



Síntesis, caracterización y funcionalización de nanopartículas de oro para su uso en biosensores

Gómez Castelán Ana Victoria Selene, Castañeda Briones María Teresa, Cruz Colín María del Rocío, Ávila Jiménez Miguel, Haro Pérez-Catalina, Espinoza-Castañeda Marisol*

Universidad Autónoma Metropolitana, Departamento de Ciencias Básicas. Av. San Pablo No. 180, Azcapotzalco, Ciudad de México. C.P. 02200. México.

* Autor para correspondencia: marisol.ec.uam@gmail.com

Recibido:

23/abril/2016

Aceptado:

10/agosto/2016

Palabras clave

Nanopartículas de oro, anticuerpo, biosensor

Keywords

Gold nanoparticles, antibody, biosensor

RESUMEN

Actualmente los nanomateriales juegan un papel importante en el desarrollo de nuevas tecnologías basadas en sensores y biosensores, debido a su gran sensibilidad, fácil manejo y bajo costo, ya que se manejan volúmenes nanométricos. Es por esto que en este trabajo se desarrolló un procedimiento simple y rápido para la síntesis de nanopartículas de oro basado en la metodología propuesta por de la Escosura-Muñiz y colaboradores, las cuales fueron caracterizadas mediante las técnicas de espectrofotometría de UV-visible y dispersión de luz dinámica. Posteriormente se optimizaron las condiciones de incubación necesarias como temperatura, tiempo y velocidad de incubación para la funcionalización superficial de las nanopartículas de oro con un anticuerpo específico para *Salmonella typhi*.

ABSTRACT

Nanomaterials currently play an important role in the development of new technologies based on sensors and biosensors, due to its high sensitivity, easy handling and low cost since nanometric volumes are handled. In this paper a simple and rapid procedure for the synthesis of gold nanoparticles based on the methodology proposed by de la Escosura-Muñiz et al. was developed, these nanoparticles were characterized by techniques UV-visible spectrophotometry and dynamic light scattering. After this, the incubation conditions for surface functionalization of gold nanoparticles with a specific antibody for *Salmonella typhi* were optimized, as well as parameters such as temperature, incubation time and speed.

Introducción

Un sensor químico es un dispositivo capaz de responder a un analito en concreto, el cual se compone principalmente de 2 partes: un receptor donde se da el reconocimiento de la sustancia por analizar y un transductor, donde se convierte la señal química obtenida en una señal medible. Si el elemento de reconocimiento es un compuesto químico orgánico o inorgánico, se trata de un sensor químico, pero si éste es de naturaleza biológica como anticuerpos, bacterias, virus, enzimas, ácidos nucleicos, entre otros, se trata de un biosensor (González y Costa, 2010).

Los biosensores tienen diversos campos de aplicación en áreas como: medicina, industria alimenticia, farmacéutica, cosmética así como en el área de seguridad (Sadana, 2003), entre otras. Actualmente se busca la mejora en las tecnologías ya desarrolladas en cuanto a su límite de detección y sensibilidad, así como que sean dispositivos de bajo costo, ser de fácil transportación y sencillos de fabricar, con tiempos de respuesta cortos, precisos y altamente selectivos (Rodríguez, 2009).

En los últimos años se ha visto una mejora significativa en la sensibilidad de los biosensores debido a la incorporación de nanomateriales, los cuales tienen tamaños entre 1-100 nm. Dependiendo de su aplicación presentan diferentes formas y tamaños, lo que les otorga propiedades ópticas, físicas y químicas específicas en la nanoescala (Zanella, 2012). Los nanomateriales pueden ser de diferentes tipos como: nanotubos, nanocables, nanopelículas, nanofibras, nanopartículas metálicas y los puntos cuánticos (quantum dots), entre otros (Baudrit y Arrieta, 2013), ya que aumentan en gran medida la relación tamaño/volumen y pueden ser usados como marcadores en los sistemas de detección.

Por otra parte, las nanopartículas metálicas (MNPs), pueden ser sintetizadas por métodos físicos y químicos; siendo estos últimos los más utilizados debido a que permite tener un mayor control del tamaño, forma y distribución de los nanomateriales (Poole y Owens, 2003).

Particularmente, las nanopartículas de oro (AuNPs, siglas por su nombre en inglés), han sido de gran interés por su aplicación en diversos tipos de biosensores, ya que presentan un gran atractivo desde el punto de vista biológico, esto es debido a que son muy biocompatibles, pueden ser funcionalizadas con distintos ligandos, presentan baja toxicidad, exhiben propiedades ópticas,

fototérmicas, físicas y químicas presentes solo en la nanoescala (Al-Qadi y Remuñán-lópez, 2009).

