



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA APLICADA

“Aplicación de nanopartículas de oro en la
elaboración de un inmunosensor para la detección de
Staphylococcus aureus en alimentos”

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN
CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA PRESENTA:

M. en C. LESLIE SUSANA ARCILA LOZANO

Director de tesis: Dr. MARLON ROJAS LÓPEZ

OCTUBRE 2016



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Tepetitla de Lardizábal, Tlaxcala siendo las 12:00 horas del día 14 del mes de

Octubre del 2016 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:

"Aplicación de nanopartículas de oro en la elaboración de un inmunosensor para la detección de *Staphylococcus aureus* en alimentos"

Presentada por el alumno:

Arcila Lozano Leslie Susana
Apellido paterno Apellido materno Nombre(s)

Con registro:

A	1	2	0	1	7	6
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

DOCTORADO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGIA

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. Blanca Estela García Pérez

Dra. Silvia Luna Suárez

Dra. Analía Arroyo Becerra

Dra. María Eugenia Jaramillo Flores

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dra. María Myrna Solís Oba



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada
Unidad Tlaxcala
Dirección

Lardizábal, Tlaxcala a 14_de _octubre _ de 2016_

ACUERDO CONFIDENCIALIDAD

En el presente documento se hace constar que los profesores que suscriben:

Dra. Silvia Luna Suárez, 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. Leslie Susana Arcila Lozano, hemos tenido acceso y conocemos el Trabajo de tesis desarrollado por la alumna y cuyo título se denomina "Aplicación de nanopartículas de oro en la elaboración de un inmunosensor para la detección de Staphylococcus aureus 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.

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

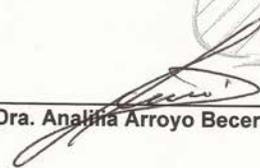
RJDM/EPC
EXT. 87816

independientemente de las sanciones penales a los infractores, prevén a favor de su titular el pago de daños y perjuicios.

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA APLICADA
UNIDAD TLAXCALA


Dra. Silvia Luna Suárez


Dra. María Eugenia Jaramillo Flores


Dra. Analina Arroyo Becerra


Dra. Blanca Estela García Pérez


Dr. Marlon Rojas López


Alumna: M. en C. Leslie Susana Arcila Lozano

RJDM/EPC
EXT. 87815

INDICE GENERAL

RESUMEN

ABSTRACT

1. INTRODUCCION

1.1 Nanotecnología.

1.2 Nanopartículas metálicas.

1.3 Métodos de síntesis de nanopartículas.

1.4 Funcionalización y conjugación de nanopartículas metálicas.

1.5 Biosensores basados en nanopartículas metálicas.

1.6 *Staphylococcus aureus*.

2.JUSTIFICACION

3.OBJETIVO

3.1 Objetivo general

3.2 Objetivos específicos

4.-MATERIALES Y METODOS

4.1 Reactivos, material biológico y medios de cultivo.

4.2 Equipos.

4.3.1 Espectrofotómetro de UV/Vis.

4.3.2 Espectrofotómetro de FT-IR.

4.3.3 Microscopio electrónico de transmisión.

4.3.4 Microscopio de escaneo confocal láser.

4.3.5 Sistema de medición de bioimpedancia.

4.3.6 Sistema de medición por fotoluminiscencia.

4.3 Preparación de *Staphylococcus aureus*

4.3.1 Para su conservación.

4.3.2 Preparación de la bacteria para ensayos con el sensor.

4.3.3 Patrón McFarland.

4.3.4 Cuantificación bacteriana por turbidimetría.

4.4 Nanopartículas de oro.

4.4.1 Síntesis de nanopartículas de oro.

4.4.2 Caracterización de las nanopartículas de oro por espectrofotometría UV/Vis.

4.4.3 Determinación del tamaño y concentración de las nanopartículas de oro.

4.4.4 Caracterización de las nanopartículas de oro por microscopía electrónica de transmisión (MET).

4.4.5 Caracterización de las nanopartículas de oro por FT-IR.

4.5 Conjugado: nanopartículas de oro recubiertas con estreptavidina.

4.5.1. Conjugación de nanopartículas de oro con estreptavidina sin marcar.

4.5.1.1 Caracterización por espectrofotometría UV/Vis del conjugado.

4.5.1.2 Caracterización del conjugado por FT-IR.

4.5.1.3 Caracterización del conjugado por MET.

4.5.1.4 Ensayos de estabilidad del conjugado.

4.5.2 Conjugación de nanopartículas de oro con estreptavidina-TRITC.

4.5.2.1 Caracterización por espectrofotometría UV/Vis del conjugado-TRITC.

4.5.2.2 Caracterización del conjugado fluorescente por FT-IR.

4.6 Bioconjugado: conjugado unido al anticuerpo biotinilado Anti-*Staphylococcus aureus*.

4.6.1 Determinación de la concentración de anticuerpo biotinilado para el bioconjugado.

4.6.1.1 Caracterización del bioconjugado por UV/Vis.

4.6.1.2 Caracterización del bioconjugado por FT-IR.

4.6.2 Determinación de la concentración de anticuerpo para el bioconjugado fluorescente.

4.6.2.1 Caracterización por UV/Vis del bioconjugado fluorescente.

4.6.2.2 Caracterización del bioconjugado fluorescente por FT-IR.

4.7 Bioreconocimiento del nano-inmunosensor fluorescente sobre *Staphylococcus aureus*.

4.7.1 Preparación bacteriana.

4.7.2 Ensayos de bioreconocimiento.

4.7.3 Ensayos de bioreconocimiento empleando control bacteriano.

4.7.4 Ensayos de bioreconocimiento empleando una matriz alimentaria.

4.8 Determinación del límite de detección del sensor fluorescente: sistema de espectroscopia de fotoluminiscencia.

4.8.1 Preparación bacteriana.

4.8.2 Preparación del sensor.

4.9 Determinación del límite de detección del sensor fluorescente: sistema de bioimpedancia.

4.9.1 Preparación bacteriana.

4.9.2 Preparación del sensor.

5.-RESULTADOS Y DISCUSIONES

5.1 Nanopartículas de oro.

5.1.1 Síntesis de nanopartículas de oro.

5.1.2 Caracterización de las nanopartículas de oro por espectrofotometría UV/Vis.

5.2 Conjugado: nanopartículas de oro recubiertas con estreptavidina.

5.2.1 Conjugación de nanopartículas de oro con estreptavidina.

5.2.2 Ensayos de estabilidad del conjugado.

5.2.3 Análisis de espectros FT-IR de las nanopartículas de oro conjugadas con estreptavidina.

5.3 Bioconjugado: conjugado unido al anticuerpo biotinilado *Anti-Staphylococcus aureus*.

5.4 Desarrollo de un inmunosensor- fluorescente.

5.4.1 Conjugación de nanopartículas de oro con estreptavidina-TRIC.

5.4.2 Bioconjugado: conjugado fluorescente unido al anticuerpo biotinilado *Anti-Staphylococcus aureus*.

5.5 Bioreconocimiento del nano-inmunosensor fluorescente sobre *Staphylococcus aureus*.

6. CONCLUSIONES

7.REFERENCIAS

RESUMEN

En este trabajo se desarrolló un método de biosensado para detectar a *Staphylococcus aureus* con un límite de detección entre 1×10^5 – 1×10^2 células/ml. Para este propósito se desarrolló un bioconjugado fluorescente coloidal constituido por nanopartículas de oro conjugadas con estreptavidina marcada con el cromóforo isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC), el conjugado fluorescente fue bioconjugado con un anticuerpo biotinilado Anti-*S. aureus*. La concentración de estreptavidina fue determinada mediante ensayos de validación que fueron corroborados mediante espectroscopia UV/Vis y microscopia electrónica de transmisión. Por medio de la microscopia confocal se comprobó que el biosensor fluorescente fue capaz de reconocer selectivamente al analito de interés. De los experimentos por espectroscopia de fotoluminiscencia del filtrado del inmunosensor fluorescente, provenientes de un ensayo de bioreconocimiento previo que fue filtrado por membrana, permitieron una medición directa de la concentración bacteriana y fue posible establecer un límite de detección del inmunosensor de 1×10^5 células/ml. Los análisis de bioimpedancia del inmunosensor fluorescente sobre muestras contaminadas previamente, permitieron una medida directa de la concentración bacteriana y se estableció un límite de detección del inmunosensor fluorescente de 1×10^2 células/ml. Derivado de los resultados, se propone así la solución coloidal obtenida en este trabajo (inmunosensor fluorescente), el cual está elaborado a base de nanopartículas de oro conjugadas con proteína (estreptavidina) e inmunoglobulina (anti-*S. aureus*) como un método alternativo para la detección rápida cualitativa y cuantitativa del microorganismo patógeno *S. aureus*.

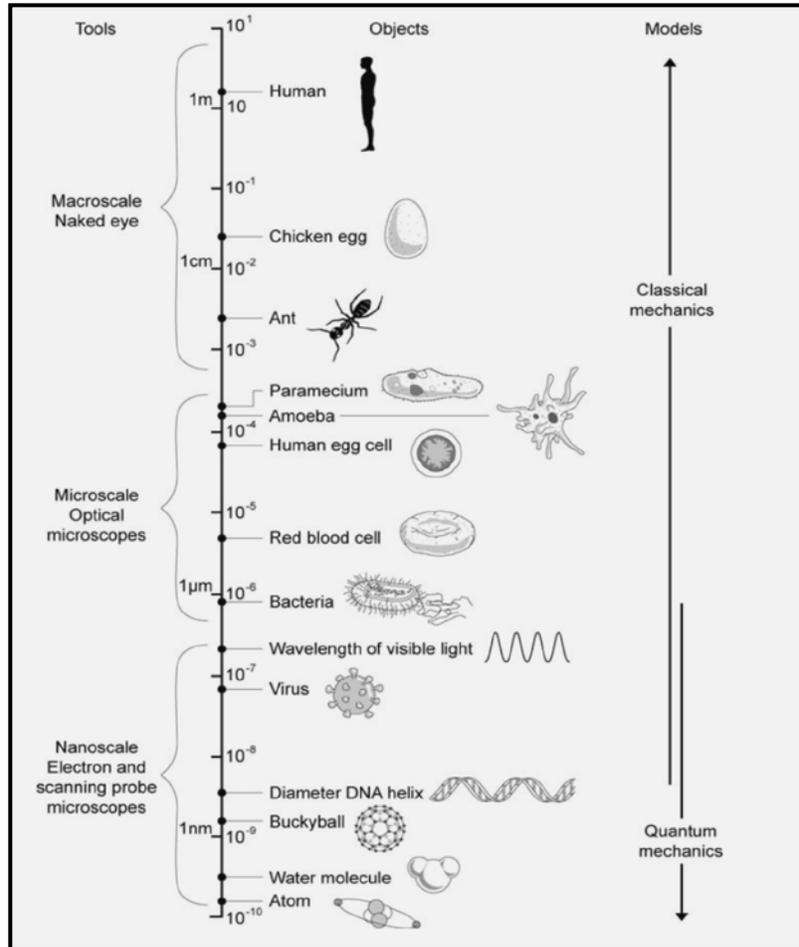
ABSTRACT

A practical method to detect *Staphylococcus aureus* with a detection limit between 1×10^5 – 1×10^2 cell/ml is reported. For this purpose, a colloidal fluorescent bioconjugate, which is tested in contaminated samples, was obtained in this work. This is based in the use of gold nanoparticles stabilized by tetramethylrhodamine isothiocyanate labeled streptavidin and biofunctionalized with biotinylated anti-staphylococcus aureus antibody. Streptavidin stabilized gold nanoparticles were obtained by titration procedures and corroborated by UV-visible spectroscopy and transmission electron microscopy. The obtained fluorescent bioconjugate, can selectively be linked to the surface of *S. aureus* in samples contaminated with this pathogenic microorganism, as evidenced by confocal micrographs. Photoluminescence emission of filtered bioconjugated nanoparticles which were previously mixed with contaminated samples, provide a direct measure of the bacteria concentration, with a detection limit of 1×10^5 cell/ml. On the other hand, bioimpedance measurements of contaminated samples tested with this bioconjugate, also provide a direct measure of the bacteria concentration with a detection limit of 1×10^2 cell/ml. This methodology could be representing a versatile tool in the biosensing field.

1 INTRODUCCION

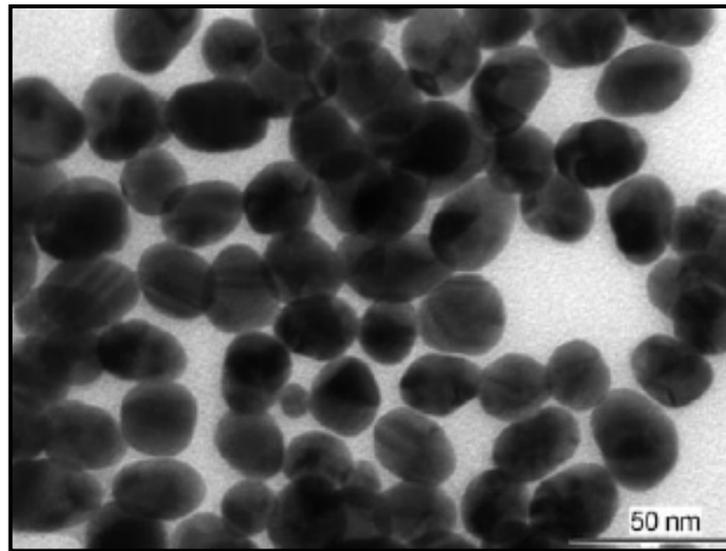
1.1 Nanotecnología. Durante la última década, la Nanociencia y la Nanotecnología, disciplinas de la ciencia que estudian y utilizan estructuras del tamaño de unos cuantos nanómetros ($1\text{nm} = 1 \times 10^{-9} \text{ m} = 10 \text{ \AA}$), han pasado de ser una rama emergente, de carácter multidisciplinario, restringida únicamente al ámbito de unos cuantos laboratorios de investigación, a convertirse en una de las líneas temáticas de investigación prioritarias en cualquiera de los países más avanzados. En particular, el impacto de la Nanotecnología en la sociedad es innegable, debido a sus múltiples aplicaciones y a su enorme capacidad para generar nuevos materiales, dispositivos e instrumentos que introducirán cambios, por ejemplo: en procesos de fabricación, en materia de salud en la manera en la que se detectarán y tratarán enfermedades, a nivel ambiental en el desarrollo de dispositivos que permitan monitorear y proteger el medio ambiente, en el rubro energético produciendo y almacenando energía, así como en la agroindustria mejorando la producción de cultivos y monitoreando la calidad alimentaria (Correia, 2010; Mongillo, 2007). La nanociencia y nanotecnología estudian y utilizan nano estructuras, que son agrupaciones de átomos o moléculas cuyas propiedades físicas y químicas dependen del tamaño y de la forma que estas tengan. Con el propósito de comparar el tamaño de los objetos y situar la ubicación de la nanoescala, la figura 1.1 muestra las relaciones entre el tamaño de diversos organismos pluricelulares, unicelulares, nanoestructuras, moléculas y átomos (Ramsden, 2009). Como ejemplo de nano estructuras se encuentran los nanotubos de carbono, los cuales pueden ser imaginados como una hoja de grafito envuelto, de tal manera que los átomos de carbono en la orilla de la hoja son covalentemente enlazados con los átomos de la orilla opuesta de la hoja. Químicamente un nanotubo de carbono es extremadamente estable porque las valencias de todos sus átomos de carbono están saturadas, los nanotubos de carbono son buenos conductores porque sus electrones se mueven libremente a lo largo de su estructura de alambres. Los objetos nanoscópicos pueden tener propiedades que no pertenecen al terreno de sus contrapartes, la más grande (bulto) o la más pequeña (átomos)(Daniel & Astruc, 2004).

Figura 1. 1 Escala de las cosas



1.2 Nanopartículas metálicas. Las nano partículas metálicas, las cuales constituyen un sistema de trabajo interesante en la nanoescala debido a la facilidad con la cual pueden ser sintetizadas y modificadas químicamente en su superficie. Ofrecen una ventaja sobre otros sistemas debido a sus características ópticas que se diferencian de las del metal en bulto. Este efecto se debe a que las nanopartículas del metal exhiben una fuerte absorción de la resonancia del plasmón, las cuales se presentan como bandas en el espectro visible y por lo tanto producen un profundo color evocador al de las tintas. Las propiedades ópticas de los coloides metálicos dependen del tamaño y la forma de las partículas (figura 1.2).

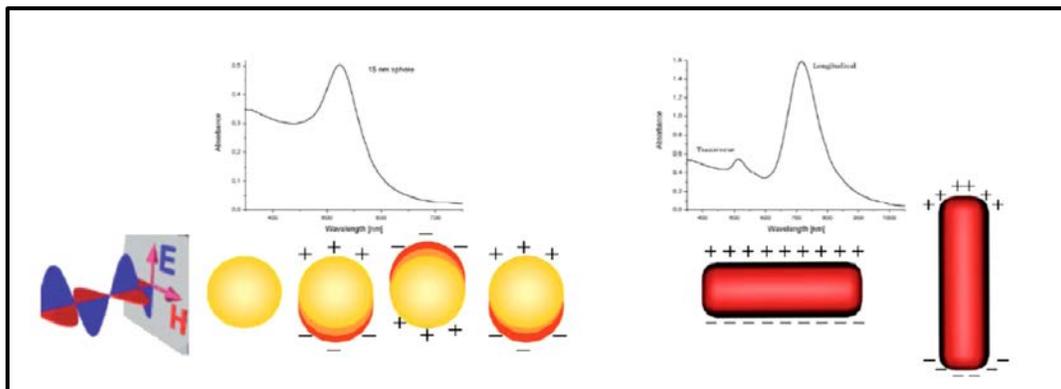
Figura 1.2 Nanopartículas metálicas.



El oro en bulto absorbe en todo el intervalo visible, con un pequeño valle entre 400-500 nm, que hace que las películas de Au (oro) se vean azules en transmisión. Sin embargo para el caso de nanopartículas de oro cuyas dimensiones van desde 500 nm hasta 3 nm, el color cambia gradualmente hasta naranja, pasando por varios tonos de púrpura y rojo. Estos efectos se deben a cambios en la resonancia del *plasmón superficial*, que es la frecuencia a la que oscilan los electrones de conducción en la superficie de la nanopartícula en respuesta al

campo eléctrico alternante de una onda electromagnética incidente. Por debajo de 3 nm, el color cambia a parduzco y finalmente se hace incoloro, debido fundamentalmente a efectos cuánticos (separación de niveles electrónicos en las bandas de conducción y de valencia). Aunque se pueden calcular espectros UV-visible para todos los metales, sólo unos pocos (Au, Ag, Cu, y los alcalinos) poseen resonancias del plasmón en el visible que les hacen poseer colores intensos. Cuando las nanopartículas no son esféricas (por ejemplo elipsoides o cilindros) existen dos bandas de resonancia que se relacionan con la oscilación transversal y longitudinal de los electrones, siendo esta última muy sensible a la relación de aspecto (cociente entre eje largo y corto) de los cilindros. Esquemas y espectros representativos se presentan en la figura 1.3 (Le Ru & Etchegoin, 2009).

Figura 1.3 Propiedades ópticas de las nanopartículas metálicas. Izquierda: Esquema de la interacción de una radiación electromagnética con una nanoesfera metálica y espectro con una sola banda debida a la formación de un dipolo inducido que oscila en fase con el campo eléctrico de la luz incidente. Derecha: Oscilaciones transversal y longitudinal de los electrones en un nanocilindro metálico y espectro con las dos bandas respectivas.



Aparte de las propiedades de las partículas individuales, también el entorno en el que se encuentran afecta a sus propiedades. Se ha demostrado que tanto el índice de refracción del medio, como la distancia media entre nanopartículas metálicas adyacentes influyen en los espectros. El efecto de las interacciones se ha utilizado para aplicaciones como la detección de ADN, mientras que el efecto del medio se ha propuesto para aplicaciones en biosensores (Correia, 2010;Pescador Rojas, 2006).

1.3 Métodos de síntesis de nanopartículas. Avances en la química coloidal han generado nuevos procesos sintéticos para obtener agrupaciones de átomos metálicos a escala nanométrica. Por ejemplo, dispersiones coloidales de partículas metálicas han sido sintetizadas a partir de la reducción de iones metálicos en presencia de diferentes solventes y materiales orgánicos que han permitido restringir su crecimiento en la escala nanométrica con un control del tamaño, homogeneidad, composición y estructura. En general, se pueden seguir dos rutas para sintetizar nanopartículas metálicas: métodos físicos y métodos químicos. Los métodos físicos, tales como espurreo, evaporación metálica, división mecánica involucran la subdivisión de los metales en bulto. Después de agregar algún tipo de material protector se pueden obtener nanopartículas estables. Aunque estos métodos son utilizados para preparar diversos tipos de nanopartículas, tienen la desventaja de ser poco efectivos para el control del tamaño, forma, estructura y composición, figura 1.4 (Daniel & Astruc, 2004; Pescador Rojas, 2006). En contraste, los métodos químicos como reducción química, reducción fotolítica y reducción radiolítica, juegan un mejor papel en la síntesis de las nanoestructuras metálicas ya que son procesos que permiten controlar el tamaño, forma, estructura interna y composición por medio de la variación de las condiciones experimentales. Para preparar los precursores atómicos que son subsecuentemente agregados a tamaños nanométricos, soluciones iónicas de metales son comúnmente usadas por estos métodos químicos. Diferentes agentes reductores han sido empleados para reducir los iones metálicos; por ejemplo, reductores para preparar dispersiones coloidales de oro incluyen: formaldehídos, alcoholes, monóxido de carbono e hidracina, Figura 1.5 (Pescador Rojas, 2006).

Figura 1.4 Métodos de preparación de las partículas metálicas de tamaño nanométrico.

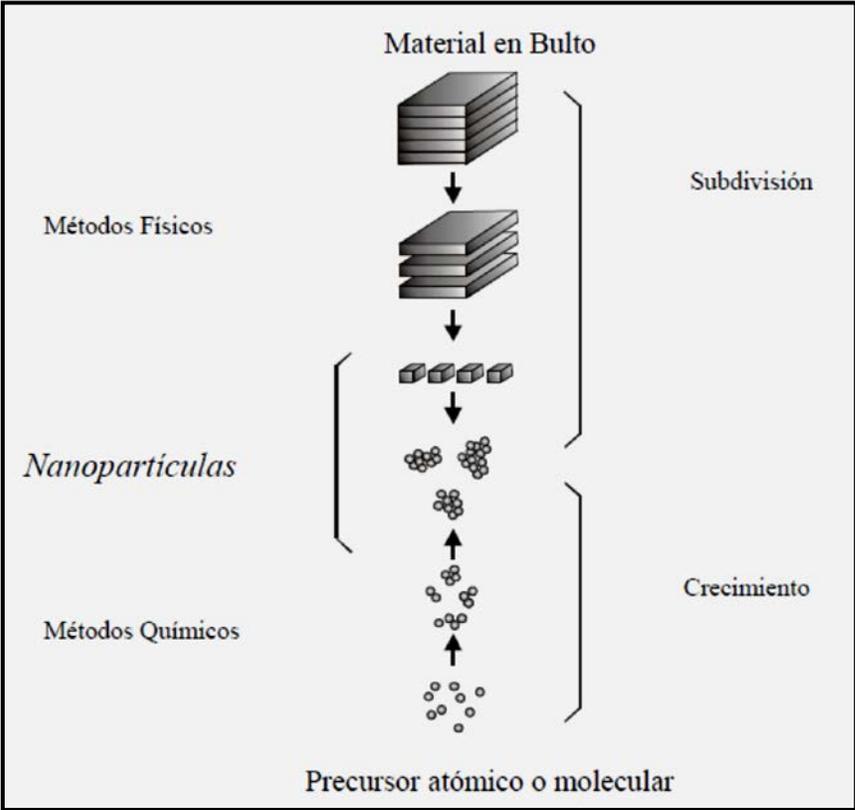


Figura 1.5. Mecanismo de reacción de la reducción de los iones de oro.

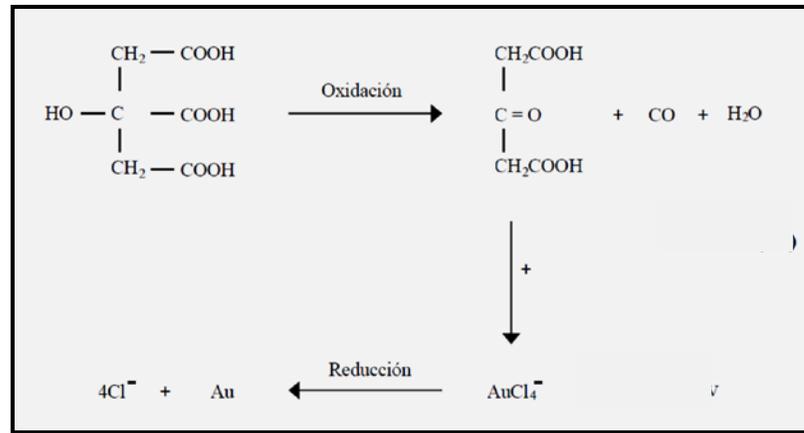
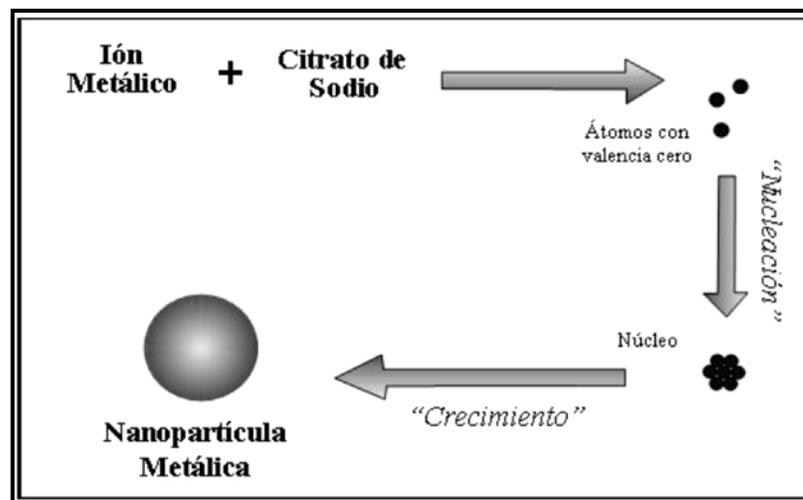


Figura 1.6 Proceso de síntesis de nanopartículas metálicas.



Un método práctico, para sintetizar nanopartículas metálicas en líquidos, es la reducción de iones de las correspondientes sales metálicas en átomos con valencia cero. En sistemas acuosos el agente reductor puede ser adicionado o generado in situ, pero en los sistemas no acuosos el solvente y el agente reductor son uno mismo. Solventes o líquidos que son fácilmente oxidados como por ejemplo los alcoholes pueden así funcionar tanto como agentes reductores y como el agente dispersor. La reducción de iones metálicos por agentes reductores en sistemas acuosos es el método establecido para la preparación de dispersiones coloidales de nanopartículas metálicas. El método de Turkevitch ha sido ya un procedimiento estándar para preparar nanopartículas de oro en agua e involucra la reducción de los iones metálicos con citrato de sodio a átomos con valencia cero, figura 1.5 (Daniel & Astruc, 2004).

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 tales nanoestructuras. Las velocidades de nucleación y crecimiento son determinadas básicamente por las probabilidades de colisiones entre: Átomo-Átomo; Átomo-Núcleo y Núcleo-Núcleo. La primera clase es la responsable del proceso de nucleación y las dos últimas del proceso de crecimiento. Cuando la velocidad de reducción es tan grande que casi todos los iones son reducidos antes de la formación de los núcleos y las probabilidades de colisiones entre átomo-átomo son mayores que las otras dos, el tamaño de las partículas resultantes es monodisperso y determinado por el número de núcleos formados al inicio de la reacción (figura 1.6). Así, todos los parámetros de reacción (temperatura, tiempo, concentración de los reactantes, orden en la cual los reactantes son adicionados a la solución, impurezas) que promuevan la creación de un gran número de núcleos y que reduzcan la velocidad de crecimiento, facilitarán la formación de partículas coloidales metálicas de tamaño nanométrico. Las ventajas de este método químico de preparación son: es muy simple y reproducible, las partículas obtenidas son nanométricas y homogéneas, la estructura, tamaño y forma de las partículas pueden ser controladas variando simplemente

las condiciones de preparación, tales como: el tipo de reductor, contenido de los iones metálicos, temperatura, agitación, etc., las dispersiones coloidales son estables por meses y presentan propiedades para diversas aplicaciones (Correia, 2010; Ferrer, 2008; Pescador Rojas, 2006; Daniel & Astruc, 2004).

1.4 Funcionalización y conjugación de nanopartículas metálicas. El uso de nanopartículas metálicas como marcadores biológicos viene determinada por la posibilidad de funcionalización con diferentes clases de biomoléculas como por ejemplo, anticuerpos, proteínas, enzimas u oligonucleótidos. La adhesión de receptores biológicos a las nanopartículas (biofuncionalización) suele realizarse a través de la unión de diversos grupos, como p.e. tiol terminales con la superficie de las nanopartículas metálicas. A pesar de que ésta es una aproximación válida, en muchos casos este tipo de funcionalización superficial no es tan sencilla ya que puede estar condicionada por el diferente grado de afinidad por la superficie metálica y del agente estabilizante usado en la síntesis de las nanopartículas y en otros casos en los que la bioconjugación se realiza a través de una unión no covalente, ésta puede no ser lo suficientemente estable, lo cual provocaría la agregación/desestabilización de las partículas debido fundamentalmente a la desorción de ligandos o intercambios superficiales dinámicos. Otra alternativa es la deposición de capas delgadas de sílice sobre la nanopartículas, ya que aparte de conferir una mayor estabilidad, la química superficial de la sílice es muy versátil y permitiría reacciones covalentes de bioconjugación a través de grupos funcionales, como por ejemplo los aldehídos o los ácidos carboxílicos (Hasanzadeh, Shadjou, de la Guardia, Eskandani, & Sheikhzadeh, 2012).

