



**Universidad
Zaragoza**

Trabajo Fin de Grado

Uso de la nanotecnología para descubrir materiales del Patrimonio Cultural

Autor

Javier Lou Franco

Directores

Ana Claro

Jesús Martínez de la Fuente

Facultad de Ciencias/Grado de Biotecnología

2015



Instituto Universitario de Investigación
en Nanociencia de Aragón
Universidad Zaragoza

Dña ANA CLARO, Investigadora Marie Curie en el Instituto de Nanociencia de Aragón,
Universidad de Zaragoza

INFORMA:

Que JAVIER LOU FRANCO ha realizado en el Instituto de Nanociencia de Aragón bajo su dirección el Trabajo de Fin de Grado descrito en la presente memoria, que lleva por título "Uso de la nanotecnología para descubrir materiales del Patrimonio Cultural" y que el trabajo realizado cumple los objetivos recogidos en las Directrices TFG en Biotecnología.

Zaragoza, a 22 de Junio de 2015

Firmado:

Directores

Ana Claro y Jesús Martínez de la Fuente

Índice

1.	RESUMEN	1
2.	INTRODUCCIÓN	2
2.1	Aspectos básicos	2
2.1.1	Nanotecnología	2
2.1.2	Biosensores	3
2.1.3	Aplicación de los biosensores en obras de arte	4
2.2	Antecedentes	5
3.	OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO	6
4.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	7
4.1	Material biológico	7
4.2	Técnicas	8
4.2.1	SDS-PAGE.....	8
4.2.2	Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).....	8
4.2.3	Espectroscopia ultravioleta-visible	8
4.2.4	ELISA	9
4.2.5	Láser	9
4.3	Métodos	9
4.3.1	Síntesis de Nanonachos.....	9
4.3.2	Funcionalización de Nanonachos.....	10
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	12
5.1	Caracterización de anticuerpos.....	12
5.2	Síntesis de NNs	14
5.3	Caracterización de NNs	15
5.4	Funcionalización de NNs	17
5.5	Optimización del biosensor	17
5.5.1	Selección de la solución de bloqueo	17
5.5.2	Biosensor enzimático	20
5.5.3	Biosensor plasmónico	22
6.	CONCLUSIONES	23
7.	BIBLIOGRAFÍA	24
8.	ANEXOS	

1. RESUMEN

La ovoalbúmina y el colágeno son proteínas que históricamente han estado muy presentes en los aglutinantes utilizados en las pinturas. Detectar su presencia es fundamental para poder realizar una conservación adecuada de las obras de arte, aunque para ello hay que lidiar con la degradación a la que se ven sometidas durante el paso del tiempo y con el pequeño tamaño muestral de que se dispone. En este estudio se han sentado las bases del desarrollo de un nanobiosensor capaz de detectar dichas proteínas específicamente en muestras con muy poca concentración de proteína. Para ello se ha combinado la especificidad de los anticuerpos como elementos de detección, con la capacidad de las nanopartículas de oro de actuar como elementos de transducción de señal. Los resultados obtenidos han permitido optimizar el diseño del biosensor mencionado, paso necesario para conseguir un análisis de muestras reales eficaz.

Both ovalbumin and collagen are historical proteins present in paint binders. In order to properly preserve our Cultural Heritage, it is essential to detect the presence and identify these proteins. Nevertheless, one must deal not only with the degradation caused by the nature of the materials and time, but also with the small sample size available. This study has been developed to find a nanobiosensor able to specifically detect these proteins, even when the protein concentration is minimal. For that purpose, the specificity of antibodies as detection elements has been combined with the capacity of gold nanoparticles to act as signal transduction elements. The results obtained allowed to optimize the biosensor design, step necessary to achieve an effective analysis of real samples.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Aspectos básicos

2.1.1 Nanotecnología

La nanotecnología surge en 1959, cuando se consideró por primera vez la posibilidad de crear productos a escala nanométrica. Este origen se atribuye al Profesor Mr. R. Feynman, que planteó este proceso tecnológico en la conferencia “There is a lot of space down there” (Feynman, 1960). Sin embargo, es en 1974 cuando nace el término “nanotecnología”, definido por la *National Nanotechnology Initiative* como “una ciencia interdisciplinaria que se encarga de la manipulación de materia con, al menos una de sus dimensiones, en el rango de 1 a 100 nm”.

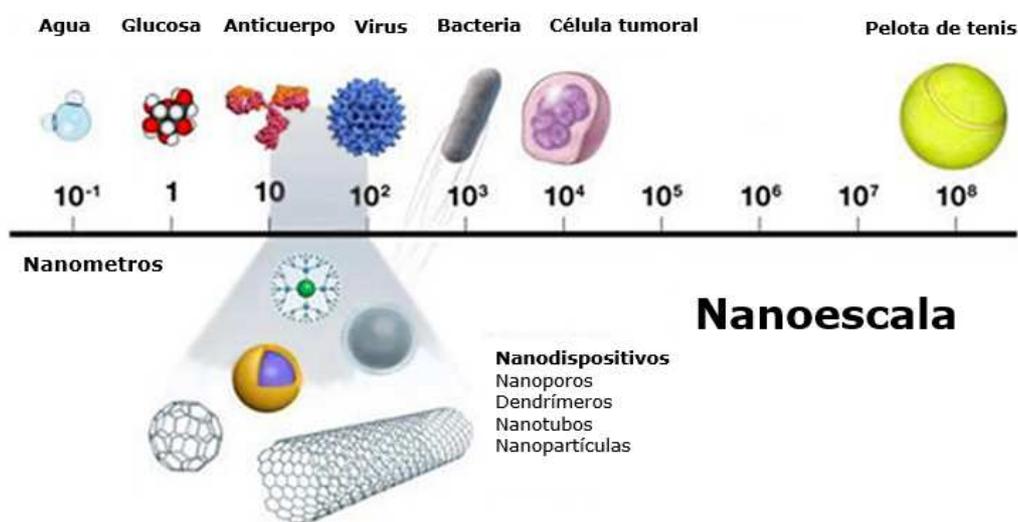


Figura 1. Situación comparativa de los nanomateriales en la escala métrica. Adaptado de (McNeil, 2005).

La *Environmental Protection Agency* (EPA) de EUA ha clasificado los nanomateriales actuales en cuatro tipos, a saber:

- Basados en carbono
- Basados en metales
- Dendrímeros
- Compuestos

Nosotros nos vamos a centrar en los nanomateriales basados en metales, más concretamente en las nanopartículas de oro (Au NPs). Estas presentan unas propiedades ópticas, térmicas y eléctricas muy interesantes, que unidas a la posibilidad de modificar su superficie químicamente para la unión a diversas biomoléculas (Daniel, 2004), las convierten en herramientas muy útiles en sistemas de biodetección.

Una de las propiedades más utilizadas de las nanoestructuras metálicas es el efecto de resonancia del plasmón de superficie localizado (LSPR). Esta propiedad óptica se aprecia en partículas metálicas de tamaño nanométrico, y confiere a las mismas un comportamiento completamente diferente del metal a nivel macroscópico. El plasmón de resonancia superficial corresponde a una interacción entre la materia y el campo electromagnético de la luz, tal como se muestra en la siguiente imagen.

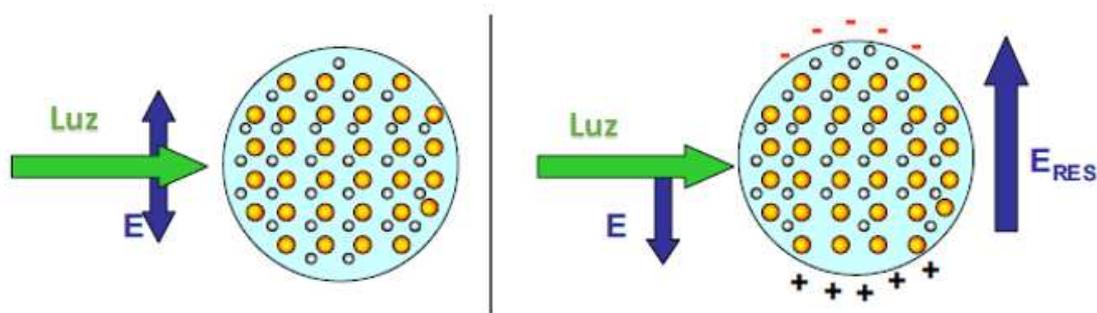


Figura 2. Esquema de la interacción de la luz con una NP metálica. Adaptado de (García, 2012).

Una NP metálica puede describirse como un entramado de núcleos iónicos con electrones de conducción que se mueven libremente dentro de la partícula. Cuando se ilumina la partícula, el campo electromagnético de la luz (E) crea una fuerza sobre estos electrones de conducción “empujándolos” hacia la superficie de la NP. Esta acumulación de carga en una zona de la NP crea un dipolo eléctrico, que genera un campo eléctrico dentro de la NP opuesto al de la luz y que forzará a los electrones a volver a su posición de equilibrio. Así, al suprimir el campo electromagnético, los electrones oscilarán con una determinada frecuencia, conocida como frecuencia plasmónica (García, 2012).

De esta forma, si se aplica una fuerza externa con una frecuencia igual a la plasmónica, se facilitará la oscilación de los electrones de la NP con una mayor amplitud. Esta oscilación electrónica implica un aumento de energía cinética y electrostática, lo que se traduce en una absorción de energía máxima por la NP (Haes, 2004). Parte de esta energía absorbida se disipará en forma de calor, por lo que podremos utilizar esta propiedad de las NPs metálicas para detectar la presencia de NPs midiendo el calor liberado.

2.1.2 Biosensores

Los biosensores representan una herramienta analítica prometedora. La IUPAC lo define como “un dispositivo que usa reacciones bioquímicas específicas mediadas por enzimas aisladas, inmunosistemas, tejidos, orgánulos o células enteras para detectar compuestos químicos generalmente por señales eléctricas, térmicas u ópticas”.

Esta herramienta data de 1962, cuando Leland Clark, considerado padre de los biosensores, inventó un dispositivo que permitía determinar rápidamente la cantidad de glucosa en sangre (Bergveld, 1996).

