

María del Alba Martín Barreiro

Aplicaciones fotónicas de
nanomateriales de oro en el
desarrollo de biosensores
enzimáticos e inmunológicos

Director/es

Marcos Ruiz, Susana de
Grazú Bonavia, Valeria

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>

© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606



Tesis Doctoral

APLICACIONES FOTÓNICAS DE
NANOMATERIALES DE ORO EN EL DESARROLLO
DE BIOSENSORES ENZIMÁTICOS E
INMUNOLÓGICOS

Autor

María del Alba Martín Barreiro

Director/es

Marcos Ruiz, Susana de
Grazú Bonavia, Valeria

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Escuela de Doctorado

Programa de Doctorado en Ciencia Analítica en Química

2020

Aplicaciones fotónicas de nanomateriales de oro en el desarrollo de biosensores enzimáticos e inmunológicos



Universidad Zaragoza

Alba Martín Barreiro

Tesis Doctoral (Zaragoza, 2020)



TESIS DOCTORAL

Aplicaciones fotónicas de nanomateriales de oro en el desarrollo de biosensores enzimáticos e inmunológicos

Alba Martín Barreiro

Directoras:

Susana de Marcos Ruiz

Valeria Grazú Bonavia

Departamento de Química Analítica

Universidad de Zaragoza

2020

Grupo de Nanobiosensores y
sistemas bioanalíticos



Grupo Bionanosurf





Dña. Susana de Marcos Ruiz, Profesora Titular del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Zaragoza, y Dña. Valeria Grazú Bonavia, Científica Titular del Instituto de Ciencia de los Nanomateriales de Aragón del Consejo Superior de Investigaciones Científicas,

CERTIFICAN,

que la presente Memoria:

APLICACIONES FOTÓNICAS DE NANOMATERIALES DE ORO EN EL DESARROLLO DE BIOSENSORES ENZIMÁTICOS E INMUNOLÓGICOS.

ha sido realizada por **Dña. Alba Martín Barreiro** bajo nuestra dirección para optar al Grado de Doctor en Química.

Y asimismo,

AUTORIZAN

la presentación de dicha Memoria para que sea defendida ante el Tribunal correspondiente.

Zaragoza, a 15 de octubre de 2020,

Fdo. Susana de Marcos Ruiz

Fdo. Valeria Grazú Bonavia

Este trabajo ha sido subvencionado gracias a los siguientes proyectos y ayudas:

- Proyectos **CTQ2016-76846-R** '(Nano)plataformas enzimáticas label-free para el control de aminos biógenas en alimentos. Biosensores y envases inteligentes' y **PID2019105408GB-I00** 'Generación enzimática de NanoMateriales: una estrategia innovadora en el desarrollo de biosensores ópticos para el control de calidad de alimentos (GENMINAL)' ambos del Ministerio de Ciencia e Investigación (MICIIN)
- Las ayudas del Gobierno de Aragón a los grupos de investigación **E-74 y E_25_17R**.
- **Proof of Concept-HOTFLOW 754609** (2017-2018) 'A Photothermal Lateral Flow Test for Visual Point of Care Detection'. European Research Council.
- **TRANSCAN JTC2016 -140 – PROSCANEXO** (2018-2020) 'Exploitation of extracellular vesicles for precision diagnostics of prostate cancer'. European Union's Horizon 2020.

Agradecimientos

'Di a todos que es posible y otras personas sentirán entonces

el valor para afrontar sus propias montañas'

Ser como el río que fluye.

Paulo Coelho.

No es de repente, pero te lo parece, como si de un truco de magia se tratara, estas aquí... mil recuerdos vienen a tu mente y se agolpan en tus ojos, mientras tus dedos tratan de organizarlos. El corazón palpita rápido... sensaciones, decisiones, aventuras, retos y personas. Tu historia.

Empezaré por el final. Dejarme llevar por la vida y los acontecimientos que han surgido durante estos cuatro años, ha sido mi mayor aprendizaje. Fluir, aprender de todo lo que viene, observar, respirar, luchar y disfrutar de cada persona que se ha cruzado mi camino, me ha llevado a ser quien soy ahora.

Muchas veces escribo, como lo hacía mi abuelo Pepe, me sirve para comprenderme y poder recordar lo que sentía en ese momento. Hace no tanto tiempo, grabé esta frase entre las hojas de mi cuaderno:

'Ha aprendido a ser más agua que nunca, a beber de ella misma, recorrerse y ser libre.'

Esto ha sido gracias a vosotros. Quién me conoce sabe que amo con fuerza y siento con profundidad, que escribir esto para mí no es trivial y que, aunque me gustan las palabras, quiero que hoy cada una de ellas también sea un cálido abrazo y una inmensa sonrisa, para todos aquellos que habéis escrito con tinta permanente en el libro de mi vida. GRACIAS.

A **Javier y Susana**, mis padres científicos, por enseñarme a amar la ciencia, por darme el método y la ilusión. Sin vosotros, no estaría aquí de ninguna de las maneras. Más allá de ser mis jefes, habéis sido mi familia. Javier, gracias por tus consejos, gracias por las horas en tu despacho, divagando mecanismos y enseñándome a pensar científicamente. Susana, gracias por tu apoyo incondicional, por enseñarme a tratar a la ciencia con paciencia y nunca desesperar. GRACIAS.

A **Valeria**, por ofrecerme la oportunidad de empezar una nueva aventura y enseñarme la raíz de un mundo científico nuevo para mí, por haberme dejado ser yo y experimentar. Por el apoyo y guía. GRACIAS.

A **Jesús M.**, por permitirme entrar en un grupo tan maravilloso, con un nivel científico y humano inconmensurable. Por hacerme sentir valorada y confiar en mí. GRACIAS.

A todos los miembros del Grupo de Nanobiosensores y Sistemas Bioanalíticos:

A **Isa**, por contagiarme su entusiasmo y alegría, por ser tan buena con todos y por su apoyo personal. Nunca olvidaré nuestro viaje a Lisboa, que nos unió tanto como nuestro amor a los colorinchis. Junto con Javier y Susana, hacéis el mejor equipo del mundo.

A **Javi y Sofía**, por aparecer como un nuevo soplo de aire fresco, por las horas de diversión, los cafés, las cervezas y las cubetas desperdigadas por todo el laboratorio (nuestra marca personal). Igual que vosotros habéis estado ahí, yo estaré siempre en el camino que os queda por recorrer. ¡Estoy orgullosa de vosotros pequeños!

Y como no, a **Jesús**, mi Chuchi, tú, caritritinidad, mereces una página aparte. Mi apoyo incondicional durante el desarrollo de esta tesis, mi compañero de locuras, de risas hasta explotar. Juntos hemos creado un nuevo diccionario, hemos hecho que nuestros jefes digan alguno de nuestros 'palabros' con naturalidad y hemos agotado las existencias de café en NTC. Hemos sido el espectáculo del departamento, con nuestros bailes y nuestra música entre cubetas. Siempre recordaré todas nuestras canciones versionadas; cantar Dua Lipa narrando como una recta de calibrado no se ajusta ni aunque lo sueñes, ha sido de las mejores cosas de la tesis. Por las crisantemadas, los pitis doblados, la complicidad inmensa y la felicidad que me has regalado durante tantos años. Levantarme para ir a trabajar era una gozada sabiendo que tú estarías ahí. ¡Gracias amigo, te quiero con locura!

A todos los miembros del Grupo Bionanosurf, pasando por toda la jerarquía:

A la gran **Carmencita**, porque sin su desparpajo con los papeles y su alegría, todo sería mucho más difícil. A los minijefes y nanojefes (**María M., Rafa, Scott, Raluca, Lucía, Laura, Vanessa, Ilaria, Carlitos, Andrés, Elena, Zsuzsa...**et.al), por ser en muchos casos, amigos más que jefes. GRACIAS.

Y a la maravillosa peña de NAP becarios, porque trabajar con todos ellos en el laboratorio es una fantasía, porque de cualquier inconveniente surgen soluciones y risas a la par, por las cenas, las fiestas, los viajes y la compañía en días duros, en los que nada funciona o el reloj marca las 21:00 h. Hacemos un gran equipo, que también tiene su jerarquía;

- El despacho Stress, compuesto por **Alvaro, Lili, Rafi, Sonia, Inés y Bea**, los más antiguos becarios 'Per Sécula Seculorum', ellos me recibieron en este grupo y pronto me di cuenta de que serían amigos además de compañeros. En este grupo, la "mención dramática" va para Lili, mi Tamara del alma, que, aunque ella se cree que es todo drama, estar con ella es sinónimo de alegría y confianza. La "mención del club de la comedia" va para Sonia, mi pareja de shows (un día haremos ese dúo), con ella me he reído infinito y me la he comido a besos, a partes iguales. Bea, mi compañera de proyecto y amiga, ella tiene claramente la "mención de LFIA", juntas hemos sufrido y reído, hemos sintetizado nachos para cinco familias y hemos tenido maravillosas conversaciones que nunca olvidaré.
- El despacho Fresh, también llamado, 'el mejor despacho del mundo', compuesto inicialmente por **Regina** (que merecerá una mención ultramega especial más adelante) y yo, pero que pronto se fue llenando para recoger de la indigencia (a veces de forma intermitente y otras duradera) a **Vito, Hector, Edu, Isa, Yili, María** y al gran **Juanjo** (siempre en nuestros corazones). En este grupo, la 'mención de fiestero' se la lleva el Vitico; todo amor y energía. Sin su 'que papsa!!' a las 9:00 h de la mañana, los días hubieran empezado peor. La 'mención de adicto a la ciencia' va claramente para mi amorcito, Hector; con él he pasado muchos de los mejores momentos en este despacho, hablar de la vida y de la ciencia con 'Don papers' es un regalo. Siempre recordaré esas tardes a las 19:00 h, ya cansados y esperando que acabaran los experimentos, divagando sobre ciencia, teniendo ideas locas (junto con Edu) y creyéndonos los nuevos premios noveles de química. La 'mención promisc' va claramente para mi amado Edu, que, junto a Sonia, completaba nuestro trío de la comedia y música en el labo; gran amigo, 'instagramer' (capta los mejores momentos) y 'escuchador' de ralladas mentales. La complicidad con él empezó muy pronto, supimos rápido que éramos el uno para el otro, aunque nuestro amor fuera imposible (lo intenté). La 'mención a la mejor profesora de ganchillo' es para mí Isita, ha sido 'chuliiiiiiiiisimoooo' aprender tanto de ti; es la culpable de mi obsesión por las artes ganchilleras además de una gran amiga. Está como una cabra, el tipo de gente que me encanta. Y falta una gran mención para una pequeña personita, 'mención de amorosidad' para mi Mari, un alma pura, todo corazón, llenas buenas palabras que rebosan sinceridad y amor. Esos abrazos y conversaciones, me los llevo muy dentro del alma.
- También está, la gente que nunca ha estado claro donde estaba (indigentes absolutos) como **Silvi, Fran, Juanico, Bea T...**et al. De aquí he de dedicar la 'mención de desdoblada' a Silvi, que aun estando en dos grupos y a mil cosas, se ha ganado el corazón de todos. De Juan y de Fran, hablaré más adelante, merecen mención especial.
- Por último, la gente que estuvo, pero se fue (aunque en algunos casos volvió): **Gabi, David E., Lou, David G., Sona...**et al. No puedo no darle la 'mención tecnológica' al gran David E., que, aunque se ríe de mí por ser analógica, me ha hecho pasar unos ratos inolvidables.

Esta tesis tampoco hubiera sido posible sin todos los **técnicos** que me han ayudado durante estos años, a destacar los compañeros del Laboratorio de Microscopías Avanzadas de Aragón e **Iñigo**, que aun sin jamón, siempre está dándolo todo.

The supreme object of life is to live. Few people live.

It is true life only to realize one's own perfection,

to make one's every dream a reality.

Oscar Wilde.

La más grande aventura de mi vida, ha sucedido también gracias a esta tesis: mis meses viviendo en Rotterdam. Esta experiencia me cambió por dentro y me aportó aún más seguridad en mi misma.

Mi trabajo en el hospital Erasmus MC, fue una experiencia laboral totalmente nueva, que hubiera sido imposible sin todas las personas que dedicaron su tiempo a mí y me enseñaron tanto:

To **Guido**, for his wonderful welcome, his absolute disposition and for teaching me to have a new scientific thought. To **Joke**, for being always with me, teaching me so much about bacteriophages (our children) and for being, in addition to my supervisor, my friend. To **Martin**, for all the hours analyzing in the microscope and to all **my colleagues from the Urology department**, who gave me a wonderful few months. He de hacer una mención especial para mi **Erlantz**, por todas las comidas fuera del horario Dutch, las mil fotocopias y por su amistad, tan fuerte como su brazo vasco.

Pero esta experiencia no hubiera tenido ningún sentido sin mi maravilloso Dutch squad (ni sin las Jumbo cookies). Ellos fueron mi verdadera familia allí, con ellos pude recorrer todo el país, findes sin apenas dormir; ir a la estación central y coger el primer tren que veíamos era nuestro modus operandi. Las cervezas de los jueves, las cenas en Bazar, las largas excursiones en bici, la lluvia en nuestros ojos, las fiestas locas, las bicis de la Celia y las cenas en casa... todo esta clavado en mi mente y cada vez que recurro a esos recuerdos, un sentimiento de felicidad extrema recorre mi cuerpo.

The most special mention goes to my 'Hungarian killer', **Katica**, my sister, my best friend there, my roommate in that wonderful house of Dukdalfpad 2 in our amazing island Katendrecht. Without you, love, nothing, nothing would have been possible. Our Elite nights and your attempts to speak Spanish, our colourful illuminated stairs, the nights cooking together, our conversations, the hugs, the beers at Fenix, your thousand shoes at the door, the orange raincoat and especially Pepe and Stela, always on our adventures... Thank you 'pumpkin', I love you so, so much.

'Titi', la **Sasha**, my little mon cheri, I miss your cookies and crepes, your poker face and your fights with Jesus, without you nothing would have been the same. Je t'aime.

Y la parte española del squad, 'los exiliados en Rotterdam', la suerte que tengo de teneros, ni me la creo:

'Arriquitraun', la **Celia**, mi Edward Cullen. Echo de menos tus 'Gus morning', alegres, pero no mucho y a toda tú. Tanto que me fui a verte a Tomewhere. Gracias Celi, por darme esa amistad tan pura, por las mil conversaciones que seguimos teniendo, incluidos nuestros lloros echando de menos Rotterdam. Te quiero y volveremos. (Sí, es una amenaza)

'Papada smile', la **Nerea**, esta fue una de mis revoluciones de 2019. Esta chica está como una auténtica cabra y no la puedo querer más. Compartimos amor por el queso y filosofía de vida. Gracias a ella pude fluir aún más, junto con el resto de locos, durante mis meses en Rotterdam. Te echo de menos Nere.

'Yisus', mi amado **Jesús**, mi niña, con e, mi compañero de cafeles y pitis en el Erasmus MC. Mi otro yo en Rotterdam. Me diste la vida cada uno de mis días allí, me hiciste reír como nadie y me regalaste una amistad incalculable. Gracias a ti (y a la Josephine) pude superar cualquier bache. Te quiero.

#superadito #toomuch #sinseryonadadeeso

La física moderna nos ha hecho coincidir,
es grande el planeta, pero estamos justo aquí.

Física Moderna (Carlos Sadness)

Durante el desarrollo de esta tesis en el departamento de analítica, pude conocer a otra familia más, mis chicos del Grupo de Vinos. Si, también me has dado mucho vino, pero, sobre todo, me han dado alegría, locuras y amor. Gracias por todas nuestras comidas en la hemeroteca y por arreglar mis días malos, porque saber que la final del pasillo estabais vosotros, era una maravilla. A **Almudena**, mi camarón, mi 'Almu fuck', la alegría de Rota, de Zaragoza y de mi corazón. Chorrete, gracias por absolutamente todo, nuestras conversaciones me han ayudado siempre, especialmente, si pienso en dos momentos difíciles de mi vida, tu apareces ahí, agarrándome la mano y haciéndome ver que todo es más fácil. A **Inés**, mi portuguesa, mi rubia, gracias por todos los momentos que nos regalaste durante tus años aquí, tu voz cantando aún resuena en los pasillos y en mis recuerdos. A **Elena**, mi Helen, mi fuego, madre mía...una loca auténtica, de las que me gustan a mí y no suelto ni aun que me apunten con una pistola. Gracias por levantarme del suelo cada una de las veces, poca gente lo sabe hacer como tú, gracias por ser una fiel amiga y regalarme tu locura cuando más la he necesitado. Te quiero mucho. Y por último a mis chicos de 'Los lunes de series', que durante tantos meses nos han hecho empezar la semana mucho mejor. A **Yohanna**, mi Yuyu, una de las personas que más ha aportado en mi filosofía de fluir, dejarse llevar, ser libre. Gracias amor, por los viajes irrepetibles, por tu espíritu aventurero, capaz de contagiarme el amor a la improvisación y por tu maravillosa amistad, te quiero. A **Marie**, mi francesita maña, gracias por la paz que desprendes allá donde vas, por ser tan buena amiga y preocuparte siempre por mí. Hacer yoga contigo, es doblemente relajante. Y a **Nachiño**, mi galleguño, todo corazón. Gracias por estar.

No me puedo olvidar tampoco de otra familia (parece que tengo muchas), mis colegas del Gym Cuellar (ya en extinción) del grupo '**Acero pa' los barcos**', ellos me han dado energía y fuerza cada tarde al salir del labo, me han activado el cuerpo y la mente y además de eso, me han regalado su amistad (junto con un gran puñado de cervezas). Mención especial a los monitores, Jose y Fer, que han conseguido hacerme sonreír sobre la bici de spinning hasta en los peores días. Y a Juan Carlos y Agus, por ser los fundadores del Juechini y darme tan buenos consejos. Especialmente a tí **Agus**, un amigo fiel, de los difíciles de encontrar. Filosofar contigo me ha enseñado a abrir aún más la mente, a ser capaz de 'mirar donde el sabio señala' y 'poder ver el bosque, a pesar de los árboles'. Gracias por todo tu apoyo en las etapas más difíciles de mi vida.

Y a cuatro personas fundamentales en mi vida:

A **Francesca**, mi compañera de trabajo, compañera de piso y sobre todo amiga. Este último año ha sido maravilloso a su lado, incluida una cuarentena. Gracias por estar siempre ahí con una sonrisa y un abrazo, llamando a la puerta de mi habitación para ver como estoy, por tu apoyo incondicional y tus ánimos. Gracias por abrirte a mí y hacerme sentir en este piso, como en un verdadero hogar. Te quiero.

A **Lucas**, mi mitad, mi mejor amigo, fuente de locura desde los 12 años, compañero de viajes y momentos. Siempre presente, siempre agarrándome de la mano. Te quiero.

A **Marti**, la hermana que nunca he tenido. Un vínculo tan fuerte, que traspasa los años, las situaciones, la distancia... y hace que cuando nos veamos, sea como la primera vez, nuestras pilas se carguen y todo fluya. Con pocas personas puedo ser tan yo como con ella. La quiero a morir.

Y a ti **Diego**, por haber aparecido en el momento justo, regalándome el amor más bonito que he sentido nunca. Por tu apoyo infinito en esta última etapa, tu paciencia y tu energía cada día. Por ser mi luz y mi impulso. Por hacerme explotar de alegría a cada momento juntos e incluso en la distancia. 'Y la vida enciende otro cartucho, de tinta color miel y labios encogidos, que imantan lo que no es metal y cruzan por donde no hay camino' Te quiero.

Y gracias a nuestro Varry, por la compañía que me ha hecho durante la escritura. Miau!

La mitad de lo que hemos vivido

Hace más ruido

Que el ruido de un cañón

Física o Química (Despistaos)

Y ahora sí, llega el gran momento, tengo que agradecer infinito más uno, a mi grupo de químicos (**Aitor, Amaya, Anamar, Ainhoa, Badia, Coreo, Diego, Fer, Javi, Jose Antonio, Juan, Llori, Lorena, Leticia, Marcos, Pablo, Rebeca y Regina**). Ellos me han acompañado desde mis inicios en la ciencia y sí o sí, nada, de nada, de nada, hubiera sido posible sin ellos. Me han hecho pasar los mejores años de mi vida, han cambiado mi corazón, mi alma y mi mente. Ver que cada uno sigue su carrera científica y seguimos tan, tan unidos, me hace sentirme la persona más afortunada en la faz de esta tierra (y también vuestra líder). **QUIMIPANDI** siempre eterno. Tan solo 10 años han pasado desde que la vida cruzó nuestros caminos y comenzó a formarse este vínculo, desde entonces hemos vivido momentos inolvidables, millones de viajes por el mundo, nuestras vacaciones de verano y nuestra casa rural obligatoria cada año, cenas, noches y fiestas en el local 'Cierta Ababol' que tantísimos recuerdos guarda en su interior, momentos duros, momentos felices, horas y horas en la biblioteca de ciencias y en la de la CAI y en Filo.... suspensos, aprobados, recuperaciones, amores, desamores, en resumidas cuentas, VIDA. Nunca podre agradeceros lo suficiente lo que me habéis dado y me dais.

A Aitor, por ser mi hermanito y regalarme toda la complicidad y amor, año tras año.

A Anamari, porque su amistad me da verdadera vida y porque es la Chusa, mi Chusi, ella, infinita, como el amor que me da.

A Badi, mi dragón preferido, por ser sinónimo de risas y alma del grupo.

A Ainhoa, química y militar, que cumplió todos sus sueños, dejando una bonita huella en nosotros.

A Cori, mi Cori, pegamento y fuente de música de este grupo, gracias por enseñarme a darle pasión a todo lo que haces, incluso a la amistad.

A Dieguico, por ser mi 'cari tq' en los principios y seguir en los finales.

A Fer, que, aunque es como el Guadiana, es parte indispensable de nuestra historia.

A Javi, mi gafitas, por ser tan puro y bueno, por aportarme siempre la lógica y la paz.

A Jose Antonio, JA, mi osito, por su amistad y apoyo eterno.

A Llori, por todo el cariño que desprende, por ser así conmigo y darme tanto amor.

A Juan, mi Juanico, por todo lo que hemos vivido junto, todas las etapas superadas y cada demasieeee dicho, gracias amigo.

A Leticia, por la antigüedad que nos precede y por todos los momentos vividos.

A Marcos, gracias por estar siempre ahí gitano, eres único.

A Pablo, por ser una pieza indispensable en todos estos años, ser mi apoyo constante y fuente de mi felicidad.

A mi Rebe, por ser la primera y la eterna, por nuestras mil conversaciones, porque te adoro y sin ti me falta algo.

A mi Lore, parte de mi alma, amistad pura, compañera de locuras, te quiero.

Y finalmente, vienen dos de mis pilares, 'la de siempre' y 'la de espíritu'.

Regina, gracias, por estar en cada momento importante de mi vida, desde los tres años, dando el máximo y haciéndome sentir la amistad más férrea y bonita que he tenido en mi vida. Verte crecer y que tu vida forme parte de la mía, es un regalo inmenso que me ha dado el universo. Ojalá por otros 25 años más Pequi, te quiero.

Y Amaya, mi mejor amiga, mi otra mitad, sin ella, me muero, con ella me siento a salvo. Mi cómplice en la vida, compartimos espíritu. Gracias por todo lo que me das cada día, por ser mi compañera de fantasías extremas, por los mil conciertos, por los millones de charlas y consejos, por comprenderme y quererme tal y como soy. No existe mejor complemento a mi locura, que la tuya. Te quiero.

'Cambia tus hojas, pero nunca tus raíces'

La familia, para mí una fuente de sabiduría y unión. También quiero agradecerles hoy a ellos, ser parte de mí. A mis abuelos, **Pepe, Marisa, Emilio y Aurelia**, por criar a vuestros hijos en el esfuerzo y el amor y por poder haberme dado a mí un pedacito de vosotros. A mis tíos, **Emilio, María José, Luis, Blanca y Javier**, por formar parte de mi historia. Y a mis amadas primas, **Mar, Sandra, Beatriz, Belén, Blanca y Pilar**, por enseñarme a abrazar el amor por la familia.

'Para escuchar a tu interior, debes hablar el idioma de los recuerdos'

Felicidad, amor, esfuerzo, olores dulces, calidez, sonrisas, besos a tres, orgullo, fuerza, corazón, la huerta, bondad, sacrificio, compromiso, pasión... son palabras, sitios o sensaciones que me vienen a la mente cuando pienso en mis padres, **Julio y Elena** y en la maravillosa vida que me han dado.

Es una fortuna tener una familia como la mía; mi madre, me ha dejado en herencia su sensibilidad, su gran corazón y sacrificio por los que quiere; mi padre, una energía desbordante, las ganas de arrasarse con todo y la fuerza de un ciclón.

Papis, gracias por apoyarme siempre, sin opción a dudas. Por darme el empujón siempre que lo he necesitado, esperando con una red para ayudarme si hacía falta. Son quien soy gracias a vosotros y a vuestro esfuerzo.

Por eso, esta tesis, es también vuestra, uno de vuestros triunfos, junto con el de hacerme sentir, la hija más afortunada del planeta.

Os quiero con absoluta locura.

Aquí y ahora es lo más parecido a la realidad.

Índice

Abreviaciones	1
Abstract	5
Presentación	7
Capítulo 1: Nanobiosensores enzimáticos basados en la fluorescencia de nanoclusters de oro	15
1.1. Introducción	17
1.2. Planteamiento	21
1.3. Síntesis y caracterización de AuNCs	22
1.3.1. Síntesis de nanoclusters de oro	22
1.3.1.1. Reactivos y disoluciones	22
1.3.1.2. Síntesis de nanocluster de oro con ácido lipoico como ligando (AuNCs@LA)	22
1.3.1.3. Síntesis de nanoclusters de oro con seroalbúmina bovina como ligando (AuNCs@BSA)	23
1.3.2. Caracterización de AuNCs	23
1.3.2.1. Microscopía electrónica.....	23
1.3.2.2. ICP-AES.....	25
1.3.2.3. Fluorescencia	26
1.3.2.4. Electroforesis	30
Sección 1A: Nanobiosensor enzimático basado en la fluorescencia de nanocluster de oro para la determinación de acetilcolina	35
1A.1. Introducción.....	37
1A.2. Objetivos.....	40
1A.3. Experimental y métodos	41
1A.3.1. Reactivos y materiales	41
1A.3.2. Estabilidad de AuNCs en diversas disoluciones amortiguadoras	41
1A.3.3. Bioconjugación de AuNCs@LA con colina oxidasa	41
1A.3.4. Caracterización por fluorescencia de la bioconjugación ChOx- AuNCs@LA.....	42
1A.3.5. Estudio de la relación -moléculas ChOx : AuNCs@LA en la bioconjugación.....	43

1A.3.6. Medidas de espectrometría de absorción atómica de alta resolución de fuente continua con horno de grafito (HR CS GFAAS)	44
1A.3.7. Estudio por fluorescencia de la reacción entre el bioconjugado AuNCs@ChOx y colina	44
1A.3.8. Estudio por fluorescencia del acoplamiento de la reacción acetilcolinaesterasa-acetilcolina, para la determinación indirecta de acetilcolina.	45
1A.4. Resultados.....	46
1A.4.1. Estrategias de biofuncionalización	46
1A.4.1.1. Elección de AuNCs	46
1A.4.1.2. Estudio de la estructura cristalina de la enzima colina oxidasa	46
1A.4.1.3. Planteamiento de la estrategia de biofuncionalización	48
1A.4.1.4. Elección de la disolución amortiguadora para la biofuncionalización	49
1A.4.1.5. Esquema de bioconjugación de AuNCs@LA con colina oxidasa	50
1A.4.2. Bioconjugación de AuNCs@LA con colina oxidasa	50
1A.4.2.1. Estudio de la relación -moléculas ChOx :AuNCs- en la bioconjugación	50
1A.4.2.2. Caracterización por electroforesis de los bioconjugados AuNCs@LA@ChOx	51
1A.4.2.3. Caracterización por fluorescencia de los bioconjugados AuNCs@LA@ChOx	52
1A.4.2.4. Caracterización los bioconjugados mediante HR CS GFAAS.	55
1A.4.3. Variación de la fluorescencia de AuNCs@LA@ChOx durante la reacción enzimática: mecanismo de detección.....	56
1A.4.4. Evaluación del nanobiosensor para la determinación cuantitativa de colina.....	59
1A.4.5. Evaluación del nanobiosensor para la determinación cuantitativa de acetilcolina.	62
1A.5. Conclusiones específicas de la sección 1A.....	66

Sección 1B: Nanoclusters de oro como sondas fluorescentes para la detección de oxígeno en reacciones enzimáticas.....

1B.1. Introducción.....	69
1B.2. Objetivos.....	74
1B.3. Experimental y métodos.....	75
1B.3.1. Reactivos y materiales	75
1B.3.2. Instrumentación y métodos	75
1B.3.2.1. Calibración de la sonda FOXY en disolución y gas.....	75
1B.3.2.2. Efecto de O ₂ en la fluorescencia de AuNCs en disolución.....	75
1B.3.2.3. Medición de los tiempos de vida de AuNCs en disolución.....	76
1B.3.2.4. Inmovilización de AuNCs@LA en soportes de sílica.....	76
1B.3.2.5. Calibración del sensor óptico LuminOx™ en gas y modificación del mismo.	76

1B.3.2.6. Efecto de O ₂ en la fluorescencia de AuNCs@LA inmovilizados en sílica a temperatura ambiente.	77
1B.3.2.7. Seguimiento de la reacción enzimática DAO-cad a partir de la fluorescencia de Ru(bpy) ₃ o AuNCs en disolución	78
1B.3.2.8. Evaluación de la fluorescencia de AuNCs en papeles comerciales	78
1B.3.2.9. Seguimiento de la reacción enzimática DAO-cad a partir de la fluorescencia de Ru(bpy) ₃ o AuNCs en papel comercial 142.	79
1B.3.2.10. Entrampamiento de AuNCs y DAO en soportes de celulosa.	79
1B.3.2.11. Efecto de O ₂ en la fluorescencia de AuNCs@LA inmovilizados en sílica a altas temperaturas.	79
1B.4. Resultados.....	81
1B.4.1. Calibración de sensores de oxígeno FOXY-R y Luminox.	81
1B.4.2. Obtención de los parámetros fluorimétricos de AuNCs.....	82
1B.4.2.1. Evaluación de la estabilidad y fotoblanqueo de AuNCs.	82
1B.4.2.2. Medida de los tiempos de vida (τ) de fluorescencia de AuNCs	82
1B.4.2.3. Medida del rendimiento cuántico (ϕ) de AuNCs.....	83
1B.4.3. Desactivación de la fluorescencia de AuNCs en disolución.	84
1B.4.3.1. Medida de la eficiencia de desactivación (γ) de O ₂ en la fluorescencia de AuNCs85	
1B.4.4. AuNCs como sondas de O₂ en fase gas	87
1B.4.5. Acoplamiento de AuNCs como sensores de oxígeno en reacciones enzimáticas: aplicación a la determinación de ABs.	89
1B.4.5.1. Seguimiento de la reacción enzimática DAO-cad a partir de la fluorescencia de Ru(bpy) ₃ o AuNCs en disolución.....	90
1B.4.5.2. Evaluación de fluorescencia de AuNCs@BSA en papeles comerciales	91
1B.4.5.3. Seguimiento de la reacción enzimática DAO-cad a partir de la fluorescencia de Ru(bpy) ₃ o AuNCs@BSA en papel comercial.....	93
1B.4.5.4. Evaluación de fluorescencia de soportes de celulosa con AuNCs y DAO entrampados, para la determinación de cadaverina.	94
1B.4.6 AuNCs como sondas de O₂ a alta temperatura.	96
1B.5. Conclusiones específicas de la sección 1B	1000
Anexo Sección 1B: Síntesis y caracterización de AuNPs estabilizadas por óxidos de oro.....	103
A.1B.1. Síntesis térmica en disolución	105
A.1B.2. Caracterización de las propiedades ópticas	105
A.1B.3. Caracterización de otras propiedades físicas	107
A.1B.4. Caracterización por espectrometría XPS.....	108
A.1B.5. Aplicaciones a dispositivos electrónicos moleculares.....	111

1.4. Conclusiones y análisis crítico del capítulo 1. Perspectivas de futuro.	113
1.5. Bibliografía	118

Capítulo 2: Métodos enzimáticos para la síntesis de nanopartículas de oro y su aplicación al desarrollo de nanobiosensores..... 127

2.1. Introducción	129
2.2. Planteamiento	133
2.3. Experimental	134
2.3.1. Reactivos y materiales.....	134
2.3.2. Instrumentación	134

Sección 2A: Modelo de síntesis *in situ* de nanomateriales de oro a partir de los residuos reductores de la enzima L-aminoácido oxidasa..... 135

2A.1. Introducción.....	137
2A.2. Objetivos.....	140
2A.3. Experimental y métodos	141
2A.3.1. Síntesis de AuNCs estabilizados por L-aminoácido oxidasa.....	141
2A.3.2. Caracterización de AuNCs/AuNPs formadas por electroforesis en gel de agarosa y fluorescencia.....	141
2A.3.3. Evaluación fluorescente de la reacción enzimática de las nanopartículas estabilizados por L-aminoácido oxidasa y su sustrato L-fenilalanina.	141
2A.4. Resultados.....	142
2A.4.1. Estudio de la estructura y residuos aminoácidos de la enzima LAAO.	142
2A.4.2. Optimización de la síntesis de AuNPs estabilizados por L-aminoácido oxidasa.....	143
2A.4.3. Caracterización y seguimiento de las propiedades ópticas de AuNMs@LAAO sintetizados.	143
2A.4.4. Caracterización de AuNMs@LAAO.	147
2A.4.5. Conclusiones y mecanismo de síntesis de AuNMs@LAAO.....	150
2A.4.6. Estabilidad y propiedades ópticas de AuNMs@LAAO a pH 7.5.	151
2A.4.7. Estudio por fluorescencia de la reacción enzimática entre AuNMs@LAAO y L-fenilalanina.	152
2A.5. Conclusiones específicas de la sección 2A.....	155

Sección 2B: Formación de nanopartículas de oro como indicador de métodos enzimáticos: determinación colorimétrica de L-fenilalanina..... 157

2B.1. Introducción.....	159
-------------------------	-----

2B.2. Objetivos	162
2B.3. Experimental y métodos	163
2B.3.1. Screening en placa	163
2B.3.2. Optimización en cubeta	163
2B.3.3. Estudio de caracterización analítica: parámetros de calidad e interferencias.....	163
2B.4. Resultados.....	164
2B.4.1. Estudio y optimización del orden de adición de los reactivos: LAAO, L-fenilalanina y Au(III)	164
2B.4.2. Mecanismo de la reacción enzimática LAAO- L-fenilalanina en presencia de Au (III).164	
2B.4.3. Optimización de la síntesis de AuNPs para la determinación colorimétrica de L-fenilalanina	166
2B.4.3.1. Screening en placa	166
2B.4.3.2. Optimización en cubeta.....	174
2B.4.4. Estudio de calibración del método para la determinación de L-Phe.....	177
2B.4.5. Linealización del ajuste sigmoideo y parámetros de calidad analítica del método....	181
2B.4.6. Estudio de interferencias en el método.	184
2B.5. Conclusiones específicas de la sección 2B	186
2.4. Conclusiones y análisis crítico del capítulo 2. Perspectivas de futuro.	187
2.5. Bibliografía	189

Capítulo 3: Nanoprismas de oro como transductores para el desarrollo de inmunosensores fototérmicos plasmónicos	193
3.1. Introducción	195
3.2. Planteamiento	201
3.3. Optimización de métodos y obtención de materiales comunes.....	204
3.3.1. Optimización del Inmunoensayo ELISA sándwich colorimétrico para los distintos biomarcadores diana de cáncer gastrointestinal.	204
3.3.1.1 Experimental.....	205
3.3.1.2. Resultados	206
3.3.2. Síntesis, derivatización, purificación y caracterización de AuNPrs.....	215
3.3.2.1. Experimental.....	215
3.3.2.2. Resultados	219
3.3.3. Bioconjugación de AuNPrs a estreptavidina y al anticuerpo de detección biotinilado.224	
3.3.3.1 Experimental.....	225
3.3.3.2. Resultados	228

3.3.4. Conclusiones.....	230
Sección 3A: Nano-inmunoensayo térmico (TermoLISA) para la detección de marcadores cancerígenos gastrointestinales	
3A.1. Introducción.....	231
3A.2. Objetivos.....	234
3A.3. Experimental y métodos.....	235
3A.3.1. Protocolo inmunoensayo sandwich TermoLISA	235
3A.3.2. Lectura del inmunoensayo TermoLISA: montaje instrumental, configuración y emisividad cámara IR.....	235
3A.3.3. Optimización del bioconjugado AuNPrs@estreptavidina mediante TermoLISA sándwich.....	236
3A.3.4. Optimización de la concentración de anticuerpo de detección biotinilado (CEA, VEGF y CA19.9) unida al bioconjugado AuNPrs@estreptavidina mediante TermoLISA.....	236
3A.4. Resultados.....	238
3A.4.1. Optimización de la emisividad de la cámara IR	238
3A.4.2. Análisis de la señal térmica.	239
3A.4.3. Optimización del bioconjugado AuNPrs@estreptavidina mediante TermoLISA sándwich.....	240
3A.4.4. Optimización de la concentración de anticuerpo de detección biotinilado (CEA, VEGF y CA19.9) unida al bioconjugado AuNPrs@estreptavidina mediante TermoLISA.....	243
3A.4.5. Propiedades analíticas del método TermoLISA sándwich para la determinación cuantitativa de marcadores de cáncer gastrointestinal.....	246
3A.4.6. Aplicación del método TermoLISA sandwich a la detección de marcadores de cáncer gastrointestinal en plasma.....	249
3A.5. Conclusiones específicas de la sección 3A.....	252
Sección 3B: Nano-inmunoensayo térmico de fluorescencia resuelta en el tiempo (TermoTRFIA) para la detección de exosomas	
3B.1. Introducción.....	255
3B.2. Objetivos.....	262
3B.3. Experimental y métodos:.....	263
3B.3.1. Producción y aislamiento de bacteriófagos M13 H6:	263
3B.3.2. Unión covalente de AuNPrs a los bacteriófagos H6:.....	264
3B.3.3. Protocolo inmunoensayo TRFIA y TermoTRFIA:	265
3B.3.4. Lectura inmunoensayo TRFIA y TermoTRFIA:.....	265
3B.4. Resultados.....	267
3B.4.1. Estudio previo del calentamiento de AuNPrs con el láser portátil.....	267

3B.4.2. Estudio previo de la transferencia de energía de AuNPRs y Europio: efecto del calentamiento en la señal fluorescente.....	267
3B.4.3. Optimización de la concentración de Nb-fagos M13 H6 en TRFIA mejorado y TermoTRFIA.	268
3B.4.4. Evaluación de la unión de Nb-fago – AuNPRs y parámetros analíticos del método TermoTRFIA	272
3B.5. Conclusiones específicas de la sección 3B	274

Sección 3C: Inmunosensor térmico de flujo lateral (TermoLFIA) para la detección de marcadores cancerígenos gastrointestinales.....

3C.1. Introducción.....	277
3C.2. Objetivos.....	283
3C.3. Experimental y métodos.....	284
3C.3.1. Fabricación tiras TermoLFIA.....	284
3C.3.2. Procedimiento evaluación de las tiras TermoLFIA.....	287
3C.3.3. Sistema irradiación láser: análisis térmico	287
3C.4. Resultados.....	289
3C.4.1. Optimización de las condiciones y selección de materiales para la fabricación de las tiras TermoLFIA.	289
3C.4.1.1. Pad de muestra/conjugado	289
3C.4.1.2. Pad de absorción	295
3C.4.1.3. Nitrocelulosa.....	295
3C.4.2. Optimización de las condiciones de deposición por spray del bioconjugado.....	298
3C.4.3. Evaluación y acoplamiento del papel termosensible	299
3C.4.4. Lectura de la señal analítica RGB en papel termosensible	301
3C.4.5. Características analíticas del método TermoLFIA para la detección de marcadores cancerígenos gastrointestinales en PBS.....	302
3C.4.5.1. Cuantificación TermoLFIA de CEA.....	302
3C.4.5.2. Cuantificación TermoLFIA de VEGF.....	304
3C.4.5.3. Cuantificación TermoLFIA de CA19.9.....	307
3C.4.6. Características analíticas del método TermoLFIA para la detección de marcadores cancerígenos gastrointestinales en plasma sanguíneo humano.	309
3C.4.6.1. Diseño de tira.....	310
3C.4.6.2. Optimización de la disolución amortiguadora de dilución del plasma.....	313
3C.5. Conclusiones específicas de la sección 3C	316
3C.6. Anexo 3C.....	319

3.4. Conclusiones y análisis crítico del capítulo 3. Perspectivas de futuro. 321
3.5. Bibliografía 325

Conclusions..... 333

Thesis summary: Photonic applications of gold nanomaterials in the
development of enzymatic and immunological biosensors 339

Chapter 1: Enzymatic nano(bio)sensors based on the fluorescence of gold nanoclusters. ...341

Chapter 2: Enzymatic in situ synthesis of gold nanoparticles and their application on the
development of nanobiosensors.....345

Chapter 3: Gold nanoprisms as transducers for the development of photothermal plasmonic
immuno-nanobiosensors348

Publicaciones..... 355

Abreviaciones

Ab Anticuerpo

Ab_{cap} Anticuerpo de captura

Ab_{det} Anticuerpo de detección

ABs Aminas biógenas

ABTS Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolona-6-sulfónico)

ACh Acetilcolina

AChE Acetilcolinaesterasa

AuNCs Nanoclusters de oro

AuNCs@BSA Bioconjugado de nanoclusters de oro con seroalbúmina bovina

AuNCs@ChOx Bioconjugado de nanoclusters de oro con colina oxidasa

AuNCs@LA Bioconjugado de nanoclusters de oro con ácido lipoico

AuNCs-c Nanoclusters de oro control

AuNMs Nanomateriales de oro

AuNMs@LAAO Nanomateriales de oro encapsulados en L-aminoácido oxidasa

AuNPrs Nanoprismas de oro

AuNPs Nanopartículas de oro

AuONPs Nanopartículas estabilizadas por óxidos de oro

Bcontrol Bioconjugado control

BSA Seroalbúmina bovina

CA19.9 Antígeno carbohidrato 19.9

Cad Cadaverina

CEA Antígeno carcinoembrionario

Ch Colina

ChOx Colina oxidasa

ChOx-c Colina oxidasa control

CNT Nanotubos de carbono

DAO Diamino oxidasa

DER Desviación estándar relativa

EDC 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida

Abreviaciones

ELISA Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas

EV Vesículas extracelulares

FAD Flavín adenín dinucleótido

FRET Transferencia de energía de resonancia de Föster

GB Glicín betaina

GOx Glucosa oxidasa

HPLC Cromatografía líquida de alta eficacia

HR CS GFAAS Espectrometría de absorción atómica de alta resolución de fuente continua con horno de grafito

HRP Peroxidasa de rábano picante

ICP-AES Espectrometría atómica de emisión con fuente de Plasma de Acoplamiento Inductivo

K_{sv} Constante de extinción Stern-Volmer

LAAO L-aminoácido oxidasa

LC Límite de cuantificación

Lc Línea control

LD Límite de detección

L-Phe L-fenilalanina

LSPR Resonancia de plasmón superficial localizado

Lt Línea test

MES Ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico

MNP Nanopartículas magnéticas

NaP Dihidrofosfato de sodio

Nb Nanobody

NC Nitrocelulosa

NIR Región espectral del infrarrojo cercano

NPs Nanopartículas

OD Densidad óptica

PAA Poliacrilamida

PAGE Electroforesis en gel de poliacrilamida

PAH Fenilalanina hidroxilasa

PBS Disolución amortiguadora de fosfato salino

PCa Cancer de próstata

PDB Protein data bank

PEG Polietilenglicol

PKU Fenilcetonuria

POC Point of care

QD Quantum dots

SDS Dodecilsulfato sódico

SEM Microscopía electrónica de barrido

STEM Microscopía electrónica de transmisión y barrido

Sulfo-NHs Sal de sodio hidroxisulfosuccinimida

TEM Microscopía electrónica de transmisión

TermoLFIA Inmunosensor térmico de flujo lateral

TermoLISA Nano-inmunoensayo térmico

TermoTRFIA Nano-inmunoensayo térmico de fluorescencia resuelta en el tiempo

TLC Cromatografía de capa fina

TMB 3, 3', 5, 5'-tetrametribencidina

TRIS Tris(hidroximetil)aminometano

TS Termosensible

UV-vis Ultravioleta visible

VEGF Factor de crecimiento endotelial vascular SEM

XPS Espectroscopia de fotoelectrones emitidos por rayos X

λ_{em} Longitud de onda de emisión

λ_{ext} Longitud de onda de excitación

Abstract

The aim of this PhD Thesis is the application of the optical properties of gold nanomaterials in the development of photonic biosensors for the determination of clinically relevant biomarkers. During this work, various gold nanomaterials have been synthesized, characterized and implemented in different biosensing schemes using both enzymes and antibodies as biological recognition elements. In fact, it was possible to develop novel nanobiosensing schemes with better analytical characteristics than the traditional ones, such as improved sensitivity and point-of-care adaptability. In all cases, the great selectivity reached was based on the selection of appropriate biological receptors for each target analyte and the optimization of their oriented binding to the corresponding nanomaterial. This allowed ensuring the most effective transduction between the biological recognition and the photonic mechanisms involved in each case.

In particular, in this Thesis, new enzymatic nanobiosensors were developed using gold nanoclusters as Vis-NIR luminescent labels, avoiding the drawbacks of conventional fluorophores, such as chemical degradation and the existence of spectral interferences in biological samples. For this, two lines of research were explored; a) the covalent binding of gold nanoclusters close to the active site of a redox enzyme to promote an energy transfer phenomena that allow the fluorescent determination of the target analytes, and b) to take advantage of the quenching of gold nanoclusters fluorescence by oxygen to monitor oxidoreductase enzymatic reactions.

The design of gold nanomaterials by means of directed and specific synthesis with biological recognition ligands (enzymes) was also proposed to explore two different NP-synthetic driven sensory concepts: a) the in-situ synthesis of gold nanomaterials by means of the reducing residues of the enzyme and b) the formation of gold nanoparticles taking advantage of the redox properties of the enzyme triggered by its interaction with the substrate. In all cases, the optical signal of the generated nanomaterial is related to the concentration of the target analyte.

Finally, this Thesis has also explored the development of photothermal plasmonic immunonanosensors, based on the use of gold nanoprism bound to antibodies which can act as physicochemical transducers of the biological recognition of the analyte generating a quantifiable thermal signal. The use of gold nanoprism as thermal labels was implemented in biosensing schemes commonly used and therefore well accepted in the clinic (ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, and LFIA: lateral flow immunoassay). This allowed the development of a novel thermal-based concept of these traditional biosensing schemes (Thermo-LISA and Thermo-LFIA) with not only better analytical characteristics but also with real possibilities of transference to the market in the short-medium term.

The optimization and the evaluation of the analytical response of the developed nanobiosensors, has allowed the quantitative determination of relevant analytes for cancer detection (gastrointestinal and prostate cancer biomarkers), control food quality (biogenic amines) and for other biomedical applications such as the determination of neurotransmitters (acetylcholine), and amino acids (L-phenylalanine) related to specific diseases.

Presentación

Los *biosensores* se definen como dispositivos analíticos basados en reacciones bioquímicas específicas, capaces de detectar en tiempo real y con una alta sensibilidad y selectividad agentes químicos y biológicos. Sus elementos principales son: un *receptor biológico o reactivo de biorreconocimiento* (enzimas aisladas, aptámeros de ADN, inmunosistemas, tejidos, orgánulos o células completas) preparado para reconocer específicamente un analito por interacciones biomoleculares y un *transductor físico-químico*, capaz de interpretar el reconocimiento biológico y ‘traducirlo’ en una señal cuantificable, proporcional a la concentración de analito, que después puede ser comunicada a un *detector*, donde se amplifica y analiza la señal.

El diseño de nuevos biosensores es parte esencial en el campo del diagnóstico y la detección ultrasensible en el ámbito clínico, se trata de métodos en constante crecimiento que han de adaptarse a los retos sanitarios actuales. En las últimas décadas este campo ha sido testigo de un rápido desarrollo enfocado en la mejora y diseño de nuevos biosensores, junto con la búsqueda de alternativas a los métodos analíticos más tradicionales como el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), la espectrometría de masas y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Estos métodos clásicos son altamente sensibles y permiten la cuantificación del analito a detectar de forma específica, sin embargo, necesitan de personal cualificado para su uso y son métodos costosos en tiempo y dinero. Por ello, la atención se ha centrado en el uso de biosensores para análisis específicos mediante la unión selectiva a compuestos diana, algunos ejemplos de este tipo de dispositivos rápidos y de fácil uso son los inmunoensayos de flujo lateral (LFIA), sensores electroquímicos o chip sensores basados en espectroscopía Raman de superficie mejorada (SERS) (**Figura 1**). Sin embargo, las plataformas de detección actualmente desarrolladas a menudo aún no son lo suficientemente rápidas o robustas y en muchos casos solo permiten la detección cualitativa o semicuantitativa.

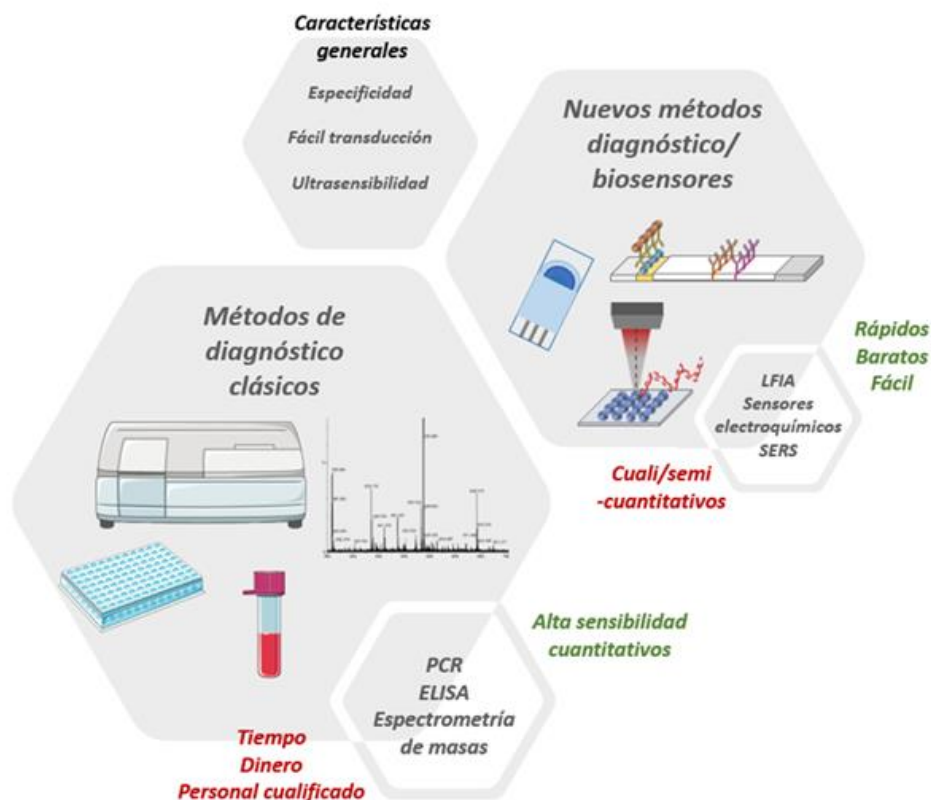


Figura 1: Características generales, ventajas y desventajas de los métodos de diagnóstico clínico clásicos, nuevos métodos y biosensores.

En este contexto, el uso de las propiedades ópticas de los nanomateriales ha abierto nuevas y prometedoras líneas de investigación para el desarrollo de nuevos sistemas transductores ópticos. Sus dimensiones que varían en la escala nanométrica, muestran características estructurales, químicas, ópticas y mecánicas únicas debido al efecto de confinamiento cuántico, su gran relación superficie/masa y su capacidad para interactuar con biomoléculas como proteínas, ácidos nucleicos, lípidos e incluso metabolitos biológicos. Cuando un nanomaterial actúa como transductor físico-químico, se aplica el término *nanobiosensor*, que se refiere a aquellos sensores cuyas propiedades vienen controladas por la escala nanotecnológica con la que están fabricados.

La implementación de las propiedades ópticas de determinadas nanopartículas (NP) en dispositivos sensores ha supuesto una gran innovación en el campo del diagnóstico molecular, proporcionando herramientas necesarias para la mejora en la sensibilidad y selectividad de los métodos ya existentes. El empleo de nanobiosensores en el sector clínico aporta las ventajas de rapidez en el análisis, de fácil manejo por parte de personal no especializado, reducidos volúmenes de muestra, alto grado de automatización y su carácter portátil y desechable, consiguiendo nuevas plataformas más integradas y miniaturizadas donde tienen lugar complejas reacciones químicas y bioquímicas. La capacidad de multi-detección y monitorización *in vivo* son otras de las características que les hace interesantes en diversas aplicaciones biomédicas y biotecnológicas

Los nanomateriales se incorporan generalmente en la zona de reconocimiento biológico, por lo que pueden actuar como soporte sólido del biorreceptor o como indicador. De esta manera, los nanobiosensores ópticos utilizan nanopartículas metálicas unidas a biomoléculas para promover el biorreconocimiento en su superficie. La interacción de estas con el analito produce el cambio en las propiedades ópticas de los nanomateriales dando lugar a una señal óptica cuantificable capaz de amplificar la señal biológica.

Las NP metálicas, en particular los nanomateriales de oro (AuNMs), excitados con la longitud de onda adecuada (generalmente UV-vis o vis-NIR), producen fuertes bandas de absorción y alta dispersión de la radiación. Estas bandas se deben al acoplamiento de los electrones de conducción, ubicados en la superficie del nanomaterial, y producen el fenómeno conocido como resonancia de plasmón superficial localizado (LSPR). Los AuNM también se pueden utilizar como aceptores de fluorescencia, altamente eficientes en procesos de transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET) o desactivación de fluorescencia, debido a sus mayores rendimientos cuánticos y su mayor eficiencia de desactivación en un amplio rango espectral. Los factores clave en este tipo de procesos ópticos son la distancia entre la nanopartícula y la biomolécula de reconocimiento y su interacción con el analito.

La incorporación de AuNM en el receptor biológico, proporciona la capacidad de miniaturización y fabricación de biosensores '*Point of care*' (POC) y tiene su principal impacto en los sistemas de diagnóstico debido a su capacidad para proporcionar nuevos esquemas indicadores. Representan una mejora en la sensibilidad, estabilidad y biocompatibilidad con respecto a los métodos colorimétricos y fluorimétricos convencionales. En consecuencia, los AuNM pueden conducir al desarrollo de biosensores ópticos para el seguimiento *in vivo* de parámetros de interés biomédico y biotecnológico.

El diseño de estos dispositivos requiere considerar aspectos importantes como:

- 1) La elección de nanomateriales con propiedades ópticas adecuadas para ser utilizados como indicadores y para resolver los problemas presentes en cada aplicación (interferencias biológicas, falta de sensibilidad, no selectividad...)
- 2) Selección de un receptor bioquímico apropiado como base para el reconocimiento biológico.
- 3) Estrategias de unión nanomaterial-receptor: el nanomaterial debe estar unido al receptor de forma estable y garantizando la sinergia entre sus propiedades ópticas y su reactividad.
- 4) Base física de la transducción: conocimiento de la señal analítica óptica y su relación con la interacción biológica y la concentración del analito a determinar.

Bajo estas premisas, el objetivo de esta Tesis Doctoral es la utilización de las propiedades ópticas de AuNM en el desarrollo de biosensores fotónicos para la determinación de sustancias de interés biomédico. Se centra, por un lado, en el desarrollo de nuevos *esquemas de detección y estrategias de inmovilización*, para el desarrollo de nanobiosensores reversibles o desechables, que puedan aplicarse a la determinación “in situ” de analitos de interés clínico en muestras biológicas complejas como la sangre. Por otro lado, con respecto al nanodiagnóstico, se centra en la *utilización de las propiedades ópticas de AuNMs* para mejorar los límites de detección de marcadores que permitan la identificación de enfermedades, en sus estadios iniciales a nivel celular o molecular. Se pretende mostrar como la fabricación de nuevos nanodispositivos sencillos y accesibles para la población, puede permitir la identificación temprana de patologías a través de la detección ultrasensible, lo que permitiría una rápida capacidad de respuesta y la inmediata aplicación del tratamiento adecuado, ofreciendo así mayores posibilidades de curación a los pacientes.

Para ello durante este trabajo, se han sintetizado y caracterizado varios AuNMs y se han implementado en reacciones enzimáticas específicas o inmunoensayos. La selectividad de estos sistemas se centra en la selección de los receptores biológicos apropiados y el estudio de estrategias de unión dirigidas a AuNM, considerando el proceso óptico de transducción del reconocimiento biológico y los mecanismos fotónicos involucrados. La optimización y la evaluación de la respuesta analítica de los diferentes nanobiosensores ha permitido la determinación cuantitativa del analito.

En cada uno de los capítulos se abarcan diferentes retos que responden a necesidades específicas en el ámbito clínico. Sin embargo, esta tesis pretende también presentar las nuevas metodologías de detección desarrolladas y aplicadas a casos modelo específicos, como nuevos métodos rápidos diagnósticos adaptables a la detección de cualquier otro analito. Así, esta tesis doctoral busca abrir nuevos horizontes en el diseño de biosensores, a través del estudio y conocimiento en profundidad de la interacción biológica determinada y la implementación al biorreconocimiento de AuNMs que actúan como transductor óptico. Las diversas estrategias presentadas buscan lograr un efecto sinérgico entre la capacidad fotónica de los nanomateriales y la especificidad del receptor biológico, en aras de lograr dispositivos analíticos novedosos, específicos y altamente sensibles.

La presente Tesis Doctoral está dividida en tres capítulos, en los que se abordan diversos sistemas de transducción e interacción biológica, cuyo resumen se muestra en la **Figura 2**. El capítulo 1 y 2 trata del desarrollo de biosensores enzimáticos con transducción óptica basada en la fluorescencia (Capítulo 1 y 2) y en la resonancia de plasmón superficial localizado (Capítulo 2) de dos tipos de AuNM, nanocluster de oro (AuNCs) y nanopartículas de oro (AuNPs). El capítulo 3 se centra en el desarrollo de biosensores inmunológicos con transducción termométrica, utilizando las propiedades ópticas de otro tipo de AuNMs, los nanoprismas de oro (AuNPrs). La optimización y la evaluación de la respuesta analítica de los distintos nanobiosensores desarrollados, se aplica a la determinación cuantitativa de analitos de importancia para la detección del cáncer (marcadores de cáncer gastrointestinal y de próstata), control de calidad de alimentos (aminas biogénicas) y para otras aplicaciones biomédicas como la determinación de neurotransmisores (acetilcolina) y aminoácidos (L-fenilalanina), relacionados con enfermedades específicas.

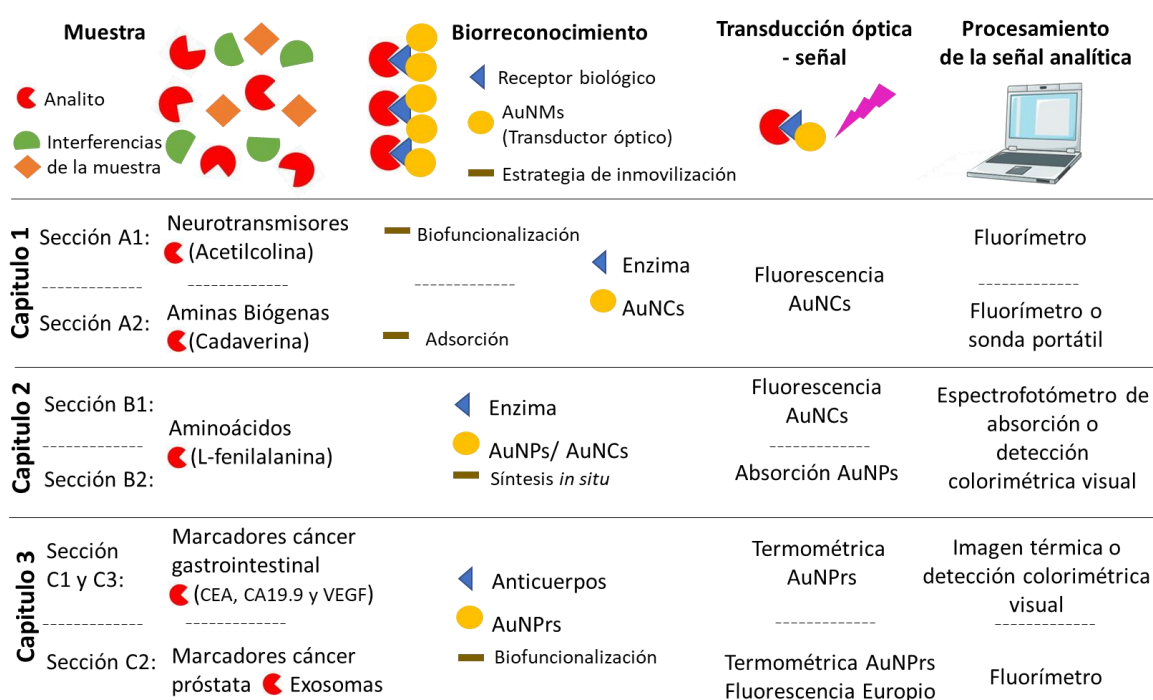


Figura 2: Aplicación de las propiedades ópticas de AuNMs en el desarrollo de los biosensores fotónicos descritos en esta Tesis Doctoral.

Cada uno de los capítulos presenta un apartado de planteamiento general y sus correspondientes secciones cuentan con un apartado de objetivos específicos y conclusiones. Además, al final de cada capítulo se presenta una sección de análisis crítico del mismo y perspectivas futuras de las metodologías desarrolladas.

Capítulo 1: Nano(bio)sensores basados en la fluorescencia de nanoclusters de oro

En este capítulo se estudian las posibilidades de los AuNCs con fluorescencia Vis-NIR en el desarrollo de nanobiosensores para la determinación analítica de pequeñas moléculas de interés biomédico. La base de estos sistemas se centra en la variación de las propiedades fluorescentes de los AuNCs debido a su interacción con las moléculas implicadas en la reacción

bioquímica. El uso de AuNCs en estos sistemas busca aprovechar las ventajas de estos nanomateriales frente al uso de fluoróforos convencionales que pueden presentar problemas como la degradación química, la existencia de interferencias espectrales en muestras biológicas (minimizadas al usar detección en la región Vis-NIR) y en muchos casos baja biocompatibilidad.

En él se profundiza sobre las interesantes propiedades de estos nanomateriales y su clasificación, junto con la síntesis y caracterización de diferentes tipos de AuNCs, utilizados a lo largo de las dos secciones en las que está dividido el capítulo. Estas secciones abordan fundamentalmente dos líneas de investigación:

1. La unión dirigida de AuNCs, previamente sintetizados, cerca del sitio activo de la enzima (receptor biológico) para propiciar fenómenos de transferencia de energía que permitan la determinación fluorescente de analitos de interés biomédico. ***“Sección 1A: Nanobiosensor enzimático basado en la fluorescencia de nanocluster de oro para la determinación de acetilcolina”***
2. Utilizar la desactivación que provoca el oxígeno sobre la fluorescencia de los AuNCs para el seguimiento de reacciones enzimáticas. Utilizando estos AuNMs como sondas fluorescentes. ***“Sección 1B: Nanoclusters de oro como sondas fluorescentes para la detección de oxígeno en reacciones enzimáticas”.***

Capítulo 2: Métodos enzimáticos para la síntesis de nanopartículas de oro y su aplicación al desarrollo de nanobiosensores

En este capítulo se evalúa el diseño de AuNMs mediante su síntesis dirigida y específica con los ligandos de reconocimiento biológico. Así, el seguimiento de las propiedades ópticas de los AuNPs sintetizados durante la interacción con el compuesto de reconocimiento biológico, permite el desarrollo de nuevas técnicas mixtas sintético-sensoras muy interesantes, en las que la señal óptica de las nanopartículas generadas es proporcional a la concentración del compuesto objetivo.

El capítulo está dividido en 2 secciones en las que se proponen dos métodos sintético-sensoras de AuNMs:

1. La síntesis in situ de nanomateriales de oro a partir de los residuos reductores de una enzima; ***“Sección 2B: Modelo de síntesis in-situ de nanopartículas y nanocluster de oro a partir de los residuos reductores de la enzima L-aminoácido oxidasa.”***
2. La formación de nanopartículas de oro, a partir de las propiedades redox de la enzima y su interacción con el sustrato, como indicador de reacciones enzimáticas; ***“Sección 2C: Formación de nanopartículas de oro como indicador de métodos enzimáticos: determinación colorimétrica de L-fenilalanina.”***

Capítulo 3: Nanoprismas de oro como transductores para el desarrollo de inmunosensores fototérmicos plasmónicos

El objetivo de este capítulo se centra en evaluar las propiedades fototérmicas de los AuNPRs en el desarrollo de nueva tecnología de termodetección. Su utilización en el diseño de nanobiosensores se aplica a la detección de cáncer, mediante la cuantificación de los diversos

marcadores cancerígenos seleccionados. El principal reto de este capítulo se centra en la detección inmunológica específica y precoz de estas proteínas, mediante el desarrollo de nuevos métodos analíticos donde los AuNPrs ligados a un receptor biológico pueden actuar como transductores físico-químicos, interpretando el reconocimiento biológico con el analito como una señal térmica cuantificable.

Este capítulo abarca dos alternativas conceptuales diferentes aplicadas a tres formatos de inmunoensayo (Sección A, B y C):

1. Una nueva metodología similar al clásico ensayo colorimétrico ELISA pero con un sistema de detección diferente, utilizando los AuNPrs como etiquetas térmicas y aplicado a dos tipos de muestras; ***“Sección 3A: Nano-inmunoensayo térmico (TermoLISA) para la detección de marcadores cancerígenos gastrointestinales”***; y la combinación de la metodología TermoLISA con la detección fluorescente (inmunoensayos de fluorescencia resuelta en el tiempo, TRFIA), ***“Sección 3B: Nano-inmunoensayo térmico de fluorescencia resuelta en el tiempo (TermoTRFIA) para la detección de exosomas”***.
2. Un innovador y sensible biosensor de transducción térmica basado en un inmunoensayo de flujo lateral (LFIA) para la detección rápida y la cuantificación de concentraciones de proteínas ultrabajas. ***“Sección 3C: Inmunosensor térmico de flujo lateral (TermoLFIA) para la detección de marcadores cancerígenos gastrointestinales.”***

Capítulo 1

Nanobiosensores enzimáticos basados en la fluorescencia de nanoclusters de oro

1.1. Introducción

Los nanoclusters de oro (AuNCs) son nanoestructuras metálicas formadas por agrupaciones de unos cientos de átomos y que presentan un gran atractivo en la investigación debido a sus especiales propiedades físico-químicas, como su estructura molecular bien definida, transiciones electrónicas discretas, carga cuantificada, una relación superficie-volumen muy elevada, magnetismo, quiralidad óptica y luminiscencia.¹ Estas propiedades de fluorescencia y su buena biocompatibilidad les han hecho ser ampliamente utilizados en variedad de aplicaciones médicas como bioimagen, biosensores, agentes antimicrobianos y terapia del cáncer.²

Los nanocluster metálicos normalmente tiene una estructura core-shell (**Figura 1.1**), que se compone de un núcleo de metal cuyo tamaño variable es crucial para las propiedades catalíticas de los clusters y un ligando orgánico (biomoléculas, polímeros y dendrímeros) o ligandos con diferentes tamaños, grupos funcionales y cargas superficiales, que interactúan directamente con el sistema biológico y por tanto controlan la biocompatibilidad de los nanocluster.³ Estos ligandos, además, controlan su estabilidad coloidal, actuando como agente de 'capping' y evitando su agregación.

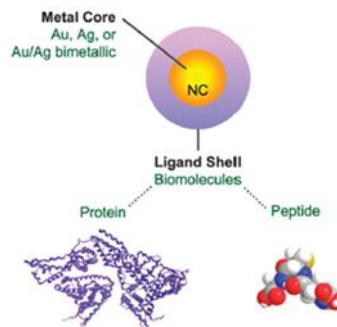


Figura 1.1: Esquema de la estructura core-shell de nanoclusters, con centro metálico (Au/Ag) y ligandos proteicos o peptídicos.⁴

Además, sus propiedades fluorescentes; longitudes de onda de emisión, desplazamientos de Stokes y rendimientos cuánticos, son modulables y dependen tanto de su tamaño como de los agentes estabilizantes o ligandos utilizados durante su bio-síntesis química.⁵ (**Figura 1.2**).

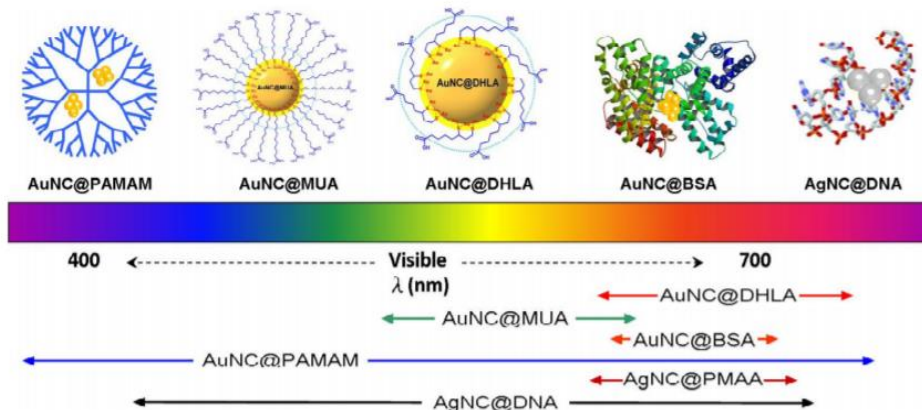


Figura 1.2: Longitud de onda de emisión de nanoclusters metálicos fluorescentes protegidos por diversas moléculas que muestra la capacidad modulable de sus propiedades ópticas.⁵

En la última década, se han sintetizado gran variedad AuNMs con propiedades luminiscentes, de tamaños variables que van de 0,3 a 20 nm, y aunque no existe un mecanismo único que explique su fluorescencia, en la bibliografía se proponen tres tipos de nanomateriales de según el mecanismo involucrado (Figura 1.3)⁶:

1) AuNCs luminiscentes de pocos átomos: su fluorescencia es debida a transiciones energéticas entre los orbitales del Au. Estas bandas de fluorescencia dependen del tamaño del cluster, existiendo una relación teórica entre este y el desplazamiento Stokes, siguiendo el clásico 'modelo jellium'⁷. Este tipo de AuNCs suele generar bandas de fluorescencia de longitud de onda más corta (en torno a 400-450 nm). Un ejemplo son los AuNCs de pocos átomos encapsulados por dendrímeros⁸ como los AuNCs@PAMAN con recubrimiento de poli(amidoamina).

2) AuNCs luminiscentes de pocos nanómetros: su fluorescencia es debida a transiciones S-Au y/o interacciones de superficie del Au (I). Estos AuNCs tienen tamaños nanométricos pequeños, carga superficial y su fluorescencia se caracteriza por poseer una longitud de onda de emisión no dependiente del tamaño, pero sí de la naturaleza del elemento X del enlace X-Au, donde X es azufre, nitrógeno, fósforo... o el correspondiente ligando que estabiliza el AuNC. Estas bandas fluorescentes aparecen más frecuentemente en la zona Vis-NIR (500-800 nm).⁹

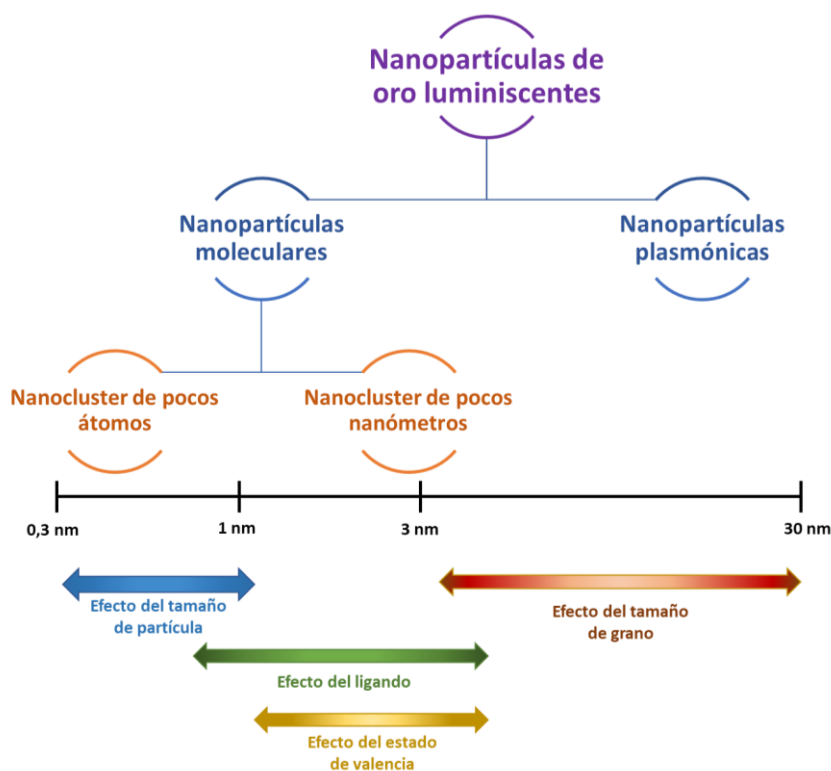


Figura 1.3: Clasificación de AuNMs luminiscentes y efecto del tamaño de partícula, los ligandos de superficie y los estados de valencia en las propiedades de luminiscencia.

3) AuNPs luminiscentes plasmónicas: se trata de nanopartículas más grandes (>20 nm) policristalinas, que no solo exhiben fuertes plasmones superficiales sino también luminiscencia y en las cuales el tamaño de grano (relacionado con el tamaño cristalino)¹⁰ juega un papel fundamental. La hipótesis plantea que la banda continua de electrones y estados de energía discretos coexisten dentro de una sola partícula, así, bajo la excitación de la luz, tanto el plasmón superficial de absorción como las transiciones de un solo electrón se excitan dando como resultado el fuerte acoplamiento entre plasmones de superficie de granos grandes y excitaciones de un solo electrón de granos pequeños dentro de una sola partícula.¹¹ Este

fenómeno conlleva al aumento de la intensidad de la luminiscencia y estabilidad, sin embargo, provoca la disminución de los tiempos de vida fluorescentes, como también sucede con algunos fluoróforos o Quantum dots (QD) cuya fluorescencia puede aumentar en contacto con superficies de oro plasmónico.¹²⁻¹⁴

Por tanto, a la hora de plantearse las posibilidades analíticas de estos materiales, la elección de uno u otro dependerá de la aplicación final. En este capítulo se van a estudiar las posibilidades analíticas de uno de los tipos de nanocluster de oro mencionados, los clasificados como **AuNCs luminiscentes de pocos nanómetros**, que presentan fluorescencia en el Vis-NIR, lo que se traduce en ventajas como: buena estabilidad con largos tiempo de vida, grandes desplazamientos de Stokes, y biocompatibilidad. La desaparición de la banda plasmónica superficial de este tipo de AuNCs se debe a efectos cuánticos, provocados por el bajo tamaño de los nanoclusters, comparable con la longitud de onda de Fermi del electrón, por lo que sus propiedades resultan más similares a las encontradas en las moléculas que en las nanopartículas metálicas. La estructura en bandas se rompe en niveles discretos de energía, debido a la limitación de tamaño, y los 18 electrones de conducción se “enlazan” perdiendo así su carácter metálico.¹⁵ A pesar de esto, la interacción con la luz sigue existiendo, y derivado de este comportamiento electrónico se encuentran transiciones electrónicas entre los niveles de energía, resultando en la absorción y emisión de la luz. Esta propiedad óptica les dota de gran potencial como sondas en biosensores fluorescentes, como alternativa al uso de QD y fluoróforos, solucionando muchos de los problemas que presentan estas sustancias como son la toxicidad y el ‘photobleaching’, respectivamente

Las aplicaciones analíticas de los AuNCs se han recopilado en los últimos años en multitud de revisiones¹⁶⁻²¹, en las que se utilizan mayoritariamente este tipo de AuNCs de pocos nanómetros y cuya aplicación destaca en cuatro campos principales:

- Determinación de un analito inorgánico, especialmente de Hg (II), Cu (II) y H₂O₂ (basado en la desactivación de la fluorescencia que producen estos compuestos).
- Determinaciones de proteínas, generalmente basadas en la disminución de la fluorescencia de los AuNCs por agregación.
- Sondas de bioimagen para imagen celular.
- Determinación analítica de pequeñas moléculas orgánicas.

Esta última aplicación, en la que se centra el presente capítulo, es menos frecuente y se encuentra en crecimiento. Algunos de los ejemplos más representativos están basados en tres estrategias:

- 1) La interacción directa del analito y AuNCs que produce desactivación de la fluorescencia (glucosa^{22,23}, clenbuterol²⁴, ascórbico ácido²⁵) o la mejora de la misma (cisteína²⁶) por diferentes mecanismos.
- 2) El analito, como la dopamina²⁷ o la histidina²⁸, interactúa con un desactivador de la fluorescencia de los AuNCs (Cu (II) y Ni (II) respectivamente), dando lugar a la recuperación de la misma.
- 3) El analito produce la disminución de la fluorescencia de AuNCs debido a la agregación de los mismos.²⁹

En general, estas metodologías suelen tener buena sensibilidad, pero la selectividad no es óptima para algunos tipos de muestra. Para diseñar métodos más selectivos, la fluorescencia de AuNCs puede ser combinada con reacciones enzimáticas que aporten una mayor especificidad, pudiéndose postular los siguientes esquemas:

a) El sustrato de la reacción enzimática y su producto muestran diferente efecto sobre la fluorescencia de AuNCs, lo que se aplica a la determinación del sustrato³⁰ o de la actividad de la enzima.^{31,32}

b) El sustrato inhibe la actividad de una enzima (que produce la disminución de la fluorescencia de los AuNs durante la reacción enzimática).³³

c) El H₂O₂ formado como subproducto en la reacción enzimática apaga la fluorescencia de los AuNCs. Este método se ha propuesto, fundamentalmente, para la determinación de glucosa mediada por glucosa oxidasa.^{34,35}

En cuanto a la síntesis de este tipo de AuNCs luminiscentes con pocos nanómetros, los métodos actuales de síntesis, se dividen en dos grupos: descendente o “*top-down*” y ascendente o “*bottom-up*”²⁰:

- Los protocolos “*top-down*” se basan en obtener nanoclusters a partir de nanopartículas o directamente del oro metálico. El método más conocido se denomina ‘*etching*’ en el que los AuNCs se preparan a partir de nanopartículas de oro con un tamaño de núcleo de 2-4 nm, usando exceso de ligando.
- En los métodos “*bottom-up*” los clústeres se construyen a partir de átomos o iones, y los más habituales se basan en la *reducción química* Au⁺/Au³⁺ en presencia de un reductor y un ligando que actúe como estabilizador. Normalmente se utilizan compuestos tiolados en busca de la formación del enlace Au-S, muy fuerte y estable. Por otra parte, algunos de los reductores más habituales son el tetrahidrobórato de sodio (NaBH₄) y cloruro de tetraquis (hidroximetil) fosfonio (THPC). Otro método *bottom-up* es la *fotorreducción*, en este no intervienen agentes inorgánicos y utiliza como reductores diversos polímeros con grupos terminales tioeter-tridentados.

Además, sus longitudes de onda de excitación y emisión se pueden modular como se ha dicho, variando su tamaño, los ligandos superficiales o incluso el medio circundante (**Figura 1.4**).

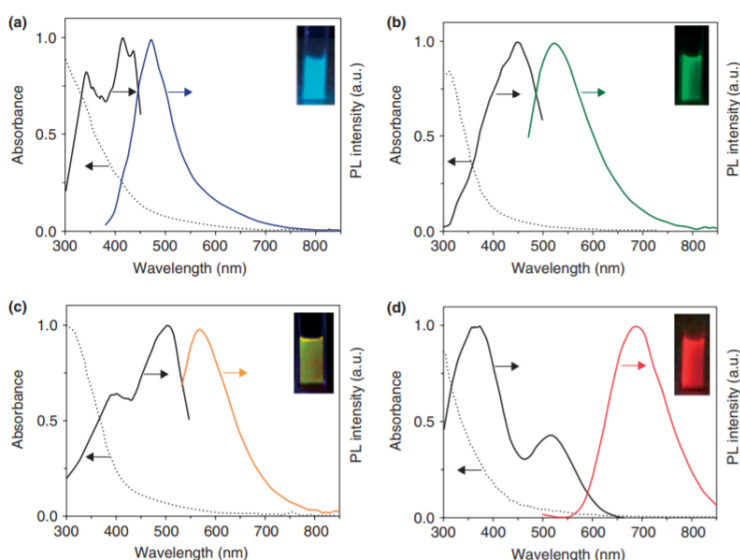


Figura 1.4: Espectros de absorción (línea punteada), excitación (línea negra), y emisión (línea en color) de diversos AuNCs luminiscentes: con emisión azul, verde y amarilla usan como agente estabilizador dodecanotiol y están recubiertos con un polímero anfifílico. Los AuNCs que emiten rojo tienen una cubierta de albúmina (BSA)³⁶.

1.2. Planteamiento

Teniendo en cuenta las propiedades fluorescentes de los nanocluster de oro que se han comentado en la sección anterior y la experiencia en el campo de los biosensores enzimáticos fluorescentes del grupo de investigación, la primera hipótesis de trabajo que se planteó en esta Tesis Doctoral fue el desarrollo de nuevos nanobiosensores para la determinación analítica de pequeñas moléculas de interés biomédico, en los que sustituir los fluoróforos convencionales por AuNCs con fluorescencia Vis-NIR. La base de estos sistemas se centra en el seguimiento y variación de las propiedades fluorescentes de AuNCs debido a su interacción con moléculas implicadas en la detección bioquímica. La utilización de AuNCs en los sistemas estudiados busca aprovechar muchas de las ventajas que estos proporcionan frente al uso de fluoróforos convencionales que pueden presentar problemas como la degradación química, la existencia de interferencias espectrales en muestras biológicas (eliminadas al utilizar la detección en la región Vis-NIR) y que en muchos casos carecen de biocompatibilidad.

Para ello se plantearon dos líneas de investigación:

1. Acoplar los AuNCs a una reacción enzimática que permita la determinación fluorescente de analitos de interés biomédico. (Sección 1A)
2. Utilizar la desactivación que provoca el oxígeno sobre la fluorescencia de los AuNCs como sondas fluorescentes. (Sección 1B)

Así, el presente capítulo consta de 2 secciones en las que se estudian aplicaciones específicas de AuNCs en las líneas de investigación planteadas:

Sección 1A. Nanobiosensor enzimático basado en la fluorescencia de nanocluster de oro para la determinación de acetilcolina.

El objetivo de esta sección es el desarrollo de un método basado en la medida de la señal fluorescente del nanomaterial, utilizando éste como marcador luminiscente, en busca de mejorar las prestaciones de los métodos actuales en la determinación del neurotransmisor acetilcolina. El objetivo principal es promover fenómenos de transferencia de energía entre los AuNCs y el centro activo de la enzima colina oxidasa, con el fin de desplazar la detección al Vis-NIR evitando así, la necesidad de acoplar una reacción indicadora, que conlleva a los problemas ya nombrados, intrínsecos de los métodos enzimáticos.

Sección 1B. Nanoclusters de oro como sondas fluorescentes para la detección de oxígeno en reacciones enzimáticas.

Teniendo en cuenta que en la bibliografía aparecen referencias del efecto desactivador del oxígeno sobre la fluorescencia de los AuNCs, el objetivo de esta sección se centra en la evaluación de estos nanomateriales como sondas fluorescentes de oxígeno y en el estudio de su mecanismo de desactivación.

Además, en esta sección se evalúan las posibilidades del uso de AuNCs como sondas de oxígeno para el seguimiento de reacciones enzimáticas con enzimas tipo oxidasa. Se pretende que el consumo de oxígeno mediado por la reacción produzca una disminución en la extinción de la fluorescencia de AuNCs, relacionada con la concentración del sustrato. El desarrollo del método en un soporte sólido como el papel, pretende dar lugar a una metodología de detección portátil y rápida. Por último, en esta sección se plantea el estudio de estas propiedades sensoras a altas temperaturas, evaluando así la estabilidad estructural y química de AuNCs a temperaturas elevadas frente a los fluoróforos convencionales.

1.3. Síntesis y caracterización de AuNCs

1.3.1. Síntesis de nanoclusters de oro

1.3.1.1. Reactivos y disoluciones

Para la síntesis de nanoclusters de oro con ácido lipoico como ligando se utilizó la sal de tetracloraurato (III) de sodio dihidratado, $\text{AuCl}_4\text{Na}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (99,8% Au), (Stream Chemicals), hidróxido de sodio, NaOH. (Panreac), (\pm)- α -Ácido lipoico, pureza $\geq 98\%$ (Sigma Aldrich) y tetrahidruoborato de sodio, NaBH_4 (MERCK-Schuchardt).

Para la síntesis de nanoclusters de oro con seroalbúmina bovina (BSA) como ligando se utilizó BSA (EC 232-936-2) (SigmaAldrich).

Para las electroforesis en gel de agarosa se utilizó Agarosa SeaKem LE (Lonza), disolución amortiguadora 10xTBE (Tris, Borato, EDTA) (OmniPur). Para la electroforesis nativa en gel de poliacrilamida (Nativa-PAGE); azul de Bromofenol, glicerol ambas de Panreac y la disolución amortiguadora 4xNativaPAGE (Thermo Fisher Scientific). Para la realización de la electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) se utilizó 2-Mercaptoetanol (Fluka Analytical), tampón de ruptura: 2x Leamnti Sample Buffer (BioRad), tampón 10xTG-dodecilsulfato sódico (TRIS-Glycine-SDS) (OmniPur) y el marcador Precision Plus Protein Dual Color Standards (10-250 kD), run on 4-20% Tris-HCl gel (BIO-RAD). Además, para las electroforesis Nativa-PAGE y SDS-PAGE, se llevó a cabo la tinción de estos geles utilizando azul de Coomassie (ThermoScientific) y para su lavado se utilizó PAGE Destained Buffer (Etanol 96%) y ácido acético ambos de Panreac.

1.3.1.2. Síntesis de nanocluster de oro con ácido lipoico como ligando (AuNCs@LA)

En un frasco de vidrio de 50 mL protegido de la luz y sometido a agitación magnética se añaden 20 mL de H_2O Mili-Q y 50 μL de NaOH 2M (pH final 10,5). Después se añade el agente estabilizante, 30 μmoles de ácido lipoico (pH final 12). La disolución final se sumerge en un baño de ultrasonidos durante 15 minutos. Posteriormente se añaden 200 μL de la sal de oro ($\text{NaAuCl}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 50 mM, para que la proporción Au:ligando sea 1:3 y se deja la mezcla en agitación constante durante 5 minutos. A continuación, se añade el agente reductor, 400 μL de una disolución de tetrahidruoborato de sodio 50 mM, gota a gota, observándose una coloración amarillenta. **(Figura 1.5)** La reacción tiene lugar a T^a ambiente, durante 15 horas y con agitación constante. El producto de síntesis (stock) se conserva a T^a ambiente y en ausencia de luz.³⁷

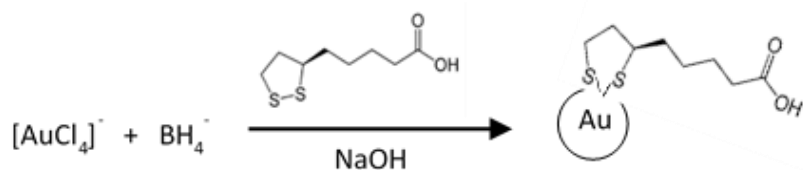


Figura 1.5: Esquema de la síntesis de AuNCs@LA.

Debido a que en la síntesis se trabaja con exceso de ácido lipoico y de tetrahidruoborato de sodio, se debe llevar a cabo una etapa de purificación para eliminarlos, así como otros posibles subproductos de la reacción. La purificación se lleva a cabo en base al tamaño de las moléculas en disolución, utilizando centricones de 4 mL con filtro de membrana de 10K (Centrifugal Filters Amicon Ultra – 4 ml. UltraCell - 10K Membrane, Millipore) mediante ultrafiltración en centrifuga, según el siguiente protocolo optimizado:

- 1º ciclo de centrifugado a 1676 g durante 5 minutos.
- 2º ciclo de centrifugado a 1676 g durante 20 minutos.
- 1º lavado: 2 mL de H₂O Mili-Q + 3º ciclo de centrifugado a 1676 g durante 20 minutos.
- 2º lavado: 1 mL de H₂O Mili-Q + 4º ciclo de centrifugado a 1676 g durante 20 minutos.

Este procedimiento supone además de una etapa de purificación un proceso de concentración, obteniéndose desde un volumen inicial de 4 mL, un volumen final de en torno a 500 µL. Los NCs purificados (stock purificado) se conservan a T^a ambiente y en ausencia de luz.

1.3.1.3. Síntesis de nanoclusters de oro con seroalbúmina bovina como ligando (AuNCs@BSA)

Se añaden 5 mL de la sal de oro 10 mM (NaAuCl₄·2H₂O) en un bote de 25 mL protegido de la luz, con agitación magnética y sumergido en un baño de agua a 37°C. A continuación, se añaden 5 mL de una disolución de BSA de 50 mg/mL previamente preincubada a 37°C. Tras 10 minutos de agitación fuerte y constante, se procede a la adición de 0,5 mL de NaOH 1M (pH final 10). La mezcla se incuba a 37°C 12 horas. (Figura 1.6) Durante este tiempo, se debe comprobar que el pH de la disolución final se mantiene a 10 y si es necesario añadir pequeños volúmenes de NaOH 1M para ajustarlo.³⁸

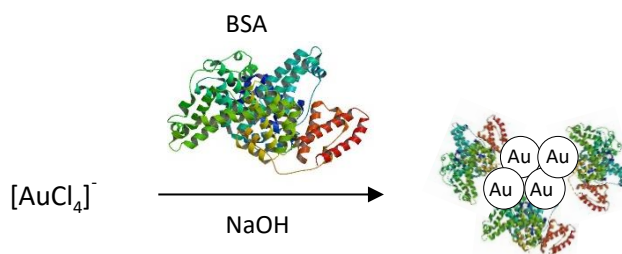


Figura 1.6: Esquema de la síntesis de AuNCs@BSA.

El producto de la síntesis (stock) se conserva a 4°C y en ausencia de luz.

1.3.2. Caracterización de AuNCs

1.3.2.1. Microscopía electrónica

Para la caracterización morfológica y de tamaños de las nanopartículas sintetizadas se utilizó un Microscopio Electrónico de Transmisión de alta resolución utilizando los modos TEM y STEM (barrido y transmisión) Tecnai F30 (FEI), con voltajes de trabajo de 200 y 300 kV. (Laboratorio de Microscopías Avanzadas, LMA, Zaragoza). Todas las muestras a estudiar tienen como disolvente H₂O, por tanto, la preparación de la muestra es simple y consiste en depositar 2 µL sobre una rejilla de cobre recubierta con carbono (Carbon Film 200 Mesh Copper, Electron Microscopy

Sciences CF200-CU), para ser observada directamente una vez se haya secado (24 horas) a temperatura ambiente.

Un microscopio electrónico de transmisión es un instrumento que aprovecha los fenómenos físico-atómicos que se producen cuando un haz de electrones suficientemente acelerado colisiona con la muestra permitiendo obtener información morfológica, estructural y composición de la muestra con resolución atómica.

En la **Figura 1.7** se muestran las imágenes obtenidas trabajado en modo STEM: el haz de electrones se enfoca sobre la muestra y la rastrea igual que un microscopio de barrido, captando los electrones transmitidos.

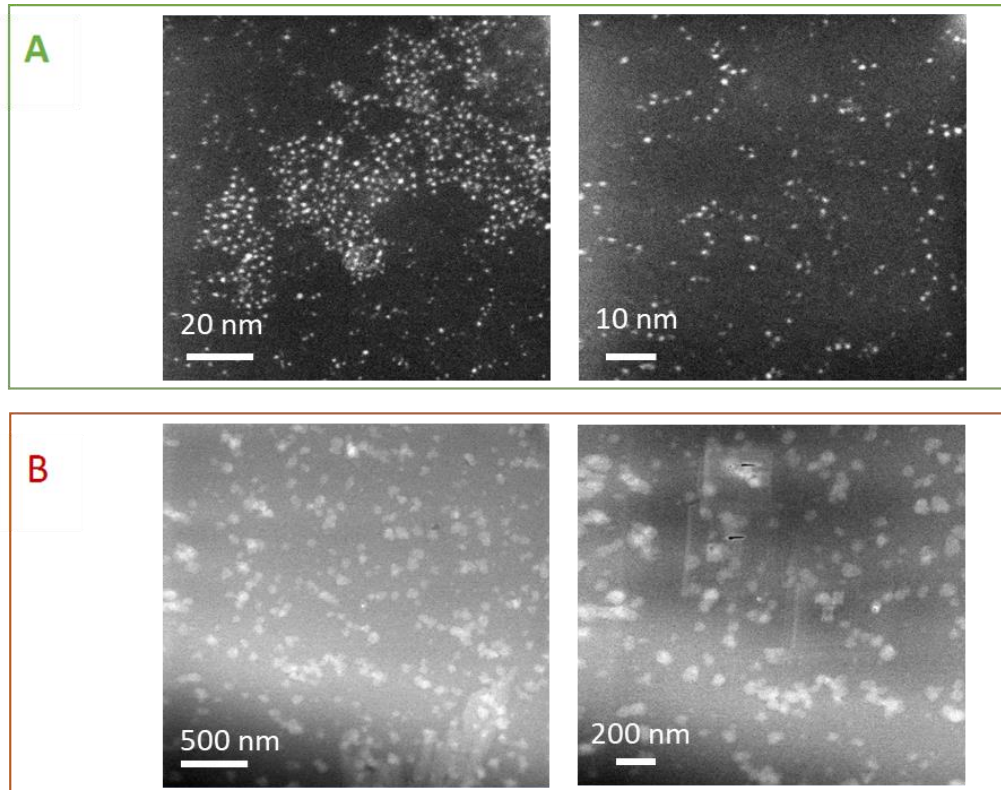


Figura 1.7: Imágenes obtenidas por STEM de **A)** AuNCs@LA **B)** AuNCs@BSA

En el caso de AuNCs@LA se trata de partículas esféricas y bastante homogéneas cuya distribución de tamaños se muestra en la **Figura 1.8**, observándose un tamaño medio de partícula de $1,604 \pm 0,23$ nm. En el caso de los AuNCs@BSA, sin embargo, se encuentran múltiples problemas en la visualización de la muestra. La alta cantidad de materia orgánica impide resoluciones mayores, ya que se produce el quemado de esta al acercarnos a ella, e incluso se compromete la estabilidad de la rejilla, provocándose roturas. Las imágenes logradas, muestran estructuras esféricas de tamaños en torno a 80 nm, lo que puede indicar que cada AuNCs está rodeado de una gran cantidad de BSA o incluso que en el interior de esas estructuras se pueden encontrar más de un AuNC, lo cual imposibilita la determinación del diámetro de los mismos.

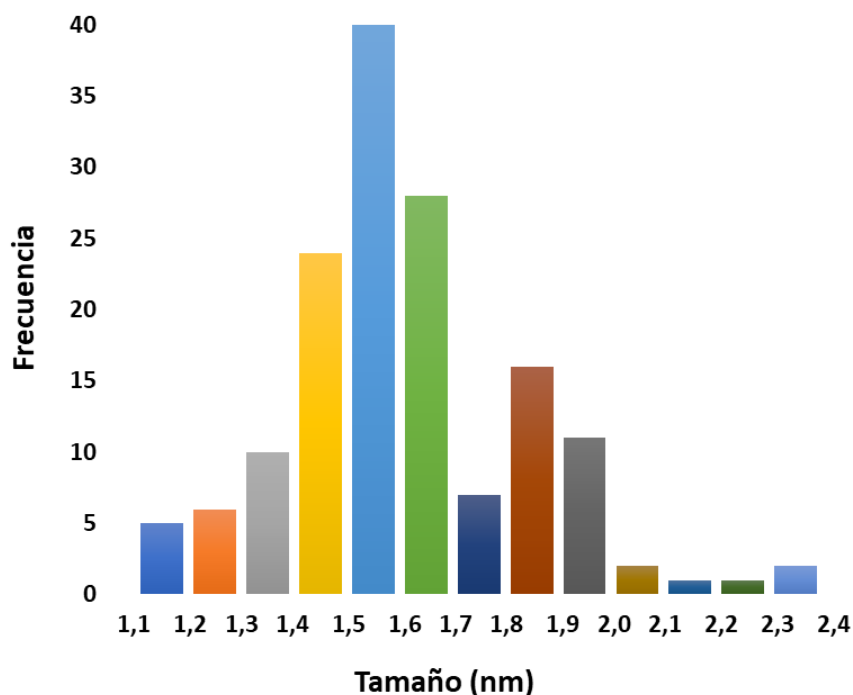


Figure 1.8: Histograma de distribución de tamaños de AuNCs@LA.

1.3.2.2. ICP-AES

Mediante Espectrometría atómica de emisión con fuente de Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-AES) se llevó a cabo la determinación de la cantidad de oro presente en las disoluciones de AuNCs (SGI de la Universidad del País vasco, UPV). En este caso se trata de muestras líquidas, con materia orgánica, por tanto, se utilizó un protocolo de digestión, cuyo objetivo es romper todos los enlaces que existen entre los átomos de la muestra (disolver el oro y diluir la muestra) y eliminar la materia orgánica.

1. Adición de 200 μL de la muestra en un eppendorf de 2mL
2. Adición de 100 μL de disolución piraña (3 ácido sulfúrico: 1 H_2O_2) gota a gota y se incubó 15 min a T^a ambiente.
3. Adición de 300 μL de agua regia (3HCl:1HNO₃), 2 horas a T^a ambiente.
4. Incubar 15 minutos a 60°C usando un Termobloc multiplazas P SELECTA.
5. Traspaso cuantitativo a un matraz aforado y enrase con H_2O Mili-Q a 20 mL.

La concentración total de oro en los AuNCs@LA stock determinada fue de $1,57 \pm 0,03 \text{ gL}^{-1}$, que corresponde a un rendimiento de síntesis del 85,6%. En bibliografía^{39,40} se muestra que la estructura cristalina de los AuNCs, determinada a partir del patrón de difracción por HRTEM, es cúbica centrada en las caras. Conociendo este dato, se puede calcular el volumen que ocupa una celda unitaria con esa estructura, tomando la masa de una celda unidad ($1,31 \cdot 10^{-21} \text{ g/celda}$) y la densidad de oro ($19,30 \text{ g/cm}^3$), se obtienen $6,79 \cdot 10^{-2} \text{ nm}^3/\text{celda}$. Con este valor y conociendo el tamaño de los AuNCs (obtenido por STEM, 1,60 nm) es posible hallar el número de redes cristalinas en cada AuNC (31,81 redes/AuNC) y dado que la estructura cúbica centrada en las caras posee 4 átomos de oro, es posible determinar el número de átomos de oro existentes en cada AuNC (127,24 átomos de oro por AuNC). Este valor es consistente con la imagen de alta

resolución STEM de un AuNC que se muestra en la **Figura 1.9**, donde se pueden visualizar el número de átomos de Au individuales que compone un solo AuNC.

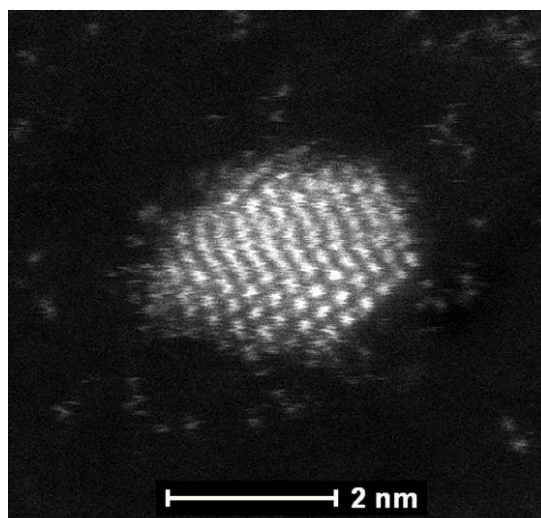


Figura 1.9: Imagen HRSTEM de un AuNC@LA obtenida con un instrumento Titan High-base para imágenes de alta resolución.

El valor del número de átomos de oro por AuNC dividido entre el número de Avogadro, nos proporciona los moles de Au que hay en cada AuNC ($2,11 \cdot 10^{-22}$ mol/AuNC). Conociendo este valor y la concentración de oro en el stock ($1,57 \pm 0,03 \text{ gL}^{-1}$), se puede calcular la concentración de AuNCs en el stock (7,96 mM). Por último, con el valor del número de moles Au por AuNC y la concentración de AuNCs en el stock, se extrae la concentración de AuNCs por mL, valor necesario a la hora de diseñar la estrategia de biofuncionalización en la sección 1A.

La concentración total de oro en los AuNCs@BSA stock determinada por ICP-AES, fue $497,2 \pm 0,9 \text{ mgL}^{-1}$. En el caso de estos AuNCs@BSA, como ya se ha dicho, no es posible obtener su distribución de tamaños debido al exceso de materia orgánica, observada en STEM y confirmado mediante los estudios de electroforesis. Por ello no es posible obtener el número de átomos por AuNCs ni por tanto la concentración de AuNCs/mL del stock.

1.3.2.3. Fluorescencia

La caracterización fluorescente de los AuNCs se llevó a cabo utilizando dos espectrofotómetros de fluorescencia: Perkin Elmer LS 55 y Photon Technology International (PTI) modelo TimeMasterTM TM-2/2003. En todos los casos se utilizó una cubeta de fluorescencia de cuarzo de volumen reducido (Suprasil ultra-micro cell de Hellma Analytics, longitud del paso óptico 3x3 mm, altura del centro 15 mm, volumen de la cámara 45 μL y volumen de llenado 70 μL)

1.3.2.3.1. Fluorescencia de nanoclusters de oro con ácido lipoico (AuNCs@LA)

Se registraron los espectros de emisión, en primer lugar, de los nanoclusters sin purificar y se compararon con el stock de nanoclusters purificados (**Figura 1.10**).

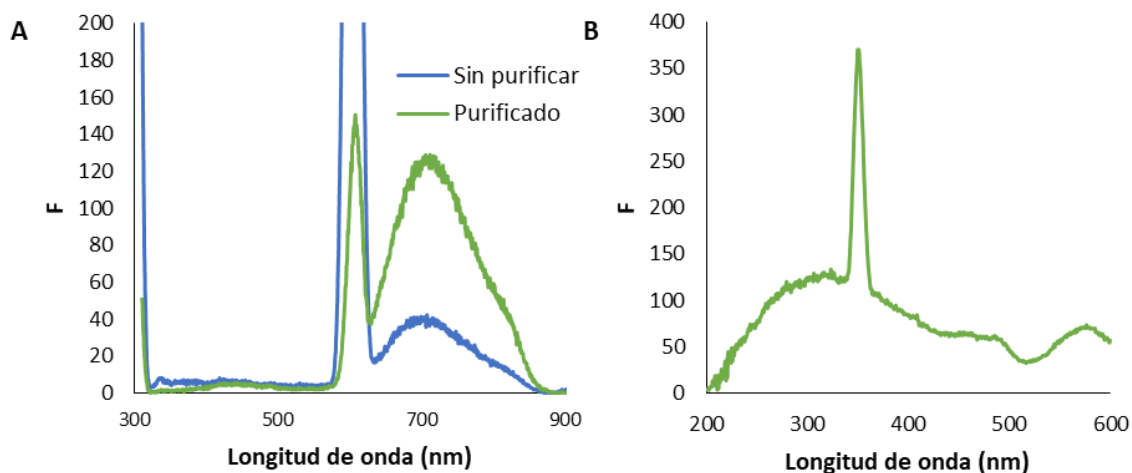
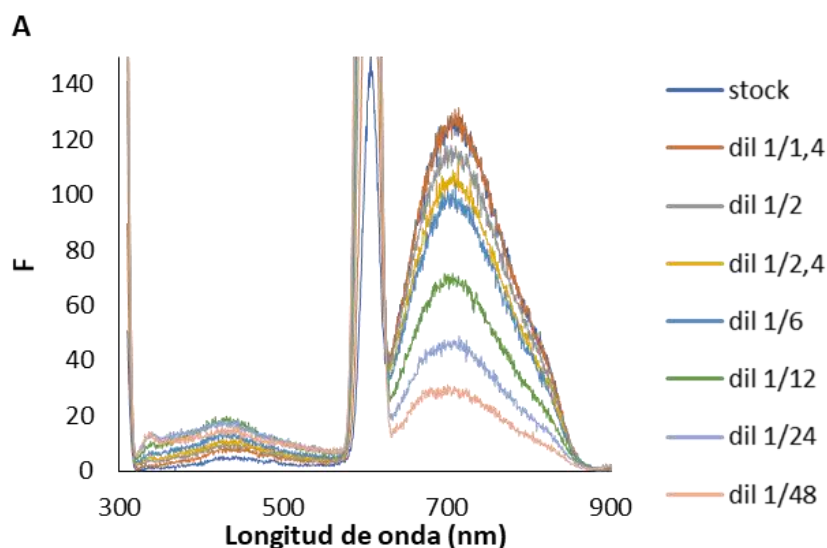


Figura 1.10: A) Espectros de emisión del stock de AuNCs@LA sin purificar y purificados, λ_{ext} 300 nm. **B)** Espectro de excitación del stock AuNCs@LA purificados con λ_{em} 700 nm. Rendijas de ext/em: 10/10 nm y velocidad de barrido 1000 nm/min.

Como se observa en la imagen, la purificación supone un aumento en la intensidad de fluorescencia del máximo de emisión, que se encuentra en torno a 700 nm (**Figura 1.10A**) y no genera otros cambios en el espectro, de lo que se concluye que la etapa de purificación, además de eliminar posibles excesos de la síntesis, actúa como un proceso de concentración del stock.

Partiendo del máximo de emisión observado, se obtiene el espectro de excitación con λ_{em} 700 nm (**Figura 1.10B**), donde se observa el máximo de excitación a 300 nm y otros dos máximos de fluorescencia a 490 nm y 560 nm. A partir de estos resultados, se eligió como par $\lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{em}}$ óptimo 300/700 nm, que además proporciona desplazamientos de Stokes mayores.

Para determinar si la fluorescencia de AuNCs depende linealmente de la concentración, se prepararon varias soluciones diluidas a partir del stock y se midió su emisión. En **Figura 1.11A** se observan espectros de cada una de estas disoluciones y donde se puede observar la existencia de filtro interno para las disoluciones más concentradas. De estos espectros es posible extraer la fluorescencia en el máximo de 700 nm para las diferentes concentraciones de AuNCs evaluadas, así la **Figura 1.11B** muestra la saturación para concentraciones superiores a 0,26 g L^{-1} (dil 1/6), por lo que se evitará trabajar por encima de este valor.



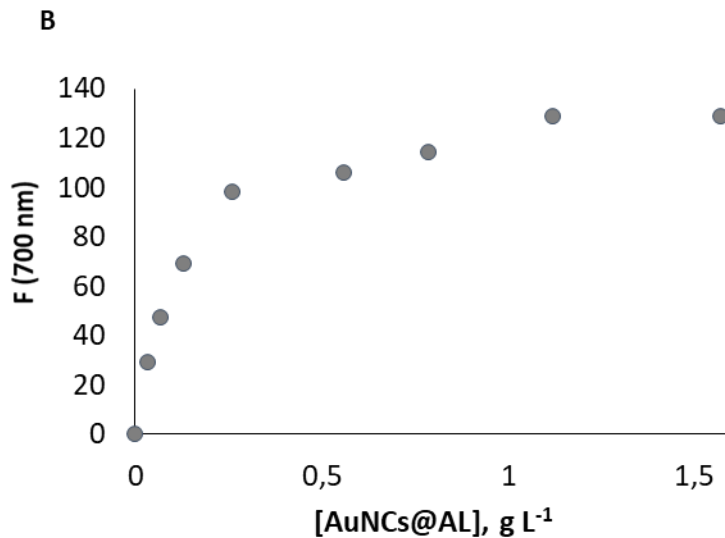


Figura 1.11: **A)** Espectros de emisión (λ_{ext} 300 nm) de AuNCs@LA purificados a distintas diluciones. **B)** Intensidad de fluorescencia a 700 nm frente a la concentración de AuNCs@LP.

1.3.2.3.2. Fluorescencia de nanoclusters de oro con BSA (AuNCs@BSA)

Se registró en primer lugar el espectro de emisión de AuNCs@BSA con λ_{ext} a 385 nm (**Figura 1.12A**), en el que se observa el máximo de fluorescencia característico de la BSA a 450 nm y el máximo a 620 nm característico de los AuNCs. Partiendo del máximo de emisión observado, se registra el espectro de excitación con λ_{em} a 620 nm (**Figura 1.12B**), en él se observan, tres máximos de excitación: un primer máximo a 275 nm característico de BSA y una banda entre 325 a 400 nm, además de otro máximo a 500 nm debidos a la fluorescencia del AuNCs. Se ensayaron las diversas λ_{ext} y se eligió como par $\lambda_{\text{ext}}/\lambda_{\text{em}}$ óptimos 385 nm / 620 nm, esta λ_{ext} proporciona un espectro de emisión libre de armónicos en la zona de emisión de los AuNCs y una alta intensidad de fluorescencia.

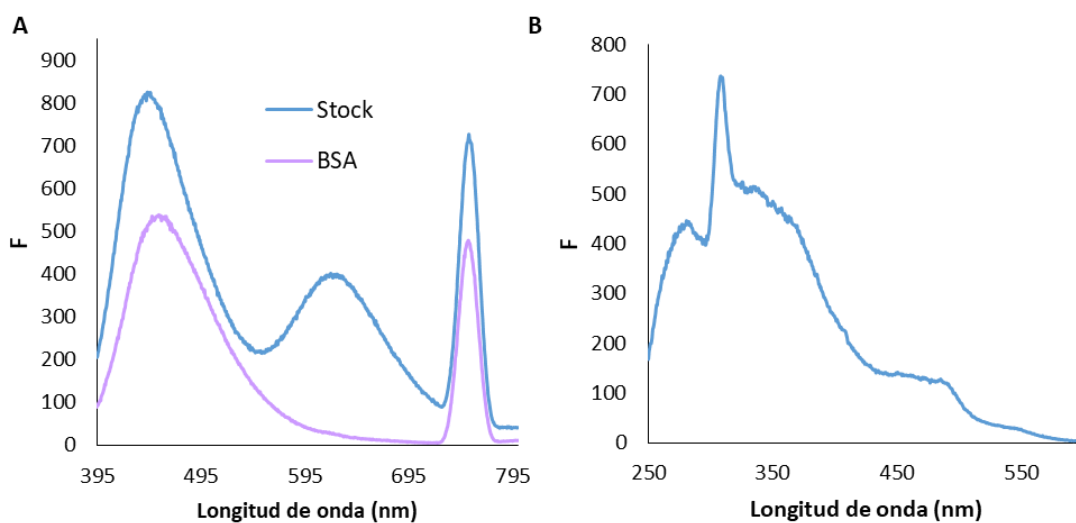


Figura 1.12: **A)** Espectros de emisión del stock de AuNCs@BSA y BSA libre con λ_{ext} 385 nm. **B)** Espectro de excitación del stock AuNCs@BSA p con λ_{em} 620 nm. Rendijas de ext/em: 10/10 nm y velocidad de barrido 1000 nm/min.

Para evaluar el efecto de la dilución sobre los AuNCs, se prepararon diversas diluciones partiendo del stock y se midió su emisión (**Figura 1.13A**). Como se observa, la intensidad de fluorescencia disminuye al aumentar la dilución sin efectos de autoabsorción. Diluciones mayores de 1/4 dan lugar a señales de fluorescencia de AuNCs muy bajas. Además, la **Figura 1.13B** confirma la relación lineal entre la fluorescencia en el máximo de 620 nm para las diferentes concentraciones de AuNCs.

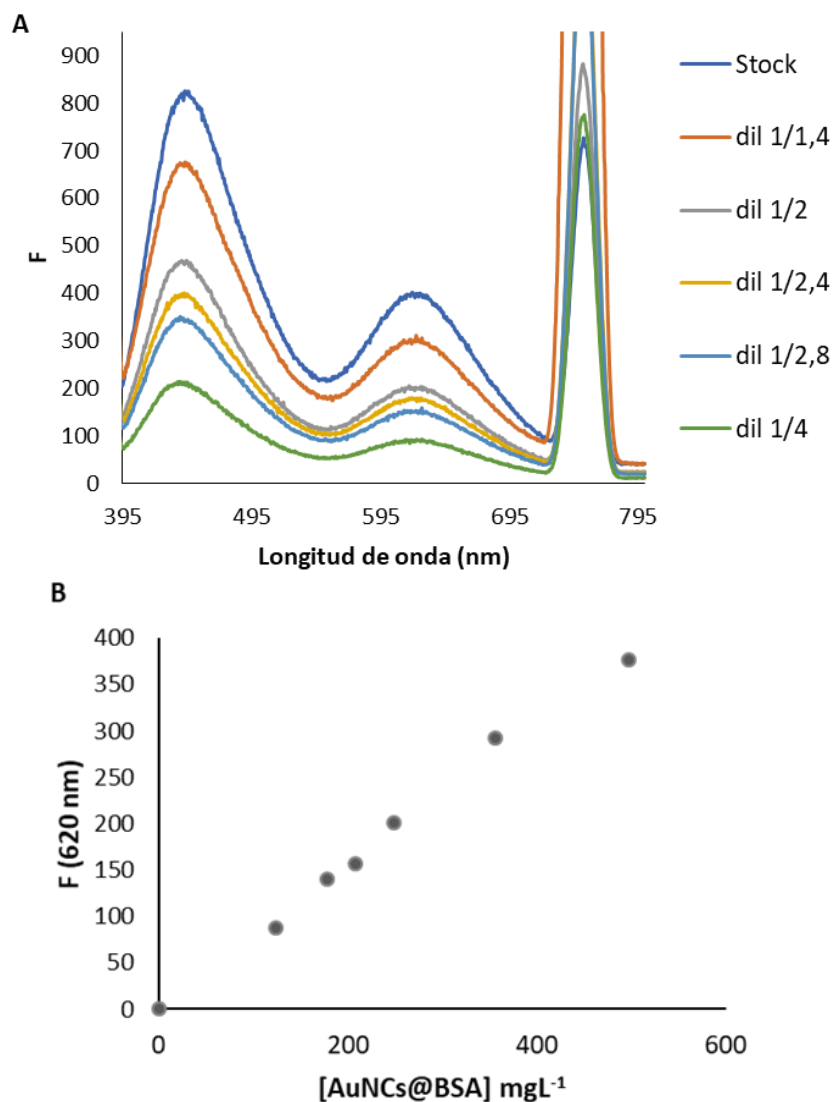


Figura 1.13: A) Espectros de emisión (λ_{ext} 385 nm) de AuNCs@BSA a distintas diluciones. **B)** Intensidad de fluorescencia a 620 nm frente a la concentración de AuNCs@BSA.

1.3.2.3.3 Estabilidad de la fluorescencia en el tiempo

Se estudió la estabilidad de la fluorescencia de AuNCs respecto al tiempo, para asegurar que estos conservan sus propiedades ópticas. Para ello se registraron los espectros de emisión de una alícuota de cada uno de los AuNCs, a lo largo de 30 días, almacenados a la T^a indicada y

protegidos de la luz. Como muestra la **Figura 1.14**, en todos los casos se observa estabilidad a lo largo del tiempo, manteniéndose la intensidad de fluorescencia del máximo de emisión.

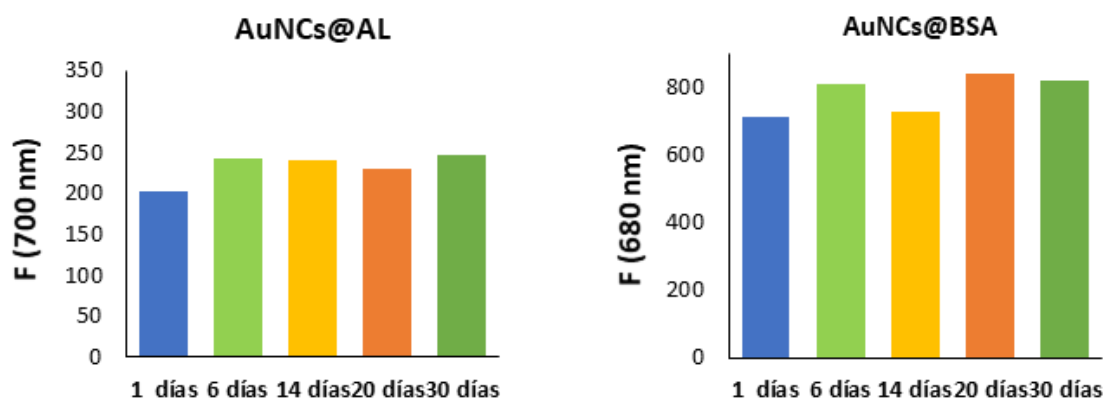


Figura 1.14: Histogramas de intensidad de fluorescencia en el tiempo para cada tipo de AuNCs.

1.3.2.4. Electroforesis

Experimental

La **electroforesis en gel de agarosa** se llevó a cabo en una cuba de electroforesis horizontal Mini-Sub Cell GT BIO-RAD (150VDC, 10W) y el procedimiento seguido para preparar el gel de agarosa consistió en mezclar las cantidades correspondientes de agarosa y de disolución amortiguadora de electroforesis TBE 0,5x, según el porcentaje (masa/volumen) de agarosa deseado: 1% (1g de agarosa en 100 mL de TBE 0,5x) o 4% (4g de agarosa en 100 mL de TBE 0,5x). Estas disoluciones se calentaron en un microondas, para conseguir una disolución homogénea y la mezcla resultante, ya enfriada, pero sin solidificar, se vertió sobre el molde de electroforesis y se colocó el peine para crear los pocillos. Tras enfriar unos 30 min hasta la solidificación total, se sumergió el molde en la cuba de electroforesis horizontal rellena con disolución amortiguadora TBE 0,5x, se retiró el peine y se inyectaron las muestras en los pocillos con ayuda de una micropipeta (V inyección=12 μ L). La electroforesis se llevó a cabo a 200 V utilizando la fuente Power-Pac HC BIO-RAD (250V/3A/300W), durante 30 minutos, pudiendo detenerse en tiempos intermedios para observar la progresión de las muestras. La fluorescencia de estos geles se observó con ayuda de una lámpara UV ChemiDoc XRS + System whit Image Lab, BIO-RAD.

La **electroforesis en gel de poliacrilamida** (PAGE), se utilizó para caracterizar los AuNCs@BSA. en dos variantes, electroforesis Nativa y SDS. Para ambas se utilizaron geles comerciales Mini-Protean TGX Gels 4-15% (BIO-RAD) y una cuba de electroforesis vertical PAGEr MiniGel Chamber LONZA (250VDC/30W/150mA/60°C):

- Electroforesis desnaturizante SDS-PAGE:

Las muestras fueron previamente tratadas con solución de ruptura según el siguiente procedimiento experimental:

1. Preparación de la solución de ruptura, formado por Mercaptoetanol (rompe los puentes disulfuro) y SDS (rompe la estructura primaria y secundaria de la proteína): 250 μ L de disolución amortiguadora (2x Leamnti Sample) y 13,16 μ L de 2-Mercaptoetanol.

2. En un vial eppendorf se añadieron 20 μ L de la muestra y 20 μ L de la solución de ruptura previamente preparado.

3. Los viales se incubaron, justo antes de ser pinchados en el gel, durante 5 min en un termobloc a 100°C, para asegurar la desnaturalización de la estructura proteica.

El gel se colocó en la cuba de electroforesis vertical conteniendo la solución amortiguadora SDS-PAGE 1X, y se procedió a la carga del gel con 12 μ L de la muestra tratada e incubada. Para conocer los pesos moleculares de las distintas fracciones peptídicas, se cargó en el primer pocillo un marcador de proteínas (10-250 kD). La electroforesis se llevó a cabo a 200 V, durante 60 minutos, utilizando la fuente Power-Pac HC BIO-RAD (250V/3A/300W).

- Electroforesis Nativa-PAGE:

En esta electroforesis se utiliza azul de bromofenol para ver el frente de las muestras en el gel, para ello se siguió el siguiente protocolo:

1. Se preparó una disolución de azul de bromofenol 9,6 mg/mL en disolución amortiguadora fosfato pH 7 10 mM.

2. En un eppendorf se mezclan 20 μ L de la muestra, 1 μ L de la disolución de azul de bromofenol preparada y 1 μ L de glicerol para dar densidad a la mezcla.

El gel comercial se coloca en la cuba de electroforesis vertical que contiene la solución amortiguadora NATIVA-PAGE 1X, y se procede a la carga del gel con 12 μ L de la mezcla de muestra. La electroforesis se lleva a cabo a 200 V, durante 60 minutos, utilizando la fuente Power-Pac HC BIO-RAD (250V/3A/300W).

- Disolución de revelado (Tinción Coomassie)

En primer lugar, se prepararon las siguientes disoluciones:

-Disolución de tinción (Coomassie): 2,5 g Azul Brillante Coomassie disueltos en una mezcla de 450 mL metanol y 100 mL ácido acético hasta 1 L con agua mili-Q.

- Disolución para desteñir (PAGE Destained Buffer): 430 mL de etanol junto con 70 mL de ácido acético a un volumen final de 500 mL.

Una vez finalizada la electroforesis PAGE, se retiró el gel y se colocó sobre un recipiente de plástico, añadiendo 50 mL de la disolución de tinción Coomassie e incubando durante unas 12 horas. Para desteñir el gel, se traspasó este a un recipiente de plástico con 50 mL de la disolución 'PAGE Destained Buffer' y se repitió este proceso de lavado dos o tres veces hasta la visualización de las bandas azules y el fondo del gel prácticamente transparente.

Resultados

La electroforesis en gel es una técnica ampliamente utilizada para separar moléculas biológicas en función, fundamentalmente de su carga, bajo la influencia de un campo eléctrico. Aunque también pueden separarse en función de su peso molecular y su forma. Las proteínas presentan una carga eléctrica neta si se encuentran en un medio que tenga un pH diferente al de su punto isoeléctrico y por eso tienen la propiedad de desplazarse cuando son sometidas a un campo eléctrico. La velocidad de migración es proporcional a la relación entre las cargas de la proteína

y su masa. Cuanto mayor carga por unidad de masa más rápida será la migración. Como usualmente los AuNCs tienen carga neta y tamaños similares a los de las proteínas, esta técnica permite evaluar su funcionalización con biomoléculas ya que esto involucra un cambio en la movilidad de los mismos por un cambio de tamaño y/o carga neta.

La **Figura 1.15A** muestra los resultados de la electroforesis de agarosa al 4% para ambos AuNCs. En ella se observa una alta fluorescencia de los AuNCs@BSA y su poca migración hacia el polo positivo, lo que indica un tamaño mayor de los AuNCs o la existencia de poca carga neta. En el caso de los AuNCs@LA purificados, se observa una gran migración hacia el polo positivo y una menor fluorescencia, lo que indica tamaños menores y/o alta carga neta.

Por otro lado, para estudiar con más profundidad los AuNCs@BSA, se realizaron electroforesis NATIVA-PAGE y SDS-PAGE, ambas reveladas con tinción Coomassie.

La electroforesis NATIVA-PAGE consiste en someter a las proteínas a migración sin desnaturalización, por ello la separación se lleva a cabo en función de su carga, de su tamaño y también de su forma. Además, dependiendo de las condiciones experimentales, es posible detectar interacciones proteína-proteína lábiles. Si la BSA ha actuado como ligando durante la síntesis de los AuNCs podría verse una disminución de la intensidad de la banda correspondiente a la BSA libre. Esto ocurriría siempre y cuando el exceso de BSA utilizado durante la síntesis permita ver por diferencia la BSA utilizada como ligando en la superficie de los AuNCs. A su vez, como los AuNCs tiene tamaños similares a las proteínas, puede ser posible que también entren en el gel y puedan separarse diferentes poblaciones de AuNCs@BSA con diferente tamaño y/o densidad de carga superficial.

Así, en la **Figura 1.15B**, se observa claramente en el carril 1 (AuNCs@BSA) la presencia de una banda proteica a la misma altura que migra la BSA libre en el carril 2. Por lo tanto, se puede concluir que no toda la BSA utilizada en la síntesis es usada como ligando y existe un exceso de BSA remanente. A su vez, en el carril 1 se observa también una banda extendida por encima de la banda correspondiente a la BSA libre, indicativa de la presencia de AuNCs heterogéneos en cuanto a tamaño y/o densidad de carga.

La electroforesis desnaturalizante SDS-PAGE es un excelente método para la determinación del peso molecular de las subunidades de proteínas, así como su pureza. Se trata de una electroforesis desnaturalizante, en la que las proteínas pierden su estructura tridimensional, por tanto, en este caso la migración es proporcional al tamaño de la molécula, pero no a su forma o su carga neta nativa. El agente desnaturalizante empleado es el detergente sodiododecilsulfato o SDS. La **Figura 1.15C** muestra en el carril 1 (AuNCs@BSA) una banda proteica a 52 KDa correspondiente a la BSA libre, pero también bandas con pesos moleculares superiores (100 y 120 KDa), correspondientes probablemente a los AuNCs de diferentes tamaños (ya sea por agregación de los mismos durante la síntesis o por la unión de diferentes moléculas de BSA como ligando) que debido a que el tratamiento de muestra está pensado para desnaturalizar proteínas en solución, no es suficiente como para soltar todas las moléculas de BSA unidas a los AuNCs.

Ambas electroforesis confirman la polidispersidad de la muestra observada por TEM y la presencia de BSA en exceso, lo cual puede ser un inconveniente a la hora de funcionalizar estos AuNCs de forma covalente a enzimas.

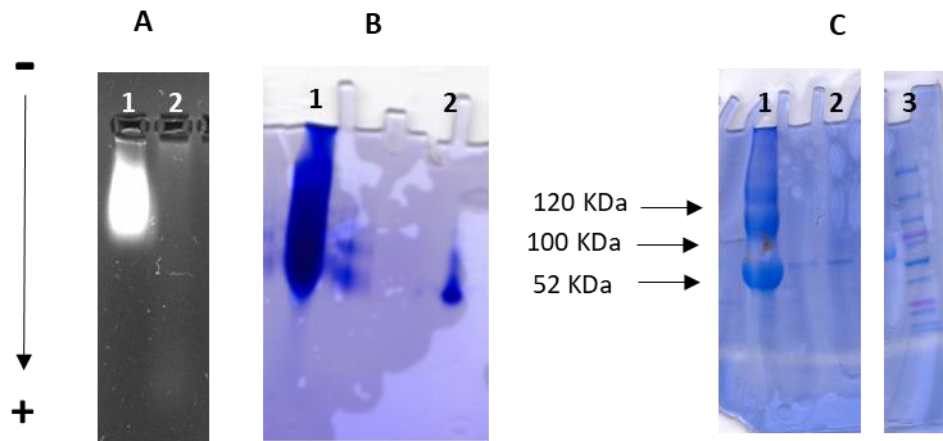


Figura 1.15: **A)** Electroforesis de Agarosa 4%: AuNCs@BSA (pocillo 1) y AuNCs@LA (pocillo 2). **B)** electroforesis NATIVA-PAGE AuNCs@BSA (pocillo 1) y BSA (pocillo 2). **C)** Electroforesis SDS-PAGE AuNCs@BSA (pocillo 1), BSA (pocillo 2) y marcadores de peso molecular (pocillo 3).

Sección 1A

Nanobiosensor enzimático basado en la fluorescencia de nanocluster de oro para la determinación de acetilcolina

1A.1. Introducción

Las determinaciones analíticas basadas en métodos ópticos enzimáticos con enzimas pertenecientes a la familia de las flavoproteínas (que poseen un grupo flavín adenín dinucleótido (FAD) como cofactor y catalizan reacciones de oxidación usando O_2 como aceptor de electrones), se centran, en gran parte, en el uso de las propiedades ópticas del cofactor FAD. El mecanismo de estas reacciones enzimáticas implica la reducción del cofactor a $FAD.H_2$ y la posterior reoxidación a FAD al finalizar la reacción.⁴¹ Ambas formas del FAD tienen diferentes propiedades de absorción y fluorescencia⁴², pero la fluorescencia de esta familia de enzimas está muy afectada (puede ser desactivada) por el entorno químico que rodea a la flavina en el centro activo y solo es observable en algunos casos. Cuando es posible, la utilización de la fluorescencia del FAD como señal analítica en métodos enzimáticos evita la necesidad de acoplar una reacción indicadora, lo que puede hacerse a través de tres alternativas⁴³:

- 1) La mejora de la fluorescencia FAD (hasta donde sabemos, no hay procedimientos que hayan sido descritos en aplicaciones/determinaciones analíticas).
- 2) La medida de la transferencia de energía FRET entre la fluorescencia intrínseca de triptófano de la enzima y el FAD (esto desplazaría las longitudes de onda de trabajo a la zona de 300 nm).
- 3) El acoplamiento de un fluoróforo a la enzima que sea capaz de producir FRET con FAD. Este fenómeno se define como fluorescencia inducida y hace referencia a las propiedades ópticas externas que han sido incorporadas a la enzima y no eran propias de su estructura molecular

Esta última opción es la más utilizada, sin embargo, presenta una serie de limitaciones como son: a) la longitud de onda de emisión de la mayoría de los fluoróforos disponibles está limitada a la región de 450–550 nm, en la que podemos encontrar interferencias espectrales cuando se aplican en muestras biológicas; b) los fluoróforos convencionales son propensos a la degradación química y en muchos casos carecen de biocompatibilidad.

Una de las enzimas presenta una interesante señal de fluorescencia del FAD es colina oxidasa (ChOx), una oxidorreductasa, perteneciente a la familia de las flavoproteínas, que poseen un grupo FAD como cofactor y cataliza la oxidación en dos pasos de la colina (Ch) a glicín betaína (GB), vía betaína aldehído. **(Figura 1A.1)** Esta reacción está mediada por el cofactor FAD y utiliza O_2 como aceptor primario de electrones.^{44–46} Además, Ch es uno de los componentes fundamentales de la membrana celular y el componente principal de los fosfolípidos (fosfatidilcolina y esfingomielina), el precursor de la acetilcolina y una fuente de grupos metilo. Por lo tanto, es importante para la integridad de las membranas celulares, la neurotransmisión, la señalización intracelular y para el transporte y metabolismo de lípidos. Además, la colina es un precursor de betaína, metionina y glicina, todos los cuales son necesarios para regular el estrés osmótico⁴⁷.

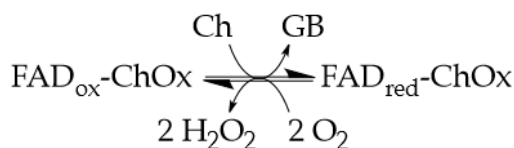


Figura 1A.1: Esquema de la reacción enzimática de la enzima oxidorreductasa ChOx y Ch.

Sección 1A: Nanobiosensor enzimático basado en la fluorescencia de nanocluster de oro para la determinación de acetilcolina.

Desde el punto de vista analítico, son especialmente interesantes las propiedades de fluorescencia del FAD de la enzima ChOx, que en su forma oxidada presenta una fuerte fluorescencia, mientras que en la forma reducida lo es muy débilmente. (Figura 1A.2). En consecuencia, la reducción del FAD y su posterior reoxidación durante la reacción enzimática con el sustrato inducen variaciones en la intensidad de fluorescencia que se pueden relacionar con la concentración de sustrato, y emplear como base de un biosensor óptico.⁴⁸

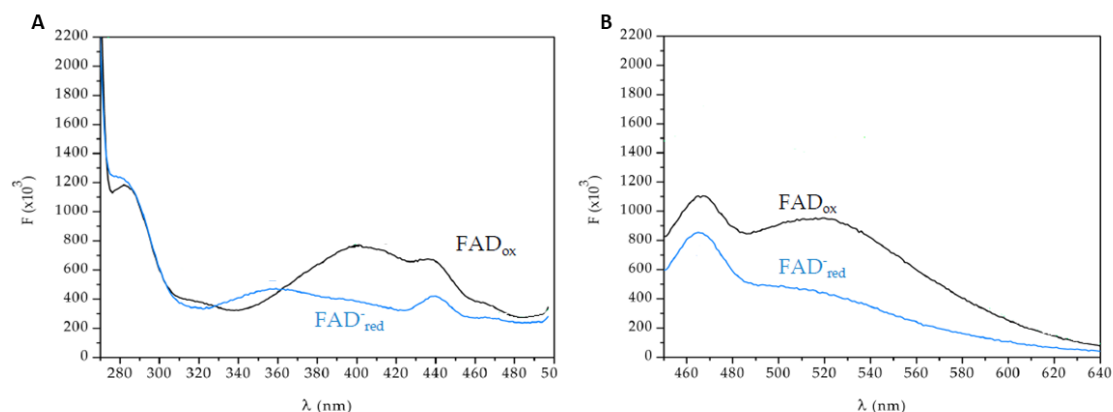


Figura 1A.2: A) variación del espectro de excitación del FAD-ChOx durante la reacción con Ch ($\lambda_{em} = 520 \text{ nm}$) B) variación del espectro de emisión del FAD-ChOx durante la reacción con Ch ($\lambda_{ext} = 400 \text{ nm}$)

Esta reacción puede ser acoplada a la reacción de acetilcolinesterasa (AChE) y acetilcolina (ACh) para su determinación indirecta. El neurotransmisor esencial a ACh es un analito de interés biomédico que se produce en las neuronas y es necesario para la transmisión del impulso nervioso. Es específico en diversas sinapsis, siendo el principal neurotransmisor del sistema colinérgico. Las variaciones de ACh están asociadas con diversas enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson y Alzheimer, tanto su aumento en sangre como su disminución, respectivamente. Por lo tanto, el desarrollo de métodos para la determinación rápida y sensible de neurotransmisores como ACh, proporciona información invaluable sobre su efecto sobre el sistema nervioso⁴⁹.

La determinación de ACh se basa en la reacción enzimática con la AChE⁵⁰, esta enzima cataliza la hidrólisis de la ACh con la consiguiente disminución de la transmisión del impulso nervioso. La acción de la acetilcolinesterasa es muy rápida: se estima que es capaz de hidrolizar una molécula de ACh en ácido acético y Ch en un milisegundo.

En primer lugar, la acetilcolinesterasa reacciona con la ACh, generándose un intermedio acetil-enzima y la liberación de la Ch. A continuación, se produce la hidrólisis de la acetil-enzima, regenerándose la acetilcolinesterasa y liberándose el acetato. (Figura 1A.3)

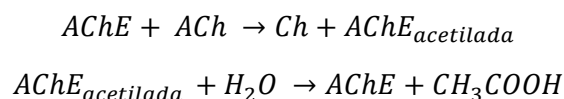


Figura 1A.3: Esquema de la reacción enzimática de la enzima AChE y el neurotransmisor ACh.

Como se ha dicho, esta reacción puede acoplarse a la reacción de ChOx para la determinación del neurotransmisor ACh, mediante la determinación de la Ch estequiometría producida, que reacciona con ChOx, reduciendo su grupo FAD proporcionalmente.

Los analitos ACh y Ch se detectan tradicionalmente mediante métodos de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)⁵¹, sin embargo, esta técnica implica largos tiempos de análisis, equipos costosos y la necesidad de personal técnico calificado. En este contexto, los biosensores enzimáticos se presentan como una alternativa a los métodos convencionales que permiten análisis in situ en tiempos cortos, reducir costes y proporcionan sensibilidades comparables a HPLC.

Como se ha dicho, el desarrollo de métodos de determinación basados en la fluorescencia intrínseca de las enzimas, como es el caso de la determinación de Ch mediante su reacción con ChOx, puede presentar problemas derivados de posibles interferencias espectrales en muestras biológicas o bajas sensibilidades. Una alternativa al uso de estas propiedades autoindicadoras es la unión química de la enzima a un fluoróforo de tal manera que se le dote de nuevas propiedades de fluorescencia. Esta idea, trasladada al desarrollo de biosensores enzimáticos, consiste en la unión a la enzima de un marcador fluorescente en la zona Vis-NIR, que permite el seguimiento de la reacción enzimática a las longitudes de excitación y emisión de dicho marcador. De esta manera se pueden evitar posibles interferencias espectrales desplazando la detección a longitudes de onda superiores. En este punto, los AuNCs se presentan como una interesante alternativa como marcadores luminiscentes en el campo bioanalítico. Además, como ya se ha comentado, presentan ventajas frente a los fluoróforos convencionales: mayor sensibilidad, fotoestabilidad, no muestran fluorescencia de base y poseen desplazamientos de Stokes grandes.

Es por ello que en esta sección se propone un esquema de trabajo general para la detección de reacciones enzimáticas, basado en la unión covalente de AuNCs lo más cerca posible al centro activo de la enzima, con el fin de facilitar fenómenos transferencia de energía con FAD y permitiendo mover la detección a alrededor de 700 nm (**Figura 1A.4**). De esta manera, el objetivo final trata de permitir la determinación libre de interferencias de Ch/ACh en muestras biológicas y a su vez, cambiar el entorno que rodea al FAD lo que puede llevar a una mejora del rendimiento cuántico de fluorescencia. Para ello se utilizará la enzima ChOx como flavoenzima modelo, primero para la determinación de Ch y tras el acoplamiento a la reacción enzimática AChE, para la determinación de ACh.

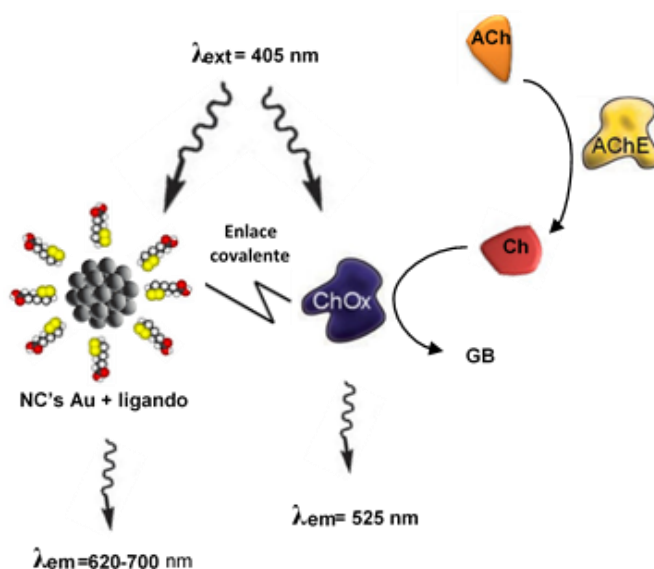


Figura 1A.4: Esquema del nanobiosensor enzimático propuesto para la determinación de ACh.

1A.2. Objetivos

El objetivo de esta sección se centra en el desarrollo de un nanobiosensor enzimático para la determinación del neurotransmisor ACh, mediante la biofuncionalización de nanoclusters de oro con la enzima ChOx. Y de esta forma desarrollar un método basado en la medida de la señal fluorescente del nanomaterial, utilizando este como marcador luminiscente, en busca de mejorar las prestaciones de los métodos actuales. En concreto se propusieron los siguientes objetivos específicos:

1. Evaluación de las propiedades de los AuNCs sintetizados y selección de los más adecuados para su aplicación al desarrollo de nanobiosensores.
2. Biofuncionalización de nanoclusters de oro.
 - a. Proposición de estrategias de biofuncionalización orientadas a través del estudio estructural de la enzima en relación a las características de los nanocluster de oro elegidos.
 - b. Elección del método de biofuncionalización y planteamiento del protocolo aplicado.
 - c. Estudio y optimización de la metodología de biofuncionalización.
3. Caracterización de los bioconjugados ChOx-AuNCs obtenidos.
 - a. Evaluación de la unión enzima-nanocluster de oro: estudio de las propiedades y estructura del bioconjugado mediante técnicas estructurales, espectroscópicas y de separación.
 - b. Estudio de la funcionalidad de la enzima inmovilizada, después de la biofuncionalización mediante técnicas espectroscópicas.
 - c. Estudio de la reacción enzimática del bioconjugado ChOx-AuNCs con Ch, a partir de la fluorescencia de los nanoclusters.
4. Evaluación del nanobiosensor desarrollado para la determinación cuantitativa de Ch.
5. Acoplamiento de la reacción AChE-ACh y evaluación del nanobiosensor desarrollado para la determinación cuantitativa de ACh.

1A.3. Experimental y métodos

1A.3.1. Reactivos y materiales

A lo largo de la sección se utilizaron las enzimas colina oxidasa, 15 U/mg sólido (*Alcaligenes* sp.) (EC 1.1.3.17) (Sigma-Aldrich) y acetilcolinaesterasa tipo V-S, 987 U/mg sólido (*Electrophorus electricus*, electric eel) (Sigma-Aldrich). Sus sustratos cloruro de colina y cloruro de acetilcolina también fueron comprados en Sigma-Aldrich.

Para la bioconjugación de los AuNCs de oro con la enzima ChOx se utilizó sal de sodio N-Hidroxisulfosuccinimida (sulfo-NHs) (Sigma-Aldrich), 1-etil-3 (3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) (ThermoFisher) y tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) (Panreac).

Así como diversas sales para la preparación de las disoluciones amortiguadoras utilizadas, Ácido 2-morfolinoetanosulfónico monohidrato (MES) y dihidrofosfato de sodio (NaP) ambos de Panreac.

1A.3.2. Estabilidad de AuNCs en diversas disoluciones amortiguadoras

Al seleccionarse el método de la carbodiimida para la unión covalente orientada de la enzima a los AuNCs, se prepararon una serie de disoluciones amortiguadoras para cubrir el intervalo de pH y fuerza iónica adecuado para favorecer la unión orientada de la enzima a través de sus grupos amino terminales: disolución amortiguadora de fosfatos NaP y de MES. Se probó así la estabilidad de la fluorescencia de los AuNCs en un total de 18 disoluciones amortiguadoras, que se resumen en la siguiente tabla:

		NaP			
pH		6,5	7	7,5	8
Fuerza iónica	100 mM	100 mM	100 mM	100 mM	100 mM
	50 mM	50 mM	50 mM	50 mM	50 mM
	25 mM	25 mM	25 mM	25 mM	25 mM
		MES			

Tabla 1A.1: Disoluciones amortiguadoras NaP y MES preparadas para cubrir el intervalo de pHs 6,5-8 y fuerza iónica 25-100 mM.

1A.3.3. Bioconjugación de AuNCs@LA con colina oxidasa

La bioconjugación de AuNCs con la enzima ChOx se realizó mediante el método de la carbodiimida. Con el fin de favorecer la unión orientada de la enzima a través de sus amino terminales, se diseñaron varias estrategias de biofuncionalización donde se varió el pH y fuerza iónica ya que son los parámetros que más pueden influir en la orientación de la enzima una vez unida de forma covalente. Con la información recogida en los apartados anteriores se diseñó un esquema de biofuncionalización final, con cuatro etapas definidas:

Sección 1A: Nanobiosensor enzimático basado en la fluorescencia de nanocluster de oro para la determinación de acetilcolina.

1. ACTIVACIÓN de los AuNCs:

En un eppendorf de 2 mL se pesaron 0,35 mg de EDC y 0,98 mg de sulfo-NHs y se añadieron 250 μ L de disolución amortiguadora MES 100 mM pH 7. A continuación, se añadieron 50 μ L de AuNCs stock y se mantuvo la mezcla en agitación orbital durante 30 minutos a temperatura ambiente.

2. PURIFICACIÓN de los AuNCs activados:

La mezcla se traspasó a un centrifugador de 10 K de 0,5 mL y se realizó la purificación por ultrafiltración en centrifuga a 4°C según el siguiente protocolo:

- i. Primer ciclo de centrifugado 5 min a 10000 g
- ii. Primer lavado: 200 μ L de NaP 50 mM pH 8
- iii. Segundo ciclo de centrifugado 5 min a 10000 g
- iv. Segundo lavado: 200 μ L de NaP 50 mM pH 8
- v. Tercer ciclo de centrifugado 5 min a 10000 g

El volumen final son 50 μ L de AuNCs activados y purificados.

3. BIOFUNCIONALIZACIÓN de AuNCs con la enzima:

Para ello en primer lugar se preparó una disolución de ChOx 1670 μ g/mL, pesando en un eppendorf 0,5 mg en 300 μ L de NaP 50 mM pH 8. En un eppendorf de 2 mL se añadieron los 50 μ L de AuNCs activados y purificados y se adicionaron 196 μ L de MES 100 mM pH 7. A continuación, se añadieron 54 μ L de ChOx 1670 μ g/mL, de esta forma la concentración de ChOx en la mezcla de funcionalización fue 300 μ g/mL. La mezcla se mantuvo en agitación orbital durante 2 horas a temperatura ambiente.

4. BLOQUEO de los carboxilos activados de los AuNCs:

A los 300 μ L de la disolución final de bioconjugado se añadieron 15 μ L de TRIS 2M pH 8, para obtener una concentración final en la mezcla de 100 mM.

1A.3.4. Caracterización por fluorescencia de la bioconjugación ChOx- AuNCs@LA

La caracterización por fluorescencia del bioconjugado, se realizó con el equipo Perkin Elmer en modo Scan, con rendijas de ext/em: 10/10 nm y velocidad de barrido 1000 nm/min.

Para estudiar los cambios de los AuNCs y la enzima antes y después de la biofuncionalización, se midió la fluorescencia de las disoluciones. Además, para poder comprender mejor los espectros finales, se prepararon diversos controles:

- Control AuNCs (AuNCs-c): se trata de una disolución de los AuNCs sin activar a la misma dilución que está en el bioconjugado final. Se añadieron en un eppendorf 50 μ L de NC y 250 μ L de la disolución amortiguadora final usada en la etapa de biofuncionalización.
- Control AuNCs + ChOx (Bcontrol): se trata de una disolución del AuNCs sin activar y ChOx a la misma dilución que está en el bioconjugado final (AuNCs + ChOx sin biofuncionalizar). Se añadieron en un eppendorf 50 μ L de AuNCs, 54 μ L de ChOx 1670 μ g/mL y 196 μ L de la disolución amortiguadora final usada en la etapa de biofuncionalización.

- Control ChOx (ChOx-c): se trata de una disolución de la enzima a la misma dilución que está en el bioconjugado final. Se añadieron en un eppendorf 54 μL de ChOx 1670 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 246 μL de la disolución amortiguadora final usada en la etapa de biofuncionalización.

Para estudiar la fluorescencia de la ChOx (a través de su grupo FAD), se utilizó en todos los casos el par $\lambda_{\text{ext}}/\lambda_{\text{em}}$: 405/525nm.

1A.3.5. Estudio de la relación -moléculas ChOx : AuNCs@LA en la bioconjugación

Con la intención de conocer la proporción de -moléculas ChOx:AuNCs@LA (ChOx:AuNC) óptima para la biofuncionalización, se estudiaron diferentes proporciones, manteniendo en todos los casos fija la cantidad de moléculas de ChOx y cambiando la cantidad de AuNCs, preparando muestras más concentradas o diluidas a partir del stock. La concentración de la enzima fue en todos los casos 300 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, lo que equivale a $3,01 \cdot 10^{15}$ moléculas de ChOx por mL.

El stock inicial de AuNCs@LA tiene una concentración de oro de 1567,28 mg/L (7,96 mM), lo que equivale a $3,77 \cdot 10^{16}$ AuNCs/ mL. Como en cada mezcla de bioconjugado se añadieron 50 μL de AuNCs en un volumen final de 300 μL , a partir del stock inicial de AuNCs@LA se consigue que en el bioconjugado haya $6,28 \cdot 10^{15}$ NCs/mL, lo cual corresponde a una relación ChOx:AuNCs de 1:2.

A partir de esta disolución se prepararon sucesivas concentraciones de AuNCs, para conseguir las proporciones ChOx:AuNCs a estudiar:

- Para el bioconjugado 1:1, se necesita una concentración de oro de 750,547 mg/L, lo que equivale a $3,01 \cdot 10^{15}$ NCs/mL. Para ello se mezclaron en un eppendorf 100 μL de AuNCs stock de 1567,28 mg/L en un volumen final de 200 μL de agua Mili-Q.

Las siguientes concentraciones se prepararon por preconcentración de la muestra mediante centricones de 0,5 mL (10K), usando una centrifuga MiniSpin Eppendorf.

- Para el bioconjugado 1:3, se necesita una concentración de oro de 2251,64 mg/L, lo que equivale a $9,03 \cdot 10^{15}$ AuNCs/mL. Esta disolución se preparó por concentración, añadiendo en el centricon 300 μL de NCs stock y centrifugando hasta conseguir un volumen final de 200 μL .
- Para el bioconjugado 1:5, se necesita una concentración de oro de 3752,73 mg/L, lo que equivale a $1,51 \cdot 10^{16}$ AuNCs/mL. Esta disolución se preparó por concentración, añadiendo en el centricon 400 μL de AuNCs stock y centrifugando hasta conseguir un volumen final de 165 μL .
- Para el bioconjugado 1:6, se necesita una concentración de oro de 4503,29 mg/L, lo que equivale a $1,081 \cdot 10^{16}$ AuNCs/mL. Esta disolución se preparó por concentración, añadiendo en el centricon 480 μL de AuNCs stock y centrifugando hasta conseguir un volumen final de 170 μL .
- Para el bioconjugado 1:7, se necesita una concentración de oro de 5253,83 mg/L, lo que equivale a $2,11 \cdot 10^{16}$ AuNCs/mL. Esta disolución se preparó por concentración, añadiendo en el centricon 400 μL de AuNCs stock y centrifugando hasta conseguir un volumen final de 120 μL .

- Para el bioconjugado 1:10, se necesita una concentración de oro de 7505,475 mg/L, lo que equivale a $3,01 \cdot 10^{16}$ AuNCs/mL. Esta disolución se preparó por concentración, añadiendo en el centrífugo 400 μ L de AuNCs stock y centrifugando hasta conseguir un volumen final de 85 μ L.

1A.3.6. Medidas de espectrometría de absorción atómica de alta resolución de fuente continua con horno de grafito (HR CS GFAAS)

Para la determinación de la concentración de Au en las diferentes disoluciones de AuNCs conjugados y controles evaluados (0,2 mL), estas se sometieron a ataque ácido (0,3 mL de agua regia, dos horas a temperatura ambiente y otros 15 min a 60 °C). Estas muestras se diluyeron a 20 mL con agua mili-Q y la solución se midió en el equipo Perkin-Elmer Avio 200 ICP-OES a 267,595 nm. Para las medidas HR CS GFAAS se eligió una longitud de onda de 242,795 nm y se aplicó el programa de temperatura mostrado en la **Tabla 1A.2**. Las medidas fueron realizadas por el grupo MARTE de la Universidad de Zaragoza.

	Secado 1	Secado 2	Pirolisis 1	Pirolisis 2	Adaptación	Atomización	Limpieza
T (°C)	90	110	500	500	500	2200	2450
Rampa (°Cs ⁻¹)	3	5	50	---	---	150	500
Mantenimiento (s)	20	10	20	10	5	10	4
Flujo de aire (Lmin ⁻¹)	2	2	2	2	---	---	2

Tabla 1A.2: Programa de temperaturas utilizado para las medidas GFAAS.

1A.3.7. Estudio por fluorescencia de la reacción entre el bioconjugado AuNCs@ChOx y colina

En primer lugar, se preparó una disolución de Ch 0,019 M, pesando en un eppendorf 4 mg de Ch en un volumen final de 1,5 mL de agua Mili-Q. A partir de esta disolución se prepararon diversas concentraciones de Ch; 10^{-3} , $5 \cdot 10^{-4}$, 10^{-4} , $5 \cdot 10^{-5}$ y 10^{-5} M, con las que se realizan los estudios de la reacción ChOx-Ch, añadiendo en cubeta 10 μ L de Ch sobre 50 μ L del bioconjugado final.

El seguimiento de la reacción se llevar a cabo por fluorescencia, con el equipo Perkin Elmer en modo Scan y en modo Timebased con rendijas de ext/em: 10/10 nm y velocidad de barrido 1000 nm/min.

- **Modo Scan:** se realizaron espectros de excitación periódicamente en el tiempo para observar los cambios de los máximos de emisión del AuNCs y del FAD de la enzima tras la reacción con la Ch. Para ello se utilizaron las λ_{ext} del AuNC, 300 nm o del FAD, 405 nm.
- **Modo Timebased:** para realizar el estudio cinético, se midió la variación de fluorescencia con el tiempo de forma continua durante la reacción, a unas longitudes de onda de excitación y emisión dadas. Los pares $\lambda_{ext}/\lambda_{em}$ estudiados fueron, 405/700 nm para el estudio de la

variación de la fluorescencia del AuNCs y 405/525 nm para el estudio de la variación de la fluorescencia del FAD.

1A.3.8. Estudio por fluorescencia del acoplamiento de la reacción acetilcolinaesterasa-acetilcolina, para la determinación indirecta de acetilcolina.

Para este estudio se utilizó el equipo Photon Technology International (PTI), en modo Timebased, con rendijas de ext/em: 10/20 nm y tiempo de integración 0,1 s.

- Estudio de la reacción enzimática AChE-ACh acoplada a ChOx

Para este ensayo se simuló la concentración de ChOx en el bioconjugado (300 µg/mL), para ello en una cubeta ($V_{\text{final}}=100$ µL) se añadieron: 63 µL de NaP 50mM pH 8, junto con 17 µL de ChOx 1670 µg/mL. Sobre esta disolución se añadieron 10 µL de una disolución de AChE 10 U/mL para que en el volumen final de esta sea 1U/mL.

Se preparó una disolución de acetilcolina $5,5 \cdot 10^{-3}$ M, pesando en un eppendorf 1 mg y se llevó a un volumen final de 1 mL. Se midió la variación de intensidad fluorescente a las longitudes de onda de máxima fluorescencia de la colina oxidasa (FAD), $\lambda_{\text{ext}}= 405$ nm / $\lambda_{\text{em}}= 525$ nm y una vez estabilizada se añadieron 10 µL de la disolución $5 \cdot 10^{-4}$ M de ACh, resultando una concentración final $5 \cdot 10^{-5}$ M y se registraron las variaciones con el tiempo.

- Evaluación del nanobiosensor para la determinación indirecta de ACh

Se realizó de la misma forma que el estudio anterior, pero en este caso se utiliza la ChOx unida al AuNCs (bioconjugado AuNCs@ChOx). Para ello, se añaden en cubeta ($V_{\text{final}}=100$ µL), 80 µL del bioconjugado final, junto con 10 µL de AchE 10 U/mL. Se comenzó a medir la variación de intensidad fluorescente a las longitudes de onda de máxima fluorescencia de la AuNCs@ChOx, $\lambda_{\text{ext}}= 405$ nm / $\lambda_{\text{em}}= 700$ nm y una vez estabilizada se añadieron 10 µL de la disolución de ACh; 10^{-3} , $5 \cdot 10^{-4}$, 10^{-4} , $5 \cdot 10^{-5}$ y 10^{-5} M y se registraron las variaciones con el tiempo.

1A.4. Resultados

1A.4.1. Estrategias de biofuncionalización

1A.4.1.1. Elección de AuNCs

Tras el estudio y caracterización de los dos tipos de nanoclusters evaluados, se decidió trabajar con los AuNCs de ácido lipoico, excluyéndose los nanoclusters de oro de BSA para esta aplicación, debido a las diversas dificultades encontradas a lo largo de la caracterización como:

- La gran cantidad de BSA en exceso de estos AuNCs observada por STEM y electroforesis, que puede dificultar la unión dirigida de la enzima ChOx a la superficie de los AuNCs e incluso dificultar los fenómenos de transferencia de energía buscados.
- La imposibilidad de obtención de la distribución de tamaños de estos AuNCs mediante STEM, debido a este exceso de materia orgánica, que impide la obtención del número de átomos por AuNCs y por tanto de la concentración de AuNCs/mL del stock, fundamental para el diseño de la estrategia de biofuncionalización.

Además, en busca de propiciar los fenómenos de transferencia de energía entre los AuNCs y la enzima, los AuNCs@LA se presentan como los más adecuados debido al solapamiento existente entre su espectro de excitación y el espectro de emisión de la ChOx. El FAD de la ChOx emite a 525 nm, longitud de onda a la que absorben los AuNCs@LA.

1A.4.1.2. Estudio de la estructura cristalina de la enzima colina oxidasa

La base de datos Protein Data Bank (PDB) es un repositorio de estructuras tridimensionales (3D) de macromoléculas biológicas como proteínas. En el marco de este trabajo, el conocimiento de los grupos funcionales en la superficie de la enzima con la que se va a funcionalizar los AuNCs, es clave para el diseño de las estrategias de unión.

Para obtener esta información, previamente se debe conocer el organismo del que procede la enzima, en este caso *Alcaligenes sp.*, un género microbiológico de bacterias Gram-negativas. Así, debido a que la ChOx proveniente de este organismo no se encuentra en PDB, se decidió trabajar con la estructura de esta misma enzima extraída de otra bacteria, *Arthrobacter Globiformis* que, al provenir del mismo género microbiológico, deberían presentar estructuras cristalinas similares. De esta forma, a partir del fichero (4mjw.pdb) y con ayuda del programa de visualización molecular Pymol 'Build' (Molecular Graphics System, Pymol), es posible buscar en la estructura 3D de la enzima, los aminoácidos de interés, pudiendo conocer así su localización. La búsqueda se centra en los siguientes aminoácidos, que pueden actuar como nucleófilos en reacciones de unión covalente o adsorción iónica de la enzima a los AuNCs:

- Lisina (lys, K): nucleófilo (amino primario, pKa 10)
- Aminos terminales: primer aminoácido de cada cadena polipeptídica (amino primario, pKa 7)
- Arginina (arg, R): cargas positivas
- Cisteína (cys, C): nucleófilo (tiol)

También se busca la zona de localización del centro activo. En la bibliografía⁵² se indica que, diferentes conformaciones del 'loop' 250-255 (zona de aminoácidos de la proteína) definen

diferentes accesibilidades a la entrada del sitio activo, lo que sugiere un papel fundamental de este loop en la regulación del acceso del sustrato al sitio activo y por tanto lo sitúa cerca del mismo. De esta forma se localiza también en la secuencia peptídica este 'loop' y se representa en la estructura tridimensional de la enzima.

Los resultados del estudio se muestran en la **Figura 1A.5**, en ella se destacan los grupos funcionales que han sido revisados. Como se observa, cercana a la zona del sitio activo se encuentran dos aminos terminales, debido a que, en su estructura cuaternaria, la enzima es un dímero. Esta zona es la más interesante para la biofuncionalización, ya que con la unión de AuNCs entorno al sitio activo, se incrementa la posibilidad de transferencia de energía entre el AuNC y el grupo FAD de la enzima (presente en el interior de su sitio activo). De esta forma se promueve que tras la unión del sustrato (Ch) al centro activo de la ChOx, a la par que se produzca un cambio en la fluorescencia del grupo FAD de la misma, se genere una transferencia de energía al AuNC y sea posible observar también cambios en su fluorescencia.

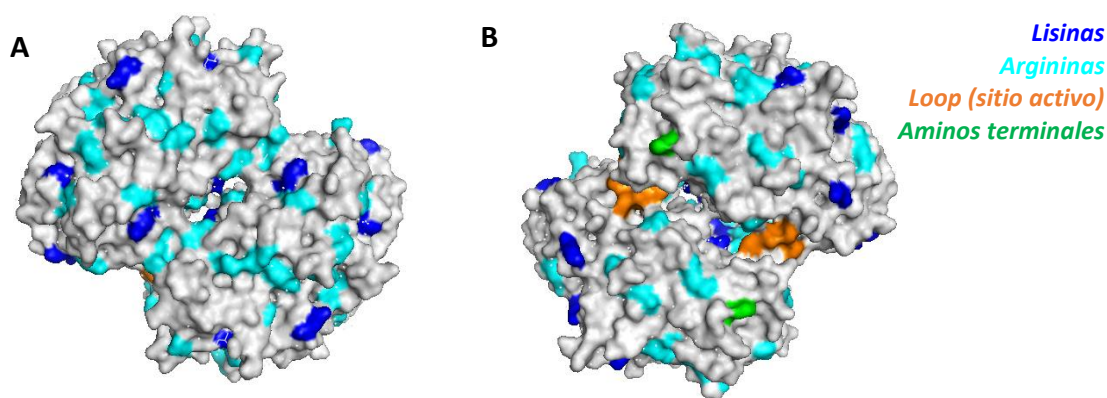


Figura 1A.5: estructura tridimensional y grupos funcionales en la superficie de la enzima ChOx (arrobacter globiformis); **A)** Cara posterior de la enzima; **B)** Cara frontal de la enzima donde se encuentra el sitio activo y los aminos terminales.

Por ello, la estrategia a seguir se basará en la química de la carbodiimida, mediante la activación de los grupos carboxilo de los AuNCs de oro y la unión de estos, mediante enlace covalente, a los aminos terminales primarios de la enzima. Según el esquema mostrado en la **Figura 1A.6**.

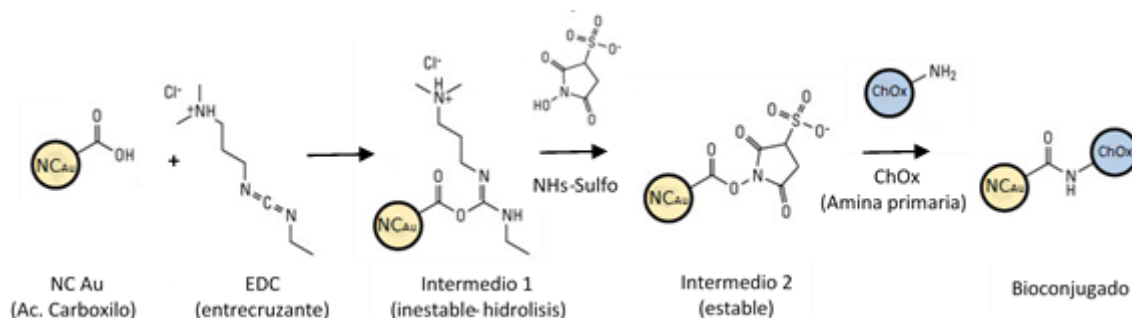


Figura 1A.6: Reacción esquemática de la bioconjugación usando el método de la carbodiimida.

Es importante que la estrategia de funcionalización respete la orientación de los grupos funcionales de la enzima y mantenga su actividad biológica tras la inmovilización de la misma a la superficie del AuNC.

1A.4.1.3. Planteamiento de la estrategia de biofuncionalización

Con la finalidad de que a la hora de realizar la biofuncionalización, los grupos amino terminales de la enzima reaccionen de forma covalente con los grupos carboxilo de los AuNCs, se buscaron las condiciones de pH adecuadas, en las cuales sólo los grupos amino terminales sean reactivos (estén desprotonados) y tengan, por tanto, mayor probabilidad de actuar como nucleófilos en la química de unión seleccionada.

Para este planteamiento, es fundamental tener en cuenta el pKa de los aminoácidos de los aminos terminales ($\sim 7,5$) y el de otros grupos aminos ionizables en la superficie proteica que puedan actuar también como nucleófilos en la reacción (ϵ -amino de las cadenas laterales de lisina, pKa ~ 10) (**Figura 1A.7**).

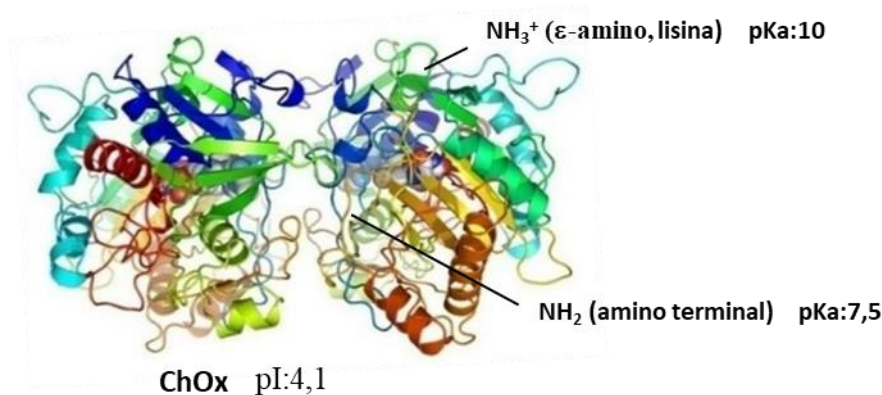


Figura 1A.7: Punto isoeléctrico y pKa de los aminoácidos de la enzima ChOx (*arrobacter globiformis*).

Por lo tanto, deben escogerse pHs de reacción que aseguren la reactividad de los grupos aminos terminales (desprotonados), evitando que los ϵ -amino de las cadenas laterales de lisinas sean reactivos (protonados). Se sabe que puede haber lisinas con pKa alterados más bajos de los normal, por lo que por seguridad se trabaja a $\text{pH} < 9$, ya que, si las mismas se encuentran desprotonadas, podrían unirse covalentemente a los AuNCs. Como muestra la **Figura 1A.5**, las lisinas son muy abundantes en toda la superficie de la enzima, por lo que la activación de estas alejaría a los AuNCs del centro activo.

Además de tener en cuenta el pKa de las lisinas y los aminos terminales, también se debe tener en cuenta el punto isoeléctrico (pI) de la enzima. Los AuNCs presentan una alta densidad de cargas negativas (grupos carboxilo desprotonados) en su superficie, por lo tanto, pueden actuar como intercambiadores catiónicos, es decir, unirse de forma reversible por atracción electrostática a proteínas con carga neta positiva. Como los procesos de adsorción iónica al AuNC son más rápidos que las reacciones de unión covalente, para tener el control de la orientación a través de la unión covalente por los aminos terminales de la enzima, hay que evitar la unión iónica de la misma a la superficie de los AuNCs. Por lo tanto, es recomendable trabajar a un pH donde la enzima tenga carga neta negativa y así la única forma de unirse a la superficie del AuNC sea por una unión covalente entre los aminos primarios de la misma y los carboxilos activados del AuNC.

Dado que el pI de la enzima es de 4,1, pHs por encima de 5 aseguran una carga neta negativa de la misma. Por tanto, el pH de unión de la enzima a los AuNCs activados con carbodiimida debe estar entre 5-8. Debido al pKa de los aminos terminales, entorno a pH 6 el 99% de los mismos se encuentra en la forma NH_3^+ , por tanto, se buscará trabajar a pHs superiores a 6,5. A pH 7 el 50% de los aminos se encuentran como NH_3^+ y el otro 50% como NH_2 (especie reactiva hacia carboxilos activados con la química de la carbodiimida). Entorno a pH 8, el 99% de los aminos se encuentra como NH_2 , pero se encuentra cerca de un pH conflictivo, donde las Lisinas pueden ser reactivas, pH 9. Por tanto, se decidió trabajar a pH entre 6,5 y 8.

1A.4.1.4. Elección de la disolución amortiguadora para la biofuncionalización

Para cubrir las condiciones de pH comentadas, se estudió la estabilidad coloidal de los AuNCs@LA en las disoluciones amortiguadoras indicadas en la parte experimental y se evaluó por fluorescencia, el efecto de las mismas sobre la estabilidad de los AuNCs@LA. Los resultados de estos estudios se recogen en las **Tabla 1A.3** que muestra la intensidad del máximo de emisión del AuNC@LA, recogida en cada tiempo evaluado para cada disolución amortiguadora.

Tiempo	0 h	4,30 h	24 h
Intensidad de Fluorescencia (λ_{em} 700 nm)			
Agua	47,51	36,35	30,3
NaP			
100 mM pH=6,5	19,46	13,46	14,42
100 mM pH=7	28,42	21,89	28,08
100 mM pH=7,5	40,7	28,14	102,2
100 mM pH=8	44,94	26,91	38,3
50 mM pH=6,5	21,67	17,13	24,79
50 mM pH=7	37,41	24,64	30,82
50 mM pH=7,5	38,96	32,44	40,81
50 mM pH=8	42,22	40,92	45,27
25 mM pH=6,5	26,58	19,34	24,78
25 mM pH=7	37,9	26,29	30,17
25 mM pH=7,5	35,69	32,51	33,5
25 mM pH=8	41,27	30,98	43,07
MES			
100 mM pH=6,5	20,56	12,1	15,09
100 mM pH=7	38,83	33,49	38,54
50 mM pH=6,5	27,28	17,14	18,87
50 mM pH=7	35,35	24,78	29,53
25 mM pH=6,5	26,34	17,39	33,33
25 mM pH=7	34,41	27,94	27,47

Tabla 1A.3: intensidades de fluorescencia en el máximo de emisión de AuNCs@LA (700 nm) con λ_{ext} 300 nm, en cada uno de los tiempos de medida, para cada tampón.

Sección 1A: Nanobiosensor enzimático basado en la fluorescencia de nanocluster de oro para la determinación de acetilcolina.

De estos resultados se extraen las siguientes conclusiones:

- En disolución amortiguadora fosfato, mantienen la estabilidad coloidal relativa durante 24 horas en diversas disoluciones amortiguadoras, a destacar, NaP 50 y 25 mM, pH 8 (97% y 75% de la señal fluorescente inicial, respectivamente) y NaP 25 mM, pH 7,5 (91% de la señal fluorescente inicial).
- En disolución amortiguadora MES, mantienen la estabilidad coloidal relativa durante 24 horas únicamente en MES 100 mM pH 7 (86% de la señal fluorescente inicial).

1A.4.1.5. Esquema de bioconjugación de AuNCs@LA con colina oxidasa

Una vez establecidas las estrategias para la unión dirigida, se planteó el protocolo de biofuncionalización utilizando la química de la carbodiimida que se dividió en cuatro etapas:

1. **Activación de AuNCs con EDC y sulfo-NHs:** para esta etapa el pH óptimo se encuentra entre 6,5 y 7, nunca superiores debido a la inestabilidad del intermedio 1 (**Figura 1A.6**), lo que podría provocar la hidrólisis del mismo. Esta etapa se diseñó ajustando las relaciones molares; Enzima:EDC (1:1500) y EDC:Sulfo-NHs (1:2)⁵³. La activación se llevó a cabo durante 30 min a T^a ambiente. Se utilizó sulfo-NHs para así mantener la carga neta negativa de los AuNCs a pesar de su activación con carbodiimida.
2. **Purificación de AuNCs activados:** se llevó a cabo por ultrafiltración para eliminar el exceso de EDC y NHs-sulfo. Proceso rápido a 4°C, a esta temperatura se pretende evitar la posibilidad de hidrólisis del intermedio 1.
3. **Biofuncionalización de AuNCs con la enzima:** se utilizaron pHs comprendidos entre 7 y 8, que permiten la reactividad de los aminos terminales (desprotonados) y eviten la desprotonación de los ε-aminos de las lisinas. Durante 2 horas a T^a ambiente.
4. **Bloqueo de los carboxilos activados:** la intención de esta etapa es evitar que los carboxilos de los AuNCs que no se han unido a la enzima, sigan siendo reactivos y puedan existir reacciones secundarias como, el entrecruzamiento entre AuNCs biofuncionalizados o la unión inespecífica de componentes de la muestra a analizar.

Con estas pautas se escogieron de entre las disoluciones amortiguadoras seleccionadas, aquellas que se ajusten mejor a estas condiciones. El protocolo completo y las disoluciones amortiguadoras seleccionadas se precisan en la parte experimental (*apartado 1A.3.3*).