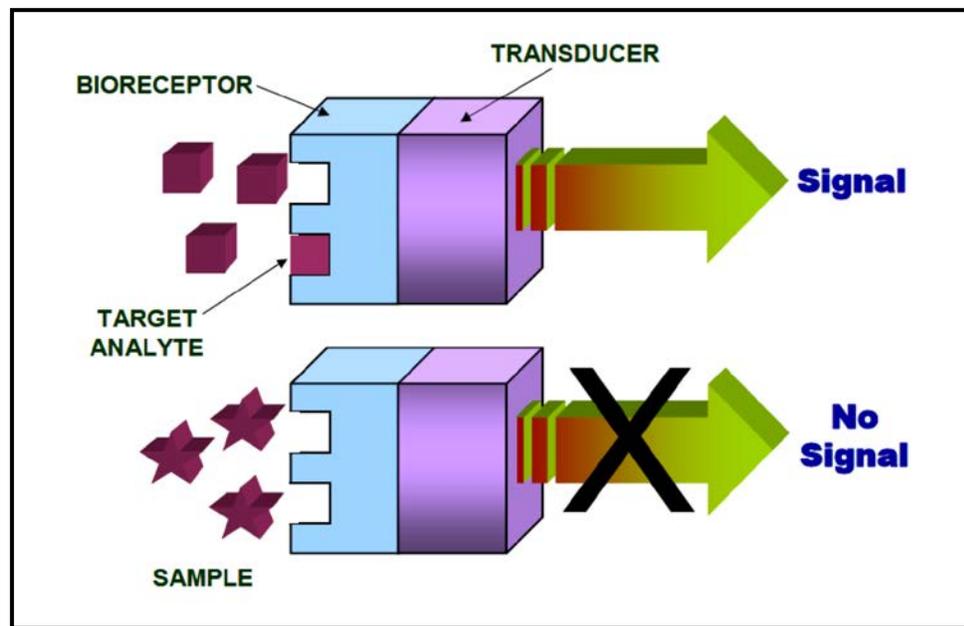
La funcionalización de las nanopartículas puede realizarse en disolución, pero también puede realizarse sobre nanopartículas depositadas sobre sustratos adecuados. Esto requiere una unión relativamente fuerte entre partículas y sustrato, a fin de evitar su desprendimiento durante los procesos de bioconjugación. En el caso de nanopartículas de oro depositadas sobre sustratos de vidrio, puede resultar conveniente la modificación de los sustratos con agentes aminosilano o mercaptosilano, de forma que existan en la superficie

grupos afines a la superficie de las nanopartículas. Un procedimiento alternativo es el uso de polielectrolitos (layer by layer assembly, LBL) para provocar una atracción electrostática entre nanopartículas y sustrato. Esta es una técnica sencilla y de aplicación muy general, que consiste en la inmersión de un sustrato cargado en una disolución de un polielectrolito de carga opuesta, de forma que se deposita una monocapa y se invierte la carga superficial, seguida de la inmersión en una dispersión de nanopartículas cargadas, de forma que se deposita una monocapa de nanopartículas sobre la superficie modificada del sustrato. La gran ventaja de este método es que se puede llevar a cabo a temperatura ambiente sobre gran variedad de sustratos y con nanopartículas que presentan superficies de diversa naturaleza. La sensibilidad de la frecuencia de resonancia plasmónica de nanopartículas metálicas frente a las propiedades dieléctricas del medio que las rodea constituye una herramienta muy útil para la detección selectiva de moléculas mediante la interacción de las mismas con sus receptores biológicos específicos, previamente inmovilizados sobre la superficie de las nanopartículas.

1.5 Biosensores basados en nanopartículas metálicas. Los biosensores constituyen una importante alternativa en el diagnóstico clínico, el control de enfermedades, monitoreo ambiental y en la industria alimentaria para asegurar la calidad y seguridad de los productos y procesos de control, mediante métodos efectivos, rápidos y económicos (Ge & Meng, 2009; Srinivas et al., 2010). Un biosensor se define como un dispositivo compacto de análisis que incorpora un elemento de reconocimiento biológico (ácido nucleico, enzima, anticuerpo, receptor, tejido, célula, aptámeros, nanopartículas) asociado a un sistema de transducción que permite procesar la señal producida por la interacción entre el elemento de reconocimiento y el analito (Cock & Aponte, 2009). El principio de detección de un biosensor se basa en la interacción específica entre el compuesto o microorganismo de interés y el elemento de reconocimiento. Como resultado de esta unión se produce la variación de una o varias propiedades físico-químicas (pH, transferencia de electrones, 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, figura 1.7 (Alkilany & Murphy, 2010). El uso de este tipo de metodologías de biosensado basadas en nanotecnología proveen alternativas interesantes y prometedoras comparadas con las técnicas analíticas convencionales, debido a su tamaño, su especificidad, su alta sensibilidad, su corto tiempo de análisis, su capacidad de inclusión en sistemas integrados, su facilidad de automatización, su capacidad de trabajar en tiempo real, su versatilidad y su bajo costo, entre otras (Thobhani et al., 2010).

Figura 1.7 . Diagrama esquemático de un biosensor.



Uno de los aspectos que más preocupa a la seguridad alimentaria es la presencia de patógenos, derivada de los procesos de manipulación, almacenamiento y control de los alimentos. El diagnóstico rápido y preciso de patógenos y su susceptibilidad a los antibióticos es crítico para el control de infecciones bacterianas (Ivnitski, Abdel-hamid, Atanasov, & Wilkins, 1999). Los ensayos biológicos para la determinación de patógenos son muy importantes, pero requieren desde algunos días hasta semanas para la identificación del agente microbiano; por lo que la implementación de una metodología que requiera menos tiempo de análisis, representaría una ventaja en la solución de problemas de diagnóstico por contaminación de alimentos por patógenos (Shinde, Fernandes, & Patravale, 2011). Tal metodología podría ser representada por el diseño y la elaboración de un inmunosensor basado en nanopartículas metálicas, el cual es capaz de adherirse por bioafinidad a la superficie del patógeno y revelar su presencia mediante distintos métodos analíticos (como fluorescencia y dispersión Raman amplificada), así como para poder evaluar cuantitativamente el número de unidades formadoras de colonias. (Raschke et al., 2003). El cuadro 1.1 muestra algunos reportes recientes sobre el estudio y desarrollo de biosensores para la detección de patógenos y sus biotoxinas basados en el uso de nanopartículas y nanoestructuras (Sanvicens, Pastells, Pascual, & Marco, 2009).

Cuadro 1.1 Biosensores basados en nanopartículas (Sanvicens et al., 2009).

TRANSDUCTOR	NANOPARTICULA (NP)	FUNCIÓN DE LA NP	PATÓGENO	LIMITE DE DETECCIÓN	VENTAJAS
OPTICO	AuNps	Amplificación de la señal	<i>E. coli</i>	58.2 +_ 1.37 pg/mL	El límite detección disminuye 5500 veces comparado con un sistema de AuNPs
	Au-Ag NPs	Sistema de biosensado	<i>S. aureus</i> Enterotoxina B	0.1ng/mL	_____
	AuNPs	Sistema de biosensado	DNA genómico de <i>B. subtilis</i>	2.5 fM	_____
	AuNPs	Sistema de biosensado	Elemento de inserción de <i>S. enteritidis</i>	1ng/mL	_____
	Magnéticas NPs CdSe/ZnS core/shell nanocristales	Sistema de biosensado	<i>E. coli</i> 0157:H7	2.3 UFC/mL	Mayor sensibilidad a los sistemas publicados. Tiempo de ensayo 30 min.
	NPs silica dopadas-colorante	Sistema de biosensado	<i>E. coli</i> 0157:H7	1 UFC/mL	Alta sensibilidad. Tiempo de ensayo 30 min.
	Dendrímeros PAMAM-OH	Amplificación de la señal	<i>P. aeruginosa</i>	-	El límite detección incrementa 350%.
	Dendrímeros PAMAM-NH ₃	Amplificación de la señal	<i>E. coli</i>	1x10 ⁴ UFC/mL	_____
	Liposomas	Amplificación de la señal	Secuencias de RNA de <i>B. anthracis</i> , <i>C. parvum</i> , <i>E. coli</i>	10-100 fmoL	Sistema universal
ELECTRO-QUÍMICO	Au NP modificadas screen-printed electrodos	Amplificación de la señal	<i>E. coli</i> 0157:H7	6 UFC/tira	_____
	PtNP recubiertas de oro film de nanoporos	Amplificación de la señal	<i>E. coli</i>	10 UFC/mL	La muestra no requiere pre-tratamiento
	AuNp basadas en un compuesto de grafito epóxido	Amplificación de la señal	ssDNA de <i>Salmonella</i> sp.	9 fmoL	Material de NOVO con propiedades mejoradas
	Polianilina recubierta con NPs magnéticas	Sistema de biosensado	Endosporas de <i>B. anthracis</i>	4.2 x 10 ² UFC/mL	Tiempo del ensayo 16 min
	Nanotubos de carbono de pared sencilla	Sistema de biosensado	<i>S. infantis</i>	100 UFC/mL	Tiempo del ensayo 1 h. Sistema libre de marcaje

1.6 *Staphylococcus aureus*. El género *Staphylococcus* incluye más de 30 especies, y de las de interés en los alimentos son: *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. hyicus*, *S. delphini*, *S. scheiferi*, *S. caprae*, *S. chromogenes*, *S. cohnii*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. lentus*, *S. saprophyticus*, *S. sciuri*, *S. simulans*, *S. warneri*, *S. xylosus*. Las especies de estafilococos están adaptadas al hospedero, habitando la mitad aproximadamente de las especies conocidas en el hombre. Los mayores números tienden a encontrarse cerca de los orificios naturales de las superficies tales como las ventanas nasales anteriores, las axilas, y las zonas inguinal y perineal donde, en hábitats húmedos, pueden alcanzar cifras de 10^3 - 10^6 por centímetro cuadrado y , en hábitats secos 10 - 10^3 . En los alimentos, las dos procedencias más importantes son los portadores nasales y los individuos cuyas manos y brazos están infestados con diviesos y furúnculos a quienes se les permite manipular alimentos. La mayoría de los animales domésticos albergan *S. aureus*. La mastitis estafilocócica no es desconocida en los rebaños lecheros, y si se ingiere la leche de las vacas infectadas o se usa para fabricar quesos, las probabilidades de contraer una intoxicación alimentaria son elevadas, figura 1.8 (Sospedra, Soler, Mañes, & Soriano, 2012).

Figura 1.8 Microscopia electrónica de *S. aureus* (<http://www.sciencephoto.com>)



En relación a algunas especies que no son *S. aureus*, *S. cohnii* se encuentra en la piel de las personas y alguna que otra vez en el tracto urinario y en las infecciones de las heridas. La piel humana es el hábitat tanto de *S. epidermidis* como de *S. haemolyticus*, estando relacionado el último con infecciones humanas. *S. hyicus* se encuentra en la piel de los cerdos, donde a veces provoca lesiones y ha sido encontrado en la leche y en las aves de corral. La piel de primates inferiores y de otros mamíferos es el hábitat de *S. xylosus*, y la piel de las personas y de otros primates es el hábitat de *S. simulans*, *S. schleiferi* subespecie *schleiferi* fue encontrado en muestras clínicas de personas enfermas con resistencia disminuida a la infección, y la subespecie *coagulans* fue aislada en infecciones de oído de perros. *S. aureus* subespecie *anaerobius* provoca enfermedades en las ovejas, y *S. delphini* fue aislada en delfines. *S. sciuri* se encuentra en la piel de roedores y *S. lentus* y *S. caprae* están relacionados con las cabras, especialmente con la leche de cabra. A pesar de que algunas de estas especies están adaptadas a hospederos no humanos, no se excluye su entrada en los alimentos humanos. Una vez en los alimentos sensibles, es de esperar que su crecimiento lleve a la producción de enterotoxinas. Todas estas especies crecen en presencia del 10% de NaCl (Boer et al., 2009; Normanno et al., 2007).

Los estafilococos existen, al menos en pequeñas cantidades, en cualquier producto alimenticio o en todos los que son de origen animal o en los que son manipulados directamente por personas, a menos que se apliquen pasos en el tratamiento térmico para efectuar su destrucción. Los estafilococos se diferencian de otras bacterias Gram-positivas por tener necesidad de determinados compuestos orgánicos en su nutrición. Necesitan aminoácidos como fuente de nitrógeno y, entre las vitaminas del grupo B, necesitan tiamina y ácido nicotínico. Cuando crecen en anaerobiosis, requieren uracilo. En un medio mínimo para el crecimiento en anaerobiosis y para la producción de enterotoxina, el glutamato monosódico hace las veces de fuente de carbono, nitrógeno, y de energía (Irlinger, 2008).

S. aureus es un microorganismo mesófilo, el crecimiento se produce en un intervalo de entre 7-48°C, las enterotoxinas son producidas entre 10-46°C, siendo la óptima entre 40-45°C. Aunque *S. aureus* crece en medios de cultivo sin NaCl, es capaz de hacerlo a

concentraciones de 7-10%, y algunas cepas crecen hasta a 20% de NaCl. Posee un alto grado de tolerancia a compuestos tales como el telurito, el cloruro mercurico, la neomicina, la polimixina, la azida sódica, todos los cuales han sido usados como agentes selectivos en los medios de cultivo. *S. aureus* puede ser diferenciado de otras especies de estafilococos por su mayor resistencia a la acriflavina. En el caso del borato, *S. aureus* es sensible, mientras que *S. epidermidis* es resistente. Con respecto a la novobiocina, *S. saprophyticus* es resistente, mientras que *S. aureus* y *S. epidermidis* no lo son. La capacidad para tolerar niveles elevados de NaCl es compartida por otros representantes de los géneros *Micrococcus* y *Kocuria*, que están muy difundidos en la naturaleza y generalmente se encuentran en los alimentos en mayor número que los estafilococos, dificultando así el aislamiento de los últimos (Nema, Agrawal, Kamboj, Goel, & Singh, 2007).

S. aureus es capaz de crecer en el intervalo de 4-9.8 pero su pH óptimo se encuentra en el intervalo de 6-7. Lo mismo que sucede con los demás intervalos de crecimiento, el pH mínimo de crecimiento exacto depende del grado hasta el cual los demás parámetros están en niveles óptimos. En la mayonesa de elaboración casera, se produjeron enterotoxinas cuando el pH inicial era de 5.15 y cuando el pH final de crecimiento no tenía un valor menor que 4.7. La SEB se produjo en un nivel de 158ng/100g con un inóculo de aproximadamente 10^5 /g. El tamponado de un medio de cultivo a pH7 hace que se elabore mayor cantidad de SEB que cuando el medio no está tamponado o lo está en la escala ácida. Los estafilococos son capaces de crecer en valores más bajos que los correspondientes a otras bacterias halófilas. Se ha comprobado crecimiento en valores de actividad de agua de 0.83, aunque pueden tolerar a_w de 0.86 como mínima (Wu et al., 2013).

S. aureus produce muchas enzimas y toxinas, que incluyen cuatro hemolisinas (alfa, beta, gamma y delta), nucleasas, proteasas, lipasas, hialuronidasas y colagenasas. Algunas cepas producen una o más exoproteínas adicionales, que incluyen la toxina del síndrome del choque tóxico (TSST1), enterotoxinas estafilocócicas, toxinas exfoliativas y leucocidinas. De las anteriores, las enterotoxinas, las cuales son potentes agentes eméticos, son consideradas de gran riesgo a la salud del consumidor. Aunque se han reportado que *S. aureus* produce

una gran cantidad de enterotoxinas, ocho de ellas han sido bien caracterizadas (tipo A, B, C₁, C₂, C₃, D y E). Las enterotoxinas estafilocócicas (SE) de *S. aureus* son estables a los tratamientos térmicos de 100°C por 30 min, un tratamiento que realmente mata a los microorganismos. Las enterotoxinas son proteínas sencillas que, por hidrólisis, dan 18 aminoácidos, siendo los más abundantes el ácido aspártico, el ácido glutámico, la lisina, y la tirosina. La secuencia de aminoácidos de la SEB fue la que primero se determinó. Su N terminal es ácido glutámico, y la lisina es el aminoácido del C terminal. La SEA, la SEB, y la SEE están compuestas de 239-296 restos de aminoácidos. La SEC₃ 236 restos de aminoácidos, y el N terminal es serina, mientras que N terminal de la SEC₁ es ácido glutámico. Las enterotoxinas son resistentes a enzimas proteolíticas tales como tripsina, quimiotripsina, la renina, y la papaína, pero son sensibles a la pepsina a un pH de 2. Las enterotoxinas son termorresistentes, la actividad biológica de la SEB fue mantenida después del calentamiento durante 16 horas a 60°C y pH7.3. El calentamiento de un preparado de SEC durante 30 minutos a 60°C no dio cambio alguno en las reacciones serológicas. El calentamiento de la SEA a 80°C/3 min o a 100°C/1 min hizo que perdiera su capacidad para reaccionar serológicamente(Podkowik, Park, Seo, Bystroń, & Bania, 2013).

Las enterotoxinas estafilocócicas, junto con la toxina del síndrome del choque tóxico (TSSST), están clasificadas como superantígenos bacterianos con respecto al reconocimiento de antígenos *in vivo*, en contraposición con los antígenos convencionales. En estos últimos, una célula CD4 T facilita el contacto entre los receptores de antígenos de la célula T y las moléculas de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Los superantígenos estafilocócicos se unen directamente a las cadenas β de receptores de las células T sin tratamiento. Una vez unidas a las moléculas de clase II del MHC, las SE estimulan a las células T ayudantes para producir citoquinas tales como las interleucinas (IL), interferón gamma, y factor de la necrosis de los tumores. Los superantígenos son proteínas que activan clones de células T muy diferentes. Entre las citoquinas, se produce una superabundancia de IL-2 y parece ser que es la responsable de muchos o de la mayoría de los síntomas de la gastroenteritis estafilocócica(González-Fandos, Sierra, García-Lopez, García-Fernández, & Otero, 1999).

El carboxilo terminal de las moléculas de las enterotoxinas estafilocócicas es decisivo para varias funciones. En un estudio que usó SEB, la supresión de sólo nueve aminoácidos de esta región motivó la pérdida completa de la actividad para estimular las células T. Se cree que el carboxilo terminal es decisivo para la conformación tridimensional de la molécula de SEB. Los estudios con SEC₁ concluyeron que la enterotoxina se une a una hélice alfa de clase II del MHC de modo que la interacción entre las células presentadoras de antígenos y las células T está estabilizada, determinando la producción de citoquinas y la multiplicación subsiguiente de los linfocitos(Irlinger, 2008).

Los síntomas de la intoxicación alimentaria estafilocócica suele aparecer cuatro horas después de la ingestión del alimento contaminado, aunque se ha informado de un intervalo de 1-6 horas. Los síntomas (náuseas, vómito, calambres abdominales, diarrea, sudoración, cefalalgia, abatimiento, y a veces una disminución de la temperatura corporal) generalmente duran de 24 a 48 horas. En las personas sanas, el tratamiento habitual consiste en reposo y mantenimiento del equilibrio líquido. Después de la remisión de los síntomas, la persona afectada no posee inmunidad demostrable frente a ataques periódicos, aunque los animales se vuelven resistentes a la enterotoxina después de la administración de dosis orales repetidas. La comprobación de la intoxicación alimentaria estafilocócica se realiza aislando estafilococos enterotóxicos en el alimento sobrante y en las heces de las personas afectadas. Se debe intentar extraer la enterotoxina de los alimentos sospechosos, especialmente cuando el número de células viables es escaso. La cantidad mínima de enterotoxina necesaria para provocar la enfermedad en las personas es aproximadamente 20ng (aunque otros autores indican que es de 100ng)(Nema et al., 2007; Viswanathan, Wu, Huang, & Ho, 2006).

S. aureus es una bacteria ubicua, ya que es un comensal zoonótico y del humano. Una gran variedad de alimentos favorecen el crecimiento de los estafilococos enterotoxigénicos. Estos alimentos se contaminan con el microorganismo durante su preparación, y la toxina se formará si el alimento no es manejado cuidadosamente antes de su consumo. Los alimentos que se asocian a intoxicaciones estafilocócicas son: carne de res, jamón, cerdo, salsas, pollo,

pavo, huevo, atún, langosta enlatada, papas, ensaladas, hongos enlatados, macarrones, productos de panadería y productos lácteos(Boer et al., 2009).

Los estafilococos no compiten bien con la flora normal de la mayoría de los alimentos, y sobre todo en aquellos que contienen bacterias ácido lácticas, donde las condiciones permiten el crecimiento de éstos últimos. Se ha demostrado la incapacidad de *S. aureus* para competir tanto en los alimentos frescos como en los congelados. A temperaturas que favorecen el crecimiento de los estafilococos, la flora saprofítica normal de los alimentos depara protección frente al crecimiento de estafilococos debido al antagonismo, a la competición por determinados nutrientes, y a la modificación del medio hacia condiciones menos favorables para *S. aureus*. Las bacterias que se sabe que son antagónicas del crecimiento de *S. aureus* incluyen a *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *S. epidermidis*, las enterobacterias, las bacterias acidolácticas y los enterococos. Se ha demostrado que la SEA es resistente a diversos estreses ambientales, pero el crecimiento de bacterias acidolácticas dio como resultado su disminución, hecho que indujo a pensar que la disminución de la toxina pudo haber sido consecuencia de la actividad de determinadas enzimas y otros metabolitos de las bacterias acidolácticas (Normanno et al., 2007; Sospedra et al., 2012).

2. JUSTIFICACIÓN

a incidencia de enfermedades gastrointestinales asociadas a microorganismos de origen bacteriano como *Staphylococcus aureus* requieren el desarrollo de nuevos métodos de biodetección que sean específicos y sensibles a bajos niveles de contaminación. Por lo que los sistemas de detección basados en el uso de nanopartículas pueden tener un gran potencial para la identificación y cuantificación de éste patógeno.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un inmunosensor basado en nanopartículas de oro para la detección de *Staphylococcus aureus*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Sintetizar y caracterizar nanopartículas de oro para obtener protocolos estandarizados.

Obtener conjugados constituidos por nanopartículas de oro y la proteína estreptavidina unida a su superficie.

Desarrollar el nano-inmunosensor constituido por los conjugados de nanopartículas con estreptavidina unidos a anticuerpos específicos para reconocimiento de *Staphylococcus aureus*.

Conocer las características ópticas y estructurales del bioconjugado y del inmunosensor empleando técnicas ópticas (fluorescencia, UV-Vis), micrográficas (TEM, SEM, AFM) y vibracionales (SERS, FTIR).

Evaluar la capacidad de identificación del nano-inmunosensor sobre *Staphylococcus aureus*.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Reactivos, material biológico y medios de cultivo. Se enlistan a continuación.

Cuadro 4.1 Reactivos, material biológico y medios de cultivo empleados en este trabajo.

Reactivo	Marca
Ácido tetracloroaúrico ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)	Sigma Aldrich®
Citrato de sodio ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	JT Baker®
Cloruro de sodio (NaCl)	Sigma Aldrich®
Reactivos patrón Mc Farland: Acido sulfúrico (H_2SO_4), Cloruro de bario ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).	
Reactivos buffer de fosfatos: Cloruro de sodio (NaCl), Cloruro de potasio (KCl), Fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4), Fosfato dibásico de sodio (Na_2HPO_4).	
Tinción de Gram: Cristal violeta, Yoduro de yodo, Alcohol etílico 95%, Safranina.	
Material Biológico	Marca y/o origen
Estreptavidina (a partir de <i>Streptomyces avidinii</i>).	Sigma Aldrich®
Estreptavidina conjugada con isotiocianato de tetrametil rodamina (TRITC) (a partir de <i>Streptomyces avidinii</i>).	Sigma Aldrich®
Anticuerpo Anti- <i>Staphylococcus aureus</i> biotinilado.	Abcam®
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Donada del Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y Comunidad del Centro de Investigación en Ciencias Microbiológicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
Medio de cultivo	Marca
Agar infusión cerebro corazón	BIOXON de México S.A. de C.V.
Caldo infusión cerebro corazón	BIOXON de México S.A. de C.V.

4.2 Equipos.

4.2.1 Espectrofotómetro de UV/Vis. Las pruebas de espectrofotometría fueron llevadas a cabo empleando un equipo UV/Vis Evolution 300 (Thermo Scientific™) equipado con una lámpara de Xenón y ancho de banda variable. En las mediciones se usó una celda de cuarzo con paso óptico de 1cm fabricada por Agilent. Fue utilizado para medir la banda de resonancia del plasmón superficial de las nanopartículas de oro, conjugado, bioconjugado y biosensor.

4.2.2 Espectrómetro de infrarrojo por transformadas de Fourier (FT-IR). Los análisis por FT-IR fueron efectuados con un espectrómetro de infrarrojo por transformadas de Fourier Bruker Vertex 70 (Alemania) en modo ATR en la región media del Infrarrojo ($4000 - 400\text{cm}^{-1}$), equipado con el accesorio MIRacle ATR y una placa de muestreo con cristal de diamante de Pike Technologies (Wisconsin, USA).

4.2.3 Microscopio electrónico de transmisión (MET). Se empleó un microscopio electrónico de transmisión Philips modelo Tecnai 10 con un voltaje de operación de 80kV para analizar la forma y tamaño de las nanopartículas de oro y del conjugado.

4.2.4 Microscopio confocal de barrido láser. Para evaluar la capacidad de identificación selectiva del biosensor fluorescente sobre *S. aureus* en medio acuoso y en muestras de leche se empleó un microscopio confocal multifotónico 710 Carl Zeiss.

4.2.5 Sistema de medición por bioimpedancia. Para establecer el límite de detección del biosensor fue utilizado un analizador de impedancia modelo 4294A (Agilent) con un rango de frecuencia 40Hz a 100Hz. Este sistema fue adaptado con electrodos de oro posicionados de tal manera que el circuito eléctrico se cierra a través de una muestra de bacterias suspendidas en 150 microlitros. Las mediciones se desarrollan en el rango de frecuencia de 100 Hz a 100 MHz a 181 pasos espaciados logarítmicamente.

4.2.6 Sistema de medición por fotoluminiscencia. Para establecer el límite de detección del biosensor se utilizó un sistema de medición de emisión de fotoluminiscencia (PL, por sus

siglas en inglés, *photoluminescence*) mediante el uso de la línea de excitación 375 nm de un láser de estado sólido Spectra-Physics, con una potencia de salida de 16 mW, pasando por la muestra líquida que está contenida en una celda de cuarzo. La señal de emisión de la muestra se introdujo en un monocromador Horiba Jobin Yvon (iHR320) provisto de un detector de CCD, dos filtros de pase largo (420 y 512 nm) se utilizaron para eliminar la línea láser.

4.3 Preparación de *Staphylococcus aureus*.

4.3.1 Para su conservación. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 fue cultivada en tubos de ensaye con agar inclinado de infusión cerebro corazón e incubada a 37°C por 12 horas, se conservaron en refrigeración a 4°C. Como control de calidad se realizaron tinciones diferenciales de Gram periódicamente. Por microscopia óptica se observan los cocos teñidos de un color azul-morado característicos de una bacteria Gram (+), así mismo se observaron las células agrupadas en racimos de uva características de la bacteria.

4.3.2 Preparación de la bacteria para ensayos con el sensor. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 fue cultivada en una caja petri con agar infusión cerebro corazón (el medio de cultivo se preparó de acuerdo a las especificaciones del fabricante) utilizando la técnica de estría cruzada e incubada a 37°C por 12 horas (como control de calidad se realizaron tinciones diferenciales de Gram). Posteriormente fue tomada una colonia y se inoculó en un matraz Erlenmeyer (capacidad de 25ml) con 20ml de caldo infusión cerebro corazón, se incubó a 37°C por 12 horas (nuevamente se realizó la tinción de Gram como control de calidad). Se tomó un mililitro del cultivo bacteriano y fue colocado en un tubo eppendorf y se centrifugó a 10,000 rpm por 10 minutos hasta obtener un pellet, las células fueron resuspendidas en 1 ml de buffer de fosfatos (10mM) diluido 1/ 100, el procedimiento se repitió tres veces con la finalidad de eliminar el medio de cultivo residual, al final se resuspendió en un volumen de

1ml de buffer de fosfatos 10mM diluido 1/100 . En el cuadro 4.2 se muestran los reactivos utilizados en la preparación del buffer de fosfatos.

Cuadro 4.2 Reactivos utilizados en la preparación de buffer de fosfatos.

Buffer de fosfatos (10mM)	
Cloruro de sodio (NaCl)	0.8g
Cloruro de potasio (KCl)	0.02g
Fosfato monobásico de potasio (KH ₂ PO ₄)	0.027 g
Fosfato dibásico de sodio (Na ₂ HPO ₄)	0.08-0.22g Variar concentración hasta ajustar pH=7.4
Aforar a un volúmen de 100ml.	

4.3.3 Patrón McFarland. Los patrones Mc Farland se utilizan como patrones de turbidez en la preparación de suspensiones bacterianas normalizadas para establecer el número de bacterias por mililitro según una escala que va de 0.5 a 10. Los estándares de Mc Farland se preparan al mezclar soluciones de ácido sulfúrico 0.18M y cloruro de bario 0.048M produciendo la formación de un precipitado de sulfato de bario en volúmenes específicos. La reacción química se describe: $H_2SO_4 (ac) + BaCl_2(ac) \rightarrow BaSO_4 (s) + 2HCl(ac)$. En el cuadro 4.3 se muestran las relaciones de volúmenes para obtener los patrones Mc Farland utilizados en este trabajo. Una vez preparados los estándares utilizando condiciones asépticas se almacenaron al abrigo de la luz a temperatura de refrigeración, evitando la congelación. Antes de ser utilizados deben alcanzar la temperatura ambiente y deben agitarse antes de ajustar la turbidez bacteriana.

Cuadro 4.3 Relación de volúmenes para la preparación de estándares Mc Farland.

Número de estándar	Volúmen 100 ml		Equivalente en número de células/ml
	BaCl ₂ 0.048M (ml)	H ₂ SO ₄ 0.18M (ml)	
0.5	0.5	99.5	1.5x10 ⁸
1	1.0	99	3x10 ⁸
2	2.0	98	6x10 ⁸
3	3.0	97	9x10 ⁸
4	4.0	96	12x10 ⁸
5	5.0	95	15x10 ⁸
6	6.0	94	18x10 ⁸
7	7.0	93	21x10 ⁸
8	8.0	92	24x10 ⁸
9	9.0	91	27x10 ⁸
10	10.0	90	30x10 ⁸

4.3.4 Cuantificación bacteriana por turbidimetría. Una vez preparada la bacteria como se describió en el apartado 4.3.2 fueron utilizados los patrones Mc Farland para ajustar la turbidez de la suspensión microbiana y que correspondiera al estándar número 4 equivalente a 12x10⁸ células/ml; posteriormente se prepararon diluciones seriadas a partir de la suspensión ajustada y se obtuvieron diluciones del microorganismo que fueron desde 12x10⁷ células/ml hasta 12x10⁰ células/ml, se utilizó como diluyente buffer de fosfatos 1/100 a un volúmen final de 10ml. Éstas diluciones bacterianas se utilizarán en los ensayos descritos en los apartados 4.7, 4.8 y 4.9.

4.4 Nanopartículas de oro.

4.4.1 Síntesis de nanopartículas de oro. Las nanopartículas de oro (AuNPs) fueron sintetizadas por reducción química del ácido cloroaúrico ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) utilizando como agente reductor y estabilizante al citrato de sodio ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$). El tamaño de las nanopartículas de oro sintetizadas por este método es de aproximadamente 20nm (Turkevich, John; Cooper 1951; Daniel en Astruc 2004). Se preparó una solución al 4% de HAuCl_4 y se adicionaron 0.5ml a 200ml de agua desionizada llevándose a ebullición con agitación constante, enseguida se adicionaron 3ml de una solución de citrato de sodio al 1%. La reacción se mantuvo en reflujo por 30 minutos. La reacción de síntesis de nanopartículas de oro por citrato reducción presenta una coloración que se aprecia a simple vista, al inicio es incolora pero conforme transcurre el tiempo adquiere tonalidades que van desde el gris pasando por el morado hasta el color final rojo rubí (característico de las partículas monodispersas de aproximadamente 20nm). Posteriormente la reacción se enfrió a temperatura ambiente y se transfirió a tubos falcon, se centrifugaron a 3,500rpm por 40min a una temperatura de 5°C. Se separó el sobrenadante y fue desechado. Se resuspendió el precipitado de nanopartículas de oro en 5ml de agua desionizada estéril y se mantuvieron en refrigeración a 4°C protegidas de la luz hasta su uso.

