longitud de onda, el cual podría atribuirse a un *amortiguamiento* del plasmón superficial (nube electrónica) de la partícula, indicando que la nanopartícula se encuentra recubierta por la proteína A, además que la forma de la banda de absorción de las nanopartículas no es modificada una vez que es unida la proteína a la superficie de estas. Se espera observar un

corrimiento hacia longitudes de onda mayores debido a la adherencia de la proteína A en la superficie de las nanopartículas. En la Figura 33 se observa claramente este desplazamiento de la banda de absorción de las nanopartículas pasando de 520 a 526 nm, lo cual indica que la proteína A se ha adherido a la superficie de las nanopartículas de oro. Se observa además que no hay cambio en la forma de la banda de absorción de las nanopartículas. Este desplazamiento, después del recubrimiento de las nanopartículas con proteína A se atribuye a los cambios en la naturaleza del dieléctrico (proteína) que rodea a las nanopartículas debido a la presencia de la proteína A, ya que la posición de la frecuencia de oscilación plasmonica en el espectro electromagnético está determinada por el índice de refracción que rodea la superficie de la nanopartícula, así como de la forma y el tamaño de estas (Thi Ha et al., 2010).

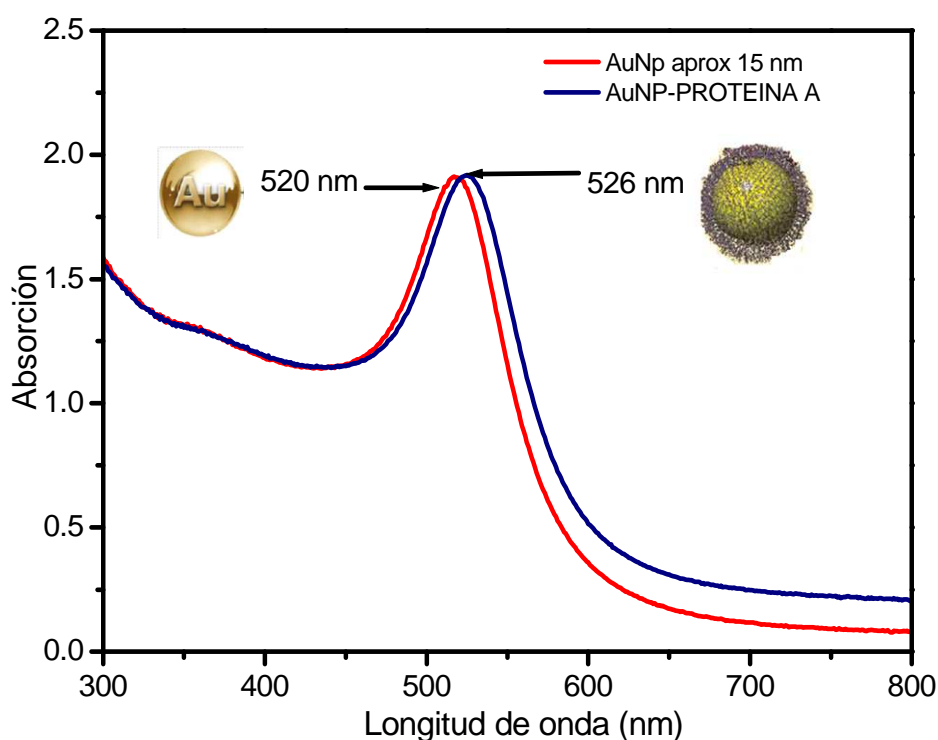


Figura 33. Espectro UV-Visible de nanopartículas de oro (rojo), y del recubrimiento de la superficie de la nanopartícula de oro con proteína A (azul).

Nuestro principal objetivo en esta fase es controlar el sitio de unión de la proteína A a la superficie de las nanopartículas, así como cuidar de los parámetros que puedan afectar la estructura y actividad de la proteína (Figura 34).

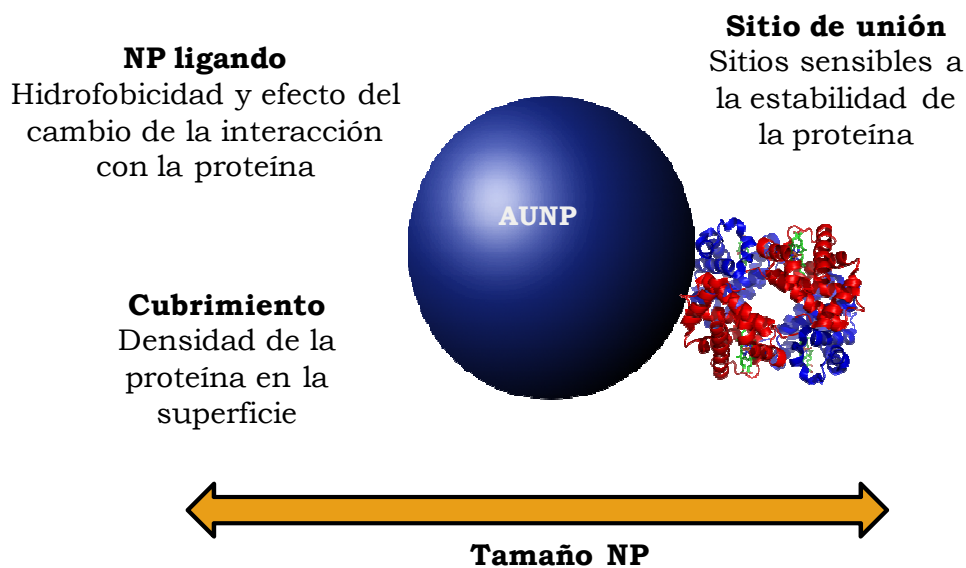


Figura 34. Parámetros que afectan la estructura y actividad de la proteína.

3.4.1 Validación proteína A a la superficie de las nanopartículas de oro.

Los agregados pueden, en particular, impedir la realización de inmunoensayos, o llevar a resultados imprecisos. Cuando la agregación es demasiado abundante, se llega a la precipitación. Por lo tanto, antes de la inmovilización de los anticuerpos a las nanopartículas, valoraciones preliminares se realizaron para determinar la aproximación de cantidad mínima de proteína A requerida para estabilizar los coloides de oro y por lo tanto minimizar la agregación de las nanopartículas y así obtener un proceso de conjugación óptima.

La valoración de las nanopartículas de oro se llevó a cabo a través de diferentes concentraciones conocidas de proteína A con buffer PBS empleando el protocolo descrito en la sección de materiales y métodos.

De esta forma se funcionalizó la superficie de las nanopartículas de oro en forma de solución coloidal con diferentes concentraciones conocidas de proteína A en un rango de 0.3-9 $\mu\text{g/ml}$. El proceso de conjugación de la proteína A sobre la superficie de las nanopartículas de oro para varias concentraciones se evaluó mediante espectroscopia UV-Vis, a pH 4 las nanopartículas de oro no son estables debido a la neutralización de las cargas seguido de la agregación de estas (Jiao et al., 2005) y sus espectros son grandes y de baja intensidad en comparación con la funcionalización a pH 7.4 (Figura 35 (b)).

La cantidad mínima de proteína necesaria para estabilizar las nanopartículas de oro se determina de la fase estable de la curva de absorbancia-concentración, (Figura 35 (c)). En este caso, la cantidad adecuada de proteína A que recubre completamente la superficie de la nanopartícula para evitar su precipitación fue de 6 $\mu\text{g/ml}$.

Como se puede observar en la Figura 35 inciso (a) se muestran las diferentes concentraciones de proteína A agregada a las nanopartículas de oro, la concentración de 0.3 $\mu\text{g/ml}$ causó la precipitación de las nanopartículas y esto vino acompañado por un cambio de color de rojo a azul , además que su plasmon (con máximo en 520 nm) disminuyó de intensidad drásticamente y se desplazó hacia longitudes de onda mayores(550 nm), todo esto se produjo debido a que no se logró cubrir completamente la superficie de las nanopartículas lo que causó su precipitación en presencia de NaCl. Cuando las moléculas de proteína A son suficientes para cubrir toda la superficie del oro forman un conjugado estable de proteína-oro y este no cambia de color (rojo) si no que permanece estable sin que ocurra la precipitación además sus espectros de absorción se vuelven constantes. A partir de la concentración de 6 $\mu\text{g/ml}$ las nanopartículas ya no presentaron un cambio de color y su plasmon aumento de intensidad así como se vio un ligero corrimiento en su longitud de onda a 530 nm y para las demás concentraciones la absorción se volvió constante, lo que nos indica que esta es la mínima cantidad para cubrir completamente la superficie de las nanopartículas y de esta manera evitar su precipitación y por lo tanto obtenemos un conjugado AuNPs -Proteína A, el cual es estable durante algunos meses estos resultados fueron ya publicados.

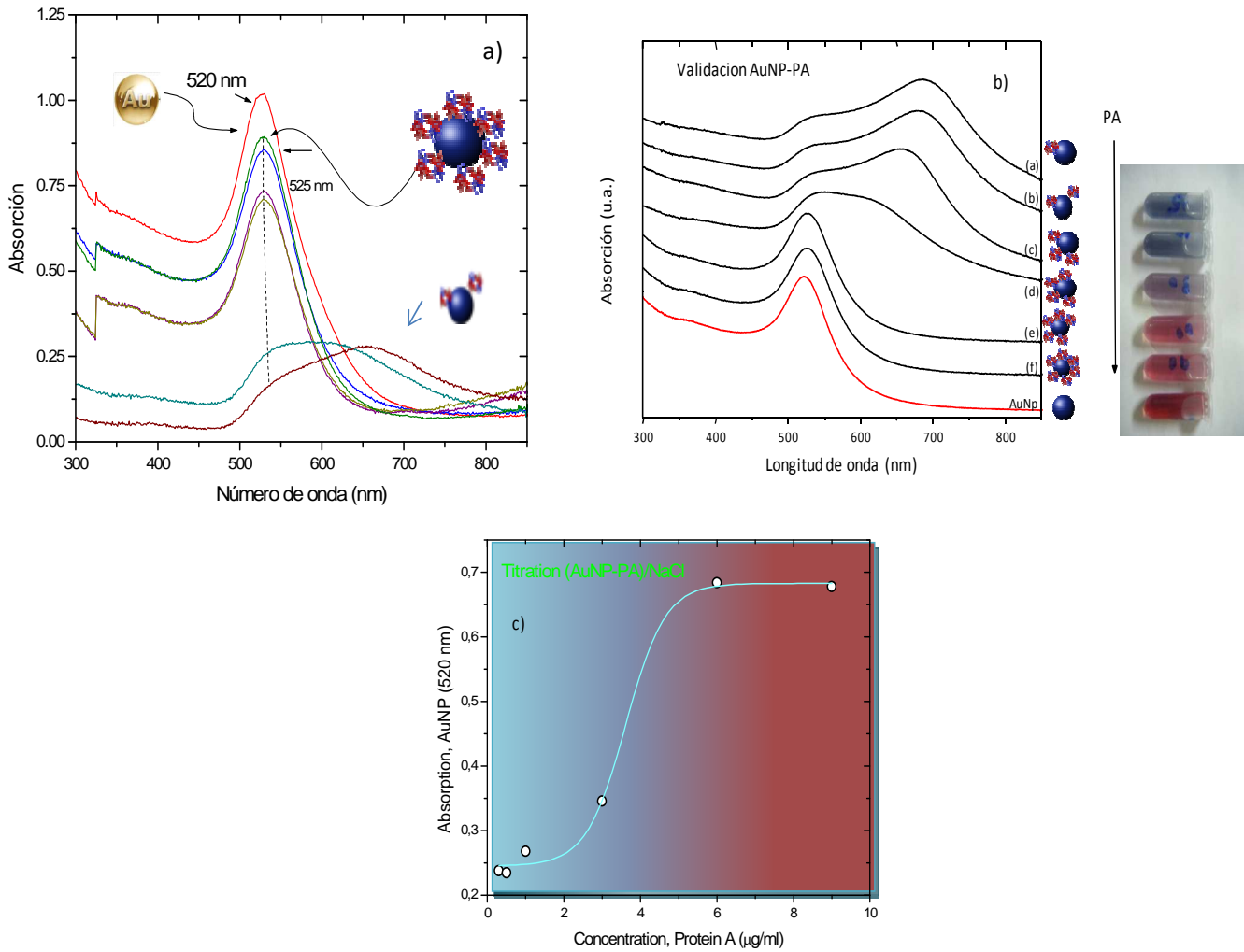


Figura 35. (a y b) Espectros de absorción UV-Visible a diferentes concentraciones de proteína A funcionalizadas a la superficie de nanopartículas de oro (AuNPs) y (c) absorción de (AuNPs) contra concentración de proteína A a una absorción de 520 nm

Las nanopartículas de oro recubiertas con proteína se obtuvieron debido a la presencia de la carga negativa de los coloides de oro provenientes de $[HAuCl_4]$ en la superficie de la partícula, presentando una afinidad por las proteínas que tienen carga positiva, a un pH fisiológico (Norde, 1986; Hermanson, 1995).

Se sugiere en este trabajo que la unión de la proteína A sobre la superficie de la nanopartícula se debe principalmente a interacciones electrostáticas ya que esta proteína cuenta con 69 grupos de lisina, 7 de histidina y 6 de arginina que pueden tener interacción con la carga negativa de la superficie de las nanopartículas. Estos aminoácidos actúan químicamente como una base ya que su cadena lateral contiene un grupo amino protonable que se encuentra cargado positivamente a valores de pH

fisiológico; por ejemplo la histidina su grupo funcional es un imidazol cargado positivamente dentro de este rango de pH. Este tipo de aminoácidos le provén carga positiva a la proteína.

También se evaluó la presencia de proteína A en la superficie de las nanopartículas mediante microscopia electrónica de transmisión (TEM). En la Figura 36 se observa como durante el proceso de funcionalización la proteína A cubre a las nanopartículas de oro. En este caso presentando un exceso de proteína A, lo cual es indeseable para la elaboración de un biosensor. En la Figura 37 se puede observar la imagen TEM con la cantidad correcta de proteína A. Se observa un halo que recubre de manera homogénea la superficie de las nanopartículas con proteína, de manera distinta a lo observado con nanopartículas sin conjugar este resultado es similar al obtenido al trabajo de de Thobhani et al, 2010 en este caso ellos usaron la proteína Albumina de suero Bovina a una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ cantidad suficiente para recubrir la superficie de la nanopartícula de 40 nm.

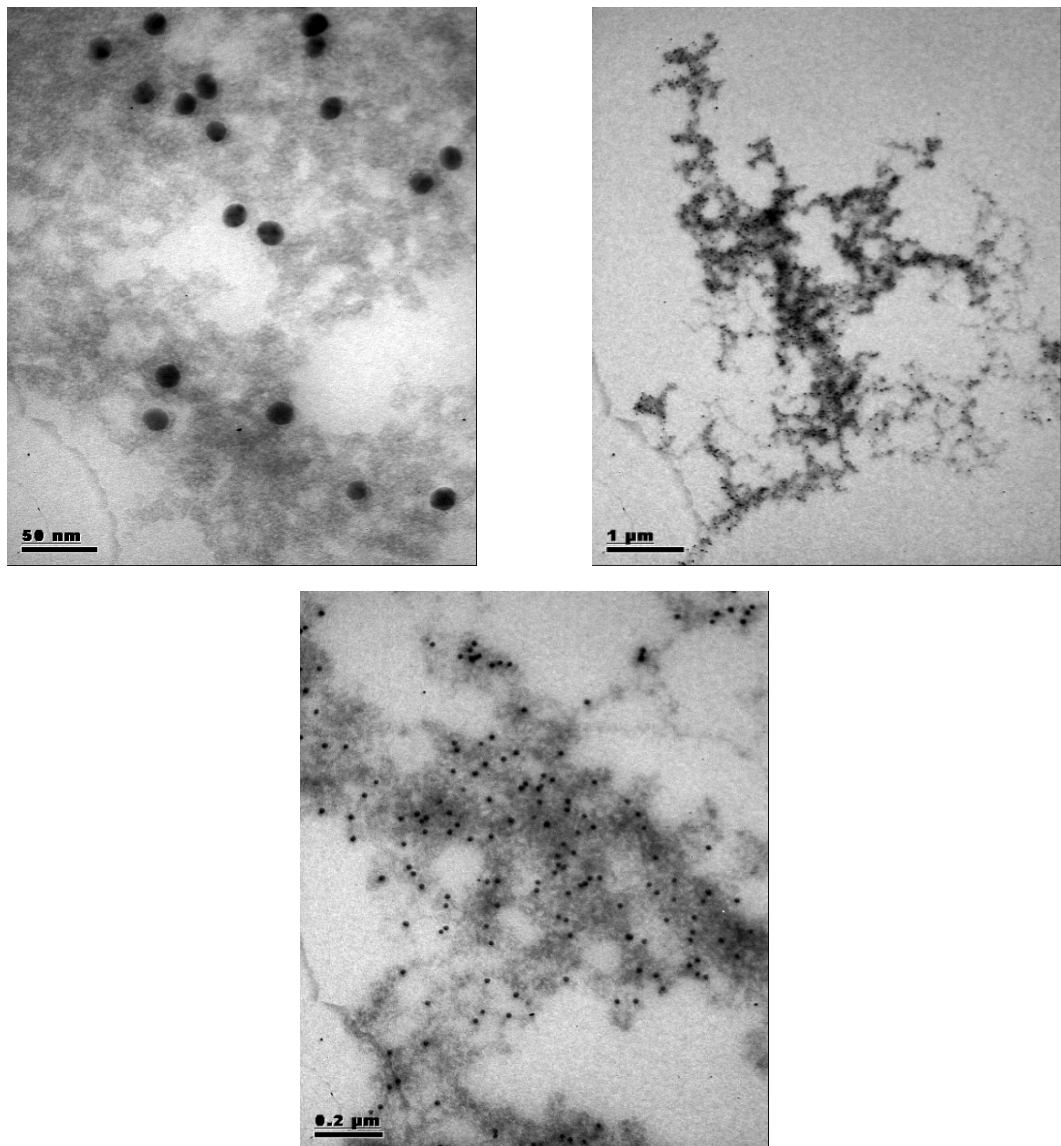


Figura 36. Imágenes TEM de nanopartículas de oro con exceso de proteína A.

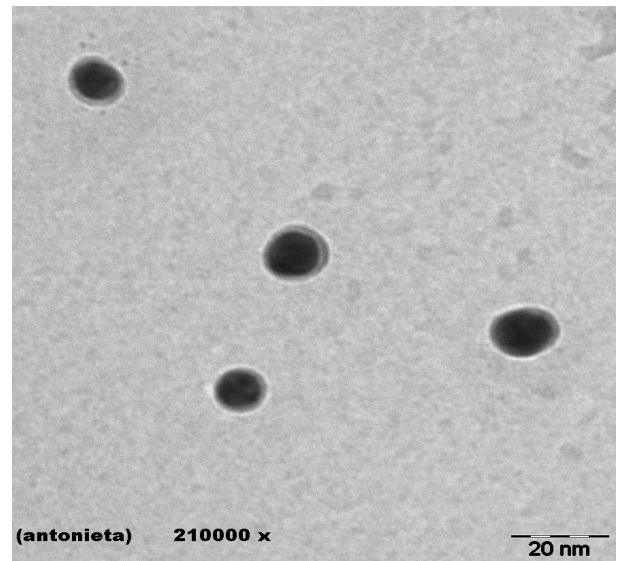
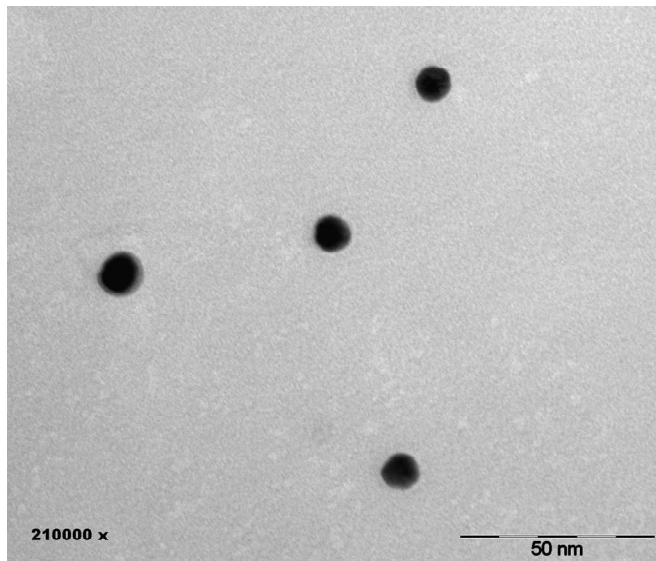


Figura 37. Imágenes TEM de nanopartículas de oro sin (izquierda) y con proteína A a una concentración de 6 µg/ml (derecha).

Como un experimento adicional, una solución coloidal de nanopartículas de oro se mezcló con agua común no esterilizada, en la que la imagen TEM de la Figura 38 muestra la presencia de algún tipo de bacteria presente en el agua no esterilizada, así como la afinidad por atracción electrostática que tienen las nanopartículas de oro (cargadas negativamente por los grupos citratos durante la síntesis) hacia la superficie de este microorganismo. Este es un experimento sencillo en el que se muestra que este tipo de unión entre nanopartículas y bacterias es posible. Sin embargo se desea que este tipo de unión sea específica para un patógeno de interés.

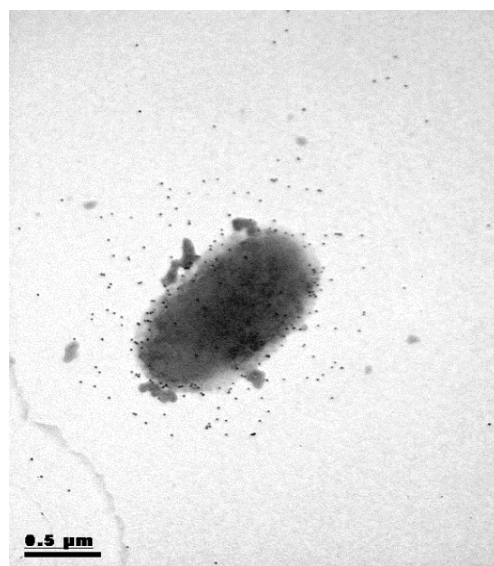


Figura 38. Imagen TEM de nanopartículas de oro unidas a la superficie de una bacteria

3.4.2 Caracterización del conjugado (AuNP's-Proteína A) mediante Espectroscopia FTIR.

También se caracterizó a las nanopartículas de oro con y sin unirse a la proteína A mediante espectroscopia FTIR. En la Figura 39 se puede observar el espectro FTIR de las nanopartículas de oro en la región de 400-2000 cm^{-1} donde aparecen los picos principales a 1589 cm^{-1} debido a $\text{CH}_2\text{-O}$ y 1403 cm^{-1} deformación C=O se atribuyen al tramo asimétrico y simétrico del grupo carboxilo en citrato de sodio ligado a las nanopartículas de oro durante la síntesis. La estructura de citrato de sodio tribásico se puede ver en la Figura 40.

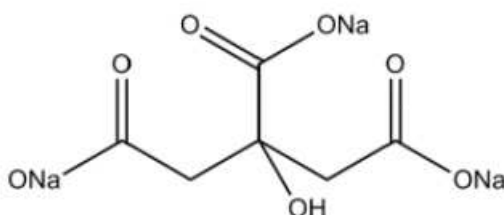


Figura 39. Estructura química del citrato de sodio.