1A.4.2. Bioconjugación de AuNCs@LA con colina oxidasa

1A.4.2.1. Estudio de la relación -moléculas ChOx :AuNCs- en la bioconjugación

Como primer paso en la optimización de la bioconjugación, se propuso la optimización de la relación entre ChOx:AuNCs, con el fin de alcanzar un alto porcentaje de modificación de las moléculas de enzima a través de sus amino primarios, sin que haya un exceso muy grande de AuNCs sin unir. Cada dímero enzimático tiene dos aminos terminales (ambos cercanos al sitio

activo), por lo que la relación óptima debería ser 1:2. Sin embargo, los grupos carboxilo activados con carbodiimida son poco estables en el tiempo y en ocasiones es necesario utilizar relaciones superiores para asegurar el marcaje de todas las moléculas de enzima con AuNCs. Por otro lado, no es adecuado utilizar excesos muy grandes de AuNCs ya que se puede forzar la unión de los mismos a los ϵ -aminos de lisinas con un pKa alterado, más bajo de lo usual.

Para ello se evaluaron diferentes relaciones -moléculas ChOx:AuNCs-, manteniendo en todos los casos la concentración de ChOx ($300\mu\text{g}/\mu\text{L}$ equivalentes a $3,01 \cdot 10^{15}$ moléculas/mL) y variando las concentraciones de AuNCs como se describe en la parte experimental (*apartado 1A.3.5*).

Debido a que, tanto la enzima como los AuNCs tienen tamaños similares, es difícil separar por técnicas sencillas (filtración, ultrafiltración, centrifugación) los AuNCs biofuncionalizados de las moléculas de enzima o AuNCs sin biofuncionalizar. Por lo tanto, con este tipo de material es más difícil caracterizar la biofuncionalización que con nanopartículas de mayor tamaño. Este hecho hace necesario utilizar varios métodos de caracterización que nos permitan asegurar la unión covalente de los AuNCs a la ChOx y aplicarlos tanto al bioconjugado como a los siguientes controles definidos en la parte experimental:

- i) Control ChOx (ChOx-c): la enzima sola diluida a la concentración utilizada durante la funcionalización.
- ii) Control AuNCs (AuNCs-c): los AuNCs diluidos a la concentración utilizada durante la funcionalización.
- iii) Control AuNCs + ChOx (Bcontrol): mezcla de AuNCs y enzima sin biofuncionalizar, a la concentración utilizada durante la funcionalización. Este es un control que permite determinar la existencia de unión no covalente de la enzima al AuNC (adsorción iónica, adsorción hidrofóbica...).

1A.4.2.2. Caracterización por electroforesis de los bioconjugados AuNCs@LA@ChOx

Se utilizó la electroforesis de agarosa (parte experimental, *apartado 1.3.2.4*.) para evaluar las variaciones en la movilidad, carga y tamaño de los controles y el bioconjugado resultante en cada una de las proporciones de bioconjugación. Es de esperar que, si la enzima se une al AuNC, se observe un cambio en su movilidad y por lo tanto si toda la enzima es modificada de forma covalente, no se aprecie la banda proteica correspondiente a la enzima sin modificar. La fluorescencia de las muestras en estos geles, tanto del FAD de la enzima ChOx como de los AuNCs, puede visualizarse con la ayuda de una lámpara UV.

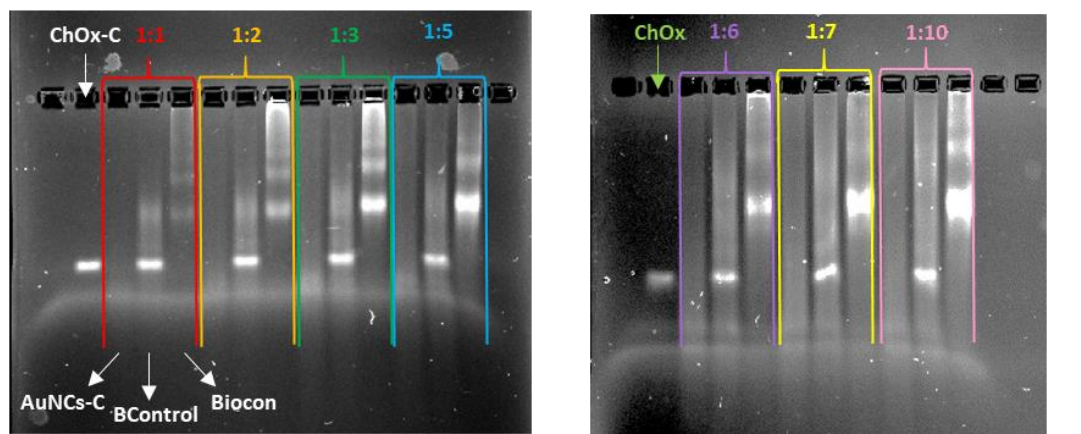


Figura 1A.8: Electroforesis de agarosa 4% en la que se observa la fluorescencia de las muestras mediante una lámpara UV. Las muestras evaluadas son: ChOx-control (primer carril) y para cada relación ChOx:AuNCs (1:n), un bloque de tres carriles, dentro de cada cual de Izda a Dcha: AuNCs-control, bioconjugado control (AuNCs + ChOx sin biofuncionalizar) y bioconjugado.

De la **Figura 1A.8**, se pueden extraer diversas conclusiones:

- En todos los casos, en el carril del bioconjugado, desaparece la banda de ChOx libre (ChOx-C), lo cual confirma la unión de la enzima covalente al NC e indica que no queda ChOx libre.
- Esta banda de ChOx sí aparece en el caso del Bcontrol (AuNCs + ChOx sin biofuncionalizar), sin sufrir variación significativa de intensidad. Además, se observa otra banda con menor movilidad, pero de muy baja intensidad que demuestra una cierta adsorción física (iónica y/o hidrofóbica) pero que puede considerarse no significativa (<10%). Esta banda adjudicada a la adsorción física, también aparece en el caso de los bioconjugados y potencia su intensidad a partir de la proporción 1:3.
- En todos los casos, en el bioconjugado, aparecen bandas en la zona superior, prácticamente a la altura del pocillo, que corresponden a la unión covalente de la enzima con el AuNCs. Estas bandas se deben a compuestos de mayor tamaño, por lo cual tienen una movilidad menor, además al no ser bandas definidas, puede indicar polidispersidad y existencia de compuestos de diversos tamaños. Estas bandas en el bioconjugado, debidas a enlace covalente, aumentan su intensidad a medida que aumenta la proporción ChOx:NC, desde 1:1 hasta 1:3, sin embargo, a partir de 1:5 no se puede encontrar correlación entre las bandas y la proporción.

1A.4.2.3. Caracterización por fluorescencia de los bioconjugados AuNCs@LA@ChOx

Se obtuvieron los espectros de emisión de cada uno de los bioconjugados y controles utilizando la longitud de onda de excitación de AuNCs (λ_{ext} 300 nm) y la longitud de onda de excitación del FAD (λ_{ext} 405 nm), que se muestran para el ratio 1:2 en la **Figura 1A.9**. Se observa que el bioconjugado presenta fluorescencia debida tanto a los AuNCs como a la enzima ChOx; esta última consiste en la fluorescencia de aminoácidos, especialmente triptófano (a unos 340 nm bajo una excitación de 225-275 nm) y la fluorescencia del FAD (a 525 nm, excitación a 405 nm).

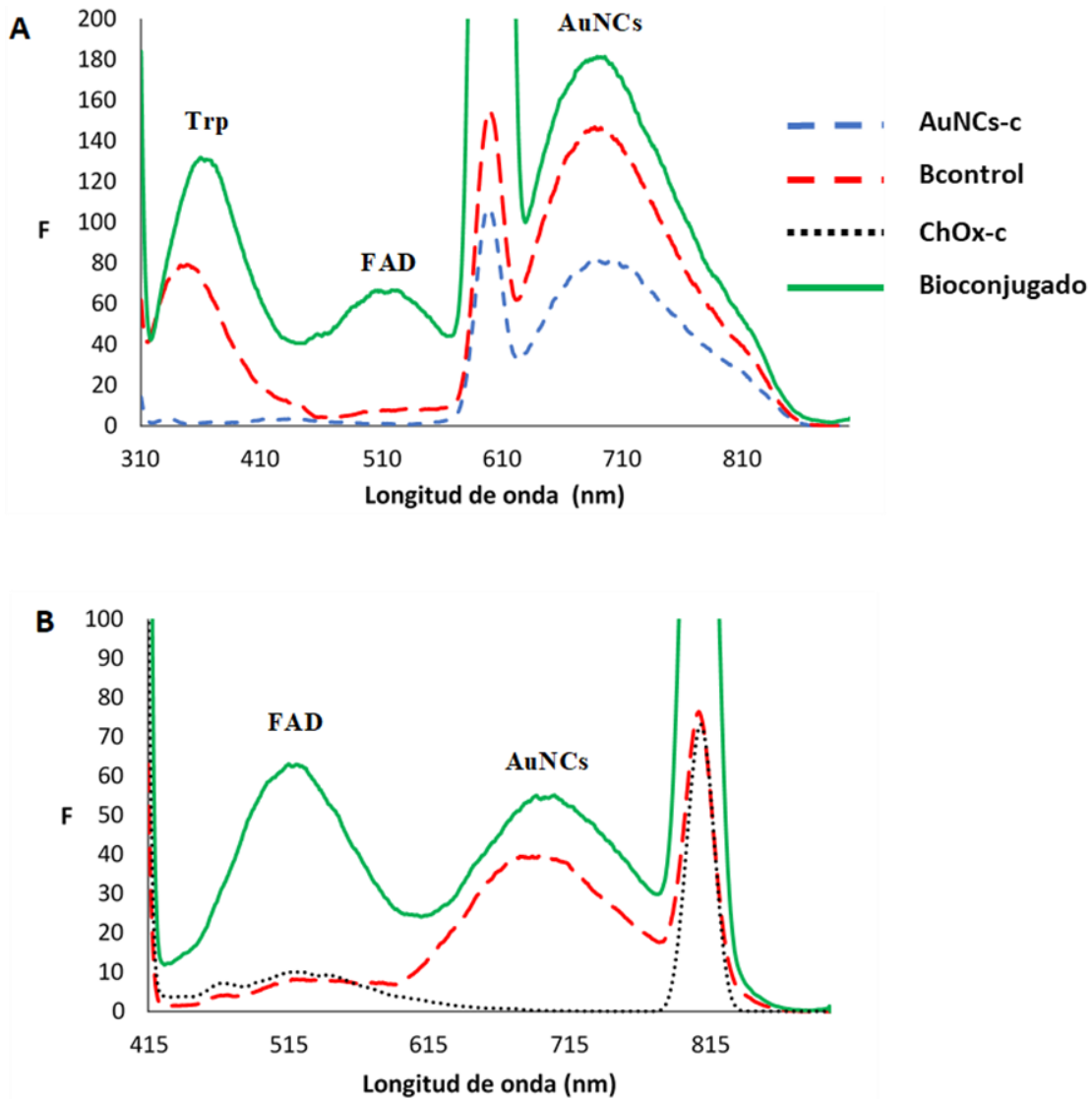


Figura 1A.9: Espectros de emisión para la relación ChOx:AuNCs 1:2 **A)** con λ_{ext} 300 nm, de los controles AuNC-c, Bcontrol y del bioconjugado **B)** con λ_{ext} 405 nm, de los controles ChOx-c, Bcontrol y del bioconjugado

Estos máximos también están presentes en los controles, sin embargo, existen diferencias interesantes entre ellos que también dependen de las relaciones ChOx:AuNCs, mostradas en la **Figura 1A.10**.

- El máximo de los AuNCs a 700 nm se intensifica en el bioconjugado en comparación al Bcontrol e incluso a AuNCs-c (**Figura 1A.9A**); sin embargo, la diferencia en la intensidad de fluorescencia entre el bioconjugado y su control (Bcontrol) es casi la misma para proporciones superiores a 1: 2 (**Figura 1A.10**). Esto indica que la bioconjugación aumenta la fluorescencia de los AuNCs y también que la estequiometría ChOx:AuNCs óptima es 1:2.
- El máximo debido al triptófano (alrededor de 350 nm) disminuye con la concentración de AuNCs, debido al efecto de filtro interno producido por el nanomaterial (**Figura 1A.10**). Además se observa el desplazamiento de este pico a una longitud de onda superior en el bioconjugado en comparación con el Bcontrol (**Figura 1A.9.A**); esto indica que los grupos de triptófano están expuestos a un ambiente más hidrofílico⁵⁴ en el bioconjugado, que es

consistente con un cambio estructural de la enzima (más abierta) debido a la bioconjugación.

- Por último, el cambio estructural sufrido por el ChOx en el bioconjugado se observa también en los espectros de fluorescencia que se llevan a cabo a $\lambda_{\text{ext}} = 405 \text{ nm}$, que corresponde a la máxima excitación del grupo FAD, mostrándose la potenciación de la fluorescencia del mismo en el bioconjugado respecto de ambos controles (**Figura 1A.9B**). Además, esta figura muestra que la intensidad de fluorescencia FAD a 525 nm en el control del bioconjugado y en el control de ChOx es muy similar, pero considerablemente menos intenso que en el bioconjugado; esta mejora puede deberse al hecho de que el grupo FAD, en esta configuración, es menos propenso a verse afectado por los desactivadores naturales de proteínas⁴².

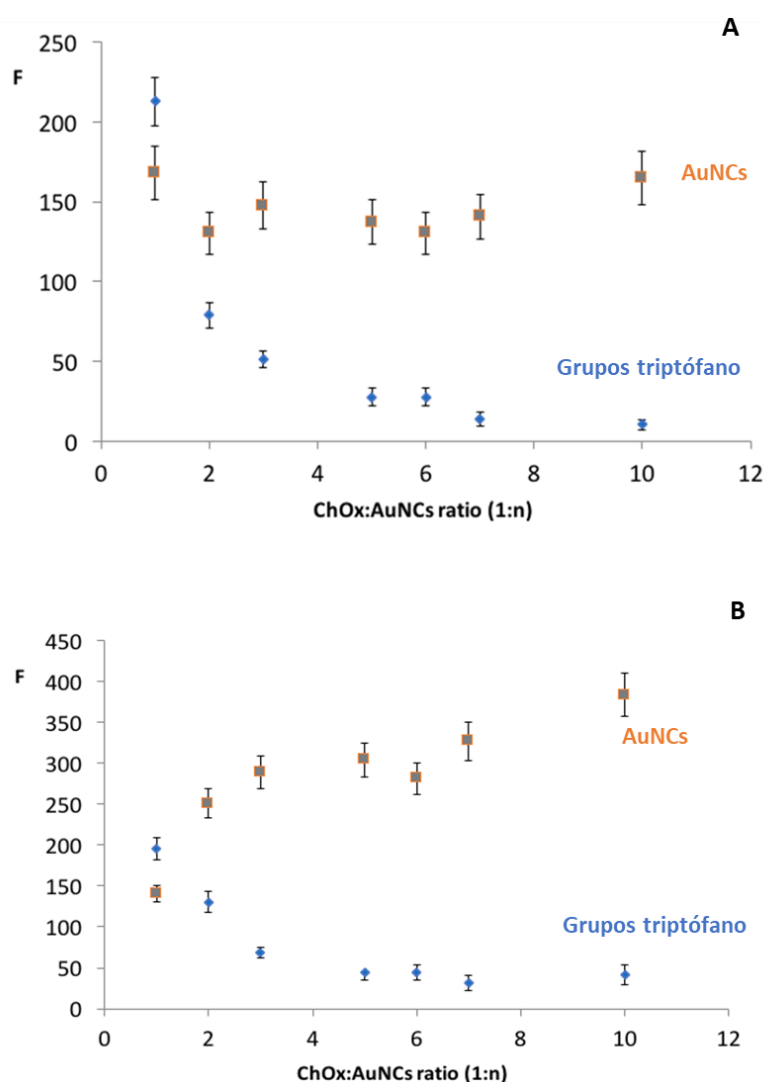


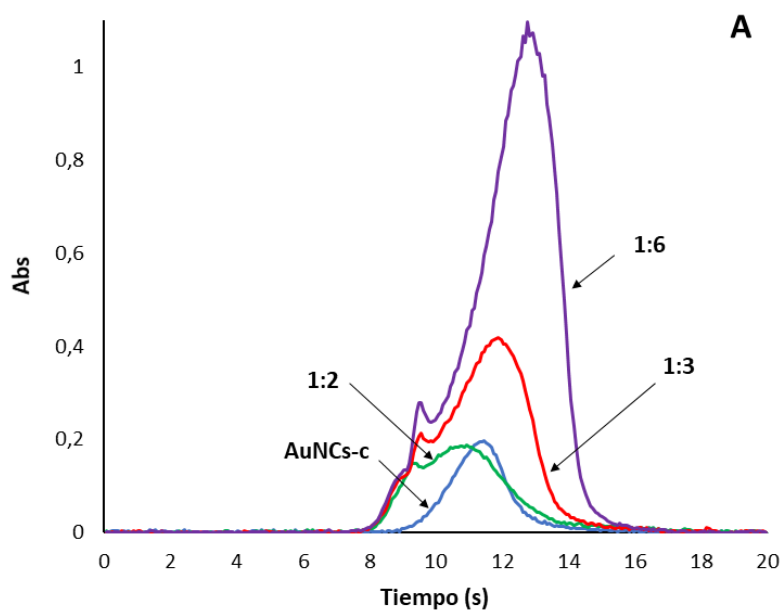
Figura 1A.10: Intensidad de fluorescencia con $\lambda_{\text{ext}}=300 \text{ nm}$ de los AuNCs ($\lambda_{\text{em}} =700 \text{ nm}$) y de los grupos triptófano ($\lambda_{\text{em}} =370 \text{ nm}$) para cada ratio evaluado ChOx:AuNCs (1:n) de las muestras **A)** control del bioconjugado **B)** bioconjugado.

1A.4.2.4. Caracterización los bioconjugados mediante HR CS GFAAS.

Finalmente, se propuso la posibilidad de estudiar la formación del bioconjugado utilizando la técnica de espectrometría de absorción atómica de alta resolución de fuente continua con horno de grafito (HR CS GFAAS), que se basa en la formación de una nube de átomos a partir de una muestra líquida o sólida, mediante la aplicación de un programa de temperaturas adecuado. De esta forma, la determinación se realiza a través de la absorbancia que generan los átomos, que se relaciona con la concentración de la muestra mediante la ley de Lambert-Beer. En el ámbito de los nanomateriales, esta técnica se está comenzando a utilizar, fundamentalmente, como método de determinación de la concentración de Au total en nanopartículas. Estudios recientes llevados a cabo por el grupo MARTE (Métodos Rápidos de Análisis con Técnicas Espectroscópicas) de la Universidad de Zaragoza, que han demostrado que los perfiles de absorción obtenidos por HR CS GFAAS durante el paso de atomización de Au (III) y AuNP exhiben algunas diferencias, por lo que se ha mostrado la capacidad de esta técnica para la diferenciación y caracterización de nanopartículas de oro y diferenciación de tamaños en muestras acuosas.⁵⁵

Dado que el entorno químico de Au es diferente en AuNCs-c, Bcontrol y en el bioconjugado, también se esperan perfiles de absorción diferentes obtenidos por GFAAS. En primer lugar, la **Figura 1A.11** muestra en todos los casos un pico en torno a 8,5 s atribuido a la materia orgánica que es más volátil y por tanto se atomiza antes.

Más específicamente, la **Figura 1A.11A** muestra que para AuNCs-c, el pico de atomización para Au aparece alrededor de 11.5 s, sin embargo, pero para Bcontrol este máximo se desplaza y pasa a tiempos de atomización más largos, de tal manera que cuanto mayor es el exceso de AuNCs, mayor es el tiempo de atomización y más intenso es el pico de absorción. Cuando el bioconjugado es sometido al mismo proceso (**Figura 1A.11B**), aparece un nuevo pico alrededor de 10 s, que es claramente diferente al de Bcontrol. Este nuevo pico (Biocon) siempre aparece al mismo tiempo de atomización y con casi la misma altura (una vez restado el aporte debido al Bcontrol), lo que concuerda con los resultados observados usando fluorescencia. Como puede verse en la **Figura 1A.11B** para relación ChOx:AuNCs 1: 2 no hay pico debido a AuNCs libres, lo que confirma esta relación como óptima.



Sección 1A: Nanobiosensor enzimático basado en la fluorescencia de nanocluster de oro para la determinación de acetilcolina.

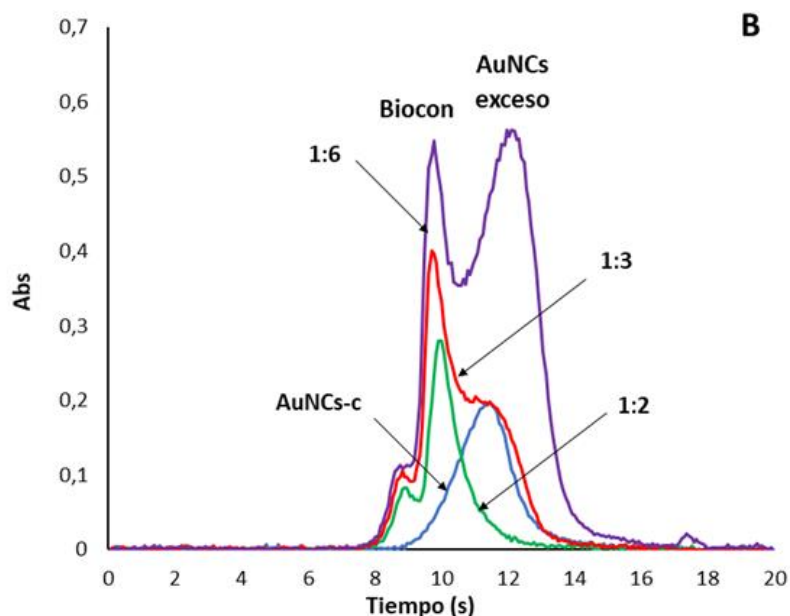


Figura 1A.11: Registros de absorbancia versus tiempo obtenidos usando HR CS GFAAS de los diferentes ratios ChOx:AuNCs y el control AuNC-c para A) Bcontrol B) Bioconjugado.

1A.4.3. Variación de la fluorescencia de AuNCs@LA@ChOx durante la reacción enzimática: mecanismo de detección

De acuerdo con la **Figura 1A.9B**, el seguimiento de la reacción entre el bioconjugado (elegido como óptimo en la relación ChOx:AuNCs 1:2) y Ch se puede llevar a cabo midiendo la fluorescencia del FAD ($\lambda_{em} = 525 \text{ nm}$) o la fluorescencia de AuNCs ($\lambda_{em} = 700 \text{ nm}$).

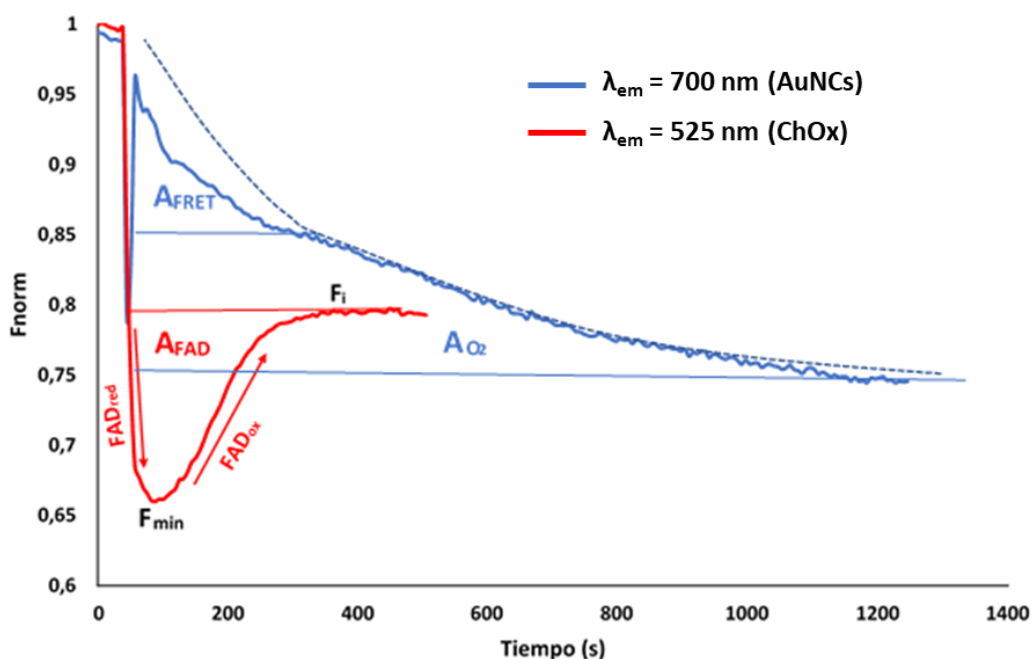


Figura 1A.12: Variación de la intensidad de fluorescencia del bioconjugado ($\lambda_{ext} = 405 \text{ nm}$) a las longitudes de onda de emisión de AuNCs (700 nm) y de ChOx (525 nm) durante la reacción enzimática del bioconjugado con Ch. La línea punteada indica el perfil de fluorescencia simulado solo debido al O_2 .

Cada uno de estos máximos de emisión presenta un excitación máxima a una longitud de onda diferente, 405 nm y 300 nm respectivamente. Sin embargo, el interés se centra en seguimiento de la fluorescencia de ambos fluoróforos simultáneamente, para propiciar fenómenos de transferencia de energía. Dado que los AuNCs presentan un espectro de excitación amplio y absorben a la longitud de onda de excitación FAD, 405 nm, se seleccionó esta como longitud de onda de excitación para ambos fluoróforos.

La **Figura 1A.12** muestra los dos perfiles cinéticos obtenidos:

- Los cambios observados en la fluorescencia FAD (emisión a 525 nm) concuerdan con las expectativas teóricas para la enzima ChOx sola en su reacción con Ch. Cuando se agrega Ch ($t = 100$ s), se observa una disminución debido a la dilución y a partir de este punto (F_i), la fluorescencia del FAD disminuye hasta un mínimo (F_{min}) debido a la reducción de FAD a FAD.H₂. Después de un tiempo, la intensidad de fluorescencia aumenta nuevamente al valor inicial después de la dilución (F_i). Este proceso es indicativo de la regeneración completa de la enzima por reoxidación de FAD.
- Para explicar el perfil de la reacción de fluorescencia de AuNCs, dos fenómenos deben considerarse simultáneamente; la desactivación de la fluorescencia mediada por O₂ y el FRET con el FAD:
 - El consumo de O₂ durante la reacción enzimática produce el aumento la intensidad de la fluorescencia, esto es observado cuando se realiza el seguimiento de la reacción entre Bcontrol y Ch a la longitud de onda de 700 nm que se muestra en la **Figura 1A.13**. Esta parte de la señal se caracteriza por un rápido aumento debido al consumo de O₂ por la reacción enzimática, y una disminución posterior debido a la difusión de O₂ (línea de puntos en la **Figura 1A.12**, que representa la señal simulada debida solo al O₂).

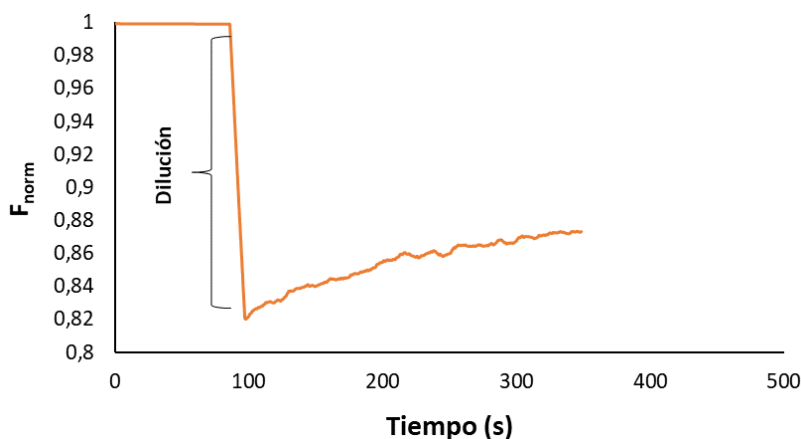


Figura 1A.13: Variación de la fluorescencia durante la reacción entre Bcontrol y Ch a $5,42 \cdot 10^{-6}$ M con $\lambda_{ext} = 405$ nm y $\lambda_{em} = 700$ nm.

- Respecto al FRET, como se muestra en la **Figura 1A.14**, el espectro de emisión FAD y el espectro de excitación de los AuNCs se superponen, lo que resulta en un fenómeno FRET de la enzima a los AuNCs. Cuando se reduce el FAD, su emisión disminuye y, en consecuencia, el FRET a las AuNCs también disminuye. Esta parte de la señal será cualitativamente similar a la del FAD, además de la superposición del efecto del O₂; en consecuencia, la señal de AuNCs a 700 nm es la caída debida al O₂ menos la intensidad debida a FRET.

Sección 1A: Nanobiosensor enzimático basado en la fluorescencia de nanocluster de oro para la determinación de acetilcolina.

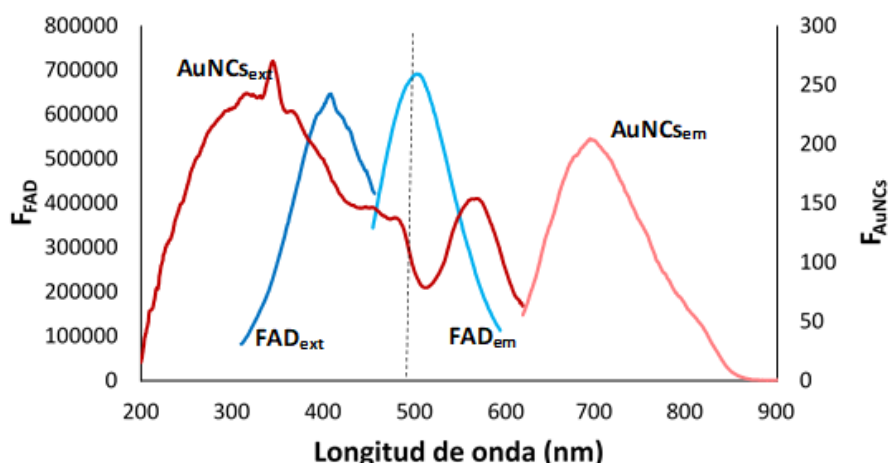


Figura 1A.14: Representación de los espectros de excitación y emisión para el FAD ($\lambda_{ext} = 405$ nm y $\lambda_{em} = 525$ nm) y AuNCs ($\lambda_{ext} = 405$ nm y $\lambda_{em} = 700$ nm). La línea discontinua indica la superposición del espectro de emisión del FAD y el espectro de excitación de AuNC, que produce la transferencia de energía FRET de la enzima a las AuNC.

La **Figura 1A.15**, muestra un esquema a modo resumen del nanobiosensor desarrollado y su mecanismo de detección. De esta forma es posible analizar los tres tipos de señales analíticas que se muestran en la **Figura 1A.12**:

- 1) El área (A_{FAD}) de la señal de fluorescencia FAD ($\lambda_{ext} = 405$ nm y $\lambda_{em} = 525$ nm)
- 2) El área de las señales fluorescentes de los AuNCs ($\lambda_{ext} = 405$ nm y $\lambda_{em} = 700$ nm) correspondiente al FRET (A_{FRET}), que se caracteriza por un perfil similar al de FAD; esta parte de la señal es difícil de diferenciar, por lo que el área de la señal del AuNCs debido al FRET se delimita según el tiempo de variación de la señal FAD.
- 3) El área total del perfil AuNCs (A_{AuNC}) que incluye FRET (A_{FRET}) y el efecto del O_2 , correspondiente a la larga caída de la señal de fluorescencia.

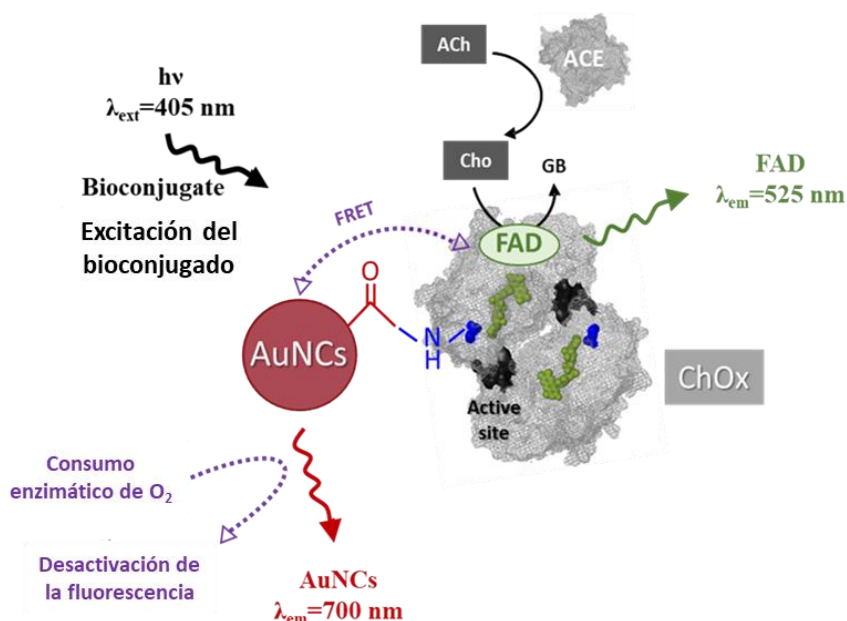


Figura 1A.15: Esquema del nanobiosensor enzimático desarrollado para la determinación de ACh y su mecanismo de detección.

1A.4.4. Evaluación del nanobiosensor para la determinación cuantitativa de colina

La evaluación de la respuesta del nanobiosensor desarrollado fue llevada a cabo mediante el estudio de la variación de la señal de fluorescencia del bioconjugado con diferentes concentraciones de Ch. Para ello, se extrajeron las áreas correspondientes a cada una de las señales analíticas indicadas en la **Figura 1A.12**, para cada concentración de Ch evaluada. La **Figura 1A.16**, muestra la representación de cada una de las áreas extraídas frente a la concentración de Ch correspondiente, donde se observan en todos los casos que las áreas muestran dos rangos de respuesta lineal, para bajas y para altas concentraciones de Ch.

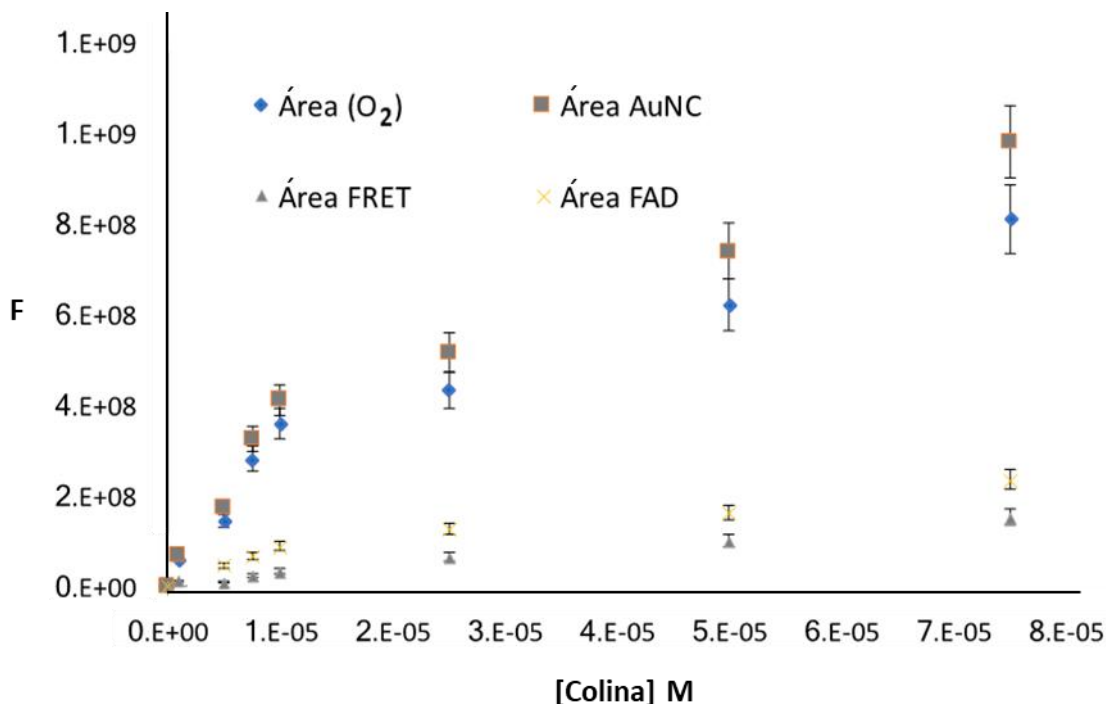


Figura 1A.16: Representación del área frente a la concentración de Ch para la variación de fluorescencia durante la reacción del bioconjugado; para la señal de AuNCs con $\lambda_{\text{ext}} = 405 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 700 \text{ nm}$ se obtienen las áreas, Área FRET, Área O_2 y Área AuNCs (FRET + O_2); y para la señal FAD con $\lambda_{\text{ext}} = 405 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 525 \text{ nm}$ se obtiene el Área FAD.

Haciendo los diferentes ajustes lineales para los dos rangos mostrados por Área FRET, Área O_2 y Área FAD y un ajuste polinómico de segundo grado para el Área AuNCs (FRET + O_2), es posible obtener los parámetros analíticos del método, desviación estándar relativa (DER %) y límites de detección (LD) y cuantificación (LC) para cada rango, valores que se muestran en la **Tabla 1A.4**.

		Rango lineal (M)	Pte	DER%	LD (M)	LC (M)	
Determinación de colina	FRET+ O_2	$1,00 \cdot 10^{-6} - 7,50 \cdot 10^{-5}$	$4,40 \cdot 10^{13}$	6,66	$3,06 \cdot 10^{-7}$	$1,02 \cdot 10^{-6}$	
	FRET	[Colina] ↓	$1,00 \cdot 10^{-6} - 1,00 \cdot 10^{-5}$	$1,43 \cdot 10^{13}$	5,9	$9,90 \cdot 10^{-7}$	$3,30 \cdot 10^{-6}$
		[Colina] ↑	$1,00 \cdot 10^{-5} - 7,50 \cdot 10^{-5}$	$4,17 \cdot 10^{12}$	10,0	$3,23 \cdot 10^{-6}$	$1,07 \cdot 10^{-5}$
	FAD	[Colina] ↓	$5,00 \cdot 10^{-6} - 1,50 \cdot 10^{-5}$	$1,43 \cdot 10^{13}$	5,4	$8,47 \cdot 10^{-6}$	$2,82 \cdot 10^{-6}$
		[Colina] ↑	$1,50 \cdot 10^{-5} - 1,00 \cdot 10^{-5}$	$1,17 \cdot 10^{12}$	3,33	$5,10 \cdot 10^{-8}$	$1,70 \cdot 10^{-6}$

Tabla 1A.4: Propiedades analíticas del método para la determinación enzimática de Ch mediante la fluorescencia del bioconjugado.

El LD es la mínima concentración de analito que se puede detectar en una muestra con un nivel aceptable de confianza y se calcula como 3 veces la desviación estándar del blanco. El LC es la concentración mínima de analito que puede determinar con un nivel aceptable de exactitud y precisión. LC se calcula como 10 veces la desviación estándar del blanco.

La **Tabla 1A.4** muestra un interesante aspecto, el límite de cuantificación obtenido para el Área FAD fue menor que el obtenido con el método enzimático usando ChOx sola sin unir a AuNCs⁴⁸, lo cual se debe a la mejora observada en la fluorescencia FAD resultante del cambio estructural de la enzima. Resultados similares a este se obtuvieron usando el Área FRET, ya que este parámetro mide la misma interacción que el FAD pero con una sensibilidad diferente.

Además, el Área FRET es solo alrededor del 10% del área total de la señal AuNCs obtenida a 700 nm, por lo que el área total Área AuNC, se considera una buena aproximación del Área O₂.

Para entender y justificar mejor este comportamiento de la señal AuNCs, se desarrolló un modelo capaz de relacionar el área total de esta señal, con la concentración de Ch:

1.- Antes de la reacción, la cubeta con el bioconjugado contiene un volumen (V_a). La intensidad de fluorescencia en este momento es F_{0,a}. Es importante recordar que esta disolución contiene O₂ disuelto, siendo [O₂]₀ la concentración en este punto. Según la ecuación de Stern-Volmer:

$$\frac{F_0}{F_{0,a}} = 1 + K_{sv} [O_2]_0 \quad (\text{Ec. A1})$$

Siendo F₀ la intensidad de fluorescencia de AuNCs cuando [O₂]=0, valor no conocido "a priori".

2.- Después de la adición del analito la concentración de oxígeno se reduce a:

$$[O_2]_{t=0} = [O_2]_0 - 2[Ch]_0 \quad (\text{Ec. A2})$$

En este momento comienza la difusión de O₂ del entorno que rodea a la cubeta. Dado que este proceso se rige por una cinética de primer orden, la concentración de oxígeno en la solución cambiará a lo largo del tiempo de acuerdo con:

$$[O_2]_t = [O_2]_0 - 2[Ch]_0 e^{-k_d t} \quad (\text{Ec. A3})$$

siendo k_d la constante de difusión. La ecuación de Stern-Volmer también cambia a lo largo del tiempo según:

$$\frac{F_0}{F_t} = 1 + K_{sv} ([O_2]_0 - 2[Ch]_0 e^{-k_d t}) \quad (\text{Ec. A4})$$

3.- Mediante la combinación de (Ec. A1) y (Ec. A4) y tras reordenar se obtiene:

$$F_t = \frac{F_{0,a}}{1 - \frac{2K_{sv}[Ch]_0 e^{-k_d t}}{1 + K_{sv}[O_2]_0}} \quad (\text{Ec. A5})$$

Esta ecuación se puede normalizar tomando la intensidad inicial (F_{0,a}) como factor de normalización. La intensidad de fluorescencia normalizada (F_{N,t}) viene dada por:

$$F_{N,t} = \frac{1}{1 - \frac{2K_{sv}[Ch]_0 e^{-k_d t}}{1 + K_{sv}[O_2]_0}} \quad (\text{Ec. A6})$$

4.- La integración de la (Ec. A6) da:

$$\text{Int}(F_{N,t}) = t + \frac{1}{k_d} \ln \left(1 - \frac{2K_{sv}[Ch]_0 e^{-k_d t}}{1 + K_{sv}[O_2]_0} \right) + K \quad (\text{Ec. A7})$$

La constante de integración (K) se obtiene considerando que $t=0 \rightarrow \text{Int}(F_{N,t})=0$ y entonces:

$$K = -\frac{1}{k_d} \ln \left(1 - \frac{2K_{sv}[Ch]_0}{1 + K_{sv}[O_2]_0} \right) \quad (\text{Ec. A8})$$

La combinación de (Ec. A7) y (Ec. A8) da el área en función del tiempo (A_t)

$$A_t = t + \frac{1}{k_d} \ln \left(\frac{1 - \frac{2K_{sv}[Ch]_0 e^{-k_d t}}{1 + K_{sv}[O_2]_0}}{1 - \frac{2K_{sv}[Ch]_0}{1 + K_{sv}[O_2]_0}} \right) \quad (\text{Ec. A9})$$

5.- El área obtenida para la solución en blanco ($[Ch] = 0$) viene dado por:

$$A_{(0)} = t \quad (\text{Ec. 10})$$

Entonces, el área debida a la reacción viene dada por:

$$A_t - A_{(0)} = \frac{1}{k_d} \ln \left(\frac{1 - \frac{2K_{sv}[Ch]_0 e^{-k_d t}}{1 + K_{sv}[O_2]_0}}{1 - \frac{2K_{sv}[Ch]_0}{1 + K_{sv}[O_2]_0}} \right) \quad (\text{Ec. A11})$$

6.- El valor del área se puede calcular para cualquier tiempo de reacción. Si se quiere calcular el área total (A_{AuNC}), es decir, el área cuando $t \rightarrow \infty$ la ecuación A11 da lugar a :

$$A_{AuNC} = \frac{-1}{k_d} \ln \left(1 - \frac{2K_{sv}[Ch]_0}{1 + K_{sv}[O_2]_0} \right) \quad (\text{Ec. A12})$$

7.- Finalmente, para valores del argumento del logaritmo de 0 a 2, se puede aplicar la siguiente aproximación: $\ln(x) \approx x-1$ y la ecuación A12 se simplifica al área final:

$$A_{AuNC} \approx \frac{2K_{sv}[Ch]_0}{k_d(1 + K_{sv}[O_2]_0)} \quad (\text{Ec. A13})$$

La relación lineal obtenida experimentalmente entre A_{AuNCs} y la concentración de Ch (**Figura 1A.16** y **Tabla 1A.4**) valida la ecuación A13. Además, para reducir el tiempo de medición, es posible considerar el área en un intervalo de tiempo dado en lugar del área total. En este caso, el modelo también se puede aplicar, pero la sensibilidad y la respuesta de rango lineal se acortará en consecuencia.

1A.4.5. Evaluación del nanobiosensor para la determinación cuantitativa de acetilcolina.

Una vez desarrollada la base del nanobiosensor enzimático, se llevó a cabo el acoplamiento a este de la AChE-ACh, para la determinación indirecta de ACh. (**Figura 1A.17**)



Figura 1A.17: Reacción de enzimática de AChE y ACh (R1), acoplada a la reacción de AuNCs@ChOx (R2) que reacciona con la Ch desprendida en R1.

Para ello se acopló al sistema ya desarrollado (R2), la reacción enzimática con AChE, que interviene en la transmisión del impulso nervioso y en la cual, el neurotransmisor ACh se hidroliza produciendo Ch de forma estequiométrica (R1). Será esta Ch la que reaccione con la enzima ChOx unida a AuNCs, determinando así, de forma indirecta, la concentración de ACh.

En primer lugar, se estudió la reacción a través de la señal fluorescente del FAD en presencia de ChOx libre y ChOx unida a AuNCs (**Figura 1A.18**). En la figura se muestra el cambio en la fluorescencia del FAD durante la reacción enzimática en cada uno de los ensayos, bajo las mismas condiciones y concentraciones. Tras la inyección de ACh, se observó que la reducción del FAD sucedió a la vez y en la misma medida en ambos casos. Esta observación confirma que la presencia de AuNCs no afecta a la reacción enzimática, produciéndose la misma cantidad de Ch (en presencia y ausencia de AuNCs) y por tanto el mismo grado de reducción del FAD. El estudio mostró también, que en el caso del bioconjugado, la re-oxidación del FAD transcurre de forma más lenta, lo que indica un efecto en la difusión del O₂ por la presencia de AuNCs.

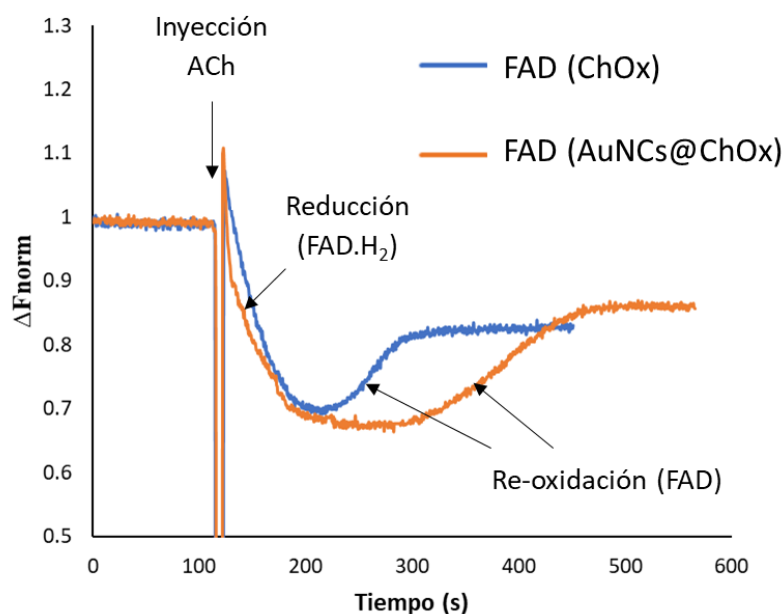


Figura 1A.18: Variación de fluorescencia durante la reacción de AChE (1U/mL) y ACh ($5 \cdot 10^{-5}$ M) con $\lambda_{ext} = 405$ nm y $\lambda_{em} = 525$ nm para ChOx libre y AuNCs@ChOx.

Antes de evaluar la capacidad del bioconjugado en la determinación de ACh, se estudiaron las condiciones de la reacción enzimática para asegurar los mejores resultados. En cuando el pH óptimo recomendado para la reacción AChE-ACh (pH 7-8)⁵⁶, es muy similar al usado en la reacción de ChOx-Ch, por lo que se mantuvieron las mismas condiciones en cuanto a la disolución amortiguadora. Por otro lado, se estudió el efecto de la concentración de enzima AChE (**Figura 1A.19**), mostrándose una mejor cinética de reacción para 2 U/mL. La AChE es una de las enzimas con más alta actividad conocidas e incluso a bajas concentraciones es capaz de lograr una rápida formación de Ch.⁵⁷

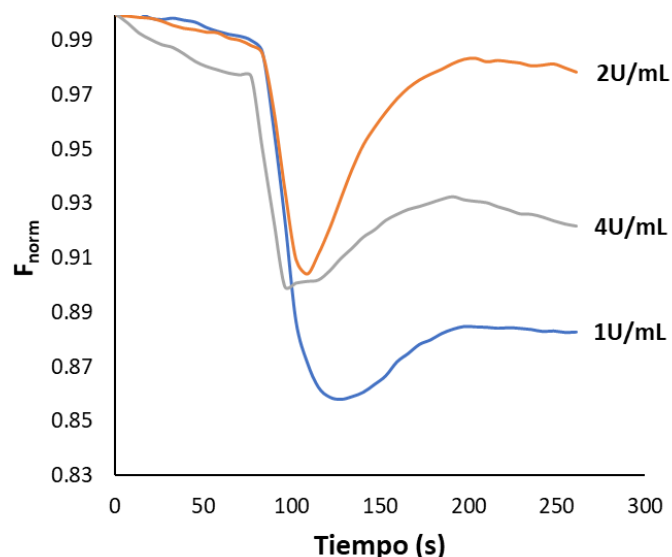


Figure 1A.19: Variación de la fluorescencia del FAD del bioconjugado AuNCs@ChOx durante la reacción de AChE (1, 2 o 4 U/mL) y ACh ($7,5 \cdot 10^{-6}$ M) con $\lambda_{\text{ext}} = 405$ nm y $\lambda_{\text{em}} = 525$ nm.

En estas condiciones, se evaluó la respuesta del nanobiosensor desarrollado acoplado a la reacción de AChE, y se llevo a cabo el estudio de la variación de la señal de fluorescencia del bioconjugado con diferentes concentraciones de ACh. La **Figura 1A.20** muestra un ejemplo de la variación de señales generadas durante la excitación ($\lambda_{\text{ext}} = 405$ nm) midiendo la fluorescencia del FAD ($\lambda_{\text{em}} = 525$ nm) o la fluorescencia de AuNCs ($\lambda_{\text{em}} = 700$ nm).

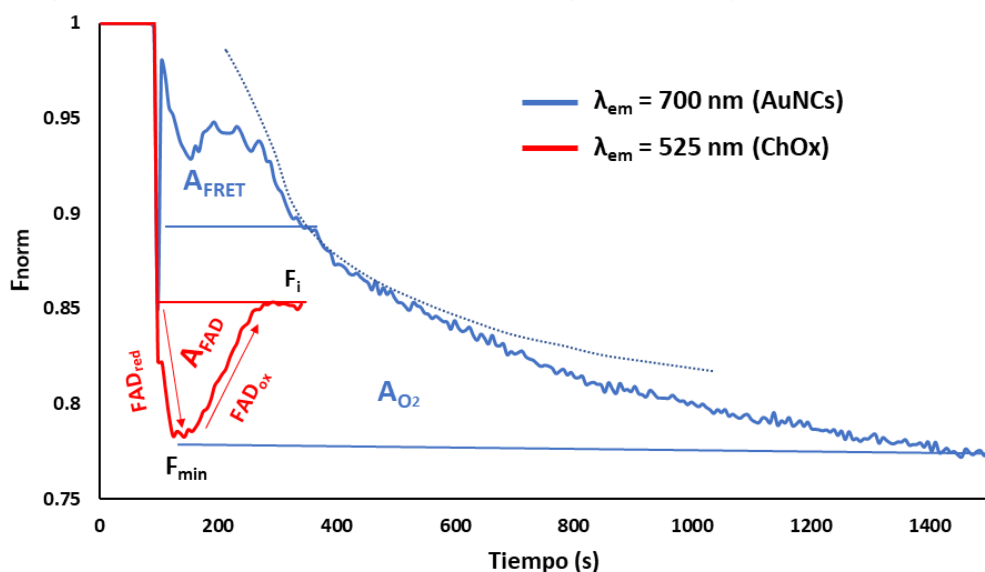


Figura 1A.20: Variación de la intensidad de fluorescencia del bioconjugado ($\lambda_{\text{ext}} = 405$ nm) a las longitudes de onda de emisión de AuNCs (700 nm) y de ChOx (525 nm) durante la reacción enzimática del bioconjugado acoplado a la reacción enzimática AChE para la determinación de ACh. La línea punteada indica el perfil de fluorescencia simulado solo debido al O_2 .

Sección 1A: Nanobiosensor enzimático basado en la fluorescencia de nanocluster de oro para la determinación de acetilcolina.

Los perfiles de fluorescencia obtenidos fueron muy similares a los mostrados para la determinación de Ch (**Figura 1A.12**) debido a que, tras la optimización de la concentración de AchE, el tiempo de la reacción de hidrólisis de ACh a Ch fue reducido al mínimo. El modelo matemático dado por la ecuación A13, también puede ser aplicado a la determinación de ACh, reemplazando $[Ch]_0$ por $[ACh]_0$ y consecuentemente, es posible realizar el mismo tratamiento analítico de las señales obtenidas.

Se extrajeron las áreas correspondientes a cada una de las señales analíticas indicadas en la **Figura 1A.20**, para cada concentración de ACh evaluada. Así, la **Figura 1A.21**, muestra la representación de cada una de las áreas extraídas frente a la concentración de ACh correspondiente, donde se observan resultados muy similares a los obtenidos en el caso de la calibración para Ch, mostrando también dos rangos de respuesta lineal, para bajas y para altas concentraciones de ACh, en este caso, también para la señal total del área FRET+O₂, A_{AuNCs}.

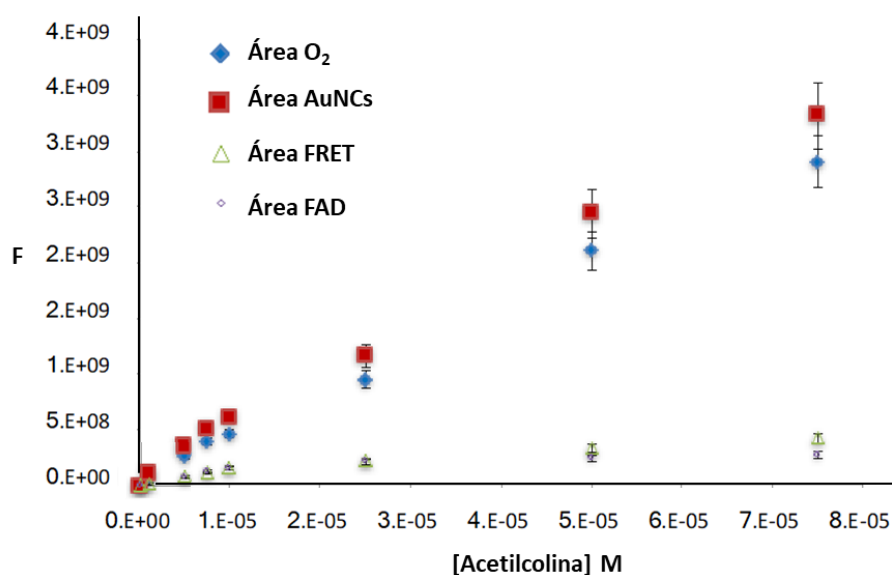


Figura 1A.21: Representación del área frente a la concentración de acetilcolina para la variación de fluorescencia durante la reacción del bioconjugado; para la señal de AuNCs con $\lambda_{ext} = 405$ nm y $\lambda_{em} = 700$ nm se obtienen las áreas, Área FRET, Área O₂ y Área AuNCs (FRET + O₂); y para la señal FAD con $\lambda_{ext} = 405$ nm y $\lambda_{em} = 525$ nm se obtiene el Área FAD.

Haciendo los diferentes ajustes lineales para los dos rangos mostrados por Área FRET, Área O₂ y Área FAD y un ajuste polinómico de segundo grado para el Área AuNCs (FRET + O₂), es posible extraer los parámetros analíticos del método, DER% y límites de detección y cuantificación para cada rango, valores que se muestran en la **Tabla 1A.5**.

			Rango lineal (M)	Pte.	DER%	LD (M)	LC (M)
Determinación de acetilcolina	FRET+O ₂	[Acetilcolina]↓	$1,00 \cdot 10^{-6} - 1,00 \cdot 10^{-5}$	$4,25 \cdot 10^{13}$	4,35	$3,17 \cdot 10^{-7}$	$1,05 \cdot 10^{-6}$
		[Acetilcolina]↑	$1,00 \cdot 10^{-5} - 7,50 \cdot 10^{-5}$	$8,83 \cdot 10^{12}$	7,23	$1,25 \cdot 10^{-6}$	$4,16 \cdot 10^{-6}$
	FRET	[Acetilcolina]↓	$1,00 \cdot 10^{-6} - 1,00 \cdot 10^{-5}$	$5,13 \cdot 10^{12}$	5,14	$2,33 \cdot 10^{-8}$	$7,76 \cdot 10^{-8}$
		[Acetilcolina]↑	$1,00 \cdot 10^{-5} - 7,50 \cdot 10^{-5}$	$1,78 \cdot 10^{12}$	9,17	$5,93 \cdot 10^{-7}$	$1,97 \cdot 10^{-6}$
	FAD	[Acetilcolina]↓	$5,00 \cdot 10^{-6} - 1,50 \cdot 10^{-5}$	$8,43 \cdot 10^{12}$	6,25	$2,35 \cdot 10^{-7}$	$7,83 \cdot 10^{-7}$
		[Acetilcolina]↑	$1,50 \cdot 10^{-5} - 1,00 \cdot 10^{-5}$	$2,10 \cdot 10^{12}$	3,69	$8,75 \cdot 10^{-7}$	$2,91 \cdot 10^{-6}$

Tabla 1A.5: Propiedades analíticas del método para la determinación enzimática de ACh mediante la fluorescencia del bioconjugado.

La sensibilidad del método desarrollado es suficiente para la determinación de Ch o ACh en varios tipos de muestras como alimentos, preparados vitamínicos o incluso muestras biológicas.^{58,59} Además se estudió la estabilidad del bioconjugado AuNCs@ChOx mostrándose que conserva su actividad durante al menos dos meses. En cuanto a la reutilización, no se usó una misma disolución para más de cinco ensayos consecutivos, por la dilución que supone añadir muestra en cada ensayo.

1A.5. Conclusiones específicas de la sección 1A

En esta sección se ha desarrollado un nanobiosensor enzimático basado en la fluorescencia de nanoclusters de oro para la determinación del neurotransmisor ACh, mediante la biofuncionalización de los AuNCs con la enzima ChOx. Las conclusiones que se pueden extraer del trabajo realizado son las siguientes:

1. A partir de los resultados obtenidos en la caracterización de los diversos AuNCs y tras la evaluación de las necesidades del método a desarrollar, se han seleccionado los AuNCs@LA, teniendo en cuenta como factor principal el solapamiento del espectro de excitación con el de la ChOx.
2. Se ha diseñado y optimizado el esquema de bioconjugación de los AuNCs con ChOx, para ello:
 - Se ha estudiado la estructura cristalina de la enzima ChOx y se ha planteado la estrategia de biofuncionalización mediante la unión de los aminos terminales de la enzima a los carboxilos de los AuNCs mediante el método de la carbodiimida.
 - Se ha estudiado la estabilidad de la fluorescencia de los AuNCs en diversas disoluciones amortiguadoras con diversos pHs y fuerzas iónicas, eligiéndose las óptimas para cada etapa.
3. Se ha obtenido y caracterizado el bioconjugado AuNCs@LA@ChOx. Para ello se ha llevado a cabo la bioconjugación estudiando diversas relaciones -moléculas ChOx:AuNCs- y se han caracterizado cada una de estas bioconjugaciones por diversas técnicas: espectrometría de fluorescencia, electroforesis de agarosa, HR CS GFAAS; concluyéndose como relación óptima 1 molécula de ChOx por cada 2 AuNCs (proporción 1:2).
4. Se ha llevado a cabo el estudio de la reacción del bioconjugado AuNCs@ChOx con Ch, eligiéndose como óptimo los pares de $\lambda_{\text{ext}}/\lambda_{\text{em}}$: 405/525 nm para el seguimiento de los cambios en la fluorescencia del FAD de la enzima y 405/700 nm para el seguimiento de AuNCs.
 - Se ha estudiado el comportamiento de estas señales evaluándose el mecanismo de detección y observándose dos efectos diferentes sobre la fluorescencia de AuNCs a 700 nm: la transferencia de energía FRET entre estos y el FAD y la desactivación de la fluorescencia debida al consumo de O₂ de la reacción enzimática.
 - Se han obtenido las áreas de las señales a utilizar como parámetro analítico en la calibración: el área (A_{FAD}) de la señal de fluorescencia FAD ($\lambda_{\text{ext}} = 405$ nm y $\lambda_{\text{em}} = 525$ nm) y el área de las señales AuNCs ($\lambda_{\text{ext}} = 405$ nm y $\lambda_{\text{em}} = 700$ nm) correspondiente solo el efecto FRET (A_{FRET}) o el área total del perfil AuNCs (A_{AuNC}) que incluye FRET (A_{FRET}) y el efecto del O₂.
 - Se ha diseñado un modelo matemático capaz de ajustarse al comportamiento de la fluorescencia de AuNCs.
5. Se ha evaluado el nanobiosensor para la determinación cuantitativa de Ch y ACh a través del acoplamiento de la reacción enzimática de AChE.
 - Se ha estudiado y optimizado las condiciones de la reacción enzimática de acetilcolinesterasa con acetilcolina acoplada a ChOx, evaluando los cambios en la fluorescencia del FAD de esta enzima libre y unida a AuNCs
 - Se han obtenido los parámetros analíticos del método para ambas determinaciones. Mostrándose las amplias posibilidades de la metodología desarrollada respecto a los métodos actuales en la determinación de Ch y ACh.

Sección 1B

Nanoclusters de oro como sondas fluorescentes para la detección de oxígeno en reacciones enzimáticas.

1B.1. Introducción

El oxígeno es el elemento más abundante en la corteza terrestre y está involucrado en prácticamente todas las formas de organismos vivos, por lo que no sorprende que la química del oxígeno desempeñe un papel importante en la biología y la medicina.⁶⁰ Así, la detección y la monitorización continua de oxígeno ha atraído una atención particular en ciencia, como puede verse en el alto número de referencias bibliográficas; una búsqueda de "oxygen sensor" en Google Scholar produce 2.600.000 resultados (búsqueda realizada el 14 de sept de 2020).

La determinación óptica de O_2 es una de las aplicaciones de luminiscencia molecular más interesantes y es aplicada en áreas de investigación como medicina, procesamiento de alimentos, seguridad industrial, biología y micro.⁶⁰⁻⁶³ Comparado con otros principios de detección, como el electrodo Clark amperométrico o la sonda Lambda^{64,65}, presenta varias ventajas como la posibilidad de detección remota y no invasiva, la posibilidad de seguimiento del analito vía imagen, la posibilidad de miniaturización y el no consumo de analito⁶¹.

La molécula de oxígeno en su estado de menor energía se denomina oxígeno triplete y es la forma más abundante y estable de oxígeno en la naturaleza. En este estado, el oxígeno posee dos electrones desapareados, que hacen que la molécula sea paramagnética. Cuando se entrega energía al oxígeno triplete, estos dos electrones quedan apareados y con spines antiparalelos, dando lugar al oxígeno molecular singlete.⁶⁶ Esta nueva configuración, se descubrió en el año 1924 y es el estado excitado de mayor energía del oxígeno molecular, es una especie electrofílica sumamente reactiva, alrededor de 1000 veces más reactiva que el oxígeno en estado fundamental.⁶⁷ Esto se debe, a que numerosas sustancias con las que reacciona el O_2 se encuentran en estado singlete, así la reacción singlete-singlete es más probable que una reacción triplete-singlete. El oxígeno singlete puede ser producido de muchas maneras, ya sea química, fotoquímica o biológicamente.⁶⁸ La **Figura 1B.1**, muestra diferentes vías para su generación.

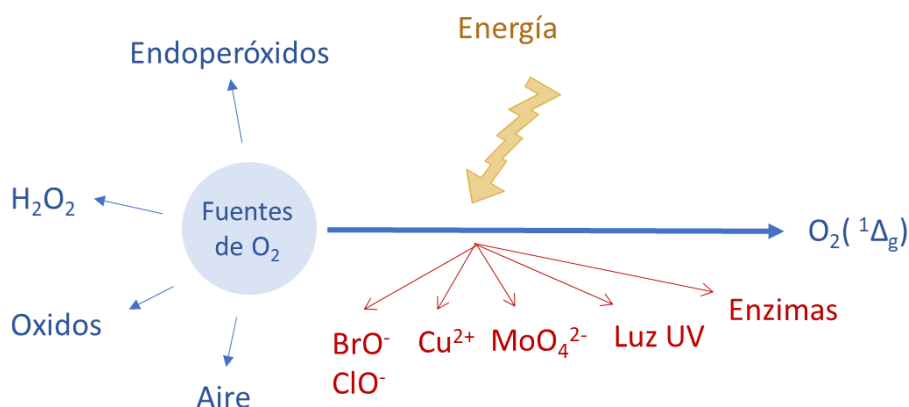


Figura 1B.1: Formación de oxígeno singlete $O_2(^1\Delta_g)$ por vías químicas, fotoquímicas y biológicas. Adaptación Pereira et al.⁶⁹

El oxígeno es ampliamente conocido por ser el desactivador universal de la luminiscencia de multitud de moléculas orgánicas, pero en algunos casos puede revertir su función y actuar como potenciador de la fluorescencia en las matrices poliméricas.^{70,71} Bolton, Kenner y Khan investigaron el fenómeno de la fluorescencia mejorada por oxígeno y atribuyeron este proceso

a un mecanismo de retroalimentación de oxígeno singlete y un mecanismo trivial que implica el agotamiento del estado fundamental del fluoróforo orgánico (O_2^*-T). Sin embargo, los sensores de detección de oxígeno no suelen basarse en este mecanismo y generalmente los métodos aplican el fenómeno de desactivación colisional de la fluorescencia del analito en el estado excitado, por lo que se utilizan reactivos que posean tiempos de vida fluorescente largos.

El tiempo de vida media de una especie excitada es el tiempo promedio que permanece la molécula en su estado de excitación antes de emitir un fotón y volver a su estado fundamental, también se define como tasa de decaimiento. Dos de las formas más importantes en las cuales una molécula excitada se relaja al estado fundamental son; la relajación (desactivación) no radiante y la relajación fluorescente. **(Figura 1B.2)**

La *relajación vibracional*, señalada por las flechas rojas cortas entre los niveles de energía vibracionales, tiene lugar durante las colisiones entre moléculas excitadas y las moléculas del disolvente. También puede ocurrir el relajamiento no radiante entre el nivel vibracional inferior de un estado electrónico excitado y el nivel vibracional superior de otro estado electrónico. Este tipo de relajación llamado algunas veces *conversión interna*, se ilustra por las flechas verdes. La *relajación fluorescente* se observa como flechas naranjas e implica la emisión de un fotón de longitud de onda mayor de la que ha originado la excitación. La fluorescencia se trata de una transición electrónica permitida, en cambio la *fosforescencia* implica una transición electrónica desde un estado triplete prohibido. Por ello la emisión de energía mediante fluorescencia tiene un tiempo de vida del orden de 10 ns, en cambio la fosforescencia tiene una vida media mucho mayor, alcanzando los milisegundos o segundos.

El oxígeno favorece la conversión de las moléculas excitadas del fluoróforo desde el estado singlete al estado triplete. Este efecto se traduce a una atenuación o desactivación de la intensidad de la emisión fluorescente.

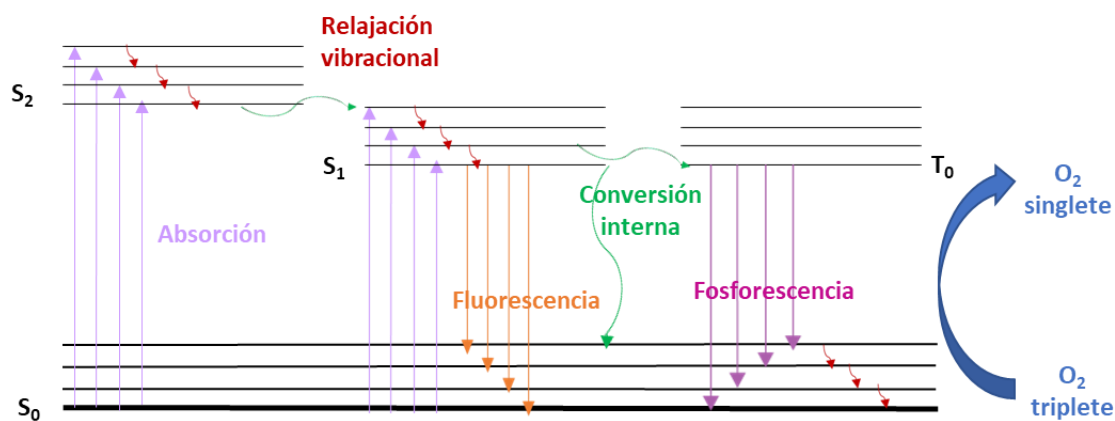


Figura 1B.2: Diagrama parcial de energía para un sistema fotoluminiscente, donde S_0 es el estado fundamental, S_2 el estado singlete excitado, S_1 el estado singlete y T_0 el estado triplete de la molécula orgánica o fluoróforo.

A lo largo de la historia se han propuesto multitud de moléculas orgánicas fluorescentes como sondas de oxígeno^{60,61}, tales como hidrocarburos aromáticos policíclicos, fullerenos y especialmente diferentes tipos de complejos metal-ligandos, siendo los más usados aquellos basados en Rutenio (Ru)-difenilfenantrolina y Platino (Pt) o Paladio (Pd) tetrakisfluorofenil porfirinas (PtTFPP o PdTFPP), que presentan las mejores propiedades analíticas y aplicabilidad, y suelen ser los reactivos elegidos en los sistemas comerciales de seguimiento O_2 .

Algunos tipos de nanomateriales, especialmente los nanoclusters de metales que poseen largos tiempos de vida de luminiscencia, también son candidatos potenciales para detección de O_2 . Sin embargo, se encuentran muy pocas referencias en la literatura (por ejemplo Ghost et al.⁷² utiliza NC de cloruro de Mo) que abordan esta posibilidad. Solo algunos trabajos⁷³⁻⁷⁵ explican la desactivación de la fluorescencia de AuNCs encapsulados en proteínas por la presencia de ROS (H_2O_2 , O_2^- , tert-butyl hydroperoxide (TBPH), OCI^- y $*OH$) que oxidan el enlace Au-S con la proteína para formar un producto disulfuro.

Por ejemplo, Wang et al.⁷⁶ diseñó un biosensor de fluorescencia para proteasas basado en el efecto degradativo de estas proteínas sobre AuNC@BSA; después de la degradación, el O_2 penetra la molécula y la fluorescencia de AuNCs disminuye mediante un mecanismo que no se explica claramente. Das et al.⁷⁷, estudió el efecto del O_2 en dos AuNC@BSA (2 nm y 2,5 nm de diámetro) con fluorescencia 410 nm y 645 nm respectivamente; los autores observaron una mejora en la fluorescencia de los AuNCs a 410 nm, explicada por el mecanismo (O_2^*-T) y la desactivación de la fluorescencia de los AuNCs a 645 nm, explicada por los autores por la presencia de ROS, que liberarían los AuNCs del andamio proteico. Así proponen un mecanismo en el que estos AuNCs chocarían entre sí para experimentar una coalescencia dando lugar a la formación de nanopartículas más grandes y justifican la aparición de esas nuevas nanopartículas con el ensanchamiento en la banda de absorción de BSA y la aparición de un hombro a 510 nm característico de las AuNPs.

Sin embargo, ninguna de estas pocas referencias bibliográficas, menciona la desactivación colisional para explicar el efecto del O_2 en la fluorescencia de los nanoclusters de oro. Así, el objetivo de esta sección se centra en la evaluación de diversos tipos de AuNCs como sondas fluorescentes de oxígeno y en el estudio de su mecanismo de desactivación. Además, en esta sección se pretende evaluar las posibilidades de AuNCs como sondas de oxígeno para el seguimiento de reacciones enzimáticas oxidativas.

Las enzimas deshidrogenasas o oxidasas son enzimas que catalizan la deshidrogenación u oxidación de sus sustratos, a través de la transferencia de electrones o átomos de hidrógeno de un dador (reductor) a un aceptor (oxidante). Otras veces la reacción consiste en la incorporación de átomos de oxígeno en el sustrato. Estas enzimas, se engloban dentro del término oxidorreductasas y generalmente se trata de reacciones reversibles que están implicadas en multitud de procesos bioquímicos en diferentes tipos de células y organismos. Requieren para su funcionamiento de la presencia de un cofactor que cumpla la función de donar o aceptar los electrones y los átomos de hidrógeno que las oxidorreductasas añaden o quitan a sus sustratos.

Además de la colina oxidasa, ya utilizada en la sección 1A, encontramos cientos de oxidorreductasas en la naturaleza y en la industria; enzimas peroxidasas, catalasas, lacasas, glucosa oxidasas (GOx), alcohol deshidrogenasas, hidroxilasas y reductasas, aunque también engloban importantes complejos como la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa o el complejo piruvato deshidrogenasa, etc., esenciales desde el punto de vista del catabolismo de la glucosa.

En bibliografía existen múltiples ejemplos del seguimiento de este tipo de reacciones a partir de control del consumo de O_2 proporcional a la cantidad de sustrato que reacciona con la enzima; un ejemplo son los sensores ópticos basados en GOx para la monitorización continua in situ de glucosa que miden los cambios de vida útil de la fluorescencia de los complejos de rutenio organometálicos desactivados por el O_2 presente⁷⁸, el consumo de este en la reacción conlleva un aumento en la fluorescencia de estos compuestos. Usando el mismo principio de sensor es

posible medir las concentraciones de compuestos orgánicos que se oxidan enzimáticamente en presencia de oxígeno, por ejemplo, alcoholes^{79,80} o aminas biógenas (ABs).⁸¹ Sin embargo, se ha encontrado que en ocasiones complejos de rutenio pueden afectar en la cinética de las reacciones enzimáticas de peroxidasa o glucosa oxidasa⁸², tanto si se utilizan en disolución sin unir a las enzimas como unidos químicamente, sustituyendo al O₂ en la etapa de regeneración de la enzima, reoxidando su coenzima, lo que se ha observado tanto por UV-vis⁸³, como electroquímicamente⁸⁴.

Una vez evaluadas las propiedades de AuNCs como sondas de O₂, en esta sección se pretende evaluar la utilización de estos nanomateriales en el seguimiento de reacciones enzimáticas que median consumo de oxígeno y compararlos con los típicos compuestos de rutenio utilizados en estas aplicaciones.

Para ello se seleccionó la enzima diamina oxidasa (DAO),⁸⁵ una oxidoreductasa con Cu²⁺ como cofactor que degrada aminas biógenas como histamina, cadaverina o putrescina (**Figura 1B.3A**). Estas sustancias tienen gran interés analítico ya que altos niveles de estas en el organismo o en alimentos están asociados con problemas de toxicidad y alergias.⁸⁶ Los métodos estándar para el control de aminas biógenas, como la cromatografía HPLC, supone tratamiento de muestra y largos tiempos de análisis, así como personal cualificado para su uso.⁸⁷ En este punto el desarrollo de biosensores enzimáticos, se presenta como una gran alternativa a los problemas de los métodos clásicos, aportando además selectividad y reversibilidad. Para obtener una determinación rápida e in situ de ABs en alimentos, la atención se centra en el desarrollo de metodología analítica que se puede implementar en tiras reactivas como sensores desechables. Los biosensores enzimáticos de este tipo ya existentes, utilizan la reacción enzimática de oxidación ya explicada, relacionando la concentración de amina biógena con la concentración de peróxido de hidrógeno liberado, el cual se determina comúnmente por métodos colorimétricos o acoplando una reacción enzimática secundaria como la de la enzima peroxidasa (HRP) (**Figura 1B.3**).⁸⁶

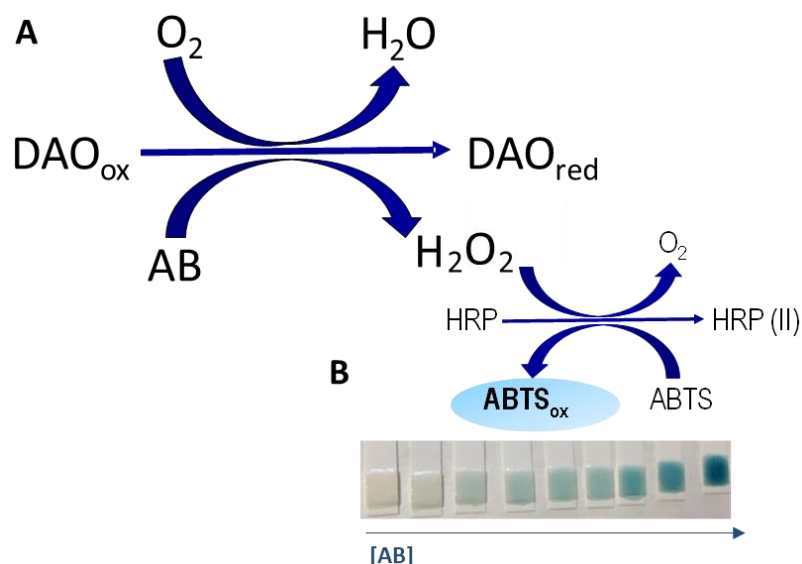


Figura 1B.3: A) Esquema de la reacción enzimática de DAO y ABs mediada por el consumo de oxígeno **B)** Esquema del método colorimétrico para la determinación de ABs que acopla a la reacción con DAO la reacción secundaria HRP- H₂O₂ junto con el colorante ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico). Se muestra también una fotografía del sistema implementado en tiras reactivas.

Por otro lado, la detección de O_2 a altas temperaturas es importante en diversas aplicaciones. Algunas enzimas muestran su máxima actividad a altas temperaturas^{88,89}, además, la medición de O_2 a altas temperaturas también es importante en la industria automotriz, generación de energía, procesamiento de alimentos o reactores químicos y bioquímicos. Sin embargo, los sensores de O_2 basados en fluoróforos orgánicos presentan limitaciones en este tipo de aplicaciones, como la baja estabilidad de estas moléculas a altas temperaturas que produce cambios estructurales y por tanto la modificación de sus propiedades ópticas.⁹⁰ De hecho, la fluorescencia de gran multitud de fluoróforos orgánicos e inorgánicos presenta una fuerte dependencia de la temperatura que se ha utilizado para el desarrollo de numerosas sondas luminiscentes termosensibles^{91,92} basadas en emisión simple (una sola banda de emisión) o dual, para la construcción de termómetros moleculares fluorescentes. Los complejos de rutenio que como se ha dicho, son los más eficientes para la determinación de O_2 basada en la desactivación colisional, también presentan este comportamiento termosensible.⁹³ Desafortunadamente, la dependencia de las emisiones con respecto a la temperatura suele ser no lineal y este hecho hace que el análisis del efecto del O_2 sea difícil, aumentando la posibilidad de introducir grandes errores sistemáticos en sistemas mal calibrados. Por su naturaleza metálica, los AuNCs toleran temperaturas elevadas, lo que les presenta como posibles candidatos para en su uso como sensores de O_2 a altas temperaturas frente a los fluoróforos convencionales.

1B.2. Objetivos

A la vista de los resultados obtenidos en la sección A de este capítulo, donde se observó que el consumo de O₂ durante la reacción enzimática producía el aumento la intensidad de la fluorescencia de AuNCs. Se planteó el estudio en mayor profundidad del mecanismo de desactivación que produce O₂ en la fluorescencia de estos nanomateriales. Así, el objetivo principal de esta sección se centra en el estudio del mecanismo de desactivación de la fluorescencia en dos tipos diferentes de AuNCs (usando como ligando ácido lipoico o BSA) debida al O₂. Además, esta sección abarca la evaluación de los AuNCs como sondas fluorescentes para la detección de O₂ en reacciones enzimáticas y como sondas de O₂ a alta temperatura

Para ello se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1) Caracterización de la respuesta al oxígeno de los AuNCs y estudio del mecanismo de desactivación mediante:

- La obtención de los tiempos de vida de fluorescencia y rendimientos cuánticos (Φ) de ambos tipos de AuNCs.
- Estudio del efecto del O₂ en la fluorescencia de estos AuNCs en disolución a temperatura ambiente y ajuste de su comportamiento al modelo de Stern-Volmer, para la obtención de las constantes de extinción (K_{sv}) y eficiencias de extinción molar en cada caso.
- Comparativa de estos valores con los obtenidos en las mismas condiciones para sondas de oxígeno clásicas basadas en complejos de rutenio.
- Inmovilización de AuNCs en soportes sólidos y evaluación de su respuesta al O₂ en fase gaseosa utilizando un sensor comercial (basado en rutenio) y comparativa con este mismo.

2) Acoplamiento de AuNCs a determinaciones enzimáticas: utilización del efecto desactivador del oxígeno en la fluorescencia de los AuNCs.

Para ello, se tomó como modelo la reacción de la enzima DAO con su sustrato cadaverina (cad), con el fin de obtener una determinación rápida e in situ de ABs en alimentos. La base de la detección trata que el consumo de O₂ en esta reacción enzimática produzca un aumento de la fluorescencia de AuNCs relacionado con la concentración de ABs. Para ello se llevaron a cabo los siguientes objetivos:

1. Seguimiento de la reacción enzimática DAO-cad en disolución a partir de la fluorescencia de AuNCs y su comparativa con compuestos de rutenio.
2. Evaluación de la fluorescencia de AuNCs absorbidos en diversos papeles comerciales y efecto de la adición de reactivos.
3. Seguimiento de la reacción enzimática DAO-cad en papel a partir de la fluorescencia de AuNCs o rutenio.
4. Fabricación de soportes de celulosa 'caseros' con AuNCs+DAO entrampados y evaluación de su fluorescencia en la determinación enzimática de cadaverina.

3) El uso de AuNCs como sondas de oxígeno a altas temperaturas, se evaluó mediante:

- El estudio del efecto de la temperatura en la fluorescencia de AuNCs inmovilizados en el rango de 30 a 210 °C.
- La valuación de la respuesta al O₂ a altas temperaturas de AuNCs inmovilizados, ajuste al modelo de Stern-Volmer y obtención de los parámetros analíticos del método de detección.

1B.3. Experimental y métodos

1B.3.1. Reactivos y materiales

Las botellas Alphagaz 1 (99,999%) de oxígeno y nitrógeno comprimidos, se adquirieron en Air Liquide. Las láminas de cromatografía de capa fina (TLC) de sílica para la inmovilización de AuNCs usadas fueron: Polygram Sil G, en la cual la sílica esta soportada sobre polietileno y cuya transparencia permite que esta sea utilizada en un sensor óptico, y DC- Fertigfolien Alugram Sil G, con sílice soportada sobre aluminio y apta para estudios a temperatura superior de 25 °C, ambas TLC son de la casa comercial Macherey-Nagel.

Para el acoplamiento de AuNCs al seguimiento de reacciones enzimáticas se preparó solución amortiguadora de fosfato (0,1 M, pH 7) a partir de los sólidos de NaH_2PO_4 , que junto a la amina biógena cadaverina (cad) fueron compradas en Sigma-Aldrich. La enzima diamino oxidasa, DAO (EC 1.4.3.22) proveniente del organismo *Lathirus cicera* se compró en Molirom (P021, 280 U/mL). La solución de rutenio ($\text{Ru}(\text{bpy})_3$) se preparó disolviendo 1 mg de tris (2,2'-bipiridil) diclororutenio (II) hexahidrato (Sigma 544981) en 0,50 ml de dimetilsulfóxido (Panreac). Los AuNCs fueron sintetizados según los protocolos descritos en este capítulo (*apartado 1.3.1.3.*). Diferentes papeles de la casa Ahlstrom; de microfibra el tipo 121 y 141 (ambos sin aglutinante) y 142 (con aglutinante); mezcla de algodón y crayon el tipo 1281; y de algodón puro el tipo 238; fueron evaluados para la absorción del sistema DAO-AuNCs.

1B.3.2. Instrumentación y métodos

1B.3.2.1. Calibración de la sonda FOXY en disolución y gas.

Para la evaluación del efecto de O_2 en disolución y en fase gas se utilizó un sensor de fluorescencia de O_2 Foxy-R de Ocean Optics que consta de un espectrómetro de matriz CCD QE65000 acoplado a una sonda de oxígeno FOXY-R (su punta posee un complejo de rutenio inmovilizado en un sustrato sol-gel) mediante una fibra óptica QBIF600-UV/Vis y utiliza como fuente de radiación una luz LED azul de pulsó Ocean Optics LS-450 nm. Este sensor fue calibrado en fase gaseosa insertando la sonda en un recipiente de PVC casero con entrada y salida de gases donde se hicieron pasar diversos % (V/V) de O_2 con el fin de obtener las curvas de calibración. La calibración en disolución de este sensor se llevó a cabo borboteando diversos % de O_2 en una cubeta con agua miliQ. La concentración en molaridad de oxígeno disuelta en agua en cada caso se halló con la ayuda del ECO-Test visocolor 5–88 O_2 (Macherey-Nagel), que se basa en el método clásico de Winkler.

1B.3.2.2. Efecto de O_2 en la fluorescencia de AuNCs en disolución.

Las medidas de fluorescencia en estado estacionario de AuNCs se llevaron a cabo con un espectrómetro de fluorescencia Time Master de Photon Technology International (PTI) (TM-272003) usando ranuras de excitación y fluorescencia de 15 nm, 1000 nm/min como velocidad de exploración y las longitudes de onda $\lambda_{\text{ext}}/\lambda_{\text{em}}$, 400/700 nm para AuNC@AL y 375/650 nm para AuNC@BSA. Los flujos de gas de diferentes concentraciones de oxígeno fueron bombeado a través de la cubeta que contiene AuNCs y la variación de fluorescencia se midió continuamente a lo largo del tiempo durante el paso del flujo a las longitudes de onda de excitación y emisión

máximas. Se tomó el valor de intensidad de fluorescencia promedio para cada concentración de O₂ controlando paralelamente la concentración de O₂ en la cubeta utilizando la sonda de fluorescencia basada en rutenio Foxy-R.

1B.3.2.3. Medición de los tiempos de vida de AuNCs en disolución.

Las mediciones de los tiempos de vida se realizaron con un láser de colorante pulsado, para ello se utilizó el equipo PTI acoplado a un láser N₂ (GL-3300) que bombea un láser de colorante, como fuente de radiación y posee un estroboscópico sistema como detector. El sistema de detección está basado en un fotomultiplicador y mide la intensidad de fluorescencia a diferentes desfases tras el pulso de excitación, obteniéndose una curva de decaimiento (intensidad de fluorescencia en función del tiempo). El láser N₂ bombeó el colorante PLD457, que emite en el rango de 440 a 478 nm con un máximo a 457 nm. Se midió el tiempo de vida para los AuNCs, haciendo uso de los siguientes parámetros instrumentales:

- λ excitación: longitud de onda correspondiente a la emisión del colorante.
- λ emisión: longitud de onda de emisión de la muestra; 700 nm para AuNCs@LA y 650 nm para los AuNCs@BSA
- Valor inicial y final del desfase: Se selecciona el valor inicial unos ns antes de que aparezca el pulso de excitación (100 ns) y el valor final se elige en función del tiempo de vida de la muestra.
- Tiempo de integración: tamaño de la ventana, en microsegundos, durante la cual se integra la señal para cada pulso laser. En este caso 1000 μ s.
- Promedios: número de barridos (intervalos de desfase completos) que se promedian para dar el decaimiento final. En este caso se realizan 20 promedios.
- Disparos: número de disparos del láser que se toman y promedian en cada desfase para cada uno de los barridos que se realizan. Se selecciona un valor de 5.
- Frecuencia de disparo del láser: aumentar la frecuencia implica reducir el tiempo de adquisición, pero también disminuir la energía por pulso y aumentar el consumo de N₂. Se fija en 10 Hz.

De los registros obtenidos se calcularon los tiempos de vida tanto manualmente como a través del software por ajuste a una función.

1B.3.2.4. Inmovilización de AuNCs@LA en soportes de sílica.

Los AuNCs se inmovilizaron sobre láminas de TLC de sílica sumergiendo estas en una solución preconcentrada de AuNCs@LA (840 mg/mL de Au) y se dejaron secar a temperatura ambiente. Para obtener una deposición homogénea, se aplicaron tres inmersiones, cada una con un ciclo de secado.

1B.3.2.5. Calibración del sensor óptico LuminOx™ en gas y modificación del mismo.

El sensor óptico comercial LuminOx™ de SST consta de un LED de excitación de 420 nm, un fotodiodo y un compuesto de rutenio como elemento sensor y es capaz de medir la concentración de O₂ de 0 a 25% (V/V). Para evaluar este sensor se colocó el mismo en una cámara casera que se trata de un recipiente de PVC con entrada y salida de gases y se insertaron diversas % (V/V) de O₂ con el fin de obtener las curvas de calibración en fase gaseosa.

El fluoróforo de rutenio colocado en el interior de este sensor comercial fue reemplazado por la lámina de sílica con AuNCs@LA como se muestra en la **Figura 1B.4**.

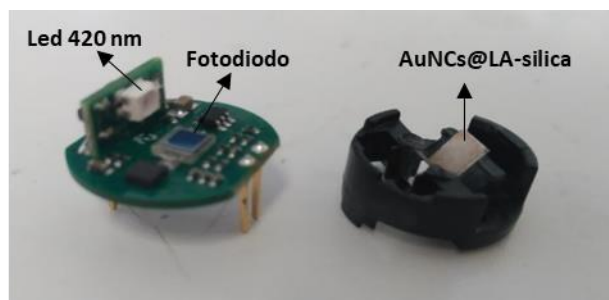


Figura 1B.4: Sensor óptico comercial LuminOx™ modificado con AuNCs en soporte de sílice.

1B.3.2.6. Efecto de O₂ en la fluorescencia de AuNCs@LA inmovilizados en sílica a temperatura ambiente.

Los espectros de emisión a temperatura ambiente del AuNCs inmovilizadas sobre soporte de sílice, se realizaron con el espectrómetro QE65000 acoplado al QF600– Fibra óptica 8-VIS/NIR.

Para estudiar el efecto del O₂ sobre los AuNCs inmovilizados se utilizó el sensor óptico LuminOx modificado con la lámina de sílica soportada sobre polietileno con los AuNCs@LA inmovilizados (cortada a un tamaño apropiado). Todo el sistema se insertó en una cámara casera de PVC, así paralelamente el O₂ en la cámara fue monitoreado por el sensor original LuminOx, el sensor LuminOx modificado con el soporte de sílica y AuNCs y la sonda de oxígeno FOXY-R para saber las concentraciones de O₂ dentro de la cámara en cada momento. (**Figura 1B.5**)

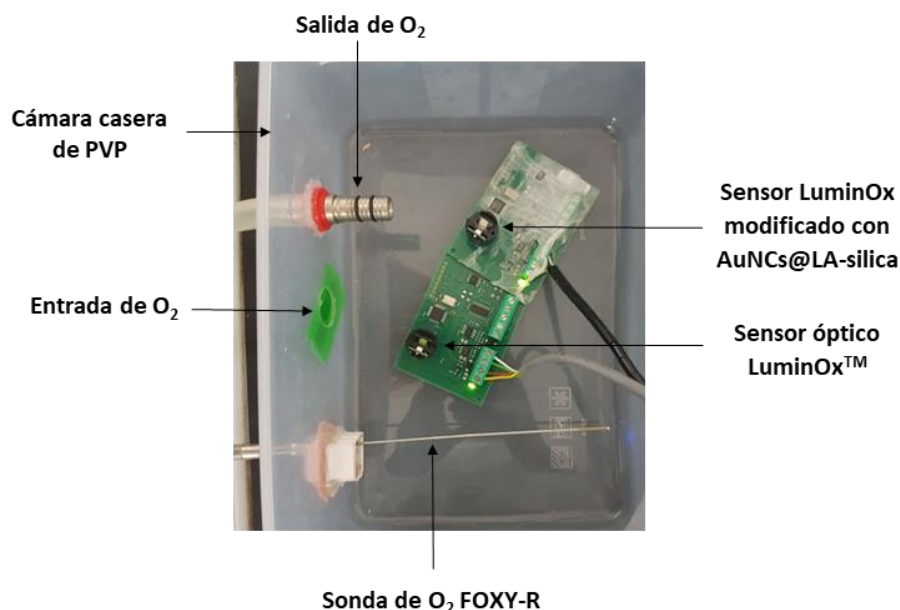


Figura 1B.5: Dispositivo utilizado para medir el efecto del O₂ sobre la fluorescencia de AuNCs-silica en fase gaseosa a temperatura ambiente.

1B.3.2.7. Seguimiento de la reacción enzimática DAO-cad a partir de la fluorescencia de $\text{Ru}(\text{bpy})_3$ o AuNCs en disolución

Las medidas del consumo de O_2 durante la reacción enzimática de DAO y cadaverina en disolución, se realizaron mediante fluorescencia. Para ello, se colocaron en la cubeta disolución amortiguadora fosfato (0,1 M, pH = 7), DAO (1U / mL) y Ru ($1,40 \cdot 10^{-5}$ M) o AuNCs@BSA (24,85 mg/mL) (volumen total 2 mL) y se obtuvo el valor de fluorescencia inicial; para $\text{Ru}(\text{bpy})_3$ se utilizó longitud de onda de excitación de 470 nm y de emisión 618 nm; para AuNCs@BSA 470 nm y 650 nm respectivamente. Después de 100 s, se inyectaron 100 μL de las soluciones de cadaverina a la concentración evaluadas (0, $2,5 \cdot 10^{-5}$, $5,0 \cdot 10^{-5}$, $1,0 \cdot 10^{-5}$ y $2,2 \cdot 10^{-4}$ M) y se midió la variación de fluorescencia durante la reacción, tomando el valor máximo de emisión del Ru o AuNCs.

1B.3.2.8. Evaluación de la fluorescencia de AuNCs en papeles comerciales

Para la fabricación de las tiras rápidas de detección, se inmovilizaron los AuNCs por absorción en diversos papeles comerciales. Para ello se cortaron fragmentos de los diferentes papeles evaluados y se depositó en cada uno de ellos 100 μL de AuNCs@BSA stock. Se prepararon también blancos de estos papeles depositando 100 μL de DAO 5 U/mL o cadaverina $2,2 \cdot 10^{-4}$ M. Los papeles se dejaron secar durante 2 horas y se evaluó su fluorescencia midiendo con la ayuda del espectrómetro portátil QE65000 (450 nm de excitación), acoplado a la fibra óptica QF600–Fibra óptica 8-VIS/NIR. La **Figura 1B.6** muestra este sistema y el simple procedimiento de medida.

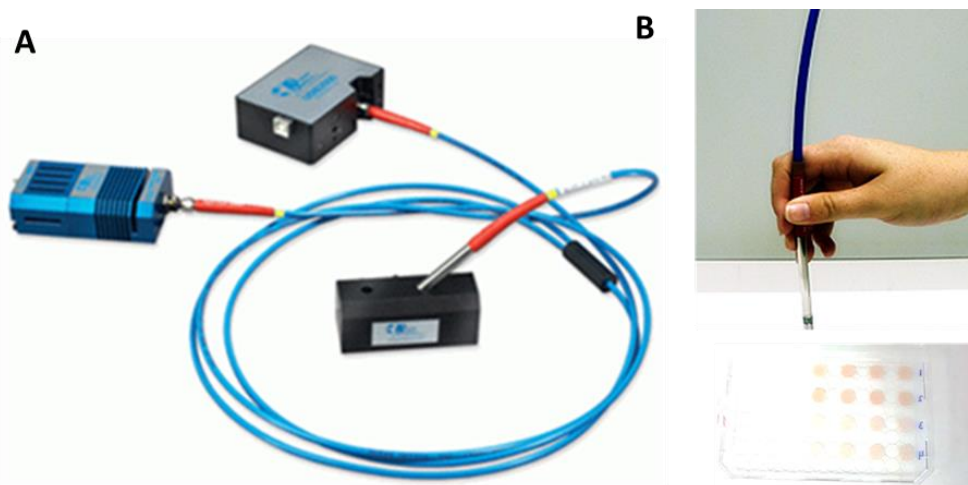


Figura 1B.6: A) espectrómetro portátil QE65000 acoplado a la fibra óptica QF600- 8-VIS/NIR de Ocean Optics B) Modo de medición de la fluorescencia de los papeles con la sonda vis/NIR.

Se estudió también el orden de adición de los reactivos en el papel, evaluándose diversas opciones:

- Adición de 30 μL de la mezcla AuNCs+DAO* de forma conjunta (tras 2 horas de secado) + 10 μL cadaverina.
- Adición de 10 μL de cadaverina (tras 10 min de secado) + 30 μL de la mezcla AuNCs+DAO*.

*Mezcla AuNCs+DAO: 100 μL AuNCs stock + 100 μL DAO 5 U/mL

Las medidas de la fluorescencia de estos papeles se realizan 1 minuto después de la adición.

1B.3.2.9. Seguimiento de la reacción enzimática DAO-cad a partir de la fluorescencia de Ru(bpy)₃ o AuNCs en papel comercial 142.

En primer lugar, se añadieron a los papeles 30 μL de la concentración de cadaverina evaluada (0, $2,5 \cdot 10^{-5}$, $5,0 \cdot 10^{-5}$, $1,0 \cdot 10^{-5}$ y $2,2 \cdot 10^{-4}$ M) y tras 10 min se añadieron 30 μL de la mezcla AuNCs+DAO (100 μL AuNCs@BSA stock + 100 μL DAO 5 U/mL) o de la mezcla Ru+DAO ($5 \cdot 10^{-5}$ M Ru(bpy)₃ + 100 μL DAO 5 U/mL).

La evaluación de su fluorescencia se llevó a cabo 1 minuto después de la adición de la muestra con el espectrómetro portátil QE65000 (450 nm de excitación), acoplado a la fibra óptica QF600–Fibra óptica 8-VIS/NIR.

1B.3.2.10. Entrampamiento de AuNCs y DAO en soportes de celulosa.

Para evaluar otros métodos de entrampamiento de los AuNCs y la enzima, se elaboraron soportes de celulosa mezclando 250 μL de pasta de celulosa 10% con 100 μL de AuNCs@BSA y 5 μL de DAO 10U/mL. Después, 10 μL de la mezcla se depositaron en placas de plástico para la formación de los soportes de celulosa-AuNCs/DAO y se dejaron secar durante 1h a 37°C.

El efecto en la fluorescencia de los AuNCs tras la adición de 5 μL de cadaverina sobre estos soportes se midió con el espectrofotómetro de fluorescencia en placa Cary Eclipse, con λ_{ext} 380 nm.

Para la obtención de la pasta de celulosa, se pesó 1 g de celulosa y se disolvió en 10 mL de ácido sulfúrico al 32%, agitando durante 1 hora. Después se añadieron a la mezcla 100 mL de agua miliQ y se eliminó el sobrenadante por centrifugación 3 veces. La pasta de celulosa resultante se filtró a vacío con fiola y lavó 5 veces con agua miliQ. Finalmente, la pasta se disolvió en agua miliQ 10% p/v.

1B.3.2.11. Efecto de O₂ en la fluorescencia de AuNCs@LA inmovilizados en sílica a altas temperaturas.

Para las mediciones de fluorescencia de AuNCs a alta temperatura, se utilizó un sistema de calefacción (Pervaporador), descrito anteriormente.⁹³ El sistema consta de una cámara de medición con dos ventanas de cuarzo y es capaz de calentarse mediante una resistencia cilíndrica. La temperatura es controlada por un controlador digital (precisión, ± 1 °C) y es posible calentar a una temperatura máxima de 250 °C. El conjunto el pervaporador se colocó sobre un soporte de PTFE. La lámina de AuNCs@LA inmovilizados sobre el soporte de sílica se colocó dentro de la cámara del pervaporador cerca de una de las ventanas de vidrio. La variación de la intensidad de la fluorescencia con la temperatura se controló con el espectrómetro QE65000 acoplado a la óptica fibra QF600–8-VIS/NIR como se muestra en la **Figura 1B.7**.

Sección 1B: Nanoclusters de oro como sondas fluorescentes para la detección de oxígeno en reacciones enzimáticas.

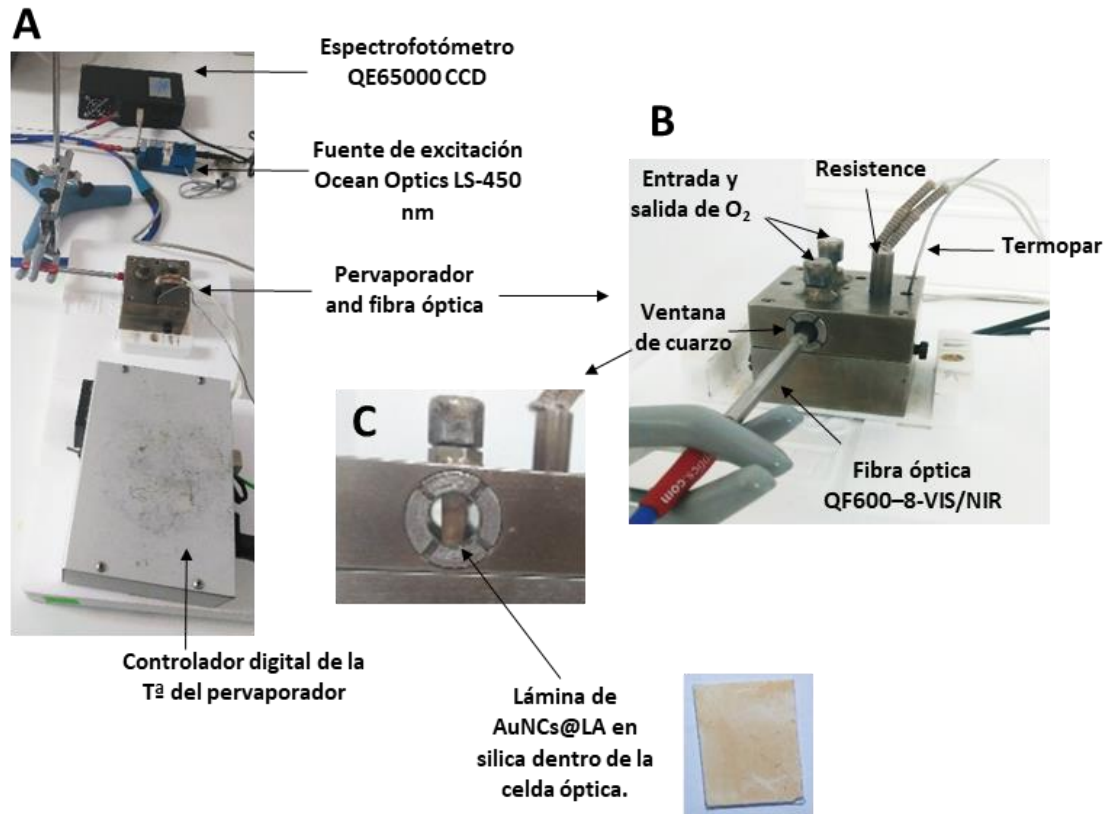


Figura 1B.7: Esta composición fotográfica muestra el dispositivo utilizado para medir la fluorescencia de AuNCs a altas temperaturas. **A)** El sistema consta de un pervaporador (los AuNCs se encuentran en el interior), el controlador digital (para elegir la temperatura del pervaporador), la fibra óptica (que excita y mide de forma remota la fluorescencia a través de una ventana óptica) y el espectrómetro CCD utilizado y junto con la fuente de excitación; los últimos tres componentes están conectados con fibras ópticas. **B)** El pervaporador, que muestra la ubicación de la fibra óptica, los tubos de entrada y salida de la muestra de aire, el calentador eléctrico (resistencia) y el termopar para controlar la temperatura del pervaporador. **C)** Detalle del pervaporador, que muestra la ventana óptica de cuarzo y la ubicación de la lámina de sílica con AuNCs inmovilizados.

1B.4. Resultados

1B.4.1. Calibración de sensores de oxígeno FOXY-R y Luminox.

Se llevó a cabo la calibración de la sonda FOXY-Rutenio, como se indica en la parte experimental (*apartado 1B.3.2.1*) y se obtuvieron las constantes K_{sv} de Stern-Volmer (modelo que rige la desactivación colisional del O_2) en fase líquida, donde el $[O_2]$ se da en M (**Figura 1B.8A**) y en fase gaseosa, donde el $[O_2]$ se expresa en % (V/V) (**Figura 1B.8B**). La calibración del sensor Luminox, que también contiene rutenio como fluoróforo, se llevó a cabo en fase gas y su K_{sv} (**Figura 1B.9**).

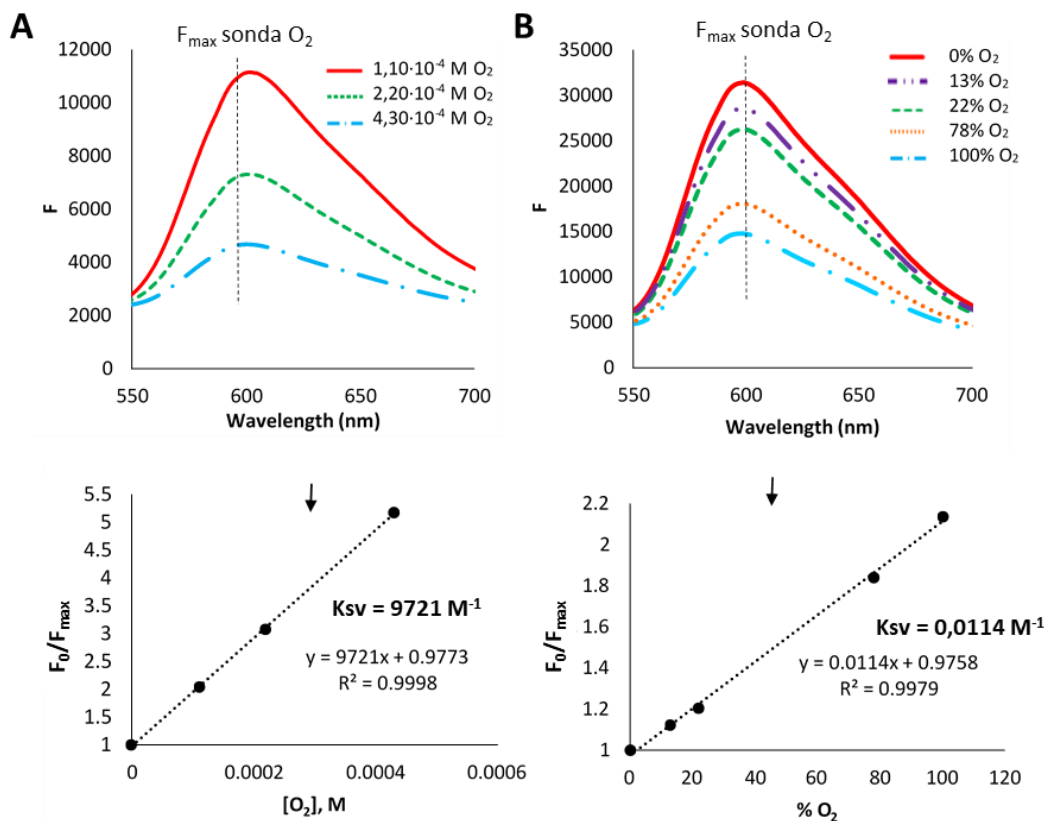


Figura 1B.8: Espectros de emisión registrados con la sonda FOXY-R y curvas de calibración obtenidas para el sensor comercial ($\lambda_{exc} = 450 \text{ nm}$ y $\lambda_{em} = 600 \text{ nm}$) **A**) en disolución **B**) en fase gas

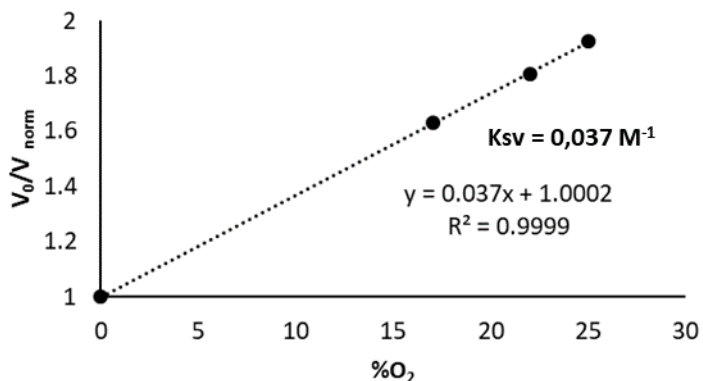


Figura 1B.9: Curva de calibración obtenida para el sensor comercial Luminox[®] O_2 en fase gas ($\lambda_{ext} 420 \text{ nm}$), que proporciona la fluorescencia transformada a voltaje.

1B.4.2. Obtención de los parámetros fluorimétricos de AuNCs

1B.4.2.1. Evaluación de la estabilidad y fotoblanqueo de AuNCs.

La utilización de la fluorescencia de AuNCs como base de la detección y la intención del desarrollo de un sensor reversible que permita su uso continuado, implica la necesidad de que estas propiedades fluorescentes permanezcan estables en el tiempo y fundamentalmente durante la exposición a la luz de excitación. Chevrier et al. demostraron la estabilidad de algunos tipos de AuNCs frente a la destrucción fotoquímica (fotoblanqueo)⁹⁴, a pesar de ello se decidió estudiar la estabilidad específica de los AuNCs evaluados en este trabajo frente al fotoblanqueo. Así, la **Figura 1B.10** muestra los resultados obtenidos después de someter a una excitación continua de 3 horas a las disoluciones stock de ambos tipos de nanoclusters. Estos estudios mostraron una alta estabilidad en el caso de AuNCs@LA y una leve inestabilidad de los AuNCs@BSA en particular durante la primera hora y media (en la siguiente 1,5 h esta fluorescencia se mantuvo constante).

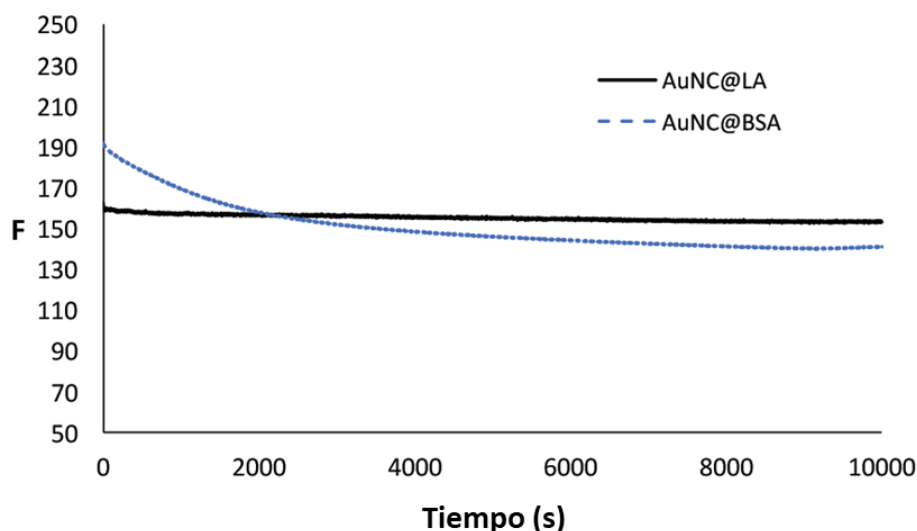


Figura 1B.10: Estudios de estabilidad de fluorescencia y fotoblanqueo para ambos tipos de AuNCs en solución. Para AuNC@BSA, $\lambda_{\text{ext}} = 450$ nm y $\lambda_{\text{em}} = 650$ nm; para AuNC@LA, $\lambda_{\text{ext}} = 450$ nm y $\lambda_{\text{em}} = 700$ nm.

1B.4.2.2. Medida de los tiempos de vida (τ) de fluorescencia de AuNCs

Como ya se ha dicho, el tiempo de vida es el tiempo promedio que una molécula pasa en el estado excitado antes de volver al estado fundamental. Este valor es muy interesante para conocer la vida útil de estos nanomateriales como sondas de fluorescencia de O_2 , ya que largos tiempos de vida se asocian con fenómenos de desactivación colisional. La **Figura 1B.11** muestra los registros del decaimiento de fluorescencia para ambos tipos de AuNCs, así a partir de estos datos y del perfil de lámpara, se calculan los tiempos de vida, de forma manual y mediante el software del equipo, por ajuste a una función. La vida útil de la fluorescencia (τ) fue de 123 ± 9 ns para AuNCs@LA y de 153 ± 15 ns para AuNCs@BSA lo que permite el uso de estos nanomateriales como sondas de fluorescencia de O_2 .

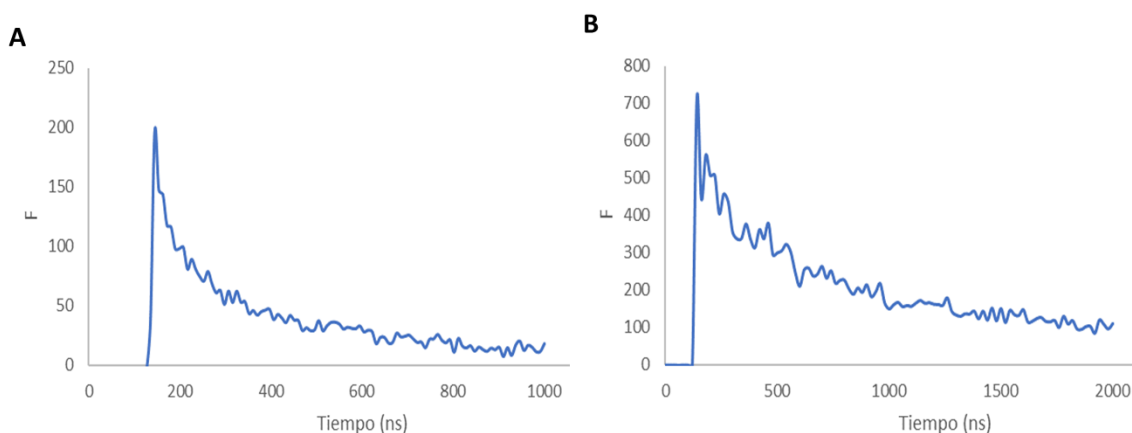


Figura 1B.11: Decaimiento de la fluorescencia para **A)** AuNCs@LA **B)** AuNCs@BSA en solución acuosa a $2,2 \cdot 10^{-4}$ M O_2

1B.4.2.3. Medida del rendimiento cuántico (ϕ) de AuNCs.

Los rendimientos cuánticos de fluorescencia se obtuvieron utilizando el método relativo propuesto por Miller et al.⁹⁵ que se basa en la obtención del ϕ de un fluoróforo utilizando como referencia el ϕ conocido de otro fluoróforo y aplicando la siguiente ecuación simplificada:

$$\phi_x = \phi_s \frac{\varepsilon_{\lambda_{exc}}^s F_c^x}{\varepsilon_{\lambda_{exc}}^x F_c^s}$$

donde el subíndice "x" se refiere al analito y "s" se refiere al estándar utilizado, en este caso fue cloruro de tris(bipyridina)rutenio (II) (Ru (bpy) $3Cl_2$). Las absorptividades molares (ε) corresponden a las pendientes de las líneas de calibración de absorbancia versus concentración, y F_c corresponden a las pendientes de las rectas de calibración de intensidad de fluorescencia versus concentración y se utilizó 410 nm como longitud de onda de excitación. El ϕ de Ru(bpy) 3 se obtuvo de la bibliografía⁹⁵, así la **Tabla 1B.1** resume los valores de ε y F_c obtenidos con los correspondientes rendimientos cuánticos calculados:

	ε ($\lambda=410$ nm)	F_c (Area)	ϕ
Ru(bpy)3	0.00059 ($R^2=0.996$)	98 ($R^2=0.95$)	0.050
AuNCs@BSA	0.00016 ($R^2=0.971$)	57 ($R^2=0.994$)	0.089
AuNCs@LA	0.00035 ($R^2=0.996$)	23 ($R^2=0.95$)	0.018

Tabla 1B.1: Absorptividades molares, pte. de las rectas de calibración de fluorescencia vs concentración (F_c) y rendimientos cuánticos (ϕ) de ambos tipos de AuNCs y Ru(bpy) 3 utilizado como referencia.

Estos valores ϕ están de acuerdo con los encontrados en bibliografía para AuNCs@LA ($\phi=0,018$)⁹⁶ y AuNCs@BSA ($\phi=0,080$)⁹⁷. Estos rendimientos son comparables a los de los fluoróforos orgánicos y están en el rango necesario para su aplicación como sensores ópticos.

1B.4.3. Desactivación de la fluorescencia de AuNCs en disolución.

Se estudió el efecto de la concentración de O₂ en AuNCs@LA en disolución como se explicó en la parte experimental (*apartado 1B.3.2.3*)

Se observó que la desactivación de la fluorescencia de AuNCs debida al efecto del O₂ se ajusta al modelo convencional de Stern-Volmer. (Ec. B1) y no la ecuación modificada para dos poblaciones de fluoróforos (accesibles y no accesible).

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv}[O_2] \quad (\text{Ec. B1})$$

Este resultado es consistente con la hipótesis de que los AuNCs se comportan como una entidad con una estructura de niveles de energía específica. La constante de Stern-Volmer (K_{sv}) es independiente de la concentración de AuNCs utilizada. La **Figura 1B.12** muestra los que valores de K_{sv} obtenidos utilizando diferentes concentraciones de AuNCs@LA son similares en todos los casos

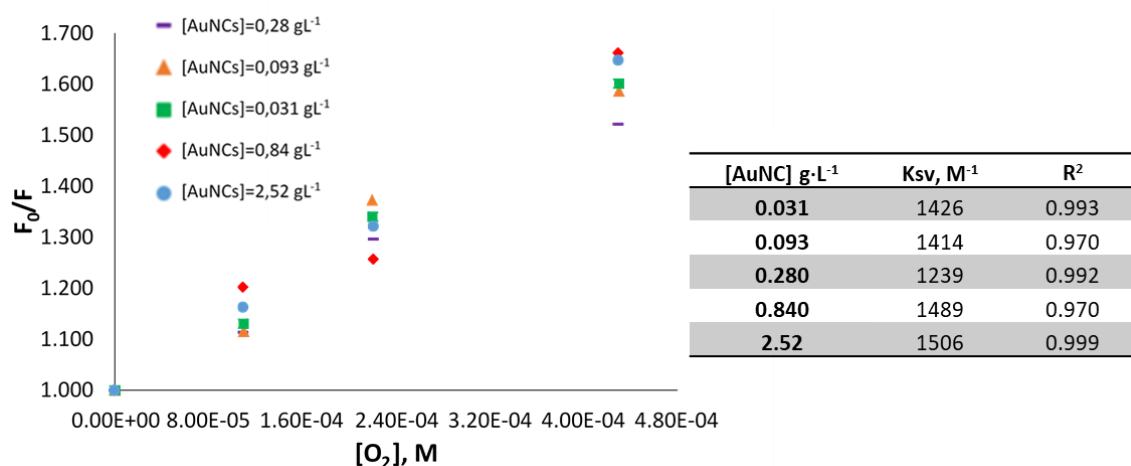


Figura 1B.12: Gráficos de Stern-Volmer utilizando soluciones con diferentes concentraciones de AuNCs@LA junto con los valores de K_{sv} obtenidos tras el ajuste lineal de las rectas obtenidas usando regresión de mínimos cuadrados.

Así el valor medio obtenido de K_{sv} fue de 1400 M⁻¹ (DER= 8,8%). Este K_{sv} es menor que el obtenido para el complejo de Ru (II) complejo de la sonda Foxy-R, lo cual es consistente con el mayor tiempo de vida útil de fluorescencia para compuestos de rutenio.

Se obtuvieron, además, los tiempos de vida de AuNCs@LA para tres concentraciones de O₂ (**Tabla 1B.2**).

[O ₂], M	τ, ns
1,1*10 ⁻⁴	146 ± 10
2,2*10 ⁻⁴	123 ± 9
4,3*10 ⁻⁴	104 ± 8

Tabla 1B.2: Valores de vida útil de AuNCs@LA obtenidos para tres concentraciones de O₂, mediante la evaluación del decaimiento de la fluorescencia.

Al reorganizar la ecuación de Stern-Volmer (Ec. B1), se obtiene la siguiente ecuación (Ec. B2):

$$\frac{1}{\tau} = \frac{1}{\tau_0} + \frac{K_{sv}}{\tau_0} [O_2] \quad (\text{Ec. B2})$$

la representación de $1/\tau$ frente a la concentración de O_2 correspondiente da la siguiente ecuación:

$$\frac{1}{\tau} = 0.0061 + 8.21 [O_2] \quad R^2 = 0.98 \quad (\text{Ec. B3})$$

Desde la que es posible calcular la $K_{sv} = 1346 \text{ M}^{-1}$ (DER = 10%) que estadísticamente (prueba t, 95% de confianza) concuerda con el valor medido a partir de los valores de intensidad (1400 M^{-1}) mostrados en la **Figura 1B.10**. Estos resultados confirman que la desactivación de la fluorescencia de AuNCs sigue el mecanismo de colisión de Stern-Volmer.

Estos resultados fueron extraídos con estudios similares para AuNCs@BSA. Se observó una mayor sensibilidad a la extinción de O_2 con estos nanoclusters en comparación con AuNC@LA con un K_{sv} de 4479 M^{-1} (DER = 10,0%, $n = 3$) (**Figura 1B.13A**) solo la mitad al valor obtenido con el Rutenio utilizando el el sensor Foxy. El valor K_{sv} también se calculó a partir de mediciones de vida útil obteniendo 3576 M^{-1} (DER = 9,8%, $n = 3$) (**Figura 1B.13B**) los valores de compararon estadísticamente (prueba t); se obtuvo un $t_{\text{experimental}}$ de 2,75, que es casi el límite al 95% de confianza ($t = 2,78$) y superior al 90%; las diferencias entre estos valores de K_{sv} se atribuyen a la dificultad de reproducir las condiciones de funcionamiento del láser.

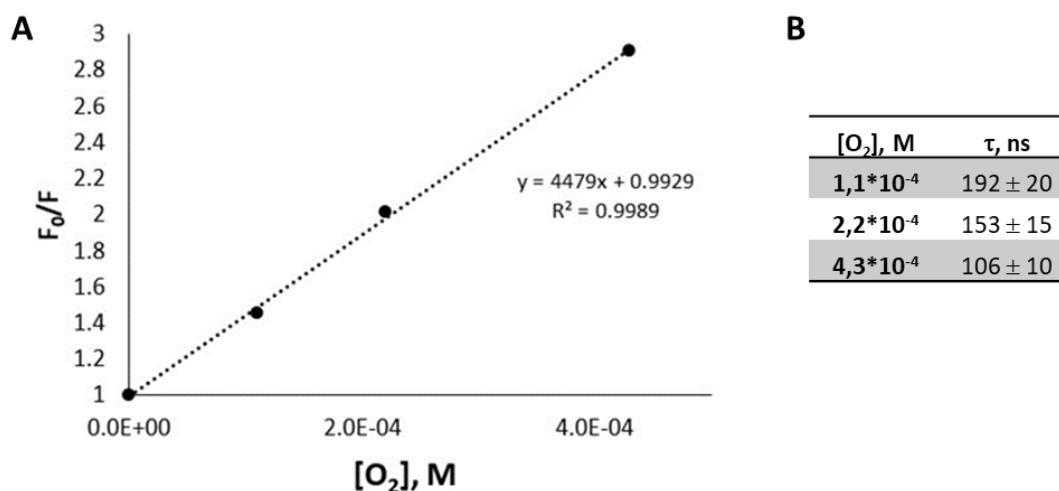


Figura 1B.13: **A)** Gráfico de Stern-Volmer para AuNCs@BSA en la concentración stock, la pendiente de esta recta da el valor de la K_{sv} . **B)** Valores de vida útil de AuNCs@LA obtenidos para tres concentraciones de O_2 , mediante la evaluación del decaimiento de la fluorescencia.

1B.4.3.1. Medida de la eficiencia de desactivación (γ) de O_2 en la fluorescencia de AuNCs

La eficiencia de desactivación de O_2 (γ) en la fluorescencia de ambos tipos de AuNCs se calculó utilizando las ecuaciones descritas en los libros de B. Valeur (páginas 78-79)⁹⁸ y de JR Lakowicz (página 281)⁹⁸.

Sección 1B: Nanoclusters de oro como sondas fluorescentes para la detección de oxígeno en reacciones enzimáticas.

a) Eficiencia de desactivación (γ) de AuNC@LA

De acuerdo con el tratamiento clásico de la desactivación por colisión, K_{SV} viene dado por:

$$K_{SV} = k_0 \gamma \tau_0 = 1500 \text{ M}^{-1} \quad (\text{Ec. B4})$$

Que sustituido en (Ec. B1) resulta en:

$$\frac{\tau_0}{\tau} = 1 + k_0 \gamma \tau_0 [O_2] \quad (\text{Ec. B5})$$

Donde γ es la eficiencia de desactivación ($0 < \gamma < 1$), τ_0 es el tiempo de vida en ausencia de oxígeno ($[O_2]=0$) y k_0 es la constante de velocidad bimolecular controlada por difusión dada por la ecuación de Smoluchowski:

$$k_0 = 7.57 * 10^{21} (R_f + R_{O_2})(D_f + D_{O_2}) \quad (\text{Ec. B6})$$

R (cm) y D ($\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$) son el radio y el coeficiente de difusión del fluoróforo y de O_2 . Usando un temperature de 293 K, D_f puede calcularse de acuerdo con la ecuación de Stokes-Einstein (S-E):

$$D_f = \frac{TK_B}{6\pi\eta R} = 2.69 * 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} \quad (\text{Ec. B7})$$

donde k_B es la constante de Boltzmann ($1.38 * 10^{-23} \text{ m}^2 \text{ Kgs}^{-2} \text{ K}^{-1}$), T (293K), η es la viscosidad cinemática del disolvente (agua, $0.00103 \text{ kg m}^{-1} \text{ s}^{-2}$ at 293K) and R el radio de AuNC@LP ($8.0 * 10^{-10} \text{ m}$). El valor D_{O_2} usado, $1.80 * 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ fue el dado por P. Han y D.M. Bartels⁹⁸ y el valor de R_{O_2} $1.73 * 10^{-10} \text{ m}$. A partir de estos valores y la ecuación 6 y 7 se obtiene el valor:

$$k_0 = 1.51 * 10^{10} \text{ s}^{-1}$$

y usando el τ de AuNCs@LA para la concentración de saturación de oxígeno en agua ($2.2 * 10^{-4} \text{ M}$) obtenida ($\tau = 123 * 10^{-9} \text{ s}$) en la ecuación 5 se obtiene el valor de la eficiencia $\gamma = 0.52$. Este valor es más bajo que el de la mayoría de los fluoróforos moleculares (≈ 1), lo cual también es consistente con la idea de que los niveles de energía responsables de la fluorescencia están parcialmente protegidos por la estructura de AuNC.

b) Eficiencia de desactivación (γ) de AuNC@BSA

Siguiendo el mismo procedimiento y utilizando los parámetros dados para AuNCs@BSA:

$K_{SV} = 4479 \text{ M}^{-1}$, $D_f = 2.39 * 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, $D_{O_2} = 1.80 * 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, $\tau = 153 * 10^{-9} \text{ s}$, $R_f = 0.90 \text{ nm}$ y $R_{O_2} = 0.173 \text{ nm}$, se calcularon los valores de k_0 and γ :

$$k_0 = 1,65 * 10^{10} \text{ s}^{-1}$$

$$\gamma = 0,90$$

Considerando que la accesibilidad de O₂ a los niveles de energía de ambos tipos de nanocluster es la misma, esta mayor eficiencia registrada para AuNCs@BSA se puede explicar teniendo en cuenta que, en este caso, como se observó en el *apartado 1.3* de este capítulo ‘Síntesis y caracterización de AuNCs’, los AuNCs@BSA están muchos más cerca unos de otros y rodeados por un gran cantidad de BSA, dando lugar a un radio aparente más alto y acortando la ruta media del oxígeno que facilita la desactivación colisional.

1B.4.4. AuNCs como sondas de O₂ en fase gas

Una vez comprobada la viabilidad del uso de AuNCs en disolución como sondas de O₂ eficaces, se estudió también, el uso de AuNCs como sondas de O₂ en fase gas. Para ello AuNCs se inmovilizaron, en este caso, sobre un soporte TLC de sílice soportada sobre polietileno y cuya transparencia permite que la luz de excitación llegue al nanomaterial inmovilizado en la sílica (*apartado 1B.3.2.4*). Con ayuda de una fibra óptica, se registraron los espectros de excitación y emisión de los AuNCs inmovilizados y que se muestran en la **Figura 1B.14A**, algo peor definidos que los obtenidos en disolución, tanto por la naturaleza del soporte como por el sistema de medición. La **Figura 1B.12B** muestra el aspecto de estas láminas durante la excitación con luz UV-vis.

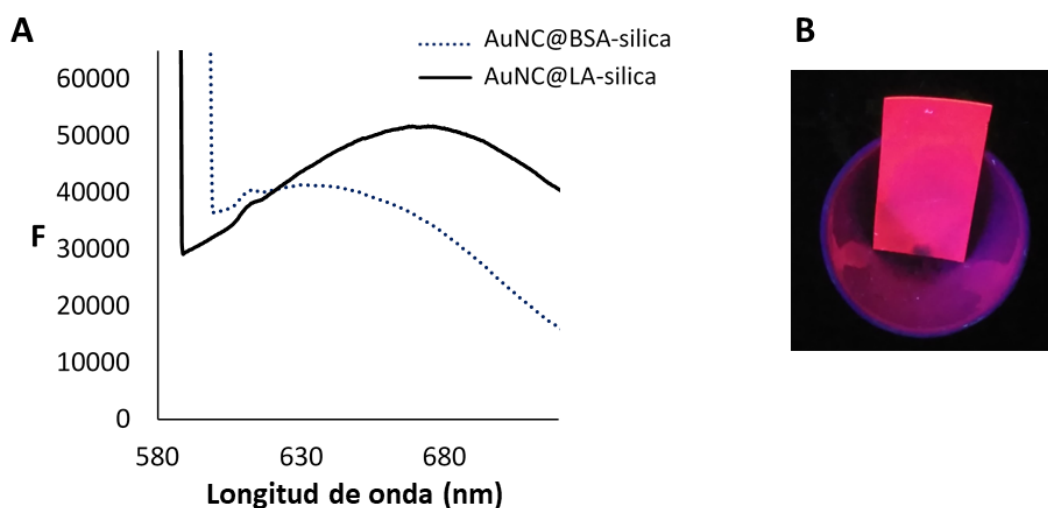


Figura 1B.14: A) Espectros de emisión de ambos AuNCs inmovilizados sobre soporte de sílica, obtenidos utilizando el espectrómetro QE65000 acoplado a QF600– Fibra óptica 8-VIS/NIR (λ_{exc} = 450 nm). **B)** Fluorescencia de una de las láminas TLC con AuNCs@LA inmovilizados excitada en el interior de una lámpara UV-vis.

En este punto se acopló al sensor Luminox™ O₂ cada una de las láminas de AuNCs fabricadas, como se muestra en la **Figura 1B.4**. Para la calibración de este nuevo sensor Luminox modificado, se evaluó su respuesta a diferentes concentraciones de O₂ dentro de cámara casera de PVC y midiendo en paralelo la concentración de O₂ en su interior con el sensor Luminox original y con la sonda Foxy-R como se explica en la parte experimental (*apartado 1B.3.2.6*). El sensor comercial emite señales de voltaje (en lugar de Intensidad fluorescente), sin embargo, el Ksv no depende de las unidades de magnitud utilizadas para medir el efecto del O₂ en la fluorescencia del fluoróforo, por lo que la ecuación de Stern-Volmer (Ec. B1) también puede ser aplicada reemplazando la intensidad de fluorescencia (F) por voltaje (V):

Sección 1B: Nanoclusters de oro como sondas fluorescentes para la detección de oxígeno en reacciones enzimáticas.

$$\frac{V_0}{V} = 1 + K_{sv}[O_2] \quad (\text{Ec. B8})$$

Así la **Figura 1B.15** muestra el gráfico de calibración obtenido con el sensor Luminox modificado con ambos tipos de AuNCs. Se obtuvieron en tres réplicas en días diferentes con las mismas láminas de AuNCs-sílice, demostrando la estabilidad del sistema. Como puede observarse, los resultados se ajustan a la ecuación de Stern-Volmer. El Ksv obtenido fue 0,0059 (DER = 4,9% n = 3) para AuNCs@LA y 0,0031 (DER = 3,3% n=3) para AuNCs@BSA.

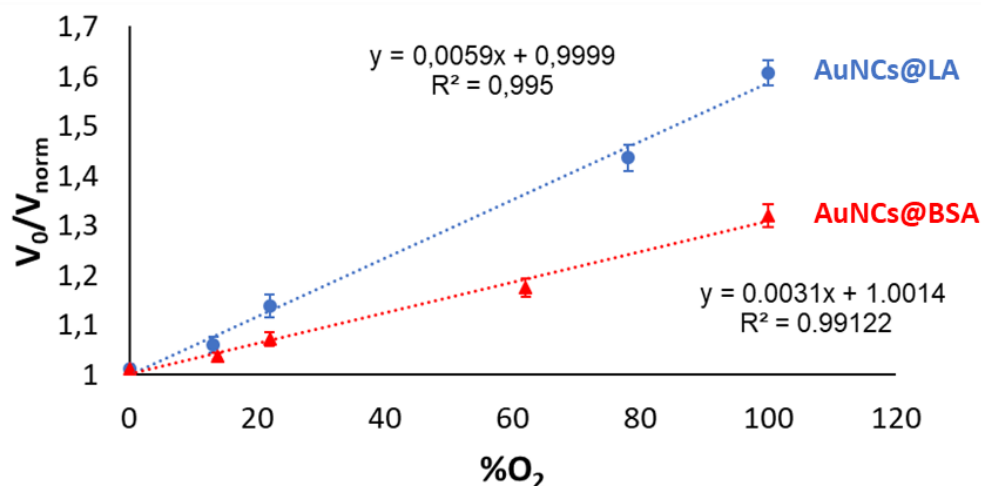


Figura 1B.15: Efecto del O₂ sobre el sensor Luminox modificado con AuNCs@LA y AuNCs@BSA inmovilizados sobre soporte de sílice. ($\lambda_{ext}= 450 \text{ nm}$)

La **Tabla 1B.3** muestra todas las Ksv obtenidas en fase gas con los diferentes sensores evaluados, de esta forma se puede observar que cuantitativamente los Ksv obtenidos para el sensor Luminox modificado con AuNCs son cuantitativamente peores que para sensor comercial original, sin embargo, al no poder conocer la concentración de rutenio inmovilizada por el fabricante es difícil comparar estos resultados. Respecto a la sonda Foxy-R, la Ksv obtenida por el sensor Luminox modificado con AuNCs@LA es menos de 2 veces menor que la Ksv obtenida para el Foxy-R, lo que se debe a la estructura física del sensor.

En cuanto a los AuNCs se observa una mayor sensibilidad para AuNCs@LA, al contrario de lo que se observó en disolución; AuNCs@LA ($K_{sv} 1346 \text{ M}^{-1}$) y AuNCs@BSA ($K_{sv} 4479 \text{ M}^{-1}$), sin embargo, esto es debido a que las longitudes de onda de excitación y de lectura de ambos métodos son diferentes. En disolución los Ksv se midieron a las longitudes de onda máximas para cada AuNCs; $\lambda_{ext}/\lambda_{em}$ fueron 400/700 nm para AuNC@AL y 375/650 nm para AuNCs@BSA. En cambio, el sensor Luminox consta de un LED de excitación de 420 nm, longitud de onda adecuada para la excitación de AuNCs@LA pero algo alejada del máximo de AuNCs@BSA, lo que justifica las Ksv obtenidas.

Sensor en fase gas	Ksv (% V/V)
Foxy-R	0,011
Luminox	0,037
Luminox (AuNCs@LA-silica)	0,0059
Luminox (AuNCs@BSA-silica)	0,0031

Tabla 1B.3: Ksv en porcentaje volumen/volumen obtenidas para cada uno de los sensores en fase gas evaluados.

En cuanto a las láminas de sílica, como se ha indicado, fueron preparadas tras tres ciclos de inmersión-secado de las mismas en las disoluciones stock de AuNCs. Adicionalmente se realizaron ensayos evaluando un mayor número de ciclos, pero no se observaron mejoras; de hecho, para diez ciclos, la Ksv mostró un rango de respuesta lineal más corto, probablemente debido al efecto de autoabsorción a altas intensidades de fluorescencia. Estos estudios confirman el optima fabricación a la concentración establecida de AuNCs, así como la estabilidad y reproducibilidad del sistema sensor para todo el rango de % O₂ en aire evaluado a temperatura ambiente.

Como muestra la **Figura 1B.16**, la reversibilidad del proceso de desactivación de la fluorescencia de AuNCs-silica fue también evaluada y confirmada realizando varios ciclos consecutivos de N₂-O₂.

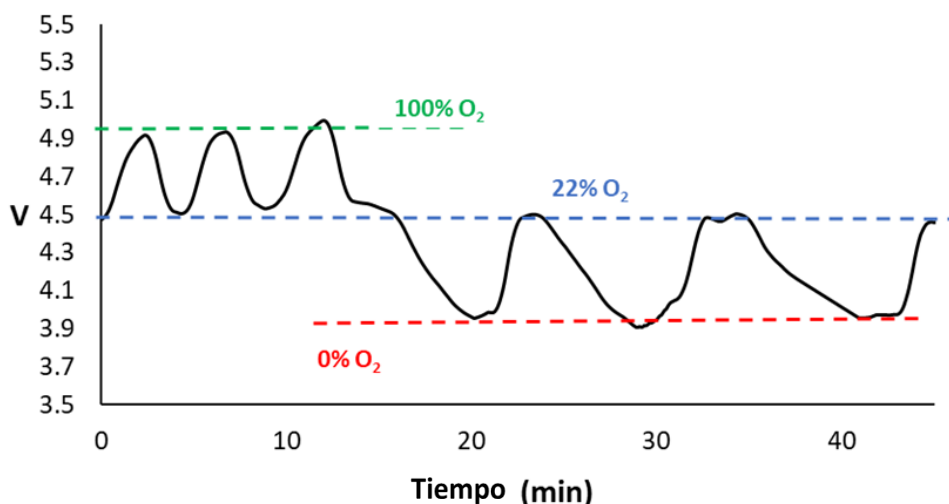


Figura 1B.16: Representación de la fluorescencia frente al tiempo de la lámina AuNC@LA-silica en el sensor comercial que muestra la reversibilidad de esta para la detección de O₂ después de varios ciclos de flujo de N₂ - O₂. El voltaje (V) es inversamente proporcional a la intensidad de la fluorescencia.

1B.4.5. Acoplamiento de AuNCs como sensores de oxígeno en reacciones enzimáticas: aplicación a la determinación de ABs.

En vista de los resultados obtenidos, se seleccionaron para esta aplicación los AuNCs@BSA que, mostraron tiempos de vida y un rendimiento cuántico superior al de AuNCs@LA, lo que conlleva a una mayor Ksv promedio. De esta manera se espera obtener mayor sensibilidad en su uso como sondas de O₂ en determinaciones enzimáticas.

1B.4.5.1. Seguimiento de la reacción enzimática DAO-cad a partir de la fluorescencia de Ru(bpy)₃ o AuNCs en disolución.

En primer lugar, se llevó a cabo la evaluación en disolución de AuNCs@BSA para el seguimiento de la reacción enzimática DAO-cad a partir de su respuesta al consumo de oxígeno y su comparativa con los resultados obtenidos utilizando Ru(bpy)₃, un complejo de Ru típicamente usado en esta aplicación. Para cada fluoróforo se recogieron los espectros finales obtenidos tras la reacción enzimática con cada una de las concentraciones de cadaverina evaluadas. En la **Figura 1B.17**, se observa como en ambos casos el aumento de la concentración de cadaverina y por tanto un mayor consumo de O₂ en la reacción enzimática, conlleva al aumento de la señal fluorescente.

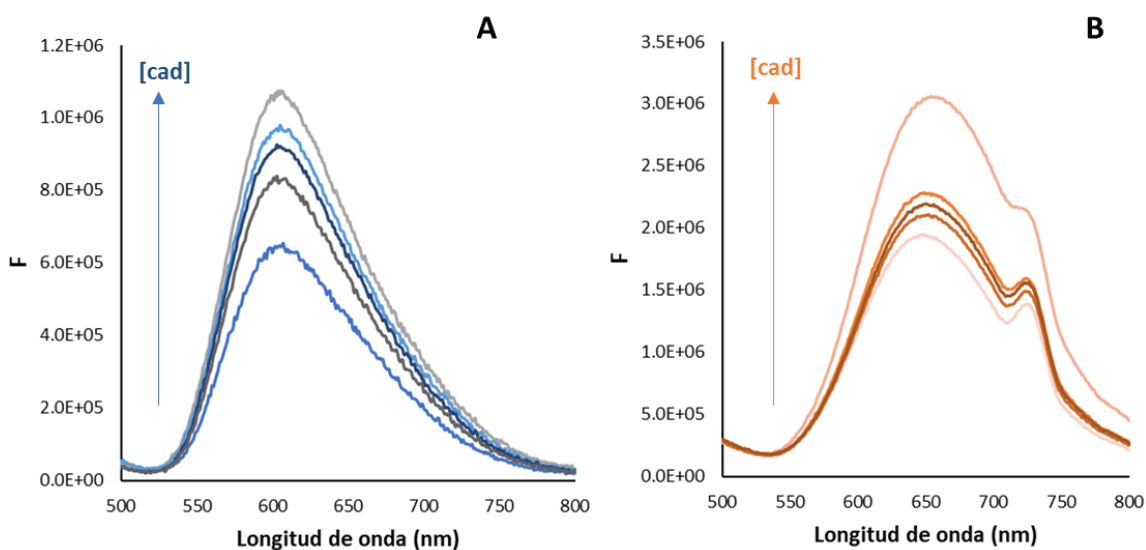


Figura 1B.17: Espectros de emisión con $\lambda_{\text{ext}} = 470$ nm de; **A)** Ru(bpy)₃ 1,40 · 10⁻⁵ M y **B)** AuNCs@BSA 24,85 mg/mL; tras la reacción enzimática de DAO (1 U/mL) y cadaverina (0, 2,5 · 10⁻⁵, 5,0 · 10⁻⁵, 1,0 · 10⁻⁵ y 2,2 · 10⁻⁴ M) en disolución amortiguadora fosfato 0.1 M pH 7.

De estos espectros es posible extraer las intensidades de fluorescencia promedio en su máximo de emisión; 618 nm para Ru(bpy)₃ y 650 nm para AuNCs@BSA. En este caso, como la concentración de cadaverina es inversamente proporcional a la concentración de O₂ la Ec. de Stern-Volmer (Ec. B1) puede adaptarse como (Ec. B9).

$$\frac{F}{F_0} = 1 + K_{sv}[\text{Cad}] \quad (\text{Ec. B9})$$

Así, la representación F/F_0 frente a la correspondiente concentración de cadaverina (siendo F_0 la fluorescencia de AuNCs@BSA en ausencia de oxígeno) proporciona los ajustes que se muestran en la **Figura 1B.18**.

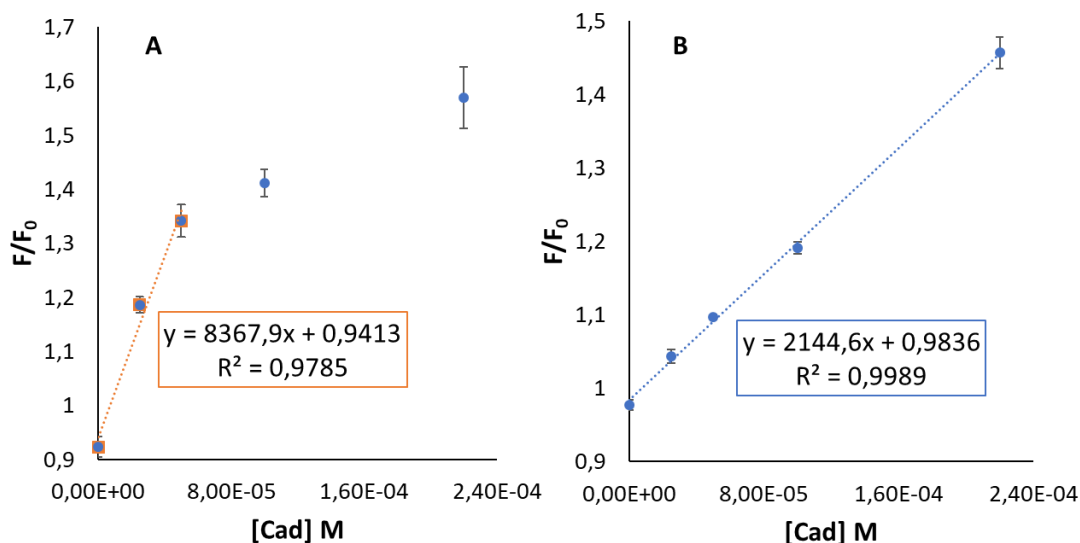


Figura 1B.18: Gráficos de Stern-Volmer adaptados a la detección de cadaverina para **A)** Ru(bpy)₃ y **B)** AuNCs@BSA.

De esta manera se observa como en el caso de del rutenio (**Figura 1B.18A**), su fluorescencia muestra una saturación de la señal para concentraciones de cadaverina superiores a $1,0 \cdot 10^{-5}$ M, sin embargo, podemos ajustar las concentraciones menores a una recta para obtener la Ksv aproximada del rutenio en la reacción enzimática, que resulta 8367.9 M^{-1} , frente a la $K_{sv} = 2144.6 \text{ M}^{-1}$ obtenida para AuNCs@BSA en la **Figura 1B.18B**, que aunque muestra un valor inferior, permite la detección lineal de cadaverina en todo el rango de concentraciones.

1B.4.5.2. Evaluación de fluorescencia de AuNCs@BSA en papeles comerciales

Para obtener una determinación rápida e *in situ* de ABs en alimentos, se pretende implementar esta metodología en tiras reactivas como sensores desechables. Para ello se depositaron AuNCs y DAO en soportes de celulosa y se evaluó la fluorescencia de AuNCs en diversos papeles junto con los blancos de DAO y cadaverina, que no mostraron fluorescencia en ninguno de los casos. (**Figura 1B.19**) Los espectros obtenidos con la sonda vis/NIR y el espectrofotómetro portátil muestran mejores respuestas para los papeles de microfibras de celulosa, 142, 121 y 141, donde los AuNCs presentan la máxima intensidad de fluorescencia sin desplazamiento de su máximo. Sin embargo, para los papeles 238 y 1281, basados en algodón, la fluorescencia de AuNCs se ve modificada y el pico de emisión se muestra ensanchado. A partir de estos resultados se seleccionó el papel 142 para futuros estudios, ya que proporciona la mayor intensidad de fluorescencia probablemente debido al mayor entrapamiento de AuNCs en la celulosa por la presencia de aglutinantes.

Sección 1B: Nanoclusters de oro como sondas fluorescentes para la detección de oxígeno en reacciones enzimáticas.

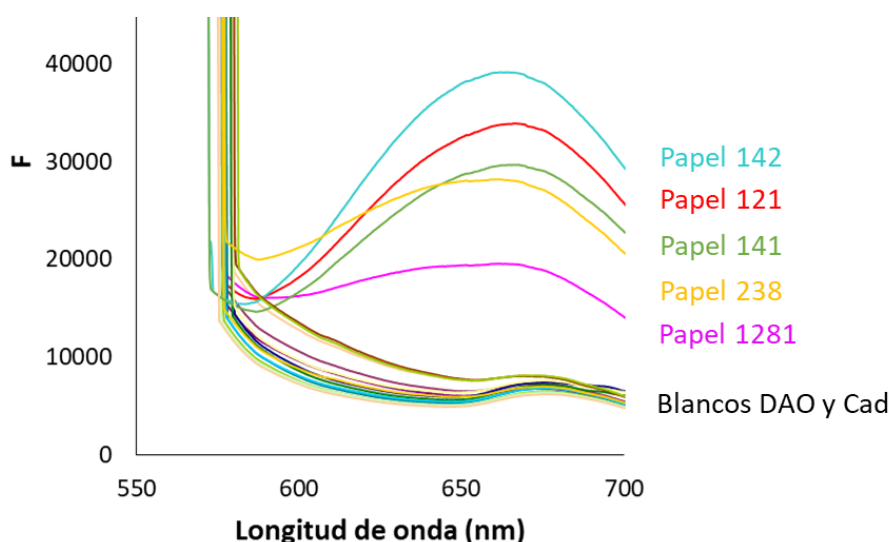


Figura 1B.19: Espectros de emisión de AuNCs y de sus blancos inmovilizados por absorción en los diferentes papeles comerciales evaluados.

En este punto se evaluó el efecto del orden de adición de AuNCs y los reactivos DAO y cadaverina en el papel seleccionado. Para ello se evaluaron dos posibilidades; A) la adición inicial de DAO+AuNCs y la posterior adición del analito, esta es la opción más indicada ya que permite secar la mezcla DAO+AuNCs previamente (lo que proporciona un sistema más robusto) y el operador solo debe añadir la muestra (**Figura 1B.20A**); B) la adición inicial de cadaverina y posterior de la mezcla DAO+AuNCs, en este caso el operador debe añadir todos los reactivos al papel. (**Figura 1B.20B**)

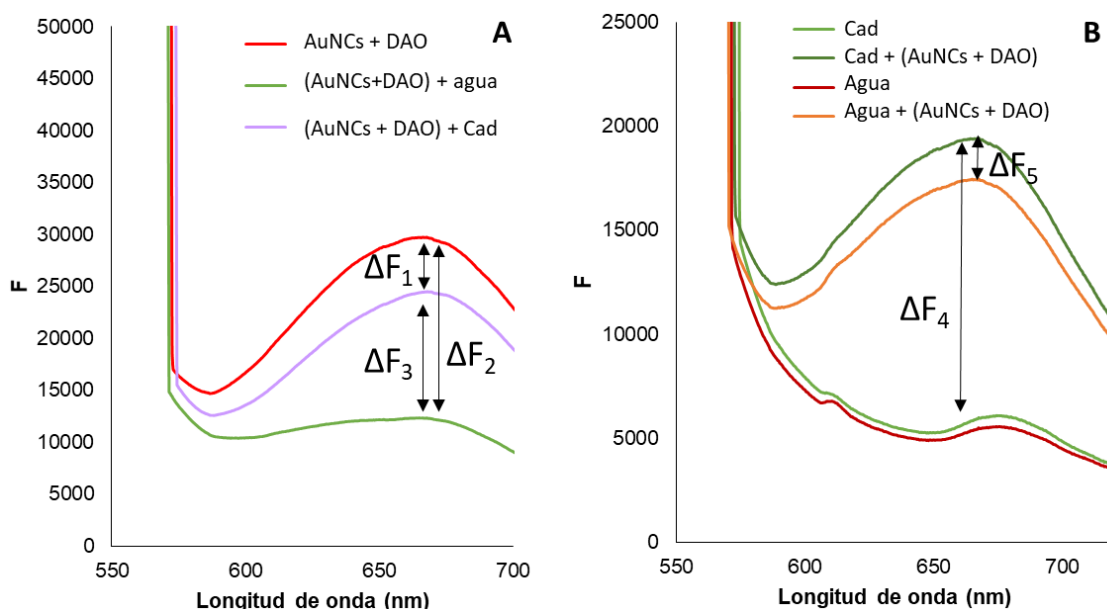


Figura 1B.20: Espectros de emisión de AuNCs y sus blancos en el papel 142 según el orden de adición **A)** (AuNCs+DAO) + cad **B)** Cad + (AuNCs+DAO), la concentración de cadaverina es en todos los casos $1,00 \cdot 10^{-4}$.

Como se observa en la **Figura 1B.20A**, la adición de la Cad sobre la mezcla AuNCs+DAO, (previamente absorbidos y secados en el papel) produce la dilución de la mezcla inicial con la consecuente disminución de la fluorescencia de AuNCs (ΔF_1). Sin embargo, esta disminución es

mayor cuando la muestra es agua (ΔF_2), lo que muestra el efecto del aumento de la fluorescencia de AuNCs proporcional al consumo de O_2 (ΔF_3). En la **Figura 1B.20B**, la adición de la mezcla AuNCs+DAO sobre cadaverina, produce la aparición de la fluorescencia (ΔF_4). Realizando la adición de esta misma mezcla AuNCs+DAO sobre agua, se observa que solo un % de la señal de fluorescencia obtenida es la debida al aumento de la F de AuNCs por el consumo de O_2 en la reacción enzimática (ΔF_5).

En la **Tabla 1B.4** se recogen los valores de las diferentes ΔF (a 650 nm) que pueden ser tomadas como parámetro analítico para la determinación del analito. De donde se observa que tanto ΔF_3 como ΔF_4 , proporcionan valores similares

ΔF_1	ΔF_3	ΔF_4	ΔF_5
5532	14149	13612	1924

Tabla 1B.4: Valores de ΔF a 650 nm extraídos de la Figura 1C.5.

Como se ha dicho anteriormente, la metodología mostrada en la **Figura 1B.20A** parecía la más indicada, debida a la inmovilización previa de AuNCs+DAO en el papel. Sin embargo, la dilución ocasionada tras la adición de la muestra y el consecuente descenso de la F de AuNCs, llevó a la selección del otro método (**Figura 1B.20B**) para realizar la calibración.

1B.4.5.3. Seguimiento de la reacción enzimática DAO-cad a partir de la fluorescencia de $Ru(bpy)_3$ o AuNCs@BSA en papel comercial.

Se llevó a cabo la evaluación de los fluoróforos AuNCs@BSA y $Ru(bpy)_3$ para el seguimiento de la reacción enzimática DAO-cad en papel comercial, a partir de su respuesta fluorescente al consumo de oxígeno. Para cada fluoróforo se recogieron los espectros finales obtenidos tras la reacción enzimática con cada una de las concentraciones de cadaverina evaluadas. La fluorescencia en su máximo se representó frente a la concentración evaluada dando lugar a las gráficas mostradas en la **Figura 1B.21**, que presentan pendientes muy similares indicando sensibilidades próximas.

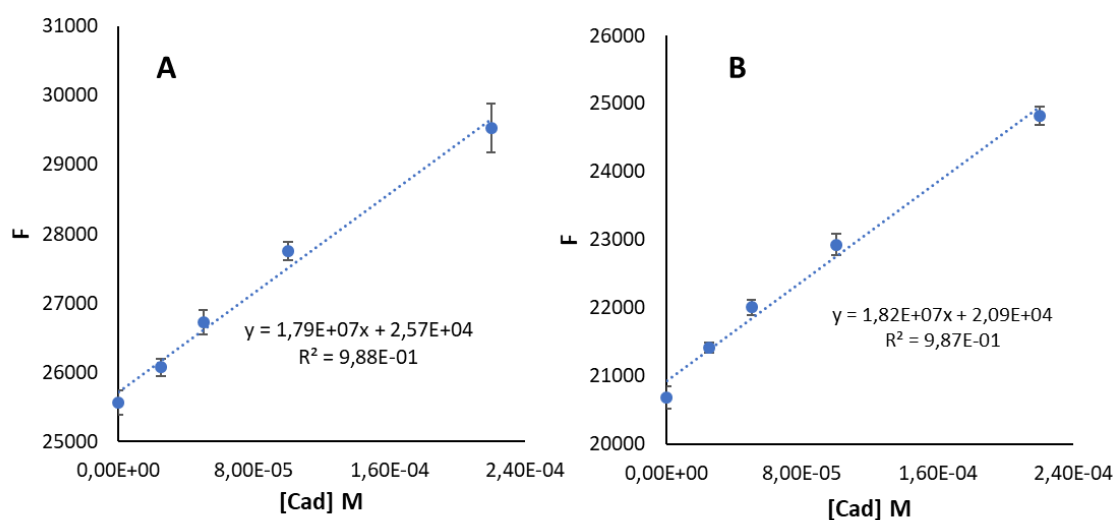


Figura 1B.21: Rectas de calibrado para la detección enzimática de cadaverina en papel comercial utilizando la fluorescencia de **A)** $Ru(bpy)_3$ y **B)** AuNCs@BSA

Sección 1B: Nanoclusters de oro como sondas fluorescentes para la detección de oxígeno en reacciones enzimáticas.

De estas gráficas se puede extraer los límites de detección y cuantificación para cada método que se muestran en la **Tabla 1B.5**:

	LD (M)	LC (M)	DER %
Ru(bpy)₃	$2,91 \cdot 10^{-5}$	$2,91 \cdot 10^{-5}$	0,71
AuNCs@BSA	$2,73 \cdot 10^{-5}$	$9,10 \cdot 10^{-5}$	0,57

Tabla 1B.5: Propiedades analíticas del método para la determinación de cadaverina mediante la reacción enzimática con DAO a partir de la fluorescencia Ru(bpy)₃ y AuNCs@BSA en papel comercial.

Como se muestra en la **Tabla 1B.5**, para el método en papel ambos fluoróforos proporcionan propiedades analíticas similares para la determinación de cadaverina.

1B.4.5.4. Evaluación de fluorescencia de soportes de celulosa con AuNCs y DAO entrampados, para la determinación de cadaverina.

A la vista de los problemas de dilución mostrados en el sistema anterior, en el que los AuNCs fueron inmovilizados por absorción a los papeles comerciales, se llevó a cabo la inmovilización insitu de los AuNCs+DAO entrampados durante la fabricación de soportes de celulosa (**Figura 1B.22**).

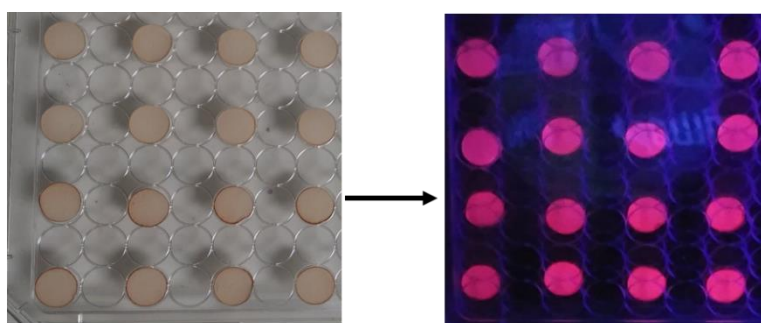


Figura 1B.22: AuNCs y la enzima DAO entrampados en soportes de celulosa caseros sobre placas plásticas y su fluorescencia bajo la exposición a luz UV.

Con este nuevo soporte se pretendió eliminar el efecto de la dilución al añadir la muestra, para ello se evaluó la variación en su fluorescencia al añadir diversas concentraciones de cadaverina. Las placas con los soportes de celulosa mostradas en la **Figura 1B.22** se introdujeron en el lector de placas de fluorescencia y se recogieron sus espectros antes y después de la adición de cadaverina (**Figura 1B.23**). Se observa como la adición de agua supone una disminución en la fluorescencia del soporte celulosa/AuNCs-DAO, lo que indica una leve dilución sobre este dispositivo. La adición de diversas concentraciones de cadaverina supone el aumento de la señal de fluorescencia de AuNCs.

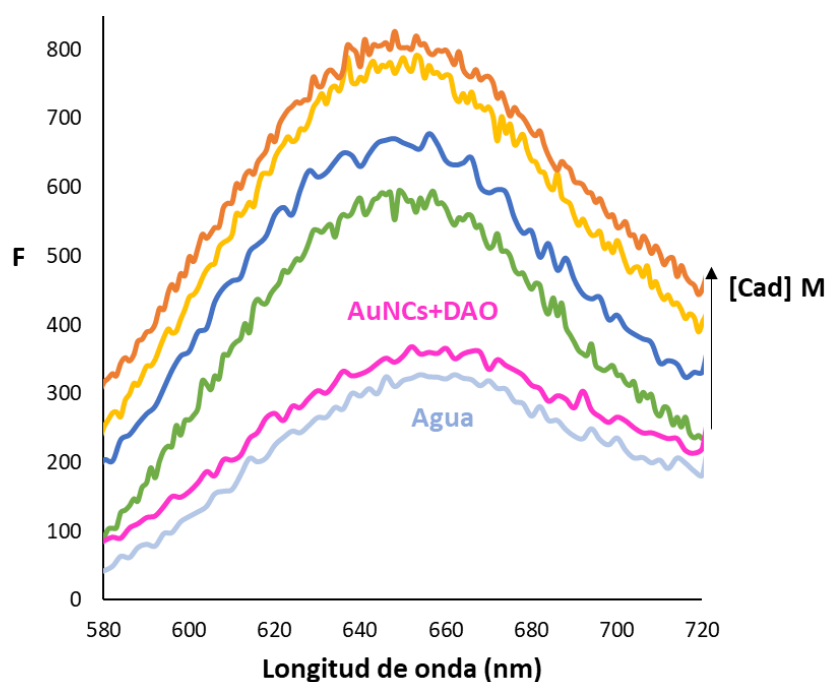


Figura 1B.23: Espectros de emisión ($\lambda_{\text{ext}}=380$ nm) de los soportes de celulosa con AuNCs+DAO atrapados y la adición de agua o diversas concentraciones de cadaverina.

Extrayendo la intensidad de fluorescencia (F) en el máximo de emisión (650 nm) y corrigiéndolo con el valor del blanco de agua (F_0), podemos obtener la calibración para las diversas concentraciones de cadaverina, que se muestra en la **Figura 1B.24**. Se observa saturación de la señal fluorescente para las concentraciones más altas de cadaverina y la gráfica se ajusta a una ecuación de segundo grado.

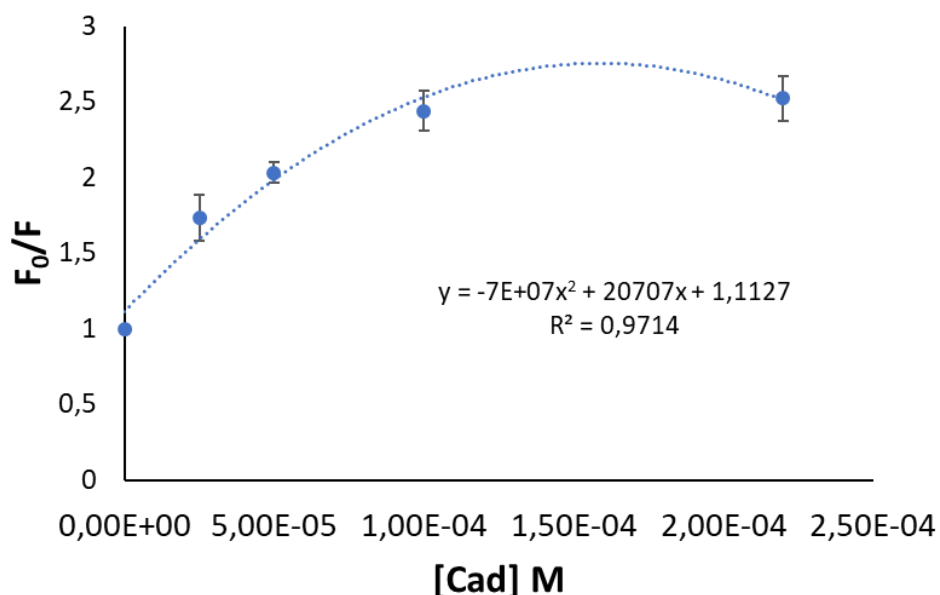


Figura 1B.24: Calibrado para la determinación de cadaverina obtenido con los soportes de celulosa con AuNCs+DAO atrapados.

El método proporciona un límite de detección de $2,17 \cdot 10^{-5}$ M y un límite de cuantificación de $7,25 \cdot 10^{-5}$ M, similar a los obtenidos con el método anterior. Sin embargo, esta metodología

proporciona soportes sensores muchos más robustos y mediante la optimización de su fabricación (% celulosa, concentraciones de DAO y AuNCs, proporciones...) es posible mejorar las características analíticas del método e incluso aplicarlo a la determinación de otras sustancias que implican una reacción enzimática con consumo de O₂.

Estos resultados confirman la posibilidad del uso de AuNCs como sondas fluorescentes para el seguimiento de reacciones enzimáticas que median consumo de oxígeno, como es el caso de las enzimas oxidorreductasas. Además, la implementación de esta metodología en tiras reactivas como sensores desechables, abre horizontes para la aplicación de este método rápido en la determinación in situ de otros analitos de interés bioquímico.

1B.4.6 AuNCs como sondas de O₂ a alta temperatura.

Por último, con el fin de evaluar la posibilidad del uso de estos nanomateriales como sondas de O₂ a altas temperaturas se estudió el efecto de la temperatura en la fluorescencia de ambos tipos de AuNCs inmovilizados en láminas de sílica, en este caso soportada sobre aluminio para soportar las altas temperaturas. La **Figura 1B.25** muestra imágenes del aspecto natural y bajo luz UV-vis, de las láminas con AuNCs@L y AuNCs@BSA inmovilizados, así como un blanco, todas ellas sometidas a las temperaturas indicadas. De este estudio se pudieron extraer diversas conclusiones. Hasta 200 °C la fluorescencia de ambos tipos de AuNCs permaneció, sin embargo, en el caso de de AuNCs@BSA se observó una disminución gradual de su fluorescencia con la temperatura. Este fenómeno es debido probablemente al exceso de proteína que estabiliza estos AuNCs@BSA, lo que dificulta su uso a altas temperaturas, causando el oscurecimiento de la lámina debido al quemado parcial de la materia orgánica en exceso, lo cual dificulta la medición de la fluorescencia. Por otro lado, en el caso de AuNCs@LA la fluorescencia permaneció prácticamente invariable hasta los 200 °C. A partir de esta temperatura ambos tipos de AuNCs dejaron de mostrar fluorescencia y es a partir de 400°C cuando se observó el quemado completo de la materia orgánica, y el consecuente oscurecimiento de las láminas.

Finalmente se observó un curioso fenómeno, a 500 °C las láminas tornaron a un color rosado, indicando la modificación del nanomaterial de partida. El estudio en profundidad de este fenómeno dio lugar a la síntesis y caracterización de un nuevo tipo de AuNPs que se muestra en el **"Anexo Sección 1B: Síntesis y caracterización de AuNPs estabilizadas por óxidos de oro"** y su uso se aplicó en el desarrollo de dispositivos electrónicos moleculares, como se explica también en este Anexo.

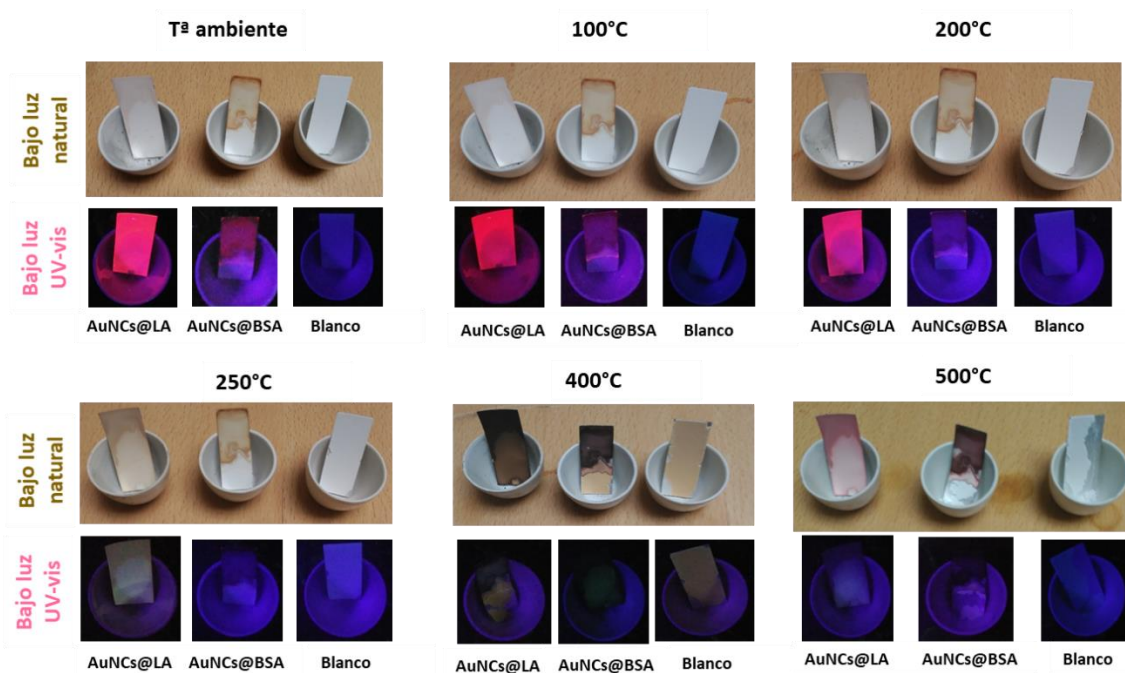


Figura 1B.25: AuNCs inmovilizados en sílica tras someterse a las diferentes temperaturas indicadas y su aspecto bajo la exposición a luz natural y bajo luz UV-vis.

Vistos los resultados anteriores, para esta aplicación se decidió trabajar únicamente con AuNCs@LA. En primer lugar, se estudió de forma detallada el efecto de la temperatura sobre la fluorescencia de AuNCs@LA-sílica utilizando el sistema descrito en la sección experimental (*apartado 1B.3.2.11*). Una vez que se colocó la lámina AuNCs-sílice dentro de la celda óptica del pervaporador, la temperatura de la resistencia se incrementó de 30 °C a 210 °C en intervalos de 10 °C y simultáneamente se registraron los espectros de emisión de la lámina. Después de ello, la temperatura se volvió a 30 °C y se repitió el ciclo de calentamiento una vez más. La **Figura 1B.26** muestra la intensidad de fluorescencia promedio a la longitud de onda máxima de excitación y emisión a cada una de estas temperaturas. Como era de esperar, la intensidad de fluorescencia disminuyó parcialmente con la temperatura, pero solo durante el primer ciclo. Después de enfriar la celda, la intensidad aumentó ligeramente y durante el segundo ciclo se observó que la intensidad de fluorescencia ya no dependía de la temperatura.

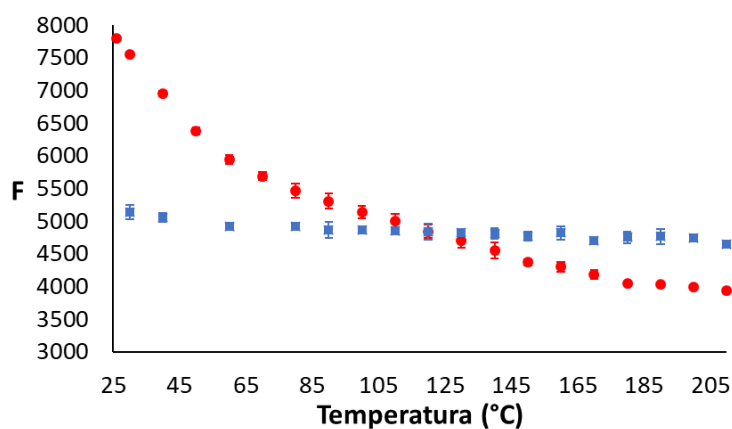


Figura 1B.26: Fluorescencia promedio (n=3) del máximo de emisión de AuNC@LA-sílica a cada temperatura evaluada. En un 'primer ciclo' (círculo rojo) de calentamiento de 26 a 210 °C y en un 'segundo ciclo' (cuadrado azul), también de 26 a 210 °C ($\lambda_{\text{ext}} = 450 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 690 \text{ nm}$).