4.4.2 Caracterización de las nanopartículas de oro por espectrofotometría UV/Vis. Las soluciones coloidales sintetizadas fueron caracterizadas individualmente por espectrofotometría empleando un equipo UV/Vis Evolution 300 (Thermo Scientific™). Se hizo un barrido que comprendió un intervalo de longitud de onda entre los 300-800nm con una resolución de 1nm. Posterior a la síntesis se tomó una alícuota de 1ml y se midió su absorbancia utilizando una celda de cuarzo con paso óptico de 1cm (Agilent). La resonancia del plasmón superficial (SPR, por sus siglas en inglés, *surface plasmon resonance*) es visible

como una banda de absorbanza bien definida cercana a 521nm, característica de coloides monodispersos con un tamaño de 20nm aproximadamente (Haiss et al. 2007).

4.4.3 Determinación del tamaño y concentración de las nanopartículas de oro. El tamaño (d) y concentración (N) de las nanopartículas de oro fueron calculados a partir de las ecuaciones descritas por Haiss et al. 2007. Los espectros UV/Vis de las nanopartículas de oro obtenidos en el apartado 4.4.2 se utilizaron para determinar los valores de absorbanzas. La ecuación de la figura 4.1 (A) fue empleada para calcular el tamaño (en nanómetros, nm) donde A_{spr} = corresponde a la absorbanza de la banda de resonancia del plasmón superficial, A_{450} = corresponde a la absorbanza de las nanopartículas a 450nm, $B_1=3.00$ y $B_2=2.20$ son constantes establecidas por los autores. Esta ecuación teórica-experimental permite calcular tamaños de partículas entre 5-80nm (Haiss et al. 2007). La ecuación de la figura 4.1 (B) se utilizó para calcular la concentración (partícula en mililitro, p/ml) donde A_{450} = coresponde a la absorbanza de las nanopartículas a 450nm y d =es ell tamaño de la nanopartícula (calculado anteriormente). Se utilizó el software MathCad 15.0 para realizar los cálculos.

Figura 4.1. Ecuaciones empleadas en la determinación de tamaño d (A) y concentración N (B) de nanopartículas de oro.

$d = \exp\left(B_1 \frac{A_{spr}}{A_{450}} - B_2\right)$	$N = \frac{A_{450} \times 10^{14}}{d^2 \left[-0.295 + 1.36 \exp\left(-\left(\frac{d - 96.8}{78.2}\right)^2\right) \right]}$
(A)	(B)

4.4.4 Caracterización de las nanopartículas de oro por microscopia electrónica de transmisión (MET). Se empleó un microscopio electrónico de transmisión Philips modelo Tecnai 10 con un voltaje de operación de 80kV para obtener imágenes que permitieron analizar forma y tamaño de las nanopartículas de oro. A partir de las imágenes MET se

determinó el área de las nanopartículas utilizando el programa ImageJ (programa de procesamiento de imágenes desarrollado por NIH, por sus siglas en inglés, *National Institute of Health*) y se realizó un análisis de distribución de tamaños de nanopartículas.

4.4.5 Caracterización de las nanopartículas de oro por FT-IR. Las nanopartículas de oro sintetizadas y caracterizadas como se describió en las metodologías de los apartados 4.4.2 y 4.4.3 fueron analizadas por FT-IR. Se usó como background base seca cristal efectuándole 30 barridos, posteriormente se colocaron 1.5 μ l de nanopartículas en el cristal de ATR hasta sequedad y se midió la muestra, cada espectro fue producto de 120 barridos.

4.5 Conjugado: nanopartículas de oro recubiertas con estreptavidina. Una vez sintetizados y caracterizados los coloides (como se describió en el apartado 4.4) se ensambló el siguiente elemento del sensor “el conjugado” que está constituido por la nanopartícula recubierta por una proteína, con la finalidad de estabilizar el coloide y permitir la unión posteriormente con el elemento de reconocimiento biológico (ERB). Se empleó a la proteína estreptavidina en dos presentaciones: sin marcar y marcada con el fluoróforo isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC, por sus siglas en inglés, *tetramethylrhodamine*).

4.5.1. Conjugación de nanopartículas de oro con estreptavidina sin marcar. Se llevó a cabo un experimento para determinar la concentración óptima de estreptavidina para recubrir la superficie de las nanopartículas de oro. Las nanopartículas se alicuotaron en tubos eppendorf y a cada tubo se le agregaron concentraciones crecientes de estreptavidina, las concentraciones de nanopartícula y proteína se muestran en el cuadro 4.4. Los tubos fueron agitados en vortex e incubados por 4 minutos a temperatura ambiente.

Cuadro 4.4 Relación de concentraciones utilizadas en la conjugación.

Estreptavidina (1mg/mL)	Nanoparticulas	Concentración estreptavidina (ug/ml)
3µl	997µl	3µg/ml
5µl	995µl	5µg/ml
10µl	990µl	10µg/ml
15µl	985µl	15µg/ml
20µl	980µl	20µg/ml
25µl	975µl	25µg/ml
30µl	970µl	30µg/ml
45µl	955µl	45µg/ml
60µl	940µl	60µg/ml
90µl	910µl	90µg/ml

Con el objetivo de determinar la concentración óptima de proteína que recubre a las nanopartículas y las estabiliza, se planteo un experimento donde de manera indirecta es posible establecer esa concentración y/o intervalo óptimo. Una vez llevado a cabo el proceso de conjugación utilizando diferentes concentraciones de proteína, se adicionó a cada tubo de reacción 1ml de NaCl al 10% y se homogeneizo, el objetivo fue promover la agregación de las nanopartículas que no fueron recubiertas con la estreptavidina sobre las que permanecen estables y no se agregan ya que han sido recubiertas eficientemente con la proteína. Visualmente se observó un cambio de color: las nanopartículas recubiertas completamente con proteína permanecieron con el color rojo-rubi característico, las nanopartículas agregadas se tornaron azul-violáceas.

4.5.1.1 Caracterización por espectrofotometría UV/Vis del conjugado. Se realizaron mediciones en el espectrofotómetro UV/Vis y se analizaron las bandas de absorción del plasmon superficial para cada tubo de reacción y así se determino la concentración y/o intervalo de proteína que recubrio eficientemente a las nanopartículas de oro basados en la

forma de línea de los espectros de absorción. Con los espectros obtenidos se realizó un análisis de espectroscopia de derivadas, en el que se representa gráficamente un intervalo dado de longitudes de onda del cociente diferencial $dA/d\lambda$, donde A representa la absorción de un espectro normal y λ la longitud de onda. Un análisis de la primera derivada de los espectros UV/Vis de los conjugados permitió establecer diferencias más notables entre ellos. Se utilizó el programa ORIGIN 6.

4.5.1.2 Caracterización del conjugado por FT-IR. El conjugado fue analizado por FT-IR, se usó como background base seca cristal efectuándole 30 barridos, posteriormente se colocaron 1.5 μ l del conjugado en el cristal de ATR hasta sequedad y se midió la muestra, cada espectro fue producto de 120 barridos.

4.5.1.3 Caracterización del conjugado por MET. Se empleó un microscopio electrónico de transmisión Philips modelo Tecnai 10 con un voltaje de operación de 80kV para obtener imágenes que permitieron identificar la adsorción de la proteína a la superficie de la nanopartícula de oro.

4.5.1.4 Ensayos de estabilidad del conjugado. Se diseñó un experimento con la finalidad de evaluar la estabilidad de los conjugados durante un período de 8 semanas. Durante el ensayo se midieron semanalmente los espectros UV/Vis de los conjugados. Los conjugados evaluados fueron preparados a tres concentraciones de proteína 15, 20 y 25 μ g/ml. Se analizaron tres series de éstos conjugados, a la primera se le adicionó 1 ml de NaCl al 10%, a la segunda serie 1 ml de buffer PBS (1X, 7.4) y la tercera serie permaneció tal cual. Los controles fueron la solución de nanopartículas de oro y el buffer PBS 7.4. Se midió el pH de cada una de las series evaluadas y de los controles. Se colocaron en tubos cilíndricos de plástico protegidos de la luz y se conservaron a 4°C durante todo el ensayo.

4.5.2 Conjugación de nanopartículas de oro con estreptavidina-TRITC. Se llevó a cabo un experimento para establecer la concentración óptima de proteína-TRITC que recubre a las nanopartículas. La metodología general fue descrita en el apartado 4.5.1. Las concentraciones empleadas se muestran en el cuadro 4.4.

4.5.1.1 Caracterización por espectrofotometría UV/Vis del conjugado-TRITC. La metodología empleada se describió en el apartado 4.5.1.1.

4.5.2.2 Caracterización del conjugado fluorescente por FT-IR. La metodología empleada se describió en el apartado 4.5.1.2.

4.6 Bioconjugado: conjugado unido al anticuerpo biotinilado *Anti-Staphylococcus aureus*.

La siguiente etapa en la construcción del sensor es la que corresponde al ensamblaje del elemento de reconocimiento biológico (ERB) sobre el conjugado. Se utilizó el anticuerpo biotinilado *Anti-Staphylococcus aureus*. Se contruyeron dos bioconjugados a partir de los conjugados descritos en el apartado 4.5.

4.6.1 Determinación de la concentración de anticuerpo biotinilado para el bioconjugado.El bioconjugado se construyó a partir del conjugado a una concentración de estreptavidina de 20µg/ml. Para establecer la cantidad de anticuerpo biotinilado necesario para adherirse a los sitios de unión de la estreptavidina, se llevo a cabo un experimento de validación del anticuerpo biotinilado en donde se utilizó un gradiente de concentración de la inmunoglobulina que fue desde: 100µg/mL, 50µg/mL, 25µg/mL, 10µg/mL, 5µg/mL, 2µg/mL y 1µg/mL. El diluyente fue una solución buffer de fosfatos diluída 1/100. Una vez preparadas las diluciones se adicionaron en tubos por separado 50µL del anticuerpo a las diferentes concentraciones y 450µl del conjugado (preparado como se describió en el apartado 4.5). Los tubos eppendorf se agitaron a 500rpm y se incubaron a 37°C por 1hr. Con la finalidad de eliminar el exceso de anticuerpo se realizó una centrifugación a 13, 00 rpm por media hora a 4°C, se retiró el sobrenadante y se resuspendio el pellet con agua. Los bioconjugados se almacenaron a 4°C hasta su uso en el bioreconocimiento del analito como se describe en el apartado 4.7.

4.6.1.1 Caracterización del bioconjugado por UV/Vis. Se realizaron mediciones de los bioconjugados en un espectrofotómetro UV/Vis y se analizaron las bandas de absorción del plasmon superficial para cada bioconjugado. Con los espectros obtenidos se realizó un análisis de espectroscopia de derivadas, en el que se representa gráficamente un intervalo

dado de longitudes de onda del cociente diferencial $dA/d\lambda$, donde A representa la absorción de un espectro normal y λ la longitud de onda. Un análisis de la primera derivada de los espectros UV/Vis de los bioconjugados permitió establecer diferencias más notables entre los bioconjugados. Se utilizó el programa ORIGIN 6.

4.6.1.2 Caracterización del bioconjugado por FT-IR. El bioconjugado fue analizado por FT-IR, se usó como background base seca cristal efectuándole 30 barridos, posteriormente se colocaron 1.5 μ l del bioconjugado en el cristal de ATR hasta sequedad y se midió la muestra, cada espectro fue producto de 120 barridos.

4.6.2 Determinación de la concentración de anticuerpo para el bioconjugado fluorescente. El bioconjugado se construyó a partir del conjugado fluorescente a una concentración de estreptavidina-TRITC de 30 μ g/ml. La metodología empleada se describió en el apartado 4.6.1.

4.6.2.1 Caracterización por UV/Vis del bioconjugado fluorescente. La metodología empleada se describió en el apartado 4.6.1.1.

4.6.2.2 Caracterización del bioconjugado fluorescente por FT-IR. La metodología empleada se describió en el apartado 4.6.1.2. **4.7 Bioreconocimiento del nano-inmuno sensor fluorescente sobre *Staphylococcus aureus*.** Una vez ensamblado el bioconjugado fluorescente como se describió en el apartado 4.6 se realizaron ensayos de biodetección sobre el microorganismo de interés. Así mismo se empleó a *Escherichia coli* como control negativo y se realizaron mezclas de ambos microorganismos para evaluar la capacidad de reconocimiento específico del sensor. Estos ensayos se llevaron a cabo tanto en un medio acuoso como en leche. Se utilizó la microscopía confocal de fluorescencia para evaluar la capacidad de biodetección específica del sensor propuesto.

4.7.1 Preparación bacteriana. *Staphylococcus aureus* fue estandarizada por turbidimetría como se describió en el apartado 4.3.4., las concentraciones bacterianas empleadas para los ensayos de bioreconocimiento fueron de 1×10^9 células/ml, 1×10^7 células/ml, 1×10^5 células/ml

y 1×10^3 células/ml. Se utilizó como diluyente buffer de fosfatos 7.4 diluído 1/100 (ver cuadro 4.5).

4.7.2 Ensayos de bioreconocimiento. En un tubo eppendorf se mezclaron: 250µl de una suspensión bacteriana (a las concentraciones bacterianas descritas en el apartado 4.7.1) y 250µl del bioconjugado fluorescente, se homogeneizo la mezcla e incubó a 37°C por 1 hora. Posteriormente se tomaron 5µl del sensor fluorescente y se colocaron en un portaobjetos para ser analizados por microscopia confocal de fluorescencia.

4.7.3 Ensayos de bioreconocimiento empleando control bacteriano. Se realizaron experimentos control siguiendo las metodologías descritas en los apartados 4.7.1 y 4.7.2 utilizando a *E. coli* como control negativo y en un experimento independiente se realizó una mezcla de ambas bacterias con la finalidad de evaluar la capacidad selectiva del sensor. Para éste ultimo ensayo se utilizaron volúmenes de 150µl de cada microorganismo para mantener un volumen de 250µl para una relación final 1:1. Posteriormente se tomaron 5µl de cada ensayo y se colocaron en portaobjetos para ser analizados por microscopia confocal de fluorescencia (ver cuadro 4.5).

4.7.4 Ensayos de bioreconocimiento empleando una matriz alimentaria. Se llevaron a cabo experimentos de bioreconocimiento empleando como matriz alimentaria leche parcialmente descremada ultrapasteurizada (alpura 2000 Clásica 250ml; especificaciones del producto: grasa saturada 21%, otras grasas 6%, azúcares totales 13% y sodio 6%). Se utilizó como diluyente a la leche en tres concentraciones: sin diluir, 1/100 y 1/1000. Se llevaron a cabo las metodologías descritas en los apartados 4.7.1, 4.7.2 y 4.7.3. En el cuadro 4.5 se muestra la relación de ensayos llevados a cabo para evaluar el bioreconocimiento del sensor.

DILUYENTE	MICROORGANISMO			
	1x10 ⁹ células/ml	1x10 ⁷ células/ml	1x10 ⁵ células/ml	1x10 ³ células/ml
Buffer de fosfatos diluido 1/100	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>
	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
	Mezcla	Mezcla	Mezcla	Mezcla
Leche	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>
	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
	Mezcla	Mezcla	Mezcla	Mezcla
Leche diluida 1/100	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>
	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
	Mezcla	Mezcla	Mezcla	Mezcla
Leche diluida 1/1000	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>
	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
	Mezcla	Mezcla	Mezcla	Mezcla

Cuadro 4.5 Relación de ensayos empleados para evaluar el nano-inmuno sensor.

4.8 Determinación del límite de detección del sensor fluorescente: sistema de espectroscopia de fotoluminiscencia. Con la finalidad de establecer la concentración mínima de *Staphylococcus aureus* que es detectada por el sensor se utilizó un sistema de medición por fotoluminiscencia como se describe en el apartado 4.2.6.

4.8.1 Preparación bacteriana. *Staphylococcus aureus* fue estandarizada por turbidimetría como se describió en el apartado 4.3.4., posteriormente se prepararon diluciones seriadas a partir de la suspensión ajustada y se obtuvieron diluciones del microorganismo que fueron

desde 12×10^8 células/ml hasta 12×10^0 células/ml, se utilizó como diluyente buffer de fosfatos 1/100 a un volúmen final de 10ml.

4.8.2 Preparación del sensor. Una vez ensamblado el sensor fluorescente como se ha descrito en los apartados 4.4, 4.5 y 4.6, se llevaron a cabo los experimentos de bioreconocimiento utilizando las diluciones seriadas del microorganismo. Se diseñó un ensayo en donde se filtraron por membrana cada uno de los sensores (bioconjugado+bacteria) de tal manera que fueron retenidos sobre ella los bioconjugados unidos a la bacteria, los permeados correspondieron al bioconjugado (conjugado fluorescente + anticuerpo) que no se unió a la bacteria y que por centrifugación pasó a través de la membrana. Se midió la intensidad de fotoluminiscencia a 574nm de los bioconjugados fluorescentes presentes en el permeado y de manera indirecta se correlacionó con la concentración bacteriana conocida de cada muestra. Como controles se utilizaron a la bacteria y al conjugado fluorescente (nanopartícula+estreptavidina-TRITC). Se graficaron las bandas de emisión a 574nm utilizando el programa ORIGIN 6.0.

4.9 Determinación del limite de detección del sensor fluorescente: sistema de bioimpedancia. Con la finalidad de establecer la concentración mínima de *S. aureus* que es detectada por el sensor se utilizó un sistema de medición por impedancia como se describe en el apartado 4.2.5.

4.9.1 Preparación bacteriana. *Staphylococcus aureus* fue estandarizada por turbidimetría como se describió en el apartado 4.3.4, posteriormente se prepararon diluciones seriadas a partir de la suspensión ajustada y se obtuvieron diluciones del microorganismo que fueron desde 12×10^8 células/ml hasta 12×10^0 células/ml, se utilizó como diluyente buffer de fosfatos 1/100 a un volúmen final de 10ml.

4.9.2 Preparación del sensor Una vez ensamblado el sensor fluorescente como se ha descrito en los apartados 4.4, 4.5 y 4.6, se llevaron a cabo los experimentos de bioreconocimiento utilizando las diluciones seriadas del microorganismo. Se utilizó un analizador de impedancia modelo 4294A (Agilent) con un rango de frecuencia 40Hz a 100Hz.

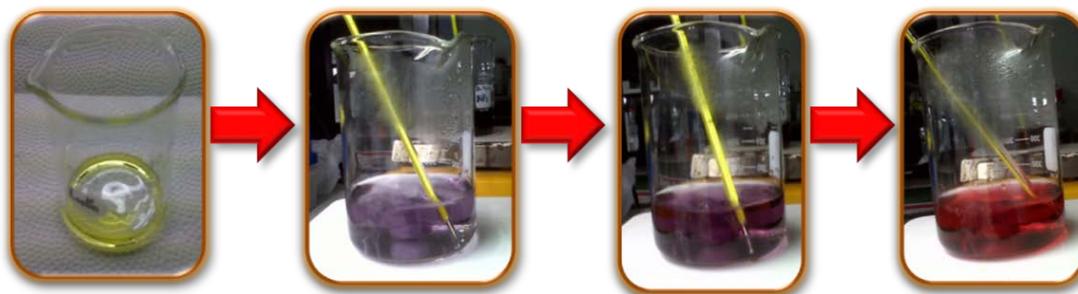
Este sistema fue adaptado con electrodos de oro posicionados de tal manera que el circuito eléctrico se cierra a través de una muestra de bacterias suspendidas en 150 microlitros. Las mediciones se desarrollan en el rango de frecuencia de 100 Hz a 100 MHz a 181 pasos espaciados logarítmicamente.

5. RESULTADOS Y DISCUSIONES

5.1 Nanopartículas de oro.

5.1.1 Síntesis de nanopartículas de oro. En este método de síntesis se utilizó una solución acuosa de ácido cloroáurico (HAuCl_4), el cual funcionó como precursor, y una solución de citrato de sodio ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$) que actuó como agente reductor. Estas soluciones se mezclaron, al inicio no se observó coloración, después de algunos minutos, la solución se tornó color púrpura y posteriormente se obtuvo el color rojo rubí característico de las nanopartículas de oro de tamaño nanométrico (≈ 20 nm) Figura 5.1 Existe un intervalo en el que no se presenta coloración durante la reacción, esto se debe a la formación del precursor llamado ácido dicarboxílico cetona, como producto de la oxidación del citrato el cual funciona como agente reductor de los iones de oro en átomos con valencia cero.

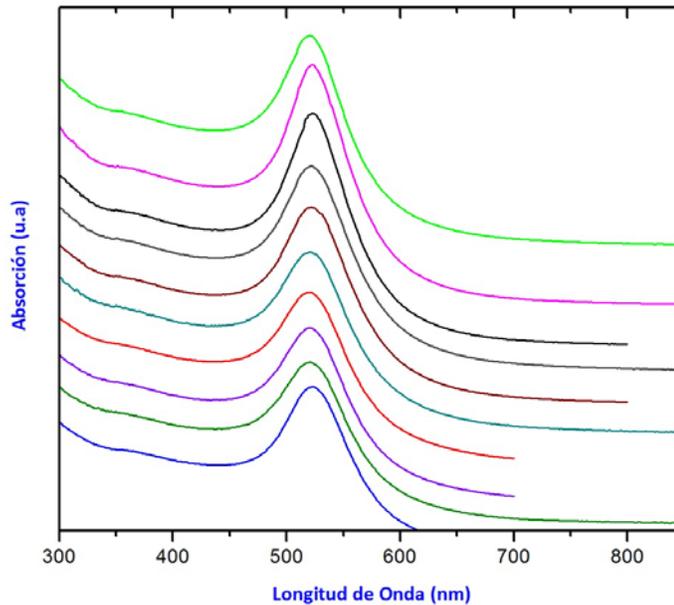
Figura 5.1 Síntesis de nanopartículas metálicas de oro.



Se llevaron a cabo una serie de reacciones de síntesis de nanopartículas de oro por el método de reducción con citrato de sodio, las cuales fueron caracterizadas individualmente por espectrofometría UV/Vis con la finalidad de observar la resonancia del plasmón superficial (RPS), que es la frecuencia a la cual oscilan los electrones de conducción en respuesta al campo eléctrico alternante de una onda electromagnética incidente. La RPS es responsable de los colores atractivos de las soluciones coloidales de algunas partículas

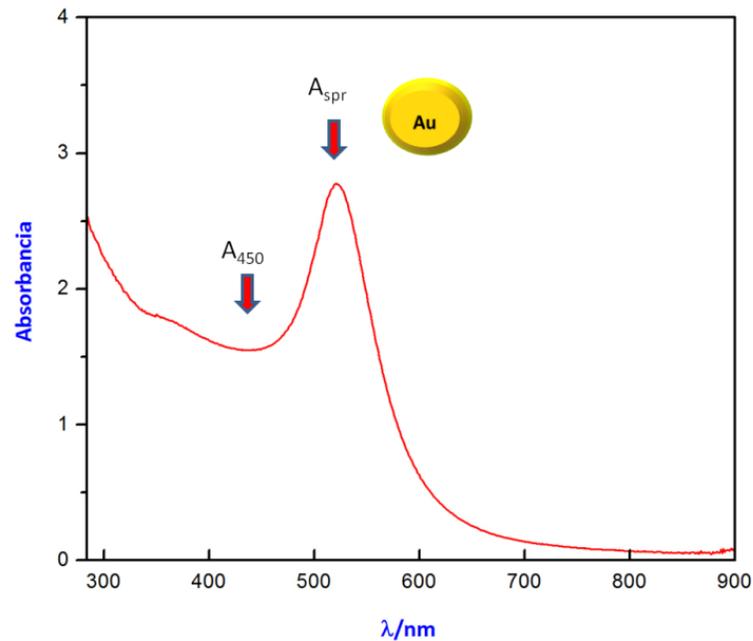
metálicas. Las nanopartículas de oro (3-500nm) absorben en el intervalo visible con un pequeño valle entre 500-600nm, Figura 5.2.

Figura 5.2. Bandas de resonancia características de nanopartículas de oro de aproximadamente de 20nm.



5.1.2 Caracterización de las nanopartículas de oro por espectrofometría UV/Vis. A partir de las ecuaciones descritas por Hais et al. (2007), se determinaron el tamaño y la concentración de nanopartículas de oro a partir de los espectros UV/Vis de las soluciones coloidales sintetizadas, considerando la absorbancia de la banda de resonancia del plasmón de superficie (A_{spr}) y de la absorbancia a una longitud de onda de 450nm (A_{450}), Figura 5.3. La metodología y ecuaciones empleadas se describieron en el capítulo de Materiales y métodos apartado 4.4.2.

Figura 5.3. Valores de absorbancias consideradas para determinar tamaño y concentración.



En el cuadro 5.1 se muestran los valores experimentales obtenidos que se utilizaron en la determinación de tamaño (d) y concentración (N) de nanopartículas de oro. Se llevaron a cabo doce reacciones de síntesis, y a partir de los espectros UV/Vis de cada una de las reacciones se aplicaron las ecuaciones previamente descritas. Es importante señalar que la ecuación empleada para determinar tamaño (Figura 4.1 A) permite determinar el tamaño de nanopartículas que oscilan entre 5-80nm. Los tamaños calculados experimentalmente se encuentran dentro de un rango de 11-40 nm aproximadamente. Así mismo, la mayor parte de las concentraciones calculadas se encuentran dentro del orden de magnitud 10^{12} p/mL. A partir de los resultados teóricos y experimentales, (Haiss et al.,2007) reportan una serie de tablas que permiten al lector obtener cálculos aproximados de tamaño (d) de nanopartícula sin llevar a cabo cálculos matemáticos. Con la finalidad de comparar los resultados obtenidos a partir de las ecuaciones y aquellos reportados en las tablas, se construyó el cuadro 5.2

donde se muestran los cocientes de la absorbancia de la banda de resonancia del plasmón de superficie (A_{spr}) sobre la absorbancia a una longitud de onda de 450nm (A_{450}). Los cocientes de la segunda columna corresponden a los datos obtenidos experimentalmente, en la tercer columna el tamaño de nanopartícula calculada, en la columna cuatro se muestran los cocientes tabulados y en la última columna el tamaño de nanopartícula reportada en tablas. Como se observa los cocientes a partir de los valores experimentales comparados con los cocientes tabulados nos dan un tamaño de nanopartícula muy cercano entre sí. Los resultados obtenidos en el cuadro 6.2 permitieron establecer que es posible determinar el tamaño (d) de la nanopartícula a través de la ecuación de la Figura 4.1 (A) o bien a partir de valores tabulados

Cuadro 5.1. Tamaños y concentraciones calculados experimentalmente a partir de las ecuaciones.

Rxn	A _{spr}		A ₄₅₀	5-80nm	
	X	Y	Y	d (nm)	N (p/mL)
1	523	2.165	1.119	36.7	0.18x10 ¹²
2	522	3.326	1.706	38.4	0.23x10 ¹²
3	522	3.149	1.589	42.3	0.16x10 ¹²
4	519	2.366	1.452	14.7	4.28x10 ¹²
5	520	2.328	1.374	17.8	2.19x10 ¹²
6	521	2.215	1.333	16.2	2.90x10 ¹²
7	520	1.596	1.029	11.6	6.33x10 ¹²
8	523	2.499	1.526	15.0	4.16x10 ¹²
9	526	2.451	1.428	19.0	1.85x10 ¹²
10	522	2.674	1.512	22.3	1.19x10 ¹²
11	520	2.878	1.624	22.5	1.23x10 ¹²
12	521	2.779	1.56	23.2	1.09x10 ¹²
13	521	3.136	1.78	21.88	1.49 x10 ¹²
14	520	2.963	1.655	23.83	1.06 x10 ¹²
15	522	2.655	1.659	13.48	6.43 x10 ¹²
16	521	3.044	1.872	14.56	5.69 x10 ¹²
13	521	3.136	1.78	21.88	1.49 x10 ¹²
14	520	2.963	1.655	23.83	1.06 x10 ¹²
15	522	2.655	1.659	13.48	6.43 x10 ¹²
16	521	3.044	1.872	14.56	5.69 x10 ¹²
17	523	1.99	1.179	17.61	1.97 x10 ¹²
18	521	3.03	1.689	24.09	1.04x10 ¹²
19	523	3.159	1.75	25.23	9.35 x10 ¹²
20	521	2.574	1.512	18.30	2.23 x10 ¹²

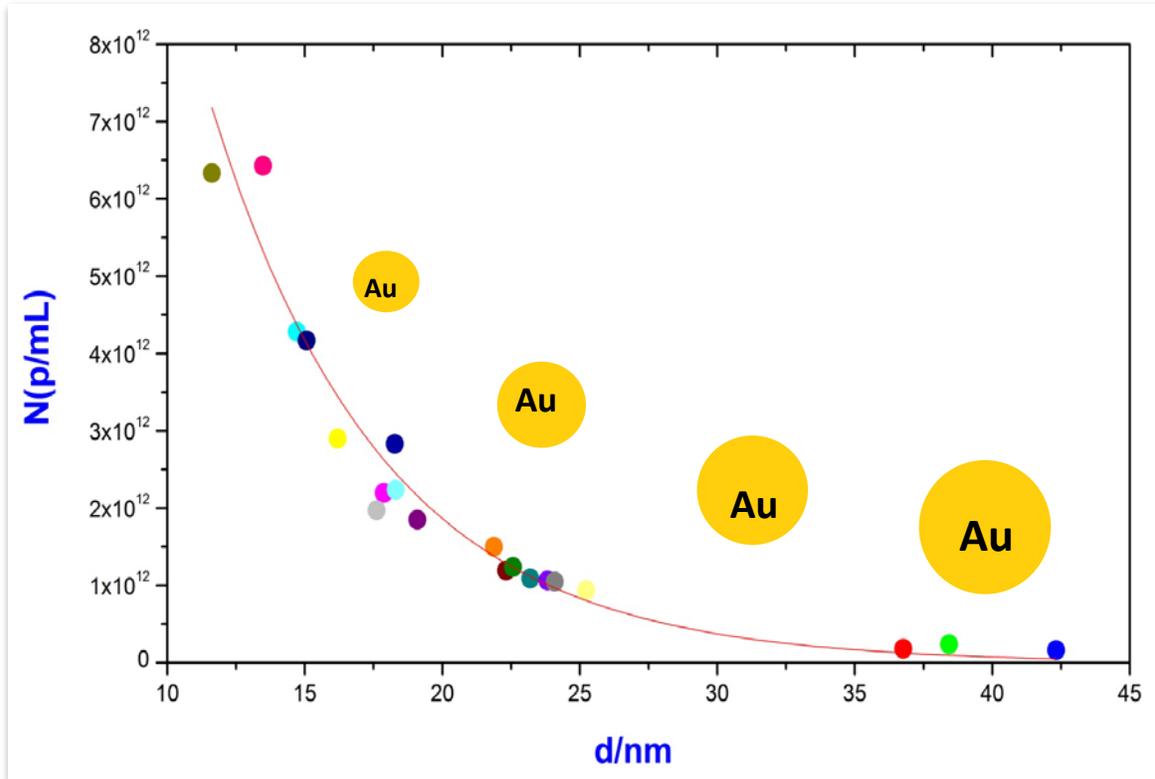
Cuadro 5.2 Comparación de tamaños (d) de nanopartículas calculados experimentalmente y tamaños de nanopartículas tabuladas.