También se observa en la Figura 40 los espectros FTIR del estándar de proteína A y del conjugado (nanopartículas de oro con proteína A), en el espectro del estándar de proteína A se observan las bandas asignadas a la amida I y amida II característicos de una proteína, se observa una fuerte señal a 1650 cm^{-1} que puede ser asignada a la tensión C=O de los enlaces amida de proteína a diferencia del espectro FTIR del conjugado se observa la aparición de un hombro visible a esta misma longitud de onda también se observan cambios en la fuerza y la posición de la banda de absorción, después de la unión de la proteína A con las nanopartículas de oro la banda amida II a 1539 cm^{-1} en el espectro FTIR de proteína A desaparece. Si bien se menciona que la banda amida I es la más estudiada para los cambios conformacionales en la estructura secundaria de las proteínas en el espectro del conjugado se observa que esta banda aparece a la misma longitud de onda que la amida I en el estándar de la proteína A pero a una menor intensidad de absorción. Esto sugiere que mediante la interacción con las nanopartículas los cambios en la estructura secundaria de proteína A se han producido. En los tres espectros se observa una amplia banda entre 3100 y 3400 cm^{-1} es atribuido a O-H y N-H banda stretching, los espectros de proteína A y del conjugado se observa un corrimiento hacia bajas longitudes de onda de O-H y N-H.

En el espectro FTIR del conjugado y el de las nanopartículas de oro las bandas a (1) 1035 cm^{-1} , (2) 900 cm^{-1} , (3) 840 cm^{-1} , and (4) 620 cm^{-1} son originados del alcohol

terciario del citrato de sodio estas bandas pueden ser asignadas a (1) the C-C-O asimétrico stretch, (2) CH₂-C-CH₂ stretch, (3) C-C-O simétrico stretch and (4) O-H fuera del plano bending, respectivamente (Smith Brian,1999).

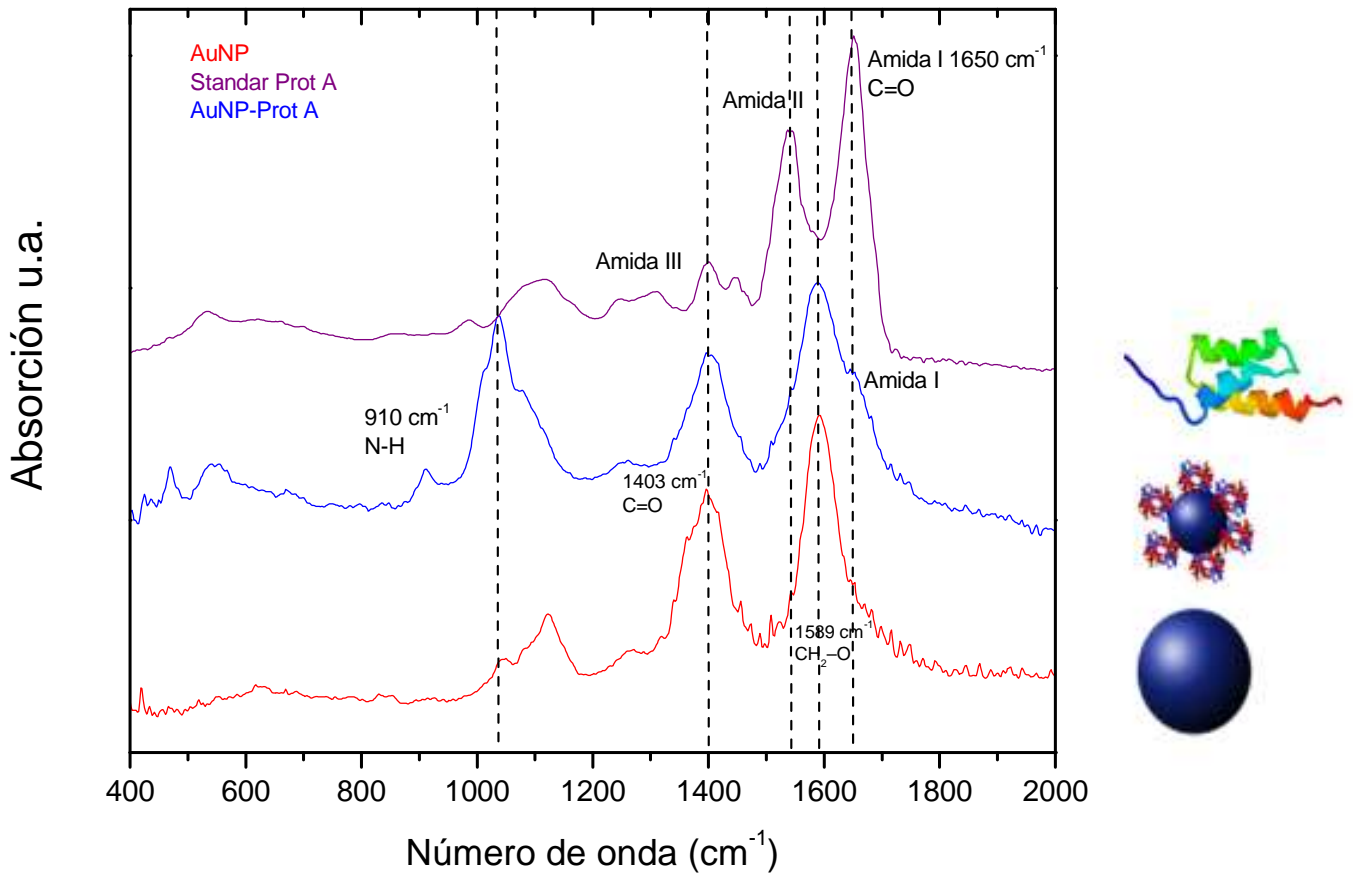


Figura 40 .Espectro FTIR de AuNP's de oro (rojo), Estándar de proteína A (purpura) y AuNP's-Proteína A (azul) (cada espectro es el promedio de tres replicas).

3.4.3 Estabilidad de los conjugados AuNP's-Proteína A.

Con la Figura 41, se pretende mostrar la estabilidad de los sistemas coloidales de nanopartículas de oro obtenidas en esta investigación. Se muestra el perfil de estabilidad del conjugado de nanopartícula-proteína A con el tiempo. Esta Grafica de concentración contra absorbancia a 520 nm durante 3 meses nos indica que las nanopartículas recubiertas con proteína A tienen una buena estabilidad y pueden ser usadas para la siguiente fase de la construcción del biosensor.

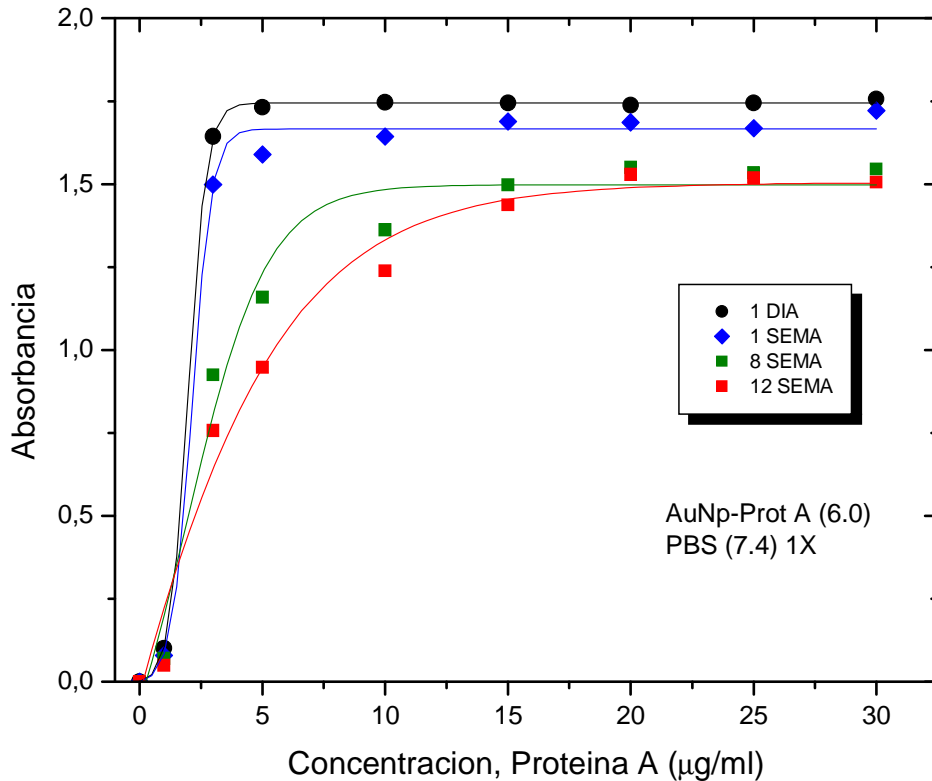


Figura 41. Absorción de (AuNP's) contra concentración de proteína A ($\mu\text{g/ml}$) durante tres meses.

3.5 Adherencia del anticuerpo anti-Salmonella sobre el Conjugado AuNP's -Proteína A y caracterización por UV-Visible.

La inmovilización de anticuerpos específicos y sus modificaciones estructurales son importantes mecanismos de bio-interfaz que son ampliamente investigados en el desarrollo de la afinidad de biosensores basados en inmunoensayos. La eficiencia en la detección de biomoléculas depende del éxito en la funcionalización de la superficie y de la inmovilización de la naturaleza de las biomoléculas. Las interacciones no específicas y mecanismos de desnaturalización son predominantes y podrían solaparse en la detección específica y suprimir la unión selectiva de biomoléculas que algunas veces indican resultados falsos positivos. La conjugación también puede estar condicionada por el diferente grado de afinidad del elemento de reconocimiento biológico por la superficie metálica.

Para garantizar la unión directa del anticuerpo al antígeno de interés, se buscó la conjugación orientada del anticuerpo es decir mediante el uso de la proteína A garantizamos la unión de la región Fc del anticuerpo a la proteína; y así la región Hipervariable de unión al antígeno quede expuesta al medio sin la pérdida de su actividad Figura 42.

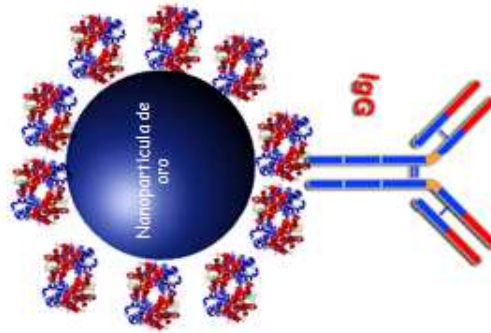


Figura 42. Esquema de unión del conjugado nanopartícula-proteína A a la región Fc del anticuerpo.

Proteína A cuenta con 5 dominios de unión IgG regiones A,B,C,D,E de acuerdo a Moks et al.,1986 sugieren que la región B así como la región E presentan actividad de unión con la región Fc del anticuerpo. Estudios estructurales de la proteína A han sugerido que 11 aminoácidos de las regiones de unión a IgG son esenciales para la unión a la parte Fc de las inmunoglobulinas (Deisenhofer, 1981). La mayoría de estos aminoácidos se cree que se encuentran localizados en dos regiones α hélices.

El aminoácido tirosina juega un rol importante en la reacción con la región Fc de las inmuoglobulinas (Ingvar, 1975).

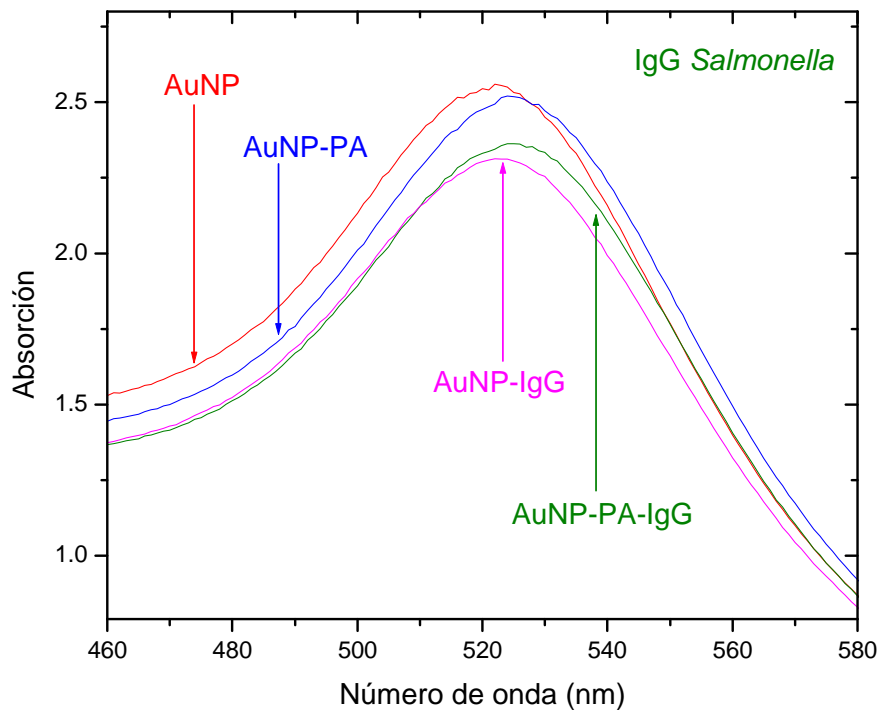


Figura 43. Espectros UV-Visible de nanopartículas con y sin proteína A y conjugadas con anticuerpo anti-salmonella.

En la Figura 44 se observan los espectros UV-Visible de las nanopartículas de oro del sistema AuNP's -PA y AuNP's -PA-IgG a diferentes concentraciones, la caracterización de UV-Visible revela que la unión del anticuerpo al sistema nanopartículas de oro-Proteína A no trajo un cambio significativo, sin embargo se observa un ligero corrimiento hacia longitudes de onda mayores, un ensanchamiento de la banda de absorción además de una disminución en la intensidad de absorción del arreglo AuNP's -PA-IgG probablemente debido a una concentración mayor de PBS empleada al conjugar concentraciones de IgG. Otro experimento que se llevo a cabo fue la conjugación de las nanopartículas con anticuerpos marcados con Fluoresceína de igual manera se observa un ligero corrimiento sobre el sistema AuNP's -Proteína A (Figura 45). Estos resultados coinciden con algunos autores (Kazuhiko et al; 2006) y también de acuerdo a la teoría de Mie la cual señala que el máximo de extinción de la luz y extinción de la sección transversal de las nanopartículas de metales nobles depende del índice de refracción del medio circundante, el crecimiento del índice de refracción permite un aumento en absorbancia y desplazamiento hacia el rojo de máximos del espectro (Nath & Chilkoti,2002).

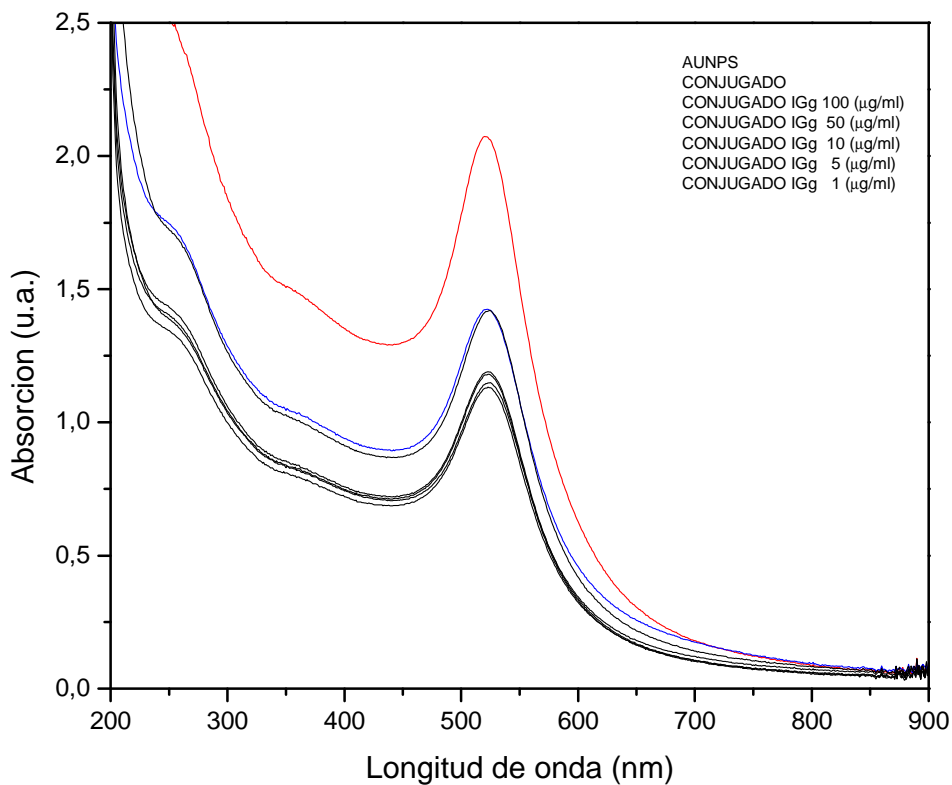


Figura 44. Espectro UV-Visible de AuNP's (rojo), AuNP's-Prot A (azul), diferentes concentraciones de Ab-Anti-salmonella en AuNP's-Prot A (negro).

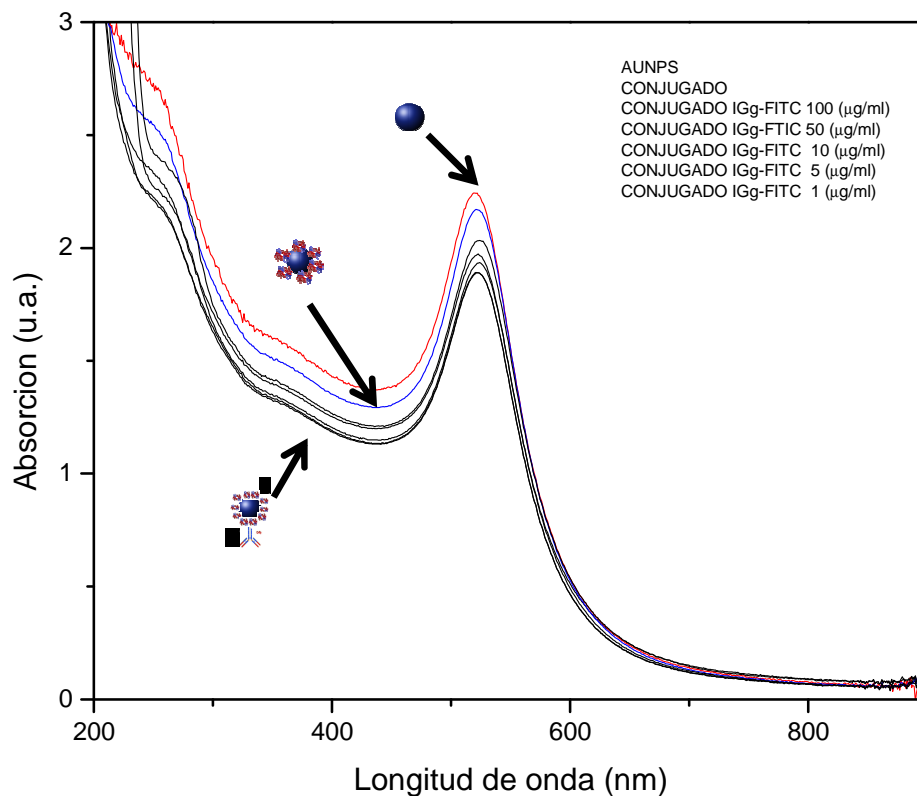


Figura 45. Espectro UV-Visible de AuNP's (rojo), AuNP's-Proteína A (azul), diferentes concentraciones de Ab-Anti-salmonella marcado con fluoresceína en AuNP's-Prot A (negro).

3.5.1 Caracterización del anticuerpo anti-Salmonella mediante Espectroscopia FTIR.

El anticuerpo anti-Salmonella fue caracterizado mediante FTIR, el espectro de absorción del anticuerpo obtenido es característico de una proteína, la banda amida I está presente alrededor de 1650 cm^{-1} , la amida II alrededor de 1539 cm^{-1} así como la banda N-H alrededor de 3300 cm^{-1} convolucionado con la banda O-H en 3430 cm^{-1} , hay bandas características en la región de los azúcares $900\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ y esto es debido a que el anticuerpo presenta aunque en menos concentración carbohidratos en su estructura, el enlace S-S de la estructura del anticuerpo está presente con una banda en 532 cm^{-1} adicionalmente hay enlaces muy débiles de C-H alrededor de 3000 cm^{-1} (Figura 46).

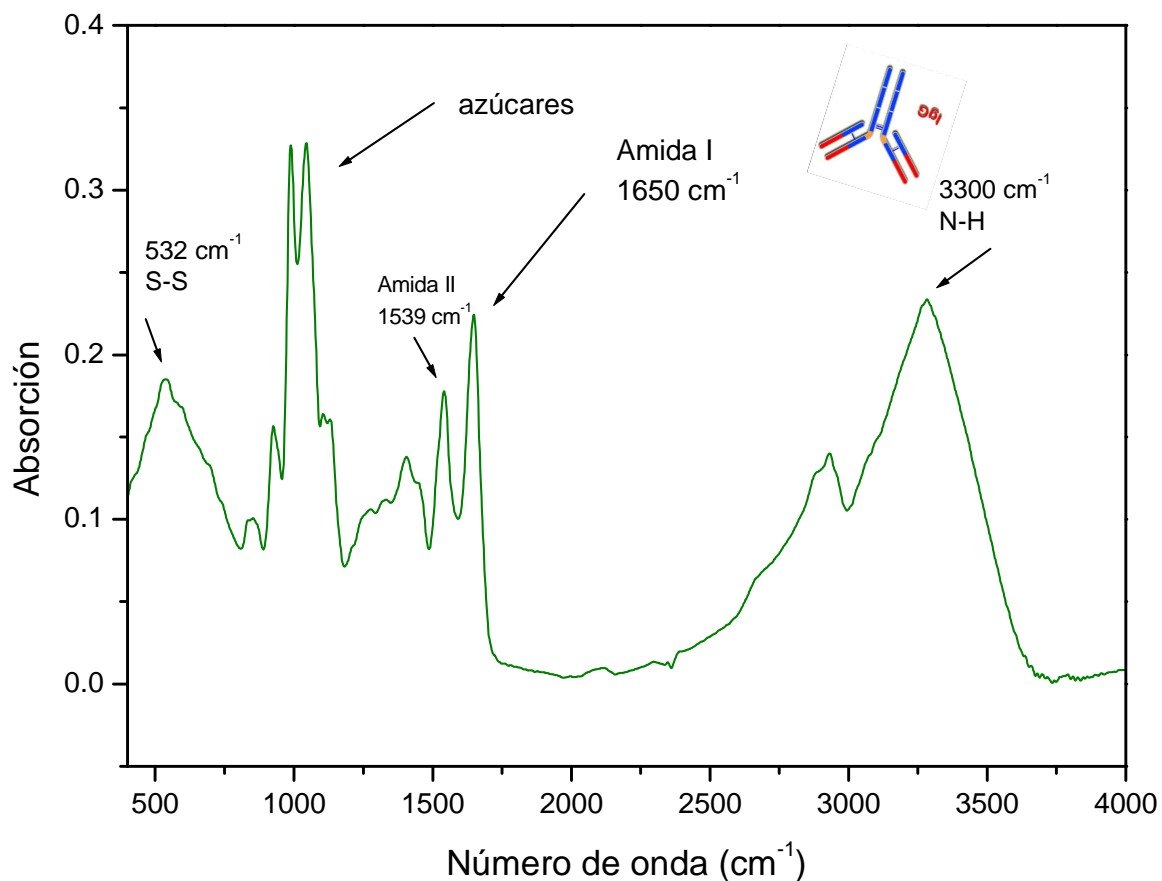


Figura 46. Espectro FTIR de anticuerpo anti-Salmonella. (cada espectro es el promedio de tres replicas).