Este resultado indica que, durante el primer ciclo, la variación de la intensidad de la fluorescencia fue debida no solo al comportamiento esperado sino también a algún tipo de cambio en la estructura de AuNC@LA-sílice. Esto se refleja de alguna manera en los espectros de fluorescencia **Figura 1B.17** que muestra ligeros cambios en intervalo de longitud de onda del máximo. Este resultado demuestra que, tras el primer pretratamiento, la plataforma se puede utilizar como sensor de O₂ a diferentes temperaturas sin afectar la fluorescencia.

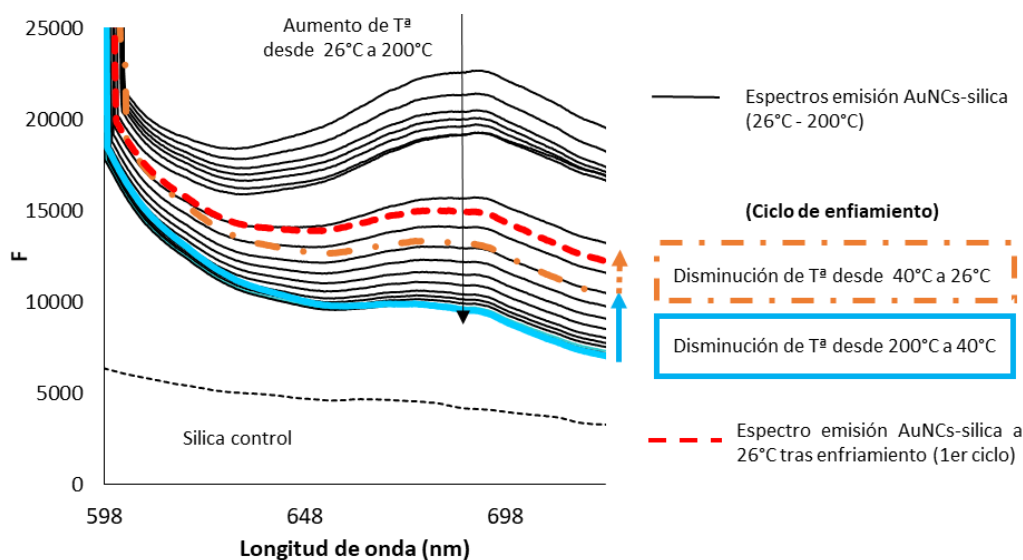


Figura 1B.27: Efecto de la temperatura en el espectro de emisión de AuNCs@LA-sílice ($\lambda_{\text{ext}} = 450$ nm) en el primer ciclo de calentamiento de 26 a 200 ° C y un ciclo de enfriamiento disminuyendo la temperatura a ambiente.

Para estudiar la respuesta de AuNC@LA al O₂ a diferentes temperaturas, después de someter la lámina al pretratamiento térmico (primer ciclo de temperatura), se hicieron pasar a través del pervaporador flujos de aire de diversas concentraciones de oxígeno. De esta forma se llevó a cabo un estudio sistemático a cuatro temperaturas y tres concentraciones de oxígeno en cada temperatura, registrando en cada caso los valores de fluorescencia en la emisión máxima de AuNCs@LA-sílice ($\lambda_{\text{em}} = 690$ nm) y se obtuvo una recta de calibración para cada temperatura que se ajusta a la ecuación de Stern-Volmer (**Figura 1B.28**)

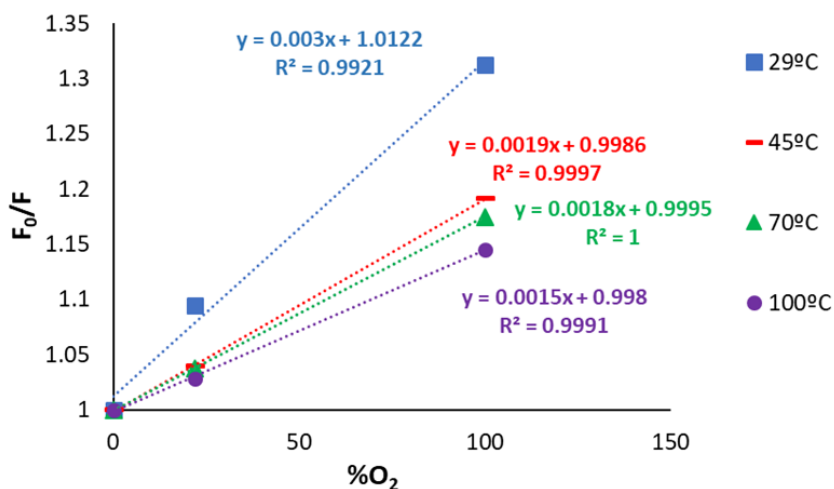


Figura 1B.28: Gráficos Stern-Volmer obtenidos a diferentes temperaturas al estudiar la variación de la fluorescencia ($\lambda_{\text{exc}}=450$ nm, $\lambda_{\text{em}} =690$ nm) de la lámina AuNC@LA-sílice (pretratada térmicamente) en respuesta a diferentes concentraciones de O₂.

Repitiendo este ensayo 3 veces en cada caso, de las pendientes es posible extraer el K_{sv} correspondiente a cada temperatura, que se muestran en la **Figura 1B.29**.

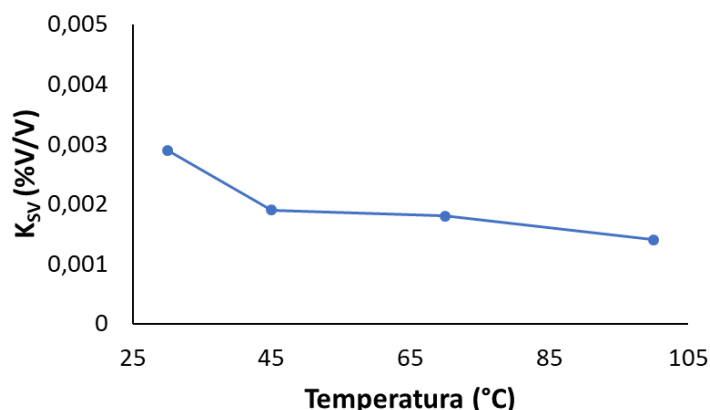
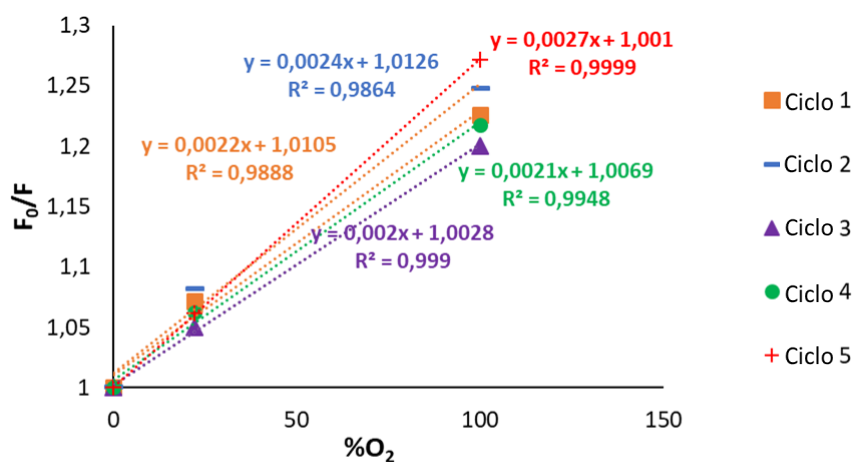


Figura 1B.29: Efecto de la temperatura sobre la constante de Stern-Volmer para AuNC@LA-sílica ($\lambda_{ext}= 450$ nm, $\lambda_{em}= 690$ nm).

Como se puede ver, los valores de K_{sv} fueron similares de 45 a 100 °. Sin embargo, es difícil predecir el efecto de la temperatura sobre K_{sv} . Por un lado, cuanto más alta es la temperatura, mayor es k_0 (el coeficiente de difusión de O_2 aumenta con la temperatura) y por otro lado, se espera que τ disminuya con la temperatura^{99,100} (la constante de desintegración no radiativa aumenta^{101,102}).

Por último, para demostrar la capacidad del sensor para mantener la capacidad de detección y reversibilidad después del calentamiento se obtuvo la K_{sv} a temperatura ambiente (usando tres concentraciones de O_2) y después el pervaporador se calentó a 100 °C, se enfrió a temperatura ambiente y se volvió a medir el K_{sv} . Este ciclo se repitió 5 veces y los resultados se muestran en la **Figura 1B.30**, donde no se observa ninguna deriva y valores similares de K_{sv} (DER = 9,9%, $n = 5$) para todos los ciclos. De los gráficos de calibración se obtuvo el límite de detección del sensor 3% (V/V) O_2 (3σ).



Ciclo	1	2	3	4	5
K_{sv}	0,0022	0,0024	0,0020	0,0021	0,0027

Figura 1B.30: Gráficos repetitivos de Stern-Volmer obtenidos a temperaturas ambiente después de calentar a 100°C con AuNCs@LA-sílica pretratada ($\lambda_{ext}= 450$ nm, $\lambda_{em}= 690$ nm) y valores de K_{sv} obtenidos en cada ciclo.

1B.5. Conclusiones específicas de la sección 1B

En esta sección se han estudiado el **mecanismo de desactivación que produce O₂ en la fluorescencia de AuNCs** y su implementación a diversas aplicaciones, para ello:

1. Se han estudiado sus propiedades de fluorescencia, demostrando que su interacción con O₂ sigue el modelo colisional de Stern-Volmer. Para ello se han estudiado los parámetros fluorimétricos de dos tipos de AuNCs en disolución acuosa y se ha estudiado el efecto del O₂ en la fluorescencia de estos AuNCs en disolución a temperatura ambiente obteniéndose las constantes de extinción (K_{sv}).
 - AuNCs@BSA mostraron tiempos de vida de 153 ± 15 ns, un rendimiento cuántico (Φ) de 0.089 y una K_{sv} promedio de 3576 M^{-1} (DER = 9.8%, n = 3).
 - AuNCs@LA mostraron tiempos de vida de 123 ± 9 ns, un rendimiento cuántico (Φ) de 0.018 y una K_{sv} promedio de 4479 M^{-1} (DER = 10.0%, n = 3).

De esta manera se ha observado AuNC@BSA son más eficientes que AuNC@LA, sin embargo, experimentan cierto fotoblanqueamiento.

2. Se ha llevado a cabo la inmovilización de ambos tipos de AuNCs en soportes de sílica y se ha evaluado su respuesta al O₂ en fase gaseosa utilizando un sensor comercial modificado. El K_{sv} obtenido para AuNCs@LA fue 0,0059 (DER = 4,9% n = 3) y 0,0031 (DER = 3,3% n=3) para AuNCs@BSA. Se ha comprobado, además, la reversibilidad del proceso de desactivación de O₂ sobre la fluorescencia de AuNCs-silica, así como la posibilidad de uso de este sensor durante al menos 6 meses dando resultados robustos y reproducibles.

En vista de los resultados obtenidos, se ha estudiado el **acoplamiento de AuNCs@BSA como sensores de oxígeno en reacciones enzimáticas** y su aplicación a la determinación de aminas biógenas, para ello:

3. Se ha estudiado la reacción de enzima diamino oxidasa (DAO) con su sustrato cadaverina (cad) y su seguimiento a través de la fluorescencia de AuNCs y se ha comparado con el uso sales de rutenio utilizadas típicamente para estas determinaciones. Comprobado que a pesar de que en disolución el complejo de rutenio Ru(bpy)₃ muestra una K_{sv} mayor que AuNCs, la utilización de estos nanomateriales permite la cuantificación de cadaverina en todo el rango de concentración, al contrario que el Ru que sufre saturación en la señal de su fluorescencia a concentraciones de cadaverina mayores de $1,0 \cdot 10^{-5}$ M.
4. Además, en busca del desarrollo de un método rápido e *in situ*, se ha evaluado la fluorescencia de ambos fluoróforos absorbidos en diversos papeles comerciales. Aquellos papeles compuestos por microfibras de celulosa han proporcionado mejores resultados. El efecto de la adición de los reactivos DAO y cadaverina sobre la fluorescencia de AuNCs se ha evaluado, proponiéndose dos opciones en el orden de adición;
 - a. La adición de cadaverina sobre los AuNCs/DAO previamente absorbidos provoca la disminución de su fluorescencia por efecto de la dilución.
 - b. La adición de los reactivos en el orden inverso (en primer lugar, la muestra y luego la mezcla AuNCs/DAO) ha permitido la evaluación del método, obteniéndose un LD de

$2,73 \cdot 10^{-5}$ M y LC de $2,91 \cdot 10^{-5}$ M para la determinación de cadaverina. El mismo método utilizando $\text{Ru}(\text{bpy})_3$ proporciona resultados similares.

5. En busca de evitar el efecto de la dilución en la adición de reactivos, se han fabricado soportes de celulosa 'caseros' atrapando insitu durante la fabricación la mezcla AuNCs+DAO. La evaluación de su fluorescencia tras la adición de cadaverina ha confirmado la disminución de los efectos de la dilución permitiendo un LD $2,17 \cdot 10^{-5}$ M y un LC de $7,25 \cdot 10^{-5}$ M de cadaverina.

Estos resultados han confirmado la posibilidad del uso de AuNCs como sondas de oxígeno, relacionando el aumento de la fluorescencia de la tira reactiva AuNCs-DAO, con el consumo de O_2 en la reacción enzimática, proporcional a la concentración de cadaverina. Esta metodología permite la cuantificación de esta amina biógena en el rango de interés y muestra sus posibilidades para la aplicación a otras reacciones enzimáticas con consumo de O_2 .

Por último, en esta sección se ha estudiado el uso de **AuNCs como sondas de O_2 a alta temperatura**, para ello:

6. Se ha estudiado el efecto de la temperatura en la fluorescencia de AuNCs inmovilizados hasta 500°C , observándose para ambos tipos la permanencia de la fluorescencia hasta 200°C . Sin embargo, AuNCs@BSA han mostrado una menor estabilidad a altas temperaturas debido al exceso de BSA derivado de su síntesis.
7. Se ha evaluado la respuesta al O_2 a altas temperaturas de AuNCs@LA inmovilizados en el rango de 30 a 100°C . La aplicación de un pretratamiento térmico previo de la lámina AuNCs-sílica ha permitido la detección de O_2 con un límite de detección de 3% (V/V) confirmando además el ajuste al modelo de Stern-Volmer con una K_{sv} a T^a ambiente promedio de $0,00228$ ($\text{DER} = 9,9\%$, $n = 5$). Se ha demostrado además que el sensor mantiene la capacidad de detección y reversibilidad después del calentamiento continuado.

Este nuevo tipo de sensor basado en fluorescencia AuNCs se presenta como una alternativa interesante para la monitorización no invasiva de O_2 en ambientes térmicamente agresivos. Considerando que el mecanismo de extinción de la fluorescencia es colisional, las interferencias en la fase gaseosa provendrán de las mismas sustancias que en el caso de otros sensores de O_2 basados en fluorescencia, es decir, especies paramagnéticas como el óxido de nitroso (NO). Trabajando en fase líquida, las interferencias provendrán de compuestos capaces de reaccionar con AuNCs, especialmente tioles, por lo que se debe tener precaución con muestras que contienen este tipo de componentes.

Anexo Sección 1B:

Síntesis y caracterización de AuNPs
estabilizadas por óxidos de oro

A la vista de lo observado en la sección B (**Figura 1B.15**), donde los AuNCs inmovilizados en sílica mostraron un curioso color rosado tras exponerse a 500 °C, se decidió estudiar en profundidad el fenómeno y caracterizar este nuevo tipo de AuNPs en disolución.

A.1B.1. Síntesis térmica en disolución

En primer lugar, se sintetizaron los AuNCs estabilizados con ácido lipoico según el procedimiento descrito. Para preparar las nuevas nanopartículas, se colocaron 150 ml de la disolución stock de AuNCs (2.265 mgL^{-1}) en un recipiente Pyrex y se calentaron a diferentes temperaturas entre 100 y 700°C durante 1 hora. Pasado este tiempo, el recipiente se dejó enfriar a temperatura ambiente y el residuo sólido se resuspendió en agua Milli-pore Mili-Q (50 mL), la mezcla se sonicó durante 15 min y se dejó reposar durante 2 horas para retirar por decantación separó de la ceniza insoluble. El aspecto de las diferentes síntesis se muestra en la **Figura A.1B.1**.



Figura A.1B.1: Aspecto de las AuNPs sintetizadas térmicamente de izda a derecha a 300, 500, 600 y 700 °C.

A.1B.2. Caracterización de las propiedades ópticas

Se agregaron dos mililitros de cada solución obtenida después del tratamiento térmico a cada temperatura, a una celda de cuarzo y se obtuvo el espectro de absorbancia. (**Figura A.1B.2**)

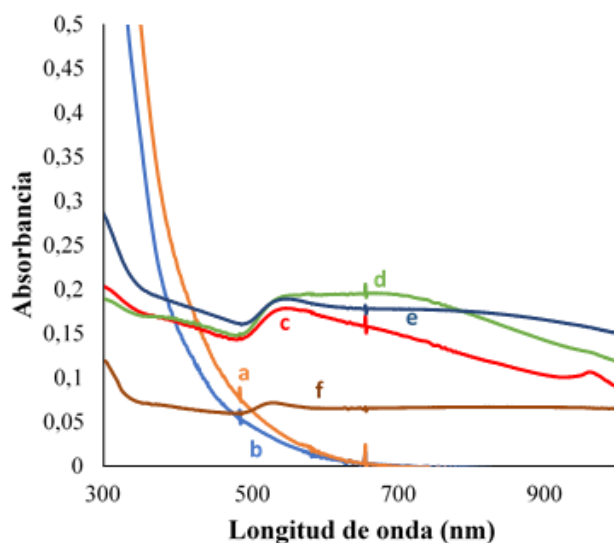


Figura A.1B.2: Espectros UV-vis de la formación de AuNCs@LA sometidos diversas temperaturas: a) 100 °C b) 200 °C c) 300 °C d) 500 °C e) 600 °C f) 700°C

Se observa que los espectros obtenidos a 100 y 200 °C solo muestran el máximo de absorción típico de los aminoácidos alrededor de los 300 nm. Este máximo comienza a desaparecer cuando la temperatura sube a 300 °C, esta disminución indica la desaparición parcial de la parte orgánica de AuNCs originales y coincide con la aparición de un pico de plasmón a 530 nm y la solución adquiere un tono marron/rosado. A partir de 500 °C la materia orgánica desaparece por completo, la disolución adquiere un tono rosado más intenso y se comienza a formar otro plasmón alrededor de 690 nm, lo que indica otra población de mayor tamaño probablemente formada por agregación. A 600 °C este plasmón de 690 nm cambia a 830 nm, lo que indica nuevamente un aumento adicional en el tamaño de AuNPs. Finalmente, la señal de absorción disminuye fuertemente a 700 °C, debida a la precipitación de las nanopartículas agregadas.

Por otro lado, se caracterizó la fluorescencia de estos AuNCs tratados térmicamente, para ello, se realizaron espectros de fluorescencia 3D con el espectrómetro Cary Eclipse, utilizando las siguientes condiciones instrumentales: rendijas de excitación y fluorescencia de 10 nm, $\lambda_{ext} = 230-600$ nm y $\lambda_{em} = 250-850$ nm.

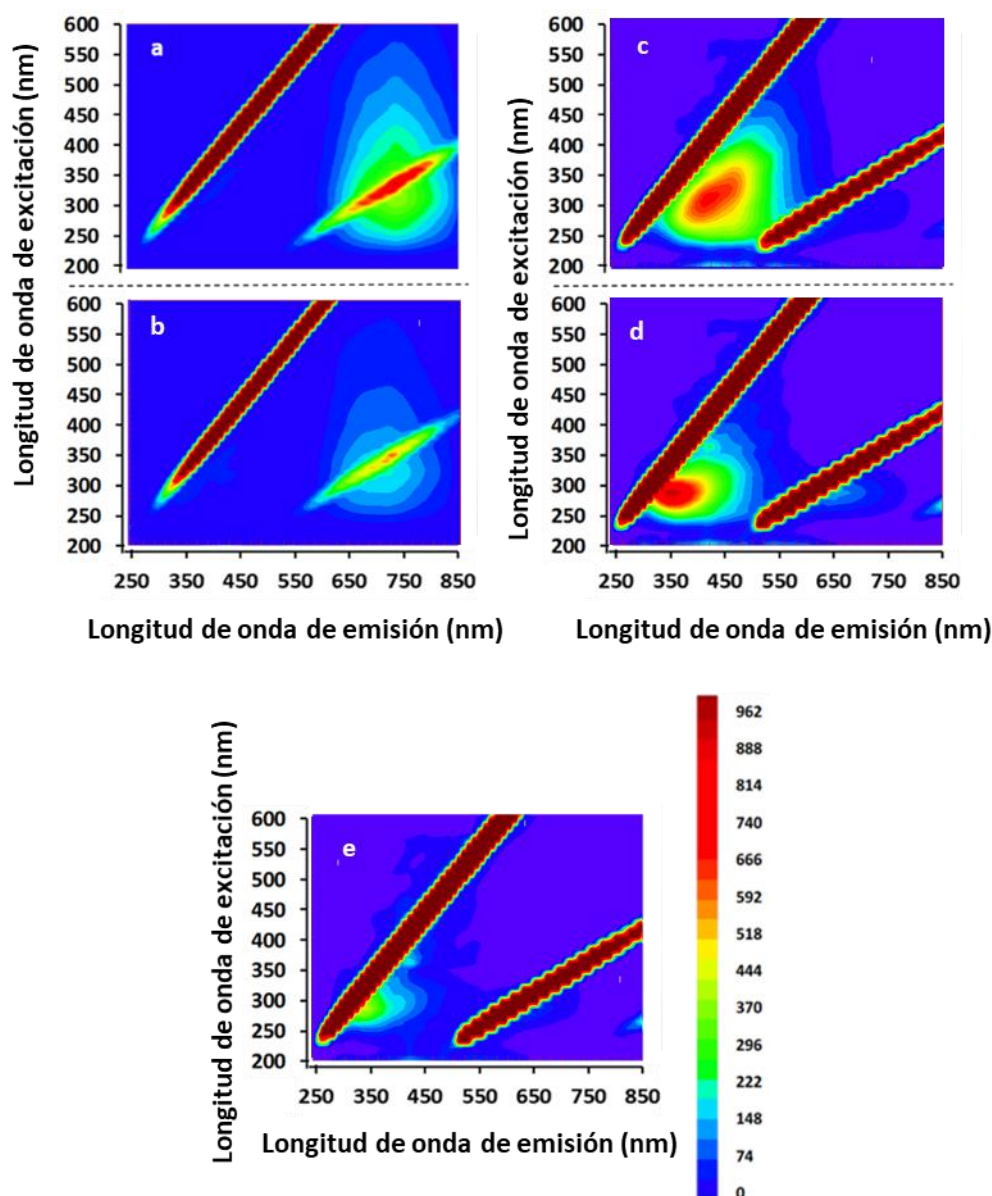


Figura A.1B.3: Espectros de fluorescencia 3D de AuNCs@LA sometidos diversas temperaturas: a) 100 °C b) 200 °C c) 300 °C d) 500 °C e) 700 °C

La **Figura A.1B.3** muestra que a 100 y 200°C, los AuNCs exhiben su fluorescencia típica a fluorescencia a 700 nm ($\lambda_{\text{ext}} = 300\text{-}500$ nm), algo menor a 200°C como ya se estudió en la sección B. Esta fluorescencia característica desaparece a 300°C y se observa un nuevo máximo de emisión grande alrededor de 450 nm con excitación alrededor de 350 nm. La aparición de esta nueva fluorescencia coincide con la formación del plasmón a 540 nm, que atribuye a las nuevas AuNPs formadas que poseen plasmón a 530 nm. Esta fluorescencia permanece a 500°C, con cierta pérdida de intensidad, asociada a la agregación de estas AuNPs. A temperaturas superiores a 700°C, esta fluorescencia disminuye fuertemente su intensidad. La imagen de estas disoluciones fluorescentes bajo la exposición a luz UV-vis se muestra en la **Figura A.1B.4**



Figura A.1B.4: Aspecto bajo la exposición a luz UV-vis de las AuNPs sintetizadas térmicamente de izda a derecha a 100, 200, 300 y 500 °C.

A.1B.3. Caracterización de otras propiedades físicas

Se utilizó un microscopio Tecnai F30 en modo STEM, para caracterizar la forma y el tamaño de las AuNPs a 500°C (**Figura A.1B.5A**), cuando toda la materia orgánica se ha quemado. La **Figura A.1B.5B** muestra el histograma de la distribución de tamaños de estas AuNPs, donde se observan dos claras poblaciones una de nanopartículas más pequeñas $3,95 \pm 1,08$ nm y otra de nanopartículas más grandes $13,66 \pm 3,37$ nm, aunque también se observan AuNPs esporádicas de tamaños mayores.

El diámetro hidrodinámico de estas AuNPs se determinó usando un analizador de tamaño de partículas (Plus Particle Size-Analyzer, Brookhaven Instruments Corporation) basado en la fluctuación dependiente del tiempo de la dispersión dinámica de luz (DLS) de un láser por las nanopartículas (**Figura A.1B.5C**) mostrando un diámetro hidrodinámico principal de 12,5 nm coincidente con la población más abundante observada por STEM y otras dos poblaciones menos abundantes alrededor de 15,5 y 19,5 nm atribuidas a las nanopartículas minoritarias que han crecido con la temperatura y presentan la absorción alrededor de 690 nm. La coincidencia entre los tamaños obtenidos por STEM y los proporcionados por DLS (que siempre suelen ser mayores a los obtenidos por microscopía) indican que estas AuNPs están estabilizadas por un fino recubrimiento que apenas afecta al diámetro hidrodinámico.

Se determinó también el potencial zeta de una suspensión de $0,01 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de la muestra de AuNPs en KCl 1 mM a 25 °C con un analizador de potencial zeta utilizando Software Zeta Plus. La medición del potencial zeta se basa en la dirección y velocidad de las partículas bajo la influencia de un campo eléctrico conocido. El valor promedio obtenido fue de $-43,82 \pm 0,63$ mV, un potencial muy negativo que evidenció la posibilidad de que estas AuNPs estuvieran

recubiertas y estabilizadas por iones de óxido negativo que conducen a un potencial zeta negativo.

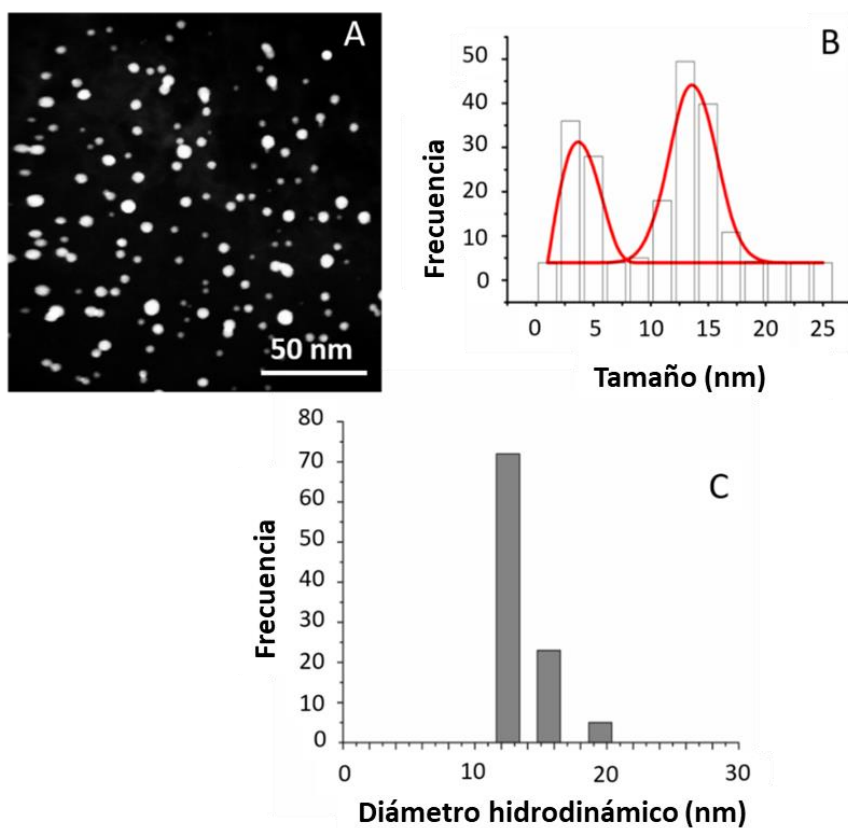


Figura A.1B.5: A) Imágenes STEM de AuNPs formadas a partir de AuNCs@LP a 500 °C. B) distribución de tamaño de estas AuNPs. C) Diámetro hidrodinámico de AuNPs obtenidos por dispersión dinámica de luz.

Por último, por ICP-AES la concentración de oro del stock de estas AuNPs obtenidas a 500 °C fue determinada, obteniéndose $2,265 \text{ mg Au}\cdot\text{L}^{-1}$.

A.1B.4. Caracterización por espectrometría XPS

Se trata de un método de espectrometría fotoelectrónica que implica la medición de los espectros de los fotoelectrones inducidos por fotones de rayos X, esta metodología cuantitativa y de baja resolución espacial se utiliza habitualmente para estimar la estequiometría, el estado químico y la estructura electrónica de los elementos que existen en un material en estado sólido.

Por ello, este estudio se realizó con las AuNPs inmovilizadas en sílice. En primer lugar, se realizó el estudio de absorción de estas con una esfera integradora, los resultados se muestran en la **Figura A.1B.6**, así como las imágenes de las láminas de sílice resultantes obtenidas a cada temperatura. Se puede observar que en este caso al obtenerlos AuNPs insitu sobre sílice, al tener que agregar más concentración de AuNCs que en solución (tres inmersiones de la lámina de sílice en la solución de AuNC@LA original) a 300°C todavía no hemos eliminado toda la materia orgánica, y el aspecto marrón de la lámina nos impide ver el plasmón de las AuNP que ya han

comenzado a formarse. Por otro lado, en las muestras de 500°C y 600°C se observa el mismo plasmón observado en disolución en torno a 530 nm, algo más intenso y ensanchado para los obtenidos a 600°C, debido a una mayor polidispersidad y agregación de los NP por efecto de la temperatura.

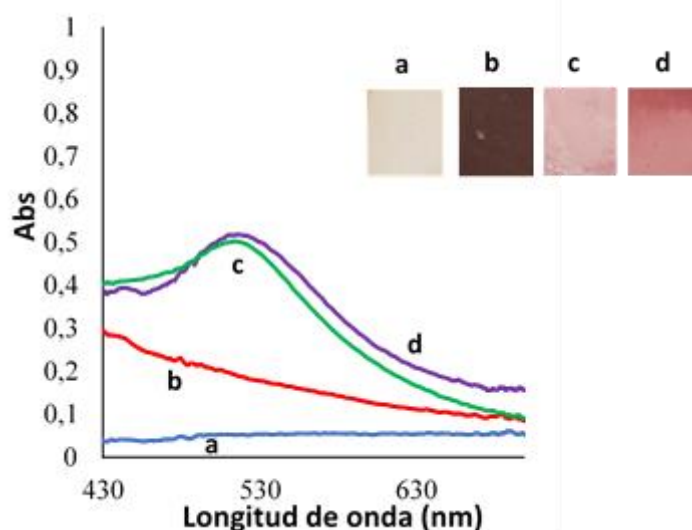


Figura A.1B.6: Espectros UV-vis de AuNCs@LA originales inmovilizadas en sílica (a) y su apariencia tras el tratamiento a diversas temperaturas: b) 300 °C c) 500 °C d) 600 °C

Como se ha dicho estas láminas se estudiaron mediante XPS (**Figura A.1B.7**). Para el análisis de estos resultados debemos tener en cuenta dos factores que provoca el tratamiento térmico: el aumento del tamaño de las AuNPs y la modificación de su superficie que sucede al pirrolizar la materia orgánica de su superficie que actúa como agente estabilizante.

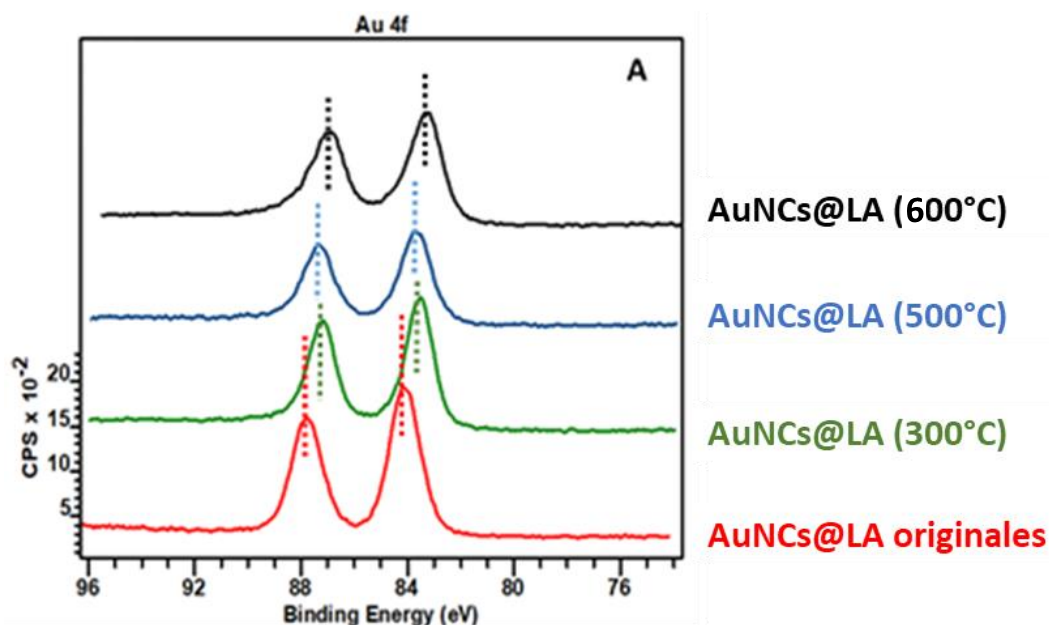


Figura A.1B.7: Espectros Au4f XPS de AuNPs@LA inmovilizados en sílice a cada temperatura de tratamiento.

Por un lado, el efecto de tamaño está relacionado con la carga d del átomo de Au, así un aumento en el tamaño de AuNPs implica una redistribución de carga que conduce a menores energías de enlace. Por otro lado, el agente estabilizante también afecta a la distribución de la carga. Los AuNCs originales, cubiertos el ácido lipoico, poseen un fuerte enlace covalente tiol-oro en la superficie que implica la transferencia de carga de AuNP al tiol. Sin embargo, las AuNP sin recubrimiento orgánico reducen su energía de enlace superficial mediante la rehibridación de los átomos de Au de la superficie y el núcleo, lo que mejora la interacción d-d.¹⁰³

Como se muestra en la **Figura A.1B.7**, los espectros de Au4f se desplazan a energías de enlace menores a medida que aumenta el tratamiento térmico de AuNCs@LA originales, lo que puede deberse a un efecto combinado de tamaño y superficie. La exposición de estos AuNCs a altas temperaturas conlleva al crecimiento de estos y a la modificación de su superficie. Así, el espectro de AuNCs original Au 4f [4f_{5/2}, 4f_{7/2}] tiene las energías de enlace (eV) de [87,77, 84,00]. Con respecto a estos, los AuNCs tratados a temperaturas de 300-500 °C tienen un desplazamiento a menores energías de 0,495-0,475 eV. El tratamiento a 600 °C presenta un desplazamiento de 0,790-0,760 eV.

En bibliografía se ha podido establecer que el estado de oxidación del oro en XPS muestra respuestas bien separadas entre sus óxidos y el oro metálico en la región de energía de unión de Au 4f.¹⁰⁴ Sin embargo, los espectros Au4f XPS de estas muestras, no mostraron energías de unión asociadas con óxidos de oro. Esto se debió a que la composición de la muestra al estar inmovilizada en sílice es mayoritariamente Silicio. Para evitar esta posible interferencia, la inmovilización se realizó en ausencia de sílice, mediante el secado directo de la muestra en una lámina de aluminio, de tal forma que se obtiene un sólido grueso sobre el aluminio, donde la composición mayoritaria es Au. (**Figura A.1B.8**)

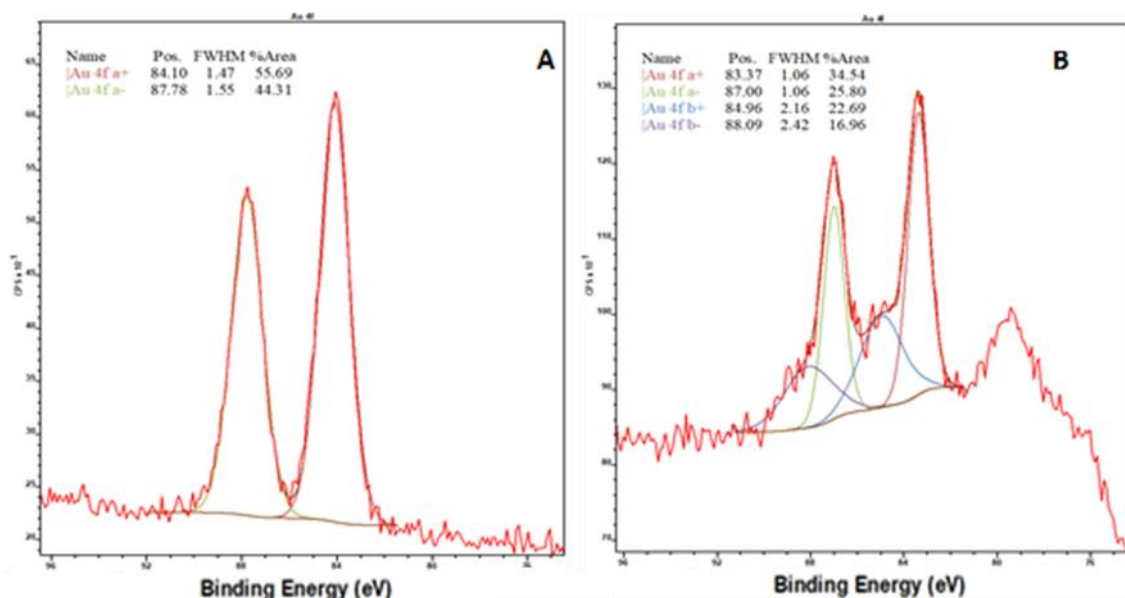


Figura A.1B.8: Espectros Au4f XPS y ajuste de AuNCs@LA originales (**A**) y AuNPs obtenidas por tratamiento térmico a 600 °C (**B**), ambos inmovilizados en lámina de aluminio.

En diferentes trabajos se ha observado e interpretado la separación espectroscópica de la respuesta del oro metálico debido a los menores óxidos AuO y o Au₂O.¹⁰⁴ En la **Figura A.1B.8B**, se observan dos hombros próximos al máximo Au4f [4f_{5/2}, 4f_{7/2}] correspondiente al metal oro y que no aparecen en la **Figura A.1B.8A** de los AuNCs@LA originales. La separación espectroscópica de estos nuevos máximos respecto al oro metal es de 1,09 y 1,59 eV

respectivamente para Au4f [4f_{5/2}, 4f_{7/2}] y se ajustan a energías de enlace asociadas a los óxidos de oro AuO/Au₂O. Asimismo, en estas muestras, como en las inmovilizadas en sílica, debido al tratamiento térmico, se observó el efecto sumatorio de tamaño y superficie, que produce el desplazamiento del espectro Au 4f del oro metálico. En este caso, el desplazamiento a menores energías de enlace energía de AuNPs a 600 °C con respecto a las AuNCs originales, es de 0,78-0,73 eV, similar al observado en la **Figura A.1B.7** para las AuNPs a 600 °C.

A.1B.5. Aplicaciones a dispositivos electrónicos moleculares.

Estos resultados llevaron a la conclusión de que las AuNPs obtenidas estaban estabilizadas por óxidos de oro (AuONPs) debido a la desaparición por tratamiento térmico de la materia orgánica estabilizante. Además de las interesantes propiedades fluorescentes de estas AuONPs y su resistencia térmica, estas tienen especial interés en su aplicación a la fabricación de dispositivos electrónicos moleculares.

En los últimos años, se han explorado una gran variedad de enfoques diferentes para la deposición de una monocapa sobre un electrodo de contacto superior, que incluyen: técnicas de evaporación (evaporación directa e indirecta)¹⁰⁵; metales líquidos¹⁰⁶; litografía de impresión de nanotransferencia¹⁰⁷; electrodeposición¹⁰⁸; deposición mediada por difusión superficial¹⁰⁹; la quimisorción de nanopartículas metálicas¹¹⁰; y la descomposición térmica inducida de un compuesto organometálico¹¹¹. Sin embargo, aunque cada uno de estos métodos tiene una ventaja particular y se han utilizado con cierto grado de éxito, la traslación de estos métodos del laboratorio a una escala de producción produce problemas como la penetración de átomos metálicos de alta energía a través de la monocapa durante el proceso de deposición. Esto da como resultado cortocircuitos y/o daño de las moléculas orgánicas funcionales en la monocapa, así como la baja cobertura superficial de la monocapa por el electrodo de contacto superior.

Aunque no está exento de problemas o competencia, el oro sigue siendo el material de electrodo más utilizado en la electrónica molecular. El uso de oro como electrodo inferior en el campo de la electrónica molecular ha sido persistente debido a la confluencia de varias propiedades, incluido su carácter noble, fácil fabricación en películas de alta calidad con terrazas atómicamente planas de gran superficie, alta conductividad y buena estabilidad ambiental.

El oro también tiene la capacidad de apoyar la formación de monocapas de excelente calidad con los contactos relativamente fuertes de la molécula de oro con grupos funcionales como tiol, amina, carboxilato y piridina. Además de su función como electrodo inferior, el oro también ha atraído mucha atención como material para la formación del electrodo de contacto superior en formas de películas delgadas metálicas continuas de nanopartículas de oro y/o nanoclusters.

Además, algunos AuNMs exhiben interesantes propiedades redox que los hacen aptos para dispositivos electrónicos híbridos¹¹², baja toxicidad, excelente biocompatibilidad (lo que también atrae su interés en una futura electrónica biocompatible¹¹³) y propiedades espectroscópicas, que se reflejan en sus amplias aplicaciones para imágenes y detección.¹¹⁴ Estas propiedades y por tanto sus aplicaciones, depende en gran medida de la capa externa que rodea al nanomaterial.

Así, los AuNPs sin recubrimiento orgánico, como los AuONPs estabilizadas con óxidos de oro sintetizadas y caracterizadas en esta sección, al tener todos los átomos de superficie disponibles,

presentan propiedades eléctricas y espectroscópicas incluso mejores que las partículas análogas cubiertas con ligandos^{115,116}. Este hecho hizo que estas AuONPs se propusieran como posibles materiales para la formación del electrodo de contacto superior en dispositivos electrónicos moleculares.

Así en colaboración con el grupo de investigación de la Dra. Pilar Cea de la Universidad de Zaragoza, se probó la fabricación de dispositivos electrónicos moleculares mediante dos pasos secuenciales de autoensamblaje. Inicialmente, un autoensamblaje del derivado de bis (feniletinil) benceno funcionalizado con amina 4,4'-(1,4-fenilen-di-2,1-etinodiil) bis (benzamina) (**1**) en oro sobre vidrio. Posteriormente se examinó la funcionalidad de la amina expuesta para anclar las nanopartículas de óxido de oro sintetizadas (AuONP), depositadas en un segundo paso de autoensamblaje. (**Figura A.1B.9**)

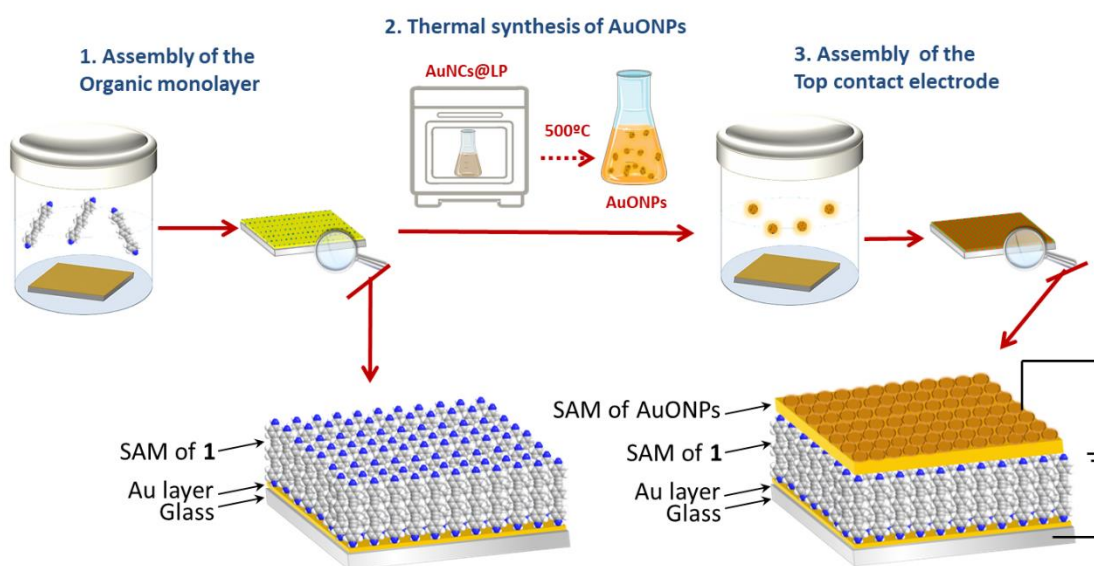


Figura A.1B.9: Esquema del proceso de autoensamblaje llevado a cabo para la fabricación de dispositivos electrónicos moleculares. Imagen extraída del artículo pendiente de publicación.

Estos estudios dieron como resultado una cobertura total de la monocapa orgánica por las nanopartículas de óxido de oro densamente empaquetadas, según lo observado por microscopía de fuerza atómica (AFM). Las propiedades eléctricas de estos dispositivos electrónicos moleculares se determinaron a partir de las curvas I-V registradas con un AFM conductivo utilizando el modo Peak Force Tunneling AFM (PF-TUNA™), estas junto con experimentos electroquímicos descartaron la formación de cortocircuitos debido a la penetración de las nanopartículas de óxido de oro a través de las monocapas.

Estos resultados abren un interesante horizonte para la fabricación de dispositivos electrónicos moleculares utilizando metodologías simples basadas en este tipo de AuNMs y se han recogido en el artículo (pendiente de publicación): *'Towards the use of uncapped gold oxide nanoparticles for the metallization of organic monolayers in molecular electronics large area devices'* (Alba Martín-Barreiro[‡], Rogelio Soto[‡], Stefano Chiodini[‡], Aitor García-Serrano[‡], Santiago Martín, Lucía Herrero, Francesc Pérez-Murano, Paul J. Low, José Luis Serrano, Susana de Marcos, Javier Galban, and Pilar Cea).

[‡] Autores con igual contribución.

1.4. Conclusiones y análisis crítico del capítulo 1. Perspectivas de futuro.

En los últimos años, el interés creciente por el uso de AuNCs ha llevado al desarrollo de algunos métodos enzimáticos ópticos basados en la fluorescencia de estos nanomateriales, sin embargo, los AuNCs no estaban unidos previamente a la enzima, impidiendo cualquier proceso de transferencia de energía FRET. Además, los sensores encontrados en bibliografía basados en oxidorreductasas, muestran en la mayoría de los casos, cambios en la señal de fluorescencia durante la reacción enzimática, que fundamentalmente se explican por la desactivación mediada por H_2O_2 a través de distintos mecanismos de oxidación del nanomaterial, que implican la degradación del AuNC.

En esta línea, este capítulo ha sido capaz de resaltar las ventajas y nuevas posibilidades del uso de AuNCs como transductores ópticos en el desarrollo de biosensores enzimáticos. Mediante el diseño de nuevos esquemas de detección y el estudio en profundidad del mecanismo de desactivación de su fluorescencia por el O_2 , se han aportado nuevas claves para su uso como etiquetas fluorescentes en reacciones enzimáticas.

En la **sección A**, se ha desarrollado un biosensor para la detección de acetilcolina, mediante la unión covalente entre AuNCs y la enzima. El estudio de esta estrategia ha mostrado que este enlace protege el nanomaterial contra la oxidación potencial por H_2O_2 , lo que ha permitido observar la desactivación de la fluorescencia mediada por O_2 , mecanismo estudiado con detalle en la **sección B**. Se ha demostrado, además, que los AuNCs producen buenos rendimientos analíticos cuando se utilizan en un método enzimático basado en las propiedades de fluorescencia inducida de las enzimas.

La fluorescencia de AuNCs se ha utilizado como señal analítica en este tipo de reacciones, tanto considerando el efecto del O_2 , como el FRET producido con el FAD de la enzima. Además, se ha observado como el enlace covalente con AuNCs es capaz de modificar la estructura de la enzima, dando lugar a una mejora de la fluorescencia intrínseca de FAD que es de interés para las enzimas que poseen este cofactor.

Respecto a las perspectivas futuras de los diversos biosensores desarrollados, algunos de los objetivos finales se centran en la inmovilización de estos sistemas o en la implementación de estos mecanismos de transducción a otras reacciones enzimáticas.

Sección 1A: Nanobiosensor enzimático basado en la fluorescencia de nanocluster de oro para la determinación de acetilcolina

Una de los aspectos críticos de este sensor es que se trata de un método en disolución, lo que dificulta su aplicación in situ. Así, una de las nuevas líneas de investigación planteadas para continuar este trabajo, se centra en la implementación de esta metodología en un soporte estable, que permita medir el analito de interés in situ.

En la misma línea, los dispositivos implantables se han convertido en una clase emergente de biosensores que podría cambiar el rumbo del diagnóstico de enfermedades, alertando anticipadamente sobre el desarrollo de problemas de salud de una persona. Por lo que, la elección de un material biocompatible para la inmovilización del bioconjugado enzima-AuNCs, podría plantear también, el diseño de un nanobiosensor implantable, que permitiría la medida del analito in-vivo. Así, la determinación de acetilcolina en sangre in situ o in vivo, significaría

una mejora en el estudio y predicción de trastornos nerviosos en los que este neurotransmisor está involucrado.

Otro de los factores clave en el desarrollo de estos dispositivos es que los materiales usados para la inmovilización, garanticen la integridad de la enzima. En el grupo de investigación en el que se ha desarrollado esta tesis doctoral se tiene una amplia experiencia en la utilización de hidrogeles de poli(acrilamida) (PAA), especialmente atractivos puesto que además de cumplir los requisitos necesarios para la implantación, permiten la inmovilización de enzimas. Así, la base de polímero de hidrogel asegura la estabilidad, mientras que el componente acuoso se encuentra en equilibrio dinámico con los tejidos que le rodea.

Esta metodología se presenta como una opción viable, ya que los resultados obtenidos en esta tesis han demostrado la posibilidad de reutilización de la misma alícuota de AuNCs@ChOx para varias determinaciones y por tanto la reversibilidad del sistema, necesaria para el diseño de sistemas de seguimiento in vivo.

Para el futuro desarrollo del nanobiosensor implantable, se tomarán como base los estudios previos realizados en el grupo¹¹⁷ en los que se ha conseguido llevar a cabo la inmovilización de las enzimas ChOx y AChE (necesarias para la determinación de ACh) de forma conjunta en una lámina de acrilamida-bisacrilamida (**Figura 1.16A**). Esta lámina ha sido implementada en una celda de flujo continuo (**Figura 1.16B**) que hace de soporte y que es posible acoplar a un espectrofotómetro y a una bomba peristáltica. De esta manera, es posible hacer circular disolución amortiguadora de forma continua dentro de la celda, en la cual se inyecta puntualmente el analito. Con este sistema, se ha realizado el seguimiento de la fluorescencia del FAD de la enzima ChOx atrapada en la lámina. La **Figura 1.16C** muestra la variación de la fluorescencia (530 nm) frente al tiempo, que se observó excitando a 430 nm para una concentración de ACh de $4 \cdot 10^{-4}$ M. Estos resultados confirman las posibilidades de esta metodología para el desarrollo de un nanobiosensor que permita la detección in situ o incluso in vivo de acetilcolina, comprobándose que la ChOx queda inmovilizada en la lámina de PAA y sigue manteniendo su actividad.

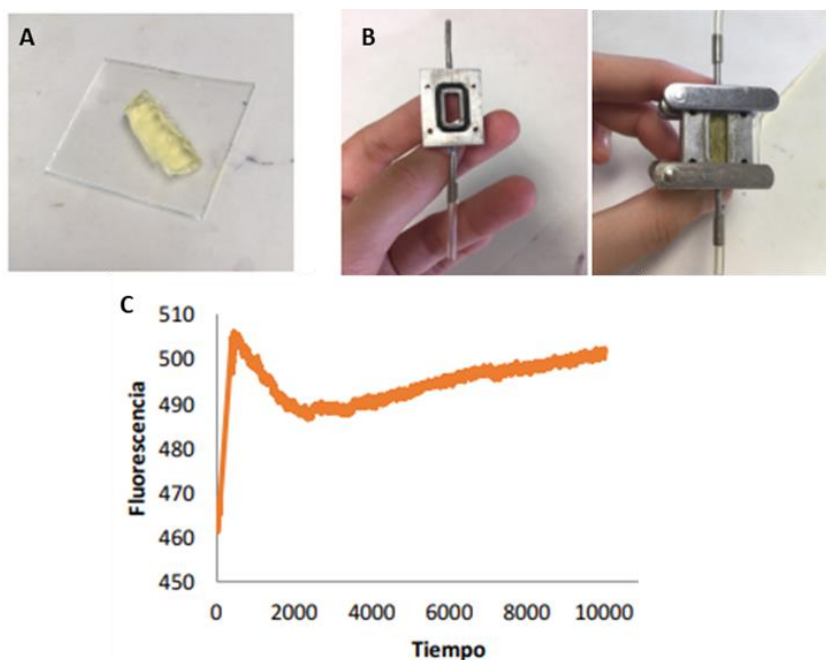


Figura 1.16: **A)** Aspecto de la lámina sensora de PAA con las enzimas ChOx y AChE atrapadas. **B)** Celda de flujo continuo que actúa de soporte para la lámina **C)** Estudio de la variación de la fluorescencia FAD de la ChOx atrapada en gel de PAA frente al tiempo ($\lambda_{em}=530nm$) ($\lambda_{ext}=430nm$) durante la reacción enzimática.

Por otro lado, otro de los factores limitantes de la metodología podría encontrarse en su aplicación a muestras reales. Con la conjugación de los AuNCs a la enzima se ha conseguido transferir la detección de la señal analítica a la zona Vis-NIR (ventana biológica donde la absorción de los tejidos es menor), al tiempo que se reducen la autofluorescencia y el scattering, evitando así la aparición de interferencias espectrales. Sin embargo, esta metodología necesita de la excitación en la zona UV (300 nm), lo que podría provocar fenómenos de auto fluorescencia en muestras reales. Por ello, otra de las líneas de investigación futuras en continuación con esta sección se centra en el uso de nanopartículas upconversión. Se trata de materiales, capaces de convertir la radiación de baja energía (NIR) en radiación de mayor energía, por ejemplo, luz visible. Así, la emisión de fluorescencia UC tiene lugar a longitudes de onda más cortas que la de la luz absorbida. Estos nanomateriales ya han sido previamente usados en el grupo para el desarrollo de nanobiosensores ópticos autoindicadores basados en glucosa oxidasa.¹¹⁸ La implementación de nanopartículas upconversion en el nanobiosensor desarrollado, podría ser un interesante campo de estudio, utilizando estos materiales como nanolamparas que excitan el bioconjugado enzima-AuNC, consiguiendo así una excitación y emisión en la región NIR.

Sección 1B: Nanoclusters de oro como sondas fluorescentes para la detección de oxígeno en reacciones enzimáticas y a altas temperaturas.

El estudio del mecanismo de desactivación de la fluorescencia de AuNCs, ha demostrado que su interacción con O₂ sigue el modelo colisional de Stern-Volmer, confirmando las posibilidades de estos nanomateriales como sondas de O₂. Sobre esta base, se ha evaluado la utilización de AuNCs en el seguimiento de reacciones enzimáticas en las que se produce el consumo de oxígeno, ya que ofrecen frente a otros fluoróforos, ventajas como la detección en la ventana biológica y estabilidad térmica. Sin embargo, la aplicación de esta metodología en un formato '*point of care*', necesita de la inmovilización de la enzima y los AuNCs en soportes sólidos estables, donde, con solo añadir la muestra pueda realizarse el test in situ. Bajo esta premisa surgen distintas limitaciones, que han sido observadas en este trabajo;

a) Si la mezcla enzima-AuNCs se deposita en el soporte por absorción, al añadir la muestra, esta mezcla puede difundir, disminuyendo así la señal de base de la fluorescencia de AuNCs (fenómeno observado en soportes de celulosa) b) El revelado del test en formato 'húmedo' es necesario, ya que el cambio en la fluorescencia de AuNCs es reversible y tras su incremento durante la reacción enzimática (debido al consumo de O₂) la fluorescencia vuelve a disminuir (regeneración del O₂), por lo que se necesita la medida de la fluorescencia in situ y en húmedo tras la adición de la muestra.

A pesar de haber reducido el efecto de difusión, mediante el entrapamiento de la mezcla enzima-AuNCs en soportes de celulosa 'caseros', la eliminación de este problema es fundamental para su aplicación real. Por ello, los próximos pasos en esta aplicación se centrarán en la evaluación de otros soportes que eliminen la difusión por completo y permitan el análisis húmedo in situ. Algunas de las opciones son el uso de soportes de silicona, hidrogeles o tectómeros, de las cuales, en el grupo de investigación, ya se han realizado algunos estudios previos con buenos resultados.

Se ha llevado a cabo el entrapamiento de AuNCs en geles de PAA¹¹⁹, así la **Figura 1.17**, muestra los espectros de emisión y excitación de los AuNCs en la lámina de PAA, así como la respuesta al oxígeno de estos nanomateriales entrapados. Demostrando prometedores resultados en el

uso de estas láminas tanto para esta aplicación como para el caso anterior (determinación de ACh).

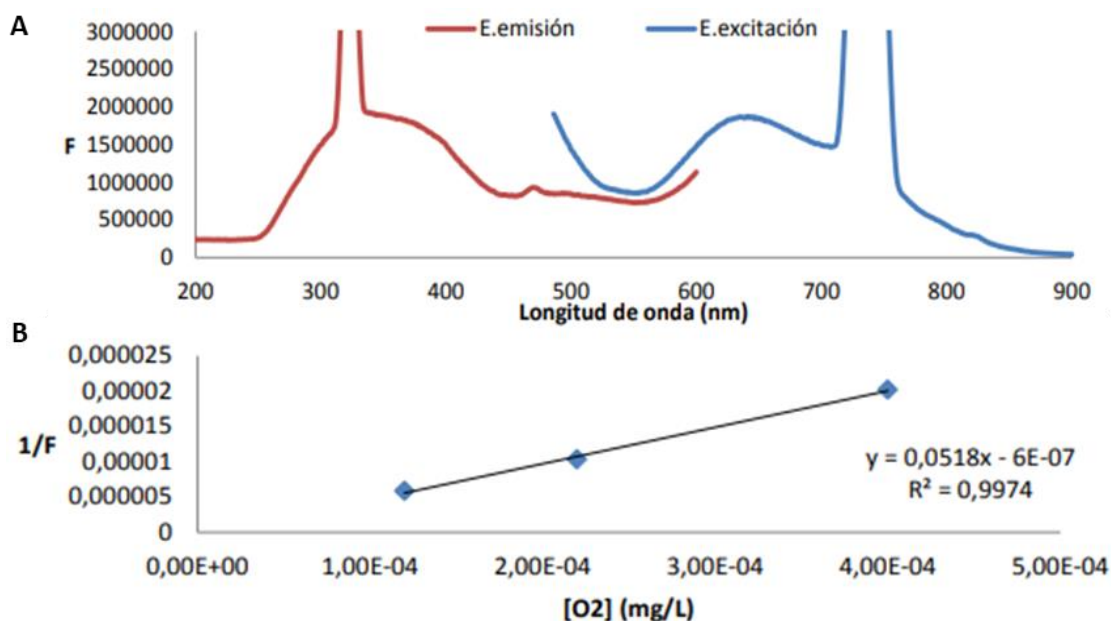


Figura 1.17: **A)** Espectros de fluorescencia de AuNCs@BSA entrampados en un gel de poliacrilamida: $\lambda_{ext}=370$ nm y $\lambda_{em}=640$ nm **B)** Respuesta de la fluorescencia de AuNCs entrampados a diversas concentraciones de O₂ junto con la respuesta al oxígeno de estos nanomateriales entrampados.

En el desarrollo de esta tesis doctoral, también se han realizado algunas pruebas preliminares inmovilizando AuNCs en tectómeros de oligoglicinas, materiales biocompatibles muy útiles para el transporte de sustancias tanto con carácter hidrofóbico como hidrofílico. Una colaboración con la Dr. Rosa Garriga Mateo, del Departamento de Química Física de la Universidad de Zaragoza, ha permitido inmovilizar varios tipos de AuNCs en estos materiales. Se han obtenido imágenes TEM de las nanopartículas inmovilizadas, comprobando la permanencia de sus propiedades ópticas por microscopía confocal de fluorescencia (**Figura 1.18**). La inmovilización de enzimas en estos materiales también se ha estudiado en el grupo, garantizando la integridad de la enzima entrampada y la posibilidad de seguimiento de la reacción enzimática en tectómeros. Estos estudios presentan a los tectómeros como potenciales soportes para el diseño de sensores de O₂ basados en la fluorescencia AuNCs para el seguimiento de reacciones enzimáticas.

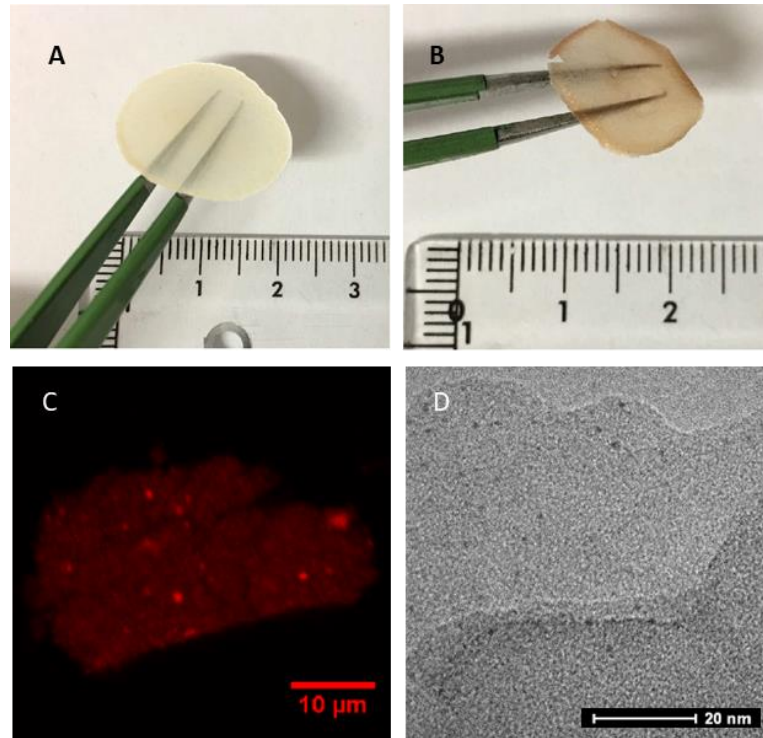


Figura 1.18: **A)** AuNCs@LA y **B)** AuNCs@BSA inmovilizados en tectómeros. **C)** Imagen obtenida por micriscopía confocal de fluorescencia e **D)** imagen TEM de los AuNCs@tectómeros.

1.5. Bibliografía

- (1) Yu, P.; Wen, X.; Toh, Y. R.; Ma, X.; Tang, J. Fluorescent Metallic Nanoclusters: Electron Dynamics, Structure, and Applications. *Part. Part. Syst. Charact.* **2015**, *32* (2), 142–163. <https://doi.org/10.1002/ppsc.201400040>.
- (2) Moriarty, P. Nanostructured Materials. *Reports Prog. Phys.* **2001**, *64* (3), 297–381. <https://doi.org/10.1088/0034-4885/64/3/201>.
- (3) Díez, I.; Ras, R. H. A. Fluorescent Silver Nanoclusters. *Nanoscale* **2011**, *3* (5), 1963–1970. <https://doi.org/10.1039/c1nr00006c>.
- (4) Luo, Z.; Zheng, K.; Xie, J. Engineering Ultrasmall Water-Soluble Gold and Silver Nanoclusters for Biomedical Applications. *Chem. Commun.* **2014**, *50* (40), 5143–5155. <https://doi.org/10.1039/c3cc47512c>.
- (5) Lin, C. A. J.; Lee, C. H.; Hsieh, J. T.; Wang, H. H.; Li, J. K.; Shen, J. L.; Chan, W. H.; Yeh, H. I.; Chang, W. H. Synthesis of Fluorescent Metallic Nanoclusters toward Biomedical Application: Recent Progress and Present Challenges. *J. Med. Biol. Eng.* **2009**, *29* (6), 276–283.
- (6) Zheng, J.; Zhou, C.; Yu, M.; Liu, J. Different Sized Luminescent Gold Nanoparticles. *Nanoscale* **2012**, *4* (14), 4073–4083. <https://doi.org/10.1039/c2nr31192e>.
- (7) Heer, W. de. The Physics of Simple Metal Clusters: Experimental Aspects and Simple Models. *Rev. Mod. Phys.* **1993**, *65* (3), 611–676.
- (8) Jie Zheng, Jeffrey T. Petty, and R. M. D. High Quantum Yield Blue Emission from Water-Soluble Au₈ Nanodots. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 26, 7780–7781.
- (9) Wang, G.; Huang, T.; Murray, R. W.; Menard, L.; Nuzzo, R. G. Near-IR Luminescence of Monolayer-Protected Metal Clusters. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (3), 812–813. <https://doi.org/10.1021/ja0452471>.
- (10) Zhou, C.; Yu, J.; Qin, Y.; Zheng, J. Grain Size Effects in Polycrystalline Gold Nanoparticles. *Nanoscale* **2012**, *4* (14), 4228–4233. <https://doi.org/10.1039/c2nr30212h>.
- (11) Qian, H.; Zhu, Y.; Jin, R. Atomically Precise Gold Nanocrystal Molecules with Surface Plasmon Resonance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, *109* (3), 696–700. <https://doi.org/10.1073/pnas.1115307109>.
- (12) Zhang, J.; Tang, Y.; Lee, K.; Ouyang, M. Tailoring Light-Matter-Spin Interactions in Colloidal Hetero-Nanostructures. *Nature* **2010**, *466* (7302), 91–95. <https://doi.org/10.1038/nature09150>.
- (13) Chen, Y.; Munechika, K.; Ginger, D. S. Dependence of Fluorescence Intensity on the Spectral Overlap between Fluorophores and Plasmon Resonant Single Silver Nanoparticles. *Nano Lett.* **2007**, *7* (3), 690–696. <https://doi.org/10.1021/nl062795z>.
- (14) Anger, P.; Bharadwaj, P.; Novotny, L. Enhancement and Quenching of Single-Molecule Fluorescence. *Phys. Rev. Lett.* **2006**, *96* (11), 3–6. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.96.113002>.
- (15) Rodríguez, E. Síntesis, Propiedades y Funcionalización de Clústeres Metálicos, Universidad de Santiago de Compostela, 2012.

- (16) Bai, Y.; Shu, T.; Su, L.; Zhang, X. Fluorescent Gold Nanoclusters for Biosensor and Bioimaging Application. *Crystals* **2020**, *10* (5). <https://doi.org/10.3390/cryst10050357>.
- (17) Porret, E.; Le Guével, X.; Coll, J. L. Gold Nanoclusters for Biomedical Applications: Toward: In Vivo Studies. *J. Mater. Chem. B* **2020**, *8* (11), 2216–2232. <https://doi.org/10.1039/c9tb02767j>.
- (18) Li, H.; Zhu, W.; Wan, A.; Liu, L. The Mechanism and Application of the Protein-Stabilized Gold Nanocluster Sensing System. *Analyst* **2017**, *142* (4), 567–581. <https://doi.org/10.1039/c6an02112c>.
- (19) Qu, X.; Li, Y.; Li, L.; Wang, Y.; Liang, J.; Liang, J. Fluorescent Gold Nanoclusters: Synthesis and Recent Biological Application. *J. Nanomater.* **2015**, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/784097>.
- (20) Chen, L. Y.; Wang, C. W.; Yuan, Z.; Chang, H. T. Fluorescent Gold Nanoclusters: Recent Advances in Sensing and Imaging. *Anal. Chem.* **2015**, *87* (1), 216–229. <https://doi.org/10.1021/ac503636j>.
- (21) Zhang, L.; Wang, E. Metal Nanoclusters: New Fluorescent Probes for Sensors and Bioimaging. *Nano Today* **2014**, *9* (1), 132–157. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2014.02.010>.
- (22) Hussain, A. M. P.; Sarangi, S. N.; Kesarwani, J. A.; Sahu, S. N. Au-Nanocluster Emission Based Glucose Sensing. *Biosens. Bioelectron.* **2011**, *29* (1), 60–65. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2011.07.066>.
- (23) Zhang, Y.; Wu, M.; Dai, W.; Li, Y.; Wang, X.; Tan, D.; Yang, Z.; Liu, S.; Xue, L.; Lei, Y. Gold Nanoclusters for Controlled Insulin Release and Glucose Regulation in Diabetes. *Nanoscale* **2019**, *11* (13), 6471–6479. <https://doi.org/10.1039/C9NR00668K>.
- (24) Cao, X.; Li, H.; Lian, L.; Xu, N.; Lou, D.; Wu, Y. A Dual-Responsive Fluorescence Method for the Detection of Clenbuterol Based on BSA-Protected Gold Nanoclusters. *Anal. Chim. Acta* **2015**, *871*, 43–50. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.02.031>.
- (25) Wang, X.; Wu, P.; Hou, X.; Lv, Y. An Ascorbic Acid Sensor Based on Protein-Modified Au Nanoclusters. *Analyst* **2013**, *138* (1), 229–233. <https://doi.org/10.1039/c2an36112d>.
- (26) Cui, M. L.; Liu, J. M.; Wang, X. X.; Lin, L. P.; Jiao, L.; Zhang, L. H.; Zheng, Z. Y.; Lin, S. Q. Selective Determination of Cysteine Using BSA-Stabilized Gold Nanoclusters with Red Emission. *Analyst* **2012**, *137* (22), 5346–5351. <https://doi.org/10.1039/c2an36284h>.
- (27) Aswathy, B.; Sony, G. Cu²⁺ Modulated BSA-Au Nanoclusters: A Versatile Fluorescence Turn-on Sensor for Dopamine. *Microchem. J.* **2014**, *116*, 151–156. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2014.04.016>.
- (28) He, Y.; Wang, X.; Zhu, J.; Zhong, S.; Song, G. Ni²⁺-Modified Gold Nanoclusters for Fluorescence Turn-on Detection of Histidine in Biological Fluids. *Analyst* **2012**, *137* (17), 4005–4009. <https://doi.org/10.1039/c2an35712g>.
- (29) Lu, Q.; Zhou, T.; Wang, Y.; Gong, L.; Liu, J. Transformation from Gold Nanoclusters to Plasmonic Nanoparticles: A General Strategy towards Selective Detection of Organophosphorothioate Pesticides. *Biosens. Bioelectron.* **2018**, *99* (May 2017), 274–280. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.07.066>.
- (30) Mathew, M. S.; Baksi, A.; Pradeep, T.; Joseph, K. Choline-Induced Selective Fluorescence Quenching of Acetylcholinesterase Conjugated Au@BSA Clusters. *Biosens. Bioelectron.*

- 2016**, *81*, 68–74. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.02.048>.
- (31) Li, H.; Guo, Y.; Xiao, L.; Chen, B. Selective and Sensitive Detection of Acetylcholinesterase Activity Using Denatured Protein-Protected Gold Nanoclusters as a Label-Free Probe. *Analyst* **2014**, *139* (1), 285–289. <https://doi.org/10.1039/c3an01736b>.
- (32) Halawa, M. I.; Gao, W.; Saqib, M.; Kitte, S. A.; Wu, F.; Xu, G. Sensitive Detection of Alkaline Phosphatase by Switching on Gold Nanoclusters Fluorescence Quenched by Pyridoxal Phosphate. *Biosens. Bioelectron.* **2017**, *95* (December 2016), 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.03.073>.
- (33) Yan, X.; Li, H.; Hu, T.; Su, X. A Novel Fluorimetric Sensing Platform for Highly Sensitive Detection of Organophosphorus Pesticides by Using Egg White-Encapsulated Gold Nanoclusters. *Biosens. Bioelectron.* **2017**, *91* (August 2016), 232–237. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.11.058>.
- (34) Zhang, J.; Tu, L.; Zhao, S.; Liu, G.; Wang, Y.; Wang, Y.; Yue, Z. Fluorescent Gold Nanoclusters Based Photoelectrochemical Sensors for Detection of H₂O₂ and Glucose. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *67*, 296–302. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.08.037>.
- (35) Xia, X.; Long, Y.; Wang, J. Glucose Oxidase-Functionalized Fluorescent Gold Nanoclusters as Probes for Glucose. *Anal. Chim. Acta* **2013**, *772*, 81–86. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.02.025>.
- (36) Palmal, S.; Jana, N. R. Gold Nanoclusters with Enhanced Tunable Fluorescence as Bioimaging Probes. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology* **2014**, *6* (1), 102–110. <https://doi.org/10.1002/wnan.1245>.
- (37) Aldeek, F.; Muhammed, M. A. H.; Palui, G.; Zhan, N.; Mattoussi, H. Growth of Highly Fluorescent Polyethylene Glycol- and Zwitterion- Functionalized Gold Nanoclusters. *ACS Nano* **2013**, *7* (3), 2509–2521. <https://doi.org/10.1021/nn305856t>.
- (38) Hu, L.; Han, S.; Parveen, S.; Yuan, Y.; Zhang, L.; Xu, G. Highly Sensitive Fluorescent Detection of Trypsin Based on BSA-Stabilized Gold Nanoclusters. *Biosens. Bioelectron.* **2012**, *32* (1), 297–299. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2011.12.007>.
- (39) Alonso, M. C.; Trapiella-Alfonso, L.; Fernández, J. M. C.; Pereiro, R.; Sanz-Medel, A. Functionalized Gold Nanoclusters as Fluorescent Labels for Immunoassays: Application to Human Serum Immunoglobulin E Determination. *Biosens. Bioelectron.* **2016**, *77*, 1055–1061. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.08.011>.
- (40) Hostetler, M. J.; Wingate, J. E.; Zhong, C. J.; Harris, J. E.; Vachet, R. W.; Clark, M. R.; Londono, J. D.; Green, S. J.; Stokes, J. J.; Wignall, G. D.; Glish, G. L.; Porter, M. D.; Evans, N. D.; Murray, R. W. Alkanethiolate Gold Cluster Molecules with Core Diameters from 1.5 to 5.2 Nm: Core and Monolayer Properties as a Function of Core Size. *Langmuir* **1998**, *14* (1), 17–30. <https://doi.org/10.1021/la970588w>.
- (41) Mattevi, A. To Be or Not to Be an Oxidase: Challenging the Oxygen Reactivity of Flavoenzymes. *Trends Biochem. Sci.* **2006**, *31* (5), 276–283. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2006.03.003>.
- (42) Galbán, J.; Sanz-Vicente, I.; Navarro, J.; De Marcos, S. The Intrinsic Fluorescence of FAD and Its Application in Analytical Chemistry: A Review. *Methods Appl. Fluoresc.* **2016**, *4* (4). <https://doi.org/10.1088/2050-6120/4/4/042005>.
- (43) Galbán, J.; Sanz-Vicente, I.; Ortega, E.; Del Barrio, M.; De Marcos, S. Reagentless Fluorescent Biosensors Based on Proteins for Continuous Monitoring Systems. *Anal.*

- Bioanal. Chem.* **2012**, *402* (10), 3039–3054. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-5715-2>.
- (44) Cardiovascular, N.; Plant, T. E.; Co, T. Identification Choline and Properties from of the Prosthetic Group of Oxidase Alcaligenes In One , Choline Is Oxidized by a Dehydrogenase-Type Enzyme (1), While in the Other an Oxidase-Type Enzyme Which Produces Hydrogen Peroxide Accompanied by Oxygen C. **1980**, *88* (1), 197–203.
- (45) Prasad, K. S.; Subramanian, V.; Paul, J. Purification and Characterization of Arsenite Oxidase from Arthrobacter Sp. *BioMetals* **2009**, *22* (5), 711–721. <https://doi.org/10.1007/s10534-009-9215-6>.
- (46) Fan, F.; Germann, M. W.; Gadda, G. Mechanistic Studies of Choline Oxidase with Betaine Aldehyde and Its Isosteric Analogue 3,3-Dimethylbutyraldehyde. *Biochemistry* **2006**, *45* (6), 1979–1986. <https://doi.org/10.1021/bi0517537>.
- (47) Caudill, M. A. Pre- and Postnatal Health: Evidence of Increased Choline Needs. *J. Am. Diet. Assoc.* **2010**, *110* (8), 1198–1206. <https://doi.org/10.1016/j.jada.2010.05.009>.
- (48) Ortega, E.; De Marcos, S.; Sanz-Vicente, I.; Ubide, C.; Ostra, M.; Vidal, M.; Galbán, J. Fluorescence of the Flavin Group in Choline Oxidase. Insights and Analytical Applications for the Determination of Choline and Betaine Aldehyde. *Talanta* **2016**, *147*, 253–260. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.09.060>.
- (49) Taylor, P. The Cholinesterases. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266* (7), 4025–4028.
- (50) Tunç, A. T.; Aynacı Koyuncu, E.; Arslan, F. Development of an Acetylcholinesterase–Choline Oxidase Based Biosensor for Acetylcholine Determination. *Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol.* **2016**, *44* (7), 1659–1664. <https://doi.org/10.3109/21691401.2015.1080167>.
- (51) Persike, M.; Zimmermann, M.; Klein, J.; Karas, M. Quantitative Determination of Acetylcholine and Choline in Microdialysis Samples by MALDI-TOF MS. *Anal. Chem.* **2010**, *82* (3), 922–929. <https://doi.org/10.1021/ac902130h>.
- (52) Salvi, F.; Wang, Y. F.; Weber, I. T.; Gadda, G. Structure of Choline Oxidase in Complex with the Reaction Product Glycine Betaine. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **2014**, *70* (2), 405–413. <https://doi.org/10.1107/S1399004713029283>.
- (53) Antibody, M. N. À.; Polo, E.; Pino, P. Taking Advantage of Unspeci Fi c Interactions to Produce Highly Active Conjugates. **2011**, No. 6, 4521–4528.
- (54) Vivian, J. T.; Callis, P. R. Mechanisms of Tryptophan Fluorescence Shifts in Proteins. *Biophys. J.* **2001**, *80* (5), 2093–2109. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(01\)76183-8](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(01)76183-8).
- (55) Resano, M.; Garcia-Ruiz, E.; Garde, R. High-Resolution Continuum Source Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry for the Monitoring of Au Nanoparticles. *J. Anal. At. Spectrom.* **2016**, *31* (11), 2233–2241. <https://doi.org/10.1039/c6ja00280c>.
- (56) Nolte, H. J.; Neumann, E.; Rosenberry, T. L. Effective Charge on Acetylcholinesterase Active Sites Determined from the Ionic Strength Dependence of Association Rate Constants with Cationic Ligands. *Biochemistry* **1980**, *19* (16), 3705–3711. <https://doi.org/10.1021/bi00557a011>.
- (57) H. R, C.; Schiffman, J. D.; Balakrishna, R. G. Quantum Dots as Fluorescent Probes: Synthesis, Surface Chemistry, Energy Transfer Mechanisms, and Applications. *Sensors Actuators, B Chem.* **2018**, *258*, 1191–1214. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.11.189>.
- (58) Sharma, B. K.; Erdman, R. A. In Vitro Degradation of Choline from Selected Foodstuffs

- and Choline Supplements. *J. Dairy Sci.* **1989**, *72* (10), 2772–2776. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(89\)79421-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(89)79421-2).
- (59) Angeles, L. Administration and Acetylcholine to Rats on in Brain1. **1982**, 322–328.
- (60) Wang, X. D.; Wolfbeis, O. S. Optical Methods for Sensing and Imaging Oxygen: Materials, Spectroscopies and Applications. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43* (10), 3666–3761. <https://doi.org/10.1039/c4cs00039k>.
- (61) Papkovsky, D. B.; Dmitriev, R. I. Biological Detection by Optical Oxygen Sensing. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42* (22), 8700–8732. <https://doi.org/10.1039/c3cs60131e>.
- (62) Lehner, P.; Staudinger, C.; Borisov, S. M.; Regensburger, J.; Klimant, I. Intrinsic Artefacts in Optical Oxygen Sensors-How Reliable Are Our Measurements? *Chem. - A Eur. J.* **2014**, *21* (10), 3978–3986. <https://doi.org/10.1002/chem.201406037>.
- (63) Zou, X.; Pan, T.; Chen, L.; Tian, Y.; Zhang, W. Luminescence Materials for PH and Oxygen Sensing in Microbial Cells–Structures, Optical Properties, and Biological Applications. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2017**, *37* (6), 723–738. <https://doi.org/10.1080/07388551.2016.1223011>.
- (64) Haghghat, F.; Khodadadi, A.; Mortazavi, Y. Temperature-Independent Ceria- and Pt-Doped Nano-Size TiO₂ Oxygen Lambda Sensor Using Pt/SiO₂ Catalytic Filter. *Sensors Actuators, B Chem.* **2008**, *129* (1), 47–52. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2007.07.068>.
- (65) Wolfbeis, O. S. Luminescent Sensing and Imaging of Oxygen: Fierce Competition to the Clark Electrode. *BioEssays* **2015**, *37* (8), 921–928. <https://doi.org/10.1002/bies.201500002>.
- (66) Min, D. B.; Boff, J. M. Chemistry and Reaction of Singlet Oxygen in Foods. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2002**, *1* (2), 58–72. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2002.tb00007.x>.
- (67) DeRosa, M. C.; Crutchley, R. J. Photosensitized Singlet Oxygen and Its Applications. *Coord. Chem. Rev.* **2002**, *233–234*, 351–371. [https://doi.org/10.1016/S0010-8545\(02\)00034-6](https://doi.org/10.1016/S0010-8545(02)00034-6).
- (68) Krinsky, N. I. Singlet Oxygen in Biological Systems. *Trends Biochem. Sci.* **1977**, *2* (2), 35–38. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(77\)90253-5](https://doi.org/10.1016/0968-0004(77)90253-5).
- (69) Pereira, A. R.; da Costa, R. S.; Yokoyama, L.; Alhadeff, E. M.; Teixeira, L. A. C. Evaluation of Textile Dye Degradation Due to the Combined Action of Enzyme Horseradish Peroxidase and Hydrogen Peroxide. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2014**, *174* (8), 2741–2747. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1222-6>.
- (70) Vishnoi G, Morisawa M, M. S. A New Plastic Optical Fiber Sensor for Oxygen Based on Fluorescence Enhancement. *Opt Rev* **1998**, *5*, 13–15.
- (71) Kenner, R. D.; Khan, A. U. Molecular Oxygen Enhanced Fluorescence of Organic Molecules in Polymer Matrices: A Singlet Oxygen Feedback Mechanism. *J. Chem. Phys.* **1976**, *64* (5), 1877–1882. <https://doi.org/10.1063/1.432471>.
- (72) Ghosh, R. N.; Askeland, P. A.; Kramer, S.; Loloee, R. Optical Dissolved Oxygen Sensor Utilizing Molybdenum Chloride Cluster Phosphorescence. *Appl. Phys. Lett.* **2011**, *98* (22), 2–4. <https://doi.org/10.1063/1.3595483>.
- (73) Kim, G.; Koo, Y. E. L.; Xu, H.; Philbert, M. A.; Kopelman, R. Nanoencapsulation Method for High Selectivity Sensing of Hydrogen Peroxide inside Live Cells. *Anal. Chem.* **2010**, *82* (6), 2165–2169. <https://doi.org/10.1021/ac9024544>.

- (74) Finkel, T.; Holbrook, N. J. Oxidants, Oxidative Stress and Biology of Ageing. *Insight Rev. Artic.* **2000**, *408* (November), 239–247.
- (75) Wen, F.; Dong, Y.; Feng, L.; Wang, S.; Zhang, S.; Zhang, X. Horseradish Peroxidase Functionalized Fluorescent Gold Nanoclusters for Hydrogen Peroxide Sensing. *Anal. Chem.* **2011**, *83* (4), 1193–1196. <https://doi.org/10.1021/ac1031447>.
- (76) Wang, Y.; Wang, Y.; Zhou, F.; Kim, P.; Xia, Y. Protein-Protected Au Clusters as a New Class of Nanoscale Biosensor for Label-Free Fluorescence Detection of Proteases. *Small* **2012**, *8* (24), 3769–3773. <https://doi.org/10.1002/smll.201201983>.
- (77) Das, T.; Ghosh, P.; Shanavas, M. S.; Maity, A.; Mondal, S.; Purkayastha, P. Protein-Templated Gold Nanoclusters: Size Dependent Inversion of Fluorescence Emission in the Presence of Molecular Oxygen. *Nanoscale* **2012**, *4* (19), 6018–6024. <https://doi.org/10.1039/c2nr31271a>.
- (78) Scully, P. J.; Betancor, L.; Bolyo, J.; Dzyadevych, S.; Guisan, J. M.; Fernández-Lafuente, R.; Jaffrezic-Renault, N.; Kuncová, G.; Matějček, V.; O’Kennedy, B.; Podrazky, O.; Rose, K.; Sasek, L.; Young, J. S. Optical Fibre Biosensors Using Enzymatic Transducers to Monitor Glucose. *Meas. Sci. Technol.* **2007**, *18* (10), 3177–3186. <https://doi.org/10.1088/0957-0233/18/10/S20>.
- (79) Lau, R. C. W.; Choi, M. M. F.; Lu, J. Alcohol Sensing Membrane Based on Immobilized Ruthenium(II) Complex in Carboxylated PVC and Surface Covalently Bonded Alcohol Oxidase. *Talanta* **1999**, *48* (2), 321–331. [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(98\)00248-3](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(98)00248-3).
- (80) Mitsubayashi, K.; Kon, T.; Hashimoto, Y. Optical Bio-Sniffer for Ethanol Vapor Using an Oxygen-Sensitive Optical Fiber. *Biosens. Bioelectron.* **2003**, *19* (3), 193–198. [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(03\)00218-5](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(03)00218-5).
- (81) Pospiskova, K.; Safarik, I.; Sebel, M.; Kuncova, G. Magnetic Particles-Based Biosensor for Biogenic Amines Using an Optical Oxygen Sensor as a Transducer. *Microchim. Acta* **2013**, *180* (3–4), 311–318. <https://doi.org/10.1007/s00604-012-0932-0>.
- (82) Ryabov, A. D.; Sukbarev, V. S.; Alexandrova, L.; Le Lagadec, R.; Pfeffer, M. New Synthesis and New Bio-Application of Cyclometalated Ruthenium(II) Complexes for Fast Mediated Electron Transfer with Peroxidase and Glucose Oxidase. *Inorg. Chem.* **2001**, *40* (25), 6529–6532. <https://doi.org/10.1021/ic010423h>.
- (83) Ivanova, E. V.; Ershov, A. Y.; Laurinavičius, V.; Meskus, R.; Ryabov, A. D. Comparative Kinetic Study of D-Glucose Oxidation by Ruthenium(III) Compounds Catalyzed by FAD-Dependent Glucose Oxidase and PQQ-Dependent Glucose Dehydrogenase. *Biochem.* **2003**, *68* (4), 407–415. <https://doi.org/10.1023/A:1023647813089>.
- (84) Ryabov, A. D.; Kurova, V. S.; Ivanova, E. V.; Le Lagadec, R.; Alexandrova, L. Redox Mediation and Photomechanical Oscillations Involving Photosensitive Cyclometalated Ru(II) Complexes, Glucose Oxidase, and Peroxidase. *Anal. Chem.* **2005**, *77* (4), 1132–1139. <https://doi.org/10.1021/ac048743g>.
- (85) McGrath, A. P.; Hilmer, K. M.; Collyer, C. A.; Shepard, E. M.; Elmore, B. O.; Brown, D. E.; Dooley, D. M.; Guss, J. M. Structure and Inhibition of Human Diamine Oxidase. *Biochemistry* **2009**, *48* (41), 9810–9822. <https://doi.org/10.1021/bi9014192>.
- (86) Bodmer, S.; Imark, C.; Kneubühl, M. Biogenic Amines in Foods: Histamine and Food Processing. *Inflamm. Res.* **1999**, *48* (6), 296–300.

<https://doi.org/10.1007/s000110050463>.

- (87) Ordóñez, J. L.; Troncoso, A. M.; García-Parrilla, M. D. C.; Callejón, R. M. Recent Trends in the Determination of Biogenic Amines in Fermented Beverages – A Review. *Anal. Chim. Acta* **2016**, *939*, 10–25. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.07.045>.
- (88) Turner, N. A.; Vulfson, E. N. At What Temperature Can Enzymes Maintain Their Catalytic Activity? *Enzyme Microb. Technol.* **2000**, *27* (1–2), 108–113. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(00\)00184-8](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(00)00184-8).
- (89) Daniel, R. M.; Danson, M. J. Temperature and the Catalytic Activity of Enzymes: A Fresh Understanding. *FEBS Lett.* **2013**, *587* (17), 2738–2743. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.06.027>.
- (90) Gally, J. A.; Edelman, G. M. The Effect of Temperature on the Fluorescence of Some Aromatic Amino Acids and Proteins. *BBA - Biochim. Biophys. Acta* **1962**, *60* (3), 499–509. [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(62\)90869-7](https://doi.org/10.1016/0006-3002(62)90869-7).
- (91) Collins, S. F.; Baxter, G. W.; Wade, S. A.; Sun, T.; Grattan, K. T. V.; Zhang, Z. Y.; Palmer, A. W. Comparison of Fluorescence-Based Temperature Sensor Schemes: Theoretical Analysis and Experimental Validation. *J. Appl. Phys.* **1998**, *84* (9), 4649–4654. <https://doi.org/10.1063/1.368705>.
- (92) Mazza, M. M. A.; Raymo, F. M. Structural Designs for Ratiometric Temperature Sensing with Organic Fluorophores. *J. Mater. Chem. C* **2019**, *7* (18), 5333–5342. <https://doi.org/10.1039/c9tc00993k>.
- (93) Filevich, O.; Etchenique, R. 1D and 2D Temperature Imaging with a Fluorescent Ruthenium Complex. *Anal. Chem.* **2006**, *78* (21), 7499–7503. <https://doi.org/10.1021/ac061382f>.
- (94) Chevrier, D. M. Properties and Applications of Protein-Stabilized Fluorescent Gold Nanoclusters: Short Review. *J. Nanophotonics* **2012**, *6* (1), 064504. <https://doi.org/10.1117/1.jnp.6.064504>.
- (95) Rhys Williams, A. T.; Winfield, S. A.; Miller, J. N. Relative Fluorescence Quantum Yields Using a Computer-Controlled Luminescence Spectrometer. *Analyst* **1983**, *108* (1290), 1067–1071. <https://doi.org/10.1039/an9830801067>.
- (96) Lin, C. A. J.; Yang, T. Y.; Lee, C. H.; Huang, S. H.; Sperling, R. A.; Zanella, M.; Li, J. K.; Shen, J. L.; Wang, H. H.; Yeh, H. I.; Parak, W. J.; Chang, W. H. Synthesis, Characterization, and Bioconjugation of Fluorescent Gold Nanoclusters toward Biological Labeling Applications. *ACS Nano* **2009**, *3* (2), 395–401. <https://doi.org/10.1021/nn800632j>.
- (97) Govindaraju, S.; Ankireddy, S. R.; Viswanath, B.; Kim, J.; Yun, K. Fluorescent Gold Nanoclusters for Selective Detection of Dopamine in Cerebrospinal Fluid. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep40298>.
- (98) Valeur, B. *Molecular Fluorescence. Principles and Applications*, 1st editio.; Willey-VCH, 2003.
- (99) Shang, L.; Stockmar, F.; Azadfar, N.; Nienhaus, G. U. Intracellular Thermometry by Using Fluorescent Gold Nanoclusters. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2013**, *52* (42), 11154–11157. <https://doi.org/10.1002/anie.201306366>.
- (100) Nakano, M.; Nagai, T. Thermometers for Monitoring Cellular Temperature. *J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.* **2017**, *30*, 2–9.

<https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2016.12.001>.

- (101) NJ, T. *Modern Molecular Photochemistry*; University science books, 1991.
- (102) J, J. Radiationless Transitions. *Pure Appl Chem* **1971**, *27*, 389–419.
- (103) Zhang, P.; Sham, T. K. X-Ray Studies of the Structure and Electronic Behavior of Alkanethiolate-Capped Gold Nanoparticles: The Interplay of Size and Surface Effects. *Phys. Rev. Lett.* **2003**, *90* (24), 4. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.90.245502>.
- (104) Tchapyguine, M.; Mikkela, M. H.; Zhang, C.; Andersson, T.; Björneholm, O. Gold Oxide Nanoparticles with Variable Gold Oxidation State. *J. Phys. Chem. C* **2015**, *119* (16), 8937–8943. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b00811>.
- (105) Costelle, L.; Räisänen, M. T.; Joyce, J. T.; Silien, C.; Johansson, L. S.; Campbell, J. M.; Räisänen, J. Structural Evolution of Gas-Phase Coinage Metal Clusters in Thiolate Self-Assembled Monolayers on Au. *J. Phys. Chem. C* **2012**, *116* (42), 22602–22607. <https://doi.org/10.1021/jp307148p>.
- (106) McCreery, R. L.; Bergren, A. J. Progress with Molecular Electronic Junctions: Meeting Experimental Challenges in Design and Fabrication. *Adv. Mater.* **2009**, *21* (43), 4303–4322. <https://doi.org/10.1002/adma.200802850>.
- (107) Loo, Y. L.; Lang, D. V.; Rogers, J. A.; Hsu, J. W. P. Electrical Contacts to Molecular Layers by Nanotransfer Printing. *Nano Lett.* **2003**, *3* (7), 913–917. <https://doi.org/10.1021/nl034207c>.
- (108) (ARTICLE)ExpFluids1993.Pdf.
- (109) Bonifas, A. P.; McCreery, R. L. Soft Au, Pt and Cu Contacts for Molecular Junctions through Surface-Diffusion-Mediated Deposition. *Nat. Nanotechnol.* **2010**, *5* (8), 612–617. <https://doi.org/10.1038/nnano.2010.115>.
- (110) Osorio, H. M.; Cea, P.; Ballesteros, L. M.; Gascón, I.; Marqués-González, S.; Nichols, R. J.; Pérez-Murano, F.; Low, P. J.; Martín, S. Preparation of Nascent Molecular Electronic Devices from Gold Nanoparticles and Terminal Alkyne Functionalised Monolayer Films. *J. Mater. Chem. C* **2014**, *2* (35), 7348–7355. <https://doi.org/10.1039/c4tc01080a>.
- (111) Ballesteros, L. M.; Martín, S.; Cortés, J.; Marqués-González, S.; Pérez-Murano, F.; Nichols, R. J.; Low, P. J.; Cea, P. From an Organometallic Monolayer to an Organic Monolayer Covered by Metal Nanoislands: A Simple Thermal Protocol for the Fabrication of the Top Contact Electrode in Molecular Electronic Devices. *Adv. Mater. Interfaces* **2014**, *1* (9), 1–6. <https://doi.org/10.1002/admi.201400128>.
- (112) Yeh, Y. C.; Creran, B.; Rotello, V. M. Gold Nanoparticles: Preparation, Properties, and Applications in Bionanotechnology. *Nanoscale* **2012**, *4* (6), 1871–1880. <https://doi.org/10.1039/c1nr11188d>.
- (113) Choi, S.; Han, S. I.; Jung, D.; Hwang, H. J.; Lim, C.; Bae, S.; Park, O. K.; Tschabrunn, C. M.; Lee, M.; Bae, S. Y.; Yu, J. W.; Ryu, J. H.; Lee, S. W.; Park, K.; Kang, P. M.; Lee, W. B.; Nezafat, R.; Hyeon, T.; Kim, D. H. Highly Conductive, Stretchable and Biocompatible Ag–Au Core–Sheath Nanowire Composite for Wearable and Implantable Bioelectronics. *Nat. Nanotechnol.* **2018**, *13* (11), 1048–1056. <https://doi.org/10.1038/s41565-018-0226-8>.
- (114) Saha, K.; Agasti, S. S.; Kim, C.; Li, X.; Rotello, V. M. Gold Nanoparticles in Chemical and Biological Sensing. *Chem. Rev.* **2012**, *112* (5), 2739–2779. <https://doi.org/10.1021/cr2001178>.

- (115) Merga, G.; Saucedo, N.; Cass, L. C.; Puthussery, J.; Meisel, D. "Naked" Gold Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Catalytic Hydrogen Evolution, and SERS. *J. Phys. Chem. C* **2010**, *114* (35), 14811–14818. <https://doi.org/10.1021/jp104922a>.
- (116) Ghandi, K.; Findlater, A. D.; Mahimwalla, Z.; MacNeil, C. S.; Awoonor-Williams, E.; Zahariev, F.; Gordon, M. S. Ultra-Fast Electron Capture by Electrosterically-Stabilized Gold Nanoparticles. *Nanoscale* **2015**, *7* (27), 11545–11551. <https://doi.org/10.1039/c5nr02291f>.
- (117) Trabajo fin de grado: 'Determinación enzimática de acetilcolina. Primeros pasos hacia el desarrollo de un biosensor óptico.' López González, Paloma. Universidad de Zaragoza, Facultad de Ciencias, **2017**.
- (118) Tesis Doctoral: 'Desarrollo de nanobiosensores enzimáticos de fluorescencia dirigidos a la monitorización mínimamente invasiva de glucosa.' Del Barrio Redondo, Melisa. Universidad de Zaragoza, Facultad de Ciencias, **2014**.
- (119) Trabajo fin de grado: 'Síntesis y caracterización de nanoclusters de oro. Aplicación al desarrollo de sensores fluorescentes para la determinación de oxígeno.' Camacho Aguayo, Javier. Universidad de Zaragoza, Facultad de Ciencias, **2018**.

Capítulo 2

Métodos enzimáticos para la síntesis de nanopartículas de oro y su aplicación al desarrollo de nanobiosensores

2.1. Introducción

Como se ha dicho, en las últimas décadas, los AuNMs han despertado la atención de la comunidad científica debido a sus propiedades eléctricas, catalíticas y ópticas únicas, procedentes y dependientes de la dimensión nanométrica. El hecho de que estas propiedades sean tan afectadas por el tamaño y características físicas, ha llevado a que la síntesis de nanopartículas coloidales de oro represente un campo importante en la nanociencia y la nanotecnología. El estudio de los mecanismos de síntesis y factores que afectan a la variabilidad de las propiedades de estas nanopartículas, ha permitido el ajuste de las mismas en función de las necesidades y aplicaciones tecnológicas, dando lugar a gran variedad de métodos.

Uno de los métodos botton-up más comunes para la síntesis de AuNPs o partículas más pequeñas como los nanoclusters de oro (AuNCs), es la reducción química directa del Au(III) (o pasando previamente por Au(I)), en presencia de un reductor y un ligando que actúe como estabilizador, normalmente se utilizan compuestos tiolados en busca de la formación del enlace Au-S, muy fuerte y estable.¹ Los parámetros más importantes para controlar el tamaño, estructura, estado de oxidación, propiedades superficiales y por lo tanto sus propiedades ópticas, son: tipo y concentración de los ligandos, la concentración del ión metal, agentes reductores y sus concentraciones, pH de la disolución, temperatura y tiempo de reacción. (Figura 2.1)

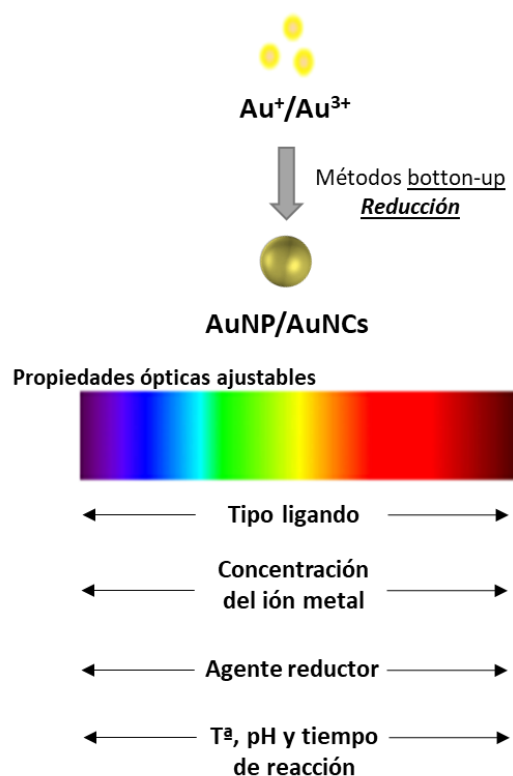


Figura 2.1. Síntesis de NPs o AuNCs mediante métodos de reducción (botton-up) y factores que afectan a sus propiedades ópticas.

Como se ha visto en el Capítulo 1, en el caso del diseño de biosensores, la capacidad de reconocimiento molecular de las AuNPs biofuncionalizadas con elementos de reconocimiento, así como sus propiedades ópticas, constituyen, en muchos casos, la base en la detección

biológica.² Una de las opciones más comunes para el desarrollo de nanobiosensores, consiste en la síntesis previa de nanopartículas y la consecuente funcionalización de estas con las biomoléculas de reconocimiento de interés. Sin embargo, en muchos casos, el diseño de AuNPs a través de la síntesis dirigida y específica con los propios ligandos de reconocimiento biológico del analito, constituye un punto de estudio muy interesante. (Figura 2.2) Así, el seguimiento y variabilidad de las propiedades electrónicas de estas nanopartículas tras su interacción con el analito, permite el desarrollo de nuevas técnicas mixtas sintético-sensoras, en las que las nanopartículas son sintetizadas *in situ* con el elemento de detección que actúa a su vez como ligando estabilizador.

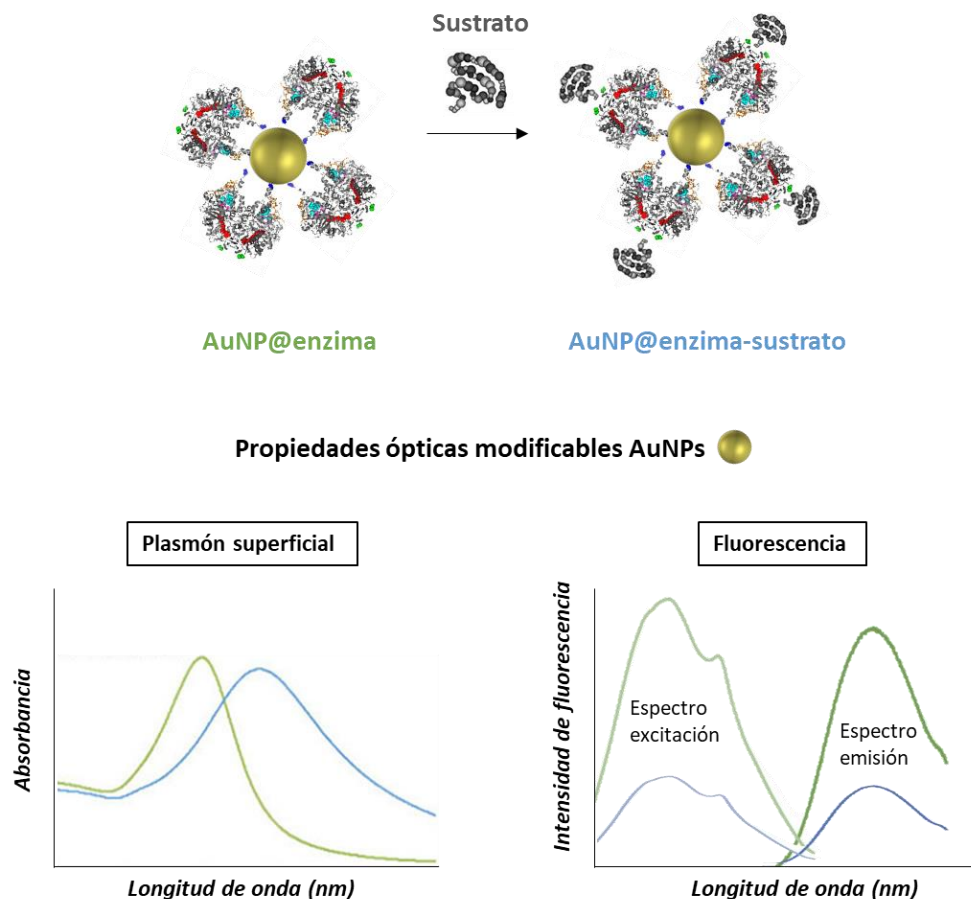


Figura 2.2. AuNPs sintetizadas utilizando como ligando el elemento de detección biológico específico (enzima) y efecto en las propiedades ópticas (plasmón o fluorescencia) de las nanopartículas tras la interacción del ligando con el analito (sustrato).

El uso de AuNPs como base para el desarrollo de este tipo de métodos de detección colorimétricos o de AuNCs para su detección fluorescente, ha crecido en los últimos años. La mayoría de estas metodologías sintético-sensoras se basan en el uso de AuNPs o AuNCs como sustitutos del reactivo cromogénico³ o del fluoróforo⁴ en cada caso y explotar tres ideas de síntesis fundamentales:

- 1) Uso de las capacidades reductoras intrínsecas de las proteínas: algunas proteínas son capaces de generar nanoestructuras de Au debido a la capacidad reductora de algunos aminoácidos⁵ y actuar a su vez como ligandos estabilizadores en la síntesis de nanopartículas o nanocluster de oro⁶. El uso de estas nanopartículas para la detección del sustrato de la proteína implicada en la síntesis es una de las ideas planteadas en este capítulo.

- 2) Uso de una reacción enzimática para la generación de AuNPs. Se ha observado que en algunas reacciones enzimáticas de oxidación en las que el O_2 actúa como oxidante, la formación de AuNPs es posible en presencia de Au(III). Este hecho, es debido a que durante la reacción enzimática se forma Au^0 , que se estabiliza como AuNPs gracias a la parte proteica de la enzima, actuando a su vez como ligando. El mecanismo concreto de la formación del Au^0 depende de la reacción enzimática y es necesario elucidarlo, aunque parece estar relacionado (al menos en parte) con la regeneración del centro activa de la enzima; no obstante, en todos los casos, las propiedades espectroscópicas de estas nanopartículas dependen de la concentración de sustrato.⁷ El seguimiento de las propiedades ópticas de las AuNPs generadas *in situ* con la reacción enzimática para la detección cuantitativa del sustrato, es otra de las ideas estudiadas en este capítulo.
- 3) Algunos autores indican, además, que el subproducto H_2O_2 de algunas reacciones enzimáticas (proporcional al sustrato) es capaz de aumentar el crecimiento de AuNPs previamente formados^{8,9} o que otros productos de reacciones enzimáticas son capaces de generar el mismo efecto¹⁰. Sin embargo, otros autores estudian el efecto contrario, mostrando que la presencia de H_2O_2 y/o subproductos de la reacción enzimática, produce en algunos casos la reducción del tamaño (etching) de las nanopartículas^{11,12}.

En este capítulo se evaluó el diseño de AuNMs mediante su síntesis dirigida y específica con los ligandos de reconocimiento biológico, explorando las posibilidades de los distintos métodos enzimáticos sintético-sensoras mencionados. Para ello se seleccionó la enzima L-aminoácido oxidasa (LAAO), una flavoenzima oxidoreductasa que cataliza la desaminación oxidativa de L-aminoácidos a cetoácidos liberando amoníaco y peróxido de hidrógeno (**Figura 2.3**). La reducción de su cofactor FAD es producida por el L-aminoácido sustrato; posteriormente, el ciclo catalítico se completa con la reoxidación del cofactor a FAD por el oxígeno molecular.¹³

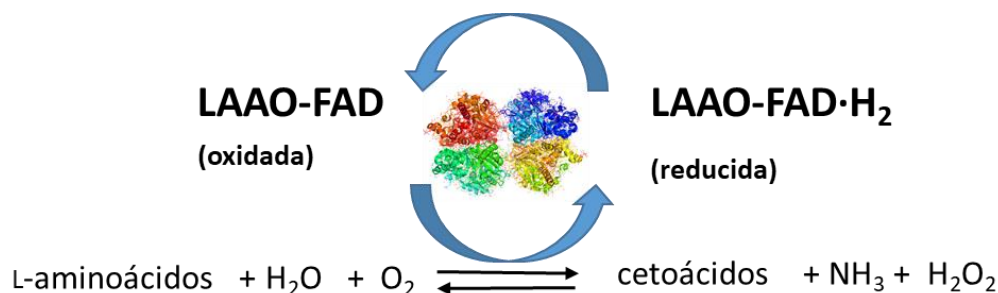


Figura 2.3: Reacción de la enzima LAAO con L-aminoácidos y proceso de oxidación-reducción de su centro activo FAD.

Las enzimas LAAO aisladas de venenos de serpiente son los miembros mejor caracterizados de esta familia de enzimas. La estructura cristalina de rayos x ha confirmado que estas enzimas se encuentran en forma de dímeros funcionales y que cada dímero tiene tres dominios: el sitio de unión al sustrato, el sitio FAD, y un dominio helicoidal.¹⁴ Estas enzimas están presentes en bacterias y mamíferos, y participan en mecanismos de defensa limitando el crecimiento de la mayoría de las bacterias y parásitos.¹⁵ Se han citado otras actividades biológicas de LAAOs de serpientes, incluida la actividad inductora de apoptosis en varias líneas celulares humanas¹⁴, así como actividad anti-VIH (virus de inmunodeficiencia humana)¹⁶, efectos que podrían estar

correlacionados con la producción localizada de H_2O_2 . La determinación de los niveles de estas enzimas LAAO puede ser fundamental para el estudio de muchos de estos procesos implicados.

Por otro lado, uno de los sustratos de la LAAO con mayor constante de afinidad es la L-fenilalanina (L-Phe) (con constante de Michaelis, $K_m=50 \mu M$, a pH 8.5 y 25 °C), así la estructura de la LAAO con su sustrato se ha refinado a una resolución de 1,8 Å.¹³ De estos estudios se deducen conformaciones de la enzima alternativas según la posición de los residuos clave His223 y Arg322, lo que sugiere un sitio activo dinámico que cambia en su interacción con el sustrato. (**Figura 2.4**) El estudio de la estructura cristalina del complejo LAAO-(L-Phe) revela un sistema de canales en forma de Y que se extiende desde la superficie externa de la proteína hasta el sitio activo. Los estudios aseguran que una región de este canal puede servir de ruta para la entrada de O_2 durante la reacción oxidativa. La segunda región, separada del canal de O_2 compuesto por el extremo N (residuos 8-16) de la proteína, desempeñaría un papel en la liberación de H_2O_2 a la superficie exterior de la proteína, cerca del resto glucano, que se cree que ancla la enzima a la célula huésped. La ubicación de este canal puede explicar la capacidad de la enzima para localizar H_2O_2 en el objetivo.

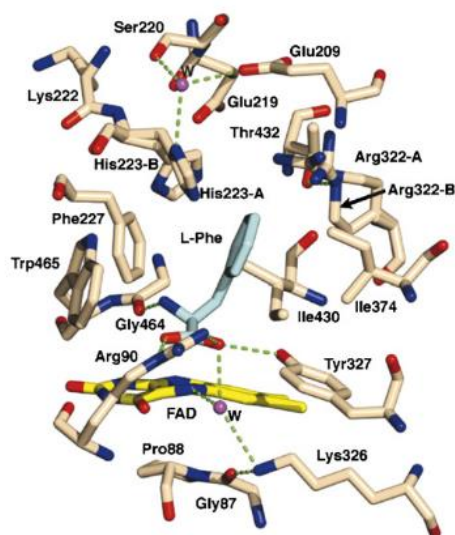


Figura 2.4: Vista del sitio catalítico que muestra las interacciones entre LAAO y el ligando de L-fenilalanina. Los enlaces de hidrógeno se muestran como líneas verdes discontinuas. El sustrato se muestra como enlaces grises y la proteína y FAD se muestran como enlaces amarillos. Las moléculas de agua se incluyen como esferas magentas y se etiquetan como W.¹¹

La L-fenilalanina es un aminoácido esencial para el ser humano, y se transforma, por medio de una reacción catalizada por la enzima fenilalanina hidroxilasa, en tirosina. Siendo también precursor de catecolaminas como la L-dopa, la norepinefrina y la epinefrina. Por tanto, la carencia o exceso de L-fenilalanina, puede provocar toxicidad y enfermedades metabólicas, como la fenilcetonuria.¹⁶ Así, la determinación de los niveles de este aminoácido en sangre, es trascendental para la evaluación de estos trastornos.

2.2. Planteamiento

Una de las opciones más habituales para el desarrollo de nanobiosensores es la síntesis previa de nanopartículas y su posterior funcionalización con las biomoléculas de reconocimiento de interés, estrategia utilizada en el Capítulo 1 (sección 1A) de esta tesis doctoral. Sin embargo, en este capítulo, se propone el diseño de AuNPs mediante síntesis dirigida e *in situ* utilizando las biomoléculas de reconocimiento biológico específicas como agentes reductores y estabilizadores, constituyendo así una estrategia muy interesante para lograr la síntesis y biofuncionalización de las AuNPs en un solo paso. Se exploraron dos conceptos sintético-sensoras diferentes; la síntesis *in situ* de AuNMs a partir de los residuos reductores de la enzima; y la formación de nanopartículas de oro, a partir de las propiedades redox de la enzima y su interacción con el sustrato, como indicador de reacciones enzimáticas.

Se seleccionó como modelo la flavoenzima L-aminoácido oxidasa (LAAO), siendo el objetivo final la evaluación de las propiedades ópticas de las AuNPs o AuNCs sintetizadas y su aplicación para la determinación cuantitativa de L-fenilalanina (L-Phe) en fluidos fisiológicos, un aminoácido fundamental para el diagnóstico y tratamiento de trastornos metabólicos.

De esta manera, el presente capítulo consta de 2 secciones, donde se estudia en profundidad el mecanismo de formación de los correspondientes nanomateriales sintetizados:

Sección 2A. Síntesis *in-situ* de nanomateriales de oro a partir de los residuos reductores de la enzima LAAO.

El objetivo de este apartado es la síntesis de AuNMs utilizando los residuos reductores de la enzima LAAO como molécula reductora y estabilizadora. Estos nuevos nano-bio híbridos proponen interesantes estrategias y aspectos a explorar; la posibilidad de ajustar las propiedades ópticas de las nanopartículas sintetizadas en función de la proteína utilizada como reductor y ligando; y el uso de sus propiedades ópticas intrínsecas para la posterior determinación enzimática de su sustrato.

Sección 2B. Síntesis de AuNPs a partir de las propiedades redox de la enzima LAAO y su sustrato L-fenilalanina.

Esta sección explora la posibilidad de síntesis *in situ* de nanopartículas durante la propia reacción enzimática con el sustrato. Esta síntesis implica, además de los residuos de aminoácidos de la enzima (Sección 2A), el ciclo de oxidación-reducción de la enzima durante la reacción con el sustrato.

2.3. Experimental

2.3.1. Reactivos y materiales

A lo largo del capítulo se utilizó la enzima L-amino ácido oxidasa, LAAO (EC 1.4.3.2) derivada del veneno de serpiente *Crotalus adamanteus* 0,47 U/mL y su sustrato L-fenilalanina, ambos de Sigma Aldrich.

Para las síntesis de AuNPs se utilizó una sal de tetracloraurato (III) de sodio dihidratado, $\text{NaAuCl}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (99,8% Au), (Stream Chemicals) e hidróxido de sodio, NaOH (Panreac)

Así como diversas sales para la preparación de las disoluciones amortiguadoras utilizadas, TRIS y NaP ambos de Panreac.

2.3.2. Instrumentación

Los espectros de absorción molecular UV-vis se realizaron con el espectrofotómetro Agilent 8453A UV-vis de haz simple y detector de fotodiodos en serie. Las medidas de absorción cinéticas se realizaron en un espectrofotómetro Analytic Jena Specord 210 Plus. Para los ensayos de screening se utilizó el espectrofotómetro microplacas Multiskan Sky de Thermo Scientific.

Las medidas de fluorescencia se llevaron a cabo con el luminómetro Cary Eclipse de Varian. Este equipo permite además registrar espectros de fluorescencia en tres dimensiones y cinéticas de reacción de fluorescencia en el tiempo.

El tamaño y morfología de las nanopartículas obtenidas se estudiaron mediante STEM con el equipo Tecnai F30 (FEI). (Laboratorio de Microscopías Avanzadas, LMA, Zaragoza).

Sección 2A

Modelo de síntesis *in situ* de nanomateriales de oro a partir de los residuos reductores de la enzima L-aminoácido oxidasa

2A.1. Introducción

Uno de los métodos particularmente atractivos en el campo de los nanobiosensores es la síntesis de nanomateriales mediada por proteínas de interés biológico, utilizando estas como moléculas reductoras y estabilizadoras. Además de tratarse de unas síntesis 'verde' sin reactivos o subproductos tóxicos, solo requiere de condiciones de reacción leves, ofreciendo nanopartículas con una gran solubilidad en agua y biocompatibilidad natural.

Esta metodología ha sido aplicada a la síntesis de nanoclusters de oro fluorescentes estabilizados con proteínas,¹⁷ generando nuevos nano-bio híbridos que plantean interesantes estrategias y aspectos a explorar, por un lado, la relación estructura proteica-propiedad óptica y el ajuste preciso de estos parámetros para el diseño dirigido de los nanoclusters y por otro, la utilización de su fluorescencia intrínseca para la determinación enzimática.

Con estas nuevas nanoestructuras se busca encontrar soluciones a las limitaciones actuales en aplicaciones de detección de imágenes biomédicas y analíticas. Además, de las propiedades de biocompatibilidad ya comentadas, los nanoclusters obtenidos con esta estrategia de síntesis, presentan fotoluminiscencia intensa en la región que abarca desde el final del visible hasta el infrarrojo cercano, especialmente en la primera ventana biológica (690-950 nm). En esta zona del espectro, los tejidos biológicos tienen más transparencia, lo que permite aplicar con éxito este tipo de nanopartículas a técnicas de imagen de fluorescencia en modelos animales^{18,19} o incluso para el seguimiento de reacciones enzimáticas en esta región.

La familia de las flavoproteínas, como la L- aminoácido oxidasa (LAAO) empleada en este capítulo, posee un cofactor FAD que presenta fluorescencia a 520 nm (**Figura 2A.1A**). Tras la reacción enzimática, la fluorescencia del FAD en su forma reducida (FAD·H₂) disminuye, así, los cambios en estas propiedades ópticas durante las reacción con el sustrato pueden usarse referencia para comprobar que los cambios en la señal del nanomaterial son debidos a la reacción enzimática.²⁰

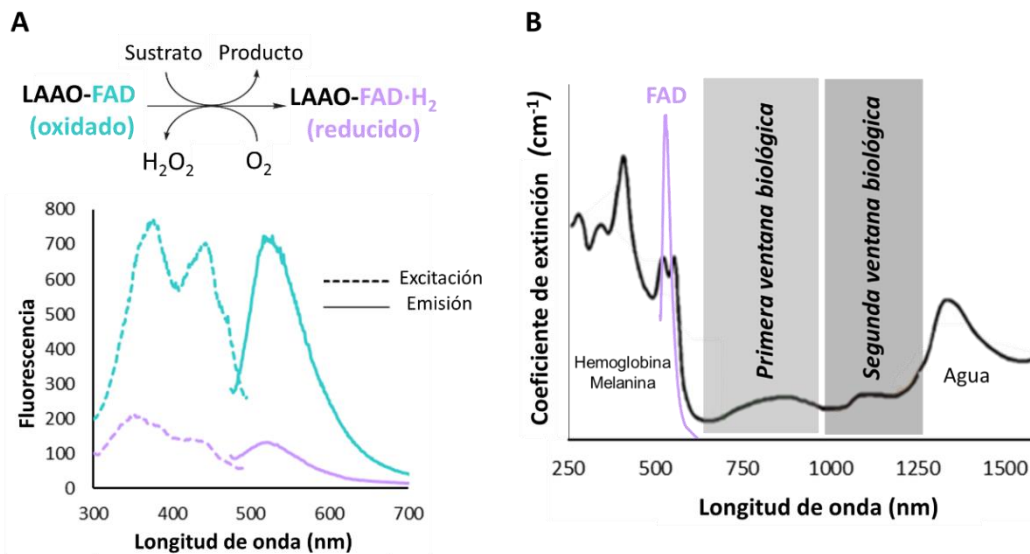


Figura 2A.1: **A)** Reacción de la enzima oxidoreductasa LAAO y espectros típicos de excitación y emisión de fluorescencia del cofactor FAD. **B)** Ventanas biológicas correspondientes a los siguientes rangos espectrales: 750-950 nm (primera ventana biológica), 1000-1350 nm (segunda ventana biológica).

Sección 2A: Modelo de síntesis *in situ* de nanomateriales de oro a partir de los residuos reductores de la enzima L-aminoácido oxidasa.

Sin embargo, muy a menudo la estructura conformacional de la enzima que rodea al FAD hace que la fluorescencia del cofactor (fuera de la ventana biológica) sea altamente desactivada por el medio ambiente y estas propiedades espectroscópicas no pueden usarse como método de determinación. (**Figura 2A.1B**) Este es el caso de la enzima LAAO, en la cual, la fluorescencia del cofactor FAD y su variación durante la reacción enzimática es prácticamente inapreciable por fluorescencia molecular.²¹

Por ello, en este caso, un efecto adicional del uso de la metodología de síntesis de nanoclusters *in situ*, trata de que la participación de la enzima en la síntesis produzca la modificación de la estructura proteica y exponga su FAD. De esta forma además de poder resaltar su fluorescencia y los cambios de la misma durante la reacción, se promuevan los fenómenos de transferencia de energía FRET entre el FAD y los AuNCs utilizando la fluorescencia en la zona anteriormente indicada como primera ventana biológica, para monitorizar la reacción enzimática.

Hasta ahora, se han explorado un pequeño número de proteínas para sintetizar nanoclusters de oro fluorescentes, como la albúmina sérica bovina (BSA)⁵, lisozima²², transferrina humana²³, trypsin²⁴, pepsina²⁵ y peroxidasa²⁶. La influencia de los contenidos y secuencias de aminoácidos de estas proteínas afecta a las propiedades ópticas de los AuNCs sintetizados, así como la formación secundaria de AuNPs más grandes con plasmón superficial, sin embargo, en todos los casos se observan mecanismos establecidos como base de este tipo de síntesis:

- Los grupos amino de **aminoácidos positivamente cargados** como **arginina (arg)**, **lisina (lys)** e **histidina (his)**, son responsables de la coordinación de los iones AuCl_4^- a través de interacciones electrostáticas.²⁷ La presencia de estos grupos determina la cantidad de Au incorporada en la enzima.

- Los **residuos reductores tirosina (tyr)** y **triptófano (trp)**, reducen los iones Au (III) a pHs superiores a 10 e influyen en el grado de reacción para formar AuNPs o AuNCs.²⁷

- Los **residuos cisteína (cys)** estabilizan la formación de AuNMs debido a la interacción tiol-oro. Los enlaces disulfuro están ocultos dentro de la estructura secundaria de la proteína y son inaccesibles en el rango de pH de 5–7.33, estos enlaces quedan disponibles gradualmente a pH más altos.²⁸

A partir de estas hipótesis, se han estudiado los efectos del tamaño de la proteína y el contenido de aminoácidos de la misma en la formación de nanoclusters y sus propiedades fluorescentes resultantes, así como la estabilidad química y fotoestabilidad de AuNCs generados por diferentes proteínas.⁶ Las conclusiones más importantes son las siguientes (**Figura 2A.2**):

- El equilibrio entre los residuos que contienen amina y residuos reductores tirosina y triptófano son críticos para la formación de nano-cluster. Proteínas con pocos residuos amina y una mayor cantidad de tirosina/triptófano, no son capaces de producir nanocluster y generan nanopartículas de Au de mayor tamaño.
- El contenido de cisteína es también crítico. Un contenido de cisteína más bajo (< 18 por proteína) provoca AuNCs con emisiones en longitudes de onda menores frente a la fluorescencia de AuNCs obtenidos con proteínas con alto contenido en cisteínas en longitudes de onda mayores.

- La estabilidad y fotoestabilidad de estos AuNCs depende en gran medida del tamaño de la proteína (del que depende también el número de aminoácidos). Proteínas más grandes conllevan a AuNCs con mejores recubrimientos y más estables.

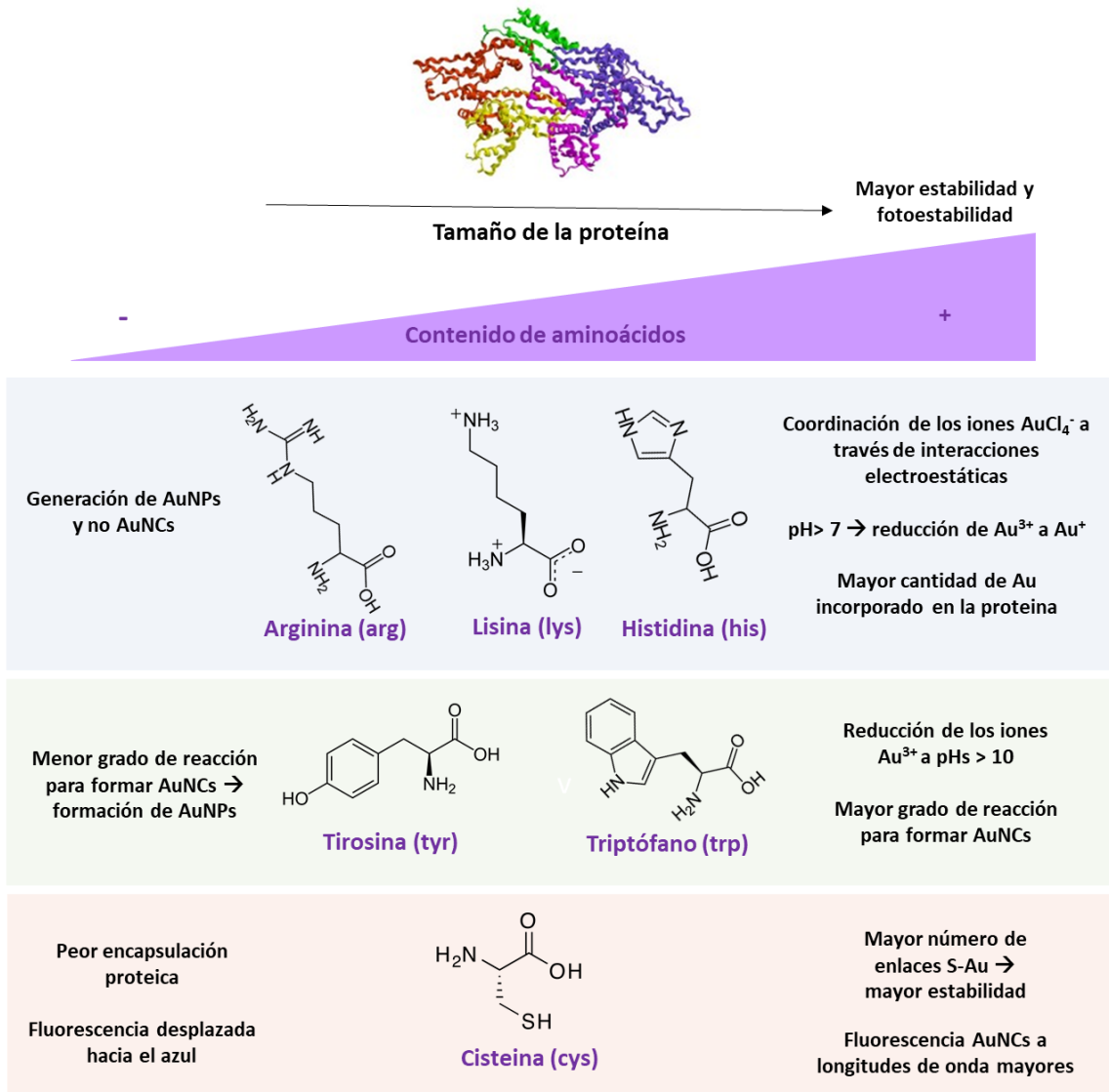


Figura 2A.2: Factores clave respecto al contenido de residuos aminoácidos para la síntesis de AuNCs o AuNPs estabilizados por proteínas.

2A.2. Objetivos

El objetivo de esta sección se centra en la evaluación de la síntesis *in situ* de AuNMs encapsulados en enzimas, utilizando los residuos aminoácidos de estas para llevar a cabo la reducción química de Au(III). La enzima LAAO se seleccionó como modelo, con la finalidad de estudiar en profundidad el mecanismo de reducción durante la síntesis y estabilización de este tipo de nanopartículas, para ello se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Estudio de la estructura y residuos aminoácidos de la enzima LAAO y comparativa con otras enzimas empleadas en este tipo de síntesis (AuNCs@BSA).
2. Estudio del mecanismo de formación de estos AuNMs a través de la optimización de los factores implicados en la síntesis: concentraciones de Au(III) y de enzima a añadir.
3. Caracterización estructural y de las propiedades ópticas de los AuNMs sintetizados.

Además, en esta sección se plantea el uso de este tipo de nanomateriales, sintetizados *in situ* con las biomoléculas de reconocimiento, en el desarrollo de biosensores. En este caso se pretende estudiar las posibilidades de las nanopartículas encapsuladas en LAAO en la detección enzimática de su sustrato L-fenilalanina, mediante los siguientes objetivos:

3. Estudio de estabilidad de la enzima después de la síntesis de AuNMs y propiedades ópticas de su cofactor FAD al pH de la reacción enzimática.
4. Seguimiento de los cambios en la fluorescencia del FAD durante la reacción enzimática y comparativa de la cinética entre la enzima libre o tras la síntesis (AuNMs@LAAO)
5. Seguimiento de las propiedades ópticas de los AuNMs@LAAO durante la reacción enzimática para la determinación con L-Phe.

2A.3. Experimental y métodos

2A.3.1. Síntesis de AuNCs estabilizados por L-aminoácido oxidasa.

Los AuNCs estabilizados con LAAO se prepararon mezclando diferentes ratios molares enzima:Au(III). Se varió la concentración de enzima y se evaluaron las disoluciones finales por fluorescencia y espectroscopia de absorción. Así, la síntesis final optimizada se realizó mezclando una solución acuosa de la enzima $4,76 \cdot 10^{-5}$ M (6,50 mg en 500 μ L) previamente atemperada a 37°C y 500 μ L de una solución acuosa de AuCl₄Na₂·2H₂O 10 mM ($4,76 \cdot 10^{-3}$ M) también atemperada y se agitó durante 15 minutos a 37°C. Después, se añadieron 50 μ L de una solución acuosa de NaOH 1 M a esta solución para ajustar el pH a 12, y la mezcla se incubó a 37 °C durante 24 h.

2A.3.2. Caracterización de AuNCs/AuNPs formadas por electroforesis en gel de agarosa y fluorescencia.

Con el fin de estudiar las propiedades de las nanopartículas generadas de forma independiente, se realizó una separación por electroforesis en gel de agarosa. Se preparó el gel al 2.5% de agarosa (SeaKem LE Agarosa, Lonza) en la disolución amortiguadora de electroforesis TBE 0,5x (Tris, Borato, EDTA de OmniPur). Esta disolución se calentó en microondas hasta conseguir una disolución homogénea. La mezcla resultante, se vertió sobre el molde de electroforesis y se colocó el peine para crear los pocillos. Tras 30 min, el gel solidificado, se sumergió en la cuba de electroforesis horizontal rellena con disolución amortiguadora TBE 0,5x, se retiró el peine y se inyectaron las muestras en los pocillos con ayuda de una micropipeta, 50 μ L de la muestra y 5 μ L de glicerol 25% en TBE 0,5x para dar densidad a la muestra. La electroforesis se llevó a cabo a 120 V, durante 20 minutos. Tras la electroforesis, la fracción de solución que permaneció en el pocillo se recogió y caracterizó su fluorescencia realizando un espectro 3D con un espectrofotómetro de fluorescencia Perkin Elmer LS 55 y comparando con la muestra antes de la electroforesis. Además, la observación de estos geles mediante una lámpara UV (ChemiDoc XRS + System whit Image Lab, BIO-RAD), permitió la caracterización fluorescente de la muestra en el interior del gel.

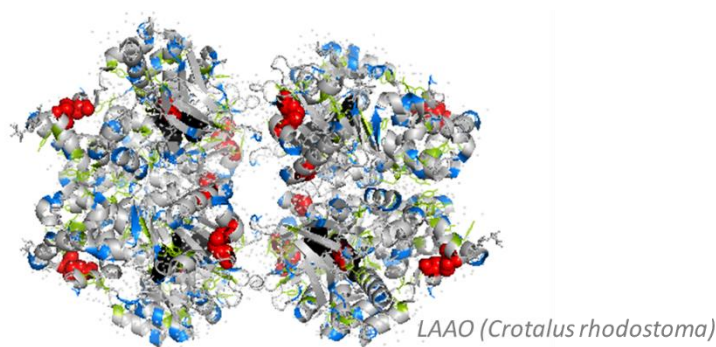
2A.3.3. Evaluación fluorescente de la reacción enzimática de las nanopartículas estabilizados por L-aminoácido oxidasa y su sustrato L-fenilalanina.

Se añadieron en una cubeta de cuarzo de volumen reducido, 25 μ L de LAAO-AuNCs/AuNPs, 25 μ L de disolución amortiguadora fosfato 0,2 M pH 6,5 y 10 μ L de la disolución de L-fenilalanina a evaluar. Se estudió también el efecto de la adición de catalasa a esta reacción, añadiendo previo al sustrato 5 μ L de catalasa 0,60 mg/mL (Sigma Aldrich). La fluorescencia de esta disolución se midió en continuo durante la reacción enzimática, tanto a las longitudes del FAD ($\lambda_{\text{ext}}/\lambda_{\text{em}} = 440/525$ nm) como de los AuNCs ($\lambda_{\text{ext}}/\lambda_{\text{em}} = 335/620$ nm) formados.

2A.4. Resultados

2A.4.1. Estudio de la estructura y residuos aminoácidos de la enzima LAAO.

Para conocer las posibilidades de la enzima LAAO en la síntesis de AuNCs, se estudió la estructura y los residuos aminoácidos de la misma. La variante utilizada a lo largo de este capítulo (de *Crotalus adamanteus*) es una glucoproteína dimérica cuya secuencia fue hallada en 1998; a pesar de ello, no se encuentra en la base de datos Protein Data Bank (PDB). Sin embargo, sí se encuentra la estructura 3D de la especie proveniente de *Crotalus rhodostoma* (2iid.pdb), cuya secuencia de aminoácidos se parece en un 83% a la LAAO *Crotalus adamanteus*²¹ y cuyos tamaños son similares, 117,4 kDa para la especie *adamanteus* y 132 kDa para la *rhodostoma*. De esta forma, a partir del fichero .pdb y con ayuda del programa de visualización molecular Pymol 'Build' (Molecular Graphics System, Pymol), se estudió la estructura 3D de la enzima y se contaron y señalaron los residuos aminoácidos de interés (**Figura 2A.3**).



	Residuos interacción tiol-oro	Residuos reductores		Residuos cargados positivamente		
	cys	tyr	trp	arg	lys	his
LAAO	24	100	20	118	128	44
BSA	35	21	3	26	60	16

Figura 2A.3: Estructura 3D de la proteína LAAO (2iid.pdb) y contenido de residuos aminoácidos clave en la síntesis de AuNCs. En rojo cisteínas (cys), en verde residuos reductores como tirosina (tyr) y triptófano (trp), en azul residuos amina cargados positivamente como arginina (arg), lisina (lys) e histidina (his). En la estructura 3D se marcan en negro los 4 FAD de la glucoproteína dimérica LAAO. La tabla muestra el número de cada uno de estos aminoácidos en la estructura de la LAAO y su comparativa con los encontrados en la enzima BSA.

Estas características se compararon con las obtenidas para la proteína BSA, cuyos AuNCs son ampliamente usados y destacan por su alta fotoestabilidad y rendimiento.⁶ Así, como se ve en la tabla de la **Figura 2A.3**, la LAAO tiene una composición de aminoácidos para la formación de AuNCs incluso más favorable que la de la BSA, lo que justifica las buenas posibilidades de la LAAO para esta síntesis.

2A.4.2. Optimización de la síntesis de AuNPs estabilizados por L-aminoácido oxidasa.

El factor clave de esta síntesis son las concentraciones de la sal de oro y de enzima a añadir. En primer lugar, a la concentración fija de enzima máxima $4.6 \cdot 10^{-5}$ M se evaluaron diversos excesos molares de oro (1:1, 1:10, 1:50, 1:100, 1:150). Tras 24 h, los viales mostraron en todos los casos el color amarillento inicial a excepción de los dos de mayor relación molar, que mostraban un color anaranjado-rojizo. Se evaluó también la fluorescencia Vis-NIR de las diversas disoluciones observándose solo un máximo de emisión en torno a 620 nm con excitación en 335 nm para las dos concentraciones de oro mayores (Figura 2A.4). Se presenta además la fluorescencia a 520 nm del FAD junto con la dispersión Raman, observada en todos los casos en torno a 450 nm; como era de esperar, estos picos de dispersión son tanto más altos cuanto más pequeña es la fluorescencia y la disolución presenta una menor absorción. Los resultados obtenidos para los ratios 1:100 y 1:150 fueron prácticamente iguales, por lo que se seleccionó como óptimo el ratio 1:100, con el fin de evitar aportar más medio ácido a la enzima. Utilizando este ratio, se evaluaron también diversas concentraciones de enzima ($7,44 \cdot 10^{-7}$, $2,98 \cdot 10^{-6}$, $1,19 \cdot 10^{-5}$, $4,76 \cdot 10^{-5}$ M) observándose formación de las nanopartículas solo a partir de la concentración de LAAO $1.19 \cdot 10^{-5}$ y el mayor rendimiento para $4,76 \cdot 10^{-5}$ M de LAAO. Concentraciones mayores de enzima no permiten la solubilidad completa de la misma.

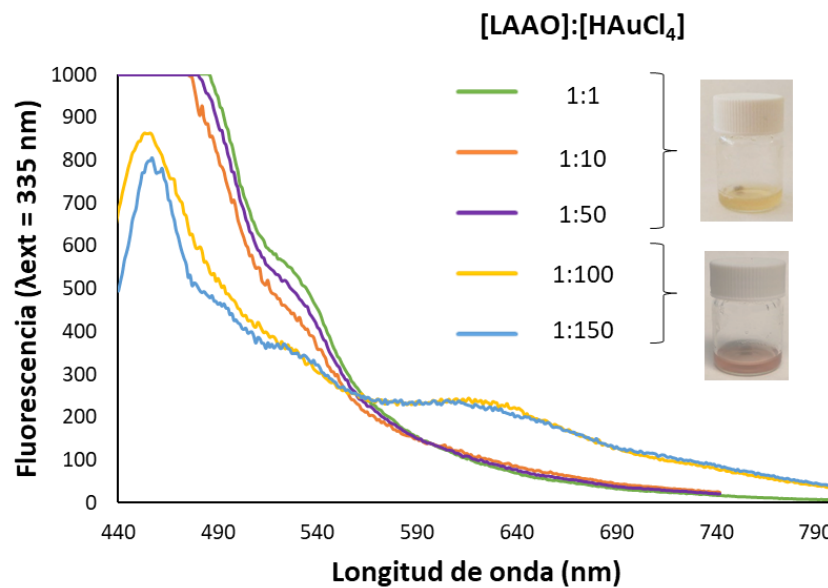


Figura 2A.4: Espectros de emisión de las diversas síntesis realizadas con diversos ratios molares [enzima]:[oro] a una concentración de enzima fija de $4,6 \cdot 10^{-5}$ M. La excitación se realiza a 335 nm y se observa un único máximo de emisión a 620 nm para las concentraciones mayores de oro.

2A.4.3. Caracterización y seguimiento de las propiedades ópticas de AuNMs@LAAO sintetizados.

Las propiedades ópticas del producto final de síntesis se evaluaron por fluorescencia y absorción. La Figura 2A.5A muestra el espectro de absorción de las nanopartículas, con un máximo a 530 nm, coincidente con el color rojizo observado en la disolución final. Para pequeñas

Sección 2A: Modelo de síntesis *in situ* de nanomateriales de oro a partir de los residuos reductores de la enzima L-aminoácido oxidasa.

nanopartículas de oro monodispersas (~ 30 nm), el plasmón superficial provoca una absorción de luz en la parte azul-verde del espectro (~ 530 nm) mientras que se refleja su complementario, produciendo un color rojizo.²⁹ La **Figura 2A.5B** muestra un espectro 3D de fluorescencia realizado a la disolución final de síntesis; este se obtiene haciendo múltiples espectros de emisión (desde 300 a 800 nm) a diferentes longitudes de onda de excitación (desde 250 a 500 nm); de esta manera se puede obtener una representación en 3 dimensiones que se muestra como curvas de nivel, donde del color azul al rojo simboliza de menor a mayor intensidad de fluorescencia. De esta forma es posible encontrar y estudiar todos los máximos de fluorescencia existentes en la disolución, y diferenciarlos del resto.

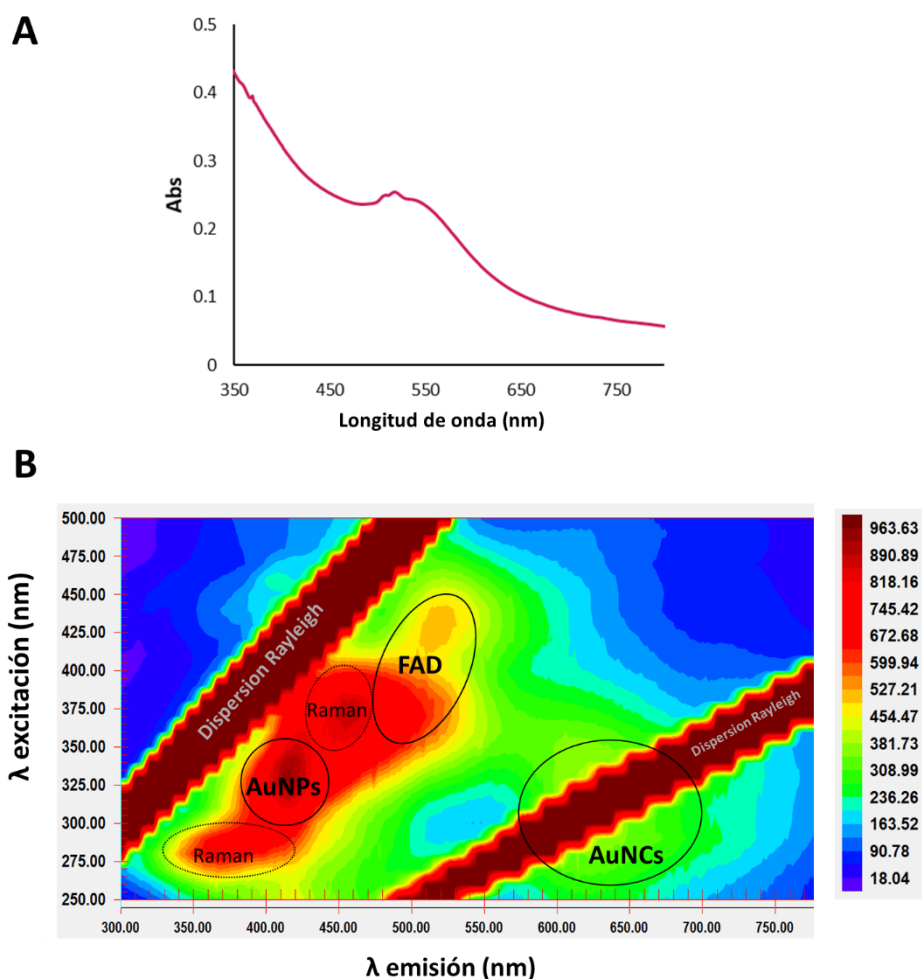


Figura 2A.5: A) espectro de absorción de la síntesis final B) espectro 3D de fluorescencia de la síntesis realizando un barrido de excitación de 250 a 500 nm, midiendo la emisión desde 300 a 800 nm; a la derecha se muestra la intensidad correspondiente a los diferentes colores

Así, en la **Figura 2A.5B** se pueden observar en primer lugar dos bandas intensas debidas a la dispersión Rayleigh, esta luz dispersada tiene la misma longitud de onda que la luz incidente, formando la primera banda diagonal observada a la izquierda del espectro 3D. Al doble de estas longitudes de onda, se puede observar la segunda banda diagonal, que representa el armónico de la dispersión Rayleigh. Así mismo, aparecen bandas casi paralelas a la banda Rayleigh debidas a la dispersión Raman; como se sabe, en este caso, la luz dispersada aparece a longitudes de

onda más largas que las de excitación. Una vez identificados los picos de dispersión, se localizan tres máximos de fluorescencia:

Fluorescencia FAD: se observan los dos máximos de excitación típicos del FAD a las longitudes de onda de 375 y 450 nm, en ambos casos el máximo de emisión aparece a 520 nm (junto a la dispersión Raman del agua, aproximadamente, a 50 nm de la longitud de onda de excitación)

Fluorescencia AuNCs: se observa un máximo de excitación a 350 nm con un amplio pico de emisión (de 550 a 700 nm) con máximo a 630 nm, característico de nanoclusters de oro de pequeño tamaño con fluorescencia próxima al Vis-NIR.

Fluorescencia AuNPs: se observa un máximo de excitación a 330 nm con emisión a 420 nm. Dado que estas longitudes de onda no son propias de fluorescencia de AuNCs, este máximo fue inicialmente asignado a las AuNPs que dotan de color rojizo a la disolución por su absorción a 530 nm. Esta hipótesis, se apoyó en diversa bibliografía que define la existencia de nanopartículas con plasmón y que presentan fluorescencia justo en esta zona del espectro.³⁰ La descripción teórica más actualizada de las principales transiciones de fluorescencia en el oro se basa en el primer modelo propuesto por Mooradian³¹, reforzado con cálculos teóricos de la energía de los estados electrónicos de bandas.^{32,33} Asignando así, la fluorescencia UV a una recombinación de electrones en la banda sp cerca del nivel de Fermi con los huecos en la primera banda d (d1). Este modelo de transiciones ópticas predice, no solo las características espectrales, sino también la relación de la intensidad de fluorescencia con la densidad conjunta de estados y los factores de ocupación.

Una vez identificadas las propiedades ópticas de las AuNPs y AuNCs obtenidas, se decidió realizar el seguimiento de estas propiedades durante la reacción de síntesis para poder entender mejor su mecanismo de formación. Para ello se midieron las propiedades ópticas de absorbancia y fluorescencia en 5 tiempos diferentes: al inicio, tras 1h, tras 2:30 h de reacción, tras 4:30 h de reacción, tras 6:30 h de reacción y al día siguiente, tras 20 h de reacción. El aspecto de estas disoluciones en cada uno de los tiempos de reacción se muestra en la **Figura 2A.6**.

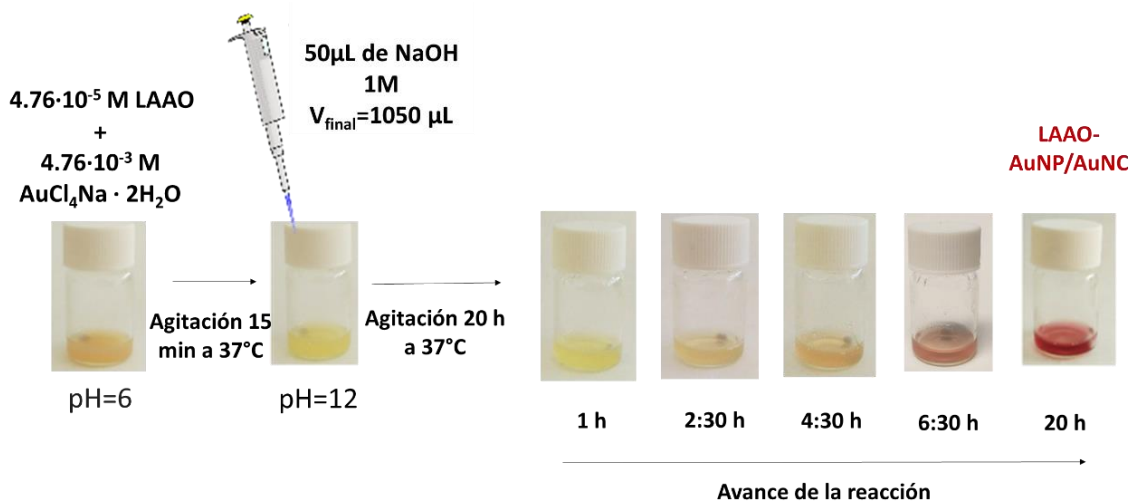


Figura 2A.6: Aspecto de las disoluciones en cada uno de los tiempos de reacción de la síntesis de AuNMs@LAAO a pH 12.

Sección 2A: Modelo de síntesis *in situ* de nanomateriales de oro a partir de los residuos reductores de la enzima L-aminoácido oxidasa.

El seguimiento de las propiedades fluorescentes en los diferentes tiempos de reacción a cada una de las longitudes de onda de interés se muestra en la **Figura 2A.7**. En el caso del FAD se observa cómo, a medida que avanza el tiempo de reacción, su máximo a 525 nm se va definiendo progresivamente hasta quedar perfectamente delimitado, lo que indica un cambio conformacional de la enzima tras la reacción con el oro, que deja su cofactor FAD más expuesto. En el caso de los AuNCs, se observa como su fluorescencia a 630 nm no aparece inicialmente y que es solo a partir de las 6 horas y media cuando esta fluorescencia comienza a observarse. Por último, en cuanto a la fluorescencia de AuNPs a 420 nm, esta aparece desde el momento inicial de la síntesis y va disminuyendo progresivamente con el tiempo de reacción.

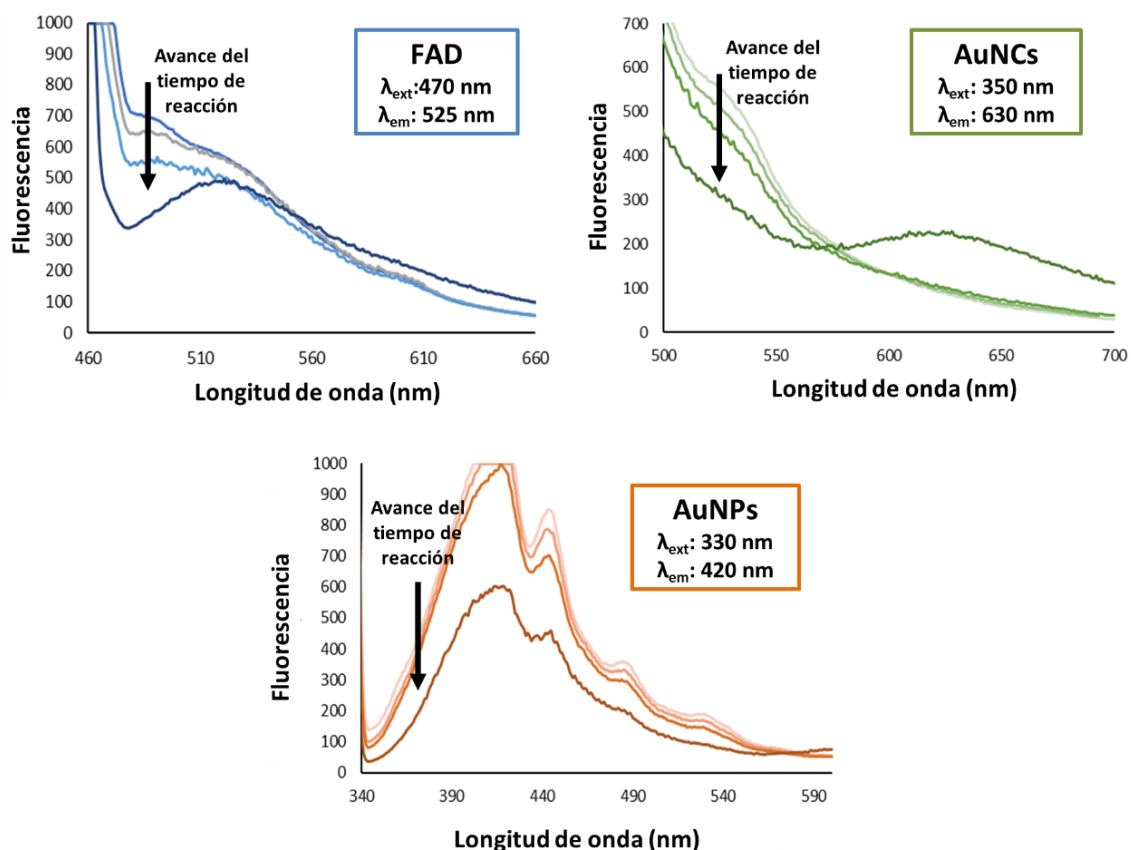


Figura 2A.7: Evolución de la fluorescencia de los distintos espectros de emisión y máximos de interés durante el avance del tiempo de reacción de síntesis de AuNMs@LAAO.

De la misma manera se llevó a cabo el seguimiento de la absorbancia a los distintos tiempos de reacción de síntesis. Como se muestra en la **Figura 2A.8**, el máximo de 530 nm comienza a aparecer a las 6.30 h, momento en el que la disolución se comienza a tornar rojiza, lo que indica la formación de las AuNPs con plasmón de superficie. Este tiempo de reacción coincide con la disminución drástica en la fluorescencia de 420 nm atribuida a estas mismas AuNPs y con la aparición de la fluorescencia a 630 nm atribuida a AuNCs.

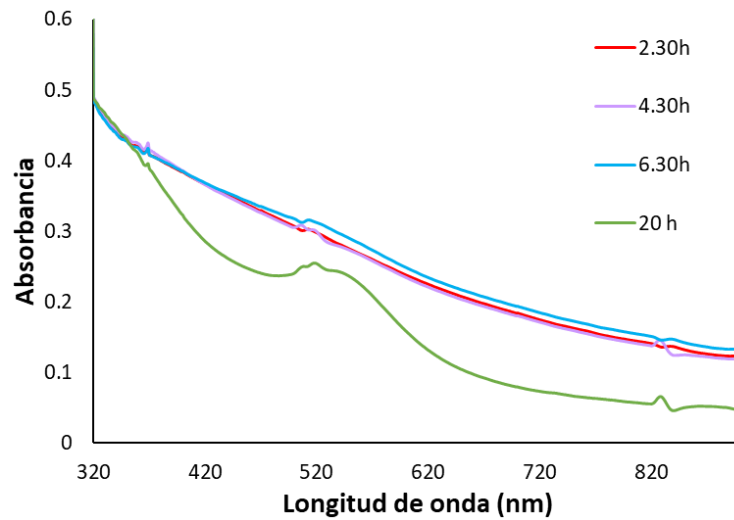


Figura 2A.8: Evolución del plasmón superficial durante el avance del tiempo de reacción de síntesis de AuNMs@LAAO.

Para estudiar en mayor profundidad la correlación entre la formación de AuNPs y AuNCs, se extrajeron los valores de intensidad de fluorescencia a los dos máximos de emisión, 420 nm y 630 nm, respectivamente, durante el tiempo de reacción. La **Figura 2A.9**, muestra la representación de estas intensidades normalizadas respecto al avance de la reacción y confirma que la aparición del máximo de fluorescencia debido a la formación de AuNCs es inversamente proporcional a la disminución de la fluorescencia a 420 nm de las AuNPs.

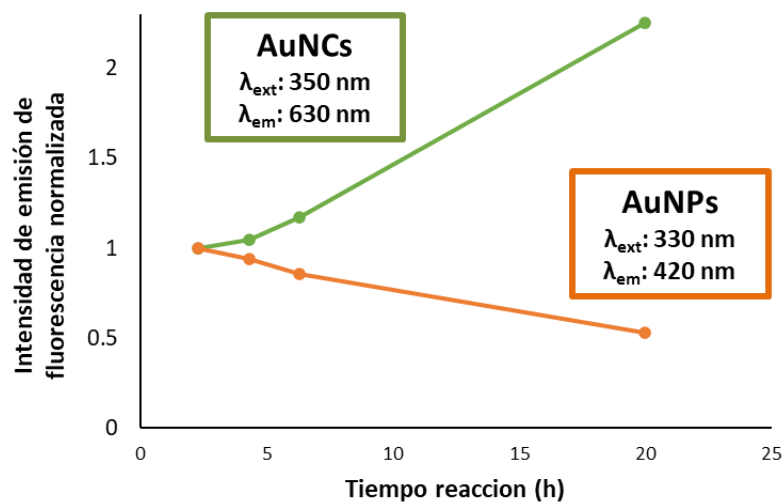


Figura 2A.9: Intensidad de fluorescencia normalizada de AuNCs y AuNPs a los diversos tiempos de reacción.

2A.4.4. Caracterización de AuNMs@LAAO.

En primer lugar, se estudiaron los AuNMs sintetizados, mediante microscopía de transmisión electrónica STEM (modo barrido y transmisión).

Sección 2A: Modelo de síntesis *in situ* de nanomateriales de oro a partir de los residuos reductores de la enzima L-aminoácido oxidasa.

La **Figura 2A.10A** muestra una de las imágenes obtenidas trabajado en modo STEM, donde se observan dos claras poblaciones de partículas esféricas, cuyas distribuciones de tamaños se indican en la **Figura 2A.10B**. En este histograma se puede observar una población de partículas pequeñas, AuNCs ($8,3 \pm 2,7$ nm), libres y separadas entre sí y otra población de nanopartículas grandes, AuNPs ($27,1 \pm 6,9$ nm), que tienden a agruparse y formar grupos de unas 7 nanopartículas rodeados por materia orgánica. Estos resultados indican que la enzima LAO rodea fundamentalmente las AuNPs grandes, confirmando que estas se forman en el entorno de la enzima provocando un cambio conformacional de la misma y la exposición del grupo FAD. Los AuNCs, pequeños y con menos materia orgánica alrededor, parecen independientes a estas agrupaciones.

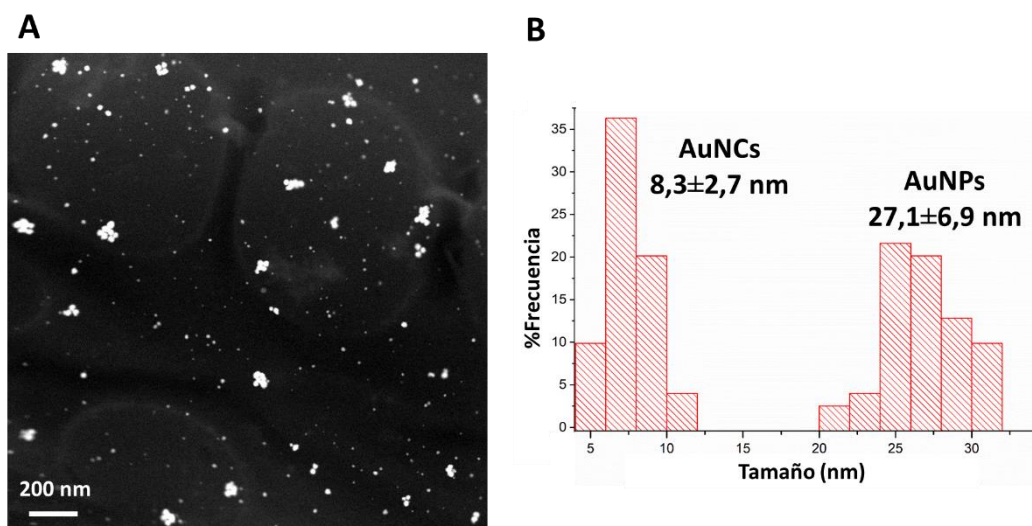


Figura 2A.10: A) imagen STEM de los AuNMs@LAO sintetizados B) histograma correspondiente que representa la distribución de tamaño de partículas.

Para poder asignar de manera experimental cada una de las propiedades ópticas observadas a una de estas poblaciones, se llevó a cabo la separación de estas nanopartículas mediante electroforesis en gel de agarosa. Con ella se pueden separar especies en función del tamaño y la carga. La **Figura 2A.11A** muestra el aspecto del gel después de la electroforesis, donde los AuNPs de color rojizo (población de tamaños mayores) se observan dentro del gel generando una banda rojiza, algo más intensa justo a la salida del pocillo. Si observamos este mismo gel con una lámpara UV, comprobamos la banda fluorescente generada por estas nanopartículas, así como en el interior del pocillo (**Figura 2A.11B**).

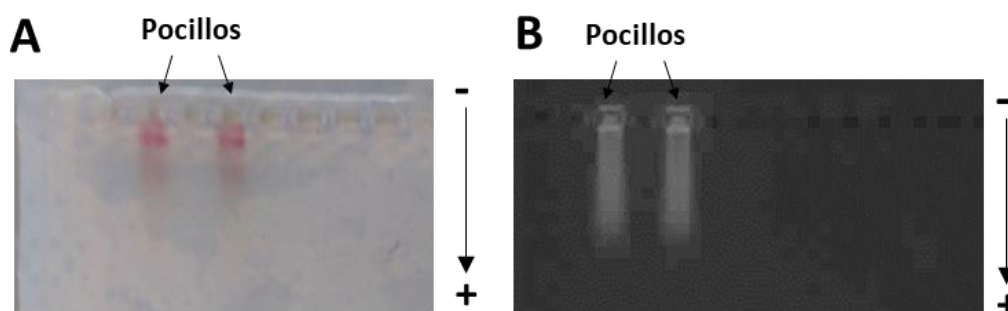


Figura 2A.11: A) Aspecto del gel de agarosa tras la electroforesis para la separación de AuNMs@LAO. B) Aspecto de este mismo gel en lámpara UV, donde se pueden observar las bandas de fluorescencia.

Tras la electroforesis, la muestra restante de los pocillos fue recogida y se realizó un espectro 3D de fluorescencia, para comparar los espectros antes y después de la separación de AuNPs y AuNCs. El análisis de los espectros 3D mostrados en la **Figura 2A.12** revela las siguientes afirmaciones:

- La comparación de ambos espectros 3D muestra, tras la separación, la desaparición del máximo de fluorescencia de 420 nm, asociado a las AuNPs de mayor tamaño que poseen plasmón. Como se observa en la **Figura 2A.11**, son estas AuNPs las que entran en el gel y muestran la banda alargada de fluorescencia. Con lo que se confirma la asociación de esta fluorescencia a las AuNPs grandes.

- Por tanto, es en el pocillo donde quedan los AuNCs de menor tamaño. Por ello, en el espectro de esta muestra (**Figura 2A.12B**) solo se observa el máximo de 630 nm, asociado a estos AuNCs. Las intensidades en este espectro son menores debido a la dilución de la muestra en el pocillo después de la electroforesis.

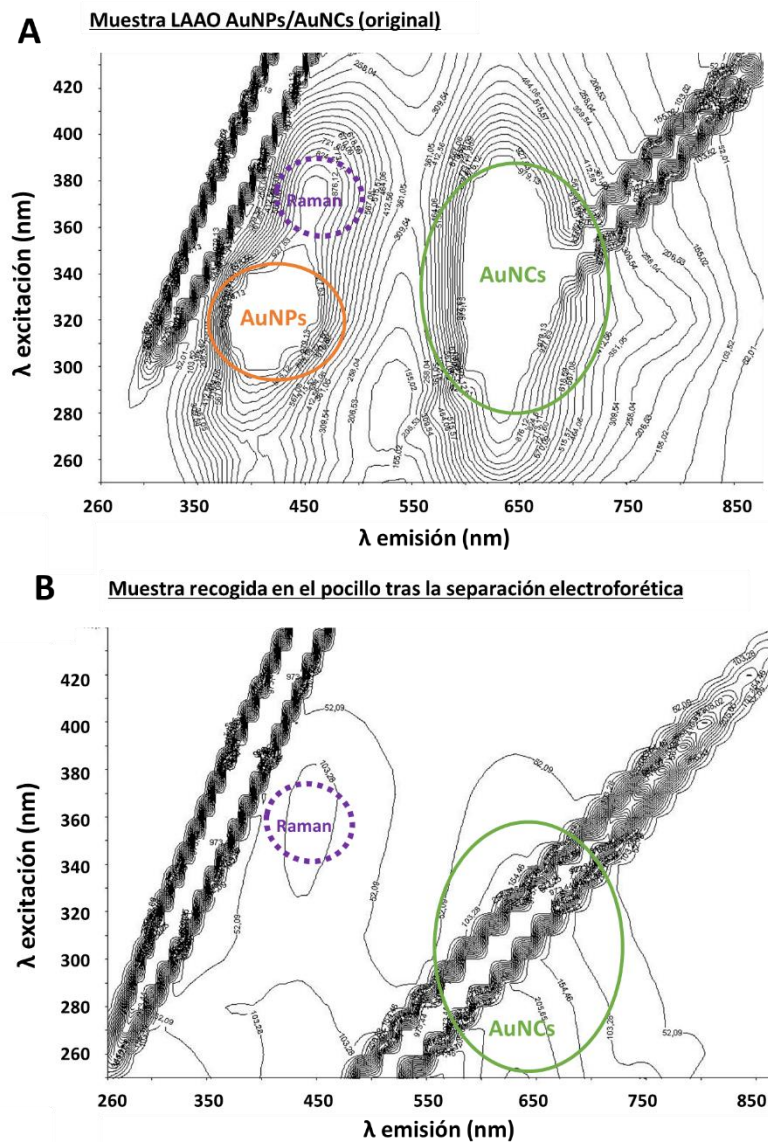


Figura 2A.12: Espectros 3D de fluorescencia realizando un barrido de excitación de 250 a 450 nm, midiendo la emisión desde 260 a 850 nm de las muestras **A)** LAAO AuNPs/AuNCs original **B)** muestra recogida en el pocillo tras la separación electroforética.

Respecto a la separación producida durante este tipo de electroforesis, como ya se ha dicho se produce en función del tamaño y la carga. Por lo que, en este caso, el hecho de que las AuNPs más grandes sean las que atraviesan la agarosa y no los AuNCs más pequeños, indica que la separación es debida a la diferencia de carga de las partículas y no a la diferencia de tamaños. Estos resultados señalan que las AuNPs tienen una gran carga negativa (mucho mayor que los AuNCs) que les hace migrar hacia el polo positivo, lo que corrobora la materia orgánica que les rodea formando las agrupaciones observadas en las imágenes STEM (**Figura 2A.10A**). Las AuNPs más grandes se agrupan rodeadas por la enzima LAAO ($pI = 4,4$)¹⁴, que al pH final de la síntesis (en torno a 12) se encuentra totalmente desprotonada y cargada negativamente, lo que hace a estas partículas correr más en el gel.

2A.4.5. Conclusiones y mecanismo de síntesis de AuNMs@LAAO

La síntesis de nanopartículas estabilizadas por la enzima LAAO ha mostrado la aparición de dos tipos de partículas:

- **AuNPs** de tamaño en torno a 27 nm, que se muestran agrupadas y rodeadas por gran cantidad de enzima. Estas AuNPs presentan fluorescencia (λ_{ext} : 330 nm y λ_{em} : 420 nm) desde el momento inicial de síntesis, pero a las 6,30 horas de reacción esta fluorescencia disminuye y aparece el plasmón superficial a 530 nm, que dota de color rojizo a la disolución.

- La disminución de la fluorescencia a 420 nm y la aparición del plasmón, coincide con la aparición de la fluorescencia de otro tipo de partículas, los nanocluster de oro (λ_{ext} : 350 nm y λ_{em} : 630 nm). Estos **AuNCs** muestran pequeños tamaños, en torno a 8 nm y se presentan libres y separados entre sí, con una baja densidad de materia orgánica.

Las conclusiones extraídas mediante estos resultados llevaron al planteamiento de una hipótesis que podría explicar el mecanismo de síntesis de estas nanopartículas (**Figura 2A.13**).

Así, por un lado, las AuNPs con fluorescencia a 420 nm se formarían al principio de la reacción, gracias a los residuos reductores de la enzima LAAO. En este momento inicial, estas nanopartículas mostrarían tamaños inferiores a los finalmente observados, sin presentar plasmón superficial.

El avance del tiempo de reacción supondría una mayor reducción y estabilización de las nanopartículas, mediada por los residuos aminoácidos de la enzima implicados. Así, estas AuNPs irían creciendo, mostrando un descenso en la fluorescencia y la aparición del plasmón superficial. La agrupación de estas AuNPs junto con la enzima LAAO podría dar lugar a autoabsorción, ocasionando el quenching fluorescente observado.

Además, un mayor grado de implicación de la enzima en el proceso de estabilización de estas AuNPs, provocaría el cambio conformacional de la enzima LAAO, exponiendo su cofactor FAD, que consecuentemente muestra una mayor definición de su máximo de fluorescencia.

Por otro lado, nuestra hipótesis plantea que los AuNCs también se formarían desde el momento inicial de reacción, sin embargo, la observación de su fluorescencia no sería posible hasta la agrupación de las AuNPs más grandes. Debido a que la longitud de onda de excitación de ambos tipos de nanopartículas coincide, esta podría ser absorbida únicamente por las AuNPs con emisión a 420 nm, predominantes poblacionalmente. En el momento de la agrupación de estas

Sección 2A: Modelo de síntesis *in situ* de nanomateriales de oro a partir de los residuos reductores de la enzima L-aminoácido oxidasa.

a las observadas tras la reacción de síntesis, una vez las AuNPs/AuNCs se han formado (línea naranja). Esta potenciación de la fluorescencia del FAD se puede atribuir, como ya se ha dicho, al cambio conformacional de la enzima implicada en la síntesis de las nanopartículas y la consecuente exposición del cofactor FAD. Por último, se observa como la disolución de las LAAO-AuNPs/AuNCs en disolución amortiguadora fosfato pH 7,5 conlleva a un aumento de la fluorescencia del FAD (línea violeta).

De la misma forma a **Figura 2A.15**, muestra los espectros de excitación y emisión de los AuNCs formados, donde se muestra un ligero aumento de la fluorescencia a pH 7,5.