Las principales características que hacen de los biosensores herramientas tan útiles son su sensibilidad, selectividad, límite de detección, tiempo de respuesta, precisión y rango lineal de medida (Higgins, 1989).

Los biosensores constan de un elemento de reconocimiento o biorreceptor y un transductor. El biorreceptor se encarga de interactuar específicamente con el analito en cuestión y la resultante reacción bioquímica se transforma mediante el transductor en una señal medible (Monošík, 2012).

Existe una gran diversidad de biosensores en función del tipo de biorreceptor (enzimas, anticuerpos, ácidos nucleicos, células completas) y transductor (electroquímico, eléctrico, óptico, piezoeléctrico, térmico) elegidos. Este trabajo se centra en los inmunosensores, que se basan en la especificidad de unión que presentan los antígenos y anticuerpos para identificar y medir determinadas sustancias. Debido a la dificultad que presenta la medida de la interacción antígeno-anticuerpo, se realizan medidas indirectas en las que o bien el antígeno o bien el anticuerpo está marcado para facilitar la detección.

Gracias a las propiedades ópticas, térmicas y eléctricas únicas de las NPs, se pueden marcar NPs con biomoléculas de forma que retengan su actividad biológica. Así, se podrán utilizar dichas propiedades para detectar las NPs y poder determinar de esta forma la concentración de analito (Ambrosi, 2007).

2.1.3 Aplicación de los biosensores en obras de arte

Las obras de arte, en concreto en el campo de la pintura, escultura e iluminura, se basan en un soporte sobre el que se superponen capas de pintura de diferentes espesores (10-100 μm), compuestas por mezclas de materiales orgánicos e inorgánicos (Sciutto, 2014).

Las pinturas utilizadas están compuestas por dos componentes básicos: pigmentos y aglutinantes. El componente que percibimos como color es el pigmento y típicamente consiste en un polvo fino de material inorgánico obtenido a partir de minerales o materiales sintetizados. Los aglutinantes componen la fracción orgánica. El pigmento queda dispersado en el aglutinante, de forma que los gránulos de polvo quedan unidos entre sí y a la superficie a la que se aplica la pintura (Tokarski, 2006).

La caracterización de aglutinantes utilizados en muestras de pinturas es crucial para conseguir una buena conservación de las obras de arte. Entre los aglutinantes más utilizados a lo largo de la historia encontramos aceites, proteínas, resinas, polisacáridos..., sin embargo son las proteínas las que han jugado un papel más relevante (Fremout, 2010).

Estos aglutinantes tradicionalmente estaban compuestos por huevo, leche, caseína, gomas de pegar y aceites, usados por separado o formando mezclas complejas, por lo que su caracterización química resulta complicada. Además, debido a que dichos compuestos han estado expuestos durante décadas o incluso siglos a la luz, oxígeno y humedad, se han ido degradando y su composición química original se ha podido ver alterada (Van Der Werf, 2012). Todo esto añadido a la dificultad intrínseca que supone el pequeño tamaño muestral de que se dispone, donde solo un 10% corresponde a la fracción orgánica, hacen de la identificación de aglutinantes una ardua tarea.

Este trabajo se centra en la detección de dos proteínas: la ovoalbúmina (OVA), por ser la proteína más abundante en la clara del huevo, y el colágeno, por ser el componente proteico más abundante de piel y huesos de mamíferos.

- **Ovoalbúmina:** posee 385 aminoácidos y una masa molecular de 43 kDa. Pertenece a la superfamilia proteínica de las serpinas, pese a que no presenta la propiedad serín-proteasa inhibidora que las caracteriza.
- **Colágeno:** es una proteína fibrosa y se distinguen varios tipos (al menos 21). Su estructura secundaria consiste en cadenas α (hélices levógiras), que se agrupan de tres en tres para formar una triple hélice dextrógira como estructura terciaria. Cada una de las cadenas que conforman el colágeno tiene una masa molecular de alrededor de 130 kDa.

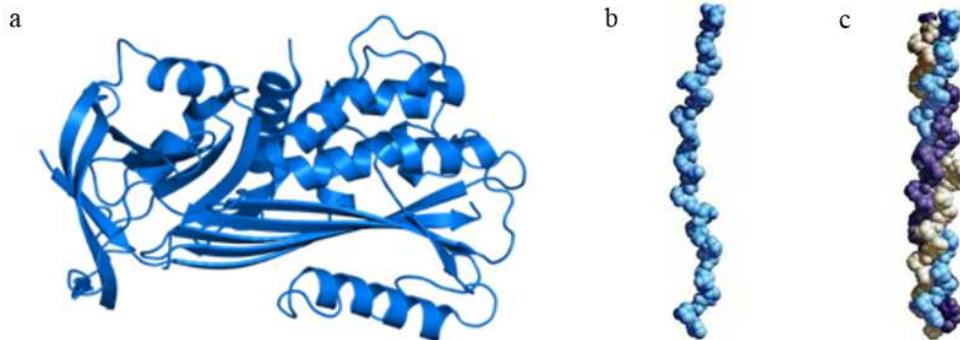


Figura 3. a. Estructura de la OVA (Yamasaki, 2002). b. Estructura tridimensional de una cadena α del colágeno. c. Triple hélice de colágeno (Nelson, 2005).

2.2 Antecedentes

La mayoría de los trabajos publicados que se centran en la detección de proteínas en obras de arte consta de tres fases distinguidas: extracción de la fase proteica a partir de la muestra, hidrólisis enzimática y análisis de la composición peptídica (Tokarski, 2006). Estos métodos se basan en técnicas acopladas a espectrometría de masas.

Gran parte de los métodos cromatográficos empleados consisten en una hidrólisis completa de la muestra proteica en sus aminoácidos, seguida de una derivatización y separación/detección mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) o HPLC acoplada a un detector fluorescente (HPLC-FD) (Fremout, 2010). El inconveniente principal de este tipo de técnicas es su carácter destructivo, la cantidad de muestra requerida y la imposibilidad de ser desarrolladas por personas no especializadas. Además, los límites de detección para aminoácidos usando estas técnicas se sitúan en un rango nanomolar (Callejón, 2008).

Otra de las herramientas que ha sido ampliamente utilizada es la espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR). Esta técnica permite detectar tanto los componentes inorgánicos de la pintura como los orgánicos y presenta la ventaja de ser una técnica no destructiva. Sin embargo, pese a que puede detectar materia proteica no es capaz de identificar proteínas y, en el caso de tratar con muestras complejas, la detección resulta complicada (Sciutto, 2014).

Los múltiples inconvenientes de estas técnicas dan pie a la necesidad de desarrollar otras más sensibles y eficaces.

3. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO

Con este trabajo se pretende diseñar un nanobiosensor térmico que permita detectar de forma rápida, sencilla y eficaz la presencia de un determinado antígeno para poder identificar el tipo de aglutinante que hay en una muestra de pintura. Los antígenos en los que se centra este trabajo son ovoalbúmina y colágeno, tal y como se indica en el apartado “2.1.3 Aplicación de los biosensores en obras de arte”. Como objetivo ulterior se persigue el diseño de un nanokit de detección que se pueda comercializar.

Para conseguir el objetivo mencionado, se ha planteado la estructura del biosensor, que se esquematiza a continuación:

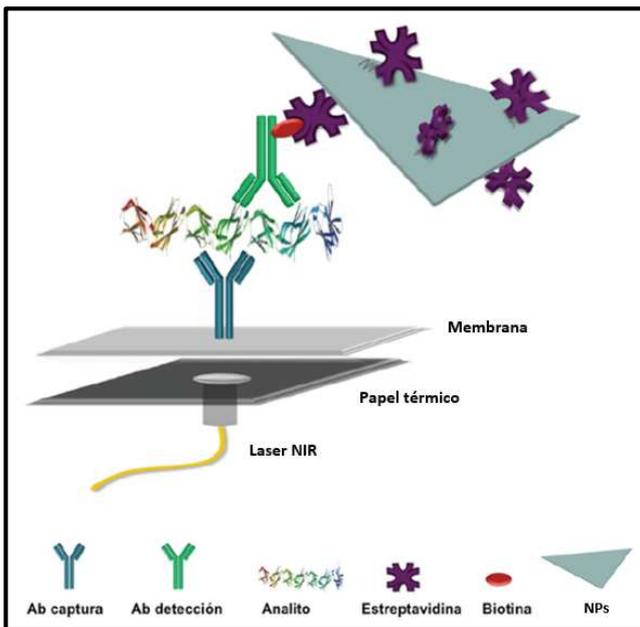


Figura 4. Diseño del nanobiosensor que se pretende desarrollar. Adaptado de (Polo, 2013).

Se ha elegido un diseño en sándwich para el biosensor. De esta forma, sobre una membrana de ésteres de celulosa se fija el anticuerpo de captura. Posteriormente se añade la muestra a analizar, que en el caso de contener el antígeno específico del anticuerpo fijado, quedará retenido. Dicho antígeno podrá ser reconocido por un anticuerpo de detección ligado a biotina, de manera que cuando añadamos las NPs funcionalizadas con estreptavidina, la interacción biotina-estreptavidina mantendrá las NPs sobre la superficie.

Como anticuerpo de captura se usan anticuerpos monoclonales para garantizar la especificidad de reconocimiento y evitar reacciones cruzadas, mientras que los anticuerpos de detección utilizados van a ser policlonales. Por otro lado, las NPs elegidas para desarrollar este biosensor son los nanotriángulos de oro, comúnmente llamados nanonachos (NNs).

Siguiendo este esquema, si tenemos el antígeno que buscamos en la muestra, se ensamblarán todas las piezas y los NNs quedarán retenidos. A continuación se coloca una hoja de papel térmico sobre la superficie en la que han quedado fijados los NNs, se irradia con láser y, en caso de que tengamos NNs, estos absorberán parte de la energía lumínica y se disipará en forma de calor, de manera que podremos detectar la presencia del antígeno visualmente en el papel térmico.

Este método de detección presenta la ventaja de tener una sensibilidad muy superior a los métodos actuales (Polo, 2013), lo que permitiría su aplicación en condiciones en las que el tamaño muestral es mínimo (como en el análisis de obras de arte, donde solo se dispone de 25 ng de muestra).

No obstante, para conseguir un biosensor eficaz, la optimización previa se realiza siguiendo dos modelos más sencillos: el primero enzimático y el segundo plasmónico.