La biofuncionalización de nanopartículas consiste en la incorporación de biomoléculas (péptidos, proteínas, anticuerpos, DNA, entre otros), mediante interacciones físicas y/o químicas (Jazayeri et al., 2016) en la superficie de MNPs principalmente. En especial la funcionalización con anticuerpos monoclonales han sido ampliamente utilizadas en biosensores ópticos, electroquímicos y másicos entre otros, (Arruebo et al., 2009), ya que brindan alta selectividad y biocompatibilidad con la especie deseada (bacterias, virus, células, etc.) (Arruebo et al., 2009), además que pueden ser aplicados para el diagnóstico de enfermedades (Mout et al., 2012), así como para terapias y monitoreo de células (Weingart et al., 2013).

Con base en lo anterior, el presente trabajo tiene como finalidad sintetizar AuNPs y desarrollar un procedimiento optimizado para la funcionalización de AuNPs con anticuerpos, para su uso en biosensores como marcadores de detección electroquímica.

Metodología

Síntesis de nanopartículas de oro

Las AuNPs, se sintetizaron siguiendo la metodología propuesta por de la Escosura Muñiz y colaboradores (de la Escosura-Muñiz et al., 2011), la cual consiste en calentar 49.5 mL de agua Milli-Q a 100 °C, una vez alcanzada esta temperatura; adicionar 0.5 mL de H₂AuCl₄ al 1%. Posteriormente agregar 1.25 mL de citrato de sodio al 1%, manteniendo la temperatura y agitación por diez minutos. Transcurrido este tiempo se observa un cambio de color en la solución, partiendo de amarillo muy tenue hasta un tono morado-rojo; color característico de las nanopartículas con un diámetro aproximado de 20 nm (Espinoza-Castañeda et al., 2013).

Funcionalización de nanopartículas de oro

Primeramente, ajustar el pH de las AuNPs a 9.0 utilizando NaOH 1 M. Colocar en un tubo Eppendorf 1.4 mL de las AuNPs con pH 9.0 para su conjugación con 100 µL del anticuerpo específico para *Salmonella typhi*, (Ab 69238), a una concentración de 0.055 mg/mL incubando en un agitador térmico (TOS-100, Thermo-Shaker) a 650 rpm durante 20 min a 25 °C. Una vez terminado el tiempo de incubación, el conjugado fue centrifugado a 14,000 rpm por 20 min a 4 °C, posteriormente el sobrenadante fue removido para eliminar el anticuerpo que no se haya

conjugado. Finalmente, resuspender el conjugado en 1 mL de agua Milli-Q.

Caracterización de nanopartículas de oro mediante la técnica de espectrofotometría de UV-Vis

Mediante la técnica de espectrofotometría de ultravioleta visible, se determinó el valor máximo de absorbancia de las nanopartículas antes y después de su funcionalización, para lo cual se colocaron 800 μL de las AuNPs con una concentración de $7.5231 \times 10^{-7} \text{ mM}$ en una celda de cuarzo de 1 cm^2 , realizando un barrido de 300-800 nm de longitud de onda, utilizando agua Milli-Q como blanco. Todas las medidas se realizaron por triplicado en un espectrofotómetro de Ultravioleta-visible (UV-Vis) Shimadzu UV-1800.

Caracterización de nanopartículas de oro mediante la técnica de dispersión de luz dinámica y potencial zeta

Mediante la técnica de dispersión de luz dinámica (DLS, siglas por su nombre en inglés), se determinó el diámetro hidrodinámico de las AuNPs sintetizadas, antes y después de su funcionalización; para ello se colocaron 800 μL de la solución en una celda de 1 cm^2 , y todas las medidas se realizaron por sextuplicado. Mediante la técnica de potencial zeta se determinó la carga superficial de las AuNPs antes y después de su funcionalización, así como su conductividad. Estas caracterizaciones fueron realizadas utilizando el equipo Zetasizer Nano range.

Resultados y discusión

Síntesis de nanopartículas de oro

Una vez transcurrido el tiempo de reacción, las AuNPs fueron enfriadas a temperatura ambiente, colocadas en un recipiente y protegidas de la luz para su almacenaje a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. La figura 1 muestra el color al finalizar la reacción.



Figura 1. Color característico de las AuNPs de un diámetro aproximado de 20 nm.

Caracterización de nanopartículas de oro mediante la técnica de espectrofotometría de UV-Vis

Se determinó el valor máximo de absorbancia de las AuNPs sintetizadas previamente, realizando un barrido de 300-800 nm de longitud de onda, con incrementos de 1 nm (Figura 2).