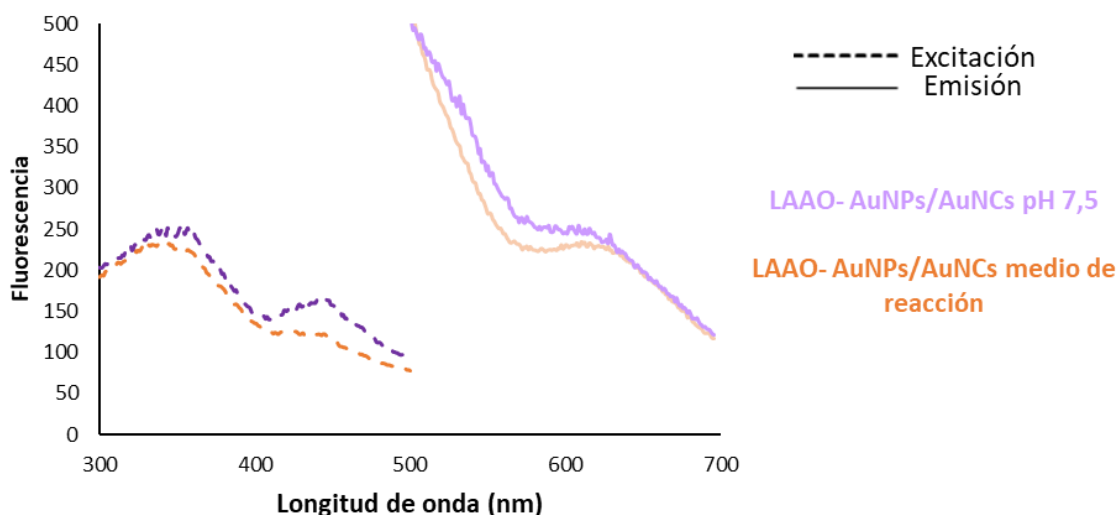


Figura 2A.15: Espectros de excitación (λ_{em} : 630 nm) y emisión (λ_{ext} :350 nm) de los AuNCs en el medio de reacción de síntesis y en disolución amortiguadora fosfato pH 7,5.

La estabilidad de estas nanopartículas al pH óptimo de la reacción enzimática LAAO-sustrato, presenta posibilidades en su aplicación al desarrollo de biosensores para la determinación cuantitativa de L-fenilalanina.

2A.4.7. Estudio por fluorescencia de la reacción enzimática entre AuNMs@LAAO y L-fenilalanina.

Como se ha explicado, la fluorescencia del cofactor FAD de la enzima L-aminoácido oxidasa está altamente desactivada por el medio, lo cual hace que estas propiedades espectroscópicas no pueden usarse como método de determinación.

Dado que la reacción enzimática genera H_2O_2 como producto, para la evaluación de esta reacción enzimática se añadió la enzima catalasa antes de la adición del L-fenilalanina, que cataliza la dismutación de H_2O_2 en agua y oxígeno, lo que acelera la regeneración de la enzima.

La **Figura 2A.16**, muestra el seguimiento de la fluorescencia del cofactor FAD (λ_{ext} :470 nm y λ_{em} : 525 nm) durante la reacción de la enzima LAAO libre y su sustrato L-fenilalanina. Así, se observa una muy lenta reducción del FAD (con tiempos superiores a una hora), que indican una cinética de reacción muy lenta, lo cual dificulta la determinación de fenilalanina mediante este método.

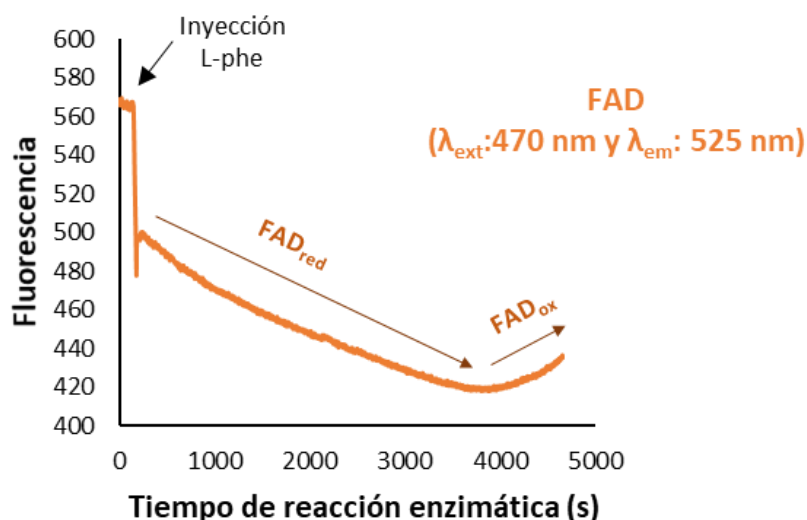


Figura 2A.16: Variación de fluorescencia del FAD durante la reacción enzimática de la enzima LAAO libre ($7,69 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) con L-fenilalanina (L-Phe) $5,38 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ en disolución amortiguadora fosfato 0,2 M pH 7,5. Previo a la inyección del sustrato, se añaden 5 μL de catalasa 0,60 mg/mL.

En este punto, se decidió estudiar las posibilidades de los AuNMs@LAAO sintetizados, en su aplicación a la detección enzimática de L-fenilalanina, observando los cambios en la emisión tanto del FAD de la enzima, como de la fluorescencia Vis-NIR de AuNCs ($\lambda_{ext}: 350 \text{ nm}$ y $\lambda_{em}: 630 \text{ nm}$) durante la reacción. Se siguió también la fluorescencia de las AuNPs con emisión a 420 nm durante la reacción enzimática, sin observar variaciones.

La variación de la intensidad normalizada de estos máximos de fluorescencia frente al tiempo de la reacción enzimática se representa en la **Figura 2A.17**:

a) **Comportamiento del FAD:** al añadir L-fenilalanina ($t=100 \text{ s}$), en primer lugar, se observa una bajada de la fluorescencia debida a la dilución, a partir de este punto, la fluorescencia del FAD disminuye (reducción del FAD, mediada por el consumo de O_2). Tras unos 30 minutos, la fluorescencia comienza a aumentar hasta el valor inicial alcanzando un valor constante, indicativo de la regeneración completa de la enzima por la re-oxidación del FAD.

b) **Comportamiento de AuNCs:** como se detalla en el Capítulo 1 (sección 1B), los AuNCs presentan largos tiempos de vida de fluorescencia, lo cual favorece la desactivación fluorescente por el oxígeno (desactivación colisional), produciendo una disminución en la intensidad de la fluorescencia emitida. Así, como se observa en la **Figura 2A.17**, el consumo del O_2 durante la reducción de la LAAO en su reacción con L-Phe, se ve reflejado como un aumento en la fluorescencia de AuNCs (aumento durante los 30 min de la reducción). Después, en la re-oxidación, la disolución va captando O_2 del aire hasta volver a la concentración inicial de saturación, que producirá de nuevo la desactivación de la fluorescencia de AuNCs. Esta recuperación del oxígeno en la disolución es muy paulatina y depende fundamentalmente de la difusión del oxígeno en el interior de la cubeta.

Sección 2A: Modelo de síntesis *in situ* de nanomateriales de oro a partir de los residuos reductores de la enzima L-aminoácido oxidasa.

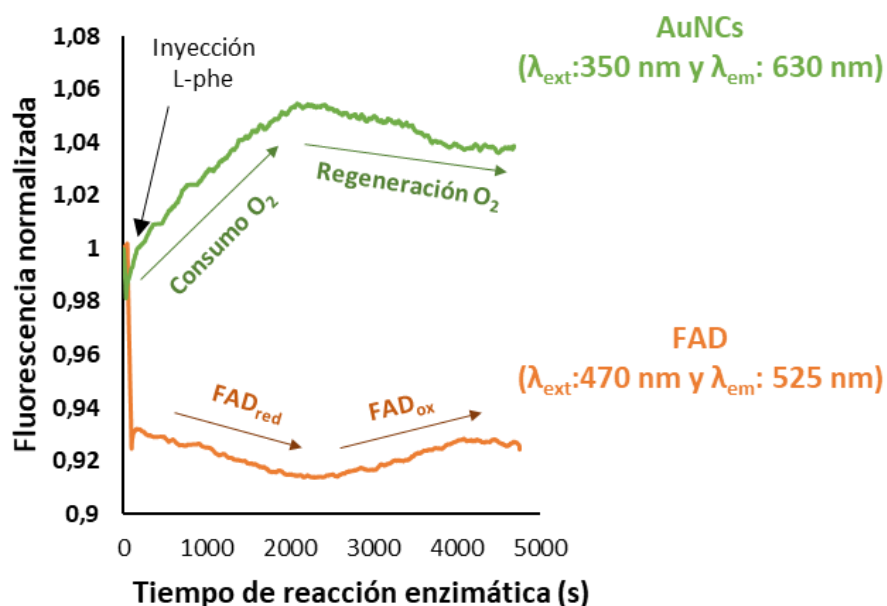


Figura 2A.17: Variación de fluorescencia del FAD y de AuNCs durante la reacción enzimática de con L-fenilalanina (L-Phe) $5,38 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ en disolución amortiguadora fosfato 0,2 M pH 7,5. Previo a la inyección del sustrato, se añaden $5 \mu\text{L}$ de catalasa 0,60 mg/mL.

Estos resultados parecen indicar una cinética de reacción de la enzima LAAO-AuNP/AuNCs con su sustrato más rápida. Esto puede ser debido al cambio conformacional de la enzima tras la reacción con el oro, que como se observó, conlleva a la mayor exposición de su cofactor FAD y por tanto de su centro activo, situado al final de los canales de O_2 definidos por su estructura cristalina.¹¹ Sin embargo, a pesar de que la cinética de la enzima mejora, los cambios de fluorescencia del FAD observados durante la reacción son pequeños, lo que se traduciría en un método analítico con baja sensibilidad y posiblemente, baja reproducibilidad.

Alternativamente, la variación en la fluorescencia de los AuNCs observada, es proporcional al consumo de oxígeno durante la reacción enzimática y por tanto a la concentración de sustrato. De esta forma, la variación de esta fluorescencia podría utilizarse como parámetro para la cuantificación del sustrato L-fenilalanina. Sin embargo, los tiempos de reacción observados, siguen considerándose demasiado largos para establecer este como un método de determinación útil.

2A.5. Conclusiones específicas de la sección 2A

En esta sección se ha evaluado la síntesis *in-situ* de AuNMs a partir de los residuos reductores de la enzima LAAO. Para ello se ha estudiado la estructura de la enzima y asegurado sus posibilidades para la síntesis mediada por sus residuos proteicos, extrayéndose las siguientes conclusiones:

1. A través de la optimización de los factores implicados en la síntesis, se han obtenido dos tipos de nanoestructuras, lo que ha permitido conocer en mayor profundidad las bases de esta metodología de síntesis.
2. La caracterización de sus propiedades estructurales y ópticas ha mostrado la existencia de AuNCs ($8,3 \pm 2,7$ nm) con fluorescencia en el Vis-NIR (λ_{ext} : 350 nm y λ_{em} : 630 nm) y otra población de nanopartículas grandes, AuNPs ($27,1 \pm 6,9$ nm) agrupadas y rodeadas por materia orgánica que presentan fluorescencia (λ_{ext} : 330 nm y λ_{em} : 420 nm) y plasmón superficial a 530 nm.
3. Los resultados obtenidos en la caracterización han llevado al planteamiento de una hipótesis que podría explicar el mecanismo de síntesis de estas nanopartículas.
4. Por último, se han estudiado las posibilidades de los AuNMs sintetizados, en su aplicación a la detección enzimática de L-fenilalanina. Los resultados han mostrado una cinética de reacción de la enzima LAAO con su sustrato más rápida, sin embargo, los cambios de fluorescencia del FAD observados durante la reacción son insuficientes para el desarrollo de un método analítico.
5. Alternativamente, se ha observado la variación en la fluorescencia de los AuNCs sintetizados, proporcional al consumo de oxígeno durante la reacción enzimática y por tanto a la concentración de sustrato. Sin embargo, los tiempos de reacción observados, siguen considerándose demasiado largos para establecer este como un método de determinación útil.

Se ha demostrado que la síntesis *in situ* de AuNCs biofuncionalizados y el seguimiento de las propiedades fluorescentes de estos, es un método adecuado para la determinación de sustratos sin el uso de reacciones indicadoras, que puede ser aplicado a otras enzimas, cuya cinética de reacción favorable, permita el desarrollo de métodos analíticos.

Sección 2B

Formación de nanopartículas de oro
como indicador de métodos
enzimáticos: determinación
colorimétrica de L-fenilalanina

2B.1. Introducción

La L-fenilalanina (L-Phe) es un aminoácido esencial, forma parte de muchas proteínas y es una fuente de tirosina (Tyr), que se sintetiza enzimáticamente con la participación de la enzima fenilalanina hidroxilasa (PAH) (**Figura 2B.1**). Esta reacción requiere del cofactor tetrahidrobiopterina (BH₄), que se oxida en presencia de oxígeno a dihidrobiopterina (BH₂). Normalmente, el 75 % de la Phe se oxida a Tyr, y el 25 % restante se incorpora a las proteínas

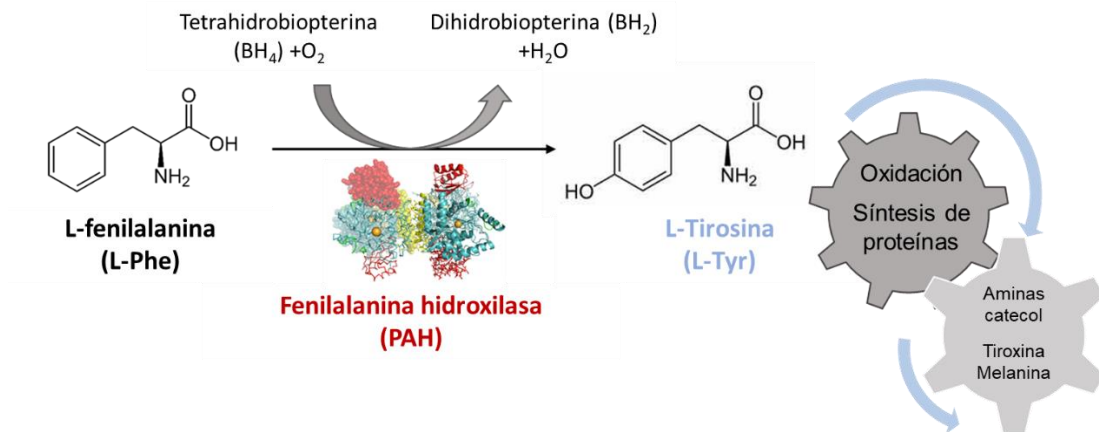


Figura 2B.1: Reacción de conversión de fenilalanina en tirosina mediada por la enzima hepática fenilalanina hidroxilasa (PAH) e implicación de la tirosina en el cuerpo humano.

La determinación cuantitativa de L-Phe en fluidos fisiológicos es crucial en el diagnóstico y tratamiento de trastornos de su catabolismo, como la fenilcetonuria (PKU), un trastorno genético caracterizado por la deficiencia en el hígado de la PAH, lo que conduce a una acumulación excesiva de Phe en el suero sanguíneo y a un defecto de Tyr.³⁴ La Tyr es esencial para la síntesis de neurotransmisores y la síntesis de hormonas tiroideas o de melanina. Por otro lado, el exceso de fenilalanina tóxica se acumula en el organismo (sangre, orina, tejidos y cerebro) lo cual ocasiona daños en el sistema nervioso, provocando discapacidad intelectual grave, retraso en el desarrollo y en otros casos más leves, daños cutáneos.³⁵ Para evitar estos problemas los pacientes con PKU, deben controlar su alimentación para mantener los niveles de fenilalanina adecuados en la sangre, evitando la ingesta de alimentos en alto contenido proteico. (**Figura 2B.2**)



Figura 2B.2: Daños producidos por la ingesta de alimentos con alto contenido proteico en pacientes con PKU.

Se consideran niveles de fenilalanina adecuados para el desarrollo cerebral normal aquellos inferiores a 120 μM ; los niveles normales en plasma están en torno a 50 μM . La fenilcetonuria no tratada se asocia con concentraciones plasmáticas de Phe superiores a 1000 $\mu\text{mol/L}$. Concentraciones por encima del valor normal de 120 μM , pero inferior a 1000 $\mu\text{mol/L}$ se asocian a hiperfenilalaninemia sin PKU, las personas con estos niveles tienen un riesgo mucho menor de deterioro cognitivo en ausencia de tratamiento.³⁶

Los niveles de fenilalanina se controlan comúnmente mediante métodos basados en cromatografía de gases y espectrometría de masas en tándem, altamente sensibles (límite de detección 1 nM)^{37,38}. En bibliografía también se encuentran diferentes métodos enzimáticos (LD 15 μM)³⁹ y fluorimétricos (LD 25 μM ⁴⁰, LD 0,3 μM ³⁹), aunque no se aplican de forma rutinaria. Otros métodos utilizados en clínica, con peor sensibilidad que los cromatográficos pero de simple aplicación, son ensayos bacteriológicos de inhibición bacteriana (BIA) como la metodología de Guthrie^{42,43}, con un límite de detección de fenilalanina de 120 μM ⁴⁰. Todos estos métodos requieren tiempo, y en algunos casos preparación de muestras compleja o instrumentación sofisticada que ha de ser manipulada por personal cualificado. Frente a estos inconvenientes, los biosensores se presentan como métodos analíticos sencillos, basados en reacciones bioquímicas específicas, capaces de detectar en tiempo real y con una alta sensibilidad y selectividad agentes biológicos. Los biosensores colorimétricos destacan por presentar varios factores clave como son la sencillez y la respuesta rápida mediante la detección visual, sin necesidad de instrumental para su detección y la posibilidad de la cuantificación usando equipos sencillos. La nanotecnología aplicada en este tipo de sensores mediante el uso de la resonancia de plasmón de nanopartículas, permite en muchos casos la detección sensible de diversas biomoléculas.³

Las estrategias actuales utilizadas para las determinaciones colorimétricas basadas en reacciones oxidasa, como la de la enzima LAAO y L-Phe, consisten en acoplar una reacción indicadora enzimática basada en la enzima HRP, que cataliza la conversión de sustratos cromogénicos (por ejemplo, TMB o ABTS) en productos coloreados tras el proceso de oxidación.^{44,45} Sin embargo, el uso de este tipo de colorantes, presenta problemas como su baja estabilidad, complejo comportamiento redox y la posibilidad de su oxidación parcial por el O_2 presente en el aire. Además, especies reductoras en la muestra pueden interferir en la oxidación de estos colorantes o estos mismos pueden reaccionar con el producto del analito.^{46,47}

Ante estos problemas, la búsqueda de nuevas estrategias basadas en el uso de AuNPs como sustituto del reactivo cromogénico, nos planteó la exploración de un nuevo concepto sintético-sensor: la síntesis de AuNPs a partir de Au(III) durante la reacción enzimática como método de detección alternativo.

Por todo ello, en esta sección, se presenta un método enzimático-colorimétrico basado en la reacción entre L-Phe y la enzima L-aminoácido oxidasa (LAAO) en presencia de Au (III), que conducen a la formación in situ de nanopartículas de oro. **(Figura 2B.3)** Así, el color o la intensidad de la banda de plasmón de las nanopartículas generadas (550 nm) se puede relacionar con la concentración de L-Phe en la muestra.

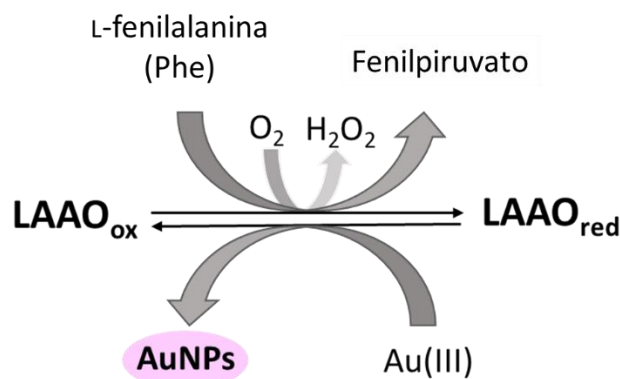


Figura 2B.3: Esquema de la reacción de la enzima oxidoreductasa LAAO con su analito L-fenilalanina en presencia de Au (III)

El mecanismo cinético de este tipo de enzimas ha sido estudiado ¹³ y se resume en la **Figura 2B.4**. El centro FAD de las L-aminoácido oxidasas cataliza la desaminación oxidativa de una amplia gama de L-aminoácidos. Durante la semirreacción reductora, el aminoácido se oxida al iminoácido con la reducción consecuente del cofactor FAD. El iminoácido producto de oxidación sufre una hidrólisis no enzimática para dar el respectivo α -cetoácido y amoníaco. Por último, una semirreacción oxidativa completa el ciclo catalítico re-oxidando el FAD con oxígeno molecular y produciendo peróxido de hidrógeno. Dado que el Au (III) es también capaz de re-oxidar el FAD y transformarse en Au⁰, esto puede demostrar el mecanismo propuesto.

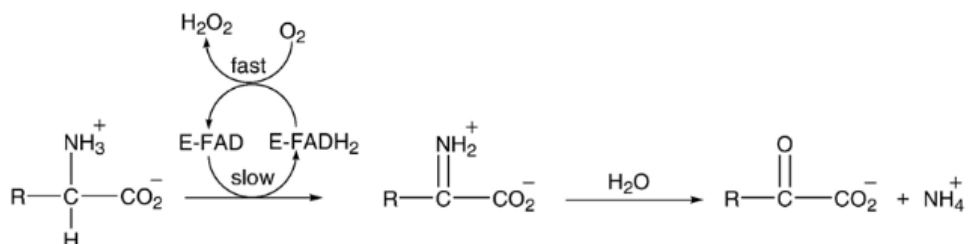


Figura 2B.4: Mecanismo de la reacción de desaminación oxidativa de L-aminoácidos mediada por enzimas L-aminoácido oxidasas.¹³

2B.2. Objetivos

El objetivo de esta sección es la optimización y conocimiento del mecanismo de la síntesis de AuNPs a partir de las propiedades redox de la enzima LAAO y su sustrato L-fenilalanina. Para ello se propusieron los siguientes objetivos específicos:

1. Estudio del mecanismo de la reacción enzimática LAAO- L-Phe en presencia de Au (III), a través de la evaluación y optimización de las condiciones experimentales como el orden de adición de reactivos, la cantidad de enzima LAAO, la concentración de Au(III), la naturaleza de la disolución amortiguadora y su pH y el tiempo de reacción enzimática LAAO – Phe antes de la adición de oro.
2. Optimización de la cinética y calibración del método para la detección de L-Phe mediante la relación de las propiedades ópticas de las nanopartículas formadas y la concentración de L-Phe.
3. Estudio de interferencias para la determinación de L-Phe en presencia de otros aminoácidos presentes en suero sanguíneo.

2B.3. Experimental y métodos

2B.3.1. Screening en placa

Los estudios en placa se usaron para hacer estimaciones semi-cuantitativas del efecto de las diferentes variables en la señal, así como del efecto de la concentración de analito. Se realizaron con arreglo al siguiente protocolo: El volumen final de cada pocillo fue de 200 μL . En primer lugar, se disolvió la enzima a la concentración requerida en 150 μL de disolución amortiguadora, después se añadieron 20 μL de L-Phe de la concentración de interés y por último, tras 5 minutos, se añadieron 30 μL de la concentración de oro a estudiar. El seguimiento de la reacción se llevó a cabo durante 12 h. En todos los casos las medidas de absorbancia se llevaron a cabo utilizando el espectrofotómetro microplacas Multiskan Sky (Thermo Scientific, MA, EE.UU.) y realizando un barrido de la absorbancia del pocillo desde 250 a 900 nm.

2B.3.2. Optimización en cubeta

Una vez estudiados los parámetros clave de esta metodología mediante el screening en placa y partiendo de esta evaluación previa, se llevó a cabo una optimización en mayor profundidad, mediante medidas en cubeta, utilizando volúmenes superiores (1,5 mL) y a una temperatura constante de 37°C. En todos los casos el procedimiento fue el siguiente: se añaden sobre la cubeta 1379 μL de la disolución amortiguadora del pH adecuado conteniendo la enzima LAAO de concentración adecuada; a continuación 100 μL de la disolución de L-Phe a analizar. Se deja transcurrir un tiempo para la reacción y posteriormente se añaden 21 μL de la disolución de Au(III) 50 mM. Todas las medidas de absorción en cubeta se realizaron en un espectrofotómetro Specord 210 Plus termostatzado a 37°C.

2B.3.3. Estudio de caracterización analítica: parámetros de calidad e interferencias.

La evaluación del método para la determinación de L-Phe se llevó a cabo en cubeta, siguiendo un procedimiento similar al indicado en el apartado anterior. Sobre 1379 μL de disolución amortiguadora fosfatos 0,1M pH 6,5 con una concentración 0,8 mg/mL de la enzima LAAO, se añadieron 100 μL de L-Phe de la concentración necesaria para que en el volumen final equivalga a 15, 50, 150, 250, 400, 500 y 1000 μM . Transcurridos 20 minutos de reacción, se añadieron 21 μL de Au (III) 3,5 mM para que en el volumen final la concentración de oro sea 0,7 mM. Después de 4 h a 37°C, se realizaron las medidas de absorción de las cubetas en el espectrofotómetro Specord 210 Plus.

Usando un procedimiento similar al descrito, se realizó un estudio de interferencias de otros L-aminoácidos, los más abundantes en el plasma sanguíneo: L-glutamina, L-valina, L-serina y L-cisteina fueron compradas en Sigma Aldrich.

2B.4. Resultados

2B.4.1. Estudio y optimización del orden de adición de los reactivos: LAAO, L-fenilalanina y Au(III)

En primer lugar, se estudiaron dos opciones respecto el orden de adición de los reactivos:

Orden de adición A: disolución amortiguadora → LAAO → L-Phe → Au(III)

Orden de adición B: disolución amortiguadora → Au(III) → LAAO → L-Phe

En ambos casos la reacción se llevó a cabo durante 20 horas. La **Figura 2B.5** muestra los resultados obtenidos para ambos casos, en la que se observa la necesidad de la reacción enzimática previa a la adición del oro, de lo contrario no se observa la aparición del plasmón entorno a 570 nm, asociado a la síntesis de nanopartículas.

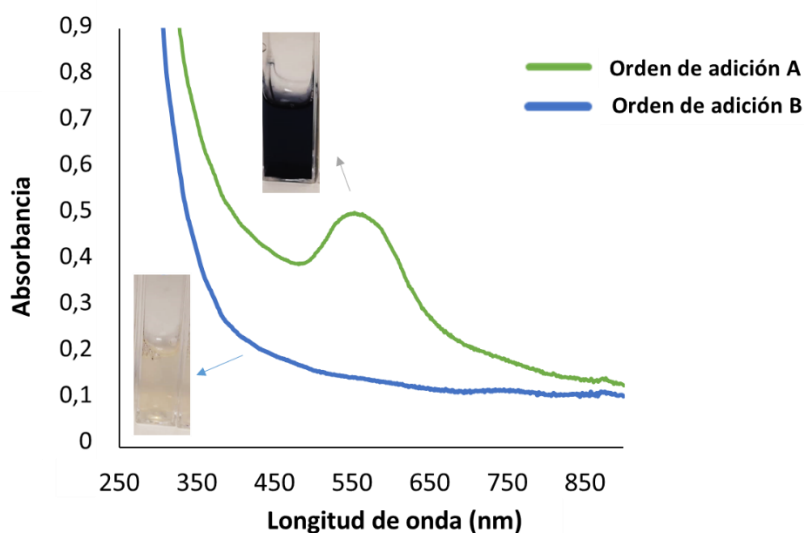


Figura 2B.5: Espectros de absorción molecular obtenidos (20 horas) tras la reacción de 0,5 mg/mL de LAAO y AuCl₄Na 1 mM en presencia de fenilalanina 2.2·10⁻³ mM en disolución amortiguadora TRIS pH 6,5 0,1 M utilizando los dos órdenes de adición indicados.

2B.4.2. Mecanismo de la reacción enzimática LAAO- L-fenilalanina en presencia de Au (III).

La capacidad intrínseca reductora de la LAAO, fue estudiada en la sección 2A mostrando que estas proteínas son capaces de generar nanoestructuras de Au mediante la participación de algunos de sus residuos aminoácidos. Para ello es necesario un exceso de Au(III) (~5 mM) y una alta concentración de la enzima LAAO (6,5 mg/mL). Sin embargo, en este caso, la metodología planteada no precisa de tan altas cantidades de oro y enzima, ya que se pretende que en ausencia del analito fenilalanina, no se observe la formación de AuNPs. Esto se observa en la **Figura 2B.6**, que muestra un experimento inicial, en el que se evalúan las capacidades reductoras de la LAAO en presencia y ausencia del analito utilizando bajas concentraciones de

oro y enzima. Ambas reacciones se incubaron a temperatura ambiente durante 20 horas, tiempo suficiente para asegurar la no implicación de los residuos reductores de la enzima. De esta forma, se puede observar que en ausencia de fenilalanina no se produce formación de ningún tipo de nanoestructura, no se observa ninguna propiedad óptica (plasmón o fluorescencia) en la disolución. Por el contrario, en presencia del sustrato fenilalanina, se observa la existencia de nanopartículas con plasmón de superficie alrededor de 570 nm.

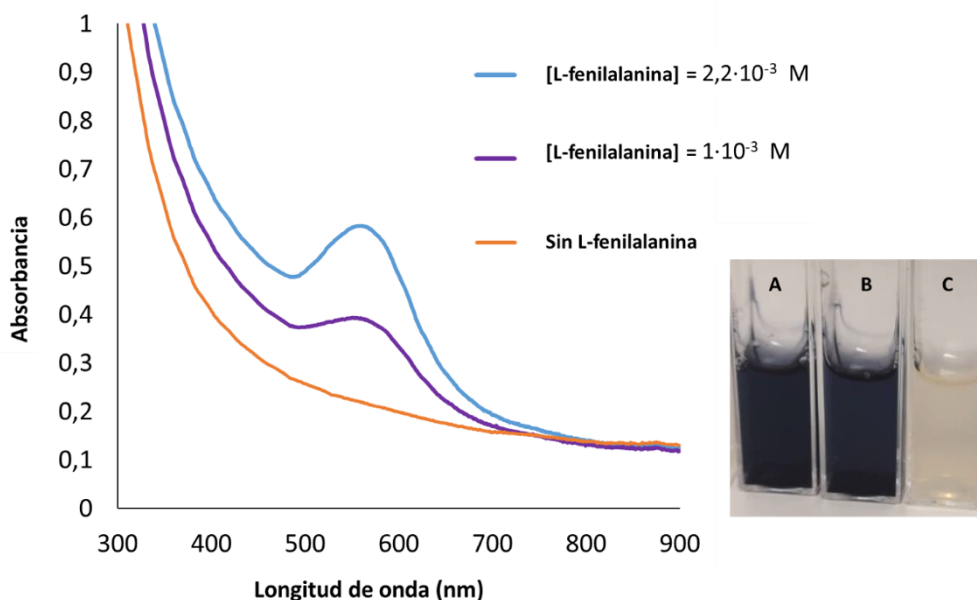


Figura 2B.6: Espectros de absorción molecular obtenidos al final de la reacción de LAAO y AuCl_4Na en presencia y en ausencia de fenilalanina. Condiciones experimentales utilizadas inicialmente: $[\text{Au(III)}] = 1 \text{ mM}$, $[\text{LAAO}] = 0,5 \text{ mg/mL}$, disolución amortiguadora TRIS pH 6,5 0,1 M, con: A) $[L\text{-fenilalanina}] = 2,2 \cdot 10^{-3} \text{ mM}$ B) $[L\text{-fenilalanina}] = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mM}$ y C) sin ella; los espectros se obtuvieron después de 20 h de reacción.

Los cambios en la intensidad de la banda de plasmón observados en la figura 2B.4 son debidos a que la cinética de formación de AuNPs aumenta cuando la concentración de L-Phe es más alta que la del O_2 (es decir, se consume todo el O_2 de la solución), lo que favorece que el Au (III) participe en la reacción enzimática. La posibilidad de que los iones metálicos puedan actuar como sustratos de enzimas se ha comprobado recientemente⁴⁸, lo que refuerza la hipótesis de que el centro activo de la enzima pueda ser el responsable de la formación de AuNPs. De ser así, tras la reacción enzimática LAAO-L-fenilalanina, el centro catalítico de la enzima reducida sería regenerado por la sal de Au (III), que se reduciría a Au^0 produciendo la reoxidación del centro activo de la enzima. Gracias a la proteína presente, la forma Au^0 se estabiliza como AuNPs. No obstante, para tener certeza sobre este mecanismo será necesario realizar, en el futuro, ensayos adicionales que demuestren la interacción redox FAD/Au o, en su defecto, la existencia de otros tipos de procesos secundarios que induzcan o faciliten la formación de las AuNP durante la reacción.

2B.4.3. Optimización de la síntesis de AuNPs para la determinación colorimétrica de L-fenilalanina

2B.4.3.1. Screening en placa

Son varios los factores experimentales a estudiar en esta metodología que pueden afectar a la señal analítica obtenida. Los más importantes son:

- a) Cantidad de enzima LAAO: afecta al desplazamiento de la longitud de onda, la estabilidad de las AuNP formadas y la intensidad del plasmón, que limita la sensibilidad del método.
- b) Concentración de Au(III): mayores concentraciones generan una mayor cantidad de AuNPs o un mayor tamaño, afectando también al desplazamiento de la longitud de onda.
- c) Naturaleza de la disolución amortiguadora y su pH: afecta a la cinética de la reacción enzimática y a la estabilidad de las AuNPs.
- d) Tiempo de reacción enzimática LAAO – Phe antes de la adición de oro: es el tiempo de conversión de la L-Phe en su producto fenilpiruvato. Un mayor tiempo de reacción enzimática antes de añadir el oro supone una mayor conversión del sustrato y por tanto una mayor reducción de la enzima. Este tiempo afecta a la velocidad de formación de las AuNPs.

Dado que el resultado de la optimización puede depender de las condiciones de partida usadas en cada estudio, se realizaron varios ensayos multivariable en los que se analizó el efecto simultáneo de varios de estos factores al mismo tiempo.

En primer lugar, para conocer mejor el efecto de la variación de estos parámetros, se llevó a cabo un cribado en placa de diversas condiciones de los factores clave a estudiar (ensayo multivariable): la concentración de oro (0,2 mM, 0,5 mM y 1 mM), la cantidad de enzima (0,3 y 0,5 mg/mL) y el pH de la disolución amortiguadora TRIS 0,1 M (pH 6,5 y 7) evaluando en todos los casos la reacción para diversas concentraciones de L-Phe (15, 20, 50, 100 y 500 mM). El volumen final de cada pocillo fue de 200 μ L, en primer lugar, se disolvió la enzima a la concentración determinada en 150 μ L de disolución amortiguadora, después se añadieron 20 μ L de fenilalanina a la concentración de interés y por último, tras 5 minutos se añadieron 30 μ L de la concentración de oro a estudiar. El seguimiento de la reacción se llevó a cabo durante 12 h. El diseño experimental en placa se muestra en la **Figura 2B.7A** (Diseño experimental A) y los resultados obtenidos se indican en la **Figura 2B.7B**

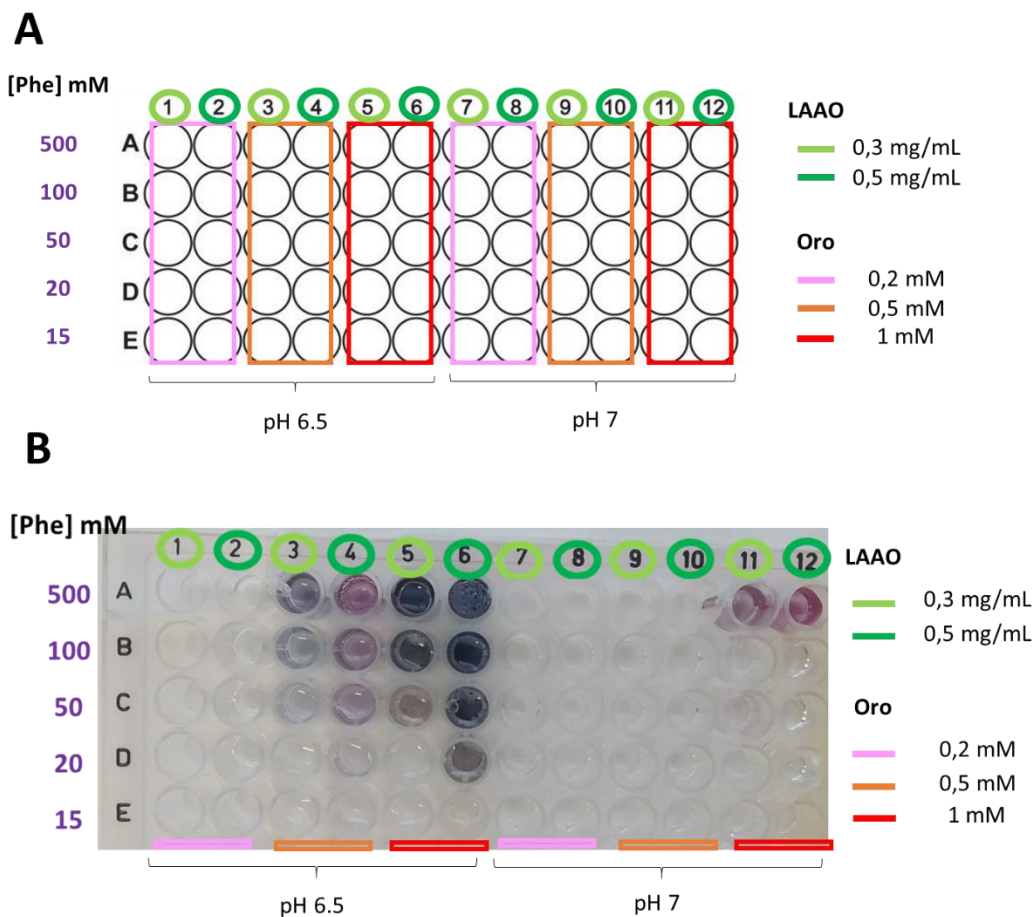


Figura 2B.7: Resultados obtenidos en el primer estudio multivariable. **A)** Composición de los ensayos; **B)** Resultados visuales al cabo de las 12 h.

Se observa en primer lugar, que el pH 6,5 favorece ampliamente la reacción respecto a pH 7. En segundo lugar, solo concentraciones de oro iguales o superiores a 0,5 mM generan AuNPs y además, el aumento de esta concentración da lugar a cambios de coloración (de rosáceo a azul), lo que implica un cambio en la naturaleza de las AuNP formadas. Por último, se puede observar que concentraciones mayores de enzima, permiten un rango de detección más amplio.

Los espectros de absorción molecular de los ensayos cuyas condiciones permiten la formación de nanopartículas en un rango de concentraciones de L-Phe (columnas 3 a 6), se muestran en la **Figura 2B.8**, de las cuales podemos obtener las siguientes conclusiones:

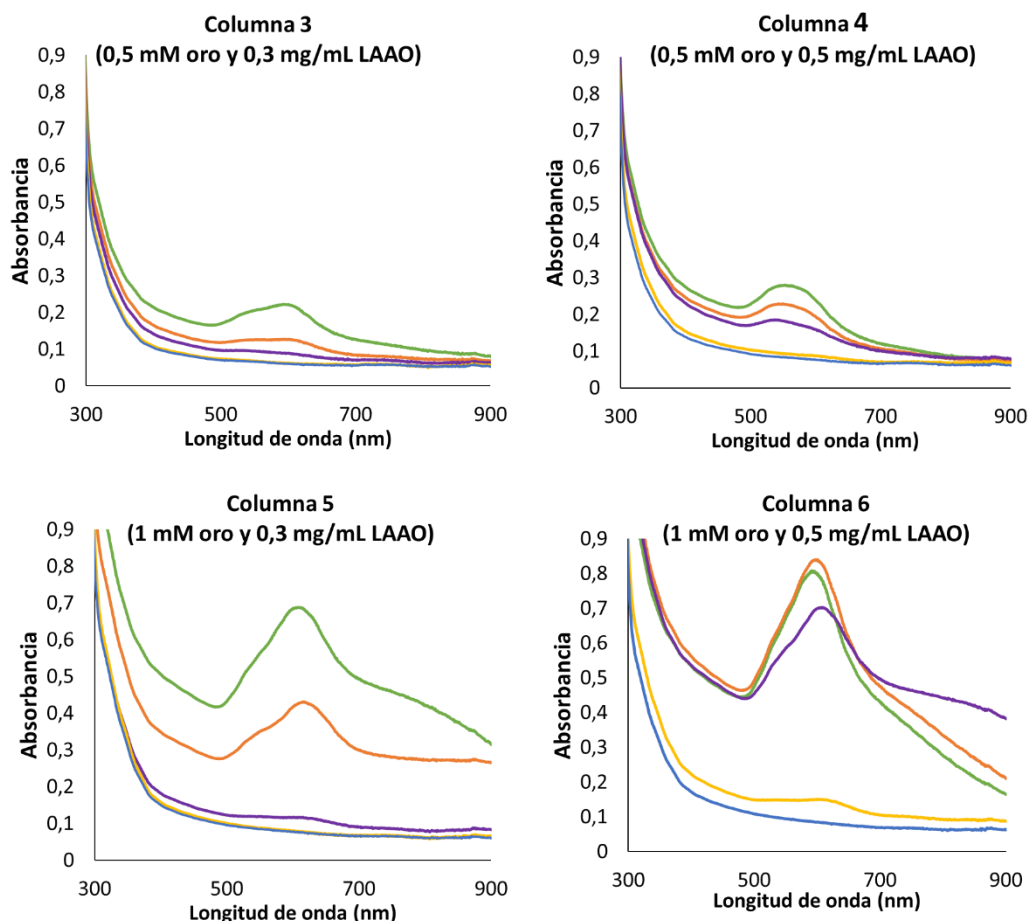


Figura 2B.8: Espectros de absorción molecular correspondientes a los ensayos multivariable indicados en la figura 2B.7B.

- 1) La señal obtenida depende de la concentración de L-Phe añadida, lo que es importante desde el punto de vista de su aplicación analítica.
- 2) En primer lugar, comparamos la columna 3 y la columna 4, en la que se utilizó la misma concentración de oro (0,5 mM) y respectivamente 0,3 mg/mL y 0,5 mg/mL de enzima. Se observa que una mayor concentración de LAAO (columna 4) genera nanopartículas más pequeñas con plasmón a 560 nm (color más rosado) frente a las AuNPs generadas con una concentración menor de LAAO (columna 3) que presentan un pico más ancho con su máximo de absorbancia en torno a 600 nm (colores más azulados); este desplazamiento batocrómico es signo de AuNP de mayor tamaño. Esto parece indicar que pequeñas concentraciones de enzima permiten la formación de nanopartículas, pero no la correcta estabilización de las mismas, por lo que agregan y se observan tamaños superiores.
- 3) Por otro lado, si comparamos una misma concentración de enzima, por ejemplo 0,5 mg/mL, con dos concentraciones de oro diferentes 0,5 mM y 1 mM (columna 4 y 6 respectivamente), se observa que, a altas concentraciones de oro, el plasmón se desplaza a longitudes de onda mayores, presentando además valores de absorbancia mayores (columna 6). Esto indica que una mayor cantidad de Au(III) permite la reoxidación de la enzima en mayor medida, produciendo el crecimiento de las nanopartículas y por tanto también una mayor población de nanopartículas sintetizadas.

4) Por último, la columna 6, cuyas condiciones de cantidad de oro (1 mM) y enzima (0,5 mg/mL) usada son máximas, presenta la mayor sensibilidad. En este caso podemos detectar nanopartículas para una concentración de hasta 20 mM de L-Phe. Sin embargo, se observa una saturación de la señal analítica a partir de 100 mM de analito, ya que mayores concentraciones de L-Phe no generan una mayor absorbancia. Este fenómeno ocurre junto con la aparición de bandas de plasmón más anchas o la presencia de más máximos, que indica la existencia de subpoblaciones de nanopartículas asociadas a mayores tamaños o agregación de las mismas (fenómeno observado en columna 5 y 6). Todos estos factores indican que concentraciones de oro tan altas, necesitarían de una mayor cantidad de enzima para conseguir su estabilización, evitando así la agregación.

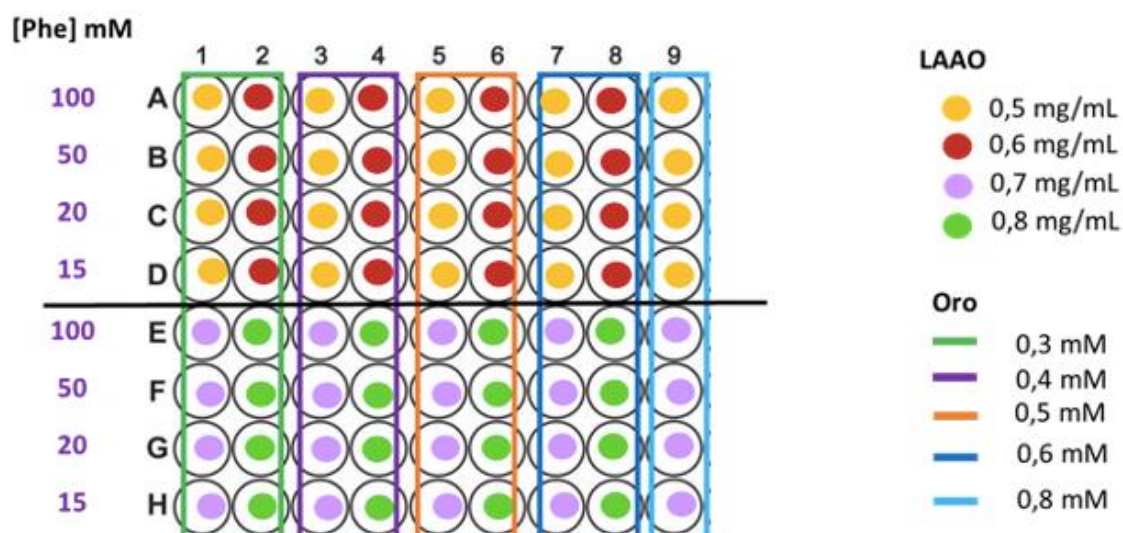
De este experimento se pudo concluir que, desde un punto de vista analítico, las condiciones óptimas observadas para las variables estudiadas son las utilizadas en la columna 4 (0,5 mM y 0,5 mg/mL LAAO) y que el objetivo en la optimización se debe centrar en alcanzar un equilibrio entre dos factores:

-Seleccionar una concentración de oro suficiente para generar una mayor cantidad de nanopartículas y por tanto alcanzar un mejor límite de detección de L-Phe.

- Seleccionar una concentración de enzima suficiente para estabilizar estas AuNPs generadas y evitar su agregación. Concentraciones demasiado bajas o altas de enzima pueden provocar la desestabilización de las mismas.

Tras evaluar los resultados anteriores, se llevó a cabo una nueva serie de ensayos en placa, cubriendo un mayor rango de los factores clave: concentración de oro (0,3, 0,4, 0,5, 0,6 y 0,8 mM) y la cantidad de enzima (0,5, 0,6, 0,7 y 0,8 mg/mL), en todos los casos en disolución amortiguadora TRIS 0,1 M pH 6,5 y evaluando la reacción para diversas concentraciones de L-Phe (15, 20, 50, 100 mM). La adición y el seguimiento de la reacción se llevó a cabo de la misma forma que en el caso anterior. El diseño experimental en placa se muestra en la **Figura 2B.9A** y los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 2B.9B**.

A



B

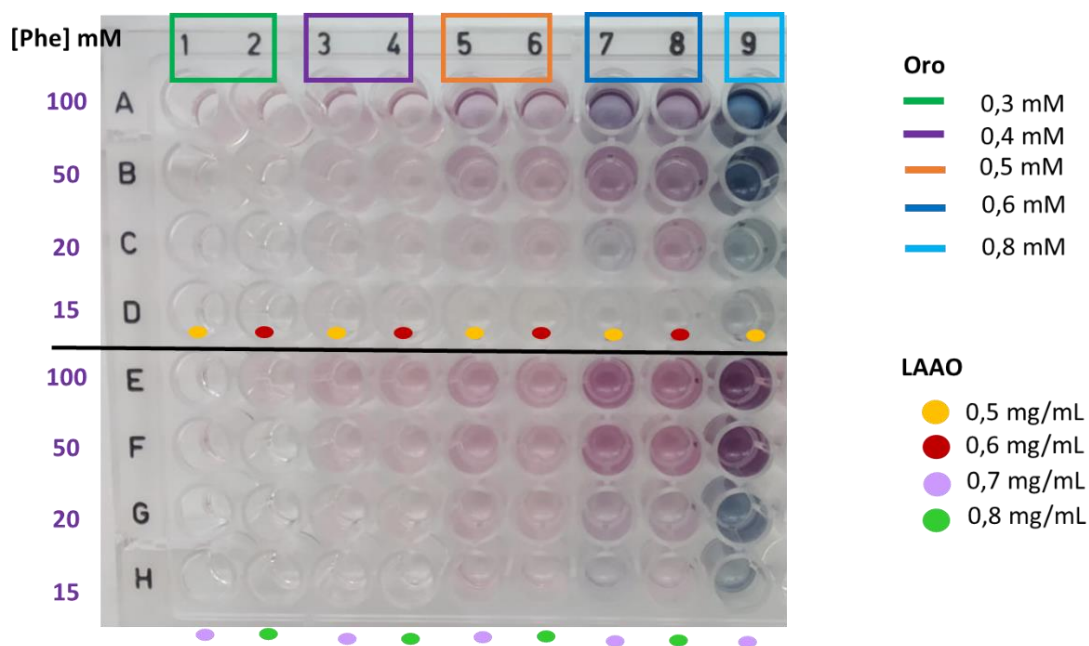


Figura 2B.9: Resultados obtenidos en el segundo estudio multivariable. **A)** Composición de los ensayos; **B)** Resultados visuales al cabo de las 12 h.

Se observa de nuevo el importante efecto que tiene la concentración del oxidante, ya que concentraciones por debajo de 0,5 mM de oro no presentan la suficiente sensibilidad (colores rosados muy débiles), y la concentración superior (0.8 mM), muestra agregación o la aparición nanopartículas más grandes (colores azulados). Esto último, se observa mejor en los espectros de absorción molecular obtenidos sobre estos ensayos (**Figura 2B.10E y 10F**) en la que se ve un desplazamiento del máximo de absorbancia en torno a 600 nm y un aumento de su intensidad, así como una disminución del rango de detección. Los resultados confirman la agregación de las AuNPs provocada por falta de enzima para estabilizar concentraciones de oro iguales o superiores a 0,8 mM.

Se observa también que 0,6 mM es la concentración de oro que permite un rango de detección más amplio para todas las concentraciones de enzima evaluadas. La diferencia obtenida entre ellas se deduce mejor de los espectros de la **Figura 2B.10A-D**. En todos los casos el máximo de absorbancia del plasmón aparece a 560 nm. Las gráficas parecen mostrar también que el efecto de la concentración de enzima no es tan importante, siempre y cuando esté por encima de un valor mínimo (0,5 mg/mL).

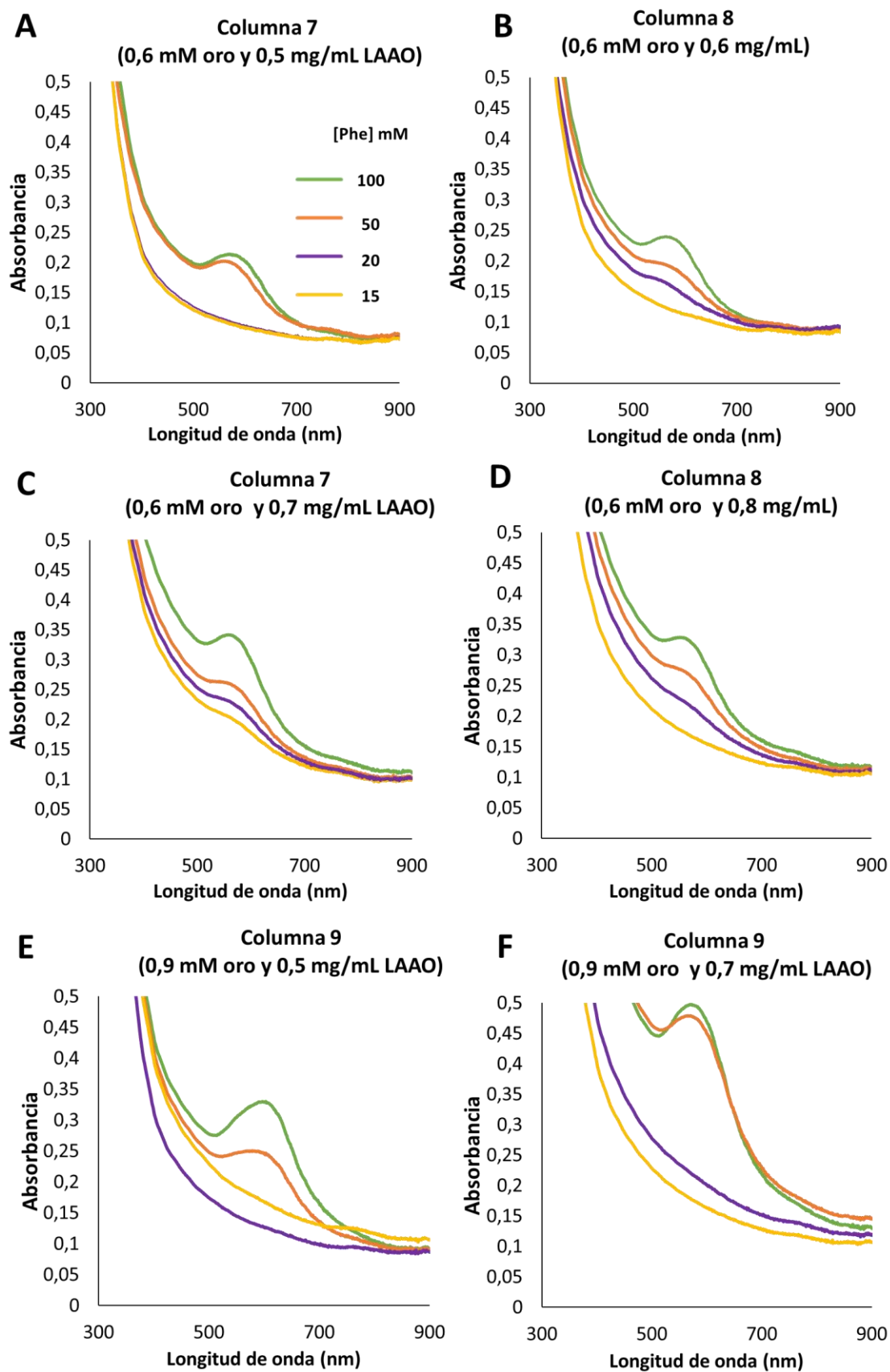
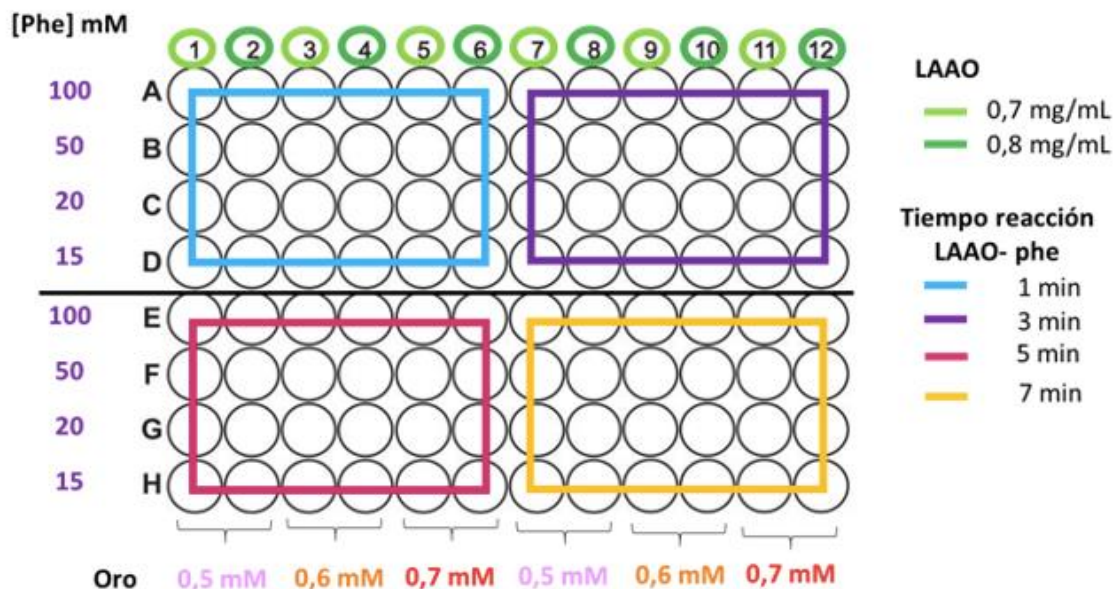


Figura 2B.10: Espectros de absorción molecular correspondientes a los ensayos multivariable indicados en la figura 2B.9B.

Finalmente se desarrolló un último ensayo multivariable, con el fin de estudiar los tiempos de reacción LAAO-L-Phe (1, 3, 5 y 7 minutos) antes de la adición de oro, cubriendo los factores clave óptimos hallados en el ensayo anterior. El diseño experimental se muestra en la **Figura 2B.11A** y los resultados obtenidos se indican en la **Figura 2B.11B**

A



B

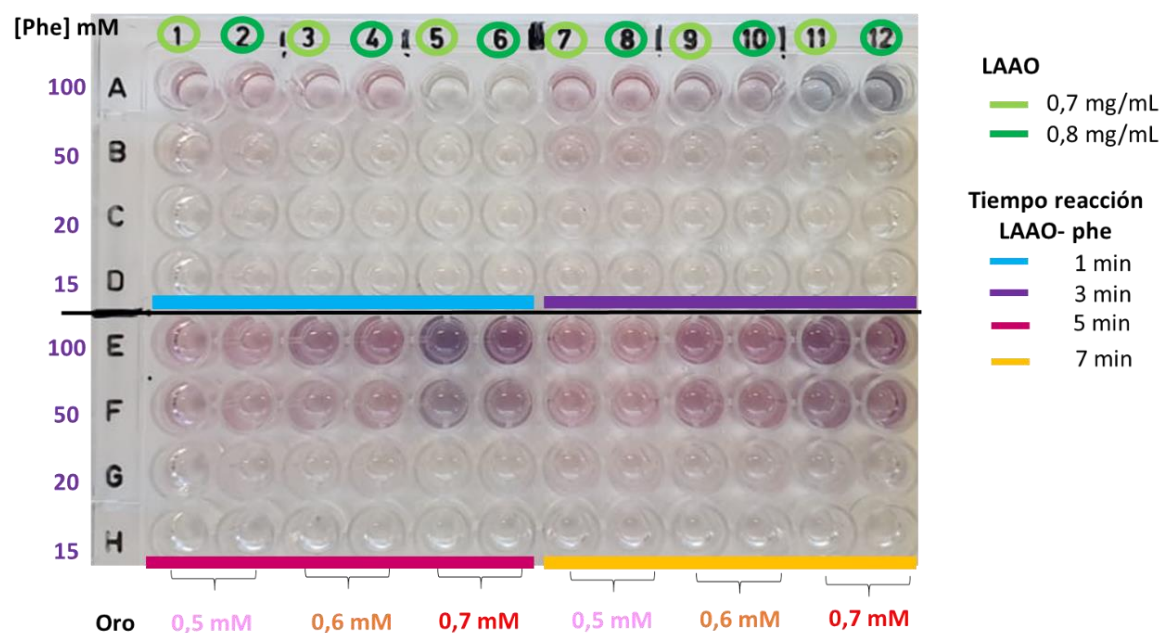


Figura 2B.11: Resultados obtenidos en el segundo estudio multivariable. **A)** Condiciones experimentales usadas. **B)** Resultados visuales al cabo de las 12 h.

Visualmente, los resultados muestran que tiempos de reacción LAAO-L-Phe inferiores a 5 min, producen un rango de detección muy corto junto con una baja sensibilidad. Respecto a los tiempos de 5 y 7 minutos, se observa que la concentración más alta de oro (0,7 mM) muestra un mayor rango de detección.

Para estudiar las cinéticas de reacción de síntesis de AuNPs en función de los tiempos de reacción LAAO-Phe se seleccionó aquella condición que proporcionó el mayor rango de detección (Au(III) 0,7 mM, y LAAO 0,8 mg/mL) y se extrajo la información necesaria a los 4 tiempos de reacción LAAO-Phe evaluados (1 min, 3 min, 5 min y 7 min) antes de la adición de oro. Para cada uno de estos cuatro casos y a cada concentración de L-Phe evaluada, se realizó el seguimiento del máximo de absorbancia a 560 nm durante las 20 h de reacción de síntesis. Así, se registraron gráficas de calibrado como las que se muestran como ejemplo en la **Figura 2B.12**, correspondientes en este caso al tiempo de reacción LAAO-L-Phe de 5 min.

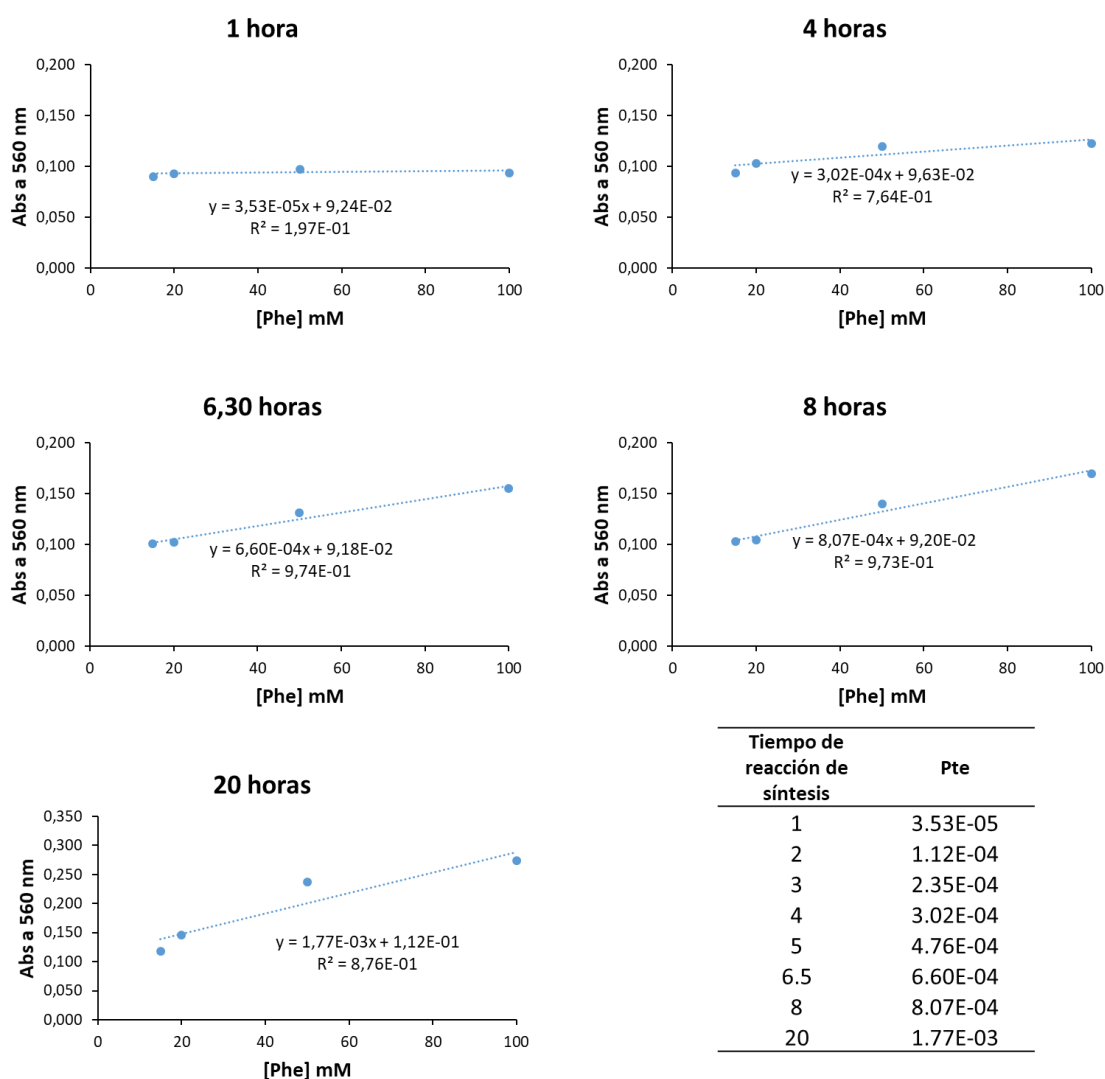


Figura 2B.12: Seguimiento del máximo de absorción (560 nm) de las AuNPs formadas a los diversos tiempos de la reacción de síntesis y bajo las condiciones: LAAO 0,8 mg/mL en disolución amortiguadora TRIS 0,1 M pH 6,5; tiempo de reacción LAAO-Phe 5 minutos; concentraciones de Phe evaluadas 15, 20, 50 y 100 mM; transcurridos los 5 minutos se añade oro 0,7 mM. Se muestra también en la tabla la pendiente correspondiente a cada tiempo de reacción de síntesis.

Aunque no se observa un comportamiento muy lineal entre la señal y la concentración, las pendientes se pueden usar a modo orientativo para comparar la sensibilidad en cada tiempo de reacción de síntesis (1; 2; 3; 4; 5; 6,5; 8 y 20 horas) y para los diferentes tiempos de reacción LAAO-Phe evaluado (1 min, 3 min, 5 min y 7 min). La **Figura 2B.13** muestra estas tendencias, confirmando la hipótesis de que mayores tiempos de reacción LAAO-L-Phe previos a la adición

de oro, conllevan a mayores rendimientos en la síntesis de nanopartículas y cinéticas de reacción mayores. Un mayor avance de la reacción enzimática supone una mayor reducción del centro catalítico de la LAAO, que será regenerado (re-oxidación) por la sal de Au (III), la cual se reduce a Au⁰ en mayor medida y con una cinética superior.

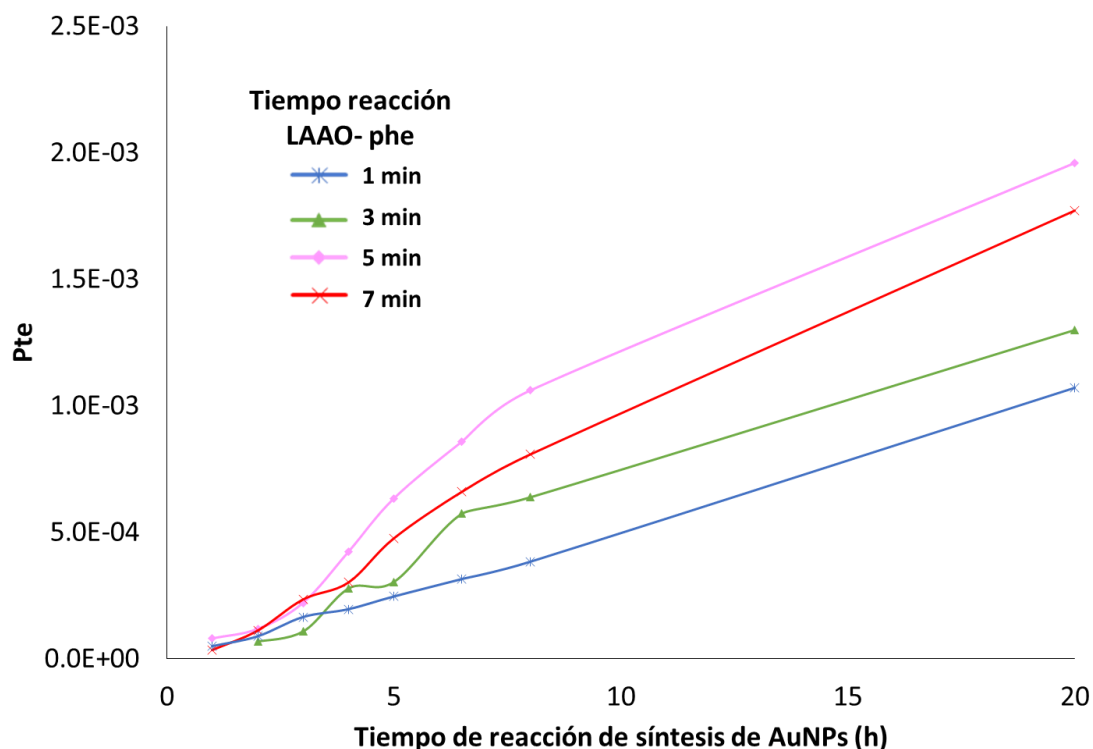


Figura 2B.13: Representación de las pendientes extraídas de las gráficas Abs a 560 nm vs [L-Phe] a cada tiempo de reacción de síntesis de AuNPs. Estos resultados se muestran para los 4 tiempos de reacción LAAO-Phe evaluados (1, 3, 5 y 7 min).

2B.4.3.2. Optimización en cubeta.

Partiendo de esta optimización previa y una vez comprendidos los factores clave de esta metodología mediante el screening en placa, se llevó a cabo una optimización en mayor profundidad en cubeta, utilizando volúmenes superiores (1,5 mL) y agitación durante la reacción.

En primer lugar, debido a los largos tiempos de reacción observados para la síntesis en TRIS (8 horas), se decidió evaluar la cinética de formación de estas AuNPs en disolución amortiguadora fosfato frente a los resultados obtenidos en TRIS. La **Figura 2B.14**, muestra la evolución de la absorbancia en el máximo (550 nm) durante el tiempo de síntesis de AuNPs a partir del tiempo 0, que consideramos como el momento en el que se añade el oro a la disolución. A través de estos resultados podemos confirmar que la cinética de formación de AuNPs, se ve desfavorecida por la presencia de TRIS en el medio frente a la existencia de iones fosfato. Feng Chen et al.⁴⁹ explica la inusual actividad ácido-base y redox que muestran varios compuestos orgánicos como Tris (hidroximetil) aminometano, o 2-amino-2- (hidroximetil) -1,3-propanodiol, capaces de coordinarse con varios iones metálicos, como Au(III), señalando incluso la posibilidad del uso de estas sales para formar nanopartículas de oro con estructura poliédrica a partir de una solución

de ácido cloroáurico. De esta forma la hipótesis para justificar este comportamiento cinético, tiene su origen en el acomplejamiento del Au(III) por TRIS, que además de dejar al reactivo en una forma menos accesible para la enzima, dará lugar a que el potencial del sistema Au(III)/Au⁰ disminuya y, por tanto, la capacidad oxidante del reactivo.

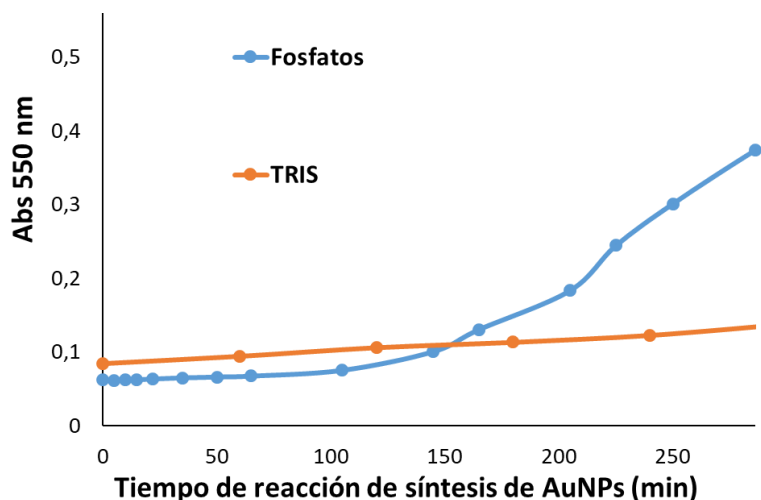


Figura 2B.14: Cinética de la reacción de síntesis de AuNPs en disolución amortiguadora fosfatos 0.1 M pH 6,5 y en disolución amortiguadora TRIS 0.1 M pH 6,5, bajo las condiciones: LAAO 0,8 mg/mL; Phe 500 mM; tiempo de reacción LAAO-Phe 5 minutos; Au(III) 0,7 mM.

En consecuencia, a partir de este punto, todos los estudios se llevaron a cabo con disolución amortiguadora fosfatos 0,1 M.

Como se ha descrito en la parte experimental de este capítulo, se llevó a cabo una re-optimización secuencial en cubeta a la temperatura constante de 37°C. Los parámetros que se estudiaron, fueron:

- El pH óptimo de reacción (pH 6,5 ó 7) utilizandola disolución amortiguadora fosfatos 0,1M. Se estudiaron dos concentraciones de L-Phe 150 μ M y 1000 μ M. Los espectros recogidos tras 4 horas de reacción (junto con las condiciones experimentales) se observan en la **Figura 2B.15A**, mostrando una mayor intensidad en la banda del plasmón (550 nm) a pH 6,5 para ambas concentraciones de L-Phe evaluadas. Como se observó en el ensayo multivariable, en el que se usaba como disolución amortiguadora TRIS, el pH 6,5 favorece ampliamente la reacción enzimática sobre pH 7, independientemente de la disolución amortiguadora usada.
- La concentración de Au(III) . Los espectros recogidos tras 4 horas de reacción se muestran en la **Figura 2B.15B**, en la que se observa que concentraciones inferiores o iguales a 0,5 mM generan pequeñas cantidades de nanopartículas. A partir de 0,6 mM aumenta el rendimiento de la síntesis, observándose su máximo para 0,7 mM. Estos resultados coinciden también con lo observado en el ensayo multivariable previo.
- El efecto de la concentración de LAAO añadida (0,5, 0,7, 0,8 mg/mL). Como se ha observado en los ensayos previos, la cantidad de enzima afecta el desplazamiento de la longitud de onda y la intensidad del plasmón que limita la sensibilidad del método. En este caso, los resultados obtenidos muestran (**Figura 2B.15C**), que el uso de 0,8 mg/mL de LAAO

proporciona una mayor intensidad, sin producir desplazamiento de la longitud de onda y por tanto sin agregación de las AuNPs.

- d) Por último, se evaluó el tiempo de la reacción LAAO-L-Phe antes de la adición de oro. La **Figura 2B.15D** indica que, también en este caso, la adición del Au(III) tras 20 min permite completar la reacción enzimática en mayor medida y obtener una velocidad de formación de AuNPs máxima.

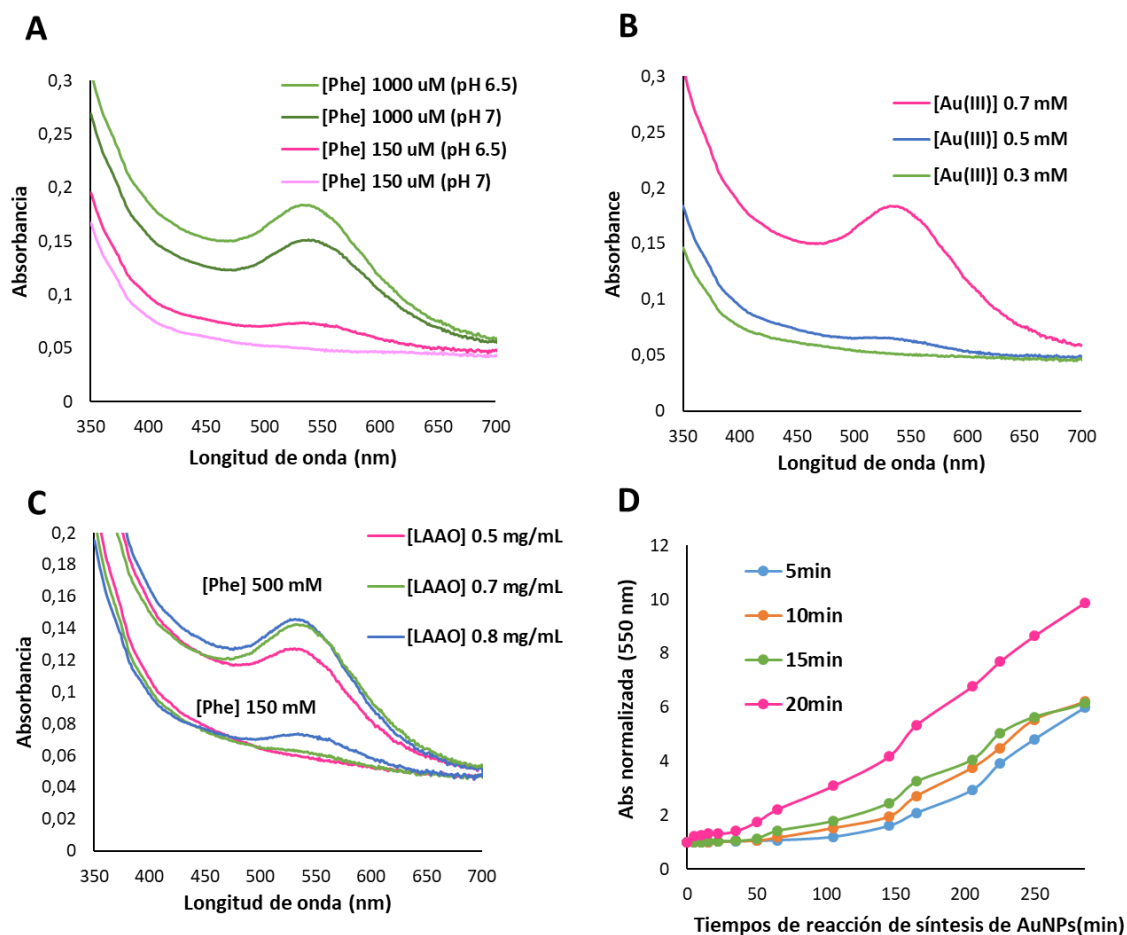


Figura 2B.15: Estudio de optimización en cubeta: **A)** pH de reacción; [LAAO] = 0,8 mg/mL y L-Phe 150 μ M y 1000 μ M y Au(III) 0,7 mM. **B)** Concentración de Au(III); 0,1M pH 6,5 (fosfato), [LAAO] = 0,8 mg/mL y L-Phe de 1000 μ M. **C)** Concentración LAAO; 0,1M pH 6,5 (fosfato), L-Phe 150 μ M y 500 μ M Au³⁺ 0,7 mM. Para los estudios **A**, **B** y **C**, el Au (III) se añade tras 5 minutos de reacción LAAO-L-Phe. **D)** Tiempo de reacción LAAO-L-Phe antes de la adición de oro; LAAO 0,8 mg/mL en disolución amortiguadora fosfatos 0,1M pH 6,5; L-Phe 500 μ M y Au(III) 0,7 mM.

Con las condiciones óptimas halladas en la optimización del método en cubeta se llevó a cabo la síntesis de AuNPs a partir de la reacción de LAAO con 500 μ M de L-Phe y se obtuvieron las imágenes de estas nanopartículas trabajando en modo STEM. En la **Figura 2B.16A** se observa una clara población de partículas esféricas, cuya distribución de tamaños se indica en la **Figura 2B.16B**. En este histograma se puede observar una población de nanopartículas pequeñas de $6,45 \pm 0,73$ nm a las que se atribuye el plasmón observado a 550 nm.

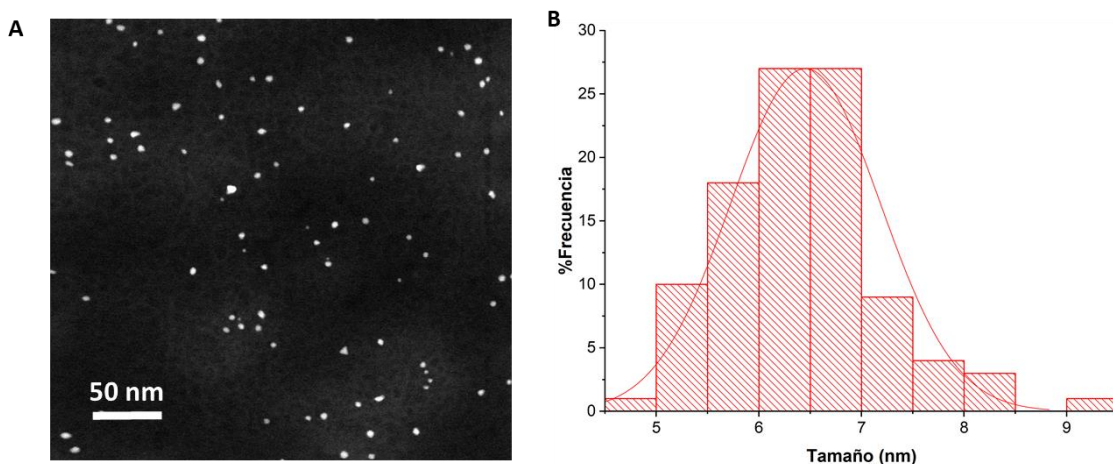
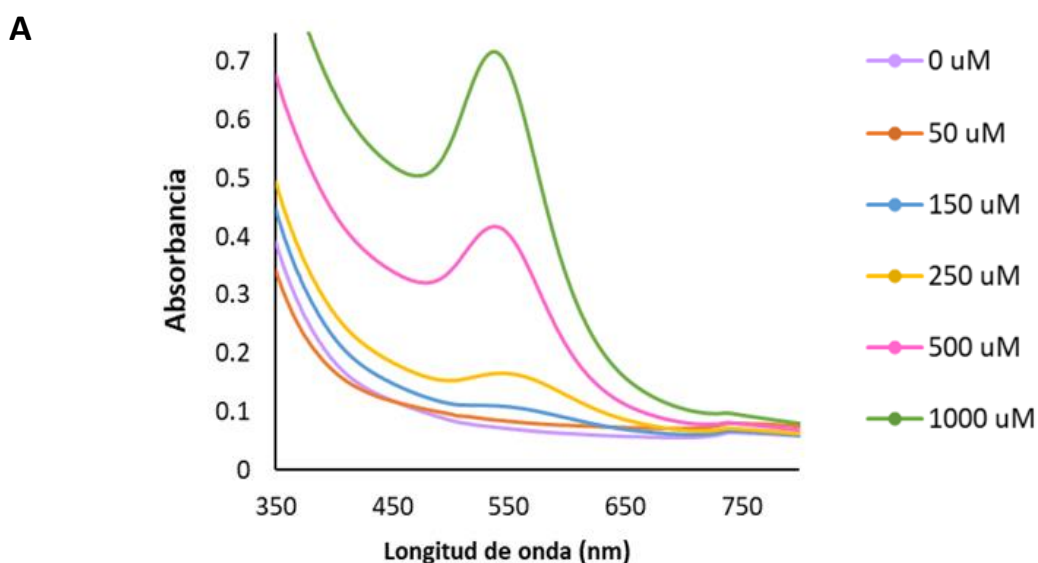


Figura 2B.16: AuNPs sintetizadas en disolución amortiguadora fosfatos 0,1M pH 6,5 utilizando LAAO 0,8 mg/mL y 500 μ M de L-Phe, transcurridos 20 minutos de reacción, se añadió Au (III) 0,7 mM. Después de 4 h a 37°C se obtuvo **A)** imagen STEM de las nanopartículas sintetizadas **B)** histograma correspondiente que representa la distribución de tamaño de partículas.

2B.4.4. Estudio de calibración del método para la determinación de L-Phe.

Como se ha dicho, de forma general, concentraciones de fenilalanina en sangre inferiores a 120 μ M se consideran como niveles normales (siendo el valor promedio en torno a 50 μ M, valores superiores a esta concentración se asocian con hiperfenilalaninemia y es a partir de concentraciones plasmáticas superiores a 1000 μ M cuando se asocia con la enfermedad fenilketonuria. Por ello, la evaluación del método se llevó a cabo para un rango de concentraciones de L-Phe de 50 a 1000 μ M, utilizando las condiciones finales optimizadas en el apartado anterior.

La **Figura 2B.17A**, muestra los máximos de absorción en cada caso tras 4 horas de reacción y la **Figura 2B.17B** la imagen de las cubetas a este mismo tiempo junto al ajuste sigmoideo de la absorbancia en el máximo (550 nm) frente a la concentración de L-Phe correspondiente.



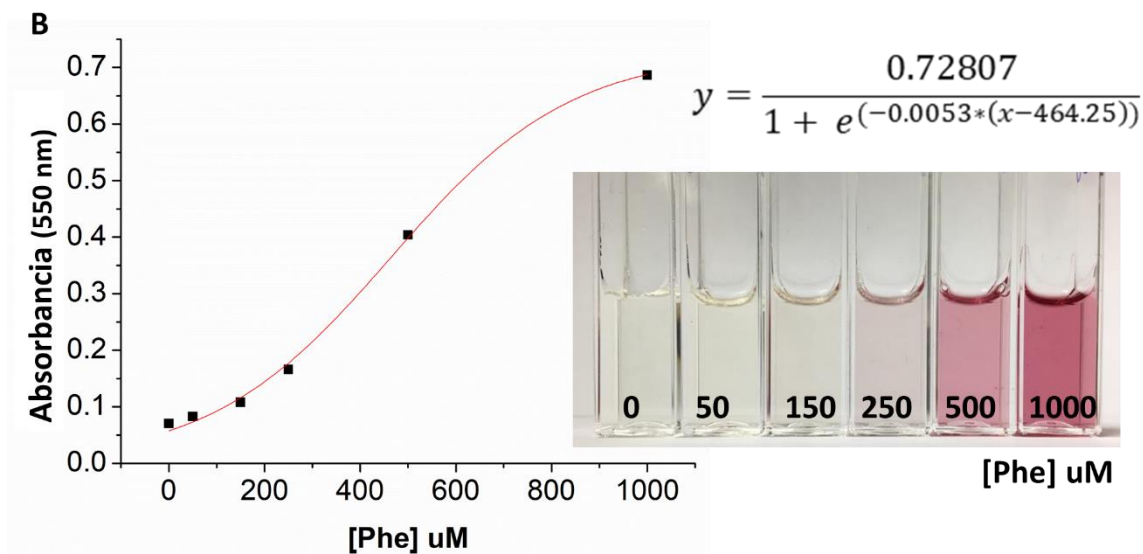


Figura 2B.17: A) Espectros de absorción molecular obtenidos tras 4 horas de reacción para las distintas concentraciones de L-Phe evaluadas **B)** Ajuste sigmoideo del método para la determinación de L-fenilalanina en el rango de 50 a 1000 μM . La reacción se llevó a cabo en disolución amortiguadora fosfatos 0,1M pH 6,5 utilizando LAAO 0,8 mg/mL y transcurridos 20 minutos de reacción, se añadió Au (III) 0,7 mM. Después de 4 h a 37°C, se registraron las medidas de absorbancia de las cubetas mostradas.

Así, estos resultados demuestran las posibilidades del método para la detección de concentraciones de fenilalanina dentro de los valores biológicos de interés. Sin embargo, la evaluación de la cinética de la reacción de síntesis para las diversas concentraciones de fenilalanina evaluadas (**Figura 2B.18**) indica que la formación de estas nanopartículas comienza entorno a los 120 minutos y muestra que a las 4 horas esta absorbancia aún no se ha estabilizado.

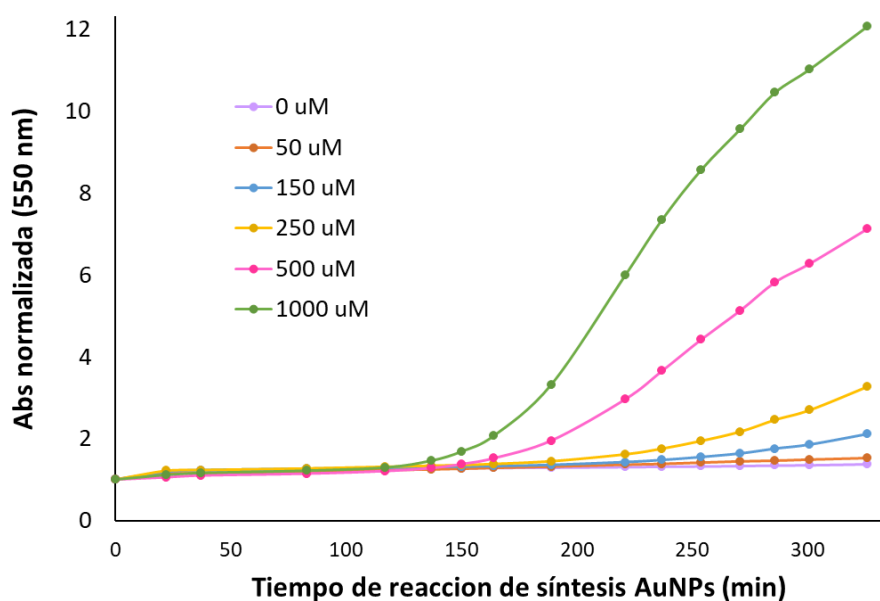


Figura 2B.18: Variación de absorbancia a 550 nm durante las 4 horas de reacción de síntesis de las AuNPs para las diversas concentraciones de fenilalanina evaluadas. Las reacciones se llevaron a cabo a 37°C en disolución amortiguadora fosfatos 0,1M pH 6,5 utilizando LAAO 0,8 mg/mL y transcurridos 20 minutos de reacción, se añadió Au (III) 0,7 mM.

Por ello y con el fin de mejorar la cinética de la reacción, se decidió evaluar el uso de la enzima catalasa que, como se ha dicho, es capaz de catalizar la dismutación del subproducto de la reacción H_2O_2 , en agua y oxígeno. La **Figura 2B.19A**, confirma que el uso de catalasa acelera la velocidad de síntesis de AuNPs, que comienzan a formarse entorno a los primeros 20 minutos con una mayor cinética de reacción. La estabilización de la absorbancia se observa entorno a los 120 min, esta absorbancia final se muestra de forma comparativa en la **Figura 2B.19B** junto con el aspecto de las cubetas.

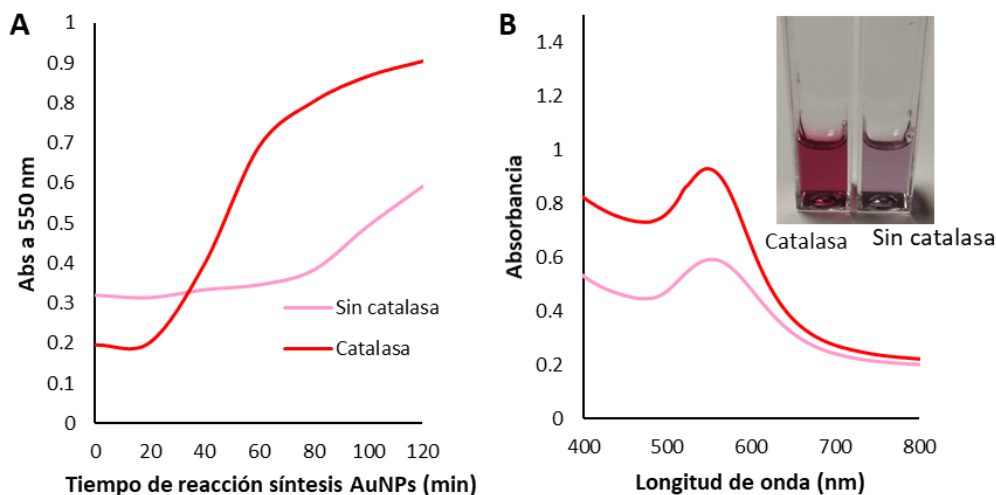


Figura 2B.19: A) Variación de la absorbancia a 550 nm durante las síntesis de las AuNPs para la determinación de L-fenilalanina 500 μM con las condiciones de reacción optimizadas, en presencia y ausencia de catalasa (100U totales). **B)** Espectros de absorción molecular y aspecto de las cubetas tras 2h de reacción.

Para conocer mejor este efecto se estudió la cinética de la reacción de síntesis sin catalasa con la adición extra de H_2O_2 (**Figura 2B.20A**), observándose una cinética mucho más lenta para la reacción con un exceso estequiométrico de H_2O_2 añadido. La **Figura 2B.20B**, muestra cómo, en ausencia de este H_2O_2 , la solución muestra un color rosado tras dos horas y media de reacción, frente a la cubeta con peróxido de hidrogeno añadido, prácticamente incolora.

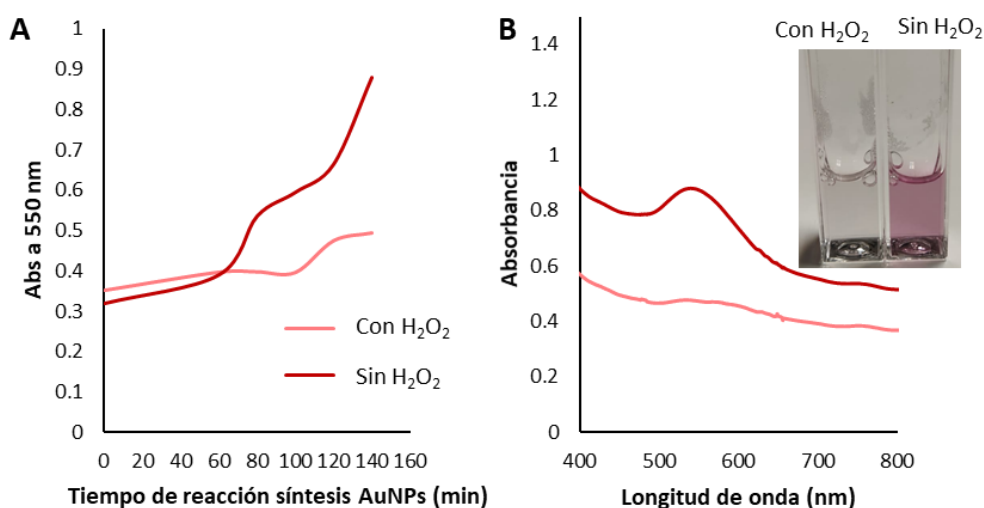


Figura 2B.20: A) Efecto de la adición de H_2O_2 500 μM sobre la variación de la absorbancia a 550 nm durante las síntesis de las AuNPs para la determinación de L-fenilalanina 500 μM con las condiciones de reacción optimizadas y en ausencia de catalasa. **B)** Espectros de absorción molecular y aspecto de las cubetas tras 2 h y media de reacción.

A la luz de estos resultados, se confirmó que la eliminación del H_2O_2 presente en el medio facilita la regeneración de la enzima, acelerando la velocidad de formación de AuNPs. Por lo que se decidió llevar a cabo la calibración final del método utilizando catalasa, en busca de mejorar la sensibilidad del método y la cinética del mismo.

La **Figura 2B.21A**, muestra los máximos de absorción en cada caso tras 3 horas de reacción, donde se observa la saturación del plasmón en la concentración más alta de 1000 μM . La **Figura 2B.21B** presenta una imagen de las cubetas a las 3 h junto con el ajuste sigmoideo de la absorbancia en el máximo (550 nm) frente a la concentración de L-Phe correspondiente, excluyendo la concentración de L-Phe máxima. Se puede observar un buen ajuste que permite la determinación de concentraciones menores de L-Phe y en un tiempo menor, suponiendo un aumento de la sensibilidad del método comparado al mismo sin catalasa.

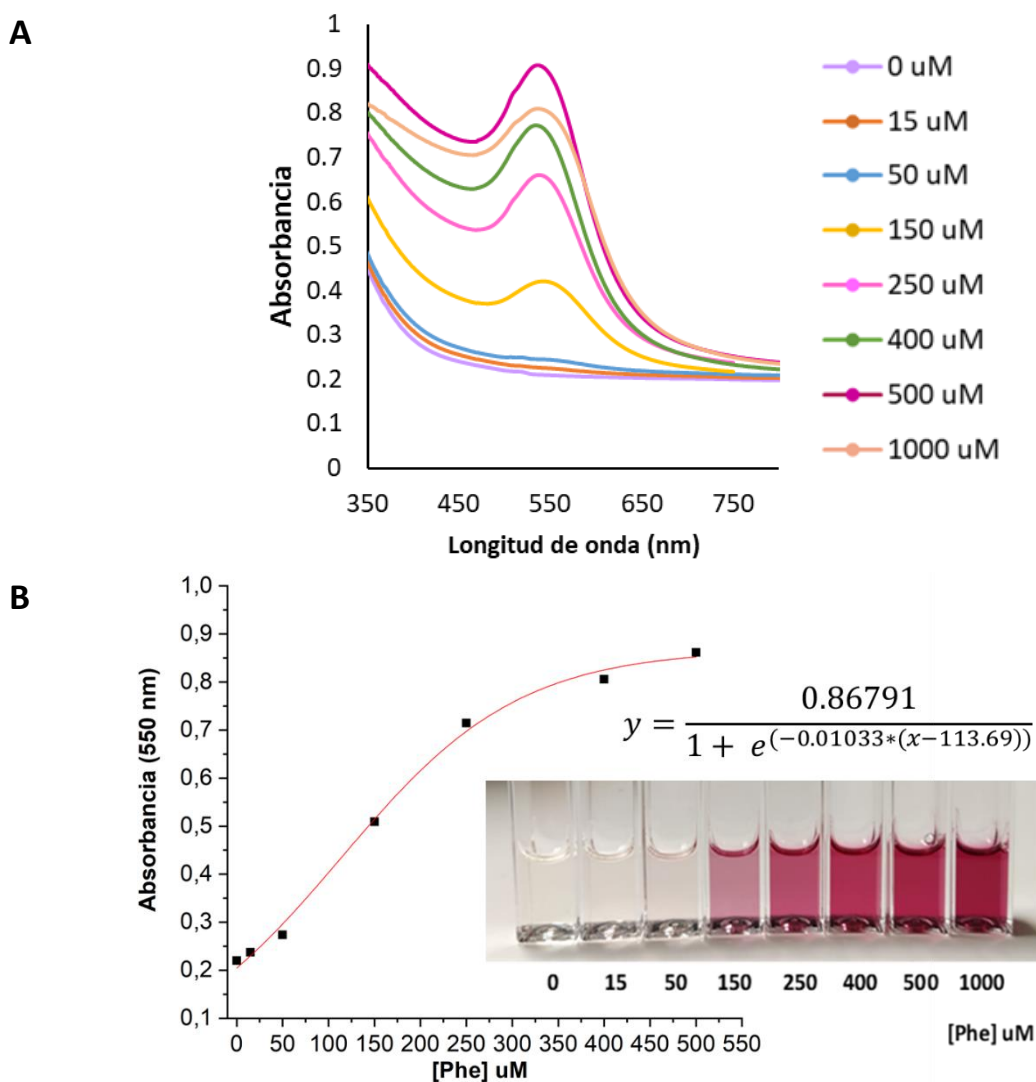


Figura 2B.21: A) Espectros de absorción molecular obtenidos tras 3 horas de reacción para las distintas concentraciones de L-Phe evaluadas. **B)** Ajuste sigmoideo del método para la determinación de L-Phe en el rango de 15 a 500 μM . La reacción se llevó a cabo en disolución amortiguadora fosfatos 0,1M pH 6,5 utilizando LAAO 0,8 mg/mL y 100 U de catalasa. Transcurridos 20 minutos de reacción, se añadió Au (III) 0,7 mM. Después de 3 h a 37°C, se registraron las medidas de absorción de las cubetas mostradas.

La evaluación de la cinética de la reacción de síntesis para las diversas concentraciones de fenilalanina evaluadas (**Figura 2B.22**) muestra esta cinética mejorada, la formación de las nanopartículas comienza entorno a los 30 minutos frente a los 120 minutos que mostraba el método sin catalasa. Se puede observar además que a las 3 horas la absorbancia a 550 nm se estabiliza, indicando el final de la reacción.

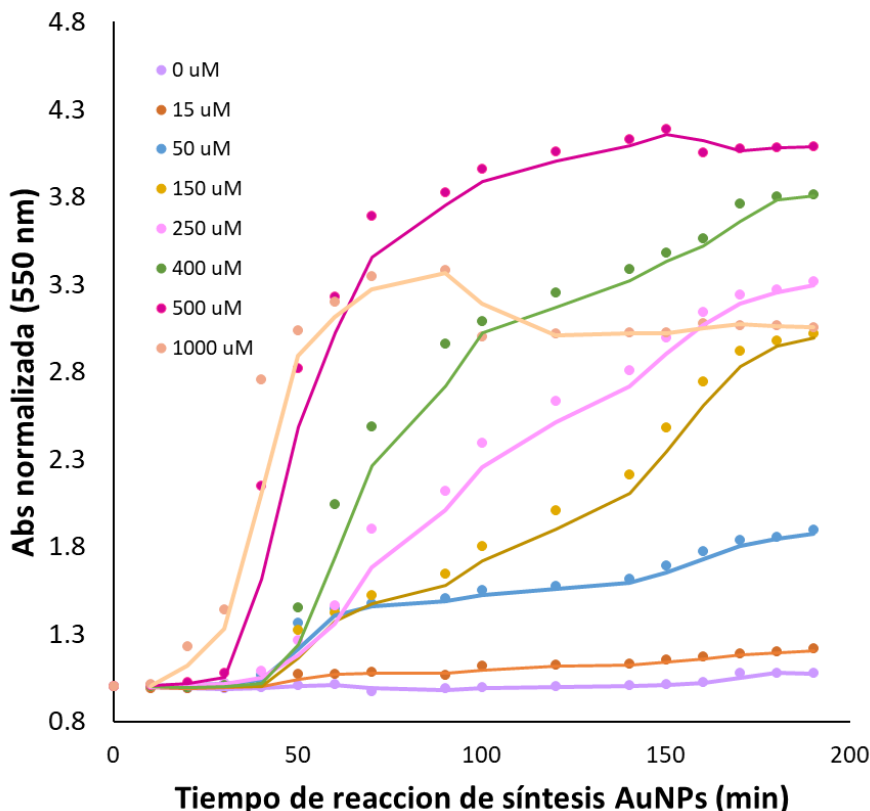


Figura 2B.22: variación de absorbancia a 550 nm durante las 3 horas de reacción de síntesis de las AuNPs para las diversas concentraciones de fenilalanina evaluadas. La reacción se llevó a cabo a 37°C en disolución amortiguadora fosfatos 0,1M pH 6,5 utilizando LAAO 0,8 mg/mL y 100 U de catalasa. Transcurridos 20 minutos de reacción, se añadió Au (III) 0,7 mM.

2B.4.5. Linealización del ajuste sigmoideo y parámetros de calidad analítica del método.

El método desarrollado presenta una calibración de respuesta sigmoidea. Aunque este tipo de curva es de difícil manejo, una adecuada interpretación de los coeficientes que aparecen en ella facilitarían su linealización. De los diferentes modelos matemáticos que generan curvas sigmoideas, el denominado de “crecimiento exponencial con capacidad de carga” (crecimiento logístico), que se aplica al crecimiento de poblaciones (como bacterias) cuando hay limitación de recursos (como alimento), puede tener sentido químico aquí; en este caso, el recurso limitante sería la concentración de analito.

La ecuación genérica de este modelo es:

$$\frac{dy}{dx} = k \left(\frac{y_{max}-y}{y_{max}} \right) y \quad (\text{Ec. C1})$$

Donde y es la variable dependiente y x es la independiente. El valor y_{\max} es la “capacidad de carga” (valor máximo que puede alcanzar y , es decir, el limitante) y k es la velocidad de crecimiento máxima, un parámetro que es característico del sistema. La aplicación de nuestro sistema a la ecuación (Ec. C1) resulta de la siguiente forma:

$$\frac{dAbs}{dc} = k \left(\frac{Abs_{\max} - Abs}{Abs_{\max}} \right) Abs \quad (\text{Ec. C2})$$

que al integrar:

$$\text{Ln} \left(\frac{Abs}{Abs_{\max} - Abs} \right) = KC + \text{Ln} \left(\frac{Abs_0}{K - Abs_0} \right) \quad (\text{Ec. C3})$$

Donde Abs_{\max} es la Absorbancia máxima obtenida, Abs_0 es la absorbancia en ausencia de analito y k depende del sistema químico (de la reacción y las condiciones de la misma). Si llamamos C_m a la concentración de analito que da un valor de Abs equivalente a la mitad del máximo ($Abs_{\max}/2$), la ecuación (Ec. C3) queda:

$$\text{Ln} \left(\frac{Abs}{Abs_{\max} - Abs} \right) = KC - KC_m = K(C - C_m) \quad (\text{Ec. C4})$$

Por tanto, es posible establecer una relación lineal entre una función de la Abs y la C (siempre y cuando Abs_{\max} fuera conocida).

Como cabría esperar, si la ecuación (Ec.C4) se reordena, queda:

$$Abs = \frac{Abs_{\max}}{1 + e^{-K(C - C_m)}} \quad (\text{Ec. C5})$$

Esta ecuación es del mismo tipo que las obtenida en los ajustes sigmoideos para el método sin catalasa (Ec. C6) (**Figura 2B.16B**) y con catalasa (Ec. C7) (**Figura 2B.20B**):

$$Abs = \frac{0,728}{1 + e^{-0,0053(C - 464,2)}} \quad (\text{Ec. C6})$$

$$Abs = \frac{0,868}{1 + e^{-0,0103(C - 113,7)}} \quad (\text{Ec. C7})$$

Al aplicar sobre estas ecuaciones la operación inversa a las realizadas para pasar de (Ec. C4) a (Ec. C5), se obtienen respectivamente las ecuaciones logarítmicas para el método sin catalasa (Ec. C8) y con catalasa (Ec. C9):

$$\text{Ln} \left(\frac{Abs}{0,728 - Abs} \right) = 0,0053C - 2,460 \quad (\text{Ec. C8})$$

$$\text{Ln} \left(\frac{Abs}{0,868 - Abs} \right) = 0,0103C - 1,171 \quad (\text{Ec. C9})$$

A partir de los datos de Abs obtenidos en cada calibrado y representando $\text{Ln} (Abs/(Abs_{\max} - Abs))$ frente a la concentración de L-Phe en cada caso, se obtienen las gráficas mostradas en la **Figura 2B.23** para el método con y sin catalasa junto con sus ecuaciones. Se observa que estas ecuaciones son prácticamente iguales a las obtenidas a partir de los ajustes sigmoideos (Ec. C8) y (Ec. C9), confirmando así la relación lineal entre la función logarítmica de la Abs y la concentración de L-Phe.

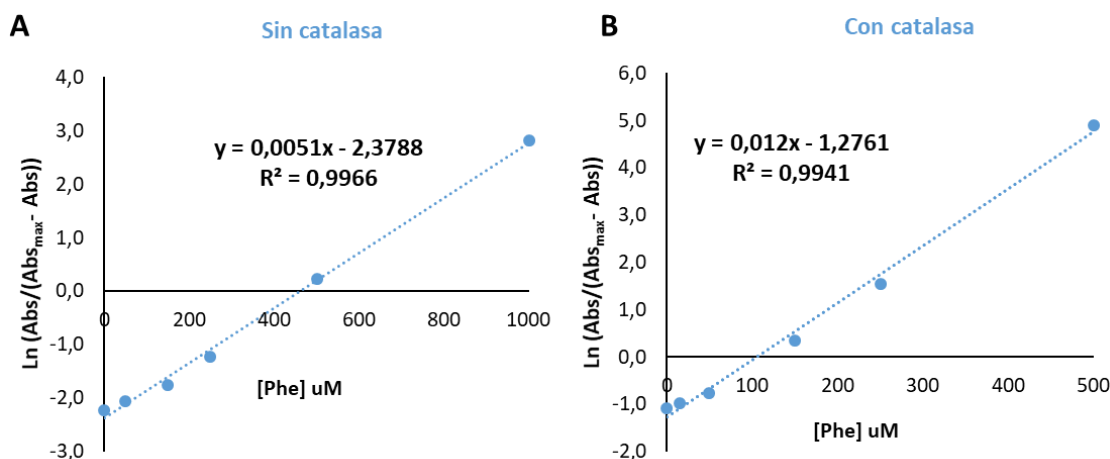


Figura 2B.23: Ajuste lineal de las calibraciones del método desarrollado, la reacción se llevó a cabo en ambos casos a 37°C en disolución amortiguadora fosfatos 0,1M pH 6,5 utilizando LAAO 0,8 mg/mL. Transcurridos 20 minutos de reacción, se añadió Au (III) 0,7 mM. Esta reacción se estudió **A)** sin catalasa y con **B)** catalasa 100 U totales.

A partir de estas ecuaciones (**Figura 2B.23**) se obtuvieron los límites de detección y cuantificación en cada caso como parámetros de calidad analítica del método.

En este caso el límite de detección es la concentración de analito que daría una absorbancia:

$$Abs_{LD} = Abs_{blanco} (interpolada) + 3s_{blanco} \quad (\text{Ec. C10})$$

Para obtener esta concentración en primer lugar se debe calcular la $Abs_{blanco} (interpolada)$, para ello en la ecuación (Ec. C3) se sustituye C por cero y se despeja la Abs

$$Abs_{blanco} = Abs_{max} \left(\frac{e^{-KC_m}}{1 + e^{-KC_m}} \right) \quad (\text{Ec. C11})$$

A esta absorbancia de blanco (Ec. C11) se le suma $3s_{blanco}$ y el valor se interpola en la ecuación (Ec. C3), es decir:

$$\text{Ln} \left(\frac{Abs_{max} \left(\frac{e^{-KC_m}}{1 + e^{-KC_m}} \right) + 3s_{bl}}{Abs_{max} - \left(Abs_{max} \left(\frac{e^{-KC_m}}{1 + e^{-KC_m}} \right) + 3s_{bl} \right)} \right) = KC - KC_m \quad (\text{Ec. C12})$$

Despejando C de la ecuación (Ec. C12) se obtiene el límite de detección. Para calcular el límite de cuantificación, únicamente se sustituye en esta ecuación el valor 3 por 10. Así la **Tabla 2B.1** muestra en resumen las ecuaciones y los límites de detección y cuantificación obtenidos para el método con y sin catalasa. Como se puede observar, el uso de catalasa, además de afectar en la cinética acortando los tiempos de reacción, permite disminuir el límite de detección del método unas 6 veces más respecto al método sin catalasa. Finalmente, la metodología desarrollada muestra un LD de 10 μM y LC de 17 μM , resultados altamente competitivos para un método rápido y colorimétrico de análisis frente a los obtenidos por los métodos cromatográficos o de inhibición bacteriana más complejos utilizados en la práctica.

	Ec. ajuste sigmoideo	Ec. ajuste lineal	Rango Phe (uM)	LD (uM)	LC (uM)
Sin catalasa	[6]	$y=0,005x - 2,378$	159 - 1000	58,8	159
Con catalasa	[7]	$y=0,012x - 1,276$	17,1 - 500	10,4	17,1

Tabla 2B.1: Ecuaciones y parámetros analíticos del método desarrollado con o sin catalasa.

2B.4.6. Estudio de interferencias en el método.

Finalmente, se estudió el efecto de otros L- aminoácidos presentes en el plasma sanguíneo, como posibles interferencias en la detección de L-fenilalanina con el método desarrollado. Con este fin:

- L-glutamina y L-valina, fueron seleccionados por ser los aminoácidos más abundantes en el plasma.
- El aminoácido L-serina fue seleccionado debido a su posible acción como agente reductor en la formación de nanopartículas (N. Jayaprakash et al.⁵⁰ describió como los grupos OH de la serina se oxidan a C=O durante la reacción de reducción de nitrato de plata (AgNO_3) para la formación de nanopartículas de plata).
- Por último, se seleccionó el aminoácido L-cisteina, debido a la alta afinidad de los grupos tiol por el oro, que posiciona a este aminoácido como una posible interferencia.

En primer lugar, se llevó a cabo la reacción de cada una de estos aminoácidos de forma independiente, en las condiciones optimizadas del método, con objeto de evaluar si eran capaces de formar AuNP. A continuación, se evaluó el efecto de estos en las AuNP formadas por el analito. Las concentraciones de aminoácidos usadas para este estudio fueron las que se consideran como normales es el plasma⁵¹: L-glutamina 550 μM , L-valina 230 μM , L-serina 120 μM y L-cisteina 110 μM (**Figura 2B.24**). La concentración de fenilalanina usada fue de 800 μM , concentración que, como ya se ha indicado, corresponde al intervalo en el que la enfermedad es activa.

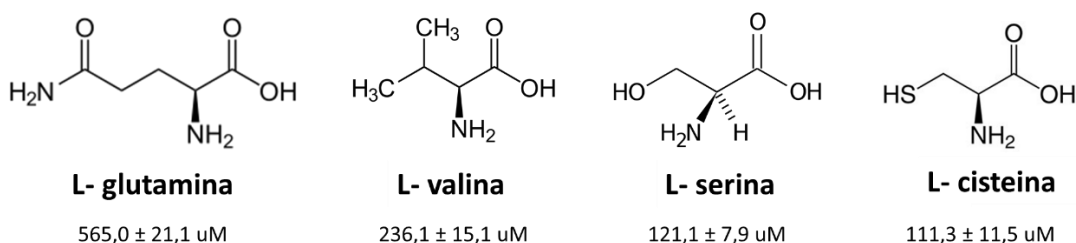


Figura 2B.24: L- aminoácidos seleccionados para el estudio de interferencias del método y concentraciones promedio de sus valores normales en plasma sanguíneo.⁵¹

La **Figura 2B.25** muestra los espectros de absorción obtenidos al aplicar el método desarrollado tanto a los aminoácidos estudiados de forma independiente, como en presencia del analito. Se

observa que ninguno de ellos genera AuNPs, excepto la cisteína, debido a la afinidad tiol-oro. Por otro lado, los espectros obtenidos para las mezclas con fenilalanina muestran, en todos los casos, el pico del plasmón a 550 nm invariable, asociado a la generación de AuNPs por el analito. Solo en la mezcla de cisteína con fenilalanina, el plasmón generado aparece desplazado hacia longitudes de onda menores, 530 nm y presenta una mayor intensidad. Sin embargo, este hecho no interfiere en la absorbancia final recogida a 550 nm, que permanece invariable. Así, este método colorimétrico permite relacionar la cantidad de nanopartículas plasmónicas (a 550 nm) con las concentraciones de L-Phe con una total selectividad.

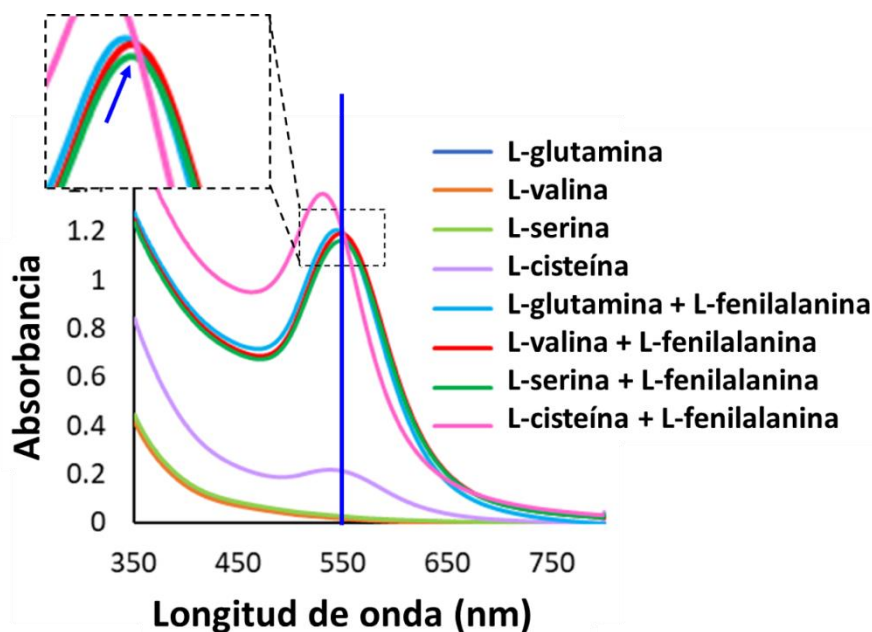


Figura 2B.25: Espectros de absorción molecular obtenidos en los diversos ensayos de interferencias realizados aplicando el método desarrollado para la determinación de L-fenilalanina (800 μ M). La reacción se llevó a cabo en disolución amortiguadora fosfatos 0,1M pH 6,5 utilizando LAAO 0,8 mg/mL y transcurridos 20 minutos de reacción, se añadió Au (III) 0,7 mM. Después de 4 h a 37°C, se registraron las medidas de absorción.

2B.5. Conclusiones específicas de la sección 2B

En esta sección se ha evaluado la síntesis de AuNPs a partir de las propiedades redox de la enzima LAAO y su sustrato L-fenilalanina.

1. Se ha estudiado el mecanismo de la reacción enzimática LAAO- L-Phe en presencia de Au (III) y mediante diversos screening en placa se han optimizado las condiciones experimentales de síntesis, obteniéndose las siguientes conclusiones:

- La formación de AuNPs precisa de la reacción enzimática LAAO-L-Phe previa a la adición del oro, indicando que el centro catalítico de la enzima reducida sería regenerado por la sal de Au (III), que se reduciría a Au⁰ produciendo la reoxidación del centro activo de la enzima.
- La parte proteica de la enzima LAAO, estabiliza la forma Au⁰ y permite la formación de AuNPs. Los experimentos realizados han indicado que pequeñas concentraciones de enzima permiten la formación de nanopartículas, pero no la correcta estabilización de las mismas, por lo que agregan y se observan tamaños superiores. Una mayor concentración de LAAO genera nanopartículas más pequeñas con plasmón a 560 nm.
- En ausencia de L-Phe, no se produce la formación de AuNPs.
- Respecto a la concentración de oro, se ha observado que una mayor cantidad de Au(III) permite la reoxidación de la enzima en mayor medida, produciendo el crecimiento de las nanopartículas y por tanto también una mayor población de nanopartículas sintetizadas.
- Se ha observado que mayores tiempos de reacción LAAO-L-Phe previos a la adición de oro, conllevan a mayores rendimientos en la síntesis de nanopartículas y cinéticas de reacción mayores.
- Se ha mostrado, además, que la cinética de formación de AuNPs se va favorecida en disolución amortiguadora fosfatos y a pH 6,5.

2. En las condiciones óptimas, se ha llevado a cabo la calibración del método para la detección de L-Phe, observándose una respuesta sigmoidea entre la concentración del sustrato y la absorbancia de las nanopartículas generadas tras la reacción enzimática.

3. Se han optimizado la cinética y mejorado la sensibilidad del método a través del acoplamiento de la enzima catalasa a la reacción.

4. La linealización del método ha permitido la obtención de las propiedades analíticas del mismo. Así la metodología desarrollada muestra un LD 10 μ M y LC de 17 μ M de L-Phe, resultados comparables con los obtenidos por los métodos cromatográficos o de inhibición bacteriana más complejos utilizados en la práctica.

5. Por último, un estudio de interferencia ha mostrado que es posible medir concentraciones de L-Phe adecuadas en presencia de otros aminoácidos presentes en el suero. Presentando este método como un buen candidato para la determinación del analito en muestras de suero sanguíneo.

2.4. Conclusiones y análisis crítico del capítulo 2. Perspectivas de futuro.

En este capítulo se ha llevado a cabo el diseño de AuNMs mediante su síntesis dirigida y específica con los ligandos de reconocimiento biológico. Así como, el seguimiento de las propiedades ópticas de estos AuNMs para el desarrollo de nuevas técnicas mixtas sintético-sensoras.

Respecto a la síntesis in-situ de AuNMs a partir de los residuos reductores de proteínas (**sección 2A**), se ha demostrado su viabilidad en el caso de la enzima LAAO, provocando además la modificación de la estructura de la enzima. Este hecho, ha dado lugar a una mejora de la fluorescencia intrínseca de FAD, resultado de interés para las enzimas que poseen este cofactor. Sin embargo, cabe resaltar, que este método depende de la estructura determinada de cada enzima, por lo que no podría ser aplicado en todos los casos, siendo necesario el análisis previo de la estructura proteica. Además, un factor crítico para el uso de estos AuNMs en su aplicación sensora, es la cinética de la reacción enzimática implicada, que ha de ser adecuada para el seguimiento de las propiedades fluorescentes de estos AuNMs. Otro factor crítico del método es, que al sintetizarse el AuNM en el interior de las enzimas, su actividad puede verse afectada limitando las propiedades indicadoras de estas.

Por otro lado, respecto a la síntesis de AuNPs in situ mediante las propiedades redox de la enzima LAAO y su sustrato L-fenilalanina (**sección 2B**), los resultados mostrados justifican que el método sea un buen candidato para la determinación del analito en muestras de suero sanguíneo, ya que el rango de concentraciones que se puede medir es adecuado y no cabe esperar que se produzcan interferencias de otros aminoácidos presentes en el suero. Sin embargo, es necesario realizar estudios con muestras reales de suero en las que las concentraciones del analito sean conocidas, con objeto de descartar efectos interferentes (en particular, sobre la cinética de la reacción) por parte de otras especies. Además, sería interesante realizar estudios adicionales que permitan reducir aún más los tiempos de análisis para la detección de un rango de concentraciones más alto (enfermedad activa).

Es importante resaltar que, el estudio llevado a cabo en esta tesis respecto al mecanismo de la reacción enzimática LAAO- L-Phe en presencia de Au(III), ha permitido dar un paso más en la utilización de las propiedades redox de una reacción enzimática, metodología en la que el grupo de investigación ha sido pionero al desarrollar un sensor para la determinación de aminos bógenas.⁵² Sin embargo, el mecanismo de esta síntesis puede variar en función de la enzima empleada o debido al efecto de algunos productos de reacción.

Respecto a las perspectivas futuras de esta metodología, los siguientes pasos se centran en la inmovilización de estos sistemas en soportes sólidos, que permitan el desarrollo de métodos POC. Algunas de las opciones planteadas en este caso son, el uso de soportes de celulosa o de tectómeros, ya mencionados en el capítulo 1.

Respecto a los soportes de celulosa, la idea es la inmovilización de la enzima y Au(III) durante el secado de la pasta de celulosa. De esta manera, la adición de un pequeño volumen de la muestra sobre el soporte, generaría la aparición de color en la celulosa, debido a la formación de AuNPs. Algunas de las primeras pruebas realizadas en el grupo de investigación muestran las posibilidades de esta metodología para el desarrollo de tiras reactivas. (**Figura 2.5**) Sin embargo,

este proceso debe ser estudiado en profundidad, ya que los primeros ensayos, han mostrado la necesidad de adicción de altas concentraciones de analito para lograr la aparición de AuNPs.



Figura 2.5: Soportes de celulosa que contienen inmovilizada una enzima modelo y Au(III). Tras la adición del sustrato, se observa la aparición de colores que indican la formación de AuNPs.

Respecto al uso de tectómeros, los primeros estudios realizados por el grupo⁵³, han permitido la inmovilización de la enzima HRP, obteniéndose láminas de tectómero sobre soportes plásticos, como las mostradas en la **Figura 2.6A**. Se muestra además como, tras la adición sobre el soporte del colorante ABTS y el sustrato H_2O_2 , el tectómero se torna azul, indicando la conversión de ABTS tras el proceso de oxidación. Se ha estudiado, además, la inmovilización de una premezcla tectómero/Au (III), que ha sido observada por SEM, observándose que el Au(III) queda retenido. Los bordes difuminados en el contorno del Au, indican que hay materia orgánica (oligoglicinas) reteniéndolo. (**Figura 2.6B**).

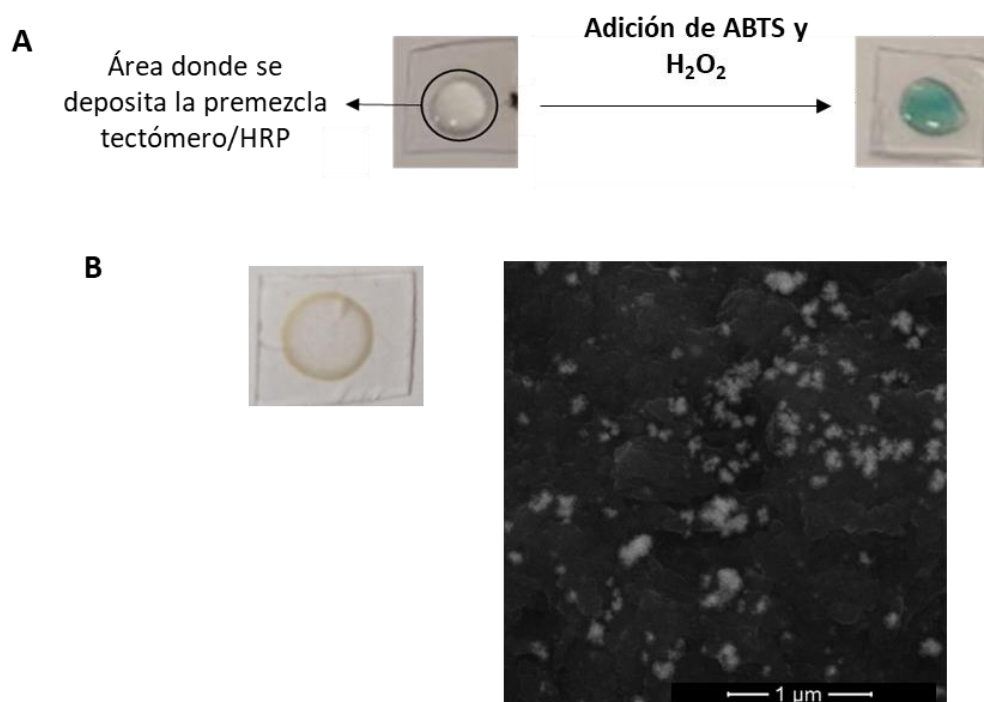


Figura 2.6: A) Lámina de tectómero, depositada sobre un soporte plástico, que contiene inmovilizada la enzima HRP. Se observa la aparición de color azul tras la adición de ABTS y H_2O_2 . **B)** Lámina de tectómero y Au(III) junto a su imagen SEM.

Estos resultados preliminares muestran las amplias posibilidades del uso de tectómeros como soportes para la formación de AuNPs como indicadores de reacciones enzimáticas.

2.5. Bibliografía

- (1) Daruich De Souza, C.; Ribeiro Nogueira, B.; Rostelato, M. E. C. M. Review of the Methodologies Used in the Synthesis Gold Nanoparticles by Chemical Reduction. *J. Alloys Compd.* **2019**, *798*, 714–740. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2019.05.153>.
- (2) Zeng, S.; Yong, K. T.; Roy, I.; Dinh, X. Q.; Yu, X.; Luan, F. A Review on Functionalized Gold Nanoparticles for Biosensing Applications. *Plasmonics* **2011**, *6* (3), 491–506. <https://doi.org/10.1007/s11468-011-9228-1>.
- (3) Sabela, M.; Balme, S.; Bechelany, M.; Janot, J. M.; Bisetty, K. A Review of Gold and Silver Nanoparticle-Based Colorimetric Sensing Assays. *Adv. Eng. Mater.* **2017**, *19* (12), 1–24. <https://doi.org/10.1002/adem.201700270>.
- (4) Demchenko, A. P. Nanoparticles and Nanocomposites for Fluorescence Sensing and Imaging. *Methods Appl. Fluoresc.* **2013**, *1* (2). <https://doi.org/10.1088/2050-6120/1/2/022001>.
- (5) Xie, J.; Zheng, Y.; Ying, J. Y. Protein-Directed Synthesis of Highly Fluorescent Gold Nanoclusters. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (3), 888–889. <https://doi.org/10.1021/ja806804u>.
- (6) Xu, Y.; Sherwood, J.; Qin, Y.; Crowley, D.; Bonizzoni, M.; Bao, Y. The Role of Protein Characteristics in the Formation and Fluorescence of Au Nanoclusters. *Nanoscale* **2014**, *6* (3), 1515–1524. <https://doi.org/10.1039/c3nr06040c>.
- (7) Navarro, J.; de Marcos, S.; Galbán, J. Colorimetric-Enzymatic Determination of Tyramine by Generation of Gold Nanoparticles. *Microchim. Acta* **2020**, *187* (3). <https://doi.org/10.1007/s00604-020-4141-y>.
- (8) Bai, J.; Flowers, K.; Benegal, S.; Calizo, M.; Patel, V.; Bishnoi, S. W. Using the Enzymatic Growth of Nanoparticles to Create a Biosensor: An Undergraduate Quantitative Analysis Experiment. *J. Chem. Educ.* **2009**, *86* (6), 712–714. <https://doi.org/10.1021/ed086p712>.
- (9) Liu, B. W.; Wu, Y. Y.; Huang, P. C.; Wu, F. Y. Colorimetric Determination of Cytosine-Rich SsDNA by Silver(I)-Modulated Glucose Oxidase-Catalyzed Growth of Gold Nanoparticles. *Microchim. Acta* **2019**, *186* (7). <https://doi.org/10.1007/s00604-019-3591-6>.
- (10) Li, G.; Yang, M.; Chen, L. C.; Gao, B.; Xiong, X. L. Colorimetric and Visual Detection of Tyrosine Based on Its Copper-Catalyzed Enzymatic Oxidation to Dopamine and Subsequent Reductive Formation of Colored Gold Nanoparticles Using Copper Ions. *Microchim. Acta* **2015**, *182* (1–2), 113–117. <https://doi.org/10.1007/s00604-014-1278-6>.
- (11) Liu, X.; Zhang, S.; Tan, P.; Zhou, J.; Huang, Y.; Nie, Z.; Yao, S. A Plasmonic Blood Glucose Monitor Based on Enzymatic Etching of Gold Nanorods. *Chem. Commun.* **2013**, *49* (18), 1856–1858. <https://doi.org/10.1039/c3cc38476d>.
- (12) Saa, L.; Coronado-Puchau, M.; Pavlov, V.; Liz-Marzán, L. M. Enzymatic Etching of Gold Nanorods by Horseradish Peroxidase and Application to Blood Glucose Detection. *Nanoscale* **2014**, *6* (13), 7405–7409. <https://doi.org/10.1039/c4nr01323a>.
- (13) Moustafa, I. M.; Foster, S.; Lyubimov, A. Y.; Vrieling, A. Crystal Structure of LAAO from *Calloselasma Rhodostoma* with an L-Phenylalanine Substrate: Insights into Structure and Mechanism. *J. Mol. Biol.* **2006**, *364* (5), 991–1002. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.09.032>.

- (14) Du, X. Y.; Clemetson, K. J. Snake Venom L-Amino Acid Oxidases. *Toxicon* **2002**, *40* (6), 659–665. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(02\)00102-2](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(02)00102-2).
- (15) Castellano, F.; Molinier-Frenkel, V. An Overview of L-Amino Acid Oxidase Functions from Bacteria to Mammals: Focus on the Immunoregulatory Phenylalanine Oxidase IL411. *Molecules* **2017**, *22* (12), 1–11. <https://doi.org/10.3390/molecules22122151>.
- (16) Zhang, Y. J.; Wang, J. H.; Lee, W. H.; Wang, Q.; Liu, H.; Zheng, Y. T.; Zhang, Y. Molecular Characterization of Trimeresurus Stejnegeri Venom L-Amino Acid Oxidase with Potential Anti-HIV Activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *309* (3), 598–604. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.08.044>.
- (17) Chevrier, D. M. Properties and Applications of Protein-Stabilized Fluorescent Gold Nanoclusters: Short Review. *J. Nanophotonics* **2012**, *6* (1), 064504. <https://doi.org/10.1117/1.jnp.6.064504>.
- (18) Kenry; Duan, Y.; Liu, B. Recent Advances of Optical Imaging in the Second Near-Infrared Window. *Adv. Mater.* **2018**, *30* (47), 1–19. <https://doi.org/10.1002/adma.201802394>.
- (19) Chen, G.; Zhang, Y.; Li, C.; Huang, D.; Wang, Q.; Wang, Q. Recent Advances in Tracking the Transplanted Stem Cells Using Near-Infrared Fluorescent Nanoprobes: Turning from the First to the Second Near-Infrared Window. *Adv. Healthc. Mater.* **2018**, *7* (20), 1–18. <https://doi.org/10.1002/adhm.201800497>.
- (20) Ortega, E.; De Marcos, S.; Sanz-Vicente, I.; Ubide, C.; Ostra, M.; Vidal, M.; Galbán, J. Fluorescence of the Flavin Group in Choline Oxidase. Insights and Analytical Applications for the Determination of Choline and Betaine Aldehyde. *Talanta* **2016**, *147*, 253–260. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.09.060>.
- (21) Pawelek, P. D.; Cheah, J.; Coulombe, R.; Macheroux, P.; Ghisla, S.; Vrieland, A. The Structure of L-Amino Acid Oxidase Reveals the Substrate Trajectory into an Enantiomerically Conserved Active Site. *EMBO J.* **2000**, *19* (16), 4204–4215. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.16.4204>.
- (22) Chen, T. H.; Tseng, W. L. (Lysozyme Type VI)-Stabilized Au₈ Clusters: Synthesis Mechanism and Application for Sensing of Glutathione in a Single Drop of Blood. *Small* **2012**, *8* (12), 1912–1919. <https://doi.org/10.1002/smll.201102741>.
- (23) Guével, X. Le; Daum, N.; Schneider, M. Synthesis and Characterization of Human Transferrin-Stabilized Gold Nanoclusters. *Nanotechnology* **2011**, *22* (27). <https://doi.org/10.1088/0957-4484/22/27/275103>.
- (24) Kawasaki, H.; Yoshimura, K.; Hamaguchi, K.; Arakawa, A. R. Trypsin-Stabilized Fluorescent Gold Nanocluster for Sensitive and Selective Hg²⁺ Detection. *Anal. Sci.* **2011**, *27* (6), 591–596. <https://doi.org/10.2116/analsci.27.591>.
- (25) Kawasaki, H.; Hamaguchi, K.; Osaka, I.; Arakawa, R. Ph-Dependent Synthesis of Pepsin-Mediated Gold Nanoclusters with Blue Green and Red Fluorescent Emission. *Adv. Funct. Mater.* **2011**, *21* (18). <https://doi.org/10.1002/adfm.201100886>.
- (26) Wen, F.; Dong, Y.; Feng, L.; Wang, S.; Zhang, S.; Zhang, X. Horseradish Peroxidase Functionalized Fluorescent Gold Nanoclusters for Hydrogen Peroxide Sensing. *Anal. Chem.* **2011**. <https://doi.org/10.1021/ac1031447>.
- (27) Xu, Y.; Palchoudhury, S.; Qin, Y.; MacHer, T.; Bao, Y. Make Conjugation Simple: A Facile Approach to Integrated Nanostructures. *Langmuir* **2012**, *28* (23), 8767–8772. <https://doi.org/10.1021/la301200g>.

- (28) Katchalski, E.; Benjamin, G. S.; Gross, V. The Availability of the Disulfide Bonds of Human and Bovine Serum Albumin and of Bovine γ -Globulin to Reduction by Thioglycolic Acid. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79* (15), 4096–4099. <https://doi.org/10.1021/ja01572a034>.
- (29) Njoki, P. N.; Lim, I. I. S.; Mott, D.; Park, H. Y.; Khan, B.; Mishra, S.; Sujakumar, R.; Luo, J.; Zhong, C. J. Size Correlation of Optical and Spectroscopic Properties for Gold Nanoparticles. *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111* (40), 14664–14669. <https://doi.org/10.1021/jp074902z>.
- (30) Goldys, E. M.; Sobhan, M. A. Fluorescence of Colloidal Gold Nanoparticles Is Controlled by the Surface Adsorbate. *Adv. Funct. Mater.* **2012**, *22* (9), 1906–1913. <https://doi.org/10.1002/adfm.201102057>.
- (31) Mooradian, A. Photoluminescence of Metals. *Phys. Rev. Lett.* **1969**, *22* (5), 185–187. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.22.185>.
- (32) Zhu, G.; Gavrilenko, V. I.; Noginov, M. A. Emission of Au Nanoparticles with and without Rhodamine 6G Dye. *J. Chem. Phys.* **2007**, *127* (10). <https://doi.org/10.1063/1.2764051>.
- (33) Dulkeith, E.; Niedereichholz, T.; Klar, T. A.; Feldmann, J.; Von Plessen, G.; Gittins, D. I.; Mayya, K. S.; Caruso, F. Plasmon Emission in Photoexcited Gold Nanoparticles. *Phys. Rev. B - Condens. Matter Mater. Phys.* **2004**, *70* (20), 1–4. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.70.205424>.
- (34) Blau, N.; Van Spronsen, F. J.; Levy, H. L. Phenylketonuria. *Lancet* **2010**, *376* (9750), 1417–1427. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60961-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60961-0).
- (35) Blau, N. Genetics of Phenylketonuria: Then and Now. *Hum. Mutat.* **2016**, *37* (6), 508–515. <https://doi.org/10.1002/humu.22980>.
- (36) Regier, D. S.; Greene, C. L. Phenylalanine Hydroxylase Deficiency Summary Diagnosis Suggestive Findings. **2019**, 1–23.
- (37) Deng, C.; Deng, Y.; Wang, B.; Yang, X. Gas Chromatography-Mass Spectrometry Method for Determination of Phenylalanine and Tyrosine in Neonatal Blood Spots. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2002**, *780* (2), 407–413. [https://doi.org/10.1016/S1570-0232\(02\)00632-3](https://doi.org/10.1016/S1570-0232(02)00632-3).
- (38) Lee, H.; Park, S.; Lee, G. Determination of Phenylalanine in Human Serum by Isotope Dilution Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2016**, *20*, 1913–1917. <https://doi.org/10.1002/rcm>.
- (39) Gerasimova, N. S.; Steklova, I. V. Fluorometric Method for Phenylalanine Microplate Assay Adapted for Phenyl- Ketonuria Screening. *Clin. Chem.* **1989**, *35* (10), 2112–2115.
- (40) Keffler, S.; Denmeade, R.; Green, A. Neonatal Screening for Phenylketonuria: Evaluation of an Automated Enzymatic Method. *Ann. Clin. Biochem.* **1994**, *31* (2), 134–139. <https://doi.org/10.1177/000456329403100204>.
- (41) Talanta, E.; Kiba, N.; Itagaki, A.; Chemistry, A. Analysis Using Immobilized Phenylalanine Dehydrogenase And. **1997**, *44*, 131–134.
- (42) Guthrie, R.; Straus, R.; Coffelt, R. W.; Fish, C. H. A Cooperatire Study of Methods for Pbenylalanine Determination ." McCaman-Robins Fluorimetric and Microbiologic Inbibition Methods. No. Table I.
- (43) Hanley, W. B.; Demshar, H.; Preston, M. A.; Borczyk, A.; Schoonheydt, W. E.; Clarke, J. T. R.; Feigenbaum, A. Newborn Phenylketonuria (PKU) Guthrie (BIA) Screening and Early

- Hospital Discharge. *Early Hum. Dev.* **1997**, *47* (1), 87–96. [https://doi.org/10.1016/S0378-3782\(96\)01846-4](https://doi.org/10.1016/S0378-3782(96)01846-4).
- (44) Cao, G.; Sun, D.; Gu, T.; Dong, Y.; Wang, G. L. Photoswitching Enzymatic Activity of Horseradish Peroxidase by Graphene Oxide for Colorimetric Immunoassay. *Biosens. Bioelectron.* **2019**, *145* (September), 111707. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.111707>.
- (45) Navarro, J.; Sanz-Vicente, I.; Lozano, R.; de Marcos, S.; Galbán, J. Analytical Possibilities of Putrescine and Cadaverine Enzymatic Colorimetric Determination in Tuna Based on Diamine Oxidase: A Critical Study of the Use of ABTS. *Talanta* **2020**, *208* (September 2019), 120392. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120392>.
- (46) Zheng, L.; Zhao, M.; Xiao, C.; Zhao, Q.; Su, G. Practical Problems When Using ABTS Assay to Assess the Radical-Scavenging Activity of Peptides: Importance of Controlling Reaction PH and Time. *Food Chem.* **2016**, *192*, 288–294. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.015>.
- (47) Arnao, M. B. Some Methodological Problems in the Determination of Antioxidant Activity Using Chromogen Radicals: A Practical Case. *Trends Food Sci. Technol.* **2000**, *11* (11), 419–421. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(01\)00027-9](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(01)00027-9).
- (48) Alonso-de Castro, S.; Cortajarena, A. L.; López-Gallego, F.; Salassa, L. Bioorthogonal Catalytic Activation of Platinum and Ruthenium Anticancer Complexes by FAD and Flavoproteins. *Angew. Chemie* **2018**, *130* (12), 3197–3201. <https://doi.org/10.1002/ange.201800288>.
- (49) Chen, F.; Wang, Y.; Ma, J.; Yang, G. A Biocompatible Synthesis of Gold Nanoparticles by Tris(Hydroxymethyl)Aminomethane. *Nanoscale Res. Lett.* **2014**, *9* (1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-9-220>.
- (50) Jayaprakash, N.; Judith Vijaya, J.; John Kennedy, L.; Priadharsini, K.; Palani, P. Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Synthesized from Serine. *Mater. Sci. Eng. C* **2015**, *49*, 316–322. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.01.012>.
- (51) Felig, P.; Wahren, J.; Raf, L. Evidence of Inter Organ Amino Acid Transport by Blood Cells in Humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1973**, *70* (6), 1775–1779. <https://doi.org/10.1073/pnas.70.6.1775>.
- (52) Navarro, J., de Marcos, S., & Galbán, J. Colorimetric-enzymatic determination of tyramine by generation of gold nanoparticles. *Microchimica Acta*, **2020**, *187*(3), 1-8. <https://doi.org/10.1007/s00604-020-4141-y>
- (53) Trabajo fin de master: 'Desarrollo de un sensor óptico enzimático para la determinación específica de tiramina en alimentos' Oliver Ledesma, Sofia. Universidad de Zaragoza, Facultad de Ciencias, **2020**.

Capítulo 3

Nanoprismas de oro como transductores para el desarrollo de inmunosensores fototérmicos plasmónicos

3.1. Introducción

Si bien los capítulos 1 y 2 de esta Tesis Doctoral se centran en la aplicación de AuNMs en el desarrollo de biosensores enzimáticos, la gran alternativa al uso de enzimas como elemento de reconocimiento biológico son los anticuerpos. Presentan ventajas como su elevada sensibilidad y especificidad, estabilidad química, afinidad variable y respuesta rápida, lo que hace mayoritario el número de los biosensores desarrollados que utilizan la unión antígeno-anticuerpo como herramienta diagnóstica.¹ Los biosensores que utilizan anticuerpos como ligandos se denominan inmunosensores.² Sin embargo, estos presentan desventajas frente a los biosensores enzimáticos; no existe consumo del analito por lo que se saturan (rango de operación de concentración estrecho) y su regeneración es difícil, se trata de dispositivos de un solo uso. Por su lado, los métodos enzimáticos también presentan inconvenientes frente a los métodos inmunológicos, las enzimas pueden ser inhibidas por sustancias presentes en la muestra y presentan una fuerte sensibilidad frente a condiciones ambientales (pH, temperatura o fuerza iónica).

Los inmunosensores comenzaron a usarse para el análisis de alimentos a mediados de la década de 1990 y es en los últimos años cuando se han realizado importantes avances en la miniaturización³⁻⁶ para la detección in situ e incluso simultánea de varias biomoléculas. Estos inmunosensores son utilizados en campos muy diversos⁷, entre ellos destacan la alimentación⁸ y medioambiente⁹. Sin embargo, el área que centra una mayor atención y crecimiento en este tipo de metodologías es el diagnóstico clínico y dentro del mismo, el estudio y detección precoz de cáncer¹⁰.

El cáncer es la segunda causa de muerte en el mundo, según la Organización Mundial de la Salud, casi una de cada seis muertes en el mundo es debida a esta enfermedad. El cáncer puede desarrollarse por diversas alteraciones que pueden incluir la interacción de factores genéticos y de agentes externos, como el alcohol, el sobrepeso y la obesidad. Según la OMS (2018), los tipos de cáncer más comunes en el mundo son: cáncer de pulmón (2,09 millones de casos cada año), cáncer de mama (2,09 millones de casos), cáncer colorrectal (1,80 millones de casos), cáncer de próstata (1,28 millones de casos), cáncer de piel (1,04 millones de casos) y de estómago (1,03 millones de casos).

En este capítulo se abarca la detección de dos tipos de cáncer diferentes, cáncer gastrointestinal (Sección A y C) y cáncer de próstata (Sección B);

- 1) Por un lado, los **cánceres gastrointestinales**, que incluyen el cáncer de todos los órganos del sistema digestivo (**Figura 3.1**), son algunos de los que mayor mortalidad presentan, representando hoy en día el 20 por ciento de todos los casos de cáncer diagnosticados,¹¹ lo cual es debido al mal pronóstico, con una baja supervivencia de 5 años y menos de un año en el caso de etapas avanzadas que presentan este tipo de cáncer. Por ello, la identificación de patrones únicos y biomarcadores específicos es esencial para desarrollar herramientas de diagnóstico precisas y tratamientos efectivos. Hasta ahora, el número de biomarcadores efectivos aplicados en la clínica para el diagnóstico de cáncer gástrico es muy bajo.¹²

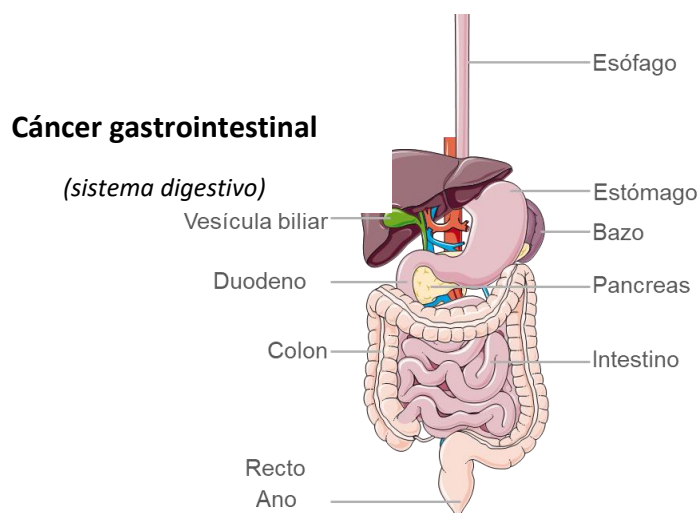


Figura 3.1: Clasificación de los tipos de cáncer del sistema digestivo que se engloban en la familia de cánceres gastrointestinales.

Es así que, algunos de los biomarcadores más utilizados (secretados por las células cancerosas en la sangre o en otros fluidos corporales) para el diagnóstico de cáncer colorrectal o el cáncer de páncreas son: el antígeno carbohidrato 19.9 (CA19.9), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el antígeno carcinoembrionario (CEA), cuyos valores biológicos de concentración en sangre normales, de enfermedad activa y de enfermedad avanzada se recogen en la **Tabla 3.1**.^{13,14} Estos marcadores sanguíneos se determinan actualmente con métodos analíticos tradicionales como inmunoensayos ELISA¹⁵, pero a pesar de ser antígenos ampliamente utilizados para el diagnóstico de este tipo de tumores, no son específicos, ya que pueden estar a altos niveles en diferentes patologías de cáncer y nos siempre son marcadores sensibles en casos metastásicos que involucran tumores no secretores.¹⁶

	Valor normal en sangre		Enfermedad activa	Enfermedad avanzada
	Fumadores	No fumadores		
CEA (ng/mL)	< 5	< 2.5	> 5	> 20
VEGF (ng/mL)	< 0.13		> 0.13	> 0.8
CA 19.9 (U/mL)	< 37		> 37	> 300

Tabla 3.1: Valores biológicos en sangre de los marcadores cancerígenos gástricos más usados en el diagnóstico de estas patologías en pacientes no enfermos, con enfermedad activa o enfermedad avanzada.

Es por ello por lo que el principal desafío en el diagnóstico de este tipo de cáncer se centra, por un lado, en la *detección específica*, a través de la búsqueda de nuevos marcadores tumorales en sangre (u otros fluidos biológicos) relacionados con el cáncer gastrointestinal y, por otro lado, en la *detección temprana*, a través del desarrollo de nuevos métodos que permitan la detección ultrasensible de estos marcadores en límites a los que los métodos clásicos no pueden competir en sensibilidad.

Cáncer gastrointestinal/próstata

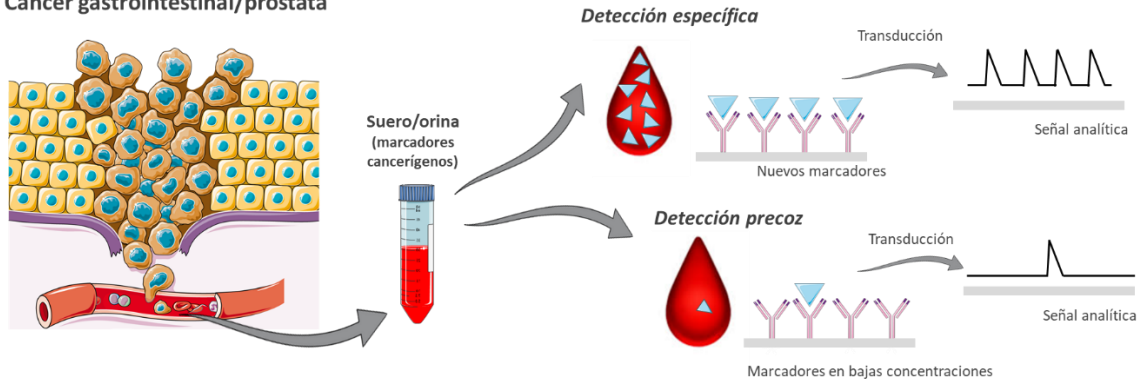


Figura 3.2: Desafíos en el desarrollo de nuevas metodologías para la detección de cáncer gastrointestinal o de próstata en fluidos biológicos.

Por tanto, existe un trabajo en paralelo en cuanto a la búsqueda de nuevos biomarcadores y al desarrollo de biosensores más sensibles y de preferencia en formatos *'point-of care'*. En esta última labor, se suelen seleccionar los biomarcadores usados en clínica, que, aunque no específicos, permiten comparar niveles de sensibilidad de nuevas tecnologías frente a métodos considerados actualmente como *'gold standard'* en clínica.

- 2) Por otro lado, el **cáncer de próstata** es el sexto cáncer más común en el mundo y el tercero más común en hombres. La incidencia del cáncer de próstata está aumentando de manera constante en casi todos los países¹⁷, lo que hace necesario, como en el caso anterior, la búsqueda de nuevos marcadores y el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico precoz (**Figura 3.2**). En este caso, en los últimos años se ha producido un gran avance con respecto al descubrimiento de nuevos biomarcadores de cáncer de próstata, así, además de los tipos de marcadores más comunes (proteínas, ADN, ARN y metabolitos), diversos estudios han informado que muchas proteínas y ARN derivados del cáncer se secretan a través de pequeñas vesículas extracelulares conocidas como exosomas. Por ello, en la actualidad, el interés se centra en el desarrollo de nuevos biosensores para la detección de exosomas en fluidos biológicos, sin embargo, la mayoría de estas plataformas son solo pruebas conceptuales que no tienen cabida aún en el mercado o no alcanzan la sensibilidad necesaria en este tipo de análisis.

Como solución a los problemas actuales que presenta la detección precoz de diversos tipos de cancer, nuevos avances en los campos de microelectrónica, materiales y nanotecnología se están implementando en los nuevos sistemas sensores desarrollados.^{18,19} Actualmente existen multitud de métodos que utilizan diferentes tipos de nanopartículas, especialmente AuNMs, para la amplificación de la señal en diferentes inmunosensores e inmunoensayos tipo sándwich^{20,21}. Así, el desarrollo de nanobiosensores inmunológicos, es claramente un área en crecimiento exponencial en los últimos años, donde en muchos casos, se han obtenido muy buenos resultados, demostrando que la integración de materiales nanoestructurados en estos sistemas facilita la multidetección así como la detección ultrasensible.²²

Sin embargo, sigue habiendo retos a alcanzar que hacen necesario la exploración de nuevos esquemas de transducción. Si bien se han desarrollado tecnologías nanoinmunosensoras muy sensibles, algunas de ellas no han ido más allá que hasta pruebas de concepto, debido a la falta de eficiencia y de sistemas autónomos capaces de monitoreo continuo de datos (bio)químicos en aplicaciones clínicas, ambientales o alimentarias. Otros casos, en las que estas tecnologías se han comercializado o están en vías a su comercialización, suelen no ser compatibles con un

formato POC implican el uso de muchas etapas de amplificación o formatos de detección e interpretación de señales a los que el personal clínico no está acostumbrados.

Dependiendo de la propiedad intrínseca del AuNM utilizado, es posible traducir el reconocimiento biológico en una señal electroquímica, sensible a la masa, óptica, quimioluminiscente, electroquimioluminiscente, fluorescente o de resonancia de plasmón superficial localizada²³. Esta última propiedad es una de las más utilizadas en el desarrollo de inmunosensores, así, los métodos LSPR basados en nanopartículas de oro son la base de una amplia variedad de metodologías de detección e imagen debido a su alta versatilidad y las especiales propiedades ópticas modulables que presentan estos nanomateriales.²⁴

Es así que, en esta tesis doctoral, se quiso explorar el uso de AuNMs con plasmón superficial con una alta tasa de conversión fototérmica, es decir, capaces de convertir la energía de la luz en calor, como elementos de transducción en formatos de biosensores ya muy instaurados en la práctica clínica como la metodología ELISA o los inmunoensayos de flujo lateral, LFIA. La anisotropía en este tipo de nanopartículas de oro cambia sus propiedades ópticas y como resultado, es posible encontrar nanopartículas con una fuerte absorción en el NIR que, tras la excitación por luz incidente de la misma longitud de onda, pueden generar un fuerte calentamiento local. Este fenómeno se llama 'conversión fototérmica de la energía de la luz' y hace que estos AuNMs anisotrópicos sean extremadamente eficientes para el calentamiento inducido por NIR.²⁵⁻²⁷ Si bien el uso de este tipo de AuNMs está muy extendido para terapia fototérmica^{24,28-30}, termografía^{31,32}, ha sido menos explorado su uso en el desarrollo de biosensores con detección térmica^{33,34} como metodología de transducción de la señal biológica.

En este sentido, nuestro grupo BioNanoSurf, fue pionero en el uso de nanoprismas de oro (AuNPrs) como etiquetas de detección en inmunoensayos. En particular los AuNPrs, son un ejemplo de nanopartículas anisotrópicas de tamaños superiores a 100 nm, que exhiben LSPR en la región del infrarrojo cercano (NIR), esta propiedad óptica permite que bajas concentraciones de AuNPrs conviertan la energía de la luz en una cantidad calor cuantificable de una forma muy efectiva, mediante un *efecto fototérmico* (**Figura 3.3**).²⁷

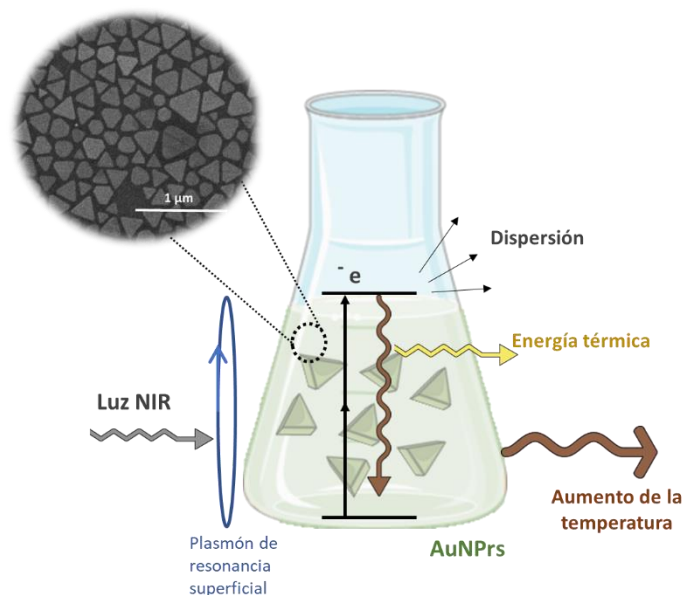


Figura 3.3: Efecto fototérmico experimentado por una disolución de nanoprismas de oro al ser irradiada con luz del infrarrojo cercano (NIR).

Así, los AuNPrs vinculados a un receptor biológico pueden actuar como transductores fisicoquímicos, interpretando el reconocimiento biológico con el analito como una señal térmica detectable. (Figura 3.4) La aplicación de estas nanopartículas fue probada previamente en el grupo en el desarrollo de un inmunoensayo tipo “dot-blot” cualitativo obteniendo alta sensibilidad, selectividad y especificidad.³⁴

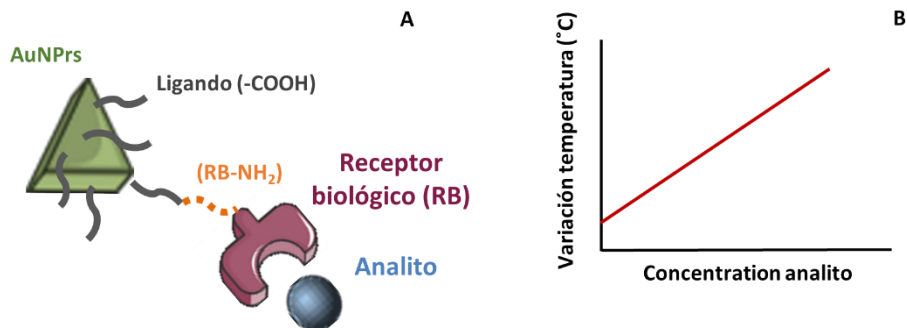


Figura 3.4: **A)** Nanoprismas de oro como transductores físico-químicos en el reconocimiento biológico de moléculas de interés biomédico y la **B)** Señal térmica generada durante el reconocimiento biológico del analito.

Estos resultados previos fueron la prueba de concepto que demostró que los AuNPrs pueden ser usados como etiquetas térmicas ultrasensibles en inmunoensayos, lo que llevó además a presentar a una patente internacional (PCT/ES2013/070549) que ha sido licenciada por Nanoimmunotech SL (NIT) y que se encuentra aprobada en fase regional/nacional en la Unión Europea, Estados Unidos, Japón y los países BRIC (Brasil, Rusia, India y China). Desde su licenciamiento a NIT, el grupo y la empresa trabajan en colaboración no sólo para llevar a cabo actividades de transferencia sino también nuevos desarrollos basados en el uso de esta nueva tecnología de transducción. Es así que NIT centró sus esfuerzos en adaptar el uso de AuNPrs como etiquetas térmicas en el ámbito de la industria alimentaria y enfocándose en un biosensor basado en microfluídica. El grupo en paralelo a través de esta tesis doctoral, fue el encargado de explorar su adaptación a formatos de inmunoensayos cuantitativos de uso establecido y común en clínica; como la metodología ELISA, cuantitativa pero con sensibilidad limitada en algunos casos, y la metodología LFIA que además de que tradicionalmente presenta baja sensibilidad, es más usual su uso en formato cualitativo o semi-cuantitativo.

Por todo ello, el objetivo de este capítulo trata de continuar en esta línea de investigación para desarrollar nuevas tecnologías cuantitativas y de alta sensibilidad basadas en el efecto fototérmico de este tipo de nanomateriales, para su aplicación a la detección de diversos marcadores cancerígenos en fluidos biológicos.

3.2. Planteamiento

Así el objetivo principal de este capítulo es el uso de nanoprismas de oro como nanotransductores térmicos en el reconocimiento biológico de marcadores cancerígenos mediante inmunoensayos de fácil transferencia clínica. La tecnología a desarrollar utiliza anticuerpos de detección (Ab_{det}) específicos acoplados a AuNPrs, que en presencia del antígeno a detectar previamente capturado por anticuerpos de captura (Ab_{cap}), formará un "sandwich" AuNPrs- Ab_{det} -antígeno- Ab_{cap} . La irradiación del este conjunto por una fuente láser NIR, genera la liberación de cantidades de calor proporcionales a la concentración de analito.

El desarrollo de este capítulo implicó la optimización, síntesis y caracterización de diferentes tipos de AuNPrs. Su funcionalización con anticuerpos llevó a investigar nuevas estrategias de funcionalización, dando lugar a esquemas totalmente diferentes a los utilizados en los capítulos 1 y 2 de esta tesis.

Así, esta tecnología aplicada a la detección de biomarcadores de **cáncer gastrointestinal o de próstata**, se presenta en este capítulo en dos formatos diferentes:

- 1) Una nueva metodología similar a la clásica prueba colorimétrica ELISA, pero con un sistema de detección diferente, utilizando los AuNPrs como etiquetas térmicas.
 - La **Sección 3A** trata del desarrollo de un nano-inmunoensayo térmico (TermoLISA) para la detección de marcadores de cáncer gastrointestinal. El ensayo TermoLISA tiene como fin verificar no sólo la capacidad de amplificación de estas nanopartículas sino también evaluar su valor diagnóstico en sí mismo a través de la comparativa de su sensibilidad, LC y LD frente al ELISA colorimétrico clásico. A su vez, en el caso de los marcadores de cáncer gastrointestinal estudiados, permitió establecer las bases para el desarrollo del inmunoensayo de flujo lateral TermoLFIA.
 - La **Sección 3B** se desarrolló durante la estancia de investigación y trata de un nuevo método que utiliza la combinación del TermoLISA y la detección fluorescente (inmunoensayos de fluorescencia de resolución temporal, TRFIA). Así, la tecnología TermoTRFIA se basa en la transferencia de los cambios de calor a la señal fluorescente, este caso, para la detección de vesículas extracelulares derivadas de próstata (exosomas) como marcadores diagnósticos de este tipo de cáncer.
- 2) Un innovador y sensible inmunoensayo térmico de flujo lateral (TermoLFIA) para la detección rápida y cuantificación de concentraciones de proteína ultrabajas, en este caso, marcadores de cáncer gastrointestinal. (**Sección 3C**)

Para el desarrollo de ambas metodologías, se llevaron a cabo los siguientes sub-objetivos comunes que se desarrollan en el **apartado 3.3 'Optimización de métodos y obtención de materiales comunes'** del presente capítulo:

- a) Optimización del **método ELISA sándwich colorimétrico** para cada marcador cancerígeno gastrointestinal evaluado con el fin de estudiar la sensibilidad y los límites de detección y cuantificación de este método clásico frente a los nuevos métodos térmicos desarrollados.
- b) **Síntesis y caracterización** de diversos tipos de **nanoprismas de oro**, con el fin de evaluar sus propiedades fototérmicas y seleccionar la síntesis óptima para esta aplicación.

- c) **Bioconjugación del anticuerpo de detección** a estas nanopartículas, optimizando la unión orientada mediante la interacción no covalente estreptavidina-biotina, esta estrategia proporciona un versátil bioconjugado AuNPrs-estreptavidina que puede vincularse posteriormente a cualquier anticuerpo biotinilado, lo que permite extender fácilmente la metodología a la detección de diferentes marcadores tumorales gástricos de la sangre: CEA, CA19.9 y VEGF.

A continuación, se detalla el planteamiento de cada una de las secciones nombradas, que se resumen a modo esquemático en la **Figura 3.5**:

Sección 3A: Nano-inmunoensayo térmico (TermoLISA) para la detección de marcadores cancerígenos gastrointestinales.

Partiendo del inmunoensayo ELISA clásico, esta nueva metodología busca estudiar el efecto fototérmico de los AuNPrs y evaluar las posibilidades de la tecnología de detección térmica mediante el desarrollo de un nuevo ensayo inmunosorbente cuantitativo y de alta sensibilidad. Los AuNPrs actúan como transductores térmicos y unidos al receptor biológico (Ab_{det}) forman un sándwich en presencia del analito junto con el Ab_{cap} inmovilizado en la superficie del pocillo. La irradiación de los pocillos por una fuente de láser NIR, permite interpretar el reconocimiento biológico del analito como una señal térmica proporcional y cuantificable. Esta señal es detectada por una cámara IR, obteniéndose así la imagen térmica de cada pocillo, de la que se puede extraer la señal térmica de variación de temperatura frente al tiempo de irradiación láser.

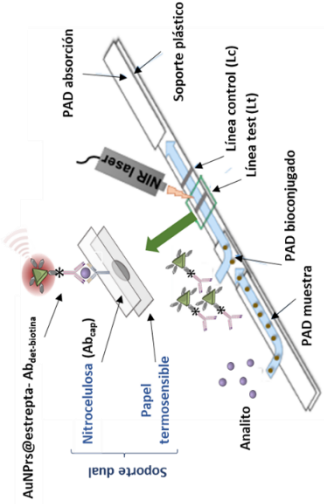
Sección 3B: Nano-inmunoensayo térmico de fluorescencia resuelta en el tiempo (TermoTRFIA) para la detección de exosomas.

La metodología TermoLISA requiere sensores térmicos (cámara de infrarrojos o termorresistencias) para cuantificar la señal, lo que hace más compleja su aplicación práctica en centros médicos. Así, en esta sección estudia la transferencia de la señal analítica de térmica a fluorescente, combinando el uso de AuNPrs como etiquetas térmicas junto con el uso de Europio como etiqueta fluorescente sensible a cambios de temperatura. Este sistema pretende facilitar la transferencia de este nuevo esquema de detección a la clínica, además de introducir un posible paso de amplificación de señal y así la mejora del LD alcanzado anteriormente. La prueba de concepto de esta metodología TermoTRFIA, se realizó durante la estancia de investigación en colaboración con el Dr. Jenster y se centró en la detección de exosomas de pacientes con cáncer de próstata, utilizando fago-nanobodies como nuevos elementos de detección.

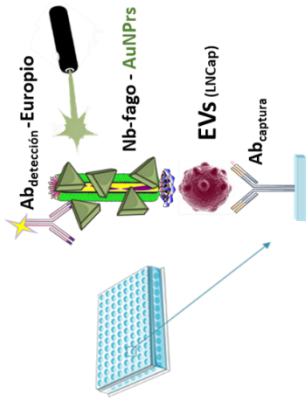
Sección 3C) Inmunosensor térmico de flujo lateral (TermoLFIA) para la detección de marcadores cancerígenos gastrointestinales.

Esta sección trata del desarrollo de un test de transducción térmica rápido, económico y sensible para la cuantificación de marcadores tumorales de cáncer gastrointestinal. En este caso los Ab_{cap} se encuentran inmovilizados en un soporte dual activo que consiste en una banda de nitrocelulosa y un papel termosensible que funciona como elemento de detección fotográfica. El sistema se basa en que la muestra fluya a lo largo del test por capilaridad, y que en presencia del analito a detectar, promueva la formación un sándwich AuNPrs- Ab_{det} -antígeno- Ab_{cap} en zona de la nitrocelulosa donde se ha sido depositado previamente el anticuerpo específico de captura (línea de test). La irradiación del área por una fuente láser NIR permite que cualquier cantidad de AuNPrs presente, libere grandes cantidades de calor, produciendo el bien el quemado de la nitrocelulosa y/o generando en el soporte de papel termosensible una señal colorimétrica visual en escala de grises, que permite la evaluación cuantitativa del analito mediante el estudio de las coordenadas de color RGB con una cámara y aplicación móvil.

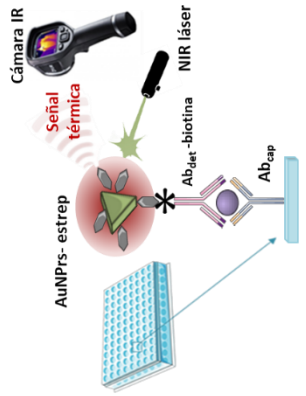
TermoLFA (Sección 3C)



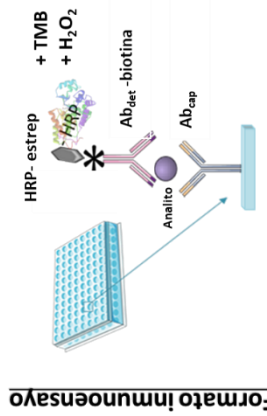
TermoTRFIA (Sección 3B)



TermoLISA (Sección 3A)

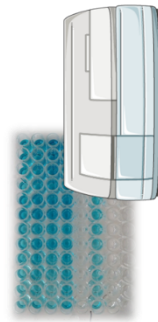


ELISA colorimétrico



Formato inmunoensayo

Sistema de transducción



Espectrofotómetro de absorción

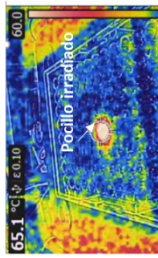
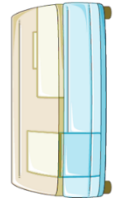
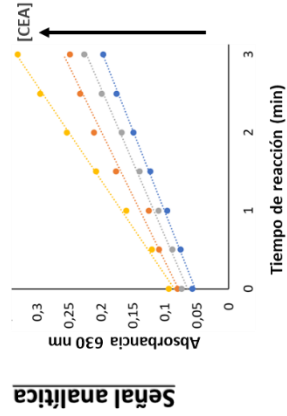


Imagen térmica



Fluorímetro
(Fluorescencia resuelta en el tiempo del Europio durante la irradiación láser)



Señal analítica

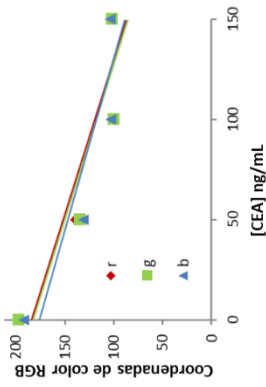
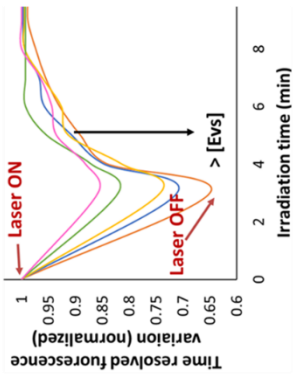
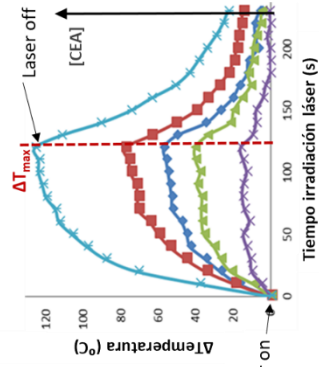


Figura 3.5: Esquema de las diferentes metodologías de inmunoensayo desarrolladas en este capítulo para la detección de marcadores de cáncer gastrointestinal y de próstata mediante detección térmica (TermoLISA, TermoTRFIA y TermoLFA), comparadas con la metodología clásica ELISA colorimétrica.

Estrep: estreptavidina

3.3. Optimización de métodos y obtención de materiales comunes

3.3.1. Optimización del Inmunoensayo ELISA sándwich colorimétrico para los distintos biomarcadores diana de cáncer gastrointestinal.

El inmunoensayo de tipo ELISA sándwich colorimétrico es un ejemplo clásico de método específico y ampliamente adaptado a la clínica para la detección de antígenos. En primer lugar, el Ab_{cap} , inmovilizado en la superficie de los pocillos de una placa multipocillos, captura el antígeno de la muestra que posteriormente es detectado a través de un conjugado anticuerpo de detección-enzima. (**Figura 3.6**) El Ab_{det} es el que reconoce el analito diana de forma específica, y la enzima actúa como elemento que desencadena su detección, usualmente de forma colorimétrica, al catalizar la bioconversión de un sustrato incoloro en un producto coloreado. Si bien en muchos casos la enzima se suele unir de forma covalente directamente al anticuerpo de detección, es también habitual el uso de anticuerpos de detección biotinilados ($Ab_{det_biotina}$) a los cuales se les une la etiqueta enzimática mediante la conocida interacción no covalente biotina-estreptavidina. En estos casos, la enzima se une covalentemente a la estreptavidina, y es esta proteína la que acopla el anticuerpo con la enzima, que es utilizada para no solo generar sino amplificar la señal analítica colorimétrica. El uso de estreptavidina como molécula de acoplamiento suele aumentar la sensibilidad en estos ensayos y evitar posibles problemas de impedimento estérico, debido a la unión extremadamente específica y de alta afinidad entre la biotina y la estreptavidina ($K_d \approx 10^{-14}M$).