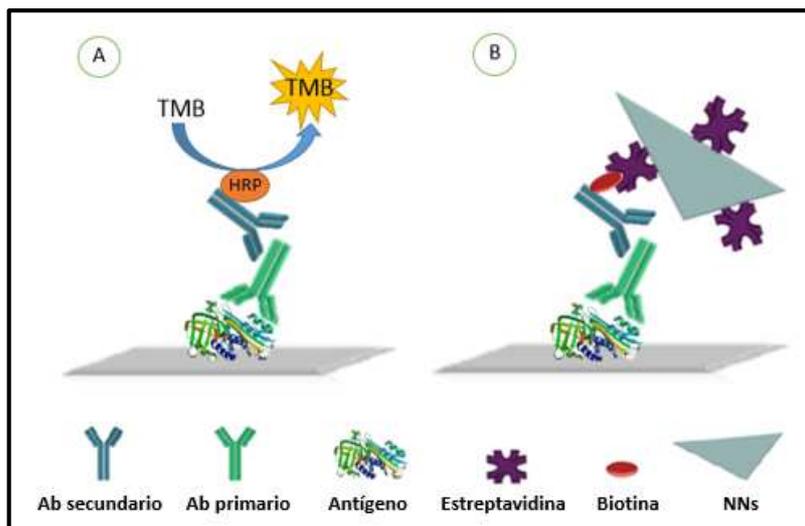


Figura 5. La imagen A corresponde al ensayo enzimático que permite una detección colorimétrica, gracias a la oxidación del TMB por acción de la peroxidasa (HRP). Por otro lado, la imagen B representa el modelo utilizado para el ensayo plasmónico. Adaptado de (Polo, 2013).

Estos dos modelos que se plantean en la imagen anterior son una simplificación del modelo deseado para el biosensor final, que van a permitir desarrollar una optimización de las relaciones antígeno/anticuerpo adecuadas.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Material biológico

Los anticuerpos y antígenos utilizados a lo largo del trabajo son los que se muestran a continuación:

Anticuerpo	Tipo	Producido en	Casa comercial
Anti-ovoalbúmina	Monoclonal	Ratón	Sigma-Aldrich®
Anti-ovoalbúmina	Policlonal	Conejo	Abcam®
Anti-colágeno (tipo I)	Monoclonal	Ratón	GeneTex
Anti-colágeno (tipo I) con biotina	Policlonal	Conejo	GeneTex
Anti-IgG de ratón con peroxidasa	Fc específico	Cabra	Sigma-Aldrich®
Anti-IgG de conejo con biotina	Policlonal	Cabra	Abcam®

Antígeno	Casa comercial
Ovoalbúmina	Sigma-Aldrich®
Albúmina	Zecchi
Colágeno tipo I (cola de rata)	BD Biosciences
Colágeno tipo II	Sigma-Aldrich®

4.2 Técnicas

4.2.1 SDS-PAGE

La electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) es una técnica que permite separar y caracterizar las proteínas. Los geles de poliacrilamida (Mini-PROTEAN® TGX™, BIO-RAD) retrasan el desplazamiento de las proteínas sometidas a un campo eléctrico en una forma aproximadamente proporcional a su cociente carga/masa. Este desplazamiento también puede verse afectado por la forma de la proteína. Al tratarse de una electroforesis desnaturizante, el SDS se une a las proteínas en una cantidad aproximadamente proporcional a la masa de la proteína. El SDS ligado incorpora una gran carga neta negativa, lo que hace que la carga intrínseca de la proteína sea insignificante y confiere a todas las proteínas un cociente carga/masa y una forma similar. Por lo tanto, las proteínas se separan casi exclusivamente en función de la masa molecular, siendo las de menor masa las que más migren en el gel (Nelson, 2005). La separación se lleva a cabo aplicando un campo eléctrico de 130 V y ajustando la intensidad de corriente a 40 mA mediante un equipo de electroforesis (PowerPac™ HC Power Supply, Bio-rad). Para poder visualizar las bandas obtenidas se realiza una tinción de plata y se comparan con un marcador de pesos moleculares (ProSieve® Color Protein Markers, Lonza).

De esta forma se pueden caracterizar los anticuerpos que se van a utilizar y comprobar su pureza.

4.2.2 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Esta técnica de microscopía avanzada utiliza electrones en lugar de luz para formar una imagen. El equipo (Quanta FEG-250 SEM) cuenta con un dispositivo que genera un haz de electrones para iluminar la muestra y con diferentes detectores se recogen después los electrones que han interactuado con la superficie de la muestra para crear una imagen que refleje las características superficiales de la muestra.

De esta forma se puede obtener información de la forma, textura y composición química de nanopartículas, distinguir diferentes tipos de NPs o realizar medidas de las NPs sintetizadas.

4.2.3 Espectroscopia ultravioleta-visible

La espectroscopia UV-Vis es una técnica que utiliza radiación electromagnética de las regiones visible, ultravioleta cercana e infrarroja cercana del espectro electromagnético, mediante un equipo (Varian Cary® 50 UV-Vis Spectrophotometer) para cuantificar las transiciones electrónicas de las moléculas que absorben radiación.

Esta técnica es útil para conocer la pureza de una muestra de NPs, ya que cada tipo de NPs tiene un espectro de absorción característico. Además, con los valores de absorbancia a longitudes de onda específicas, es posible cuantificar una muestra de NPs.

4.2.4 ELISA

El ensayo de inmunosorbente ligado a enzima (ELISA) permite detectar un antígeno o anticuerpo concreto. La detección se basa en un anticuerpo conjugado con una enzima que reacciona con un sustrato incoloro para generar un producto con reacción de color. Este sustrato se denomina sustrato cromógeno. En este caso la enzima utilizada es la peroxidasa de rábano (HRP) y el sustrato cromógeno el 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB). Finalmente se puede medir el color generado espectrofotométricamente mediante un lector de placas ELISA (Thermo Scientific™ Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer).

Existen múltiples variantes de ELISA (indirecto, en sándwich, competitivo) que hacen que sea una técnica muy versátil (Kindt, 2007).

4.2.5 Láser

Los equipos láser permiten irradiar una muestra con un haz de luz a una longitud de onda determinada. El sistema cuenta con un láser cuántico (Laser Quantum), una fuente de energía modulable (Mpc 6000) y una serie de espejos que reflejan el haz de luz.

En este caso se van a irradiar las membranas que contienen NNs con un haz de luz a 1064 nm, de manera que los NNs presentes puedan absorber energía lumínica y disiparla en forma de calor sobre el papel térmico.

4.3 Métodos

4.3.1 Síntesis de Nanonachos

El objetivo de esta síntesis es obtener NNs con una LSPR a 1050 nm. Este proceso consta de cuatro fases (Pelaz, 2012):

- 1. Reducción de oro.** Se parte de un stock de ácido cloroáurico (HAuCl_4) 2 mM que se reduce mediante tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 0,5 mM. En este proceso el Au^{3+} se reduce a Au^0 , que posteriormente agrega formando NNs y nanoesferas (NSs). Para conseguir que la forma de las NPs sea la deseada y presenten la banda LSPR a 1050 nm, durante el proceso de reducción hay que añadir una pequeña cantidad de yoduro potásico (KI), que favorece la síntesis de NPs con formas anisótropas.
- 2. Cuantificación y caracterización de NNs.** Para comprobar que la síntesis ha ido bien, se realiza un espectro de absorción en el UV-Vis y se observan al microscopio (SEM).
- 3. Estabilización de NNs.** La estabilización de los NNs se realiza añadiendo polietilenglicol (PEG), un poliéter bifuncional con un grupo tiol en un extremo y un grupo carboxilo en el otro (HS-PEG-COOH). El grupo tiol se unirá covalentemente a los átomos de oro de las NPs, mientras que en el otro extremo quedarán los grupos carboxilo dispuestos para ser activados cuándo y cómo se requiera. Para que esta reacción tenga lugar es necesaria la adición de borohidruro de sodio (NaBH_4), de forma que se reduzcan los enlaces disulfuro que se puedan formar entre las moléculas de PEG y se permita que reaccionen con el oro de la superficie de las NPs. Por otro lado, para favorecer la unión de las moléculas de PEG a las NPs se sube el pH de la mezcla resultante a 12 y se deja sonicando una hora a 60°C.

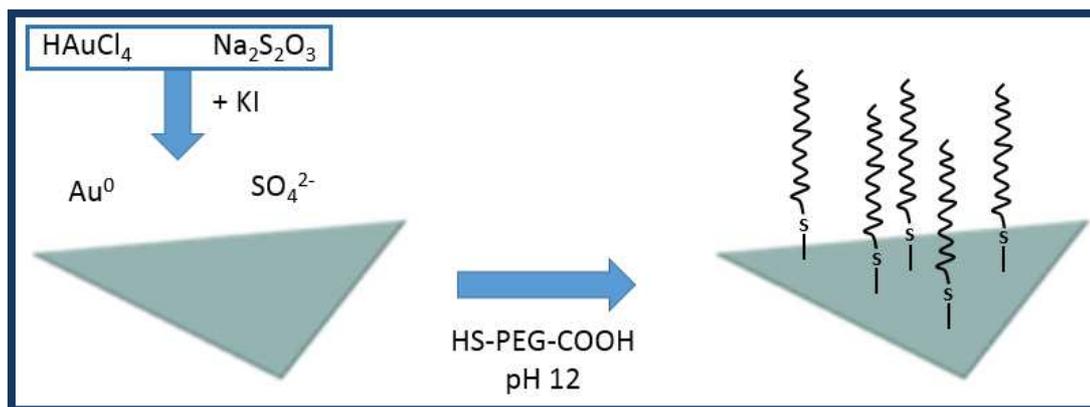


Figura 6. Esquema de la síntesis y estabilización de NNs. Adaptado de (Pelaz, 2012).

- 4. Concentración de NNs.** Para concluir la síntesis es necesario realizar una serie de lavados para concentrar los NNs y eliminar las impurezas (NSs, principalmente). Esto se hace centrifugando la disolución en la que tenemos los NNs y eliminando el sobrenadante, que es donde estarán básicamente las NSs. El pellet, en el que tendremos los NNs sedimentados, se resuspende en agua Milli-Q.