3.5.2 Caracterización mediante FTIR del sistema AuNP's-Proteína A con el anticuerpo anti-Salmonella.

Se caracterizo mediante FTIR la unión del sistema AuNP's-Proteína A con el anticuerpo anti-Salmonella a diferentes concentraciones, se muestra en la Figura 47 los diferentes espectros de absorción FTIR del sistema AuNP's-Proteína A con las diferentes concentraciones del anticuerpo (1-8 µg/ml). El espectro de color rojo corresponde a las nanopartículas de oro donde se observan las bandas características ligadas al citrato reductor, el espectro en color azul corresponde al sistema AuNP's-Proteína A, se observan la banda correspondiente a la amida I, los siguientes espectros corresponden al sistema AuNP's-Proteína A con el anticuerpo anti-Salmonella a diferentes concentraciones, nosotros encontramos la misma estructura pero con algunas diferencias, es posible observar que en los arreglos (AuNP's-Proteína A-ab) se hacen presentes en la región de los azúcares 900-1200 cm⁻¹ bandas que corresponden

a estos, aparecen nuevas bandas en 2941, 977, 854 cm^{-1} y el pico característico de el enlace S-S de la cadena a 532 cm^{-1} está presente.

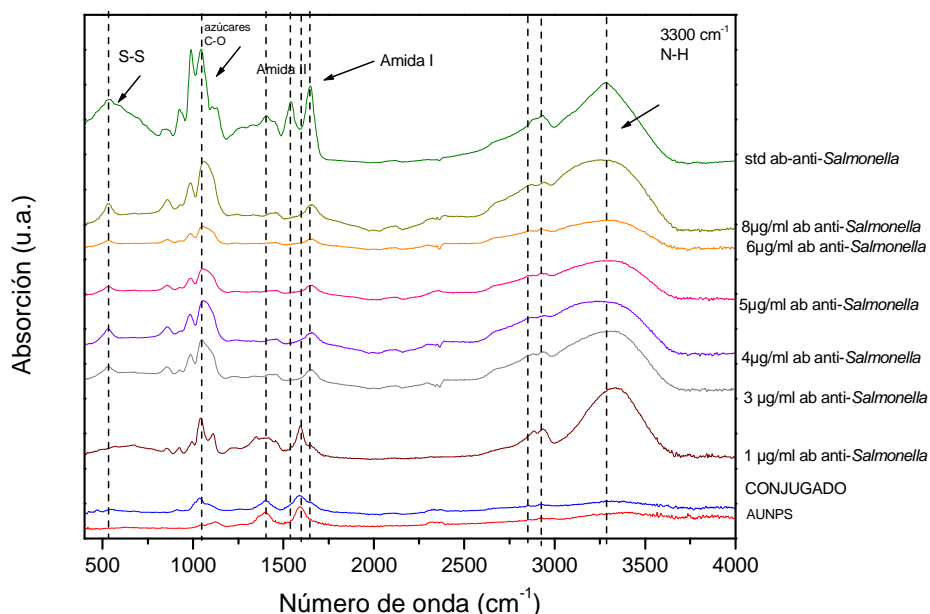


Figura 47 .Espectros FTIR de AUNP's (rojo), AUNP's- proteína A (azul) y AuNP's-Ab anti-Salmonella diferentes concentraciones 1-8 $\mu\text{g/ml}$ (cada espectro es el promedio de tres replicas).

Para la conjugación del anticuerpo al sistema AUNP's- proteína A se decidió trabajar a una concentración de anticuerpo anti-Salmonella de 10 $\mu\text{g/ml}$.

En la Figura 48 se presentan los espectros FTIR de las nanopartículas de oro, conjugado y arreglo, así como los estándares de la proteína A y del anticuerpo anti-salmonella, todos acortados en la región de 500 a 2000 cm^{-1} . Cada espectro presenta semejanzas y diferencias entre cada uno de ellos. En primer lugar tenemos el espectro de las nanopartículas de oro analizado anteriormente se observan las bandas asignadas al citrato en 1403 y 1589 cm^{-1} , posteriormente se observa el espectro del conjugado donde vemos que se hacen presentes las bandas correspondientes a los grupos citratos observados en el espectro de las nanopartículas, pero presenta algunas diferencias, después de la unión con la proteína A, se observa una banda en 1649 cm^{-1} que corresponde a la banda de la amida I que no está presente en el espectro de las nanopartículas, también se observa una disminución de la banda en 1112 cm^{-1} y la aparición de una nueva banda a 1044 cm^{-1} . En el espectro del estándar de la proteína A se observan las bandas asignadas a la amida I y II en 1649 y 1539 cm^{-1} respectivamente en donde solo la banda amida I es visible en el espectro del conjugado, desapareciendo la banda correspondiente a la amida II, en el espectro del estándar de la proteína A podemos observar que no se presentan bandas en la región

de los azúcares y esto es obvio porque nuestra proteína no presenta hidratos de carbono en su estructura. Posteriormente se muestra el espectro del arreglo el cual es formado por las nanopartículas unidas a su superficie con proteína A y anticuerpo anti-*Salmonella* se puede observar la presencia de la banda de 1589 cm^{-1} que corresponde a la presencia del citrato que proviene de las nanopartículas de oro, también se observa la banda en 1649 cm^{-1} asignada a la amida I, esta banda también se hace presente en el espectro del conjugado, nuevamente desaparece la banda amida II y la banda correspondiente al citrato en 1403 cm^{-1} está presente pero presenta un ensanchamiento, este espectro a diferencia del conjugado presenta bandas en la región de los azúcares coincidiendo en algunas bandas con el estándar del anticuerpo en esta misma región algunas bandas sufren algunos ligeros corrimientos como consecuencia de la unión del anticuerpo al conjugado. El espectro del estándar del anticuerpo presenta las bandas características de una proteína como la amida I y II y presenta bandas intensas en la región de los azúcares y esto es característico de su estructura ya que los anticuerpos son glicoproteínas, también se observa la banda característica en 532 cm^{-1} debida al enlace S-S de la estructura de los anticuerpos.

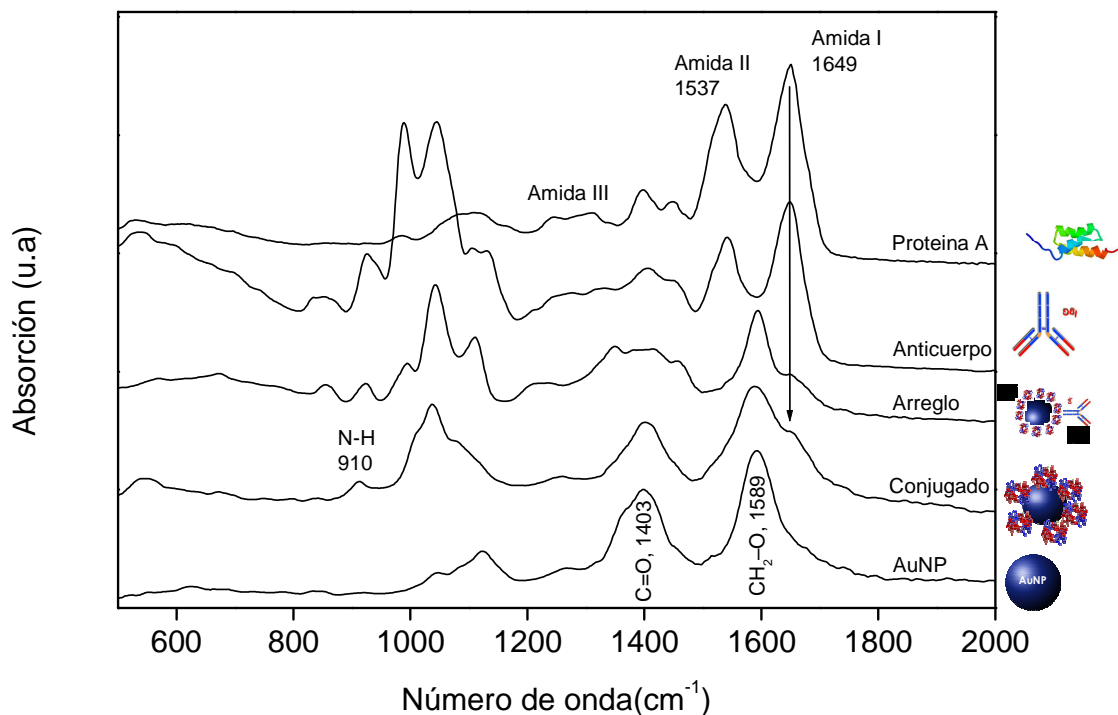


Figura 48. Espectros FTIR de AUNP's, conjugado AUNP's- proteína A, estándar Proteína A , arreglo AUNP's- proteína A-ab, estándar anticuerpo anti-*Salmonella*, arreglo AUNP's- proteína A-ab-salmonella,(cada espectro es el promedio de tres replicas).

3.6 Preparación de la cepa *Salmonella*.

A partir de un cultivo puro de microorganismo *Salmonella*, en un tubo inclinado conteniendo caldo soya tripticaseina, se sembraron las cepas de prueba por estría cruzada en placas de agar soya tripticaseina y se incubaron a 37°C durante 24 h. como se puede observar en la Figura 49, posteriormente se eligieron colonias del mismo tipo morfológico y con un asa bacteriológica se transfirió la biomasa a un tubo que contenía caldo soya tripticaseina y nuevamente se incubó a 37°C durante 24 h. Al observarse el crecimiento en medio líquido de las cepas de prueba, se procedió a realizar el ajuste de su concentración con el fin de estandarizar el inóculo de cada ensayo. Para ello, el cultivo se diluyó y se ajustó al tubo número 0.5 del Nefelómetro de McFarland, que equivale a tener una concentración de 3×10^9 UFC/ml. El Nefelómetro de McFarland es un estándar de turbidez que permite estimar la concentración de bacterias en una suspensión.

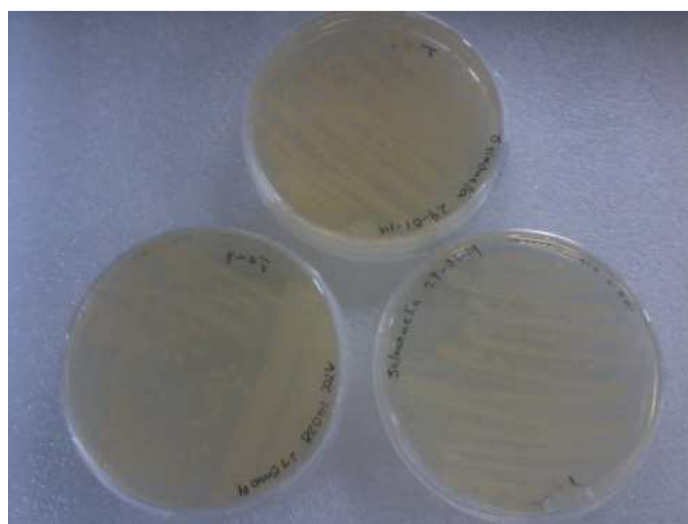


Figura 49.- Cepas de *Salmonella* en Agar Soya Tripticaseina.

3.6.1 Caracterización FTIR de la bacteria *Salmonella*

Posteriormente se caracterizo mediante FTIR a la bacteria *Salmonella*, en la Figura 50 se observa la presencia de varias bandas características, y la mayoría de ellos representan vibraciones de grupos funcionales en los componentes principales de biomoléculas como proteínas, ácidos grasos, ácidos nucleicos e hidratos de carbono.

En la tabla 9 se muestra las principales bandas asignadas a los diferentes grupos funcionales presentes en las diferentes estructuras de las bacterias.

Los espectros FTIR medidos para las células intactas de bacterias son generalmente complejos y los picos son amplios debido a la superposición de las contribuciones de

todas las biomoléculas presentes en una célula bacteriana. En la ausencia de agua, Naumann et al., recomiendan que los cinco grandes regiones de absorbancia en los espectros FTIR que deben ser analizados para la identificación de bacterias son : región espectral 3000-2800 cm^{-1} es la región de ácidos grasos (región I); 1700-1500 cm^{-1} contiene las bandas amida I y II de proteínas y péptidos (II Región); 1500-1200 cm^{-1} es una región mixta de ácido graso de vibraciones de flexión, proteínas y compuestos de fosfato (región III); 1200-900 cm^{-1} contiene bandas de absorción de los hidratos de carbono en paredes celulares microbianas (IV Región), y 900 a 700 cm^{-1} es la "región de huellas digitales" que contiene absorbancias débiles pero muy singulares que son características de bacterias específicas (región V). Regiones I y II son los más útiles para la identificación de bacterias de rutina; Sin embargo, las otras regiones se pueden utilizar para entender mejor las variaciones menores en la estructura y composición de la bacterias. La región de huella digital es significativa para la discriminación de los microorganismos a nivel de cepa.

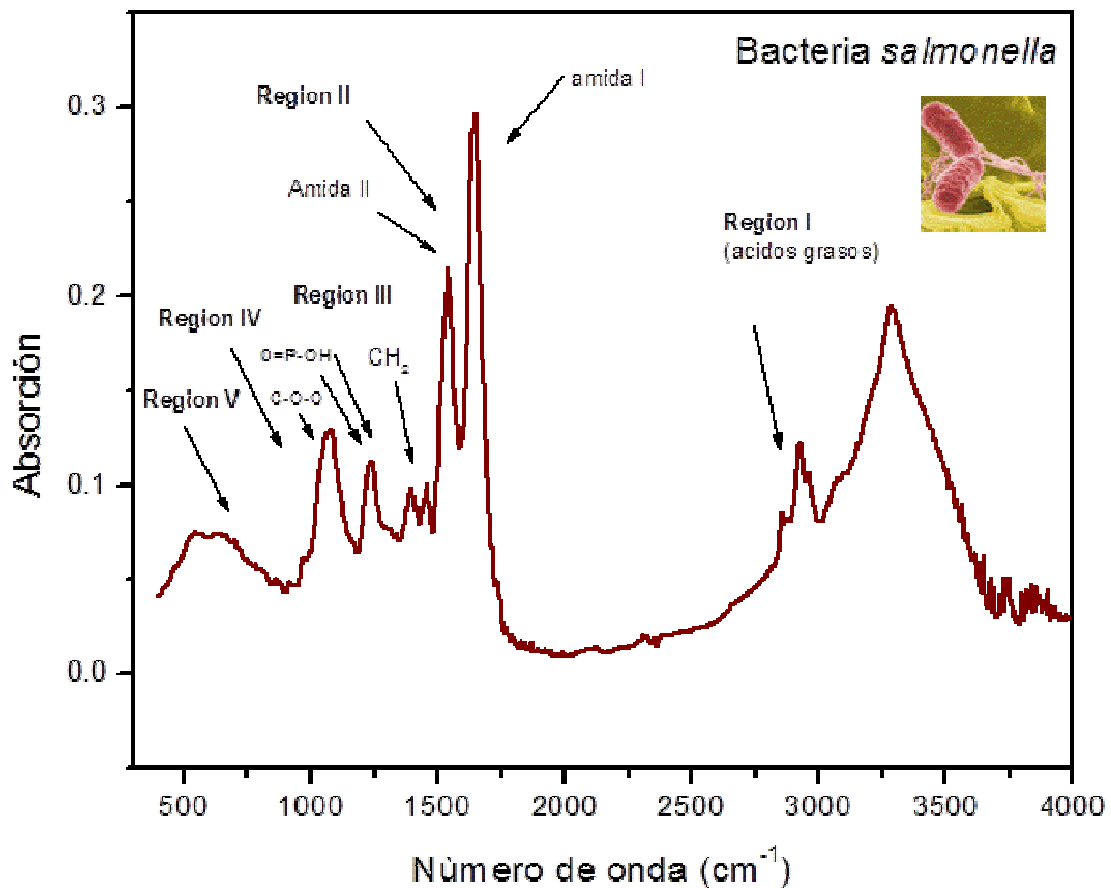


Figura 50. Espectro típico FTIR de una bacteria Gram-negativa Salmonella (cada espectro es el promedio de tres replicas).

Tabla 9 Asignación de los grupos funcionales asociados con una mayor vibración de las bandas en el FTIR de la bacteria.

Wave number (cm ⁻¹)	Molecular vibrations of functional groups and the biomolecule contributor
3200	N-H stretching of amide A in proteins
2955	C-H asymmetric stretching of -CH ₃ in fatty acids
2930	C-H asymmetric stretching of >CH ₂ in fatty acids
2898	C-H stretching of >C-H of aminoacids
2870	C-H symmetric stretching of -CH ₃ in fatty acids
2850	C-H symmetric stretching of >CH ₂ in fatty acids
1740	>C=O stretching of lipid esters
1715	>C=O stretching of ester, in nucleic acids and carbonic acids
1695-1675	Amide I band components of proteins
1655	Amide I of α -helical structures of proteins
1637	Amide I of β -pleated sheet structures of proteins
1550-1520	Amide II band of proteins
1515	Tyrosine band
1468	C-H deformation of >CH ₂ in lipids proteins
1415	C-O-H in-plane bending in Carbohydrates, DNA/RNA backbone, proteins
1400	C=O symmetric stretching of COO- group in aminoacids, fatty acids
1310-1240	Amide III band components of proteins
1240	P=O asymmetric stretching of phosphodiester in phospholipids
1200-900	C-O-C, C-O dominated by ring vibrations in various polysaccharides
1085	P=O symmetric stretching in DNA, RNA and phospholipids
720	C-H rocking of >CH ₂ in fatty acids, proteins
900-600	"Fingerprint region"

3.7 Dispersion Raman y SERS (Surface-Enhanced Raman Scattering).

La espectroscopia Raman es adecuada para la detección y el análisis de los cambios implicados en las modificaciones de las proteínas en la conformación de unión o mecanismos de interacción (Ahern & Garrell, 1991). La banda amida III en el espectro Raman se ha utilizado para determinar con precisión la conformación secundaria de la proteína (S. Cai & B. R. Singh, 2004). En el presente trabajo, la espectroscopia Raman se utilizó para estudiar la estructura nativa y la interacción entre las estructuras de la proteína A y el anticuerpo anti-*Salmonella* unidos a la superficie de la nanopartícula.

En los anticuerpos IgG predomina la estructura β -hoja (47%), 7% de α -hélices. Una vez que se contaba con los conjugados y arreglos así como con los estándares de proteína A y anticuerpo anti-*Salmonella* se hizo una caracterización preliminar de cada uno de ellos mediante dispersión Raman para observar el efecto SERS que producían las nanopartículas de oro al unirse al elemento de reconocimiento. La Figura 51 muestra los espectros Raman de las nanopartículas de oro, estándar de la

proteína A, estándar del anticuerpo *Salmonella* y los espectros SERS del conjugado y arreglo.

Como se muestra en la Figura 51 se observa el espectro Raman de las nanopartículas se observan bandas en 1375, 1448, 1558 cm^{-1} son asignadas a las extensiones simétricas de los carboxilatos, mientras que el pico a 1595 cm^{-1} es asignado a las extensiones asimétricas de los carboxilatos. También se muestra el espectro Raman de la proteína A, se muestra claramente sus características conformaciones secundarias nativas, la banda amida I alrededor 1659 cm^{-1} y una banda en 1336 cm^{-1} en la región amida III se observaron en el espectro de proteína A y están relacionadas con sus características de la estructura secundaria α -hélice (S. Cai & B. R. Singh, 2004). En el espectro de proteína A también se observó una banda en 933 cm^{-1} asociada con el modo de vibración del grupo terminal CH_3 de la α -hélice estructura. El espectro SERS del conjugado Au-Proteína A se observa un espectro similar al de las nanopartículas de oro se hacen presente las bandas en 1375 y 1558 cm^{-1} que proviene de las nanopartículas y están asociados con las extensiones simétricas de los carboxilatos, se observa también presencia de nuevas bandas que no están presentes ni en el espectro de las nanopartículas ni en el del estándar de proteína A. Se muestra el espectro Raman del estándar del anticuerpo anti-*salmonella* se observan las bandas características correspondientes a la amida I y se observa una banda en la región de los azúcares que no está presente en el espectro del estándar de proteína A. Finalmente se muestra el espectro SERS del arreglo presenta algunas similitudes con el espectro del estándar del anticuerpo anti-*salmonella*, se observa una banda similar en la región de los azúcares, se observa una banda intensa centrada en 680 cm^{-1} la banda de 1558 cm^{-1} se ensancha y disminuye un poco de intensidad, la banda de 1375 cm^{-1} desaparece totalmente y aparecen nuevas bandas en 1293 y 1410 cm^{-1} . Todos estos cambios de bandas en los espectros raman nos indican la construcción del biosensor.

En la tabla 10 se muestran algunas frecuencias de vibración Raman en anticuerpos se indican en negrita para la caracterización de la intensidad Nivel: vw: muy débil, w: débil, m: media, s: fuerte, vs: muy fuerte (Kengne-Momo et al., 2012).

Tabla 10: Resumen de los diferentes modos de vibración Raman de la proteína A, anticuerpo IgG y de la interacción que se da entre ellos.

Frequency (cm ⁻¹)	Compound	Assignment	Intensity
647	SpA/IgG	Tyrosine	vw/m
758	SpA/IgG	Tyrosine	vw/m
832	SpA/IgG	Tyrosine	w/m
857	SpA/IgG	Tyrosine	w/m
880–920	SpA/IgG	ρ CH ₂	m/m
933	SpA	δ CH ₃	w
958	SpA/IgG	ρ CH ₃	w/w
1004	SpA/IgG	Phenylalanine	s/vs
1032–1170	SpA/IgG	ν C–C or alkyl C–N	w/w
1243	IgG	Amide III	vs
1336	SpA	Amide III	vs
1416	SpA/IgG	Tryptophan	s/vs
1451	SpA/IgG	ρ CH ₂	vs/vs
1552	SpA/IgG	Tryptophan	w/w
1610	SpA/IgG	Phenylalanine	m/m
1659	SpA	Amide I	vs
1673	IgG	Amide I	vs
2860	SpA/IgG	ν C–H	m/w
2940	SpA/IgG	ν C–H	m/w

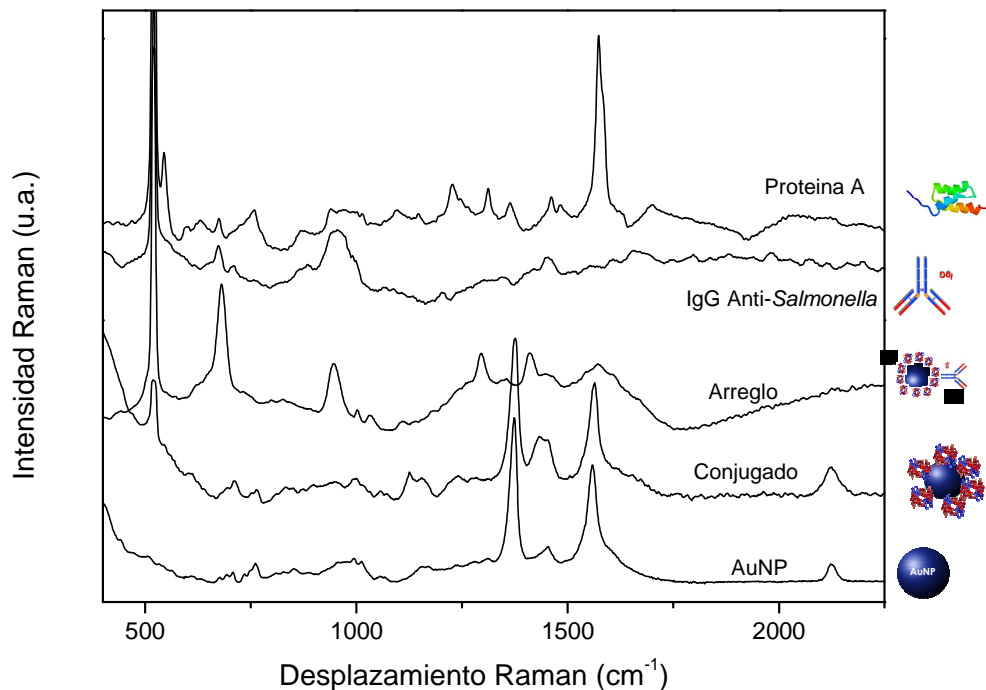
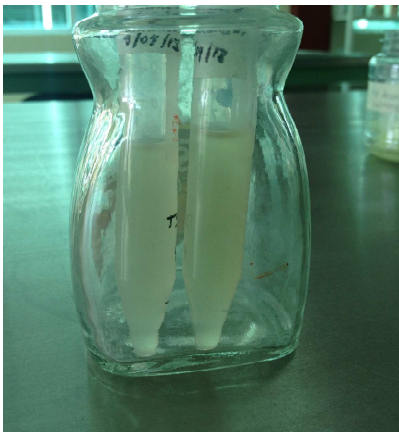


Figura 51. Espectro Raman de AUNP's, estandar proteína A, ab anti-Salmonella y espectros SERS de el conjugado (AUNP's- proteína A), arreglo (AUNP's- proteína A-ab).