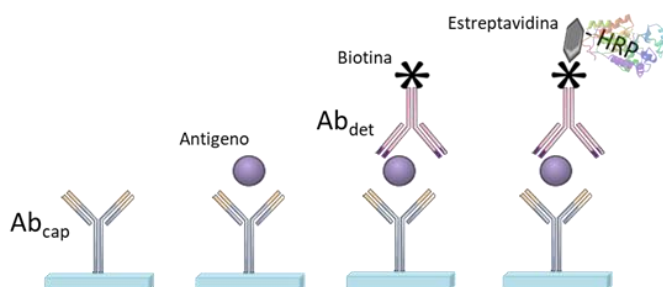


Figura 3.6: Esquema del inmunoensayo colorimétrico ELISA

La biotina, una molécula pequeña de bajo peso molecular que se conjuga fácilmente, pudiendo unirse hasta 150 moléculas de biotina por cada molécula de anticuerpo³⁵, dando lugar así a sistemas de detección de alta sensibilidad al aumentar la capacidad amplificadora del bioconjugado $Ab_{det}@enzima$. Además, la biotinylación dirigida de los anticuerpos en la región constante (cadena pesada, CH) a través de sus restos de carbohidratos o a través de tioles obtenidos después de la reducción de los disulfuros ubicados en la región bisagra, evita posibles impedimentos estéricos en los sitios de reconocimiento del antígeno (situados en las cadenas ligeras, CL)³⁶, de esta manera la interacción del anticuerpo biotinilado con la molécula de revelado (estreptavidina-enzima), no se ve comprometida con el reconocimiento de los epítopos antigénicos (**Figura 3.7**)

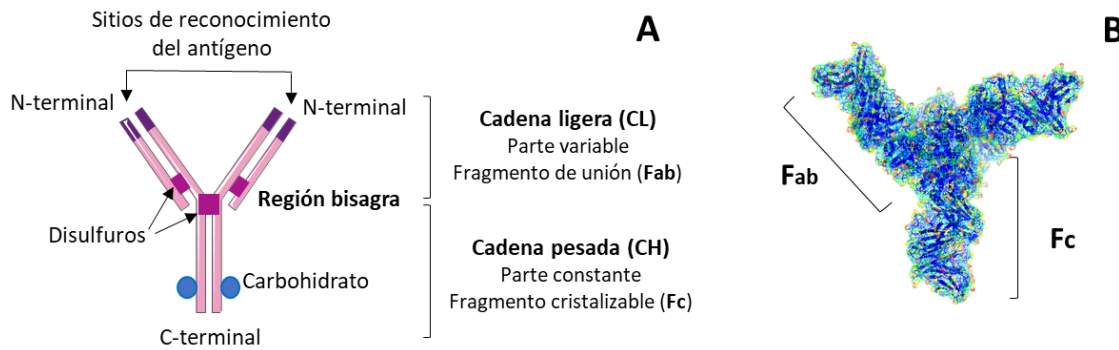


Figura 3.7: **A)** estructura en forma de Y de un Ab donde se observan las dos cadenas ligeras (regiones variables) y las cadenas pesadas (regiones constantes), así como los sitios funcionales específicos con los que el Ab puede unirse a los antígenos (N-terminal). Se muestran también los grupos que pueden ser utilizados para funcionalizar los anticuerpos de forma dirigida (disulfuros y carbohidratos) **B)** modelo tridimensional de un Ab a partir de estudios por cristalografía de rayos X extraído de la base de datos Protein Data Bank (4fqv.pdb)

Siguiendo esta metodología, diversos inmunoensayos colorimétricos ELISA sándwich se llevaron a cabo con el objetivo de validar los pares de anticuerpos (Ab_{cap} y $Ab_{det_biotina}$) para cada marcador cancerígeno y optimizar sus concentraciones, con el fin de obtener las mejores condiciones de reconocimiento, evitando efectos estéricos anticuerpo-anticuerpo y la saturación de la señal analítica de revelado, intentando además reducir al máximo la señal de fondo. El objetivo final trata de conocer las características analíticas (sensibilidad, LD y LC) que este método clásico ofrece frente a los biosensores fototérmicos desarrollados en este capítulo.

3.3.1.1 Experimental

Para el desarrollo de los diferentes ensayos ELISA, se utilizaron placas de poliestireno de 96 pocillos con superficie MaxiShorp (Nalgene Nunc International) cuya alta afinidad por moléculas con dominios mixtos hidrófilos/hidrófobos permite unir a estas los **anticuerpos de captura** seleccionados: CEA (monoclonal mouse Antibody anti-CEA MAb3C1 clone, Hytest), VEGF (monoclonal human/Primate VEGF Antibody anti-hVEGF mab239, R&D systems) y CA19.9 (monoclonal mouse Antibody anti-CA199 L1C00901, Linc-Bio).

La placa se incubó durante toda la noche a 4°C conteniendo 0,1 mL por pocillo del Ab_{cap} en disolución amortiguadora de fosfato salino (PBS) 50 mM pH 8, a las diferentes concentraciones evaluadas. La placa se vació y bloqueó con 0,25 ml de disolución de bloqueo (PBS 50 mM, NaCl 0,3 M, Tween 0,5% y 5 mg/ml de BSA) durante 1 hora a 37°C con agitación orbital, este paso es de gran importancia ya que trata de que la BSA ocupe los sitios libres en la superficie del pocillo para evitar después una adsorción del anticuerpo de detección y por tanto un aumento en la señal de fondo e incluso la aparición de falsos positivos. Después de lavar la placa dos veces con 0,25 ml de disolución de lavado (PBS con Tween al 0,5%), se incubaron durante 1 hora a 37°C con agitación orbital 0,1 ml de las muestras de **antígeno**; antígeno CEA (8CEA88, Hytest), antígeno VEGF (rhVEGF 293-VE, R&D systems) y antígeno CA19.9 (L2C007, Linc-Bio).

Luego, las distintas placas se lavaron tres veces con la disolución de lavado seguido de incubación a 37°C durante 30 minutos con 0,1 ml de los **anticuerpos de detección biotinilados** correspondientes: CEA (monoclonal mouse detection antibody biotin-labelled MAb3C6-biotin clone, Hytest), VEGF (polyclonal Human/Primate VEGF165 Biotinylated Antibody BAF293, R&D

systems) and CA 19.9 (monoclonal mouse Biotinylated Antibody anti-CA199 L1C00901-B, Linc-Bio). La placa se lavó nuevamente tres veces y después se añadieron 0,1 ml de dilución 1:2000 de peroxidasa(HRP)-estreptavidina (7100-05, SothernBiotech) en PBS. Finalmente, la placa se lavó tres veces y se midió la actividad de HRP. Para esto, se añadieron a cada pocillo 0,1 ml de sustrato de peroxidasa comercial con 3,3', 5,5'-tetrametilbencidina (TMB) (T0440, Sigma Aldrich). En esta reacción el HRP se reduce, oxidando al colorante TMB, que pasa de ser incoloro en su forma reducida a presentar una coloración azul cuando está oxidado. (**Figura 3.8A**) El cambio en las propiedades de absorción del TMB a lo largo de la reacción se sigue a 630 nm cada 30 segundos durante 10 minutos utilizando un espectrofotómetro microplacas Multiskan Sky (Thermo Scientific). De esta forma se obtienen gráficas como las de la **Figura 3.8B**, que muestran la variación de la densidad óptica (OD) en el tiempo de reacción y de las cuales podemos extraer la pendiente (pte) de la parte lineal expresada en mOD/min. Para la utilización de estas pendientes como valor comparativo obtenido para las diferentes concentraciones de anticuerpo a optimizar, es importante seleccionar en todos los casos el mismo tiempo de reacción, correspondiente a la zona lineal inicial de la curva en la que se asegura trabajar en las condiciones de velocidad inicial de la enzima.

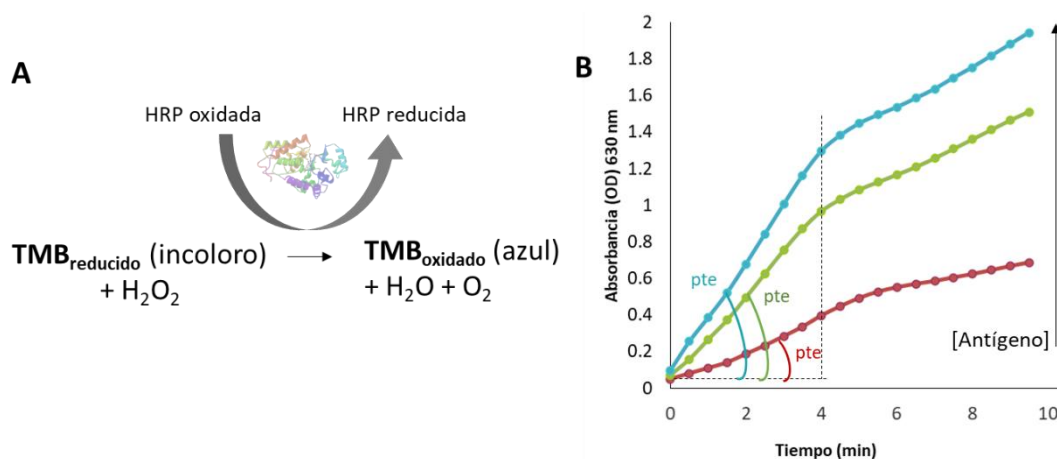


Figura 3.8: A) Reacción redox de revelado HRP-H₂O₂-TMB. **B)** Variación de la absorbancia del TMB en el tiempo de reacción para diferentes concentraciones de antígeno y misma concentración de anticuerpos de captura y detección.

3.3.1.2. Resultados

Para cada uno de los marcadores cancerígenos estudiados (CEA, VEGF y CA19.9) se optimizó la concentración, en primer lugar, del Ab_{cap} inmovilizado y posteriormente del Ab_{det_biotina}.

Antígeno carcinoembrionario (CEA)

Se evaluaron diversas concentraciones del Ab_{cap} (0, 3, 5, 8 y 12 µg/mL) usando en todos los casos una concentración fija de Ab_{det_biotina} (1 µg/mL) en un rango lineal de 0, 12, 25, 50 y 100 ng/mL de CEA y realizando triplicados para cada concentración. De esta manera representando las pendientes extraídas de la variación de densidad óptica durante los tres primeros minutos (mOD/min) frente a las diferentes concentraciones de analito, podemos obtener las rectas de calibración correspondientes a cada par Ab_{cap}- Ab_{det_biotina}, mostradas en la **Figura 3.9A**, en las que se eliminó la concentración máxima de 100 ng/mL debido a la saturación de la señal observada y la consecuente pérdida de la linealidad.

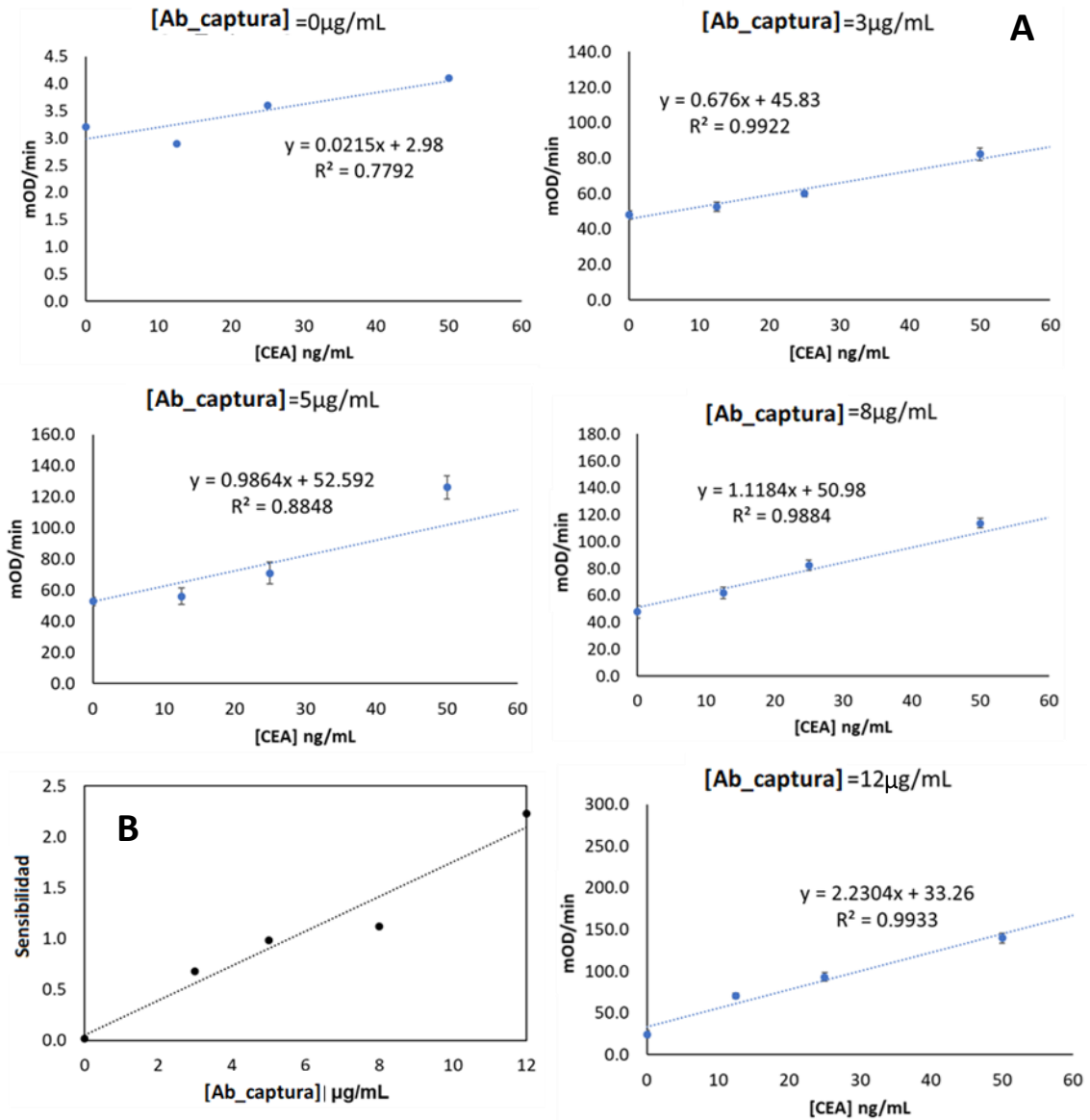


Figura 3.9: A) Optimización del Ab_{cap} para el antígeno CEA utilizando en todos los casos 1 µg/mL de $Ab_{det_biotina}$. **B)** Representación de la sensibilidad obtenida en cada caso frente a la concentración de Ab_{cap} evaluada.

En la **Figura 3.9B**, se observa cómo, en ausencia del Ab_{cap} no hay señal colorimétrica y por tanto la sensibilidad del método es prácticamente cero, lo que indica que no hay absorción del $Ab_{det_biotina}$ en el pocillo. Además, en esta figura se observa una cierta tendencia lineal en la sensibilidad respecto al aumento de la concentración. De estos resultados se pueden extraer las figuras de mérito analíticas obtenidas para cada concentración del Ab_{cap} (**Tabla 3.2**), seleccionándose 12 µg/mL como concentración óptima al proporcionar la máxima sensibilidad y menores LD y LC.

[Ab _{captura}] (µg/mL)	Sensibilidad	LD (ng/mL)	LC (ng/mL)
0	0,022	-	-
3	0,676	11,3	37,6
5	0,986	8,47	28,2
8	1,12	11,4	38,1
12	2,23	6,06	20,2

Tabla 3.2: parámetros analíticos obtenidos en la optimización del Ab_{cap} para el reconocimiento del antígeno CEA.

Utilizando 12 µg/mL de Ab_{cap}, diversas concentraciones del Ab_{det_biotina} (0, 0,5, 1, 1,5 y 2,0 µg/mL) fueron evaluadas para el mismo rango lineal de CEA. En este caso, incluyendo la concentración máxima de 100 ng/mL, la **Figura 3.10A** muestra los calibrados correspondientes a cada par Ab_{cap}-Ab_{det_biotina}.

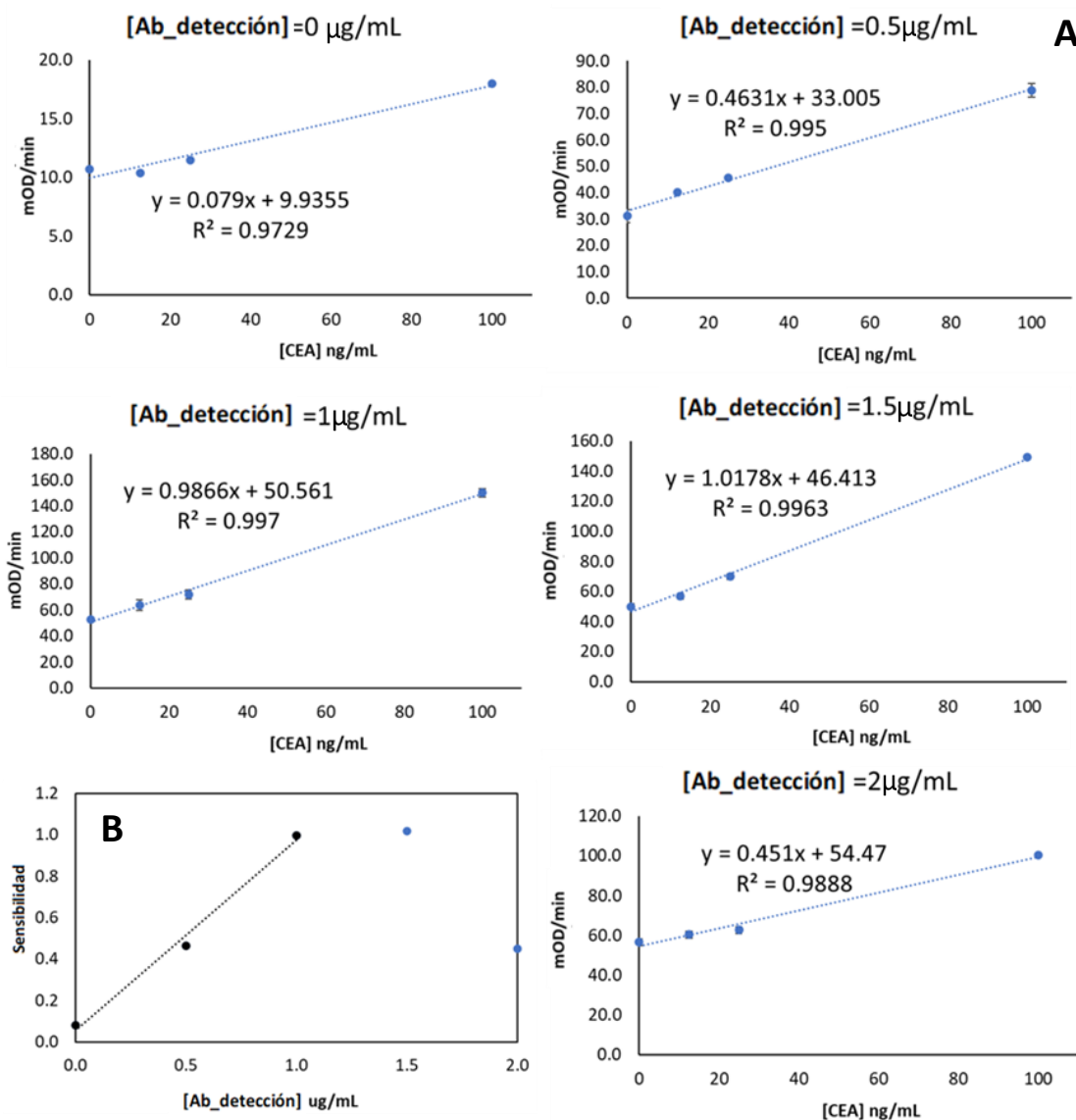


Figura 3.10: A) Optimización del Ab_{det_biotina} para el antígeno CEA utilizando en todos los casos 12 µg/mL de Ab_{cap}. **B)** Representación de la sensibilidad obtenida en cada caso frente a la concentración de Ab_{det_biotina} evaluada.

En la **Figura 3.10B**, se observa cómo, en ausencia $Ab_{det_biotina}$, no hay apenas señal colorimétrica y por tanto la sensibilidad del método es prácticamente cero, lo que indica que no hay absorción de las moléculas de revelado estreptavidina-HRP en el pocillo. Se observa además cómo, hasta $1 \mu\text{g/mL}$ de $Ab_{det_biotina}$, la sensibilidad aumenta de forma lineal con la concentración, sin embargo, a concentraciones mayores se alcanza la saturación y la sensibilidad comienza a disminuir, lo que conlleva a un aumento de los límites de detección y cuantificación, recogidos en la **Tabla 3.3**. Esta saturación viene explicada por un efecto de impedimento estérico; debido a un aumento en la proximidad de los anticuerpos de detección, en la superficie se dificultan los procesos de unión a otras moléculas, en este caso, de la molécula estreptavidina-HRP que debe unirse en la última etapa de revelado a la biotina presente en el anticuerpo de detección. La selección de una concentración de $Ab_{det_biotina}$ que asegure su orientación y espaciado adecuado puede incrementar el volumen de moléculas de revelado presentes en la superficie y por tanto la sensibilidad del método, que en este caso alcanza su máximo utilizando $1 \mu\text{g/mL}$.

[Ab_detección] ($\mu\text{g/mL}$)	Sensibilidad	LD (ng/mL)	LC (ng/mL)
0,0	0,079	-	-
0,5	0,463	19,7	65,7
1,0	0,997	5,84	19,4
1,5	1,02	5,57	18,6
2,0	0,451	11,3	37,8

Tabla 3.3: parámetros analíticos obtenidos en la optimización del $Ab_{det_biotina}$ para el reconocimiento del CEA.

Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)

Se evaluaron las concentraciones del Ab_{cap} (0, 2, 5 y $8 \mu\text{g/mL}$), usando en todos los casos una concentración fija de anticuerpo de $Ab_{det_biotina}$ ($0,1 \mu\text{g/mL}$) en un rango lineal de 0, 12, 25, 50 y 100 ng/mL de VEGF con triplicados. Procediendo de igual forma que en el caso anterior, podemos obtener las rectas de calibrado correspondientes a cada par Ab_{cap} - $Ab_{det_biotina}$, mostradas en la **Figura 3.11A**. Se observa un buen ajuste a polinomio de segundo grado, donde la concentración máxima de 100 ng/mL produce en todos los casos un descenso en la pendiente (mOD/min) por un efecto de saturación del antígeno en la superficie, que impide el posterior reconocimiento de los epítomos antigénicos por el $Ab_{det_biotina}$.

En la **Figura 3.11B**, se observa, además de la nula absorción del $Ab_{det_biotina}$ en ausencia de Ab_{cap} , como la sensibilidad final obtenida para cada concentración de Ab_{cap} evaluada, comienza a descender para $5 \mu\text{g/mL}$ hasta verse saturada para $8 \mu\text{g/mL}$, lo cual se ve reflejado numéricamente en la **Tabla 3.4A**. Eliminando la concentración máxima de VEGF, de 100 ng/mL y recalculando los parámetros analíticos para las dos concentraciones de Ab_{cap} que proporcionan mejores límites de detección (**Tabla 3.4B**) se puede observar como el aumento de 2 a $5 \mu\text{g/mL}$ supone solo una leve mejora de la sensibilidad. Por lo que se seleccionó $2 \mu\text{g/mL}$ como concentración óptima de Ab_{cap} .

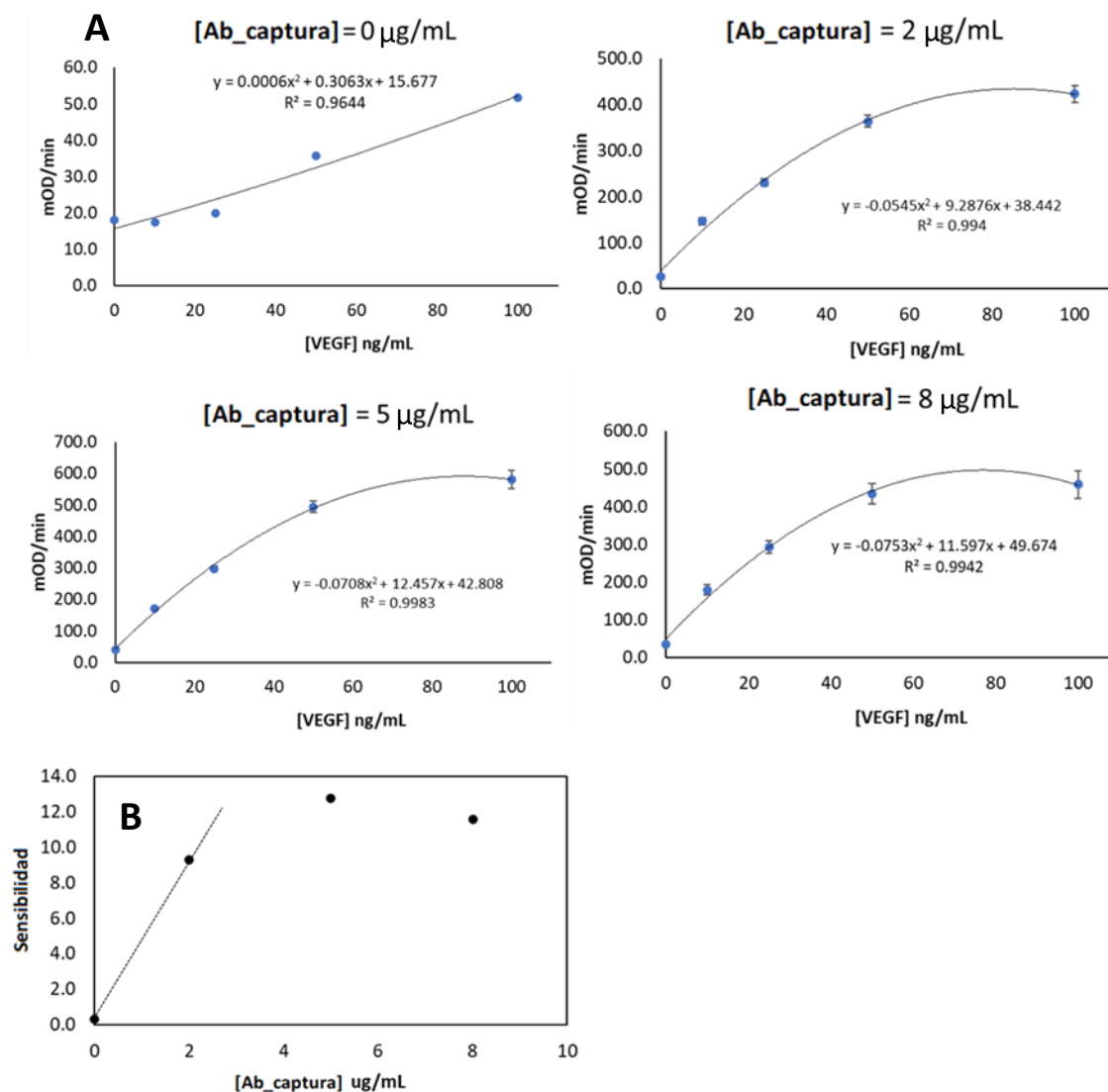


Figura 3.11: A) Optimización del Ab_{cap} para el antígeno VEGF utilizando en todos los casos 0,1 µg/mL de Ab_{det_biotina}. **B)** Representación de la sensibilidad obtenida en cada caso frente a la concentración de Ab_{cap} evaluada.

A	[Ab_{captura}] (µg/mL)	Sensibilidad	LD (ng/mL)	LC (ng/mL)
	0	0,306	-	-
	2	9,29	0,801	2,67
	5	12,7	0,316	1,05
	8	11,6	1,58	5,28

B	[Ab_{captura}] (µg/mL)	Sensibilidad	LD (ng/mL)	LC (ng/mL)
	2	10,1	0,738	2,46
	5	11,9	0,339	1,13

Tabla 3.4: A) Parámetros analíticos obtenidos en la optimización del Ab_{cap} para el reconocimiento del antígeno VEGF. **B)** Parámetros analíticos obtenidos eliminando la concentración de 100 ng/mL de VEGF.

Utilizando 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del Ab_{cap} , diversas concentraciones del $\text{Ab}_{\text{det_biotina}}$ (0, 0,1, 0,2, 0,3 y 0,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) fueron evaluadas, la **Figura 3.12A** muestra los calibrados correspondientes a cada par Ab_{cap} - $\text{Ab}_{\text{det_biotina}}$, también ajustadas a polinomios de segundo grado. La **Figura 3.12B** muestra que concentraciones de $\text{Ab}_{\text{det_biotina}}$ superiores a 0,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ producen un descenso en la sensibilidad y una aumento en los límites de detección y cuantificación, como se muestra en la **Tabla 3.5**.

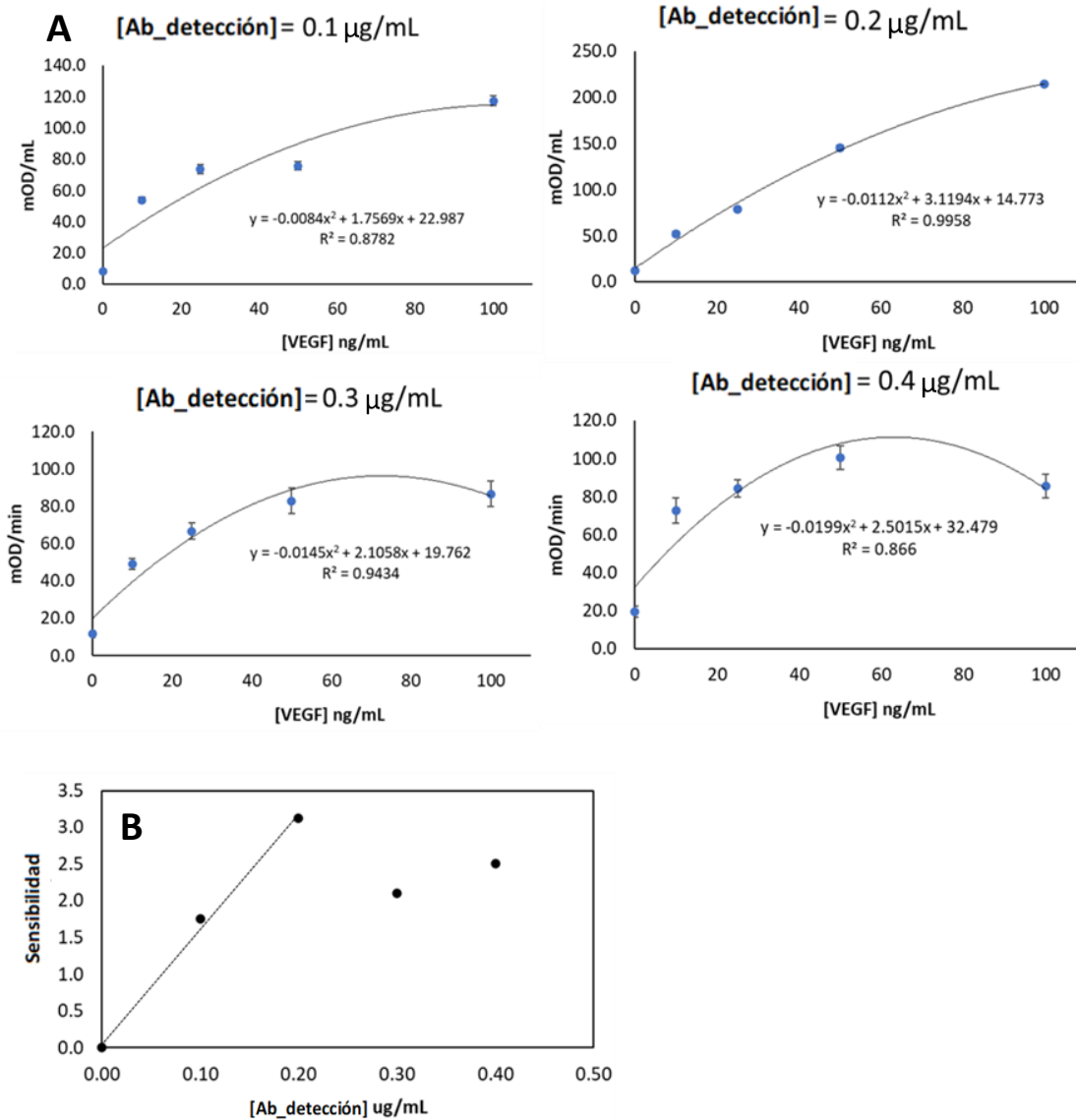


Figura 3.12: **A)** Optimización del anticuerpo de $\text{Ab}_{\text{det_biotina}}$ para el antígeno VEGF utilizando en todos los casos 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Ab_{cap} . **B)** Representación de la sensibilidad obtenida en cada caso frente a la concentración de $\text{Ab}_{\text{det_biotina}}$ evaluada.

[Ab_detección] ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Sensibilidad	LD (ng/mL)	LC (ng/mL)
0,1	1,76	1,59	5,31
0,2	3,12	1,43	4,76
0,3	2,11	2,82	9,40
0,4	2,50	3,00	10,0

Tabla 3.5: parámetros analíticos obtenidos en la optimización del anticuerpo de $\text{Ab}_{\text{det_biotina}}$ para el reconocimiento del antígeno VEGF.

Antígeno carbohidrato 19.9 (CA 19.9)

Para la selección de la concentración de Ab_{cap} (0, 3, 5, 8 y 12 $\mu\text{g/mL}$), se evaluó cada una de ellas usando en todos los casos una concentración fija de anticuerpo de $Ab_{det_biotina}$ (1 $\mu\text{g/mL}$) en un rango lineal de 0, 12, 25, 50 y 100 ng/mL de CA 19.9 y realizando triplicados para cada concentración. Las rectas de calibración correspondientes a cada par Ab_{cap} - $Ab_{det_biotina}$ recogidas en la **Figura 3.13A** y ajustadas a polinomios de segundo grado. Así, la **Figura 3.13B** muestra además de la nula absorción del $Ab_{det_biotina}$ en ausencia de Ab_{cap} , saturación de la señal a partir de 5 $\mu\text{g/mL}$. Un exceso de Ab_{cap} en la superficie puede provocar el bloqueo de los sitios de reconocimiento y por tanto pérdida de la sensibilidad y aumento de los límites de detección y cuantificación, como se muestra en la **Tabla 3.6**.

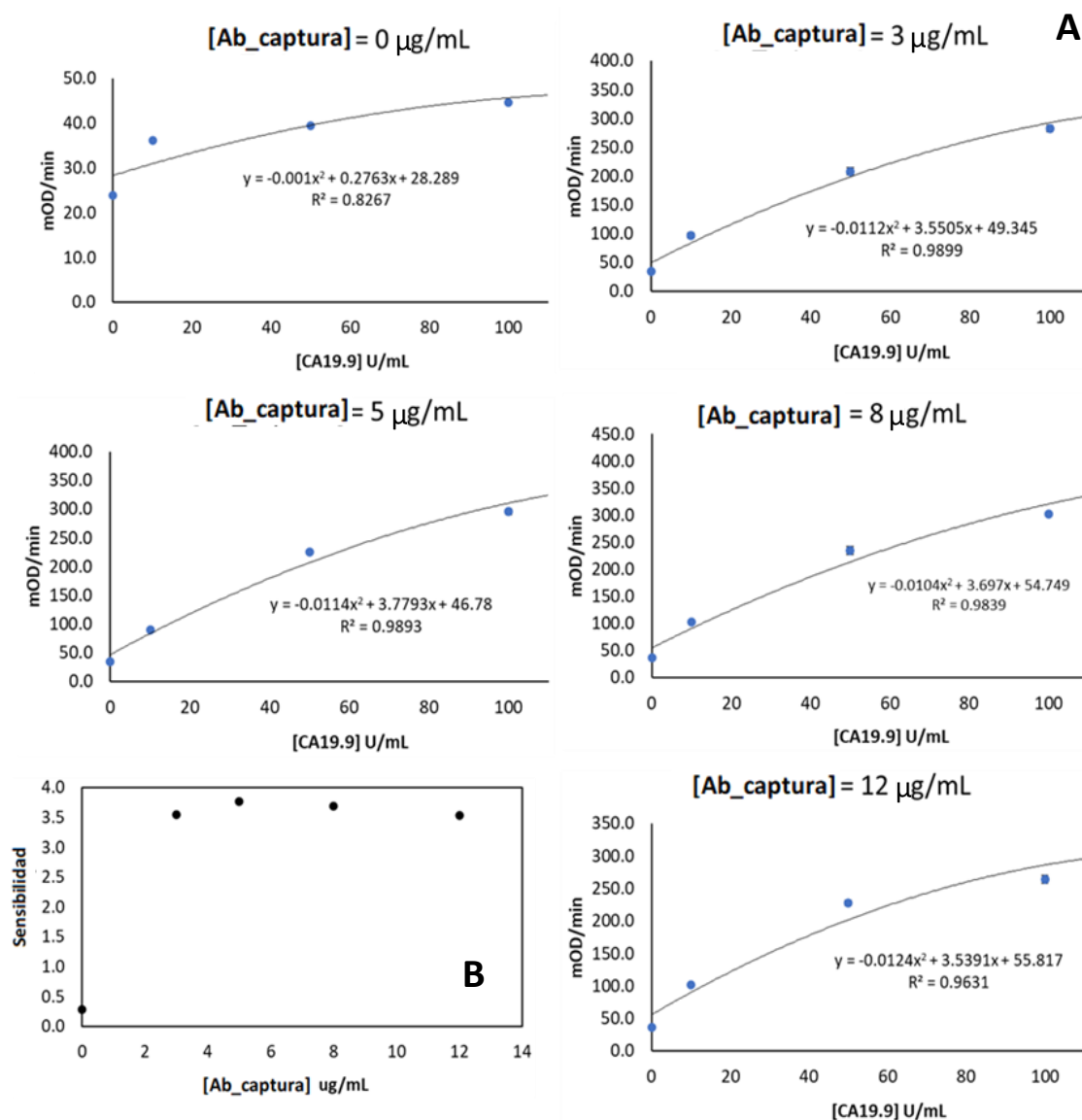


Figura 3.13: **A)** Optimización del Ab_{cap} para el antígeno CA19.9 utilizando en todos los casos 1 $\mu\text{g/mL}$ de $Ab_{det_biotina}$. **B)** Representación de la sensibilidad obtenida en cada caso frente a la concentración de Ab_{cap} evaluada.

[Ab_captura] (µg/mL)	Sensibilidad	LD (ng/mL)	LC (ng/mL)
0	0,276	46,8	159
3	3,55	2,63	8,76
5	3,78	0,33	1,12
8	3,70	1,72	5,73
12	3,54	0,30	1,00

Tabla 3.6: Parámetros analíticos obtenidos en la optimización del Ab_{cap} para el reconocimiento del antígeno CA19.9.

Utilizando 5 µg/mL de Ab_{cap}, se evaluaron diversas concentraciones del anticuerpo de Ab_{det_biotina} (0, 0,5, 1, 2 y 3 µg/mL), la **Figura 3.14A** muestra los calibrados correspondientes a cada par Ab_{cap}-Ab_{det_biotina} ajustados a polinomios de segundo grado. La **Figura 3.14B** muestra un aumento lineal de la sensibilidad a mayor concentración de Ab_{det_biotina}, alcanzando su máximo para 3 µg/mL. Sin embargo, la **Tabla 3.7** muestra como los límites de detección y cuantificación alcanzan su valor mínimo para 2 µg/mL, debido a la existencia de una menor señal de fondo.

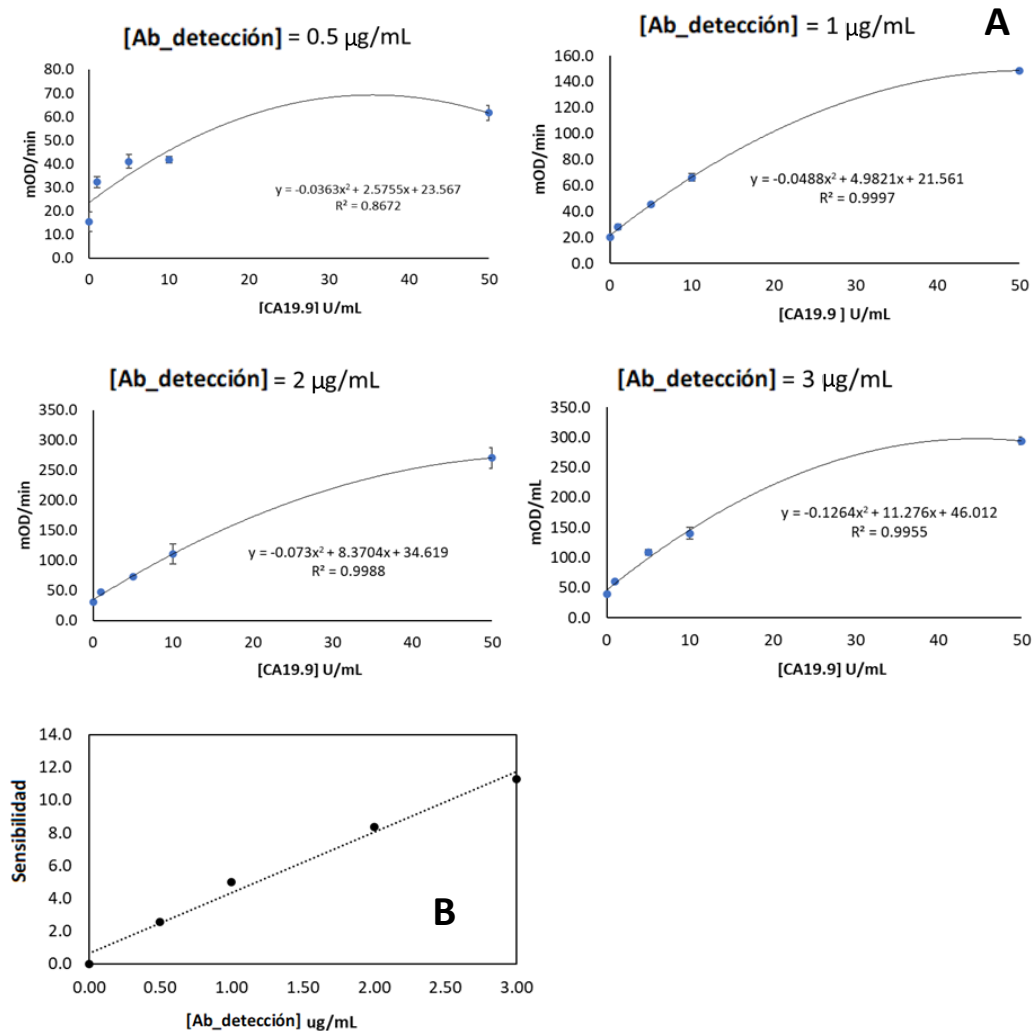


Figura 3.14: **A)** Optimización del anticuerpo de Ab_{det_biotina} para el antígeno CA19.9 utilizando en todos los casos 1 µg/mL de Ab_{cap}. **B)** Representación de la sensibilidad obtenida en cada caso frente a la concentración de Ab_{det_biotina} evaluada.

[Ab_detección] (µg/mL)	Sensibilidad	LD (ng/mL)	LC (ng/mL)
0.5	2,57	4,86	16,2
1	4,98	0,298	0,994
2	8,37	0,127	0,422
3	11,28	0,263	0,878

Tabla 3.7: Parámetros analíticos obtenidos en la optimización del anticuerpo de Ab_{det_biotina} para el reconocimiento del antígeno CA19.9.

Las propiedades analíticas finales de esta metodología clásica optimizada para las parejas de anticuerpo seleccionadas para cada marcador de cáncer gastrointestinal se recogen en la **Tabla 3.8**. Si comparamos estos límites con los valores biológicos de enfermedad activa recogidos en la **Tabla 3.1**, podemos observar cómo solo en el caso del antígeno CA 19.9, para el que la enfermedad se considera activa en concentraciones inferiores 37 U/mL, esta metodología alcanza la sensibilidad, LD y LC suficientes para detectar valores bajos que indiquen actividad cancerígena en las primeras fases de la enfermedad. En el caso del CEA (enfermedad activa < 5 ng/mL) y del antígeno VEGF (enfermedad activa < 0.13 ng/mL), los límites de detección no alcanzan a cubrir el intervalo de interés para la detección en bajas concentraciones y por tanto precoz de estos marcadores cancerígenos.

ELISA sándwich colorimétrico					
	Rango (ng/mL)	Sensibilidad	LD (ng/mL)	LC (ng/mL)	DER %
CEA	18,6 - 100	1,02	5,57	18,6	20,8
VEGF	4,76 - 100	3,11	1,42	4,76	12,1
	Rango (U/mL)	Sensibilidad	LD (U/mL)	LC (U/mL)	DER %
CEA19.9	0,42 -50	6,23	0,13	0,42	8,37

Tabla 3.8: Parámetros analíticos para la detección de los diferentes marcadores cancerígenos gástricos mediante la metodología ELISA sándwich colorimétrico.

3.3.2. Síntesis, derivatización, purificación y caracterización de AuNPrs

3.3.2.1. Experimental

Síntesis y derivatización de AuNPrs

La síntesis de AuNPrs se optimizó a partir distintas variaciones del método descrito anteriormente²⁵. Así, se llevaron a cabo tres protocolos diferentes S1, S2 y S3 cuya información se recoge en la **Tabla 3.9**, para obtener tres tipos de AuNPrs de los que se evaluaron varias de sus propiedades como su capacidad de calentamiento, en busca de seleccionar aquellos que proporcionen la mayor eficiencia fototérmica.

Paso	SINTESIS 1	SINTESIS 2	SINTESIS 3
1	Disolución M1 (vaso 300 mL): 20µl KI (0,1M) +240mL Na ₂ S ₂ O ₃ (0,5mM)	Disolución M2 (vaso 300 mL): 60µl KI (0,1M) +220mL Na ₂ S ₂ O ₃ (0,5mM)	Disolución M1 (vaso 300 mL): 20µl KI (0,1M) +240mL Na ₂ S ₂ O ₃ (0,5mM)
2	200mL de HAuCl ₄ (2mM) en botella de 1 L	200mL de HAuCl ₄ (2mM) en botella de 1 L	200mL de HAuCl ₄ (2mM) en botella de 1 L
3	Sobre el HAuCl ₄ se añaden 120 mL de M1 (probeta de 250 mL) --> adición 30 seg	Sobre el HAuCl ₄ se añaden 100 mL de M1 (probeta de 1 mL)--> adición 30 seg	Sobre el HAuCl ₄ se añaden 120 mL de M1 (probeta de 250 mL)--> adición 30 seg
4	Espero 4 min	Espero 4 min	Espero 4 min
5	Se añaden otros 120 mL de M1 (probeta de 250 mL)--> adición 30 seg	Se añaden otros 100 mL de M1 (probeta de 100 mL)--> adición 30 seg	Se añaden otros 120 mL de M1 (probeta de 250 mL)--> adición 30 seg
6	Espero 4 min	Espero 4 min	Espero 4 min
7	Se añaden 100 mL de Na ₂ S ₂ O ₃ (0,5mM) (probeta de 100 mL)	Se añaden 70 mL de Na ₂ S ₂ O ₃ (0,5mM) (probeta de 100 mL)	Se añaden 60 mL de Na ₂ S ₂ O ₃ (0,5mM) (probeta de 100 mL)
8	Reaccionando 1 hora	Reaccionando 1 hora	Reaccionando 1 hora

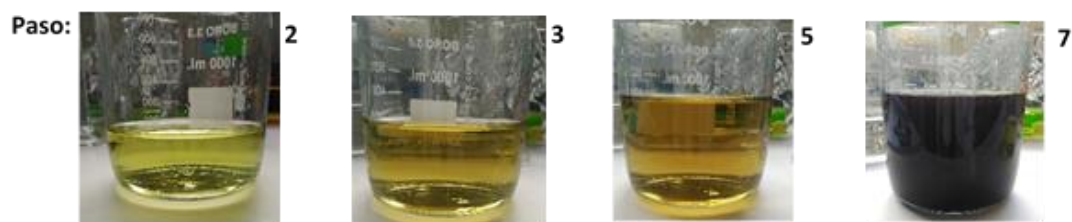


Tabla 3.9: Protocolo de síntesis de los tres tipos de AuNPrs sintetizados y aspecto de la suspensión en cada uno de los pasos.

Como se verá a continuación, el protocolo de síntesis óptimo seleccionado (S1) proporciona una alta reproducibilidad y una alta estabilidad coloidal de estos AuNPrs. Para esta síntesis, se añadieron en primer lugar 120 ml de tiosulfato de sodio, Na₂S₂O₃ 0,5 mM (0,1 M de yoduro potásico, KI) lentamente sobre 100 ml de sal de tetracloraurato (III) de sodio dihidratado, AuCl₄Na₂·2H₂O (99,8% Au), (Stream Chemicals 79-0500) 2 mM, después de 4 minutos a temperatura ambiente sin agitar, se produce una segunda adicción de la misma manera. Finalmente, se añadieron 100 ml de Na₂S₂O₃ 0,5 mM. La reacción tiene lugar a temperatura ambiente durante 1 hora y sin agitación. Después, los AuNPrs se derivatizaron con HS-PEG-COOH (5000 g/mol) (135000-4-32, Rapp Polymere GmbH) usando una relación de masa AuNPrs:PEG, 1: 1 o 1: 5 y agregando a esta solución reductor borohidruro de sodio, NaBH₄, en

relación molar con PEG 1: 1. De esta manera, utilizando las fuertes interacciones tiol-oro para proteger los AuNPrs con ligandos PEG, además de aportar estabilidad coloidal a estas nanopartículas sintetizadas, el polímero proporciona funcionalidad a las mismas a través de los carboxilos terminales introducidos, que les permiten una fácil unión a los aminos para la posterior etapa de biofuncionalización.

Por último, el pH de la disolución de AuNPrs se ajustó a 12 con una solución concentrada de NaOH y se sometió a un baño de ultrasonido a 60 °C durante 1 h. El exceso de reactivos se eliminó lavando los AuNPrs PEGilados por centrifugación, tres veces, durante 15 minutos a 5000 g, eliminando en cada lavado el sobrenadante y re-suspendiendo en agua Milli-Q. KI, NaBH₄ y Na₂S₂O₃ se compraron en Sigma-Aldrich (MO, EE. UU.).

Purificación de AuNPrs

Para eliminar las AuNP esféricas y pseudoesféricas que no pudieron eliminar con los lavados, se utilizó una etapa de purificación mediante electroforesis de agarosa. Esta se realiza a gran escala en geles de 12 pocillos con una capacidad de 1800 µL cada pocillo. La agarosa utilizada es al 2,5% (SeaKem LE Agarosa, Lonza) en 0,5x TBE (TRIS, borato, EDTA) (10x TBE de Merck Millipore, MA, EUA). Se mezclaron 10 ml de los AuNPrs lavados y 1,8 ml de glicerol al 25% en 0,5x TBE y se depositó en los pocillos y sometiendo a 140 V durante 30 minutos. Después de la electroforesis, las AuNPs esféricas y los AuNPrs más pequeños entran al poro de la agarosa, quedando los AuNPrs purificados en los pocillos para ser recogidos. (Figura 3.15) Los AuNPrs purificados finalmente se lavaron dos veces con agua mili-Q para eliminar restos de TBE y se resuspendieron en un volumen menor para concentrar la suspensión.

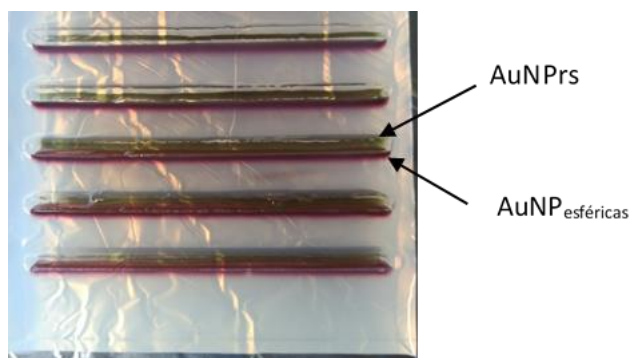


Figura 3.15: electroforesis en gel de agarosa finalizada, para la purificación de AuNPrs (disolución dentro de los pocillos, en verde oscuro) y eliminación de las nanopartículas esféricas y pseudoesféricas (dentro del gel, en granate).

Caracterización de AuNPrs

Después de la purificación, la concentración de oro final para cada síntesis se obtuvo mediante ICP-AES Optima 8300 (Perkin Elmer) y por espectroscopía UV-Vis mediante un espectrofotómetro Cary 50 Probe de Varian Medical Systems, aplicando la ley de Lambert Beer y utilizando el coeficiente de absorbancia experimental a 1050 nm, $\epsilon_{1050\text{ nm}} = 29\text{ ml mg}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ para calcular la concentración en las etapas anteriores a la purificación y $\epsilon_{1050\text{ nm}} = 35.86\text{ ml mg}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ para los AuNPrs ya purificados.

Los tamaños de nanopartícula se obtuvieron mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), las imágenes se adquirieron usando un SEM Inspect F50 de emisión de campo con un sistema EDX INCA PentaFET × 3 (FEI Company, Eindhoven, Países Bajos) en un rango de energía entre 0 y 30 keV.

Para evaluar la capacidad de calentamiento de estos AuNPs, se irradió por duplicado una misma concentración (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de estos tres tipos de AuNPs en una cubeta de cuarzo y se irradiaron con un láser de 1064 nm durante 20 min, a una potencia de 1224 mW, hasta alcanzar el máximo valor de temperatura, en ese momento el laser se apagó y se registró la disminución de la temperatura hasta el minuto 30. La solución se agitó magnéticamente durante la medida y la temperatura se registró, con una cámara infrarroja en un punto inferior a la incidencia del haz láser, como se muestra en la **Figura 3.16**.

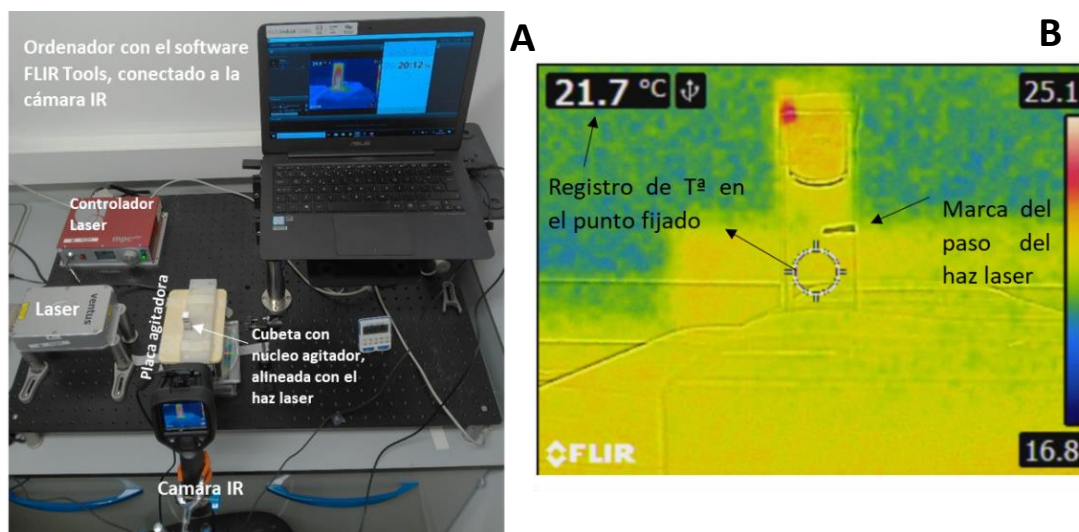


Figura 3.16: A) Diseño experimental para el cálculo de la eficiencia fototérmica de cada AuNPs. B) Imagen térmica registrada con la cámara IR.

El láser utilizado para este y todos los futuros estudios es un láser de onda continua de 3 W Quantum Ventus que funciona a una potencia máxima de 2.5 W (área irradiada de aproximadamente 4.52 mm^2 , intensidad promedio de 55 W/cm^2). La imagen térmica se obtuvo utilizando la cámara IR FLIR Serie Ex E4 (Oregon, EE. UU.), también usada en todos los ensayos de este capítulo. (**Figura 3.16**)

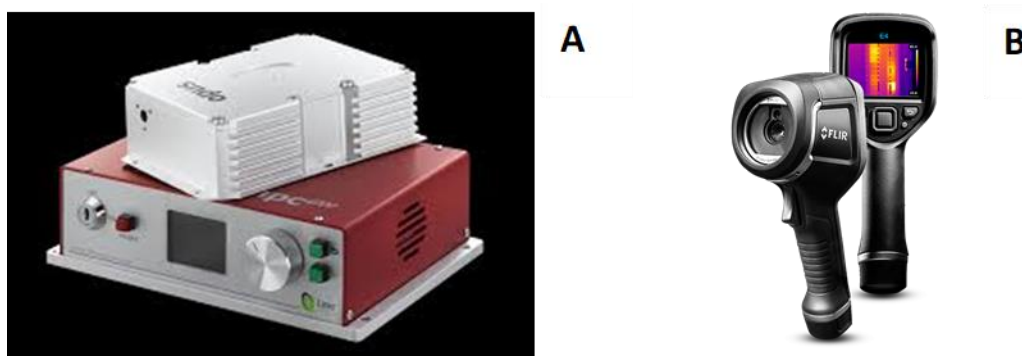


Figura 3.17: A) Láser de 1064 nm y B) cámara infrarroja empleadas a lo largo del capítulo.

Cálculo de eficiencia de conversión fototérmica de AuNPs

A partir de las curvas de calentamiento obtenidas por imagen térmica (cámara IR), se comparó la capacidad de calentamiento de los diferentes AuNPs obteniendo la eficiencia de conversión térmica calculada utilizando la ecuación (Ec. D1) propuesta por Roper ³⁷ y utilizada para diferentes autores³⁸:

$$\eta = \frac{hS(T_{max}-T_{amb})-Q_{dis}}{I(1-10^{-A\lambda})} \quad (\text{Ec. D1})$$

Para resolver la ecuación 1, el calor disipado al ambiente externo, Q_{amb} viene dado por (Ec. D2), donde h es el coeficiente de transferencia de calor, S es el área de superficie del recipiente de muestra, T_{max} es la temperatura máxima alcanzada por cada disolución de AuNPrs en la irradiación láser y T_{amb} es la temperatura ambiente:

$$Q_{amb} = hS (T_{max} - T_{amb}) \quad (\text{Ec. D2})$$

Q_{dis} puede ser calculado independientemente de la misma manera, irradiando agua en las mismas condiciones.

Para obtener hS , se introduce el parámetro adimensional (θ) (Ec. D3) y además una constante de tiempo (τ_s) (Ec. D4), relacionada con el ciclo de enfriamiento (cuando el láser está apagado):

$$\theta = \frac{T-T_{amb}}{T_{max}-T_{amb}} \quad (\text{Ec. D3})$$

$$\tau_s = \frac{\sum_i m_i C_i}{hS} \quad (\text{Ec. D4})$$

Ambas ecuaciones están relacionadas por la (Ec. D5):

$$t = -\tau_s \ln \theta \quad (\text{Ec. D5})$$

y por lo tanto τ_s se calcula para cada AuNPrs (por duplicado) al representar el logaritmo natural negativo de θ en función del tiempo de enfriamiento. La pendiente extraída de estas gráficas corresponde, en cada caso, a la constante de tiempo de enfriamiento, τ_s . A partir de este valor y conociendo la masa del sistema 2 g y $C_i 4.18 \text{ J/g}^\circ\text{C}$, se puede resolver la (Ec D4) y obtener la constante hS .

3.3.2.2. Resultados

Mediante UV-vis se obtuvieron los correspondientes espectros de absorción de los AuNPrs antes de la purificación, donde se observa la resonancia localizada de plasmón superficial (LSRP) para cada una de las síntesis, con bandas NIR centradas a 1230 nm (S1), 1026 nm (S2) y 846 nm (S3) respectivamente. (Figura 3.18)

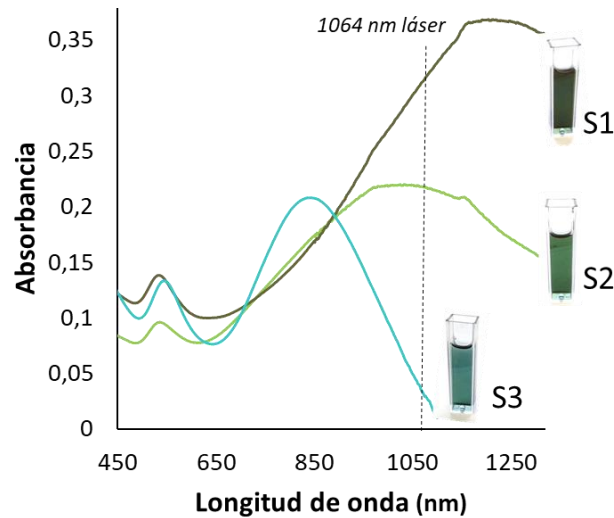


Figura 3.18: Espectros UV-vis de los diferentes AuNPrs sintetizados, que muestra el pico de 520 nm correspondiente a AuNPs esféricos (subproducto de síntesis eliminado por purificación) y las bandas NIR características de AuNPrs obtenidas por cada protocolo de síntesis.

Esta propiedad óptica permite a los AuNPrs convertir la energía de la luz en calor por el efecto fototérmico. Para evaluar la capacidad de calentamiento, se irradió en cada caso, la misma concentración de estos tres tipos de AuNPrs por duplicado. Adquiriendo la imagen térmica mediante una cámara infrarroja, se obtuvieron las señales térmicas de variación de temperatura normalizada frente a tiempo de irradiación (Figura 3.19), en las que se observa como al encender el láser se registra un aumento de temperatura (ciclo de calentamiento) y tras apagar el láser una recuperación de la temperatura inicial (ciclo de enfriamiento).

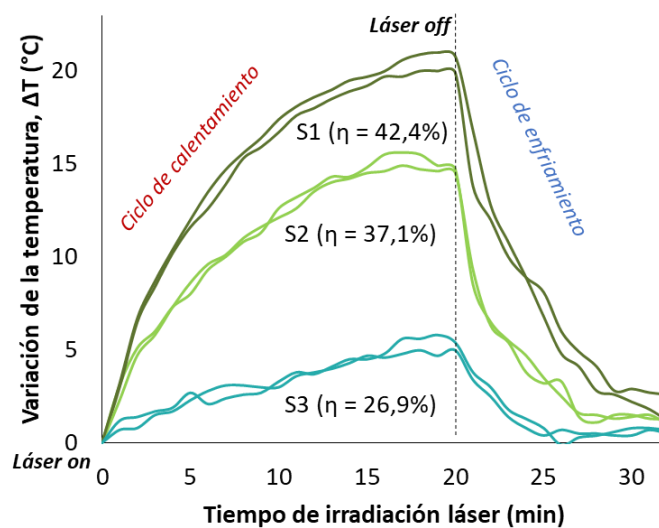


Figura 3.19: Señales térmicas y eficiencia de conversión fototérmica (η) obtenidas por imagen térmica con una cámara infrarroja durante la irradiación de las diferentes soluciones de AuNPrs a la misma concentración (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) utilizando un láser de 1064 nm a 1224 mW.

A partir de estas señales térmicas obtenidas (**Figura 3.19**), se realizó el cálculo de la eficiencia de conversión fototérmica (η) de cada AuNPrs, como se indica en la parte experimental (*apartado 3.3.2.1*). Según la (Ec D5) τ_s se calcula para cada AuNPrs (por duplicado) al representar el logaritmo natural negativo de θ en función del tiempo de enfriamiento (**Figura 2.20**). La pendiente extraída de estas gráficas corresponde, en cada caso, a la constante de tiempo de enfriamiento, τ_s .

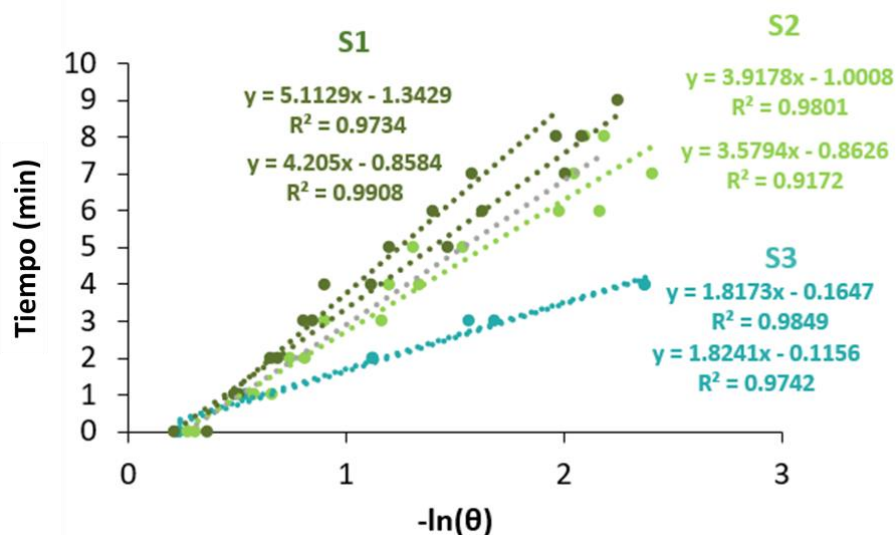


Figura 3.20: Representación del logaritmo natural de θ en función del tiempo de enfriamiento, correspondiente a la bajada de la señal térmica al apagar el láser.

Con estos valores se puede resolver la Ec. D4 para obtener h_s y finalmente la eficiencia de conversión fototérmica (η), según la Ec. D1. Todos estos parámetros se presentan resumidos en la **Tabla 3.10** para cada AuNPrs sintetizado.

	S1	S2	S3
T_{amb} (°C)	22,7	22,6	21,4
T_{max} (°C)	43,05	37,2	26,6
Abs 1064 nm	6,5	5,4	1,2
τ (min) promedio	4,7	3,7	1,8
τ (s) promedio	279,5	224,4	109,2
h_s (W/°C)	0,030	0,037	0,077
Q_{dis} (W)	0,09	0,09	0,09
η	0,424	0,371	0,269
η (%)	42,4	37,1	26,9

Tabla 3.10: Parámetros para el cálculo de la eficiencia de conversión fototérmica para cada uno de los AuNPrs obtenidos mediante las diferentes síntesis.

Se obtuvieron también las imágenes SEM y los histogramas de distribución de tamaño de partícula obtenidos para cada protocolo de síntesis tras la purificación (**Figura 3.21**), obteniendo un tamaño promedio de 277 ± 36 nm (S1), 221 ± 21 nm (S2) y 199 ± 29 nm (S3), en cada caso.

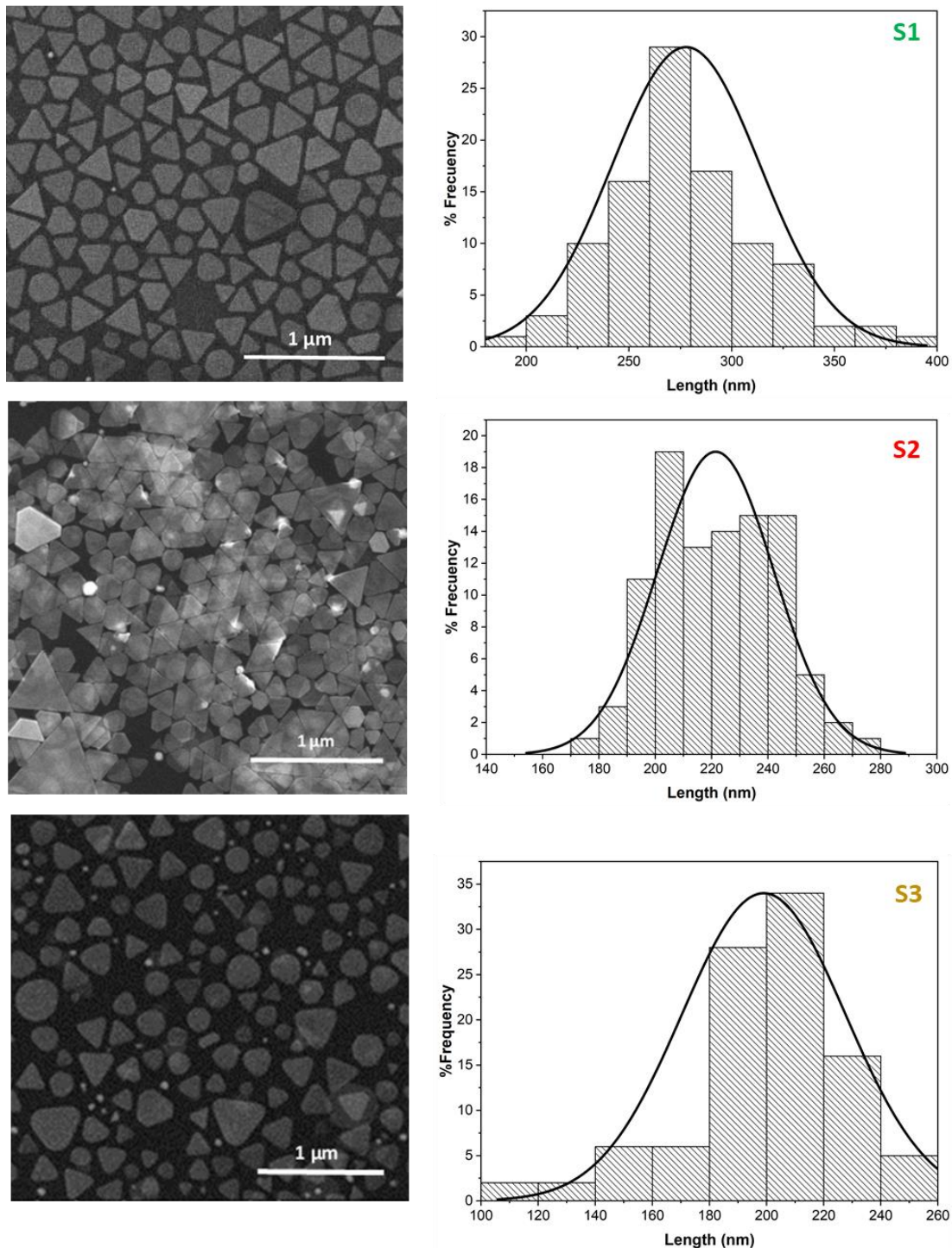


Figura 3.21: Imágenes SEM de cada tipo de AuNPrs sintetizado y los histogramas correspondientes que representan la distribución de tamaño de partícula.

De esta forma, se observa que los AuNPrs más grandes (S1), muestran la mayor eficiencia fototérmica, seguidos de la síntesis 2. La síntesis 3 muestra los peores resultados al encontrarse el máximo de plasmón superficial muy alejado de la longitud de onda del láser utilizado.

En busca de discernir entre la síntesis 1 o 2, se compararon los rendimientos de la síntesis, que se expresan como la masa de oro (obtenida por ICP-AES) en los AuNPrs que se obtienen al final del proceso de purificación respecto a los obtenidos inicialmente tras la derivatización con PEG (AuNPrs no purificados) (**Tabla 3.11**), indicando un mayor rendimiento en el caso de la síntesis 1, en torno al 22%, frente al 14% obtenido en el caso de la síntesis 2. Como ya se ha dicho, además de AuNPrs en la síntesis se producen AuNP_{esféricas} (540 nm) y pseudoesféricas como nanoprismas de menor tamaño, la eliminación de estos subproductos limita el rendimiento final de la síntesis.

	S1A	S1B	S2A	S2B
Masa AuNPrs@PEG final obtenida (mg)	5,01	5,17	4,18	4,24
Rendimiento de síntesis (%)	22,33	21,95	13,53	14,81
Tras derivatización PEG	1,91	2,21	1,93	1,99
Relación Abs-NPrs (1050 nm)/ Abs-NP_{esféricas} (540nm)				
Tras lavados	2,33	2,26	2,17	2,24
Tras purificación agarosa	4,55	4,55	5,01	4,66

Tabla 3.11: Parámetros para el cálculo de la eficiencia de conversión fototérmica para cada una de las síntesis y sus duplicados

Además, la relación Abs-NPrs (1050 nm)/Abs-NP_{esféricas} (540 nm) es un marcador de la eficiencia y rendimiento de purificación, por ello este ratio fue calculado para dos réplicas de cada síntesis; tras la derivatización con PEG, después de los lavados (**Figura 3.22**) y después de la purificación de los AuNPrs, cuyos valores se muestran en la **Tabla 3.11**, ratios superiores a 3 después de la purificación son signo de una buena eficiencia de purificación.

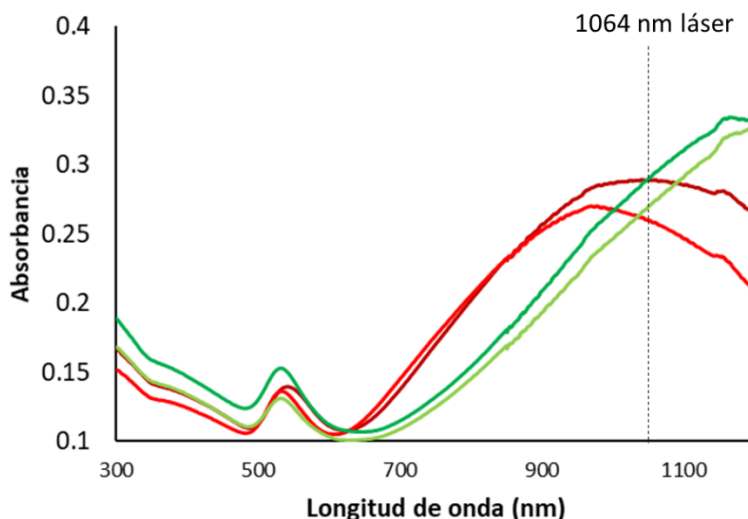


Figura 3.22: Espectros de absorción de las síntesis S1 y S2 y sus réplicas, antes de la purificación.

Además, de la mayor eficiencia de conversión fototérmica y mayor rendimiento de síntesis, en la **Figura 3.22**, los espectros de las réplicas de la síntesis 1 muestran mayor reproducibilidad en el máximo del LSPR, así como en la longitud de onda del láser (1064 nm). Por todo ello, la síntesis 1 fue seleccionada como óptima

Por último, la estabilidad coloidal en agua de los AuNPrs purificados y obtenidos por la síntesis S1, fue evaluada en el tiempo midiéndose la absorbancia a 1064 nm de las disoluciones de AuNPrs purificadas y conservadas a 4°C y observándose una variabilidad prácticamente nula para ambas réplicas, durante más de 40 días. (Figura 3.23)

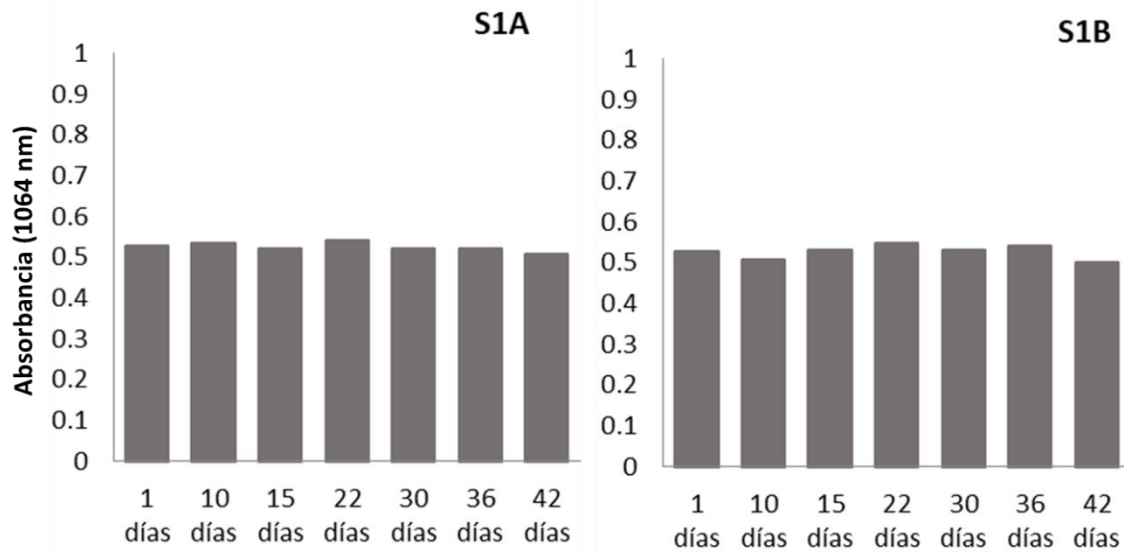


Figura 3.23: Absorbancia a 1060 nm recogida durante 42 días de dos réplicas (S1A y S1B) de la síntesis 1 purificadas y conservadas a 4°C.

Como se ha explicado en la parte experimental, estos AuNPrs se derivatizaron con HS-PEG-COOH utilizando dos ratios diferentes de la relación de masa AuNPrs:PEG, 1: 1 o 1: 5 para obtener el mayor porcentaje de recubrimiento superficial de los AuNPrs con estreptavidina en el primer paso de bioconjugación. Esto es debido a que las moléculas de PEG además de conferir estabilidad coloidal a los AuNPrs confieren grupos carboxilo a través de los cuales se uniría de forma covalente estreptavidina. A mayor densidad de grupos COOH es de esperar que pueda cambiar la capacidad de unión de esta proteína usada como adaptadora para luego unir el anticuerpo de detección biotinilado de interés.

Para determinar si efectivamente la cantidad de moléculas de PEG ancladas era diferente al incubar con los diferentes ratios AuNPrs:PEG, como última caracterización, fue estudiado el potencial eléctrico (potencial ζ) de ambos AuNPrs, siendo ligeramente más negativo la relación de masa 1:5 NPrs:PEG ($-22,92 \pm 0.75$ mV) que la de la relación 1:1 NPrs:PEG ($-13,97 \pm 0.68$ mV). Esta variación observada en el potencial de superficie es seguramente debido a la presencia de un mayor número de grupos carboxilo expuestos en la superficie externa de AuNPrs:PEG 1:5. Si bien existe una diferencia clara en la densidad de grupos carboxilo superficial entre ambas muestras de AuNPrs se decidió continuar con ambas preparaciones para así seleccionar la óptima tras los resultados obtenidos respecto al rendimiento de unión del anticuerpo de detección.

3.3.3. Bioconjugación de AuNPrs a estreptavidina y al anticuerpo de detección biotinilado.

La bioconjugación controlada y orientada del anticuerpo de detección a AuNPrs es un factor clave para lograr la mayor sensibilidad y selectividad en las técnicas de detección desarrolladas. Existe una amplia variedad de estrategias para obtener una orientación de anticuerpos adecuada con respecto a la superficie de las nanoparticulas (unión covalente, electrostática, indirecta...) con el fin de preservar la bioactividad, afinidad y eficacia de la orientación de los anticuerpos funcionalizados.³⁹ El enlace covalente es una de las estrategias más indicadas de enlace orientado, ya que proporciona un enlace estable y de alta reproducibilidad. Además, el uso de otras biomoléculas adaptadoras unidas directamente a la superficie de las AuNP, como la interacción avidina-biotina o estreptavidina -biotina, es una buena opción para desarrollar una plataforma versátil y robusta, por ser una de las interacciones no covalentes más rápidas y fuertes conocidas y resistente condiciones extremas de pH y temperatura. La proteína avidina posee una capacidad de unión a la biotina algo más alta que la estreptavidina, sin embargo, debido a las cadenas laterales glicosiladas que posee, provoca mayores señales de fondo, lo cual puede ser un grave problema en la detección y condicionar los límites de cuantificación del método analítico.⁴⁰ El uso de estreptavidina, al no tratarse de una glicoproteína, puede mejorar los problemas de fondo y proporcionar blancos de método mejores.

Así, la metodología propuesta implica en primer lugar el enlace covalente previo estreptavidina-AuNPrs. En este caso, al estar los AuNPrs derivatizados con PEG-COOH, se utilizó la química de carbodiimida/N-hidroxisuccinimida para la unión covalente de estos carboxilos terminales a las aminas primarias de la estreptavidina, que permitirá posteriormente la fácil unión de cualquier anticuerpo biotinilado. (Figura 3.24). Como la estreptavidina tiene cuatro sitios de unión a la biotina, no es necesario su unión orientada ya que con cualquier orientación quedarán expuestos en la superficie de los nanoprismas sitios de unión a biotina.

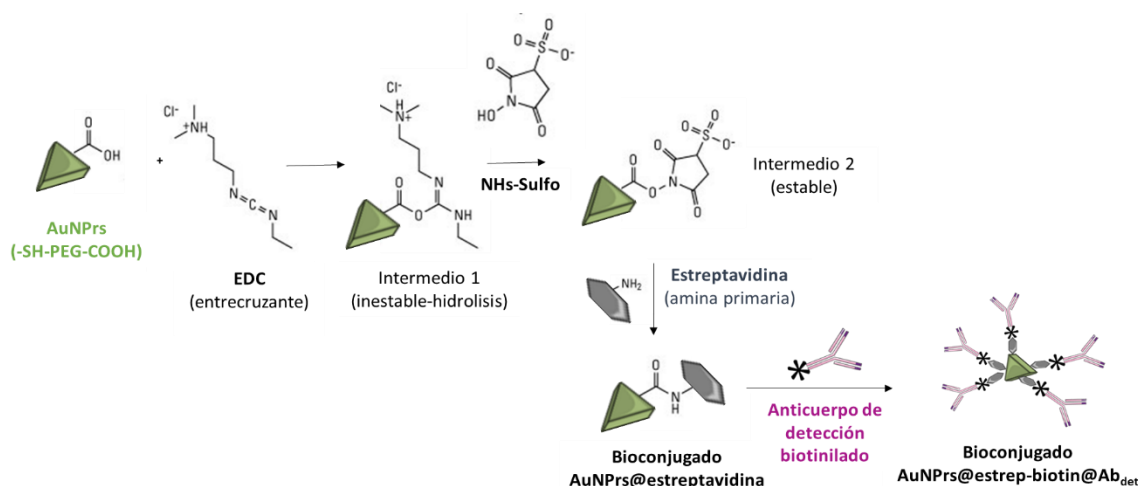


Figura 3.24: Reacción esquemática de la bioconjugación usando, en primer lugar, el método de la carbodiimida para la unión AuNPrs@streptavidina y después, para la unión del anticuerpo de detección a este bioconjugado, la interacción no covalente biotina-estreptavidina.

Para la biofuncionalización orientada AuNPrs (estreptavidina) - (biotina) Ab, la estabilidad de este enlace y el control del número de estreptavidina y Abs por AuNPrs se optimizó y estudió ampliamente. Para ello, se evaluaron diferentes concentraciones de estreptavidina añadida para la unión a AuNPrs y mediante marcaje radiactivo de esta proteína, se seleccionó la concentración óptima que permite obtener la máxima superficie del prisma ocupada por estreptavidina. Por último, para correlacionar el porcentaje de saturación del nanoprismo con estreptavidina y la eficiencia de unión de anticuerpo de detección biotinilado, se evaluó también mediante radioactividad la concentración de anticuerpo anti-CEA unido.

3.3.3.1 Experimental

Bioconjugación de AuNPrs a estreptavidina y al anticuerpo de detección biotinilado.

Se optimizó la funcionalización de los AuNPrs derivatizados con PEG (NPrs:PEG relación de masa 1:1 o 1:5) con estreptavidina, usando la química de la carbodiimida (reticulación de ácidos carboxílicos con aminas primarias) con el fin de obtener un bioconjugado robusto y versátil AuNPrs@estreptavidina que asegure el mayor recubrimiento de estreptavidina posible para la posterior unión del anticuerpo de detección biotinilado. Las etapas secuenciales para la biofuncionalización AuNPrs@estreptavidina fueron las siguientes:

En primer lugar, se llevó a cabo la etapa de activación de los carboxilos con EDC y NHs-Sulfo, en esta etapa deben usarse pHs nunca superiores a 7, debido a la inestabilidad a hidrólisis del intermedio 1 (**Figura 3.24**), el uso de NHs-Sulfo, a veces opcional en la química de la carbodiimida, no sólo estabiliza el intermedio reactivo hacia aminas primarias, sino que también mantiene la carga neta negativa de los AuNPrs a pesar de su activación con EDC. Esto permite mantener la estabilidad coloidal de los nanoprismas durante esta etapa de activación. Se incubaron 500 ml de 0,5 mg/ml de AuNPrs en tubos Eppendorf Protein LowBind de 2 ml (Hamburgo, Alemania) con 500 ml de una solución de activación consistente en Sulfo-NHs 3,5 mM y EDC 1,5 mM ambas en MES 10 mM pH 6 y se incubó la mezcla con agitación a 37°C durante 30 min. Después se realizaron dos ciclos de centrifugación a 9000 rpm durante 9 minutos, eliminando el sobrenadante y resuspendiendo con 500 µL de MES 10 mM pH 6. Esta última etapa tiene el fin de eliminar los excesos de la mezcla de activación, el proceso debe ser rápido y 4°C para evitar la hidrólisis del intermedio 2. Se añadieron 500 µl de diferentes concentraciones de esta estreptavidina (8, 10 y 15 µg/ml) en MES 10 mM pH 6, las disoluciones de incubaron a 37°C durante 1 hora. El stock de estreptavidina fue previamente cuantificado mediante la medida de su absorbancia a 280 nm, aplicando la ley de Lambert-beer y usando como coeficiente de extinción a esta longitud de onda $41326 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Tras la hora de incubación, los grupos carboxílicos activados de los AuNPrs que quedasen sin unir estreptavidina se bloquearon con BSA al 2,5% (500 µL sobre 500 µL de AuNPrs@estreptavidina) en MES 10 mM, pH 6 a 37°C durante 2 horas, seguido de dos ciclos de centrifugación a 4500 rpm durante 9 min. Esta etapa de bloqueo evita reacciones secundarias como el entrecruzamiento de AuNPrs@estreptavidina o posibles uniones inespecíficas posteriores. EDC, Sulfo-NHS, estreptavidina (ref 85878) y BSA (EC 232-936-2) se compraron a Sigma-Aldrich (MO, EE. UU.).

Finalmente, al conjugado óptimo AuNPrs@estreptavidina, se añadieron 500 µL del anticuerpo de detección biotinilado en las diferentes concentraciones evaluadas, en este caso, CEA (2, 6, 10

o 12 µg/mL) en MES 10 mM pH 6, y la mezcla se agitó a 37 °C 1:30 h, seguido de dos lavados a 4500 rpm durante 9 min con disolución amortiguadora ácido bórico 50 mM pH 8 para eliminar el exceso de Ab. Esta disolución garantiza la estabilidad coloidal de los AuNPrs a largo plazo.

Cuantificación de proteínas mediante marcaje radiactivo

Para optimizar la cantidad de estreptavidina y posteriormente, de anticuerpos de detección inmovilizados en la superficie de los AuNPrs (NPrs:PEG relación de masa 1:1 o 1:5), la concentración de estas proteínas se cuantificó mediante marcaje radiactivo, que permite la detección de bajas concentraciones de las proteínas unidas a AuNPrs que no son posibles de determinar con métodos convencionales como el método colorimétrico de Bradford de menor sensibilidad.

Para el radiomarcaje de las proteínas, se incubaron en cada caso, 125 µg de estreptavidina o 56 µg del anticuerpo biotinilado de detección con 50 µL del isótopo radioactivo $K^{125}I$ (1mCi/mL) y 0,15 mg de cloramina T como agente oxidante durante 15 segundos a temperatura ambiente en un volumen total de 150 µL de MES 10 mM pH 6. Después, se detuvo la reacción agregando 150 µL de MES 10 mM pH 6 que contenía 62 µg de tirosina y 1,5 mg de yoduro de potasio. La proteína radiomarcada se purificó utilizando columnas PD MiniTrap G-10 (GE Healthcare Life Sciences, Fairfield, CT, EE. UU.) y su concentración se determinó utilizando un kit de ensayo Pierce Coomassie Plus (Bradford) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE. UU.) utilizando concentraciones conocidas de estreptavidina o del propio anticuerpo biotinilado, como calibrado.

Las proteínas radiomarcadas se usaron posteriormente para la bioconjugación de AuNPr con estreptavidina y con el anticuerpo biotinilado de detección (a las diferentes concentraciones evaluadas) siguiendo el protocolo anterior descrito. Finalmente, la emisión gamma del bioconjugado y los sobrenadantes centrifugados en cada caso (estreptavidina o Ab detección biotinilado) se midieron durante 60 segundos usando un contador de gamma universal Compugamma Wallac 1282 LKB. Cada muestra fue preparada y medida por triplicado.

Cálculos teóricos

El primer paso de biofuncionalización fue la unión de AuNPrs PEGiladas con estreptavidina, mediante la unión covalente via carbodiimida. Para comparar los resultados experimentales obtenidos por radioactividad, se llevaron a cabo los cálculos teóricos para conocer el número de moléculas máximo de estreptavidina que puede saturar teóricamente la superficie de un solo nanoprismo. Tomando los AuNPrs como un prisma de base triangular (233,8 nm de altura del prisma (h), 9 nm de lado (l) y 270 nm la base (b)), se calculó su área $A = 3bl + bh$, obteniendo valor de 70416 nm². Varias bases de datos compilan las estructuras 3D de las proteínas, este caso se utilizó el PDB para obtener la estructura de la estreptavidina (1vwa.pdb) y medir su tamaño con ayuda del programa de visualización molecular Pymol (Molecular Graphics System, Pymol), de esta forma, la proteína se ajustó por su morfología a un hexágono (**Figura 3.25A**) y su área se calculó tomando como lado de 3.5 nm y como apotema de 3 nm, obteniendo un área de 31.5 nm². Asumiendo que las estreptavidinas se unen al AuNPrs por una única orientación, se realizó la proyección del área mayor (cara hexagonal) sobre la superficie de AuNPrs, lo que indicó que, en teoría, la superficie de un AuNPrs saturado de estreptavidina permitir la unión de aproximadamente 2235 estreptavidinas.

Se calculó teóricamente que un prisma de 270 nm, posee $1,64 \cdot 10^7$ átomos de oro y por tanto el peso de un prisma es $3,23 \cdot 10^9$ g/mol. Siendo que finalmente la disolución de AuNPrs bioconjugados posee 0,3 mg/mL de oro, la concentración calculada de esta fue de $9,29 \cdot 10^{-11}$ mmol/ml de oro. Sabiendo que 1 $\mu\text{g/mL}$ de estreptavidina (52,8 KDa) equivale a $1,89 \cdot 10^{-8}$ mmol/mL de la misma, podemos calcular el ratio mmoles de proteína por nanoprismas correspondiente a una concentración de 1 $\mu\text{g/mL}$ de estreptavidina, que corresponde a 204 estreptavidinas por AuNPrs. Utilizando esta ratio, podemos calcular que 2235 estreptavidinas equivale a un ratio molar correspondiente a una concentración de proteína de 10,96 $\mu\text{g/mL}$, teóricamente el 100% del área superficial de los AuNPrs ocupada.

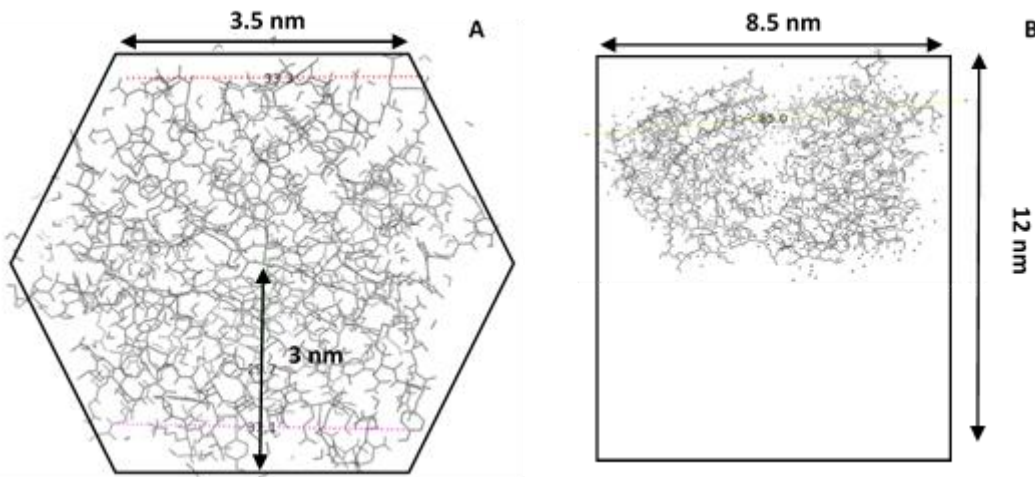


Figura 3.25: Estructura 3D obtenida desde el banco de datos de proteínas, PDB de **A)** estreptavidina (1vwa.pdb) ajustada a un hexágono y **B)** porción F_{ab} del anticuerpo de detección AntiCEA 3C6 (1clo.pdb) ajustado a un rectángulo. En ambos casos se tomó en cuenta la proyección de mayor área sobre la superficie de las AuNPrs para el cálculo teórico de la máxima cantidad de moléculas de proteínas que saturarían la superficie del nanoprisma en cada caso.

En el segundo paso de la biofuncionalización, el bioconjugado AuNPrs@estreptavidina es unido al anticuerpo de detección biotinilado mediante la unión orientada estreptavidina-biotina. Para lograr el rendimiento de unión más alto, se evaluó la concentración añadida del anticuerpo biotinilado de detección anti-CEA como modelo. En este caso, ajustando el anticuerpo a un rectángulo de altura de 12 nm (altura estándar de los Ab)⁴¹ y con base de 8,5 nm (obtenida de la estructura de la parte ligera del anticuerpo antiCEA 3C6, 1clo.pdb) (**Figura 3.25B**), es posible obtener el área aproximada del anticuerpo, 85 nm^2 , lo que indica que la superficie de un AuNPr@estreptavidina permitir la unión teórica de aproximadamente 533 anticuerpos por AuNPrs suponiendo el 100% de la superficie teórica de estreptavidina cubierta por anticuerpos. Sabiendo que 1 $\mu\text{g/mL}$ de anticuerpo (150 KDa) equivale a $6,67 \cdot 10^{-9}$ mmol/mL de la misma, podemos calcular el ratio mmoles de anticuerpo por nanoprismas correspondiente a una concentración de 1 $\mu\text{g/mL}$ de, 72 anticuerpos por AuNPrs. Utilizando esta ratio, podemos calcular que 533 estreptavidinas equivale a un ratio molar correspondiente a una concentración de anticuerpo de 7,40 $\mu\text{g/mL}$, teóricamente el 100% del área superficial de los AuNPrs ocupada.

3.2.3.2. Resultados

Se llevó a cabo la evaluación del rendimiento de unión de AuNPrs (NPrs:PEG, 1:1 y 1:5) usando diferentes concentraciones de estreptavidina (8, 10 y 15 $\mu\text{g/ml}$), mediante cuantificación de proteínas por marcaje radioactivo (etiquetado de estreptavidina con K^{125}I) y compararla posteriormente con el valor teórico y así correlacionar con la máxima saturación factible de la superficie del AuNPr. En los resultados, recogidos en la **Figura 3.26**, se observa, en primer lugar, que en todos los casos se obtiene un mayor porcentaje de unión al usar AuNPrs con relación de masa NPrs:PEG, 1:1, lo cual indica que esta cantidad de PEG es suficiente para saturar la superficie de los AuNPrs. Un aumento del número de grupos carboxilo en la superficie del prisma no provoca un aumento del número de estreptavidinas unidas, probablemente debido al impedimento estérico entre las proteínas.

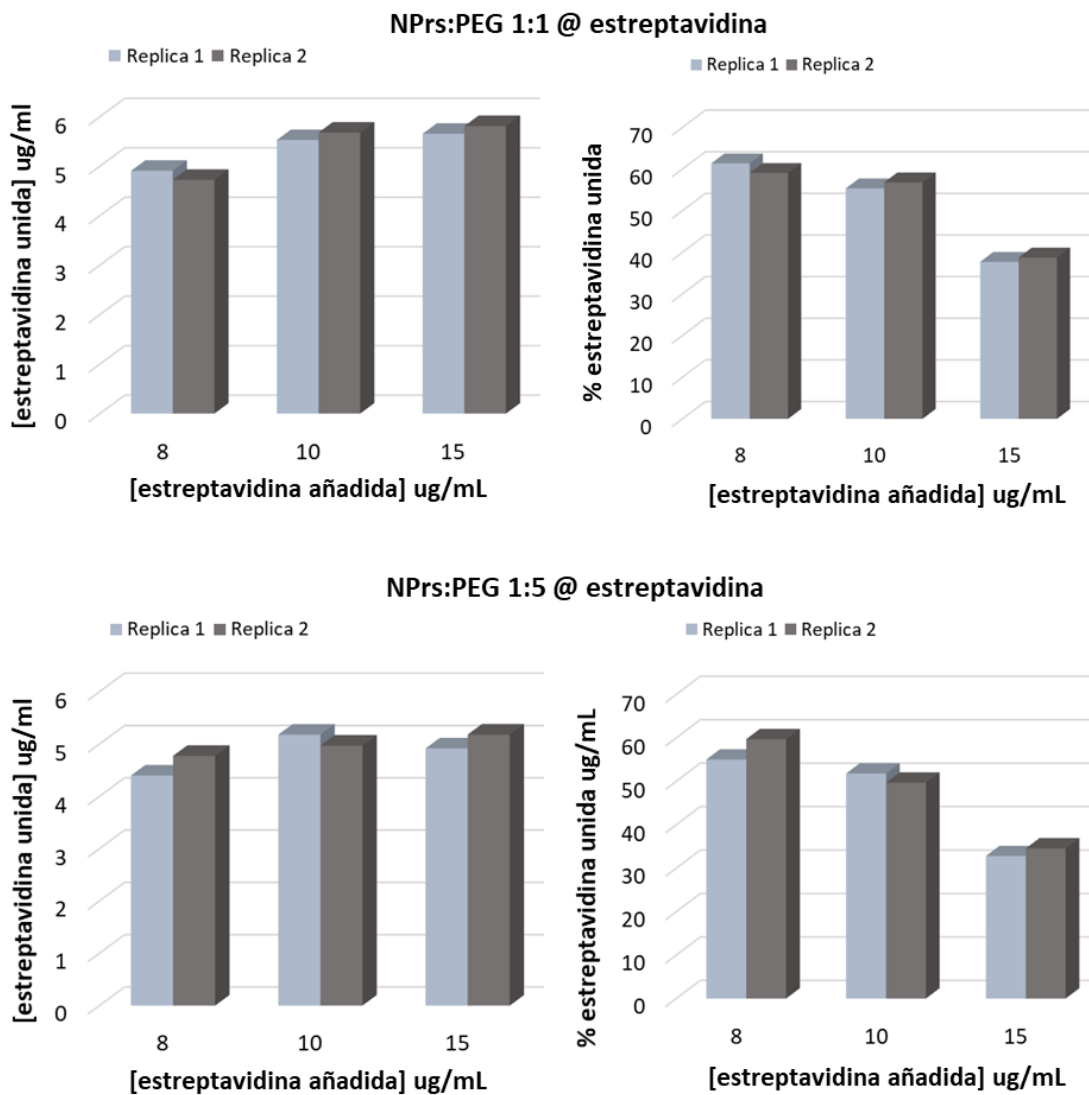


Figura 3.26: Resultados de la cuantificación por marcaje radioactivo (K^{125}I) para conocer la concentración de estreptavidina unida a los AuNPrs.

En estos resultados, también se observa que en ambos casos, la máxima cantidad total de proteína unida se logra al agregar 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, en cuyo caso el 56% de la estreptavidina se une al AuNPrs (5,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estrep. unida), en comparación con el 60 % en el caso de agregar 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (4,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estrep. unida) y el 38 % en el caso de agregar 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptavidina (5,7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptavidina unida). (Tabla 3.12)

		% superficie AuNPrs ocupada	$\mu\text{g}/\text{mL}$ añadidos	$\mu\text{g}/\text{mL}$ unidos	Nº proteínas unidas en total en la suspensión de AuNPrs
Estreptavidina	Teórico	100%	-	10,9	2235
	Experimental	56 %	10,0	5,6	1142
Ab anti-CEA biotina	Teórico	100%	-	7,4	533
	Experimental	86%	12,0	6,4	459

Tabla 3.12: Resultados teóricos y experimentales (marcaje radioactivo, K^{125}I) de la cantidad de estreptavidina y anticuerpo antiCEA biotinilado unidos a los AuNPrs:PEG 1:1.

Las medidas de radioactividad que evalúan la unión de varias concentraciones del anticuerpo anti-CEA de detección biotinilado añadido (2, 6, 10 y 12 $\mu\text{g}/\text{ml}$) se muestran en la **Figura 3.27**, donde se observa que la mayor cantidad de Ab anti-CEA unido se logra al agregar 12 $\mu\text{g}/\text{ml}$, en cuyo caso el 53% del Ab anti-CEA agregado está unido a los AuNPrs@estreptavidina, lo que equivale a una unión de 6,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptavidina, una superficie teórica de 86% de AuNPrs-estreptavidina ocupada por Ab anti-CEA biotinilado. (Tabla 3.12)

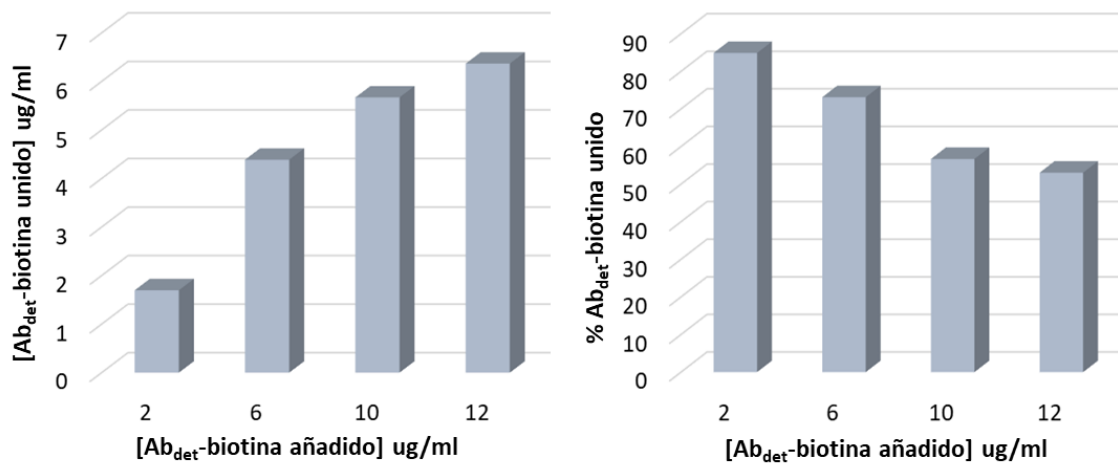


Figura 3.27: Resultados de la cuantificación por marcaje radioactivo (K^{125}I) para conocer la concentración de anti-CEA 3C6 unida a los AuNPrs.

3.3.4. Conclusiones

De este apartado de optimización de métodos y obtención de materiales comunes, se obtuvieron las siguientes conclusiones:

- Se seleccionaron las concentraciones óptimas de Ab_{cap} y Ab_{det_biotin} para la metodología clásica ELISA colorimérico, para cada uno de los marcadores de gastrointestinales evaluados. (**Tabla 13**) y se obtuvieron los parámetros analíticos del método en cada caso, que se presenta en la **Tabla 3.8**.

	$[Ab_{cap}] \mu\text{g/mL}$	$[Ab_{det_biotin}] \mu\text{g/mL}$
CEA	12	1
VEGF	5	0,2
CA19.9	5	2

Tabla 3.13: Resumen de las concentraciones de Ab_{cap} y Ab_{det_biotin} seleccionadas tras la optimización del método ELISA colorimérico para cada uno de los marcadores de cáncer gastrointestinal evaluados.

- Se sintetizaron tres tipos de AuNPrs y tras su caracterización se seleccionó la síntesis 1 como óptima. Estos AuNPrs tienen una banda NIR centrada a 1230 nm, la eficiencia de conversión fototérmica máxima con un 42,4% y un tamaño promedio de 277 ± 36 nm. Además, esta síntesis muestra la mayor reproducibilidad y los AuNPrs obtenidos presenta una buena estabilidad coloidal en agua durante largos periodos de tiempo.
- Se evaluó la bioconjugación de AuNPrs con el anticuerpo biotinilado mediante la previa unión de estreptavidina a los AuNPrs seleccionados. El protocolo optimizado para el caso del marcador CEA, se evaluó por medio de la cuantificación de ambas proteínas en la superficie del prisma, mediante marcaje radiactivo. De esta forma se concluyó que el ratio AuNPrs:PEG 1:1 posee la cantidad de PEG suficiente para saturar de grupos carboxilo la superficie de los AuNPrs y por tanto de estreptavidina. Además, se encontraron las concentraciones de estreptavidina y Ab_{det_biotin} óptimas a añadir (10 y 12 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente), que permiten la mayor unión de estas proteínas a la disolución de AuNPrs (5,6 y 6,4 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente).

Sección 3A

Nano-inmunoensayo térmico
(TermoLISA) para la detección de
marcadores cancerígenos
gastrointestinales

3A.1. Introducción

Como ya se ha dicho, los AuNPrs vinculados a un receptor biológico pueden actuar como transductores físico-químicos, interpretando el reconocimiento biológico con el analito como una señal térmica cuantificable, que se podría detectar con una cámara IR. De esta forma, en esta sección se evaluaron las posibilidades de la tecnología de detección térmica basada en AuNPrs desarrollando un nuevo ensayo inmunsorbente cuantitativo y de alta sensibilidad, llamado TermoLISA, para la detección de biomarcadores de cáncer gastrointestinal.

Esta metodología utiliza como elemento de detección el bioconjugado AuNPrs(estreptavidina) - (biotina)Ab_{detección}, previamente optimizado mediante control del número de estreptavidinas y Abs en la superficie de AuNPrs (*apartado 3.3.3*), a través de la cuantificación de estas proteínas mediante marcaje radiactivo. Esta estrategia proporciona un bioconjugado versátil que puede vincularse posteriormente a cualquier otro anticuerpo de detección siempre que esté biotinilado, lo que permite extender la metodología a la detección de los diferentes marcadores tumorales gástricos en sangre estudiados: CEA, CA19.9 y VEGF.

De esta forma, el inmunoensayo TermoLISA (**Figura 3A.1**) tiene como objetivo abrir horizontes en la detección cuantitativa ultrasensible con un formato similar al ELISA, así, una vez formado el sándwich de anticuerpos, la irradiación de los pocillos por la fuente de láser NIR, genera la liberación de cantidades de calor proporcional a la concentración de analito capturado. Estos pequeños cambios de temperatura se pueden detectar con una cámara IR obteniendo su imagen térmica, de la que se extraen finalmente las señales térmicas de variación de temperatura tras un ciclo de calentamiento y enfriamiento.

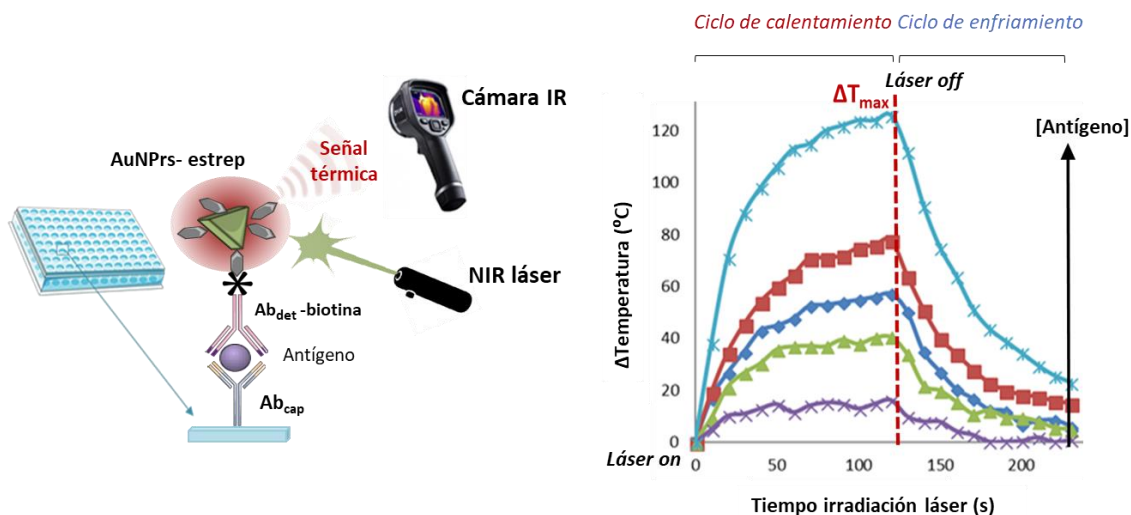


Figura 3A.1: Esquema del inmunoensayo TermoLISA junto con las señales térmicas recogidas para distintas concentraciones crecientes de antígeno CEA.

3A.2. Objetivos

En esta sección se abarca la optimización y desarrollo de la metodología TermoLISA mediante los siguientes objetivos específicos:

1. Optimización del protocolo TermoLISA partiendo del protocolo optimizado para el ELISA colorimétrico.
2. Optimización del montaje experimental, parámetros de medida térmica y tratamiento de las señales térmicas para así obtener las características analíticas del método.
3. Optimización del bioconjugado AuNPrs@streptavidina para su aplicación al método TermoLISA.
4. Optimización de la unión del Ab_{det_biotin} (para cada marcador) a este bioconjugado para su aplicación al método TermoLISA.

Toda esta etapa de optimización se lleva a cabo utilizando muestras de los tres analitos preparadas con concentraciones conocidas en PBS.

5. Por último, en las condiciones optimizadas, estudiar la aplicación del ensayo TermoLISA en muestras de plasma sanguíneo humano a las que se les añaden concentraciones de analito conocidas, para así evaluar posibles interferencias de matriz.

3A.3. Experimental y métodos

3A.3.1. Protocolo inmunoensayo sandwich TermoLISA

Para el desarrollo de los diferentes ensayos TermoLISA, se utilizaron los mismos materiales que en el caso del ELISA colorimétrico (*apartado 3.3.1.*) y los primeros pasos del protocolo, así como las concentraciones de los anticuerpos de captura unida a los pocillos de las placas utilizadas fueron los mismos que los optimizados para el ELISA colorimétrico.

Es así que, la placa se incubó durante la noche a 4°C conteniendo 0,1 ml por pocillo del anticuerpo de captura en PBS 50 mM pH 8, 12 µg/mL (CEA), 2µg/mL (VEGF) o 5 µg/mL (CA19.9). La placa se vació y bloqueó con 0,25 ml de disolución de bloqueo (PBS 50 mM, NaCl 0,3 M, Tween 0,5% y 5 mg/ml de BSA) durante 1 hora a 37°C con agitación orbital. Después de lavar la placa dos veces con 0,25 ml de disolución de lavado (PBS con Tween al 0,5%), se incubaron durante 1 hora a 37°C con agitación orbital 0,1 ml de las muestras de antígeno. Por último, tras tres lavados, se incubaron durante 2 horas a 37°C con agitación orbital 0,3 mg/ml del bioconjugado AuNPrs@streptavidin@Ab_{det}biotina en ácido bórico pH 8 y tween 20 al 1%. Finalmente, la placa se lavó tres veces y se dejó vacía secando a temperatura ambiente.

Para estudiar el efecto de la matriz y aplicar esta metodología en muestras de plasma, concentraciones conocidas de estos marcadores tumorales de cáncer se adicionaron a una solución de plasma (Normal, Pooled Human Donors de Dismed, España) y se analizaron por termoLISA, para comparar la sensibilidad, LD y LC del método cuando se detectan las mismas concentraciones de marcador, pero disueltos en PBS

3A.3.2. Lectura del inmunoensayo TermoLISA: montaje instrumental, configuración y emisividad cámara IR

La placa multipocillos se colocó sobre un soporte de irradiación, diseñado con un agujero donde se centra el pocillo a irradiar. El haz láser NIR de 1064 nm, operando a una potencia de salida de 2,5 W, rebota en un espejo y se desvía 90 °C para incidir por la parte inferior de la placa de pocillos que se encuentra colocada boca abajo. Los pocillos se irradian de forma continua durante 2 minutos. La imagen térmica de cada pocillo se obtuvo utilizando la cámara IR utilizando una distancia focal > 0,5 m, ángulo de medición 45 ° y factor de emisividad (ε) 0.1 que fue optimizado. (**Figura 3A.2**) Por lo tanto, la lectura del inmunoensayo se llevó a cabo registrando la imagen térmica durante los 2 minutos de irradiación láser (ciclo de calentamiento) y 2 minutos después de la irradiación cuando el láser está apagado (ciclo de enfriamiento). Las señales térmicas de variación de temperatura en el tiempo de irradiación se extrajeron de la imagen térmica utilizando el software FLIR Tools.

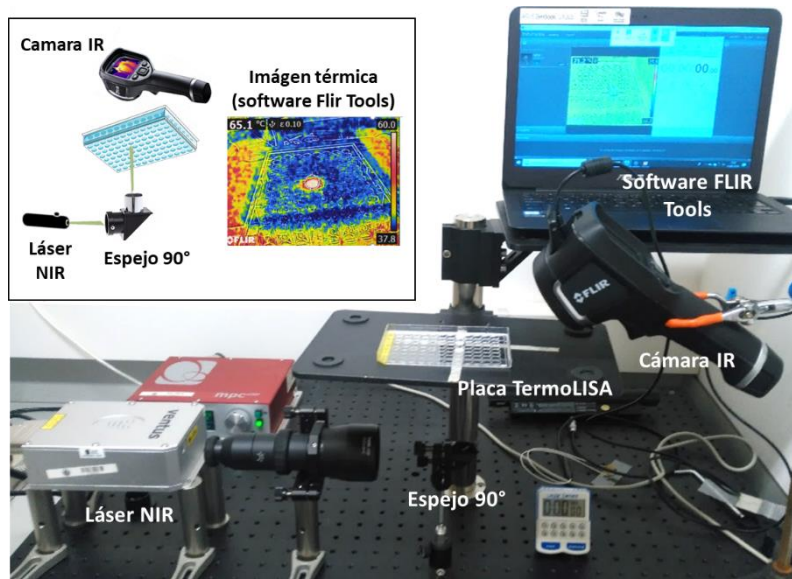


Figura 3A.2: Esquema montaje instrumental TermoLISA

Para la optimización de la emisividad, se irradió durante 40 segundos una concentración de AuNPrs de 180 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y un blanco agua a las dos emisividades evaluadas, 0,1 y 0,9, utilizando un láser de 1064 nm a 2 W.

3A.3.3. Optimización del bioconjugado AuNPrs@estreptavidina mediante TermoLISA sándwich

En esta sección se evaluaron también diferentes bioconjugados AuNPr@estreptavidina, para ello se llevaron a cabo diversos TermoLISA sandwich para el analito CEA (0, 50, 100, 150, 200 ng/mL) que se seleccionó como modelo para esta optimización. Se siguió el protocolo TermoLISA (sección 3A.3.1) hasta el último paso en el que en vez de agregar el bioconjugado completo, primero se agregó el anticuerpo de detección biotinilado en una concentración fija (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y luego 0,03 mg de los diferentes bioconjugados AuNPr@estreptavidina para cada lineal rango completo. Con esta modificación del protocolo se pretende, que este caso, los resultados sean independientes de la cantidad de $\text{Ab}_{\text{det_biotin}}$ (como en el caso de los estudios de radioactividad) y esta sean constante en todos los casos.

De esta forma, se seleccionó el bioconjugado AuNPrs@estreptavidina que proporciona una mayor sensibilidad para la aplicación desarrollada y comparar estos resultados con los obtenidos por radioactividad.

3A.3.4. Optimización de la concentración de anticuerpo de detección biotinilado (CEA, VEGF y CA19.9) unida al bioconjugado AuNPrs@estreptavidina mediante TermoLISA

El método TermoLISA fue utilizado también para evaluar la derivatización de AuNPrs@estreptavidina con el anticuerpo de detección biotinilado de cada uno de los marcadores cancerígenos estudiados.

En el caso del anti-CEA esta concentración ya fue evaluada por marcaje radioactivo (sección 3.2.3.2), obteniéndose una concentración óptima añadida de estreptavidina de 12 $\mu\text{g/mL}$ (6,37 $\mu\text{g/mL}$), para comparar con este resultado se llevó a cabo un TermoLISA directo, agregando en primer lugar 0,2 μg del antígeno CEA, bloqueando la placa con BSA y agregando 0,03 mg de cada AuNPrs@streptavidina@Abdet_biot (2, 6, 10, 12 y 15 $\mu\text{g/ml}$).

Para evaluar las diferentes concentraciones de los anticuerpos de detección biotinilado del resto de marcadores de cáncer, se realizaron diversas conjugaciones AuNPrs@estreptavidina con las concentraciones de anticuerpo biotinilado: anti-VEGF165 (0,5, 1,5, 2,5 $\mu\text{g/mL}$) y anti-CA19.9 (5, 10 y 15 $\mu\text{g/mL}$). Finalmente, con estos conjugados se realizaron diversos TermoLISA sandwich para cada rango lineal del marcador de cáncer evaluado: VEGF (0, 10, 25, 50 y 100 ng/mL) y CA19.9 (1, 5, 10, 50, 100 U/mL)

3A.4. Resultados

3A.4.1. Optimización de la emisividad de la cámara IR

La emisividad es la capacidad de un cuerpo o superficie para emitir una proporción de radiación térmica.⁴² Este valor es diferente para cada material y cuanto más pequeño sea, mejor aislante por reflexión será dicha superficie, siendo 1 el valor máximo. Este valor es muy importante ya que afecta directamente a la medición de temperatura, la cámara termográfica proporcionará un valor de temperatura u otro en función del valor de emisividad introducido. En la cámara, este factor viene predeterminado como 0,9, pero es posible cambiarlo a valores superiores o inferiores. Existen multitud de tablas, donde se pueden encontrar los valores de emisividad tabulados para muchos materiales, plásticos, metálicos, orgánicos... sin embargo, en este caso, el material irradiado del que tomaremos la imagen térmica, no es un material puro, sino que es una mezcla de materiales, desde el poliestireno de la placa de pocillos, pasando por la materia orgánica inmovilizada en el pocillo junto con las nanopartículas de oro. Por ello, es muy difícil obtener el parámetro de emisividad correcto en este caso.

Debido a que el calor desprendido se debe al efecto fototérmico de las nanopartículas de oro y sabiendo que la emisividad del oro puro es 0,02, se decidió utilizar como factor de emisividad amplificador (ϵ) 0,1 y compararlo con el valor 0,9 predeterminado. En la **Figura 3A.3**, se observan las señales térmicas de calentamiento y su enfriamiento posterior junto con las imágenes térmicas recogidas en cada caso al principio de la irradiación. Podemos observar como en el caso de emisividad 0,1, la irradiación del blanco no genera variación de la señal térmica y la temperatura ambiente inicial medida es de 33.8 °C, consiguiendo una amplificación de la señal térmica 6 veces mayor que utilizando el coeficiente 0,9, en cuyo caso la temperatura ambiente inicial medida es de 22.1 °C.

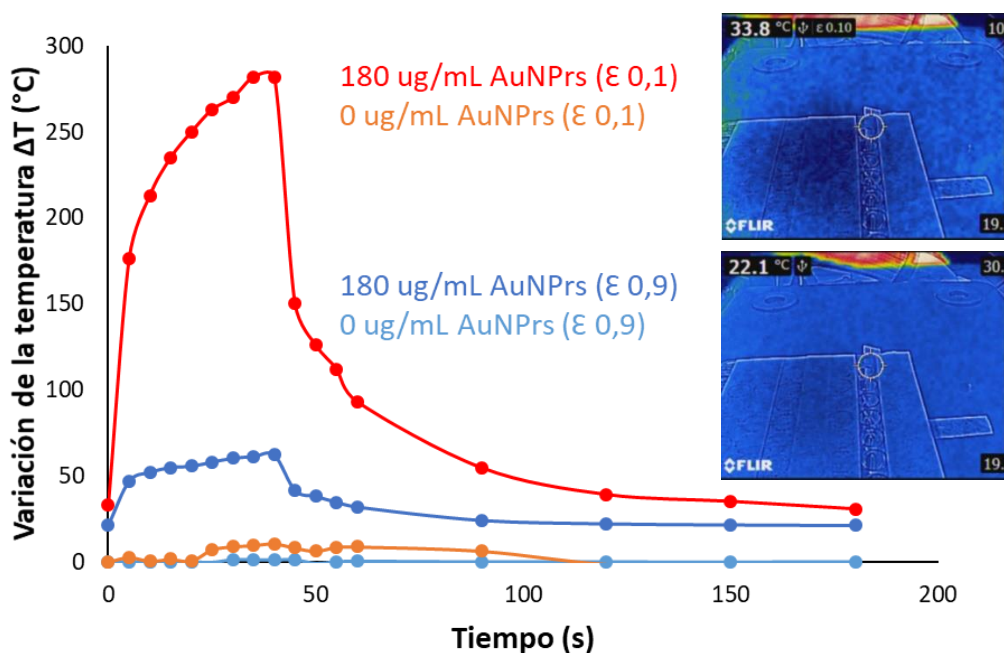


Figura 3A.3: Señales e imágenes térmicas obtenidas al irradiar con un láser de 1064 nm a 2 W, 0 y 180 $\mu\text{g/mL}$ de una disolución de AuNPrs a las dos emisividades evaluadas. La temperatura ambiente medida con termómetro fue en ambos casos de 23°C.

3A.4.2. Análisis de la señal térmica.

Con el fin de obtener la máxima sensibilidad, se evaluó el análisis de la señal analítica térmica mediante diversos métodos (**Figura 3A.4**):

- Variación de temperatura máxima.
- Decaimiento fototérmico: cálculo matemático para obtener la constante de tiempo (τ) relacionada con el ciclo de enfriamiento (pendiente de la recta tiempo de enfriamiento vs $-\ln(\theta)$, apartado 3.3.2.1 'Cálculo de eficiencia de conversión fototérmica de AuNPrs').
- Área de señal de calentamiento-enfriamiento (área bajo la curva, AUC).

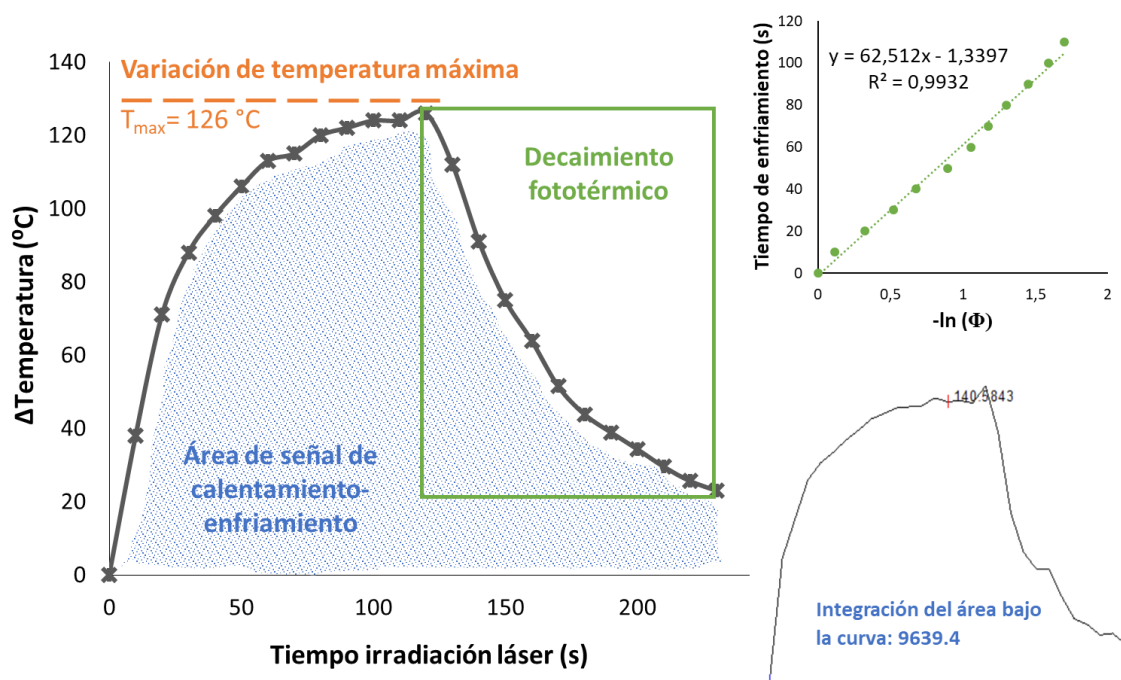


Figura 3A.4: Análisis de la señal térmica equivalente a 200 ng/mL de CEA y los diferentes métodos de tratamiento de la señal analítica.

De esta forma, realizando los mismos tratamientos analíticos para todas las concentraciones de CEA evaluadas, podemos obtener las rectas de calibrado para cada uno de los métodos de análisis de la señal térmica (**Figura 3A.5**), de cuyas pendientes se deduce la sensibilidad de los mismos, observándose que el tratamiento de las áreas, además de aportar una información global de la señal, produce mayores valores de señal analítica para las concentraciones más bajas de analito, lo que permite evaluar un mayor rango de detección con mayor sensibilidad.

Por ello, todos los calibrados finales del método TermoLISA se obtuvieron tratando las señales térmicas mediante la obtención de las áreas. Estos análisis se realizaron utilizando el software Origin Pro 8.0, que permite integrar las señales térmicas del área bajo la curva, proporcionales a la concentración de marcador de cáncer analizado.

Sin embargo, a lo largo de esta sección, para la optimización del método TermoLISA, se utilizará el método de análisis de variación de temperatura máxima, que permite un tratamiento más rápido y directo de las señales.

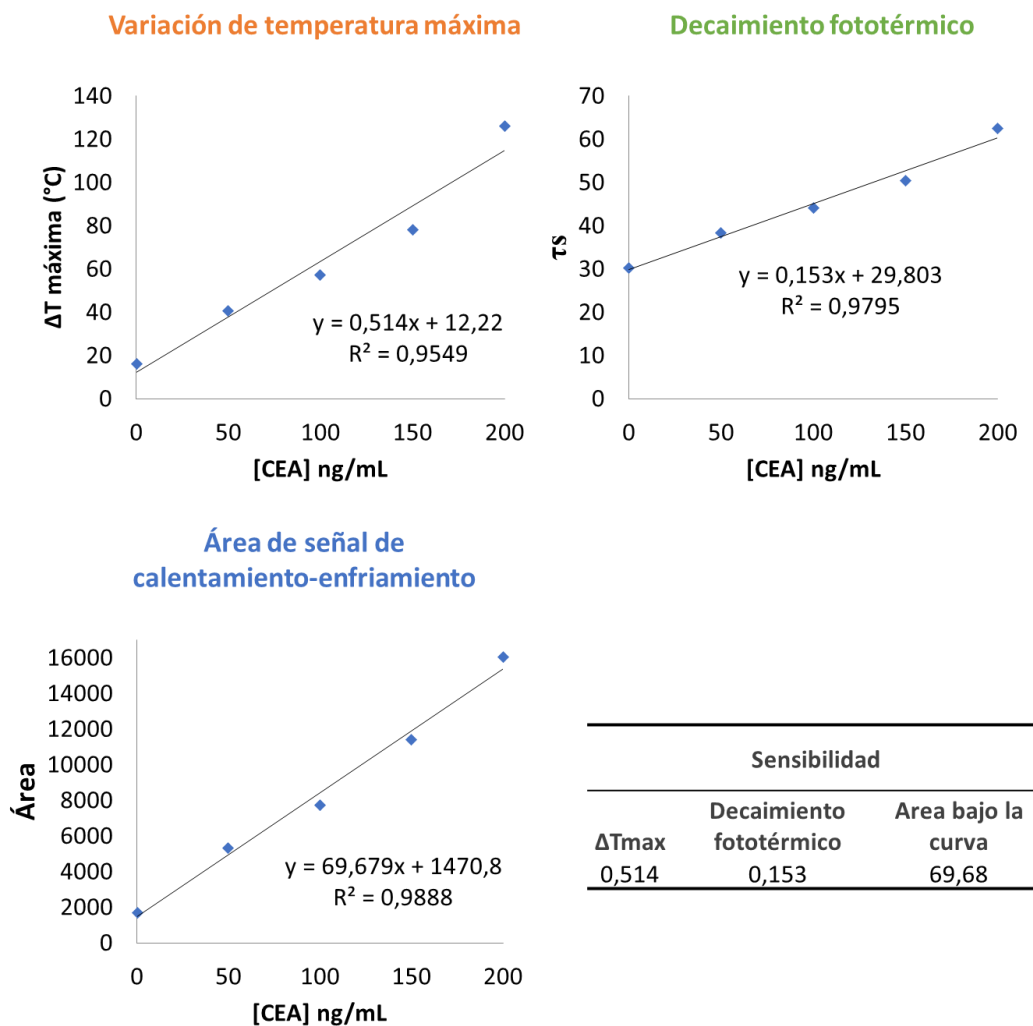


Figura 3A.5: Análisis de la señal térmica equivalente a 200 ng/mL de CEA y los diferentes métodos de tratamiento de la señal analítica.

3A.4.3. Optimización del bioconjugado AuNPrs@estreptavidina mediante TermoLISA sándwich.

El ratio máximo de estreptavidina a unir en el conjugado AuNPrs@estreptavidina se determinó previamente por marcaje radioactivo de la estreptavidina (*apartado 3.3.3*), obteniéndose la saturación con las condiciones de inmovilización optimizadas al añadir una concentración de estreptavidina de 10 $\mu\text{g/mL}$ (5,6 $\mu\text{g/mL}$ proteína unida) a un total de 0,5 mg/mL de AuNPrs. En esta sección se evaluaron también diferentes bioconjugados AuNPr@estreptavidina mediante TermoLISA, utilizando el anticuerpo biotilado anti-CEA como modelo, con el fin de para poder correlacionar cantidad de anticuerpo de detección unido con respuesta biológica y por lo tanto señal analítica observada.

Así, tras el análisis de los resultados con la cámara IR, se extrajeron las señales térmicas mostradas en la **Figura 3A.6**, que representan la variación de temperatura frente al tiempo de irradiación láser para cada concentración de CEA.

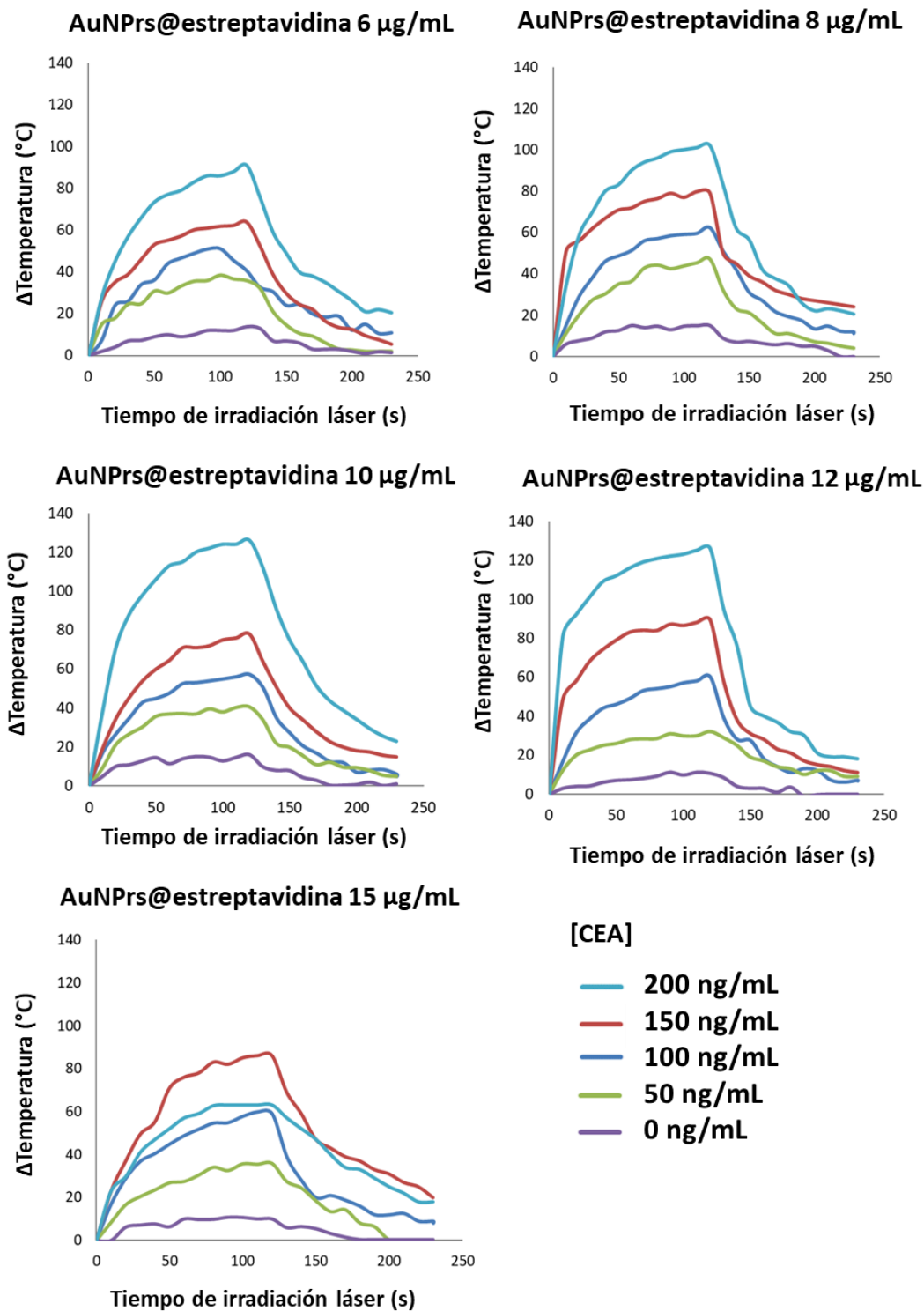


Figura 3A.6: Señales térmicas obtenidas en el reconocimiento de CEA para los distintos bioconjugados AuNPrs@estreptavidina evaluados mediante TermoLISA.

En estas figuras se puede observar como a medida que aumenta la concentración de estreptavidina añadida a los AuNPrs, la temperatura máxima alcanzada para cada concentración de CEA aumenta, siendo máxima para 12 µg/mL. Como también se observaba en los estudios de radioactividad (*apartado 3.3.3*), concentraciones de estreptavidina añadida superiores a esta, como es el caso de 15 µg/mL, apenas aumenta el número de estreptavidina unida a los AuNPrs, ya que la superficie se ve saturada.

Esto puede provocar problemas de impedimento estérico en el enlace del anticuerpo de detección biotinilado a los sitios de reconocimiento de la estreptavidina, que se encuentran bloqueados o impedidos, lo que conlleva a un menor número de Abs de detección unidos o disponibles para el reconocimiento. De esta forma, en la figura 3A.6, observamos que el TermoLISA realizado con el conjugado AuNPrs@estreptavidina 15 $\mu\text{g/mL}$, registra disminución clara de la señal térmica registrada para la concentración más alta del rango de CEA evaluado (200 $\mu\text{g/mL}$). Extrayendo las variaciones de temperatura máximas en cada caso y representándolas frente a la concentración de CEA, se obtuvieron las diferentes rectas de calibrado para cada bioconjugado AuNPrs@estreptavidina (**Figura 3A.7**).

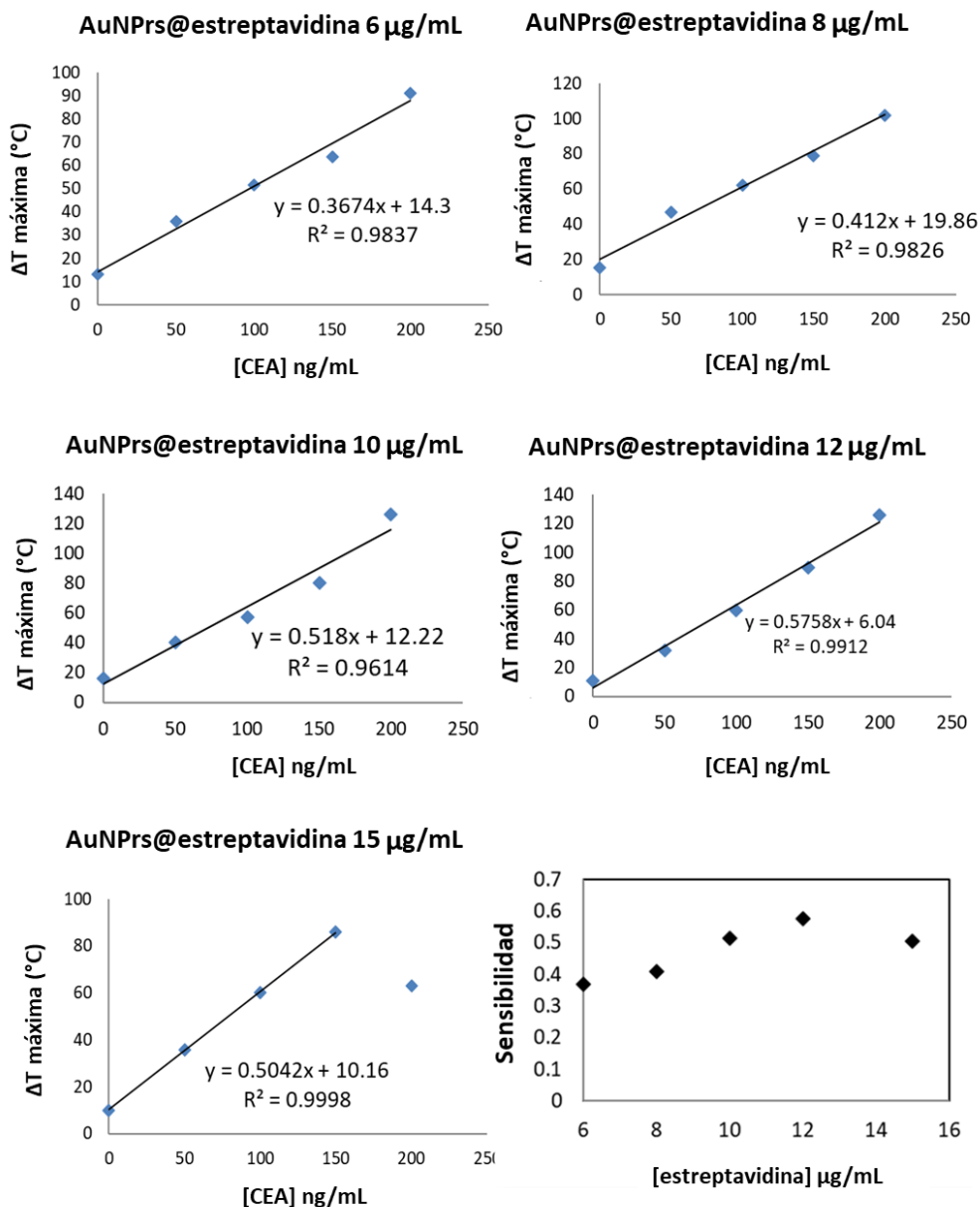


Figura 3A.7: Rectas de calibrado de variación de temperatura máxima y sensibilidad obtenida para cada bioconjugado AuNPrs@estreptavidina evaluado mediante TermoLISA sandwich para el reconocimiento de CEA.

La pendiente de estas rectas es igual a la sensibilidad del método, observando que la mayor corresponde a la adición de 12 $\mu\text{g/mL}$ de estreptavidina, concentración intermedia entre las dos óptimas observadas en las medidas de radioactividad, 10 y 15 $\mu\text{g/mL}$.

3A.4.4. Optimización de la concentración de anticuerpo de detección biotilado (CEA, VEGF y CA19.9) unida al bioconjugado AuNPrs@estreptavidina mediante TermoLISA

La evaluación de la cantidad óptima anticuerpo de detección biotilado anti-CEA añadida al conjugado AuNPrs@estreptavidina óptimo (12 $\mu\text{g}/\text{mL}$), se llevó a cabo mediante un TermoLISA directo. Los resultados obtenidos por imagen térmica (**Figura 3A.8**) mostraron la mejor sensibilidad para 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de anti-CEA Ab biotilado añadido, coincidiendo con los resultados obtenidos por marcaje radiactivo (*apartado 3.3.3*), que indicaban que esta concentración equivalía a la mayor superficie teórica ocupada, con 6,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptavidina unidos. Concentraciones más altas de anticuerpo añadido en la conjugación, producen saturación de la superficie e incluso disminuyen la sensibilidad de TermoLISA.

TermoLISA directo: optimización de $[\text{Ab}_{\text{detección}} \text{ anti-CEA biotina}]$

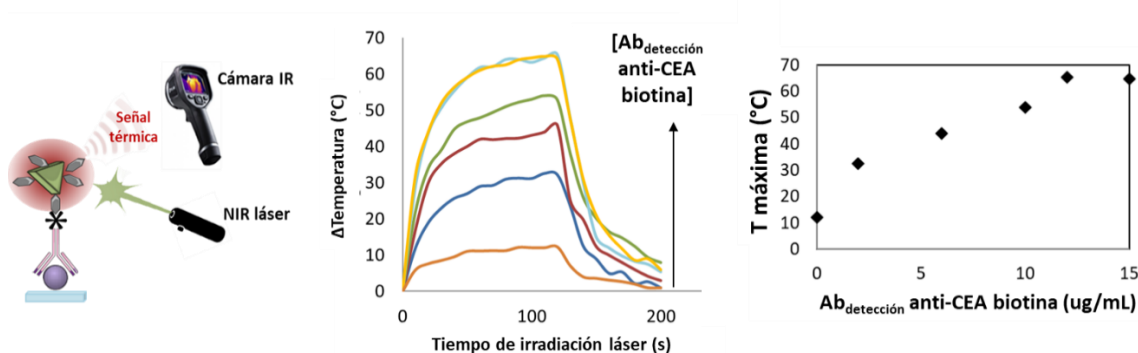


Figura 3A.8: Señales térmicas obtenidas para las diversas concentraciones de $\text{Ab}_{\text{detección}}$ anti-CEA biotilado evaluadas mediante TermoLISA directo para 0,2 μg de CEA

En este punto, se evaluaron diferentes concentraciones de los anticuerpos de detección biotilados, para los otros analitos diana a detectar (VEGF y CA19.9), a unir al bioconjugado AuNPrs@estreptavidina, mediante diferentes termoELISA sándwich para cada rango lineal de marcador de cáncer estudiado, siguiendo el protocolo indicado en el *apartado 3A.3.1*. Después de la irradiación de los pocillos con el láser NIR, se obtuvieron y analizaron las imágenes térmicas.

La **Figura 3A.9** muestra las señales térmicas obtenidas para el anticuerpo biotilado anti-VEGF165 (0,5, 1,5, 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y la representación en cada caso el área de la señal térmica normalizada frente a la concentración de VEGF. Las curvas de calibración se ajustan a una ecuación polinómica cuadrática, desde la que podemos obtener las sensibilidades y los límites de detección y cuantificación para cada concentración de anticuerpo de detección biotilado utilizado en el bioconjugado AuNPrs@estreptavidina@ Ab_{det} _biotina (**Tabla 3A.1**). La concentración intermedia de 1,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Ab anti-VEGF165 biotina, proporciona los mejores LD y LC, además de la mayor sensibilidad. Concentraciones mayores de anticuerpo añadido al bioconjugado AuNPrs@estreptavidina, provocan una fuerte bajada de la sensibilidad y proporcionan peores LD y LC, debido al efecto de saturación (un aumento en la concentración de Ab añadido pueden no suponer un aumento de Ab unido) o al bloqueo de los sitios de reconocimiento del anticuerpo de detección contiguos en la superficie del AuNPr por impedimento estérico.

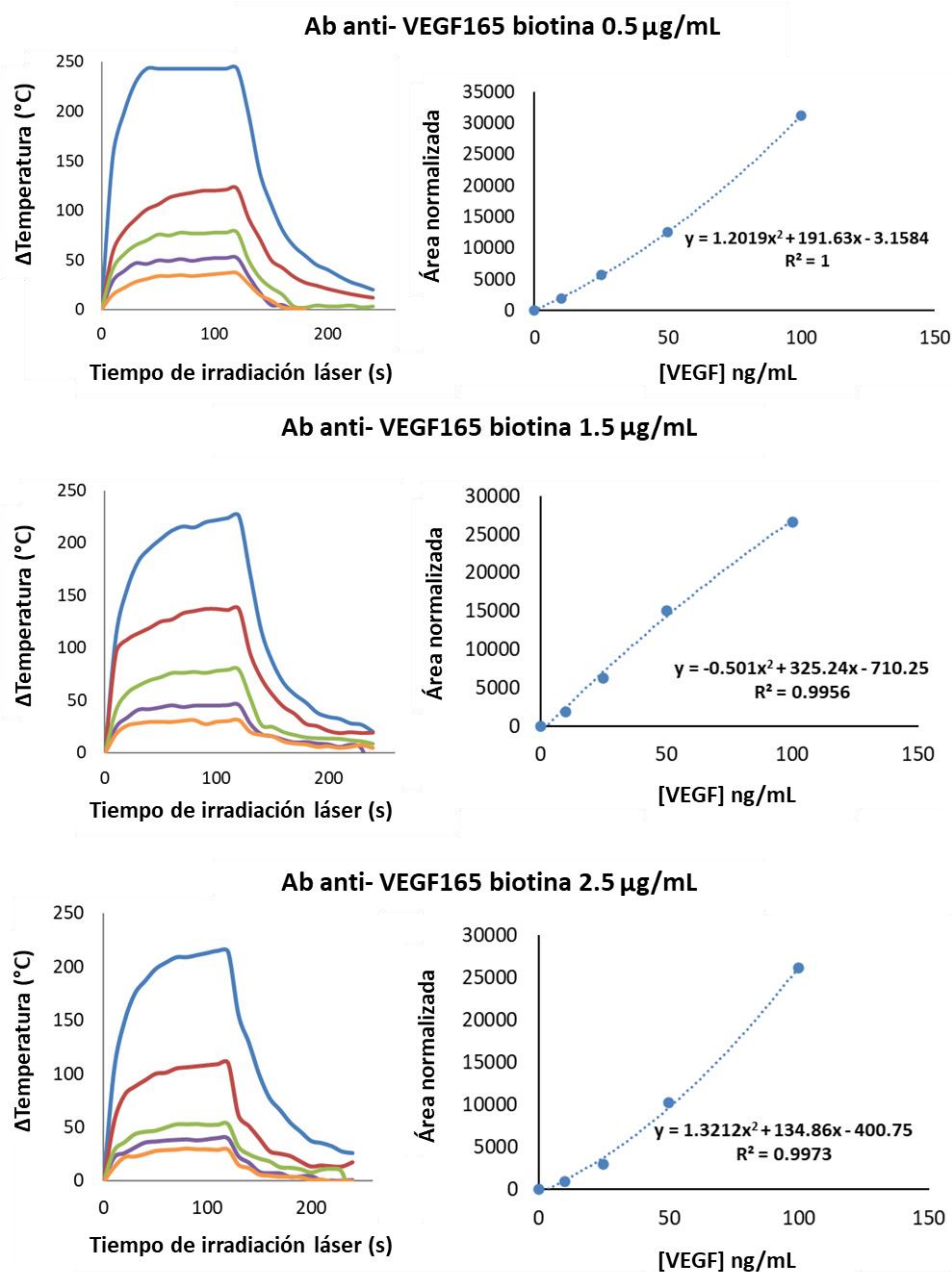


Figura 3A.9: Señales térmicas obtenidas por TermoLISA sándwich para las diversas concentraciones de $Ab_{detección}$ anti-VEGF biotinilado evaluadas junto con sus curvas de calibración.

TermoLISA VEGF (ajuste polinómico)

$[Ab_{det} \text{ biotina}]$	LD (ng/mL)	LC (ng/mL)	Sensibilidad
0,5 µg/mL	0,82	2,72	181
1,5 µg/mL	0,45	1,50	325
2,5 µg/mL	3,54	11,8	134

Tabla 3A.1: Características analíticas del método TermoLISA sandwich en la detección de VEGF para las diferentes concentraciones de Ab anti-VEGF biotinilado evaluadas.

El mismo estudio se llevó a cabo para el anticuerpo carbohidrato CA19.9, la **Figura 3A.10** muestra las señales térmicas obtenidas para cantidades crecientes añadidas de anticuerpo biotinilado anti-CA19.9 (5, 10 and 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y las curvas de calibrado del área de la señal térmica normalizada frente a la concentración de CA19.9, que en este caso también se ajustan a una ecuación polinómica cuadrática, en la que se ha eliminado el ultimo valor, 100 U/mL por saturación de la señal.

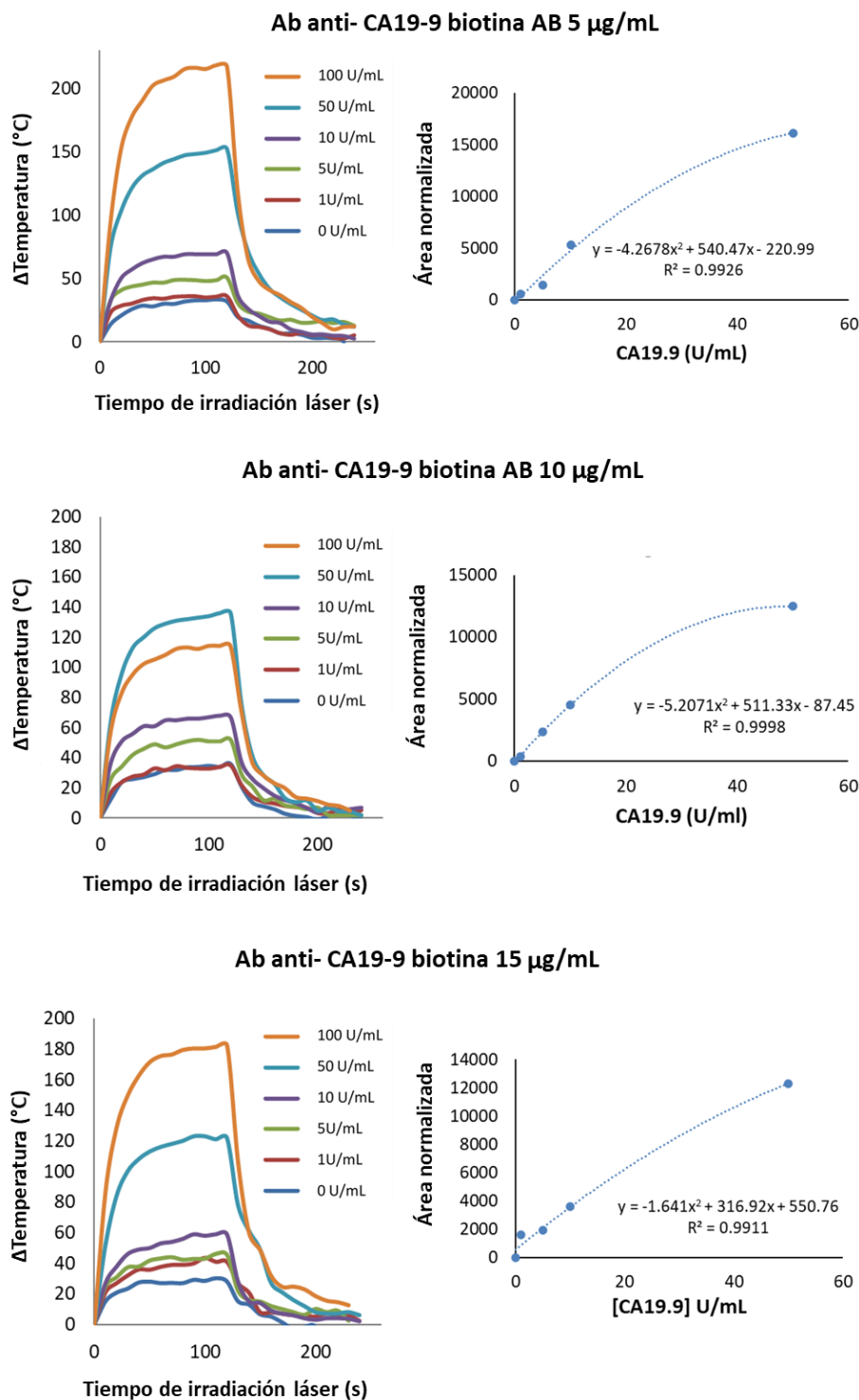


Figura 3A.10: Señales térmicas obtenidas por TermoLISA sándwich para las diversas concentraciones de $\text{Ab}_{\text{detección}}$ anti-CA19.9 biotinilado evaluadas junto con sus curvas de calibración.

Como se observa en la figura, en este caso las gráficas también se ajustan a una ecuación polinómica cuadrática, desde la que podemos obtener las sensibilidades y los límites de detección y cuantificación para cada concentración de anticuerpo de detección biotinilado evaluado (**Tabla 3A.2**).

TermoLISA CA 19.9 (ajuste polinómico)

[Ab_{det}biotina]	LD (ng/mL)	LC (ng/mL)	Sensibilidad
5 µg/mL	0,17	0,59	540
10 µg/mL	0,72	2,41	511
15 µg/mL	1,88	6,26	316

Tabla 3A.2: Características analíticas del método TermoLISA sandwich en la detección de CA 19.9 para las diferentes concentraciones de Ab anti-CA19.9 biotinilado evaluadas.

La concentración más baja de Ab anti-CA19.9 biotina, 5µg/mL, proporciona los mejores LD y LC y la mayor sensibilidad. Concentraciones mayores provocan, al igual que en el caso de VEGF, una bajada de la sensibilidad y peores LD y LQ.

3A.4.5. Propiedades analíticas del método TermoLISA sándwich para la determinación cuantitativa de marcadores de cáncer gastrointestinal

La evaluación final de la nueva metodología desarrollada y optimizada se llevó a cabo repitiendo el análisis TermoELISA por triplicado para cada marcador cancerígeno según muestra el protocolo (*apartado 3A.3.1*), utilizando las concentraciones de Ab_{captura} optimizadas por ELISA colorimétrico (*apartado 3.3.1*) y para la bioconjugación utilizando en todos los casos 12 µg/mL de estreptavidina y la concentración de Ab_{detección} biotinilado optimizada en cada caso. (**Tabla 3A.3**)

Antígeno	Ab_{captura} (µg/mL)	Ab_{detección} biotina (µg/mL)
CEA	12	12
VEGF	2	1,5
CA 19.9	5	5

Tabla 3A.3: Concentración de los anticuerpos de captura y detección biotinilado óptimas y utilizadas para el desarrollo de inmunoensayo TermoLISA.

Las curvas de calibrado para los tres marcadores cancerígenos se muestran en la **Figura 3A.11**, de las cuales podemos extraer las propiedades analíticas del método TermoLISA en PBS que se compilan en la **Tabla 3A.4** junto con el ELISA colorimétrico y los valores biológicos de estos marcadores cuando la enfermedad está activa.

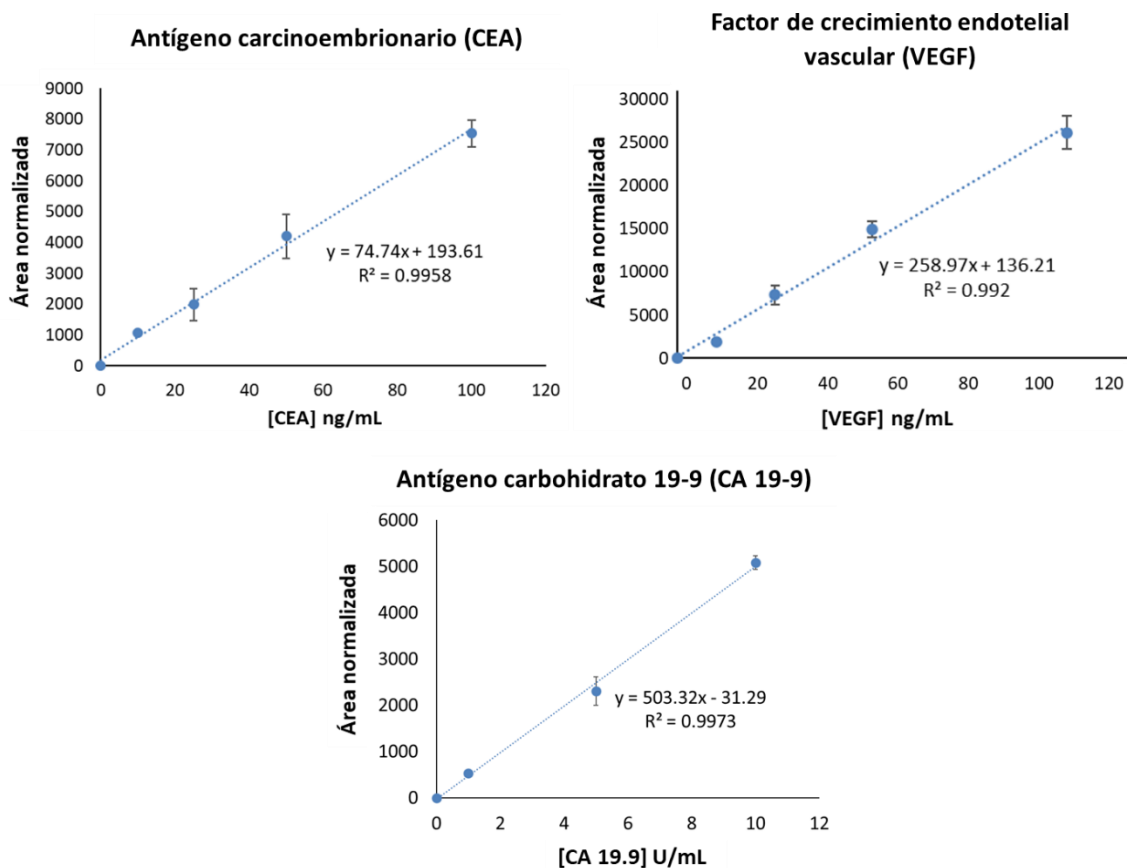


Figura 3A.11: Curvas de calibrado para los tres marcadores cancerígenos evaluados mediante la nueva metodología TermoLISA sándwich.

En el caso del CEA (valor de enfermedad activa > 5 ng/ml), el TermoLISA sí puede alcanzar los niveles necesarios de cuantificación (LC 3.01 ng/mL) que el ELISA colorimétrico (LC 18,58 ng/mL) utilizando la misma pareja de anticuerpos, no alcanza, con niveles de detección de incluso 0,91 ng/ml. En cuanto al límite de detección para el TermoLISA (LD 0.91 ng/mL), también mejora los obtenidos para el ELISA colorimétrico (LD 0,91 ng/mL).

Para la detección de VEGF (valor de enfermedad activa > 0,13 ng/ml), el TermoLISA mejora cuatro veces el límite de cuantificación (LC 1,88 ng/mL) respecto al ELISA colorimétrico (LC 4.76 ng/mL), sin embargo, ninguno de los dos métodos permite la cuantificación del valor de la enfermedad activa. A pesar de ello, el límite de detección para el TermoLISA (LD 0.56 ng/mL) está muy cerca del valor de la enfermedad activa y mejora el límite de detección obtenido para el ELISA colorimétrico (LD 1,42 ng/mL).

Por último, para la detección de CA19.9 (valor de enfermedad activa > 37 U/ml) los límites de cuantificación para ambos métodos son muy similares y en ambos casos ya están muy por debajo de la concentración de enfermedad activa. Para el ajuste lineal en la calibración de este analito, se han eliminado los valores de 50 y 100 U/mL, por observarse saturación de la señal.

Así, el nano-inmunoensayo TermoLISA desarrollado en al menos dos de los analitos diana se aumenta de forma considerable la sensibilidad con respecto al ELISA colorimétrico clásico y disminuye los límites de detección y cuantificación con valores bajos de DER. Además, el desarrollo de esta metodología, demuestra la capacidad de transducción de estos nanomateriales en ensayos biológicos, así como sus posibilidades en el desarrollo de biosensores térmicos.

CEA (ea > 5 ng/mL)*	Rango (ng/mL)	Sensibilidad	LD (ng/mL)	LC (ng/mL)	DER %
ELISA colorimétrico (PBS)	18,58 - 100	1,02	5,57	18,6	20,8
TermoLISA (PBS)	3,03 -100	74,6	0,91	3,03	11,6
TermoLISA (plasma)	3,56 -100	196	1,07	3,56	12,4
VEGF (ea > 0,13 ng/mL)*	Rango (ng/mL)	Sensibilidad	LD (ng/mL)	LC (ng/mL)	DER %
ELISA colorimétrico (PBS)	4,76 - 100	3,11	1,42	4,76	12,1
TermoLISA (PBS)	1,88 - 100	259	0,56	1,88	10,5
TermoLISA (plasma)	4,10 -100	173	1,23	4,10	14,1
CA19,9 (ea >37 U/mL)*	Rango (U/mL)	Sensibilidad	LD (U/mL)	LC (U/mL)	DER %
ELISA colorimétrico (PBS)	0,42 -50	6,23	0,13	0,42	8,37
TermoLISA (PBS)	0,60 -50	545	0,18	0,60	9,22
TermoLISA (plasma)	2,77 -50	344	0,83	2,77	11,2

*ea: valor a partir del cual se considera enfermedad activa

Tabla 3A.4: Características analíticas del método TermoLISA sándwich para la detección de CEA, VEGF y CA 19.9 en PBS y en plasma, en comparación con las características analíticas del método ELISA colorimétrico clásico.

3A.4.6. Aplicación del método TermoLISA sandwich a la detección de marcadores de cáncer gastrointestinal en plasma.

Con el fin de estudiar los posibles efectos de la matriz en el análisis de estos marcadores cancerígenos en muestras de plasma sanguíneo humano mediante la metodología TermoLISA, se evaluaron los mismos rangos de antígenos en esta matriz. Para ello es importante conocer la composición del plasma sanguíneo y las proteínas que lo componen, que pueden causar inespecificidad o aumentar la señal de fondo. (**Figura 3A.12**)

Matriz: plasma sanguíneo humano

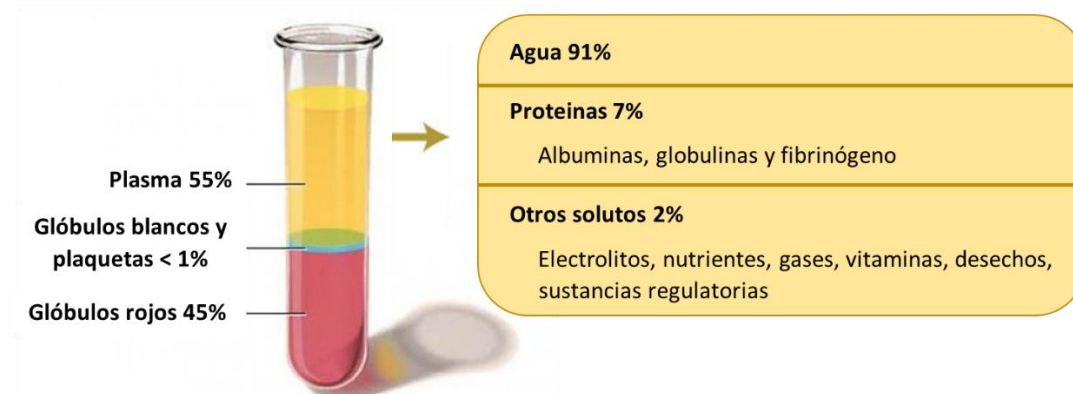


Figura 3A.12: Composición del plasma sanguíneo humano.

Mediante el análisis TermoLISA, se obtuvieron las señales térmicas por triplicado para cada analito (**Figura 3A.13**) de las cuales se extrajeron para cada caso el área normalizada bajo la curva de variación de temperatura en el tiempo de irradiación laser. Representando estas áreas frente a la concentración del marcador analizada se obtuvieron los gráficos de calibración en plasma a partir de los cuales se obtuvieron las propiedades analíticas del método TermoLISA aplicado en plasma, mostradas en la **Tabla 3A.4**, junto con las obtenidas para el método aplicado en PBS y en comparación con el ELISA colorimétrico clásico.

Para la detección de CEA, se observa una mayor pendiente en el caso del plasma, prácticamente el doble (195,76 en plasma frente a 74,56 para la muestra en PBS). Sin embargo, las señales térmicas en plasma muestran un aumento en la temperatura máxima del blanco, lo que finalmente supone LD y LC muy similares a los obtenidos en PBS. Este aumento en la señal de fondo (y por tanto en la pendiente), puede ser debido a interacciones inespecíficas de los AuNPRs del bioconjugado AuNPRs@estreptavidina@Ab_{det_biotina_antiCEA} con la BSA del plasma (que a su vez, puede adsorberse a las placas si el bloqueo no es completo). La densidad de carga de los AuNPRs es diferente en cada bioconjugado y depende entre otros factores, de la pI del anticuerpo de detección. Por ello, es posible que, en este caso, ocurra una adsorción inespecífica de los AuNPRs a la base del pocillo, no observada en los otros bioconjugados.

Para los antígenos VEGF y CA 19.9, la metodología TermoLISA muestra, sin embargo, sensibilidades algo menores en su aplicación en plasma y límites de detección y cuantificación algo más altos pero similares a los obtenidos en PBS.

Sección 3A: Nano-inmunoensayo térmico (TermoLISA) para la detección de marcadores cancerígenos gastrointestinales

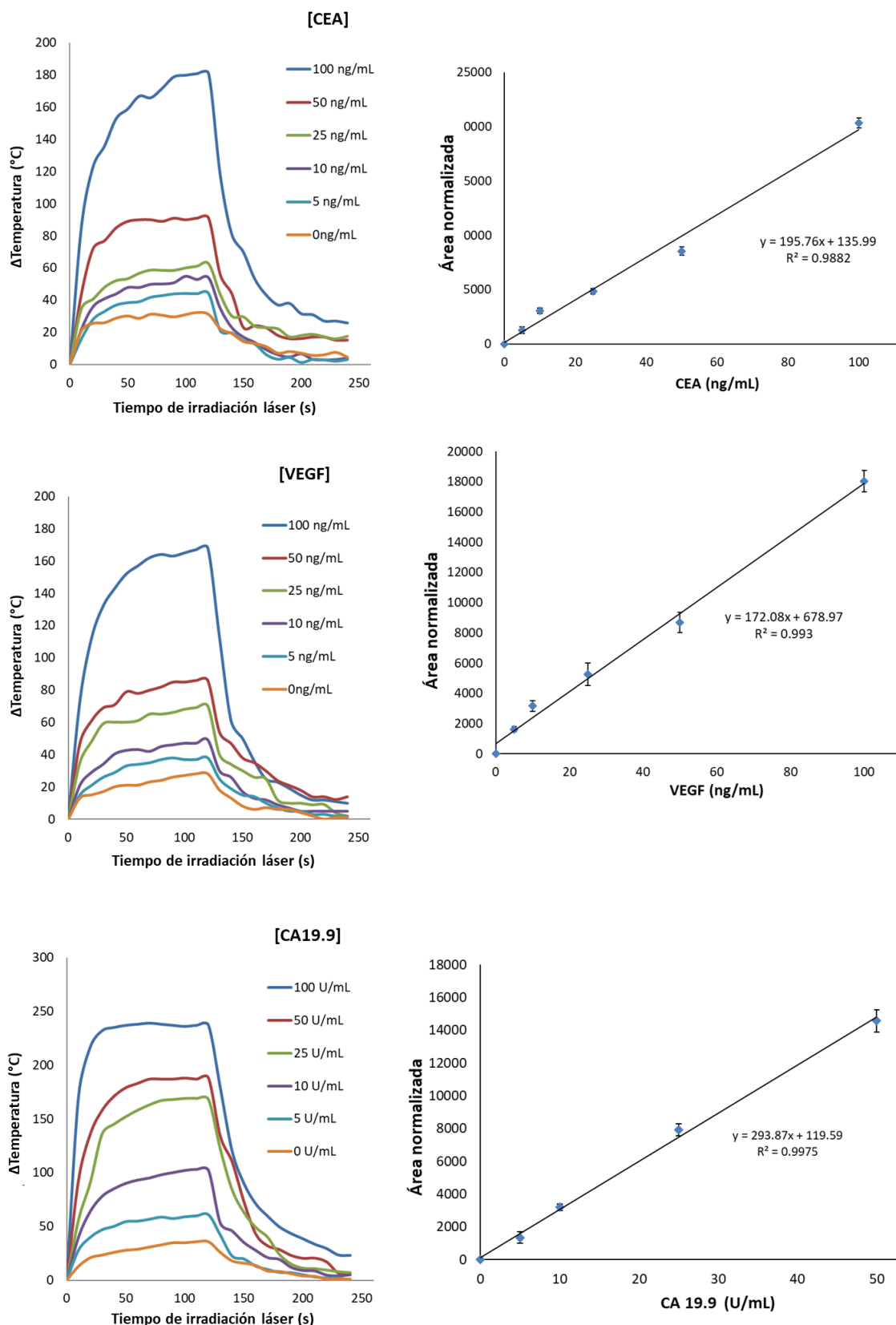


Figura 3A.13: Señales térmicas y rectas de calibrado obtenidas del análisis cuantitativo TermoLISA de antígeno carcinoembrionario (CEA), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y antígeno de carbohidrato (CA 19.9) en muestras de plasma humano.

Cabe destacar que los resultados obtenidos en plasma fueron realizados con otro lote de AuNPrs y bioconjugados nuevos, respecto a los usados en la calibración del método en PBS (*apartado 3A.4.5*). La similitud de los resultados obtenidos en ambas calibraciones resalta la reproducibilidad de la metodología desarrollada.

Así, el inmunoensayo TermoLISA desarrollado es capaz de disminuir, en algunos casos, los límites de detección y cuantificación respecto al ELISA colorimétrico, siendo aplicado con éxito en muestras de plasma sin interferencias de la matriz. Estos resultados muestran, además, la gran eficiencia de la etiqueta termica con respecto a la etiqueta enzimática; ambos métodos compiten en sensibilidad de igual a igual, sin embargo, en el TermoLISA, hay muchos menos prismas por anticuerpo de detección que moléculas de HRP en el ELISA.

Además, se trata de una metodología robusta y versátil, ya que es fácilmente adaptable a la cuantificación de cualquier marcador cancerígeno, mediante la unión del bioconjugado AuNPrs@streptavidina con el anticuerpo de detección biotinilado en cada caso.

3A.5. Conclusiones específicas de la sección 3A

En esta sección se ha optimizado el desarrollo de un nuevo nano-inmunoensayo térmico (TermoLISA) para la detección de marcadores de cáncer gastrointestinal, extrayéndose las siguientes conclusiones:

1. Se ha llevado a cabo la optimización del montaje experimental, parámetros de medida térmica y tratamiento de las señales térmicas para así obtener las características analíticas del método.
 - Se ha seleccionado el factor de emisividad amplificador (ϵ) 0,1.
 - Se han seleccionado los tiempos de irradiación para la lectura del inmunoensayo registrando la imagen térmica durante los 2 minutos de irradiación láser (ciclo de calentamiento) y 2 minutos después de la irradiación cuando el láser está apagado (ciclo de enfriamiento). En todos los casos, el haz láser NIR de 1064 nm opera a una potencia de salida de 2,5 W
 - Se ha llevado a cabo el análisis de la señal analítica térmica mediante diversos métodos, observándose que el tratamiento de las áreas, además de aportar una información global de la señal, permite evaluar un mayor rango de detección con mayor sensibilidad.
2. Se ha optimizado el protocolo del inmunoensayo TermoLISA mediante la optimización del bioconjugado AuNPrs@streptavidina y la evaluación de la unión del Ab_{det_biotin} a este bioconjugado para cada marcador cancerígeno.
 - Se ha seleccionado como concentración óptima de estreptavidina añadida 12 $\mu\text{g/ml}$, concentración intermedia entre las dos óptimas observadas en las medidas de radioactividad, 10 y 15 $\mu\text{g/mL}$ (apartado 3.3.3).
 - Se han seleccionado las concentraciones de Ab_{det_biotin} que proporcionan mayor sensibilidad para cada marcador cancerígeno CEA, VEGF y CA19.9; 12, 1,5 y 5 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente.
3. Se han evaluado los parámetros analíticos del método utilizando muestras de los tres analitos preparadas con concentraciones conocidas en PBS, obteniéndose LD, LC y DER% para la detección de cada marcador evaluado.
4. Por último, con las condiciones optimizadas se ha estudiado la aplicación del método TermoLISA en muestras de plasma sanguíneo humano a las que se les añadieron concentraciones analito conocidas para evaluar posibles interferencias de matriz.