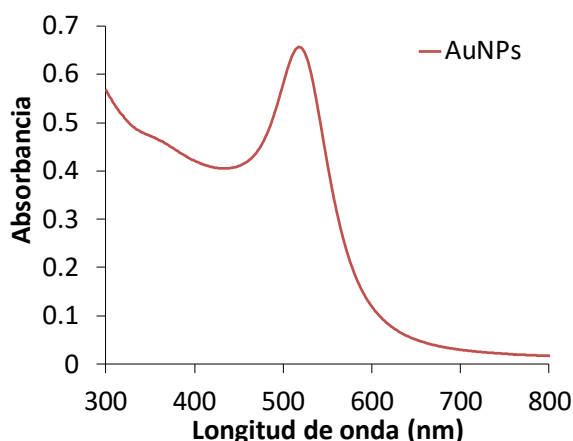


Figura 2. Espectro de absorción para las AuNPs sin modificar.

En la figura 2 se puede observar una absorbancia máxima de 0.657 a una longitud de onda de 518.33 nm lo cual es indicativo de que las AuNPs tienen un diámetro aproximado a 20 nm (de la Escosura-Muñiz et al., 2011).

Caracterización de nanopartículas de oro mediante la técnica de dispersión de luz dinámica

Utilizando la técnica de DLS se determinó que el diámetro hidrodinámico de las AuNPs, el cual es de $26.53 \pm 1.418 \text{ nm}$.

Caracterización de nanopartículas de oro mediante la técnica de potencial zeta

Utilizando la técnica de potencial zeta se determinó la carga superficial de las AuNPs, la cual resultó ser negativa con un valor de $-35 \pm 2.04 \text{ mV}$, igualmente se determinó su conductividad, siendo de $0.248 \pm 0.0012 \text{ mS/cm}$. Todas las mediciones fueron realizadas por sextuplicado.

Caracterización de nanopartículas de oro funcionalizadas mediante la técnica de espectrofotometría de UV-Vis

La comprobación de la inmovilización del anticuerpo en la superficie de las AuNPs, se llevó a cabo mediante la caracterización por UV-Vis. Para esto, se determinó la absorbancia de las AuNPs funcionalizadas realizando un

barrido de 300-800 nm de longitud de onda, con incrementos de 1 nm (Figura 3).

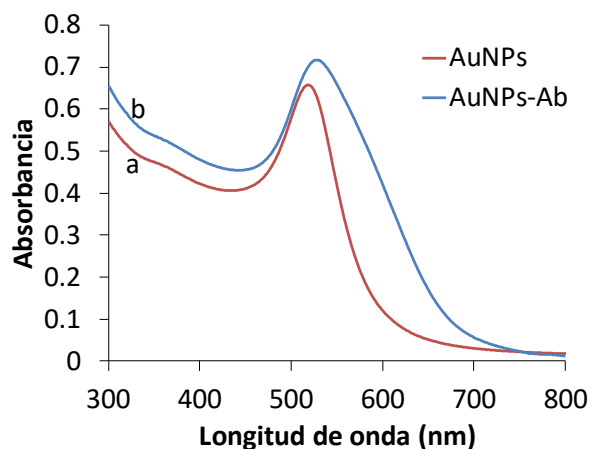


Figura 3. Espectro de absorción obtenido para: (a) AuNPs sin modificar, (b) AuNPs funcionalizadas.

En la figura 3 se observa que las AuNPs funcionalizadas presentan una absorbancia de 0.716 a una longitud de onda de 528 nm (Figura 3b), este desplazamiento de 10 nm es indicativo de que el anticuerpo ha sido inmovilizado en la superficie de las AuNPs.

Caracterización de nanopartículas de oro funcionalizadas mediante el potencial zeta

Posteriormente también se comprobó la funcionalización de las AuNPs mediante la determinación de la carga superficial, siendo de -28.7 ± 0.479 mV y con una conductividad de 0.0105 ± 0.00018 mS/cm (Figura 4).

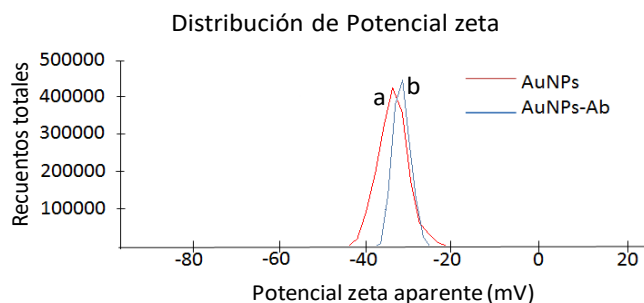


Figura 4. Potencial zeta obtenido para: (a) AuNPs sin modificar, (b) AuNPs funcionalizadas.

En la figura 4 se observa una disminución en la carga superficial de las AuNPs funcionalizadas; esto es debido a la presencia del anticuerpo en su superficie (Figura 4 b)

en comparación con las AuNPs no modificadas (Figura 4 a).

En la tabla 1 se muestran los resultados obtenidos en las caracterizaciones realizadas a las AuNPs antes y después de su funcionalización.