Se realizó la prueba serológica de aglutinación la cual consiste en que un antígeno particulado (ejemplo: bacterias, eritrocitos), al ser puesto en contacto con su anticuerpo específico en proporciones óptimas, se une por medio de enlaces cruzados. Este complejo de unión agrupa, produciendo una reacción de aglutinación. En la

figura 52 inciso a) se observa la muestra de *Salmonella* utilizada en este experimento a una concentración de 3×10^9 UFC/ml. Figura 52 inciso b) diferentes concentraciones de anticuerpo anti-*Salmonella* con el conjugado AUNP's-proteína A fueron evaluadas con el antígeno de interés. Durante el experimento no se observa una aglutinación importante posiblemente pues se necesita que tanto el antígeno como el anticuerpo estén en concentraciones óptimas. Cuando cualquiera de los reaccionantes están en exceso no se pueden formar grandes agregados antígeno-anticuerpo posiblemente esta haya sido la causa de no poder observar la aglutinación claramente, aunque cabe señalar que las concentraciones más bajas de anticuerpo fueron las que mostraron un poco mas de aglutinación.

a)



b)

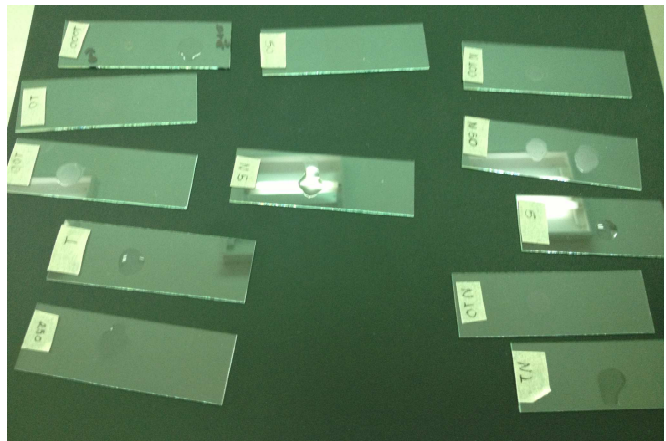


Figura 52. a) *Salmonella* a una concentración de 3×10^9 UFC/ml. b) Prueba serológica de precipitación diferentes concentraciones de anticuerpo anti-*Salmonella* fueron usadas.

3.8 Detección de *Salmonella* mediante Microscopía de fluorescencia.

Se llevo a cabo también la prueba de fluorescencia para la detección de *salmonella* mediante el arreglo AUNP's-proteínaA-anticuerpo-anti-*salmonella* FITC. La primera prueba consistió en llevar a cabo la unión del anticuerpo con el antígeno *Salmonella* (3×10^9 UFC/ml). Estas muestras fueron fijadas en un portaobjeto e incubadas a 37°C por una hora posteriormente fueron lavadas con PBS y se les adiciono $15 \mu\text{l}$ de vectashield mounting médium se les puso un cubreobjetos y se almaceno para fluorescencia (Figura 53).

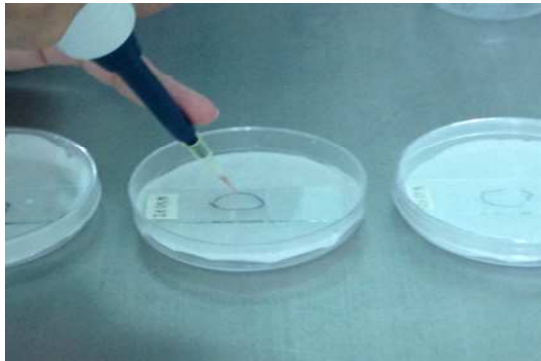
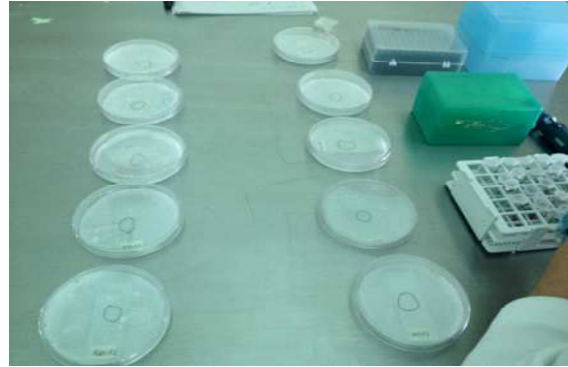


Figura 53. Fotos del procedimiento de la preparación de muestras del sistema AUNP's-proteína A con anticuerpo anti-Salmonella marcado con fluoresceína y bacteria Salmonella.

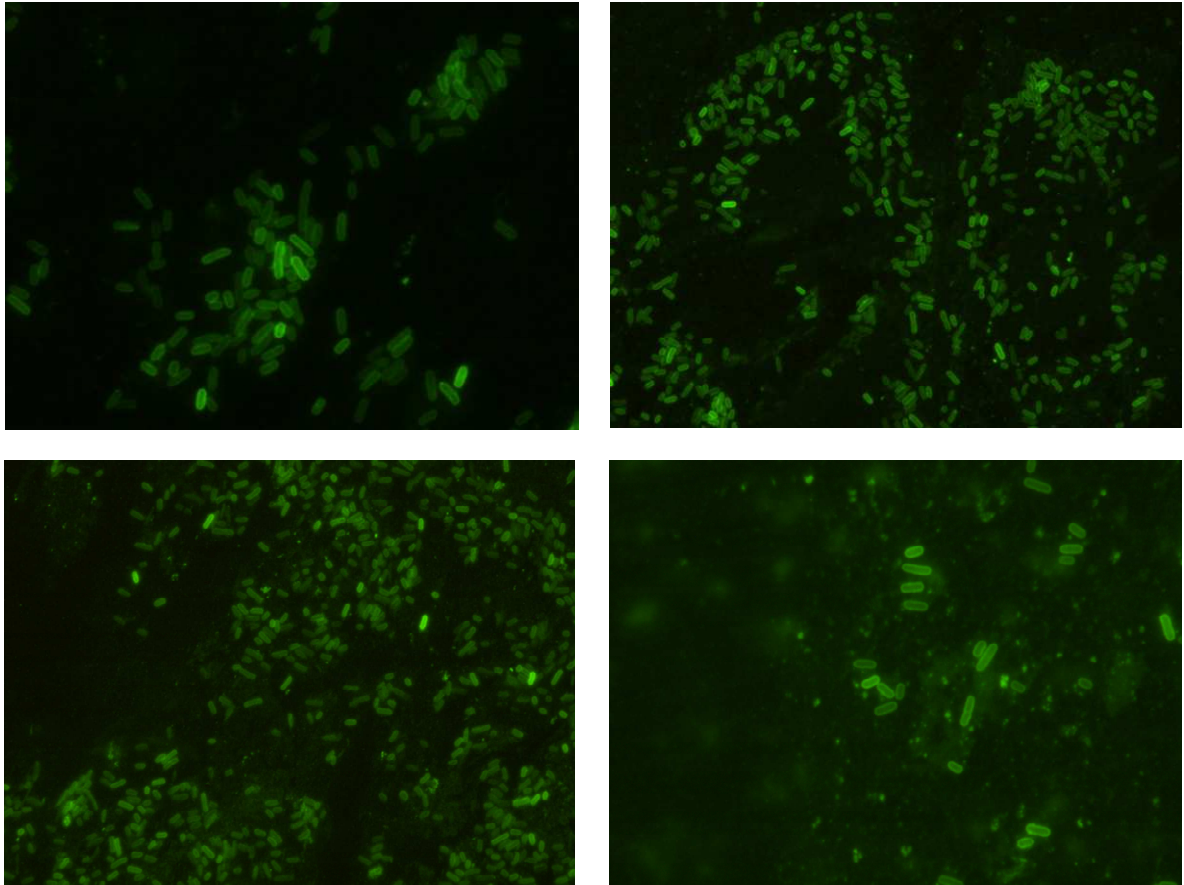
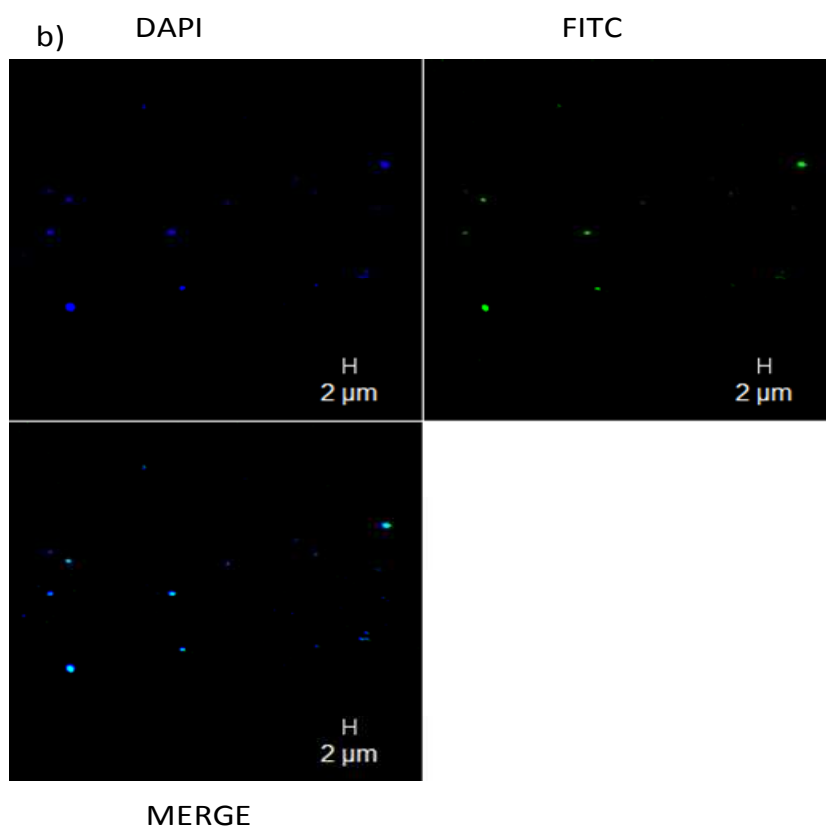
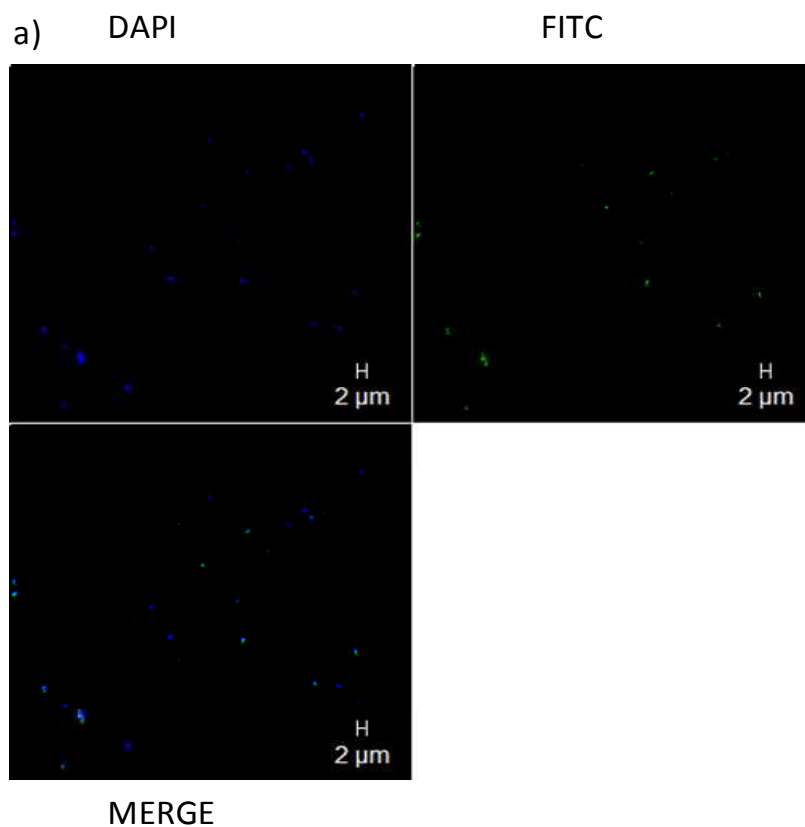


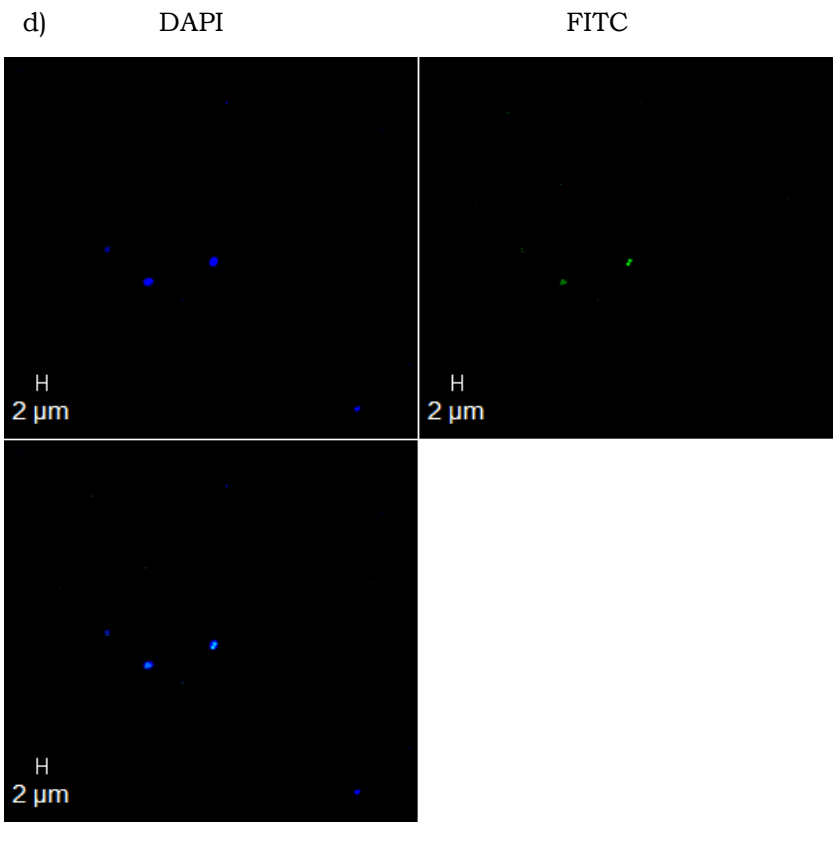
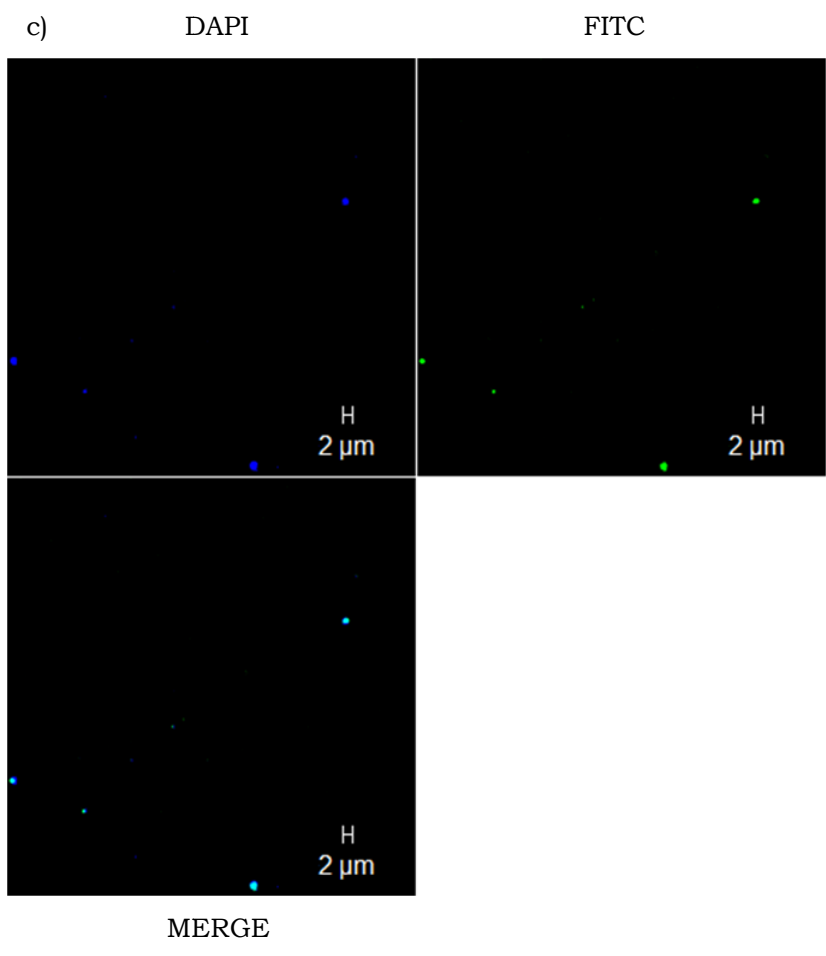
Figura 54. Imágenes de microscopia de fluorescencia usando anticuerpo anti-Salmonella marcado con fluoresceína, en verde antígeno Salmonella.

Este fue un experimento preliminar para buscar la concentración adecuada de anticuerpo anti-*Salmonella*. Así como una manera de verificar que nuestro anticuerpo policlonal anti-*salmonella* FTIC era capaz de reconocer al antígeno. Como se muestra en la Figura 54 se observan diferentes imágenes de microscopia de fluorescencia se observa que el anticuerpo fue capaz de reconocer a la bacteria *salmonella* ya que esta última presenta fluorescencia en este caso de color verde debido a la unión que se llevo a cabo entre antígeno y anticuerpo marcado con fluoresceína. También es posible observar la forma de la bacteria en este caso *salmonella* tiene una forma de bacilo que se hace presente en las imágenes mostradas de manera visible y con estructura definida característico de la bacteria. Este es nuestro control donde podemos decir que nuestro anticuerpo es eficiente contra el antígeno *Salmonella* ya que se presenta la emisión de la fluorescencia.

Otro experimento consistió en evaluar mediante fluorescencia diferentes concentraciones de bacteria *Salmonella*, desde 3×10^9 UFC/ml hasta 3×10^2 UFC/ml las imágenes se muestran en la Figura 55.

Las preparaciones se montaron con vectashield-DAPI, es un reactivo que permite conservar la fluorescencia y tiene DAPI un fluorocromo que tiñe DNA en color azul, así que en un canal se observó el DAPI, que en este caso marcó a las bacterias y en el otro canal se buscó la marca del anticuerpo (FITC), la tercera figura corresponde a la superposición de ambos fluorocromos, la cual muestra una coincidencia de ambos marcadores. De este experimento se puede observar el reconocimiento de la bacteria por el arreglo biosensor desarrollado en este trabajo.