Los resultados obtenidos han verificado no sólo la capacidad de amplificación de AuNPrs como transductores térmicos en ensayos cuantitativos, sino también han reconocido el valor diagnóstico de esta metodología en sí misma. Así, se ha demostrado que el método TermoLISA aumenta de forma considerable la sensibilidad con respecto al ELISA colorimétrico clásico y disminuye los LD y LC con bajos RSD. El método se ha aplicado con éxito en muestras de plasma sin interferencias de la matriz.

Además, el desarrollo de esta metodología, demuestra sus posibilidades en el desarrollo de biosensores térmicos ultrasensibles, por lo que estos resultados han permitido establecer las bases para el desarrollo del inmunoensayo de flujo lateral TermoLFIA. (Sección 3C)

Sección 3B

Nano-inmunoensayo térmico de
fluorescencia resuelta en el tiempo
(TermoTRFIA) para la detección de
exosomas

3B.1. Introducción

La metodología TermoLISA desarrollada en la sección 3A, demostró un aumento en la sensibilidad con respecto al ELISA colorimétrico clásico y disminuyó los límites de detección y cuantificación, además estos resultados aseguraron la capacidad de transducción de los nanoprismas de oro (AuNPrs) en ensayos biológicos, así como las posibilidades en su aplicación al desarrollo de biosensores. Sin embargo, la metodología TermoLISA requiere de sensores térmicos (cámara infrarroja o resistencias térmicas) para cuantificar la señal térmica, una tecnología de lectura clínica no estándar hasta el momento. En base a esta problemática y para facilitar la implementación de la metodología TermoLISA en distintos entornos, se planteó evaluar la combinación de las propiedades térmicas de los AuNPrs y la detección fluorescente, con el fin de poder transferir los cambios de calor a la señal de fluorescencia, una tecnología estándar en el ámbito clínico. Así, la motivación final de este trabajo se basó en la aplicación de este posible acoplamiento de detección térmico-fluorescente en el desarrollo de inmunoensayos.

Para este objetivo, se realizó una estancia de investigación de 3 meses en el Centro Médico Erasmus de Rotterdam (Países Bajos) en colaboración con el grupo del Dr. Guido Jenster del Departamento de Urología, aprovechando su experiencia en el desarrollo de inmunoensayos ELISA y fluorescencia resuelta en el tiempo (TR-FIA)⁴³, así como su amplio conocimiento respecto a la detección de cáncer de próstata (PCa) basada en el uso de vesículas extracelulares (EV) en orina, como marcadores de este tipo de tumor.⁴⁴⁻⁴⁸

Esta investigación responde al desafío que propone en la actualidad la detección precoz, específica y no invasiva del cáncer de próstata, causante de más de 70.000 muertes en Europa cada año. Así, el objetivo consistió en el desarrollo de una metodología de diagnóstico simple y accesible a centros médicos y pacientes, potencialmente sensible a la detección de vesículas extracelulares como biomarcadores de cáncer de próstata.

Las vesículas extracelulares derivadas de tumores han surgido en los últimos años como una interesante alternativa de biomarcadores en biopsias líquidas⁴⁹, consideradas también una alternativa menos invasiva frente a las biopsias de tejido convencionales para el cáncer.⁵⁰

Se ha comprobado que las EV median en la comunicación intercelular y juegan un papel importante en una gran variedad de procesos normales y patológicos, incluido el cáncer. Contienen moléculas altamente específicas relacionadas con tumores, y pueden ser cuantificados en una gran variedad de fluidos biológicos (sangre periférica y orina) y ser útiles para la detección de cáncer y seguimiento de la progresión tumoral.⁵¹

La definición amplia de vesícula extracelular se refiere a todos los tipos de vesículas liberadas de las células que están encerradas por una bicapa lipídica y no pueden replicarse.⁴⁴ Las EV contienen una gran variedad de moléculas, incluidas proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y metabolitos. Según su biogénesis, se han definido tres subtipos principales de EV: exosomas, microvesículas (también llamadas ectosomas, desprendimiento de vesículas o micropartículas) y apoptóticas⁵². Los exosomas corresponden a las vesículas intraluminales de cuerpos multivesiculares que se liberan de las células después de la fusión de la membrana limitante de estos orgánulos con la membrana plasmática, la mayoría de ellos con tamaños de entre 30 y 150 nm de diámetro.⁵³ Los marcadores cancerígenos de exosomas más comunes incluyen

Sección 3B: Nano-inmunoensayo térmico de fluorescencia resuelta en el tiempo (TermoTRFIA) para la detección de exosomas.

tetraspaninas (CD9, CD63 y CD81), flotilina-1, integrinas, complejo principal de histocompatibilidad (MHC) I y II, Hsp70, TSG101 y Alix. Los exosomas también contienen otras proteínas, diferentes especies de ARN y ADN.⁵⁴ (**Figura 3B.1**)

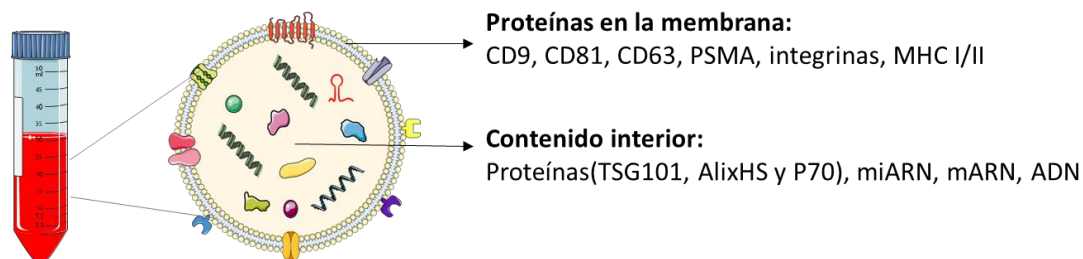


Figura 3B.1: Exosomas extraídos por biopsia líquida, biomarcadores canónicos en la membrana y en el contenido exosomal.

En los últimos años se han realizado grandes esfuerzos dedicados al desarrollo biosensores de análisis de EV basados en microfluídica y en el uso de nanomateriales, sin embargo, la mayoría de estas plataformas son solo pruebas conceptuales que no tienen cabida aún en el mercado.

En la bibliografía se pueden encontrar descritos multitud de biosensores con aplicaciones biomédicas basados en las propiedades ópticas, electrónicas o magnéticas de nanopartículas⁵⁵ como; LSPR de AuNP, la fluorescencia de nanotubos de carbono (CNT) o QD, o las propiedades magnéticas de las nanopartículas magnéticas (MNP). El uso de NPs ha permitido así, el desarrollo de dispositivos con mayor sensibilidad y límites de detección más bajos.

En particular, los biosensores basados en fluorescencia para la detección de EVs, utilizan nanopartículas o sondas fluorescentes funcionalizadas con un elemento de reconocimiento (anticuerpos o aptámeros) y relacionan los cambios en la intensidad de fluorescencia o la longitud de onda que se produce como consecuencia de la interacción de las sondas fluorescentes con el analito. De esta forma es posible cuantificar específicamente el analito correlacionando los cambios en la fluorescencia con la concentración inicial.^{56,57} Los ensayos tradicionales para la identificación de EV mediante técnicas fluorescentes se basan en inmunoensayos tradicionales como ELISA y Western blot, donde los anticuerpos están acoplados a fluoróforos orgánicos.⁵⁸ La combinación de estos métodos con las características propiedades de algunos nanomateriales, permiten mejorar los límites de detección e incluso permitir la detección individual de una sola molécula. La **Tabla 3B.1** muestra ejemplos de algunos de los nanobiosensores fluorescentes desarrollados en los últimos años para la detección de exosomas, en ella se ha detallado el límite de detección de cada metodología, el tipo de nanomaterial utilizado, la proteína de membrana exosomal que se utiliza como diana, la biomolécula de detección empleada, el origen o la línea celular de los EVs utilizados y la necesidad o no de purificación previa de los exosomas.

Sección 3B: Nano-inmunoensayo térmico de fluorescencia resuelta en el tiempo (TermoTRFIA) para la detección de exosomas.

Nanomaterial	Diana	Biomolécula de detección	Origen de los EVs	Purificación previa EVS	LD	Ref
Microesferas magnéticas y CuO NPs	CD63	colesterol (biomarcador de membrana) y apt (anti-CD63)	Línea celular de cáncer de hígado humano (HepG2)	SI (separación magnética, exoEasy Maxi Kit)	5×10^7 exosomas/mL	59
			Suero humano (individuos sanos y pacientes con cáncer)	NO	4.8×10^7 exosomas/mL	
AuNP	CD63	Apt	Línea celular de cáncer de hígado humano (HepG2)	NO	10^8 exosomas /mL	60
Lanthanide chelate-doped polystyrene beads	CD9, CD81, y CD63	Abs y lectinas	Línea celular de cáncer de próstata humano (LNCaP)	SI (UC)	0.03 ng /mL	61
Polydiacetylene liposomes	CD63	Ab	Plasma humano (HansaBioMed Life Science)	SI (UC)	3×10^8 exosomas/mL	62
MoS ₂ -MWCNT	CD63	Ab	Línea celular de cáncer de mama (MCF-7)	SI (TEIRy UC)	1.48×10^6 exosomas/mL	63
GO	CD63 y EpCAM	Apt	Línea celular de cáncer colorrectal humano (SW480)	SI (UC)	2.1×10^7 exosomas/mL	64
s-SWCNTs	CD63	Apt	Línea celular de cáncer de mama (MCF-7)	SI (UC)	5.2×10^8 exosomas/mL	65
GO	CD63, EpCAM, PTK-7, PSMA, PDGF, CEA, AFP	Apt	Línea celular de cáncer de mama (MCF-7), células de cáncer cervical (HeLa), línea celular de cáncer gástrico (SGC7901), línea celular de cáncer de hígado humano (HepG2), línea celular epitelial mamaria humana (MCF-10A)	SI (UC)	1.6×10^5 exosomas /mL	66
MXene Nanosheets	CD63	Apt	Línea celular de melanoma (B16), línea celular de cáncer de mama (MCF-7), línea celular de carcinoma de ovario humano (OVAR-3) y línea celular de cáncer de hígado humano (Hep G2)	SI (UC)	1.4×10^3 exosomas /mL	67
AuNRs-UCNPS (paper)	CD63	Apt	Línea celular de cáncer de hígado humano (HepG2)	SI (UC)	1.1×10^6 exosomas/mL	68
UCNPs	EpCAM	Apt	Cáncer de mama (MDA-MB-231)	SI (UC)	8×10^4 exosomas/mL	69

Tabla 3B.1: Ejemplos recogidos en bibliografía de algunos de los biosensores basados en fluorescencia y nanomateriales para la detección de EVs desarrollados en los últimos tres años. GO= oxido de grafeno; MWCNT= nanotubos de carbono de paredes múltiples; s-SWCNTs= nanotubos de carbono de pared simple acortados; MXene = $M_{n+1}X_nT_x$ ($n = 1, 2, 3$), donde M representa al metal de transición, X representa carbon y/o nitrogeno, and T_x denota los grupos funcionales en la superficie como -O, -OH, o -F; AuNRs = nanorods de oro; UCNPS= NPs upconversion; Ab = anticuerpo; Apt = aptámero; UC = ultracentrifugación; TEIR: reactivo de aislamiento de exosoma total; Equivalencia $80 \text{ ng/mL} \approx 7 \cdot 10^7$ exosomas /mL⁷⁰.

Sección 3B: Nano-inmunoensayo térmico de fluorescencia resuelta en el tiempo (TermoTRFIA) para la detección de exosomas.

Algunos de estos métodos se basan en inmunoensayos absorbentes, derivados de los ensayos de proteínas inmunoabsorbentes ligados a enzimas clásicos (ELISA), donde, los EVs por lo general se capturan en una superficie recubierta con un anticuerpo dirigido a proteínas de superficie comunes en exosomas, como las tetraspaninas CD63, CD9 o CD81.⁴⁸ Posteriormente, las proteínas de membrana de interés, presentes en la superficie de los EV capturados, se detectan utilizando anticuerpos dirigidos al mismo epítipo de la misma proteína u otras proteínas específicas de la superficie EV. En ocasiones, la obtención de muestras de exosomas puros conlleva la aparición de proteínas solubles contaminantes (por ejemplo, fragmentos de proteínas diana utilizada para su captura), por ello es muy común utilizar un esquema de biosensor donde el biomarcador usado para la captura sea diferente del usado para la detección. De esta manera se asegura el detectar exosomas y no fragmentos solubles del biomarcador usado para su captura o restos de membrana celular. Los anticuerpos de detección suelen estar marcados con un fluoróforo utilizado para la detección de los EV capturados en un ensayo fluoróforo-unido inmunoabsorbente (FLISA) o inmunoensayo de fluorescencia resuelta en el tiempo (TRFIA)⁷¹. Cabe destacar que este último tipo de ensayo, permite solventar algunos de los problemas de los fluoroinmunoensayos convencionales, limitados por la fluorescencia de fondo residual producida por la unión no específica de los fluoróforos a determinados componentes del ensayo o derivados de la propia configuración del equipo, tales como los propios anticuerpos, plásticos, lentes, espejos...etc. Así, la fluorometría resuelta en el tiempo permite distinguir la señal de fondo residual mediante la resolución temporal, es decir, la fluorescencia no es medida inmediatamente después de la excitación del compuesto fluorescente, sino tras un cierto tiempo que permite excluir las señales de fondo de corta duración.

La emisión de fluorescencia resuelta en el tiempo de compuestos de Europio (Eu) es una de las más utilizadas, ya que da como resultado altos niveles de sensibilidad, debido a que los quelatos de este lantánido (Europio (III), Eu^{3+}) poseen una vida media larga y muestran una emisión de larga duración, con un tiempo de decaimiento más largo. Esto permite la implementación de un breve retraso en la detección de la señal después del pulso de excitación (unos 400 microsegundos en el caso de estos compuestos) lo que elimina la fluorescencia de fondo no específica de corta duración y hace a estos quelatos ideales para su aplicación en este tipo de inmunoensayo fluorescente altamente sensible.⁷² Este método ha sido aplicado con muy buenos resultados para la detección de exosomas por el Dr. Guido Jenser, con cuya colaboración se planteó el desarrollo de la nueva metodología TermoTRFIA abarcada en esta sección, que tiene como objetivo combinar la detección fluorescente de la técnica TRFIA y las propiedades de transducción térmica de los AuNPrs, para desarrollar así un nuevo método de mayor sensibilidad.

La técnica TRFIA para la detección de exosomas inicialmente desarrollada por el grupo holandés, utilizaba anticuerpos como elementos de detección, que después eran reconocidos por un anticuerpo secundario marcado con europio.⁴³ (**Figura 3B.2**) Este método muestra su mayor sensibilidad usando como anticuerpo de detección CD9 frente a EVs purificados de la línea celular VCaP, permitiendo en este caso la detección de EVs en una concentración mínima de 23,5 ng/mL equivalente a $2 \cdot 10^7$ exosomas/mL. Este método, sin el uso de nanomateriales es capaz de alcanzar sensibilidades semejantes a formatos de detección más complejos donde se combinan varios tipos de materiales diferentes con etapas de preconcentración antes de la detección. Además, otra ventaja de esta metodología es que no necesita purificación previa y los exosomas son detectados directamente en el medio de cultivo con exosomas.

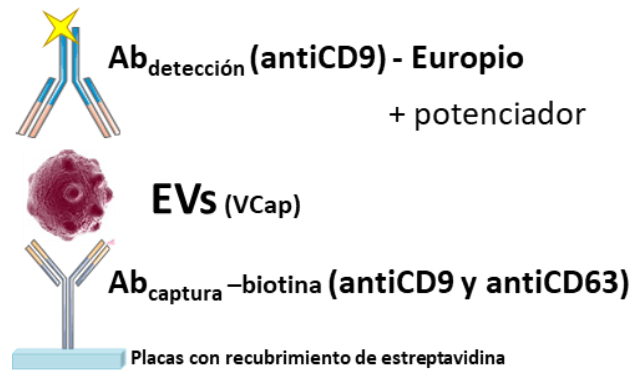


Figura 3B.2: Esquema del ensayo TRFIA inicial desarrollado por el grupo del Dr. Jensen basado en la fluorescencia de Europio para la detección de exosomas.

Sin embargo, con el fin de mejorar más la sensibilidad de este esquema de detección, se pensó en implementar dos nuevas tecnologías: i) cambiar el elemento biológico de detección (**Figura 3B.3A**) y ii) introducir nanoprismas de oro como etiquetas térmicas que permitan aumentar la sensibilidad de la detección fluorescente debido a cambios en la intensidad de fluorescencia del europio por cambios de temperatura desencadenados de forma remota con un láser (**Figura 3B.3B**).

Este esquema de detección mejorado (**Figura 3B.3A**) utiliza la misma mezcla de anticuerpos de captura CD9/CD63 que el método antiguo, pero tras la adición de la muestra conteniendo EVs, se pretende usar bacteriófagos M13 expresando nanobodies (Nb) anti-CD9 como nuevos elementos de detección de exosomas en lugar de los clásicos anticuerpos. Por último, un anticuerpo secundario anti-M13 marcado con Europio, actúa como sonda fluorescente. Al igual que en el esquema de detección inicial, la adición de un potenciador, produce la apertura del quelato de europio y liberación del mismo, permitiendo medir su fluorescencia intensificada resuelta en el tiempo y relacionar así esta con la concentración fagos y por tanto de EVs capturados.

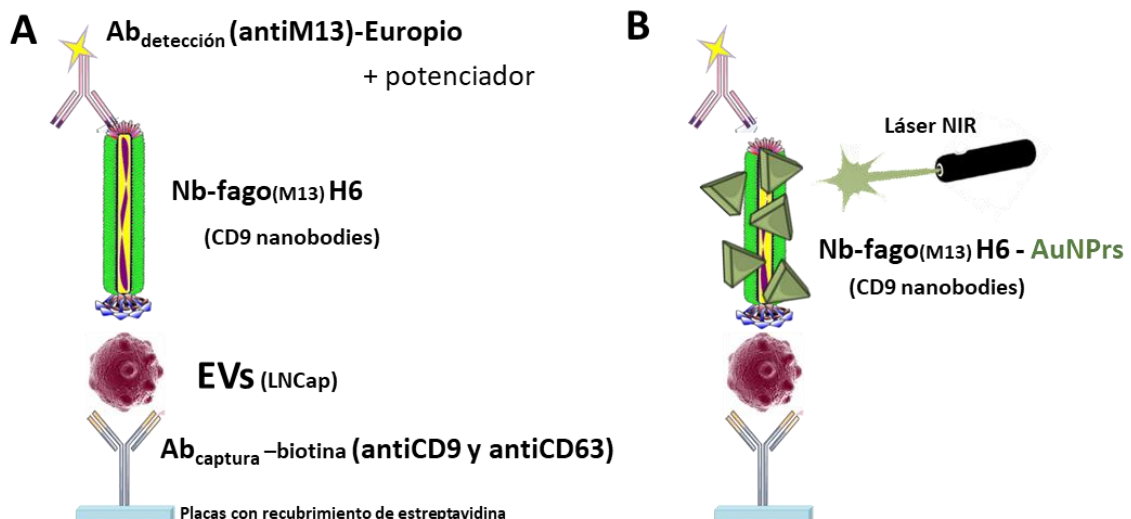


Figura 3B.3: A) Esquema del ensayo TRFIA mejorado propuesto basado en la fluorescencia de Europio para la detección de exosomas que utiliza la tecnología de expresión de nanobodies en bacteriófagos como elemento de detección **B)** Esquema del ensayo TermoTRFIA basada en el

Sección 3B: Nano-inmunoensayo térmico de fluorescencia resuelta en el tiempo (TermoTRFIA) para la detección de exosomas.

acoplamiento a esta tecnología del uso de AuNPrs para promover el intercambio de energía AuNPrs-Europio para la detección de exosomas.

Los nanobodies son fragmentos de unión a antígeno de dominio único derivados de los anticuerpos de la cadena pesada de los camélidos, teniendo apenas unos nanómetros de longitud y especiales propiedades como su alta afinidad y estabilidad. Los Nbs más pequeños presentan un peso molecular de 15 kDa frente a los 150 kDa de los IgG convencionales o sus fragmentos Fab correspondientes (55 kDa). Algunas de sus características morfológicas son su forma alargada, que crea un paratopo convexo capaz de interactuar más profundamente en las superficies cóncavas del antígeno y su pequeño tamaño, que se traduce a una mayor cantidad de estos sitios de reconocimiento por densidad de área. Estas características aumentan la afinidad de la construcción nanobodies-bacteriófago comparada con la del anticuerpo anti-CD9 convencional. Esto sumado al hecho que varios anti-M13 modificados con europio pueden unirse a la superficie del fago, debería resultar en un aumento de la sensibilidad que permita mejorar los límites de detección.⁷³

Además, otra ventaja del uso los Nbs frente al uso de anticuerpos, es que se pueden producir a gran escala con buenos rendimientos. Existen multitud de bibliotecas que contienen la información genética requerida producir Nbs con alta especificidad y afinidad. Las bibliotecas inmunológicas son la opción más común para la producción de Nbs y requieren una inmunización activa de camélidos como las llamas. Una vez que se selecciona la secuencia específica esta se amplifica e inserta en un vector de clonación. El proceso de selección más adecuado para aislar el Nbs se realiza aprovechando la tecnología de expresión en fagos, insertando los diferentes fragmentos en un vector de clonación de fagémidos.⁷⁴ Se trata de un método de rápida producción con un bajo costo (**Figura 3B.4**).

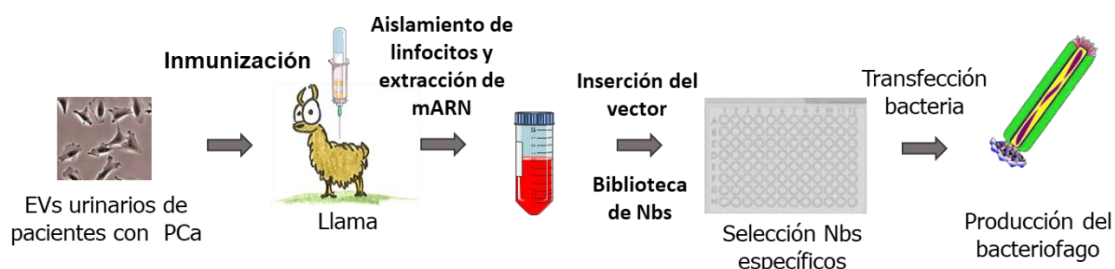


Figura 3B.4: Procedimiento de selección y obtención de nanobodies utilizando la tecnología de expresión en fagos.

Partiendo de este formato de detección, la nueva metodología TermoTRFIA planteada, tiene como objetivo combinar la detección fluorescente y térmica (**Figura 3**), promoviendo el intercambio de energía AuNPrs-Europio mediante la unión directa de AuNPrs al fago. Este método se desarrolló, sobre la base de los resultados TermoLISA obtenidos en la sección 3A, donde al irradiar con un láser los pocillos del inmunoensayo, es posible detectar subidas de temperatura global, mediante una cámara de infrarrojo, asociadas a la cantidad de EVs presentes en la muestra. Así, la nueva hipótesis consistió en la posibilidad de medir la variación de la fluorescencia del europio debida al calor emitido por AuNPrs durante la irradiación láser, ya que como se observa en la **Figura 3B.5**, variaciones en la temperatura afectan a la fluorescencia del Europio (615 nm), reduciéndola de forma proporcional⁷⁵.

Este efecto es posible debido a que la eficacia cuántica de la fluorescencia del europio disminuye con el aumento de la temperatura, así, un aumento de la frecuencia de las colisiones a altas temperaturas, aumenta la probabilidad de desactivación no radiante (conversión externa). En este sentido, gran variedad de fluoróforos han sido usados en bibliografía como termómetros ópticos basados en cambios en la intensidad de fluorescencia debido a sus ventajas incomparables como la sensibilidad espacial y alta resolución sin contacto, así como la respuesta rápida.⁷⁶⁻⁷⁹ Sin embargo, nunca se ha utilizado hasta el momento esta propiedad para el desarrollo de métodos de detección de alta sensibilidad como el que se propone en esta sección.

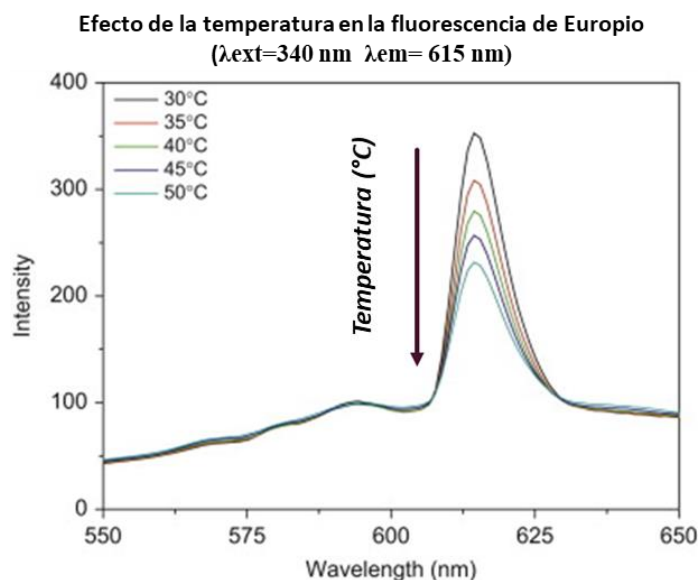


Figura 3B.5: Variación de la fluorescencia del Europio en función de la temperatura ⁷⁵.

El desarrollo del nuevo inmunoensayo propuesto se dirigió a la detección de exosomas provenientes de cáncer de próstata, dentro del proyecto europeo (Exploitation of extracellular vesicles for precision diagnostics of prostate cancer. PROSCANEXO) en el que tanto el grupo del Dr. Jensen como el nuestro participan. Es por ello que en la librería de fagos del laboratorio del Dr. Jensen, se contaba con fagos capaces de reconocer biomarcadores de PCa de membrana específicos (PSMA y CD9). En concreto en las pruebas realizadas en esta sección se usó el fago H6 específico para la proteína de membrana CD9.

3B.2. Objetivos

El objetivo principal en esta sección consiste en el desarrollo y optimización de un nano-inmunoensayo térmico de fluorescencia resuelta en el tiempo (TermoTRFIA) para la detección de exosomas de cáncer de próstata.

Para alcanzar este objetivo global se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Estudio de la interacción del Europio con las nanopartículas plasmónicas (AuNPrs) y evaluación de su capacidad transductora térmico-fluorescente.
2. Desarrollo de la tecnología TermoTRFIA basada en el uso de fago-nanobodies como elementos de detección, para lo cual es necesaria la optimización de parámetros tales como: concentración de fago-Nbs, unión covalente de AuNPrs al fago, evaluación comparativa de uso de AuNPrs unidos al fago y/o libres en disolución, modo de irradiación láser y lectura del ensayo fluorescente, tiempos de irradiación láser y tiempo de medición de la intensidad de fluorescencia.
3. Evaluación de la tecnología TermoTRFIA en la detección específica de EVs de cáncer de próstata mediante la determinación de los parámetros analíticos del método.

3B.3. Experimental y métodos:

3B.3.1. Producción y aislamiento de bacteriófagos M13 H6:

Preparación de células de E. Coli competentes

En primer lugar, se llevó a cabo la preparación de células competentes de *E. Coli* TG1. Las células bacterianas crecen durante la noche en el medio SOB (Super Optimal Broth) a una baja temperatura (23°C en lugar de 37°C) antes de que la transformación tenga lugar. Al día siguiente, cuando la densidad óptica (OD_{600 nm}) del cultivo alcanzó 0,55 unidades, las células fueron transferidas a un baño de hielo e incubadas durante 10 minutos. Finalmente, las células TG1 fueron recogidas por centrifugación a 2400 g durante 10 minutos a 4°C y resuspendidas en la disolución amortiguadora de transformación Inoue a temperatura de 4 °C (55 mM MnCl₂, 15 mM CaCl₂, 250 mM KCl, 10 mM PIPES). Finalmente, las células fueron fraccionadas en alícuotas en Inoue con DMSO (10:1) y almacenadas a -80°C.

Transfección con el fago

En este punto se llevó a cabo la coinfección de las células competentes con un 'helperphage', un fago que porta el genoma WT M13 con ΔpIII y proporciona resistencia a la kanamicina, para una fácil selección. Así, la producción del bacteriófago H6 (específico para la proteína CD9) se llevó a cabo mediante el cultivo de bacterias con el vector Nb H6 hasta adquirir una OD de 0.5-0.8 a 600 nm. Para esto se agregaron 200 μL de Nb-vector H6 en 50 ml de bacterias y se incubó a 37°C - 270 rpm, verificando su OD cada hora (tiempo total 2-3 h) Una vez alcanzado el valor OD 0,5, se agregaron 50 μL del hiperfago M13 y se incubaron a 37°C -270 rpm durante 30 min. Después, la mezcla se centrifugó a 4000 rpm durante 10 min y se retiró el sobrenadante. El sedimento bacteriano se resuspendió en 10 ml de TAK (2 xTY, 100 μL ampicilina y 25 μg/mL kanamicina). Se prepararon dos Erlenmeyer de 500 mL con 200 mL de TAK y a cada uno de añadieron 5 mL del sedimento bacteriano resuspendido y se dejó incubando durante la noche a 30°C a 270 rpm.

Aislamiento del fago

Una vez finalizado el crecimiento y obtenido los fagos, se llevó a cabo el aislamiento de los mismos. Se agregaron 40 mL en cada tubo falcon de 50 mL y se centrifugaron 30 min a 4200 rpm, para eliminar las bacterias TG1. Se transfirió el sobrenadante y se añadió 1/5 parte del volumen de solución de PEG (20% de PEG₆₀₀₀, NaCl 2.5 M), añadiéndose así 10 ml de PEG en 40 ml. Los fagos se dejaron en hielo durante 1 h para permitir la precipitación y se concentraron por centrifugación (30 min, 4000 rpm). Los fagos se resuspendieron en 1 ml de DPBS y la solución se centrifugó (2 min, 14000 rpm) para eliminar las bacterias restantes, y el sobrenadante se filtró a través de un filtro estéril de 0,45 μm.

Valoración del fago

Para determinar la concentración de los fagos precipitados se llevó a cabo una valoración de los mismos. Para ello se realizaron diluciones seriadas de los fagos aislados por debajo de 10⁻¹⁰ (10⁻⁶ 10⁻⁸ 10⁻⁹ 10⁻¹⁰). Para ello, las células *E. Coli* TG1 se crecieron hasta alcanzar un OD de 0,5 y se infectaron con los fagos diluidos (500 uL:500 uL) en un vial de 2 mL durante una hora a 37°C. Entonces, 100 μL de las muestras TG1 infectadas se depositaron en placas 2xTY conteniendo 25 μg/mL de kanamicina y se dejaron crecer durante la noche a 37°C. Las colonias fueron contadas

Sección 3B: Nano-inmunoensayo térmico de fluorescencia resuelta en el tiempo (TermoTRFIA) para la detección de exosomas.

al día siguiente (**Figura 3B.6**) para determinar las unidades de formación en placa por mililitro (pfu/mL) según la siguiente fórmula:

$$\frac{pfu}{mL} = n^{\circ} \text{ de colonias } (n) \times \frac{1}{\text{dilución}} \times 20$$

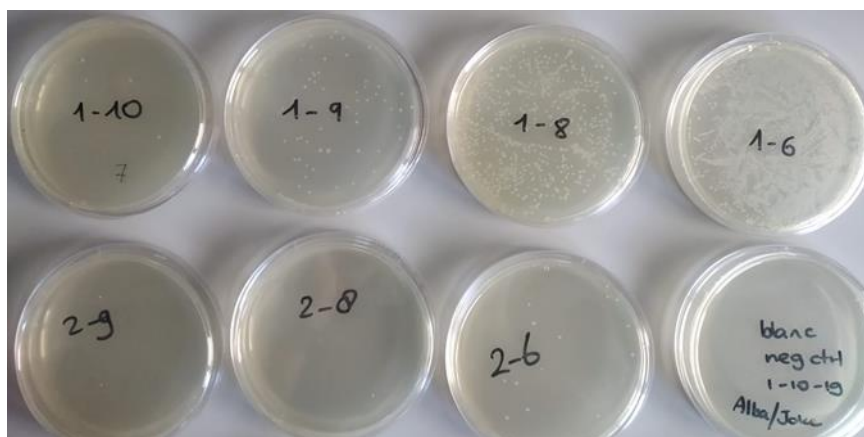


Figura 3B.6: Placas 2xTY con las colonias formadas tras la incubación durante la noche de células TG1 infectadas por los fagos obtenidos.

3B.3.2. Unión covalente de AuNPrs a los bacteriófagos H6:

El marcaje de los fagos con AuNPrs fue realizado vía química de la carbodiimida, con el fin de unir los carboxilos terminales de los AuNPrs con los aminos de proteínas de la cápside del fago. Para ello en primer lugar, 0,5 mg/mL de AuNPrs se activaron con una mezcla de sulfo NHs $7 \cdot 10^{-3}$ M y EDC $3 \cdot 10^{-3}$ M (en MES 100 mM pH 6). Así, 500 μ L de esta mezcla se añadieron sobre los 500 μ L de AuNPrs 0,5 mg/L y se agitó durante 30 min a temperatura ambiente. Tras centrifugar los prismas durante 9 min a 9000 rpm se eliminó el exceso de mezcla reactiva quitando el sobrenadante y realizando un lavado al resuspenderlos en MES 100 mM pH 6. Se realizó otro lavado igual en este caso en NaHCO_3 0.3 M pH 8.7, obteniéndose un volumen final de 200 μ L.

Por otro lado $1 \cdot 10^{12}$ pfu/mL del fago H6 se pre-concentraron añadiendo 150 μ L de la disolución 20% PEG₆₀₀₀, 2,5 M NaCl. Tras mezclar manualmente por inversión los viales fueron almacenados en hielo durante 30 minutos y posteriormente centrifugados 10 min a 13000 rpm. Tras retirar el sobrenadante obtenemos el pellet de los fagos al que se le añadieron 100 μ L de AuNPrs activados y se incubaron 1 hora a temperatura ambiente. Después se añadieron 900 μ L de DPBS a los fagos marcados con AuNPrs junto con 150 μ L de PEG (20% PEG₆₀₀₀, 2,5 M NaCl), se almacenó 30 min en hielo y se centrifugaron a 14000 rpm durante 5 min. Tras eliminar el sobrenadante, el pellet fue disuelto en un volumen final de 400 μ L de DPBS y valorado para conocer la concentración final de fagos marcados con AuNPrs. Como al adicionar la mezcla precipitante de PEG sólo precipitan los fagos y no los prismas, se realizó además un espectro de absorción de la muestra fago-AuNPrs para confirmar el marcaje de los fagos con los prismas. Se confirmó la presencia de prismas unidos a los fagos, y que su unión no produce su agregación tras la unión covalente al observarse la invariabilidad del plasmón de AuNPrs unidos respecto a los AuNPrs en solución.

3B.3.3. Protocolo inmunoensayo TRFIA y TermoTRFIA:

Se utilizaron placas con recubrimiento de estreptavidina (KaiSA96, Kaivogen) para la inmovilización de los anticuerpos de captura biotinilados bCD9 (Invitrogen) y bCD63 (Biolegend, California). Las placas recubiertas de estreptavidina se incubaron con 100 μ L de la mezcla bCD9 y bCD63 ambos a 1 ng/mL en disolución amortiguadora RED (Kaivogen), durante 1 hora con agitación 750 rpm, a temperatura ambiente. Se retiraron los sobrenadantes y la placa se lavó tres veces con disolución de lavado (Kaivogen) de forma automática con un lavaplatos (TECAN). Posteriormente, las muestras de medio de cultivo rico en EVs procedente de la línea celular LNCaP (establecidas originalmente de una lesión en nodo linfático metastásica de adenocarcinoma de próstata humano) y de concentración exosomal conocida se diluyeron en medio de cultivo RPIM y se añadieron a los pocillos en diversas concentraciones por triplicado. Las muestras se incubaron durante 1 hora con agitación a temperatura ambiente. Las placas se lavaron nuevamente tres veces y posteriormente se añadieron 100 μ L de los Nb-fagos M13 H6 (Nbs específicos para la proteína CD9) a las diversas concentraciones evaluadas, sin marcar (TRFIA) o marcados con AuNPrs (TermoTRFIA) y se incubaron 1 hora a temperatura ambiente. Tras otros tres lavados, se añadieron 100 μ L de anticuerpo de detección aM13 marcado con un quelato de Europio, aM13-Eu (proporcionado por el Dr. Janne Leivo, Universidad de Turku) a una concentración de 0,05 ng/mL en disolución amortiguadora RED y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Se eliminó el exceso de anticuerpo y las placas se lavaron tres veces. Por último, se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente 100 ml de solución potenciadora de europio (Kaivogen, Turku, Finlandia), que produce la liberación del quelato a la disolución y por tanto la intensificación de su fluorescencia. En el caso del TRFIA, también se evaluó la adición final de 9 μ g de AuNPrs en cada pocillo en busca de la amplificación de la señal térmica.

3B.3.4. Lectura inmunoensayo TRFIA y TermoTRFIA:

La fluorescencia resuelta en el tiempo de europio fue medida mediante el equipo Wallac Victor 2, 1420 multilabel (Perkin-Elmer) con un filtro de emisión de 665 nm a una longitud de onda de 615 nm. En el caso de la metodología TRFIA, la representación de la intensidad de fluorescencia recogida frente a la concentración de LNCaP añadida, proporciona la recta de calibrado de la que se pueden extraer las propiedades analíticas del método. Para la metodología TermoTRFIA, una vez medida la fluorescencia inicial, los pocillos son irradiados con un láser diodo de infrarrojo portátil de 980 nm y baja potencia (200 mW) (Roithner Laser Technik, diámetro 22x65 mm) durante 3 minutos, produciendo la excitación de los AuNPrs y la liberación consiguiente de calor. (**Figura 3B.7A**). De esta forma la fluorescencia del europio disminuye durante la irradiación y es al final de esta, cuando la placa es introducida de nuevo en el equipo Wallac Victor 2 para medir su mínimo de fluorescencia (que coincide con el máximo calor liberado tras los 3 minutos de irradiación). A partir de este punto, la fluorescencia del europio se midió cada minuto durante 7 minutos, observándose el aumento de la fluorescencia hasta su valor inicial debido al enfriamiento progresivo del pocillo. (**Figura 3B.7B**). El tratamiento analítico de estas señales se realizó a través de la extracción del área dentro de la curva y la representación de estos valores frente a la concentración de exosomas evaluada en cada caso.

Sección 3B: Nano-inmunoensayo térmico de fluorescencia resuelta en el tiempo (TermoTRFIA) para la detección de exosomas.

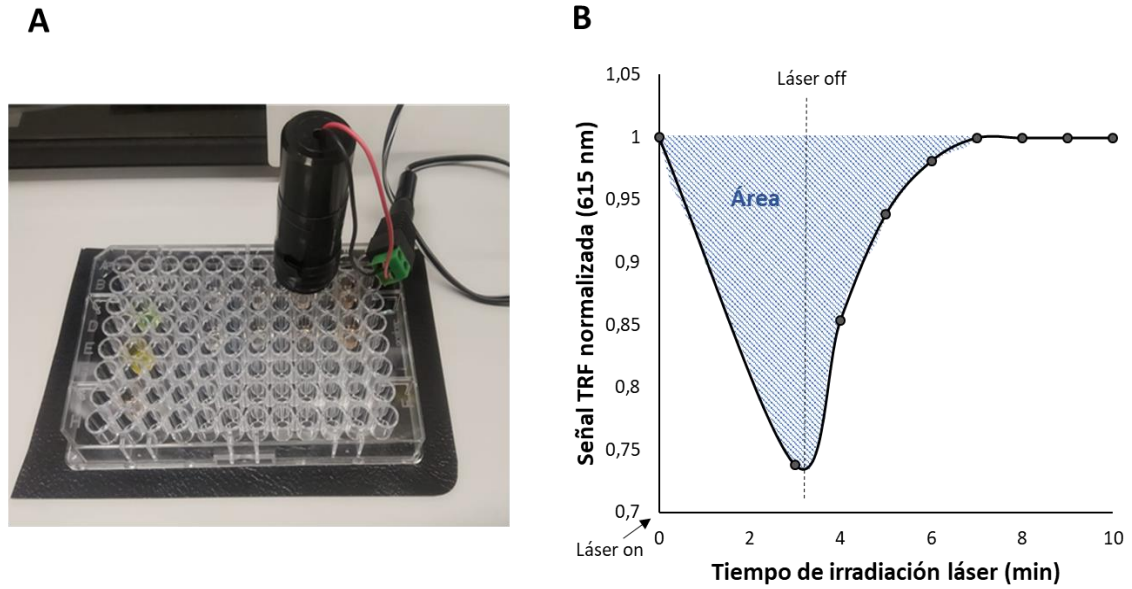


Figura 3B.7: A) Laser diodo de 980 nm y 200 mW utilizado para la irradiación de los pocillos del ensayo TermoTRFIA **B)** Ejemplo de una señal termoTRFIA obtenida durante y tras la irradiación del pocillo, donde se observa además en azul el área extraída como parámetro analítico.

3B.4. Resultados.

3B.4.1. Estudio previo del calentamiento de AuNPRs con el láser portátil.

El láser utilizado para el desarrollo de la metodología TermoTRFIA (980 nm) está más alejado de la longitud de onda del máximo de absorción de AuNPRs (1230 nm) que el láser usado en la investigación previa para la metodología TermolISA (láser de 1064 nm) y posee una potencia muy baja (200 mW). Por ello se llevó a cabo la evaluación de la capacidad de calentamiento de este láser de diodo portátil con diversas concentraciones de AuNPRs, irradiando las mismas durante 90 segundos y midiendo con una cámara IR el calentamiento producido, así como el decaimiento de la señal térmica al apagar el láser (**Figura 3B.8**). Estos resultados mostraron el calentamiento proporcional mediado por el láser tras la irradiación de los AuNPRs y la posibilidad de su utilización en el desarrollo de la metodología TRFIA.

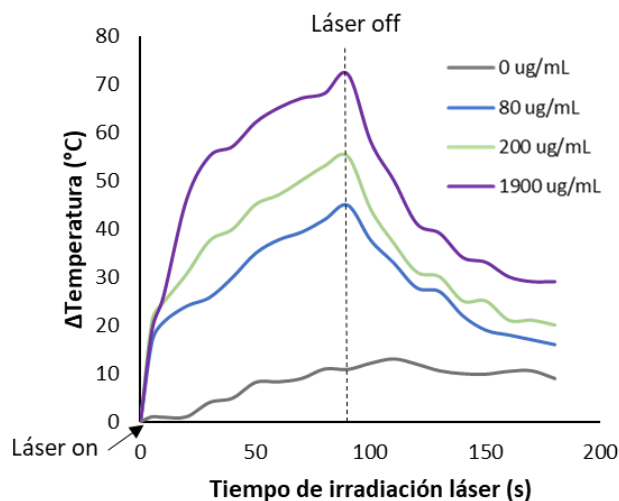


Figura 3B.8: Señales térmicas obtenidas tras la irradiación de diversas concentraciones de AuNPRs con el láser diodo de 980 nm y 200 mW utilizado para el ensayo TermoTRFIA.

3B.4.2. Estudio previo de la transferencia de energía de AuNPRs y Europio: efecto del calentamiento en la señal fluorescente.

Se evaluó la variación de la señal fluorescente de europio debida al calentamiento emitido por los AuNPRs irradiados. Para ello, se mezclaron 5 $\mu\text{g/mL}$ de una disolución del anticuerpo aM13-Eu con diversas cantidades de AuNPRs (0, 2, 5 y 9 μg), se midió la fluorescencia resuelta en el tiempo inicial y a continuación se irradiaron las disoluciones durante 3 min y se recogió la señal fluorescente cada minuto durante los siguientes 7 minutos, obteniéndose graficas de señal TRF frente al tiempo de irradiación como las mostradas en la **Figura 3B.9A**. En estas gráficas se observa cómo, al encender el láser, la señal fluorescente del europio disminuye en mayor medida a mayor concentración de AuNPRs, esto es debido a que el calentamiento producido es mayor y por tanto la fluorescencia del europio disminuye en mayor medida. En el momento que cesa la irradiación láser, se observa como la señal fluorescente comienza a recuperarse, el calor

Sección 3B: Nano-inmunoensayo térmico de fluorescencia resuelta en el tiempo (TermoTRFIA) para la detección de exosomas.

producido en el pocillo se va disipando y el europio recupera la señal TRF inicial. Se observa también como en el caso de 0 $\mu\text{g/mL}$ AuNPrs, no hay desprendimiento de calor y por tanto tras la irradiación láser la señal fluorescente permanece invariable. Y que 9 $\mu\text{g/mL}$ AuNPrs proporciona la máxima variación térmica.

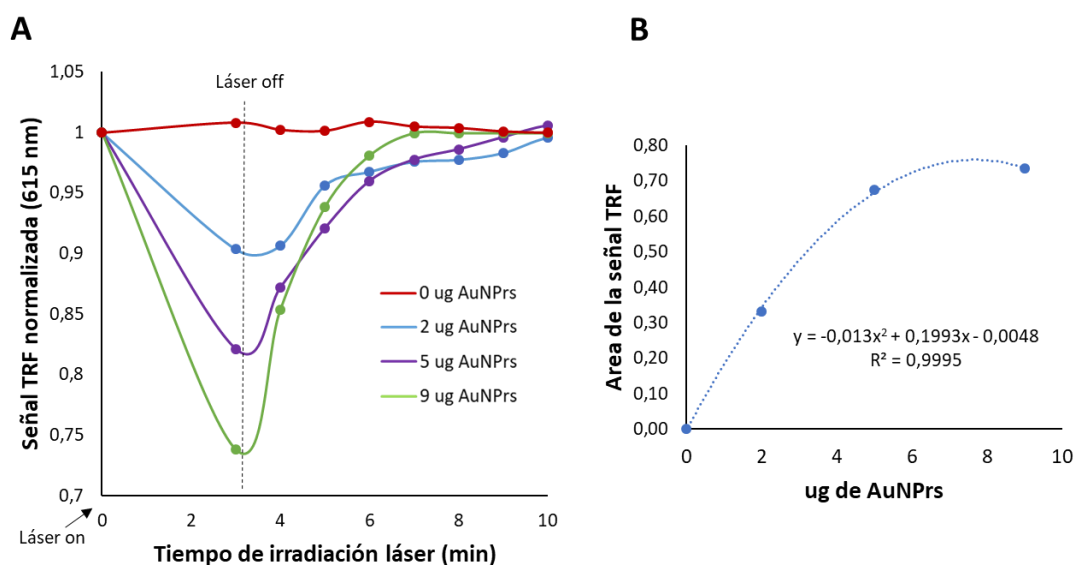


Figura 3B.9: **A)** Variación de la señal de fluorescencia resuelta en el tiempo de Europio medida a 615 nm en función del tiempo de irradiación láser (980 nm, 200 mW) para las diversas concentraciones de AuNPrs evaluadas. **B)** Representación del área extraída de estas señales fluorescentes/térmicas frente a la concentración de AuNPrs evaluada.

El tratamiento de estas señales de variación TRF con la irradiación láser, pueden analizarse mediante la extracción de las áreas resultantes de las señales fluorescentes calentamiento-enfriamiento y representarse en función de la concentración de AuNPrs evaluada (**Figura 3B.9B**), observándose una correlación entre estas áreas y la cantidad de AuNPrs. De esta forma la señal global depende, de la señal inicial fluorescente (que en este caso es la misma) y de la variación de esta fluorescencia debida al calentamiento producido por los AuNPrs.

3B.4.3. Optimización de la concentración de Nb-fagos M13 H6 en TRFIA mejorado y TermoTRFIA.

En primer lugar, se optimizó la concentración de Nb-fagos M13 H6 usada en el inmunoensayo TRFIA mejorado (**Figura 3B.3A**), para ello se evaluaron tres concentraciones diferentes $1 \cdot 10^{-10}$, $2,5 \cdot 10^{-10}$ y $5 \cdot 10^{-10}$ pfu/mL en un rango amplio de EVs LNCap (0, $2,28 \cdot 10^6$, $2,28 \cdot 10^7$, $1,14 \cdot 10^8$, $2,28 \cdot 10^8$, $4,55 \cdot 10^8$ partículas/mL), analizando cada concentración por triplicado. Al finalizar el ensayo se registró la señal de fluorescencia resuelta en el tiempo del europio a 615 nm y representándose esta frente a la concentración de EVs, se obtuvieron los calibrados para cada concentración de Nb-fagos M13 H6 evaluada (**Figura 3B.10A**), que como se observa se ajustan a ajustes polinómicos de segundo grado, de los cuales se puede extraer las propiedades analíticas del método. En la **Figura 3B.10B**, se observan los límites de detección y cuantificación obtenidos en cada caso y la representación de estos frente a la concentración de Nb-fagos M13 H6 evaluada. Así se observa que, al aumentar la concentración de fagos, los LD y LC del método disminuyen de una forma lineal, debido a problemas estéricos; una mayor cantidad de fagos

genera un menor espacio para el acceso del anticuerpo de detección aM13-Europio y por tanto una disminución en la sensibilidad y límites de detección y cuantificación. Si comparamos la sensibilidad de este método TRFIA que utiliza como elemento de detección bacteriófagos M13 y nanobodies CD9 (LD=1,19·10⁶ exosomas/mL) con la técnica TR-FIA inicialmente desarrollada por el grupo holandés, que utiliza anticuerpos CD9 como elementos de detección (LD=2·10⁷ exosomas/mL) (**Figura 3B.2**), se observa que el uso de nanobodies en el método amplifica el rango de detección hasta casi 17 veces frente al uso de los anticuerpos convencionales. Como se ha explicado el uso de Nbs proporciona una mayor cantidad de sitios de reconocimiento por densidad de área, aumentando la afinidad en el reconocimiento. Además, debido el tamaño del fago, pueden unirse varias copias del anticuerpo policlonal anti-M13por fago. La consecuencia es una clara mejora en los límites de detección del método.

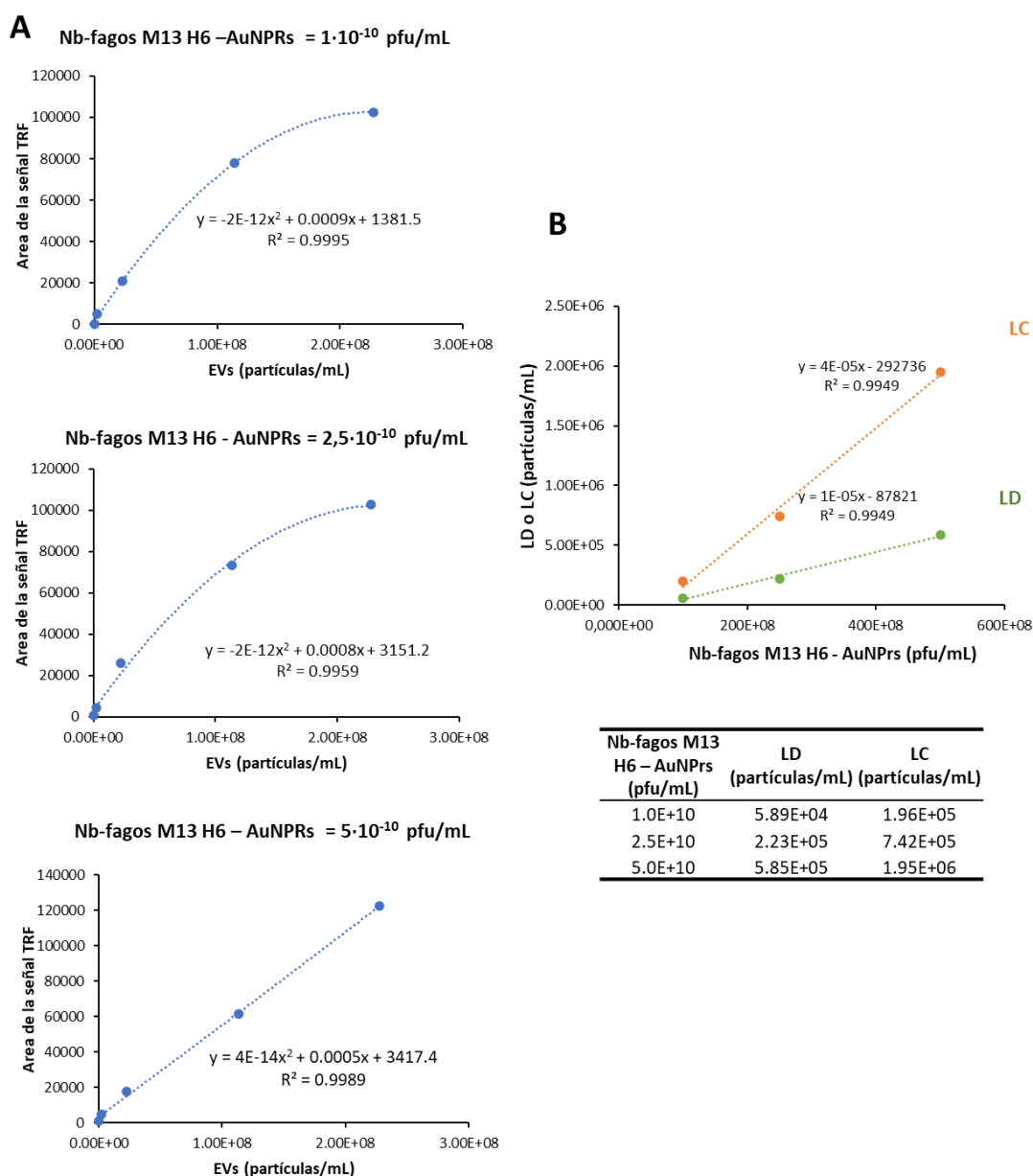


Figura 3B.10: A) Variación de la señal de fluorescencia resuelta en el tiempo de Europio medida a 615 nm para las diversas concentraciones de EVs LNCaP evaluadas mediante TRFIA para cada concentración de Nb-fagos M13 H6. **B)** Límites de detección y cuantificación proporcionada por el método TRFIA para cada concentración de Nb-fagos M13 H6 usada.

Sección 3B: Nano-inmunoensayo térmico de fluorescencia resuelta en el tiempo (TermoTRFIA) para la detección de exosomas.

Este mismo estudio de optimización de la concentración de Nb-fagos M13 H6 se llevó a cabo utilizando la metodología TermoTRFIA (**Figura 3B.3B**), para ello se evaluaron las mismas tres concentraciones diferentes $1 \cdot 10^{-10}$, $2,5 \cdot 10^{-10}$ y $5 \cdot 10^{-10}$ pfu/mL pero en este caso de los fagos marcados con AuNPrs (Nb-fagos M13 H6 – AuNPrs). Al finalizar el ensayo se registró la señal de fluorescencia resuelta en el tiempo del Europio a 615 nm y se añadieron en cada pocillo 9 μ g de AuNPrs para la amplificación de la señal térmica. Tras la irradiación láser durante 3 minutos, la fluorescencia del europio se midió cada minuto durante 10 minutos y se obtuvieron las señales de variación de fluorescencia como las mostradas en la **Figura 3B.11**.

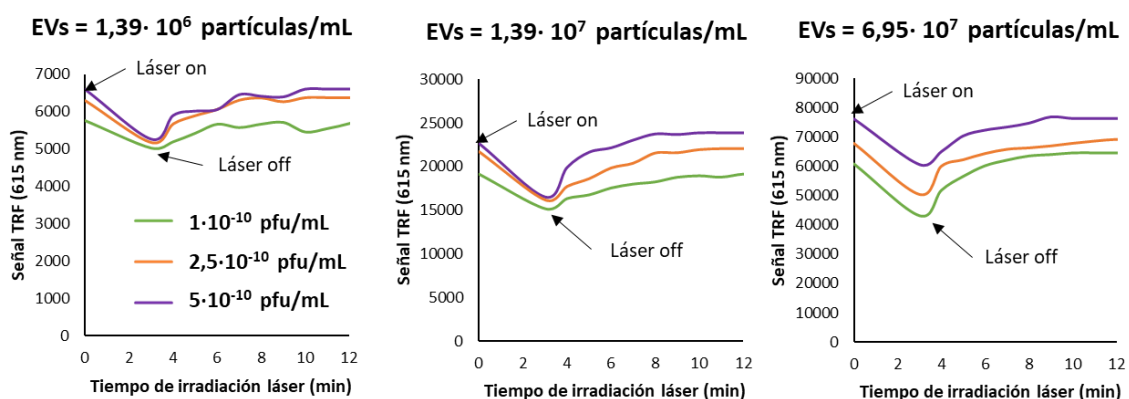


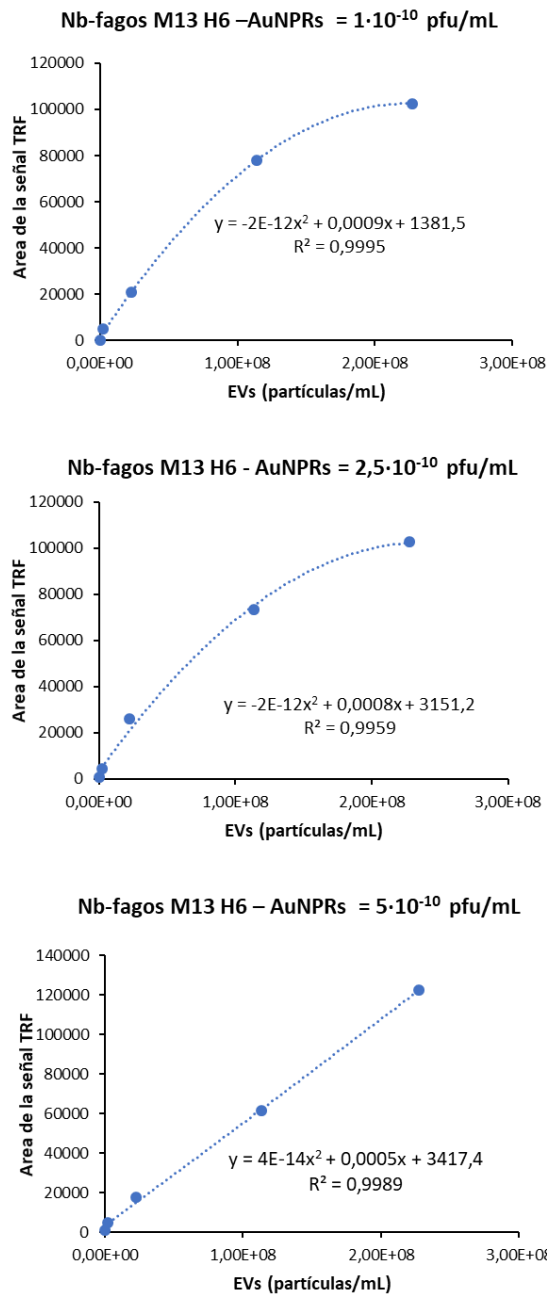
Figura 3B.11: variación de la señal de fluorescencia resuelta en el tiempo de Europio medida a 615 nm en función del tiempo de irradiación láser (980 nm, 200 mW) para diversas concentraciones de EVs evaluadas a las diferentes concentraciones de Nb-fagos M13 H6 – AuNPrs.

Extrayendo las áreas de estas señales fluorescente/térmicas y representándose estas frente a la concentración de EVs, se obtuvieron los calibrados para cada concentración de Nb-fagos M13 H6 – AuNPrs evaluada (**Figura 3B.12A**), que como se observa se ajustan a ecuaciones polinómicas de segundo grado. En la **Figura 3B.12B**, se observan los límites de detección y cuantificación obtenidos en cada caso y la representación de estos frente a la concentración de Nb-fagos M13 H6 – AuNPrs evaluada. Así se observa que, como en el caso anterior, para la metodología TermoTRFIA también un aumento de la concentración de fagos produce la disminución de los LD y LC del método de una forma lineal. Además, si comparamos estos resultados con los obtenidos para el método simple TRFIA, se pueden observar límites de detección 6 veces mejores en el caso del TermoTRFIA para todas las concentraciones evaluadas de fagos. Esto es debido, como se ha dicho, a que la señal final es un sumatorio de señales:

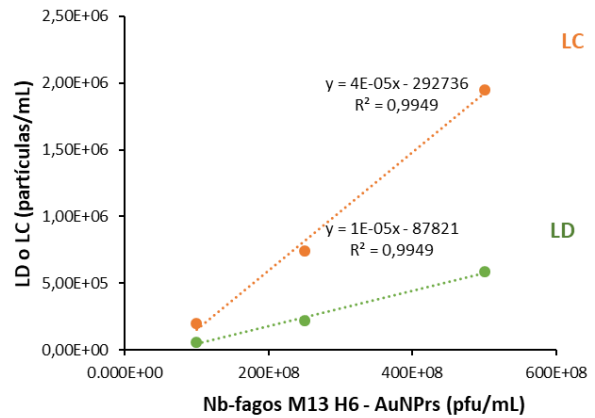
1. La señal fluorescente del europio inicial, que es proporcional a la cantidad de anticuerpos de detección aM13 y por tanto a la cantidad de Nb-fagos que reconocen los EVs.
2. La variación de la señal fluorescente (área) debida al calor desprendido por los AuNPrs unidos al fago, proporcional a la concentración de Nb-fagos que reconocen los EVs.
3. La adición de AuNPrs libres en la disolución final, genera una amplificación en el calentamiento generado y por tanto en la variación fluorescente. Debido a que la potencia láser y la longitud de onda no son las óptimas, el efecto de calentamiento generado por los AuNPrs unidos a los fagos, no permite ver grandes variaciones de temperatura y lo que hace necesario la adición extra de AuNPrs libres.

Además, estos resultados confirman que la modificación de los fagos con AuNPrs no afecta al reconocimiento por parte del anti-aM13.

A



B



Nb-fagos M13 H6 - AuNPRs (pfu/mL)	LD (partículas/mL)	LC (partículas/mL)
$1.0E+10$	$5.89E+04$	$1.96E+05$
$2.5E+10$	$2.23E+05$	$7.42E+05$
$5.0E+10$	$5.85E+05$	$1.95E+06$

Figura 3B.12: A) Áreas de las señales fluorescente térmicas para las diversas concentraciones de EVs LNCaP evaluadas mediante TermoTRFIA para cada concentración de Nb-fagos M13 H6 - AuNPRs. **B)** Límites de detección y cuantificación proporcionada por el método TermoTRFIA para cada concentración de Nb-fagos M13 H6 usada.

3B.4.4. Evaluación de la unión de Nb-fago – AuNPRs y parámetros analíticos del método TermoTRFIA

Como se ha dicho, la cantidad de AuNPRs unidos a los fagos que quedan en el pocillo después de los lavados es muy baja para la potencia láser utilizada (200 mW), siendo además un láser con la longitud de onda algo alejada de la óptima. Debido a esto, las variaciones de calor generadas tras la irradiación son demasiado pequeñas para afectar de forma destacada a la señal fluorescente, es por ello que, al finalizar el ensayo, se añaden en cada pocillo 9 μg de AuNPRs. Para poder evaluar si el efecto de los AuNPRs unidos a los fagos es despreciable o no sobre el producido por los AuNPRs añadidos al final del ensayo, se llevó a cabo la evaluación de un mismo rango de EVs LNCap (0, $1,14 \cdot 10^6$, $2,28 \cdot 10^7$, $1,14 \cdot 10^8$, $2,28 \cdot 10^8$, $4,55 \cdot 10^8$ partículas/mL), con la concentración de fagos óptima, $1 \cdot 10^{-10}$ pfu/mL, usando fagos sin marcar y fagos marcados con AuNPRs. En ambos casos se añadieron al final del ensayo 9 μg de AuNPRs y se obtuvieron en cada caso las señales que se muestran en la **Figura 3B.13A**.

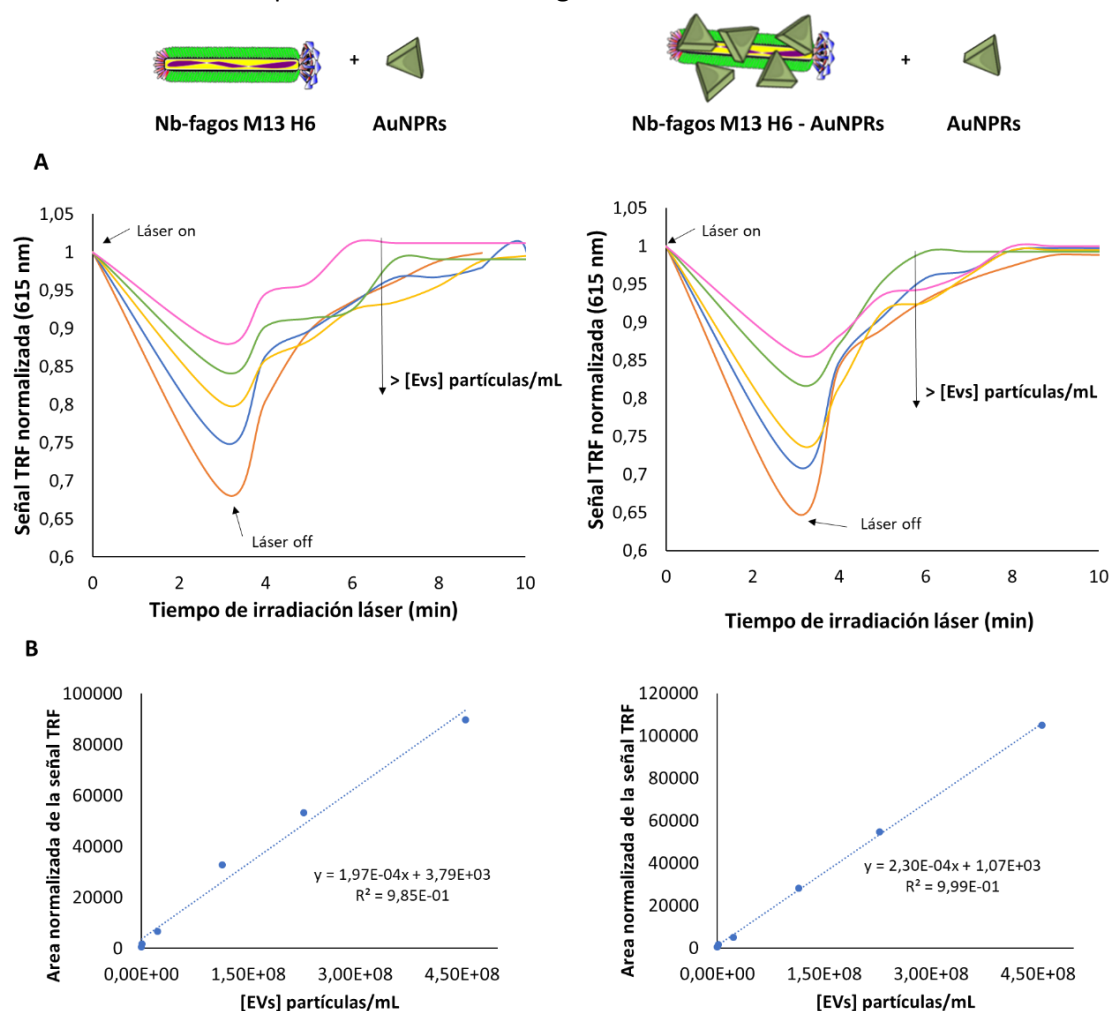


Figura 13: A) Variación de la señal de fluorescencia resuelta en el tiempo de Europio normalizada medida a 615 nm en función del tiempo de irradiación láser (980 nm, 200 mW) para diversas concentraciones de EVs evaluadas a con $1 \cdot 10^{-10}$ pfu/mL Nb-fagos M13 H6 sin marcar o marcados con AuNPRs, añadiendo en ambos casos al final del experimento 9 μg de AuNPRs **B)** Áreas de las señales fluorescente térmicas para las diversas concentraciones de EVs LNCaP evaluadas mediante TermoTRFIA para cada caso.

Extrayendo las áreas de las señales fluorescente/térmicas normalizadas de la **Figura 3B.13A** y representándose estas frente a la concentración de EVs, se obtuvieron los calibrados para cada caso (**Figura 3B.13B**), de los cuales se pueden extraer los parámetros analíticos del método, recogidos en la **Tabla 3B.2** junto con los obtenidos para el método TRFIA clásico.

		Sensibilidad	LD (partículas/mL)	LC (partículas/mL)	DER%
TRFIA	Nb-fagos M13 H6	$1,60 \cdot 10^{-3}$	$1,19 \cdot 10^6$	$3,98 \cdot 10^6$	7,27
TermoTRFIA	Nb-fagos M13 H6 (+AuNPrs)	$1,99 \cdot 10^{-4}$	$2,19 \cdot 10^5$	$7,28 \cdot 10^5$	5,15
	Nb-fagos M13 H6 – AuNPrs (+AuNPrs)	$2,32 \cdot 10^{-4}$	$7,77 \cdot 10^4$	$2,59 \cdot 10^5$	6,21

Tabla 3B.2: Parámetros analíticos del método TRFIA mejorado en comparativa con los obtenidos con el método TermoTRFIA con Nb-fagos M13 H6 sin marcar o marcados con AuNPrs.

De estos resultados se puede concluir, en primer lugar, que el uso de los fagos marcados con AuNPrs (Nb-fagos M13 H6 – AuNPrs), mejora 3 veces el límite de detección y cuantificación respecto al ensayo con los fagos sin marcar añadiendo únicamente AuNPrs libres en disolución. Este efecto es debido probablemente a la transferencia de energía existente entre los AuNPrs unidos al fago y el % de europio no liberado del anticuerpo tras la adición del potenciador, que hace la transferencia de calor más eficiente, mejorando la sensibilidad del método. La **Tabla 3B.2**, muestra también como el método TermoTRFIA desarrollado, produce una mejora de unas 15 veces de los límites de detección y cuantificación respecto al TRFIA mejorado que utiliza Nb-fagos y analiza sólo fluorescencia.

Por otro lado, si comparamos estos valores con los obtenidos para el método clásico TRFIA que usa anticuerpos convencionales como elemento de detección ($LD=2 \cdot 10^7$ exosomas/mL), el método TermoTRFIA mejorado usando Nb-fagos, mejora unas 260 veces los límites de detección y cuantificación, permitiendo la detección de hasta $7,77 \cdot 10^4$ partículas/mL y reduciendo notablemente el LD de los métodos fluorescentes desarrollados en los últimos años, que se muestran en la **Tabla 3B.1**.

De esta forma, el uso de AuNPrs en el TRFIA consigue la amplificación de la señal fluorescente y mejora la selectividad del sistema, debido a que la señal final evaluada (área de la señal TRF) es una suma de la cantidad de fluoróforo y la variación de su fluorescencia con la temperatura. Este hecho junto con las ventajas ya nombradas del uso de la construcción fago-Nbs como elemento de reconocimiento, provoca el aumento de la sensibilidad y los límites de detección del método.

Es importante destacar que el análisis de este inmunoensayo con un láser de mayor potencia (>200 mW) y longitud de onda óptima (1050 nm) probablemente evitaría la adición final adicional de AuNPrs necesaria para la amplificación de la señal térmica y mejoraría la sensibilidad del sistema.

Además, estos resultados resaltan las posibilidades de la tecnología TermoLISA, capaz de transferirse a la detección de otros tipos de sistemas biológicos, mejorando las propiedades analíticas del método.

3B.5. Conclusiones específicas de la sección 3B

En esta sección se ha desarrollado un nano-inmunoensayo térmico de fluorescencia resuelta en el tiempo (TermoTRFIA) para la detección de exosomas, mediante el acoplamiento de la detección térmica TermoLISA desarrollada en la sección 3A y la detección fluorescente del método TRFIA desarrollado por el grupo holandés de acogida. Con esta metodología se ha explorado además la utilización de bacteriófagos M13 con nanobodies como elementos de reconocimiento de exosomas.

Las conclusiones que se pueden extraer del trabajo realizado son las siguientes:

1. Se ha evaluado la variación de la señal fluorescente de europio debida al calentamiento emitido por los AuNPrs irradiados, confirmándose la dependencia de la temperatura sobre su fluorescencia y por tanto la capacidad de transducción del sistema. Se ha demostrado, además, la correlación entre el área extraída de la variación fluorescente de calentamiento-enfriamiento y la cantidad de AuNPrs.
2. Se ha aplicado al método TRFIA la tecnología de reconocimiento mediada por bacteriófagos-Nb para la detección específica de EVs de cáncer de próstata. Para ello se ha llevado a cabo la producción y aislamiento de bacteriófagos M13 H6, con Nbs específicos para la proteína CD9 y se han aplicado al método TRFIA mediante la optimización previa de su concentración. Así, se ha comprobado que el uso de fago-nanobodies amplifica el rango de detección del método TRFIA hasta casi 10 veces frente al uso de los anticuerpos convencionales.
3. Se ha llevado a cabo el acoplamiento de la tecnología térmica de AuNPrs a este método fluorescente TRFIA mejorado, dando lugar al nuevo nano-inmunoensayo térmico de fluorescencia resuelta en el tiempo (TermoTRFIA). Para ello se han optimizado y evaluado distintos factores:
 - Se ha seleccionado el tiempo de irradiación láser y el tiempo completo de medición por pocillo para obtener la mayor sensibilidad con las características del láser disponible (980 nm y 200 mW), siendo estos tiempos 3 y 10 minutos respectivamente.
 - Se ha seleccionado como señal analítica el área de las señales fluorescente/térmicas obtenidas tras la irradiación, comprobándose que esta señal final es debida a una sumatorio de dos señales: la señal fluorescente del europio proporcional a la concentración de Nb-fagos que reconocen los EVs y la variación de esta fluorescencia debida al calor desprendido por los AuNPrs.
 - Se ha llevado a cabo la unión covalente de AuNPrs al fago y la evaluación comparativa de la metodología mediante este enlace directo de los AuNPrs al fago o usando AuNPrs libres en disolución. Así, se ha comprobado que, en las condiciones del ensayo, el calor liberado por los AuNPrs unidos a los fagos, no es suficiente para observar variaciones en la fluorescencia del europio, de esta forma la adición de AuNPrs en la disolución final, genera una amplificación en el calentamiento generado y por tanto en la variación fluorescente.
4. El método TermoTRFIA permite la detección de hasta $7,77 \cdot 10^4$ partículas/mL, reduciendo notablemente el LD de los métodos fluorescentes desarrollados en los últimos años.
5. El uso de un láser con mayor potencia y longitud de onda óptima probablemente evitaría la adición final adicional de AuNPrs necesaria para la amplificación de la señal térmica y mejoraría la sensibilidad del sistema.

Sección 3C

Inmunosensor térmico de flujo lateral
(TermoLFIA) para la detección de
marcadores cancerígenos
gastrointestinales

3C.1. Introducción

Los dispositivos de flujo lateral son tiras reactivas inmunocromatográficas rápidas. Al igual que otros ensayos inmunológicos, el método de ensayo se basa en la reacción antígeno-anticuerpo. El desarrollo de ensayos LFIA ha ganado amplia aceptación en el mercado del diagnóstico *in vitro* desde mediados de los 80. Algunas de las ventajas de este tipo de test diagnóstico (**Tabla 3C.1**) son, su simplicidad de diseño y pequeño tamaño, además, la obtención de resultados de forma rápida y su fácil uso hace que este tipo de test diagnóstico no demande personal especializado para su utilización, ni para la interpretación de sus resultados.

Características y ventajas de los test LFIA

Fácil uso	Interpretación de los resultados simple a menudo lectura visual.
Simple y barato	Pequeño, portátil y normalmente sin equipamiento extra requerido.
Rápido	Resultados <i>in situ</i> sin tratamiento de muestra en 5- 30 minutos.
Volumen de muestra	Del orden del uL en muestra biológicas como sangre, suero, plasma, saliva , orina...
Multiplexing	Es posible la detección de varios analitos al mismo tiempo en un mismo test.
Variedad de analitos	Aplicados a la detección de múltiples antígenos, con alta sensibilidad, especificidad y reproducibilidad.

Tabla 3C.1: Características y ventajas de los ensayos LFIA

Como muestra la **Figura 3C.1**, los test LFIA están formados generalmente por tres zonas diferenciadas, conocidas por su nombre en inglés '*pad*', con componentes y materiales distintos a través de los cuales migra la muestra por capilaridad. Las diferentes partes se montan superpuestas en una tira plástica adhesiva '*backing card*' y se colocan a presión en un casete fabricado especialmente para este uso.

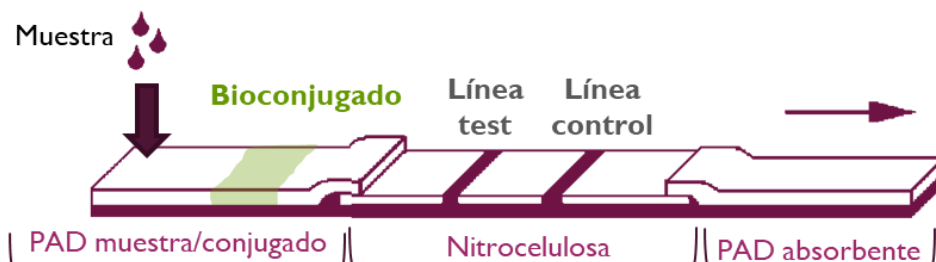


Figura 3C.1: Esquema y componentes de test LFIA

Los componentes principales de las tiras reactivas de flujo lateral son:

- **Pad de muestra/conjugado:** en función de las necesidades de la muestra, puede ser uno o estar separado en dos. La muestra es añadida en el extremo proximal de la tira (pad de muestra) y migra a través de esta región donde se encuentra inmobilizado el bioconjugado (pad de conjugado), que se trata del anticuerpo de detección químicamente unido a una partícula que actuará como transductor del reconocimiento biológico analito-anticuerpo. Las nanopartículas más comúnmente utilizadas en estos test son de oro coloidal o una partícula de látex monodispersa coloreada, para el reconocimiento visual de la misma⁸⁰. Sin embargo, existen test que utilizan otros tipos de revelado derivado de las diferentes propiedades de las nanopartículas empleadas como la fluorescencia^{81,82} o el paramagnetismo⁸³. La muestra al paso por este pad,

vuelve a movilizar el bioconjugado seco, y el analito interactúa con el anticuerpo de detección que se encuentra anclado a la nanopartícula. Por lo tanto, esta interacción Ab_{det} -analito sucede antes la interacción analito- Ab_{cap} , lo cual ocurre en la siguiente sección de la tira (nitrocelulosa). Esta es una diferencia de importancia con el formato ELISA donde el analito interacciona en primer lugar con el anticuerpo de captura soportado en la superficie de los pocillos de una placa multipocillo.

-Nitrocelulosa (NC): es una membrana porosa que funciona como matriz por donde fluye la muestra una vez llevado a cabo el reconocimiento biológico Ab_{det} -analito (en el pad de muestra/conjugado). Consta de dos partes; la denominada línea de test (Lt), donde ha sido depositado el Ab_{cap} y que interaccionará con el bioconjugado NP- Ab_{det} -analito; y la denominada línea de control (Lc), donde se deposita un anticuerpo secundario capaz de reconocer al Ab_{det} que forma parte del bioconjugado. (**Figura 3C.2**) Esta Lc asegura que el frente de bioconjugado ha corrido hasta el final del test. Los resultados se interpretan como la presencia o ausencia de línea test, normalmente en el formato de inmunoensayo sándwich.

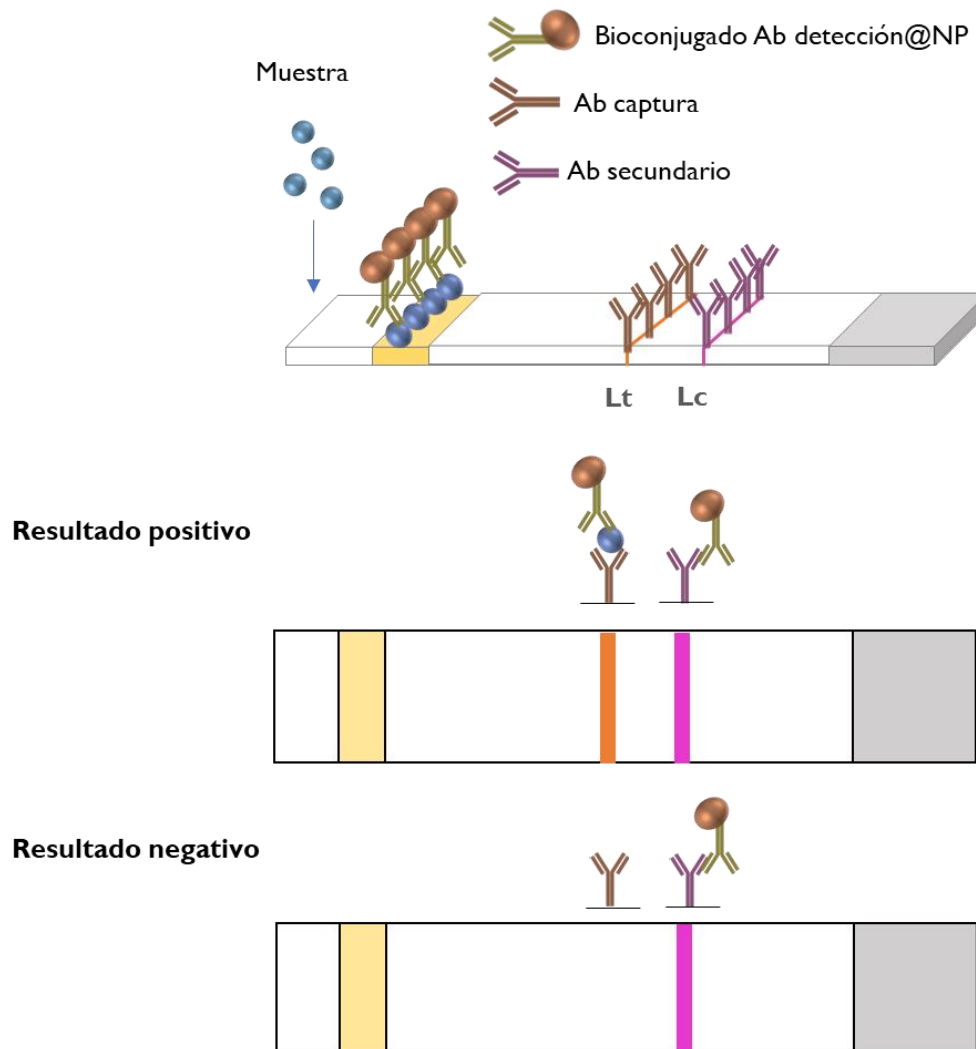


Figura 3C.2: Funcionamiento de un test de flujo lateral en formato sándwich.

- **Pad de absorción:** este pad se encuentra al final de la tira y se encarga de absorber el resto de bioconjugado y muestra que no ha sido reconocido en las líneas de test y control. Este componente es importante para asegurar, no solo que la muestra pueda fluir por la tira, sino que también es determinante en la cantidad de muestra que puede aplicarse.

En la actualidad multitud de casas comercializan ensayos de este tipo conocidos como POC, sistemas que no dependen del uso del personal o las instalaciones de un laboratorio y tienen el potencial de mejorar la atención médica del paciente. El ejemplo más conocido y utilizado en los hogares son los test de embarazo (detección de gonadotropina coriónica humana, hCG), pero algunas casas comerciales ya disponen de test LFIA para parásitos y virus gastrointestinales (H.Pylori, verotoxina E. coli, Giardia lamblia...), enfermedades respiratorias (legionella pneumophila, streptococcus, Influenza A y B...), alergias alimentarias como la celiacía o incluso para la detección de marcadores cancerígenos en sangre, tema abarcado en este capítulo.

Aunque para la detección del marcador VEGF, aun no existen test de flujo lateral comerciales ni tampoco en bibliografía, varios test LFIA para la detección de los marcadores CEA y CA19.9 son ya comercializados por algunas empresas (**Tabla 3C.2**):

Ref. web	Empresa	Analito	Lectura	Límite de detección (LD)
84	Humasis (South Korea)	CEA	Visual	5 ng/mL
85	Concile GmbH (Alemania)	CEA	Visual	2,5 ng/mL
86	Turklab Tibbi Malzemeler (Turquía)	CEA	Visual	5 ng/mL
87	Boditech (South Korea)	CEA	Lector de fluorescencia	1 ng/mL
85	Concile GmbH (Alemania)	CA19.9	Visual	14 U/mL
88	AllTest (China)	CA19.9	Visual	30 U/mL

Tabla 3C.2: Test LFIA comerciales para la detección de CEA y CA19.9 en plasma.

Sin embargo, aunque los test citados alcanzan los niveles de sensibilidad necesarios para estos marcadores, la mayoría se trata de ensayos cualitativos y en pocos casos, semicuantitativos que necesitan de instrumentos de lectura, no tan accesibles económicamente.

En el ámbito de la investigación, existen también multitud de artículos científicos centrados en la detección LFIA de gran variedad analitos, mediante distintas técnicas aplicadas y basadas en las propiedades ópticas de nanomateriales⁸⁹ y más específicamente en la detección de marcadores tumorales⁹⁰. Así, diversos métodos basados en LFIA (**Tabla 3C.3**) estudian la detección del antígeno carcinomaembrionario proporcionando métodos cualitativos (detección visual) o semicuantitativos mediante la ayuda de instrumentación.

Como se observa, para mejorar la sensibilidad de estos sistemas, generalmente se requiere de dispositivos de detección especiales y/o tratamiento software de la imagen para alcanzar mayor sensibilidad o la opción de cuantificación del analito diana.

Sección 3C: Inmunosensor térmico de flujo lateral (TermoLFIA)
para la detección de marcadores cancerígenos gastrointestinales

Ref.	Año	Detección	Trasducción	Lectura	Límite de detección (LD)
91	2018	Fluorescencia	FRET producido entre AuNPs@Ab _{det} y el fluoróforo FITC@Ab _{cap}	Espectrofotómetro de fluorescencia	10 ng/mL
92	2016	Densidad óptica	Color proporcionado por MNPs@Ab _{det}	Visual o software de análisis de imagen	0,25 ng/mL
93	2017	Magnetización	Color o señal magnética proporcionada por MNPs-CEA	Visual o lector de ensayo magnético	0,5 ng/mL (visual) o 0,045 ng/mL (lector)
94	2016	Quimio-luminiscencia	QL del luminol y H ₂ O ₂ y HRP@AuNPs@Ab _{det}	Visual o lector de quimioluminiscencia	10 ng/mL (visual) o 0,2 ng/mL (lector)

Tabla 3C.3: Métodos LFIA para la detección del antígeno carcinomaembrionario (CEA) en plasma.

Por otro lado, la integración de AuNMs plasmónicos para su detección visual en este formato de inmunosensor, ha sido ampliamente aplicada y ha llevado a una mejora en los límites de detección y a la expansión en su rango de aplicación. Sin embargo, el efecto fototérmico experimentado por AuNMs plasmónicas (tras la irradiación con luz de longitud de onda cerca de su banda LSPR, parte de la luz incidente se absorbe y la mayoría se disipa como calor en su entorno local o medio circundante), no se ha explotado en la fabricación de este tipo de biosensores centrando la detección a una señal visual. El primer ejemplo del uso del efecto fototérmico de AuNPs en biosensor de flujo lateral fue descrito por Bischof et al. para la detección de un antígeno criptocócico usando AuNP esféricos. Sin embargo debido a la baja eficiencia térmica de estas AuNPs se vieron obligados a usar una cámara infrarroja para detectar la señal térmica.⁹⁰ Así, es importante destacar la limitación del uso de AuNPs esféricas y una longitud de onda láser resonante de aproximadamente 530 nm, que con un menor efecto fototérmico, no permite la visualización del quemado a simple vista y por tanto tampoco la posibilidad de alcanzar límites de alta sensibilidad con una señal visual. Estos dos hechos limitan el uso de etiquetas térmicas en el desarrollo de inmunoensayos de flujo lateral térmicos para aplicaciones POC.

Sin embargo, el uso de AuNPrs como etiqueta térmica es una tecnología nueva y prometedora para el desarrollo de este tipo de formato de inmunosensor con potencial de alcanzar alta sensibilidad con una señal visual manteniendo las ventajas típicas de este tipo de biosensor como ser simplicidad y rapidez. Además de la alta capacidad de absorción molar de estos AuNPrs, que les hace buenas etiquetas para la detección colorimétrica a simple vista, gracias a sus propiedades ópticas características, la sensibilidad LFIA tradicional podría mejorarse detectando y cuantificando el calor generado después de la irradiación con una fuente de luz de una longitud de onda que coincidente a con la resonancia del plasmón superficial.

Así, el gran objetivo de esta sección es el desarrollo de un biosensor de transducción térmica innovador y sensible basado en un test LFIA, para la detección y cuantificación de concentraciones ultra bajas de proteínas de forma rápida, económica y versátil. Esta tecnología utiliza anticuerpos de detección acoplados a nanopartículas plasmónicas (AuNPrs@streptavidina-biotina@Ab_{det}) y anticuerpos de captura (Ab_{cap}) inmovilizados en un soporte dual que consiste en una banda de nitrocelulosa unida al papel termográfico (termosensible) que funciona como elemento de detección fotográfica y opera como un transductor de señal térmica produciéndose en el papel un cambio de intensidad de color en escala de grises. (**Figura 3C.3**)

Sección 3C: Inmunoensayador de flujo lateral (TermoLFIA) para la detección de marcadores cancerígenos gastrointestinales

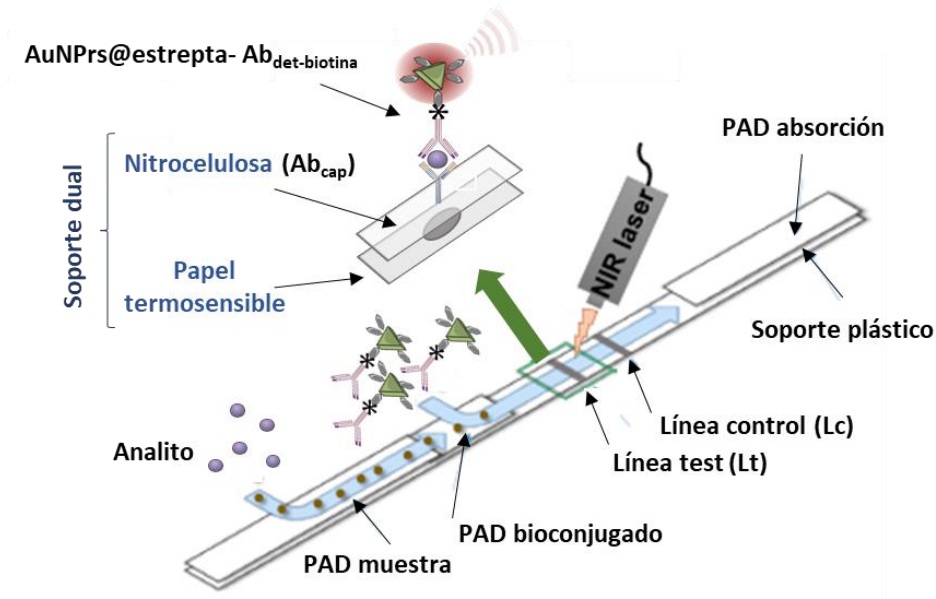


Figura 3C.3: Esquema del inmunosensor término de flujo lateral (TermoLFIA) desarrollado.

Solo en presencia del analito a detectar, se formará el sándwich entre anticuerpo de captura localizado en la línea de test y el bioconjugado unido al analito a detectar (Figura 3C.4).

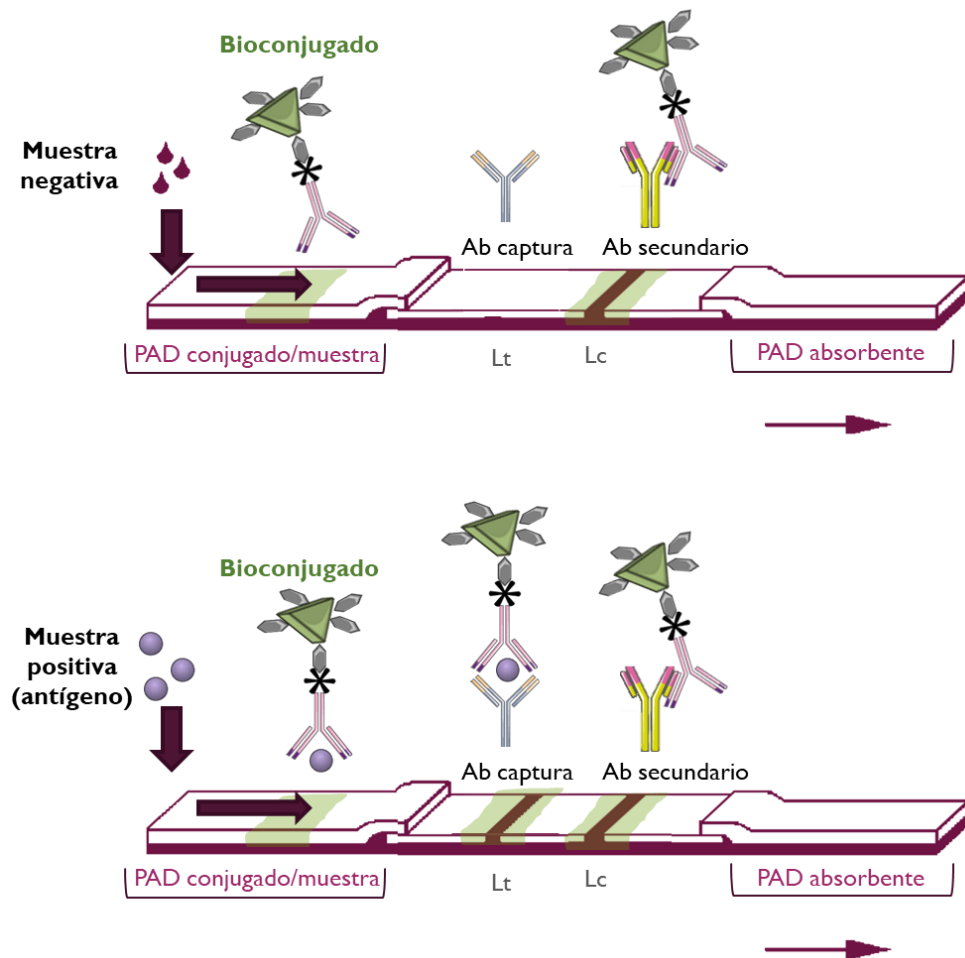


Figura 3C.4: Esquema del funcionamiento del test TermoLFIA desarrollado.

La irradiación del área por una fuente láser NIR causará que cualquier AuNPrs presente en la línea test, libere grandes cantidades de calor proporcionales a la concentración de analito, que pueden ser interpretadas en tres formatos de transducción diferentes todos ellos sin necesidad de dispositivos complejos de lectura o instrumentación costosa (**Figura 3C.5**):

- *Concentraciones de analito altas* permiten la detección visual de la línea de test tanto de forma colorimétrica directa como tras su irradiación con láser al producir el quemado directo de la nitrocelulosa.
- *Concentraciones de analito intermedias* no permiten la detección colorimétrica visual de la línea de test de una forma clara, pero sí producen el quemado de la nitrocelulosa tras la irradiación láser y su cuantificación mediante papel termosensible.
- *Concentraciones de analito bajas* no permiten detección visual de la línea de test ni el quemado directo de la nitrocelulosa, pero sí la detección y cuantificación a través de la transducción térmica observada en el papel termosensible en escala de grises según cantidad de analito en la muestra.

En consecuencia, la presencia del analito es cuantificable hasta un rango de concentración ultrabaja y la señal analítica de salida final más amplificada, recogida en el papel termosensible, se leerá a través de una aplicación móvil que analiza las coordenadas de color RGB. Por lo que sin la necesidad de equipamiento costoso sería posible la cuantificación en este novedoso formato de biosensor de flujo lateral térmico.

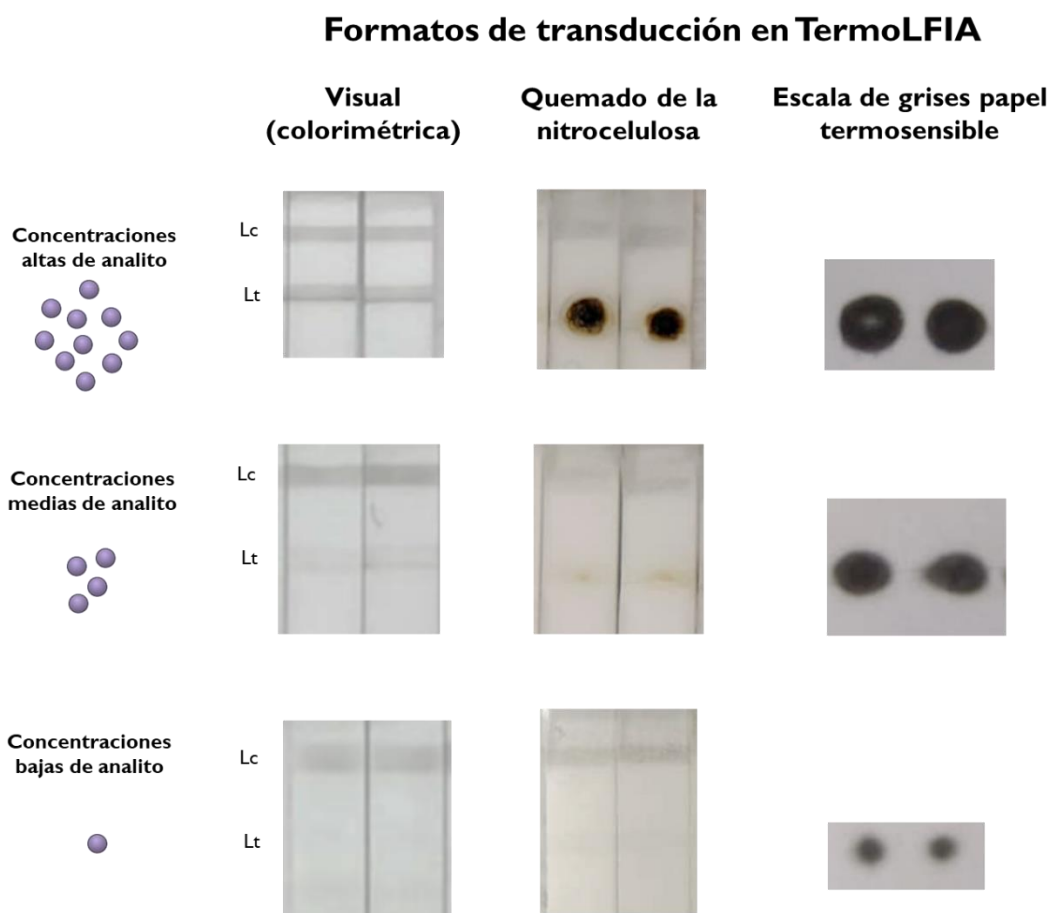


Figura 3C.5: Formatos de transducción y amplificación de la señal térmica que ofrece la tecnología TermoLFIA planteada, según las diversas concentraciones de analito a detectar.

3C.2. Objetivos

Para alcanzar el desarrollo de este biosensor aplicado a la detección de marcadores cancerígenos gastrointestinales, fue necesario el planteamiento y consecución de varios objetivos específicos que incluyeron la optimización secuencial y analítica de diversos factores importantes en la construcción de este tipo de sensores:

- 1. La selección de los materiales del test** (PAD muestra/bioconjugado, PAD absorbente y nitrocelulosa) y pret-ratamiento de los mismos mediante el desarrollo de métodos de evaluación cuantitativos (RGB, imagen térmica IR y papel termosensible).
- 2. La optimización del bioconjugado** para flujo lateral (bloqueo del bioconjugado, optimización de la formulación y estabilidad del conjugado).
- 3. Optimización de métodos para la fabricación de tiras TermoLFIA:** condiciones y deposición de bioconjugado y concentración de anticuerpos depositados en las líneas de test y control en las tiras.
- 4. Proceso de análisis del biosensor TermoLFIA:** acoplamiento del papel termosensible, esquemas de irradiación, potencia láser, estudio sistemático de los rangos de amplificación de papel termosensible.
- 5. Lectura de la señal analítica RGB en papel termosensible**
- 6.** Tras la optimización de todos estos parámetros, el objetivo final se centra en la **cuantificación por TermoLFIA de los marcadores** de cáncer gastrointestinal (**CEA, CA19.9 y VEGF**) **en disolución amortiguadora** y la obtención de las propiedades analíticas del método. Además, se plantea la optimización de la metodología desarrollada para la detección de estos marcadores **en plasma sanguíneo humano**.

3C.3. Experimental y métodos

3C.3.1. Fabricación tiras TermoLFIA

Para la fabricación de las tiras, se seleccionó el diseño final mostrado en la **Figura 3C.6**.

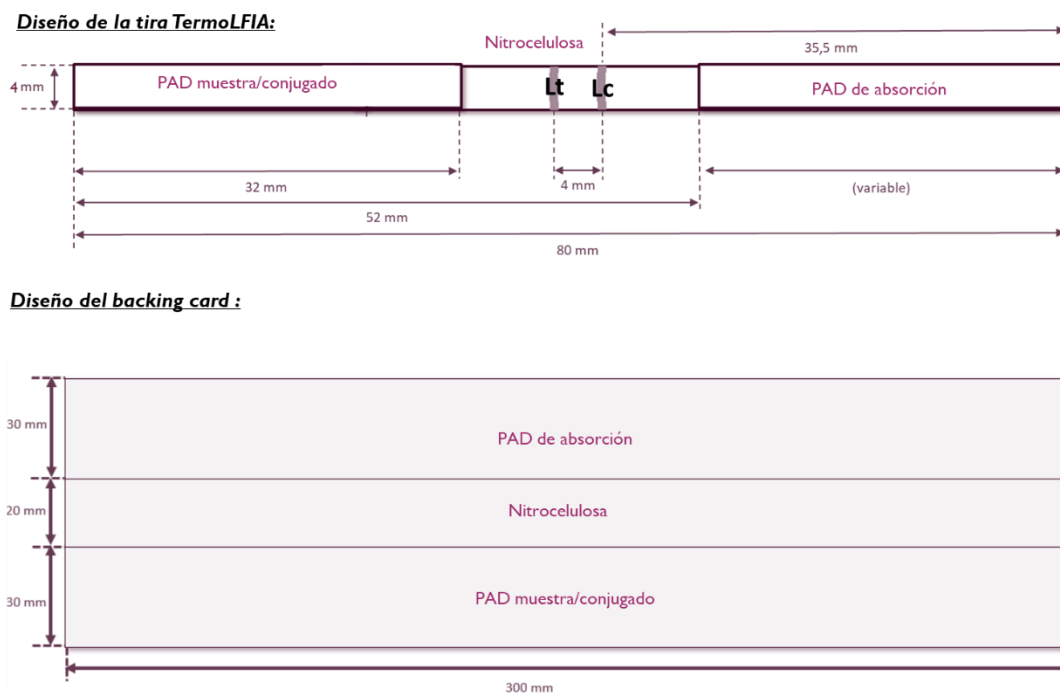


Figura 3C.6: Diseño y medidas finales de los componentes en las tiras de flujo lateral fabricadas, así como del backing card.

Algunos de los parámetros más importantes a definir son:

1. El ancho de la tira, en este caso 4 mm, que limitará el volumen de muestra añadido, así como la concentración de conjugado depositada. Un mayor ancho de las tiras supone un mayor gasto de conjugado por tira, pero también mayor estabilidad y robustez de los resultados.
2. Diseño del PAD muestra/conjugado, que en este caso se decidió colocar como un pad único del mismo material.
3. Distancia y posición de las líneas test y control, se eligieron a partir de los parámetros recomendados y más usados por fabricantes, junto con las características de la nitrocelulosa y los AuNPrs utilizados. La porosidad de la nitrocelulosa determina la velocidad de flujo capilar (VFC) de la misma y el tamaño de los AuNPrs (superiores a 200 nm) afecta también en la movilidad del conjugado a largo del test, lo que supone que ambos parámetros condicionan la sensibilidad final. Por ello, es importante tener en cuenta que la posición de la línea test respecto a la de control, puede compensar una velocidad de flujo capilar más rápida y ayudar a alargar los tiempos de interacción del frente de muestra/conjugado en las líneas test y control (**Figura 3C.7**)

Lt	Lc	Distancia Lt-Lc	Intensidad de la señal
		18 mm	-84 %
		12 mm	-60%
		4 mm	-44%

Figura 3C.7: Efecto de la distancia entre las líneas test y control en la intensidad de la señal de la línea test, siendo el 100% de referencia la intensidad de la línea control.

Una vez fijados estos parámetros, se llevó a cabo la fabricación de las tiras diseñadas utilizando el equipamiento específico para cada tarea (**Figura 3C.8**)

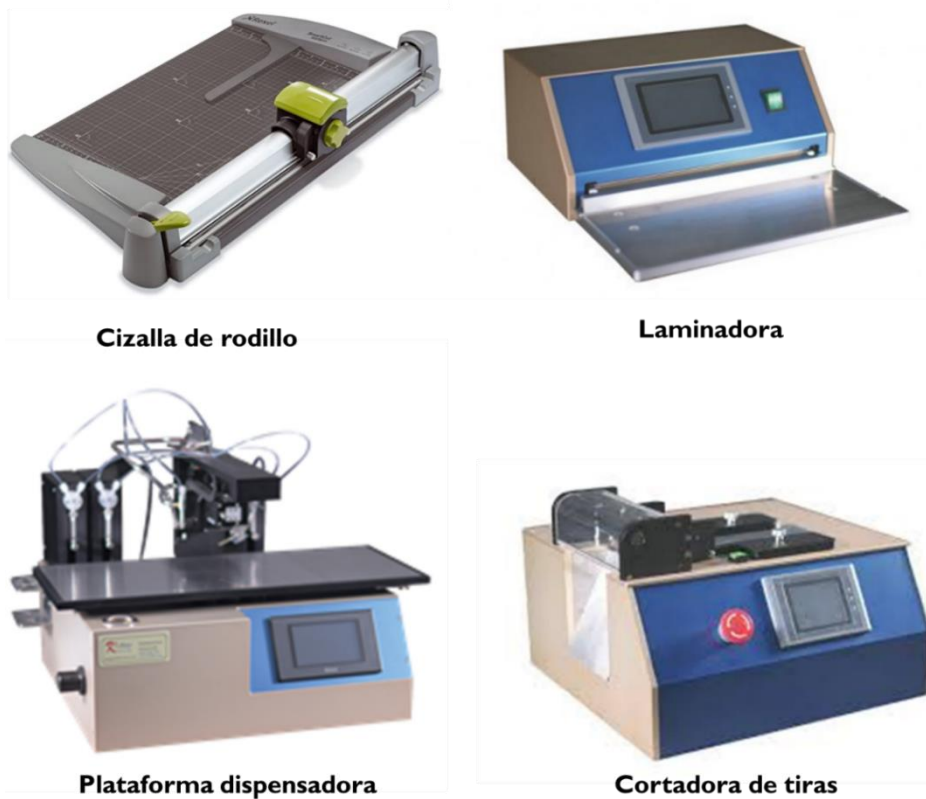


Figura 3C.8: Equipamiento necesario para la fabricación de tiras de flujo lateral.

Partiendo de estas medidas seleccionadas, en primer lugar, se cortaron los pad y la nitrocelulosa en las medidas necesarias, con ayuda de una cizalla de rodillo Rexel smartcut de Office Depot (Florida, USA). Los materiales ya cortados, se pegaron sobre el backing card adhesivo KN-221 80mm x 300mm de Kenosha (Amstelveen, Holanda), que sirve de respaldo plástico para la tira. El pegado de estos materiales se llevó a cabo con la ayuda de una laminadora manual MTB300 de Kinbio (Shangai, China), que se trata de un sistema capaz de inmovilizar el backing card a la superficie metálica mediante absorción de vacío, lo que permite colocar de forma precisa cada uno de los componentes y además dispone de un brazo metálico que puede ser configurado para generar una presión constante a la terminación de cada uno de los componentes, para asegurar la aproximación y la buena adhesión de los mismos.

Sección 3C: Inmunosensor térmico de flujo lateral (TermoLFIA)
para la detección de marcadores cancerígenos gastrointestinales

Para la **deposición de los anticuerpos** sobre la nitrocelulosa se utilizó la plataforma dispensadora XYZ HM3035 también de la casa comercial Kinbio. Para ello se utilizó el modo dispensador a una velocidad de 50m/s y las concentraciones optimizadas para cada anticuerpo. Los Ab_{cap} depositados en Lt fueron los mismos que los usados en TermoLISA.

Tiras reactivas CEA:

Línea de control (Lc): IgG anti-ratón de cabra (policlonal) Ab 7063 Abcam (1.1 mg/mL)

Línea de prueba (Lt): Anti-ratón CEA MAb3C1 (monoclonal) Hytest (1.1 mg/mL)

Tiras reactivas CA19.9:

Línea de control (Lc): IgG anti-ratón de cabra (policlonal) Ab 7063 Abcam (1.1 mg/mL)

Línea de prueba (Lt): Anti-ratón CA19.9 Mab L1C00901-L180202 (monoclonal) LincBio (0.5 mg/mL)

Tiras reactivas VEGF:

Línea de control (Lc): IgG anticuerpo anti-cabra de conejo (policlonal) ThermoFisher 31105 (1 mg/ml)

Línea de prueba (Lt): cabra anti-humano VEGF165 IgG MAB293 (policlonal) R&D systems (0.5 mg/mL)

Este mismo equipo dispone de un módulo de adsorción al vacío capaz de depositar en modo 'spray', para llevar a cabo la deposición del bioconjugado por pulverización sobre el pad de muestra/conjugado.

Una vez montado, el backing card es cubierto con un 'film' plástico que realiza la doble tarea de proteger y aproximar los distintos componentes del test. Por último, se introduce el backing card en una cortadora de tiras de guillotina en la que se puede seleccionar el ancho y se obtienen finalmente las tiras con el diseño preestablecido. (**Figura 3C.9**)

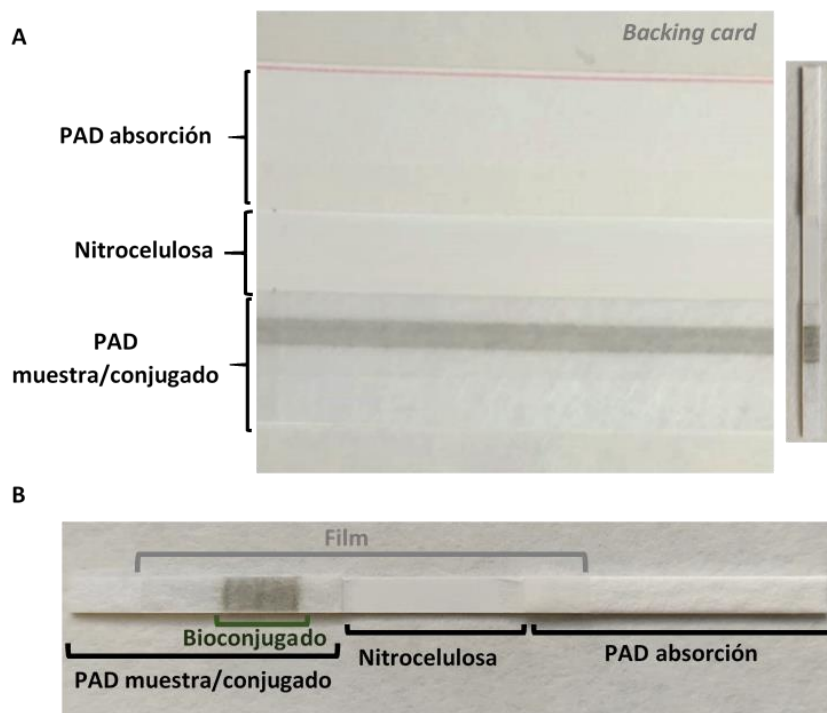


Figura 3C.9: A) Backing card montado con los anticuerpos y el bioconjugado previamente depositados sobre la nitrocelulosa y el pad de muestra/conjugado B) Una de las tiras TermoLFIA fabricada.

3C.3.2. Procedimiento evaluación de las tiras TermoLFIA

Para evaluar la sensibilidad de las tiras de flujo lateral fabricadas, se diluyó el marcador cancerígeno en la disolución amortiguadora optimizada (obteniendo las concentraciones de interés) y se agregó 100 μL de esta disolución en el extremo proximal del PAD de muestra/conjugado. Se dejó correr el frente de muestra por capilaridad a lo largo de la tira durante 5 minutos. En este momento es posible observar claramente las líneas test y control en la nitrocelulosa y llevar a cabo el análisis visual colorimétrico para obtener el resultado del test positivo (Lt visible) o negativo (Lt no visible). Luego se llevó a cabo el análisis térmico del test (quemado de nitrocelulosa y revelado con el papel termosensible), habiendo previamente dejado secar las tiras durante 15 min a 37°C o durante 45 min a temperatura ambiente.

3C.3.3. Sistema irradiación láser: análisis térmico

Las tiras secas, se colocaron en un portamuestras de vidrio y este se introdujo en un soporte plástico para ser irradiado mediante el sistema mostrado en la **Figura 3C.10**.

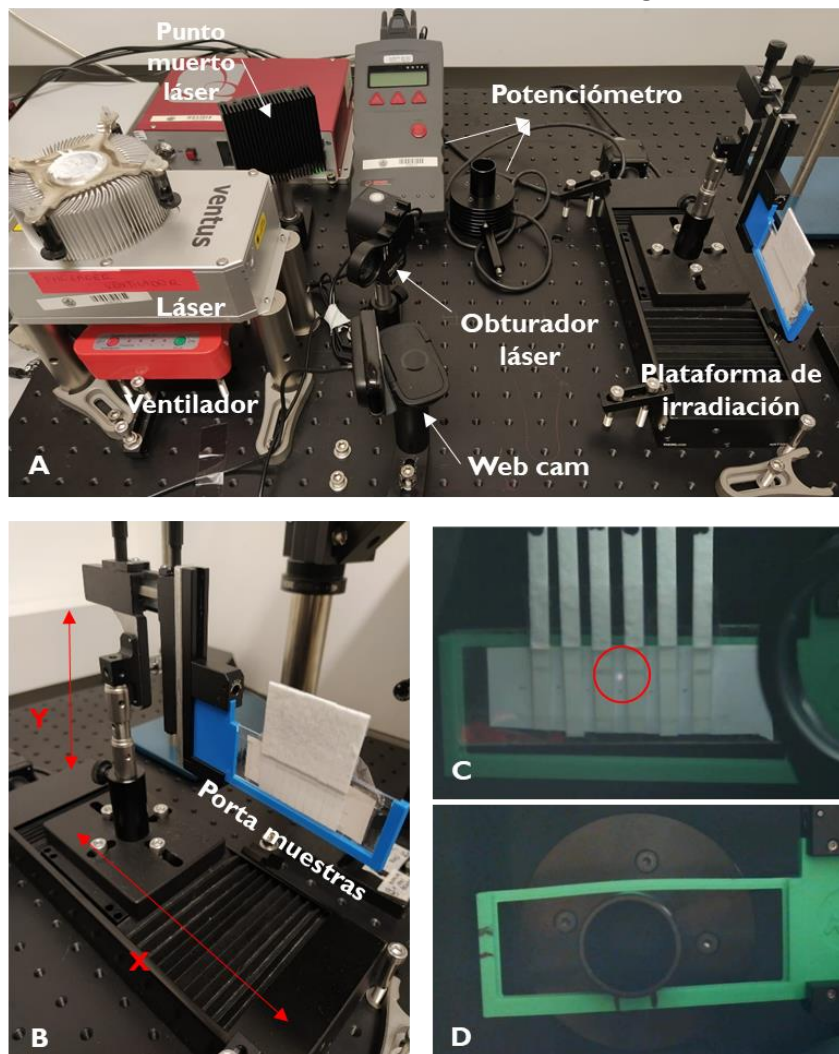


Figura 3C.10: A) Esquema del montaje instrumental para la irradiación de tiras TermoLFIA B) Plataforma de irradiación con el soporte de tiras C) Visualización web cam del soporte de tiras y el haz láser (rodeado en rojo) D) Medición de la potencia láser utilizando el potenciómetro.

Sección 3C: Inmunosensor térmico de flujo lateral (TermoLFIA)
para la detección de marcadores cancerígenos gastrointestinales

Una vez encendido el láser, este se topa con un obturador que lo dirige a un punto muerto, así, en el momento en el que se abre el obturador, el láser se dirige hacia el portamuestras, situado en la plataforma de irradiación automatizada, posible de controlar desde el ordenador en el eje X e Y. A su vez, es posible visualizar el haz láser a través de la imagen web cam, lo que permite, gracias a la plataforma automatizada, dirigir este haz a cualquier punto del portamuestras. La potencia láser también puede ser variada y controlada con un potenciómetro.

Una vez la plataforma está situada en el eje Y para que el haz láser (a la potencia elegida) esté a la altura de la línea de test, es posible mover el eje X de mm en mm hasta colocar el haz centrado en la tira a evaluar. Para iniciar la irradiación se abre el obturador y una vez acabado el tiempo de irradiación cerramos el mismo, se desplaza el eje X hasta centrar en a la siguiente tira el haz y abrimos el obturador de nuevo. El uso del obturador permite mantener el láser siempre encendido y a una potencia estable y constante.

3C.4. Resultados

3C.4.1. Optimización de las condiciones y selección de materiales para la fabricación de las tiras TermoLFIA.

Para lograr un flujo constante del analito y del bioconjugado a través de la tira y obtener los mejores resultados, se seleccionaron uno por uno los materiales que forman el test de flujo lateral, en función de las características de nuestro sistema y necesidades específicas de cada uno de los componentes. Para todos estos ensayos se utilizó el bioconjugado para la detección de CEA, AuNPRs@estreptavidina@Ab_{det_biotina_antiCEA}, optimizado para la metodología TermoLISA. (Sección 3A: apartados 3A.3.3 y 3A.3.4)

3C.4.1.1. Pad de muestra/conjugado

El objetivo principal en la selección de este pad es mantener estable el bioconjugado seco una vez depositado y asegurar su liberación del pad (re-suspensión con la muestra) de manera eficiente y reproducible hacia la nitrocelulosa. Variaciones en el material del pad y pretratamiento del mismo, así como en el modo de deposición del conjugado y secado constituyen parámetros importantes a definir para asegurar tanto a la reproducibilidad del test como una buena sensibilidad del test.

Se llevaron a cabo diversos ensayos en los que se evaluaron pads de diferente composición y características:

- Diferentes **materiales** (fibra de vidrio, poliésteres o algodones) y sus características de flujo y liberación de bioconjugado tras su re-suspensión al paso de la muestra. Todos los pad evaluados son de la casa comercial Ahlstrom-Munksjö. (**Tabla 3C.4**)

Tipo (Ahlstrom-Munksjö)	Peso base (g/m ²)	Calibre (mm)	Tasa de absorción (s/ Xcm)	Absorción de agua (mg/cm ²)	Composición
8964	75	0,43	5 (s/2 cm)	79	Fibra de vidrio
8950	50	0,25	12 (s/2 cm)	46	Fibra de vidrio
8951	75	0,38	3 (s/2 cm)	63	Fibra de vidrio
6615	135	0,51	-	-	Fibras de poliéster
6613	100	0,42	-	-	Fibras de poliéster
6614	75	0,42	5 (s/2 cm)	57	Fibras de poliéster
Relia Flow	100	0,42	21 (s/4 cm)	37	Fibras de poliéster pretratadas
601	88	0,19	120 (s/4 cm)	25	Fibra de algodón de alta pureza
238	186	0,34	150 (s/4 cm)	33	Fibra de algodón de alta pureza
237	183	0,42	86 (s/4 cm)	38	Fibra de algodón de alta pureza
222	291	0,83	20 (s/4 cm)	88	Fibra de algodón de alta pureza

Tabla 3C.4: Materiales evaluados para la selección del pad de muestra/conjugado.

- Diversos **pretratamientos del pad**, para asegurar una liberación óptima y estabilidad del bioconjugado una vez depositado. La mayoría de los materiales utilizados en los sistemas de inmunoensayo de flujo lateral son de naturaleza muy hidrofóbica y deben tratarse para ser hidrófilos. El pretratamiento se realiza por inmersión del pad en soluciones acuosas conteniendo una mezcla de proteínas consideradas inertes, tensioactivos, azúcares y/o polímeros de composición variada (**Tabla 3C.5** **Tabla 3C.5**). Tras realización de una búsqueda bibliográfica se seleccionaron aquellos pretratamientos más utilizados.

Pretratamiento	Buffer	pH	Preservantes	BSA	Tensioactivos	PVP
A	PBS 50 mM	8	Sacarosa 2,5%	5%	Tween 20 (1%)	0,5%
B	Borato 20 mM	8	Sacarosa 5% Trehalosa 2%	-	Triton x100 (0,04%)	--
C	Ac Bórico 50 mM	8	Sacarosa 1%	0,5%	Tween 20 (1%)	0,5%

Tabla 3C.5: Pretratamientos del pad de muestra/conjugado evaluados. PVP: polivinilpirrolidona

-Formulación del bioconjugado para su deposición: se trata de la disolución amortiguadora en la que se encuentra el bioconjugado y que se deposita sobre el pad. Esta disolución compromete la estabilidad de las nanopartículas y por tanto puede condicionar la liberación del bioconjugado en el tiempo. Se evaluaron tres disoluciones amortiguadoras diferentes TRIS 0.05 M pH 8, Ac. Bórico 0.05 M pH 8 y PBS 0.05 M pH 8, en todos los casos con tween 20 al 1%.

-Método de deposición del bioconjugado: se evaluó la deposición con pipeta (8 μ L del bioconjugado), la inmersión de los pads en disolución de bioconjugado y por último se compararon las condiciones óptimas con la deposición por spray utilizando la plataforma dispensadora.

- **Secado** tras el pretratamiento y deposición del conjugado: para ello se usó una cámara de secado casera, un recipiente hermético a través del cual se hizo pasar un flujo continuo de N₂. El sistema se encuentra introduce en una incubadora a 37°C y el control de la humedad (<10% recomendado) se lleva a cabo mediante un sensor colocado en el interior del recipiente (**Figura 3C.11**).



Figura 3C.11: Cámara de secado casera con flujo continuo de N₂ y control de humedad y temperatura.

Como se ha dicho, para llevar a cabo esta optimización de se seleccionó el analito CEA como modelo y se utilizó el conjugado optimizado previamente para TermoLISA, AuNPrs@estreptavidina@Ab_{det_biotina_antiCEA} en ac. Bórico 0,05M pH 8, Tween 20 1%. El primer paso consistió en **evaluar el pad más adecuado** para la deposición de los prismas comparando el uso de pipeta o inmersión del pad para llevarla a cabo. Se prepararon tiras pegando sobre el backing card únicamente la nitrocelulosa y el pad de absorción. Los pad de muestra/conjugado se cortaron y pretrataron por inmersión con la disolución de pretratamiento A y tras la deposición del bioconjugado (mediante pipeta o inmersión) y secado, se montaron en las tiras. Para poder comparar unos pads con otros se depositó 1 μ L del Ab secundario (1 mg/mL) manualmente en la nitrocelulosa. (**Figura 3C.12**) Las tiras de flujo lateral se evaluaron añadiendo

Sección 3C: Inmunosensor térmico de flujo lateral (TermoLFIA) para la detección de marcadores cancerígenos gastrointestinales

100 μ L de PBS. En todos los casos el bioconjugado fluyó a través de la tira y fue reconocido por el anticuerpo secundario, generando una línea de control clara en la nitrocelulosa.

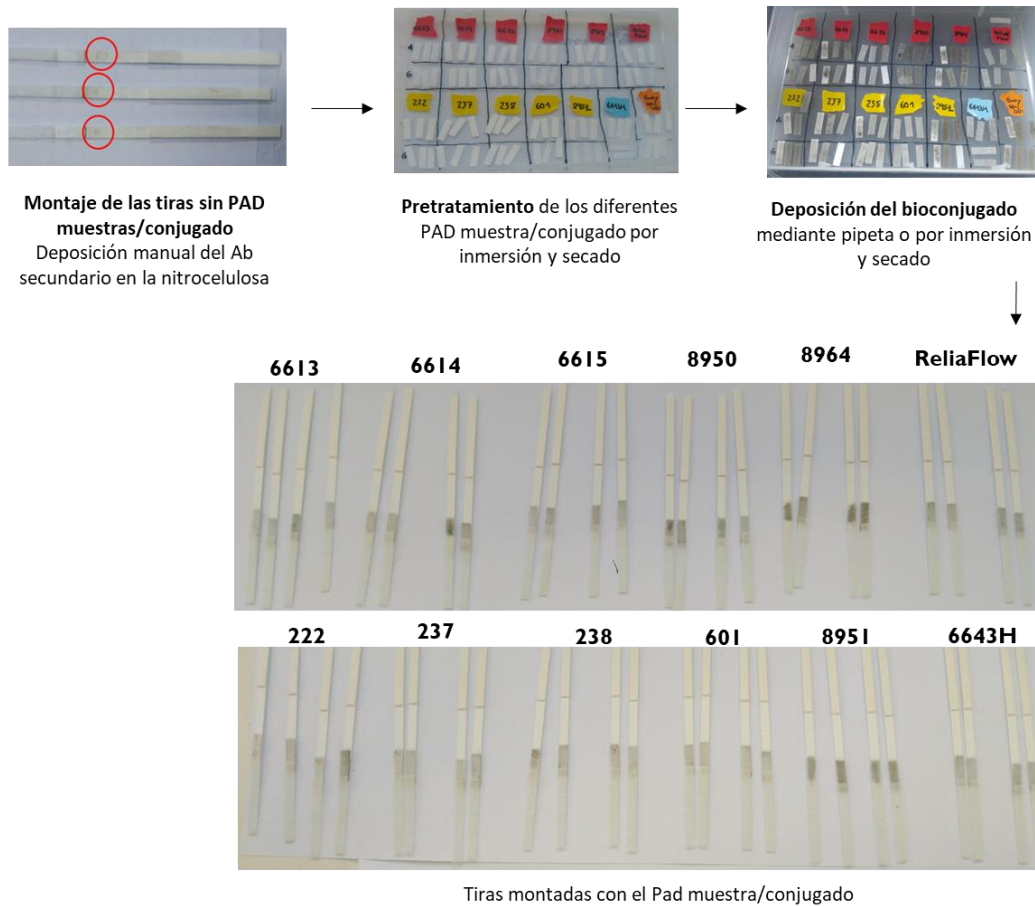


Figura 3C.12: Esquema experimental del ensayo de evaluación de los diferentes materiales y un único pretratamiento del pad muestra/conjugado y dos maneras de deposición del bioconjugado (mediante pipeta o inmersión en solución de prismas).

Para la valorar de forma cuantitativa diferencias entre los parámetros evaluados, se desarrollaron diferentes **métodos de evaluación** (Figura 3C.13):

- *Estudio de las coordenadas RGB del pad muestra/conjugado* con una cámara móvil y una aplicación móvil que permite captar las coordenadas de color RGB. Se tomaron estas coordenadas en la zona del bioconjugado antes y después de la adición de la muestra modelo (PBS) y se calculó su diferencia para cada una de las coordenadas. Un valor de coordenada RGB más bajo indica más intensidad de color. Así, tras la deposición del conjugado en el PAD, un valor de coordenada RGB más bajo indicó mayor absorción del conjugado en el mismo. Para las coordenadas RGB del pad después de la prueba de flujo lateral y la liberación del conjugado, un cambio mayor en el RGB, indicó una mayor resuspensión y por tanto liberación de bioconjugado del pad hacia la nitrocelulosa.

- *Imagen térmica IR:* después de la adición de PBS y de que fluyera por la tira de nitrocelulosa, se irradió el punto donde se encuentra el anticuerpo secundario (línea de control) que reconoce el anticuerpo anti-CEA unido en la superficie de los nanoprismas, con una potencia laser de 1500 mW durante 2 min y se recogieron las señales térmicas de calentamiento-enfriamiento. Una mayor variación de temperatura, indicó una mayor liberación del conjugado al pad.

Sección 3C: Inmunosensor térmico de flujo lateral (TermoLFIA) para la detección de marcadores cancerígenos gastrointestinales

- **Papel termosensible:** se fijó papel termosensible en la parte posterior de la tira durante la irradiación y se tomaron los valores RGB de las señales generadas, de esta forma es posible relacionar un valor RGB más bajo (más intensidad de color) con una mayor absorción y liberación del conjugado del pad.

En la **Figura 3C.13**, se muestran los métodos de evaluación junto con los resultados obtenidos en cada caso.

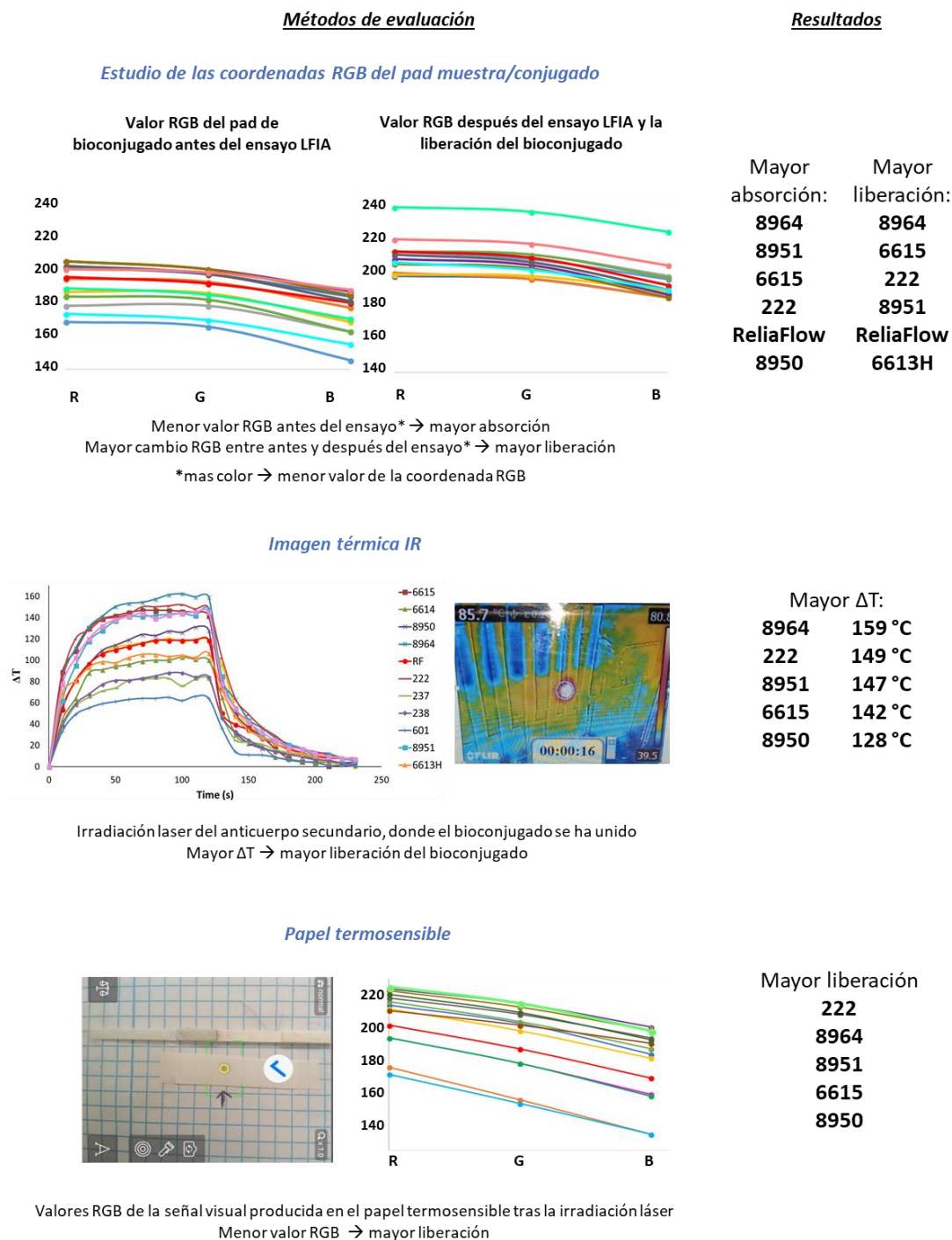


Figura 3C.13: Métodos cuantitativos desarrollados para la evaluación del mejor pad de bioconjugado/muestra. Junto con los resultados obtenidos en cada ensayo, se incluye en una clasificación donde se han ordenado los distintos materiales según su mayor a menor capacidad de absorción o liberación del bioconjugado depositado.

En cuanto al **material de pad óptimo (Tabla 3C.4)**, en el estudio de las coordenadas RGB, el pad 8964 presentó una mayor absorción del conjugado depositado en el pad y una mayor desorción del mismo al llevarse a cabo el ensayo de flujo lateral. Podemos observar que este resultado coincide con el obtenido para la evaluación por medio de imagen térmica, dado que la tira fabricada con el pad 8964 presentó una mayor variación de la temperatura al irradiar la línea de control de la tira. Por último, la evaluación mediante papel termosensible dio lugar a mayores señales visuales en el caso de 8964 y 222, casi al mismo nivel. **Por todo lo cual el material 8964 fue seleccionado como pad de muestra/conjugado.**

En cuanto al **protocolo de deposición óptimo del bioconjugado**, se observó que la inmersión proporcionó resultados más reproducibles que la deposición con pipeta, por lo cual se comparó el método de inmersión con la deposición por pulverización realizada mediante la plataforma dispensadora en modo spray, en ambos casos se utilizó bioconjugado AuNPrs@estreptavidina-biotina@Abanti-CEA a 0.5 mg/mL. Para este experimento se fabricaron tiras completas con el pad de conjugado óptimo 8964 y depositando los anticuerpos en las líneas de test (ab captura anti CEA a 1.1 mg/mL) y control (ab secundario anti-mouse a 1.1 mg/mL). Las tiras de flujo lateral resultantes se evaluaron añadiendo 100 μ L de CEA 100 ng/mL en PBS. Se tomaron las coordenadas RGB del pad de conjugado antes y después del ensayo de flujo lateral de tres tiras para cada caso (inmersión o spray) y se irradió la Lt, comparándose las señales obtenidas en papel termosensible.

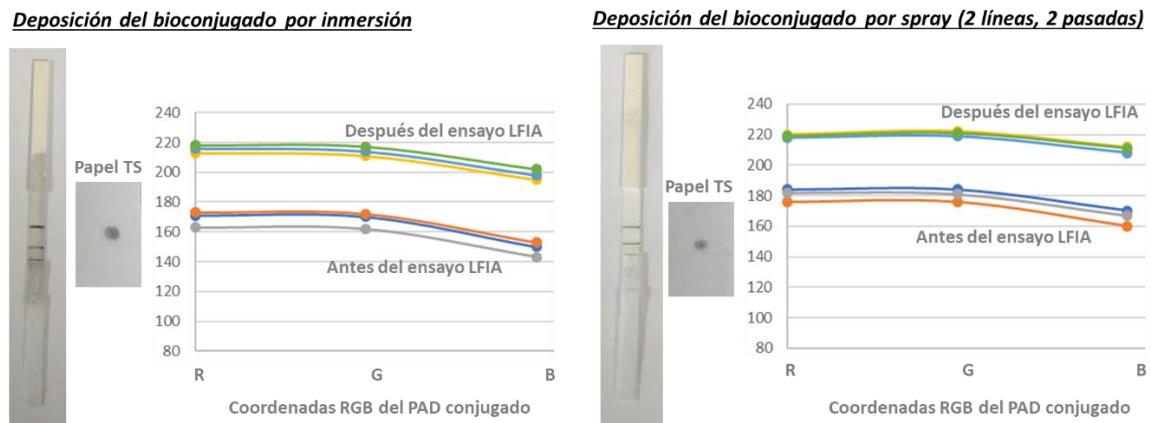


Figura 3C.14: Comparativa de la deposición del bioconjugado por el método de inmersión o el método de spray: coordenadas RGB del pad de conjugado tras absorción-desorción de bioconjugado y señales observadas en el papel termosensible (TS) tras la irradiación laser de la Lt.

Así, en la **Figura 3C.14** se puede observar cómo, la variación entre las coordenadas RGB es ligeramente mayor para el caso de la deposición por inmersión y también lo es la señal obtenida en el papel termosensible. Sin embargo, la tira de flujo lateral queda sucia en el caso de la inmovilización por inmersión, lo que implica que hay demasiado conjugado inmovilizado, que se queda atrapado en la nitrocelulosa ensuciándola y dando lugar a posibles falsos positivos. Hay que tener en cuenta que, en este tipo de ensayo, no hay un paso de lavado posterior y una vez que la muestra fluye por la tira, ocurre simultáneamente la resuspensión del bioconjugado y el lavado de la tira. Al depositar el bioconjugado por spray, este queda localizado en una zona concreta del pad cercana a la nitrocelulosa y al fluir la muestra, corre de una forma más homogénea, asegurando un mejor lavado. Además, la realización de la deposición con un equipo (dispensadora en modo spray) y no manual (inmersión), asegura la reproducibilidad del mismo, por lo **que se seleccionó como óptima la deposición del conjugado por spray.**

Por último, se **evaluaron distintas disoluciones de pretratamiento del pad de conjugado** (PBS, borato y ac. bórico conteniendo distintos estabilizantes) detalladas en la **Tabla 3C.5** en un ensayo combinado en el que también se evaluó la **formulación de la disolución amortiguadora donde resuspender el bioconjugado para su deposición** (PBS, TRIS y ac. bórico), preparándose un total de 9 tipos de tiras (3 pretratamientos x 3 formulaciones) que se muestran en la **Figura 3C.15**. Las tiras de flujo lateral se evaluaron añadiendo 100 μ L de PBS, por lo que solo es de esperar señal visual en la línea de control (test negativo), sin embargo, como muestra la figura (flechas negras) en algunos casos para el pretratamiento A y B, se observa señal colorimétrica en la línea de test (falso positivo). Por el contrario, el **pretratamiento C, elegido como óptimo**, no mostró falsos positivos para ninguna formulación. En esta figura, además, se observa que para el pretratamiento C, la formulación de ácido bórico proporcionó la mayor sensibilidad, permitiendo a su vez la reproducibilidad de los resultados pasado un mes desde la fabricación de las tiras de test.

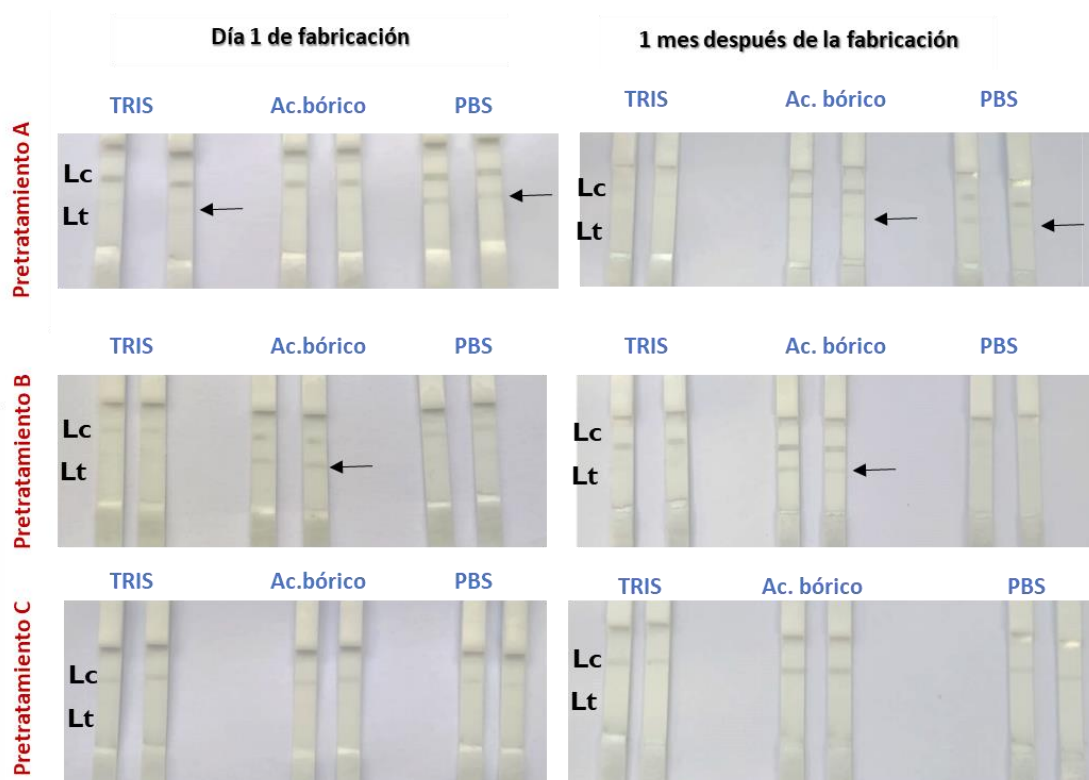


Figura 3C.15: Tiras de flujo lateral CEA fabricadas para la optimización del pretratamiento del pad del bioconjugado (en rojo) y la formulación del bioconjugado para su deposición (en azul), evaluadas el primer día de su fabricación y un mes después.

Usando la formulación de ácido bórico específica para la deposición del bioconjugado, se evaluó también cuantitativamente, la capacidad de liberación del bioconjugado del pad por estas tiras el día de su fabricación y un mes después. La **Tabla 3C.6** muestra la tabla de las coordenadas de color RGB del pad del bioconjugado antes y después del ensayo (absorción y desorción) para cada pretratamiento en los dos momentos temporales evaluados (día de fabricación y un mes después). Así, se observa que en el primer día de fabricación el pretratamiento C proporciona la mayor liberación (mayor diferencia entre las coordenadas de absorción y desorción) y que, tras

almacenar estas tiras durante un mes, este pretratamiento es el que genera un menor cambio en la desorción del bioconjugado inmovilizado en el pad de conjugado.

Día 1 de fabricación				1 mes después de la fabricación			
Pretratamiento A				Pretratamiento A			
	R	G	B		R	G	B
Adsorción	203	203	190	Adsorción	203	203	190
Desorción	217	217	205	Desorción	212	211	200
Dif	14	14	15	Dif	9	8	10
Pretratamiento B				Pretratamiento B			
	R	G	B		R	G	B
Adsorción	214	213	196	Adsorción	214	213	196
Desorción	225	224	220	Desorción	217	218	207
Dif	11	11	24	Dif	3	5	11
Pretratamiento C				Pretratamiento C			
	R	G	B		R	G	B
Adsorción	209	206	191	Adsorción	208	206	191
Desorción	229	228	220	Desorción	224	225	214
Dif	20	22	29	Dif	16	19	23

Tabla 3C.6: Coordenadas RGB y variación de las mismas (dif), en el primer día de fabricación y un mes después, de los pads de las tiras utilizando para la deposición del bioconjugado la formulación específica óptima de ácido bórico y habiendo pretratado cada pad con los tres pretratamientos evaluados.

Como **conclusiones**, en este apartado se optimizaron las condiciones del pad de conjugado seleccionándose el material 8964 y el pretratamiento C (ácido bórico 50 mM pH8, sacarosa 1%, BSA 5%, PVP 0.5% y tween 20 (1%)), así como la deposición mediante spray del bioconjugado formulado en ácido bórico 50 mM pH 8, 1% tween 20.

3C.4.1.2. Pad de absorción

Se seleccionó como óptimo el material Ahlstrom grado 222, ya que se encuentra dentro de los recomendados para su uso como pad de absorción y en el estudio recogido en la **Figura 3C.13** fue el material de fibra de algodón con un mejor resultado de absorción del conjugado.

3C.4.1.3. Nitrocelulosa

La membrana de nitrocelulosa (NC) es la parte más crítica de test de flujo lateral, ya que es la superficie sobre el cual se produce el sándwich entre el analito y los anticuerpos de captura y detección. Así, en este componente se detecta la señal analítica, ya sea sobre la propia membrana de nitrocelulosa (por el color de los nanoprismas en la Lt o por el quemado tras irradiar con el láser) o sobre el papel térmico acoplado al test. Hay dos parámetros muy importantes a tener en cuenta para la elección de la nitrocelulosa:

-*Velocidad de flujo capilar (VFC)*: está definido como el tiempo (s) requerido para que la muestra fluya completamente por una membrana de 4 cm de largo. Una velocidad de flujo capilar más lenta indica una mayor sensibilidad para la prueba de lateral flow, debido a que los tiempos de residencia del bioconjugado en la línea test y control son más largos. Sin embargo, como

contrapartida, un flujo demasiado lento, puede provocar problemas de adsorción inespecífica en la línea de test y provocar falsos positivos.

-Bloqueo de la membrana: con ello se evita la unión inespecífica de las nanopartículas a la membrana mientras fluyen por ella. El bloqueo puede ser por inmersión o ‘al vuelo’, opción seleccionada en este caso. La nitrocelulosa se bloquea con el pretratamiento que se libera del pad de conjugado a la vez que la muestra y el bioconjugado fluyen por la tira.

Partiendo de estos conceptos, se evaluaron cuatro tipos de nitrocelulosa diferentes, todos ellos de la marca GE Healthcare (Chicago, USA) y se fabricaron tiras CEA depositando en todos en la nitrocelulosa, únicamente anticuerpo secundario (ab secundario anti-mouse a 1.1 mg/mL) en la correspondiente Lc. Para evaluar como fluye el bioconjugado en cada una de las NC, se añadieron 100 μ L PBS como para resuspender el bioconjugado del pad.

La **Figura 3C.16** muestra el aspecto de las tiras tras el ensayo de flujo lateral; en la nitrocelulosa C apenas se observa línea de control indicativo que el flujo con esta nitrocelulosa es demasiado rápido para un reconocimiento adecuado de los anticuerpos depositados. La nitrocelulosa D mostró un flujo muy lento con un frente no uniforme, resultando en una nitrocelulosa sucia (absorción inespecífica) al final del ensayo. Las nitrocelulosas A y B permiten ambas el flujo de la muestra con un frente uniforme asegurando que las dos quedan limpias al final del ensayo. Sin embargo, la nitrocelulosa A (FF80HP) muestra un flujo experimental más lento (el bioconjugado tarda más tiempo en recorrer la tira), por lo que se observa una L más intensa, lo que se traduce en una mayor sensibilidad.

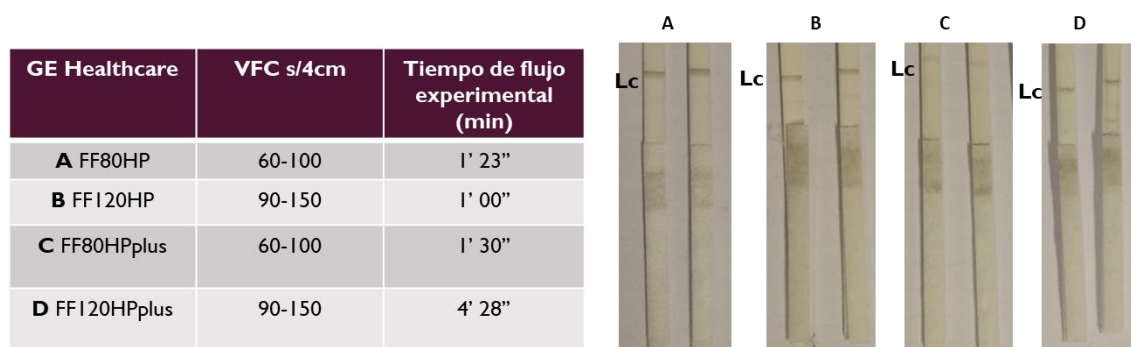


Figura 3C.16: Características de los cuatro tipos de nitrocelulosa evaluados y aspecto de las tiras de flujo lateral tras el ensayo, donde se observan la intensidad de las líneas de control (ab secundario anti-mouse a 1.1 mg/mL) en cada caso.

Como se ha dicho, para el análisis térmico del inmunoensayo TermoLFIA, una opción es el análisis del quemado directo de la nitrocelulosa (**Figura 3C.5**), por ello se decidió evaluar también, el nivel de quemado de las membranas A y B con el bioconjugado depositado a diferentes concentraciones (deposición manual de 1 μ L de bioconjugado) y a diversas potencias láser (300 y 500 mW). Como se observa en la **Figura 3C.17**, la nitrocelulosa A produjo un mayor quemado con la potencia más baja.

Sección 3C: Inmunosensor térmico de flujo lateral (TermoLFIA) para la detección de marcadores cancerígenos gastrointestinales

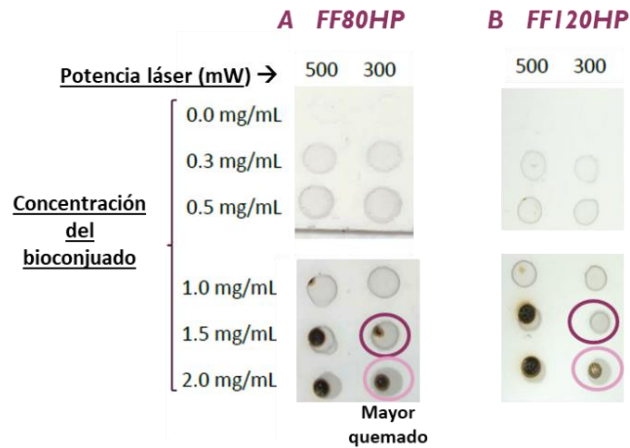
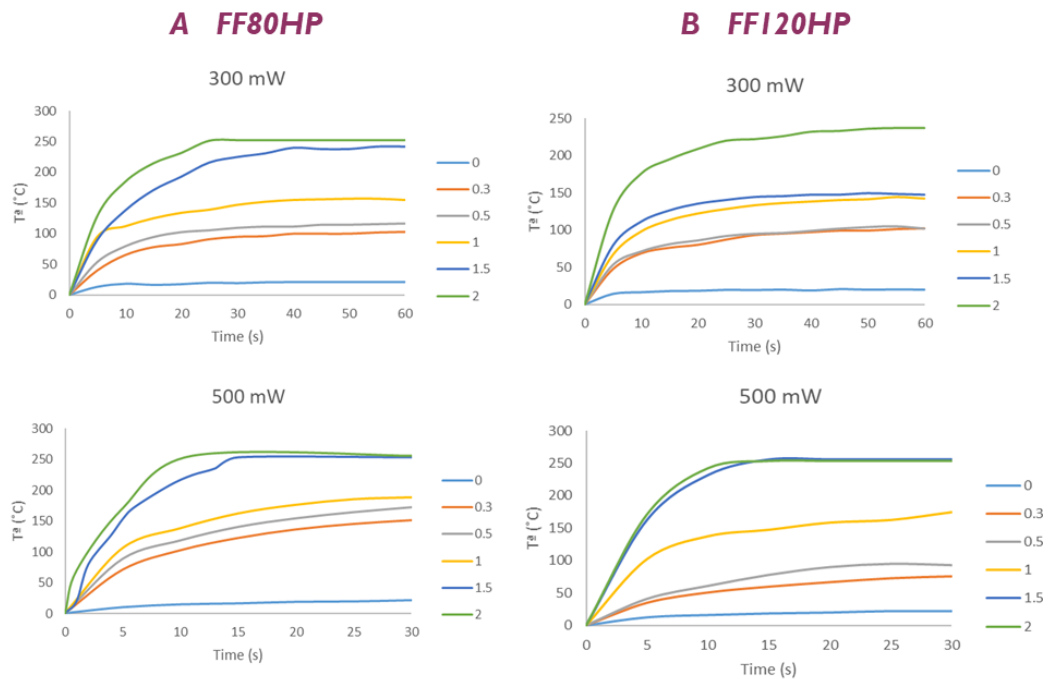


Figura 3C.17: Evaluación del quemado de la nitrocelulosa a las potencias de irradiación 300 y 500 mW (durante 1 minuto) de las diversas concentraciones del bioconjugado depositado.

Además, el seguimiento de la irradiación por imagen térmica, permite obtener las señales térmicas a cada potencia evaluada (**Figura 3C.18**). Representando en cada caso la temperatura máxima alcanzada frente a la concentración de conjugado, se obtuvieron las sensibilidades para cada nitrocelulosa, observándose una sensibilidad mucho mayor en el caso de la NC FF80HP (A), que se seleccionó como óptima.



Potencia (mW)	Sensibilidad NC A	Sensibilidad NC B
300 mW	I 6 I	97
500 mW	I 64	I I I

Figura 3C.18: Señales térmicas obtenidas por imagen térmica obtenidas al irradiar diversas concentraciones de bioconjugado para las diferentes nitrocelulosas evaluadas a ambas potencias laser.

La **Tabla 3C.7**, muestra un resumen de los factores optimizados en este apartado 3C.4.1:

	Pad muestra/conjugado	Nitrocelulosa	Pad absorción
Material	8964	FF80HP (A)	222
Pretratamiento	C	Al vuelo	-
Formulación bioconjugado	Ac. Bórico 50 mM pH 8, 1% Tween 20		

Tabla 3C.7: Optimización de las condiciones y materiales seleccionados para la fabricación de las tiras TermoLFIA.

3C.4.2. Optimización de las condiciones de deposición por spray del bioconjugado.

Para la deposición de bioconjugado, como se ha dicho, se utilizó el modo spray de la plataforma dispensadora y se optimizaron varios parámetros:

- La concentración de bioconjugado seleccionada fue 0,5 mg/ml, a la cual los AuNPrs biofuncionalizados se mantienen estables en el tiempo.
- El número de líneas de bioconjugado
- El número óptimo de pasadas de spray sobre una misma línea

Para la optimización de estos dos últimos parámetros se prepararon tiras anti-CEA y se evaluaron con controles positivos CEA 50 ng/mL. Como se muestra en **Figura 3C.19**, por un lado, el número óptimo de pasadas de spray en la misma línea es 4 (5 min de espera entre pasada y pasada), que proporciona una mayor homogeneidad en la línea y mayor liberación del bioconjugado.

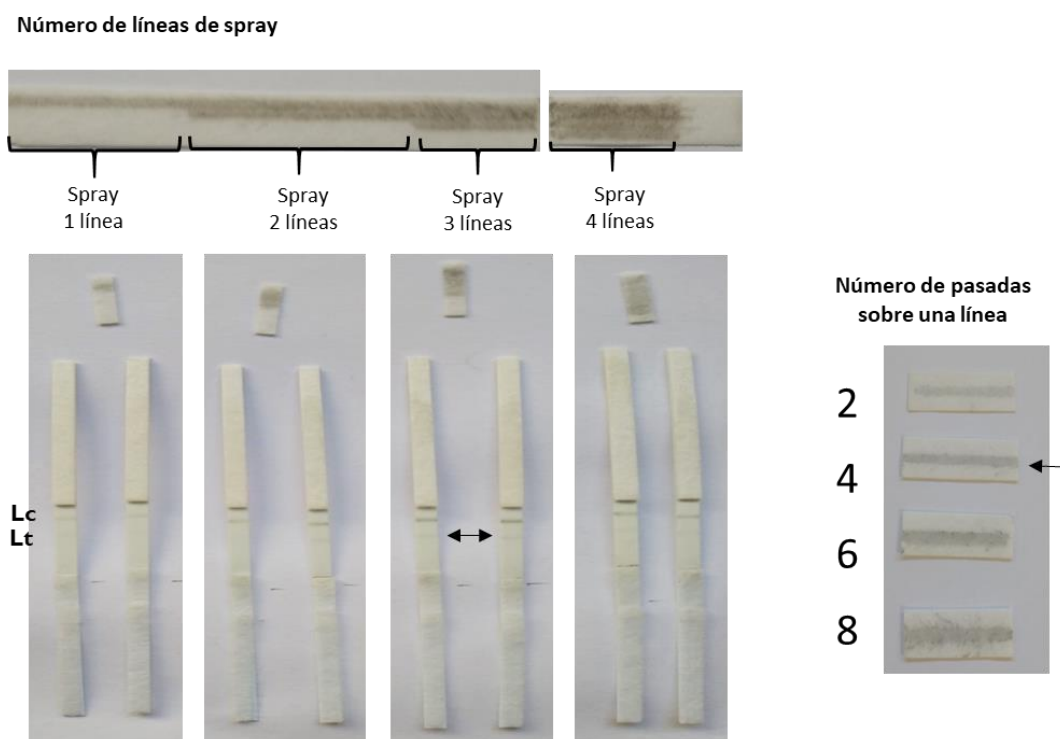


Figura 3C.19: Evaluación de la deposición del bioconjugado mediante el modo spray: número de líneas y número de pasadas sobre cada línea.

En cuanto a la optimización del número de líneas, en la **Figura 3C.19** se observa como la visualización de las líneas de test y control mejora con el número de líneas, hasta las 4 líneas de spray con las que obtenemos una menor sensibilidad. Por ello los **parámetros óptimos para la inmovilización del bioconjugado mediante spray son 3 líneas, 4 pasadas.**

Es importante destacar que los bioconjugados utilizados para la detección de cada marcador cancerígeno por TermoLFIA, son los optimizados previamente para TermoLISA (*sección 3A: aparatos 3A.3.3 y 3A.3.4*).

3C.4.3. Evaluación y acoplamiento del papel termosensible

Con todos los parámetros anteriores optimizados y las tiras definitivas fabricadas, se seleccionó el papel termosensible a utilizar, para ello se evaluó la respuesta de dos tipos de papel termosensible (A y B) a diversas temperaturas (**Figura 3C.20**). De esta manera se seleccionó como óptimo el papel termosensible B, por tener un rango dinámico más bajo, es decir, es posible obtener señal térmica en el papel a menor temperatura.

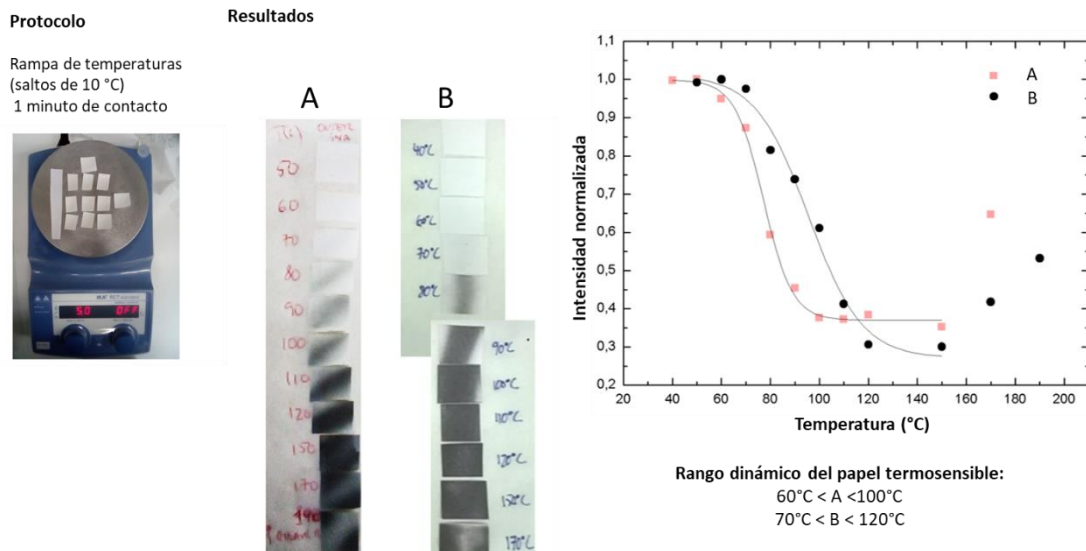


Figura 3C.20: Caracterización de dos tipos diferentes de papel térmico A y B.

Para llevar a cabo el proceso de análisis de térmico acoplado el papel termosensible, se evaluaron los dos esquemas de irradiación posibles (**Figura 3C.21**), con el papel delante o detrás de la tira de flujo lateral. Para ello se depositó manualmente en la nitrocelulosa diversas concentraciones del bioconjugado y se evaluó el quemado directo de la nitrocelulosa, observando que para una misma concentración de bioconjugado, el papel termosensible detrás, proporcionó mayor quemado y por tanto una mayor sensibilidad. Esto es debido a que el posicionamiento del papel termosensible delante de la tira produce una pérdida de la potencia del láser que llega a la nitrocelulosa. El **esquema de irradiación óptimo fue el del papel termosensible detrás de la tira.**

Sección 3C: Inmunosensor térmico de flujo lateral (TermoLFIA) para la detección de marcadores cancerígenos gastrointestinales

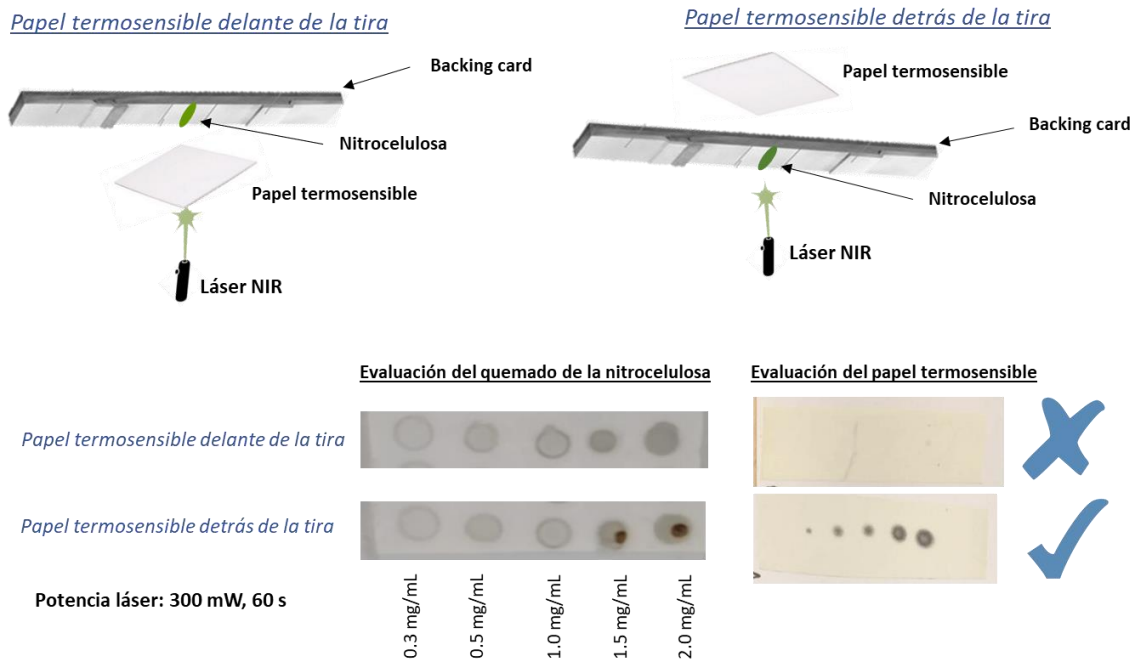


Figura 3C.21: Esquemas de irradiación laser para el acoplamiento del papel termosensible y evaluación del mismo.

Finalmente, se evaluó de la misma forma, la potencia del láser y la capacidad de amplificación del papel termosensible, con diferentes concentraciones de bioconjugado (**Figura 3C.22**). Se observa que, en los casos de potencias y concentraciones más bajas (encuadradas en colores), no se produce quemado en la nitrocelulosa. Sin embargo, en estos casos, si se observa señal en el papel termosensible, confirmando la amplificación que produce su uso en estas mismas mediciones.

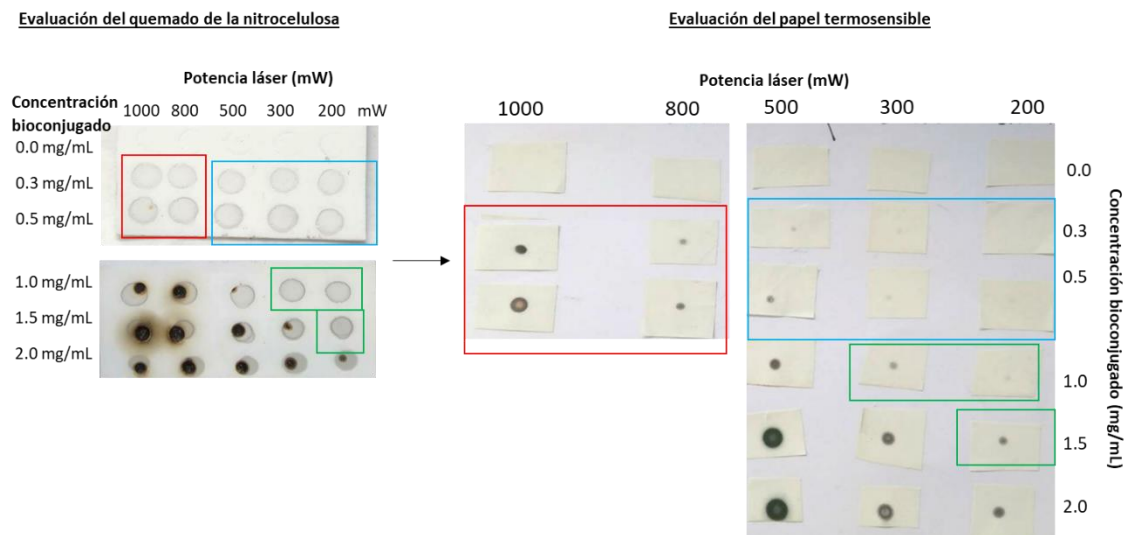


Figura 3C.22: Evaluación de la potencia láser y capacidad de amplificación del papel termosensible frente al quemado de la nitrocelulosa.

3C.4.4. Lectura de la señal analítica RGB en papel termosensible

Como ya se ha explicado, las principales ventajas del uso de papel termosensible acoplado a este sistema son:

- Proporcionar una amplificación a la señal de quemado obtenida en la nitrocelulosa. Además, incluso en los casos de concentraciones de analito más bajas (0-25 ng/mL) en las que no ocurre el quemado directo en la nitrocelulosa, es posible observar una señal de color gris en el papel termosensible.

- Esta señal de escala de grises puede permitir, además de la detección cualitativa de bajas concentraciones de analito, la cuantificación de la señal colorimétrica mediante el estudio de las coordenadas de color RGB, utilizando la cámara de un Smartphone y una aplicación móvil RGB (Color Grab). Con esta aplicación gratuita y disponible en Google Play, podemos capturar el color en un espacio limitado constante (círculo amarillo) (**Figura 3C.23A**) y una vez almacenado el color, la aplicación descompone el color y proporciona información colorimétrica en diferentes códigos como las coordenadas RGB (**Figura 3C.23B**).

Es importante resaltar que al utilizar para todos los casos el mismo espacio en el que se captura el color (diámetro del círculo amarillo), las coordenadas finales de cada señal dependerán tanto de la intensidad de la escala de grises como del tamaño del punto de color (más grande cuanto mayor sea el calor desprendido y por tanto la concentración de analito).

En el caso de los colores grises, la coordenada B, es la que experimenta una mayor variación, por lo que será la seleccionada para el análisis de las señales en el papel termosensible y en cada uno de los casos, se representará su valor frente a la concentración de antígeno.



Figura 3C.23: A) Interfaz de la aplicación Color Grab disponible en Google play **B)** Información colorimétrica proporcionada por la aplicación en los códigos de color RGB o HSV, para cada una de las señales del papel termosensible evaluadas.

3C.4.5. Características analíticas del método TermoLFIA para la detección de marcadores cancerígenos gastrointestinales en PBS.

Utilizando los materiales optimizados junto con los protocolos y métodos seleccionados, se fabricaron las tiras de flujo lateral para cada uno de los marcadores cancerígenos estudiados y se evaluaron en el rango de concentraciones de interés seleccionándose la potencia del láser y el tiempo de irradiación óptimo en cada caso. Así se obtuvieron para cada marcador cancerígeno las señales colorimétricas visuales de la línea test y control y tras la irradiación laser, se observó el quemado directo de la nitrocelulosa. Se obtuvieron además las señales en escala de grises en el papel termosensible acoplado a la parte posterior de la tira. La obtención de las coordenadas RGB de estas señales y su representación analítica permitió la obtención de las características analíticas del método.

3C.4.5.1. Cuantificación TermoLFIA de CEA

La cuantificación del antígeno carcinoembrionario se llevó a cabo en el rango de 1 a 100 ng/ml. La **Figura 3C.24**, muestra los tres tipos de transducción posibles para la evaluación de las tiras TermoLFIA.

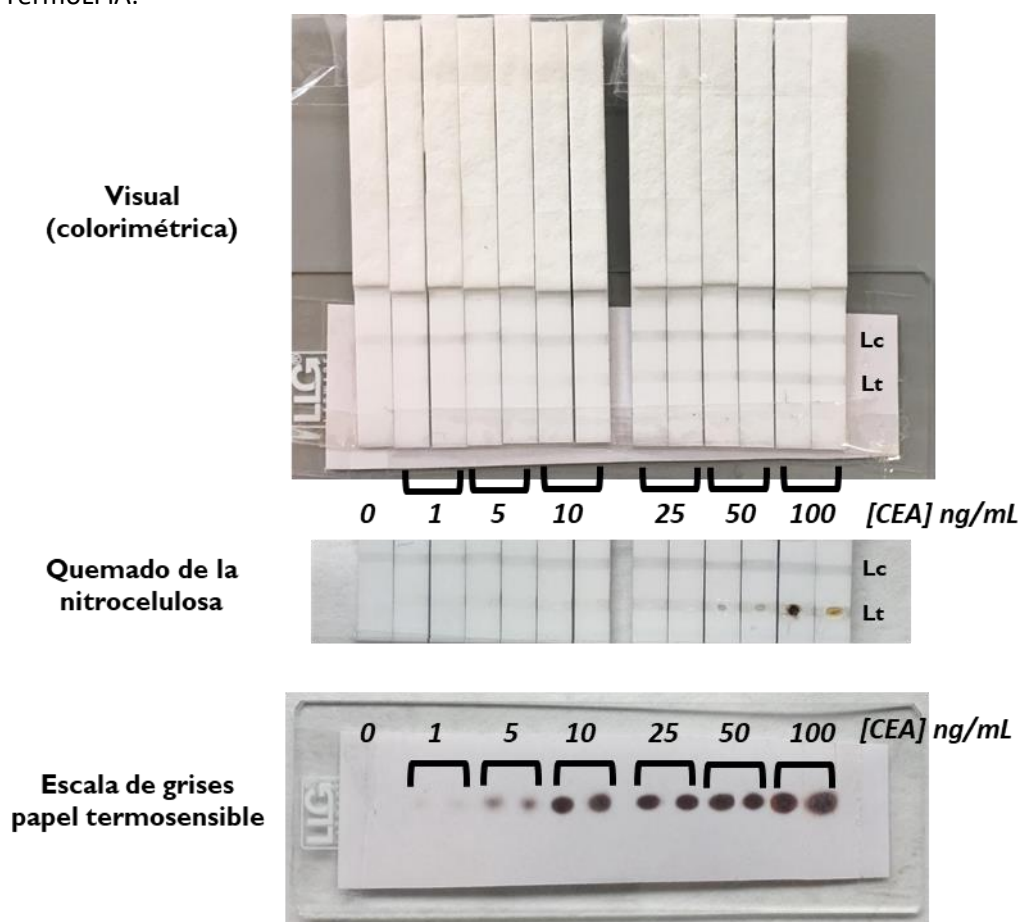


Figura 3C.24: Tiras de flujo lateral fabricadas para la detección de antígeno carcinoembrionario (CEA) en el rango de 0-100 ng/mL y las tres transducciones de la señal posibles. Antes de la irradiación (transducción visual) y tras la irradiación 2 min (para 25-100 ng/mL) y 4 min (para 0-

10 ng/mL) con una potencia laser NIR de 1500 mW (señal de quemado en nitrocelulosa y señal en escala de grises en papel termosensible).

Se observa, en primer lugar, la transducción visual de tiras LFIA antes del quemado, junto con el aspecto de la nitrocelulosa tras la irradiación laser y las señales del papel termosensible. Para evitar la saturación de la señal a las concentraciones altas, la irradiación de las tiras se llevó a cabo en dos rangos de 0 a 10 ng/mL (2 minutos) y de 25 a 100 nm/mL (4 minutos). De esta manera se observó, la posibilidad de la detección visual colorimétrica directa de 25 a 100 ng/mL, el quemado de la nitrocelulosa (en el caso de 50 y 100 ng/mL) y la amplificación de la señal en papel termosensible hasta 1 ng/mL.