4.3.2 Funcionalización de Nanonachos

La funcionalización consiste en modificar la superficie de la NP con grupos funcionales. Para desarrollar nuestro biosensor, tenemos que funcionalizar los NNs de oro con estreptavidina (Sigma-Aldrich®), una proteína que presenta gran afinidad por la biotina. Este proceso requiere una serie de pasos (Polo, 2013).

- 1. Activación:** los NNs sintetizados han sido estabilizados con PEG. Como ya se ha comentado, este polímero presenta un grupo carboxilo en un extremo, que puede ser activado para que reaccione con los grupos amino de la estreptavidina y así formar un enlace amida. Los compuestos activadores utilizados son carbodiimida (EDC) y sulfo-N-hidroxisuccinimida (S-NHS). Primero se formará un éster activado por EDC en la superficie de los NNs (recuadro azul en Fig. 7) y, a continuación, se obtendrá el éster succinimidil (recuadro verde en Fig. 7). Este intermedio de reacción presenta carga negativa, lo cual mantiene las repulsiones electrostáticas entre los NNs e impide la agregación de estos.

La relación óptima de cantidades (Polo, 2013) es la siguiente:



Todo ello debe ir disuelto en tampón MES 10 mM pH6. La disolución resultante se incuba a 37 °C para favorecer la activación.

Finalmente la muestra debe ser centrifugada para eliminar el sobrenadante, donde habrán quedado todas las moléculas activadoras que no hayan reaccionado.

- 2. Funcionalización:** tras activar los grupos carboxilo de las moléculas de PEG que recubren los NNs, se deja que reaccionen con estreptavidina. La relación óptima de cantidades es 5 µg de estreptavidina por cada 0,5 mg de NNs (Polo, 2013). Esta reacción se disuelve de nuevo en tampón MES 10 mM pH6. A este pH se consigue que las moléculas de estreptavidina tengan carga positiva (ya que su pI es 6,4), por lo que interaccionan electrostáticamente con los grupos carboxilo activados de los NNs. No es conveniente usar

un pH más bajo porque podría afectar a la integridad de la proteína. Para favorecer la formación de los enlaces amida se deja incubando la disolución a 37 °C.

- Bloqueo:** para inactivar los grupos carboxilo del PEG que no hayan reaccionado con la estreptavidina, se utiliza un reactivo bloqueante también bifuncional, H₂N-PEG-OMe. Este polímero tiene un grupo amino en un extremo que se unirá a los grupos carboxilo libres, mientras que en el otro extremo tiene un grupo metoxilo no reactivo. Dicho agente bloqueante se disuelve en bicarbonato 10 mM a pH 8 y se incuba 2 horas a 37 °C. Este cambio de pH provoca que la estreptavidina adquiera carga negativa y de esta forma las moléculas que no han llegado a formar enlace covalente con los NNs, se separarán de los mismos por repulsión electrostática. De esta forma facilitaremos los lavados posteriores, ya que al centrifugar quedarán en el pellet los NNs con estreptavidina unida covalentemente, mientras que aquellas moléculas de estreptavidina que estuvieran interaccionando electrostáticamente quedarán en el sobrenadante y se podrán cuantificar.

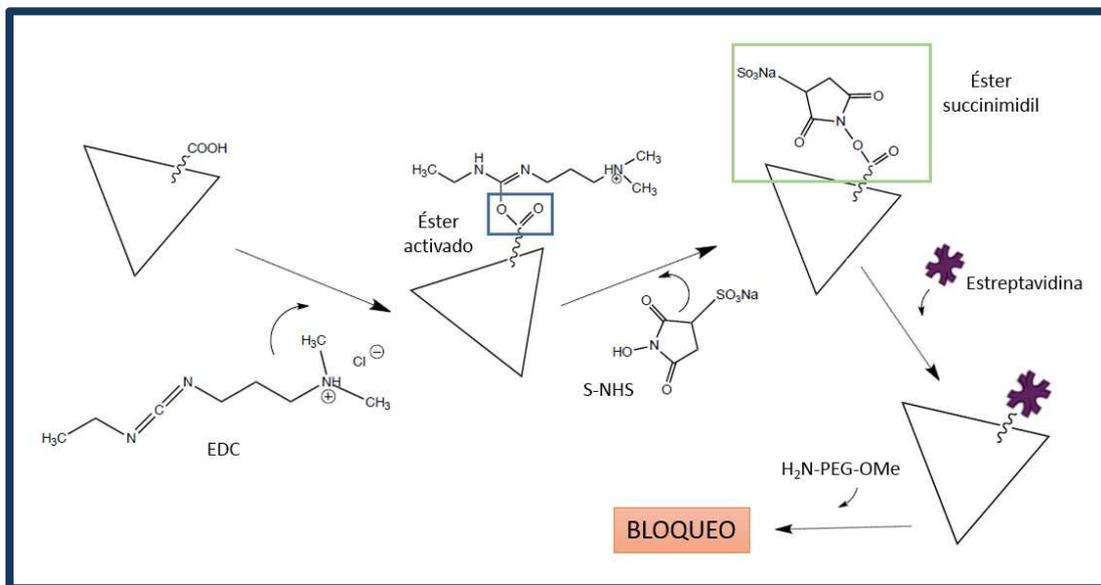


Figura 7. Esquema de la funcionalización de NNs con estreptavidina. Adaptado de (Polo, 2013).

4. Análisis de la eficiencia de funcionalización: método de Bradford.

Para determinar la cantidad de estreptavidina unida a los NNs se ha utilizado un método cuantitativo de detección de proteínas. Así, se diluye una alícuota del sobrenadante recogido tras la etapa de bloqueo con azul de Coomassie (relación 1:1). Este colorante interacciona con aminoácidos básicos (especialmente arginina) y aromáticos, lo que provoca un cambio en el máximo de absorción del colorante desde 465 a 595 nm (Bradford, 1976). Experimentalmente se mide el aumento de absorbancia a 595 nm en un lector de placas Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer (Thermo Scientific). Apoyándonos en una recta de calibrado podemos determinar la concentración de proteína no unida y, conociendo la cantidad de proteína que hemos usado en la funcionalización podemos conocer el porcentaje de proteína covalentemente unida a los NNs.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Caracterización de anticuerpos

El primer experimento que se hace es una caracterización de anticuerpos, con el objetivo de conocer su pureza. Para ello se realiza un SDS-PAGE con los anticuerpos que se usan a lo largo del trabajo.

En el primer gel se analizan los anticuerpos α -colágeno (con y sin biotina) y α -OVA monoclonal, mientras que en el segundo se analizan α -OVA policlonal y α -IgG de conejo con biotina. Tras realizar la tinción de plata de los geles se observan los siguientes resultados:

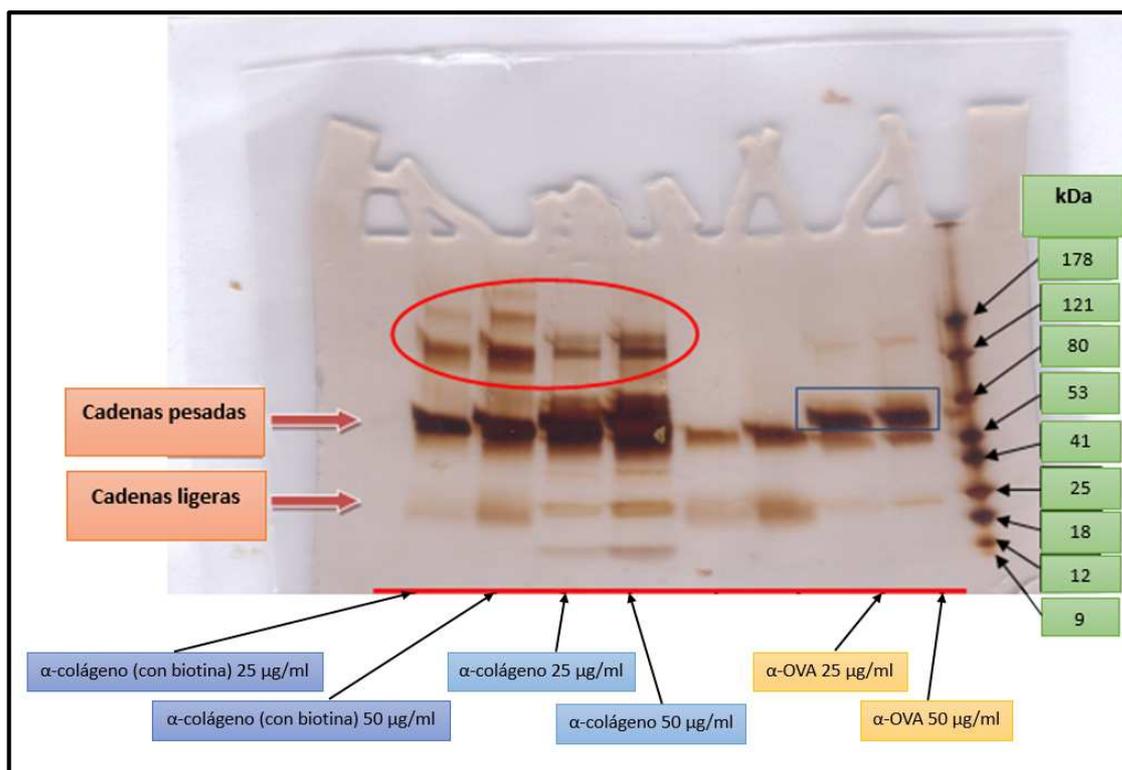


Figura 8. Gel de electroforesis tras hacer una tinción de plata.

En todos los casos se pueden ver dos bandas a 23 y 55 kDa, correspondientes a las cadenas ligeras y pesadas de los anticuerpos, respectivamente. Pero aparte de estas bandas, se ve alguna más.

- Las bandas que se encuentran rodeadas en rojo corresponden a los anticuerpos completos, sin desnaturizar, ya que se sitúan en torno a 155 kDa (dos cadenas ligeras de 23 kDa y dos cadenas pesadas de 55 kDa). Esto puede deberse a que el tampón de ruptura utilizado está algo deteriorado y no ha reducido por completo los puentes disulfuro que mantienen las cadenas del anticuerpo unido.
- En las muestras α -OVA se aprecian dos bandas (en el recuadro azul) justo encima de las bandas correspondientes a las cadenas pesadas, que pueden ser debidas a la presencia de albúmina de suero bovino (BSA), un agente estabilizante cuya masa molecular es 66,5 kDa. Esto indicaría que dichos anticuerpos no están del todo puros.