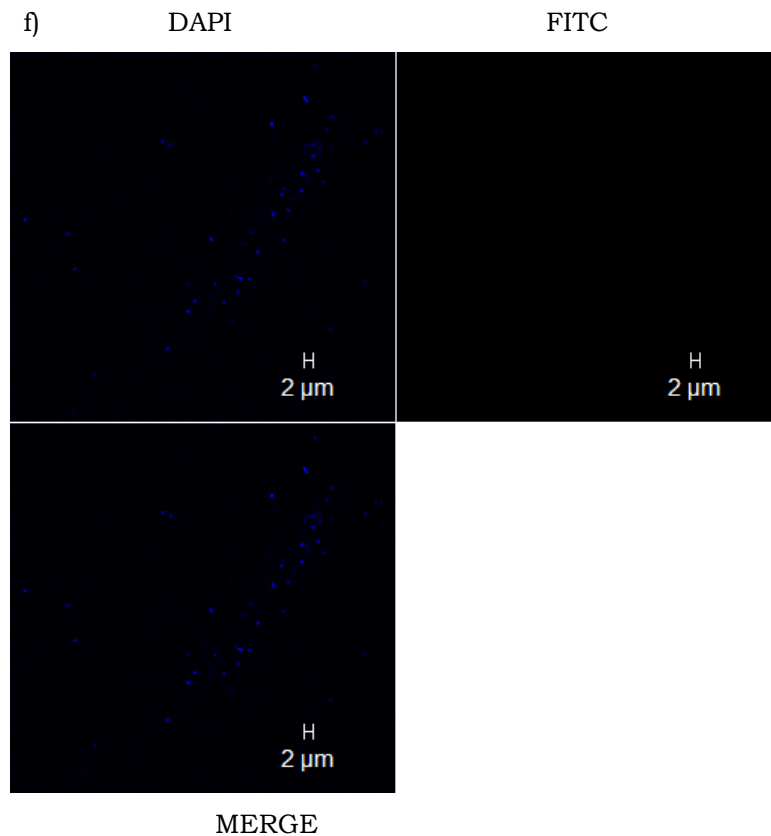
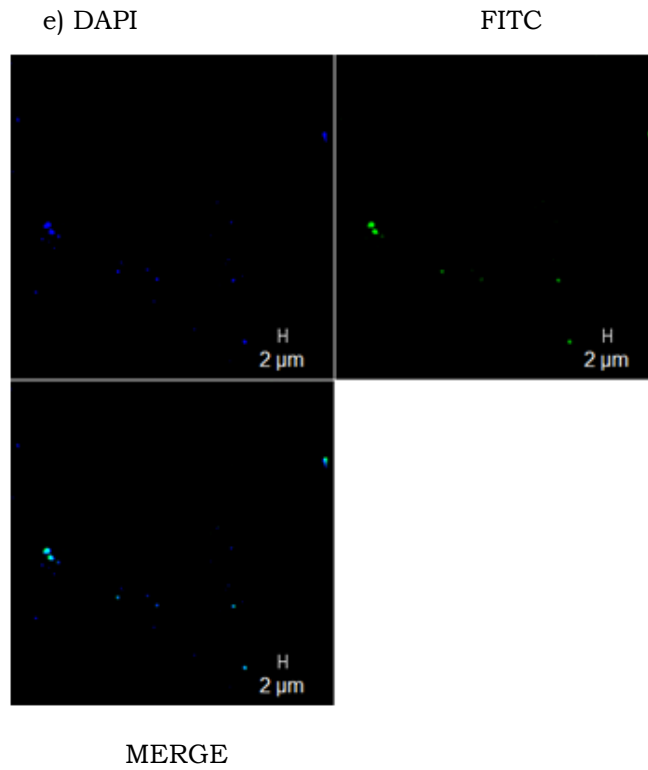
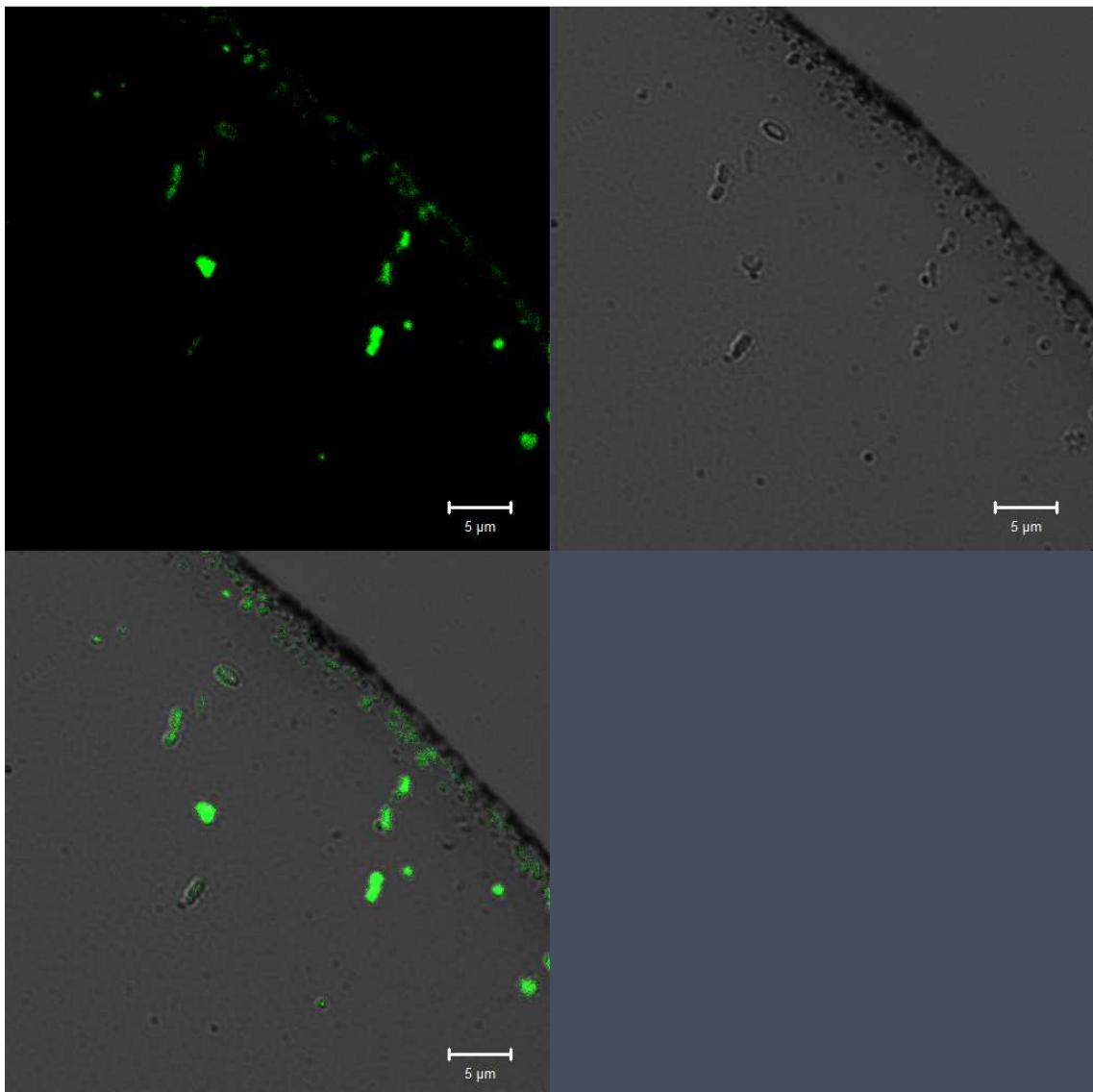
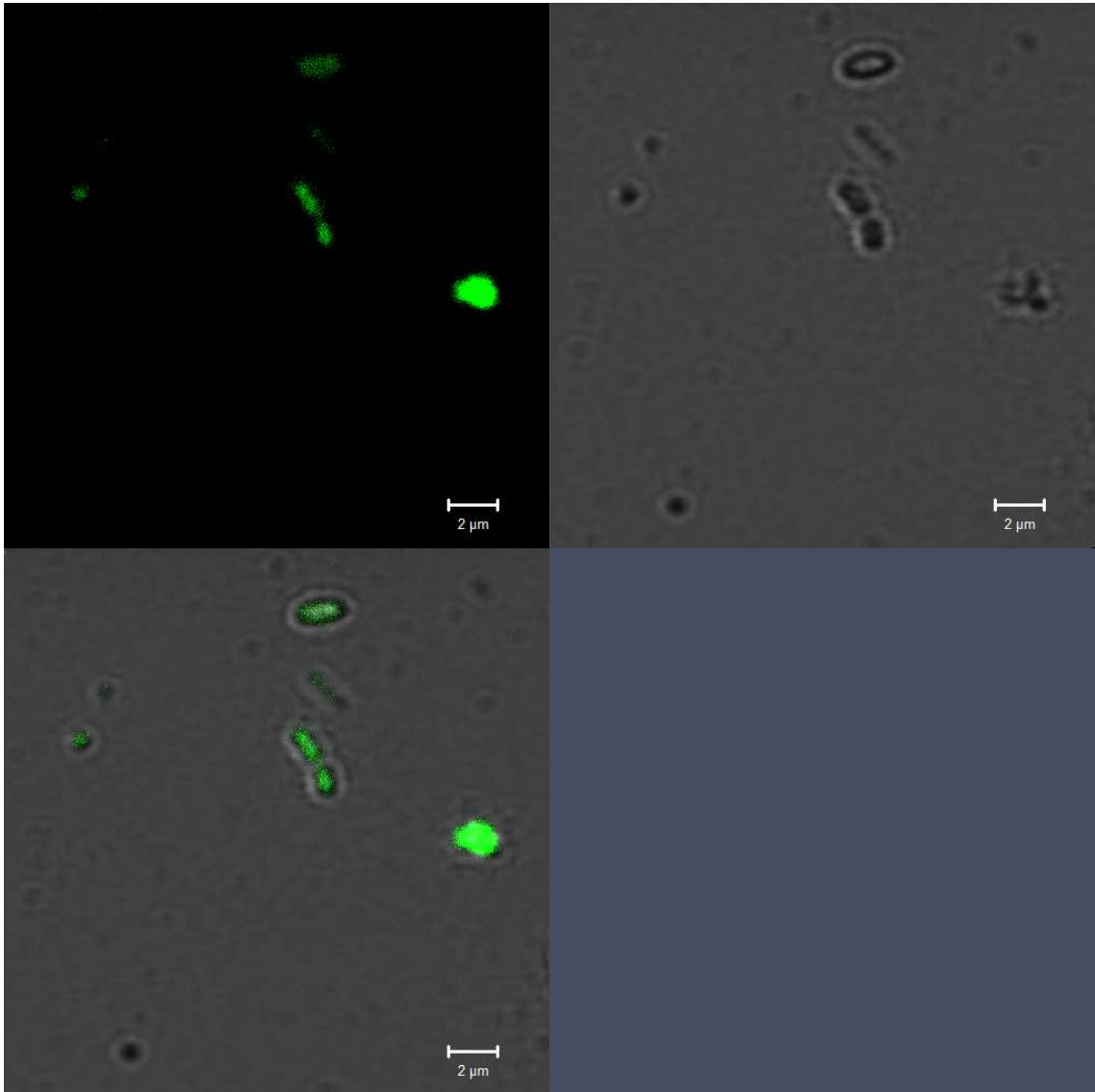
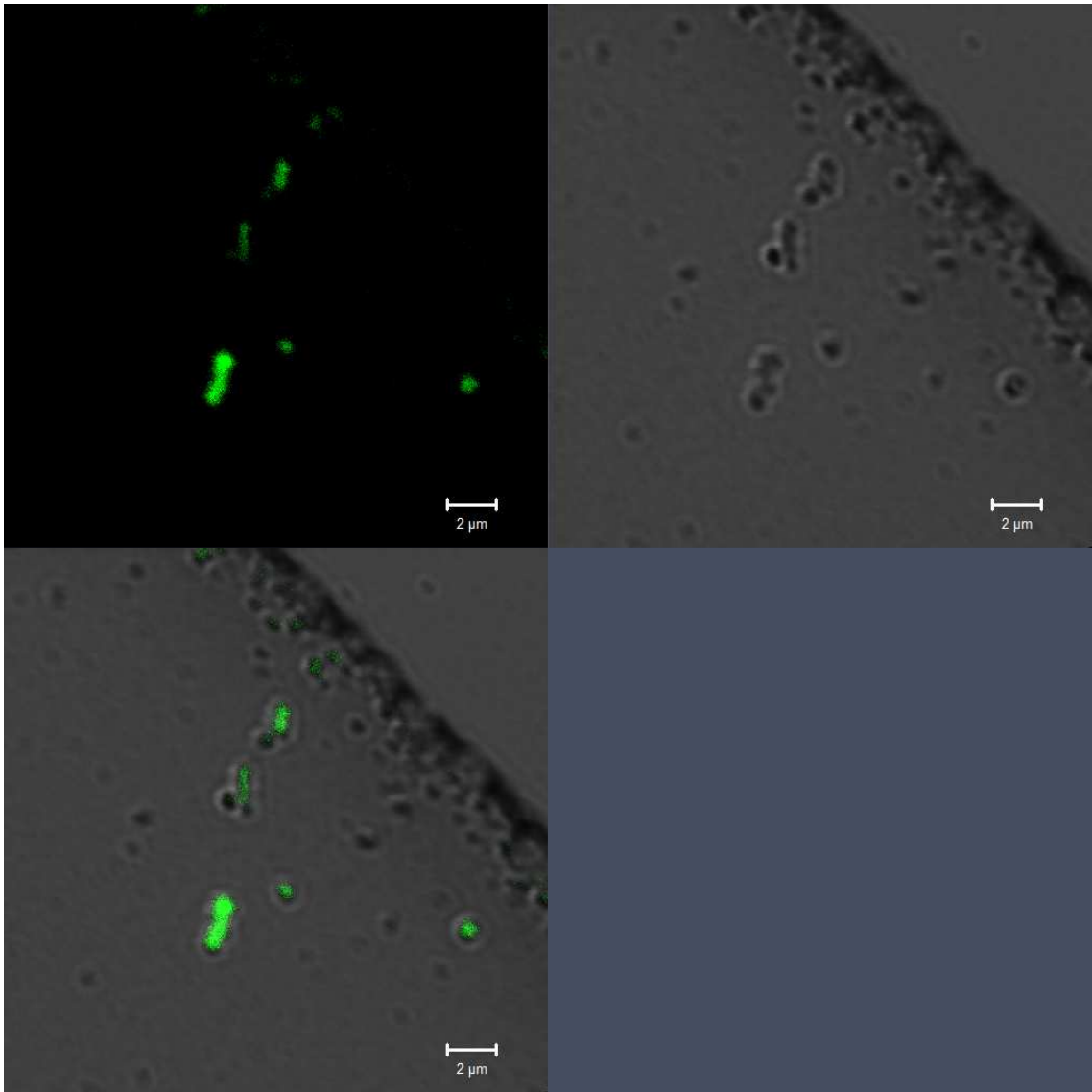


Figura 55. Imágenes de microscopía de fluorescencia a) *Salmonella* 3×10^9 UFC/ml, b) *Salmonella* 3×10^7 UFC/ml, c) *Salmonella* 3×10^5 UFC/ml, d) *Salmonella* 3×10^4 UFC/ml, e) *Salmonella* 3×10^3 UFC/ml, f) *Salmonella* 3×10^2 UFC/ml con nanopartículas de oro funcionalizadas con anticuerpo anti-*Salmonella* marcado con FITC.

Otras mediciones que se llevaron a cabo consistieron en evaluar una concentración de bacteria *salmonella* utilizando el arreglo biosensor para comprobar el reconocimiento a una concentración de 3×10^7 UFC/ml. Como se muestra en la Figura 56 podemos observar diferentes imágenes de fluorescencia en campo claro y campo oscuro donde la detección entre el biosensor y la bacteria se hizo evidente. Se observa a la bacteria teñida en color verde estas bacterias teñidas coinciden en ambos campos y en la superposición de estos, también se observa la forma de bacilo característica de la bacteria. Se muestran varias imágenes para tener una mayor evidencia de la detección.







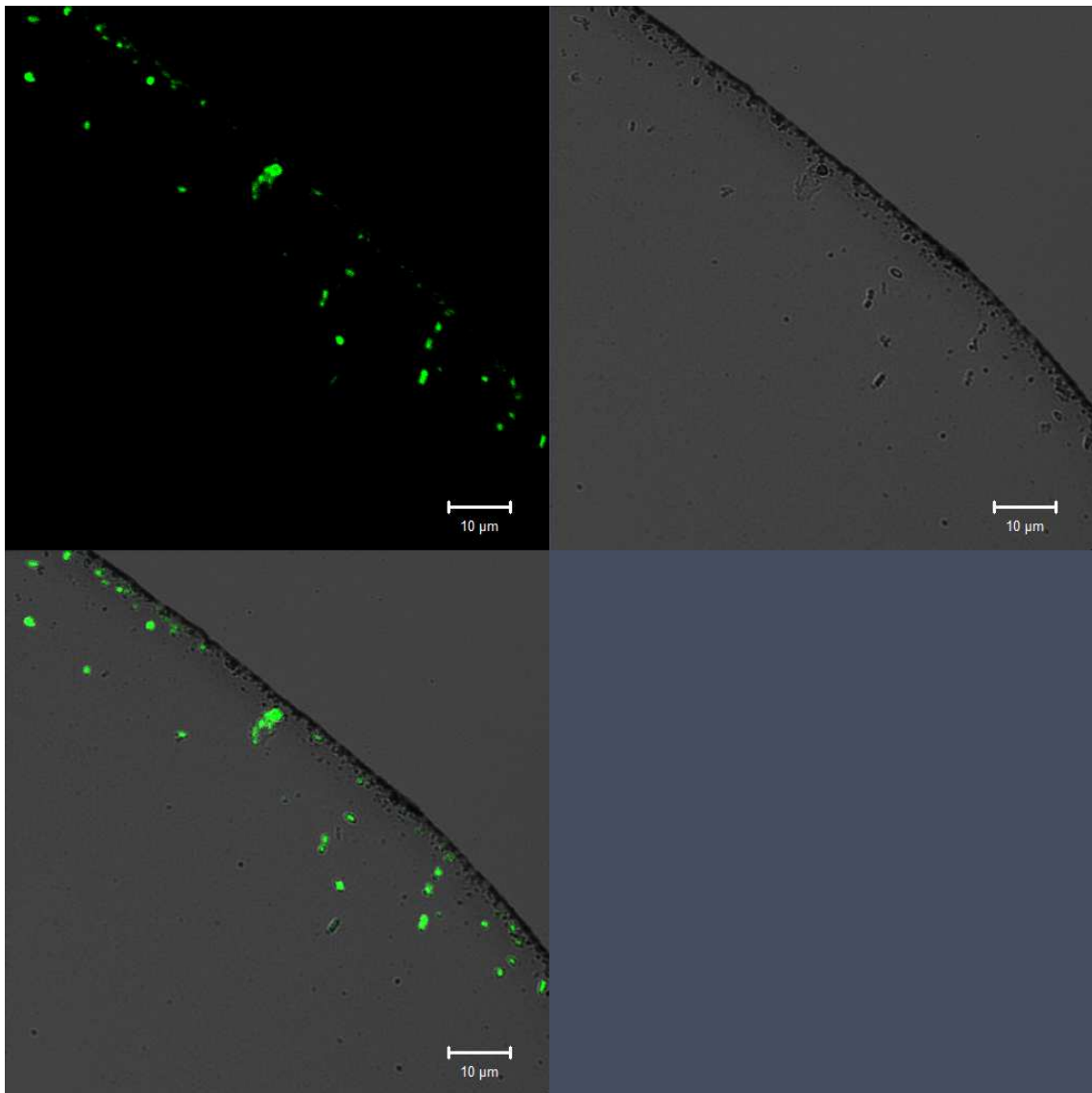
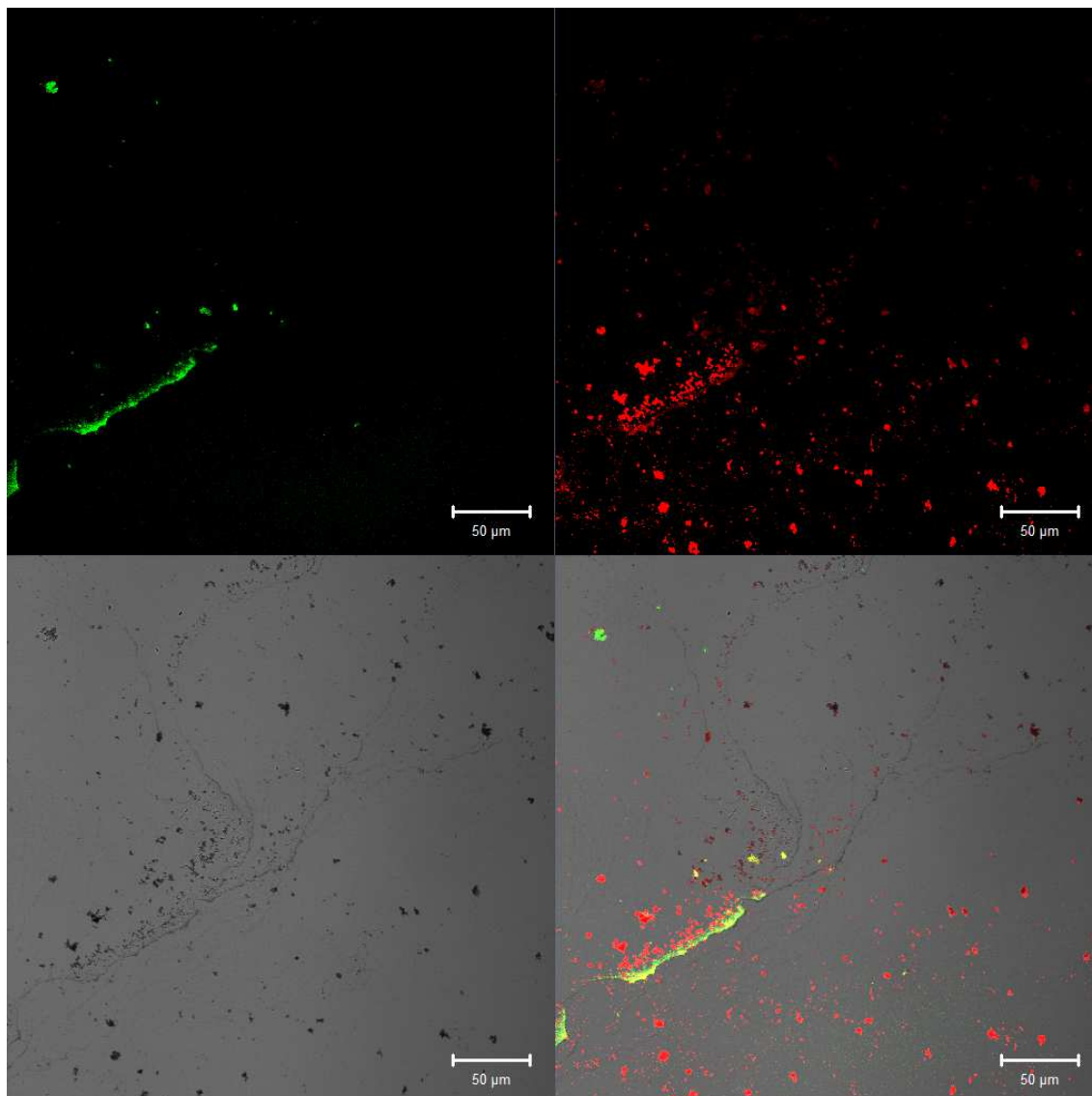
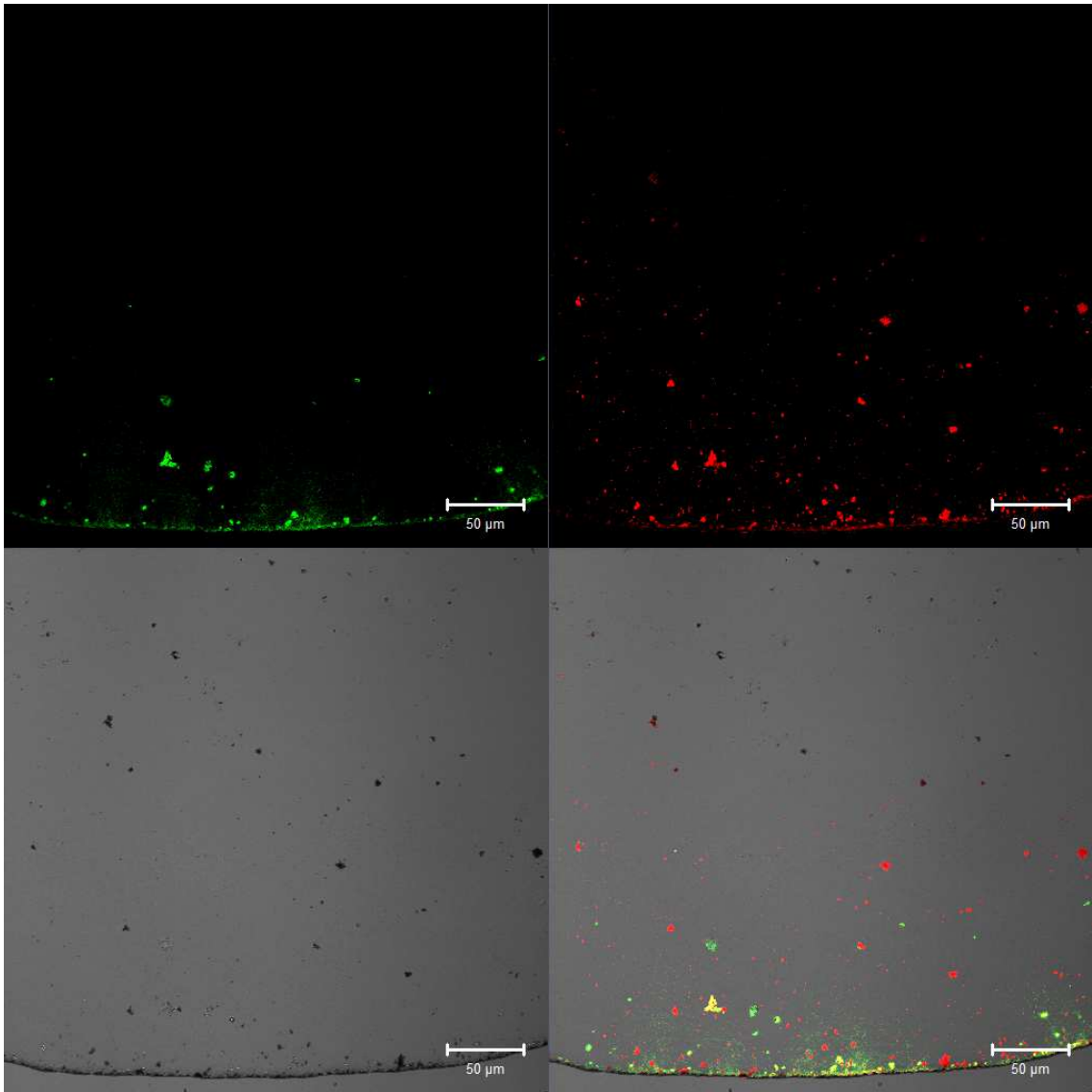


Figura 56. Imágenes de microscopia de fluorescencia a una concentración de bacteria *Salmonella* 3×10^7 UFC/ml, con nanopartículas de oro funcionalizadas con anticuerpo anti-*Salmonella* marcado con FITC.