Este mismo estudio se repitió con un nuevo lote de tiras, para poder comparar así los resultados y estudiar la reproducibilidad entre lotes. Para ello, se llevó a cabo con cada lote de tiras LFIA, el análisis de coordenadas RGB de las señales en papel termosensible de escala de grises para cada concentración de CEA, representando el valor de una de estas coordenadas (coordenada B, la más sensible para colores grises) frente a la concentración de CEA (**Figura 3C.25**). Se obtuvo así, un calibrado para cada rango evaluado: el rango más bajo (hasta 10 ng/mL) en el que la irradiación se llevó a cabo durante 4 min y el rango más alto (desde 25 ng/mL) en el cual 2 min de irradiación fueron suficientes provocándose saturación de la señal por el quemado excesivo de la nitrocelulosa. Así, se realizó un ajuste lineal para concentraciones inferiores a 10 ng/mL permitiendo la cuantificación de CEA en este intervalo y un ajuste polinómico de segundo grado para concentraciones entre 25 y 100 ng/mL de CEA, que permite una determinación semicuantitativa en este rango.

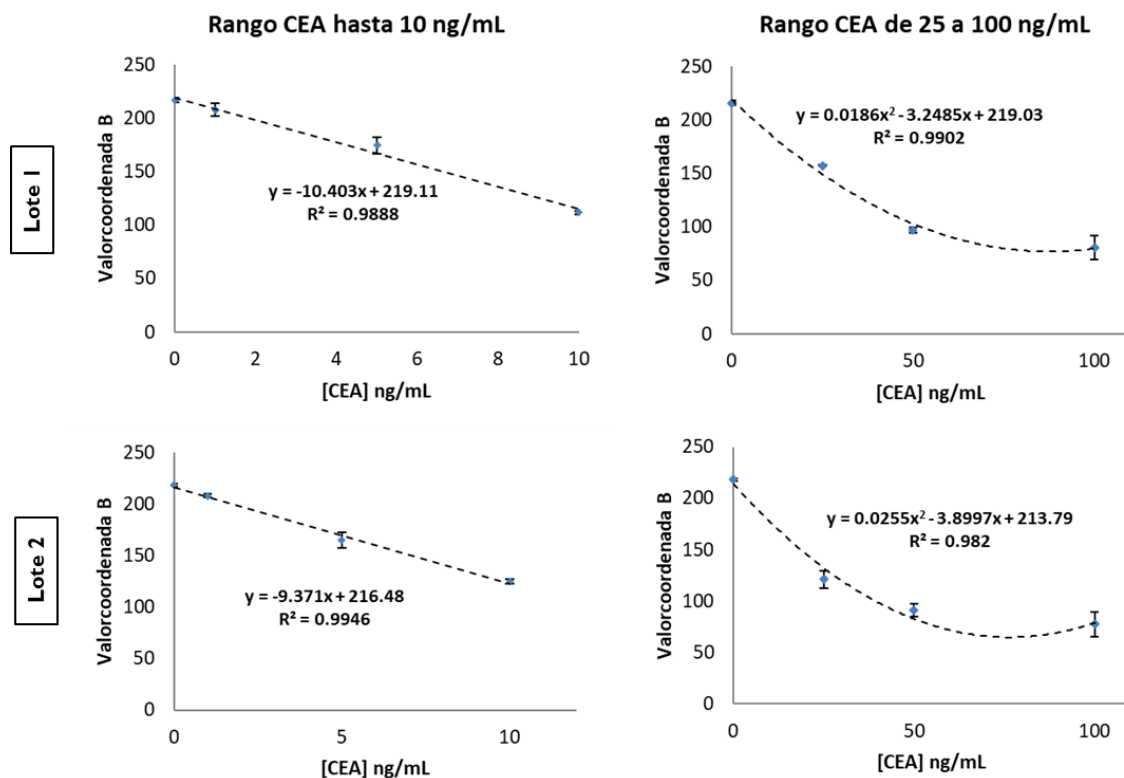


Figura 3C.25: Representación de la coordenada B obtenida del análisis RGB de las señales en papel termosensible para cada concentración de CEA evaluada mediante las tiras termoLFIA. Se muestran los ajustes para ambos rangos evaluados y cada uno de los lotes de tiras preparadas.

De estos calibrados es posible extraer las características analíticas del método para cada lote, mostradas en la **Tabla 3C.8**. De esta forma es posible comparar estadísticamente las pendientes de ambos lotes mediante un análisis de la regresión lineal al 95% (**Anexo 3C**). Así la evaluación de los intervalos de confianza de la pendiente y la 'oo' al 95% confirman que no hay diferencias significativas entre las pendientes de ambos lotes, confirmándose la robustez del método.

CEA	Rango evaluado (ng/mL)	Sensibilidad	LD (ng/mL)	LC (ng/mL)	DER%
TermoLFIA (lote 1)	< 10	10,4	0,60	2,01	4,46
	25-100	3,24	1,94	5,48	4,56
TermoLFIA (lote 2)	< 10	9,37	0,45	1,49	1,94
	25-100	3,89	1,07	3,60	7,54

Tabla 3C.8: propiedades analíticas del método TermoLFIA para la detección de CEA en cada lote de tiras fabricado.

Estas propiedades analíticas muestran además una mejora considerable en el LC y el LD en comparación con el método ELISA colorimétrico e incluso mejores que para el TermoLISA, como se observa en la tabla comparativa **Tabla 3C.9**. Además, esta técnica ofrece la disminución de los límites de detección respecto a los métodos de detección de CEA actualmente comerciales y la posibilidad de cuantificar la muestra mediante una metodología sencilla y accesible (uso de Smartphone). De esta forma, a pesar de ser un método rápido, las tiras TermoLFIA son capaces de alcanzar límites de cuantificación mejores que los métodos más convencionales en las mismas condiciones, obteniéndose resultados robustos y reproducibles.

CEA (ea > 5 ng/mL)*	Rango (ng/mL)	LD (ng/mL)	LC (ng/mL)	DER %
ELISA colorimétrico (PBS)	18,58 - 100	5,57	18,6	20,8
TermoLISA (PBS)	3,03 -100	0,91	3,03	11,6
TermoLFIA (PBS)	2,01-10	0,60	2,01	4,46
	5,48 -100	1,94	5,48	4,56

Tabla 3C.9: Comparativa de las propiedades analíticas del método termoLFIA frente al ELISA colorimétrico clásico y el método TermoLISA para la determinación del marcador cancerígeno CEA en PBS. *ea: valor a partir del cual se considera enfermedad activa.

3C.4.5.2. Cuantificación TermoLFIA de VEGF

La cuantificación del factor de crecimiento endotelial se llevó a cabo de la misma manera en el rango de 1 a 100 ng/ml. La **Figura 3C.26**, muestra las tiras LFIA para la detección de VEGF y su evaluación visual colorimétrica, quemado de la nitrocelulosa tras la irradiación laser y las señales del papel termosensible.

De esta manera se observó, por un lado, la posibilidad de la detección visual colorimétrica directa hasta 1 ng/mL y, por otro lado, en dos rangos de irradiación, el quemado de la nitrocelulosa en concentraciones bajas como 5 ng/mL, así como la amplificación de la señal en

papel termosensible hasta 0,10 ng/mL. La irradiación de las tiras se llevó a cabo en dos rangos de 0 a 5 ng/mL (1 minutos) y de 5 a 100 nm/mL (30 segundos).

Es importante resaltar, que las señales del papel termosensible obtenidas para concentraciones altas, mostraron zonas blancas (en el centro de la señal) debido al exceso de calor absorbido por el papel (saturación de señal). Sin embargo, este hecho no debería ser un problema en la cuantificación colorimétrica, ya que la captura del color mediante la aplicación Color Grab, se da en un espacio limitado constante (**Figura 3C.23A**) que engloba toda la señal. Así, las coordenadas finales de cada señal dependen no solo de la intensidad en la escala de grises, sino también del tamaño punto de color el color.

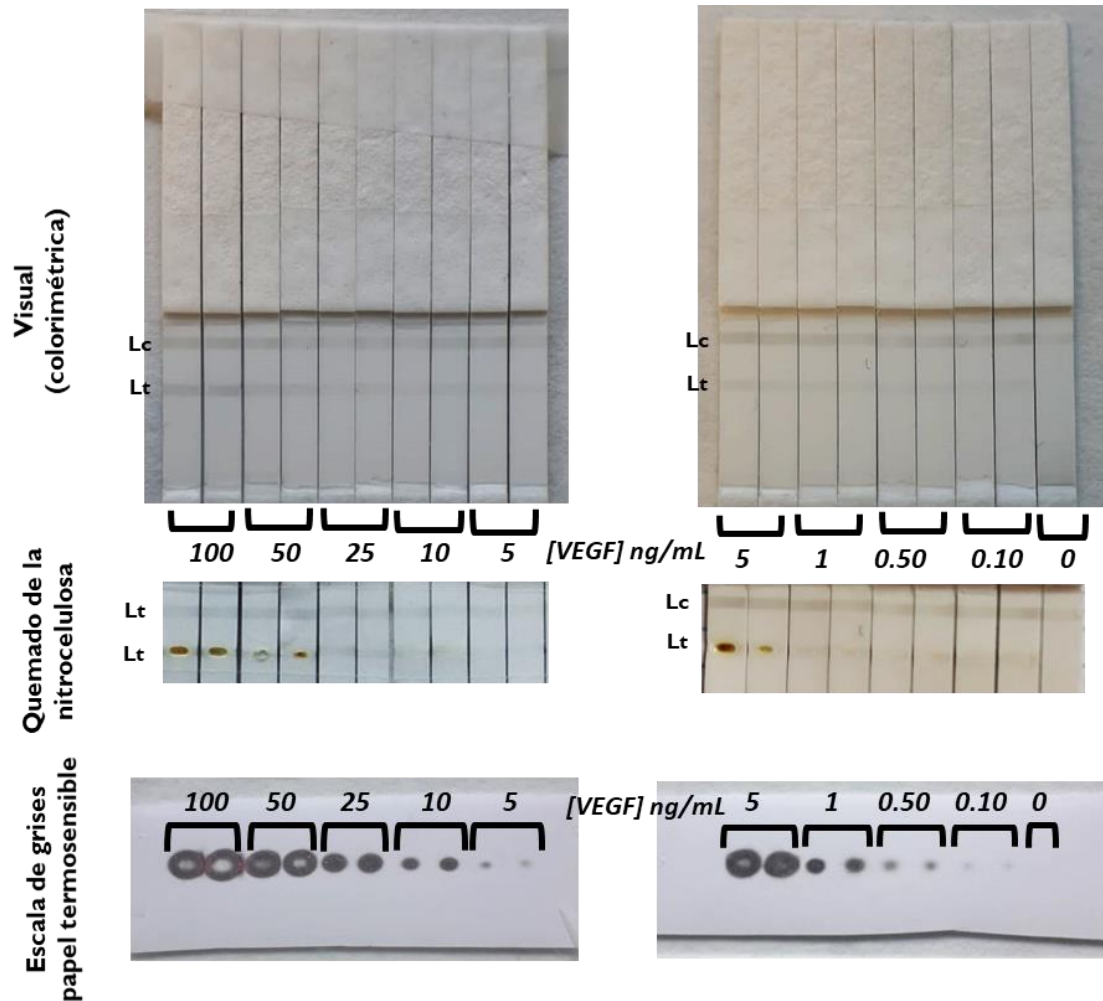


Figura 3C.26: Tiras de flujo lateral fabricadas para la detección de factor de crecimiento endotelial (VEGF) en el rango de 0-100 ng/mL y las tres transducciones de la señal posibles. Antes de la irradiación (transducción visual) y tras la irradiación 30 seg (para 5-100 ng/mL) y 1 min (para 0-5 ng/mL) con una potencia laser NIR de 1800 mW (señal de quemado en nitrocelulosa y señal en escala de grises en papel termosensible).

Así, se llevó a cabo el análisis de las coordenadas RGB de las señales en papel termosensible para cada concentración de VEGF, como en el caso anterior y se realizó un ajuste polinómico de segundo grado para cada rango. Así, la **Figura 3C.27A** muestra un buen ajuste en ambos casos a un polinomio de segundo grado.

Sección 3C: Inmunsensor térmico de flujo lateral (TermoLFIA) para la detección de marcadores cancerígenos gastrointestinales

Con el fin de estudiar si la saturación observada en el papel termosensible (zona blanca en el centro de la señal) afecta en la cuantificación colorimétrica RGB, los valores más altos de cada rango se eliminaron, realizándose los ajustes lineales que se muestran en la **Figura 3C.27B**. En ellas se observa que la eliminación de las concentraciones más altas en cada rango da lugar un ajuste lineal en ambos casos, permitiendo la cuantificación de VEGF en este intervalo. Un ajuste polinómico de segundo grado permite una determinación semicuantitativa en los rangos completos.

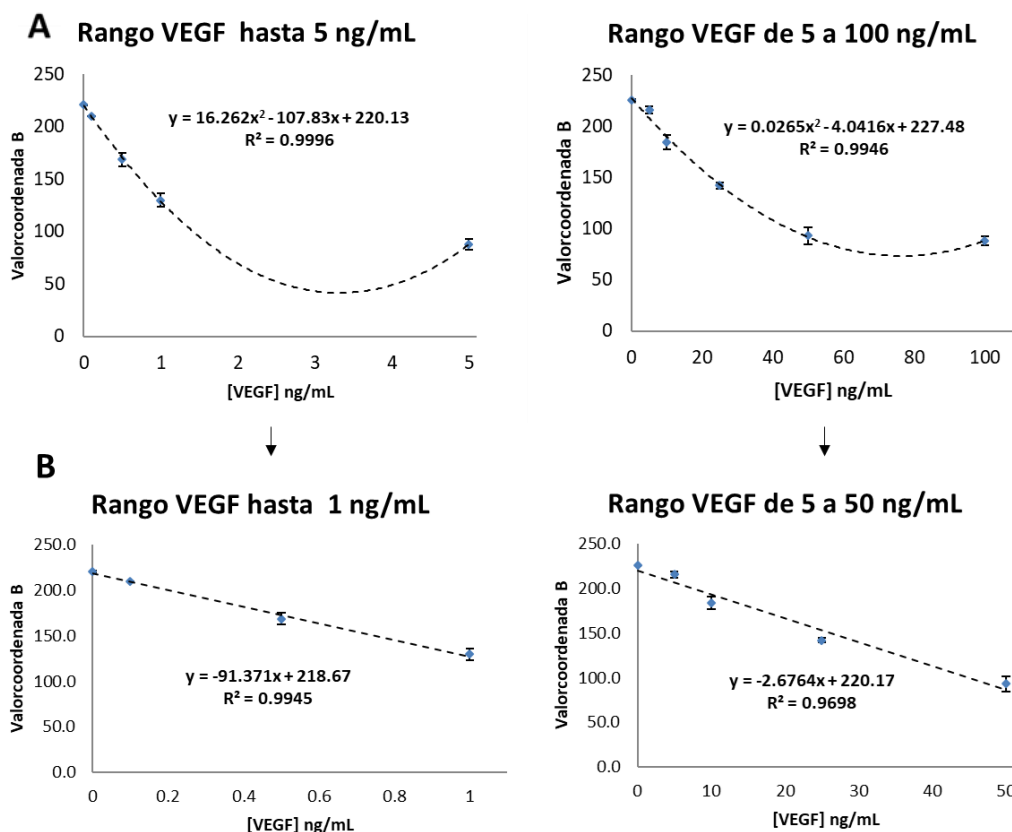


Figura 3C.27: Representación de la coordenada B obtenida del análisis RGB de las señales en papel termosensible para cada concentración de VEGF evaluada mediante las tiras TermoLFIA. **A)** en el rango de concentraciones altas y bajas y **B)** en estos mismos rangos pero eliminando las concentraciones más altas en cada uno.

De estas calibraciones es posible extraer las características analíticas del método para cada intervalo, mostradas en la **Tabla 3C.10**.

VEGF	Rango evaluado (ng/mL)	Sensibilidad	LD (ng/mL)	LC (ng/mL)	DER%
TermoLFIA	< 1	91,4	0,023	0,077	2,25
	5-50	2,67	0,78	2,62	3,38

Tabla 3C.10: Propiedades analíticas del método TermoLFIA para la detección de VEGF.

Estas propiedades analíticas muestran una gran mejora en el LC y el LD en comparación con el método colorimétrico y el TermoLISA, como se observa en la **Tabla 3C.11**. Los resultados obtenidos para el método TermoLFIA permiten alcanzar los valores sumamente bajos de este marcador cuando la enfermedad es activa (>0,13 ng/mL), permitiendo un límite de detección ultra bajo de 0,023 ng/mL, así como la cuantificación de hasta 0,077 ng/mL de VEGF, gracias a la transducción del papel termosensible y la consecuente amplificación de la señal térmica.

VEGF (ea > 0,13 ng/mL)*	Rango (ng/mL)	LD (ng/mL)	LC (ng/mL)	DER %
ELISA colorimétrico (PBS)	4,76 - 100	1,42	4,76	12,1
TermoLISA (PBS)	1,88 - 100	0,56	1,88	10,5
	0,077- 1	0,023	0,077	2,25
TermoLFIA (PBS)	2,36 – 50	0,78	2,63	3,38

Tabla 3C.11: Comparativa de las propiedades analíticas del método TermoLFIA frente al ELISA colorimétrico clásico y el método TermoLISA para la determinación del marcador cancerígeno VEGF en PBS. *ea: valor a partir del cual se considera enfermedad activa.

3C.4.5.3. Cuantificación TermoLFIA de CA19.9

La cuantificación del antígeno carbohidrato 19.9 se llevó a cabo como en los casos anteriores y en el rango de 1 a 100 U/ml (**Figura 3C.28**).

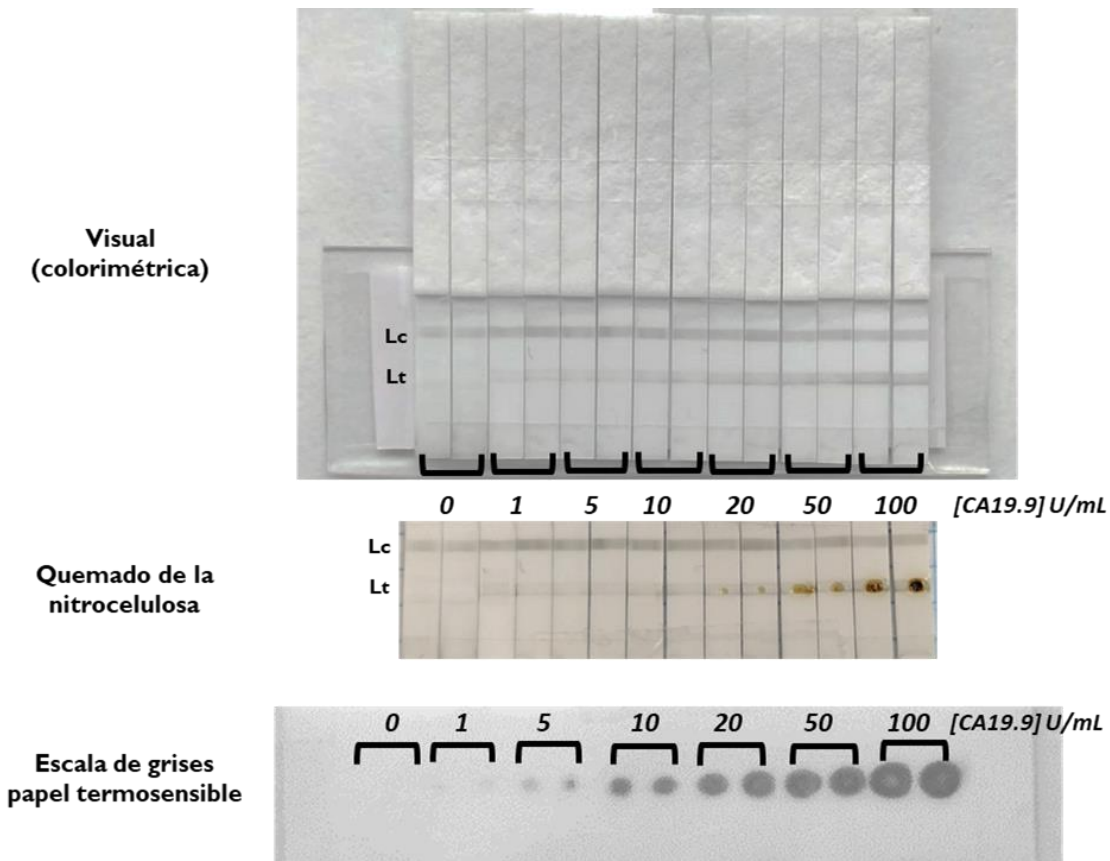


Figura 3C.28: Tiras de flujo lateral fabricadas para la detección del antígeno carbohidrato 19.9 (CA19.9) en el rango de 0-100 U/mL junto con las tres transducciones de la señal posibles. Antes de la irradiación (transducción visual) y tras la irradiación durante 2 min con una potencia laser NIR de 950 mW (señal de quemado en nitrocelulosa y señal en escala de grises en papel termosensible).

Como se observa en la **Figura 3C.28**, en este caso, el método permite la detección visual colorimétrica directa de hasta 1 U/mL de CA19.9, sin embargo, esto sería solo una determinación cualitativa. Por otro lado, la irradiación de todo el rango de concentraciones durante 2 minutos, produce el quemado de la nitrocelulosa a partir de 20 U/mL y la amplificación de la señal térmica en el papel termosensible en todo el rango, permitiendo su consiguiente cuantificación.

Para ello, se analizaron las coordenadas RGB de las señales en el papel termosensible obtenidas para cada concentración y se representó el valor de la coordenada B frente a la concentración de analito. (**Figura 3C.29**). Se realizó un ajuste polinómico de segundo grado para todo el rango (de 0 a 100 U/mL) observándose una R^2 baja de 0,922 debido a una clara saturación en las señales de las concentraciones mayores. Así, se decidió eliminar las concentraciones más altas realizando un ajuste polinómico para el rango de 0 a 50 U/mL que permite una determinación semicuantitativa y un ajuste lineal para el rango de 0 a 20 U/mL, permitiendo la cuantificación de CA19.9 en este intervalo. De este ajuste se extrajeron las características analíticas del método que se observan en la **Tabla 3C.12**.

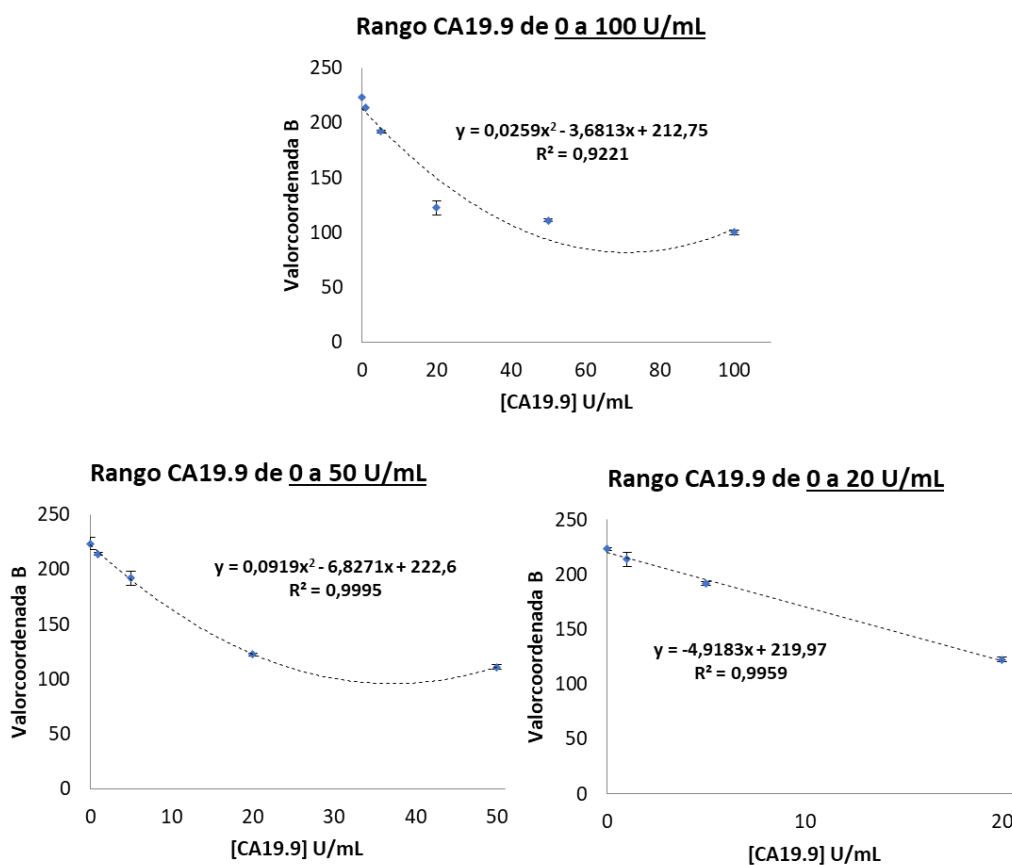


Figura 3C.29: Representación de la coordenada B obtenida del análisis RGB de las señales en papel termosensible para cada concentración de CA19.9 evaluada mediante las tiras TermoLFIA en el rango completo (de 0 a 100 U/mL), eliminando la máxima concentración (de 0 a 50 U/mL), y las dos concentraciones mayores (de 0 a 20 U/mL).

CA19.9	Rango evaluado (ng/mL)	Sensibilidad	LD (ng/mL)	LC (ng/mL)	DER %
TermoLFIA	0-20	4,91	0,92	3,08	2,16

Tabla 3C.12: Propiedades analíticas del método TermoLFIA para la detección de CA19.9.

Estas propiedades analíticas muestran resultados algo inferiores a los obtenidos con el método ELISA colorimétrico y el TermoLISA, como se observa en la **Tabla 3C.13**. Sin embargo, el valor de CA19.9 para considerar enfermedad activa es a partir de 37 U/ml y el límite de cuantificación del método TermoLFIA es de 1,28 U/mL, más que suficiente. De esta forma, a pesar de ser un método rápido, permite la cuantificación de este analito dentro del rango de interés, de forma sencilla y accesible.

CA19.9 (ea >37 U/mL)*	Rango (U/mL)	LD (U/mL)	LC (U/mL)	DER %
ELISA colorimétrico (PBS)	0,42 -50	0,13	0,42	8,37
TermoLISA (PBS)	0,60 -50	0,18	0,60	9,22
TermoLFIA (PBS)	3,08 -20	0,92	3,08	2,16

Tabla 3C.13: Comparativa de las propiedades analíticas del método TermoLFIA frente al ELISA colorimétrico clásico y el método TermoLISA para la determinación del marcador cancerígeno CA19.9 en PBS. *ea: valor a partir del cual se considera enfermedad activa.

3C.4.6. Características analíticas del método TermoLFIA para la detección de marcadores cancerígenos gastrointestinales en plasma sanguíneo humano.

Con el fin de estandarizar el método para su utilización en muestras reales y evaluar las posibles interferencias que pudiera provocar la matriz de plasma sanguíneo en el revelado del test de flujo lateral, se llevó a cabo la evaluación del método TermoLFIA utilizando muestras de plasma humano dopado con los marcadores cancerígenos a evaluar. Es importante tener en cuenta que el plasma, además de contener diversas proteínas que pueden provocar fenómenos de absorción inespecífica (como se explicó en la Sección 3A: apartado 3A.4.6), tiene una viscosidad 1,5 veces superior a la del agua, parámetro altamente importante en el desarrollo de un test de flujo lateral. Una mayor viscosidad en la muestra supone una menor velocidad del flujo capilar, lo cual puede provocar fenómenos de adsorción inespecífica en la membrana (posibles fasos positivos) además de impedir la salida de la totalidad de la muestra del pad de conjugado, con una consiguiente pérdida de la sensibilidad del test.

Por ello, en primer lugar, utilizando tiras LFIA para la detección de CA19.9, se evaluaron distintos porcentajes de plasma sanguíneo humano diluyendo el mismo en la disolución amortiguadora de muestra (PBS) junto con la concentración de CA19.9 evaluada (0 o 200 U/mL) y se compararon con la muestra diluida únicamente en PBS. Como se observa en la **Figura 3C.30**, las tiras positivas (200U/mL CA19.9) evaluadas con PBS presentan un intensa y visible línea test y tanto para la muestra positiva como la negativa (0 U/mL CA19.9) se observa también una intensa línea control. Sin embargo, a medida que el porcentaje de plasma es mayor, la intensidad en ambas líneas desaparece de forma gradual. De esta forma solo diluyendo el plasma un 10%, conseguimos obtener una intensidad de línea test y control similar a la evaluación en PBS. Además, si se observa el salto del pad de conjugado a la nitrocelulosa (señalado en la imagen con una flecha roja), se puede comprobar como con un mayor porcentaje de plasma, el bioconjugado no es capaz de avanzar por la nitrocelulosa y queda retenido al comienzo. Este efecto es menor a mayor dilución del plasma.

Sección 3C: Inmunosensor térmico de flujo lateral (TermoLFIA) para la detección de marcadores cancerígenos gastrointestinales

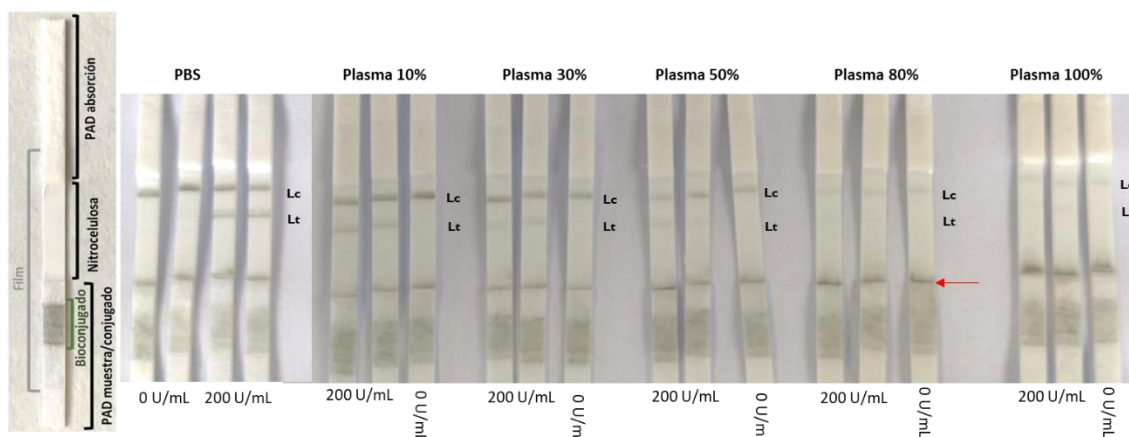


Figura 3C.30: Tiras TermoLFIA para la detección de 0 o 200 U/mL de CA19.9 en PBS o en distintos porcentajes de plasma sanguíneo diluidos en PBS.

Estos resultados indicaron problemas en la aplicación de este test a muestras de plasma, por lo que se llevó a cabo una optimización dirigida a mejorar la sensibilidad de las tiras en esta aplicación, así como evitar la dilución de la muestra de plasma en menor medida.

Los factores a optimizar fueron el diseño de la tira y la disolución amortiguadora de dilución del plasma.

3C.4.6.1. Diseño de tira.

Se decidió cambiar el diseño de la tira de flujo lateral separando el pad de muestra/conjugado en dos partes, muestra y conjugado. (**Figura 3C.31**) Para ello se utilizó como pad de conjugado el mismo utilizado hasta el momento (8964 Ahlstrom), con el mismo pretratamiento usado (Pretratamiento C: ácido bórico 50 mM pH8, sacarosa 1%, BSA 5%, PVP 0.5% y tween 20 (1%)), ya que estas condiciones favorecen la salida del bioconjugado de la tira y aseguran la estabilidad del mismo durante el tiempo.

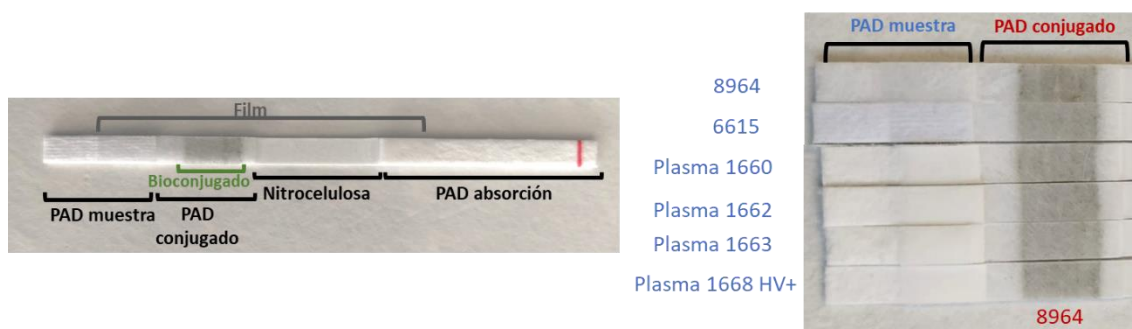


Figura 3C.31: Nuevo diseño de las tiras TermoLFIA con pad de muestra y pad de conjugado separados, junto con los diferentes pad de muestra evaluados.

Por otro lado, en busca de evaluar el efecto de la porosidad y composición del pad de muestra para favorecer la salida de la misma, se evaluaron diferentes materiales (**Tabla 3C.14**) para ser usados como pad de muestra, todos de la casa comercial Ahlstrom- Munksjo. Entre los materiales evaluados se encuentran el tipo 8964, usado como pad de muestra/conjugado hasta el momento y el 6615, uno de los que dio mejores resultados en la optimización del pad de muestra/conjugado (apartado 3C.4.1.1), además de otros 4 tipos de la gama Ahlstrom CytoSep®, diseñados de forma específica para la retención de las células sanguíneas y separación

del plasma o suero, permitiendo que este fluya rápidamente. En este caso, nuestra muestra es plasma, previamente separado de la sangre, pero esta gama puede mejorar la fluidez del mismo y la capacidad de absorción del pad de muestra.

Tipo Ahlstrom-Munksjö Ahlstrom CytoSep®	Peso base (g/m ²)	Calibre (mm)	Tasa de absorción (s/ 4cm)	Absorción de agua (mg/cm ²)	Composición
8964	75	0,43	5 (s/2 cm)	79	Fibra de vidrio
6615	135	0,51	-	-	Fibras de poliéster
1660	73	0,32	74	48	Mezcla de fibra patentada
1662	142	0,61	31	76	Mezcla de fibra patentada
1663	233	1,04	39	102	Mezcla de fibra patentada
HV plus (1668) Tratado	70	0,35	43	48	Mezcla de fibra patentada (pretratada)

Tabla 3C.14: Materiales evaluados para la selección del pad de muestra; en naranja la gama normal de Ahlstrom y en azul la gama especial CytoSep® para la separación del plasma.

Además, para evaluar cambios en la hidrofilia del pad de muestra y su interacción con la muestra, cada uno de estos pad se evaluó con dos disoluciones de pretratamiento, utilizadas en bibliografía para muestras de plasma en test de flujo lateral:

Pretratamiento plasma A⁹⁵: disolución amortiguadora Tris-HCl (pH 8.0), 0.23% Triton X-100 y 0.15 M NaCl.

Pretratamiento plasma B⁹²: ácido bórico 0,003 M, perborato de sodio 0,004 M, cloruro de sodio al 0,5% (p/v), BSA al 0,5% (p/v) y Tween-20 al 2% (v/v).

De esta forma se prepararon 12 tipos de tiras TermoLFIA (únicamente con línea control (anticuerpo secundario) y utilizando el bioconjugado CA19.9), con los 6 materiales de pad de muestra diferentes y cada uno de ellos pretratado con las disoluciones de pretratamiento plasma A o B. Las tiras se evaluaron con muestras negativas de PBS, 50% plasma y 100% plasma, por lo que en todos los casos solo se debería observar la aparición de la línea control tras correr el test. (**Figura 3C.32**)

En esta figura se puede observar, en primer lugar, que el pretratamiento plasma B del pad de muestra produce señales más intensas en prácticamente todos los casos y, en segundo lugar, que los pad de muestra que permiten una mayor visibilidad de la línea de control son 8964, 6615, 1662 y 1660, todos ellos proporcionan mejores resultados comparativamente con el diseño viejo de la tira, que usaba un único pad muestra/bioconjugado, tanto usando un 100% de plasma como un 50%. Además, algunos de los pad de muestra evaluados, alcanzan una intensidad en la línea de control similar a la obtenida con el diseño viejo de tiras utilizando como muestra únicamente PBS (sin plasma).

Sección 3C: Inmunosensor térmico de flujo lateral (TermoLFIA)
para la detección de marcadores cancerígenos gastrointestinales

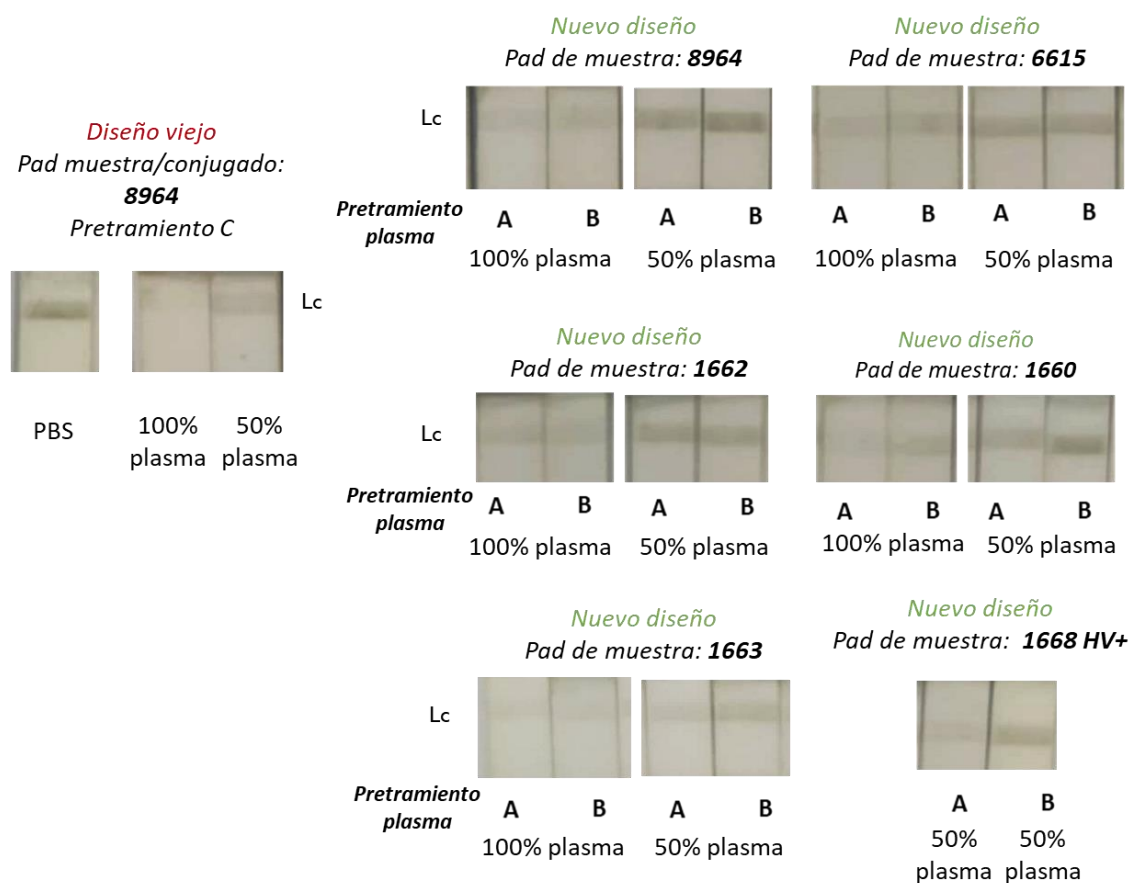


Figura 3C.32: Evaluación visual de la línea control en tiras TermoLFIA CA19.9, con el nuevo diseño de pad de muestra y bioconjugado por separado, para los diferentes materiales evaluados como pad de muestra y los distintos pretratamientos del mismo para la aplicación de muestras de plasma negativas. Se muestra también los mismos resultados para el diseño anterior de las tiras LFIA con un mismo pad muestra/conjugado, a modo comparativo.

Para estudiar estos resultados no sólo cualitativamente sino también de forma cuantitativa, las líneas de control de las diferentes tiras fueron irradiadas con el láser a una potencia de 1768 mW durante 1 minuto y se obtuvieron así las señales de quemado de la nitrocelulosa y las señales de escala de grises en el papel termosensible acoplado a la tira (**Figura 3C.33**). Observando esta figura se puede reafirmar que el pretratamiento plasma B del pad de muestra produce mayor quemado en la nitrocelulosa y una mayor intensidad en las señales del papel termosensible. Así, los pad de muestra que recogen mejores señales usando plasma 50% son 8964, 1662 y 1660, sin embargo, observando las señales en papel termosensible para plasma 100%, el **pad 8964 proporciona mayor intensidad de señal** que el resto, por lo que este pad junto con el **pretratamiento plasma B** fueron los seleccionados para la fabricación de las nuevas tiras LFIA en su aplicación a muestras de plasma.

Sección 3C: Inmunosensor térmico de flujo lateral (TermoLFIA) para la detección de marcadores cancerígenos gastrointestinales

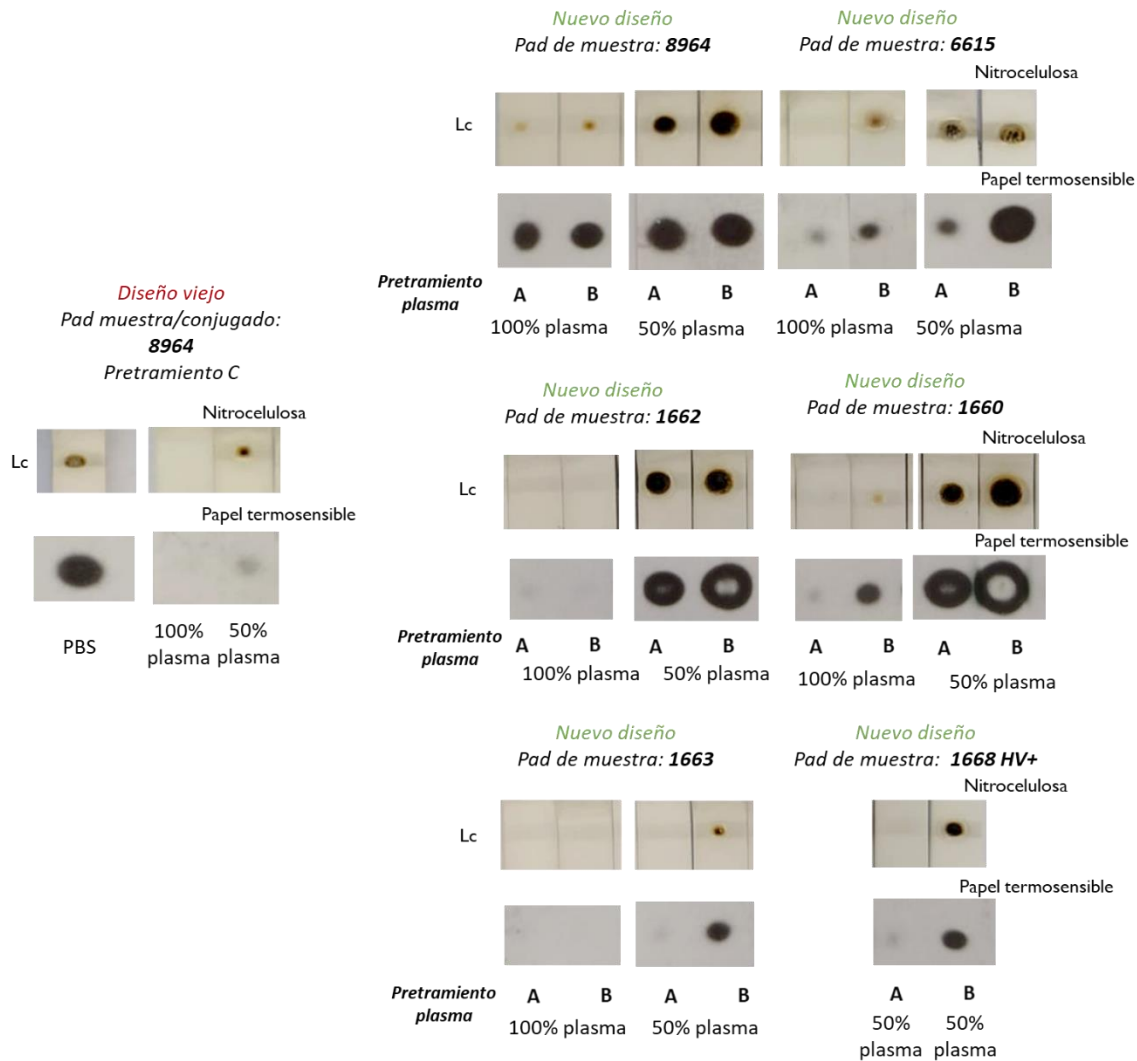


Figura 3C.33: Evaluación del quemado de la nitrocelulosa y las señales del papel termosensible tras la irradiación láser a 1768 mW, 1 min, de la línea control en tiras TermoLFIA CA19.9 con el nuevo diseño de pad muestra y conjugado separados, para los diferentes materiales evaluados como pad de muestra y los distintos pretratamientos del mismo para la aplicación de muestras de plasma negativas. Se muestra también los mismos resultados para el diseño anterior de las tiras LFIA con un mismo pad muestra/conjugado, a modo comparativo.

3C.4.6.2. Optimización de la disolución amortiguadora de dilución del plasma.

Se optimizó también la composición de la disolución amortiguadora para diluir las muestras de plasma, añadiéndole tensoactivos para conseguir un mayor caudal laminar y disminuir su viscosidad. Así se evaluó la adición de Tween 20 o Triton X-100 en diversos porcentajes (2, 5 y 10 %), utilizando tiras TermoLFIA para la detección de CEA con el nuevo diseño y nuevos materiales optimizados. La evaluación de estas tiras se llevó a cabo utilizando muestras de plasma al 50% conteniendo una concentración de CEA de 100 ng/mL y diversos porcentajes indicados de Tween 20 o Triton X-100. La **Figura 3C.34** muestra la evaluación de estas tiras mediante los diferentes tipos de transducción posible, visual colorimétrica y tras la irradiación láser de la línea de test a una potencia de 1786 mW durante 30 segundos. Se observa un mayor quemado de la

Sección 3C: Inmunosensor térmico de flujo lateral (TermoLFIA)
para la detección de marcadores cancerígenos gastrointestinales

nitrocelulosa y señal en el papel termosensible en el caso del Tween 20, además estas señales aumentan correlativamente al aumentar el porcentaje de Tween 20 añadido.

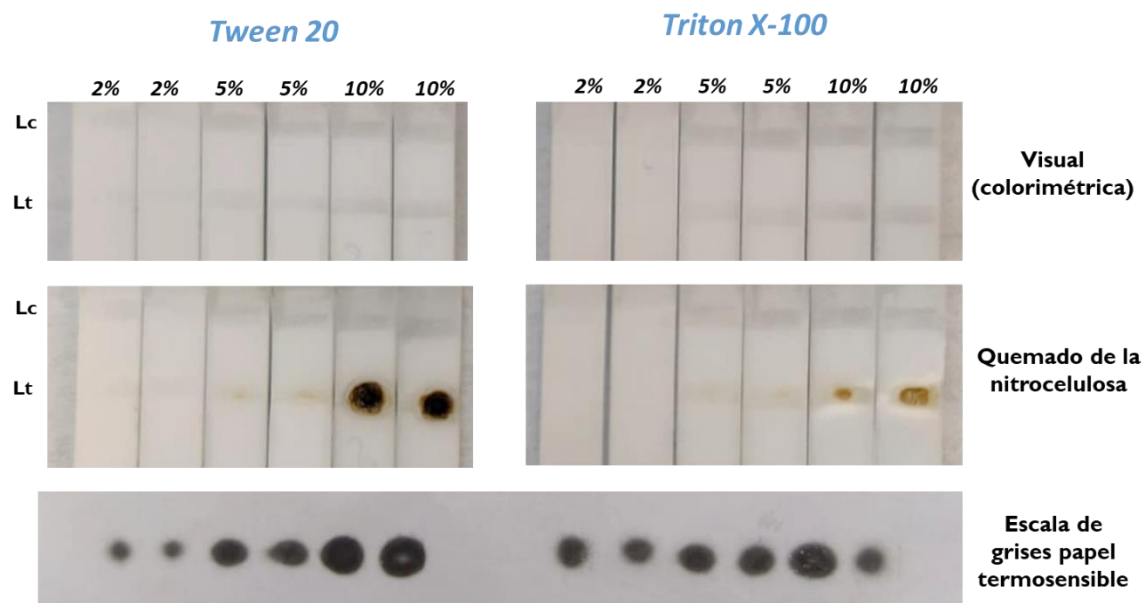


Figura 3C.34: Tiras TermoTLFIA para la detección de CEA fabricadas con el nuevo diseño y materiales optimizados. Estas tiras se han evaluado con muestras de plasma al 50% conteniendo una concentración de CEA de 100 ng/mL y diversos porcentajes indicados de Tween 20 o Tritón X-100. La irradiación se llevó a cabo durante 30 segundos a una potencia de 1786 mW.

A la vista de estos resultados, se decidió evaluar el uso de mayores porcentajes de Tween 20 como aditivo en la muestra. La **Figura 3C.35** muestra las mismas tiras TermoLFIA CEA evaluadas utilizando muestras de plasma al 50% conteniendo una concentración de CEA de 50 ng/mL o 0 ng/mL y diversos porcentajes indicados de Tween 20. Además de una comparativa de la evaluación de estas tiras sin plasma, solo con PBS y CEA 50 ng/mL. La irradiación láser de la línea de test se realizó a una potencia de 1786 mW durante 30 segundos y las señales de quemado de la nitrocelulosa y papel termosensible se recogen en la misma figura. Se observa como a partir de 5% de Tween 20, se obtiene señal en el papel termosensible y que esta aumenta correlativamente hasta una concentración del 15%. Sin embargo, porcentajes superiores a este, como 20%, proporcionan falsos positivos, observándose línea de test y quemado de la nitrocelulosa cuando la concentración de CEA evaluada es 0 ng/mL. Además, se observa que porcentajes de Tween 20 aún más altos, como 30%, impiden la salida de la muestra del pad y el avance de la misma hacia la nitrocelulosa, favoreciendo seguramente fenómenos de agregación de los prismas.

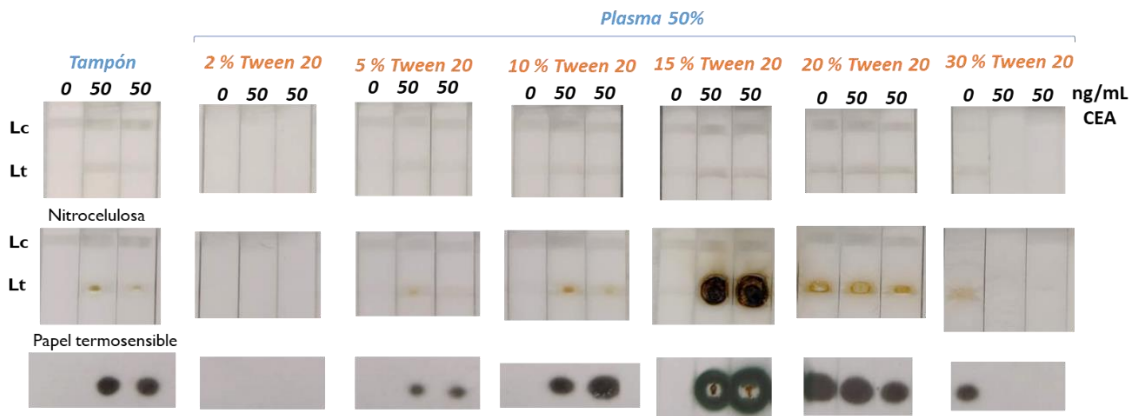


Figura 3C.35: Tiras TermoTLFIA para la detección de CEA fabricadas con el nuevo diseño y materiales optimizados, evaluadas con muestras de plasma al 50% conteniendo una concentración de CEA de 50 ng/mL o 0 ng/mL y diversos porcentajes indicados de Tween 20. La irradiación se llevó a cabo durante 30 segundos a una potencia de 1786 mW.

Por último, se evaluaron los dos porcentajes de Tween óptimos, 10 y 15%, utilizando muestras de plasma al 50% conteniendo diversas concentraciones de CEA en todo el rango evaluado y se irradió la línea de test a una potencia de 1500 mW durante 1 minuto. Las señales visuales, de quemado de la nitrocelulosa y papel termosensible se recogen en la **Figura 3C.36**, en la que se observan señales correlativas en la intensidad del papel termosensible con la concentración de CEA para ambos porcentajes de Tween 20, sin existencia de falsos positivos. Para no provocar la saturación de la señal, se seleccionó como óptimo el **porcentaje de 10% de tween 20**.

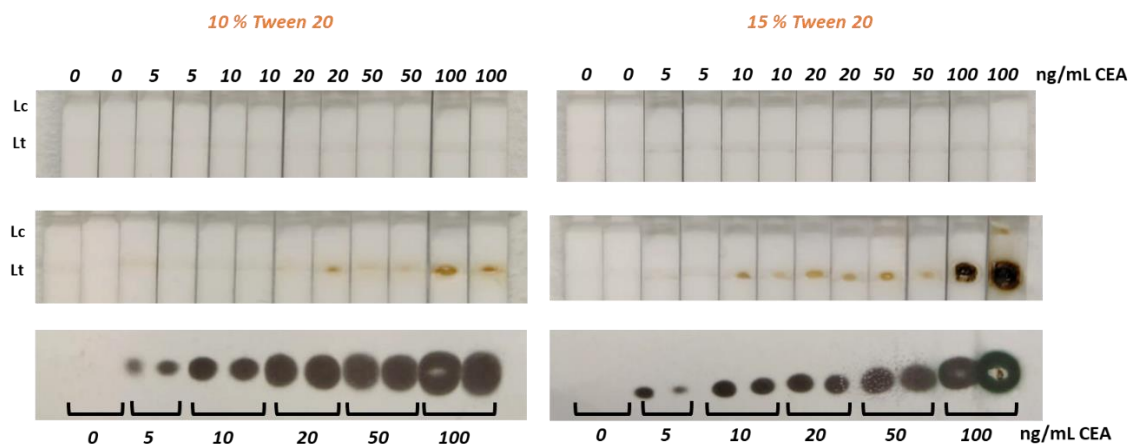


Figura 3C.36: Tiras TermoTLFIA para la detección de CEA fabricadas con el nuevo diseño y materiales optimizados, evaluadas con muestras de plasma al 50% conteniendo una concentración de CEA de 50 ng/mL o 0 ng/mL y diversos porcentajes indicados de Tween 20. La irradiación se llevó a cabo durante 1 minuto a una potencia de 1500 mW.

De todos estos estudios, se puede concluir que el problema de la aplicación del plasma a las tiras TermoLFIA es la viscosidad de esta muestra. Que como se ha mostrado es posible de resolver cambiando el diseño de la tira y su tratamiento, así como optimizando la composición de la disolución amortiguadora de dilución del plasma. En estas condiciones, como se muestra en la **Figura 3C.36**, es posible detectar el analito en plasma en todo el rango de concentraciones, diluyendo la muestra al 50%.

3C.5. Conclusiones específicas de la sección 3C

En esta sección se ha desarrollado un innovador inmunosensor térmico de flujo lateral. La tecnología TermoLFIA desarrollada ha permitido la detección sensible de distintos marcadores de cáncer gastrointestinal, de forma rápida y versátil mediante diferentes formatos de transducción; semi-cuantitativos (detección visual de la línea de test y quemado directo de la nitrocelulosa) y cuantitativo (escala de grises en papel termosensible mediante la medida de las coordenadas RGB).

Para ello se ha llevado a cabo la optimización secuencial y analítica de diversos factores importantes para la construcción del test LFIA:

- Se ha seleccionado el material 8964 como pad de muestra/conjugado, por presentar las mejores propiedades de absorción y desorción del bioconjugado depositado.
- Se ha seleccionado como óptima la deposición del bioconjugado mediante spray, este método, además de proporcionar una movilización más homogénea del bioconjugado a través de la tira, asegura la reproducibilidad en el proceso de deposición, al tratarse de un método automático y no manual.
- Se ha evaluado el pretratamiento de este pad, seleccionándose como óptimo el C (ácido bórico 50 mM pH8, sacarosa 1%, BSA 5%, PVP 0.5% y tween 20 (1%)), así como, la formulación del bioconjugado óptima para su deposición, seleccionándose la disolución amortiguadora Ac. Bórico 0.05 M pH 8. Estas condiciones permiten una mayor estabilidad en el tiempo del bioconjugado depositado, así como una mayor sensibilidad, libre de falsos positivos.
- Como pad de absorción se ha seleccionado el material 222, por presentar la mejor capacidad de absorción.
- Se han optimizado además las condiciones de deposición por spray del bioconjugado. La pulverización de 3 líneas y 4 pasadas sobre cada línea, proporciona una mayor homogeneidad del conjugado en el pad y una mayor sensibilidad del test.
- Se ha seleccionado como óptimo el papel termosensible B, que permite obtener señal térmica a menor temperatura. El esquema de irradiación donde el papel termosensible se sitúa detrás de la tira, ha proporcionado una mayor sensibilidad.

Con todos estos parámetros optimizados, se ha llevado a cabo el análisis de las características analíticas del método para las tiras TermoLFIA fabricadas para la detección de los tres marcadores cancerígenos CEA, VEGF y CA19.9. En todos los casos, el uso del papel termosensible y el análisis de las coordenadas RGB, ha permitido la cuantificación de los analitos en PBS, mostrando, en algunos casos LD y LC mejores que los presentados por el ELISA colorimétrico o el TermoLISA. De esta forma, a pesar de ser un método rápido, la metodología TermoLFIA permite la cuantificación de los marcadores estudiados dentro del rango de interés clínico, presentándose como un método sencillo y rápido, que no necesita de personal cualificado.

Además, en esta sección se han optimizado las tiras TermoLFIA para su aplicación a muestras de plasma, evitando así, los problemas derivados de la viscosidad del plasma, que producen la pérdida de sensibilidad del test, para ello:

Sección 3C: Inmunosensor térmico de flujo lateral (TermoLFIA)
para la detección de marcadores cancerígenos gastrointestinales

- Se ha llevado a cabo el rediseño de la tira (pad de muestra separado del pad de conjugado). Manteniendo el pad de conjugado y sus condiciones ya optimizadas, se ha seleccionado como pad de muestra el material 8964, que proporciona mayor sensibilidad junto con el pretratamiento plasma B (ácido bórico 0,003 M, perborato de sodio 0,004 M, cloruro de sodio al 0,5% (p/v), BSA al 0,5% (p/v) y Tween-20 al 2% (v/v)).
- Se ha optimizado también la disolución amortiguadora de dilución del plasma. Así, añadiendo un porcentaje de 10% de tween 20 y diluyendo el plasma un 50%, es posible detectar el analito en plasma con buena sensibilidad en todo el rango de concentraciones

Los resultados mostrados han permitido confirmar las posibilidades de la metodología en su uso clínico y la facilidad en su uso, sin necesidad de personal cualificado, registrando resultados de forma rápida y sencilla.

3C.6. Anexo 3C

Análisis de la regresión rango concentraciones bajas

Rango concentraciones bajas				
Lote 1			Lote 2	
[CEA] ng/mL	Coordenada B		[CEA] ng/mL	Coordenada B
10	111.5		10	125
5	174.5		5	165
1	207.5		1	208
0	216.5		0	218

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coefficiente de correlación múltiple	0.98
Coefficiente de determinación R ²	0.97
R ² ajustado	0.95
Error típico	9.33
Observaciones	4.00

<i>Análisis de varianza</i>					
	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	5299.74	5299.74	60.82	0.02
Residuos	2	174.26	87.13		
Total	3	5474.00			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Superior 95%</i>	<i>Inferior 95.0%</i>
Intercepción	22.14	20.65	1.07	0.40	110.98	-66.70
Variable X 1	0.88	0.11	7.80	0.02	1.37	0.40

Análisis de la regresión rango concentraciones altas

Rango concentraciones altas				
Lote 1			Lote 2	
[CEA] ng/mL	Coordenada B		[CEA] ng/mL	Coordenada B
100	81		100	77.5
50	97		50	91
25	157.5		25	121
0	216		0	217

Estadísticas de la regresión	
Coeficiente de correlación múltiple	0.96
Coeficiente de determinación R^2	0.93
R^2 ajustado	0.89
Error típico	20.88
Observaciones	4.00

Análisis de varianza					
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	11009.74	11009.74	25.25	0.04
Residuos	2	871.95	435.98		
Total	3	11881.69			

	Coeficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Superior 95%	Inferior 95.0%
Intercepción	-8.90	28.92	-0.31	0.79	115.53	-133.34
Variable X 1	0.98	0.20	5.03	0.04	1.82	0.14

3.4. Conclusiones y análisis crítico del capítulo 3. Perspectivas de futuro.

Los inmunosensores fototérmicos desarrollados en este capítulo presentan diversas posibilidades en el campo de la clínica.

Por su parte, la **metodología TermoLISA**, se presenta como una mejora de los métodos clásicos ELISA colorimétricos o fluorescentes, empleados ampliamente en hospitales para el diagnóstico inmunológico con alta sensibilidad y especificidad. Estos, son métodos cuantitativos robustos, que permiten analizar un gran número de muestras a la vez y que se han incorporado exitosamente a sistemas automáticos de alto rendimiento. Con estas mismas motivaciones, el método TermoLISA se presenta como una novedosa opción de diagnóstico inmunológico a través de la implementación de la transducción térmica ultrasensible a los métodos clásicos, permitiendo, como se ha demostrado, disminuir los LD y LC.

Sin embargo, las tecnologías térmicas no son métodos de lectura estándar en la clínica, por lo que la aplicación del método TermoLISA en hospitales requeriría de la construcción de sistemas automatizados de irradiación y medida de imagen térmica. El diseño de este tipo de sistemas sería sencillo y viable económicamente, compuesto por una fuente de excitación y un detector, con una estructura no tan diferente a los lectores de placas de fluorescencia automáticos. Este sistema podría utilizar como fuente de excitación un led diodo laser de 1064 nm acoplado a una fibra óptica (estos componentes pueden encontrarse en el mercado por precios que oscilan los 200-1000 € en función de la potencia) y como detector, podría acoplarse o bien cualquier tipo de sensor de temperatura más económico como termopares y termorresistencias (precios inferiores a 50€) o bien sistemas de imagen térmica IR más robustos, como cámaras termográficas que aunque supondrían el encarecimiento del producto (precios que oscilan los 800-2000€ en función de la precisión y calidad), mejorarían el proceso de detección. Además, en la actualidad, casas comerciales como FLIR, están desarrollando nuevos sistemas y accesorios más sencillos y accesibles, que permiten la medida de temperatura *in situ* incluso con un teléfono móvil (**Figura 3.28**) por precios de en torno a 200€, estos nuevos dispositivos permitirían incluso la miniaturización del equipo de medida.

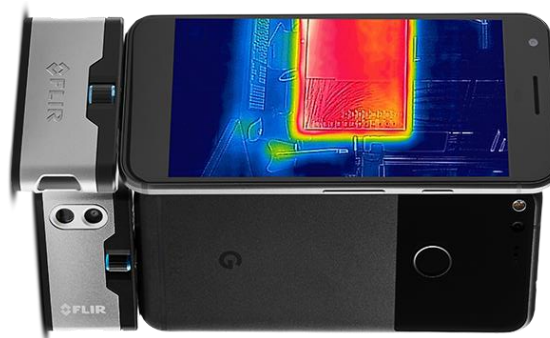


Figura 3.28: Cámara térmica FLIR ONE Gen 3, con una precisión de ± 3 °C o ± 5 y con un rango dinámico de -20 a 120°C.

Por otro lado, la búsqueda de otras opciones para la estandarización de esta metodología, motivó el desarrollo de la **metodología TermoTRFIA**, mediante la transducción de la señal térmica a señal fluorescente. TermoTRFIA, facilita la transferencia a la clínica de la tecnología térmica de detección desarrollada, de una forma más sencilla, utilizando la fluorescencia como método de detección estándar. Además, el desarrollo de esta metodología, ha evaluado el uso de incipientes e interesantes herramientas de reconocimiento biológico como son los nanobodies, permitiendo mejorar los límites de detección gracias a la transducción térmico-

fluorescente combinada. Sin embargo, esta metodología necesita mejorar el método de lectura fluorescente e irradiación simultánea; como perspectivas futuras se plantea la posibilidad de fabricación de soportes automáticos de irradiación que puedan ser fácilmente acoplados a una placa multipocillos (**Figura 3.29**). Estos sistemas permitirían la irradiación automática del pocillo y la medida de la fluorescencia simultánea por cualquier lector de placas de fluorescencia, lo que posibilitaría la transferencia de esta metodología a cualquier laboratorio o centro clínico.

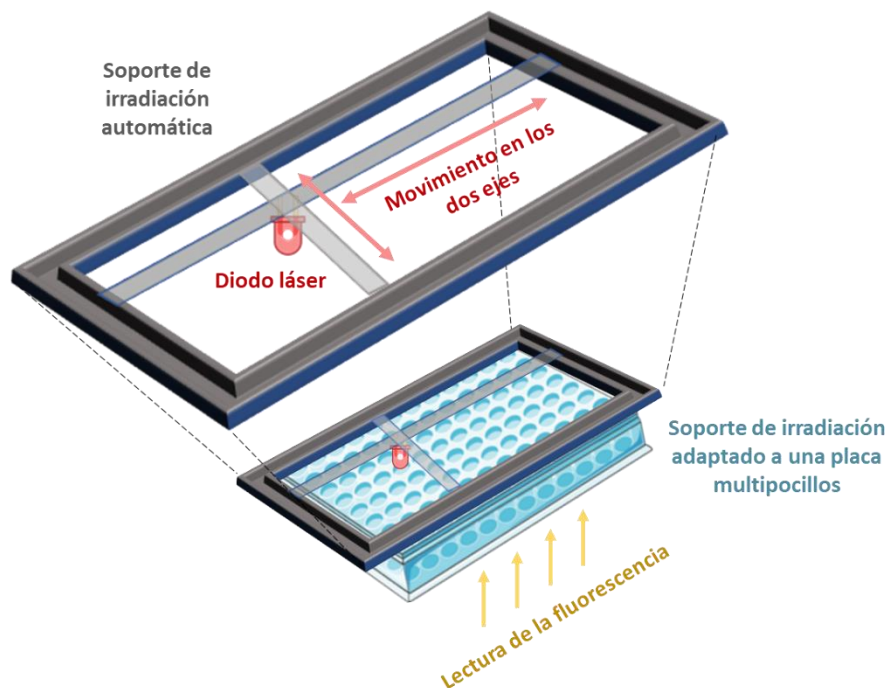


Figura 3.29: Prototipo de soporte de irradiación automática acoplable a una placa multipocillos.

Por otro lado, la aplicación del método TermoLISA a la detección de marcadores de cáncer gastrointestinal y la posterior aplicación de la tecnología TermoTRFIA a la detección de exosomas, muestra la facilidad de transferencia de esta tecnología térmica a la detección de diferentes analíticos. Resaltando además la versatilidad de la metodología, a través del marcaje de diferentes elementos de reconocimiento con AuNPrs como etiquetas térmicas.

En cuanto a la **tecnología TermoLFIA** desarrollada, se trata de un formato de inmunoensayo completamente diferente a los dos métodos anteriores. TermoLISA y TermoTRFIA, son métodos robustos que permiten el análisis simultáneo de un gran número de muestras e incluso la fácil multidetección. Por otro lado, la metodología TermoLFIA pretende acercar esta tecnología térmica a la población. Se trata de un método POC, rápido y ultrasensible, que frente a otros LFIA presentes en el mercado, permite la detección sensible y cuantitativa mediante la amplificación del papel termosensible. TermoTRFIA, ha mostrado LD y LC similares e incluso en algunos casos mejores respecto al método clásico ELISA o al método TermoLISA. Sin embargo, la puesta a punto de esta metodología LFIA, es mucho más difícil y laboriosa, debido a la gran cantidad de factores a tener en cuenta en su optimización.

Otro de los puntos pendientes en el desarrollo de esta metodología es su miniaturización. Para ello se pretende desarrollar un dispositivo portátil que posea en su interior un láser colimado de baja potencia e incida en la línea test durante un tiempo determinado. Las tiras TermoLFIA se colocarían dentro de un casete con un diseño especial (**Figura 3.30**), así, la forma de uso y lectura de este test se plantea de la siguiente manera:

- 1) En la parte superior del casete se encuentra el pocillo de muestra, donde se añaden los 100 μL de la misma.
- 2) Una vez transcurridos 5 minutos, a través de la ventana superior podemos observar en la nitrocelulosa la línea de control y la línea de test en caso de muestra positiva.
- 3) En caso de no ser visible esta línea de test, para amplificar esta señal, se lleva a cabo la irradiación de las tiras (15 minutos después de añadir la muestra) introduciendo el casete en el dispositivo.
- 4) El láser incide por la ventana superior del casete exactamente en la línea de test, durante un tiempo determinado.
- 5) El casete se extrae del dispositivo portátil
- 6) Una ventana en la parte posterior del casete permitiría observar la señal en escala de grises generada en el papel termosensible tras la irradiación.

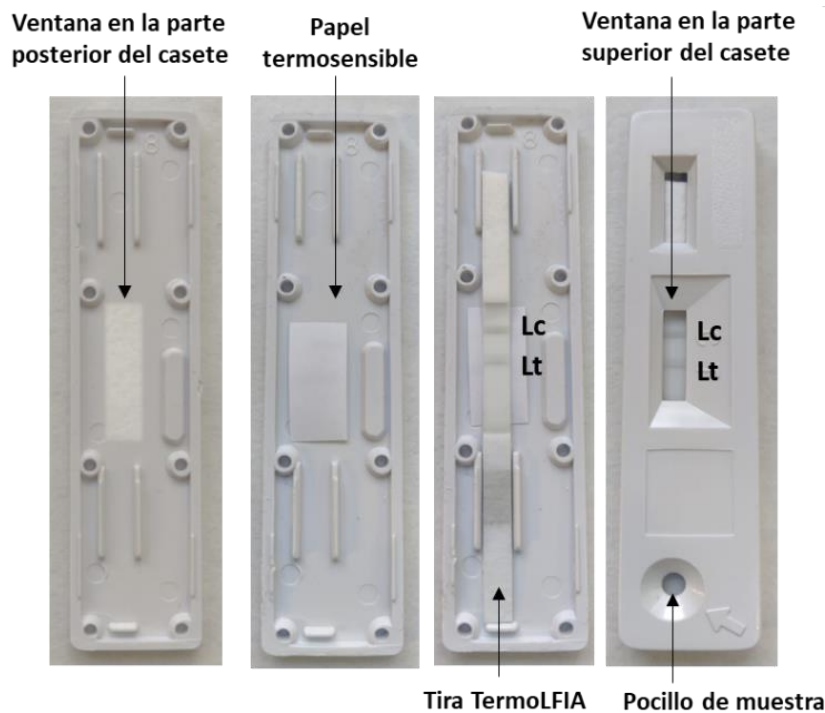


Figura 3.30: Diseño del casete TermOLFIA y modo de colocación en su interior de la tira de flujo lateral y papel termosensible.

Este sistema ampliaría aun más las posibilidades de la metodología en aplicación a la clínica, debido a la facilidad en su uso, sin necesidad de personal cualificado, siendo capaz de registrar resultados de forma rápida y sencilla.

Se han llevado a cabo algunas pruebas de concepto iniciales, irradiando con un laser colimado de baja potencia (400 mW) los casetes TermOLFIA CA19.9. Los resultados que se muestran en la **Figura 3.31** dan muestra de las opciones prometedoras de este sistema. Se observó quemado de la nitrocelulosa en las concentraciones de 50 a 10 U/mL, así como señal en el papel termosensible. Para la concentración más baja evaluada, de 5 U/mL, no se observó quemado en la nitrocelulosa, pero si señal en el papel termosensible. Los resultados obtenidos pronostican sensibilidades similares a las obtenidas con el sistema laser experimental, con potencias muy inferiores, debido a la colimación del láser en el prototipo y a la cercanía entre el mismo y la línea test.

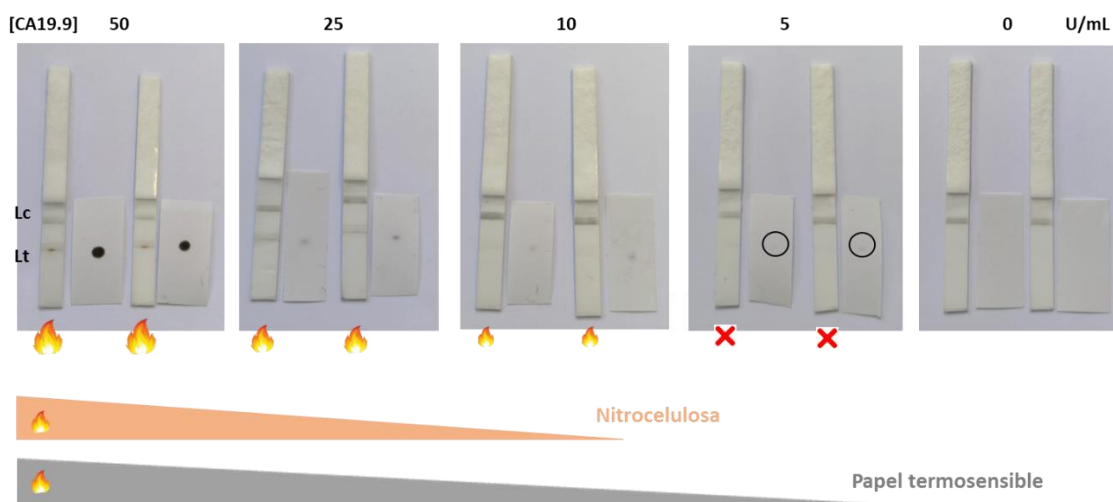


Figura 3.31: Tiras Termofluidica para la detección de CA19.9 en el rango de 0 a 50 U/mL, evaluadas dentro de los casetes con un laser colimaod de baja potencia.

Por otro lado, la evaluación de estas tiras Termofluidica con muestras clínicas es el siguiente paso futuro. Para ello, como parte de una colaboración continua con el Dr. Roberto Pazo, se nos proporcionarán muestras de pacientes oncológicos del Hospital Univeristario Miguel Servet (Zaragoza). Se han recopilado 40 muestras de plasma (20 antes/20 después de un ciclo de tratamiento) de 20 pacientes con cáncer de páncreas metastásico, de los que disponemos de la base de datos actualizada con su evolución clínica. Desde el biobanco HUMS, se ha realizado un estudio de arrays de proteínas, con el fin de conocer la concentración de las proteínas CEA y CA19.9 antes y después del tratamiento. Así el objetivo inmediato consistirá en la evaluación de estas mismas muestras mediante la metodología Termofluidica y su comparativa.

Por último, otra de las perspectivas futuras que se plantea respecto a la metodología Termofluidica, es la posibilidad de multidetección a través de la deposición de varias líneas de test en la misma tira, tantas como analitos se quieran detectar. Este formato de sería muy interesante para el estudio de las muestras reales citadas y de manera más general, para la aplicación de este test Termofluidica a otros casos de diagnóstico clínico, donde la medida simultanea de varios analitos puede ayudar a la toma rápida de decisiones clínicas.

De los tres sensores desarrollados, la metodología Termofluidica es la que presenta más posibilidades reales de transferencia comercial, ya que además de tratarse de una novedosa técnica POC ultrasensible, su fácil miniaturización y los primeros resultados obtenidos usando el prototipo laser miniaturilaser colimado de baja potencia, aseguran resultados prometedores en la transferencia comercial. Como prueba de ello, en la actualidad esta metodología está siendo evaluada para su aplicación a la detección del coronavirus SARS CoV-2, gracias a la financiación recibida por Aena, a través de la Plataforma Tecnológica Interdisciplinar Salud Global del CSIC.

3.5. Bibliografía

- (1) Stefan, R. I.; Van Staden, J. F.; Aboul-Enein, H. Y. Immunosensors in Clinical Analysis. *Fresenius. J. Anal. Chem.* **2000**, *366* (6–7), 659–668. <https://doi.org/10.1007/s002160051560>.
- (2) Lippa, P. B.; Sokoll, L. J.; Chan, D. W. Immunosensors - Principles and Applications to Clinical Chemistry. *Clin. Chim. Acta* **2001**, *314* (1–2), 1–26. [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(01\)00629-5](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(01)00629-5).
- (3) Kim, S. J.; Gobi, K. V.; Harada, R.; Shankaran, D. R.; Miura, N. Miniaturized Portable Surface Plasmon Resonance Immunosensor Applicable for On-Site Detection of Low-Molecular-Weight Analytes. *Sensors Actuators, B Chem.* **2006**, *115* (1), 349–356. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2005.09.025>.
- (4) Suzuki, M.; Ozawa, F.; Sugimoto, W.; Aso, S. Miniaturization of SPR Immunosensors. *Anal. Sci.* **2001**, *17*, 265–267.
- (5) Zhang, X.; Zou, Y.; An, C.; Ying, K.; Chen, X.; Wang, P. A Miniaturized Immunosensor Platform for Automatic Detection of Carcinoembryonic Antigen in EBC. *Sensors Actuators, B Chem.* **2014**, *205*, 94–101. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2014.08.011>.
- (6) Suzuki, M.; Ozawa, F.; Sugimoto, W.; Aso, S. Miniature Surface-Plasmon Resonance Immunosensors - Rapid and Repetitive Procedure. *Fresenius. J. Anal. Chem.* **2002**, *372* (2), 301–304. <https://doi.org/10.1007/s00216-001-1209-3>.
- (7) Felix, F. S.; Angnes, L. Electrochemical Immunosensors – A Powerful Tool for Analytical Applications. *Biosens. Bioelectron.* **2018**, *102* (November 2017), 470–478. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.11.029>.
- (8) Ricci, F.; Volpe, G.; Micheli, L.; Palleschi, G. A Review on Novel Developments and Applications of Immunosensors in Food Analysis. *Anal. Chim. Acta* **2007**, *605* (2), 111–129. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.10.046>.
- (9) Raman Suri, C.; Boro, R.; Nangia, Y.; Gandhi, S.; Sharma, P.; Wangoo, N.; Rajesh, K.; Shekhawat, G. S. Immunoanalytical Techniques for Analyzing Pesticides in the Environment. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **2009**, *28* (1), 29–39. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2008.09.017>.
- (10) Wu, J.; Fu, Z.; Yan, F.; Ju, H. Biomedical and Clinical Applications of Immunoassays and Immunosensors for Tumor Markers. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **2007**, *26* (7), 679–688. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.05.007>.
- (11) Keighley, M. R. B. Gastrointestinal Cancers in Europe. *Aliment. Pharmacol. Ther. Suppl.* **2003**, *18* (3), 7–30. <https://doi.org/10.1046/j.0953-0673.2003.01722.x>.
- (12) Baniak, N.; Senger, J. L.; Ahmed, S.; Kanthan, S. C.; Kanthan, R. Gastric Biomarkers: A Global Review. *World J. Surg. Oncol.* **2016**, *14* (1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12957-016-0969-3>.
- (13) Dbouk, H. A.; Tawil, A.; Nasr, F.; Kandakarjian, L.; Abou-Merhi, R. Significance of CEA and VEGF as Diagnostic Markers of Colorectal Cancer in Lebanese Patients. *Open Clin. Cancer J.* **2007**, *1* (1), 1–5. <https://doi.org/10.2174/187418940701011049>.
- (14) Sandblom, G.; Granroth, S.; Rasmussen, I. C. TPS, CA 19-9, VEGF-A, and CEA as Diagnostic and Prognostic Factors in Patients with Mass Lesions in the Pancreatic Head. *Ups. J. Med.*

- Sci.* **2008**, *113* (1), 57–64. <https://doi.org/10.3109/2000-1967-214>.
- (15) Hyodo, I.; Doi, T.; Endo, H.; Hosokawa, Y.; Nishikawa, Y.; Tanimizu, M.; Jinno, K.; Kotani, Y. Clinical Significance of Plasma Vascular Endothelial Growth Factor in Gastrointestinal Cancer. *Eur. J. Cancer* **1998**, *34* (13), 2041–2045. [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(98\)00282-2](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(98)00282-2).
- (16) Căinap, C.; Nagy, V.; Gherman, A.; Cetean, S.; Laszlo, I.; Constantin, A. M.; Căinap, S. Classic Tumor Markers in Gastric Cancer. Current Standards and Limitations. *Clujul Med.* **2015**, *88* (2), 111–115. <https://doi.org/10.15386/cjmed-409>.
- (17) GRONBERG, H.; SHARP, D. Prostate Cancer Epidemiology. Commentary. *Lancet (British Ed.)* **2003**, *361*, 859–864.
- (18) Huang, X.; Jain, P. K.; El-Sayed, I. H.; El-Sayed, M. A. Gold Nanoparticles: Interesting Optical Properties and Recent Applications in Cancer Diagnostics and Therapy. *Nanomedicine* **2007**, *2* (5), 681–693. <https://doi.org/10.2217/17435889.2.5.681>.
- (19) Grodzinski, P.; Silver, M.; Molnar, L. K. Nanotechnology for Cancer Diagnostics: Promises and Challenges. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **2006**, *6* (3), 307–318. <https://doi.org/10.1586/14737159.6.3.307>.
- (20) Pei, X.; Zhang, B.; Tang, J.; Liu, B.; Lai, W.; Tang, D. Sandwich-Type Immunosensors and Immunoassays Exploiting Nanostructure Labels: A Review. *Anal. Chim. Acta* **2013**, *758*, 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.10.060>.
- (21) Liu, G.; Lin, Y. Nanomaterial Labels in Electrochemical Immunosensors and Immunoassays. *Talanta* **2007**, *74* (3), 308–317. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2007.10.014>.
- (22) Pei, X.; Zhang, B.; Tang, J.; Liu, B.; Lai, W.; Tang, D. Sandwich-Type Immunosensors and Immunoassays Exploiting Nanostructure Labels: A Review. *Anal. Chim. Acta* **2013**, *758*, 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.10.060>.
- (23) Elahi, N.; Kamali, M.; Baghersad, M. H. Recent Biomedical Applications of Gold Nanoparticles: A Review. *Talanta* **2018**, *184* (February), 537–556. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.02.088>.
- (24) Zeng, S.; Yong, K. T.; Roy, I.; Dinh, X. Q.; Yu, X.; Luan, F. A Review on Functionalized Gold Nanoparticles for Biosensing Applications. *Plasmonics* **2011**, *6* (3), 491–506. <https://doi.org/10.1007/s11468-011-9228-1>.
- (25) Alfranca, G.; Artiga, Á.; Stepien, G.; Moros, M.; Mitchell, S. G.; De La Fuente, J. M. Gold Nanoprism-Nanorod Face off: Comparing the Heating Efficiency, Cellular Internalization and Thermoablation Capacity. *Nanomedicine* **2016**, *11* (22), 2903–2916. <https://doi.org/10.2217/nnm-2016-0257>.
- (26) Chou, C. H.; Chen, C. D.; Wang, C. R. C. Highly Efficient, Wavelength-Tunable, Gold Nanoparticle Based Optothermal Nanoconvertors. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109* (22), 11135–11138. <https://doi.org/10.1021/jp0444520>.
- (27) Pelaz, B.; Grazu, V.; Ibarra, A.; Magen, C.; Del Pino, P.; De La Fuente, J. M. Tailoring the Synthesis and Heating Ability of Gold Nanoprismes for Bioapplications. *Langmuir* **2012**, *28* (24), 8965–8970. <https://doi.org/10.1021/la204712u>.
- (28) Abadeer, N. S.; Murphy, C. J. Recent Progress in Cancer Thermal Therapy Using Gold Nanoparticles. *J. Phys. Chem. C* **2016**, *120* (9), 4691–4716.

<https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b11232>.

- (29) Jiang, K.; Smith, D. A.; Pinchuk, A. Size-Dependent Photothermal Conversion Efficiencies of Plasmonically Heated Gold Nanoparticles. *J. Phys. Chem. C* **2013**, *117* (51), 27073–27080. <https://doi.org/10.1021/jp409067h>.
- (30) Riley, R. S.; Day, E. S. Gold Nanoparticle-Mediated Photothermal Therapy: Applications and Opportunities for Multimodal Cancer Treatment. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology* **2017**, *9* (4). <https://doi.org/10.1002/wnan.1449>.
- (31) Elliott, A. M.; Stafford, R. J.; Schwartz, J.; Wang, J.; Shetty, A. M.; Bourgoyne, C.; O’Neal, P.; Hazle, J. D. Laser-Induced Thermal Response and Characterization of Nanoparticles for Cancer Treatment Using Magnetic Resonance Thermal Imaging. *Med. Phys.* **2007**, *34* (7), 3102–3108. <https://doi.org/10.1118/1.2733801>.
- (32) Baffou, G.; Bon, P.; Savatier, J.; Polleux, J.; Zhu, M.; Merlin, M.; Rigneault, H.; Monneret, S. Thermal Imaging of Nanostructures by Quantitative Optical Phase Analysis. *ACS Nano* **2012**, *6* (3), 2452–2458. <https://doi.org/10.1021/nn2047586>.
- (33) John R.Giudicessi, BA.Michael J.Ackerman., 2013. NIH Public Access. *Bone* **2008**, *23* (1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>.
- (34) Polo, E.; Del Pino, P.; Pelaz, B.; Grazu, V.; De la Fuente, J. M. Plasmonic-Driven Thermal Sensing: Ultralow Detection of Cancer Markers. *Chem. Commun.* **2013**, *49* (35), 3676–3678. <https://doi.org/10.1039/c3cc39112d>.
- (35) Howard, G. C.; Bethell, D. R. *Basic Methods in Antibody Production and Characterization*; CRC Press, 2000. <https://doi.org/10.1201/9781420036534>.
- (36) Cho, I. H.; Paek, E. H.; Lee, H.; Kang, J. Y.; Kim, T. S.; Paek, S. H. Site-Directed Biotinylation of Antibodies for Controlled Immobilization on Solid Surfaces. *Anal. Biochem.* **2007**, *365* (1), 14–23. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2007.02.028>.
- (37) Roper, D. K.; Ahn, W.; Hoepfner, M. Microscale Heat Transfer Transduced by Surface Plasmon Resonant Gold Nanoparticles. *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111* (9), 3636–3641. <https://doi.org/10.1021/jp064341w>.
- (38) Savchuk, O. A.; Carvajal, J. J.; Massons, J.; Aguiló, M.; Díaz, F. Determination of Photothermal Conversion Efficiency of Graphene and Graphene Oxide through an Integrating Sphere Method. *Carbon N. Y.* **2016**, *103*, 134–141. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2016.02.075>.
- (39) Montenegro, J. M.; Grazu, V.; Sukhanova, A.; Agarwal, S.; de la Fuente, J. M.; Nabiev, I.; Greiner, A.; Parak, W. J. Controlled Antibody/(Bio-) Conjugation of Inorganic Nanoparticles for Targeted Delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65* (5), 677–688. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.12.003>.
- (40) Bayer, E. A.; Ben-Hur, H.; Wilchek, M. Isolation and Properties of Streptavidin. *Methods Enzymol.* **1990**, *184* (C), 80–89. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)84262-F](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)84262-F).
- (41) Yeow, N.; Tabor, R. F.; Garnier, G. Mapping the Distribution of Specific Antibody Interaction Forces on Individual Red Blood Cells. *Sci. Rep.* **2017**, *7* (August 2016), 1–7. <https://doi.org/10.1038/srep41956>.
- (42) Avdelidis, N. P.; Moropoulou, A. Emissivity Considerations in Building Thermography. *Energy Build.* **2003**, *35* (7), 663–667. [https://doi.org/10.1016/S0378-7788\(02\)00210-4](https://doi.org/10.1016/S0378-7788(02)00210-4).
- (43) Duijvesz, D.; Versluis, C. Y. L.; Van Der Fels, C. A. M.; Vredenburgt-Van Den Berg, M. S.;

- Leivo, J.; Peltola, M. T.; Bangma, C. H.; Pettersson, K. S. I.; Jenster, G. Immuno-Based Detection of Extracellular Vesicles in Urine as Diagnostic Marker for Prostate Cancer. *Int. J. Cancer* **2015**, *137* (12), 2869–2878.
- (44) Théry, C. et al. Minimal Information for Studies of Extracellular Vesicles 2018 (MISEV2018): A Position Statement of the International Society for Extracellular Vesicles and Update of the MISEV2014 Guidelines. *J. Extracell. Vesicles* **2018**, *7* (1), 1535750.
- (45) Duijvesz, D.; Luider, T.; Bangma, C. H.; Jenster, G. Exosomes as Biomarker Treasure Chests for Prostate Cancer. *Eur. Urol.* **2011**, *59* (5), 823–831. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2010.12.031>.
- (46) Duijvesz, D.; Burnum-Johnson, K. E.; Gritsenko, M. A.; Hoogland, A. M.; Vredenburg-van Den Berg, M. S.; Willemsen, R.; Luider, T.; Paša-Tolić, L.; Jenster, G. Proteomic Profiling of Exosomes Leads to the Identification of Novel Biomarkers for Prostate Cancer. *PLoS One* **2013**, *8* (12), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082589>.
- (47) Kalra, H. et. al. Vesiclepedia: A Compendium for Extracellular Vesicles with Continuous Community Annotation. *PLoS Biol.* **2012**, *10* (12), 8–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001450>.
- (48) Hartjes, T. A.; Mytnyk, S.; Jenster, G. W.; van Steijn, V.; van Royen, M. E. Extracellular Vesicle Quantification and Characterization: Common Methods and Emerging Approaches. *Bioengineering* **2019**, *6* (1). <https://doi.org/10.3390/bioengineering6010007>.
- (49) Cordonnier, M.; Chanteloup, G.; Isambert, N.; Seigneuric, R.; Fumoleau, P.; Garrido, C.; Gobbo, J. Exosomes in Cancer Theranostic: Diamonds in the Rough. *Cell Adh. Migr.* **2017**, *11* (2), 151–163. <https://doi.org/10.1080/19336918.2016.1250999>.
- (50) Castro-Giner, F.; Gkountela, S.; Donato, C.; Alborelli, I.; Quagliata, L.; Ng, C.; Piscuoglio, S.; Aceto, N. Cancer Diagnosis Using a Liquid Biopsy: Challenges and Expectations. *Diagnostics* **2018**, *8* (2), 31. <https://doi.org/10.3390/diagnostics8020031>.
- (51) Zhang, Y.; Liu, Y.; Liu, H.; Tang, W. H. Exosomes: Biogenesis, Biologic Function and Clinical Potential. *Cell Biosci.* **2019**, *9* (1), 19. <https://doi.org/10.1186/s13578-019-0282-2>.
- (52) Yáñez-Mó, M. et. al. Biological Properties of Extracellular Vesicles and Their Physiological Functions. *J. Extracell. Vesicles* **2015**, *4*, 27066.
- (53) Colombo, M.; Raposo, G.; Théry, C. Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2014**, *30*, 255–289.
- (54) McAndrews, K. M.; Kalluri, R. Mechanisms Associated with Biogenesis of Exosomes in Cancer. *Mol. Cancer* **2019**, *18* (1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12943-019-0963-9>.
- (55) Martin-Gracia, B.; Martin-Barreiro, A.; Cuestas-Ayllon, C.; Grazu, V.; Line, A.; Llorente, A.; Martínez de la Fuente, J.; Moros, M. Nanoparticle-Based Biosensors for Detection of Extracellular Vesicles in Liquid Biopsies. *J. Mater. Chem. B* **2020**. <https://doi.org/10.1039/d0tb00861c>.
- (56) Nawrot, W.; Drzozga, K.; Baluta, S.; Cabaj, J.; Malecha, K. A Fluorescent Biosensors for Detection Vital Body Fluids' Agents. *Sensors (Switzerland)* **2018**, *18* (8), 1–21. <https://doi.org/10.3390/s18082357>.
- (57) Wu, D.; Sedgwick, A. C.; Gunnlaugsson, T.; Akkaya, E. U.; Yoon, J.; James, T. D. Fluorescent

- Chemosensors: The Past, Present and Future. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46* (23), 7105–7123. <https://doi.org/10.1039/c7cs00240h>.
- (58) Chia, B. S.; Low, Y. P.; Wang, Q.; Li, P.; Gao, Z. Advances in Exosome Quantification Techniques. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **2017**, *86*, 93–106. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.10.012>.
- (59) He, F.; Wang, J.; Yin, B. C.; Ye, B. C. Quantification of Exosome Based on a Copper-Mediated Signal Amplification Strategy. *Anal. Chem.* **2018**, *90* (13), 8072–8079. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b01187>.
- (60) Gao, M. L.; Yin, B. C.; Ye, B. C. Construction of a DNA-AuNP-Based Satellite Network for Exosome Analysis. *Analyst* **2019**, *144* (20), 5996–6003. <https://doi.org/10.1039/c9an01328h>.
- (61) Islam, M. K.; Syed, P.; Lehtinen, L.; Leivo, J.; Gidwani, K.; Wittfooth, S.; Pettersson, K.; Lamminmäki, U. A Nanoparticle-Based Approach for the Detection of Extracellular Vesicles. *Sci. Rep.* **2019**, *9* (1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46395-2>.
- (62) Kim, C.; Lee, K. Polydiacetylene (PDA) Liposome-Based Immunosensor for the Detection of Exosomes. *Biomacromolecules* **2019**, *20* (9), 3392–3398. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.9b00641>.
- (63) Tayebi, M.; Tavakkoli Yarak, M.; Yang, H. Y.; Ai, Y. A MoS₂-MWCNT Based Fluorometric Nanosensor for Exosome Detection and Quantification. *Nanoscale Adv.* **2019**, *1* (8), 2866–2872. <https://doi.org/10.1039/c9na00248k>.
- (64) Wang, H.; Chen, H.; Huang, Z.; Li, T.; Deng, A.; Kong, J. DNase I Enzyme-Aided Fluorescence Signal Amplification Based on Graphene Oxide-DNA Aptamer Interactions for Colorectal Cancer Exosome Detection. *Talanta* **2018**, *184* (March), 219–226. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.02.083>.
- (65) Xia, Y.; Liu, M.; Wang, L.; Yan, A.; He, W.; Chen, M.; Lan, J.; Xu, J.; Guan, L.; Chen, J. A Visible and Colorimetric Aptasensor Based on DNA-Capped Single-Walled Carbon Nanotubes for Detection of Exosomes. *Biosens. Bioelectron.* **2017**, *92* (November 2016), 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.01.063>.
- (66) Jin, D.; Yang, F.; Zhang, Y.; Liu, L.; Zhou, Y.; Wang, F.; Zhang, G. J. ExoAPP: Exosome-Oriented, Aptamer Nanoprobe-Enabled Surface Proteins Profiling and Detection. *Anal. Chem.* **2018**, *90* (24), 14402–14411. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b03959>.
- (67) Zhang, Q.; Wang, F.; Zhang, H.; Zhang, Y.; Liu, M.; Liu, Y. Universal Ti₃C₂MXenes Based Self-Standard Ratiometric Fluorescence Resonance Energy Transfer Platform for Highly Sensitive Detection of Exosomes. *Anal. Chem.* **2018**, *90* (21), 12737–12744. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b03083>.
- (68) Chen, X.; Lan, J.; Liu, Y.; Li, L.; Yan, L.; Xia, Y.; Wu, F.; Li, C.; Li, S.; Chen, J. A Paper-Supported Aptasensor Based on Upconversion Luminescence Resonance Energy Transfer for the Accessible Determination of Exosomes. *Biosens. Bioelectron.* **2018**, *102* (November), 582–588. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.12.012>.
- (69) Wang, Y.; Luo, D.; Fang, Y.; Wu, W.; Wang, Y.; Xia, Y.; Wu, F.; Li, C.; Lan, J.; Chen, J. An Aptasensor Based on Upconversion Nanoparticles as LRET Donors for the Detection of Exosomes. *Sensors Actuators, B Chem.* **2019**, *298* (March), 126900. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.126900>.
- (70) Stefanius, K.; Servage, K.; Santos, M. de S.; Gray, H. F.; Toombs, J. E.; Chimalapati, S.; Kim,

- M. S.; Malladi, V. S.; Brekken, R.; Orth, K. Human Pancreatic Cancer Cell Exosomes, but Not Human Normal Cell Exosomes, Act as an Initiator in Cell Transformation. *Elife* **2019**, *8*, 1–26. <https://doi.org/10.7554/eLife.40226>.
- (71) Coumans, F. A. W.; Gool, E. L.; Nieuwland, R. Bulk Immunoassays for Analysis of Extracellular Vesicles. *Platelets* **2017**, *28* (3), 242–248. <https://doi.org/10.1080/09537104.2016.1265926>.
- (72) Nouhi, A.; Hajjoul, H.; Redon, R.; Gagné, J. P.; Mounier, S. Time-Resolved Laser Fluorescence Spectroscopy of Organic Ligands by Europium: Fluorescence Quenching and Lifetime Properties. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2018**, *193*, 219–225. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.12.028>.
- (73) Hu, Y.; Liu, C.; Muyldermans, S. Nanobody-Based Delivery Systems for Diagnosis and Targeted Tumor Therapy. *Front. Immunol.* **2017**, *8* (NOV). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01442>.
- (74) Salvador, J. P.; Vilaplana, L.; Marco, M. P. Nanobody: Outstanding Features for Diagnostic and Therapeutic Applications. *Anal. Bioanal. Chem.* **2019**, *411* (9), 1703–1713. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-01633-4>.
- (75) Basu, B. B. J.; Vasantharajan, N. Temperature Dependence of the Luminescence Lifetime of a Europium Complex Immobilized in Different Polymer Matrices. *J. Lumin.* **2008**, *128* (10), 1701–1708. <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2008.03.024>.
- (76) Uchiyama, S.; Kimura, K.; Gota, C.; Okabe, K.; Kawamoto, K.; Inada, N.; Yoshihara, T.; Tobita, S. Environment-Sensitive Fluorophores with Benzothiadiazole and Benzoselenadiazole Structures as Candidate Components of a Fluorescent Polymeric Thermometer. *Chem. - A Eur. J.* **2012**, *18* (31), 9552–9563. <https://doi.org/10.1002/chem.201200597>.
- (77) Uchiyama, S.; Gota, C.; Tsuji, T.; Inada, N. Intracellular Temperature Measurements with Fluorescent Polymeric Thermometers. *Chem. Commun.* **2017**, *53* (80), 10976–10992. <https://doi.org/10.1039/c7cc06203f>.
- (78) Uchiyama, S.; Tsuji, T.; Ikado, K.; Yoshida, A.; Kawamoto, K.; Hayashi, T.; Inada, N. A Cationic Fluorescent Polymeric Thermometer for the Ratiometric Sensing of Intracellular Temperature. *Analyst* **2015**, *140* (13), 4498–4506. <https://doi.org/10.1039/c5an00420a>.
- (79) Kauffman, G. B.; Uchiyama, S.; Silva, A. P. De. Products of Chemistry Luminescent Molecular Thermometers. *J. Chem. Educ.* **2006**, *83* (5).
- (80) Borse, V. B.; Konwar, A. N.; Jayant, R. D.; Patil, P. O. Perspectives of Characterization and Bioconjugation of Gold Nanoparticles and Their Application in Lateral Flow Immunosensing. *Drug Deliv. Transl. Res.* **2020**, 878–902. <https://doi.org/10.1007/s13346-020-00771-y>.
- (81) Ali, M.; Sajid, M.; Khalid, M. A. U.; Kim, S. W.; Lim, J. H.; Huh, D.; Choi, K. H. A Fluorescent Lateral Flow Biosensor for the Quantitative Detection of Vaspin Using Upconverting Nanoparticles. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2020**, *226*, 117610. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.117610>.
- (82) Chen, Y.; Fu, Q.; Xie, J.; Wang, H.; Tang, Y. Development of a High Sensitivity Quantum Dot-Based Fluorescent Quenching Lateral Flow Assay for the Detection of Zearalenone. *Anal. Bioanal. Chem.* **2019**, *411* (10), 2169–2175. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-01652-1>.

- (83) Moyano, A.; Serrano-Pertierra, E.; Salvador, M.; Martínez-García, J. C.; Rivas, M.; Blanco-López, M. C. Magnetic Lateral Flow Immunoassays. *Diagnostics* **2020**, *10* (5). <https://doi.org/10.3390/diagnostics10050288>.
- (84) Humasis CEA Test <http://www.humasis.com/> (accessed Jul 22, 2020).
- (85) Concile CEA y CA19.9 Test <https://www.concile.de/> (accessed Jul 22, 2020).
- (86) Turklab CEA Test <http://www.turklab.com.tr/> (accessed Jul 22, 2020).
- (87) Boditech CEA Test <http://www.boditech.co.kr/eng/> (accessed Jul 22, 2020).
- (88) Alltest CA19.9 Test <http://www.custom-monoclonalantibody.com/sale-12030742-fast-reading-convenient-rapid-test-kit-ce-certificate-for-carbohydrate-antigen-19-9.html> (accessed Jul 22, 2020).
- (89) Yu, Q.; Zhao, Q.; Wang, S.; Zhao, S.; Zhang, S.; Yin, Y.; Dong, Y. Development of a Lateral Flow Aptamer Assay Strip for Facile Identification of Theranostic Exosomes Isolated from Human Lung Carcinoma Cells. *Anal. Biochem.* **2020**, *594*, 113591.
- (90) Huang, L.; Tian, S.; Zhao, W.; Liu, K.; Ma, X.; Guo, J. Multiplexed Detection of Biomarkers in Lateral-Flow Immunoassays. *Analyst* **2020**, *145* (8), 2828–2840. <https://doi.org/10.1039/c9an02485a>.
- (91) Wang, J.; Cao, F.; He, S.; Xia, Y.; Liu, X.; Jiang, W.; Yu, Y.; Zhang, H.; Chen, W. FRET on Lateral Flow Test Strip to Enhance Sensitivity for Detecting Cancer Biomarker. *Talanta* **2018**, *176* (April 2017), 444–449. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.07.096>.
- (92) Liu, F.; Zhang, H.; Wu, Z.; Dong, H.; Zhou, L.; Yang, D.; Ge, Y.; Jia, C.; Liu, H.; Jin, Q.; Zhao, J.; Zhang, Q.; Mao, H. Highly Sensitive and Selective Lateral Flow Immunoassay Based on Magnetic Nanoparticles for Quantitative Detection of Carcinoembryonic Antigen. *Talanta* **2016**, *161*, 205–210. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.08.048>.
- (93) Lu, W.; Wang, K.; Xiao, K.; Qin, W.; Hou, Y.; Xu, H.; Yan, X.; Chen, Y.; Cui, D.; He, J. Dual Immunomagnetic Nanobeads-Based Lateral Flow Test Strip for Simultaneous Quantitative Detection of Carcinoembryonic Antigen and Neuron Specific Enolase. *Sci. Rep.* **2017**, *7* (February), 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep42414>.
- (94) Chen, Y.; Sun, J.; Xianyu, Y.; Yin, B.; Niu, Y.; Wang, S.; Cao, F.; Zhang, X.; Wang, Y.; Jiang, X. A Dual-Readout Chemiluminescent-Gold Lateral Flow Test for Multiplex and Ultrasensitive Detection of Disease Biomarkers in Real Samples. *Nanoscale* **2016**, *8* (33), 15205–15212. <https://doi.org/10.1039/c6nr04017a>.
- (95) Gao, X.; Zheng, P.; Kasani, S.; Wu, S.; Yang, F.; Lewis, S.; Nayeem, S.; Engler-Chiurazzi, E. B.; Wigginton, J. G.; Simpkins, J. W.; Wu, N. Paper-Based Surface-Enhanced Raman Scattering Lateral Flow Strip for Detection of Neuron-Specific Enolase in Blood Plasma. *Anal. Chem.* **2017**, *89* (18), 10104–10110. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b03015>.

Conclusions

This Doctoral Thesis has led to open new horizons in the design of nanobiosensors. New transduction strategies and detection schemes have been developed in order to achieve novel and highly sensitive analytical devices, through the application of the optical properties of AuNMs in the development of photonic biosensors.

Chapter 1 and 2 have explored the development of optical-based enzymatic nanobiosensors:

- The fluorescence changes of AuNCs covalently linked to choline oxidase have been used for the development of an enzymatic nanobiosensor for the determination of neurotransmitter acetylcholine, through the coupling of the acetylcholine esterase enzymatic reaction. The detection mechanism has been studied observing two different effects on the fluorescence of AuNCs at 700 nm: the fluorescence resonance energy transfer (FRET) between AuNCs-FAD and the quenching effect of O₂ (which is consumed during the enzymatic reaction). A mathematical model capable of adjusting to the fluorescence behaviour of AuNCs has been designed. The analytical parameters of the method have been obtained, showing its wide possibilities for the determination of Ch and ACh.
- The quenching mechanism on the fluorescence of AuNCs has been studied, showing that its interaction with O₂ follows the Stern-Volmer collisional model. In the view of these results, the coupling of AuNCs as oxygen probes in enzymatic reactions has been evaluated. The reaction of the enzyme diamine oxidase (DAO) with its substrate cadaverine has been studied in order to obtain a rapid and in situ determination of biogenic amines in food. Homemade cellulose supports with entrapped AuNCs-DAO has allowed to develop a rapid enzymatic method for the determination of cadaverine relating the increase in the fluorescence of the AuNCs-DAO test strip with the consumption of O₂ in the enzymatic reaction. This methodology allows the quantification of this biogenic amine and shows potential for its application to other enzymatic reactions with consumption of O₂.
- The use of immobilized AuNCs-silica as high-temperature O₂ probes has been also studied, observing the permanence of fluorescence up to 200 °C. The response to O₂ at high temperatures has been evaluated in the temperature range from 30 to 100 °C, the sensor has a detection limit of 3% (V/V) of O₂. This new type of sensor based on fluorescence AuNCs is as an interesting alternative for non-invasive monitoring of O₂ in thermally aggressive environments or for the monitoring of enzymatic reactions that show their maximum activity at high temperatures.
- The *in-situ* synthesis of enzyme-encapsulated gold nanoclusters has been carried out through a bottom up methodology consisting in the use of the amino acid residues of the enzymes as reductants of Au(III). The flavoenzyme L-phenylalanine oxidase (LAAO) has been chosen as model and the synthesis methodology has been optimized. The spectroscopic properties of the obtained nanostructures, have been studied. Finally, the possibilities of synthesized AuNMs in their application to the enzymatic detection of L-phenylalanine has been evaluated. The results obtained have shown faster reaction kinetics of the LAAO enzyme (FAD) with its substrate and the variation in the fluorescence of AuNCs. This variation in fluorescence was proportional to the oxygen concentration, which in turn correlates with the substrate concentration. However, the observed reaction times are still considered too long to establish this as a useful determination method. Nevertheless, it has

been probed that the in situ synthesis of AuNCs and the monitoring of their fluorescent properties is a suitable method for the determination of substrates without the use of indicator reactions, that can be applied to other enzymatic reactions, with more favourable reaction kinetics and allow their use in the development of analytical techniques.

- An enzymatic-colorimetric method has been developed based on the reaction between L-phenylalanine and the LAAO in presence of Au (III), which lead to the formation of gold nanoparticles that can be related to the concentration of L-Phe in the sample. The mechanism has been studied and the experimental synthesis conditions have been optimized. The calibration of the method for the detection of L-Phe has been carried out, observing a sigmoid response between the concentration of the substrate and the absorbance of the nanoparticles generated after the enzymatic reaction. The kinetics has been optimized and the sensitivity of the method improved through the coupling of the enzyme catalase to the reaction. The developed methodology shows analytical properties comparable with those obtained by HPLC or bacterial inhibition methods used as gold standard methodologies. Finally, an interference study has shown that this method as a good candidate for the determination of the target amino acid in blood serum samples.

Chapter 3 have explored the development of photothermal plasmonic immuno-nanobiosensors for the detection of different cancer markers. High sensitivity diagnosis platforms have been developed based on gold nanoprism (AuNPrs) thermal detection:

- First, the possibilities of the thermo-sensing technology for the detection of gastrointestinal cancer markers, has been evaluated through the design of a new thermal nano-immunoassay (ThermoLISA), comparing its sensitivity with that of the classic colorimetric ELISA. The streptavidin-biotin strategy has been used to obtain a versatile bioconjugate AuNPrs@strep, that can be subsequently linked to any biotinylated detection antibody of interest. In the presence of the analyte to be detected, a "sandwich" of biomolecule-nanoparticles is formed and the irradiation of the wells with a NIR laser source allows thermal transduction of the biological signal. The evaluation of these signals with an IR camera by extracting the emission-decay signal area provides an analytical correlation between local heat triggered and the concentration of the target analyte. The final ThermoLISA developed greatly increases the sensitivity, decreases the LOD and LOQ, and shows low RSD compared to the classic colorimetric ELISA. The method has been successfully applied in plasma samples without observing significant matrix interferences.
- The combination of ThermoLISA and fluorescent detection (time resolved fluorescence immunoassays), has led to the development of a new ThermoTRFIA methodology, based on transferring the heat changes to a fluorescent output signal, for prostate-derived EVs detection. This methodology has used bacteriophages (M13) with single domain nanonodies as specific detection elements and Europium as fluorescent probe. The detection scheme promotes the exchange of thermal energy between AuNPrs and the Europium labels of the Anti-M13 antibody. Thus, it has been shown that the fluorescence of europium decreases due to the local heating triggered on the AuNPrs during IR laser irradiation and afterwards, an increase in the fluorescence intensity is observed due to the progressive cooling of the well. The analytical treatment of these signals allows the quantitative detection, significantly reducing the LOD of fluorescent methods developed in recent years. Furthermore, these results show the possibility of transferring thermal sensor

technology to the detection of more complex analytes, improving the analytical properties of the method.

- Finally, an innovative and sensitive thermal lateral flow immunoassay ThermoLFIA, has been developed for the detection of gastrointestinal cancer markers, using the AuNPrs bioconjugate optimized for the ThermoELISA biosensing scheme. For the manufacturing of the LFIA test, the analytical optimization of various important factors has been carried out. If the analyte is present in the sample, the irradiation of the test line area by a NIR laser source causes the AuNPrs retained on the test line to release large amounts of heat. This allows the quantification of the analyte through the gray-scale signal imprinted in a thermosensitive paper coupled to the nitrocellulose strip. These signals have been evaluated by means of the study of their RGB coordinates with a mobile phone camera and a RGB app. This simple and fast methodology allows the quantification of the studied markers within the range of clinical interest, showing in some cases LOD and LOQ better than those presented by the colorimetric ELISA or even the also developed ThermoLISA detection methodology. ThermoLFIA strips have been optimized for their application to plasma samples, thus avoiding the problems derived from plasma viscosity. The results obtained have confirmed the great potential of this POC methodology in cancer diagnosis.

Thesis summary

Photonic applications of gold nanomaterials in the development of enzymatic and immunological biosensors

Biosensors are defined as integrated receptor–transducer devices that use specific biochemical reactions mediated by biorecognition reagents such as isolated enzymes, DNA aptamers, immunosystems, tissues, organelles or whole cells to detect chemical compounds providing selective quantitative or semi-quantitative analytical information usually by electrical, thermal or optical signals^{1,2}. Biosensors are becoming essential in the fields of health care diagnostics for chemical and biological analysis³. During the last two decades, attention has been focused on the use of biosensors for specific analysis by selectively binding the target compounds. In this context, the use of the optical properties of nanomaterials has opened new and promising lines of research for the development of transducer systems that can be the basis of ultrasensitive optical **nanobiosensors**⁴. Their dimensions ranging in the nanometric scale, display unique structural, chemical, optical and mechanical features due to effects such as the quantum size effect, their large surface to mass ratio and their ability to interact with bio-molecules such as proteins, nucleic acids, lipids and even biological metabolites⁵. Nanoparticles (NPs) properties find importance in biomedical applications, more particularly for multimodal disease diagnostics, imaging and sensing⁶.

Nanomaterials are generally incorporated as labelling agents of the biological recognition elements used, but they can act also as solid support of the bioreceptor besides as an indicator⁷. In this way, **optical nanobiosensors** use metallic nanoparticles bound to detection biomolecules to promote biorecognition interactions on their surface. The binding of target analytes induced the change in the optical properties of these nanomaterials that could be transduced into a clearly detectable optical signal through the **amplification of the biological signal**.

Metallic NPs, in particular **gold nanomaterials (AuNMs)**, excited with light of proper wavelengths (usually UV-visible or vis-NIR), produce strong absorption bands and high scattering of radiation. These bands are due to the coupling of the conduction electrons, located on the surface of the nanomaterial, with radiation phenomenon known as *localized surface plasmon resonance* (LSPR). AuNMs has also been used as highly efficient long-range fluorescence

¹ Iupac. Glossary for Chemist for Terms Used in Biotechnology. *Compend. Chem. Terminol. (The Golden Book)* **1997**, 64 (1), 143–168.

² Thévenot, D. R.; Toth, K.; Durst, R. A.; Wilson, G. S. Electrochemical Biosensors: Recommended Definitions and Classification. *Biosens. Bioelectron.* **2001**, 16 (1–2), 121–131.

³ Altintas, Z. *Biosensors and Nanotechnology: Applications in Health Care Diagnostics.*; John Wiley & Sons, 2017.

⁴ Jianrong, C.; Yuqing, M.; Nongyue, H.; Xiaohua, W.; Sijiao, L. Nanotechnology and Biosensors. *Biotechnol. Adv.* **2004**, 22 (7), 505–518.

⁵ Saptarshi, S. R.; Duschl, A.; Lopata, A. L. Interaction of Nanoparticles with Proteins: Relation to Bio-Reactivity of the Nanoparticle. *J. Nanobiotechnology* **2013**, 11 (1), 1–12.

⁶ Ramesh Raliya, Tandeep Singh Chadha, Kelsey Hadad, and P. B. Perspective on Nanoparticle Technology for Biomedical Use. *Curr Pharm Des.* **2016**, 22 (17), 2481–2490.

⁷ Willner, I.; Willner, B. Biomolecule-Based Nanomaterials and Nanostructures. *Nano Lett.* **2010**, 10 (10), 3805–3815.

acceptors in *energy transfer processes* (FRET)⁸ or in *fluorescence quenching*^{9,10} for biological and medical applications due to its higher quenching efficiency in a wide spectral range. The key point of all these types of optical process is the distance between the nanoparticle and the recognition biomolecule, as well as its interaction with the analyte or events associated to this binding that could affect this key distance.

Additionally, in the field of optical nanobiosensors, the capacity of nanomaterials of also be able to act as solid supports, facilitates not only miniaturization (point of care biosensors), but also operational stability and even their ease of handling. However, the incorporation of the AuNMs as labels to the recognition biomolecules has the most impact in diagnosis systems due to its ability to provide novel indicator schemes¹¹. They represent an improvement in sensitivity, stability and biocompatibility with respect to conventional colorimetric and fluorimetric labelling systems. In consequence, AuNMs can lead to the development of optical biosensors not only for *ex situ* but also for *in situ monitoring of parameters of biomedical and biotechnological interest*.

The design of AuNMs as labels requires considering important aspects as:

- 1) The **election of nanomaterials** with suitable **optical properties** to be used as indicators and to solve specific problems for each application (biological interferences, lack of sensitivity, non-selectivity, long-term stability...)
- 2) **Selection of an appropriate (bio)chemical receptor** as a basis for specific biological recognition.
- 3) **Nanomaterial-receptor binding strategies**: the nanomaterial must be linked to the receptor in an oriented and stable way, guaranteeing the synergy between its optical properties with the specificity of the receptor
- 4) **Physical basis of transduction**: knowledge of the optical analytical signal and its relationship with the biological interaction and the concentration of the analyte to be determined.

The aim of this PhD Thesis is the application of the optical properties of AuNMs in the development of photonic biosensors for the determination of biomedical interest biomarkers. During this work, it has been synthesized and characterized various AuNMs and implemented in specific enzymatic reaction or immunoassays with improved sensitivity and point-of-care adaptability with respect to traditional biosensing schemes. The selectivity of these systems focuses on the selection of the appropriate biological receptors for each target analyte and the study of oriented binding strategies of AuMNs to them, considering optimal conditions to ensure the most effective transduction between the biological recognition and the photonic mechanisms involved in each case.

⁸ Shi, J.; Tian, F.; Lyu, J.; Yang, M. Nanoparticle Based Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) for Biosensing Applications. *J. Mater. Chem. B* **2015**, *3* (35), 6989–7005.

⁹ Halawa, M. I.; Gao, W.; Saqib, M.; Kitte, S. A.; Wu, F.; Xu, G. Sensitive Detection of Alkaline Phosphatase by Switching on Gold Nanoclusters Fluorescence Quenched by Pyridoxal Phosphate. *Biosens. Bioelectron.* **2017**, *95* (March), 8–14.

¹⁰ Liu, J.; Guan, Z.; Lv, Z.; Jiang, X.; Yang, S.; Chen, A. Improving Sensitivity of Gold Nanoparticle Based Fluorescence Quenching and Colorimetric Aptasensor by Using Water Resuspended Gold Nanoparticle. *Biosens. Bioelectron.* **2014**, *52*, 265–270.

¹¹ Holzinger, M.; Goff, A. Le; Cosnier, S. Nanomaterials for Biosensing Applications: A Review. *Front. Chem.* **2014**, *2* (AUG), 1–10.

The optimization and the evaluation of the analytical response of the developed nanobiosensors, has allowed the quantitative determination of analytes of importance for cancer detection (gastrointestinal and prostate cancer markers), control food quality (biogenic amines) and for other biomedical applications such as the determination of neurotransmitters (acetylcholine) and amino acids (L-phenylalanine), related to specific diseases. Chapter 1 and 2 are related to the different approaches explored for the development of optical based enzymatic nanobiosensors, and Chapter 3 is focused on the development of nanoimmunosensors. In all cases, new biosensing schemes were developed having good analytical features such as high sensitivity and fast response. Indeed, several of them have sufficient potential to initiate a feasibility study of a possible further maturation of their Technology Readiness Level (TRL). In particular, the use of thermal labels for the development of a Thermal Nano-linked immune Sorbent Assay (ThermoLISA) and a Thermal Lateral Flow immunoassay (ThermoLFIA) has been done in collaboration with Nanoimmunotech SL.

Chapter 1: Enzymatic nano(bio)sensors based on the fluorescence of gold nanoclusters.

The main objective of this Chapter is to study the possibilities of the use of gold nanoclusters (AuNCs) with Vis-NIR fluorescence¹² in the development of nanobiosensors for the analytical determination of small molecules of biomedical interest¹³. The basis of these systems focuses on monitoring the variation of the fluorescent properties of AuNCs due to their interaction with molecules involved in the mechanism of reaction of redox enzymes used as biological recognition elements in the biosensing schemes proposed¹⁴.

The use of AuNCs seeks to take the advantage of these nanomaterials compared to the use of conventional fluorophores which can present problems such as chemical degradation, the existence of spectral interferences in biological samples (minimized when the signal to be detected is shifted from the Vis to the Vis-NIR region of light spectra) and in many cases low biocompatibility.

Section 1A. Enzymatic nanobiosensor based on the fluorescence of gold nanocluster for the determination of acetylcholine:

The most commonly used method for the optical determination of the neurotransmitter acetylcholine (ACh) is based on coupling the enzymatic reaction of acetylcholinesterase (ACE) with that of choline oxidase (ChOx) and an indicating auxiliary reaction (peroxidase plus an appropriate dye), where the determination of acetylcholine is carried out as a function of the concentration of choline (Ch) formed¹⁵.

¹² Yu, P.; Wen, X.; Toh, Y. R.; Ma, X.; Tang, J. Fluorescent Metallic Nanoclusters: Electron Dynamics, Structure, and Applications. *Part. Part. Syst. Charact.* **2015**, *32* (2), 142–163.

¹³ Lin, C. A. J.; Lee, C. H.; Hsieh, J. T.; Wang, H. H.; Li, J. K.; Shen, J. L.; Chan, W. H.; Yeh, H. I.; Chang, W. H. Synthesis of Fluorescent Metallic Nanoclusters toward Biomedical Application: Recent Progress and Present Challenges. *J. Med. Biol. Eng.* **2009**, *29* (6), 276–283.

¹⁴ Aldeek, F.; Muhammed, M. A. H.; Palui, G.; Zhan, N.; Mattoussi, H. Growth of Highly Fluorescent Polyethylene Glycol- and Zwitterion- Functionalized Gold Nanoclusters. *ACS Nano* **2013**, *7* (3), 2509–2521.

¹⁵ Galbán, J.; Sanz-Vicente, I.; Navarro, J.; De Marcos, S. The Intrinsic Fluorescence of FAD and Its Application in Analytical Chemistry: A Review. *Methods Appl. Fluoresc.* **2016**, *4* (4).

The objective of this section is the development of a method for the indirect determination of the neurotransmitter ACh based on the measurement of the fluorescent signal of AuNCs. The nanobiosensor design seeks to promote FRET between AuNCs and the flavin adenine dinucleotide (FAD) cofactor of the enzyme ChOx, in order to shift the Ch detection to the Vis-NIR zone, thus avoiding both the issues related with using colorimetric labels in the Vis region of the spectra and the need of coupling a colorimetric auxiliary indicator reaction. To do this, the synthesized AuNCs have been biofunctionalized using carbodiimide chemistry to obtain oriented-covalent binding of AuNCs in the proximities of the active site of the enzyme, where the FAD cofactor is located. (**Figure 1A**)

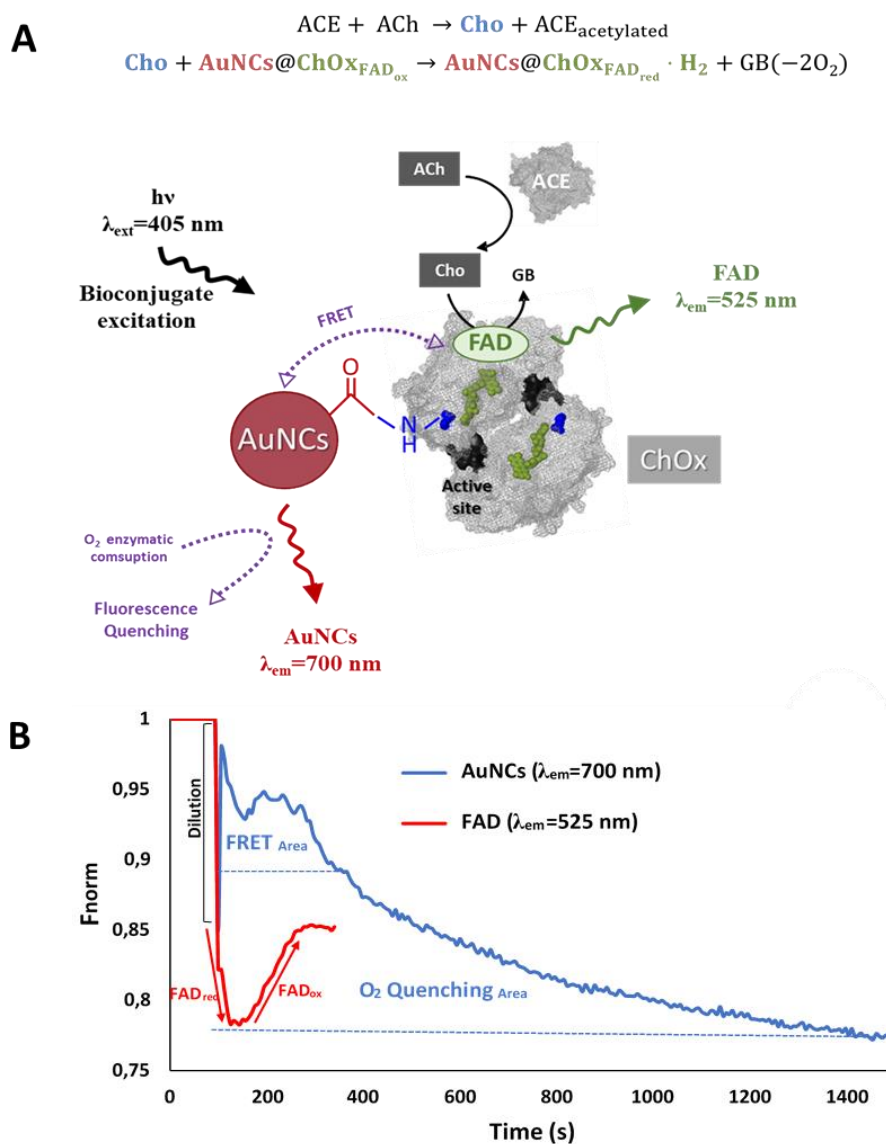


Figure 1: **A)** Enzymatic reaction and scheme of the enzymatic nanobiosensor **B)** Variation of fluorescence during the reaction of the AuNCs-ChOx bioconjugate with acetylcholine $2,5 \cdot 10^{-5}$ M with $\lambda_{\text{ext}} = 405$ nm.

The bioconjugates obtained have been characterized by molecular fluorescence and agarose gel electrophoresis, concluding that, 1 molecule of ChOx per 2 AuNCs is the optimal ratio for the biofunctionalization. In these conditions, the Vis-NIR fluorescence of AuNCs-ChOx varies during the enzymatic reaction proportionally to the ACh concentration.

The origin of this analytical signal has been studied (**Figure 1B**) and it has been concluded that the variation of the AuNCs-ChOx fluorescence is due to two differentiated effects: the fluorescence energy transfer between AuNCs and FAD (ChOx) and the O₂ quenching effect on the fluorescence of AuNCs. This methodology allows the determination of acetylcholine in a concentration range from 1.0·10⁻⁶ to 7.5·10⁻⁵ M and a DER=4%. This new approach can potentially be applied to the determination of other substrates which oxidation is catalyzed by a flavo-enzyme, in order to both increase their FAD fluorescence properties and move the fluorescence measurement to the vis-NIR region. The biosensor is reversible and avoids the problems due to the use of conventional fluorophores.

Section 1B. Gold nanoclusters as fluorescent probes for the detection of oxygen in enzymatic reactions:

As O₂ consumption during the enzymatic reaction produced an increase in the intensity of the fluorescence of AuNCs (see section A), the O₂ quenching effect was further studied, demonstrating that AuNCs can act in solution as fluorescent probes for oxygen O₂ through collisional Stern-Volmer model. Two types of AuNCs were evaluated; to do that, their lifetimes in aqueous solution, and their quenching constants (K_{sv}) and efficiencies (γ) were obtained.

Once the deactivation mechanism was studied, the main objective of this section was the evaluation of the possibilities of AuNCs as oxygen probes for monitoring enzymatic reactions that involve oxygen consumption. To do this, the reaction of the diamino oxidase enzyme (DAO) with its substrate cadaverine was studied (**Figure 2A**), in order to obtain an *in situ* determination of biogenic amines (BA) in food. Rapid and economical methods for the control of BA (mainly, histamine, tyramine, cadaverine and putrescine) are required by food industries and public health agencies. Their levels are indicators of food quality and freshness; in addition, at certain levels, their presence is related to intoxication and intolerance.¹⁶

The O₂ consumption in the DAO-cadaverine enzymatic reaction produces the increase in the AuNCs fluorescence which can be related to the concentration of AB. For the development of a rapid and point of care method, AuNCs and DAO were deposited into a cellulose support (**Figure 2B**). Then, the reaction was studied on this solid support with a portable fibre optic device equipped with a 450 nm LED as the excitation source and measuring the emission at 670 nm. The increase on the fluorescence (ΔF) of the AuNCs-DAO test strip, can be related to the concentration of BA (**Figure 2C**). The method allows the determination of cadaverine with a limit of detection (LOD) and quantification (LOQ) of 2,17·10⁻⁵ M and 7,25·10⁻⁵ M respectively.

¹⁶ Ordóñez, J. L.; Troncoso, A. M.; García-Parrilla, M. D. C.; Callejón, R. M. Recent Trends in the Determination of Biogenic Amines in Fermented Beverages – A Review. *Anal. Chim. Acta* **2016**, *939*, 10–25.

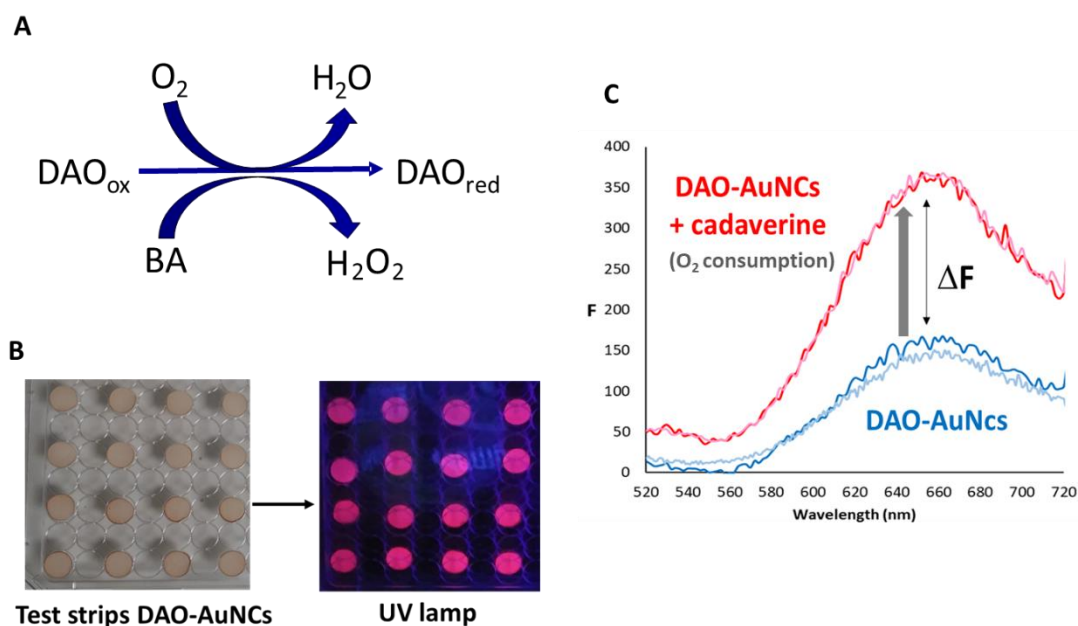


Figure 2: **A)** Scheme of the enzymatic reaction of DAO and BA. **B)** AuNCs and DAO immobilised into a cellulose support **C)** Variation on the fluorescence of AuNCs strip with the cadaverine addition.

In addition, the use of AuNCs as gas phase oxygen sensors was also evaluated. AuNCs were deposited on a silica support and tested for response to O₂ in gas phase using a miniaturized sensor (**Figure 3A**). These studies verified its functionality in the range of 0-100% O₂ (V/V) ensuring the reversibility of the O₂ deactivation process on the fluorescence of AuNCs deposited on solid supports, making it possible to use this sensor for at least 6 months with robust and reproducible response.

Some enzymes show their maximum activity at high temperatures^{17,18}, furthermore, the measurement of O₂ at high temperatures is also important in different industrial applications (automotive industry, power generation, food processing or chemical and biochemical reactors). However, commercial sensors based on organic fluorophores have limitations in O₂ detection at high temperatures (low stability that produces structural changes and therefore the modification of their optical properties). Due to their metallic nature, AuNCs are interesting candidates in this application, therefore the effect of the temperature on the fluorescence of AuNCs was studied in the range from 30 to 210 °C, showing that the fluorescence intensity slightly decreases with the temperature in a first heating cycle but remains constant in further cycles. Then, the response of AuNCs fluorescence to O₂ was evaluated (**Figure 3B**), demonstrating that the sensor has a K_{sv} that slightly drops with increasing temperature (**Figure 3C**). Measuring in gas phase at 100 °C, the sensor has a detection limit of 3% (V/V) O₂ at a signal-to-noise ratio of 3. These results have demonstrated for the first time the collisional deactivation mechanism to explain the effect of O₂ on gold nanocluster fluorescence. Also checking the possibility of its use in harsh reaction conditions that are needed by some enzymatic reactions.

¹⁷ Turner, N. A.; Vulfson, E. N. At What Temperature Can Enzymes Maintain Their Catalytic Activity? *Enzyme Microb. Technol.* **2000**, *27* (1–2), 108–113.

¹⁸ Daniel, R. M.; Danson, M. J. Temperature and the Catalytic Activity of Enzymes: A Fresh Understanding. *FEBS Lett.* **2013**, *587* (17), 2738–2743.

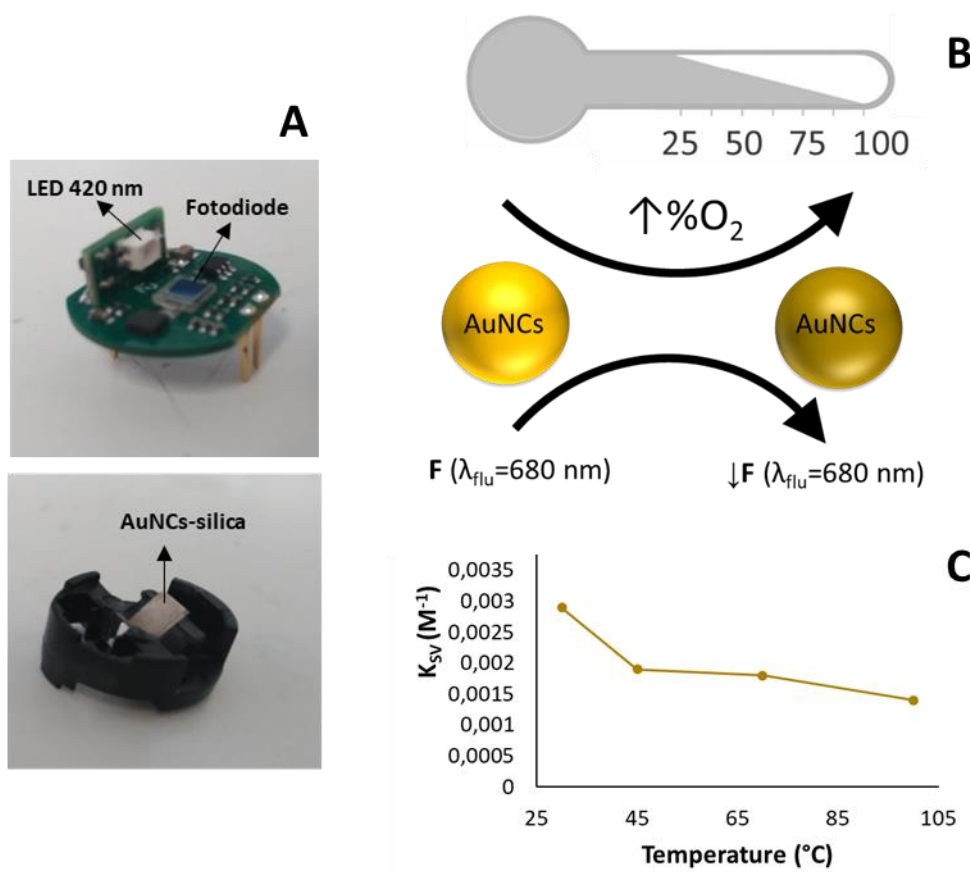


Figure 3: **A)** Miniaturized optical sensor modified with AuNCs immobilized on silica support. **B)** Scheme of the fluorescence response of AuNCs to the presence of O₂ at high temperatures. **C)** Effect of temperature on the Stern-Volmer constant for AuNCs immobilized on a silica support.

Chapter 2: Enzymatic *in situ* synthesis of gold nanoparticles and their application on the development of nanobiosensors

The molecular recognition ability of biofunctionalized gold nanoparticles (AuNPs) as well as their optical properties constitute, in most of the cases, the basis for biological detection. One of the most common options for the development of nanobiosensors is the prior synthesis of nanoparticles and their subsequent functionalization with the recognition biomolecules of interest (strategy used in Chapter 1: section A of this doctoral thesis). However, in many cases, the design of AuNPs through directed and *in situ* specific synthesis using the biological recognition ligands as reducing and capping agents constitutes a very interesting strategy to achieve the synthesis and biofunctionalization of the AuNPs in a single step. Thus, monitoring the optical properties of the AuNPs synthesized during the interaction with the biological recognition compound, allows the development of very interesting new mixed synthetic-sensory techniques, in which the optical signal of the *in situ* generated biofunctionalized nanoparticles is proportional to the concentration of the target compound.

In this chapter, two methods for *in situ* synthesis of AuNPs or AuNCs are proposed, exploring two different synthetic-sensory concepts; the *in-situ* synthesis of gold nanomaterials from the reducing residues of the enzyme; or the formation of gold nanoparticles, from the redox

properties of the enzyme and its interaction with the substrate, as an indicator of enzymatic reactions.

The flavoenzyme L-amino acid oxidase (LAO) was selected as a model, an oxidoreductase that catalyses the oxidative deamination of L-amino acids to keto acids releasing ammonia and hydrogen peroxide. The reduction of its FAD cofactor is mediated by the substrate consumption and subsequently an oxidative reaction completes the catalytic cycle by reoxidizing the FAD with molecular oxygen¹⁹.

The final goal of both sections is the evaluation of the optical properties of the synthesized AuNPs or AuNCs and their application for the quantitative determination of L-phenylalanine (L-Phe) in physiological fluids, which is critical for the diagnosis and treatment of disorders of its catabolism, such as phenylketonuria (PKU).²⁰

Section 2A. In situ synthesis of gold nanomaterials from the reducing residues of the enzyme L-amino acid oxidase.

The objective of this section is the synthesis of nanomaterials using an enzyme of biological interest as reducing and stabilizing molecules. These new nano-bio hybrids propose interesting strategies and aspects to explore; the possibility of tuning the optical properties of the synthesized AuNMs as a function of the protein used as reductant and ligand; and the use of its intrinsic optical properties for enzymatic determination.

This methodology consists in the use of amino acid residues of the enzymes to carry out the chemical reduction of Au(III): 1) The reducing residues tyrosine (tyr) and tryptophan (trp) reduce the Au ions; 2) the positively charged amino acids arginine (arg), lysine (lys) and histidine (his) are responsible for the coordination of the AuCl⁻ ions and determine the amount of Au incorporated in the enzyme; 3) and additionally cysteines (cys) stabilize the formation of AuNCs due to the well-known and very stable thiol-gold interaction²¹.

For the *in situ* synthesis of enzyme-encapsulated gold nanoclusters, the structure of the LAO enzyme²² has been studied; as a conclusion, the possibilities for the nanoparticle synthesis mediated by its protein residues have been checked (**Figure 4A**). Through the optimization of the factors involved in the synthesis, two types of nanostructures have been obtained. The characterization of their structural and optical properties has shown the formation of one AuNCs (8.3 ± 2.7 nm) population with Vis-NIR fluorescence and another population of larger nanoparticles (AuNPs, 27.1 ± 6.9 nm) grouped and surrounded by organic matter, showing fluorescence at 420 nm and surface plasmon at 530 nm. (**Figure 4B**). The results obtained in the characterization have led to the proposal of a hypothesis that could explain the synthesis

¹⁹ Castellano, F.; Molinier-Frenkel, V. An Overview of L-Amino Acid Oxidase Functions from Bacteria to Mammals: Focus on the Immunoregulatory Phenylalanine Oxidase IL4I1. *Molecules* **2017**, *22* (12), 1–11.

²⁰ (1) Blau, N.; Van Spronsen, F. J.; Levy, H. L. Phenylketonuria. *Lancet* **2010**, *376* (9750), 1417–1427. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60961-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60961-0).

²¹ Xu, Y.; Sherwood, J.; Qin, Y.; Crowley, D.; Bonizzoni, M.; Bao, Y. The Role of Protein Characteristics in the Formation and Fluorescence of Au Nanoclusters. *Nanoscale* **2014**, *6* (3), 1515–1524.

²² Moustafa, I. M.; Foster, S.; Lyubimov, A. Y.; Vrieling, A. Crystal Structure of LAO from *Calloselasma Rhodostoma* with an L-Phenylalanine Substrate: Insights into Structure and Mechanism. *J. Mol. Biol.* **2006**, *364* (5), 991–1002.

mechanism of these type of nanoparticles. The possibilities of synthesized nanoparticles have been studied in their application to the enzymatic detection of L-phenylalanine.

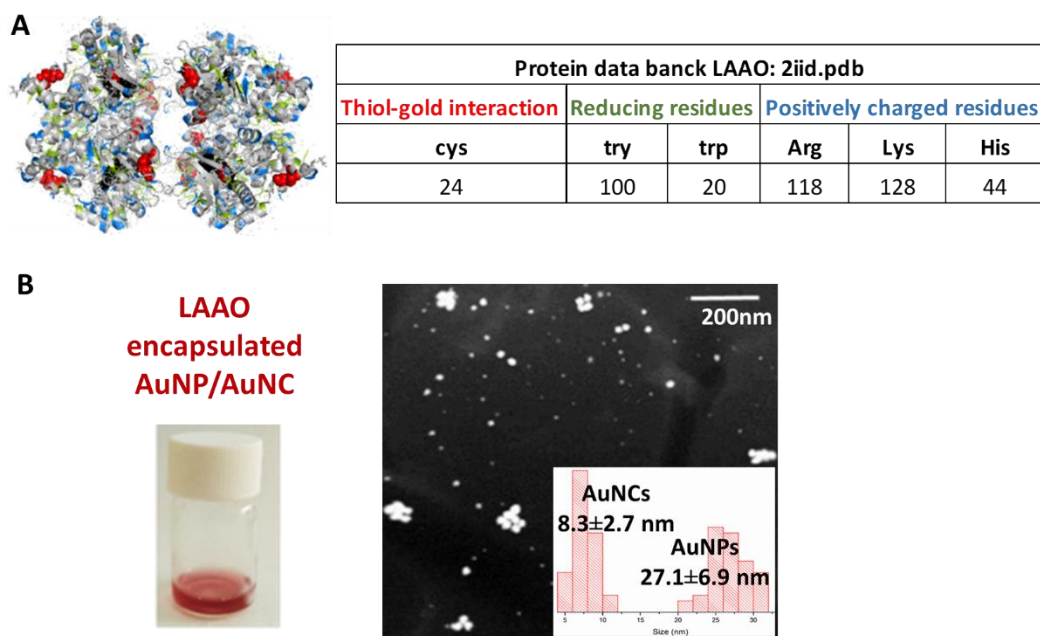


Figure 4: A) LAAO structure and availability of its amino acid residues; **B)** LAAO encapsulated AuNPs/AuNCs appearance and the size distribution of both nanomaterials extracted from the image obtained by transmission electron microscopy (TEM)

The results have shown a faster reaction kinetics of the LAAO enzyme with its substrate, however, the observed changes of FAD fluorescence during the reaction are insufficient for the development of an analytical method. Regarding the analytical application of the optical properties of the synthesized nanomaterials, although the variation of AuNCs fluorescence is proportional to the oxygen concentration, the reaction times are considered too long to establish a useful analytical method.

In view of these results, the following section 2B, explores the possibility of in situ synthesis of nanoparticles during the enzymatic reaction. This synthesis involves, in addition to the amino acid residues of the enzyme, the oxidation-reduction cycle of the enzyme during the reaction with the substrate.

Section 2B. Formation of gold nanoparticles as an indicator of enzymatic methods: colorimetric determination of L-phenylalanine

In this section, an enzymatic-colorimetric method has been developed based on the reaction between L-Phe and the L-aminoacid oxidase (LAAO) in the presence of Au (III), which have led to the formation of gold nanoparticles. Thus, the colour or intensity of the LSPR band of the generated nanoparticles (550 nm) can be related to the concentration of L-Phe in the sample. **(Figure 5A)**

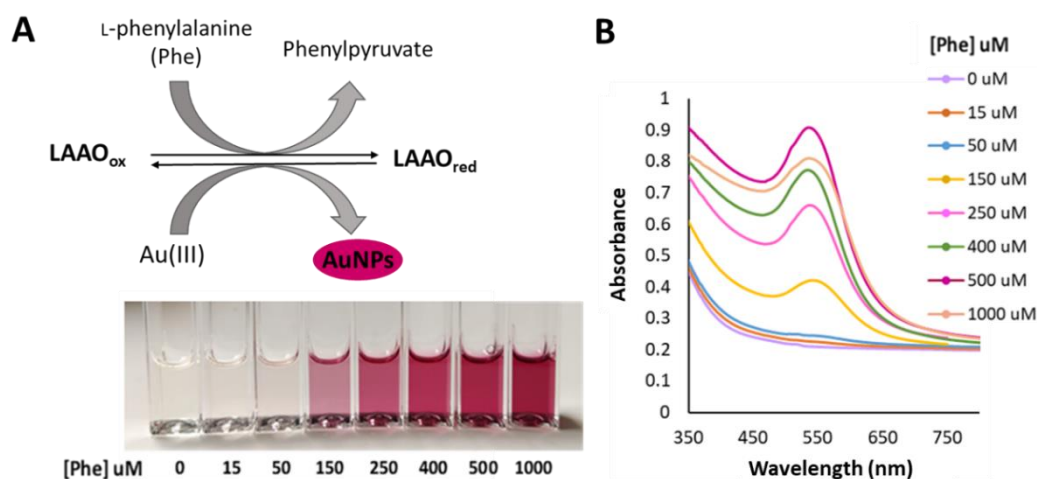


Figure 5: **A)** Scheme of the reaction of the LAAO with its analyte L-phe in the presence of Au (III) and appearance of the AuNPs formed for different [Phe] **B)** Molecular absorption spectra of the LSPR band obtained after 3 hours of reaction for different concentrations of L-phe (corresponding to the cuvettes shown in figure A).

For this, the mechanism of the LAAO-L-phenylalanine enzyme reaction in the presence of Au (III) has been studied, through the evaluation and optimization of experimental conditions such as the order of addition of reagents, the amount of LAAO enzyme, the concentration of Au (III), the nature of the buffer and its pH, and the LAAO-Phe enzymatic reaction-time before the addition of gold. These studies have reinforced the hypothesis that the active center of the enzyme may be responsible for the formation of AuNPs. If so, after the LAAO-L-phenylalanine enzymatic reaction, the catalytic center of the reduced enzyme would be regenerated by the Au (III), which would be reduced to Au⁰, producing the reoxidation of the active center of the enzyme. Thanks to the protein present, the Au⁰ form is stabilized as AuNPs.

The calibration of the method for the detection of L-phenylalanine has been carried out, observing a sigmoid response in the relationship between the concentration of the substrate and LSPR of the nanoparticles generated after the enzymatic reaction (**Figure 5B**). The linearization of the method has allowed obtaining its analytical properties with LOD of 10 μM and LOQ of 17 μM of L-phenylalanine. In addition, an interference study has shown that this methodology can be applied to the determination of Phe in presence of other common amino acids present in human serum samples. Highly competitive results were obtained for the further development of a rapid method based on colorimetry compared to those currently used as gold standards that are more complex (chromatographic ones) or slower (bacterial inhibition methods).

Chapter 3: Gold nanoprisms as transducers for the development of photothermal plasmonic immuno-nanobiosensors

Gold nanoprisms (AuNPrs) are anisotropic nanoparticles that exhibit localized surface plasmon resonance (LSRP) in the near infrared region (NIR).²³ This optical property allows low

²³ Alfranca, G.; Artiga, Á.; Stepien, G.; Moros, M.; Mitchell, S. G.; De La Fuente, J. M. Gold Nanoprism-Nanorod Face off: Comparing the Heating Efficiency, Cellular Internalization and Thermoablation Capacity. *Nanomedicine* **2016**, *11* (22), 2903–2916.

concentrations of AuNPRs to convert light energy into quantifiable heat (photothermal effect)²⁴ and makes their application interesting in the development of biological assays. AuNPRs linked to a biological receptor can act as physical-chemical transducers, interpreting the biological recognition with the analyte as a quantifiable thermal signal.

The main goal of this section is to evaluate the possibilities of the AuNPRs thermo-sensing technology in the development of different format of immune-nanobiosensor and its application to the detection of various types of cancer markers; 1) for the detection of gastric cancer (Section A and C), through the quantification of related tumour markers in plasma samples²⁵ such as carbohydrate antigen 19.9 (CA 19.9), vascular endothelial growth factor (VEGF) and carcinoembryonic antigen (CEA); 2) for the detection of exosomal markers on prostate-derived extracellular vesicle (EVs).²⁶

The main challenge in the diagnosis of both types of cancer is focused on the specific and early detection of the mentioned biomarkers, through the development of new methods that allow their ultrasensitive detection up to limits that classical methods cannot reach. In this case, a large number of antibodies could be found commercially, specific for these tumour markers. This added to their high specificity and affinity constants for the analytes against which they are developed, is why they were chosen as recognition molecules for the development of these other optical biosensor formats.

Thus, the objective is the use of gold nanoprisms as thermal nanotransducers in the biological recognition of carcinogenic markers. The technology to be developed uses specific detection antibodies (Ab_{det}) coupled to AuNPRs, which in the presence of the antigen to be detected (previously captured by capture antibodies (Ab_{cap})), will form an AuNPRs- Ab_{det} -antigen- Ab_{cap} "sandwich". The irradiation of this set by a NIR laser source, generates the release of amounts of heat proportional to the analyte concentration.

The development of this chapter implied the optimization, synthesis and characterization of different types of AuNPRs. Its functionalization with antibodies led to investigate new functionalization strategies, giving rise to totally different schemes from those used in Chapters 1 and 2 of this thesis.

Bearing this in mind, thermal detection has been combined with immunoassay applied to the detection of the mentioned biomarkers; two different conceptual alternatives have led to the development of three different immunoassays formats (Section A, B and C):

- 1) A new methodology similar to the classic colorimetric Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) but with a different detection system, using the AuNPRs as thermal labels and applied to two different types of samples; **Section 3A** uses ThermoLISA to the detection of gastrointestinal cancer markers; **Section 3B** uses the combination of ThermoLISA and fluorescent detection (time resolved fluorescence immunoassays, TRFIA), based on transferring the heat changes to the fluorescent signal (ThermoTRFIA). In this case, for the

²⁴ Pelaz, B.; Grazu, V.; Ibarra, A.; Magen, C.; Del Pino, P.; De La Fuente, J. M. Tailoring the Synthesis and Heating Ability of Gold Nanoprisms for Bioapplications. *Langmuir* **2012**, *28* (24), 8965–8970.

²⁵ Baniak, N.; Senger, J. L.; Ahmed, S.; Kanthan, S. C.; Kanthan, R. Gastric Biomarkers: A Global Review. *World J. Surg. Oncol.* **2016**, *14* (1), 1–14.

²⁶ Hartjes, T. A.; Mytnyk, S.; Jenster, G. W.; van Steijn, V.; van Royen, M. E. Extracellular Vesicle Quantification and Characterization: Common Methods and Emerging Approaches. *Bioengineering* **2019**, *6* (1).

detection of prostate-derived extracellular vesicle (exosomes) as diagnostic markers of this type of cancer.

- 2) An innovative and sensitive thermal transduction biosensor based on a lateral flow immunoassay (LFIA) for the rapid detection and quantification of ultra-low protein concentrations in this case gastrointestinal cancer markers. (Section 3C)

Section 3A. Thermal nano-immunoassay (ThermoLISA) for the detection of gastrointestinal cancer markers

Colorimetric or fluorescent ELISAs are well established in the clinic, but in many cases their sensitivity is limited. To achieve greater sensitivity, complex systems such as immunoPCR (100 to 10,000 times more compared with routine ELISA)^{27,28} are generally necessary, which involve more steps, cost and complexity in the detection process. Simpler as well as robust methods are needed to improve the sensitivity of classical methods. This fact has motivated the objective of this section: the evaluation of the possibilities of the thermo-sensing technology in the development of a new thermal nano-immunoassay for the detection of gastrointestinal cancer markers, comparing its sensitivity with that of the classic colorimetric ELISA.

For this goal, the binding of the different Ab_{det} with AuNPrs has been optimized by means of an oriented functionalization strategy using streptavidin as the linker between the AuNPrs and different biotinylated Ab_{det} (biotin@ Ab_{det}). This strategy provides a versatile bioconjugate that can be subsequently linked to any biotinylated antibody which allows extending the methodology in a simple way to other cancer biomarkers. In the presence of the analyte to be detected, a "sandwich" of biomolecule-nanoparticles is formed and the irradiation of the wells with a NIR laser source allows thermal transduction of the biological signal. (Figure 6A). Finally, with an IR camera the thermal image is obtained, from which it can be extracted temperature variation versus time records (Figure 6B), for each cancer marker concentration. The evaluation of these signals by extracting the emission-decay signal area, provides the analytical correlation between local heat triggered and concentration of the target analyte.

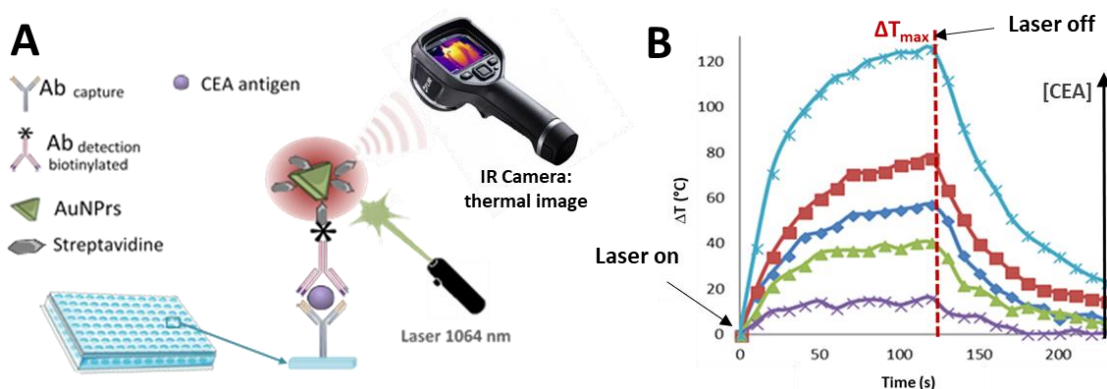


Figure 6: A) Scheme of the ThermoLISA assay B) Thermal signal for each CEA concentration (ng/mL)

²⁷ Sano, T.; Smith, C. L.; Cantor, C. R. Immuno-PCR: Very Sensitive Antigen Detection by Means of Specific Antibody-DNA Conjugates. *Science* (80-). **1992**, 258 (5079), 120–122.

²⁸ Pourhassan-Moghaddam, M.; Rahmati-Yamchi, M.; Akbarzadeh, A.; Daraee, H.; Nejati-Koshki, K.; Hanifehpour, Y.; Joo, S. W. Protein Detection through Different Platforms of Immuno-Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Nanoscale Res. Lett.* **2013**, 8 (1), 1–11.

The final ThermoLISA developed greatly increases the sensitivity and decreases the LOD and LOQ with a low RSD compared to the classic colorimetric ELISA for the determination of the different gastric tumour markers; CEA (LOQ 3.01 ng/mL and LOD 0.91 ng/mL); VEGF (LOQ 1.88 and LOD 0.56 ng/mL); and CA19.9 (LOQ 0.60 U/ml and LOD 0.1 U/mL). The method has been successfully applied in plasma samples without matrix interferences. These results highlight the transduction capacity of these nanomaterials in biological assays, as well as their possibilities in the development of others kind of biosensors.

The methodology developed has a similar scheme to the classic ELISA but changing the label to an AuNPr instead of an enzyme or fluorophore, being able to achieve detection levels similar to immunoPCR but with simpler detection process.

Section 3B. Time-resolved fluorescence thermal nano-immunoassay (TermoTRFIA) for the detection of exosomes

ThermoLISA methodology requires thermal sensors (infrared camera or thermo-resistances) to quantify the signal, which makes its practical application in medical centres more complex. For this reason, the combination of the thermal properties of AuNPrs as labels, with fluorescent detection has been tested to be able to transfer heat changes to a fluorescent output signal. This could facilitate the translation of this new scheme of detection into the clinic, in addition to introducing a possible signal amplification step and thus the improvement of the LOD reached previously.

For this goal the work in this section was developed in Rotterdam (The Netherlands) in collaboration with Dr. Jenster, taking advantage of its experience in the development of ELISA and fluorescence over time immunoassays (TR-FIA). In addition, we have selected extracellular vesicles (EV) as model analyte to test the feasibility of this new ThermoLISA configuration, due to the large experience of Dr. Jenster in the field of prostate cancer and immuno- based detection of extracellular vesicles (EVs) in urine as a marker of this tumour.

The TRFIA methodology previously developed by the host group, uses bacteriophages with single domain nanonodies (Nb-phages) as specific detection elements of EVs and a secondary antibody, anti-M13 labeled with Europium, a fluorescent probe with a long decay time, which allows to measure its fluorescence resolved over time (TRF) and relate this to the phage concentration and therefore with that of EVs.

The proposed Thermo-TRFIA scheme aims to combine fluorescent and thermal detection based on the fact that Europium fluorescence intensity decreases with the increase of temperature. Thus to promote the exchange of thermal energy between AuNPrs and the Europium labels of the Anti-M13, they were brought close by conjugating the AuNPrs to the Nb-phage used for the specific detection of exosomes expressing CD9 as biomarker (Nb-phage H6). **(Figure 7A)**

Once the initial fluorescence has been measured, the wells are irradiated with a portable low power 980 nm infrared diode laser (200 mW) for 3 minutes, causing the excitation of the AuNPrs and the release consequent heat. In this way, the europium fluorescence decreases during irradiation and when the laser turn off, the plate is introduced again in the fluorimeter to measure its minimum fluorescence (which coincides with the maximum heat released after 3 minutes of irradiation). From this point, europium fluorescence was measured every minute for 7 minutes, observing the increase in fluorescence to its initial value due to progressive cooling of the well. **(Figure 7B)**. The analytical treatment of these signals was carried out through the

extraction of the area within the curve and the representation of these values against the concentration of exosomes used for calibration of the assay. The ThermoTRFIA method allows the detection of up to $7.77 \cdot 10^4$ particles/mL, significantly reducing the LOD of fluorescent methods developed in recent years.²⁹ Furthermore, these results show the possibility of transferring thermal sensor technology to the detection of more complex analytes, improving the analytical properties of the method.

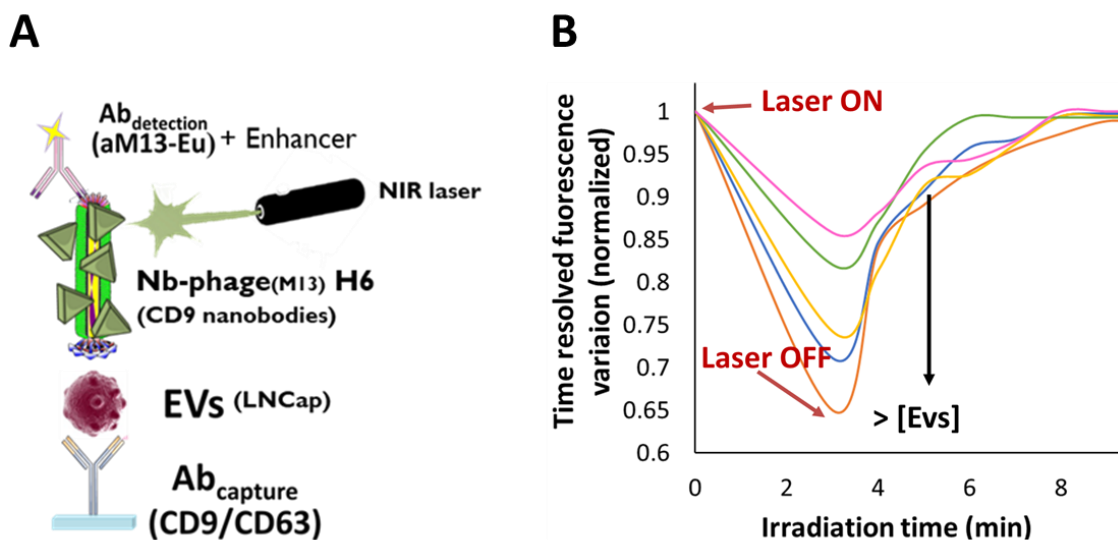


Figure 7: A) Scheme of the ThermoTRFIA B) Time resolved fluorescence variation with the laser irradiation time (A) from TRF areas are extracted.

Section 3C. Thermal lateral flow immunoassay (ThermoLFIA) for the detection of gastrointestinal carcinogenic markers

The results obtained from the ThermoLISA for the determination of gastrointestinal cancer markers (see section 3A), raised the possibility of transforming this methodology into a point of care biosensors device, adapting the use of these thermal labels to a lateral flow format. Some of the advantages of this type of test are its simplicity of design, small size and quick response. Furthermore, its easy use and interpretation of its results (such as a pregnancy test) makes this type of analysis accessible to the population. However, thy type of immunobiosensor has low sensitivity and is mainly used for qualitative or semiquantitative monitoring of the target analyte, as quantitative LFIA test are much less developed. The introduction of AuNPrs ad labels in this type of immunoassay could led to overcome these weaknesses.

Thus, the main objective of this section is the development of an innovative and sensitive thermal transduction biosensor based on a LFIA for the detection and quantification of ultra-low protein concentrations in a fast, economical and versatile way. In this methodology the bioconjugate AuNPrs@streptavidin – biotin@Ab_{det}, optimized for ThermoLISA, is deposited in the conjugate PAD; the capture antibodies are immobilized on a dual support, consisting of a nitrocellulose strip attached to thermographic paper. This thermosensitive paper acts as a photographic detection element and operates as a thermal signal transducer, producing a

²⁹ Martin-Gracia, B.; Martin-Barreiro, A.; Cuestas-Ayllon, C.; Grazu, V.; Line, A.; Llorente, A.; Martinez de la Fuente, J.; Moros, M. Nanoparticle-Based Biosensors for Detection of Extracellular Vesicles in Liquid Biopsies. *J. Mater. Chem. B* **2020**.

change in the colour intensity of the gray scale of the imprinted signal onto the thermographic paper. (Figure 8A)

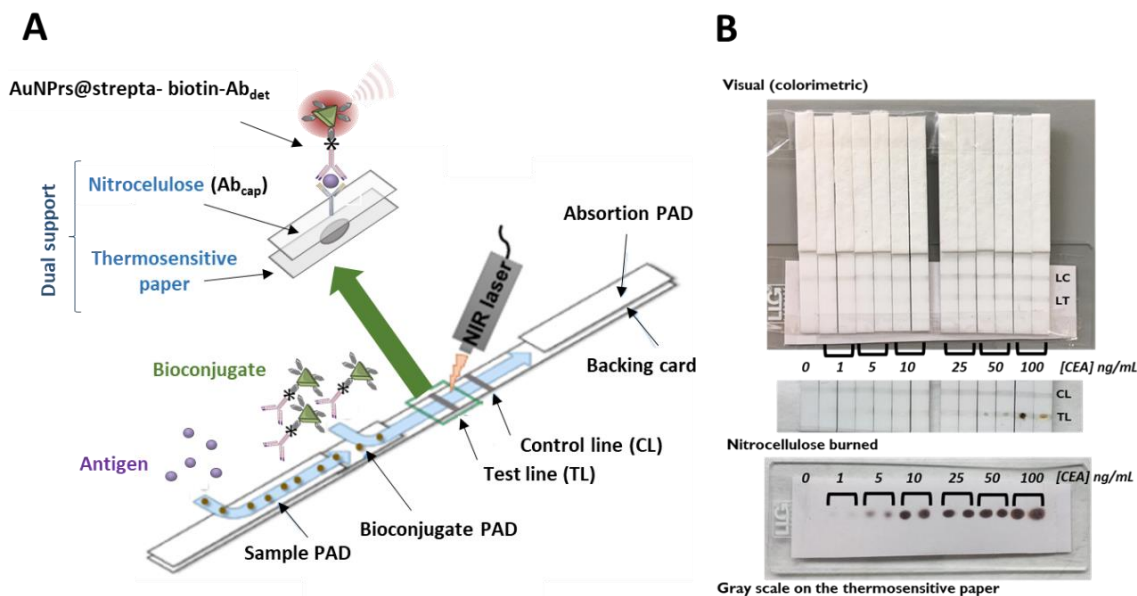


Figure 8: **A)** Scheme of the ThermoLFIA biosensor **B)** Lateral flow strips manufactured for the detection of CEA in the range of 0-100 ng/mL and all three possible signal transductions. Before irradiation (visual transduction) and after irradiation 2 min (for 25-100 ng/mL) and 4 min (for 0-10 ng/mL) with a NIR laser power of 1500 mW (nitrocellulose burned and grayscale signals on heat-sensitive paper).

Irradiation of the test line area by a NIR laser source cause any AuNPrs present to release large amounts of heat proportional to the analyte concentration, which can be interpreted in three different transduction formats (Figure 8B):

- High analyte concentrations allow visual detection of the test line (colorimetric) and, after laser irradiation, they cause the direct burning of the nitrocellulose.
- Intermediate analyte concentrations do not allow the visual detection of the test line in a clear way, but they do cause the direct burning of the nitrocellulose after laser irradiation and also its quantification by means of attaching thermosensitive paper to the lateral flow strip.
- Low analyte concentrations do neither allow the visual detection of the test line or the direct burning of the nitrocellulose, but they do allow detection and quantification through the signal imprinted on the thermosensitive paper attached to the strip.

Consequently, the presence of the analyte is quantifiable down to an ultra-low concentration range and the most amplified final output signal, collected on the thermosensitive paper, could be read through a mobile application that analyses the RGB colour coordinates.

The optimization of the use of AuNPrs as thermal labels for LFIA is not as straightforward as in the case of the development of a Thermo-LISA assay. In this case, it is necessary to deposit and dry the AuNPrs@streptavidin-biotin@Ab_{det} bioconjugate in one of the components (conjugate pad) of the lateral flow strip, which involves i) ensuring the stability of the AuNPrs in dry conditions, avoiding their aggregation ii) checking the activity of the detection antibody and confirming its recognition ability along the strip.

Thesis summary

To achieve an efficient resuspension of the deposited AuNPrs and ensure an accurate and controlled flow of the sample, it was necessary to select the best materials to prepare the strips through the development of a battery of evaluation methods (RGB, IR thermal image and thermosensitive paper). Thus, based on a quantitative comparison, the best materials for this type of label have been selected as: i) sample/conjugate pad (where the bioconjugate is deposited), nitrocellulose (along which the sample moves and where the test and control lines are loaded), and iii) the absorbent pad (that collect the liquid processed through the strip by capillary action).

The optimization of the bioconjugate for lateral flow (blocking of the bioconjugate, optimization of the formulation buffer, stability of the conjugate) was carried out, as well as the optimization of the methods for the manufacture of ThermoLFIA strips (conditions and deposition of bioconjugate and concentration of antibodies in the lines loaded in the strip). Finally, for the analysis process, the coupling of thermosensitive paper, the irradiation schemes and the laser power has been optimized. The final ThermoLFIA enables the detection of different gastrointestinal biomarkers with higher sensitivity than ELISA: i) CEA with a LOD of 0.60 ng/mL an a LOQ of 2.01 ng/mL; ii) VEGF with a LOD of 0.019 ng/mL an a LOQ of 0.064 ng/mL; iii) CA19.9 with a LOD of 0.92 U/mL an a LOQ of 3.08 U/mL; all of them within the concentration ranges of active disease.

Finally, the application of these ThermoLFIA strips to real plasma samples has led to their optimization through the selection of a new strip design and materials, sample buffer and plasma dilution. Finally, the irradiation of these strips with a portable and miniaturized laser device allowed confirming the transference possibilities of the methodology for its clinical use. Compared to other biosensing schemes this methodology has several advantages such as its ease of use without the need of qualified personnel, ultrasensitivity and quick quantitative results (30 minutes).

Publicaciones

Listado de publicaciones por capítulos

Capítulo 1

- 1) Martín-Barreiro, A., de Marcos, S., & Galbán, J. (2018). **Gold nanoclusters as a quenched fluorescent probe for sensing oxygen at high temperatures.** *Microchimica Acta*, 185(3), 171.
- 2) Martín-Barreiro, A., de Marcos, S., M. de la Fuente, J., Grazú, V., & Galbán, J. (2018). **Gold nanocluster fluorescence as an indicator for optical enzymatic nanobiosensors: choline and acetylcholine determination.** *Sensors and Actuators B: Chemical*, 277, 261-270.
- 3) Martín-Barreiro, A., Camacho, J., Oliver, S., Navarro, J., Sanz, I., de Marcos, S. & Galbán, J. **Enzymatic optical assays based on gold nanomaterials. A review.** *In preparation. Invitation from Microchimica Acta.*

Además, este capítulo ha dado lugar a una colaboración, que queda reflejada en la siguiente publicación:

- 4) Martín-Barreiro, A.‡, Soto, R.‡, Chiodini, S.‡, García-Serrano, A.‡, Martín, S., Herrer, L., Pérez-Murano, F., Low P.J., Serrano, J.L., de Marcos, S., Galban, J., & Cea, P. (2020). ‡equal contribution. **Towards the use of uncapped gold oxide nanoparticles for the metallization of organic monolayers in molecular electronics large area devices.** *Submitted*

Capítulo 2

- 5) Martín-Barreiro, A., de Marcos, S., & Galbán, J. **Gold nanoparticles formation as an indicator of enzymatic methods: colorimetric L-phenylalanine determination.** *In preparation.*

Capítulo 3

- 6) Martín-Gracia, B., Martín-Barreiro, A., Cuestas-Ayllon, C., Grazu, V., Line, A., Llorente, A., M. de la Fuente, J., & Moros, M. (2020). **Nanoparticle-based biosensors for detection of extracellular vesicles in liquid biopsies.** *Journal of Materials Chemistry B.*, 8, 6710-6738.
- 7) Martín-Barreiro, A., Grazú, V., M. de la Fuente, J. **Thermal-nano-immunoassay (ThermoLISA) for the detection of gastric cancer biomarkers.** *In preparation.*
- 8) Martín-Barreiro, A., Grazú, V., Moros, M., M. de la Fuente, J. **Thermal lateral Flow immunoassay for the detection of gastric cancer biomarkers.** *In preparation.*



Gold nanoclusters as a quenchable fluorescent probe for sensing oxygen at high temperatures

Alba Martín-Barreiro¹ · Susana de Marcos¹ · Javier Galbán¹

Received: 18 October 2017 / Accepted: 11 January 2018
© Springer-Verlag GmbH Austria, part of Springer Nature 2018

Abstract

Gold nanoclusters (AuNCs) capped with lipoic acid (LA) or templated with bovine serum albumin (BSA) are shown to be viable fluorescent probes for oxygen (O₂) which acts as a collisional quencher. Quenching of fluorescence, with its lifetimes in the order of 123 ± 9 ns (LA) and 153 ± 15 ns (BSA) (in aqueous solution), is best measured at excitation/emission wavelengths of 400/680 nm and 375/650 nm respectively. It follows the Stern-Volmer model, whose quenching constants (K_{sv}) and quenching efficiencies (γ) are 1400 M⁻¹ and 0.52 for AuNC@LA and 4479 M⁻¹ and 0.90 for AuNC@BSA. The probes were immobilized on a silica support and tested for response to O₂ in gas phase using a commercial instrument. The effect of temperature on the fluorescence of AuNC@LA was studied in the range from 30 to 210 °C. Fluorescence intensity slightly decreases with temperature in the first heating cycle but remains constant in further cycles. The AuNC@LA were studied for their response to O₂ in the temperature range from 30 to 100 °C, and even at 100 °C they respond to O₂, with a K_{sv} that slightly drops with increasing temperature. Measuring in gas phase at 100 °C, the sensor has a detection limit of 3% (V/V) of O₂ at a signal-to-noise ratio of 3.