Rxn	A_{spr}/A_{450} (Exp)	d/nm (Exp)	A_{spr}/A_{450} (Tabla)	d/nm (Tabla)
1	1.93	36.7	1.92	35
2	1.95	38.4	1.96	40
3	1.98	42.3	2	45
4	1.63	14.7	1.61	14
5	1.69	17.8	1.69	18
6	1.66	16.2	1.65	16
7	1.55	11.6	1.56	12
8	1.64	15.0	1.65	16
9	1.72	19.0	1.73	20
10	1.77	22.3	1.73	20
11	1.77	22.5	1.73	20
12	1.78	23.2	1.8	25

A

partir de los valores de tamaño (d) y concentración (N) de nanopartículas se construyó una gráfica y se observó una dependencia exponencial de la concentración de nanopartículas/mL y el tamaño de nanopartícula. Cuando se sintetizaron nanopartículas de oro que oscilaron entre 30-40 nm la concentración se calculó menor a 1×10^{12} p/mL, la concentración de nanopartícula cuyo tamaño fue entre 10-15nm fue mayor a 6×10^{12} p/mL. Sin embargo, la mayor parte de las síntesis que se llevaron a cabo formaron tamaños homogéneos de nanopartículas cuyos tamaños oscilaron entre 15 a 25nm con una concentración entre $1-4 \times 10^{12}$ p/mL. Figura 5.4.

Figura 5.4. Dependencia exponencial de la concentración de nanopartículas de oro (d) respecto al tamaño de nanopartícula (N).



5.2 Conjugado: nanopartículas de oro recubiertas con estreptavidina. Las nanopartículas de oro (AuNPs) poseen atributos físicos y químicos importantes por lo que han sido utilizadas como la base de sensores químicos y biológicos con aplicaciones en óptica, catálisis, ciencia de los materiales, bio-nanotecnología así como biología, nanomedicina y microbiología de los alimentos (Park et al. 2010; Krishnendu et al, 2011;. Khan et al, 2012;. Sapsford et al, 2013). Las AuNPs se sintetizan de una manera sencilla y son estables (Daniel et al., 2004), poseen una relación superficie-volumen alta y presentan biocompatibilidad con ligandos biológicos (Soenen et al., 2015). Estas propiedades de biocompatibilidad pueden

ajustarse variando su tamaño, forma y el ambiente químico circundante (Haiss et al, 2007;. Krishnendu et al, 2011;. Nguyen et al, 2014). La funcionalización de la superficie de las AuNPs con biomoléculas genera materiales híbridos que ha posibilitado que las nanopartículas interactúen específicamente con sistemas biológicos (Daniel et al, 2004;. Boisselier, 2009; Sapsford y col ., 2013). La afinidad de las AuNPs metálicas por tioles, disulfuros, ditiocarbamatos, aminas y otros ligandos permite la bioconjugación con una variedad de moléculas biológicas incluyendo ligandos de bajo peso molecular (ácido, tiamina, ácido dimercaptosuccínico fólico), polisacáridos (ácido hialurónico, quitosano, dextrano, oligosacáridos, heparina), ácidos grasos poliinsaturados (ácido palmítico, fosfolípidos), oligómeros de ADN y proteínas (transferrina, anticuerpos, lectinas, citoquinas, fibrinógeno, trombina) (Dang et al, 2005; Haiss et al, 2007; Wampler et al, 2009; Thanh et al, 2010; Chai et al, 2012; Sapsford et al, 2011; Sapsford et al, 2013). Los sistemas basados en afinidad como: el sistema de estreptavidina-biotina posibilita el empleo de un gran número de aplicaciones en bio-nanotecnología (Thanh et al, 2010; Chen y otros, 2013, Sapsford et al, 2013). La molécula de biotina tiene una fuerte interacción y especificidad por la molécula de estreptavidina ($K_d \sim 10^{-15}$ M), la asociación entre ellas no es afectada por los pH extremos, disolventes orgánicos y otros agentes desnaturalizantes (Waner et al, 2008;. Katz , 1997, González et al., 1997).

5.2.1 Conjugación de nanopartículas de oro con estreptavidina. Las nanopartículas de oro, una vez que han sido sintetizadas poseen una superficie cargada negativa formada principalmente por grupos citratos, provenientes de la síntesis de las mismas. Esta carga negativa de la superficie produce repulsión entre cada una de ellas, constituyendo así el estado coloidal, manteniéndose estables. Sin embargo, con el paso del tiempo esta carga negativa va debilitándose por la adherencia de cargas positivas constituidas por compuestos remanentes del proceso de síntesis. Una vez que la carga superficial de las nanopartículas se agota, no existen fuerzas electrostáticas de repulsión que impidan el acercamiento entre ellas, dando origen así al proceso de agregación. En este proceso, se adhieren grandes cantidades de nanopartículas para formar micropartículas que no son estables y que tienden incluso a precipitarse. Por esta razón es necesario aplicar intencionalmente a la superficie

de las nanopartículas de oro moléculas mucho más grandes como son las proteínas. Las proteínas podrían unirse a la superficie de la nano partícula mediante interacciones de tipo: iónica, covalente o hidrofóbica. Una vez que la proteína se ha unido a la nanopartícula, esta se vuelve más estable y mucho menos susceptible a la presencia de iones en el medio en donde se encuentran suspendidas. La proteína estreptavidina es una opción viable para ser utilizada debido a que por una parte sirve como agente estabilizador de las nanopartículas de oro, y por otra, como elemento receptor de anticuerpos biotinilados (Nara et al., 2008; Sai et al., 2010).

Con la finalidad de determinar la concentración mínima necesaria de estreptavidina que recubra la superficie de la nanopartícula, se llevó a cabo una conjugación en la cual se utilizaron diferentes concentraciones de la proteína entre 0-25 $\mu\text{g/ml}$ de estreptavidina. Se adiciono la proteína a un tubo eppendorf que contenía 1mL de nanopartículas (previamente caracterizada por UV/Vis), se agito en un vortex y se incubó a temperatura ambiente por 4 minutos, este procedimiento se llevo a cabo para cada una de las concentraciones a probar. Una nanopartícula que ha sido conjugada (nanopartícula-estreptavidina) con la cantidad apropiada de proteína permanece en estado coloidal cuando es sometida a un ambiente con sal, donde las fuerzas electrostáticas de los iones interaccionan con la nanopartícula cargada negativamente lo que provoca una agregación y precipitación de la misma al neutralizar su carga. Por lo que, una vez que se llevó a cabo la conjugación (nanopartícula-estreptavidina) se adicionó 1mL de NaCl 10% al tubo eppendorf y se midió su espectro de absorción por UV/Vis. Después de este procedimiento, si tanto la coloración original de la solución coloidal de nanopartículas de oro, como su banda de absorción (plasmón superficial) se mantienen, entonces se habrá preparado correctamente el conjugado de nanopartícula de oro-estreptavidina. La figura 5.5 muestra los espectros de absorción UV/Vis de las nanopartículas de oro cuando se conjugan con diferentes concentraciones de estreptavidina y se someten posteriormente a altas concentraciones de sal. Como se puede observar en la figura 5.5 una vez que se incrementa la concentración de estreptavidina la banda de resonancia del plasmón superficial se va definiendo cada vez más hasta ser muy similar a la del control (espectro en rojo con $\lambda=525\text{nm}$). Los espectros UV/Vis del conjugado

donde se utilizaron concentraciones de proteína entre 10-25 $\mu\text{g/ml}$ se muestran mejor definidos y la forma de línea es similar a la del control, teniendo una posición espectral cercana a $\lambda=538\text{nm}$, desplazada respecto a la del control $\lambda=525\text{nm}$. Este desplazamiento hacia longitudes de onda mayores es característico de una nanopartícula de oro conjugada a una proteína. El desplazamiento hacia longitudes de onda mayores es debido al efecto de retardamiento causado por la estreptavidina en la nube electrónica de las nanopartículas de oro (Sýkora et al., 2010). La concentración mínima necesaria de proteína para recubrir a la nanopartícula y estabilizarla fue entre 10-25 $\mu\text{g/ml}$ de estreptavidina.

La espectroscopia de derivadas representa gráficamente un intervalo dado de longitudes de onda, del cociente diferencial $dA/d\lambda$, donde A representa la absorción de un espectro normal y λ la longitud de onda. Un análisis de la primera derivada de los espectros UV/Vis de los conjugados permitió establecer diferencias más notables entre ellos, como se muestra en la figura 5.6. Los conjugados AuNP-estreptavidina (donde se utilizaron volúmenes de proteína entre 1-5 $\mu\text{g/ml}$) presentaron derivadas del espectro notoriamente diferentes respecto a la derivada del espectro de la nanopartícula (control en rojo). Sin embargo, las derivadas de los espectros del conjugado AuNP-Estreptavidina (con concentraciones de proteína entre 10-25 $\mu\text{g/ml}$) muestran similitudes en sus máximos respecto al máximo de la derivada del espectro control (en rojo), y su desplazamiento espectral hacia longitudes de onda mayores mostrado en los mínimos de la derivada. Se observó una consistencia y similitud de los máximos y mínimos de las derivadas de los conjugados AuNP-estreptavidina, a las concentraciones de 15 a 25 $\mu\text{g/ml}$ de proteína, respecto al control. Lo que significa que la concentración de proteína necesaria para recubrir las nanopartículas y estabilizarlas se encuentra en un intervalo de 15-25 $\mu\text{g/ml}$ de proteína. Los resultados de éste análisis son consistentes con los obtenidos en el ensayo de validación previamente discutido, Figura 5.5.

Figura 5.5 Conjunción de las nanopartículas con estreptavidina. A la izquierda se muestran los espectros de resonancia del plasmón superficial frente a un gradiente de concentración de estreptavidina. A la derecha el comportamiento esquemático de las nanopartículas conjugadas en un sistema coloidal cuando se someten a altas concentraciones de NaCl.

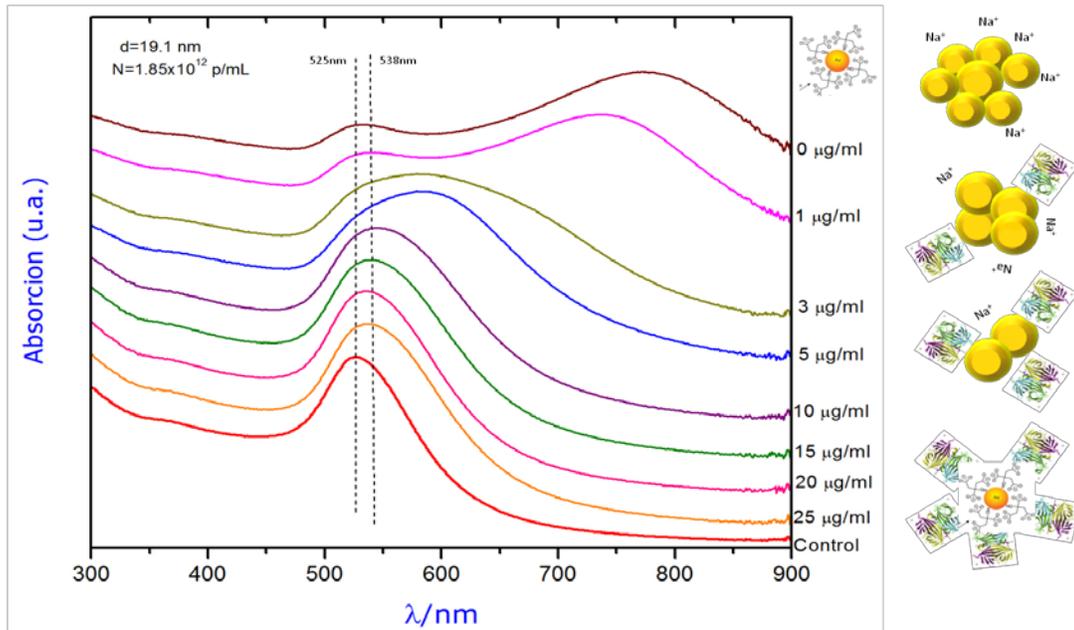
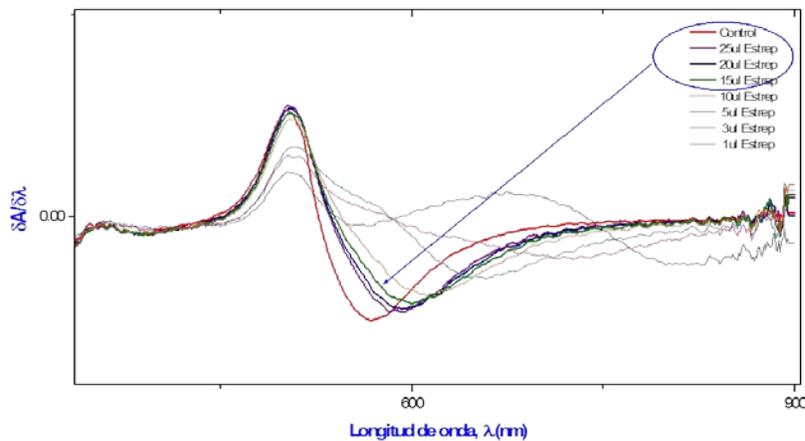
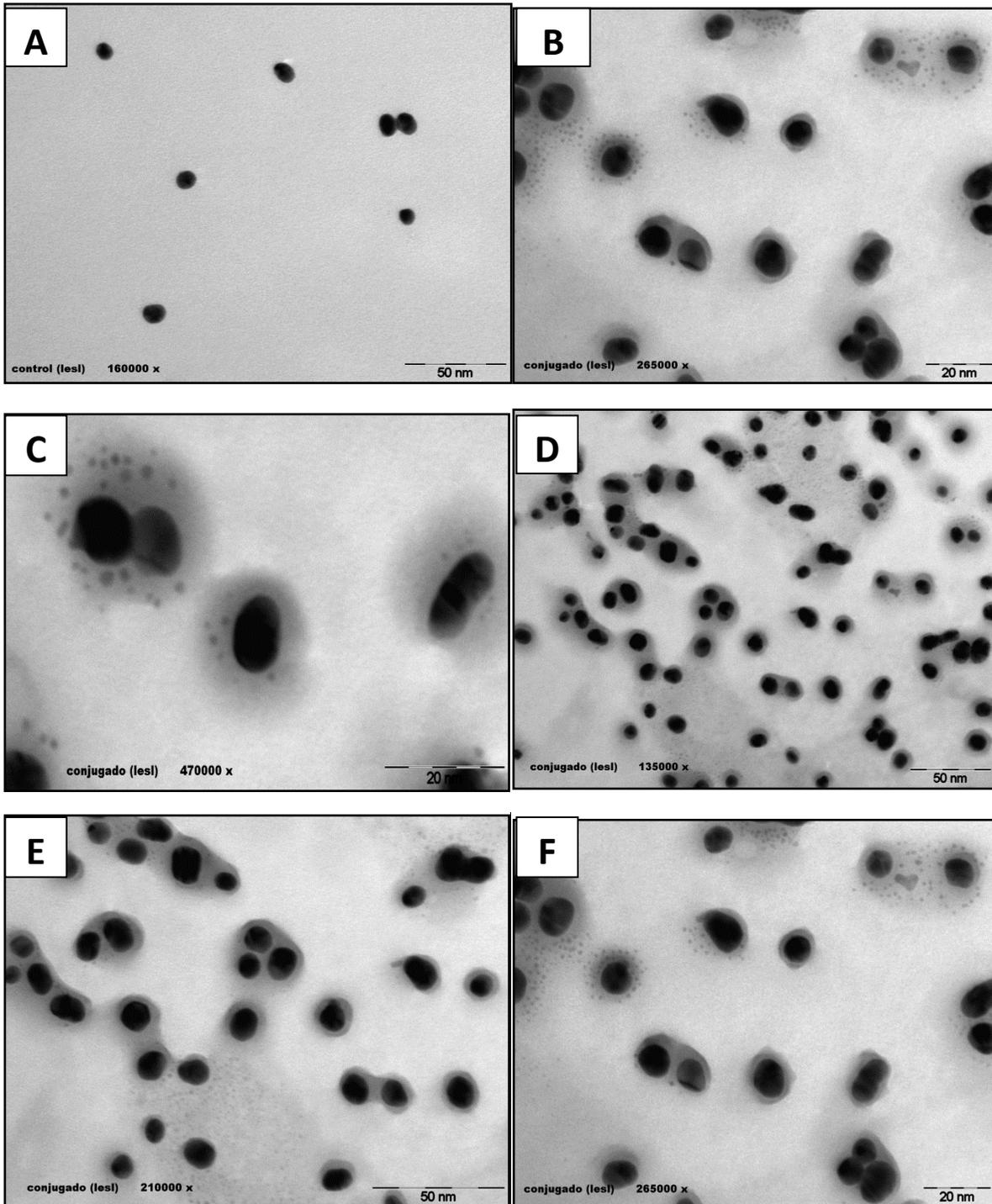


Figura 5.6 Primera derivada de los espectros de absorción UV/Vis de los conjugados nanopartícula-estreptavidina.



En la figura 5.7 se presentan una serie de microscopias electrónicas de transmisión (TEM). Se pueden observar a las nanopartículas de oro (figura A como control, con un aumento de 160,000x). En las figuras B hasta la F los conjugados nanopartícula de oro-estreptavidina (con un aumento de 135,000x hasta 470,000x). En éstas últimas, se observa a la estreptavidina rodeando la superficie de la nanopartícula formando una capa heterogénea. Las microscopias electrónicas de transmisión en conjunto con los resultados obtenidos a partir de los ensayos de validación y de las espectroscopias UV/Vis, confirmaron que se llevo a cabo el procedimiento de conjugación de las nanopartículas de oro con la proteína estreptavidina.

Figura 5.7. Microscopías electrónicas de transmisión (TEM). Figura A. Nanopartículas de oro (control); Figuras B, C, D, E, F. Conjugados nanopartícula-estreptavidina.



5.2.2 Ensayos de estabilidad del conjugado. Con base en los resultados obtenidos de los ensayos anteriores se diseñó un experimento con la finalidad de evaluar la estabilidad de los conjugados nanopartícula-estreptavidina utilizando 15, 20 y 25 $\mu\text{g/ml}$ de proteína durante un período de 8 semanas. En el apartado 4.5.1.4 del capítulo Materiales y métodos se describió la metodología empleada. En el cuadro 5.3 se muestran los resultados de las mediciones espectroscópicas llevadas a cabo durante los dos meses del experimento. Se graficaron en el eje de las abscisas las semanas y en el de las ordenadas las absorbancias de los espectros. Se llevó a cabo una corrección de las absorbancias por el método de sustracción de línea recta con el objetivo de obtener las absorbancias reales de los espectros. En la figura 5.8 se muestran los valores de las absorbancias de las nanopartículas y los conjugados (nanopartículas de oro-estreptavidina) en relación al tiempo. Se representaron las concentraciones de estreptavidina como sigue: 15ul (cuadros), 20ul (triángulos) y 25ul (rombos). El gráfico en rojo representa el control (nanopartículas de oro), como se muestra en la gráfica las absorbancias del control tienden a disminuir respecto al tiempo pero se observa que la disminución es gradual, ver cuadro 5.3. Los gráficos en azul representan los conjugados con las tres concentraciones de proteína, los conjugados muestran una disminución de las absorbancias respecto al tiempo de manera gradual, el comportamiento es similar que para el gráfico control. Los gráficos en verde representan los conjugados a las tres concentraciones de proteína en presencia de PBS, la disminución de las absorbancias es gradual pero muestran valores por debajo del control. Los gráficos en rosa representan los conjugados a las tres concentraciones de proteína en presencia de NaCl 10%, a partir de la semana 0 se observó un decaimiento de las absorbancias para los tres conjugados principalmente del conjugado con 15ul de proteína, en la semana 3 los tres conjugados mostraron absorbancias cercanas a cero por lo que el equipo no las detectó. En el cuadro 5.4 y la figura 5.9 se muestran respectivamente los valores obtenidos de las mediciones puntuales de pH y una gráfica concentrada donde se graficó en las abscisas el tiempo en semanas y en eje de las ordenas el pH. Cabe mencionar que a partir de la semana 6 los volúmenes finales de los controles y conjugados se vieron disminuidos debido a la manipulación de los mismos durante los procesos de medición particularmente de las

absorbancias por UV/Vis. Esto ocasiono que durante las mediciones de pH el electrodo del equipo no fuera cubierto en su totalidad por la muestra y se observó que los valores de pH medidos no eran consistentes con los que se habían medido con anterioridad. Por lo que se decidió graficar los valores de pH hasta la semana 5, y ya no se midieron posteriormente. En la figura 5.9 se muestran los valores de pH obtenidos en el experimento. El comportamiento general de los conjugados y el control es una dependencia del pH respecto al tiempo. Las nanopartículas de oro (control en rojo) mostraron un incremento de pH que oscilo de 5.2 a 6.3. Los conjugados en presencia de PBS (gráficos verdes) incrementaron el pH de 7.4 a 8.0 a. Los conjugados en presencia de NaCl (gráficos rosas) incrementaron el pH desde 5.5 a 6.3 de manera general, el incremento es gradual para los conjugados a las tres concentraciones de proteína. El comportamiento de los conjugados (gráficos en azul) fue gradual, pero se observa una diferencia del conjugado con 15ul de proteína respecto a los de 20 y 25ul de estreptavidina. El pH del conjugado con 15ul (cuadros) oscilo entre 5.9-6.5, estos valores son más cercanos a los pH del control. Los conjugados con 20ul de proteína oscilaron entre 5.9-7.1 y los conjugados con 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de proteína de 6.5-7.5.

Cuadro 5.3. Concentrado de absorbancias y longitudes de onda.

Experimento de Estabilidad del Conjugado (AuNp-Estrep)																				
1 Control (AuNps Vol. 2ml)				2 Conjugado (Estrep+Nanos vol. 2ml)				3 Conjugado + NaCl10% (vol. 2ml)				4 Conjugado + PBS 7.4% (vol. 2ml)								
Semanas	λspr (nm)	Abs	Abs	Semanas	λspr	Abs	Abs	Semanas	λspr	Abs	Abs	Semanas	λspr	Abs	Abs					
Semana 0	529	1.402	0.559	0.843	Semana 0	526.4	526	1.710	0.619	1.091	0.607	0.841	Semana 0	530.69	531	1.482	0.955	0.887		
Semana 1	523.3	523	1.37	0.542	0.828	Semana 1	527.18	527	1.787	0.589	1.198	0.615	0.137	0.078	Semana 1	527.6	528	0.886	0.316	0.57
Semana 2	523.29	523	1.332	0.543	0.789	Semana 2	526.69	527	1.655	0.538	1.117	0	0	0	Semana 2	527.66	528	0.864	0.262	0.422
Semana 3	523.35	523	0.9596	0.4001	0.560	Semana 3	526.95	527	1.558	0.571	0.967	0	0	0	Semana 3	527.58	527	0.538	0.194	0.345
Semana 4	523.09	523	0.945	0.407	0.538	Semana 4	527.09	527	1.49	0.573	0.917	0	0	0	Semana 4	527.1	527	0.515	0.197	0.318
Semana 5	523.39	523	0.922	0.4	0.522	Semana 5	526.8	527	1.463	0.563	0.9	0	0	0	Semana 5	526.67	527	0.459	0.199	0.246
Semana 6	523.55	523	0.838	0.368	0.47	Semana 6	526.97	527	1.36	0.534	0.826	0	0	0	Semana 6	525.99	526	0.3496	0.182	0.188
Semana 7	523.6	523	0.826	0.346	0.48	Semana 7	527.13	527	1.35	0.524	0.826	0	0	0	Semana 7	525.41	525	0.307	0.163	0.144
Semana 8	523.57	523	0.754	0.326	0.428	Semana 8	526.87	527	1.246	0.492	0.754	0	0	0	Semana 8	524.49	525	0.288	0.185	0.103
1 Control (AuNps Vol. 2ml)				2 Conjugado (Estrep+Nanos vol. 2ml)				3 Conjugado + NaCl10% (vol. 2ml)				4 Conjugado + PBS 7.4% (vol. 2ml)								
Semanas	λspr (nm)	Abs	Abs	Semanas	λspr	Abs	Abs	Semanas	λspr	Abs	Abs	Semanas	λspr	Abs	Abs					
Semana 0	529	1.402	0.559	0.843	Semana 0	526.41	526	1.744	0.624	1.12	0.588	0.812	Semana 0	526.89	527	1.504	0.619	0.885		
Semana 1	523.3	523	1.37	0.542	0.828	Semana 1	527.26	527	1.782	0.585	1.197	0.22	0.258	Semana 1	527.75	528	0.97	0.352	0.618	
Semana 2	523.29	523	1.332	0.543	0.789	Semana 2	527.06	527	1.607	0.598	1.009	0.093	0.085	Semana 2	528.01	528	0.825	0.31	0.515	
Semana 3	523.35	523	0.960	0.400	0.560	Semana 3	527.1	527	1.513	0.555	0.958	0	0	Semana 3	528	528	0.623	0.228	0.395	
Semana 4	523.09	523	0.945	0.407	0.538	Semana 4	527.15	527	1.5	0.556	0.944	0	0	Semana 4	527.98	528	0.519	0.206	0.313	
Semana 5	523.39	523	0.922	0.4	0.522	Semana 5	527.26	527	1.455	0.553	0.902	0	0	Semana 5	527.51	528	0.407	0.163	0.244	
Semana 6	523.55	523	0.838	0.368	0.47	Semana 6	527.11	527	1.344	0.528	0.813	0	0	Semana 6	527	527	0.341	0.152	0.189	
Semana 7	523.6	523	0.826	0.346	0.48	Semana 7	527.07	527	1.309	0.511	0.798	0	0	Semana 7	526.44	526	0.305	0.136	0.169	
Semana 8	523.57	523	0.754	0.326	0.428	Semana 8	526.94	527	1.177	0.471	0.706	0	0	Semana 8	526.54	526	0.414	0.224	0.19	
1 Control (AuNps Vol. 2ml)				2 Conjugado (Estrep+Nanos vol. 2ml)				3 Conjugado + NaCl10% (vol. 2ml)				4 Conjugado + PBS 7.4% (vol. 2ml)								
Semanas	λspr (nm)	Abs	Abs	Semanas	λspr	Abs	Abs	Semanas	λspr	Abs	Abs	Semanas	λspr	Abs	Abs					
Semana 0	529	1.402	0.559	0.843	Semana 0	524.86	525	1.654	0.53	1.124	0.567	0.838	Semana 0	528.8	529	1.503	0.655	0.848		
Semana 1	523.3	523	1.37	0.542	0.828	Semana 1	525.46	525	1.659	0.505	1.154	0.231	0.231	Semana 1	527.43	527	1.003	0.361	0.642	
Semana 2	523.29	523	1.332	0.543	0.789	Semana 2	525.22	525	1.562	0.503	1.059	0.04	0.155	Semana 2	527.64	527	0.846	0.317	0.529	
Semana 3	523.35	523	0.960	0.400	0.560	Semana 3	525.55	525	1.709	0.574	1.033	0	0	Semana 3	527.56	527	0.671	0.246	0.425	
Semana 4	523.09	523	0.945	0.407	0.538	Semana 4	526.17	526	1.739	0.717	1.022	0	0	Semana 4	527.31	527	0.556	0.218	0.388	
Semana 5	523.39	523	0.922	0.4	0.522	Semana 5	525.88	526	1.601	0.607	0.994	0	0	Semana 5	526.72	527	0.445	0.206	0.289	
Semana 6	523.55	523	0.838	0.368	0.47	Semana 6	525.42	526	1.665	0.74	0.925	0	0	Semana 6	526.72	527	0.445	0.206	0.289	
Semana 7	523.6	523	0.826	0.346	0.48	Semana 7	526.44	526	1.689	0.764	0.955	0	0	Semana 7	526.53	527	0.445	0.206	0.289	
Semana 8	523.57	523	0.754	0.326	0.428	Semana 8	526.06	526	1.505	0.724	0.781	0	0	Semana 8	525.31	525	0.197	0.092	0.105	

Cuadro 5.4. Concentrado de valores de pH.

Experimento de Estabilidad del Conjugado (AuNp-Estrep)										
15ul Estreptavidina	1 Control (AuNps)		2 Conjugado (Estrep+Nanos)		3 Conjugado + NaCl10%		4 Conjugado + PBS 7.4%		PBS	
	Semanas	pH	Semanas	pH	Semanas	pH	Semanas	pH	Semanas	pH
Semana 0	5.2		Semana 0	5.95	Semana 0	5.5	Semana 0	7.35	Semana 0	7.4
Semana 1	5.3		Semana 1	6	Semana 1	5.6	Semana 1	7.4	Semana 1	7.5
Semana 2	5.4		Semana 2	6.1	Semana 2	5.7	Semana 2	7.5	Semana 2	7.65
Semana 3	5.6		Semana 3	6.23	Semana 3	5.74	Semana 3	7.6	Semana 3	7.7
Semana 4	5.7		Semana 4	6.4	Semana 4	5.79	Semana 4	7.65	Semana 4	7.8
Semana 5	5.8		Semana 5	6.5	Semana 5	5.8	Semana 5	7.7	Semana 5	7.93
Semana 6	6.29		Semana 6	6.5	Semana 6	5.53	Semana 6	7.6	Semana 6	7.8
Semana 7			Semana 7		Semana 7		Semana 7		Semana 7	
Semana 8			Semana 8		Semana 8		Semana 8		Semana 8	
Semana 9			Semana 9		Semana 9		Semana 9		Semana 9	

20ul Estreptavidina	1 Control (AuNps)		2 Conjugado (Estrep+Nanos)		3 Conjugado + NaCl10%		4 Conjugado + PBS 7.4%		PBS	
	Semanas	pH	Semanas	pH	Semanas	pH	Semanas	pH	Semanas	pH
Semana 0	5.2		Semana 0	5.9	Semana 0	5.7	Semana 0	7.4		
Semana 1	5.3		Semana 1	6	Semana 1	5.8	Semana 1	7.5		
Semana 2	5.4		Semana 2	6.85	Semana 2	5.9	Semana 2	7.65		
Semana 3	5.6		Semana 3	6.9	Semana 3	6	Semana 3	7.7		
Semana 4	5.7		Semana 4	7.2	Semana 4	6.1	Semana 4	7.8		
Semana 5	5.8		Semana 5	7.3	Semana 5	6.16	Semana 5	7.92		
Semana 6	6.29		Semana 6	7.1	Semana 6	5.88	Semana 6	7.75		
Semana 7			Semana 7		Semana 7		Semana 7			
Semana 8			Semana 8		Semana 8		Semana 8			
Semana 9			Semana 9		Semana 9		Semana 9			

25ul Estreptavidina	1 Control (AuNps)		2 Conjugado (Estrep+Nanos)		3 Conjugado + NaCl10%		4 Conjugado + PBS 7.4%		PBS	
	Semanas	pH	Semanas	pH	Semanas	pH	Semanas	pH	Semanas	pH
Semana 0	5.2		Semana 0	6.5	Semana 0	5.8	Semana 0	7.4		
Semana 1	5.3		Semana 1	6.9	Semana 1	5.95	Semana 1	7.5		
Semana 2	5.4		Semana 2	7	Semana 2	6	Semana 2	7.65		
Semana 3	5.6		Semana 3	7.1	Semana 3	6.18	Semana 3	7.77		
Semana 4	5.7		Semana 4	7.3	Semana 4	6.2	Semana 4	7.83		
Semana 5	5.8		Semana 5	7.46	Semana 5	6.28	Semana 5	7.94		
Semana 6	6.29		Semana 6	6.29	Semana 6	6.18	Semana 6	7.78		
Semana 7			Semana 7		Semana 7		Semana 7			
Semana 8			Semana 8		Semana 8		Semana 8			
Semana 9			Semana 9		Semana 9		Semana 9			

Figura 5.8. Gráfico concentrado de las absorbancias respecto al tiempo.