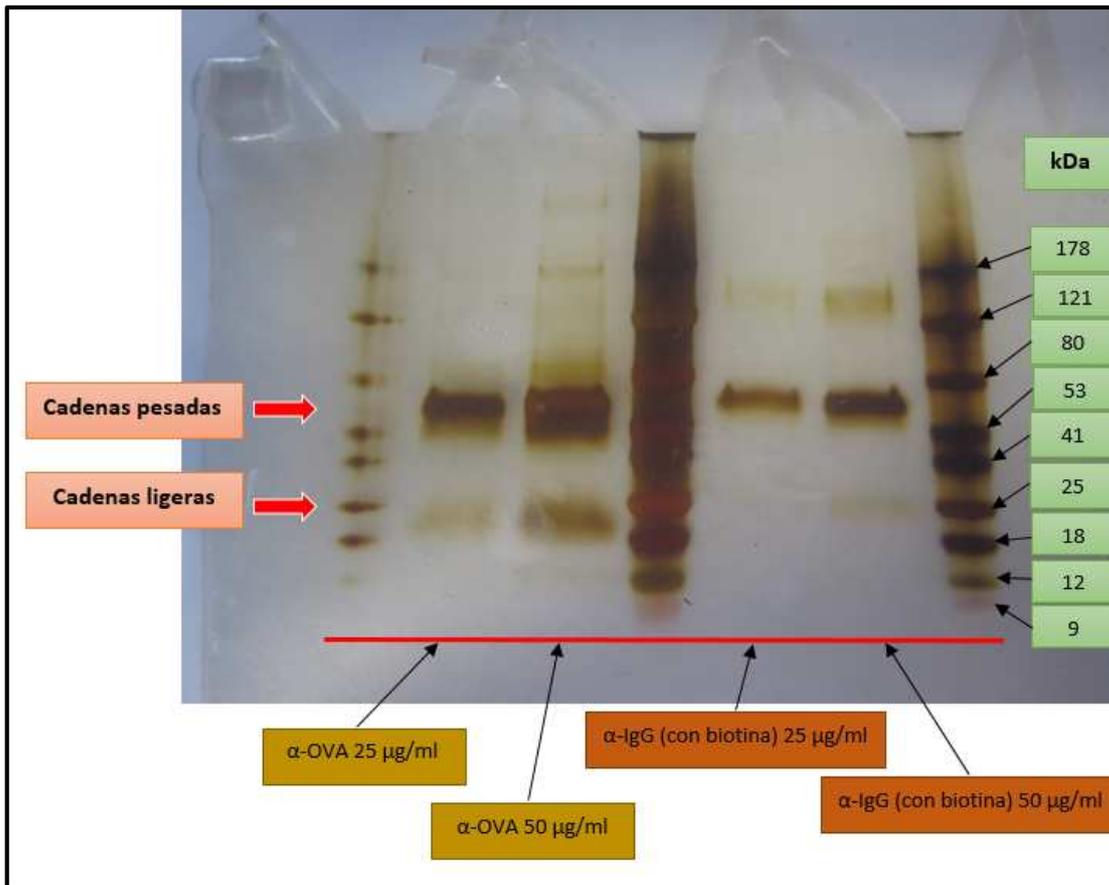


Figura 9. Gel de electroforesis tras hacer una tinción de plata.

En este gel se observa un patrón de bandas bastante similar al anterior:

- En todos los pocillos en los que se han cargado anticuerpos se ven dos bandas correspondientes a las cadenas pesadas y ligeras, a unos 55 y 23 kDa respectivamente. No obstante, en el carril que contiene α -IgG con biotina a 25 μ g/ml, todavía no se discierne la banda correspondiente a las cadenas ligeras. Esto es debido a que durante la tinción con plata, el paso crítico de revelado de las bandas se paró antes de que se pudiera detectar esta banda para evitar que otras, como la que se ve en el carril que tiene α -OVA 50 μ g/ml, se quemaran, lo cual hace difícil identificar bandas individuales. Por ello resulta de especial relevancia el carril que contiene α -IgG con biotina a 50 μ g/ml, en el que sí que se ve esta banda de las cadenas ligeras al estar el anticuerpo más concentrado.
- Por otro lado, igual que habíamos visto en el gel anterior, vuelven a aparecer las bandas a unos 155 kDa, relativas al anticuerpo completo.

5.2 Síntesis de NNs

Durante la síntesis de NNs es importante hacer un seguimiento del proceso para garantizar que estos adquieren la forma y tamaño adecuados. Sabiendo que el máximo de absorción de los NNs se encuentra a 1050-1100 nm, se puede determinar su presencia espectrofotométricamente. Para ello se analiza el espectro de absorción de una muestra de NNs diluida 1:4.

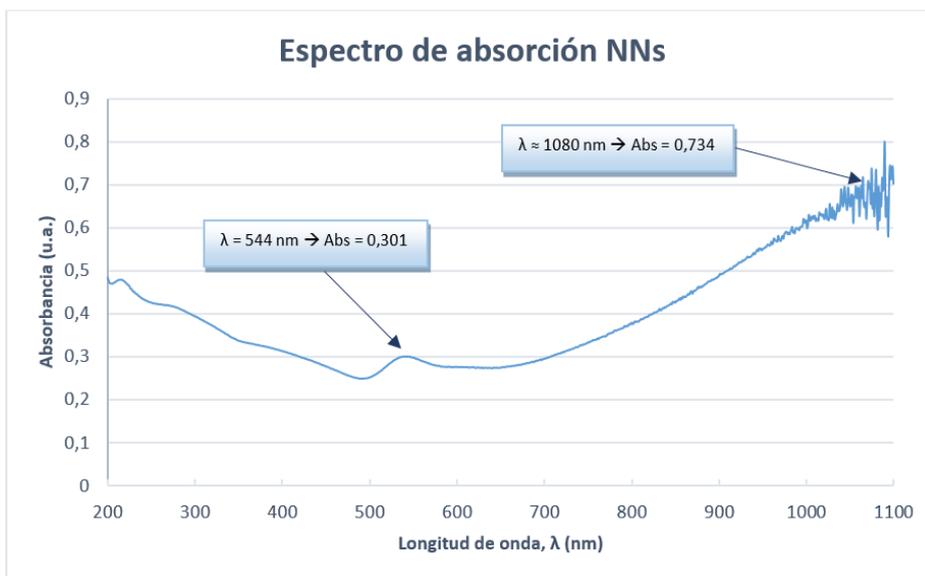


Figura 10. Espectro de absorción obtenido tras diluir una muestra de NNs en agua Milli-Q (dilución 1:4). Se aprecia un pico en torno a 1080 nm correspondiente a los NNs y otro a 544 nm que representa las NSs. La muestra todavía no ha pasado por la fase de lavado.

En base al espectro obtenido se puede apreciar que las NPs obtenidas de forma mayoritaria en la síntesis son los NNs. Se considera que la síntesis ha ido bien cuando al calcular el cociente entre la absorbancia generada por los NNs y aquella que dan las NSs se obtiene una razón de 2,2-2,5 (Pelaz, 2012).

Pico NNs $\rightarrow \lambda = 1080 \text{ nm} \rightarrow \text{Abs} = 0,734$

Pico NSs $\rightarrow \lambda = 544 \text{ nm} \rightarrow \text{Abs} = 0,301$

$$\left. \begin{array}{l} \text{Pico NNs} \rightarrow \lambda = 1080 \text{ nm} \rightarrow \text{Abs} = 0,734 \\ \text{Pico NSs} \rightarrow \lambda = 544 \text{ nm} \rightarrow \text{Abs} = 0,301 \end{array} \right\} \frac{\text{Abs}_{\text{NNs}}}{\text{Abs}_{\text{NSs}}} = 2,439$$

Además de comenzar con la caracterización, como se sabe que en estas condiciones de trabajo 1 Unidad de Absorbancia corresponde a 0,04 mg/ml de NNs (Pelaz, 2012), se puede cuantificar la muestra teniendo en cuenta el factor de dilución (x4).

$$0,734 \cdot 0,04 = 0,029 \text{ mg/ml de NNs (en cubeta)}$$

$$0,029 \cdot 4 = \mathbf{0,117 \text{ mg/ml de NNs}}$$

Tras realizar los lavados con los que concluye la fase de síntesis, se vuelve a tomar una muestra y se realiza otro espectro para analizar la eficacia de este paso.

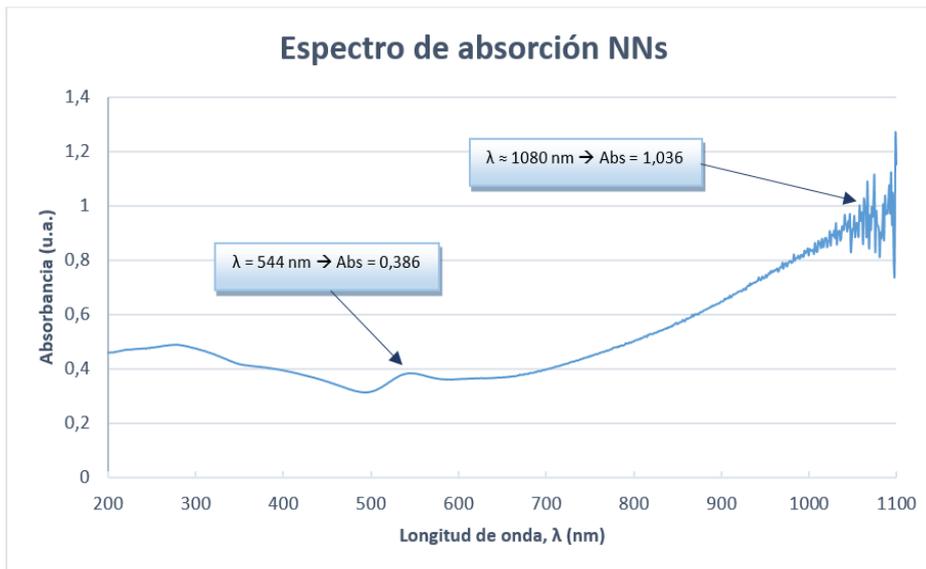


Figura 11. Espectro de absorción obtenido tras diluir una muestra de NNs en agua Milli-Q (dilución 1:40). Como en el espectro anterior, seguimos observando un pico correspondiente a los NNs y otro de las NSs.