Otro experimento que se realizó consistió en tener una mezcla de bacterias en este caso *salmonella* y *Staphylococcus aureus*, el cual se probó con el mismo biosensor y medido por microscopia de fluorescencia en campo claro y oscuro usando un microscopio confocal. Como se observa en la Figura 57 diferentes imágenes muestran que el anticuerpo anti-*Salmonella* no reacciona de forma cruzada con *Staphylococcus aureus*, y que el arreglo bioconjugado con ambas bacterias solo es capaz de unirse de forma específica a *Salmonella* lo que indica que el biosensor se puede utilizar para detectar *Salmonella* dentro de un consorcio microbiano. Como puede observarse dos colores claramente definidos en color verde a los que corresponden a la detección de la bacteria *salmonella* y en color rojo que corresponde a la bacteria *Staphylococcus*

aureus de igual manera se ve la forma de bacilo para *salmonella* y de coco para *Staphylococcus aureus* con estos resultados se muestra la especificidad del biosensor.





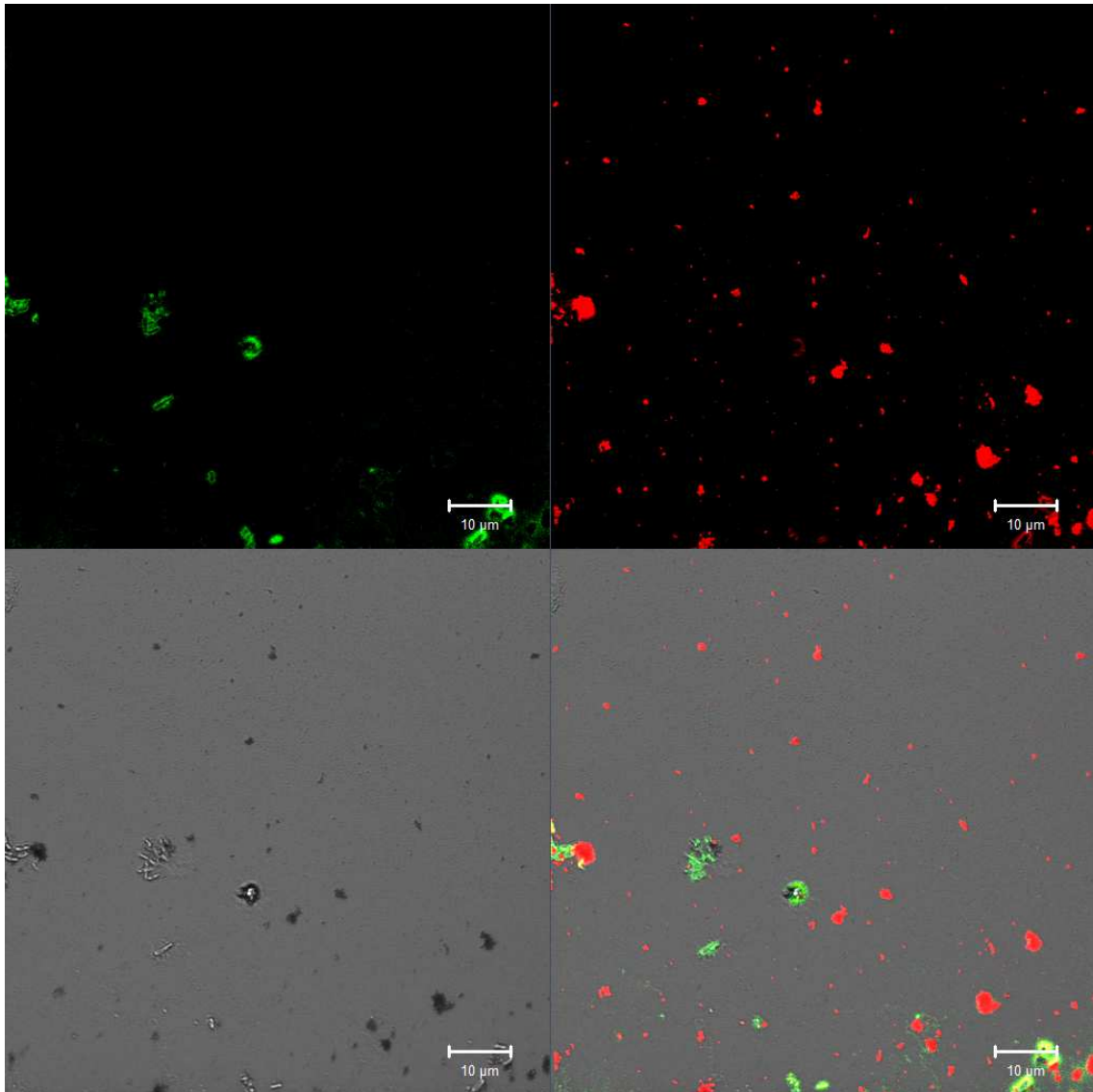
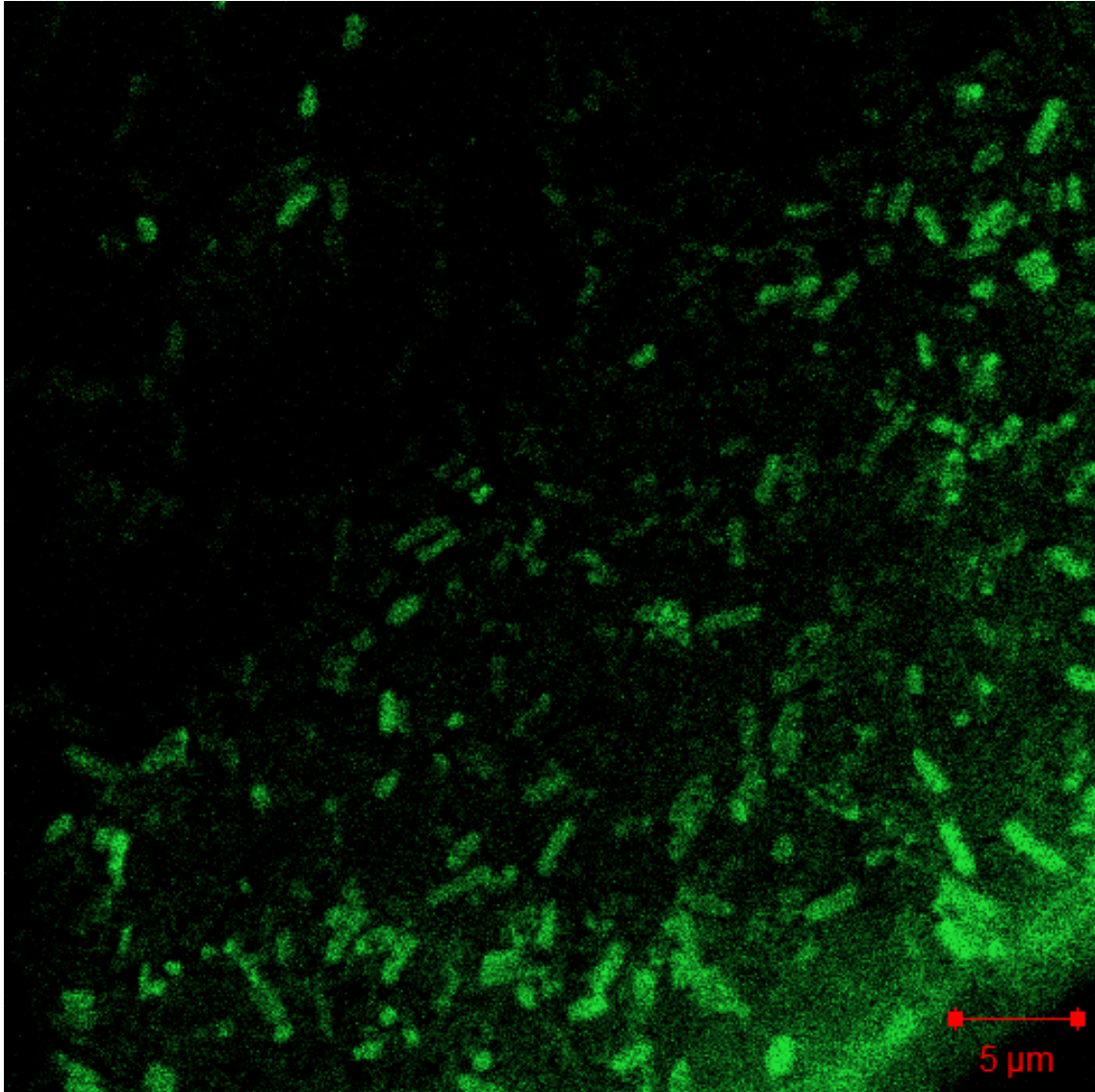


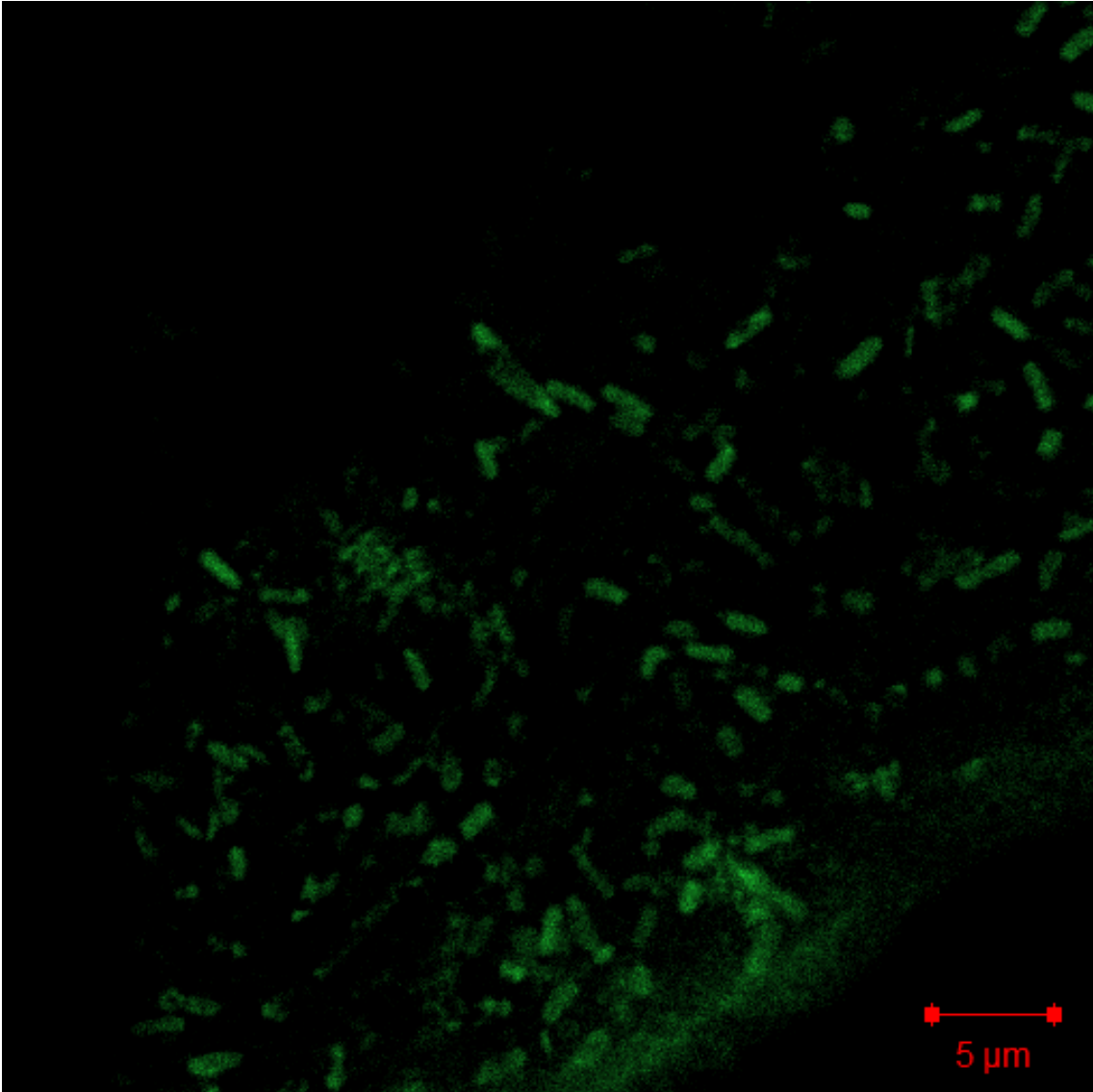
Figura 57. Imágenes de microscopía de fluorescencia de una mezcla entre bacteria Salmonella y Staphylococcus aureus, con nanopartículas de oro funcionalizadas con anticuerpo anti-Salmonella marcado con FITC y anticuerpo anti- Staphylococcus aureus marcado con rodamina.

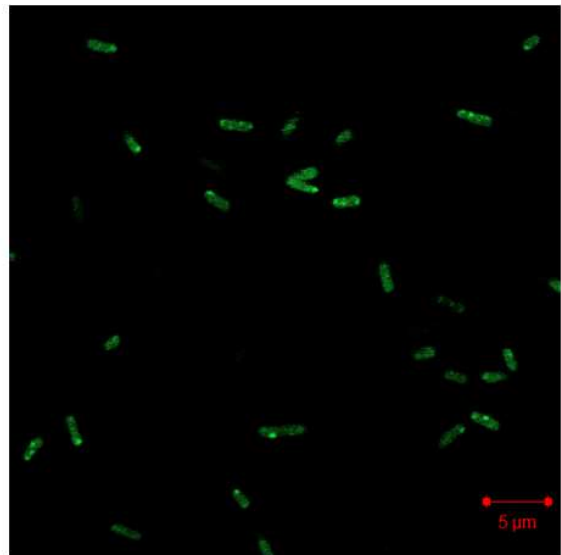
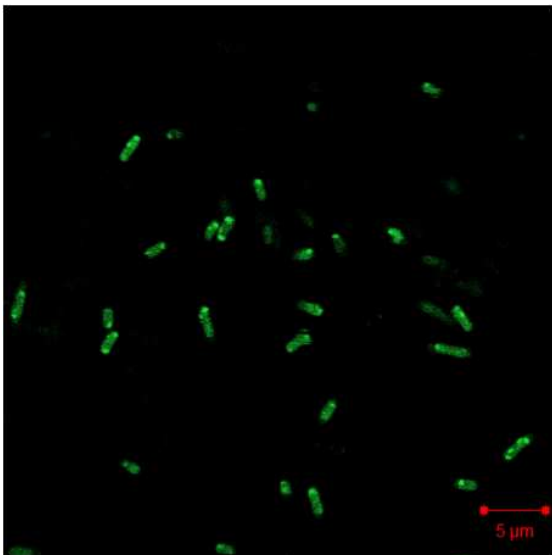
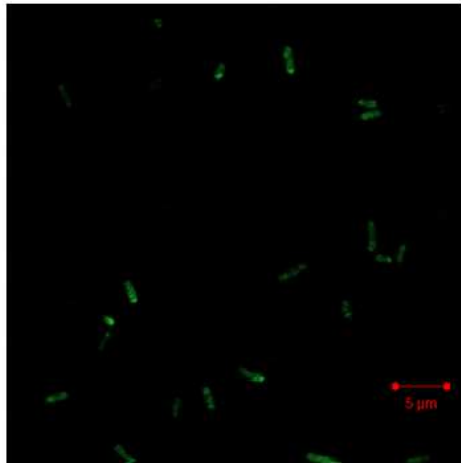
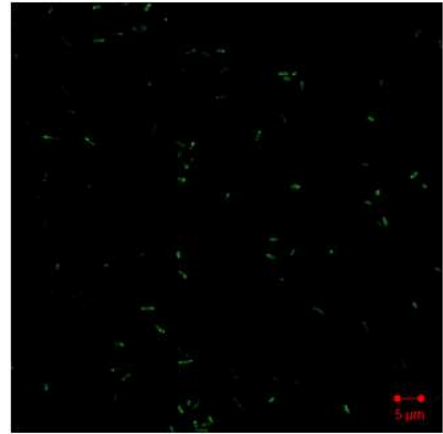
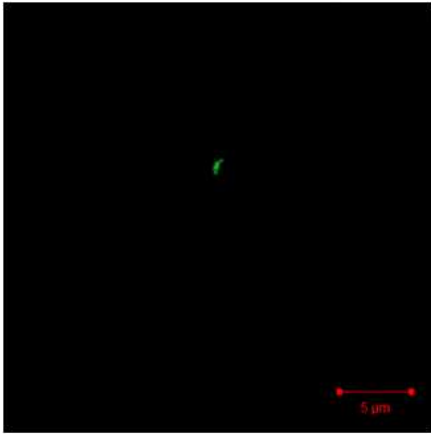
Y finalmente se realizó otro experimento mediante microscopía fluorescente evaluando una concentración de 3×10^8 UFC/ml que consistió en el uso de nanopartículas de oro recubiertas con proteína A y un anticuerpo policlonal anti-Salmonella marcado con Isotiocianato de fluoresceína (FITC). En la Figura 58 se observa diferentes imágenes, los resultados muestran que el FITC del anticuerpo generó la señal microscópica fluorescente, se utilizó microscopía de fluorescencia confocal para examinar la unión del arreglo bioconjugado a las bacterias. En las figuras se observa a las bacterias en fluorescencia brillante en este caso de color verde que corresponde a la emisión de FITC, se observa claramente una forma de bacilo

característico de la bacteria *salmonella* lo cual coincide con los resultados de fluorescencia mostrados anteriormente; esto indicó que grandes cantidades de nanopartículas marcadas con proteína A y anticuerpo anti-*salmonella* FTIC se habían unido a *Salmonella*. Los anticuerpos, marcados con fluoresceína se unen a los antígenos de la pared del microorganismo. Un posterior lavado elimina los anticuerpos no fijados y al examinar la extensión con un microscopio de fluorescencia se puede observar la fluorescencia en la pared de estas bacterias como se observa en las imágenes.

El uso de las nanopartículas fluorescentes revela la intensidad de señal amplificada y una mayor fotoestabilidad. Estos resultados indican que las nanopartículas bioconjugadas se unen a *Salmonella* a través del patrón de unión al antígeno mediada por anticuerpos pudiendo así identificar a la bacteria. Comparando con técnicas convencionales fluorescentes, el uso de nanopartículas fluorescentes en microscopía de inmunofluorescencia ofrece ventajas de más alta luminiscencia y superior fotoestabilidad, así como otorgarle mayor estabilidad al anticuerpo. Otra ventaja que presenta es que mediante la sustitución del anticuerpo puede adaptarse para otras bacterias, esta técnica tiene el potencial de desarrollar un método universal para la detección de una amplia variedad de bacterias en biomédica y áreas biotecnológicas y en este caso en particular este biosensor fue desarrollado para la rápida detección de *Salmonella* en alimentos.







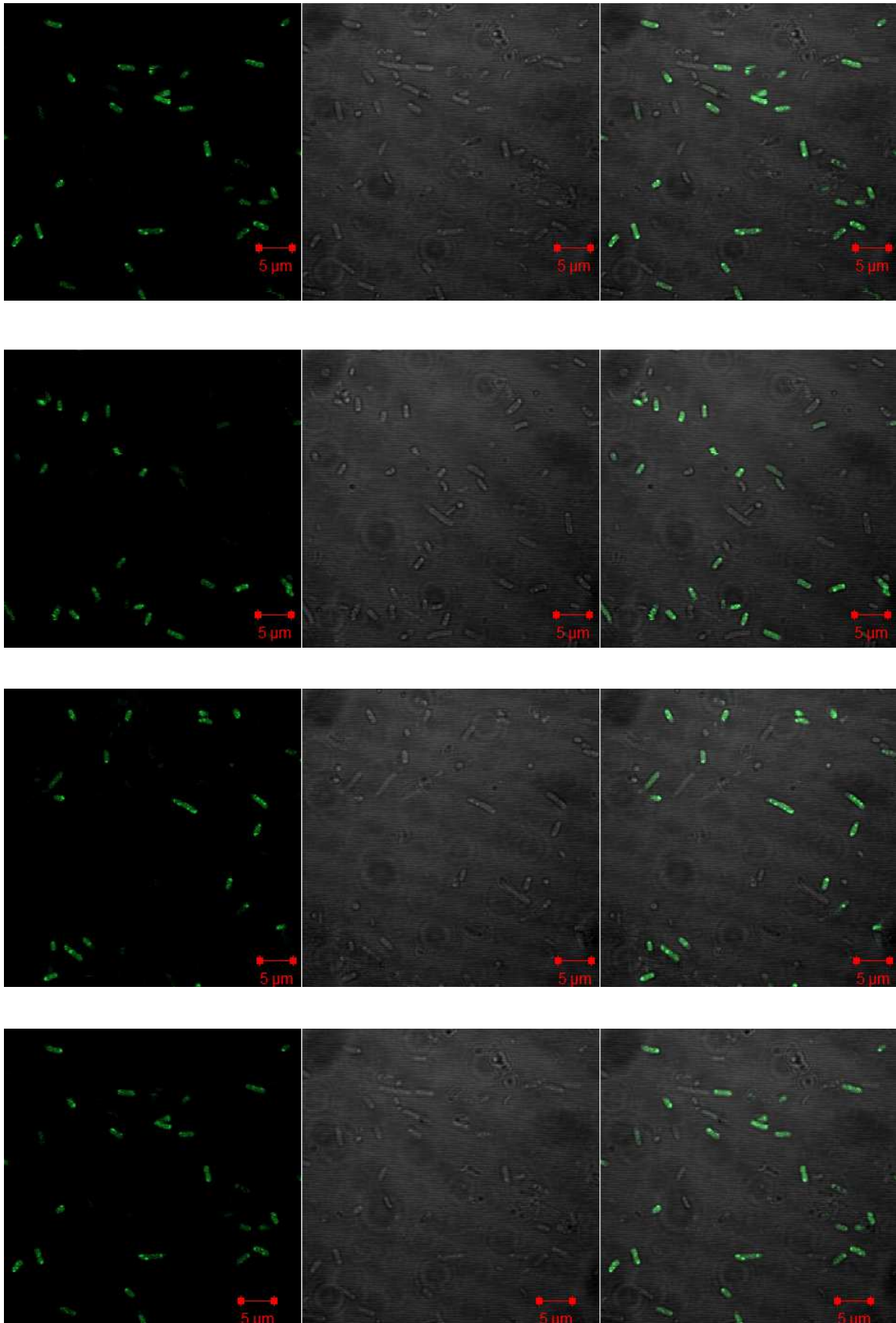


Figura 58. Imágenes de microscopía de fluorescencia de bacteria *Salmonella* a una concentración de 3×10^8 UFC/ml, con nanopartículas de oro funcionalizadas con anticuerpo anti-*Salmonella* marcado con FITC.