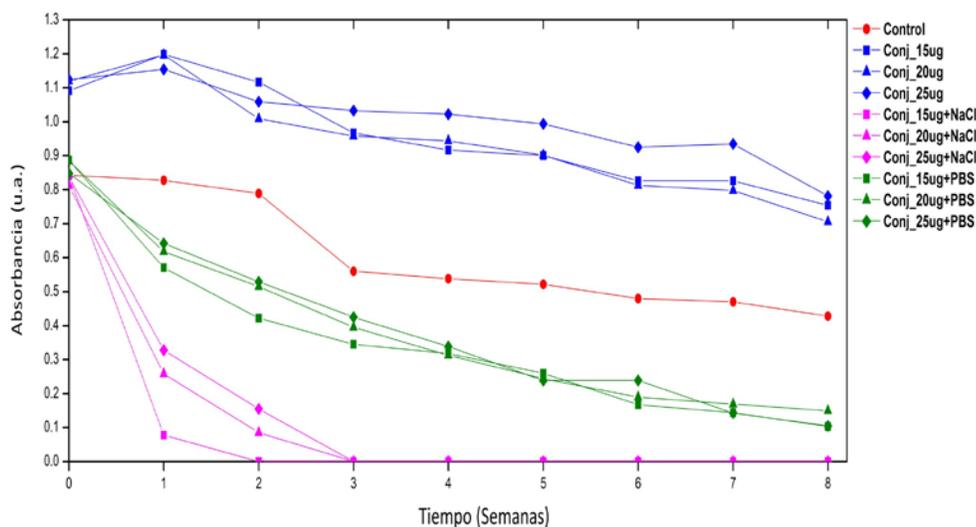
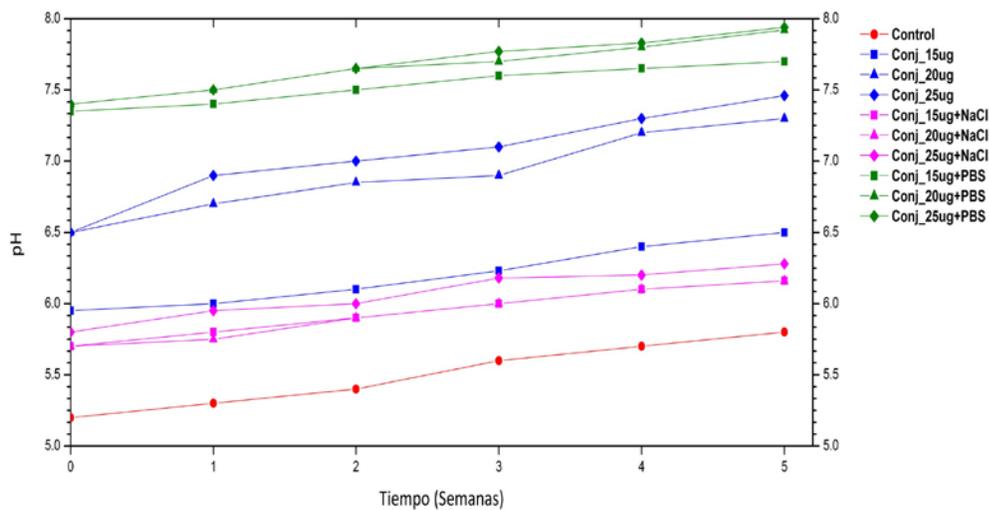


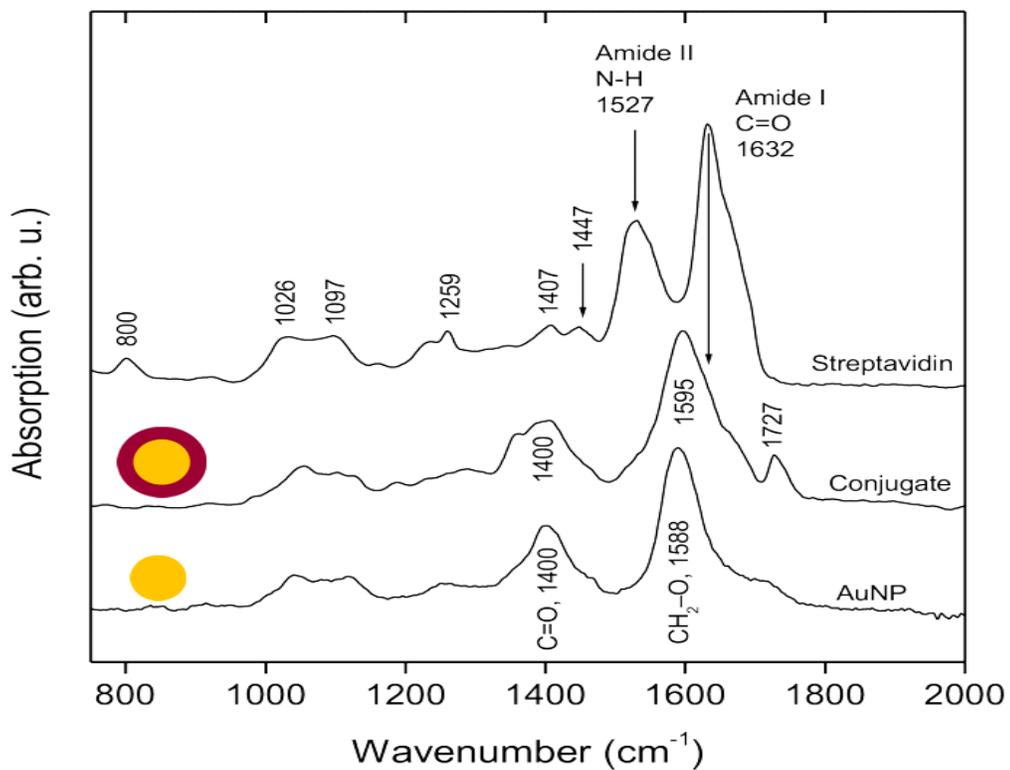
Figura 5.9. Gráfico concentrado de los valores de pH respecto al tiempo.



5.2.3 Análisis de espectros FT-IR de las nanopartículas de oro conjugadas con estreptavidina. La figura 5.10 muestra los espectros FTIR de las nanopartículas de oro, conjugado y estreptavidina. El espectro FTIR de la estreptavidina (estándar concentrado, 1 mg/ml) muestra una banda intensa a 1632 cm^{-1} que se asocia principalmente con la vibración de estiramiento C = O de la amida I, relacionada directamente con la conformación de estructura secundaria de la proteína. La banda de amida II en 1527 cm^{-1} resulta de la vibración de flexión N-H y también de la vibración de estiramiento C-N. Otras bandas de frecuencias de vibración más bajas son los modos de flexión C-H₂ (banda en 1447 cm^{-1}); vibraciones de estiramiento C-NH₂ de aminas primarias de cadena lateral en 1407 cm^{-1} , así como varias bandas relacionados con vibraciones C-N, C-O, y C-C-O de los residuos del esqueleto de la proteína y de los aminoácidos (región de 1259 cm^{-1} hasta 800 cm^{-1}). El espectro FTIR de las nanopartículas de oro muestra dos bandas intensas a 1588 cm^{-1} y 1400 cm^{-1} asociadas a los modos de estiramiento CH₂-O y C = O respectivamente del grupo de citrato como resultado del proceso de síntesis (Thi et al., 2010). Los grupos carboxilatos son buenos adsorbentes para biomoléculas tales como proteínas (Krishnendu et al., 2011). El espectro de FTIR del conjugado muestra diferencias con respecto al espectro de la estreptavidina debido a la adsorción sobre las nanopartículas de oro (Kamnev et al., 2002). Esta adsorción se establece a través de la interacción electrostática entre los grupos con terminación (-COO⁻) en la superficie de las nanopartículas y los grupos amino cargados positivamente (-NH) de los residuos de la estreptavidina (Thobhani et al., 2010). El efecto de la absorción infrarroja amplificada en la superficie (SEIRA por sus siglas en inglés, *surface enhanced infrared absorption*) es responsable de la observación de la vibración del grupo amida I a 1632 cm^{-1} , debido a su proximidad e interacción con la nanopartícula. La baja concentración de estreptavidina (20 mg / ml) que cubre la superficie de las nanopartículas de oro en la solución coloidal no sería suficiente para ser detectada utilizando sólo FTIR sin la influencia de las nanopartículas de oro. Otra señal SEIRA que surge de la adsorción de estreptavidina en AuNPs es la banda en la región de 1595 cm^{-1} , lo que indica que los residuos N-H están directamente involucrados en la interacción con la nanopartícula de oro. Las vibraciones C-NH₂ cerca de 1400 cm^{-1} también se han mejorado, lo que sugiere la

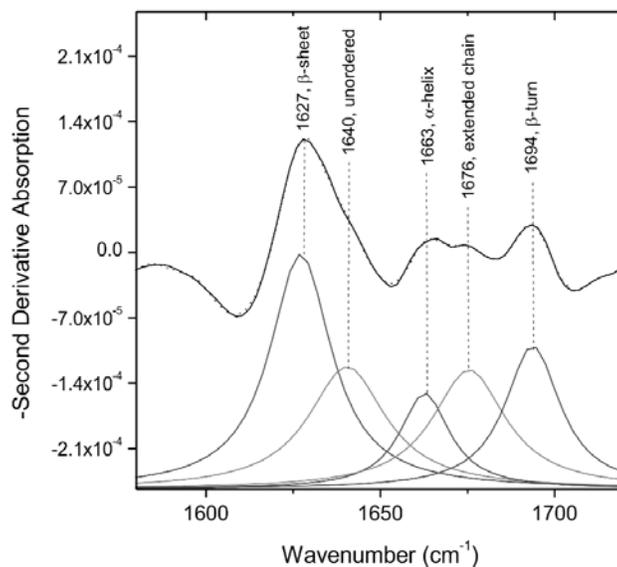
participación de los grupos amino de la cadena lateral, y de las vibraciones C-O/C-C en las regiones de 1150-1000 cm^{-1} . Según la teoría SEIRA sólo las vibraciones moleculares que son perpendiculares a la superficie del metal son amplificadas (Osawa, M., 2001).

Figura 5.10 Espectros FTIR de las nanopartículas de oro, conjugado y estreptavidina.



La banda de amida I de la estreptavidina se analizó por la segunda derivada del espectro de FTIR, como se muestra en la figura 5.11 . El espectro experimental fue deconvolucionado en cinco señales individuales relacionadas a su vez con la β - (1694 cm^{-1}), cadena extendida (1676 cm^{-1}), α -hélice (1663 cm^{-1}), no ordenadas (1640 cm^{-1}) y β -hoja (1627 cm^{-1}) estructuras. área integrada se asoció con el porcentaje de cada estructura. Estimamos que el 51,3% de β -hoja (incluyendo cadena extendida), el 10,5% de α -hélice, el 17,5% de β -a su vez y el 20,9% de las estructuras desordenadas. Estos valores están en buen acuerdo con los datos experimentales obtenidos con el programa STRIDE asignación de la estructura secundaria de la secuencia de polipéptido de estreptavidina (Uniprot p22629). Torreggiani et al., 1999 y González et al., 1997 estimación 47% y el 64% de las estructuras de β -hoja respectivamente, mientras que Aragarana et al., 1986, los rendimientos de \sim 55-66% de β -hoja y la estructura de cadena extendida en avidina , que es una proteína relacionada que comparte 38% de identidad de secuencia con estreptavidina. El último se determinó mediante el uso de deconvolución de FTIR en bruto y los espectros de Raman (Honzatko et al., 1986, Swamy, et al., 1996). Las estimaciones del porcentaje de las estructuras secundarias reportadas en este trabajo

Figura 5.11 Porcentajes de estructura secundaria de la estreptavidina.



5.3 Bioconjugado: conjugado unido al anticuerpo biotilado *Anti-Staphylococcus aureus*. En la figura 5.10 se observa que a concentraciones elevadas de anticuerpo la banda de resonancia del plasmón superficial no es definida con respecto al control (espectro azul que corresponde a la nanopartícula-estreptavidina con una $\lambda=524\text{nm}$). Sin embargo conforme las concentraciones de inmunoglobulina decrecen la banda de absorción se va haciendo más definida y similar respecto al control. A partir de $2\mu\text{L}$ de inmunoglobulina el valor de $\lambda=524\text{nm}$ es similar al control (estreptavidina-nanopartícula). En la figura 22 se muestra un gráfico en donde se graficaron los valores del λ_{spr} respecto a las concentraciones de inmunoglobulina utilizada. Los resultados son consistentes con los mostrados en la figura 5.11, conforme disminuye la concentración de anticuerpo la posición de λ_{spr} se desplaza hasta ser similar a λ_{spr} del complejo nanopartícula-estreptavidina. Son estas concentraciones de inmunoglobulina (a partir de $5\mu\text{g/mL}$, $2\mu\text{g/mL}$ y $1\mu\text{g/mL}$) las que se utilizaran para llevar a cabo los ensayos posteriores frente al analito de interés.

Figura 5.10 Determinación de la concentración de inmunoglobulina. Se muestran los espectros UV/Vis de resonancia del plasmón superficial del bioconjugado frente a un gradiente de concentración de la inmunoglobulina.

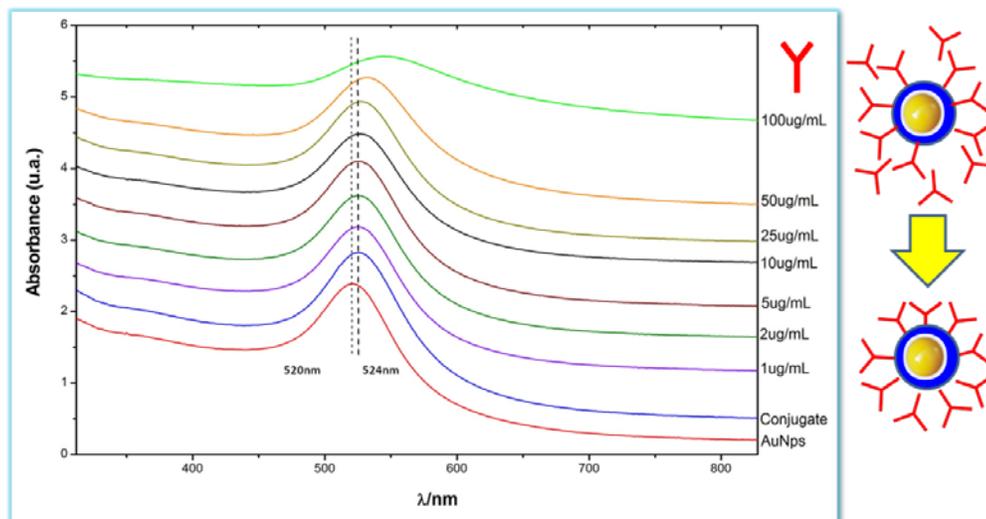
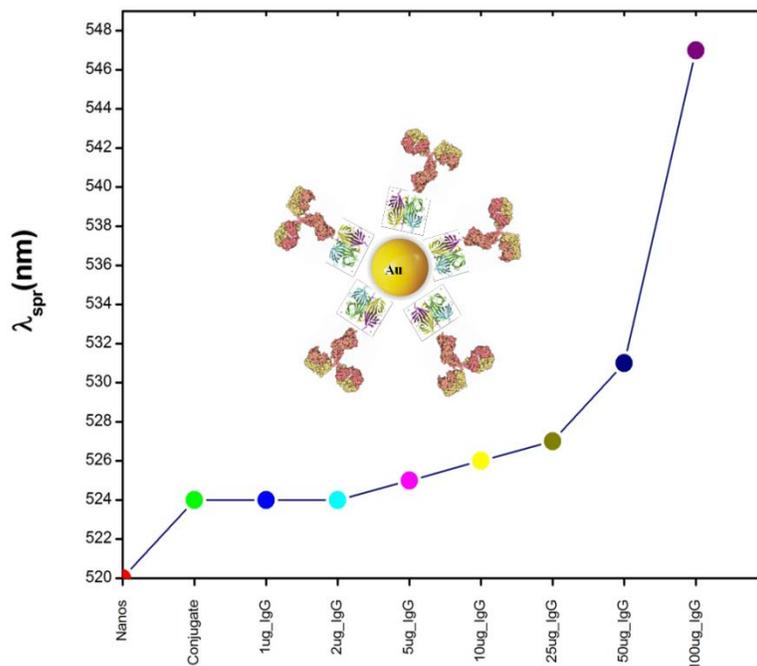
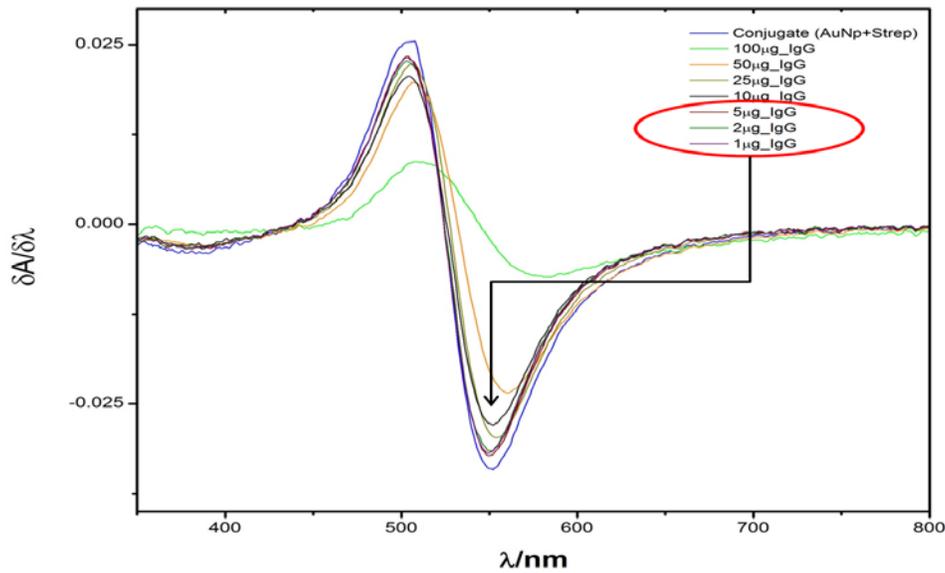


Figura 5.11 Relación de λ_{spr} de los bioconjugados respecto a la concentración de inmunoglobulina.



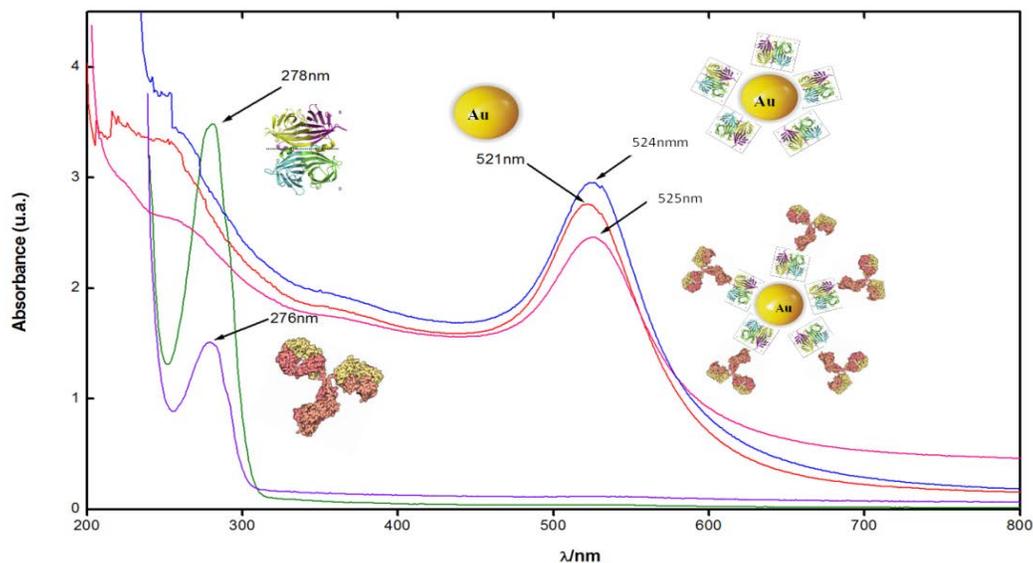
Un análisis de la primera derivada de los espectros UV/Vis de los bioconjugados permitió establecer diferencias más notables entre ellos, como se muestra en la figura 5.12. Los bioconjugados donde se utilizaron volúmenes de inmunoglobulina entre 100-10 μ g/ml presentaron derivadas del espectro notoriamente diferentes respecto a la derivada del espectro control (conjugado, espectro en azul). Sin embargo, las derivadas de los espectros del bioconjugado con concentraciones de proteína entre 5-1 μ g/ml muestran similitudes en sus máximos respecto al máximo de la derivada del espectro control (en azul), y su desplazamiento espectral hacia longitudes de onda mayores mostrado en los mínimos de la derivada. Se observó una consistencia y similitud de los máximos y mínimos de las derivadas de los conjugados a las concentraciones de 5 a 1 μ g/ml de proteína, respecto al control. Los resultados de éste análisis son consistentes con los obtenidos en el ensayo de validación previamente discutido.

Figura 5.12 Primera derivada de la absorción UV/Vis.



En la figura 5.13 se muestran los espectros UV/Vis de los diferentes componentes del conjugado. La banda de absorción del anticuerpo biotinilado tiene una posición espectral de $\lambda=276$ nm, la banda de absorción de la proteína estreptavidina tiene un $\lambda=278$ nm y la banda de absorción de la nanopartícula de oro tiene un $\lambda_{spr}=521$ nm. Cuando se lleva a cabo la funcionalización de la nanopartícula con la proteína estreptavidina se observa un corrimiento de la banda de resonancia del plasmón superficial de $\lambda_{spr}=521$ nm a $\lambda_{spr}=524$ nm. Una vez que se llevó a cabo la conjugación con el anticuerpo biotinilado se observó una banda de absorción $\lambda_{spr}=525$ nm. A pesar del corrimiento de 1nm de la banda de absorción del conjugado respecto a la nanopartícula de oro funcionalizada, fue suficiente para poder establecer si se había llevado a cabo la conjugación con el anticuerpo biotinilado. La identificación de las posiciones espectrales de cada uno de los componentes del bioconjugado es importante ya que permite realizar un monitoreo sistemático en la construcción del biosensor en cada una de las etapas que lo constituyen.

Figura 5.13. Espectros UV/Vis de los constituyentes del bioconjugado.



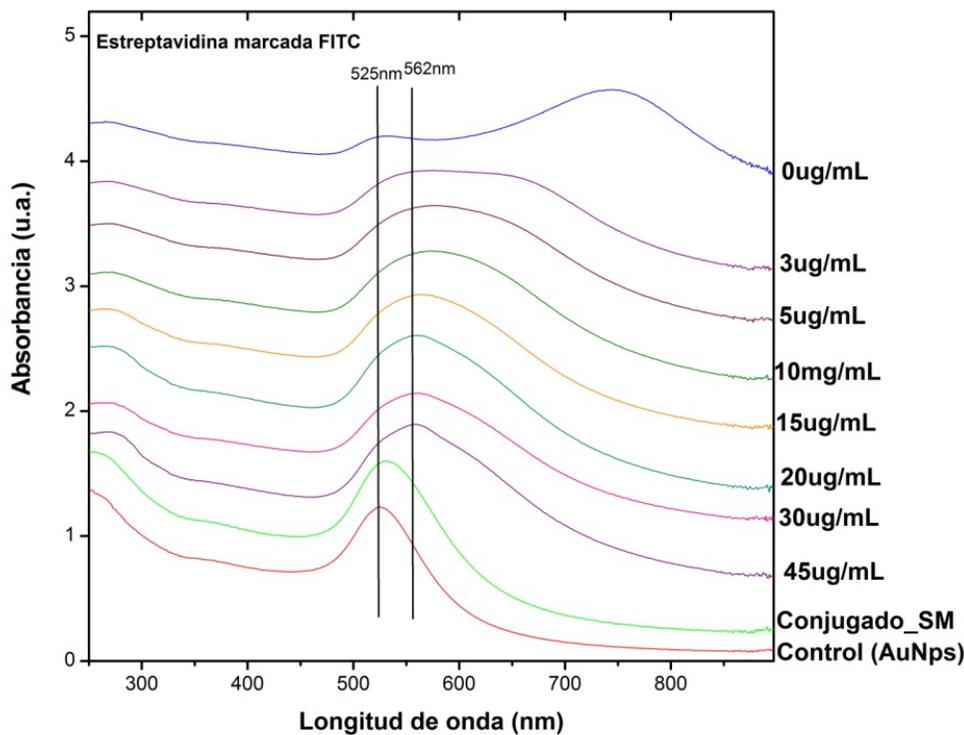
5.4 Desarrollo de un biosensor fluorescente basado en la proteína estreptavidina – TRITC.

Se ensambló un biosensor fluorescente utilizando a la proteína estreptavidina marcada con un cromóforo: isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC).

5.4.1 Conjugación de nanopartículas de oro con estreptavidina-TRITC. Con la finalidad de determinar la concentración mínima de estreptavidina-TRITC que recubriera la superficie de las nanopartículas, se llevó a cabo un experimento de validación en la cual se utilizaron concentraciones de la proteína entre 0-45 $\mu\text{g/ml}$. Se procedió experimentalmente como se describió en el apartado 4.5.2 del capítulo Materiales y métodos. Una nanopartícula que ha sido conjugada con la cantidad apropiada de proteína permanece en estado coloidal cuando es sometida a un ambiente salino, donde las fuerzas electrostáticas de los iones interaccionan con la nanopartícula cargada negativamente lo que provoca una agregación y precipitación de la misma al neutralizar su carga. Por lo que, una vez que se llevó a cabo la conjugación se adicionó 1mL de NaCl 10% al tubo eppendorf y se midió su espectro de absorción por UV/Vis. Después de este procedimiento, si la coloración original de la solución coloidal de nanopartículas de oro, como su banda de absorción (plasmón superficial) se

mantienen, entonces se habrá preparado correctamente el conjugado de nanopartícula de oro-estreptavidina TRITC. Como se observa en la figura 5.14 una vez que se incrementa la concentración de estreptavidina la banda de resonancia del plasmón superficial se va definiendo cada vez más hasta ser muy similar a la del control (espectro en rojo). Los espectros UV/Vis del conjugado donde se utilizaron concentraciones de proteína entre 15-45 $\mu\text{g}/\text{ml}$ se muestran mejor definidos y se van pareciendo al control, teniendo una posición espectral con una $\lambda=562\text{nm}$ desplazada respecto a la del control $\lambda=525\text{nm}$. Este desplazamiento hacia longitudes de onda mayores es debido al efecto de retardamiento causado por la estreptavidina en la nube electrónica de las nanopartículas de oro (Sýkora et al., 2010). El rango de concentración de proteína para recubrir a la nanopartícula y estabilizarla fue de 20-45 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Figura 5.14. Conjugación de las nanopartículas con estreptavidina marcada con TRITC. Se muestran los espectros de resonancia del plasmón superficial frente a un gradiente de concentración de estreptavidina TRITC.



La espectroscopia de derivadas representa gráficamente un intervalo dado de longitudes de onda, del cociente diferencial $dA/d\lambda$, donde A representa la absorción de un espectro normal y λ la longitud de onda. Un análisis de la primera derivada de los espectros UV/Vis de los conjugados permitió establecer diferencias más notables entre ellos, como se muestra en la figura 5.15. Los conjugados donde se utilizaron volúmenes de proteína entre 3-15 $\mu\text{g/ml}$ presentaron derivadas del espectro notoriamente diferentes respecto a la derivada del espectro de la nanopartícula (control en rojo). Sin embargo, las derivadas de los espectros del biconjugado con concentraciones de proteína entre 20-45 $\mu\text{g/ml}$ muestran similitudes en sus máximos respecto al máximo de la derivada del espectro control (en rojo), y su desplazamiento espectral hacia longitudes de onda mayores mostrado en los mínimos de la derivada. Se observó una consistencia y similitud de los máximos y mínimos de las derivadas de los conjugados a las concentraciones de 20 a 45 $\mu\text{g/ml}$ de proteína respecto al control. Lo que significa que la concentración de proteína necesaria para recubrir las nanopartículas y estabilizarlas se encuentra en un intervalo de 20 a 45 $\mu\text{g/ml}$ de proteína.

Figura 5.15 Primera derivada de los espectros de absorción UV/VIS de los bioconjugados

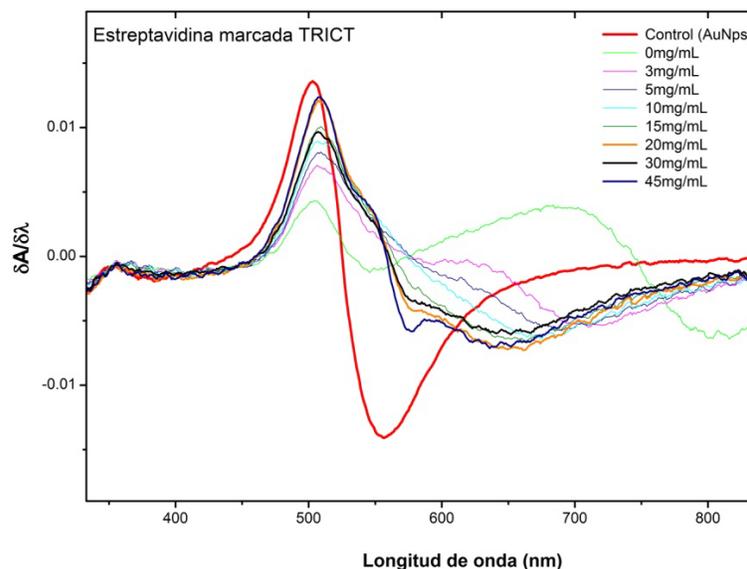
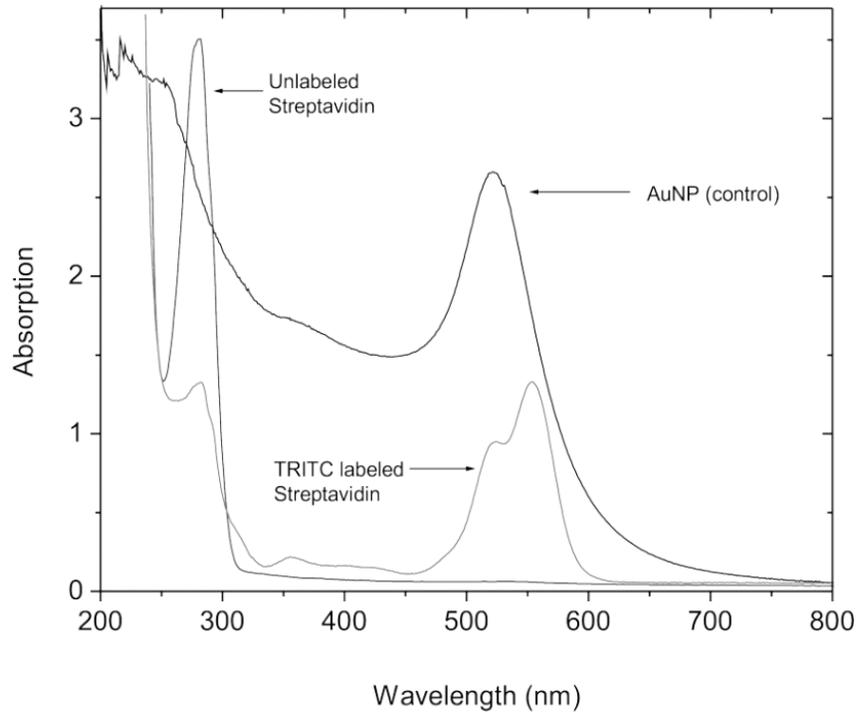


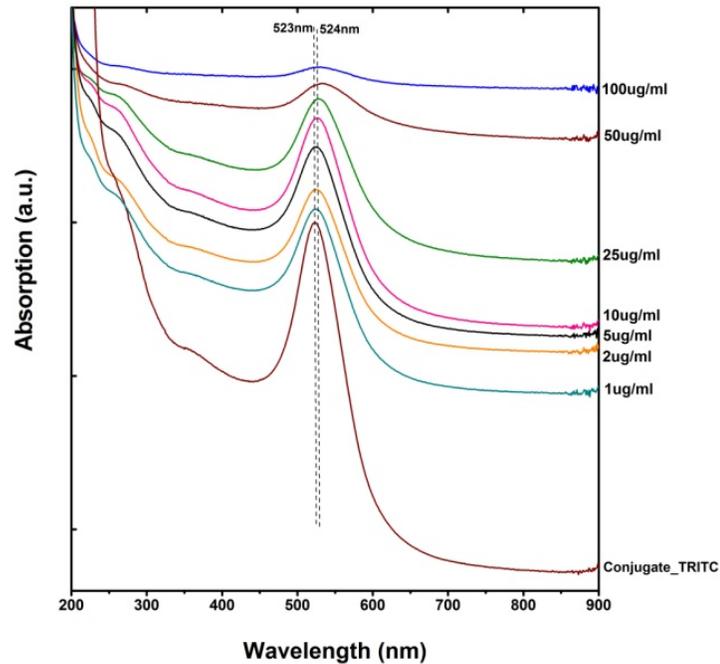
Figura 5.16 Espectros UV/Vis de las nanopartículas de oro y estreptavidinas.