Hay dos aspectos que se espera que hayan cambiado en esta situación con respecto de la anterior. Por un lado, la relación NNs/NSs debe haber aumentado, ya que uno de los objetivos de los lavados es reducir la proporción de impurezas. Por otro lado, la concentración de NNs debe ser mayor.

Calculando la relación entre las absorbancias de NNs y NSs ($Abs_{NNs}/Abs_{NSs}=2,684$) se observa que las etapas de lavado han disminuido la proporción de NSs.

En cuanto a la concentración de los NNs, se calcula igual que en el caso anterior, pero teniendo en cuenta que el factor de dilución en este caso es 40, ya que los NNs están mucho más concentrados. Este hecho se aprecia visualmente con un color oscuro mucho más intenso.

$$1,036 \cdot 0,04 = 0,041 \text{ mg/ml de NNs (en cubeta)}$$

$$0,041 \cdot 40 = \mathbf{1,657 \text{ mg/ml de NNs}}$$

Se observa que la disolución resultante tras los lavados está 14 veces más concentrada en NNs que la que se tenía anteriormente.

5.3 Caracterización de NNs

Tras sintetizar los NNs, se realiza una caracterización visual de los mismos al SEM.

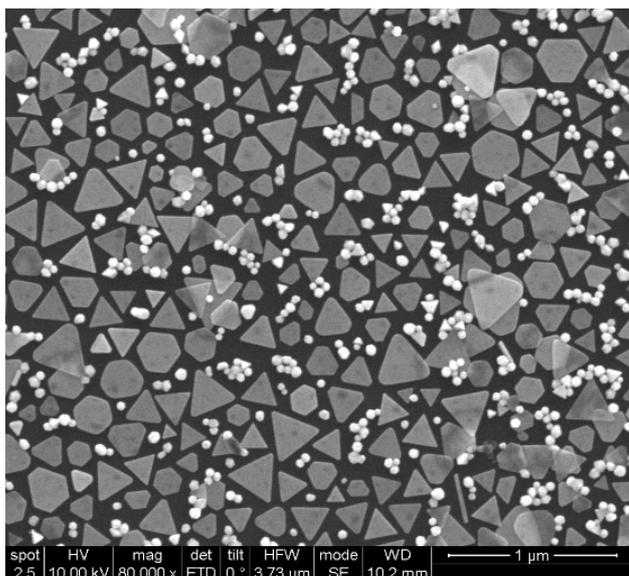


Figura 12. Muestra de NNs vista al SEM sobre una superficie de silicio.

Como se puede ver en la Figura 12, en la síntesis se han obtenido fundamentalmente NNs (de forma triangular), aunque siguen quedando NSs (pequeñas y de color blanco) pese a que se haya realizado la fase de lavado.

En cuanto al tamaño de los NNs obtenidos, es algo irregular, por lo que se utiliza el software “ImageJ” para realizar medidas de un número significativo de NNs. Así se obtiene el siguiente histograma de distribución de tamaños:

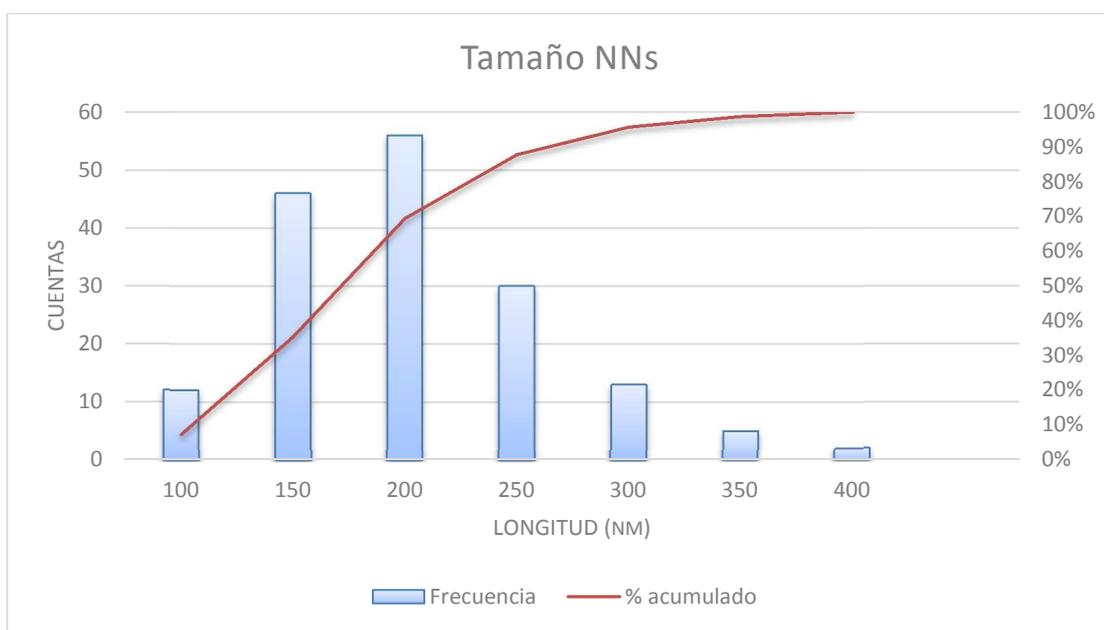


Figura 13. Histograma representativo de la longitud de los lados de los NNs. En el eje de abscisas se muestra el límite superior de cada intervalo, mientras que en las ordenadas aparecen la frecuencia obtenida y el porcentaje de acumulación.

De esta forma se puede comprobar que la mayor parte de NNs tienen lados de entre 100 y 200 nm, aproximadamente un 70% de los NNs sintetizados. Teniendo en cuenta que el tamaño de los NNs determina la frecuencia de resonancia plasmónica, es fundamental controlar el tamaño de los NNs en la síntesis.

5.4 Funcionalización de NNs

Para poder utilizar los NNs como elementos de transducción de la señal en nuestro biosensor, es necesario funcionalizarlos con estreptavidina, de forma que puedan reconocer un anticuerpo conjugado con biotina. El protocolo de funcionalización es el que se detalla en el apartado “Materiales y métodos”, pero para garantizar que los NNs han unido estreptavidina covalentemente se aplica el método de Bradford de detección de proteínas a los sobrenadantes (SN) obtenidos tras centrifugar las muestras. Para ello es necesario utilizar muestras blanco, que contienen agente bloqueante y tampón MES 10 mM, y muestras 100% de señal, que contienen la concentración total de estreptavidina añadida en la funcionalización (5 µg/ml). Los resultados obtenidos son los siguientes:

	Abs _{595nm} (u.a.)		Media	SD	M-B	% libre
Blanco	0,281	0,277	0,279	0,003	0	
100%	0,309	0,315	0,312	0,005	0,033	
SN NNs	0,292	0,302	0,297	0,007	0,018	55,79

Tabla 1. Medidas de absorbancia registradas por duplicado tras aplicar el método de Bradford. Los sobrenadantes (SN) analizados contienen agente bloqueante, tampón MES 10 mM y la proteína no unida a los NNs.

“SD”: desviación típica, “M-B”: Media – Blanco. Los valores de absorbancia, Media y M-B se miden en unidades de absorbancia (u.a.).

En la tabla anterior se aprecia que los niveles de absorbancia registrados en los SN de las muestras se encuentran entre los valores “Blanco” y los valores “100%”, lo cual era esperable ya que solo parte de la estreptavidina se une a los NNs. Además, al calcular la desviación típica se obtienen valores muy bajos, lo que quiere decir que la técnica es reproducible. Cuando se descuenta la absorbancia correspondiente al agente bloqueante y al tampón, se obtiene una señal 100% y un valor que se corresponde con la cantidad de proteína que teníamos en el SN de la muestra. Así, resulta que el 55,79% de la estreptavidina añadida no se ha unido a los NNs o, dicho de otra forma, solo el **44,21%** se ha unido covalentemente a los NNs. Este porcentaje de unión corresponde con el esperado, ya que durante la funcionalización se añade estreptavidina en exceso para optimizar el proceso, y no toda se une a los NNs.

5.5 Optimización del biosensor

Para conseguir que el kit de detección funcione, previamente hay que comprobar que los anticuerpos utilizados reconocen los antígenos para los que son específicos, que las soluciones de bloqueo funcionan, etc. Todo esto se comprueba mediante ensayos dot-blot.

5.5.1 Selección de la solución de bloqueo

Uno de los pasos cruciales en el diseño del biosensor es el bloqueo de la superficie del pocillo, para evitar que se unan moléculas inespecíficamente por adsorción. Inicialmente se parte de dos posibles soluciones de bloqueo, ambas disueltas en tampón PBS:

- BSA
- Leche en polvo

Siguiendo el protocolo comentado en el Anexo I (Tabla A1), se ensayó cada una de las soluciones de bloqueo con albúmina y con colágeno, ya que cada ensayo debe ser optimizado independientemente.

Ensayos con albúmina (OVA y albúmina Zecchi)

Se realizaron dos ensayos paralelamente, uno con OVA y otro con albúmina de la casa comercial *Zecchi*. En ambos casos se usó el mismo anticuerpo de reconocimiento, el anticuerpo monoclonal α -OVA producido en ratón. Se obtienen los siguientes resultados:

	Leche		BSA		Control	
Pocillo	Sin OVA	Con OVA	Sin OVA	Con OVA	Sin OVA	Con OVA
Abs_{450 nm} (u.a.)	0,084	3,721	0,087	3,701	3,919	3,757

Tabla 2. Medidas de absorbancia registradas por triplicado para cada situación. Se comparan dos agentes bloqueantes, leche en polvo y BSA (ambas disueltas en tampón PBS) con la situación control (añadiendo tampón PBS como solución de bloqueo).