Tabla 1. Resultados obtenidos en las caracterizaciones para las AuNPs antes y después de su funcionalización.

	AuNPs	AuNPs-Ab	Δ
Longitud de onda	518.33 ± 0.57 nm	528 ± 0 nm	9.67 ± 0.57 nm
Carga superficial	-35 ± 2.040 mV	-28.7 ± 0.479 mV	-6.3 ± 1.561 mV
Conductividad	0.248 ± 0.012 mS/cm	0.010 ± 0.0001 mS/cm	0.237 ± 0.011 mS/cm

Como se puede comparar en la tabla 1, hay un desplazamiento en la longitud de onda de las AuNPs funcionalizadas en comparación con las no funcionalizadas, ya que la señal se desplazó 9.67 ± 0.57 nm, su carga superficial disminuyó en -6.3 ± 1.561 mV y de igual manera su conductividad 0.2375 ± 0.0118 mS/cm.

Estos resultados confirman la adsorción del Ab en la superficie de las nanopartículas, todos los experimentos fueron realizados por triplicado lo que confirma la reproducibilidad de esta técnica, lo que da pie a que estas AuNPs funcionalizadas puedan ser utilizadas en sistemas de biosensores.

Conclusiones

En este trabajo se desarrollaron procedimientos sencillos y rápidos para la síntesis de AuNPs así como para su funcionalización con anticuerpos. La metodología aquí propuesta puede ser aplicada para el uso de nanomateriales biofuncionalizados y utilizados en sistemas de detección utilizando biosensores, ya que en este caso en particular, las AuNPs funcionan como marcadores electroquímicos. El reciente aumento en el uso de biosensores basados en nanomateriales se ha debido a su gran selectividad, sensibilidad, fácil manejo y su bajo costo.

La metodología que aquí se plantea puede ser utilizada para la modificación superficial de nanopartículas metálicas por adsorción inespecífica, lo que permite que puedan ser aplicados en diversos sistemas de detección de cualquier tipo de bacterias, ya que solamente hay que



emplear el anticuerpo necesario para la bacteria de interés.

Agradecimientos

Se agradece al PRODEP, el apoyo proporcionado para la realización de este trabajo a través del proyecto Folio UAM-PTC-533, DSA/103.5/15/7467. Referencias

Al-Qadi S., Remuñán-lópez C. (2009). Nanopartículas metálicas: oro. Monografías de La Real Academia Nacional de Farmacia, 28: 8-17.

Arruebo M., Valladares M., González-Fernández Á. (2009). Antibody-Conjugated Nanoparticles for Biomedical Applications. *Journal of Nanomaterials*, 2009: 1-24.

Baudrit J. R. V., Arrieta R. M. (2013). Nanomedicina y sensores: alcance de la nanotecnología para el monitoreo y control de la glucosa en pacientes con diabetes. *Boletín de Ciencia y Tecnología*, 1-14.

de la Escosura-Muñiz A., Parolo C., Maran F., Mekoçi A. (2011). Size-dependent direct electrochemical detection of gold nanoparticles: application in magnetoimmunoassays. *Nanoscale*, 3: 3350-3356.

Espinoza-Castañeda M., de la Escosura-Muñiz A., González-Ortiz G., Martín-Orúe S. M., Pérez J. F., Merkoçi A. (2013). Casein modified gold nanoparticles for future theranostic applications. *Biosensors and Bioelectronics*, 40: 271-276.

González G., M. B., Costa G., A. (2010). Los biosensores electroquímicos: herramientas de la analítica y del

diagnóstico clínico. Real Academia Nacional de Farmacia, 197-222.

Jazayeri M. H., Amani H., Pourfatollah A. A., Pazoki-Toroudi H., Sedighimoghaddam B. (2016). Various methods of gold nanoparticles (GNPs) conjugation to antibodies. *Sensing and Bio-Sensing Research*, 9: 17-22.

Mout R., Moyano D. F., Rana S., Rotello V. M. (2012). Surface functionalization of nanoparticles for nanomedicine. *Chemical Society Reviews*, 41: 2539-2544.

Poole C. P., Owens F. J. (2003). Introducción a la Nanotecnología. España: Reverté S.A.

Rodríguez B. E. S. (2009). Biosensores en la industria (Primera ed). Estados Unidos de América.

Sadana A. (2003). Biosensors: Kinetics of Binding and Dissociation Using Fractals (First Edit). Elsevier B.V.

Weingart J., Vabbilisetty P., Sun X.-L. (2013). Membrane mimetic surface functionalization of nanoparticles: Methods and applications. *Advances in Colloid and Interface Science*, 197-198, 68-84.

Zanella, R. (2012). Metodologías para la síntesis de nanopartículas: controlando forma y tamaño. Mundo Nano. *Revista Interdisciplinaria en Nanociencias y Nanotecnología*, 5: 69-81.