La Figura 5.16 muestra los espectros UV-Vis de las nanopartículas de oro (AuNPs), estreptavidina no marcada y estreptavidina marcada con isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC). El espectro de las nanopartículas de oro muestra una banda intensa de absorción a 525 nm, que se relaciona con la resonancia de plasmón de superficie (SPR). La estreptavidina-TRITC y la estreptavidina no marcada muestran una banda de absorción a 280 nm que es causada por la absorción de dos aminoácidos aromáticos triptófano (Trp) y tirosina (Tyr) (Pace et al., 1995). Por otro lado, la estreptavidina-TRITC muestra otras dos bandas a 522 y 553 nm que se pueden asociar con la absorción del cromóforo TRITC (Lin et al, 2013; Pedone et al, 2010).

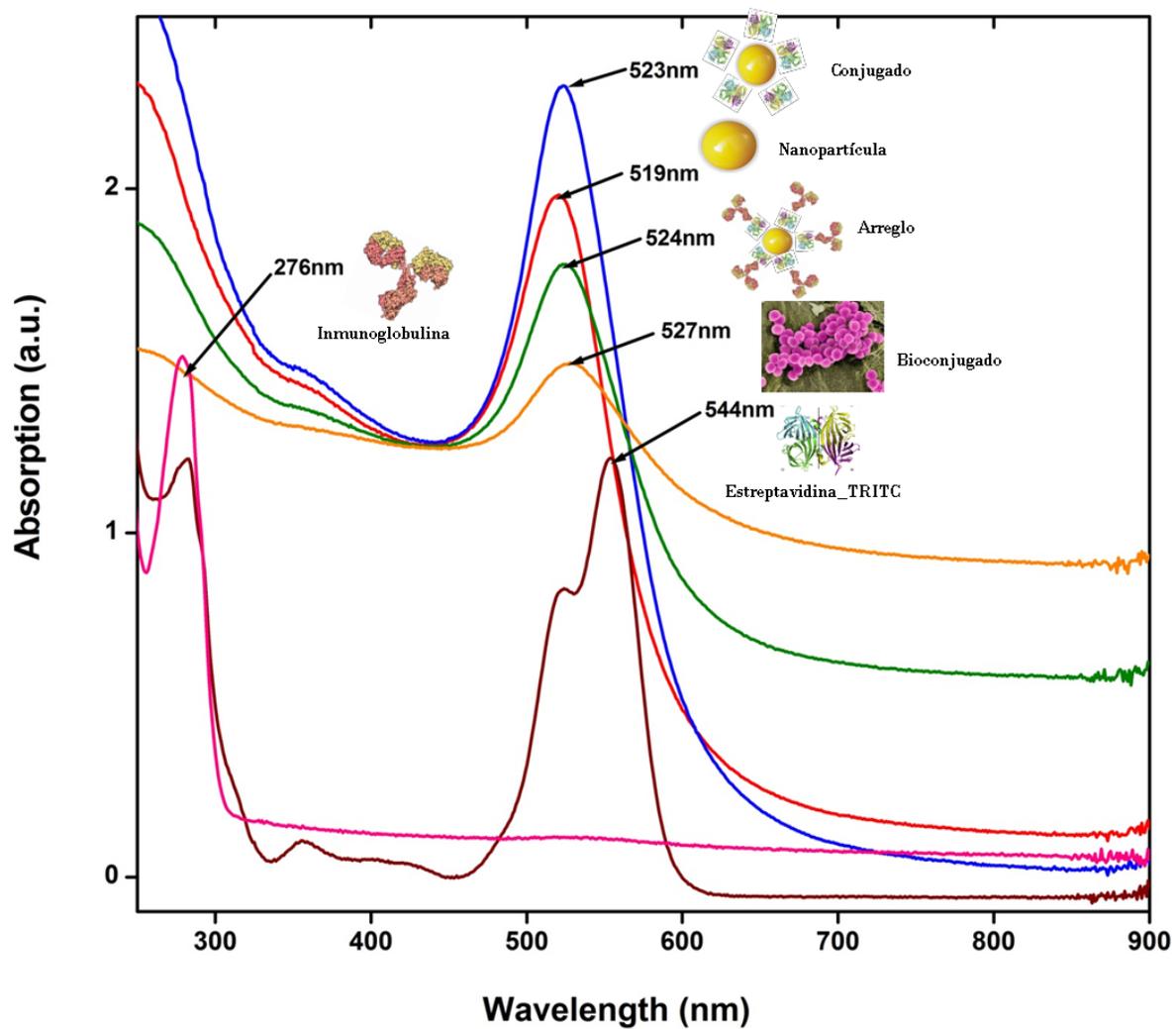
5.4.2 Bioconjugado: conjugado fluorescente unido al anticuerpo biotinilado Anti-*Staphylococcus aureus*. Se llevó a cabo la conjugación de la nanopartícula de oro-estreptavidina TRITC con el anticuerpo biotinilado específico para *S. aureus*. La conjugación se realizó partiendo de la nanopartícula funcionalizada con la proteína estreptavidina. El procedimiento de funcionalización se discutió previamente. Para establecer la cantidad de anticuerpo biotinilado necesario para adherirse a los sitios de unión de la estreptavidina, se llevo a cabo un experimento de validación del anticuerpo biotinilado en donde se utilizó un gradiente de concentración de la inmunoglobulina que fue desde: 100µg/mL, 50µg/mL, 25µg/mL, 10µg/mL, 5µg/mL, 2µg/mL y 1µg/mL. Cada una de las concentraciones a probar corresponden a una reacción por separado llevada a cabo en tubos eppendorf. Se adicionó a cada tubo de reacción 450µl de la nanopartícula-estreptavidina (previamente estandarizada de acuerdo a lo discutido en apartados anteriores) más 50µL del anticuerpo biotinilado. Se agitaron suavemente y se incubaron a 37°C por 1hr. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se midieron en un espectrofotómetro UV/Vis y se obtuvieron los espectros que se muestran en la figura 5.16. Como se puede observar a concentraciones elevadas de anticuerpo la banda de resonancia del plasmón superficial no es definida con respecto al control (espectro rojo que corresponde a la nanopartícula-estreptavidina TRITC con una $\lambda=523\text{nm}$). Sin embargo conforme las concentraciones de inmunoglobulina decrecen la banda de absorción se va haciendo más definida y similar respecto al control. A partir de 2µL de inmunoglobulina el valor de $\lambda=524\text{nm}$ es similar al control. Las concentraciones de inmunoglobulina a partir de 5µg/mL, 2µg/mL y 1µg/mL se utilizaran para llevar a cabo los ensayos posteriores frente al analito de interés.

Figura 5.16. Bioconjugación del conjugado fluorescente con el anticuerpo biotinilado Anti-*S. aureus*. Se muestran los espectros UV/Vis de resonancia del plasmón superficial del complejo nanopartícula-estreptavidina-TRITC-anticuerpo frente a un gradiente de concentración de la inmunoglobulina.



En la figura 5.17 se muestran los espectros UV/VIS de resonancia del plasmón superficial de cada uno de los componentes del nano-inmunoensensor. La inmunoglobulina presenta una banda de absorción con una posición espectral en $\lambda=276\text{nm}$, la banda de absorción de la proteína estreptavidina TRITC tiene un $\lambda=544\text{nm}$, la nanopartícula de oro presenta una banda de absorción con una posición espectral de $\lambda=519\text{nm}$, el conjugado (nanopartícula de oro-estreptavidina TRITC) presenta un $\lambda=523\text{nm}$, el arreglo (nanopartícula de oro-estreptavidina TRITC-inmunoglobulina) presenta un $\lambda=523\text{nm}$ y el bioconjugado muestra un $\lambda=527\text{nm}$.

Figura 5.17. Nano-inmunosensor. Se muestran los espectros UV/VIS de resonancia del plasmón superficial de cada uno de los componentes del biosensor



5.5 Bioreconocimiento del nano-inmuno-sensor fluorescente sobre *Staphylococcus aureus*.

En las figuras 5.18, 5.19, 5.20 y 5.21 se muestran una serie de micrografías confocales del nano-inmuno-sensor. En las micrografías de la figura 32 y 34 se realizó una contaminación in situ en leche con los microorganismos a ser identificados. Para ambas figuras, en la primera fila se observan los canales fluorescentes, campo claro y merge respectivamente del bioconjugado, en donde fue evidente el reconocimiento del analito por parte del inmuno-sensor. Se utilizó a *S. aureus* a una concentración de aproximadamente 1.8×10^9 UFC/ml (de acuerdo a la escala Mac Farland) y se llevó a cabo la bioconjugación de acuerdo a los protocolos establecidos previamente. En las micrografías se observa al microorganismo agrupado en racimos característicos al género de la bacteria.

En la segunda fila de micrografías en ambas figuras, se utilizó a *E. coli* a la misma concentración que el microorganismo anterior, la bacteria fue utilizada como control negativo del sistema de biosensado por lo que no se aprecia fluorescencia en ninguno de los canales.

En la tercer fila de micrografías en ambas figuras se mezclaron los dos microorganismos a la misma concentración de trabajo descrita anteriormente. El nano-inmuno-sensor indentifico selectivamente a *S. aureus* tanto en el sistema sin alimento como en leche.

Los resultados de los ensayos permitieron establecer que el nano-inmuno-sensor es selectivo para *S.aureus* sobre otros microorganismos, y que es posible la identificación en matrices alimentarias líquidas como la leche. Para éste último caso se realizó una dilución decimal de 10^3 antes de contaminarse y ser utilizado con el biosensor, ya que se tenía como antecedente en previas mediciones que el alimento concentrado inhibe la fluorescencia del sistema probablemente por las caseínas contenidas en él.

Figura 5.18. Nano-inmunosensor. Se muestran las micrografías confocales del inmunosensor utilizando como analito a *S. aureus* (primera fila de arriba hacia abajo), *E. coli* (segunda fila) y una mezcla de los dos microorganismos (tercera fila).

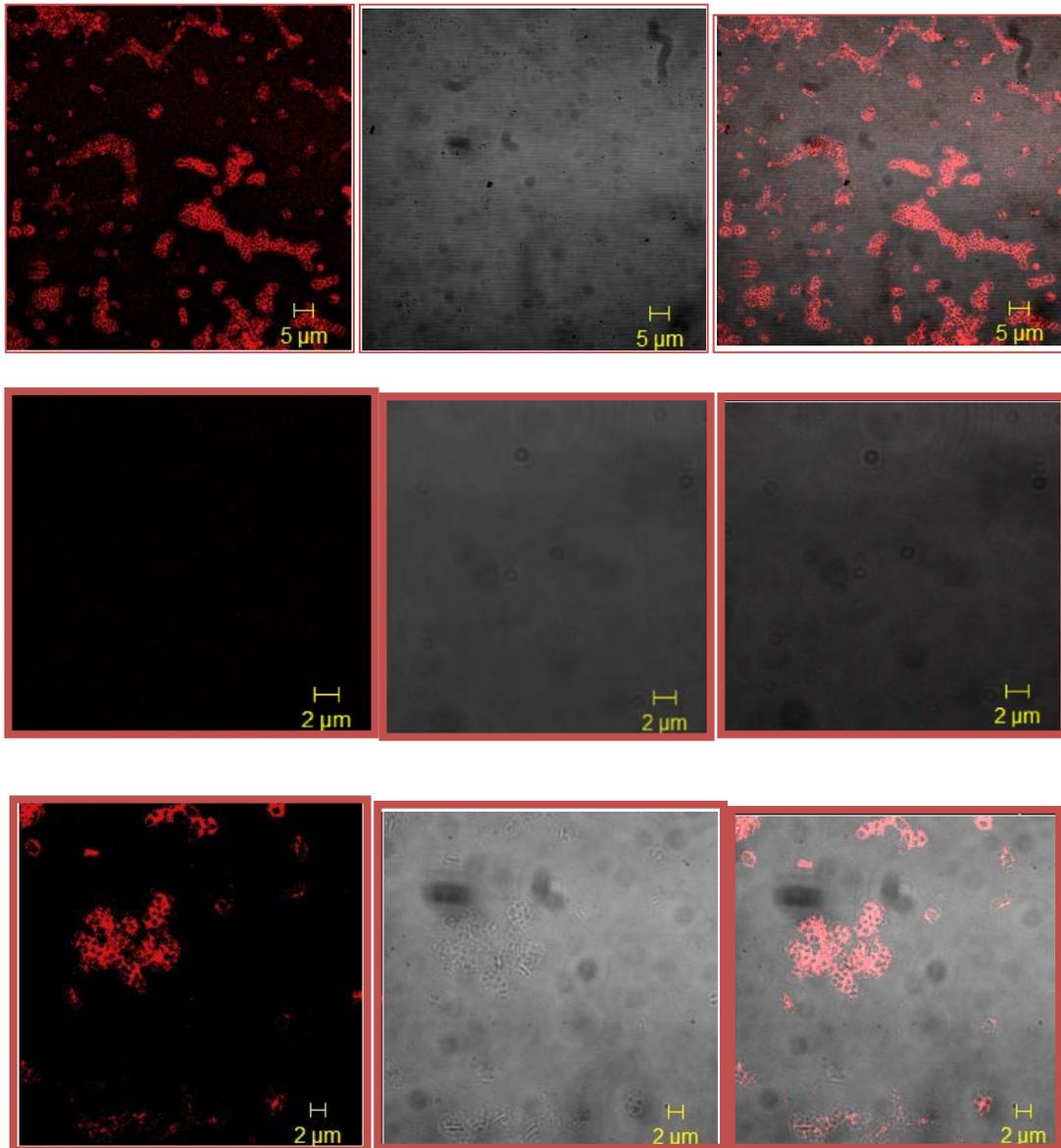


Figura 5.19. Nano-inmunosensor. Se muestran las micrografías confocales del inmunosensor utilizando como analito a *S. aureus* (primera fila de arriba hacia abajo), *E. coli* (segunda fila) y una mezcla de los dos microorganismos (tercera fila), los ensayos se llevaron a cabo en leche.

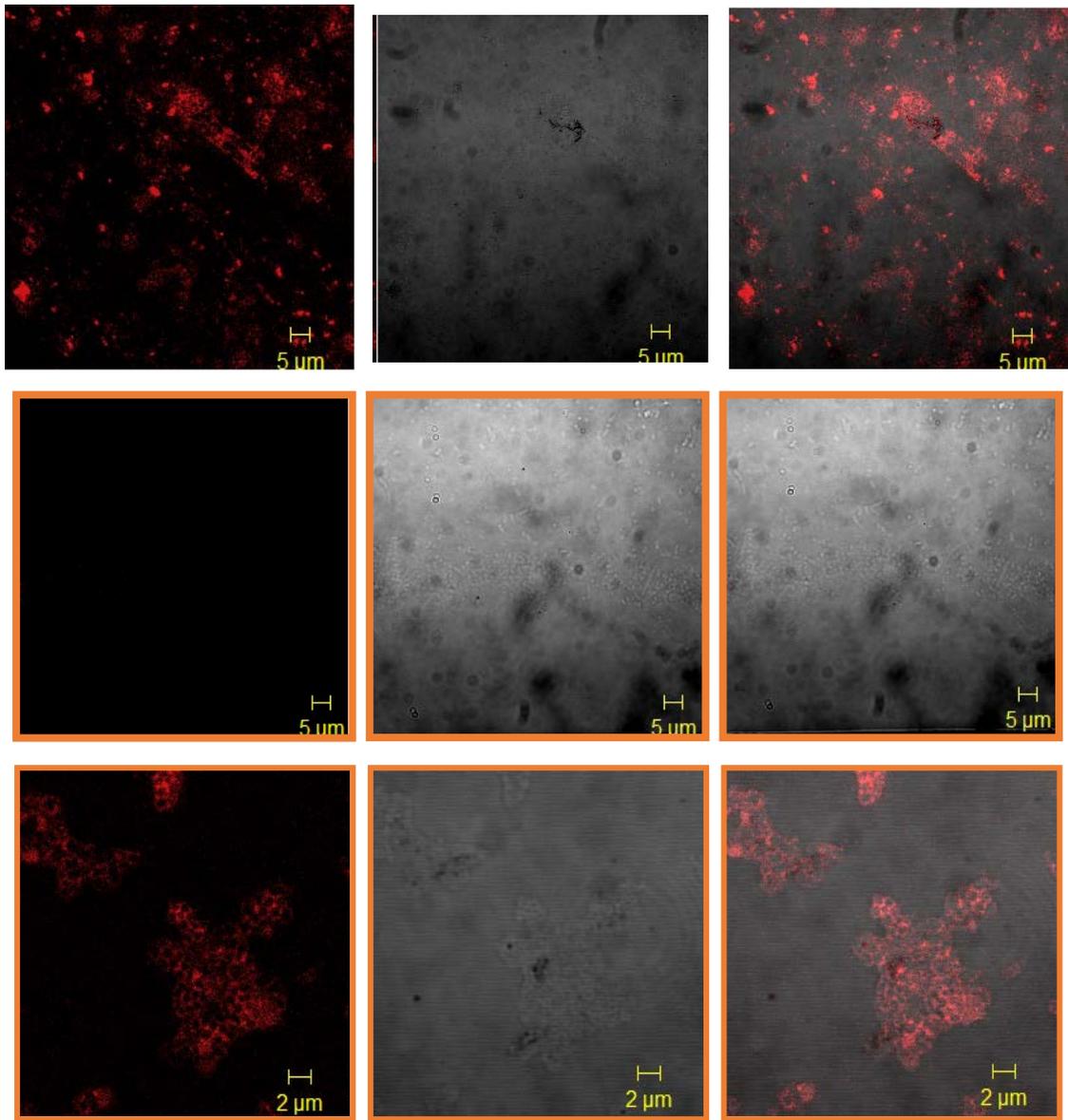


Figura 5.20. Nano-inmunosensor. Se muestran las micrografías confocales del inmunosensor utilizando como analito a *S. aureus* (primera y segunda fila de arriba hacia abajo), *E. coli* (tercera fila) y una mezcla de los dos microorganismos (cuarta fila).

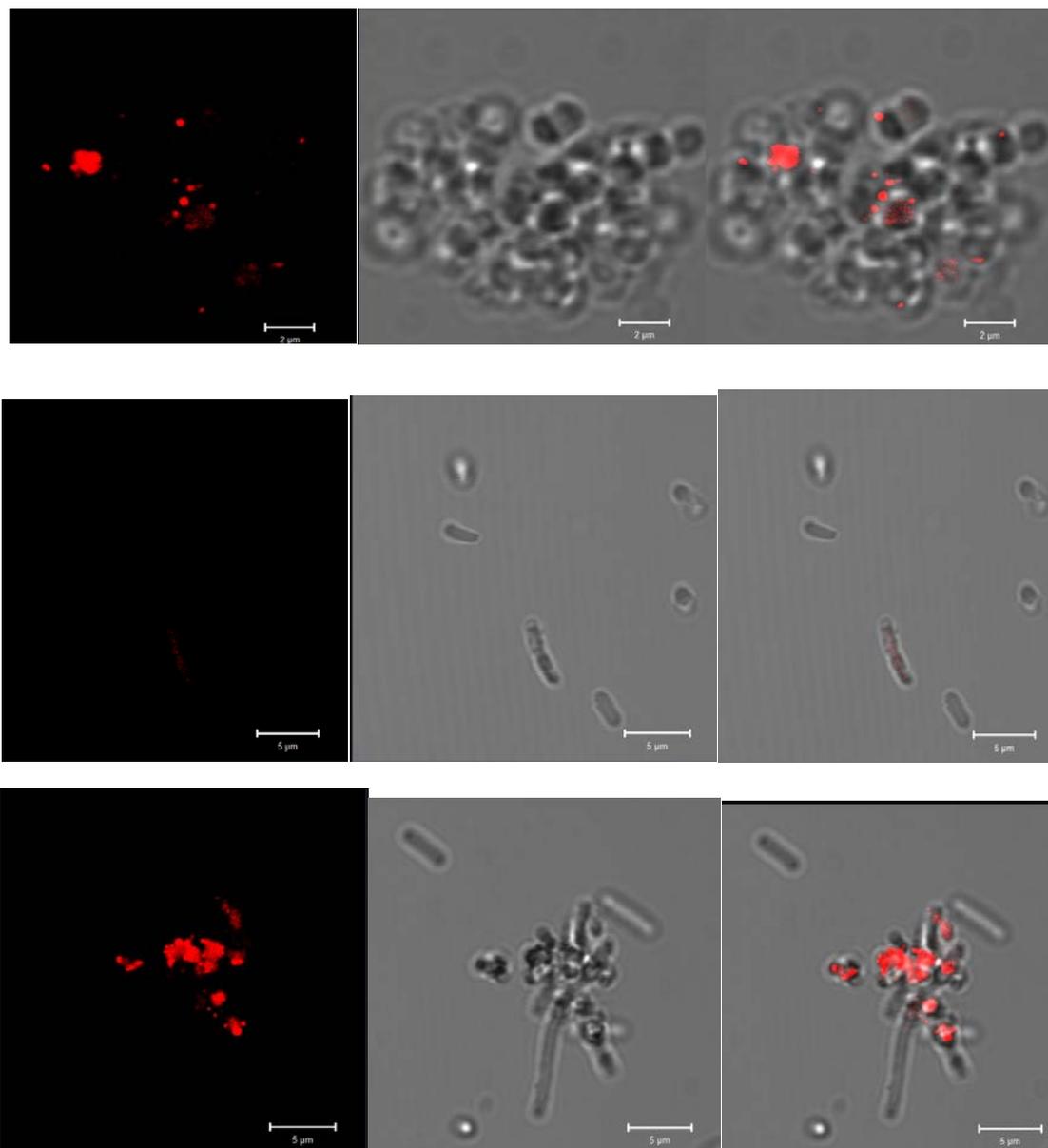
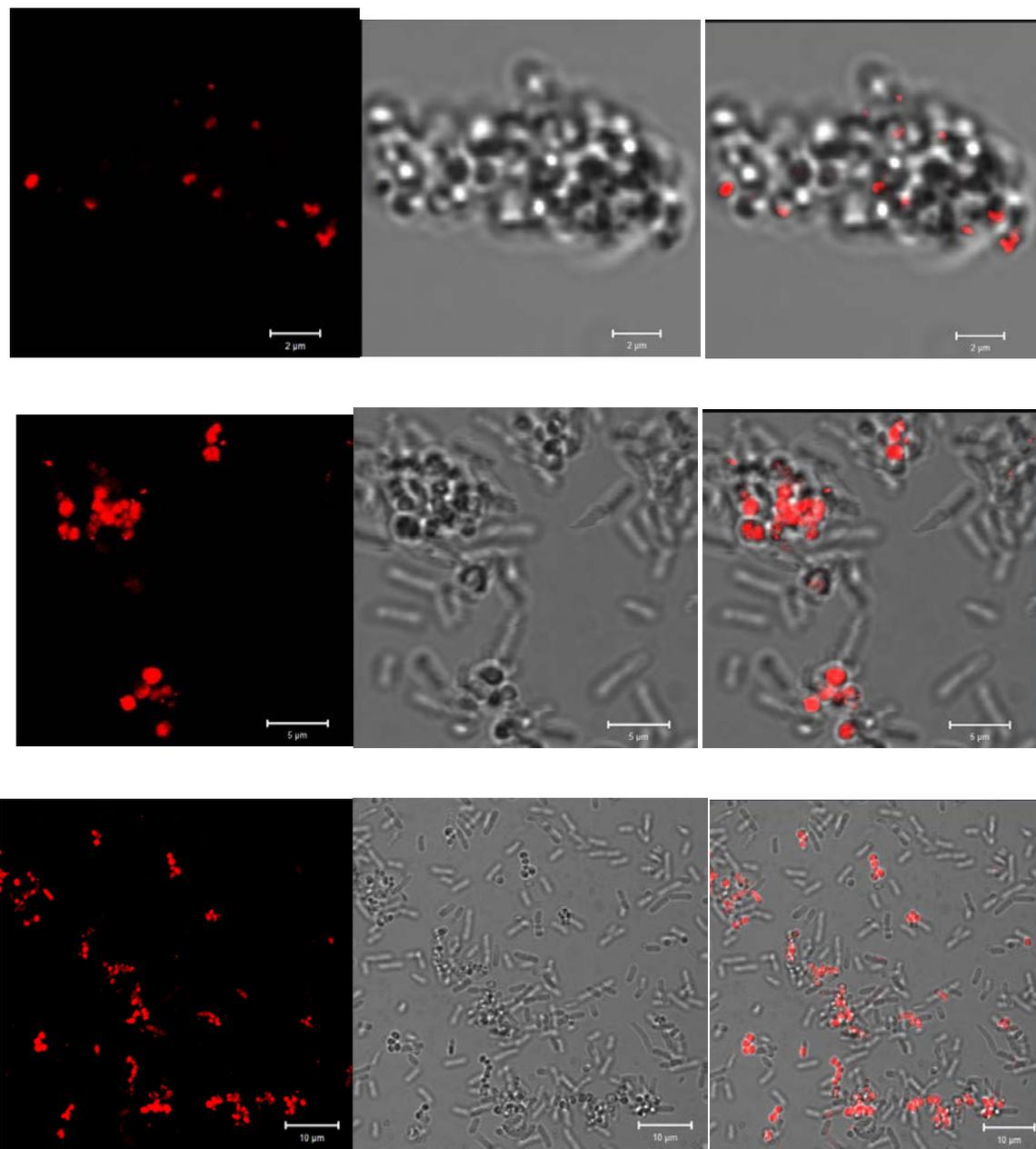


Figura 5.21. Nano-inmunosensor. Se muestran las micrografías confocales del inmunosensor identificando a *S. aureus* (primera fila de arriba hacia abajo) y una mezcla de los dos microorganismos (segunda y tercera fila) en leche.



6. CONCLUSIONES

6.1 Mediante el uso de protocolos estandarizados, se sintetizaron nanopartículas de oro por el método de reducción química; y los espectros de absorción UV/Vis de los coloides obtenidos fueron analizados utilizando un modelo teórico-experimental que permitió la estimación del tamaño de partícula (d) oscilando entre 10-40 nm, así como la concentración de nanopartículas (N), que fue calculada entre 0.1×10^{12} - 6×10^{12} partículas/ml.

6.2 La proteína estreptavidina biotinilada la cual fue empleada para ser conjugada a la superficie de las nanopartículas de oro, resultó ser muy adecuada para la estabilización de estas. Los ensayos de estabilidad de los conjugados mostraron que en condiciones normales son estables por un periodo de tiempo prolongado (mayor a 2 meses), mientras que en presencia de PBS (pH 7.4) se reduce su concentración a un 20% respecto a la inicial después de 2 meses, y en condiciones extremas de NaCl 10% no hay estabilidad y los conjugados se destruyen totalmente después de 3 semanas. Esta proteína, además de servir como estabilizante de nanopartículas de oro, sirvió posteriormente como capa de unión a través de la biotina con el anticuerpo biotinilado anti-*S. aureus*.

6.3 Mediante ensayos de validación y de análisis de la banda de resonancia de plasmon superficial se determinó una concentración de 20 $\mu\text{g/ml}$ de estreptavidina sin marcar y 30 $\mu\text{g/ml}$ de estreptavidina marcada con cromóforo fluorescente (TRITC) como la cantidad mínima necesaria para conjugarse y recubrir la superficie de las nanopartículas de oro.

6.4 El análisis FTIR del conjugado estreptavidina-nanopartícula de oro mostró el aumento de la intensidad de absorción infrarroja por el efecto de la superficie metálica de oro de las nanopartículas (efecto SEIRA). En particular la señal SEIRA observada en 1595 cm^{-1} surge de la adsorción y acoplamiento covalente de la estreptavidina con el grupo carboxilo de los citratos de la superficie de las nanopartículas de oro. De esta manera se sugiere que los residuos de los aminoácidos cargados positivamente ($-\text{NH}$) pueden estar involucrados en la

unión con los grupos aniónicos ($-\text{COO}^-$) de los citratos unidos a la superficie de las nanopartículas de oro.

6.5 Se utilizó un anticuerpo biotinilado (anti-*S. aureus*) como elemento de reconocimiento biológico (ERB) del inmunosensor, el cual se acopló mediante el enlace avidin-biotina a la proteína estreptavidina. Los ensayos de validación usando la espectrofotometría UV/Vis permitieron establecer una concentración de 5 $\mu\text{g/ml}$ de anticuerpo biotinilado sin marcar y 10 $\mu\text{g/ml}$ de anticuerpo biotinilado marcado con TRITC como la cantidad necesaria para conjugarse con las nanopartículas de oro-estreptavidina.

6.6 De la mezcla (1:1) entre la suspensión coloidal fluorescente obtenida en este trabajo (inmunosensor fluorescente) y una muestra de agua y/o leche contaminadas con las bacterias *S. aureus/E. coli*, se observó el bio reconocimiento selectivo de *S. aureus* utilizando microscopía confocal de fluorescencia.

6.7 De los experimentos por espectroscopia de fotoluminiscencia del filtrado del inmunosensor fluorescente, provenientes de un ensayo de bio reconocimiento previo que fue filtrado por membrana, permitieron una medición directa de la concentración bacteriana y fue posible establecer un límite de detección del inmunosensor de 1×10^5 células/ml.

6.8 Los análisis de bioimpedancia del inmunosensor fluorescente sobre muestras contaminadas previamente, permitieron una medida directa de la concentración bacteriana y se estableció un límite de detección del inmunosensor fluorescente de 1×10^2 células/ml.

6.9 Derivado de los resultados, se propone así la solución coloidal obtenida en este trabajo (inmunosensor fluorescente), el cual está elaborado a base de nanopartículas de oro conjugadas con proteína (estreptavidina) e inmunoglobulina (anti-*S. aureus*) como un método alternativo para la detección rápida cualitativa y cuantitativa del microorganismo patógeno *S. aureus*. Con límites de detección entre 10^5 - 10^2 células/ml.