A la vista de los resultados, ambas soluciones de bloqueo parecen funcionar de forma similar. Se observa que los valores detectados de TMB oxidado son muy bajos en las situaciones en las que no fijamos antígeno (OVA) al pocillo, independientemente de que se haya bloqueado con leche o con PBS. Esto nos indica que las soluciones de bloqueo están funcionando, ya que apenas hay anticuerpos adsorbidos que permitan oxidar el TMB en dichas situaciones.

Cuando se fija antígeno al pocillo, los valores de absorbancia detectados a 450 nm son bastante más altos, como cabría esperar, ya que al haber antígeno, se va a poder unir el anticuerpo monoclonal α -OVA, a cuya región constante se unirá el anticuerpo secundario conjugado con HRP. Esta enzima es la que favorece la oxidación del TMB añadido posteriormente, lo cual se traduce en una mayor señal.

Por otro lado, en la situación control se observan valores muy elevados de señal independientemente de que se fije antígeno o no. Esto pone patente la necesidad de usar una solución de bloqueo para evitar la adsorción inespecífica en el pocillo.

A continuación se realizó un ensayo similar, pero fijando albúmina *Zecchi* en vez de OVA. Los resultados fueron los siguientes:

	Leche		BSA		Control	
Pocillo	Sin alb.	Con alb.	Sin alb.	Con alb.	Sin alb.	Con alb.
Abs_{450 nm} (u.a.)	0,072	0,471	0,068	0,967	3,513	3,659

Tabla 3. Medidas de absorbancia registradas por triplicado para cada situación. Se comparan dos agentes bloqueantes, leche en polvo y BSA (ambas disueltas en tampón PBS) con la situación control (añadiendo tampón PBS como solución de bloqueo).

En este segundo caso se está utilizando un tipo de albúmina completamente diferente al anterior. La primera conclusión que se puede sacar al ver diferencias notables entre las muestras con albúmina fijada y las que no tienen, es que nuestro anticuerpo reconoce diferentes tipos de albúmina, lo cual es bueno para esta investigación, ya que el objetivo final es diseñar un biosensor que sea útil e invariable para detectar diversos tipos de albúmina presente en una muestra, independientemente de su origen. Es decir, se pretende que el biosensor sea capaz de identificar de forma diferenciada si en una muestra tenemos albúmina, colágeno u otra proteína utilizada en los aglutinantes.

Así, las muestras en las que no se ha fijado antígeno y se ha usado solución de bloqueo dan una señal de absorbancia mínima, similar a la que obteníamos en el ensayo anterior. Aquellas en las que se fija antígeno dan un valor superior, aunque no tan alto como el que se obtenía en el ensayo con OVA. Esto se debe a que el anticuerpo de reconocimiento utilizado no es específico para este antígeno.

Hasta ahora no se han encontrado diferencias significativas entre las dos soluciones de bloqueo en cuanto a su eficacia, pero ambas parecen funcionar. Por lo tanto planteamos un experimento basado en el método ELISA competitivo. La única modificación con respecto a los ensayos anteriores es que el anticuerpo monoclonal primario se incubará con antígeno antes de añadirlo al pocillo, de forma que no deberíamos detectar señal. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Albúmina				
	Leche		BSA	
Pocillo	Sin albúmina	Con albúmina	Sin albúmina	Con albúmina
Abs _{450 nm} (u.a.)	0,082	0,170	0,113	0,343

Tabla 4. Medidas de absorbancia registradas por triplicado para cada situación. Como antígeno se utiliza albúmina *Zecchi*.

A la vista de los resultados se pueden sacar dos conclusiones:

- Las muestras que tienen albúmina fijada dan valores más elevados que aquellas sin albúmina. Esto significa que el anticuerpo que se añade, o no está unido a antígeno en su totalidad, o bien compite por la unión a antígeno, de forma que parte de los complejos antígeno-anticuerpo añadidos se disociarían y los anticuerpos pasarían a unirse específicamente al antígeno fijado en el pocillo.
- La **leche en polvo** parece funcionar algo mejor que el BSA como solución de bloqueo para la detección de albúmina.

Ensayos con colágeno (colágeno tipo I y colágeno tipo II)

En cuanto al colágeno, se repite el mismo ensayo para elegir la solución de bloqueo idónea. Las dos soluciones de bloqueo candidatas vuelven a ser leche en polvo y BSA, ambas disueltas en tampón PBS. Como anticuerpo primario se usa α -colágeno específico para colágeno tipo I. Se obtienen los siguientes resultados:

Colágeno tipo I				
	Leche		BSA	
Pocillo	Sin colágeno	Con colágeno	Sin colágeno	Con colágeno
Abs _{450 nm} (u.a.)	0,163	0,834	0,080	0,838
Colágeno tipo II				
	Leche		BSA	
Pocillo	Sin colágeno	Con colágeno	Sin colágeno	Con colágeno
Abs _{450 nm} (u.a.)	0,158	0,160	0,096	0,110

Tabla 5. Medidas de absorbancia registradas por triplicado para cada situación.

Los resultados obtenidos para el colágeno tipo I son los esperados: si se fija antígeno al pocillo, el anticuerpo se une a él y se detecta mayor señal que en las situaciones control (sin colágeno fijado). Es decir, ambas soluciones de bloqueo funcionan y la especificidad antígeno-anticuerpo queda patente.

Sin embargo, al analizar los resultados que se obtienen trabajando con colágeno tipo II, no se aprecian diferencias significativas entre la situación control y la situación en la que se fija colágeno al pocillo. Por lo tanto, a diferencia de lo que se observaba con diferentes tipos de albúmina, este anticuerpo α -colágeno solo nos sirve para detectar colágeno tipo I, ya que presenta una especificidad muy elevada.

A continuación, igual que se hizo con albúmina, se plantea el ensayo basado en un ELISA competitivo, utilizando como antígeno colágeno tipo I.

Colágeno tipo I				
	Leche		BSA	
Pocillo	Sin colágeno	Con colágeno	Sin colágeno	Con colágeno
Abs _{450 nm} (u.a.)	0,849	0,656	0,162	0,180

Tabla 6. Medidas de absorbancia registradas por triplicado para cada situación.

En este caso se observa que, al utilizar leche en polvo como solución de bloqueo, la superficie del pocillo no se ha bloqueado correctamente, mientras que cuando se usa BSA, el bloqueo parece bastante eficaz. Por lo tanto, se selecciona el **BSA** como solución de bloqueo para los experimentos sucesivos con colágeno.

5.5.2 Biosensor enzimático

El segundo paso realizado en la optimización del biosensor se centra en encontrar las relaciones antígeno/anticuerpo adecuadas. Se pretende conseguir una respuesta lineal, que permita detectar más señal cuanto más antígeno sea reconocido por su anticuerpo específico. Este proceso se realiza con los dos antígenos con los que se está trabajando, OVA y colágeno.

El esquema de trabajo seguido es el que se muestra en la Figura 5.A, siguiéndose el protocolo esquematizado en el Anexo I (Tabla A2). Sin embargo hay una serie de parámetros, como la concentración de antígeno y anticuerpo primario y los tiempos de incubación, que se fueron modificando para encontrar las condiciones óptimas.

En todas las situaciones el método empleado es el ELISA competitivo y la detección de señal se basa en la oxidación del TMB por la peroxidasa unida al anticuerpo secundario, obteniéndose los resultados que se muestran en el Anexo II (Tablas A4 y A5).

Solo en los experimentos realizados con OVA se llegó a optimizar las relaciones de antígeno y anticuerpo para que la detección de antígeno tenga una respuesta lineal. Estos resultados se observan cuando la relación molar antígeno/anticuerpo es muy elevada, es decir, cuando tenemos una proporción de antígeno mucho mayor que de anticuerpo. Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

Antígeno 	Ag/Ab 	Abs _{450nm} (u.a.)
0	0	0,0593
0	0/1	0,0584
1	0	0,0615
1	1/0,01	0,0965
1	1/0,02	0,1284
1	1/0,04	0,2066
1	1/0,05	0,2638
1	1/0,06	0,3403

Tabla 7. Medidas de absorbancia registradas por triplicado para cada situación. Las relaciones de antígeno fijado a la membrana y antígeno/anticuerpo añadidos son molares. En naranja aparecen los ensayos control.

Al representar gráficamente la señal de absorbancia detectada frente a la concentración de anticuerpo primario utilizado, se observa que la relación es lineal.

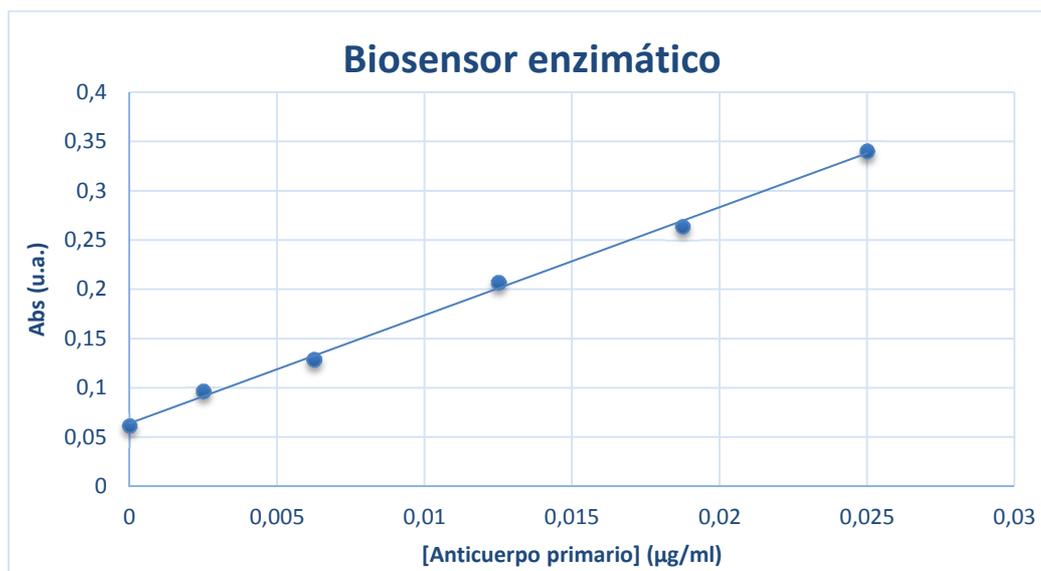


Figura 14. Representación de la señal de absorbancia detectada frente a la concentración de anticuerpo α -OVA utilizada. El elevado coeficiente de determinación ($R^2=0,9979$) muestra una buena relación entre los datos obtenidos y la respuesta lineal.