RESUMEN DE LOS RESULTADOS MÁS IMPORTANTES OBTENIDOS

- Se obtuvieron nanopartículas de oro con un tamaño promedio de entre 15-30 nm mediante el método de reducción química de HAuCl_4 utilizando como agente reductor al citrato de sodio.
- El tamaño de las nanopartículas de oro (determinado experimentalmente) fue consistente con la longitud de onda de absorción UV-visible cuya banda se asocia al plasmon superficial de la nanopartícula.
- Se verificó la forma y tamaño de las nanopartículas de oro mediante Microscopia Electrónica de Transmisión y Microscopia de fuerza Atómica.
- Se aplicaron métodos de validación Nanopartícula-Proteína para la determinación de la concentración mínima necesaria de proteína A para estabilizar la superficie metálica de la nanopartícula.
- El proceso de validación fue corroborado mediante espectroscopia UV-visible, observándose un corrimiento de la banda del plasmon hacia bajas energías asociándose esto a la conjugación de la proteína. Además de esto, se observó mediante microscopia electrónica de transmisión (TEM) el conjugado AuNP-proteína A con la concentración adecuada de proteína A determinada por UV-visible.
- Se determinó el valor de concentración mínima necesaria de proteína A (6 $\mu\text{g/ml}$) suficiente para recubrir las nanopartículas de oro, las cuales resultaron ser estables durante varias semanas. Esto permite su almacenamiento, manipulación y utilización para conjugarse a sistemas biológicos como anticuerpos y otras biomoléculas.
- Se determinó una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ de anticuerpo anti-*Salmonella* como un valor adecuado para la detección del antígeno de *Salmonella*.
- Se construyó un arreglo biosensor a manera de solución coloidal constituido por nanopartículas de oro con recubrimientos de proteína A y anticuerpos policlonales anti-*salmonella* para la detección específica de este patógeno.
- Se probó la detectividad y selectividad específica de la bacteria patógena *Salmonella*, utilizando el arreglo biosensor desarrollado en este trabajo mediante emisión fluorescente proveniente del cromóforo FITC presente en esta estructura.
- Con todo lo anterior, se obtuvo una metodología de preparación del arreglo biosensor basado en nanopartículas de oro, que muestra la capacidad de detección específica de la bacteria *Salmonella*. Este podría ser considerado como una alternativa práctica para el diagnóstico de este patógeno en alimentos y agua contaminada.

CONCLUSIONES

Se diseñó y generó una metodología experimental para la elaboración de nanoestructuras cuasi-esféricas basadas en nanopartículas de oro biofuncionalizadas en su superficie por proteína A y un anticuerpo policlonal, con capacidad de bioreconocimiento selectivo de la bacteria patógena *Salmonella* y sus serotipos. Este nano-inmuno-sensor tiene una presentación en forma de solución coloidal, permitiendo que la superficie de estas estructuras se adhiera al antígeno presente en la pared celular de la bacteria. Este nano-inmuno-sensor posee la característica de estar marcado con el cromóforo FITC, que al ser excitado con radiación laser genera emisión fluorescente y revela la presencia de esta bacteria patógena. Esta metodología podría representar una alternativa práctica a los métodos de diagnóstico actuales en alimentos y agua contaminada por este tipo de microorganismos.

BIBLIOGRAFIA

- A. M. Ahern and R. L. Garrell. (1991). Protein-metal interactions in protein-colloid conjugates probed by surface-enhanced raman spectroscopy. *Langmuir*, vol. 7, no. 2, pp. 254–261.
- Alcalá M.P.L. (2002). Ingeniería de anticuerpos aplicada al desarrollo y aplicación de biosensores enzimáticos. Tesis de doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Barcelona, 100 p.
- Astruc, D., Daniel. (2004). Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology, *Chemical Reviews*, 104 (1): 293-346.
- B. Alberts, A. Johnson, D. Bray, et al. 1989. *Molecular Biology of the Cell*, Taylor and Francis, London, UK.
- Baker, C. C.; Pradhan, A. and Shah, S. I. Metal nanoparticles. (2004). In *Encyclopedia of nanoscience and nanotechnology*. American Scientific Publishers, USA. 449-473.
- C.d.l. Casas, W. Li. (2012). A review of application of carbon nanotubes for lithium ion battery anode material, *Journal of Power Sources.*, 208: 74-85.
- Carralero S. V. (2009). Preparación de biosensores enzimáticos e inmunosensores basados en electrodos modificados con nanopartículas de oro. (Tesis de Doctorado - Universidad Complutense de Madrid).
- D. R. Burton, L. Gregory, and R. Jefferis. (1986) “Aspects of the molecular structure of IgG subclasses”. *Monographs in Allergy*, vol. 19, pp. 7–35.
- Davis, J., D. Huw Vaughan, and M.F. Cardosi. (1995). Elements of biosensors construction. *Enzyme Microb. Technol.* 17:1030-1035.

- Deisenhofer, J. (1981). *Biochemistry* 20, 2361-2370.
- Derjaguin, B.V., Landau, L. (1941). Theory of the stability of strongly charged lyophobic solid and of the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes. *Acta Physiochim. URSS* 14, 633 S.
- F.S. Ligler, *Anal. Chem.* 81 (2009) 519.
- Farré M., Brix R. y Barceló D. (2005). Screening water for pollutants using biological techniques under European Union funding during the last 10 years. *Trend. Anal. Chem.* 24, 532-544.
- Feldheim D. and Foss C. (2002). *Metal nanoparticles: Synthesis, characterization and applications*. New York.
- Feng, P. (2001). Appendix 1: Rapid methods for detecting foodborne pathogens. En *Bacteriological Analytical Manual (BAM)*. FDA, Food and Drug Administration.
- Feynman Richard P. (1959). "There's Plenty of Room at the Bottom", at American Physical Society California Institute of Technology (Caltech).
- Gajovic, N., G. Binyamin, A. Warsinke, F.W. Scheller, and A. Heller. (2000). Operation of a miniature redox hydrogel-based pyruvate sensor in undiluted deoxygenated calf serum. *Anal. Chem.* 72:2963- 2968.
- Gao, Z., Fang, Y., Ren, J., Ning, B., Zhu, H., He, Y. (2004). Studies on biotin-avidin indirect conjugated technology for a piezoelectric DNA sensor. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* 84,599 –606.
- Gerard, M., Chaubey, A., Malhotra, B. D. (2002). Application of conducting polymers to biosensors. *Biosensors & Bioelectronics*, 17, 345–359.
- González R. V.,García I. E.,Ruiz G.O.,Gago C. L.(2005).Aplicaciones de biosensores en la industria agroalimentaria .14,47-50.
- Hainfield J. and Powell R. (2002). "New frontiers in gold labeling," *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, vol. 48, pp. 471-479.
- Hall, R.H. (2002). Biosensor technologies for detecting microbiological foodborne hazards. *Microbes and Infect.* 4:425-432.
- Hanna, S. E., C J. Connor, and H. H. Wang. (2005). Real-time polymerase chain reaction for the food microbiologist: technologies, applications, and limitations. *Journal of Food Science* 70(3): 49-53.
- Hermanson, G. *Bioconjugate Techniques 2nd ed.* San Diego: Academic Press, 2008. I. Lynch, K.A. Dawson, Protein-nanoparticle interactions, *Nano Today*, 2008, 3 (1–2): 40-47.
- Hubbard R.E., Kamran H.M. (2010). *Hydrogen Bonds in Proteins: Role and Strength*. eLS.
- I.K. Litos, P.C. Ioannou, T.K. Christopoulos, J. Traeger-Synodinos, E. Kanavakis, *Biosens. Bioelectron.* 24 (2009) 3135.

- Ingvar Sjöholm. Protein A from *Staphylococcus aureus* Spectropolarimetric and Spectrophotometric Studies. (1975). *Eur. J. Biochem.* 51, 55-61.
- J. B. Pendry, L. Martin Moreno y F. J. Garcia Vidal. (2004). Mimicking Surface Plasmons with Structured Surfaces. *J en Science*, vol. 305, pags. 847-848.
- J. Hu, P.C. Zheng, J.H. Jiang, G.L. Shen, R.Q. Yu, G.K. Liu, *Anal. Chem.* 81 (2009) 87.
- J. Wang, (2001). "Glucose Biosensors: 40 Years of advances and challenges," *Electroanalysis* 13, 983–988 [doi: 10.1002/1521-4109].
- Jasson, V., L. Jacxsens, P. Luning, A. Rajkovic, and M. Uyttendaele. (2010). Alternative microbial methods: An overview and selection criteria. *Food Microbiology* 27: 710-730.
- Jiao L. S, Niu L, Shen J, You T, Dong S and Ivaska A. (2005). *Electrochem. Commun.* 7 219.
- K. L. Kelly, E. Coronado, L. L. Zhao and G. C. Schatz, J. (2003). *Phys. Chem. B*, , 107, 668.
- Kazuhiko Fujiwara, Hitoshi Watarai, Hideaki Itoh, Erika Nakahama, Nobuaki Ogawa. (2006). Measurement of antibody binding to protein immobilized on gold nanoparticles by localized surface plasmon spectroscopy *Anal Bioanal Chem* 386: 639–644 DOI 10.1007/s00216-006-0559-2.
- Leonard, P.; Hearty, S.; Brennan, J.; Dunne, L.; Quinn, J.; Chakraborty, T. y O’Kennedy, R. (2003). Advances in biosensors for detection of pathogens in food and water. Review. *Enzyme and Microbial Technology*, 32, 3-13.
- Leonard, P.; Hearty, S.; Brennan, J.; Dunne, L.; Quinn, J.; Chakraborty, T. y O’Kennedy, R. (2003). Advances in biosensors for detection of pathogens in food and water. Review. *Enzyme and Microbial Technology*, 32, 3-13.
- Lesk A. M. and Chothia C. (1982). "Evolution of proteins formed by β -sheets. II. The core of the immunoglobulin domains," *Journal of Molecular Biology*, vol. 160, no. 2, pp. 325–342.
- Lindmark, R., Movitz, I., and Sjöquist, J. (1977). *Eur. J. Biochem.* 74, 623-628.
- López, M.A., Ortega, F. (2002). Inmunosensores: herramientas analíticas con un gran potencial de futuro. *Schironia* 1, 52-60.
- López, M.A., Ortega, F., Domínguez, E., Katakis, I. (1998): Electrochemical immunosensor for the detection of atrazine. *J. Mol. Recogn.* 11, 178-181.
- Luo, Y. and Zhou, X. (2004). Nanoencapsulation of a hydrophobic compound by a miniemulsion polymerization process. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*. Volume 42, Issue 9, pages 2145–2154.
- Luong, J.H.T, C.A. Groom, and K.B. Male. (1991). The potential role of biosensors in the food and drink industries. *Biosens. and Bioelectron.* 6:547-554.

- M. Boutonnet, J. Kizling, P. Stenius, G. Maire, (1982). *Colloids and Surf.*, 5, 209.
- M. Boutonnet, J. Kizling, R. Touroude, G. Maire, P. Stenius, (1986). *Applied Catal.*, 20,163.
- M. Faraday, Philos. Trans. Roy. Soc. London (1857), 147, 145.
- M. Graille, E. A. Stura, A. L. Corper, et al. (2000).Crystal structure of a *Staphylococcus aureus* protein domain complexed with the Fab fragment of a human IgM antibody: structural basis for recognition of B-cell receptors and superantigen activity,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 97, no. 10, pp. 5399–5404.
- M. Moskovits. (2005). *Journal of Raman Spectroscopy*, 36, 485.
- Malorny, B., C. Löfström, M. Wagner, N. Krämer, and J. Hoorfar. (2008). Enumeration of *Salmonella* bacteria in food and feed samples by real-time PCR for quantitative microbial risk assessment. *Applied and Environmental Microbiology* 74(5): 1299-1304.
- Mello, L.D., and L.T. Kubota. (2002). Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. *Food Chem.* 77:237-256.
- Méndez-Álvarez, S., and E. Pérez-Roth. (2004). La PCR múltiple en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 22(3): 183-192.
- Moks Tomas, Abrahmsen Lars, Nilsson Bjorn, Hellman Ulf, Sjoquist John and Uhlen Mathias. (1986).Staphylococcal protein A consists of five IgG-binding domains *Eur. J. Biochem.* 156,637-643.
- Moore, J. W.; Stanitski, C. L.; Wood, J. L. and Kotz, J. C. (2000).El mundo de la Química. Editorial Addison Wesley Longman de México, 2ª Edición. México D. F.
- Mozola, M. A. (2006). Genetics-based methods for detection of *Salmonella* spp. in foods. *Journal of AOAC International* 89(2): 517-529.
- Mullis, K. B., and F. A. Faloona. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* 155: 335-350.
- N. Sanvicens, M.-P. Marco. (2008).Trends Biotechnol. 26 425.
- Nath N, Chilkoti A. (2002). *Anal Chem* 74:504–509.
- Naumann D, Schultz C, Helm D. (1996). What can infrared spectroscopy tell us about the structure and composition of intact bacterial cells. Mantsch HH, Chapman D. eds. *Infrared Spectroscopy of Biomolecules*.Wiley-Liss, New York, NY.; 279-310.
- Norde, W. (1986). Adsorption of proteins from solution at the solid–liquid interface. *Adv. Colloid Interface Sci.* 25, 267.
- O.A. Sadik, A.O. Aluoch, A. Zhou. (2009). *Biosens. Bioelectron.* 24 2749.

- Olsen, J. E., S. Aabo, W. Hill, S. Notermans, K. Wernars, P. E. Granum, T. Popovic, H. N. Rasmussen, and O. Olsvik. (1995). Probes and polymerase chain reaction for detection of food-borne bacterial pathogens. *International Journal of Food Microbiology* 28: 1-78.
- Pal, S.; Tak, Y. K. y Song, J. M. (2007). Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle A study of the Gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73 (6), 1712-1720.
- Patel P.D. (2002). Biosensors for measurement of analytes implicated in food safety: a review. *Trends in Analytical Chemistry*, vol. 21, n° 2, 96-115.
- Poole, C. P. y Owens, F. J. (2003) Introduction to nanotechnology. Wiley Interscience, USA.
- Putnam, F. W. (1975). *The Plasma Proteins: Structure, Function and Genetic Control* vol 1, 2nd edn (New York: Academic) p 141.
- R. P. Kengne-Momo, Daniel, F. Lagarde, Y. L. Jeyachandran, J. F. Pilard M. J. Durand-Thouand, and G. Thouand.(2012). Protein Interactions Investigated by the Raman Spectroscopy for Biosensor Applications *International Journal of Spectroscopy*. Volume 2012, Article ID 462901, 7 pages doi:10.1155/2012/462901
- Rasooly, A. (2001). Surface plasmon resonance analysis of Staphylococcal enterotoxin B in food. *Food Protec.* 64:37-43.
- Roldughin V. (2002). "Quantum-size colloid metal system", *Russian Chemical Reviews*, vol. 69,pp. 821-843.
- S. Cai and B. R. Singh. (2004). A distinct utility of the amide III infrared band for secondary structure estimation of aqueous protein solutions using partial least squares methods," *Biochemistry*, vol. 43, no. 9, pp. 2541–2549.
- S. Hong, I. Choi, S. Lee, Y.I. Yang, T. Kang, J. Yi. (2009). *Anal. Chem.* 81 1378.
- S. Link and M. El-Sayed, *J. Phys. Chem. B*, 1999, 103, 8410.
- Sadik, O.A., A.L. Zhou, S. Kikandi, N. Du, Q. Wang and K. Varner. (2009). Sensors as tools for quantitation, nanotoxicity and nanomonitoring assessment of engineered nanomaterials. *J. Environ. Monit.*, 11: 1782-1800.
- Sanvicens Nuria, Pastells Carme, Pascual Nuria, Marco M.-Pilar. (2009) Nanoparticle-based biosensors for detection of pathogenic bacteria. *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 28, No. 11.
- Scott H. Brewer, Wilhelm R. Glomm, Marcus C. Johnson, Magne K. Knag, and Stefan Franzen. (2005). Probing BSA Binding to Citrate-Coated Gold Nanoparticles and Surfaces. *Langmuir*, 21 (20), pp 9303–9307.
- Sha Lou, Jia-ying Ye, Ke-qiang Li and Aiguo Wu. (2012). A gold nanoparticle-based immunochromatographic assay: The influence of nanoparticulate size. *Analyst*. 137, 1174 DOI: 10.1039/c2an15844b.

- Sibai A., Elamri K., Barbier D., Jaffrezic-Renault N., Souteyrand E. (1996). Analysis of the polymer-antibody-antigen interaction in a capacitive immunosensor by FTIR difference spectroscopy. *Sensors and Actuators B* 31 125-130.
- Sjöholm I. (1975). Protein A from *Staphylococcus aureus*: spectropolarimetric and spectrophotometric studies. *Eur J Biochem* 51:55–61.
- Skoog, Douglas A. y Leary, James J. (1994). *Análisis instrumental*. Cuarta Edición. McGraw Hill. Madrid.
- Smith Brian. (1999). *Infrared spectral interpretation A systematic approach*, CRC Press LLC.
- Surewicz WK., Mantsch HH. (1988). New insight into protein secondary structure from resolution-enhanced infrared spectra. *Biochim Biophys Acta*, 952: 115–130.
- Thi Ha Lien Nghiem, Thi Huyen La, Xuan Hoa Vu, Viet Ha Chu, Thanh Hai Nguyen, Quang Huan Le, Emmanuel Fort, Quang Hoa Do and Hong Nhung Tran. (2010). Synthesis, capping and binding of colloidal gold nanoparticles to proteins. *Adv. Nat. Sci.: Nanosci. Nanotechnol.* 1 025009 (5pp). doi:10.1088/2043-6254/1/2/025009.
- Thobhani Smita, Attree Simon, Boyd Robert, Kumarswami Neelam, Noble James, Szymanski Mateusz, Porter A. Robert (2010). Bioconjugation and characterisation of gold colloid-labelled proteins. *Journal of immunological methods*.p.60-69.
- Tothill, I.E. (2001). Biosensors developments and potential applications in the agricultural diagnosis sector. *Comp.Electron. Agr.* 30:205-218.
- Uhlen Mathias, Guss Bengt, Nilsson Bjorn, Gatenbeck Sten, Philipson Lennar, and Lindberg Martin. (1984). Complete Sequence of the Staphylococcal Gene Encoding Protein A. A GENE EVOLVED THROUGH MULTIPLE DUPLICATIONS. *The American Society of Biological Chemists, Inc* Vol. 259, No. 3, Issue of February pp. 1695-1702.
- Velasco-García M. y Mottram T. (2003). Biosensor technology addressing agricultural problems. Review paper. *Biosystems Engineering*, vol. 84,(1),1 12.
- Velasco-García, M.N., and T. Mottram. (2003). Biosensor technology addressing agricultural problems. Review paper. *Biosyst. Eng.* 84:1-12.
- Venugopal, V. (2002). Biosensors in fish production and quality control. *Biosensors & Bioelectronics* 17, 147–157.
- Wangoo N, Bhasin K K, Meht S K and Suri C R (2008). *J. Colloid Interface Sci.* 323 247.
- Wilson, G.S., and R. Gifford. (2005). Review biosensors for real-time in vivo measurements. *Biosens. Bioelectron.* 20:2388-2403.

- Wittwer, C. T., M. G. Herrmann, C. N. Gundry, and K. S. J. Elenitoba-Johnson. (2001). Real-time multiplex PCR assays. *Methods* 25(4): 430-442.
- Xiaojun Zhao, Lisa R. Hilliard, Shelly John Mechery, Yanping Wang, Rahul P. Bagwe, Shouguang Jin, and Weihong Tan. (2004). A rapid bioassay for single bacterial cell quantitation using bioconjugated nanoparticles. *PNAS* vol. 101 no. 42 15027–15032
- Y. Liu, R. Brandon, M. Cate, X. Peng, R. Stony, M. Johnson. (2007). *Anal. Chem.* 79 8796. *Adv. Nat. Sci.: Nanosci. Nanotechnol.* 1 (2010) 025009 (5pp) doi:10.1088/2043-6254/1/2/025009.

APENDICE

Otro resultado que se obtuvo fue la publicación de un artículo.

UV-Visible intensity ratio (aggregates/single particles) as a measure to obtain stability of gold nanoparticles conjugated with protein A

M. A. Ríos-Carrillo · B. E. García-Pérez ·
M. E. Jaramillo-Pérez · V. L. Gayou ·
M. Rojas-López

Received: 5 November 2012 / Accepted: 20 March 2013
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2013

Abstract We have analyzed the titration process of gold nanoparticles with several amounts of protein A (0.3, 0.5, 1, 3, 6, and 9 $\mu\text{g/ml}$) in the presence of NaCl, which induces aggregation if the surface of particles is not fully covered with protein A. The colloidal solutions with different particle size (16, 18, 20, 33 nm) were synthesized by citrate reduction, to be conjugated with protein A. UV-Visible spectroscopy was used to measure the absorption of the surface plasmon resonance of gold nanoparticles as a function of the concentration of protein A. Such dependence shows an aggregation region ($0 < x < 6 \mu\text{g/ml}$), where the amount of protein A was insufficient to cover the surface of particles, obtaining aggregation caused by NaCl. The rest part is the stability region ($x \geq 6 \mu\text{g/ml}$), where the amount of protein used covers the surface of particles and protects it from the aggregation. In addition to that the ratio between the intensities of both: the aggregate and of the gold nanoparticle bands was plotted as a function of the

concentration of protein A. It was determined that 6 $\mu\text{g/ml}$ is a sufficient value of protein A to stabilize the gold nanoparticle-protein A system. This method provides a simple way to stabilize gold nanoparticles obtained by citrate reduction, with protein A.

Keywords Gold nanoparticles · UV-Visible · Protein A · Titration

Introduction

Colloidal metallic particles, in particular gold, have been found to possess biological applications as affinity labels in the diagnostic field and also as probes in light and electron microscopy (Hochberg 1992; Sorvico et al. 2005; Jennings and Strone 2007). Gold nanoparticles synthesized in water and subsequently linked to biomolecules have many applications in the life sciences, such as drug delivery, gene transfer, biosensors in cell and tissue analysis, and studies of biological processes at the nanoscale (Chen et al. 2008).

Conjugation of gold nanoparticles with proteins not only affords stabilization of the system but, more importantly, also introduces biocompatible functionalities into these nanoparticles for further biological interactions (Wang et al. 2008). In particular, protein A (cell wall protein) produced by most strains of *Staphylococcus aureus* (Paragins 1970), has been employed to be conjugated to the surface of gold

M. A. Ríos-Carrillo · V. L. Gayou ·
M. Rojas-López (✉)
CIBA-Tierras, Instituto Politécnico Nacional, Tepic,
Tlaxcala, México
e-mail: mrojas@ipn.mx

B. E. García-Pérez
Departamento de Inmunología, INCH, Instituto
Politécnico Nacional, México, DF, México

M. E. Jaramillo-Pérez
Departamento de Ingeniería Bioprocésos, INCH, Instituto
Politécnico Nacional, México, DF, México

Published online: 07 April 2013

 Springer

nanoparticles (Dhan et al. 2007). Protein A is functionally bivalent (Langone 1982) and it results to be very useful into the sensing field because it reacts with the Fc region of immunoglobulin G from various mammals (Fotsgen and Nyquist 1996; Patrick 2008) and in some species with IgA and IgM as well (Langone 1978; Gendrawand et al. 1978).

Conjugated gold nanoparticles, are obtained from the negative charge on the gold colloids, (synthesized by citrate reduction) having an affinity for proteins that are positively charged at neutral or physiological pH (Norde 1986; Hagar 1989; Himmerson 2008). Some proteins, in particular antibodies, are adsorbed strongly to colloidal gold to form stable conjugates with the protein retaining its biological property. The adsorption of proteins to gold nanoparticles is non-covalent process based on three separate but dependent phenomena: (a) ionic interaction between the negatively charged nanoparticle and the positively charged sites on the protein; (b) hydrophobic attraction between the protein and the metal surface; (c) dative binding between the metal and the conducting electrons of nitrogen and sulfur atoms of the protein (Saini et al. 2010).