7. REFERENCIAS

- Alkilany, A. M., & Murphy, C. J. (2010). Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: what we have learned so far? *Journal of Nanoparticle Research : An Interdisciplinary Forum for Nanoscale Science and Technology*, 12(7), 2313–2333. doi:10.1007/s11051-010-9911-8
- Boer, E. De, Zwartkruis-nahuis, J. T. M., Wit, B., Huijsdens, X. W., Neeling, A. J. De, Bosch, T., ... Heuvelink, A. E. (2009). International Journal of Food Microbiology Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in meat. *International Journal of Food Microbiology*, 134(1-2), 52–56. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.12.007
- Cock, L. S., & Aponte, A. A. (2009). USE OF ENZYMATIC BIOSENSORS AS QUALITY INDICES : A SYNOPSIS OF PRESENT AND FUTURE TRENDS IN THE FOOD INDUSTRY, 69(June), 270–280.
- Correia, A. (2010). Agenda estratégica de nanociencia y nanotecnología Versión 1.0.
- Daniel, M.-C., & Astruc, D. (2004). Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chemical Reviews*, 104(1), 293–346. doi:10.1021/cr030698+
- Ferrer, J. H. (2008). *Caracterización electroquímica de nanopartículas de oro . Relación entre la forma tridimensional de la partícula y su orientación superficial .* Universidad de Alicante.
- Ge, B., & Meng, J. (2009). Advanced Technologies for Pathogen and Toxin Detection in Foods: Current Applications and Future Directions. *Journal of the Association for Laboratory Automation*, 14(4), 235–241. doi:10.1016/j.jala.2008.12.012
- González-Fandos, M. E., Sierra, M., García-Lopez, M. L., García-Fernández, M. C., & Otero, a. (1999). The influence of manufacturing and drying conditions on the survival and toxinogenesis of *Staphylococcus aureus* in two Spanish dry sausages (chorizo and salchichón). *Meat Science*, 52(4), 411–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22062705>

Haiss, W., Thanh, N. T. K., Aveyard, J., & Fernig, D. G. (2007). Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-vis spectra. *Analytical Chemistry*, 79(11), 4215–21. doi:10.1021/ac0702084

Hasanzadeh, M., Shadjou, N., de la Guardia, M., Eskandani, M., & Sheikhzadeh, P. (2012). Mesoporous silica-based materials for use in biosensors. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 33, 117–129. doi:10.1016/j.trac.2011.10.011

Irlinger, F. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: coagulase-negative staphylococci. *International Journal of Food Microbiology*, 126(3), 302–10. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.016

Ivnitski, D., Abdel-hamid, I., Atanasov, P., & Wilkins, E. (1999). Biosensors for detection of pathogenic bacteria. *Biosensors & Bioelectronics*, 14, 599–624.

Le Ru, E., & Etchegoin, P. (2009). *Principles of surface Raman spectroscopy and related effects* (First Edit.). Elsevier B.V.

Mongillo, J. F. (2007). *Nanotechnology 101*. Westport, Connecticut.: Greenwood Press.

Nema, V., Agrawal, R., Kamboj, D. V., Goel, A. K., & Singh, L. (2007). Isolation and characterization of heat resistant enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* from a food poisoning outbreak in Indian subcontinent. *International Journal of Food Microbiology*, 117(1), 29–35. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.01.015

Normanno, G., Corrente, M., La Salandra, G., Dambrosio, a, Quaglia, N. C., Parisi, a, ... Celano, G. V. (2007). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in foods of animal origin product in Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 117(2), 219–22. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.04.006

Pescador Rojas, J. A. (2006). *“Nanoparticulas bimetalicas de Au-Ag: Síntesis, caracterización y su aplicación para el transporte térmico”*. Instituto Politécnico Nacional.

Podkowik, M., Park, J. Y., Seo, K. S., Bystron, J., & Bania, J. (2013). Enterotoxigenic potential of coagulase-negative staphylococci. *International Journal of Food Microbiology*, 163(1), 34–40. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.02.005

Ramsden, J. (2009). *Essentials of Nanotechnology*. Ventus Publishing ApS.

Raschke, G., Kowarik, S., Franzl, T., Sönnichsen, C., Klar, T. a., Feldmann, J., ... Kürzinger, K. (2003). Biomolecular Recognition Based on Single Gold Nanoparticle Light Scattering. *Nano Letters*, 3(7), 935–938. doi:10.1021/nl034223+

Sanvicens, N., Pastells, C., Pascual, N., & Marco, M.-P. (2009). Nanoparticle-based biosensors for detection of pathogenic bacteria. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 28(11), 1243–1252. doi:10.1016/j.trac.2009.08.002

Shinde, S. B., Fernandes, C. B., & Patravale, V. B. (2011). Recent trends in in-vitro nanodiagnosics for detection of pathogens. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*. doi:10.1016/j.jconrel.2011.11.033

Sospedra, I., Soler, C., Mañes, J., & Soriano, J. M. (2012). Rapid whole protein quantitation of staphylococcal enterotoxins A and B by liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of Chromatography. A*, 1238, 54–9. doi:10.1016/j.chroma.2012.03.022

Srinivas, P. R., Philbert, M., Vu, T. Q., Huang, Q., Kokini, J. L., Saos, E., ... Ross, S. A. (2010). Nanotechnology Research : Applications in. *The Journal of Nutrition*. doi:10.3945/jn.109.115048.119

Thobhani, S., Attree, S., Boyd, R., Kumarswami, N., Noble, J., Szymanski, M., & Porter, R. a. (2010). Bioconjugation and characterisation of gold colloid-labelled proteins. *Journal of Immunological Methods*, 356(1-2), 60–9. doi:10.1016/j.jim.2010.02.007

Viswanathan, S., Wu, L., Huang, M., & Ho, J. A. (2006). Electrochemical Immunosensor for Cholera Toxin Using Liposomes and Poly (3 , 4-ethylenedioxythiophene) -Coated Carbon Nanotubes amplified detection of cholera toxin . The sensing interface, 78(4), 1115–1121.

Wu, L., Gao, B., Zhang, F., Sun, X., Zhang, Y., & Li, Z. (2013). A novel electrochemical immunosensor based on magnetosomes for detection of staphylococcal enterotoxin B in milk. *Talanta*, *106*, 360–6. doi:10.1016/j.talanta.2012.12.053

Wiley J., Sherwood L., Woolverton C. (2008). *Microbiología de Prescott, Harley y Klein*. Mc Graw Hill. Séptima Edición.



Fluorescent Bioconjugate Based on Gold Nanoparticles for the Determination of *Staphylococcus aureus*

L. S. Arcila-Lozano, M. A. Ríos-Corripio, B. E. García-Pérez, M. E. Jaramillo-Flores, C. A. González, R. C. Rocha-Gracia, J. M. Gracia-Jiménez & M. Rojas-López

To cite this article: L. S. Arcila-Lozano, M. A. Ríos-Corripio, B. E. García-Pérez, M. E. Jaramillo-Flores, C. A. González, R. C. Rocha-Gracia, J. M. Gracia-Jiménez & M. Rojas-López (2016): Fluorescent Bioconjugate Based on Gold Nanoparticles for the Determination of *Staphylococcus aureus*, *Analytical Letters*, DOI: [10.1080/00032719.2016.1212204](https://doi.org/10.1080/00032719.2016.1212204)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/00032719.2016.1212204>



Accepted author version posted online: 05 Aug 2016.
Published online: 05 Aug 2016.



[Submit your article to this journal](#)



[View related articles](#)



[View Crossmark data](#)

Full Terms & Conditions of access and use can be found at
<http://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=lanl20>

Download by: [Mr M. Rojas-López*]

Date: 05 August 2016, At: 19:00

Supertitle: Fluorescence

Fluorescent Bioconjugate based on Gold Nanoparticles for the Determination of *Staphylococcus aureus*

L. S. Arcila-Lozano

CIBA-Tlaxcala, Instituto Politécnico Nacional, Tepetitla, Tlaxcala, México

M. A. Ríos-Corripio

CIBA-Tlaxcala, Instituto Politécnico Nacional, Tepetitla, Tlaxcala, México

B. E. García-Pérez

ENCB-Depto. de Inmunología, Instituto Politécnico Nacional, DF, México

M. E. Jaramillo-Flores

ENCB-Depto. de Ingeniería Bioquímica, Instituto Politécnico Nacional, DF, México

C. A. González

ESM, Instituto Politécnico Nacional, DF, México

R. C. Rocha-Gracia

Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Benemérita Universidad Autónoma de
Puebla. Instituto de Ciencias, Puebla, México

J. M. Gracia-Jiménez

Instituto de Física, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México

M. Rojas-López*

CIBA-Tlaxcala, Instituto Politécnico Nacional, Tepetitla, Tlaxcala, México

*Address correspondence to M. Rojas-López. Tele.: (52) 5557296000. E-mail:

marlonrl@yahoo.com.mx

Received 19 May 2016; accepted 09 July 2016.

Abstract

A practical method to determine *Staphylococcus aureus* using bioconjugated gold nanoparticles is reported. The protocol uses gold nanoparticles stabilized by tetramethylrhodamine isothiocyanate labeled streptavidin followed by functionalization with biotinylated anti-staphylococcus aureus antibodies. The streptavidin stabilized gold nanoparticles were obtained by titration and analyzed by ultraviolet-visible spectroscopy and transmission electron microscopy. The obtained fluorescent bioconjugate selectively linked to the surface of *S. aureus* in samples contaminated with the microorganism, as demonstrated by confocal micrographs. The biorecognition process was performed by mixing the fluorescent bioconjugate with the sample. Bacterial dilutions from 1×10^8 to 1×10^2 cell/ml of *S. aureus* were determined, obtaining sensitivity values of 1×10^5 cell/ml by photoluminescence and 1×10^2 cell/ml by bioimpedance. This methodology represents a useful bioanalytical approach for the determination of *Staphylococcus aureus*.

Keywords: biosensor, gold nanoparticles, *Staphylococcus aureus*, streptavidin

INTRODUCTION

Foodborne illnesses are usually infectious or toxic in nature and caused by bacteria, viruses, parasites, or chemical substances entering the body through contaminated food or water (European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control 2014). The World Health Organization estimates that in 2015, 550 million (almost one in ten people in the world) fall ill and 230,000 deaths every year from diarrheal with a significant proportion of these cases following the consumption of contaminated food and drinking water. Children under 5 years of age carry 40% of the foodborne disease burden with 125,000 deaths every year (World Health Organization 2015).

Staphylococcus aureus has been indicated as the fifth causative agent of all reported outbreaks (European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control 2016). *S. aureus* is a ubiquitous bacterium that is both a human and zoonotic commensal and is a common cause of foodborne poisoning worldwide from the ingestion of heat-stable toxins produced in food (Morandi et al. 2007; Podkowik et al. 2013). The signs and symptoms of staphylococcal food poisoning occur when foods containing approximately 10^5 to 10^8 cells per gram or milliliter or enterotoxin (100 ng) are ingested (Sospedra et al. 2012; Wu et al. 2013). *S. aureus* may be transmitted to food by hands or drippage from the nose and mouth. Foods involved in staphylococcal food poisoning include canned mushrooms, cooked sausage, salads with eggs, meat and meat products, fowl and egg products, tuna fish, chicken, potatoes, pasta, baked goods milk, boiled goat milk, and other dairy products (González-Fandos et al. 1999; Nema et al. 2007; Normanno et al. 2007; Irlinger 2008; De Boer et al. 2009; Podkowik et al. 2013).

Conventional bacterial identification methods usually include a morphological evaluation of the microorganism as well as tests for the organisms ability to grow in various media.

Although standard microbiological techniques allow the detection of single bacteria, amplification of the signal is required through the growth of a single cell into a colony. Traditional methods for the detection of bacteria are laborious, time consuming, and material intensive (Arora et al. 2011). These involve the following steps: pre-enrichment, selective enrichment, biochemical screening, and serological confirmation. A complex series of tests is often required before the identification is confirmed. The results of such tests are often difficult to interpret and not available on the time scale desired in the microbiological laboratory. In particular way, traditional technique for identification of *Staphylococcus aureus* is described in the Mexican Official Standard NOM-115-SSA1-1994 (Diario Oficial de la Federación 1995). This method allows the determination of bacteria in food and is carried out directly on selective medium plates and differential culture, with confirmation by coagulase and thermonuclease protocols. The overall technique requires 4 to 5 days for a positive identification. This method is suitable for food analysis in which more than 100 cells of *Staphylococcus aureus* bacteria are expected per gram.

Biosensors offer several advantages over existing techniques that include reduced analysis time, high throughput screening, improved sensitivity, and real time analysis (Jasson et al. 2010). The worldwide demand for biosensors to detect microorganisms is expected to grow from \$6.72 billion in 2009 to \$14.42 billion by 2016 (DiGregorio 2010). The integration of nanotechnology into biosensors holds great promise for addressing the analytical needs of food diagnostic systems (Sanvicens et al. 2009; Wu et al. 2013). Nanoparticles have raised great expectations in regard to generating enhanced signal-to-noise-ratios, reducing response times, and use in multiplexed systems. Another advantage of nanoparticle based technology is the

detection of food borne pathogens in unprocessed and complex food (Li et al. 2005; Chen 2008; Lin et al. 2008; Zhu, Du, and Fu 2009; Pires et al. 2011; Wu et al. 2013).

Among the nanomaterials employed in biosensors are gold nanoparticles, which possess unique optoelectronic properties and provide high surface-to-volume ratios with biocompatibility using appropriate ligands (Park and Hamad-Schifferli 2010; Khan et al. 2012; Sapsford et al. 2013; Soenen et al. 2015). The affinity of the surface of metallic gold nanoparticles for ligands includes thiols, disulfides, dithiocarbamates, and amines that allow bioconjugation with low molecular weight ligands (folic acid, thiamine, dimercaptosuccinic acid), polysaccharides (hyaluronic acid, chitosan, dextran, oligosaccharides, heparin), polyunsaturated fatty acids (palmitic acid, phospho- lipids), deoxyribonucleic acid oligomers, and proteins (transferrin, antibodies, lectins, cytokines, fibrinogen, thrombin) that make them scaffolds for the fabrication (Dang et al. 2005; Haiss et al. 2007; Hun and Zhang 2007; Wampler and Ivanisevic 2009; Thanh and Green 2010; Sapsford et al. 2011, 2013; Chai, Tian, and Cui 2012). The affinity-based streptavidin-biotin system has been employed for a number of applications in bionanotechnology and biosensing (Thanh and Green 2010; Chen et al. 2013; Sapsford et al. 2013). Biotin has a strong and biospecific interaction with streptavidin (dissociation constant of 10^{115} M) and the association between biotin and streptavidin is rapid and unaffected by extremes of pH, organic solvents, and other denaturing agents (González et al. 1997; Katz 1997; Waner and Mascotti 2008).

There have been several reports on the use of gold nanoparticles to detect *S aureus*. Some used the non-polymerase chain reaction-based method, which measures the resonance light-scattering signal of aptamer-conjugated gold nanoparticles to detect single *S aureus* cell within 1.5 hours (Chang et al. 2013). An analytical method based on the affinity nanoprobe-

based mass spectrometry that enables detection of *S aureus* in aqueous samples was also reported. The detection limit of *S aureus* using this method is in the order of a few tens of cells (Lai et al. 2015). A gold nanoparticle-based colorimetric aptasensor for *Staphylococcus aureus* using tyramine signal amplification has been reported. The limit of the method was 9 cfu/ml (Yuan et al. 2014).

An immunochromatographic assay based on gold nanoparticles was developed for *S aureus*. Processed food samples inoculated artificially with 0.9, 1.2, 2.4, and 6 cfu/g of bacteria yielded positive results in the immunochromatographic measurements with a total analysis time of 25 h (Huang 2007). Gold nanoparticles were employed for the direct colorimetric polymerase chain reaction detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in clinical specimens. The colorimetric assay used two gold nanoparticles probes functionalized with *Staphylococcus aureus* 23S rRNA- and *mecA*-specific oligonucleotides with a detection limit of 500 ng of the target amplicon (Chan et al. 2014). In a recent paper, we reported the use of gold nanoparticles covered with protein A and functionalized with fluorescent antibodies to detect salmonella (Rios-Corripio 2016).

Here we describe the design of a fluorescent-nanoimmunosensor colloidal solution for the rapid identification of *Staphylococcus aureus*. This system employed colloidal gold nanoparticles conjugated with the labeled tetramethylrhodamine-streptavidin protein, linked to biotinylated anti-*Staphylococcus aureus* antibodies. The biorecognition process used the fluorescent bioconjugate with the sample. Bacterial dilutions from 1×10^8 to 1×10^2 cell/ml of *S aureus* were employed, obtaining sensitivities of 1×10^5 cell/ml by photoluminescence and 1×10^2 cell/ml by bioimpedance measurements.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Tetrachloroauric acid trihydrate 99.5% precursor was from Sigma-Aldrich. The sodium citrate dehydrate reducing agent was from J. T. Baker. The tetramethylrhodamine-conjugated streptavidin protein from *Streptomyces avidinii* was acquired from Sigma-Aldrich and was stored in pH 7.4, 0.01 M phosphate-buffered saline. Sodium chloride was purchased from Sigma-Aldrich. Anti-*Staphylococcus aureus* antibody biotinylated was purchased from Abcam. The reference strain of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 was donated from the Hospital Microbiology Laboratory and Community of Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México.

Bacteria Preparation

Staphylococcus aureus ATCC 25923 was cultured on brain heart infusion agar plaque (Bioxon de México S. A. de C. V.) and incubated at 37°C for 12 h. A single colony was transferred into a culture tube containing 5 ml of brain heart infusion broth and incubated at 37°C for 12 h. One milliliter of the bacterial culture was centrifuged at 10,000 rpm for 10 min to obtain a pellet. The cells were washed three times with sterile phosphate-buffered saline to remove residual medium and resuspended in 1 ml of phosphate-buffered saline. Bacterial serial dilutions were prepared for detection. The MacFarland scale was used as a standard method for the counting of bacteria. The concentration of bacteria in the initial brain heart infusion broth was estimated to be 12×10^8 cell/ml. Serial dilution was carried out in sterile saline solution to 12×10^7 to 12×10^0 cell/ml.

Instrumentation

Ultraviolet-visible measurements were carried out using an Evolution 606 Spectrophotometer (Thermo Scientific). It was used to measure the surface plasmon resonance absorption band of single nanoparticles, conjugates (gold nanoparticle-streptavidin), and bioconjugates (gold nanoparticle-streptavidin-antibody). A Philips model Tecnai 10 transmission electron microscope operated at 80 kV was used to characterize the shape and size of the gold nanoparticles and the streptavidin conjugate. A Carl Zeiss 710 confocal laser scanning microscope was used to obtain the images of *S. aureus* selectively identified by the bioconjugate.

Bioimpedance measurements used a precision impedance meter (Agilent; Model 4294A), which supplied a signal $I \cos(\omega t)$ at 100 MHz. This system was adapted by gold electrodes positioned so that the electric circuit is closed through a sample of bacteria suspended in 150 μl . Measurements were obtained from 100 Hz to 100 MHz at 181 steps spaced logarithmically.

Photoluminescence emission measurements were carried out by using the 375 nm excitation line of a solid state laser Spectra-Physics, with an exit power of 16 mW, through liquid samples in a quartz cell. The emission signal from the sample was introduced into a Horiba Jobin Yvon (iHR320) monochromator with a charged coupled device detector. 420 and 512 nm long pass filters were used to remove the laser radiation.

Synthesis of Gold Nanoparticles

Gold nanoparticles were prepared by chemical reduction of tetrachloroauric acid trihydrate with sodium citrate dehydrate in water. The gold nanoparticles were synthesized because the citrate ions acts as the reducing, and capping agents. This method involved the preparation of 1 ml of HAuCl_4 at 4% in deionized water. 0.5 ml of this solution was added to

200 ml of deionized water and brought to boiling with constant stirring. Once the sample was between 97 and 100°C, 3 ml of 1% sodium citrate were added and the solution began to darken and turn bluish gray or purple. After 30 min, the reaction was complete and the final color of solution was a deep wine red indicating that the colloidal solution of gold nanoparticles was obtained. After the solution was cooled, the gold nanoparticles were centrifuged at 3,500 rpm for 40 min, the supernatant was removed, and the nanoparticles were resuspended in 6 ml of deionized water. The obtained suspension was stored at 4°C until use.

Titration of Gold Nanoparticles with Streptavidin

A titration was carried out in order to determine the critical tetramethylrhodamine-streptavidin concentration for covering the surface of the gold nanoparticles with a full monolayer. The colloidal solution of gold nanoparticles was treated with increasing concentrations of streptavidin. After adding tetramethylrhodamine-streptavidin to the gold nanoparticles, 10% NaCl was added. If most of the gold nanoparticles were still covered with citrate groups, then the negative charge of the gold nanoparticles was screened by Na⁺ and agglomeration of the colloid took place. This flocculation was accompanied by a color change of the solution.

Preparation of the Conjugate

30 µg/ml of tetramethylrhodamine-labeled streptavidin was the minimum concentration to cover the surface of the 10 to 20 nm gold nanoparticles. 30 µl/ml of tetramethylrhodamine labeled streptavidin were treated with 970 µl of gold nanoparticles, vortexed for 30 s, and incubated at room temperature for 4 min. The obtained conjugate was stored at 4°C until use.

Preparation of the Fluorescent Bioconjugate

10 µg/ml of anti-*S. aureus* biotinylated antibodies were used to functionalize the surface of the fluorescent conjugate. The fluorescent conjugate was mixed with the biotinylated antibody in a 1:1 ratio and the bioconjugated nanoparticles were incubated at 37°C for 1 h. The resulting solution was centrifuged at 3500 rpm for 40 min and the supernatant was discarded. The solution was resuspended in water and stored at 4°C for the determination of *S. aureus* by fluorescence microscopy.

Preparation of Bacteria

The fluorescent bioconjugate (colloidal solution) was mixed 1:1 with 1.2×10^9 cell/ml *S. aureus*. The fluorescent bioconjugate-bacteria were incubated at 37°C for 1 h to promote the labeling of the cell membrane of *S. aureus* with the fluorescent bioconjugate. 5 µl of the obtained suspension was placed on slides to be analyzed by fluorescence.

RESULTS AND DISCUSSION

Ultraviolet-Visible Absorption Spectroscopy of Gold Nanoparticles, the Conjugate, and the Bioconjugate

Figure 1 shows ultraviolet-visible spectra of gold nanoparticles, the conjugate (gold nanoparticle-tetramethylrhodamine-streptavidin), and the bioconjugate (gold nanoparticle-tetramethylrhodamine-streptavidin-biotinylated antibodies). The spectrum of gold nanoparticles shows intense absorption at 520 nm, which is related with surface plasmon resonance. The spectrum of tetramethylrhodamine labeled streptavidin protein shows three bands. The absorption at 280 nm is caused by the absorption of the aromatic amino acids tryptophan and tyrosine (Pace et al. 1995). The bands at 522 and 553 nm are associated with the absorption of

the chromophore tetramethylrhodamine that labels this protein (Pedone et al. 2010; Lin et al. 2013).

For determining the concentration of protein that covers the surface of gold nanoparticles, 0 to 45 $\mu\text{g/ml}$ of tetramethylrhodamine-streptavidin were introduced to the colloidal solution of gold nanoparticles (control) to gradually cover the surface. Once the gold nanoparticles were conjugated with the protein, the colloidal solution obtained was mixed in a 1:1 ratio with 10% NaCl to promote the aggregation of nanoparticles that were not totally covered with the protein (Geneviève et al. 2007). This procedure is known as titration. **Figure 2a** shows the ultraviolet-visible spectra of the gold nanoparticles conjugated with several concentrations of tetramethylrhodamine-streptavidin after mixing with NaCl. In the upper spectrum, gold nanoparticles (without streptavidin) show a broad absorption band from 700 to 800 nm due to aggregated gold nanoparticles caused by mixing with NaCl. Since the gold nanoparticles are initially covered with citrate molecules that have carboxyl groups, the negative charge of the gold nanoparticles is screened by Na^+ and colloidal aggregation occurs. This aggregation is accompanied by a change of color of the solution to gray-purple.

For concentrations between 5 and 45 $\mu\text{g/ml}$ of tetramethylrhodamine-streptavidin, a superposition between the broad band associated with aggregated nanoparticles and the gold nanoparticle-streptavidin conjugate band is observed in the ultraviolet-visible spectrum. In addition, as the streptavidin concentration increases, the broad band from aggregation shifts to higher wavelength with a decrease in intensity. In the same way, as the concentration of streptavidin increases, the surface plasmon resonance absorption associated with the gold nanoparticle-streptavidin conjugate increases in intensity. However, only the spectrum of the

conjugate, which is similar to the surface plasmon resonance absorption of the corresponding spectrum of the gold nanoparticles control, was displaced by 5 wavenumbers.

The spectrum of the conjugate includes the absorption of the bands at 522 and 553 nm from the chromophore tetramethylrhodamine of the streptavidin that overlap in the ultraviolet-visible spectrum of each conjugate. As a consequence of the absorption of this chromophore, the linewidth of the surface plasmon resonance absorption of the conjugate (gold nanoparticle-streptavidin) larger compared with the single gold nanoparticles control, due to damping caused by tetramethylrhodamine-streptavidin on the electronic cloud of gold nanoparticles (Sýkora et al. 2010).

The spectra with the line shape most similar to the surface plasmon resonance band of the gold nanoparticles control and without aggregation were selected to provide the optimum concentrations of tetramethylrhodamine-streptavidin to form an adequate conjugate and provide stability to the gold nanoparticles. Therefore, the concentration interval of tetramethylrhodamine-streptavidin used to cover the surface of the gold nanoparticles was from 20 to 45 $\mu\text{g/ml}$. Under these conditions, stable conjugate particles capable of withstanding the interaction with NaCl were obtained.

However, the first derivative of the ultraviolet-visible spectra of the conjugate prepared with tetramethylrhodamine-streptavidin concentrations from 0 to 45 $\mu\text{g/ml}$) during the titration with NaCl highlights the main differences between the line shape of the surface plasmon resonance band of the gold nanoparticles control and the surface plasmon resonance band of the conjugate at several tetramethylrhodamine-streptavidin concentrations following reaction with NaCl. **Figure 3** shows the first derivative of the ultraviolet-visible spectrum of the gold nanoparticles control and gold nanoparticles conjugated with tetramethylrhodamine-streptavidin.

The signal related with the single gold nanoparticles control includes two bands. The signals of the conjugates have different line shapes and higher bandwidths. In the absence of the protein, the gold nanoparticles aggregate because their surface is uncharged following reaction with NaCl, causing a distortion of the line shape in the first derivative spectrum. When the concentration of protein increases, the surface of the gold nanoparticles is increasingly covered. When the concentration of protein is between 20 and 45 $\mu\text{g/ml}$, the colloidal solution does not aggregate in the presence of NaCl, and the line shapes of the first derivative spectra are similar to the controls and the red color of the colloidal solution remained.

A sufficient concentration of protein (30 $\mu\text{g/ml}$) was used to prepare the conjugate gold nanoparticle-tetramethylrhodamine-streptavidin. The conjugate structure was functionalized on the surface with biotinylated anti-*Staphylococcus aureus* antibodies as described in the experimental section. The affinity between the avidin and biotin occurs so that the constant region of the biotinylated antibodies is linked to the avidin of the protein, and the variable region of the antibodies is exposed to the outside. **Figure 4** shows ultraviolet-visible spectra of gold nanoparticles control, the gold nanoparticle-tetramethylrhodamine-streptavidin conjugate, and the gold nanoparticle-tetramethylrhodamine-streptavidin-antibody bioconjugate. The surface plasmon resonance absorption of gold nanoparticles is centered at 520 nm, while the surface plasmon resonance for the conjugate is centered at 524 nm because of frequency damping caused by tetramethylrhodamine-streptavidin. The surface plasmon resonance absorption of the bioconjugate at 531 nm also results from the shift of the wavelength to higher wavelengths by the presence of the tetramethylrhodamine-streptavidin and the biotinylated antibody linked to this protein.

Transmission Electron Microscopy

Gold nanoparticles and the gold nanoparticle- tetramethylrhodamine-streptavidin conjugate were characterized by transmission electron microscopy. **Figure 5a** shows a typical image of the gold nanoparticles employed in this work. The average size was between 10 and 20 nm. **Figure 5b** shows a typical image of the conjugate, which is characterized by the gold nanoparticles covered by a layer of tetramethylrhodamine-streptavidin. The concentration of tetramethylrhodamine-streptavidin used to prepare this conjugate (30 µg/ml) was determined by the titration procedure described above. This protein layer serves to stabilize the particles in the colloidal state, promote an adequate attachment of the biotinylated antibodies during biofunctionalization, and produce the red fluorescence from the tetramethylrhodamine-chromophore.

Confocal Microscopy

The fluorescent bioconjugate in colloidal form obtained in this work was directly analyzed by mixing with water treated with 10^5 cell/ml *S. aureus*. After mixing in a 1:1 ratio, an aliquot was characterized by scanning confocal microscopy. **Figure 6** shows dark-field, clear-field, and the combination of both fields of a cluster of *S. aureus*. **Figure 6d** shows the combination of several clusters at higher magnification. In the dark field, the red fluorescence due to the tetramethylrhodamine chromophore of the streptavidin suggests adequate recognition of this pathogenic microorganism by the bioconjugate. All images were from an internal focusing plane of the cluster by integrating the fluorescence from all focusing planes. A three-dimensional reconstruction of the cluster in **Figure 6a** is shown in **Figure 7**.

Figure 8 shows images of dark, clear, and combined fields for *S. aureus* with *Escherichia coli*. Both types of bacteria are pathogenic microorganisms of interest. Fluorescence arising from

the bioconjugate demonstrates selectivity for *S aureus*. Only the surface of coccus were covered by the fluorescent biofunctionalized nanoparticles bioconjugate, unlike the *E coli* bacilli which were not recognized by the bioconjugate. Interferences of the fluorescent bioconjugate with microorganisms depend on the cross reactivity of the antibody. The selectivity of the bioconjugate colloidal solution for *S aureus* was favorable in the presence of pathogenic *E coli*. However, this phenomenon needs to be further investigated to eliminate interferences with these bacteria and other *Micrococcaceae* species and to minimize nonspecific binding by using different capture antibodies and blocking procedures.

Figure 9 shows the negative control of this bioconjugate with *E coli*. 5 μ l of the mixed bioconjugate-bacteria sample at 10^5 cell/mL was immobilized on slides. Micrographs of dark, clear, and combined fields show no recognition of this bacillus by the fluorescent bioconjugate.

Figure 10 shows the selective biorecognition of *S aureus* in diluted milk that was treated with *S aureus* and *E coli* bacteria. The bioconjugate solution was mixed 1:1 with the contaminated milk. The resultant mixture was centrifuged and immobilized on slides to be analyzed by confocal microscopy. Micrographs of dark, clear, and combined fields show the recognition of *S aureus* by the bioconjugate. Again, only coccus were recognized by the bioconjugate and covered by the fluorescent functionalized nanoparticles. The tetramethylrhodamine fluorescence micrographs demonstrate the presence of this pathogenic microorganism. According to these findings, this methodology may be an easy and reliable approach to determine *S aureus* in food.