5.5.3 Biosensor plasmónico

El último experimento realizado en este trabajo es el diseño del biosensor plasmónico. En este caso el elemento generador de señal son los NNs, a diferencia de los ensayos anteriores en los que era la acción de la peroxidasa sobre el TMB lo que permitía detectar la señal.

El diseño del biosensor plasmónico se basa en el esquema representado en la Figura 5.B y solo se desarrolla utilizando OVA como antígeno, ya que en el caso del colágeno todavía no se han optimizado las relaciones antígeno/anticuerpo. Así, la OVA queda fijada sobre una membrana de ésteres de celulosa, esta se reconoce por el anticuerpo primario (α -OVA policlonal), que a su vez es reconocido por el anticuerpo secundario (α -IgG con biotina). La biotina presente en el anticuerpo secundario permite la unión de los NNs funcionalizados con estreptavidina, para que finalmente se detecten los NNs tras irradiarlos con un láser que emite luz en el infrarrojo cercano (NIR).

Siguiendo el protocolo detallado en el Anexo I (Tabla A3) y utilizando las cantidades que se muestran a continuación, se plantea el ensayo plasmónico.

Ensayo	Antígeno	Ag/Ab
1	0	0
2	0	0/0,06
3	1	0/0,06
4	1	0,2/0,06
5	1	0,4/0,06
6	1	0,6/0,06
7	1	0,8/0,06
8	1	1/0,06

Tabla 8. Cantidades añadidas de cada componente del biosensor plasmónico. El antígeno fijado en la membrana aparece en relación molar con el antígeno y anticuerpo incubados O/N. Por otro lado, el anticuerpo secundario y los NNs se añaden en exceso (0,1 μ g y 2 μ g por muestra, respectivamente). En naranja aparecen los ensayos control.

Los resultados obtenidos son los que se muestran en la siguiente imagen:

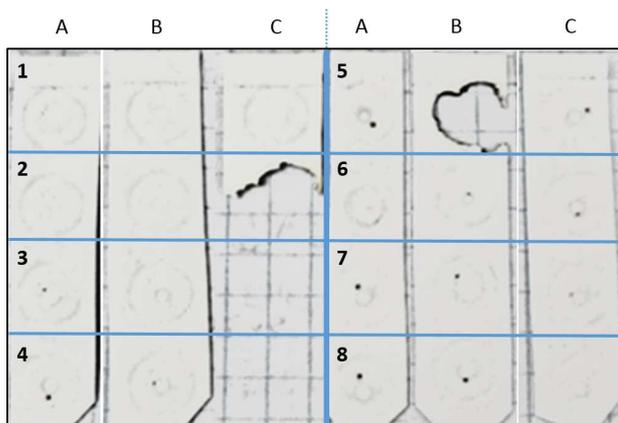


Figura 15. Resultados obtenidos por triplicado (muestras A, B y C en cada ensayo) tras irradiar las muestras con un láser en el infrarrojo cercano. En las muestras en las que han quedado retenidos NNs, estos absorben energía y la disipan en forma de calor, quemando el papel térmico adyacente (visualmente se observa un punto negro, pudiendo quemarse la membrana al trabajar con exceso de NNs).

En la mayoría de las muestras se observan los resultados esperados.

- Los ensayos 1 y 2 son controles negativos, por lo que no se detecta señal.
- Una de las muestras del ensayo 4 (4C) se irradia demasiado tiempo con el láser, por lo que quema la membrana y provoca la pérdida de las muestras 2C y 3C.
- Salvo las muestras 3B y 8C, todas las demás generan la señal que se espera. En estos dos casos, al estar trabajando con volúmenes tan pequeños sobre una membrana (solo se

fijan 40 μ l de antígeno), cabe la posibilidad de que se haya fijado el antígeno en una zona periférica de la membrana. Esto, junto con el reducido diámetro del haz de luz generado por el láser, complica la tarea de detección de señal, ya que hay que conseguir enfocar con el láser la zona precisa de la membrana en la que tenemos el antígeno fijado y, por ende, los NNs.

6. CONCLUSIONES

En este trabajo se ha comenzado el desarrollo de dos biosensores, uno específico para ovoalbúmina y otro para colágeno, siendo la presencia de ambas proteínas de especial interés en la conservación de obras de arte. En base a los resultados obtenidos se pueden sacar las siguientes conclusiones:

1. Los biosensores diseñados permiten la detección de ovoalbúmina y colágeno gracias a la especificidad antígeno-anticuerpo.
2. Los NNs sintetizados presentan la capacidad de absorber energía lumínica en el infrarrojo cercano y, a continuación, disiparla en forma de calor.
3. Los NNs permiten unir a su superficie biomoléculas covalentemente, de forma que mantengan su actividad biológica.
4. La leche en polvo disuelta en PBS funciona bien como solución de bloqueo cuando se trabaja con OVA. En el caso del colágeno, el BSA disuelto en PBS es lo que presenta una buena eficacia a la hora de bloquear superficies.
5. En el biosensor de OVA, las mejores respuestas de detección se obtienen cuando se trabaja con una relación molar “antígeno/anticuerpo primario” elevada.

Being both proteins, ovalbumin and collagen, especially important in Cultural Heritage conservation, in this work we started the development of two biosensors. Based on the obtained results, we could conclude:

- 1. The biosensors designed allow to detect ovalbumin and collagen due to the specific bonding antigen-antibody.**
- 2. The synthesized NNs are able to absorb near infrared radiation and, furthermore, dissipate this energy as heat.**
- 3. Biomolecules can establish covalent linkage with NNs surface and keep their biological activity.**
- 4. Milk powder dissolved in PBS works well as blocking solution when working with OVA. Working with collagen, it is BSA dissolved in PBS which has a good efficiency blocking surfaces.**
- 5. OVA biosensor requires a high molar relation “antigen/primary antibody” in order to achieve a good detection.**

7. BIBLIOGRAFÍA

- Ambrosi, A. (2007). *The application of nanomaterials in electrochemical sensors and biosensors*. (Tesis doctoral inédita). Dublin City University. School of Chemical Sciences.
- Bergveld, P. (1996). The future of biosensors. *Sensors and Actuators A: Physical*, 56(1-2), 65–73.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
- Callejón, R. (2008). *Desarrollo de un método de HPLC para la determinación de aminoácidos en vinagre y su validación en muestras reales*. (Tesis doctoral inédita). Universidad de Sevilla. Departamento de Bioquímica, Bromatología, Toxicología y Medicina legal.
- 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.
- Feynman, R. P. (1960). There's plenty of room at the bottom. *Engineering and Science*, February 1960, 22–36.
- Fremout, W., Dhaenens, M., Saverwyns, S., Sanyova, J., Vandenabeele, P., Deforce, D., Moens, L. (2010). Tryptic peptide analysis of protein binders in works of art by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 658(2), 156–162.
- García, M. A. (2012). Surface plasmons in metallic nanoparticles: fundamentals and applications. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 45(38), 283001-283021.
- Haes, A. J., Zou, S., Schatz, G. C., Van Duyne, R. P. (2004). Nanoscale Optical Biosensor: Short Range Distance Dependence of the Localized Surface Plasmon Resonance of Noble Metal Nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry B*, 108(22), 6961–6968.
- Higgins, I. J. (1989). Chemical sensors. Edwards T. E. (Ed.). In *Biosensors* (pp. 259–260). Glasgow: Blackie and Sons.
- Kindt, T. J., Goldsby, R. A., Osborne, B. A. (2007). Interacciones antígeno-anticuerpo: principios y aplicaciones. In *Inmunología de Kubly* (6th ed., pp. 145–167). Madrid: McGraw-Hill.
- Nelson, D. L., M Cox, M. (2005). *Lehninger. Principios de bioquímica*. (4th ed.). Barcelona: Omega.
- McNeil, S. E. (2005). Nanotechnology for the biologist. *Journal of Leukocyte Biology*, 78(3), 585–594.
- Monošík, R., Stred'anský, M., Šturdík, E. (2012). Biosensors - classification, characterization and new trends. *Acta Chimica Slovaca*, 5(1), 109–120.

- Pelaz, B., Grazu, V., Ibarra, A., Magen, C., del Pino, P., M. de la Fuente, J. (2012). Tailoring the Synthesis and Heating Ability of Gold Nanoprisms for Bioapplications. *Langmuir*, 28(24), 8965–8970.
- Polo, E. (2013). *Funcionalización de nanopartículas de oro para su aplicación en sistemas de biodetección*. (Tesis doctoral inédita). Universidad de Zaragoza. Ingeniería Química y Tecnologías del Medio Ambiente.
- Polo, E., del Pino, P., Pelaz, B., Grazu, V., M. de la Fuente, J. (2013). Plasmonic-driven thermal sensing: ultralow detection of cancer markers. *Chemical Communications*, 49(35), 3676–8.
- Sciutto, G., Prati, S., Mazzeo, R., Zangheri, M., Roda, A., Bardini, L., ... Marcaccio, M. (2014). Localization of proteins in paint cross-sections by scanning electrochemical microscopy as an alternative immunochemical detection technique. *Analytica Chimica Acta*, 831, 31–37.
- Tokarski, C., Martin, E., Rolando, C., Cren-Olivé, C. (2006). Identification of Proteins in Renaissance Paintings by Proteomics. *Analytical Chemistry*, 78(5), 1494–1502.
- Van Der Werf, I. D., Calvano, C. D., Palmisano, F., Sabbatini, L. (2012). A simple protocol for Matrix Assisted Laser Desorption Ionization- time of flight-mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) analysis of lipids and proteins in single microsamples of paintings. *Analytica Chimica Acta*, 718, 1–10.
- Yamasaki, M., Arai, Y., Mikami, B., Hirose, M. (2002). Loop-inserted and thermostabilized structure of P1-P1' cleaved ovalbumin mutant R339T. *Journal of Molecular Biology*, 315(2), 113–120.