On the other hand, antibody-antigen binding is a fundamental phenomenon in the fields of biochemistry and biology that may be readily used with gold nanoparticles adequately conjugated with protein A. The success of the performance of nanoparticle-based immunoassays could depend on the chemical properties of the gold nanoparticles, as well as the bioactivity and adequate conjugation of the protein A.

In this article, we report the obtaining of a stability condition of gold nanoparticles conjugated with protein A through the estimation of the UV-Visible intensity ratio (aggregated/total particles). This method provides a simple way to stabilize gold nanoparticles obtained by citrate reduction, with protein A.

Materials and methods

Materials

Tetrahydroauric acid trihydrate 99.5 % ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) as precursor purchased from Sigma-Aldrich, sodium citrate dehydrate ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) as a reducing agent was from JT Baker, and Protein A was obtained from

Sigma-Aldrich. This was stored in phosphate buffer saline (PBS) buffer pH 7.4, 0.01 M. Sodium chloride NaCl was purchased from Sigma-Aldrich. Transmission electron microscope was used to analyze the particle size, and UV-Visible spectrophotometer Thermo Scientific Evolution 606 was used to measure the surface plasmon resonance of both single and protein A conjugate-gold nanoparticles.

Preparation of gold nanoparticles

Citrate-reduction method to produce gold nanoparticles was used according to Himmerson (2008). It is based on the reduction of tetrachloroauric acid (HAuCl_4) by sodium citrate in presence of heat. The gold nanoparticles are synthesized because the citrate ions act as both a reducing agent, and a capping agent. This method involved the preparation of 1 ml of HAuCl_4 at 4 % in deionized water, then 0.5 ml was added to this solution to 200 ml of deionized water and brought to boiling. The solution was kept under constant stirring. Once the sample reaches the stage of temperature between 97 and 100 °C, 1 ml of 1 % sodium citrate were added. As sodium citrate was added, the solution began to darken and turn black-gray or purple. After 30 min, the reaction was completed and the final color of solution was a deep wine red indicating that the colloidal solution of gold nanoparticles was obtained. Four colloidal solutions were prepared at several temperatures to obtain gold nanoparticles with different size. After the solutions were cooled, the gold nanoparticles were centrifuged at 3,500 rpm for 40 min, the supernatant was removed and the nanoparticles were re-suspended in 4 ml with deionized water. The obtained suspension was stored in refrigeration at 4 °C until needed.

Titration of gold nanoparticles with protein A

The titration procedure of gold nanoparticles with protein A was carried out following the protocol of Sit and Geuze (1994), to obtain a correct approximation of the amount of protein A which must be added to maintain the stability of the gold nanoparticles. This protocol was to perform various protein A solutions at different concentrations ranging from 0.3 to 9 µg/ml. Was added one volume of 3–80 µl of protein A (100 µg/ml) in 1 ml of gold nanoparticles to

reach these concentrations. After 5 min, were added 1 ml of sodium chloride at 10 % with the aim of increasing the rate of precipitation of the nanoparticles. The minimum amount of protein A required to stabilize gold nanoparticles was determined using the ratio of UV-Visible intensities of aggregating particles as a function of the concentration of protein A. The stabilization of the nanoparticles in the presence of NaCl was also monitored by a color change of the colloids from red to dark blue. When the concentration of protein A added is sufficient to stabilize the gold nanoparticles, the colloidal solution do not suffers color changes and the intensity of the absorbance is maintained, although a displacement of about 4 nm can be observed.

Results and discussion

Size and concentration of gold nanoparticles

Gold nanoparticles were synthesized according to the method mentioned in this study, thus several colloidal solutions were obtained by aeration. Figure 1 shows the UV-Visible spectra of the colloidal solutions analyzed in this study. All of them were prepared by following the same procedure varying slightly the temperature of the synthesis from 97 to 100 °C. UV-Visible spectra of these solutions allow us to observe differences in intensity between them which are produced by changes on particle size and concentration. The typical appearance of the nanoparticles is observed in the TEM image shown inset of the Fig. 1, showing the spherical nature and an average size of 13.4 nm determined statistically.

We have used a simple and fast method to determine the size and concentration of gold nanoparticles, proposed by Hain et al. (2007). This model is based on multipole scattering theory with correction of the complex refraction index of the gold nanoparticles. This correction was realized because for small particles the mean free path is reduced due to collisions of electrons with the particle surface, compared with the mean free path of the conduction electrons in the bulk (~42 nm for gold). This correction affects the dielectric constant of the particles, and affords a better qualitative description of their UV-Visible absorbance and allows the determination of particle size.

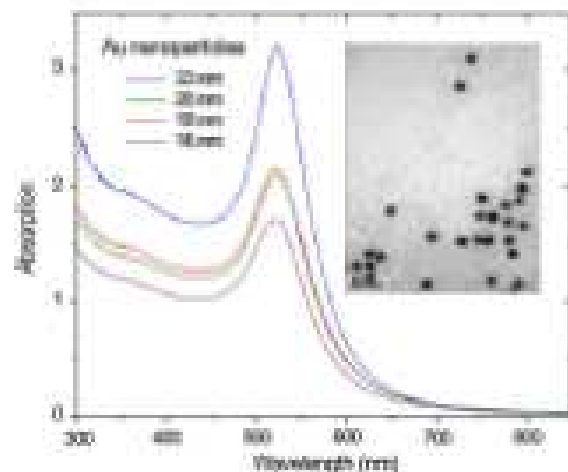


Fig. 1 UV-Visible spectra of the group of colloidal solutions with different concentrations and particle size used in this study. Inset TEM image of gold nanoparticles analyzed in this study. For this case $d = 13.4$ (TEM) and $d = 16$ nm (theoretical model)

This method uses the information of the UV-Visible spectra obtained experimentally.

The particle size was calculated by:

$$d = \exp\left(B_1 \frac{A_{450}}{A_{520}} - B_2\right) \tag{1}$$

where (A_{450}) is the absorbance of the surface plasma resonator, (A_{520}) is the absorbance at 450 nm. B_1 is the inverse of the slope of the linear fit between (A_{450}/A_{520}) and $\ln(d)$, whereas B_2 is the interception. Using the experimental values of the parameters B_1 and B_2 reported in Hain et al. (2007), $B_1 = 3.0$ and $B_2 = 2.2$. The calculations of particle diameters using Eq. (1) allow to determine the size of gold nanoparticles. These calculations are in good agreement with the experimental measurements of several authors (Aleksandra et al. 2006; Sioaf et al. 2006; Njoki et al. 2007) and with the theoretical calculations reported by Khlebtsov (2008), Kimling et al. (2006) and by Hain et al. (2007). Estimations of size made in this study using Eq. (1) and spectral UV-vis parameters are valid from 5 to 80 nm (Hain et al. 2007), however they also show good agreement with other theoretical models too (Khlebtsov 2008; Kimling et al. 2006).

Also, concentration of the nanoparticles can be estimated using the expression:

$$N = \frac{A_{520} \times 10^{14}}{d^2 \left(-0.295 - 1.36 \exp\left(-\left(\frac{d-80}{11}\right)^2\right)\right)} \tag{2}$$

Using both equations and the information from the UV-Visible spectra, we have calculated size and concentration of the gold nanoparticles analyzed in this study. The results are summarized in Table 1.

The relation between concentration and particle size can be observed in Fig. 2. Experimental data were obtained from Eqs. (1) and (2), and the line is a fit of these data. This relation arises from the dependence of N and d on the quotient (A_{sp}/A_{450}) of the UV-Visible spectra. The use of the ratio of the absorbance at the surface plasmon resonance peak (A_{sp}) to the absorbance at 450 nm (A_{450}), which is near to the local minima has shown to be in good agreement with experimental determination of particle size from other authors (Khlebov 2008; Hahn et al. 2007).

Titration of gold nanoparticles with protein A, for size and particle concentration constants

Colloidal solutions were conjugated with different concentrations of protein A, from 0.3 to 9 $\mu\text{g}/\text{ml}$. After 10 min of incubation, the conjugated solutions were mixed with NaCl (10 %) to promote aggregation of the gold nanoparticles in case of the surface is not fully covered with protein A. The UV-Visible spectra of this reaction can be observed in Fig. 3 for one of the colloidal solutions analyzed in this study, which has a particle size of 18 nm, calculated using Eq. (1).

For low concentrations of protein A we can observe two absorption bands, one of these near 525 nm and the other near 688 nm. The first band is associated to the gold nanoparticles absorption, whereas the second band is associated to the absorption of the aggregates, which is typical when gold nanoparticles are immersed in NaCl solution. Protein A has an absorption band at 276 nm that fortunately is situated far from the surface plasmon resonance (near 520 nm). As the protein A concentration increases, the wavelength of the absorption band of the aggregates diminishes toward the absorption band of the gold

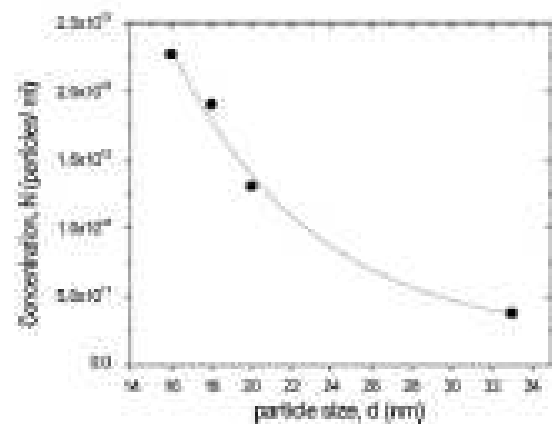


Fig. 2 Relation between concentration and particle size for the colloidal solutions analyzed in this study

nanoparticles. When an optimum value of protein A has been reached, the spectrum of the conjugated gold nanoparticle-protein A is very similar to the gold nanoparticle spectrum, except by a shift of about 4 nm, in good agreement with the reported by other authors (Laino et al. 2009). In this case, the titration procedure for one of the colloidal solutions (d and N constants) is shown in Fig. 3, where the concentration of protein A was varied. The typical dependence of the absorption profile with protein A concentration during the titration process with NaCl is shown in Fig. 4. This graph suggests a concentration of 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (protein A) as an adequate value to avoid nanoparticles aggregation.

Titration of gold nanoparticles with protein A, with variation of size and particle concentration

The same procedure as in the previous section was applied for all the colloidal solutions studied in this study (Table 1). According to the Fig. 3, three concentration values of protein A were selected (0.5, 3, and 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$) corresponding to the initial, exponential, and

Table 1 Size and concentration of gold nanoparticles obtained using the Eqs. (1) and (2) and also from the UV-Visible spectra of the colloidal solutions

No. Exp.	λ_{sp} (nm)	A_{sp}	A_{450}	d (nm)	N (part/ml)
7	523	1.21	1.69	33	3.82E11
9	521	2.16	1.27	18	1.90E12
6	522	2.10	1.21	30	1.30E12
8	530	1.71	1.03	16	2.27E12

Fig. 3 UV-Visible spectra of gold nanoparticles solutions during the titration process with NaCl for several protein A concentrations. In this case the particle size is 18 nm and particle concentration is 1.9E12 particles/ml (using Eqs. 1, 2)

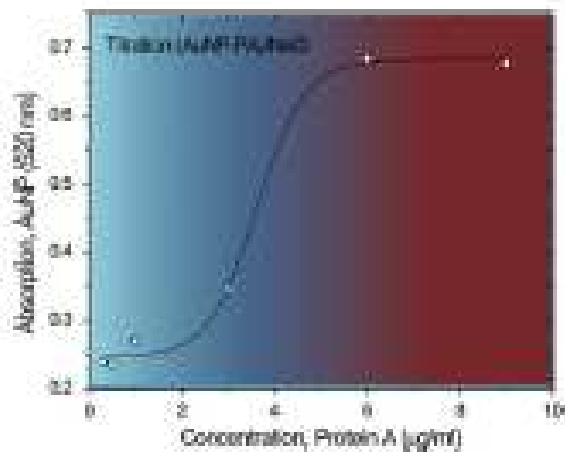
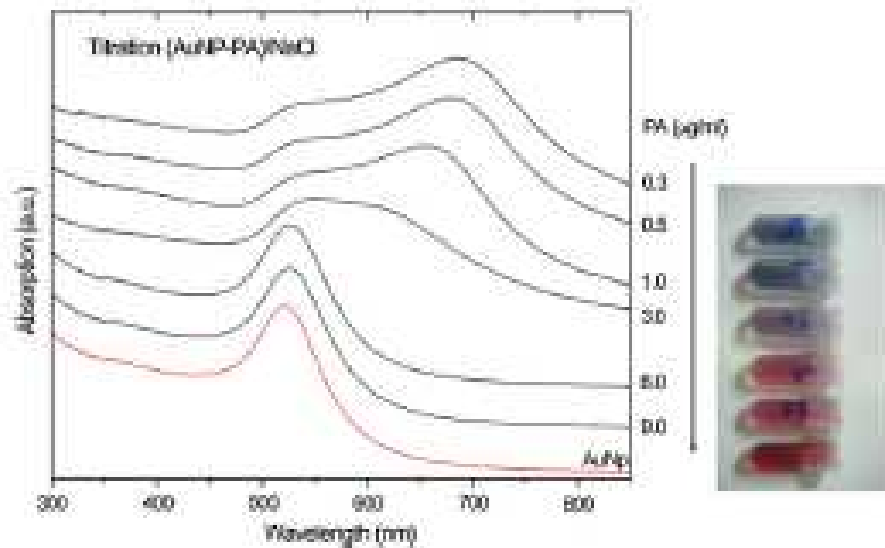


Fig. 4 Typical absorption profile of gold nanoparticles as a function of concentration of protein A, in the presence of NaCl. In this case the particle size is 18 nm and particle concentration is 1.9E12 particles/ml (using Eqs. 1, 2)

stable phase of the gold nanoparticles absorption band, respectively. The last was done to observe the line shape variations of the UV-Visible absorption for all the particle concentrations, being the concentration of protein A constant.

In the first case, for low protein A concentration (0.5 µg/ml) we observe both absorption bands (single and aggregate gold), Fig. 5. A very intense absorption of the aggregates suffers a shift to low wavelengths, whereas the absorption of gold remains unaltered. There is a systematic relation between the shift to low wavelengths of the absorption of aggregates with

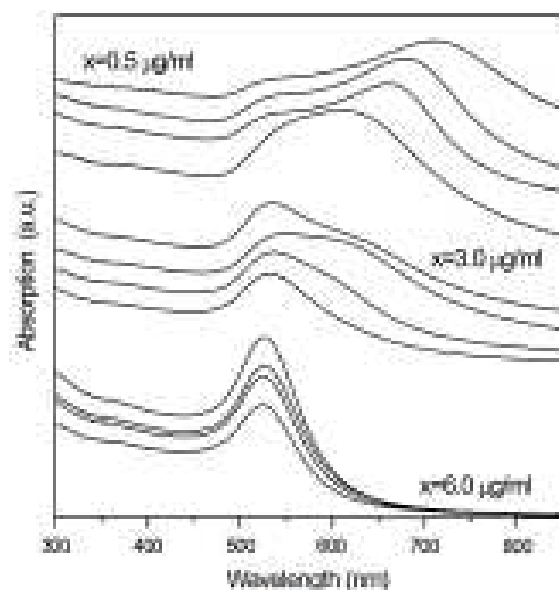


Fig. 5 UV-Visible spectra of the gold nanoparticles conjugated with protein A (0.5, 3.0 and 6.0 µg/ml) for five colloidal solutions (with 16, 18, 20, and 33 nm of particle size) in the presence of NaCl

particle size and also with particle concentration (20, 18, and 16 nm), except for the colloidal solution with 33 nm, being not clear the reason of the last. However, in most of cases a common behavior indicates that bigger particles react more quickly with NaCl to form aggregates than short particles.

In the second case (3 $\mu\text{g/ml}$), Fig. 5, the intensity of the absorption of aggregates starts to diminish with respect to the previous case (0.5 $\mu\text{g/ml}$), because now more protein A covers the surface of gold nanoparticles, keeping their intensities very similar. As in the previous case, there is a systematic relation between the shift to low wavelengths of the absorption of aggregates with particle size and particle concentration (20, 18, and 16 nm). Colloidal solution with 33 nm which has the lowest particle concentration presents mostly the absorption of the gold nanoparticles and a very low intensity associated to aggregates.

In the last case (6 $\mu\text{g/ml}$) we have no absorption bands associated to aggregation, only bands from gold nanoparticles are present, Fig. 5. This fact indicates that the particles are covered by protein A and aggregation is not present using NaCl, having a stable condition. Finally we have compared the relative intensities between the absorption of the aggregate particles (I_a) and the absorption of the individual gold nanoparticles (I_i), to obtain the dependence of the intensity ratio I_a/I_i on the concentration of protein A, Fig. 6. This method allows to obtain a critical concentration value of protein A from which gold nanoparticles conjugated with this protein can stabilize the system, which is independent from size-concentration of the colloidal solutions. This is because the particle size and the particle concentration are not independent, but they are related by the Eqs. (1) and (2) and also by the continuous line shown in Fig. 2.

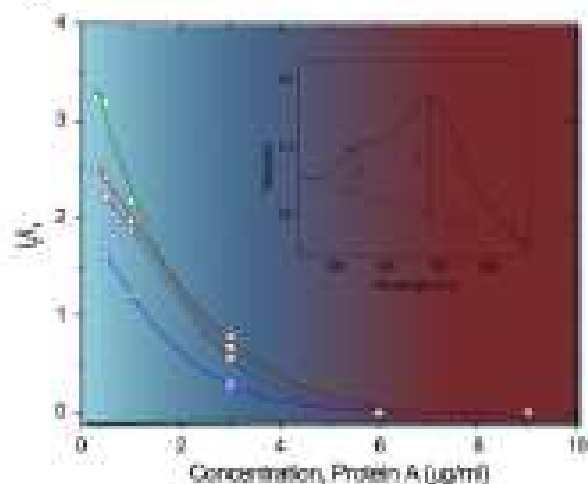


Fig. 6 Dependence of the ratio I_a/I_i on the concentration of protein A. The particle sizes of the colloidal solutions used were 16, 18, 20, and 33 nm, according to the table cited in Fig. 1

Conclusions

An easy way to estimate the concentration value of protein A that stabilize gold nanoparticles synthesized by citrate reduction at neutral pH was obtained. Such method involves the performance of the titration procedure of gold nanoparticles conjugated with protein A in the presence of NaCl, for several colloidal solutions having different particle size and particle concentration. In a first stage the size and concentration are constant, varying only the protein concentration, whereas in a second stage, several values of protein A are kept constant and the variation of particle size and particle concentration were analyzed. From these results we analyzed the ratio between the intensities of the aggregates and individual gold nanoparticles bands as a function of the concentration of protein A, to obtain 6 $\mu\text{g/ml}$ as the sufficient amount of protein A to stabilize the gold nanoparticle-protein A system, which is independent of the particle size and particle concentration of the colloidal solutions prepared by citrate reduction.

Acknowledgments We acknowledge the financial support from Instituto Politécnico Nacional and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

References

- Alcolovska A, Bogoyevic V, Kishimoto R, Melnikova A, Dykman L, Kishimoto N (2006) Gold nanorods: synthesis and optical properties. *Critical J* 68:661–678
- Chen YM, Yu CL, Chang TL, Tseng WL (2008) Colorimetric detection of lysozyme based on electrostatic interaction with human serum albumin-modified gold nanoparticles. *Langmuir* 24(7):3654–3658
- Dolan Q, Xiaotian H, Kemlin W, Xiaojun D, Weibong T, Bryan C (2007) Fluorescent nanoparticle-based indirect immunofluorescence microscopy for detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biomed Biotechnol Article ID 80364*. [9. doi:10.1155/2007/80364](https://doi.org/10.1155/2007/80364)
- Forsgren A (1970) Significance of protein A production by staphylococci. *Infect Immun* 2:672–673
- Forsgren A, Sjögquist J (1966) Protein A from *S. aureus*. I. Purification-immune reaction with human γ -globulin. *J Immunol* 97:823–827
- Ginalvanoni J, Van der Donk JA, Noordenj A, Van Duin RH, Vaccarin JP (1978) Protein A reactivity of various mammalian immunoglobulins. *Scand J Immunol* 8:21–28
- Hesse W, Thamm N, Argy and J, Fernig D (2007) Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-Vis spectra. *Anal Chem* 79:4215–4221
- Hayat MA (1989) *Colloidal gold: principles, method and application*, vol 1. Academic Press Inc, New York

- Hartmann O (2011) *Immunogold techniques*. Academic Press Inc, San Diego
- Hochberger M (1992) Colloidal gold and its application in cell biology. *Int Rev Cytol (Surv Cell Biol)* 137:227
- Jennings T, Srinivas G (2017) Past, present, and future of gold nanoparticles: bio-applications of nanoparticles advances in experimental medicine and biology, vol. 538. Springer-Verlag, Berlin, p 94
- Kholosov N (2004) Determination of size and concentration of gold nanoparticles from extinction spectra. *Anal Chem* 76:4020–4023
- Kiriling I, Maier M, Gnanou Y, Kotaka V, Bailon R, Pich A (2006) Turbidity method for gold nanoparticles synthesis control. *J Phys Chem B* 110:15706–15707
- Langmuir I (1916) Protein A: a model for general use in immunology. *J Immunol Methods* 24:269–285
- Langmuir I (1962) Protein A of *Staphylococcus aureus* and related immunoglobulin receptors produced by streptococci and pneumococci. *Adv Immunol* 12:157–252
- Leite M, Talarin P, Baldochi PL, Azeiteiro S (2009) Study of protein-gold nanoparticles conjugates by fluorescence and surface-enhanced Raman scattering. *J Mol Liq* 124:195–200. doi:10.1016/j.molliq.2009.02.004
- Nyári P, Liu L, Mész D, Papp M, Kálmán S, Mészáros S, László J, Zhang C (2017) Size correlation of optical and spectroscopic properties for gold nanoparticles. *J Phys Chem B* 111:14666–14670
- Nurki W (2016) Adsorption of protein from solution at the colloidal interface. *Adv Colloid Interface Sci* 25:297
- Panick M, (2009) *Microbiología Médica, 6. Ed. (6a edición)*. Elsevier-Mosby, España p 209–225
- Shin I, Gross B (1988) Cold markers for single and double immunolabeling of ultrathin cryosections. In: Biele JM, Vardavas JM (eds) *Immunolabeling for electron microscopy*. Elsevier, New York, p 179
- Shof M, Kuroi R, Maay E (2006) Preparation and characterization of inorganic gold nanoparticles with protonated amine. *Biomaterials* 27:319–326
- Smita T, Saito A, Sakata R, Nishimura K, Imai N, Mizuno S, Rohan A, Pieter (2010) Immunogold and characterization of gold crystal-labelled proteins. *J Immunol Methods* 356:60–69. doi:10.1016/j.jim.2010.02.007
- Soriano F, Dubernet C, Coudane P, Cassone P (2005) Metallic colloidal nanotechnology, applications in diagnosis and therapeutics. *Curr Pharm Des* 11:209
- Wang J, Shao JX, Miao JL, Sun CB (2010) Synthesis and capping of water-dispersed gold nanoparticles by an amino acid: immunogold and binding studies. *J Colloid Interface Sci* 321:147