The fluorescent bioconjugate was mixed with water contaminated with *S aureus* from 1.2×10^8 to 1.2×10^5 cell/ml and passed through cellulose acetate membranes (0.22 μ m). The permeated bioconjugate nanoparticles without links to *S aureus* were characterized by their photoluminescence. **Figure 11** shows the photoluminescence spectra of the permeated

fluorescent nanoparticles that serve as emission centers during laser excitation. The filtrated samples were analyzed in a quartz cuvette, including the bioconjugate colloidal solution as the control with the bioconjugate was assigned to be 1×10^0 cell/ml by approximation. No intrinsic photoluminescence of 1.2×10^8 cell/ml *S. aureus* was observed. An intense band at 574 nm from the tetramethylrhodamine of the streptavidin in the bioconjugate nanoparticles was present. After performing spectral normalization of the band at 521 nm from the quartz cuvette, a decrease of the photoluminescence intensity was observed from the band at 574 nm with the bacteria concentration. Thus, for high bacteria concentrations, few bioconjugated nanoparticles were obtained after filtration. On the other hand, for low bacteria concentrations, the number of bioconjugated nanoparticles and photoluminescence increased after filtration. The sensitivity limit was 1×10^5 cell/ml.

Figure 12 shows bioimpedance curves of water treated with 1.2×10^8 to 1.2×10^1 cell/ml *S. aureus*. All samples were mixed in a 1:1 ratio of the bioconjugate in the colloidal solution obtained in this work. Bioimpedance measurements as a function of frequency of the electrical signal show two local maximum frequencies (not shown) at 100 and 199.5 Hz for *S. aureus* labeled with the bioconjugate. Using either frequency, a detection limit of 1×10^2 cell/ml was obtained. The signal of the bioconjugate was assigned by approximation to 1×10^0 cell/ml. An exponential dependence from a semilogarithmic plot of impedance as a function of the bacteria concentration was observed. These results show that the concentration of *S. aureus* was determined using the bioconjugate reported in this work.

CONCLUSIONS

A colloidal fluorescent bioconjugate, which is based in the use of gold nanoparticles stabilized with tetramethylrhodamine labeled streptavidin and biofunctionalized with biotinylated anti-*S aureus* antibody, was employed for the analysis of water and milk and provided good selectivity to the surface of *S aureus*, as evidenced by confocal microscopy. Photoluminescence emission of filtered bioconjugated nanoparticles that were previously mixed with contaminated samples provided a direct measurement of the bacteria concentration with a detection limit of 1×10^5 cell/ml. Impedance measurements of contaminated samples with this bioconjugate also provided direct determination of the bacteria concentration with a detection limit of 1×10^2 cell/ml. This methodology may be an important alternative to determine pathogens in food.

Acknowledgments

The authors thank support from SNI-CONACYT, COFAA-IPN, SIP-IPN, CNMN-IPN, and Instituto Nacional de Rehabilitación, México.

References

- Arora, P., A. Sindhu, N. Dilbaghi, and A. Chaudhury. 2011. Biosensors as innovative tools for the detection of food borne pathogens. *Biosensors and Bioelectronics* 28 (1):1–12. doi:10.1016/j.bios.2011.06.002
- Chai, Y., D. Tian, and H. Cui. 2012. Electrochemiluminescence biosensor for the assay of small molecule and protein based on bifunctional aptamer and chemiluminescent functionalized gold nanoparticles. *Analytica Chimica Acta* 715:86–92. doi:10.1016/j.aca.2011.12.006
- Chan, W. S., B. S. Tang, M. V. Boost, C. Chow, and P. H. Leung. 2014. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using a gold nanoparticle-based colourimetric polymerase chain reaction assay. *Biosensors and Bioelectronics* 53:105–11. doi:10.1016/j.bios.2013.09.027
- Chang, Y.C., C. Y. Yang, R. L. Sun, Y. F. Cheng, W. C. Kao, and P. C. Yang. 2013. Rapid single cell detection of *Staphylococcus aureus* by aptamer-conjugated gold nanoparticles. *Scientific Reports* 3:1863. doi:10.1038/srep01863

- Chen, Z. G. 2008. Conductometric immunosensors for the detection of staphylococcal enterotoxin B based bio-electrocatalytic reaction on micro-comb electrodes. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 31 (4):345–50. doi:10.1007/s00449-007-0168-2
- Dang, T. X., S. J. Farah, A. Gast, C. Robertson, B. Carragher, E. Egelman, and E. M. Wilson-Kubalek. 2005. Helical crystallization on lipid nanotubes: streptavidin as a model protein. *Journal of Structural Biology* 150 (1):90–99. doi:10.1016/j.jsb.2005.02.002
- De Boer, E. D., J. T. M. Zwartkruis-Nahuis, B. Wit, X. W. Huijsdens, A. J. De Neeling, T. Bosch, R. A. A. Van Oosterom, A. Vila, and A. E. Heuvelink. 2009. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in meat. *International Journal of Food Microbiology* 134 (1–2):52–56. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.12.007
- Diario Oficial de la Federación. 1995. Norma Oficial Mexicana NOM-115-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la determinación de *Staphylococcus aureus* en alimentos. <http://www.cofepris.gob.mx/MJ/Documents/Normas/115ssa1.pdf>.
- DiGregorio, B. E. 2010. Several rapid-read microbial biosensors being developed. *Microbe* 5 (10):417–18. doi:10.1128/microbe.5.417.1
- European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control. 2014. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2014. *EFSA Journal* 14 (2):4380. doi:10.2903/j.efsa.2016.4380
- European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control. 2016. Data dictionaries—guidelines for reporting data on zoonoses, antimicrobial resistance and food-borne outbreaks using the EFSA data models for the Data Collection Framework (DCF) to be used in 2016, for 2015 data. EFSA Supporting publication 2016. <http://doi:10.2903/j.efsa.2016.4380>.
- Geneviève, M., C. Vieu, R. Carles, A. Zwick, G. Brière, L. Salomé, and E. Trévisiol. 2007. Biofunctionalization of gold nanoparticles and their spectral properties. *Microelectronic Engineering* 84 (5–8):1710–13. doi:10.1016/j.mee.2007.01.247
- González, M., L. A. Bagatolli, I. Echabe, J.L.R. Arrondo, C. E. Argaran, C. R. Cantor, and D. F. Gerardo. 1997. Interaction of Biotin with streptavidin. *Molecular Biology* 272 (17):11288–94. doi:10.1074/jbc.272.17.11288
- González-Fandos, M. E., M. Sierra, M. L. García-Lopez, M. C. García-Fernández, A. Otero. 1999. The influence of manufacturing and drying conditions on the survival and toxinogenesis of *Staphylococcus aureus* in two Spanish dry sausages (chorizo and salchichón). *Meat Science* 52 (4):411–19. doi:10.1016/s0309-1740(99)00023-6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22062705>.
- Haiss, W., N. T. K. Thanh, J. Aveyard, and D. G. Fernig. 2007. Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-vis spectra. *Analytical Chemistry* 79 (11):4215–21. doi:10.1021/ac0702084
- Homola, J. (2008). Surface plasmon resonance sensors for detection of chemical and biological species. *Chemical Reviews* 108:462–93. doi:10.1021/cr068107d
- Huang, S. H. 2007. Gold nanoparticle-based immunochromatographic assay for the detection of *Staphylococcus aureus*. *Sensors and Actuators B: Chemical* 127 (2):335–40. doi:10.1016/j.snb.2007.04.027
- Hun, X., and Z. Zhang. 2007. A novel sensitive staphylococcal enterotoxin C1 fluoroimmunoassay based on functionalized fluorescent core-shell nanoparticle labels. *Food Chemistry* 105 (4):623–29. doi:10.1016/j.foodchem.2007.03.068

- Irlinger, F. 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: Coagulase-negative staphylococci. *International Journal of Food Microbiology* 126 (3):302–10. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.016
- Jasson, V., L. Jacxsens, P. Luning, A. Rajkovic, and M. Uyttendaele. 2010. Alternative microbial methods: An overview and selection criteria. *Food Microbiology* 27 (6):710–30. doi:10.1016/j.fm.2010.04.008
- Katz, B. A. 1997. Binding of biotin to streptavidin stabilizes intersubunit salt bridges between Asp61 and His87 at low pH. *Journal of Molecular Biology* 274 (5):776–800. doi:10.1006/jmbi.1997.1444
- Khan, H. A., M. A. K. Abdelhalim, M. S. Al-Ayed, and A. S. Alhomida. 2012. Effect of gold nanoparticles on glutathione and malondialdehyde levels in liver, lung and heart of rats. *Saudi Journal of Biological Sciences* 19 (4):461–64. doi:10.1016/j.sjbs.2012.06.005
- Lai, H. Z., S.G. Wang, C.Y. Wu, and Y.C. Chen. 2015. Detection of *Staphylococcus aureus* by functional gold nanoparticle-based affinity surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 87 (4):2114–20. doi:10.1021/ac503097v
- Lin, F. Y. H., M. Sabri, J. Alirezaie, D. Li, and P. M. Sherman. 2005. Development of a nanoparticle-labeled microfluidic immunoassay for detection of pathogenic microorganisms development of a nanoparticle-labeled microfluidic immunoassay for detection of pathogenic microorganisms. *Clinical and Vaccine Immunology* 12 (3):418–25. doi:10.1128/cdli.12.3.418-425.2005
- Lin, Y. H., S. H. Chen, Y. C. Chuang, Y. C. Lu, T. Y. Shen, C. A. Chang, and C. S. Lin. 2008. Disposable amperometric immunosensing strips fabricated by Au nanoparticles-modified screen-printed carbon electrodes for the detection of foodborne pathogen *Escherichia coli* O157:H7. *Biosensors and Bioelectronics* 23 (12):1832–37. doi:10.1016/j.bios.2008.02.030
- Mohammed, F. A., M. Girilal, S. A. Mahdy, S. S. Somsundar, R. Venkatesan, and P. T. Kalaichelvan. 2011. Vancomycin bound biogenic gold nanoparticles: A different perspective for development of anti VRSA agents. *Process Biochemistry* 46 (3):636–41. doi:10.1016/j.procbio.2010.11.001
- Morandi, S., M. Brasca, R. Lodi, P. Cremonesi, and B. Castiglioni. 2007. Detection of classical enterotoxins and identification of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* from milk and dairy products. *Veterinary Microbiology* 124:66–72. doi:10.1016/j.vetmic.2007.03.014
- Nema, V., R. Agrawal, D. V. Kamboj, A. K. Goel, and L. Singh. 2007. Isolation and characterization of heat resistant enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* from a food poisoning outbreak in Indian subcontinent. *International Journal of Food Microbiology* 117:29–35. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.01.015
- Normanno, G., M. Corrente, G. La Salandra, A. Dambrosio, and N. C. Quaglia. 2007. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in foods of animal origin product in Italy. *International Journal of Food Microbiology* 117:219–22. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.04.006
- Pace, C. N., F. Vajdos, L. Fee, G. Grimsley, and T. Gray. 1995. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Science: A Publication of the Protein Society* 4 (11):2411–23. doi:10.1002/pro.5560041120
- Park, S., and K. Hamad-Schifferli. 2010. Nanoscale interfaces to biology. *Current Opinion in Chemical Biology* 14 (5):616–22. doi:10.1016/j.cbpa.2010.06.186

- Pedone, A., J. Bloino, S. Monti, G. Prampolini, and V. Barone. 2010. Absorption and emission UV-Vis spectra of the TRITC fluorophore molecule in solution: a quantum mechanical study. *Physical Chemistry Chemical Physics: PCCP* 12 (4):1000c06. doi:10.1039/b920255b
- Pires, A. C., N. D. F. F. Soares, L. H. M. da Silva, M. C. H. da Silva, M. V. De Almeida, M. Le Hyaric, N. J. De Andrade, R. F. Soares, A. B. Mageste, and S. G. Reis. 2011. A colorimetric biosensor for the detection of foodborne bacteria. *Sensors and Actuators: B. Chemical* 153 (1):17c03. doi:10.1016/j.snb.2010.09.069
- Podkowik, M., J. Y. Park, K. S. Seo, J. Bystro, and J. Bania. 2013. Enterotoxigenic potential of coagulase-negative staphylococci. *International Journal of Food Microbiology* 163:34c0340. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.02.005
- Rios-Corripio, M. A., Arcila-Lozano, L.S., Garcia-Perez, B.E., Jaramillo-Flores, M.E., Hernandez-Perez, A.D., Carlos-Martinez, A., Rosales-Perez, and Rojas-Lopez, M. 2016. Fluorescent gold nanoparticle-based bioconjugate for the detection of salmonella. *Analytical Letters* 49:1862c03. doi:10.1080/00032719.2015.1128944
- Saha, K., S. S. Agasti, C. Kim, X. Li, and V. M. Rotello. 2011. Gold nanoparticles in chemical and biological sensing. *Chemical Engineering Journal* 112:2739c039. doi:10.1021/cr2001178
- Sanvicens, N., C. Pastells, N. Pascual, and M. P. Marco. 2009. Nanoparticle-based biosensors for detection of pathogenic bacteria. *Trends in Analytical Chemistry* 28 (11):1243c02. doi:10.1016/j.trac.2009.08.002
- Sapsford, K. E., W. R. Algar, L. Berti, K. B. Gemmill, B. J. Casey, E. Oh, and I. L. Medintz. 2013. Functionalizing nanoparticles with biological molecules: Developing chemistries that facilitate nanotechnology. *Chemical Reviews* 113 (3):1904c074. doi:10.1021/cr300143v
- Sapsford, K. E., K. M. Tyner, B. J. Dair, J. R. Deschamps, and I. L. Medintz. 2011. Analyzing nanomaterial bioconjugates: A review of current and emerging purification and characterization techniques. *Analytical Chemistry* 83 (12):4453c088. doi:10.1021/ac200853a
- Soenen, S. J., W. J. Parak, J. Rejman, and B. Manshian. 2015. (Intra)cellular stability of inorganic nanoparticles: Effects on cytotoxicity, particle functionality and biomedical applications. *Chem. Rev.* 115:1177c01178. doi:10.1021/cr400714j
- Sospedra, I., C. Soler, J. Mañes, and J. M. Soriano. 2012. Rapid whole protein quantitation of staphylococcal enterotoxins A and B by liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of Chromatography* 1238:54c059. doi:10.1016/j.chroma.2012.03.022
- Sýkora, D., V. Kasicka, I. Mikšík, P. Režanka, K. Záruba, P. Matejka, and V. Král. 2010. Application of gold nanoparticles in separation sciences. *Journal of Separation Science* 33 (3):372c087. doi:10.1002/jssc.200900677
- Thanh, N. T. K., and L. A. W. Green. 2010. Functionalization of nanoparticles for biomedical applications. *Nano Today* 5 (3):213c030. doi:10.1016/j.nantod.2010.05.003
- Tokel, O., F. Inci, and U. Demirci. 2014. Advances in plasmonic technologies for point of care applications. *Chemical Reviews* 114 (11):5728c082. doi:10.1021/cr4000623
- Wampler, H. P., and A. Ivanisevic. 2009. Nanoindentation of gold nanoparticles functionalized with proteins. *Micron* 40 (4):444c038. doi:10.1016/j.micron.2009.01.002

- Waner, M. J., and D. P. Mascotti. 2008. A simple spectrophotometric streptavidin-biotin binding assay utilizing biotin-4-fluorescein. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 70 (6):873–77. doi:10.1016/j.jbbm.2007.06.001
- Wu, L., B. Gao, F. Zhang, X. Sun, Y. Zhang, and Z. Li. 2013. A novel electrochemical immunosensor based on magnetosomes for detection of staphylococcal enterotoxin B in milk. *Talanta* 106:360–66. doi:10.1016/j.talanta.2012.12.053
- Yang, M., Y. Kostov, H. A. Bruck, and A. Rasooly. 2009. Gold nanoparticle-based enhanced chemiluminescence immunosensor for detection of staphylococcal enterotoxin B (SEB) in food. *International Journal of Food Microbiology* 133 (3):265–71. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.05.029
- Yuan, J., S. Wu, N. Duan, X. Ma, Y. Xia, J. Chen, and Z. Wang. 2014. A sensitive gold nanoparticle-based colorimetric aptasensor for *Staphylococcus aureus*. *Talanta* 127:163–68. doi:10.1016/j.talanta.2014.04.013
- Zhu, S., C. Du, and Y. Fu. 2009. Localized surface plasmon resonance-based hybrid Au–Ag nanoparticles for detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxin B. *Optical Materials* 31:1608–13. doi:10.1016/j.optmat.2009.03.009

Figure 1. Ultraviolet-visible spectra of gold nanoparticles (control) and tetramethylrhodamine labeled streptavidin protein.

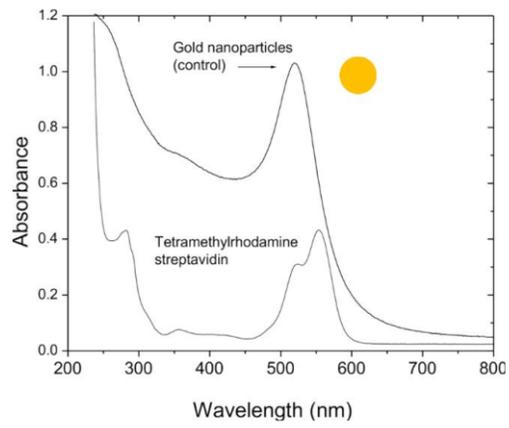


Figure 2. Ultraviolet-visible spectra of gold nanoparticles conjugated with several concentrations of tetramethylrhodamine-streptavidin during the titration.

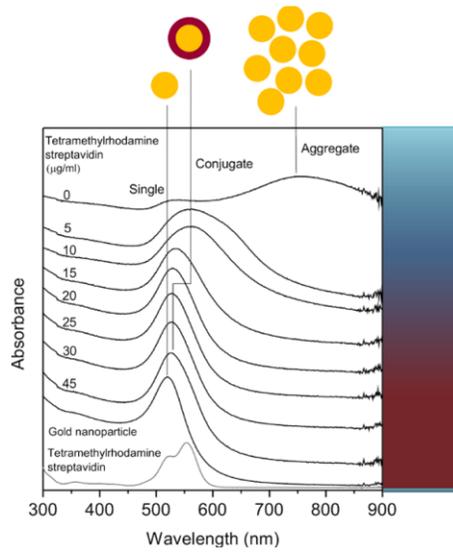


Figure 3. First derivative absorbance of the ultraviolet-visible spectra of gold nanoparticles conjugated with tetramethylrhodamine-streptavidin ($\mu\text{g/ml}$).

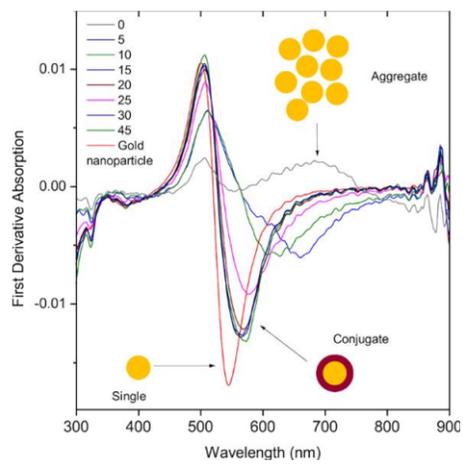


Figure 4. Ultraviolet-visible spectra of gold nanoparticles, the gold nanoparticles-tetramethylrhodamine-streptavidin conjugate, and the gold nanoparticle-tetramethylrhodamine-streptavidin-antibody bioconjugate.

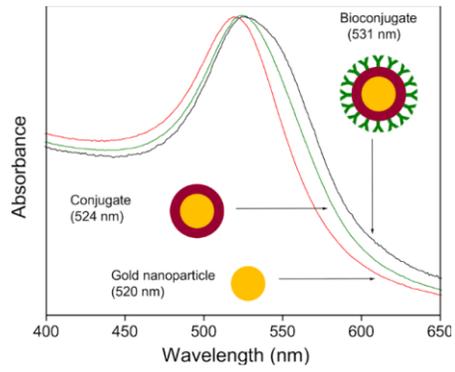
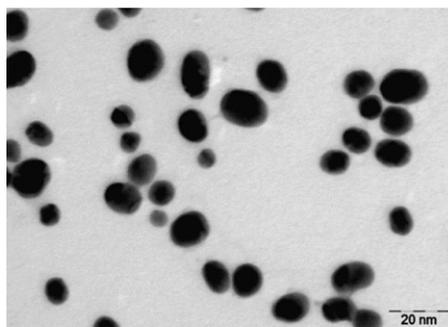
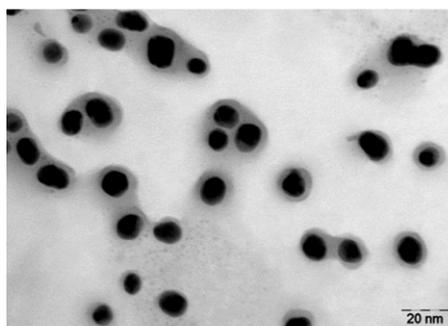


Figure 5. Transmission electron microscopy images of gold nanoparticles prepared by (a) citrate-reduction and the (b) conjugate obtained by titration with tetramethylrhodamine-streptavidin. The gold nanoparticles were covered with a layer of tetramethylrhodamine-streptavidin.



(a)



(b)

Figure 6. Confocal microscopy images of a cluster of *Staphylococcus aureus* recognized by the fluorescent bioconjugate described in this work: (a) dark-field, (b) clear-field, (c) the combination of both fields, and (d) the combination of several clusters at higher resolution.

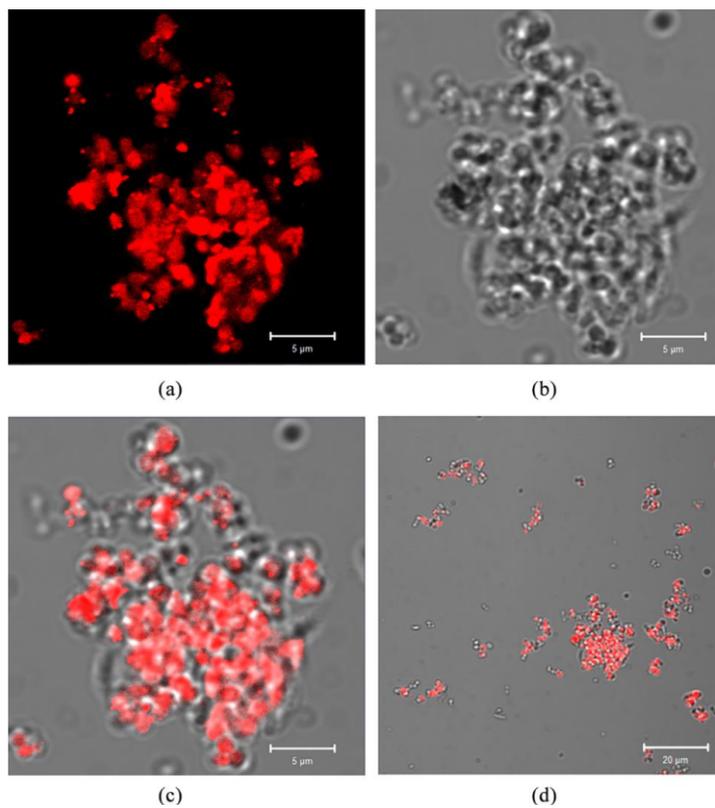


Figure 7. Three-dimensional integrated fluorescence from a cluster of *S. aureus* by scanning confocal microscopy. The microorganism was recognized by the fluorescent bioconjugate.

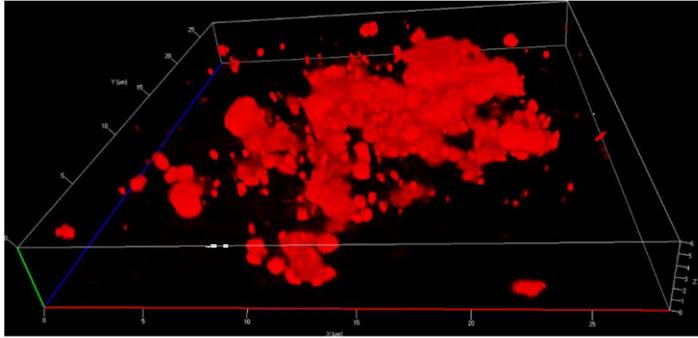


Figure 8. Confocal microscopy images of the fluorescent bioconjugate reported in this work which selectively identifies *S. aureus* in presence of *E. coli*: (a) dark-field, (b) clear-field, and (c) combination of both fields.

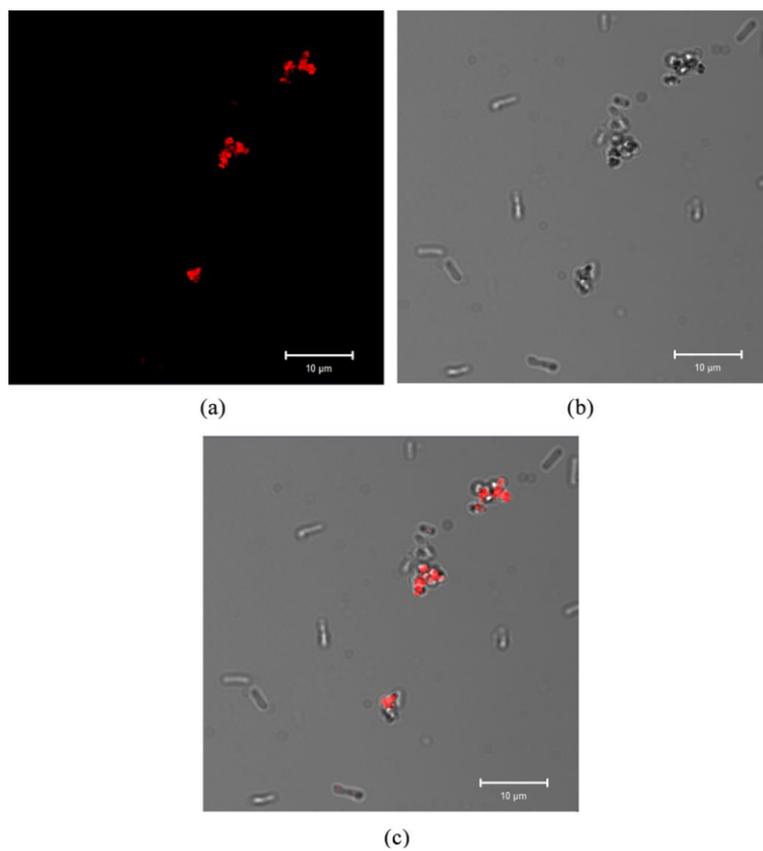


Figure 9. Confocal microscopy images of the fluorescent bioconjugate in presence of *E. coli* with no recognition of bacilli by the bioconjugate: (a) dark-field, (b) clear-field, and (c) combination of both fields.

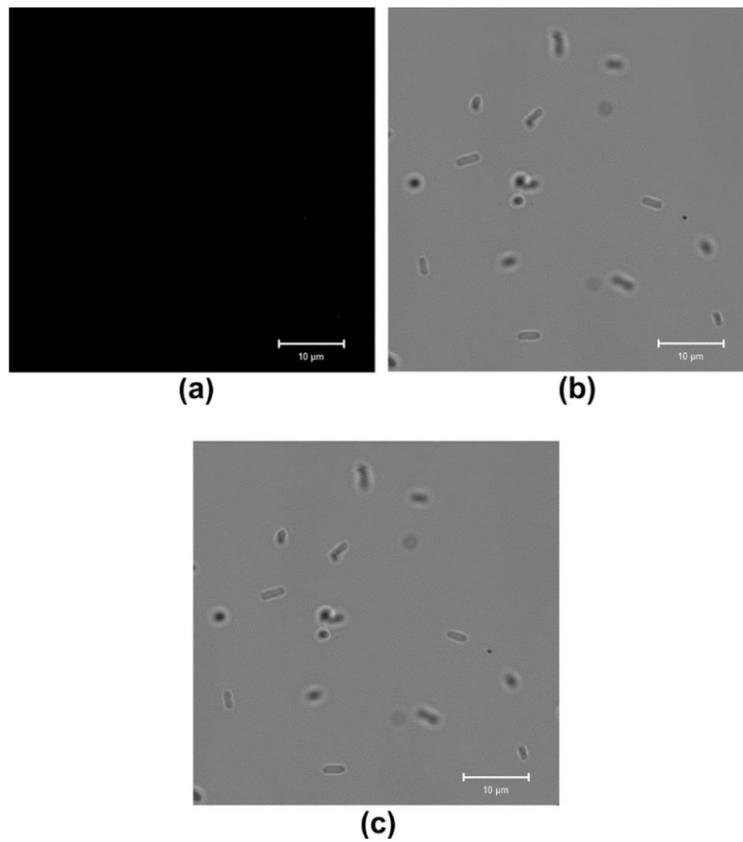


Figure 10. Confocal microscopy images of the fluorescent bioconjugate in milk contaminated with *S aureus* and *E coli*: (a) dark-field, (b) clear-field, and (c) combination of both fields. The selective recognition of the coccus of *S aureus* is visible in all images.

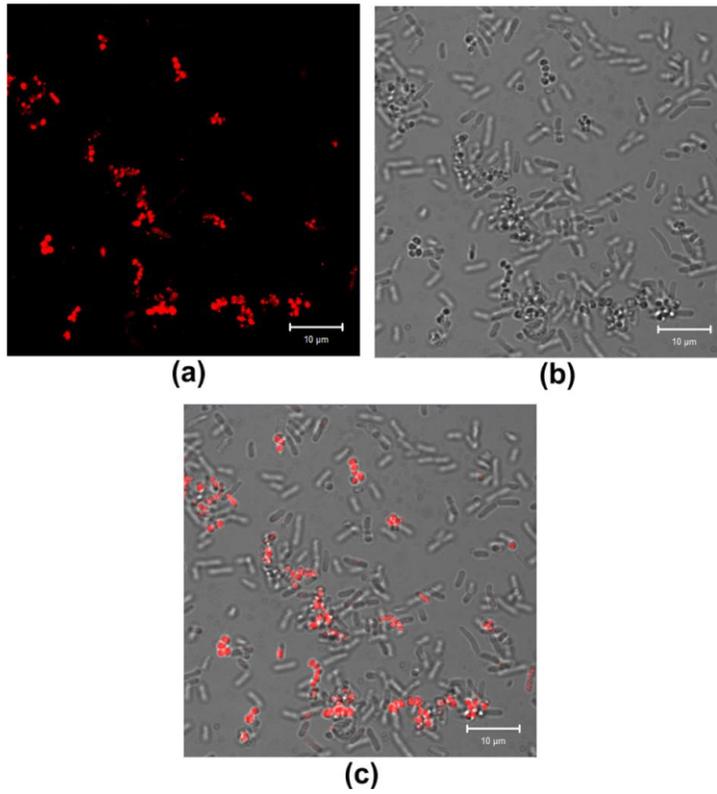


Figure 11. Photoluminescence spectra of the filtered bioconjugate nanoparticles. The retentate bioconjugate nanoparticles were linked to *S. aureus* at several concentrations of bacteria. The emission band at 574 nm is from the tetramethylrhodamine in the bioconjugate and is proportional to the bacteria concentration.

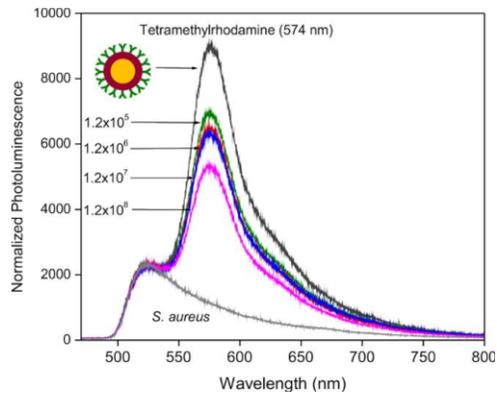


Figure 12 Bioimpedance curves of water samples contaminated with concentrations of *S aureus* from 1.2×10^8 to 1.2×10^1 cell/ml.