Keywords Fluorescence quenching · Collisional quenching · Oxygen sensor · BSA-temple · Lipoic acid-capped · Commercial device · Elevated temperature · Stern-Volmer equation · Nanomaterial

Introduction

Gold nanoclusters (AuNCs) are perhaps the kind of NCs which are acquiring more importance in analytical chemistry because of their interesting optical properties [1, 2]. Like other nanomaterials (such as quantum dots), their Stokes' shift and emission peaks (λ_{em}) depend on the number of gold atoms forming the AuNCs. However, for larger AuNCs, the λ_{em} also depends on the ligand used for AuNC stabilization, i.e., the chemical pathway used for their synthesis so that variations in the synthesis method usually produce modifications in their spectroscopic properties.

The analytical applications of AuNCs fluorescence for sensing and bioimaging [3] have become more widespread [4–6]. According to Li et al. [6], these methods are mainly based on

three mechanisms: 1) fluorescence quenching, which is the basis of the determination of ion metals such as Hg(II) and Cu(II), or small molecules such as dopamine [7] or histamine; 2) AuNCs aggregation for protein determination; and 3) energy transfer (FRET) for bioimaging. Unlike other nanomaterials [8, 9], AuNCs have been scarcely used to sense gases.

O₂ determination is one of the most interesting real world applications of molecular luminescence [10–14]. Compared to other sensing principles, as the amperometric Clark electrode or the Lambda sensor, present several advantages as the possibility of remote and non-invasive sensing, greater miniaturization, analyte imaging and the lack of analyte consumption [10]. Although a mechanism assisted by O₂ singlet and luminophore triplet assisted (O₂*-T) has been described demonstrating that O₂ can produce fluorescence enhancement in some compounds [15, 16], these methods are generally based on the collisional quenching that the analyte produces in the excited state, so reagents having long luminescent (fluorescence or phosphorescence) lifetimes are used. For this application, probes have been proposed [10, 11] such as polycyclic aromatic hydrocarbons, fullerenes and especially different kinds of metal-ligands complex, being those based on Ru-dilphenylphenanthroline and Pt or Pd tetrakisfluorophenyl porphyrins (PtTFPP or PdTFPP) which present better analytical figures of merit and applicability,

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00604-018-2676-y>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Javier Galbán
jgalban@unizar.es

¹ Analytical Biosensors Group, Analytical Chemistry Department, Faculty of Sciences, Instituto Universitario de Nanociencia de Aragon (INA), University of Zaragoza, Pedro Cerbuna 12, 50009 Zaragoza, Spain

and being the reagent of choice in different commercial O₂ monitoring systems.

Some types of nanomaterials, especially nanoclusters having long luminescence lifetimes, are also potential candidates for O₂ sensing. However, very few references can be found in the literature addressing this possibility (the paper by Ghost et al., using Mo chloride NCs being an exception [17]) and none of these few papers mention collisional quenching to explain the O₂ effect in AuNCs. Thus, Wang [18] designed a fluorescence biosensor for proteases based on the degradative effect of these proteins on AuNC@BSA; after the degradation, O₂ comes into the reagent and the Au fluorescence becomes quenched by a mechanism not clearly explained. Das et al. [19], studied the O₂ effect on two AuNC@BSA (2 nm and 2.5 nm in diameter) having blue (410 nm) and red (645 nm) fluorescence respectively; the authors found a fluorescence enhancement in the blue AuNCs, explained by the O₂^{*}-T mechanism, and fluorescence quenching in the red ones, due to AuNCs aggregation.

O₂ sensing at high temperatures is important in several applications as automotive industry, power generation, food processing or chemical and biochemical reactors. For these proposals, O₂ sensors based on organic fluorophores present limited applications. In this paper, we study the fluorescence quenching caused by O₂ in two different types of AuNCs, in the light of the Stern-Volmer model at ambient temperature. Because of their metallic nature, AuNCs also tolerate elevated temperatures, leading to their use as O₂ sensors at higher temperature than organic fluorophores, an aspect also evaluated in this paper.

Experimental

Reagents

Hydrogen tetrachloroaurate (III) hydrate (99.8%-Au) (AuCl₄Na₂H₂O) was purchased from Stream Chemicals (<https://secure.strem.com>). Sodium borohydride and (±)-α-lipoic acid, were purchased from Sigma-Aldrich Co. LLC. (<http://www.sigma-aldrich.com>). Alphagaz1 (99.999%) compressed oxygen and nitrogen, were purchased from Air Liquide (Madrid, Spain, <https://industrial.airliquide.es/>). Pre-coated TLC-sheets Polygram Sil G and DC-Fertigfolien Alugram Sil G were purchased from Macherey-Nagel (Düren, Germany, <https://www.mn-net.com/>).

Apparatus

Purification of the synthesized gold nanoclusters (AuNCs) was carried out using a Koch centrifuge from Bunsen (Spain, <http://www.bunsen.es>) and Amicon-Ultra 10 kDa centrifugal filters from Millipore (Germany).

A Tecnai F30H–7650 microscope (scanning and transmission mode, STEM) (FEI, The Netherlands, <https://www.fei.com>) was used for AuNCs characterization.

Steady state fluorescence measurements were carried out with a Photon Technology International (PTI) Time Master fluorescence spectrometer (TM-272003). For lifetime measurements this instrument has a N₂ laser (GL-3300) that pumps a dye laser, as a radiation source, and a stroboscopic system as the detector.

A Foxy-R fluorescence O₂ sensor from Ocean Optics (EW Duiven, The Netherlands, <https://oceanoptics.com/>) consisted of a QE65000 CCD-array spectrometer coupled to an oxygen probe FOXY-R (by a QBIF600-UV/Vis optical fiber), using a blue LED light pulsed Ocean Optics LS-450 as radiation source. This sensor was calibrated in gas phase (and in solution (ESM 1, Fig. S1.1 and S1.2) with the help of the visocolor ECO Test 5–88 for O₂ (Macherey-Nagel) which is based in the classical Winkler method.

LS-450 light source and QE65000 CCD-array spectrometer coupled to a QF600–8-VIS/NIR optical fiber was used for AuNC fluorescence measurements.

A LuminOx™ gas phase optical oxygen sensor (static type) from SST (www.sstsensing.com) consisting of a 420 nm excitation LED, a photodiode (Fig. 2) and a Ruthenium compound as the sensing element. This sensor measures O₂ concentration from 0 to 25% (V/V) (see ESM1, Fig. S1.3 for original sensor calibration).

For high temperature AuNC fluorescence measurements, the optical fiber illuminated (across a quartz transparent window) a homemade heating system (Pervaporator) previously described [20] (ESM2, Fig. S2.1). In brief, the system consists of a measuring chamber with two quartz windows. The system is heated using a cylindrical resistance and the temperature is controlled by a home-made digital controller (accuracy, ±1 °C). The maximum temperature provided by the resistance was 250 °C. The whole pervaporator was placed on a PTFE support.

Gold nanoclusters synthesis

Lipoic acid stabilized gold nanoclusters (AuNC@LA) were synthesized by a chemical reduction method using NaBH₄ as the reducer and lipoic acid as the capping agent, applying a previously described procedure [21] (ESM 3.1). Albumin bovine gold nanoclusters (AuNC@BSA) were also synthesized according to the procedure described by Lianzhe et al. [22] (ESM 4.1).

Fluorescence characterization and O₂ effect on AuNCs in batch

The effect of the O₂ on AuNC fluorescence was monitored with the PTI in Timebased mode, using the

following instrumental conditions (excepting where indicated): 15 nm excitation and fluorescence slits, 1000 nm min^{-1} scanning speed, measured at $\lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{flu}}$, 400/680 nm (for AuNC@LA) and 375/650 nm (for AuNC@BSA). Gas flows of different oxygen concentrations were pumped through the cuvette containing AuNCs and the fluorescence variation was continuously measured over time. The average fluorescence intensity value was taken. In parallel, the O_2 concentration was monitored using the Foxy-R fluorescence sensor.

Measurements of fluorescence decays were performed with a pulsed dye laser. The N_2 laser pumped the dye PLD457, which emits in the range from 440 to 478 nm with a maximum at 457 nm. The following instrumental parameters were applied: 100 ns offset, 1000 μs integration time, 20 averages (complete offset intervals) with 5 shots at each offset for each of the sweeps performed and 10 Hz frequency of firing of the laser. From the fluorescence decay and lamp profile registers, the lifetimes were calculated both manually and through the program by adjustment to a function.

Immobilization of AuNCs on silica support

AuNCs were immobilized either: 1) on pre-coated TLC-sheets Polygram Sil L G, in which the silica is supported on polyethylene and whose transparency allows to implement them in an optical sensor, and 2) on pre-coated DC- Fertigfolien Alugram Sil G, a silica supported on aluminum and suitable for studies at temperature higher than 25 °C. In both cases, the immobilization was carried out by immersing the TLC-sheets in a pre-concentrated solution of nanoclusters (840 mg mL^{-1} Au) and allowing the system to dry at room temperature; to obtain homogeneous deposition, three immersion/drying cycles were applied.

Fluorescence characterization and O_2 effect of AuNCs immobilized on silica support

The emission spectra at ambient temperature of the AuNCs immobilized on silica support, were carried out with the QE65000 spectrometer coupled to the QF600–8-VIS/NIR optical fiber.

To study the O_2 effect, the Ruthenium fluorophore initially placed in the the LuminOx™, was replaced by the AuNCs-silica platform (cut to an appropriated size). The whole system was then inserted into a homemade chamber consisting of a PVC vessel with inlet and outlet for gases (ESM2, Fig. S2.2). In parallel to these measurements, the O_2 in the chamber was monitored with the FOXY-R oxygen probe in order to know the concentrations of O_2 in each moment.

Measurement of the AuNCs-silica platform fluorescence at high temperature: O_2 effect

AuNC@LA immobilized onto the silica support were placed in the measuring chamber of the pervaporator. The variation of the fluorescence intensity with the temperature was monitored with the QE65000 spectrometer coupled to the optical fiber QF600–8-VIS/NIR.

Results and discussion

AuNCs characterization

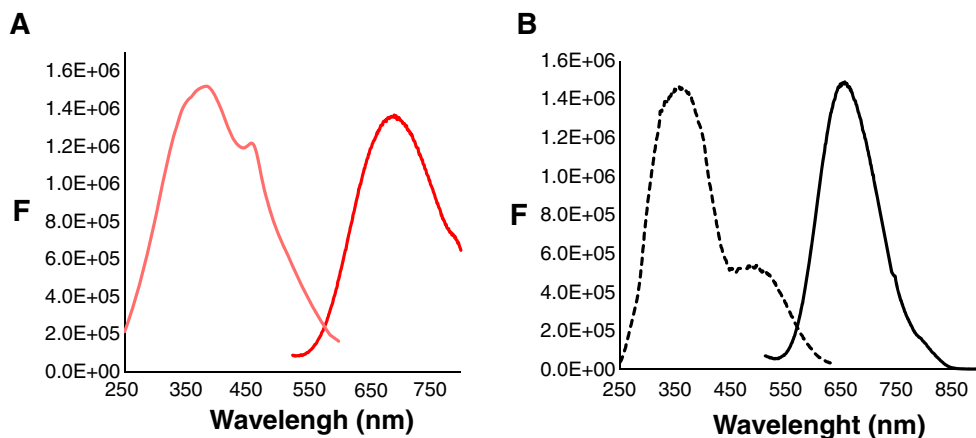
The synthesized AuNC@LA were characterized by STEM; the images showed spherical morphology and homogeneous particles, with an average diameter of 1.60 ± 0.23 nm (ESM3.2, Fig. S3.1). The gold content in the AuNCs stock was obtained by ICP-AES resulting in 0.28 gL^{-1} . The excitation and fluorescence maximum of these AuNCs appear at 400 nm and 680 nm, respectively (Fig. 1A). The wavelength of the maximum excitation slightly depended on the AuNCs concentration but not the fluorescence spectra (ESM3.3, Fig. S3.2); the fluorescence lifetime of these nanoclusters was 123 ± 9 ns (in aqueous solution at $2.2 \cdot 10^{-4}$ M O_2) which enables the use of these nanomaterials as O_2 fluorescence probes to be evaluated.

Similar studies were performed with AuNC@BSA. The STEM image (ESM4.1, Fig. S4.1) also showed spherical morphology with a mean diameter of 1.80 ± 0.35 nm (and large masses of protein surrounding the nanoclusters). AuNC@BSA showed excitation and emission maxima at 375 nm and 650 nm, respectively (Fig. 1B) and its fluorescence lifetime was 153 ± 15 ns (in aqueous solution at $2.2 \cdot 10^{-4}$ M O_2).

Chevrier et al. [23] found that AuNCs have low photobleaching. Our results agree with these observations: AuNC@LA did not show photobleaching during at least 3 h under continuous excitation; in the same experimental conditions, AuNC@BSA showed a slight instability during the first 1.5 h but during the following 1.5 (at least) the fluorescence remained constant. (ESM3.4, Fig. S3.3).

The fluorescence quantum yield (Φ) for both types of AuNCs was obtained using tris(bipyridine)ruthenium(II) chloride as a reference standard. Values of 0.018 (see ESM3.5) and 0.089 (ESM 4.3) for AuNC@LA and AuNC@BSA were obtained which reasonably agree with those previously reported in the bibliography of 0.018 [24] and 0.080 [25], respectively. These yields are comparable to those of organic fluorophores and they are in the range of what is necessary for their application as optical sensors.

Fig. 1 Excitation (left) and emission (right) spectra of AuNCs in solution. **A)** AuNC@LA ($\lambda_{\text{ext}} = 400$ nm and $\lambda_{\text{em}} = 680$ nm) **B)** AuNC@BSA ($\lambda_{\text{ext}} = 375$ nm and $\lambda_{\text{em}} = 650$ nm). Other instrumental conditions as indicated in the [Experimental](#) section



AuNC fluorescence quenching in solution

The effect of the O_2 concentration on the AuNC@LA fluorescence was first studied in solution following the procedure explained in the [Experimental](#) section. The results led us to conclude that:

- 1) The O_2 fluorescence quenching fits the conventional Stern-Volmer eq. (1) and not the modified equation for two populations of fluorophores (accessible and not accessible). This result is consistent with the idea of nanoclusters behave as an entity with a specific energy level structure. The Stern-Volmer constant (K_{sv}) is independent of the AuNC@LA concentration used. Five K_{sv} values were obtained using different AuNC@LA concentrations (ESM3.6, Fig. S3.6, Table S3.1). The average value obtained was 1400 M^{-1} (RSD = 8.8%). This K_{sv} is smaller than that obtained for the Ru(II) complex of the Foxy-R probe which is consistent with its lower fluorescence lifetime.
- 2) The lifetime values obtained for three O_2 concentrations (ESM3.7, Table S3.2), confirm that the quenching follows a collisional mechanism (1). The K_{sv} obtained from lifetime measurements was 1346 M^{-1} (RSD = 10%) which statistically (t-test, 95% confidence) agrees with the value measured from the intensity values (1400 M^{-1}).

$$\frac{F_0}{F} = \frac{\tau_0}{\tau} = 1 + K_{sv}[O_2] = 1 + k_0\gamma\tau_0[O_2] \quad (1)$$

- 3) The O_2 quenching efficiency (γ) on the AuNC@LA fluorescence was estimated to be 0.52 (ESM5.1), which is lower than that of most of molecular fluorophores (≈ 1), and is also consistent with the idea that the energy levels responsible for the fluorescence are partially shielded by this AuNCs structure.
- 4) The quenching is fully reversible. Fig. S3.7 (ESM3.8) gives the fluorescence intensity variations obtained with consecutive N_2 - O_2 flow cycles, although more complete

additional results dealing with the reversibility of the sensor will be given in gas phase.

Similar studies were carried out with AuNC@BSA. A higher sensitivity to O_2 quenching was observed with these nanoclusters compared to AuNC@LA with a $4479 \text{ M}^{-1} K_{sv}$ value (RSD = 10.0%, $n = 3$) (ESM4.2, Fig. S4.2) only half of that obtained with the Foxy sensor, and a quencher efficiency of 0.9 (ESM5.2). Considering that the O_2 accessibility to the energy levels of both types of nanocluster is the same, this higher efficiency can be explained considering that in BSA, the nanoclusters are close to each other (see Figs. S3.1 and S4.1), giving higher apparent kinetic radius and shortening the mean pathway for the oxygen between collisions. The K_{sv} value was also calculated from lifetime measurements, obtaining 3576 M^{-1} (RSD = 9.8%, $n = 3$) (ESM4.4). This value was statistically compared to that obtained by fluorescence intensity (t-test); a $t_{\text{experimental}}$ of 2.75 was obtained, which is nearly the limit at 95% confidence ($t = 2.78$) and higher than that at 90%; the differences between these K_{sv} values is attributed to the difficulty of reproducing laser operation conditions.

Immobilization of the AuNCs to obtain solid state sensors in gas phase: read-out possibilities

Once the viability of an effective O_2 quencher was tested, the possibility of using this effect for designing an O_2 gas sensor was studied. AuNC@LA were immobilized on a silica support following the previously described procedure. This platform showed worse-defined excitation and emission spectra than those obtained in solutions, due to both the nature of the support and the design of the system used for measuring (ESM6.1, Fig. S6.1).

AuNC@LA immobilized on the silica support was tested as the chemical basis of the Luminox™ O_2 sensor (Fig. 2) described in the [experimental](#) section. For the calibration of

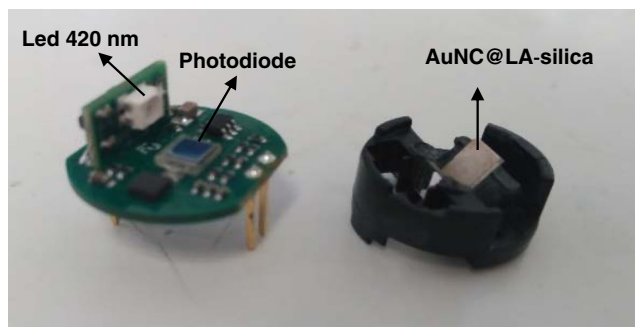


Fig. 2 Commercial optical sensor with AuNCs on a silica support

this new sensor, its response to different concentrations of O_2 inside a gas chamber was studied, making the measurement of O_2 in parallel with the Foxy-R probe (Fig. S2.2).

The commercial sensor gives voltage signals (instead of fluorescence intensity). However, the K_{sv} is not sensitive to the units of magnitude used for measuring the O_2 effect on the fluorescence of the fluorophore, so eq. (1) can also be applied but replacing fluorescence intensity (F) by voltage (V). Figure 3 shows the calibration graph obtained with the AuNC@LA-silica platform located in the Luminox™. As can be seen, the results fit the Stern-Volmer equation very well. The K_{sv} obtained was 0.0059 (RSD = 4.9% $n = 3$), quantitatively worse than that of the commercial sensor (0.0369), but approximately in the same proportion as in solution. However, it is less than 2 times lower than that of the Foxy-R, which is due to the physical structure of the sensor. The three K_{sv} used for calculating the averaged value were obtained on three different days with the same AuNC@LA-silica platform, which demonstrates the system stability. As has been indicated, this platform was prepared submitting the silica to three immersion-drying cycles in a AuNC@LA solution. Additional assays were done submitting the support to a higher number of immersion-drying cycles, but no improvements were observed; in fact, for ten cycles the K_{sv} showed a shorter linear response range, probably due to the effect of autoabsorption at high fluorescence intensities. These studies confirm the optimal

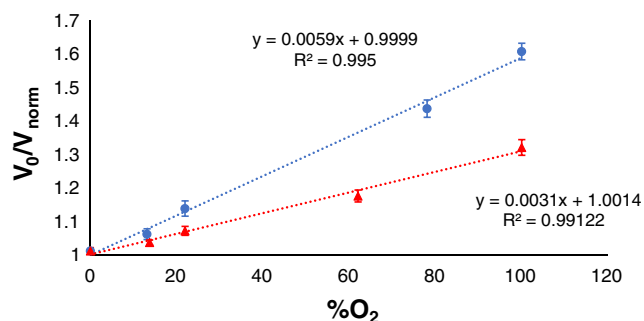


Fig. 3 O_2 effect of the AuNC@LA (blue circle) and AuNC@BSA (red triangle) immobilized on silica support. Signals measured in the Luminox™ sensor ($\lambda_{ext} = 450$ nm and $\lambda_{em} = 680$ nm (LA) or 650 nm (BSA)). The sensor give voltage values. V_0/V_{nor} are the same as F_0/F

fabrication at the established concentration of AuNC@LA (three immersing-dry cycles) as well as the stability and reproducibility of the sensor system for the entire range of % of O_2 in air at room temperature. The reversibility of quenching effects on the AuNC-silica platform has been confirmed, by carrying out several consecutive N_2 - O_2 cycles (ESM6.2, Fig. S6.2). Moreover, the O_2 quenching on the AuNC-silica platform was periodically measured during 6 months (after its manufacture) giving reproducible results.

AuNC@BSA immobilized on the silica support were also tested on the Luminox™ O_2 sensor. Figure 3 shows the calibration graph. The K_{sv} obtained was 0.0031% V/V, smaller than that obtained for AuNC@LA. A possible explanation of this result is the fact that the optical arrangement of the Luminox™ sensor (excitation source, filter and detector) are not optimized for the measurement of the fluorescence of the AuNC@BSA, and its LED source (420 nm) is more shifted from its excitation maximum than in the case of AuNC@LA, which causes a loss of sensitivity with this measuring system.

However, the excess protein (BSA) that stabilizes these AuNCs makes it difficult to use them at high temperatures, causing the darkening of the silica platform due to the organic matter burning and making it difficult to measure the fluorescence. Therefore AuNC@LA will be used in the following studies.

Sensing behavior at high temperatures in gas phase

As has been indicated above, one the most interesting possibilities of using AuNCs for O_2 sensing comes from its metallic nature which allows us to use it at temperatures where organic fluorophores decompose. To test this, first the effect of temperature on the AuNC@LA stability and fluorescence was studied, using the system described in the experimental section (ESM2, Fig. S2.1). Once the AuNC@LA-silica was placed inside the optical cell of the pervaporator, the temperature of the resistance was increased from 30 °C to 210 °C (10 °C stepwise) and simultaneously the emission spectra was recorded; after that, the temperature was returned to 30 °C and the cycle was repeated. Figure 4 shows the averaged fluorescence intensity, at the excitation and fluorescence maxima wavelength, at each of these temperatures. As expected, the fluorescence intensity decreased with the temperature, but only during the first cycle. After cooling the cell the intensity slightly increases, and during the second cycle the fluorescence intensity was not dependant on the temperature. This result indicates that during the first cycle, the fluorescence intensity variation was not only due to the expected behaviour but also to some sort of change in the AuNC@LA-silica structure.

This is somehow reflected in the fluorescence spectra (ESM7, Fig. S7.1) which shows slight changes in the 690–700 nm wavelength interval. This result is very important because it demonstrates that, after the first pretreatment, the

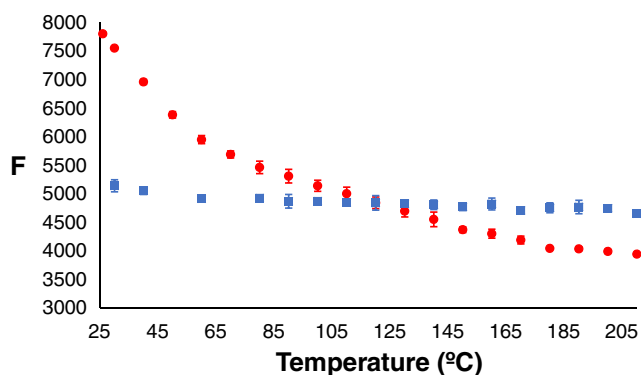


Fig. 4 Average fluorescence of the AuNC@LA-silica emission maximum at each temperature in the pretreatment step. In a ‘first cycle’ (red circle) of heating from 26 to 210 °C and in a ‘second cycle’ (blue square), also from 26 to 210 °C ($\lambda_{\text{exc}} = 450$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 690$ nm)

platform can be used as an O₂ sensor at different temperatures without affecting the fluorescence.

In order to study the AuNC@LA-silica response to O₂ at different temperatures, air flows with different oxygen concentrations were passed through the pervaporator where a previously pretreated (after being submitted to the first temperature cycle) AuNC@LA-silica platform was placed; the fluorescence variations were measured with the same optical fiber system as in the previous case. A systematic study was carried out at four temperatures (3 oxygen concentrations at each temperature). By evaluating each of the O₂ concentrations and recording the fluorescence values at the maximum emission of AuNC@LA-silica ($\lambda_{\text{em}} = 690$ nm) in each case, we obtained a fluorescence vs %O₂ calibration line for each temperature, from which we derived the different K_{sv} values (Fig. 5). As can be seen, the K_{sv} values were similar from 45 to 100 °C (ESM7.1, Fig. S7.2). It is difficult to predict the temperature effect of the K_{sv} . On the one hand, the higher the temperature, the higher the k_0 (the O₂ diffusion coefficient increases with the temperature). On the other hand, the τ is expected to decrease with the temperature [26, 27] (the non-radiative decay constant increases [28, 29]), so a balanced response is finally observed.

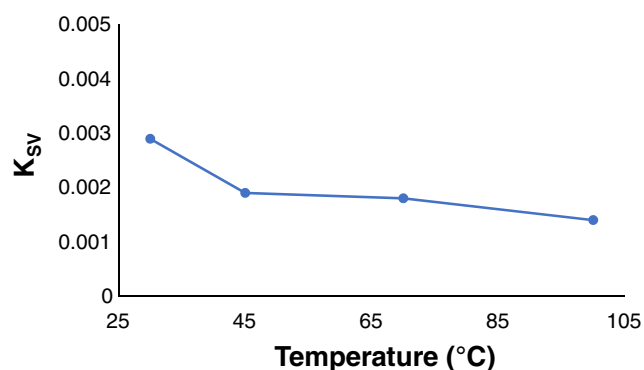


Fig. 5 Temperature effect on the K_{sv} for AuNC@LA-silica ($\lambda_{\text{exc}} = 450$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 690$ nm)

To demonstrate the ability of the sensor to retain the sensing capability and reversibility after heating, the following experiment was carried out: the K_{sv} was obtained at ambient temperature (from three O₂ concentrations), then the sensor was heated at 100 °C, cooled down at ambient temperature and the K_{sv} was measured again. This cycle was repeated 5 times. The results are detailed in ESM7.2 (Fig. S7.3). As can be seen, no drift is observed and similar K_{sv} values were obtained (RSD = 9.9%, $n = 5$). From the calibration graphs a limit of detection of 3% (V/V) O₂ (3σ) is obtained.

Conclusions

This paper shows that AuNCs can be used as efficient fluorophores in O₂ collisional quenching, following the Stern-Volmer model. AuNC@BSA are more efficient than AuNC@LA but the latter can be used at higher temperatures. Future experiments should be done in order to test the possibility of using AuNCs as an O₂ probe at even higher temperatures. This new type of sensor based on AuNC fluorescence would be an interesting alternative for non-invasive O₂ monitoring in thermally aggressive environments. Considering that the mechanism of the fluorescence quenching is collisional, interferences in the gas phase will come from the same substances as in the case of other O₂ fluorescence based sensors, i.e. paramagnetic species (NO). Working in liquid phase, interferences will come from compounds able to react with AuNCs, especially thiols, so caution should be taken with samples containing these types of components.

Acknowledgements The authors thank to MINECO of Spain (CTQ2016-76846R), DGA-FEDER funding to Research Groups (E74) and BSH (project ‘‘Smart Ovens III’’) for financial support.

Compliance with ethical standards

The authors declare that they have no competing interests.

References

- Zheng J, Nikovich PR, Dickson RM (2007) Highly fluorescent noble metal quantum dots. *Annu Rev Phys Chem* 58:409–431
- Zheng J, Zhou C, Yu M, Liu J (2012) Different sized luminescent gold nanoparticles. *Nano* 4:4073–4083
- Wolfbeis OS (2015) An overview of nanoparticles commonly used in fluorescent bioimaging. *Chem Soc Rev* 44:4743–4768
- Cui M, Zho Y, Song Q (2014) Synthesis, optical properties and applications of ultra-small luminescent gold nanoclusters. *TrAC Trends Anal Chem* 57:73–82
- Chen LY, Wang CW, Yuan Z, Chang HT (2015) Fluorescent gold nanoclusters: recent advances in sensing and imaging. *Anal Chem* 87:216–229

6. Li H, Zhu W, Wan A, Liu L (2017) The mechanism and application of the protein-stabilized gold nanocluster sensing system. *Analyst* 142:567–581
7. Rasheed PA, Lee JS (2017) Recent advances in optical detection of dopamine using nanomaterials. *Microchim Acta* 184:1239–1266
8. Korotcenkov G, Brinzari V, Cho BK (2016) Conductometric gas sensors based on metal oxides modified with gold nanoparticles: a review. *Microchim Acta* 183:1033–1054
9. Miller DR, Akbar SA, Morris PA (2014) Nanoscale metal oxide-based heterojunctions for gas sensing: a review. *Sens Actuators B Chem* 204:250–272
10. Papkovsky DB, Dmitriev RI (2013) Biological detection by optical oxygen sensing. *Chem Soc Rev* 42:8700–8732
11. Wang X, Wolfbeis OS (2014) Optical methods for sensing and imaging oxygen: materials, spectroscopies and applications. *Chem Soc Rev* 43:3666–3761
12. Lehner P, Staudinger C, Borisov SM, Regensburger J, Klimant I (2015) Intrinsic artefacts in optical oxygen sensors-how reliable are our measurements. *Chem Eur J* 21:3978–3986
13. Zou XS, Pan TT, Chen L, Tian YQ, Zhang WW (2017) Luminescence materials for pH and oxygen sensing in microbial cells-structures, optical properties, and biological applications. *Crit Rev Biotechnol* 37:723–738
14. Wolfbeis O (2015) Luminescent sensing and imaging of oxygen: fierce competition to the Clark electrode. *BioEssays* 37: 921–928
15. Kenner RD, Khan AU (1976) Molecular oxygen enhanced fluorescence of organic molecules in polymer matrices: a singlet oxygen feedback mechanism. *J Chem Phys* 64:1877–1882
16. Vishnoi G, Morisawa M, Muto S (1998) A new plastic optical fiber sensor for oxygen based on fluorescence enhancement. *Opt Rev* 5: 13–15
17. Ghosh RN, Askeland PA, Kramer S, Loloee R (2011) Optical dissolved oxygen sensor utilizing molybdenum chloride cluster phosphorescence. *Appl Phys Lett* 98:221103
18. Wang Y, Wang Y, Zhou F, Kim P, Xia Y (2012) Protein-protected Au clusters as a new class of nanoscale biosensor for label-free fluorescence detection of proteases. *Small* 8:3769–3773
19. Das T, Ghosh P, Shanavas MS, Maity A, Mondal S, Purkayastha P (2012) Protein-templated gold nanoclusters: size dependent inversion of fluorescence emission in the presence of molecular oxygen. *Nano* 4:6018–6024
20. Galbán J, Sanz-Vicente I, Castillo JR, Luque de Castro MD (2001) Integrated analytical pervaporation-gas phase absorptiometry: theoretical aspects and applications. *Anal Chim Acta* 434:81–93
21. Aldeek F, Muhammed MH, Palui G, Zhan N, Mattoussi H (2013) Growth of highly fluorescent polyethylene glycol-and zwitterion-functionalized gold nanoclusters. *ACS Nano* 7:2509–2521
22. Lianzhe H, Shuang H, Parveen S (2012) Highly sensitive fluorescent detection of trypsin based on BSA-stabilized gold nanoclusters. *Biosens Bioelectron* 32(1):297–299
23. Chevrier DM, Chatt A, Zhang P (2012) Properties and applications of protein-stabilized fluorescent gold nanoclusters: short review. *J Nanophoton* 6:064504
24. Lin CAJ, Yang TY, Lee CH, Huang SH, Sperling RA, Zanella M, Li JK, Shen JL, Wang HH, Yeh HI, Parak WJ, Chang WH (2009) Synthesis, characterization, and bioconjugation of fluorescent gold nanoclusters toward biological labeling applications. *ACS Nano* 3: 395–401
25. Govindaraju S, Ankireddy SR, Viswanath B, Kim J, Yun K (2017) Fluorescent gold nanoclusters for selective detection of dopamine in cerebrospinal fluid. *Sci Rep* 7:40298
26. Nakano M, Nagai T (2017) Thermometers for monitoring cellular temperature. *J Photochem Photobiol C* 30:2–9
27. Shang L, Stockmar F, Azadfar N, Nienhaus GU (2013) Intracellular thermometry by using fluorescent gold nanoclusters. *Angew Chem Int Ed Engl* 52:11154–11157
28. Jortner J (1971) Radiationless transitions. *Pure Appl Chem* 27: 389–419
29. Turro NJ (1991) Modern molecular photochemistry. University science books, Mill Valley, California. Ch. 6 p 187



Gold nanocluster fluorescence as an indicator for optical enzymatic nanobiosensors: choline and acetylcholine determination

Alba Martín-Barreiro^a, Susana de Marcos^a, Jesús M. de la Fuente^b, Valeria Grazú^b,
Javier Galbán^{a,*}

^a Analytical Biosensors Group, Analytical Chemistry Department, Faculty of Sciences, Aragón Institute of Nanosciences (INA), University of Zaragoza, 50009 Zaragoza, Spain

^b Nanotechnology and Apoptosis Group, Aragon Materials Science Institute (ICMA), CSIC-University of Zaragoza, CIBER-BBN, C/Mariano Esquillor s/n, Edif I+D, 50018, Zaragoza, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Gold nanoclusters
Fluorescence
O₂ quenching
Oriented binding
FRET
Acetylcholine

ABSTRACT

Gold nanoclusters (AuNCs) have been covalently linked to a FAD-dependent enzyme, choline oxidase (AuNCs@ChOx), with the objective of using the AuNCs fluorescence at 700 nm for monitoring the enzymatic reaction. The linking methodology has been optimized to obtain oriented binding and as a result the structure of the enzyme changes leading to an enhancement of the intrinsic FAD fluorescence of the enzyme (at 525 nm). During the enzymatic reaction with choline, the AuNCs@ChOx fluorescence intensity at both wavelengths (700 nm and 525 nm) changes proportionally to the choline concentration and can be simultaneously monitored. The mechanism of the analytical signal has been studied and a combination of FRET and O₂ quenching was found to be responsible for the changes. A mathematical equation is proposed for modelling the signal. The combination of AuNCs@ChOx with acetylcholinesterase permitted the determination of acetylcholine in a concentration range from 1·10⁻⁶ to 1·10⁻⁵ M and RSD = 4%. This new approach can potentially be applied to any other flavo-enzyme in order to both increase their FAD fluorescence properties and to move the fluorescence measurement to the NIR region. The biosensor is reversible and avoids the use of conventional fluorophores, which are prone to chemical degradation and present worse biocompatibility.

1. Introduction

Gold nanoclusters (AuNCs) belong to the group of metallic nanomaterials having fluorescence properties [1]. Their emission wavelengths, Stokes displacements, quantum yields and lifetimes depend on their size but also on the stabilizing agents or ligands used during their (bio)chemical synthesis. There is no single mechanism explaining the fluorescence of all AuNCs. In fact, Zheng [2] proposes three types of luminescent gold nanoparticles depending on the mechanism involved: those containing a few atoms (which follow the classical jellium model), those having small nanometer sizes (whose fluorescence involves S-Au transitions, and/or surface Au(I) interactions) and those with larger plasmonic nanoparticles. This means that the analytical possibilities and applications of AuNCs will depend on the group in which they are included. Moreover, AuNCs have additional interesting properties such as good biocompatibility and excellent photostability [3,4] which make them a convincing alternative to semiconductor quantum-dots in analytical applications.

The analytical applications of AuNCs have been compiled in recent reviews [5–8]. Three main fields are highlighted: inorganic analyte determination, especially of Hg(II), Cu(II) and H₂O₂ (based on the quenching of fluorescence these compounds produce), protein determinations (generally based on quenching by AuNCs aggregation or by products of the reaction) and bioimaging. The use of AuNCs for the analytical determination of small organic molecules is less frequent but is now gaining in importance. The most representative examples are based on three strategies: 1) the direct analyte/AuNCs interaction produces fluorescence quenching (glucose [9], clenbuterol [10], ascorbic acid [11]) or enhancement (cysteine [12]) by different mechanisms; 2) the analyte, such as dopamine [13] or histidine [14], interacts with an AuNCs quencher (Cu(II) and Ni(II) respectively), giving a fluorescence enhancement; and 3) the analyte produces AuNCs fluorescence quenching by aggregation [15]. These methodologies usually have good sensitivity, but the selectivity is not optimal for some types of sample.

To design more selective methods, AuNCs fluorescence can be

* Corresponding author.

E-mail address: jgalban@unizar.es (J. Galbán).

<https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.08.116>

Received 28 May 2018; Received in revised form 13 August 2018; Accepted 23 August 2018

Available online 03 September 2018

0925-4005/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

coupled with enzymatic reactions. To date there are not many examples, but the following schemes can be postulated: 1) the substrate and its product show different quenching/enhancement on the AuNCs fluorescence; this has been applied to the determination of acetylcholine after being hydrolyzed by acetylcholinesterase (ACE) to choline (which quenches the fluorescence [16]) and also for the measurement of the activity of several enzymes such as ACE [17] or alkaline phosphatase [18]; 2) the substrate inhibits the activity of an enzyme (which produces a quencher during the reaction), proposed for organophosphate pesticide determination by its inhibition in the tyrosinase/dopamine reaction [19]; and 3) the H_2O_2 formed (in the enzymatic reaction) quenches the fluorescence of the AuNCs, proposed in particular for glucose determination mediated by glucose oxidase [20–22].

Many optical enzymatic methods are based on flavo-enzymes containing FAD as a coenzyme. The mechanism of these enzymatic reactions involves the cofactor reduction to FAD.H₂ and the subsequent re-oxidation to FAD (when the reaction is over) [23]. Both FAD and FAD.H₂ have different absorption and fluorescence properties [24]. The absorption remains nearly unaltered in flavo-enzymes, but fluorescence is highly quenched by the chemical environment surrounding the flavine in the active center and is only observable in some cases. The utilization of FAD spectroscopic properties as signals in analytical methods would avoid the necessity of coupling an indicating reaction, which is the “Achilles heel” when a biosensor for a monitoring system is being designed. Three alternatives could be applied [25]: 1) the enhancement of the FAD fluorescence (as far as we know, no procedures have been described), 2) the measurement of the FRET between the intrinsic tryptophan fluorescence of the enzyme and FAD (this moves the working wavelengths to the 300 nm zone), and 3) the coupling of a fluorophore to the enzyme which is able to produce FRET with FAD. This last option is preferred; however, its limitation is that the measurement wavelength of the majority of available fluorophores is limited to the 450–550 nm region, in which we can find spectral interferences when it is applied in biological samples; moreover, chemical fluorophores are prone to chemical degradation and in many cases lack biocompatibility.

The essential neurotransmitter acetylcholine (ACh) is produced in the neurons and is necessary for the transmission of the nervous impulse. It is specific in various synapses, being the main neurotransmitter of the cholinergic system. Variations of acetylcholine are associated with various neurodegenerative diseases such as Parkinson's and Alzheimer's, both increases and decreases, respectively. Therefore, the development of methods for the rapid and sensitive determination of neurotransmitters such as acetylcholine, provides invaluable information about its effect on the nervous system [26].

In addition, Ch is one of the fundamental components of cell membranes and the major component of phospholipids (phosphatidylcholine and sphingomyelin), the precursor of acetylcholine and a source of methyl groups. Therefore, it is important for the integrity of the cellular membranes, neurotransmission, intracellular signaling and for the lipid transport and metabolism. Furthermore, choline is a precursor of betaine, methionine and glycine, all of which are required to regulate osmotic stress [27].

The analytes ACh and Ch are traditionally detected by high-performance liquid chromatography (HPLC) [28]. However, this technique involves long analysis times, expensive equipment and the need for qualified technical personnel. In this context, enzymatic biosensors [29] are presented as an alternative to conventional methods that allow *in situ* analysis in short times and that provide high sensitivities comparable to HPLC for lower costs. Due to the fast-enzymatic hydrolysis of ACh to choline (Ch) by acetylcholinesterase, most enzymatic methods of ACh determination are based on the hydrolysis of ACh and the detection/quantification of the Ch generated during the reaction.

In this paper, we propose a general working scheme for the detection of enzymatic reactions. This is based on linking the AuNCs as close as possible to the active center of the enzyme, in order both to facilitate

the FRET with FAD (moving the detection to around 700 nm to allow the interference free determination of choline/acetylcholine in biological samples), and to try to change the environment surrounding the FAD to enhance its fluorescence quantum yield. Choline Oxidase is used as a model flavo-enzyme, first for choline determination and later, after coupling to the ACE enzymatic reaction, for acetylcholine determination.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Hydrogen tetrachloroaurate (III) hydrate (99.8%-Au) (Chloroauric acid) was purchased from Stream Chemicals (<https://secure.strem.com>). (\pm)- α -Lipoic acid, sodium borohydride, 2-(N-morpholino) ethane-sulfonic acid (MES), N-Hydroxysulfosuccinimide sodium salt, N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC), Acetylcholine (ACh) chloride $\geq 99\%$, Choline chloride $\geq 99\%$ and the enzymes Choline Oxidase (ChOx) from *Alcaligenes* sp. (15 U/mg protein, EC 1.1.2.17) and Acetylcholinesterase (ACE) from *Electrophorus electricus* Type V-S, (electric eel) (987 U/mg protein, EC 3.1.1.7) were purchased from Sigma-Aldrich Co. LLC. (<http://www.sigma-aldrich.com>). Tris(hydroxymethyl)aminomethane (TRIS), Na_2CO_3 , NaOH and $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ from Panreac AppliChem (<http://www.panreac.com>). For agarose electrophoresis, Seakem LE Agarose from Lonza (<http://www.lonza.com>) and Tris-Borate-EDTA Buffer (10xTBE) from Merck Millipore (<http://www.merckmillipore.com>). All fluorescence measurements were carried out in a 3 x 3 mm path length ultra-micro quartz cell (0.045 mL) Hellma 105.251-QS (www.hellma-analytics.com).

2.2. Apparatus

For the purification of synthesized gold nanoclusters (AuNCs) by ultracentrifugation, Amicon-Ultra 10 kDa centrifugal filters from Millipore (Germany) and a Koch centrifuge from Bunsen (<http://www.bunsen.es>) were used. The nanoparticles size and morphology of AuNCs were detected by transmission electron microscopy using a Tecnai F30H-7650 microscope (scanning and transmission mode, STEM) and a Titan High-base for High Resolution (0.09 nm) Imaging (HRSTEM) (FEI, The Netherlands, <https://www.fei.com>). The electrophoresis equipment consisted of a Mini-Sub Cell GT BIO-RAD (150VDC, 10 W) and a PAGER MiniGel Chamber LONZA (250VDC/30 W/150 mA/ 60 °C). Fluorescence measurements were made on a LS 55 fluorescence spectrometer (Perkin-Elmer, UK, <https://www.perkinelmer.com>), equipped with a xenon lamp as the excitation light source, using the emission and excitation band passes of 10 nm, at a scan rate of 1000 nm·min⁻¹. Lifetime measurements were carried out with a Photon Technology International (PTI) Time Master fluorescence spectrometer (TM-272003) equipped with a N₂ laser (GL-3300) that pumps a dye laser (as a radiation source), and a stroboscopic system as the detector. A Perkin-Elmer Avio 200 ICP-OES was used for the determination of Au concentration in AuNCs. An Analytic Jena, high-resolution continuum source atomic absorption spectrometer, ContraAA 700 was used for AuNCs characterization.

2.3. Synthesis of AuNCs

AuNCs were synthesized by a chemical reduction synthesis method of a gold salt using NaBH₄ as reducer and lipoic acid as capping agent, using a procedure previously described [30]. In short, 20 mL of milliQ-H₂O, 0.05 mL of NaOH and 3·10⁻⁵ mol of lipoic acid (LA) are mixed (in a 50 mL glass bottle protected from light) and subjected to an ultrasound bath for 15 min. Then, 0.2 mL of the 0.05 M gold salt (AuCl₄Na·2H₂O) are added (Au:ligand ratio 1:3) and the mixture is stirred constantly for 5 min. The reducing agent is then added, 0.4 mL of a 0.05 M sodium tetraborate (NaBH₄) solution, dropwise. The

reaction takes place at room temperature for 15 h and with constant stirring. After that, a purification step for removing the reagent excess and the by-products is carried out, consisting of ultracentrifugation (10 K membrane filter), according to the following optimized protocol: first spin cycle at 1676 g for 25 min. 1st wash with 2 mL Milli-Q H₂O; second spin cycle at 1676 g for 20 min; second wash with 1 mL Milli-Q H₂O; third spin cycle at 1676 g for 20 min. The synthesis product was kept at room temperature in the absence of light and characterized by several analytical techniques (see below).

2.4. Atomic spectrometry measurements

For the determination of the Au concentration in AuNCs, the AuNCs solution (0.2 mL) was submitted to acid attack (0.3 mL aqua regia, two hours at room temperature and another 15 min at 60 °C) and then was diluted to 20 mL with bi-distilled water; this solution was measured in the Perkin-Elmer Avio 200 ICP-OES at 267.595 nm. For the GFAAS measurements a wavelength of 242.795 nm was chosen and the following temperature program was applied:

Step	Drying 1	Drying 2	Pyrolysis 3	Pyrolysis 4	Adaptation	Atomization	Cleaning
T (°C)	90	110	500	500	500	2200	2450
Ramp (°Cs ⁻¹)	3	5	50	—	—	150	500
Hold (s)	20	10	20	10	5	10	4
Air flow (Lmin ⁻¹)	2	2	2	2	—	—	2

2.5. Bioconjugation of AuNCs with choline oxidase

The preparation of AuNCs bioconjugated to ChOx (AuNCs@ChOx) was carried out using the carbodiimide method (ESM3) according to a four stage procedure.

Stage 1. Activation of AuNCs with EDC and NHS-Sulfo: This stage is designed by adjusting the molar ratios EDC:Enzyme and EDC:NHS-Sulfo:EDC to 1:1500 and 1:2 respectively. In a 2 mL Eppendorf, 0.35 mg of EDC and 0.98 mg of NHS-Sulfo are weighed and dissolved in 0.25 mL of 0.1 M MES buffer pH 7; then 0.05 mL of the AuNCs are added, leaving the mixture to react for 30 min under continuous stirring.

Stage 2. Purification of activated AuNCs: The activated mixture is transferred to a 10 K centrifugal filters of 0.5 mL and the purification is performed by centrifugal ultrafiltration at 4 °C according to the following protocol (this temperature is intended to avoid the possibility of hydrolysis of intermediate 1, see ESM3): first spin cycle at 3000 g for 5 min; first wash, 0.2 mL of 0.05 M PBS pH 8; second spin cycle at 3000 g for 5 min; second wash, 0.2 mL of 0.05 M PBS pH 8; third spin cycle at 3000 g for 5 min.

Stage 3. Bioconjugation of the AuNCs with the enzyme: A 1670 mg L⁻¹ (4.2 U·mL⁻¹) ChOx solution is prepared by dissolving the appropriate ChOx weight in 0.05 M PBS pH 8. Then, in a 2 mL Eppendorf 0.05 mL of purified and activated AuNCs and 0.2 mL of 0.05 M PBS pH 8 and 0.055 mL of ChOx solution are mixed. The mixture is kept in orbital stirring for 2 h at room temperature.

Stage 4. Blocking of Activated Carboxyls: 0.015 mL of TRIS 2 M pH = 8 are mixed with 0.3 mL of the final bioconjugate solution. This mixture was labelled as the AuNCs@ChOx stock solution and kept at 4 °C until use.

2.6. Study of the enzymatic reaction

The PTI luminometer is able to measure the fluorescence intensity nearly simultaneously at two fluorescence wavelengths (λ_{em}) if both are excited at the same excitation wavelength (λ_{exc}). Therefore,

405 nm was chosen as λ_{exc} and 525 nm and 700 nm as λ_{em} . For choline determination, 0.05 mL of the AuNCs@ChOx stock solution were added to the cuvette and the fluorescence measurement began; after stabilization, 0.01 mL of the choline solution were added, and the fluorescence versus time measurement was taken to signal stabilization; the areas of the signals at both wavelengths (A505 and A700) were taken as the measurement parameters. For ACh determination, a similar procedure was used, excepting that 0.080 mL of the AuNCs@ChOx stock solution and 0.010 mL of 10 U·mL⁻¹ ACE, are added initially mixed in the cuvette.

2.7. Agarose electrophoresis

To prepare the agarose gel the corresponding amounts of agarose and 0.5xTBE electrophoresis buffer are mixed: 1% (1 g of agarose in 100 mL of TBE 0.5x) or 4% (4 g of agarose in 100 mL of 0.5xTBE). These solutions are heated in microwaves to obtain a homogeneous solution. The resulting mixture, already cooled but not solidified, is poured onto the electrophoresis mould and the comb is properly placed to create the wells. After solidification, the mould is immersed in the horizontal

electrophoresis cell filled with 0.5xTBE buffer, the comb is removed and the samples are injected into the wells with the aid of a micropipette ($V_{injection} = 0.012$ mL). The electrophoresis is carried out at 200 V for 30 min and can be stopped at intermediate times to observe the progression of the samples. Since it is a non-denaturing electrophoresis, the structure of the AuNCs and the enzyme are not affected, and their fluorescence properties remain, which allows their bands to be detected by means of a UV lamp.

2.8. Study of the ChOx molecules: AuNCs/mL ratio in bioconjugation

In order to know the optimal ChOx:AuNCs ratio for biofunctionalization, different proportions were studied, maintaining in all cases the amount of ChOx molecules (300 g·L⁻¹, which is equivalent to 3.01·10¹⁵ molecules of ChOx per mL) and changing the amount of AuNCs per mL. The ChOx:AuNCs ratios studied were 1:1, 1:2, 1:3, 1:5, 1:6, 1:7 and 1:10.

2.9. AuNCs@ChOx bioconjugates fluorescence and electrophoresis characterization

During the fluorescence and electrophoresis AuNCs@ChOx bioconjugate (BioCon) characterization studies, several control samples were simultaneously measured:

- AuNCs control (AuNCs-c): containing AuNCs that were not activated or incubated with ChOx at the same concentration as the final BioCon.
- Bioconjugate Control (Bcontrol): containing unbounded AuNCs that were not activated with EDC and ChOx at the same concentration as in the final BioCon.
- ChOx control (ChOx-c): containing ChOx at the same dilution as in the final BioCon.

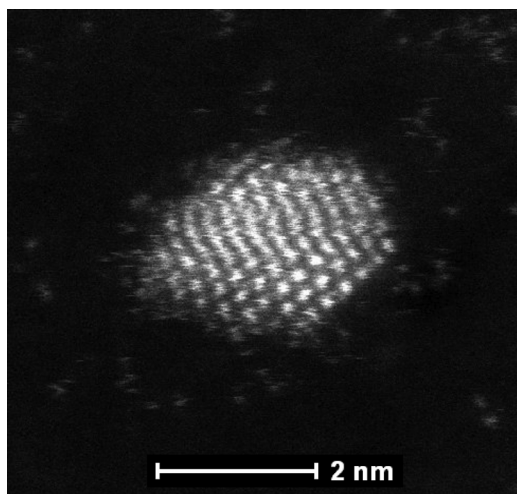


Fig. 1. HRSTEM image of one AuNCs obtained with a Titan High-base instrument for High Resolution Imaging. The individual atoms can be visualized.

3. Results and discussion

3.1. AuNCs characterization

The morphology of AuNCs was characterized by STEM. They are spherical in shape and fairly uniform in size, the average diameters being 1.60 ± 0.23 nm (see ESM1 Figure S1.1 and S1.2). The agarose electrophoresis shows a large migration of these AuNCs to the positive pole as a narrow band indicating not only a narrow size distribution but also small sizes and/or a high net charge.

In order to optimize the bioconjugation procedure it was necessary to obtain the concentration of AuNCs in the stock prepared according to the procedure given in Section 2.2. First, the Au total concentration was determined by ICP-AES, resulting in 1.57 ± 0.03 g L⁻¹, which corresponds to a synthesis yield of 85.6%. In the literature [31,32] it is shown that the crystalline structure of AuNCs (determined from the diffraction pattern by HRTEM) is face-centered cubic and therefore the unit-cell mass is $1.31 \cdot 10^{-21}$ g. Considering the Au density (19.3 g·cm⁻³), a unit-cell volume of $6.79 \cdot 10^{-2}$ nm³ is obtained. With this value and the diameter of the AuNCs, it is possible to determine the Au atomic number (~127) and the mass ($2.11 \cdot 10^{-22}$ g) of each AuNC and subsequently the AuNCs concentration in the prepared stock ($3.77 \cdot 10^{16}$ AuNCs per mL). This value is generally consistent with the STEM image of the AuNCs shown in Fig. 1 and it will be taken as the reference for the subsequent optimization studies.

The emission spectrum shows a maximum at about 700 nm. The excitation spectrum is very broad and shows a maximum at 300 nm, and a nearly continuous excitation up to 600 nm (ESM1, figure S1.3). To determine whether AuNCs fluorescence depends linearly on the concentration, several diluted solutions were prepared. Figure S1.4 (ESM1) shows saturation for high AuNCs concentrations. The AuNCs are stable during at least 30 days (7.0% RSD). The fluorescence lifetime of AuNCs greatly depends on the size and synthetic pathways used, so values from a few [33] to several hundred [6] ns have been reported in the literature. The AuNCs synthesized here showed a lifetime of 120 ± 10 ns. Finally, O₂ produces collisional quenching of the fluorescence of these AuNCs with a Stern-Volmer constant of 1500 ± 200 M⁻¹ (ESM1 Figure S1.5). The synthesized clusters showed high colloidal stability at a broad range of pH and ionic strength (see Supplementary Info for more details). This allowed the use of different media conditions to ensure ChOx oriented binding.

3.2. Optimization of bioconjugation of AuNCs with choline oxidase

3.2.1. Analysis of the crystal structure of the enzyme choline oxidase

It is well known that energy transfer is highly dependent on the donor-acceptor distance. Therefore, to succeed in the FAD-AuNCs energy transfer, it would be very useful to test if ChOx has amine terminal aminoacids located close to the FAD group (i.e., the active site). To obtain this information, the ChOx structure needs to be known. Several databases compile the three-dimensional (3D) structures of proteins, the Protein Data Bank (PDB) [34] being one of the most important. PDB contains structural information about ChOx from *Arthrobacter globiformis* which is an organism belonging to the same microbiological genus as *Alcaligenes* sp; in fact, ChOx coming from both organisms has similar fluorescent and kinetic properties [35]. Once the 3D structure is obtained, the search focuses on finding amino acids which can act as nucleophiles in covalent binding reactions or ionic adsorption, located close to the active center. The literature [36] indicates that different conformations of the loop 250–255 (amino acid zone of the protein) are fundamental in the control of access to the active site in ChOx. Fortunately, this loop has two terminal amines (see ESM2) (the enzyme is a dimer), so it is worth testing for biofunctionalization with the terminal carboxyl of AuNCs.

3.2.2. Study of the pH

The carbodiimide method was chosen for the covalently oriented attachment of the enzyme to the AuNCs (see ESM3). On the one hand, this method ensures the covalently bonding of proteins through amine groups to the carboxyl groups in the NCs. As only deprotonated amines are able to establish a covalent bond, by changing the pH of the buffer it is possible to promote the bonding through the terminal amine groups of the protein instead of the lysine side chain. Thus, the pH should be higher than 6.5 (to have the N-terminal amines totally or partially deprotonated), and lower than 9 (to avoid deprotonation of the ε-amine groups of lysines). On the other hand, the buffer composition and the ionic strength of the solution should lead to AuNCs colloidal stability during the whole process. A series of phosphate and MES buffered solutions with different pH and ionic strengths were tested (see ESM4). As a result of these studies and considering the corresponding requirements of the different stages of the biofunctionalization, MES 0.1 M pH 7 was chosen for AuNCs activation (with EDC/NHS) and PBS 0.050 M pH 8 for the rest of the steps in the biofunctionalization process.

3.2.3. AuNCs:ChOx ratio

Optimization of the ChOx:AuNCs ratio is essential in order to achieve a sensitive sensor. As has been indicated, each enzyme dimer has two terminal amines (both close to the active site), so the theoretical optimum ratio should be 1:2. However, carbodiimide-activated carboxyl groups are poorly stable over time and sometimes it is necessary to use higher ratios to ensure the bonding of all the enzyme molecules; in addition, it is not appropriate to use very large AuNCs excesses because the binding to the ε-amines of lysines can be strengthened, increasing the background signal. Different molecular ChOx:AuNCs ratios were tested (see experimental section; in all cases the concentration of ChOx was kept at $3.01 \cdot 10^{15}$ molecules·mL⁻¹).

First, agarose electrophoresis was used to evaluate the variations in motility, charge and target size of the resulting bioconjugated compound. Fig. 2 shows the electrophoretic plate obtained for different ratios. For each ratio, *AuNCs-c*, *Bcontrol* and *BioCon* lanes (see experimental section) are shown; in addition, a *ChOx-c* lane has also been included. As can be seen, three bands are highlighted.

These are:

1) At the end of the lane, which corresponds to the free enzyme; this band does not appear in the *BioCon* line, indicating that there is no free ChOx in these solutions.

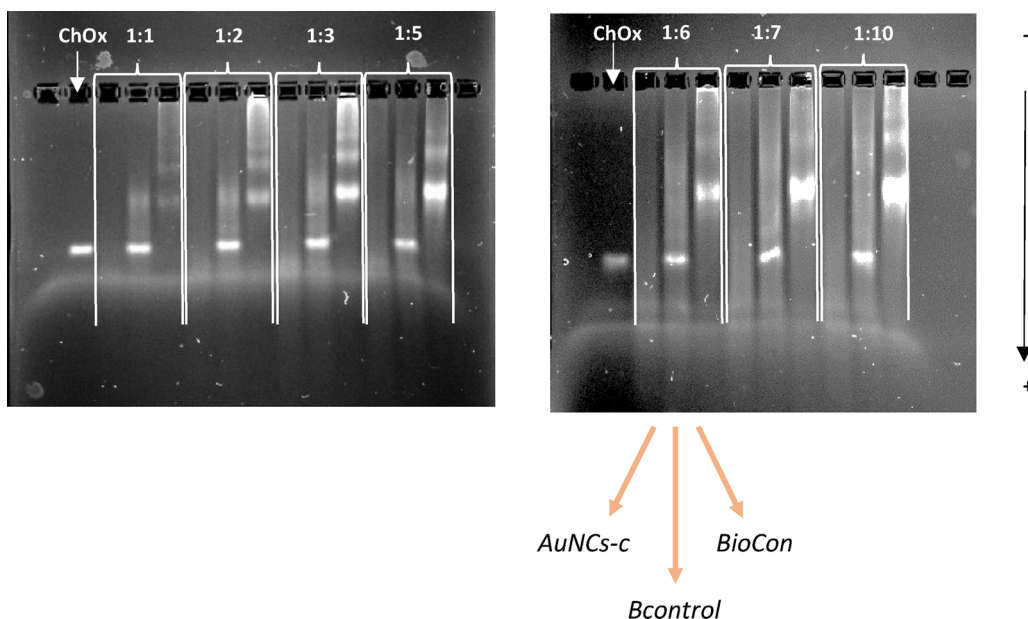


Fig. 2. Agarose electrophoresis of ChOx-control and ChOx:AuNCs at different ratio (1:n). For each ChOx:AuNCs ratio a block of three lanes corresponding to AuNCs-control (left), Bioconjugate control (centrum) and BioCon (right) are shown.

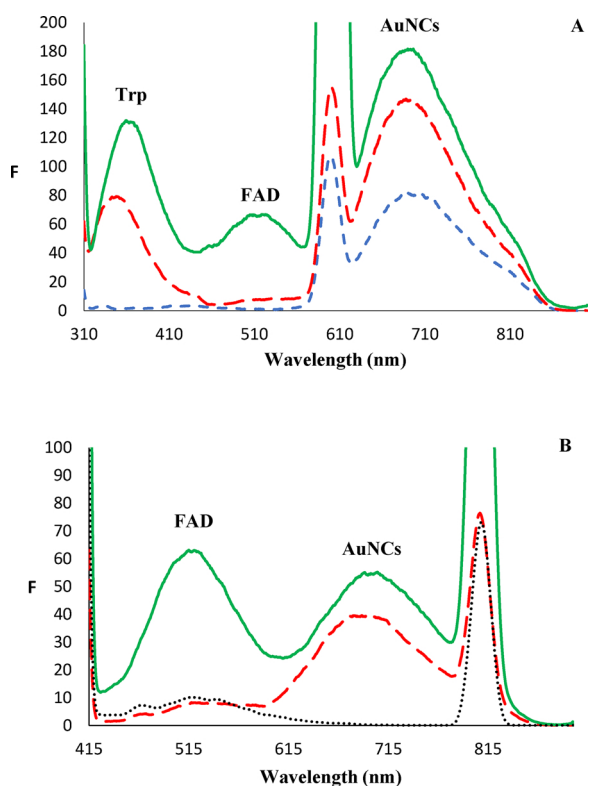


Fig. 3. Fluorescence spectra. **A)** with λ_{ext} 300 nm, of the control samples (---) AuNCs-c, (---) Bcontrol and (—) BioCon for ChOx:AuNCs ratio 1:2. **B)** with λ_{ext} 405 nm, of the control samples (.....) ChOx-c, (---) Bcontrol, and (—) BioCon for ChOx:AuNCs ratio 1:2.

2) In the middle of the lane; since this band appears in *Bcontrol*, it may be the result of physical interaction (ionic and/or hydrophobic) between both entities. Interestingly, this band is fuzzy in the *Bcontrol* solution, and its intensity does not depend on the AuNCs concentration. However, in the *BioCon*, the intensity of this band increases with the ratio.

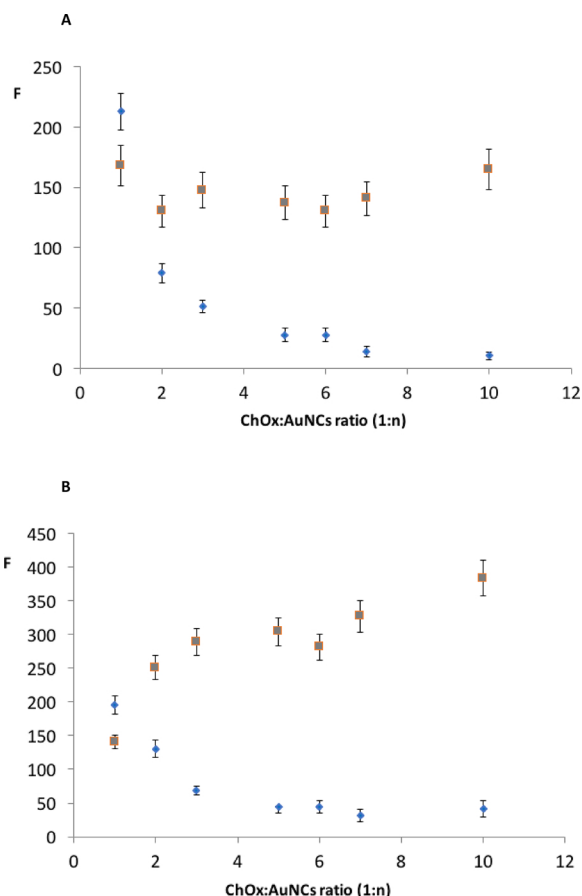


Fig. 4. Fluorescence intensity (λ_{exc} = 300 nm) of the maximum at 700 nm (◆) (AuNCs) and 370 nm (■) (tryptophan groups) versus ChOx:AuNCs ratio (1:n): **A)** Bcontrol **B)** BioCon.

3) At the beginning of the lane, which should correspond to the *BioCon*. The intensity of this band reaches a maximum for 1:2 and 1:3 ratios and then decreases but does not show a correlation with the ratio.

The *BioCon* presents fluorescence due to both the AuNCs and the ChOx (Fig. 3); this last consists of aminoacid fluorescence, especially tryptophan (at about 340 nm under 225–275 nm excitation) and FAD fluorescence (at 525 nm, excitation at 405 nm). These maxima are also present in the *Bcontrol* solutions. However, there are interesting differences between them which also depend on the AuNCs:ChOx ratios (Fig. 4).

* First. The maximum at 700 nm is enhanced in the *BioCon* compared to the *Bcontrol* (and even AuNCs-c); however, the difference in the fluorescence intensity between the *BioCon* and *Bcontrol* is nearly the same for ratios higher than 1:2. This indicates that the bioconjugation increases the AuNCs fluorescence and also that the AuNCs:ChOx stoichiometry is 2.

* Second. The maximum due to tryptophan (about 350 nm) clearly decreases with the AuNCs concentration, due to the inner filter effect produced by the nanomaterial. More interestingly, it appears redshifted in the *BioCon* compared to the *Bcontrol*; this indicates that tryptophan groups are exposed to a more hydrophilic environment [37] in the *BioCon*, which is consistent with a structural change of the enzyme (it becomes more open) due to the bioconjugation.

* Third. The structural change suffered by the ChOx in the *BioCon* is also observed when the fluorescence spectra is carried out at a $\lambda_{exc} = 405$ nm, which corresponds to the maximum excitation of the FAD group. Fig. 3B shows that the FAD fluorescence intensity at 525 nm in the *Bcontrol* and ChOx-c is very similar, but considerably less intense than in the *BioCon*; this enhancement may be due to the fact that the

FAD group, in this configuration, is less prone to be affected by natural quenchers in proteins [24].

Finally, the possibility of studying the *BioCon* formation using graphite furnace-atomic absorption spectroscopy (GFAAS) is here proposed. Resano et al [38] have shown that the absorption profiles obtained by GFAAS during the atomization step for Au (III) and AuNP exhibit some differences. Since the chemical environment of Au will be different in the AuNCs-c, *Bcontrol* and *BioCon*, the absorption profiles obtained by GFAAS for the three samples would also be expected to exhibit some differences, if this step is properly designed. Fig. 5A shows that for AuNCs-c the atomization peak for Au appears at about 11.5 s, but for *Bcontrol* this peak change and moves to longer atomization times in such a way that the higher the AuNCs excess, the longer the atomization time (and the higher the absorption peak). When *BioCon* is submitted to the same process (Fig. 5B), a new peak appears at shorter atomization times (about 10 s), which is clearly different from that of the *Bcontrol*. This new peak (which is due to the *BioCon*) always appears at the same atomization time and with nearly the same height (after subtracting the contribution due to the *Bcontrol*), which agrees with the results observed using fluorescence. As can be seen in Fig. 5B, for the 1:2 ratio there is no peak due to free AuNCs, confirming this ratio as the optimum.

3.3. AuNCs@ChOx bioconjugate fluorescence variation during the enzymatic reaction: sensing mechanism

According to Fig. 3B, the reaction between *BioCon* and choline can be monitored by measuring the FAD fluorescence ($\lambda_{em} = 525$ nm) or the AuNCs fluorescence ($\lambda_{em} = 700$ nm). Each fluorophore presents its maximum excitation at a different wavelength (405 nm and 300 nm, respectively). However, it is more interesting to monitor the fluorescence of both fluorophores simultaneously. Since the Au still absorbs at the FAD excitation wavelength, 405 nm was used for both fluorophores. Fig. 6A shows the kinetic profiles obtained. The observed changes in the FAD fluorescence agree with the theoretical expectations for ChOx alone [31]. So, when choline is added ($t = 100$ s), a decrease is observed due to the dilution. From this point (F_i), the FAD fluorescence decreases to a minimum (F_{min}) due to the FAD reduction to FAD.H₂. After a time, the intensity increases again to the initial value after dilution (F_f), which is indicative of the complete regeneration of the enzyme by re-oxidation of FAD, and consequently that all the choline has reacted.

To explain the AuNCs fluorescence reaction profile, two phenomena should be considered simultaneously: fluorescence quenching by O₂ [39] and energy transfer (FRET) with FAD. The O₂ consumption during the enzymatic reaction will increase the fluorescence intensity (this is observed when the reaction between *Bcontrol* and choline is monitored at the 700 nm wavelength shown in figure S5.1, ESM5). This part of the signal is characterized by a fast increase due to O₂ consumption by the enzymatic reaction, and a later decrease due to O₂ diffusion (dotted line in Fig. 6A, representing the simulated signal due only to O₂). Regarding the FRET, as shown in figure S5.2 (ESM5), the FAD emission spectrum and the excitation spectrum of the AuNCs overlap, which results in FRET from the enzyme to the AuNCs. When the FAD is reduced, its emission decreases and consequently the FRET also decreases. This part of the signal will be qualitatively similar to that of the FAD and will overlap that of the O₂; in consequence, the AuNCs signal at 700 nm is the decay due to O₂ minus the intensity due to FRET.

3.4. Evaluation of the nanobiosensor for the quantitative determination of choline

The evaluation of the response of the developed nanobiosensor was carried out by studying the variation of the *BioCon* fluorescence signal with different concentrations of choline. As previously indicated, three types of analytical signals were tested (Fig. 6A): 1) the area (A_{FAD}) of

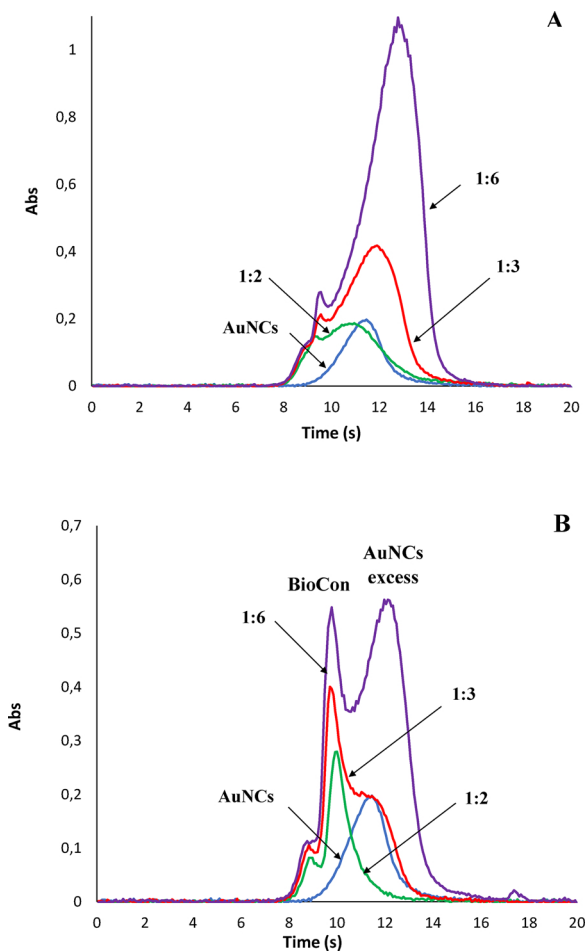


Fig. 5. Absorbance versus time recordings obtained using HR CS GFAAS at different ChOx:AuNCs ratio: AuNCs (blue line); 1:2 (green line); 1:3 (red line); 1:6 (violet line).

A) *Bcontrol* B) *BioCon*.

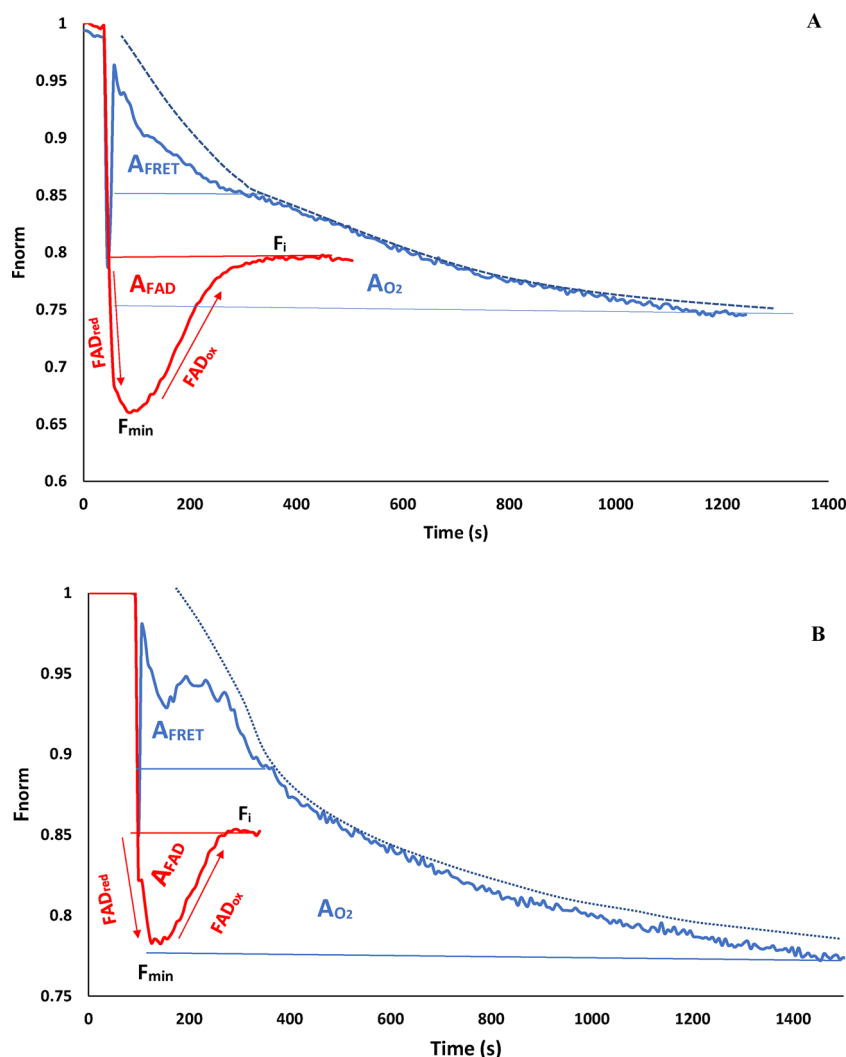


Fig. 6. A) BioCon fluorescence intensity ($\lambda_{exc} = 405\text{ nm}$) variation at 525 nm (red line) and 700 nm (blue line) during the enzymatic reaction with choline. Dotted line indicates the simulated fluorescence profile only due to O_2 . B) BioCon fluorescence intensity ($\lambda_{exc} = 405\text{ nm}$) variation at 525 nm (red line) and 700 nm (blue line) during the enzymatic reaction with acetylcholine and ACE. Dotted line indicates the simulated fluorescence profile due only to O_2 .

the FAD fluorescence signal ($\lambda_{exc} = 405\text{ nm}$ and $\lambda_{em} = 525\text{ nm}$); 2) the area of the AuNCs signals ($\lambda_{exc} = 405\text{ nm}$ and $\lambda_{em} = 700\text{ nm}$) corresponding to the FRET (A_{FRET}), which is characterized by a profile similar to that of FAD; this part of the signal is difficult to differentiate, so the AuNCs signals during the time of the FAD signal variation are

considered as a measurement of the A_{FRET} ; 3) the total area of the AuNCs profile (A_{AuNC}) which includes the FRET (A_{FRET}) and the O_2 effect (A_{O_2}), corresponding to the long decay of the fluorescence signal. The analytical figures of merit corresponding to these parameters are compiled in Table 1 (see Fig S6.1, ESM6 for calibration graphs). The

Table 1
Analytical figures of merit for the enzymatic determinations using the BioCon fluorescence.

			Linear range (M)	Slope	RSD%	LOD (M)	LOQ (M)
Choline determination	FRET + O_2	[Choline]↓	$1.00 \cdot 10^{-6} - 7.50 \cdot 10^{-5}$	$4.40 \cdot 10^{13}$	6.66	$3.06 \cdot 10^{-7}$	$1.02 \cdot 10^{-6}$
		[Choline]↑	$1.00 \cdot 10^{-6} - 1.00 \cdot 10^{-5}$	$1.43 \cdot 10^{13}$	5.90	$9.90 \cdot 10^{-7}$	$3.30 \cdot 10^{-6}$
	FAD	[Choline]↓	$1.00 \cdot 10^{-5} - 7.50 \cdot 10^{-5}$	$4.17 \cdot 10^{12}$	10.04	$3.23 \cdot 10^{-6}$	$1.07 \cdot 10^{-5}$
		[Choline]↓	$5.00 \cdot 10^{-6} - 1.50 \cdot 10^{-5}$	$1.43 \cdot 10^{13}$	5.40	$8.47 \cdot 10^{-6}$	$2.82 \cdot 10^{-6}$
		[Choline]↑	$1.50 \cdot 10^{-5} - 1.00 \cdot 10^{-5}$	$1.17 \cdot 10^{12}$	3.33	$5.10 \cdot 10^{-8}$	$1.70 \cdot 10^{-6}$
			Linear range (M)	Slope	RSD%	LOD (M)	LOQ (M)
Acetylcholine determination	FRET + O_2	[Acetylcholine]↓	$1.00 \cdot 10^{-6} - 1.00 \cdot 10^{-5}$	$4.25 \cdot 10^{13}$	4.35	$3.17 \cdot 10^{-7}$	$1.05 \cdot 10^{-6}$
		[Acetylcholine]↑	$1.00 \cdot 10^{-5} - 7.50 \cdot 10^{-5}$	$8.83 \cdot 10^{12}$	7.23	$1.25 \cdot 10^{-6}$	$4.16 \cdot 10^{-6}$
	FRET	[Acetylcholine]↓	$1.00 \cdot 10^{-6} - 1.00 \cdot 10^{-5}$	$5.13 \cdot 10^{12}$	5.14	$2.33 \cdot 10^{-8}$	$7.76 \cdot 10^{-8}$
		[Acetylcholine]↑	$1.00 \cdot 10^{-5} - 7.50 \cdot 10^{-5}$	$1.78 \cdot 10^{12}$	9.17	$5.93 \cdot 10^{-7}$	$1.97 \cdot 10^{-6}$
	FAD	[Acetylcholine]↓	$5.00 \cdot 10^{-6} - 1.50 \cdot 10^{-5}$	$8.43 \cdot 10^{12}$	6.25	$2.35 \cdot 10^{-7}$	$7.83 \cdot 10^{-7}$
		[Acetylcholine]↑	$1.50 \cdot 10^{-5} - 1.00 \cdot 10^{-5}$	$2.10 \cdot 10^{12}$	3.69	$8.75 \cdot 10^{-7}$	$2.91 \cdot 10^{-6}$

values obtained with the A_{FAD} show two linear response ranges, one for low and the other for high choline concentrations. The most interesting aspect is that the LOQ was smaller than that obtained with ChOx alone, which is due to the enhancement observed in the FAD fluorescence resulting from the structure change of the enzyme. Similar results were obtained using the A_{FRET} , because this parameter measures the same interaction as A_{FAD} but with a different sensitivity.

The A_{FRET} is only about 10% of the total area at 700 nm, so the total area (A_{AuNCs}) is considered as a good approximation of the A_{O_2} . We have developed a model relating the total area with the choline concentration (see detailed deduction in ESM7). Considering that the air/solution O_2 diffusion is a first order kinetic process (1) and taking into account the Stern-Volmer plot for O_2 quenching (2), the following equations can be set out:

$$[O_2]_t = [O_2]_0 - 2[ChO]_0 e^{-k_d t} \quad (1)$$

$$\frac{F_{0,a}}{F_t} = 1 + K_{sv} [O_2]_t \quad (2)$$

k_d and K_{sv} being the O_2 diffusion constant and the Stern-Volmer constant, respectively. After combining (1) and (2), the fluorescence intensity profile (F_t) will be given by:

$$F_t = \frac{F_{0,a}}{1 - \frac{2K_{sv}[ChO]_0}{1 + K_{sv}[O_2]_0} e^{-k_d t}} \quad (3)$$

$F_{0,a}$ being the BioCon fluorescence intensity before the reaction. The integration of (3) gives the A_{AuNCs} value for the whole area:

$$A_{AuNCs} \approx \frac{2K_{sv}}{k_d(1 + K_{sv}[O_2]_0)} [Choline]_0 \quad (4)$$

The experimentally obtained linear relationship between A_{AuNCs} and the choline concentration (Fig S6.1 and table 1 A) validates equation (4). In order to reduce the measurement time, it is possible to consider the area at a given time interval instead of the total area. In this case, the model can also be applied (see ESM7), but the sensitivity and the linear range response will be shortened accordingly.

Choline oxidase (ChOx) is currently used as the base of colorimetric tests and enzymatic kits for Ch determination. By coupling ACh to ChOx, the same procedure is used for the determination of acetylcholine. The selectivity provided by these enzymes is enough for most applications. The biosensor presented in this paper bases its selectivity in these enzymes. Moreover, according to the bibliography, the sensitivity is also enough for choline or acetylcholine determination in several types of samples such as foodstuffs, vitamin preparations or even biological samples [40,41].

We have observed that the AuNCs@ChOx compound retains its activity during at least two months. As regards reusability, we have not used the compound more than five consecutive assays. Exhaustive studies of the lifetime and reusability of the biosensor will be carried out using different solid supports.

3.5. Coupling of the acetylcholinesterase-acetylcholine reaction for the determination of acetylcholine

To determine acetylcholine (ACh), the enzymatic reaction of the BioCon was coupled with that of the ACE/Ach:



Before evaluating the analytical capabilities of the BioCon, the optimal conditions of the enzymatic reaction (5) were considered. The optimum pH of the reaction has been previously reported to be around 7–8 [42], which is similar to that used for choline determination, so it is not necessary to find a compromise value for both reactions. The effect of the enzyme concentration has been studied. ACE is one of the most active known enzymes [43] so even for low enzyme concentrations it is possible to achieve a rapid choline formation. After optimization, 2

$U \cdot mL^{-1}$ was finally chosen (Fig. S6.2). In these conditions, the fluorescence versus time profile obtained (Fig. 6B) was very similar to that of the choline, because the time of the hydrolysis reaction was reduced to a minimum. The mathematical model given by (4) can also be applied in this case but replacing $[Choline]_0$ by $[ACh]_0$. Consequently, the same analytical parameters described for choline determination can also be applied.

The analytical figures of merit are compiled in table 1B (representations in Fig. S6.3). The analytical figures of merit are similar to those obtained with choline. In this case, the values obtained with the total area (A_{AuNCs}) showed two linear adjustments, one for low concentrations and the other for higher concentrations.

4. Conclusions

Several optical enzymatic methods for Ch or ACh determination based on nanomaterial fluorescence have previously been reported, including carbon dots [44], quantum dots (QD) [45–49] and AuNCs [16,20]. In all the cases, the nanomaterials were not previously linked to the enzyme, inhibiting any FRET process. Moreover, decreases in the fluorescence signal during the enzymatic reaction were reported in all cases. These were explained by the H_2O_2 quenching in the fluorescence, the mechanism being the oxidation of either the metal-forming nanomaterial (for example, Te in QD) or the S-metal bond (giving a –S–S–bond); both mechanisms imply fluorophore degradation. Some authors have observed that the nanomaterial oxidation by H_2O_2 is enhanced by increasing the temperature and the reaction time; in fact, some of those methods use an incubation step (at 37 °C) for the enzymatic formation of H_2O_2 in the presence of the nanomaterial. As indicated before, we have observed an increase in the fluorescence of the nanomaterial which was explained, in addition to FRET, by the decrease of the quenching of O_2 on the AuNCs fluorescence. It seems clear that both the experimental procedure described in this paper and the AuNCs@ChOx linkage protect the nanomaterial against the potential oxidation by H_2O_2 , allowing the O_2 fluorescence quenching to be observed (whatever the nanomaterial having the fluorescence lifetime large enough) and the reutilization of the same AuNCs@ChOx aliquot for several determinations (which is necessary for the design of monitoring systems). Finally, when the studies cited above are reviewed in depth, it can be seen that the differences in the quantification limit for H_2O_2 , choline or acetylcholine are not very significant (1 order of magnitude) and they are also similar to those obtained in this paper.

In conclusion, this paper demonstrates that AuNCs produce good analytical performances when used in an enzymatic method based on the induced fluorescence properties of enzymes. Choline and acetylcholine have been used as model analytes. These fluorescence properties can be used both considering the O_2 quenching effect on the fluorescence of AuNCs and the FRET with the FAD. Moreover, AuNCs are able to modify the structure of the enzyme, giving rise to an enhancement of the intrinsic fluorescence of FAD which is of considerable interest for enzymes having this cofactor.

Funding sources

This work was supported by the MINECO of Spain (project CTQ2016-76846R) and research funding from DGA (Fondo Social Europeo) (E25_17R).

Acknowledgments

The authors thanks Prof. Martín Resano and Mr. Raúl Garde (Analytical Chemistry Department, University of Zaragoza) for carrying out the measurements by GFAAS and for their technical advice. The authors also acknowledge the Laboratorio de Microscopias Avanzadas (LMA) at the Instituto de Nanociencia de Aragón-Universidad de Zaragoza for offering access to their instruments and expertise. The

authors would also like to thank Dr. Rodrigo Fernández-Pacheco (LMA) for helpful discussions.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.08.116>.

References

- [1] P. Yu, X. Wen, Y.R. Toh, X. Ma, J. Tang, Fluorescent metallic nanoclusters: electron dynamics, structure, and applications, *Part. Part. Syst. Charact.* 32 (2015) 142–163, <https://doi.org/10.1002/ppsc.201400040>.
- [2] J. Zheng, C. Zhou, M. Yu, J. Liu, Different sized luminescent gold nanoparticles, *Nanoscale* 4 (2012) 4073–4083, <https://doi.org/10.1039/c2nr31192e>.
- [3] L. Zhang, E. Wang, Metal nanoclusters: new fluorescent probes for sensors and bioimaging, *Nano Today* 9 (2014) 132–157, <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2014.02.010>.
- [4] X. Qu, Y. Li, L. Li, Y. Wang, J. Liang, J. Liang, Fluorescent gold nanoclusters: synthesis and recent biological application, *J. Nanomater.* (2015), <https://doi.org/10.1155/2015/784097> ID 784097.
- [5] M. Cui, Y. Zhao, Q. Song, Synthesis, optical properties and applications of ultra-small luminescent gold nanoclusters, *TRAC Trends Anal. Chem.* 57 (2014) 73–82, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.02.005>.
- [6] L.Y. Chen, C.W. Wang, Z. Yuan, H.T. Chang, Fluorescent gold nanoclusters: recent advances in sensing and imaging, *Anal. Chem.* 87 (2015) 216–229, <https://doi.org/10.1021/ac503636j>.
- [7] H. Li, W. Zhu, A. Wan, L. Liu, The mechanism and application of the protein-stabilized gold nanocluster sensing system, *Analyst* 142 (2017) 567–581, <https://doi.org/10.1039/c6an02112c>.
- [8] O.S. Wolfbeis, An overview of nanoparticles commonly used in fluorescent bioimaging, *Chem. Soc. Rev.* 44 (2015) 4743–4768, <https://doi.org/10.1039/c4cs00392f>.
- [9] A.M.P. Hussain, S.N. Sarangi, J.A. Kesarwani, S.N. Sahu, Au-nanocluster emission based glucose sensing, *Biosens. Bioelectron.* 29 (2011) 60–65, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2011.07.066>.
- [10] X. Cao, H. Li, L. Lian, N. Xu, D. Lou, Y. Wu, A dual-responsive fluorescence method for the detection of clenbuterol based on BSA-protected gold nanoclusters, *Anal. Chim. Acta* 871 (2015) 43–50, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.02.031>.
- [11] X. Wang, P. Wu, X. Hou, Y. Lu, An ascorbic acid sensor based on protein-modified Au nanoclusters, *Analyst* 138 (2013) 229–233, <https://doi.org/10.1039/c2an36112d>.
- [12] M.I. Cui, J.M. Liu, X.X. Wang, L.P. Lin, L. Jiao, L.H. Zhang, Z.Y. Zheng, S.Q. Lin, Selective determination of cysteine using BSA-stabilized gold nanoclusters with red emission, *Analyst* 137 (2012) 5346–5351, <https://doi.org/10.1039/c2an36284h>.
- [13] B. Aswathy, G. Sony, Cu²⁺ modulated BSA–Au nanoclusters: a versatile fluorescence turn-on sensor for dopamine, *Microchem. J.* 116 (2014) 151–156, <https://doi.org/10.1016/j.microc.2014.04.016>.
- [14] Y. He, X. Wang, J. Zhu, S. Zhong, G. Song, Ni²⁺-modified gold nanoclusters for fluorescence turn-on detection of histidine in biological fluids, *Analyst* 137 (2012) 4005–4009, <https://doi.org/10.1039/c2an35712g>.
- [15] Q. Lu, T. Zhou, Y. Wang, L. Gong, J. Liu, Transformation from gold nanoclusters to plasmonic nanoparticles: a general strategy towards selective detection of organophosphorothioate pesticides, *Biosens. Bioelectron.* 99 (2018) 274–280, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.07.066>.
- [16] M.S. Mathew, A. Bakshi, T. Pradeep, K. Joseph, Choline-induced selective fluorescence quenching of acetylcholinesterase conjugated Au@BSA clusters, *Biosens. Bioelectron.* 81 (2016) 68–74, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.02.048>.
- [17] H. Li, Y. Guo, L. Xiao, B. Chen, Selective and sensitive detection of acetylcholinesterase activity using denatured protein-protected gold nanoclusters as a label-free probe, *Analyst* 139 (2014) 285–289, <https://doi.org/10.1039/c3an01736b>.
- [18] M.I. Halawa, W. Gao, M. Sagib, S.A. Kitte, F. Wu, G. Xu, Sensitive detection of alkaline phosphatase by switching on gold nanoclusters fluorescence quenched by pyridoxal phosphate, *Biosens. Bioelectron.* 95 (2017) 8–14, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.03.073>.
- [19] X. Yan, H. Li, T. Hu, X. Su, A novel fluorimetric sensing platform for highly sensitive detection of organophosphorus pesticides by using egg white-encapsulated gold nanoclusters, *Biosens. Bioelectron.* 91 (2017) 232–237, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.11.058>.
- [20] C.Y. Ke, Y.T. Wu, W.L. Tseng, Fluorescein-5-isothiocyanate-conjugated protein-directed synthesis of gold nanoclusters for fluorescent ratiometric sensing of an enzyme-substrate system, *Biosens. Bioelectron.* 69 (2015) 46–53, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.02.002>.
- [21] J. Zhang, L. Tu, S. Zhao, G. Liu, Y. Wang, Y. Wang, Z. Yue, Fluorescent gold nanoclusters based photoelectrochemical sensors for detection of H₂O₂ and glucose, *Biosens. Bioelectron.* 67 (2015) 296–302, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.08.037>.
- [22] X. Xia, Y. Long, J. Wang, Glucose oxidase functionalized fluorescent gold nanoclusters as probes for glucose, *Anal. Chim. Acta* 772 (2013) 81–86, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.02.025>.
- [23] A. Mattevi, To be or not to be an oxidase: challenging the oxygen reactivity of flavoenzymes, *Trends Biochem. Sci.* 31 (2006) 276–283, <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2006.03.003>.
- [24] J. Galbán, I. Sanz-Vicente, J. Navarro, S. de Marcos, The intrinsic fluorescence of FAD and its application in analytical chemistry: a review, *Methods Appl. Fluoresc.* 4 (2016) 042005, <https://doi.org/10.1088/2050-6120/4/4/042005>.
- [25] J. Galbán, I. Sanz-Vicente, E. Ortega, M. del Barrio, S. de Marcos, Reagentless fluorescent biosensors based on proteins for continuous monitoring systems, *Anal. Bioanal. Chem.* 402 (2012) 3039–3054, <https://doi.org/10.1007/s00216-012-5715-2>.
- [26] Taylor Palmer, *The cholinesterases*, *J. Biol. Chem.* 266 (7) (1991) 4025–4028.
- [27] Marie A. Caudill, Pre- and postnatal health: evidence of increased choline needs, *J. Am. Diet. Assoc.* 110 (8) (2010) 1198–1206, <https://doi.org/10.1016/j.jada.2010.05.009>.
- [28] Markus Persike, et al., Quantitative determination of acetylcholine and choline in microdialysis samples by MALDI-TOF MS, *Anal. Chem.* 82 (3) (2010) 922–929, <https://doi.org/10.1021/ac902130h>.
- [29] Tunç Ayşe Tuğçe, ElifAynacı Koyuncu, Fatma Arslan, Development of an acetylcholinesterase–choline oxidase based biosensor for acetylcholine determination, *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* 44 (7) (2016) 1659–1664, <https://doi.org/10.3109/21691401.2015.1080167>.
- [30] F. Aldeek, M.H. Mohammed, G. Pauli, N. Zhan, H. Maltoussi, Growth of highly fluorescent polyethylene glycol- and zwitterion-functionalized gold nanoclusters, *ACS Nano* 7 (2013) 2509–2521, <https://doi.org/10.1021/nm305856t>.
- [31] M.C. Alonso, L. Trapiella-Alfonso, J.M. Costa, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, Functionalized gold nanoclusters as fluorescent labels for immunoassays: application to human serum immunoglobulin e determination, *Biosens. Bioelectron.* 77 (2016) 1055–1061, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.08.011>.
- [32] M.J. Hostetler, J.E. Wingate, Ch. Zhong, J.E. Harris, R.W. Vachet, M.R. Clark, J.D. Londono, S.J. Gree, J.J. Stokes, G.D. Wignall, G.L. Glish, M.D. Porter, N.D. Evans, R.W. Murray, Alkanethiolate gold cluster molecules with core diameters from 1.5 to 5.2 nm: Core and monolayer properties as a function of core size, *Langmuir* 14 (1998) 17–30, <https://doi.org/10.1021/la970588w>.
- [33] J. Zheng, C. Zhang, R.M. Dickson, Highly fluorescent, water-soluble, size-tunable gold quantum dots, *Phys. Rev. Lett.* 93 (2004) 077402, <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.93.077402>.
- [34] PDB Website, <https://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=4MJW> (last Accessed December 2017).
- [35] E. Ortega, S. de Marcos, I. Sanz-Vicente, C. Ubide, M. Ostra, M. Vidal, J. Galbán, Fluorescence of the Flavin group in choline oxidase. Insights and analytical applications for the determination of choline and betaine aldehyde, *Talanta* 147 (2016) 253–300, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.09.060>.
- [36] F. Salvi, Y.F. Wang, I.T. Weber, G. Gadda, Structure of choline oxidase in complex with the reaction product glycine betaine, *Acta Crystallogr. D70* (2014) 405–413, <https://doi.org/10.1107/S1399004713029283>.
- [37] J.T. Vivian, P.R. Callis, Mechanisms of tryptophan fluorescence shifts in proteins, *Biophys. J.* 80 (2001) 2093–2109, [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(01\)76183-8](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(01)76183-8).
- [38] M. Resano, E. García-Ruiz, R. Garde, High-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry for the monitoring of Au nanoparticles, *J. Anal. At. Spectrom.* 31 (2016) 22–33, <https://doi.org/10.1039/c6ja00280c>.
- [39] A. Martín-Barreiro, S. de Marcos, J. Galbán, Gold nanoclusters as a quenecheable fluorescent probe for sensing oxygen at high temperatures, *Microchim. Acta* 185 (2018) 171–177, <https://doi.org/10.1007/s00604-018-2676-y>.
- [40] B.K. Sharma, R.A. Erdman, In vitro degradation of choline from selected foodstuffs and choline Supplements 1, 2, *J. Dairy Sci.* 72 (10) (1989) 2772–2776, [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(89\)79421-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(89)79421-2).
- [41] Richards Jope, Effects of phosphatidylcholine administration to rats on choline in blood and choline and acetylcholine in brain, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 220 (2) (1982) 322–328.
- [42] H.J. Nolte, T.L. Rosenberry, E. Neumann, Effective charge on acetylcholinesterase active sites determined from the ionic strength dependence of association rate constants with cationic ligands, *Biochemistry* 19 (1980) 3705–3711, <https://doi.org/10.1021/bi00557a011>.
- [43] D.M. Quinn, Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states, *Chem. Rev.* 87 (1987) 955–979, <https://doi.org/10.1021/cr00081a005>.
- [44] X.L. Ren, J.F. Wei, J. Ren, L. Qiang, F.Q. Tang, X.W. Meng, A sensitive biosensor for the fluorescence detection of the acetylcholinesterase reaction system based on carbon dots, *Coll. Surf. B: Biointerfaces* 125 (2015) 90–95, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.11.007>.
- [45] C.I. Wang, A.P. Periasamy, H.T. Chang, Photoluminescent C-dots@RGO Probe for sensitive and selective detection of acetylcholine, *Anal. Chem.* 85 (2013) 3263–3270, <https://doi.org/10.1021/ac303613d>.
- [46] Z.Z. Zheng, X.Y. Li, Z.F. Dai, S.Q. Liu, Z.Y. Tang, Detection of mixed organophosphorus pesticides in real samples using quantum dots/bi-enzyme assembly multilayers, *Mat. Chem.* 21 (2011) 16955–16962, <https://doi.org/10.1039/c1jm11631b>.
- [47] Z. Chen, X. Ren, X. Meng, D. Chen, C. Yan, J. Ren, Y. Yuan, F. Tang, Optical

detection of choline and acetylcholine based H₂O₂-sensitive quantum dots, *Biosens. Bioelectron.* 28 (2011) 50–55, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2011.06.041>.

- [48] H.C. Li, Y.X. Guo, L.H. Xiao, B. Chen, A fluorometric biosensor based on H₂O₂-sensitive nanoclusters for the detection of acetylcholine, *Biosens. Bioelectron.* 59 (2014) 289–292, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.03.054>.
- [49] X.W. Meng, J.F. Wei, X.L. Ren, J. Ren, F.Q. Tang, A simple and sensitive fluorescence biosensor for detection of organophosphorus pesticides using H₂O₂-sensitive quantum dots/bi-enzyme, *Biosens. Bioelectron.* 47 (2013) 402–407, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.03.053>.

Mrs. Alba Martín-Barreiro received her degree in Chemistry at the University of Zaragoza in 2015 and completed her Master degree in 2017. She is currently developing her PhD studies in the Analytical Biosensors Group of the University of Zaragoza and in the Nanotechnology and Apoptosis Group of ICMA-CSIC. Her research interest is focused on the use of the optical properties of nanomaterials as indicators for optical nanobiosensors.

Dr. Susana de Marcos received her PhD in Chemistry from University of Zaragoza (Spain) in 1993. She was a postdoctoral fellow at the University of Graz (Austria) under the supervision of Prof. O.S. Wolfbeis, working in the field of optical sensors. From 1998 she is an Assistant Professor in Analytical Chemistry at the University of Zaragoza. She is member of the Analytical Biosensors Group and the Aragon Institute of Nanoscience (INA). Her research interest is focused on the development of optical (bio)sensors for continuous monitoring analytes for biomedical and environmental applications.

Dr. Valeria Grazú Native of Uruguay, received her PhD in Science from Autonomous University of Madrid in 2006. She was a postdoctoral fellow in the Nanotherapy and Nanobiosensors Group (GN²) at the Aragon Institute of Nanoscience (INA) from 2006 to 2013 and the Research & Development Director of Nanoimmunotech S.L (2014–2015). She is currently Senior Resesacher at the ICMA-CSIC. Her research interests include the development of novel mono/multifunctionalization strategies of nanomaterials with different biomolecules (enzymes, peptides, antibodies, carbohydrates, and so forth) for their use in diagnosis and therapy.

Dr. Jesus M. de la Fuente started his PhD work in 1999 on the evaluation of carbohydrate-carbohydrate interactions using gold nanoparticles (IIQ-CSIC, Spain). After obtaining his PhD he worked at University of Glasgow (UK) to develop a research project involving the biological application of nanoparticles. He currently leads the research group specialized in the biofunctionalization of nanoparticles at ICMA-CSIC. His research interests are based on the development of general and simple strategies for the functionalization of nanoparticles and surfaces for biomedical and biotechnological applications. From 2014 he is a Visiting Professor at the Shanghai Jiao Tong University (P.R. China).

Prof. Javier Galbán received his PhD degree in chemistry from Zaragoza University, Zaragoza, Spain, in 1986. From 2002 he is a Full Professor in Analytical Chemistry in the University of Zaragoza, where he is the coordinator of the Analytical Biosensors Group. He also belongs to the Aragon Institute of Nanoscience. His interest fields are optical (nano)biosensors as a part of monitorization devices, molecular spectrometry, especially fluorescence (theoretical, sensors and as a detection technique for chromatography), and education in Analytical Chemistry.



Cite this: *J. Mater. Chem. B*, 2020, 8, 6710

Received 1st April 2020,
Accepted 2nd June 2020

DOI: 10.1039/d0tb00861c

rsc.li/materials-b

Nanoparticle-based biosensors for detection of extracellular vesicles in liquid biopsies

Beatriz Martín-Gracia,^a Alba Martín-Barreiro,^{†ab} Carlos Cuestas-Ayllón,^a Valeria Grazú,^{ab} Aija Line,^c Alicia Llorente,^d Jesús M. de la Fuente^{*ab} and María Moros^{id} ^{*ab}

Tumor-derived extracellular vesicles have emerged as an alternative source of cancer biomarkers in liquid biopsies. Despite their clinical potential, traditional methods for isolation and analysis have hampered their translation into the clinic. The use of nanomaterial-based biosensors can speed up the development of analytical methods for quantifying extracellular vesicles in a specific, highly reproducible, robust, fast and inexpensive way. Here we review the utility of extracellular vesicles as a novel type of liquid biopsies and the recent advances in nanoparticle-based biosensors for their analysis. We aim to emphasise the limitations and challenges that hinder extracellular vesicle analysis using these biosensors and point out potential solutions.

^a Aragón Materials Science Institute (ICMA), CSIC/University of Zaragoza, Zaragoza, Spain. E-mail: m.moros@csic.es, j.m.fuente@csic.es

^b Biomedical Research Networking Center in Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine (CIBER-BBN), Spain

^c Latvian Biomedical Research and Study Centre, Riga, Latvia

^d Department of Molecular Cell Biology, Institute for Cancer Research, Oslo University Hospital, Oslo, Norway

[†] Equal contribution.



María Moros

Dr María Moros is a researcher at the Aragón Materials Science Institute (ICMA), Zaragoza, Spain. She obtained her PhD in Chemistry (PhD extraordinary award) from the Institute of Nanoscience of Aragon (Zaragoza), under the supervision of Dr J. M. de la Fuente and Dr V. Grazú. After postdoctoral work in this group from 2012 to 2015, she held a Marie Curie Fellowship at the Institute of Applied Sciences and Intelligent Systems in Naples. She

joined the ICMA with a Juan de la Cierva Fellowship and she obtained an ERC Starting Grant in 2019. Her research interests involve using nanoparticles to develop more sensitive biosensors and mechanotransduction tools for regenerative medicine, and to understand how the grafting molecules can affect their biological fate.

1. Introduction

Liquid biopsies are considered a very promising alternative to conventional tissue biopsies for cancer detection, monitoring tumor progression and tracking tumor evolution.¹ Recently, tumor-derived extracellular vesicles (EVs) have emerged as an alternative source of biomarkers in liquid biopsies. Although EVs were initially proposed to be cellular waste, to date it is known that they mediate intercellular communication and play a major role in a variety of normal and pathological processes, including cancer.² As the cargoes that EVs carry largely depend on their parent cells, EVs hold great promise as prognostic elements.³ Despite their clinical potential, the use of complex and time-consuming traditional methods for isolation and analysis has limited their clinical translation.⁴ Furthermore, characterization of EVs can be challenging because of the high heterogeneity of the isolates, which generally contain a mix of EVs of different origin, with diverse sizes and cargo content.^{5,6} In this context, the development of new analytical platforms to perform high-throughput analyses in an easy and sensitive way without sample pre-treatment could speed up their clinical translation. Ideally, point of care (POC) biosensors will allow for a sensitive, selective and fast detection of EVs while remaining easy to use and inexpensive. In recent years great efforts have been devoted to develop novel biosensors for EV analysis based on microfluidics, nanomaterials or plasmonics to name a few. However the majority of these platforms are only proof of concept works that have not entered into the market.

In this review we present the recent progress in the detection of EVs and describe the state-of-the-art in nanomaterial-based biosensors. Although several reviews have focused on some isolation and detection techniques,^{7–14} this review concentrates



on the advantages of using nanomaterials, mainly nanoparticles (NPs) to develop biosensors. We also provide a comprehensive overview of the potential use of EVs as a novel type of liquid biopsies and the techniques that are currently used to analyze EV biomarkers in biofluids. Then, we focus on the advantages of using NPs to design and develop innovative biosensors, and how the correct selection of biomolecules and nanostructures and the way to combine both could improve their analytical performance. The main aim of this review is to present in a critical way the state-of-the-art in NP-based biosensors and finally address current challenges in the detection of EVs, considering the advantages and limitations of each technique.

2. Liquid biopsies and extracellular vesicles

2.1. Liquid biopsies

Liquid biopsies of cancer are samples of biofluids such as blood or urine that are used for the analysis of cancer cells or

cancer tissue-derived molecules.^{15,16} Liquid biopsies have emerged as a very promising alternative to conventional tissue biopsies since they can be obtained in a noninvasive or minimally invasive way, thus avoiding the risks related to tissue sampling and allowing serial sampling during the course of disease. Importantly, they have been shown to reflect intratumoral heterogeneity better than tissue biopsies, and are suitable for longitudinal monitoring of cancer evolution and detection of resistance-conferring tumor cell subclones.¹⁷ Hence, liquid biopsies have a potential utility for cancer diagnosis, detection of minimal residual disease, tracking tumor progression and predicting the emergence of chemoresistance.¹⁸ The most common types of liquid biopsies are circulating tumor cells (CTCs) and circulating cell-free DNA (cfDNA) or RNA (cfRNA) (Table 1).^{19–21} CTC analyses range from the enumeration and immunophenotyping of CTCs to the single cell genomic, transcriptomic or proteomic profiling and tumor growth assays.^{19,22} cfDNA can be exploited for the detection and quantification of tumor mutations, copy number variations and methylation markers,²¹ whereas cfRNA can be used for the profiling of mRNAs and non-coding RNAs, and the identification

Table 1 Main types of cancer liquid biopsies. The table shows the main liquid biopsies, and their main source and detection methods. The examples are taken from ref. 25 except for some tumor-derived EV examples, where the readers are referred to ref. 26 and 27. Although many molecules have shown their potential in liquid biopsies, there are still few of them that have reached the clinic and many need further validation

Types of liquid biopsies		Main source	Detection	Example
Circulating tumor cells	Cell count	Blood	Several approaches based on the biological, physical and functional properties of CTCs. After CTC isolation, different molecular analysis including NGS, FISH and ICH or testing for drug sensitivity can be done	Enumeration of CTCs by CellSearch for metastatic breast, prostate or colorectal cancer
	Single cell analysis: <ul style="list-style-type: none"> – genomics – transcriptomics – proteomics – cytogenetics 			
Tumour-derived cell-free molecules	Proteins	Blood	Immunoassays	<ul style="list-style-type: none"> – PSA, prostate cancer – CA 15–3, breast cancer – EGFR mutation test, NSCLC
	ctDNA: mutations amplifications deletions translocations methylation	Any biofluid in contact with cancer	NGS	<ul style="list-style-type: none"> – Epi proColon based on gene methylation, colorectal cancer – hTERT, prostate cancer
	ctRNA: <ul style="list-style-type: none"> – expression profiles (<i>i.e.</i> of mRNAs, miRNAs, lncRNAs) – mRNA splicing 		PCR (qPCR, dPCR)	<ul style="list-style-type: none"> – PCA3, prostate cancer
Tumor-derived EVs	EV count	Any biofluid in contact with cancer	RNA-Seq	Increased in pancreatic cancer
	Proteins: expression and modifications RNA: expression profiles, <i>i.e.</i> of miRNA, lncRNA, mRNA		Nanoparticle tracking analysis, tunable resistive pulse sensing. Other platforms are under development	
			Mass spectrometry, ELISA	Many examples such as Del-1 for breast cancer Many examples such as <ul style="list-style-type: none"> – AR-V7, prostate cancer – ExoDx Prostate test – miR-196a and miR-1246 for pancreatic cancer
			PCR, RNA-Seq	
<ul style="list-style-type: none"> – exosomes – microvesicles – apoptotic bodies 	DNA: presence and modifications		PCR, NGS	Mutations in KRAS and TP53 in pancreatic cancer
	Lipids and metabolites		Mass spectrometry	See ref. 26 and 27 for examples in prostate cancer

CA: cancer antigen; Ct: circulating tumor; CTC: circulating tumor cell; dPCR: digital PCR; FISH: fluorescence *in situ* hybridization; hTERT: human telomerase reverse transcriptase; ICH: immunocytochemistry; NGS: next-generation sequencing; NSCLC: non-small cell lung cancer; lncRNA: long noncoding RNA; PCA3: prostate cancer antigen 3; PSA: prostate-specific antigen; qPCR: quantitative PCR; RNA-Seq: RNA-sequencing



of tumor-specific fusion transcripts and splice variants.²² Some of such tests, for example the enumeration of CTCs using the CELLSEARCH[®] CTC Test²³ or the detection of epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations using the cobas[®] EGFR Mutation Test,²⁴ have been approved by the Food and Drug Administration and are available for routine clinical use. More recently, tumor-educated platelets and tumor-derived EVs have emerged as an alternative source of cancer tissue-derived biomarkers in liquid biopsies.^{18,22}

2.2. Extracellular vesicles

The term “EV” refers to all types of particles released from cells that are enclosed by a lipid bilayer and cannot replicate.²⁸ EVs contain a large variety of molecules, including proteins, nucleic acids, lipids and metabolites. According to their biogenesis, three main subtypes of EVs have been defined: exosomes, microvesicles (also called ectosomes, shedding vesicles or microparticles) and apoptotic bodies.²⁹ Exosomes correspond to intraluminal vesicles of multivesicular bodies that are released from cells after fusion of the limiting membrane of these organelles with the plasma membrane. The majority of them range between 30 and 150 nm in diameter.^{30,31} Microvesicles are generated by budding from the plasma membrane and range between 50 and 1000 nm in diameter.³¹ Apoptotic bodies are highly heterogeneous EVs formed during apoptotic cell death, and the majority of them have a diameter ranging between 1 and 5 μm . However, the release of smaller EVs (<1 μm in diameter) during the progression of apoptosis has also been reported.³² Some specific types of cancer cells have been found to release unusually large EVs (1–10 μm in diameter) referred to as large oncosomes or large EVs,^{33,34} but their biogenesis is not fully understood so far. As the current methods for EV isolation do not allow accurate separation of EV subtypes, the International Society for Extracellular Vesicles (ISEV) in the recently updated position paper recommends using the term “extracellular vesicle” instead of terms like “exosome” or “microvesicle”, unless the biogenesis pathway of the studied vesicles is clearly established.²⁸ In this review, however, in order to not modify the terminology of the revised manuscripts, we will utilize the terms employed in the original works.

Although initially considered a waste disposal mechanism,³⁵ both live cell and apoptotic cell-derived EVs have turned out to be important mediators of intercellular communication acting in a paracrine and systemic manner.^{32,36} Overwhelming evidence suggests that cancer-derived EVs promote cancer progression in various ways. For instance, EVs released by highly aggressive, drug resistant or hypoxia-experienced cancer cells transfer their phenotypic traits to other cancer cells.^{37–39} Cancer-derived EVs can also be taken up by various cell types constituting the tumor microenvironment leading to stromal activation, induction of angiogenesis, lymphangiogenesis and immune suppression.^{40,41} Furthermore, cancer-derived EVs can act systemically by helping to establish pre-metastatic niches in lymph nodes and organ-specific distal sites.⁴²

2.3. Extracellular vesicles as a novel type of liquid biopsies

EVs are released by the vast majority, if not all, cell types in the body; hence blood and other biofluids contain a mixture of EVs

released by various cells. Multiple studies have shown that the levels of EVs in biofluids of cancer patients are higher than in healthy controls.^{43–50} Furthermore, some studies suggest that elevated levels of EVs are associated with the presence of minimal residual disease, therapy failure and disease progression, and that the level of EVs significantly drops after surgery.^{51,52} These findings support the idea that the presence of cancer stimulates the release of EVs; however, whether these EVs are produced by cancer cells themselves or represent a systemic response to the disease or treatment is still a matter of debate.^{18,53} Moreover, increased levels of EVs have been found in the blood of patients with various non-cancer diseases and physiological stress conditions, suggesting that the release of EVs is a common response to various stress cues.¹⁸ Thus, the EV level *per se* does not appear to be a highly specific biomarker of cancer. On the other hand, EVs isolated from plasma and other biofluids of cancer patients have been shown to contain cancer cell-derived molecules such as truncated epidermal growth factor receptor EGFRvIII,⁵⁴ mutated DNA and mRNA fragments and cancer-specific splice variants and fusion transcripts,^{55–57} as well as cancer-associated mRNA, protein and miRNA signatures.^{55,58} These findings have raised the idea that cancer-derived EVs may serve as a source of RNA, protein, lipid, DNA and metabolite-based biomarkers for early detection of cancer, monitoring cancer progression and tracking tumor evolution (Table 1 and Fig. 1).

EVs may have several advantages over CTC, cfDNA or cfrRNA-based liquid biopsies. At first, they are more abundant than CTCs and therefore may reflect intratumor heterogeneity better than CTCs and/or be easier to detect at earlier stages of cancer, in particular for tumors that release few CTCs, such as tumors of the central nervous system.^{18,59,60} Secondly, in contrast to vesicle-free cfDNA and cfrRNA, EVs contain molecular signatures reminiscent of their parental cells and protect their cargo from degradation.^{18,59} Indeed, several studies have shown that EV-enclosed DNA yields higher sensitivity and specificity for detecting *KRAS*, *EGFR* and *BRAF* mutations than total circulating cfDNA.^{56,61–63} Our recent study demonstrated that some miRNA biomarkers show better diagnostic performance if tested in EV-enclosed RNA as compared to total circulating cfrRNA.⁶⁴

Currently, one of the main biological challenges in developing EV-based blood tests is that the proportion of cancer-derived EVs in the total pool of EVs present in blood is low and highly variable among patients leading to high variability in the assay performance. One of the possible solutions is to isolate specific EV subpopulations that may serve as biomarkers by themselves or may be enriched with cancer-derived molecules. For instance, glypican-1 (GPC1) has been identified as a highly specific marker of pancreatic cancer-derived EVs and the levels of GPC1-positive EVs have been shown to have diagnostic and prognostic value in pancreatic cancer.^{65,66} Similarly, prostate-specific membrane antigen (PSMA) has been used for the isolation of prostate-specific EVs. Although PSMA is a prostate-specific, not prostate cancer-specific, protein, the plasma levels of PSMA-positive EVs could discriminate prostate cancer from benign prostatic hyperplasia and correlate with the aggressiveness of the disease.^{67,68} Conceivably, these EV subpopulations are also enriched in cancer-derived molecules.



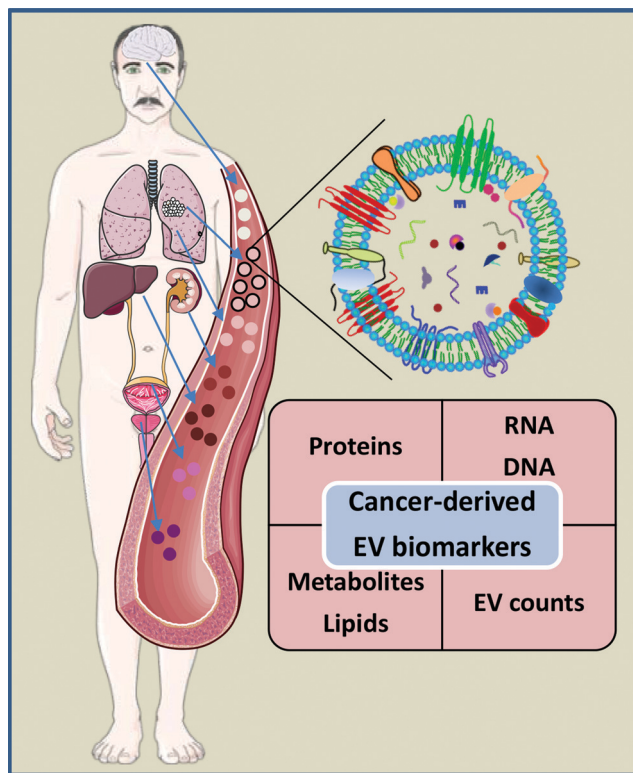


Fig. 1 EV-based biomarkers in liquid biopsies. Human blood and other biofluids contain a mixture of EVs released by various cell types. Importantly, EVs isolated from cancer patients' biofluids contain various cancer-derived molecules. This has raised the idea that EVs may serve as a source of protein, RNA, DNA, lipid and metabolite based cancer biomarkers. Moreover, several studies indicate that the levels of EVs are increased in cancer patients. Therefore, the count of specific EV subpopulations in biofluids may be used as a biomarker on its own. Some elements of the figure originate from Servier Medical Art image bank.

Furthermore, EVs have been detected in various other biofluids including lymph, saliva, urine, cerebrospinal fluid, breast milk and bronchoalveolar lavage fluid;^{56,69–71} hence these biofluids may serve as organ-specific liquid biopsies for cancers that are in contact with the given biofluid.

2.4. State-of-the-art techniques to analyze EV biomarkers in biofluids

The use of omics methodologies such as mass spectrometry for protein, lipid and metabolite quantification, and next

generation sequencing for quantification of nucleic acids, has led to the discovery of numerous EV-based biomarkers for several diseases.^{18,72,73} In the biomarker development pipeline, the validation phase follows the discovery phase. In this phase, the ability of the biomarker to separate specific patient groups using larger and independent patient cohorts is verified, and the best analytical platform to quantify the biomarker is established. In fact, the quantitative verification of the biomarkers identified in the discovery phase studies is considered a bottleneck in biomarker development. The analytical method should be able to quantify the biomarker(s) in a specific, highly reproducible, robust, fast and cheap way in order to facilitate the implementation of the biomarker test in the clinic. Conventional techniques to analyse EVs include methods such as nanoparticle tracking analysis (NTA), flow cytometry, dynamic light scattering (DLS), western blotting (WB) or immunoassays among others (Table 2). These techniques can provide valuable information about EV size, concentration or specific markers, as summarized in excellent reviews where readers are referred to for detailed information.^{10,11,74,75} On the other hand, mass spectrometry and next generation sequencing, although very useful for the discovery of biomarkers, are currently not widely used in clinical laboratories. Instead, PCR-based tests, for the quantification of nucleic acids, and immunological methods, mainly enzyme linked immunosorbent assays (ELISA), for the quantification of proteins, are part of clinical lab routines and are commonly used for diagnostic purposes (Table 1). These methods have high sensitivity and do not require complex equipment. In terms of EVs, a polymerase chain reaction (PCR)-based test for the detection of RNAs in urinary EVs that can reduce the number of unnecessary biopsies has already been commercialized.⁷⁶ The potential of lateral flow immunoassays (LFIAs) for detection of protein biomarkers in EVs has also been shown since a LFIA using the membrane proteins tetraspanins as targets is able to detect purified EVs from human plasma and urine.⁷⁷ LFIAs are based on similar principles as ELISA tests, in which a capture antibody is immobilized on a solid phase, and are ideal POC tests because they require few resources. Interestingly, immunoisolation is particularly suitable for liquid biopsies of specific cancer types and several microfluidic devices based on this principle are being developed.⁷⁸

In addition to the analytical approaches, the standardization of the preanalytical procedures is essential for robust biomarker quantification and data interpretation.⁸⁵ It is critical

Table 2 Summary of conventional techniques used to characterize EVs. WB = Western Blot; ELISA = Enzyme linked immunosorbent assay; NTA = Nanoparticle tracking analysis; DLS = dynamic light scattering; Ab = Antibody

	WB	ELISA	Flow cytometry	NTA	DLS
What is measured	Presence and molecular weight of proteins	Quantification of surface protein markers	Concentration of EVs, phenotype	Concentration of EVs, size	Size
Signal	Colorimetric, chemiluminescence, fluorescence	Colorimetric, chemiluminescence, fluorescence	Light scattering, fluorescence	Light scattering	Light scattering
LOD (EVs per mL)	10^{11} – 10^{12}	10^9 – 10^{10}	10^7 – 10^9	10^7 – 10^9	10^8 – 10^{12}
Specificity	High (specific antigen-Ab)	High (specific antigen-Ab)	High if Abs are used	Low	Low
Ref.	79,80	79–81	82,83	75,80	84



that the collection and storage of biofluids follows specific guidelines.⁸⁶ Moreover, when working with EVs, the way in which vesicles are isolated/purified should be carefully investigated. The main goal of EV isolation is to concentrate the molecular signal contained in the EVs and/or remove contaminants that may mask the signal or perturb the analytical measurement. At the moment, several methods to isolate/purify EVs exist, including ultracentrifugation, size-exclusion chromatography, precipitation, immunoisolation, microfluidics or filtration.^{78,87–89} These methods have advantages and disadvantages that have to be considered in relation with the specific biofluid, the biomolecule that is going to be measured and the analytical method that is going to be used. In fact, it has been shown that the yield and purity of EVs significantly vary between different isolation methods.^{90,91} Therefore, the isolation of EVs may introduce a potential error in the quantification of biomarkers. Thus, ideally, a routine test should not require a prior isolation of EVs from the biofluids. This could be possible if the EV-associated biomarker is very abundant and/or the quantification method is very sensitive and not affected by other materials found in the biofluid. This strategy has already given promising results. For example, Duijvesz *et al.* have developed a highly sensitive time-resolved fluorescence immunoassay (TR-FIA) for capture/detection of prostate cancer derived EVs that allows the quantification of EV proteins directly from urine.⁴⁶ Other example is the ExoScreen assay, which is able to detect EVs directly in serum using two antibodies to capture the vesicles that are then detected using photosensitizer-beads.⁹²

3. Development of nanoparticle-based biosensors

Currently, a nanomaterial can be defined as “a natural, incidental or manufactured material containing particles, in an unbound state or as an aggregate or as an agglomerate and where, for 50% or more of the particles in the number size distribution, one or more external dimensions is in the size range 1–100 nm”.⁹³ On the other hand, the International Organization for Standardization defines a NP as “a material with all external dimensions in the nanoscale, where the lengths of the longest and the shortest axes of the nano-object do not differ significantly”. In this review we will mainly focus on the use of NPs for the development of biosensors with enhanced performance. Materials on the nanometre scale have unique optical, electronic, and magnetic properties that are different from the bulk material. Of particular interest is the possibility of changing their physicochemical properties by tuning the shape and size of many NPs. For instance, important features that can be tailored on demand are the surface plasmon resonance (SPR) of gold NPs (AuNPs), the emission wavelength of carbon nanotubes (CNTs) or Quantum Dots (QDs), or the magnetic properties of magnetic nanoparticles (MNPs). One general advantage of NPs is their large surface area to volume ratio, enabling the attachment of an enhanced number of biomolecules.^{94,95} In addition, as NPs and biomolecules have similar sizes, they can interact more effectively. NPs therefore hold huge interest in biomedical applications. Indeed, NP-based

biosensors have become one of the major topics in the field of diagnostics.^{96,97} The use of NPs allows the development of devices with increased sensitivity and lower limits of detection (LODs), features with growing interest in the sensing field. Furthermore, lab-on-a-chip based assays allow the rapid analysis of low amounts of samples, thus reducing clinical care costs.⁷⁷

In the field of EVs, several detection platforms have been reported based on diverse sensing techniques, such as colorimetry, fluorescence, SPR, Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS), electrochemistry or nuclear magnetic resonance, showing the potential of NPs in diagnostics.^{79,98,99} These methods, along with their advantages and disadvantages, will be discussed in the next sections.

3.1. Functionalization of NPs with antibodies and aptamers

When developing biosensors, antibodies (Abs) and aptamers are two of the most commonly used molecular recognition biomolecules. These molecules are generally coupled to NPs in order to selectively recognize EVs. The most common targets to identify and detect EVs are protein markers such as tetraspanins (CD63, CD9, CD81), ALIX or TSG101.³ Moreover, EVs also contain specific markers directly related with their cellular origin; the analysis of these antigens could be used to detect EVs derived from cancer cells for instance.² Aside from proteins, EVs also contain RNAs; among all RNA species, miRNAs are in general very abundant, and can be used as biomarkers,¹⁰⁰ although aptamers and Abs are not commonly used to target them.

Different types of Abs or Ab-derived fragments can be used to functionalize NPs to detect EV antigens.¹⁰¹ The most widely used is Immunoglobulin G (IgG). IgG consists of four polypeptide chains linked together by disulphide bonds, forming a Y-shaped structure (Fig. 2a and b). The IgG structure can be subdivided into two parts, the antigen binding fragment (Fab) and the constant fragment (Fc) (Fig. 2b). The Fab region (arms of the Ab) contains the antigen-binding site, which confers antigen specificity. A single IgG has two antigen-binding sites that are found at the extremity of the arms. In order to improve the biosensor performance, it is highly important to leave these antigen binding sites available, so that they can interact with their antigens. One of the key factors to develop a reliable biosensor, therefore, is the technique used to immobilize the Abs on the NP surface, as the selected methodology can impact the Ab structure and activity, and ultimately the biosensor sensitivity.^{102,103} The methodologies used to functionalize Abs on NPs are based on physical adsorption, covalent binding or the use of specific adaptor molecules (Fig. 2c–g).^{104–106} Generally, strategies that provide a better orientation of the Ab on the NP surface and without involving the antigen-binding sites will result in a better outcome than strategies providing a random orientation of the Ab.¹⁰⁷ Here we present some of these strategies, which could be implemented to build biosensors to detect EVs.

One of the most common strategies to covalently link Abs to NPs is to use the amine groups from the Abs (Fig. 2d).¹⁰⁵ However, using this approach, Abs will be immobilized with a random orientation, as some Abs will be well oriented, while others will not have their antigen binding sites available.



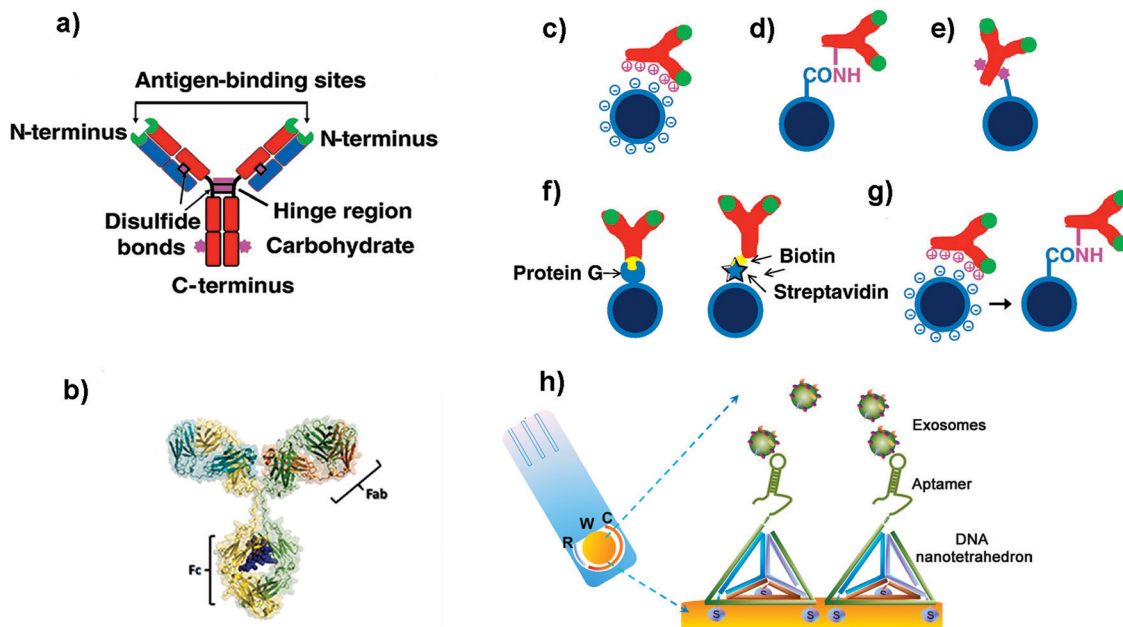


Fig. 2 (a and b) Schematic cartoon showing (a) the Y-shaped structure of an Ab (which is the ligand to be attached to the NP); the two light chains (variable regions) and the heavy chains (constant regions) are coloured in blue and red respectively. The green colour represents the antigen binding sites. The purple colour represents groups which can be used for attachment to NPs. (b) Three-dimensional model of an Ab from X-ray crystallography studies. (c–g) Schematic representation of different strategies used to functionalize NPs with Abs: (c) electrostatic adsorption; (d) covalent binding via amine groups on the Ab; (e) covalent binding via carbohydrate groups on the Ab; (f) use of adaptor biomolecules (streptavidin–biotin, Protein G); (g) ionic adsorption plus covalent binding. Adapted from ref. 105 with permission from Elsevier. (h) Schematic illustration of a nanotetrahedron-assisted electrochemical aptasensor. Aptamer-containing nanotetrahedra were immobilized via three thiol groups onto the gold electrodes for direct capture of exosomes in suspension. R: reference electrode area; W: working electrode area, with a diameter of 4 mm; C: counter electrode area. Adapted with permission from ref. 108. Copyright (2017) American Chemical Society.

Moreover, taking into account the different pK_a values of the amine groups of the Ab, at the pH conventionally used for this kind of reaction, the most reactive amine groups are the terminal ones. Unfortunately, these moieties are located in the antigen binding area, and their use could reduce the recognition efficacy of the Abs. In order to overcome this limitation, other strategies have been developed to improve the orientation of the Abs. For instance, Puertas *et al.* demonstrated that by binding the Ab on MNPs through its sugar moieties (located in the Fc region, Fig. 2e), by their partial oxidation and formation of a Schiff base, the LOD of a LFIA could be greatly improved.¹⁰⁹ Other works suggested the use of bioorthogonal click chemistry to functionalize the surface of NPs with Abs. The cycloaddition between 1,2,4,5-tetrazines (Tz) and *trans*-cyclooctene (TCO) is a straightforward method to bind Abs on the NP surface.¹¹⁰ Furthermore, it is fast, catalyst free and chemoselective. Abs modified with TCO have been used to detect cells and pathogens before being coupled with MNPs functionalized with Tz.^{110,111} When compared with direct Ab binding, the use of bioorthogonal click chemistry yielded higher sensitivity. This strategy could enhance the signal to a greater extent than other two-step labelling strategies that are routinely used, such as the coupling of avidin-modified Abs with biotin-conjugated MNPs. In addition, consecutive steps of orthogonal chemistry can further amplify the signal and increase the sensitivity.¹¹²

However, all these examples imply the chemical modification of the Abs. This modification can ultimately affect Ab structure and activity. To overcome this concern, other strategies have been proposed. Some groups have demonstrated that unspecific reversible interactions between the Ab and the NPs can be used to orient the Ab before performing a covalent coupling (Fig. 2g).^{113,114} In these cases, the incubation pH can be selected to orient the Ab, as the net protein surface charge depends on the isoelectric point of the Ab.¹¹⁵ Puertas *et al.* described this strategy to bind different types of Abs to MNPs, demonstrating that in all cases the activity was higher than when using a random conjugation.¹² This approach has been also used for the binding of Abs to AuNPs¹¹⁶ and multiwalled carbon nanotubes (MWCNTs),¹¹⁷ showing an improvement of the analytical performance of the biosensors when using this approach.

Aside from the orientation, the Ab density is also an important factor to take into account.^{114,118} Although the use of adaptor molecules (Fig. 2f) could provide worse Ab coating, the improvement on the presentation is able to enhance its activity.¹¹⁹ On the other side, Van der Heide *et al.* described that using protein A as an adaptor molecule resulted in higher Ab per AuNP and higher binding efficacy when compared to random immobilization through the most reactive amine groups.¹²⁰

Aptamers are synthetic single-stranded oligonucleotides (DNA or RNA) that bind to target molecules, such as proteins or nucleic acids, with high affinity and selectivity. Thus, they



have been used in many biomedical applications, including biosensing. Aptamers are selected from an oligonucleotide library by Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment (SELEX), a process that can be automatized.^{121,122} Target recognition and subsequent binding is based on electrostatic and hydrophobic interactions and the three-dimensional structure that they adopt. Compared to Abs, aptamers are thermally stable, have a smaller size, are more flexible and lack immunogenicity.^{123,124} When developing biosensors, the density of the aptamers on the surface of the support can be a critical factor. For instance, a dense coating could end with a high steric crowding and aptamer entanglement, thus resulting in poorer accessibility.¹²⁵ It has been suggested that immobilization through the 3' end or the addition of a linker can improve the target binding, presumably due to a decreased steric hindrance or an improved folding.¹²⁶ In this sense, the use of DNA nanotetrahedron structures to functionalize the aptamers can greatly improve the accessibility and binding ability of aptamers to their targets.^{127,128} For instance, Wang *et al.* developed an electrochemical biosensor to detect EVs where the aptamers were oriented using a tetrahedron structure (Fig. 2h).¹⁰⁸

The sensitivity of the aptasensor was increased 100-fold when compared with that obtained using single-stranded aptamers.

3.2. NP-based biosensors for EV analysis

3.2.1. Lateral flow immunoassays. LFIA is a well-established and versatile technology used to detect and quantify analytes by performing an immunochromatographic assay using a porous membrane. These assays are good candidates as POC diagnostic sensors, presenting many advantages in comparison with other analytical methods used in clinical care. In addition to being rapid and cost-effective diagnosis devices, these tests are easy to use since unskilled personnel can perform them, and additional processing or external equipment is not required.

In a typical LFIA sandwich assay, the sample is added to the sample-pad and it migrates by capillarity to the conjugate-pad. There, the analyte finds a conjugate composed of the detection Ab conjugated to particles such as latex beads or AuNPs (Fig. 3a).^{129,130} This complex flows through the nitrocellulose membrane, where the analyte is now recognised by the capture Ab immobilized at the test line (TL). Finally, the excess of conjugate reaches the control line (CL) where a secondary Ab

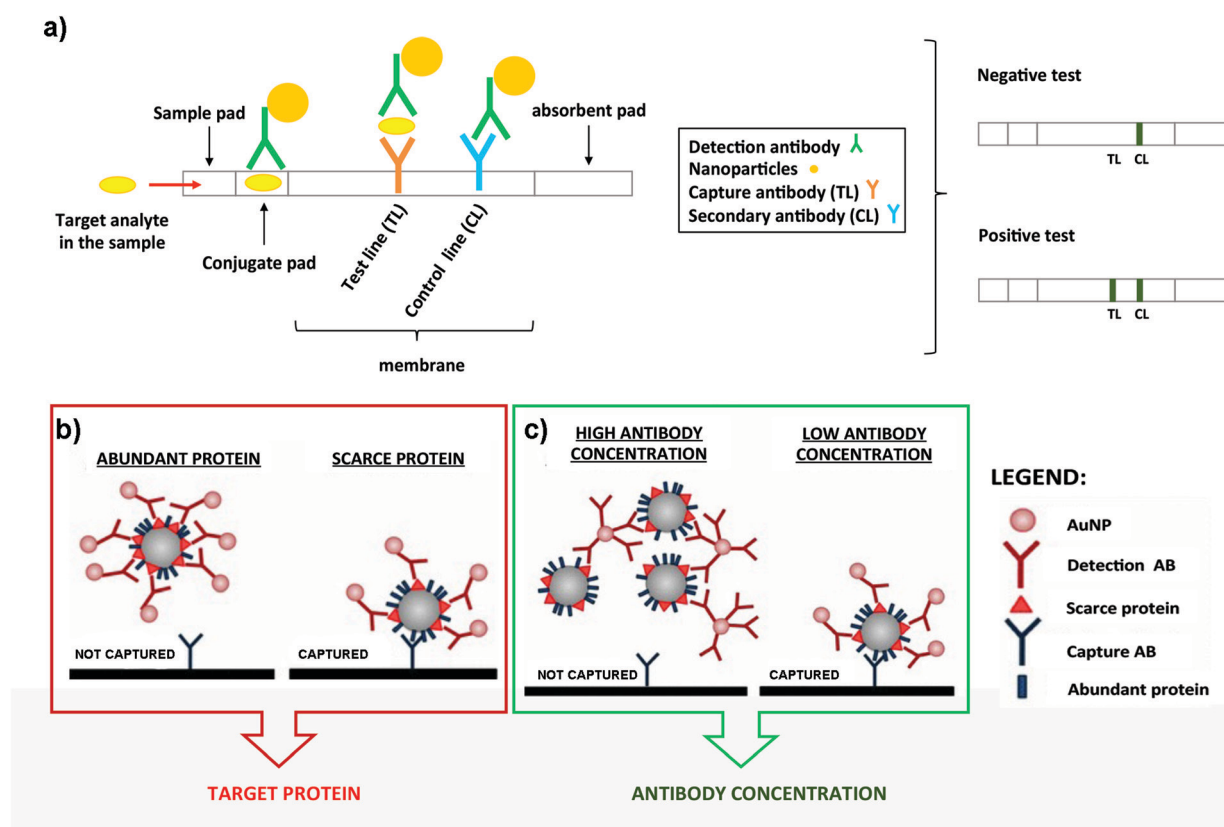


Fig. 3 (a) Schematic representation of a typical LFIA when the target analyte is present (left panel). Naked eye detection of a negative and positive test (right panel). (b) Steric hindrance model for exosomal detection using LFIA: if a marker is abundant, the exosome is completely covered by the conjugate, composed of the detection Ab functionalized on NPs. This reduces the availability of epitopes for the capture antibody present at the TL (left panel). However, if the detection marker is scarcer, the exosome can be captured (right panel). (c) Model of the effect of the Ab concentration coupled to AuNPs. When AuNPs are conjugated using a high concentration of the Ab, bigger aggregates are generated due to the crosslinking of Abs and exosomes. This results in an impaired flow of the mixture on the strip and lower capture capacity (left panel). However, if the detection Ab is conjugated at lower concentration, these complexes are not formed and each exosome can bind to several AuNPs, resulting in a better capture at the TL (right panel). Adapted from ref. 133. Copyright (2018), with permission from Springer Nature.



is located. This Ab recognizes the detection Ab, to indicate that the test worked properly. The excess of sample migrates to the absorbent pad (Fig. 3a).^{131,132} In summary, if the target analyte is present, both the CL and the TL should appear and be detected visually. If the target analyte is not present, only the CL appears. The best well-known example of this bioanalytical method is the human pregnancy test, based on the detection of human Chorionic Gonadotropin (hCG) in urine.

LFIA test strips are therefore ideal candidates for EV detection when onsite analysis and simplicity are needed. Oliveira-Rodríguez *et al.* developed a LFIA using tetraspanins as targets to detect purified exosomes from cell culture supernatants of Ma-Mel-86c melanoma cells.⁷⁷ In this work the authors were able to detect 8.54×10^8 exosomes per mL when combining anti-CD9 and anti-CD81 as capture Abs and anti-CD63 as the detection Ab. The detection Ab was labelled with 40 nm AuNPs. In addition, and as a proof of concept, these authors managed to visually detect 5 μ g and 20 μ g of plasma and urine-derived exosomes respectively (commercial exosomes from healthy donors) when different combinations of capture and detection Abs against CD9, CD81 and CD63 were used. The Ab pair was selected case-by-case depending on the different protein composition (localization and density of tetraspanins) present on the exosomal surface.

Some studies have been carried out to evaluate the performance of different NPs as labels, including AuNPs, carbon black nanoparticles (CB) and MNPs. To select the best option, the following parameters were compared: simplicity for the bioconjugate formation, stability over time and ease of visualization on the strips.¹³⁴ NPs were functionalized with anti-CD63 and tested to detect EVs purified from plasma of healthy donors on strips containing anti-CD9 as the capture antibody. Conjugates made using AuNPs provided the best performance providing similar sensitivity results as CB ($\approx 10^9$ EVs per mL), but providing a better fitting in the linear range. Moreover, AuNPs are easier to get functionalized with Abs. In contrast, MNPs provided low sensitivity and generated a retention-like line at the end of the sample pad during the test. This study also explored a multiple-targeted approach, incorporating the anti-CD81 Ab in an additional capture line. Although single-targeted and multiple-targeted detection provided similar LODs when using a reflectance reader, the multiple-targeted detection had a broader detection range. Since EVs from different origin express diverse proteins on the surface, the incorporation of several test lines may allow the detection of a broader range of EVs, opening the possibility to study a concrete disease marker.

LFIA immunoassays using AuNPs as labels have been successfully employed for the detection of the endogenously expressed tumour-derived antigen MICA (MHC class I chain-related protein A) in exosomes.¹³³ In this case it was very important to consider potential competition events and steric effects in LFIA assays, highlighting the importance of targeting scarce proteins with the detection Ab present on the NPs (Fig. 3b). In fact, targeting abundant proteins on the exosomal surface could lead to steric impediments, impairing the subsequent binding of the EVs with the capture Ab present at the TL.⁷⁷

Furthermore, controlling the density of the detection Ab on the AuNP surface allowed an improvement of the LOD, mainly driven by the decrease of the aggregates because of the cross-linking of Abs and exosomes (Fig. 3c). Taking into account all these considerations, MICA-containing exosomes purified from metastatic melanoma cell lines were detected at a concentration of 5×10^{10} exosomes per mL, using anti-CD9 and anti-MICA Abs as capture and detection Abs respectively. This was the first time that canonical exosome markers as well as an endogenously expressed tumour-derived antigen were detected using a LFIA.

In order to increase the sensitivity of LFIA sensors, an amplification step could be carried out. Wu *et al.* recently reported a LFIA system using two different AuNP bioconjugates.¹³⁵ The first one included a monoclonal anti-CD9 Ab, while the second bioconjugate was labelled with an anti-BSA Ab. The first bioconjugate recognized the exosomes and could be retained at the TL, where a polyclonal anti-CD9 Ab was immobilized. The second bioconjugate was then added, enhancing the staining, as the first bioconjugate was blocked with BSA. This enhancement improved the optical intensity of the red band formed by the AuNPs on the TL. This system was used to detect isolated exosomes from MCF-7 human breast cancer cells, showing a LOD of 1.3×10^6 particles per mL, improving the sensitivity by two orders of magnitude when compared to conventional LFIAs. This LFIA was also successfully used for detecting MCF-7 exosomes diluted in ultracentrifuged foetal bovine serum, proving its potential application in practical diagnostics.

Besides, it is also possible to detect exosomes through the phospholipids present within their lipid bilayer. Dong *et al.* studied this possibility using biotin-tagged 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-poly(ethylene glycol) (DSE-PEG-biotin) to label exosomes through the strong hydrophobic interaction of the fatty acid tails and the phospholipid membrane.¹³⁶ Based on the high affinity between streptavidin and biotin, fluorescent nanospheres conjugated to streptavidin (FNs-SA) were used as the detection system. On the other hand, streptavidin was deposited at the TL in the LFIA test strips. In this complex system, the biotin-EVs formed a complex with the FNs-SA and with the streptavidin present at the TL. With this approach, ultracentrifuged exosomes from human epithelial Cal 27 cells were tested in the test strips and the minimal detectable concentration using a portable UV lamp was 2.0×10^6 particles per mL. To collect the exosomes, however, two rounds of ultracentrifugation were performed, consequently increasing the time: (i) to isolate the exosomes from cell culture media, and (ii) to remove the excess of reagents after labelling with DSPE-PEG-biotin.

As an alternative to standard LFIA performed using Abs, a lateral flow aptamer assay (LFAA) was proposed by Yu *et al.*¹³⁷ This LFAA system was based on a competitive format, where in the presence of exosomes, a CD63 aptamer functionalized on AuNPs could interact with the CD63 exosomal proteins. On the other hand, a CD63 aptamer complementary strand was deposited at the TL. In the presence of exosomes, the aptamers present on the AuNPs will interact with them, avoiding the subsequent binding of the AuNPs to the TL. However, in the



absence of exosomes, the AuNPs@aptamer could interact with the complementary aptamer present at the TL, and give a positive signal. Some parameters such as the concentration of the blocking buffer to pre-treat the strips, the streptavidin ratio to AuNP aptamer and the optimal incubation time were optimized, reaching a LOD of 6.4×10^8 particles per mL for exosomes derived from lung carcinoma A459 cells. Although the idea of using aptamers instead of Abs could be advantageous, further work should be conducted to validate this LFAA: the addition of a CL on the test strips, the control of AuNP aggregation and the possibility to assemble the strips in a more reproducible way could all help to improve the system.

3.2.2. Colorimetric detection. Colorimetric detection of EVs attracts significant interest due to its simplicity, as the colour changes can be distinguished with the naked eye without requiring sophisticated equipment. Thus, colorimetric platforms are ideal candidates as POC biosensors. In some cases, however, a relatively low sensitivity is obtained, and the colorimetric signal has to be analysed using a spectrophotometer. In order to enhance the signal, additional steps such as recombinase polymerase amplification can be included, but this can complicate the whole process. Many of these colorimetric biosensors are based on the colour change associated to AuNP aggregation or on the peroxidase (HRP)-like activity of some NPs and the colour change induced when H_2O_2 and a substrate are present.

For instance, Chen *et al.* used positively charged MNPs to isolate exosomes directly from plasma.¹³⁸ The exosomes were thereafter eluted using a high concentration of sodium chloride. By performing this anion exchange-based isolation, exosomes were recovered with high efficiency and high purity in a fast way. Once isolated, aptamer-coated iron oxide nanoparticles were added for the visual detection of exosomes (Fig. 4). The rationale behind this experiment is that iron oxide nanoparticles have weak intrinsic HRP-like activity, catalyzing a change of color when 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB-substrate of peroxidase) and H_2O_2 are present. Interestingly, the presence of aptamers on the MNP surface increased the HRP-like activity when compared with naked MNPs. In the presence of exosomes, these aptamers could bind to them by molecular recognition, getting desorbed from the MNP surface. Once the aptamers were desorbed, a decrease in the catalytic activity of those NPs was achieved, followed by a decrease in the colour change when TMB and H_2O_2 were present. This color change could be detected by UV-vis spectroscopy, and a linear correlation between the absorbance and the concentration of exosomes was found. The LOD of this aptasensor was 7.0×10^6 particles per mL for exosomes isolated from plasma (healthy donors) and 3.58×10^6 particles per mL for exosomes isolated from simulated prostate cancer (PCa) plasma samples. Similarly, single-walled carbon nanotubes (s-SWCNTs) coated with CD63 aptamers were used to detect exosomes due to their HRP-like intrinsic activity.¹³⁹ The detection limit was 5.2×10^8 particles per mL and the whole detection process took 40 minutes. Interestingly, no complex technologies to enhance the signal were needed. Using graphitic nitride nanosheets and a similar detection approach, a LOD of 13.52×10^8 particles per mL was reported.¹⁴⁰

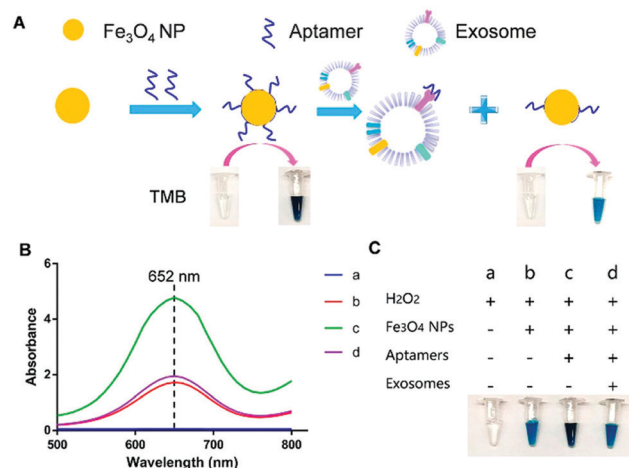


Fig. 4 Visible detection of exosomes. (A) Schematic representation of the detection mechanism for the visible detection of exosomes. (B) UV-vis absorption spectra of TMB- H_2O_2 (curve a); TMB- H_2O_2 and iron oxide NPs (curve b); TMB- H_2O_2 and aptamer-iron oxide NPs (curve c); and TMB- H_2O_2 , aptamer-iron oxide NPs, and exosomes (curve d). (C) Digital images of TMB- H_2O_2 (image a); TMB- H_2O_2 and iron oxide NPs (image b); TMB- H_2O_2 and aptamer-iron oxide NPs (image c); and TMB- H_2O_2 , aptamer-iron oxide NPs, and exosomes (image d). Reprinted with permission from ref. 138. Copyright (2018) American Chemical Society.

AuNPs are commonly used to design colorimetric-based biosensors as their optical properties depend on the NP separation. Aggregation causes a shift in the extinction coefficient that can be appreciated with a colour change. Taking advantage of this phenomenon, Jiang *et al.* described a biosensor composed of aptamers and AuNPs to detect and profile exosomes.¹⁴¹ Complexation of aptamers with AuNPs protected them from aggregation at high ionic strength, as aptamers stabilized the AuNPs by steric repulsion. When exosomes were present, these could bind to the aptamers, resulting in the displacement of these ligands from the AuNP surface, destabilizing the AuNPs under high ionic strength conditions. This led to AuNP aggregation, resulting in a red-to-blue color change that could be measured by UV-vis spectroscopy. This sensor was used to differentiate exosomes derived from different cancer cell lines depending on the CD63 expression level. Furthermore, the authors were able to detect exosomal proteins restricted to a unique cell line by using an aptamer that could bind to protein tyrosine kinase-7, over-expressed in human acute lymphoblastic leukemia cells.

The aggregation of AuNPs in combination with other steps to amplify the signal has also been reported. For instance, Liu *et al.* designed a pair of DNA-labelled Abs that could bind to the same target biomarker present on exosomes.¹⁴² Upon synchronous recognition of the protein on the exosome surface, the DNA strands could hybridize, generating a unique DNA signal. This double-stranded DNA signal was amplified twice by recombinase polymerase amplification combined with transcription-mediated amplification to produce RNA strands. The RNA products were proportional to the initial concentration of the biomarker and could be detected by using oligonucleotide-coated AuNPs, complementary to the RNA. RNA recognition by the AuNPs promoted their aggregation and a red-to-blue



color change that could be measured by absorption spectroscopy. With this technique, the authors demonstrated the possibility to detect EGFR and Epstein–Barr virus latent membrane protein 1 (LMP1)-positive exosomes derived from nasopharyngeal carcinoma cells. Despite being more complex than other colorimetric methods, the developed biosensor was highly sensitive, and was able to detect 100 particles per mL.

DNA hybridization chain reaction (HCR) has also been used to enhance the signal in colorimetric biosensors.^{143,144} Zhang *et al.* used aptamer-conjugated MNPs to isolate exosomes from cell culture media.¹⁴⁴ Thereafter, a bivalent-cholesterol-labelled DNA probe was incorporated into the exosome membrane by hydrophobic interactions. The sticky end of this anchor triggered an enzyme-linked HCR, where alkaline phosphatase (ALP) was introduced. ALP enables the removal of the phosphate group from ascorbic acid 2-phosphate to produce ascorbic acid, which can further reduce Ag^+ . This reaction led to the formation of silver shells on gold nanorods (AuNRs), and gave rise to a change of colour that could be distinguished with the naked eye. Interestingly, the colour changed from pink to brown, green or purple with increasing concentration of exosomes. This allowed an easier detection with the naked eye when compared with the development of a unique colour. The reported LOD was 1.6×10^5 particles per mL by UV-vis spectroscopy. The sensor was tested with plasma from donors, obtaining similar concentration values as standard techniques, that is, ultracentrifugation followed by NTA.

3.2.3. Fluorescence detection. Fluorescence spectroscopy consists in the emission of light by atoms when, after a previous excitation process, they return to the fundamental state. Fluorescent probes are widely used for optical bioassays and for the development of fluorescence-based biosensors.^{145,146} Their transduction method is based on the changes in the fluorescence intensity or wavelength that occurs as a consequence of the interaction of the fluorescent probes with the analyte. After this successful interaction, it is possible to specifically quantify the analyte by correlating the changes in fluorescence to the initial concentration. In this review we will mainly focus on the use of NPs with fluorescence properties as transduction elements.

Traditional assays for the identification of EVs by fluorescence techniques are based on immunoassays, such as ELISA and western blot, where Abs are coupled to organic fluorophores.¹⁴⁷ These methods have excellent analytical performances, but sometimes the stability of the fluorophore is compromised, thus limiting their application. Fluorescent NPs have advantageous optical properties, such as high photostability and quantum yields, low photobleaching, size-tunable emission, extremely broad excitation range and narrow emission which allow large Stokes shift, that can overcome the limitations of current fluorophores.¹⁴⁸ These properties allow improving the LOD and even enabling single molecule detection, making fluorescence-based nanobiosensor devices more sensitive and reliable when compared to the classic fluorescence detection methodologies. Fluorescent NPs include NPs made with silica and organically modified silica,¹⁴⁹ metals,¹⁵⁰ metal oxides,¹⁵¹ metal nanoclusters,^{152,153} upconversion NPs (UCNPs),^{154,155}

organic polymers,¹⁵⁶ quantum dots (QDs),^{157,158} silicon quantum dots¹⁵⁹ and different carbonaceous nanomaterials such as carbon dots, carbon nanotubes, carbon nanoclusters and nanodiamonds.^{160,161}

Lanthanide-doped UCNPs undergo a non-linear photophysical process whereby low-energy radiation, usually in the near infrared (NIR) range, is converted to higher-energy radiation, for example, visible light (anti-Stokes shift). Thus, the fluorescence emission of UCNPs takes place at shorter wavelengths than the absorbed light. This feature makes them especially attractive for biological applications and nanobiosensor development, since it avoids the use of ultraviolet (UV) light, therefore minimizing the autofluorescence of biological samples.^{162,163} UCNPs coupled to aptamers have been used as energy donors in the development of aptasensors based on Luminescence Resonance Energy Transfer (LRET) in combination with other fluorophores or NPs that act as acceptors. LRET and Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) are mechanisms that occur due to the very short distance interaction between the energy levels of two luminescent/fluorescent molecules in which the emission wavelength of the donor molecule coincides with the excitation wavelength of the acceptor molecule. In this way, the excited donor transfers its energy to the acceptor, which emits a photon. Wang *et al.* used tetramethyl rhodamine (TAMRA) and UCNPs functionalized with two DNA aptamers to target the epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) present on the exosome membrane of some cell lines.¹⁶⁴ After the aptamer–exosome binding, both DNA strands got closer and the distance between the energy donor (UCNPs) and the acceptor (TAMRA) was reduced, promoting the LRET process (Fig. 5). Due to the coincidence between the emission wavelength of the donor and the excitation spectrum of the acceptor, the excitation of UCNPs by IR light produces a UV emission that excites the TAMRA molecule, leading to a yellow emission (585 nm) that is linearly correlated with the exosome concentration. This LRET sensor reached a LOD of 8×10^4 particles per mL.

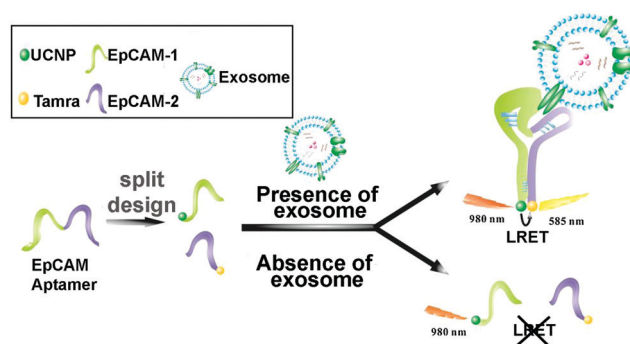


Fig. 5 Aptasensor based on LRET between UCNP donor and TAMRA acceptor for highly sensitive detection of exosomes. The two DNA strands from the EpCAM aptamer are labeled with UCNPs and TAMRA, which get closer to each other when recognition of EpCAM exosomes occurs. The LRET fluorescence response enables the quantitative detection of exosomes. Reprinted with permission from ref. 164. Copyright (2019) American Chemical Society.



The possibility of immobilizing this type of sensors in a user-friendly POC format makes them even more interesting. This is the case of an exosomal aptasensor based on a LRET system that used AuNRs as the acceptor and UCNP immobilized on a paper support as the donor.¹⁶⁵ As before, the sequence of the CD63 aptamer was split into two different fragments, and AuNRs and UCNP were decorated with only one of the fragments. In the presence of exosomes, the CD63 protein present on their surface was combined with both strands of the aptamer bound to AuNR and UCNP-paper respectively; this reduced the distance between acceptor and donor, allowing the LRET to take place. The analytical signal was the quenching effect produced by AuNRs over the green luminescence of UCNP under IR excitation, reporting a LOD of 1.1×10^6 particles per mL.

QDs are also widely used in fluorescence-based biosensing, due to their high emission quantum yield, size tunable emission profiles with a narrow spectral band and unique photophysical properties.¹⁶⁶ Bai *et al.* used QDs to build a bead-based exosome microfluidic chip for exosome isolation and multiplexed detection.¹⁶⁷ Anti-CD9-labeled magnetic beads were used to isolate exosomes, while three QD probes labelled with Abs to detect tumoral markers were used for multiplexed detection of exosome surface markers (carcinoma embryonic antigen, CEA; Cytokeratin 19; Progastrin-releasing peptide, proGRP). With this novel microfluidic immunoassay system and using an inverted fluorescence microscope, it was possible to discriminate between plasma-derived exosomes from lung cancer patients and healthy controls. Further, minimal differences were found between these experimental results and clinical data obtained using traditional methods for the detection of CEA in real samples. Although CdSe-based QDs are the most used QDs, works that use other kind of QDs as fluorescent labels for EV detection combined with fluorescence microscopy have been reported: InP/ZnS QDs,¹⁶⁸ silicon QDs¹⁶⁹ and gold-carbon dots¹⁷⁰ among others.

Although metallic NPs can be used as fluorescent labels because of their intrinsic fluorescence, not many works have employed them to detect EVs. He *et al.* used CuO NPs modified with CD63 aptamers to form sandwich complexes with exosomes previously isolated with magnetic beads.¹⁷¹ These complexes were subsequently dissolved in acidic medium to obtain copper(II) ions which were thereafter reduced to fluorescent CuNPs (copper nanoparticles) in the presence of sodium ascorbate and poly(thymine) (Fig. 6a). CuNPs' concentration and fluorescence were proportional to the exosome content, obtaining a LOD of 4.8×10^7 particles per mL. Many times the fluorescence of these metallic NPs is not intrinsic, but comes from ligands placed on their surface during their synthesis. For instance, Gao *et al.* designed a complex exosome detection method using a rolling circle amplification (RCA) reaction.¹⁷² A series of long DNA hairpin structures with components such as CD63 aptamer, linker and spacer sequences were obtained using the RCA reaction. In the presence of exosomes, the RCA product could attach to the exosomal membrane, opening its hairpin structure and exposing a linker sequence. A fluorescent AuNP-linker/complementor bioconjugate (AuNP-L/cL) could

then pair with this linker sequence by toehold-mediated strand displacement, releasing the fluorescent cL probe. The fluorescence signal was proportional to exosome concentration, reaching detection limits in the order of 1×10^8 particles per mL.

Other metallic materials reported in the literature are MXenes, new nanosheet structures that combine transition metal carbides and thus metallic conductivity with hydrophilic nature due to their oxygen or hydroxyl terminated surfaces. This property facilitates their interaction with biomolecules, positioning them as highly interesting nanobiointerfaces for the development of biosensors, where they are used as nano-quenchers.¹⁷⁴ The detection mechanism is based on a FRET phenomenon in which a fluorophore (donor) transfers energy to the nano-quencher (acceptor) by distance-dependent fluorescence quenching coupling. When this distance increases, the fluorescence of the donor is recovered, as the nano-quencher does not act anymore. This phenomenon has been exploited to detect EVs using a fluorescent-labelled Cyanine (Cy3)-CD63 aptamer and Ti_3C_2 MXenes as the 2D nano-quencher interface.¹⁷⁵ MXenes could absorb the aptamer by chelation interaction of the hydrogen-metal bond, turning off the Cy3 fluorescence. When exosomes were added, the Cy3 fluorescence was recovered because of the release of the aptamer from the nanosheet, as a consequence of its higher affinity with the surface of the exosome. A LOD of 1.4×10^3 particles per mL was obtained. This FRET mechanism has been also exploited to detect EVs using s-SWCNTs, MoS_2 -multiwall carbon nanotubes (MWCNT), graphene oxide (GO) or MoS_2 nanosheets (Fig. 6b).^{139,173,176-178}

Finally, polymeric NPs such as lanthanide chelate-doped polystyrene beads are also being used as sensing platforms. Islam *et al.* used these NPs with long-lifetime fluorescence when compared with the fluorescence of highly effective markers, such as europium, to develop a NP-based time resolved fluorescence immunoassay (NP-TRFIA).¹⁷⁹ The polystyrene beads were conjugated with Abs or lectins against tetraspanins present on the exosome surface. Anti-CD9 Abs were immobilized on the surface of a microwell plate so that they could capture the exosomes. Thereafter, polystyrene beads were added and TRF detection was performed. It was demonstrated that beads coated with lectins showed a 2–10 fold higher signal when compared to Eu-chelates. EVs from minimally processed urine samples were detected with a LOD of 0.03 ng mL^{-1} . Another example for the development of a fluorescence-based immunosensor was the use of polydiacetylene liposomes conjugated to anti-CD63 Abs.¹⁸⁰ Based on the optical properties of polydiacetylene, the interaction with exosomes isolated from human plasma led to changes in the fluorescence signal, achieving a detection limit of 3×10^8 particles per mL.

3.2.4. Electrochemical detection. In electrochemical biosensors the signal is generated as a consequence of an electrochemical interaction (redox reaction) between the analyte and the electrode surface. This influences the electric or potential current, and ultimately generates an electronic signal with the help of a transducer. Electrochemical biosensors such as potentiometric, amperometric, and voltammetric ones have notable advantages such as low detection limits, high stability,



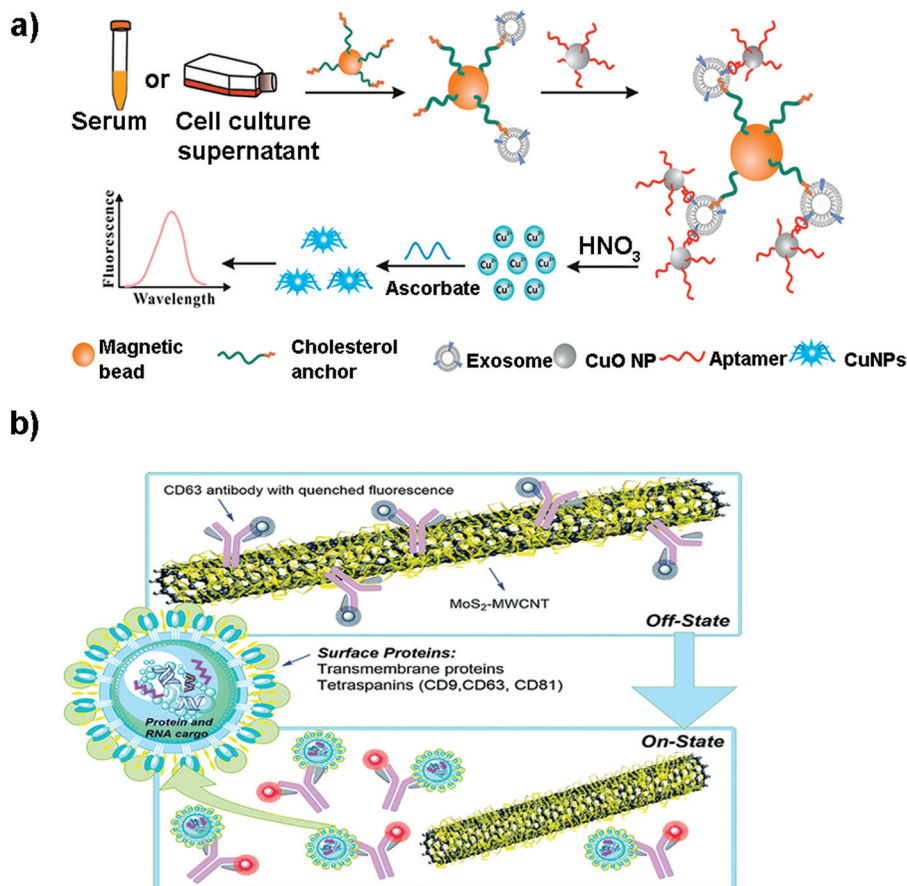


Fig. 6 (a) Direct capture and rapid detection of exosomes using a copper-mediated signal amplification strategy. After the formation of sandwich complexes (Magnetic Bead–exosome–CuO NP), the unbound CuO NP probes are separated by a magnet and dissolved by acidolysis to convert CuO NPs into copper(II) ions (Cu^{2+}) and reduced to fluorescent copper nanoparticles (CuNPs) by sodium ascorbate in the presence of poly(thymine). The fluorescence intensity of CuNPs increases with the increase of Cu^{2+} concentration, which is directly proportional to the concentration of exosomes. Reprinted with permission from ref. 173. Copyright (2018) American Chemical Society. (b) A MoS_2 -MWCNT fluorescence nanosensor based on FRET in which the fluorophore-CD63 (donor) transfers energy to the nano-quencher MoS_2 -MWCNT (acceptor) and provides an “on-off” sensor to detect the exosome–antibody recognition. Reprinted with permission from ref. 173. Published by the Royal Society of Chemistry.

real-time response and reproducibility, together with a high surface to volume ratio, which facilitates electronic transference and direct attachment of biomolecules.¹⁸¹ Nanomaterials based on noble metals, metallic oxides,¹⁸² QDs, carbon-based materials such as CNTs¹⁸³ and some polymeric biomaterials¹⁸⁴ have interesting properties that make them attractive to be exploited in this type of biosensors. They can be used directly because of their own redox properties, or indirectly if they have electrocatalytic properties toward other species.¹⁸⁵

For instance, Boriachek *et al.* used QDs and a voltammetric immunoassay for the electrochemical detection of exosomes.¹⁸⁶ To this end, biotinylated CdSe QDs were functionalized with Abs against HER-2 and FAM134B, as potential markers of breast and colon cancer respectively. After acid dissolution of the CdSe QDs and anodic stripping voltammetric quantification of Cd^{2+} , a sensitive detection of 10^5 exosomes per mL was achieved in exosomes derived from serum samples of patients with colorectal adenocarcinoma. The same authors developed a more sophisticated dual isolation and electrochemical detection using gold-loaded ferric oxide nanocubes ($\text{Au-NPFe}_2\text{O}_3\text{NCs}$)

functionalized with CD63 Abs. Exosomes derived from BeWo placental choriocarcinoma cells were first isolated using these magnetic nanocubes (Fig. 7a and b).¹⁸⁷ The exosomes were subsequently transferred to screen-printed electrodes previously functionalized with an anti-placental exosome Ab. The oxidation of TMB in the presence of H_2O_2 was accomplished because of the HRP-like activity of the $\text{Au-NPFe}_2\text{O}_3\text{NCs}$. Subsequent addition of stop solution produced diimine, a product that is electroactive and stable. Naked eye detection along with electrochemical quantification reported a LOD of 10^3 exosomes per mL. In addition, electrochemical biosensors based on metallic NPs have been successfully applied for multiplexing. For instance, Zhou *et al.* designed an electrochemical sensor for exosome and microsome detection by direct electro-oxidation of AgNPs and CuNPs labelled with anti-EpCAM and anti-PSMA respectively. The platform required only 25 μL of sample and exhibited a LOD of 50 exosomes per sensor.¹⁸⁸

Electrochemiluminescent (ECL) biosensors are based on the emission of light (chemiluminescence) when an electrochemical reaction takes place, commonly on an electrode.



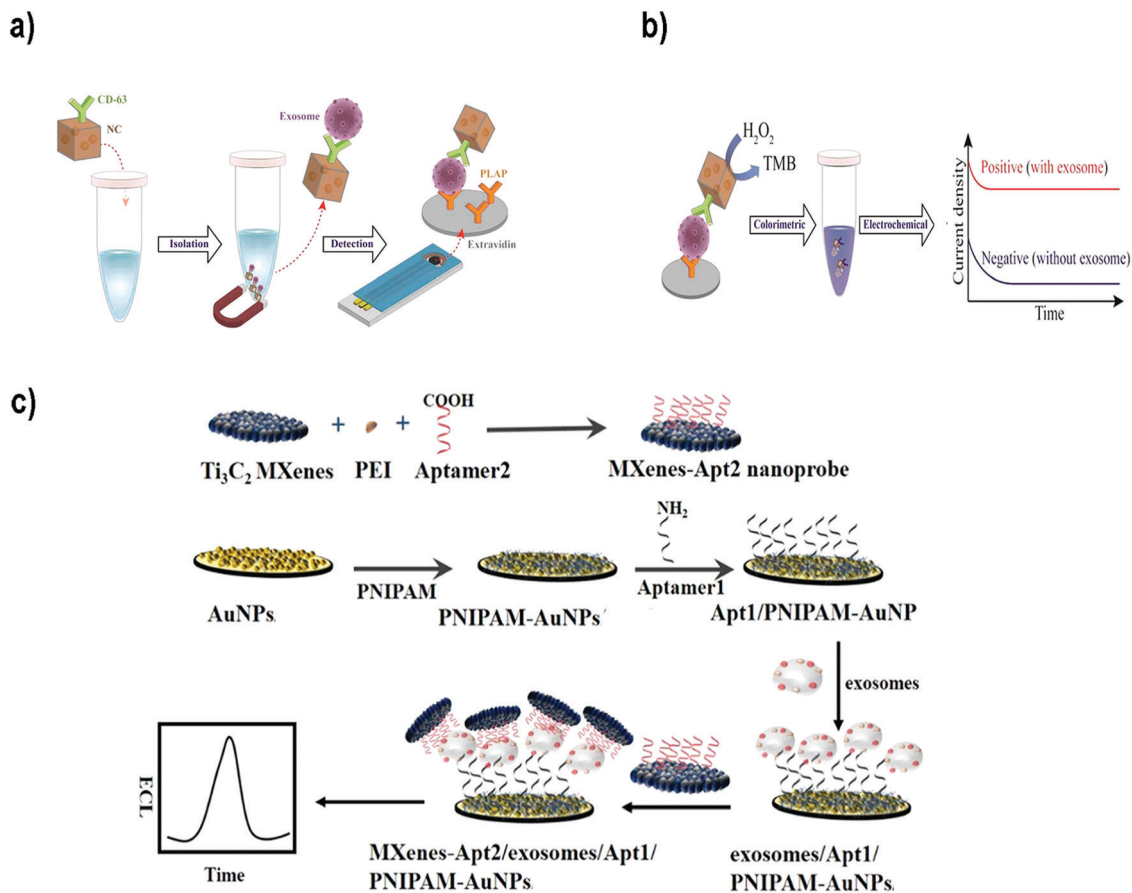


Fig. 7 (a and b) Electrochemical biosensor based on dual isolation and electrochemical detection using Au-NPFe₂O₃NCs. (a) Schematic representation of the assay for direct exosome isolation and detection from cell culture media. In this method, the Au-NPFe₂O₃NCs were initially functionalized with a generic antibody (CD63) and dispersed in cell culture media to capture bulk exosomes. After magnetic capture and purification, exosome-bound Au-NPFe₂O₃NCs were transferred to specific Ab-modified, screen-printed electrodes. (b) The HRP-like activity of Au-NPFe₂O₃NCs was then used to achieve naked-eye detection along with electrochemical quantification of specific exosomes present in cell culture media. Reproduced from ref. 187 with permission from The Royal Society of Chemistry. (c) The principle of an ECL biosensor for exosome detection using Ti₃C₂ MXene nanosheets to enhance the signal. Reprinted from ref. 189. Copyright (2018), with permission from Elsevier.

Therefore, this methodology combines electrochemical and luminescence techniques, and merges the advantages of both methods.¹⁹⁰ The use of NPs to build this type of sensors offers advantages such as amplification of the ECL signal, or the possibility to use NPs as the sensor nucleus (ECL comes directly from the NP) or as resonance energy transfer acceptors (NPs and fluorophores-combined ECL). Zhanga *et al.*¹⁸⁹ developed a sensor using Ti₃C₂ MXene nanosheets to enhance the ECL signals of luminol. Exosomes were first captured onto an electrode surface functionalized with an aptamer to recognize the exosomal EpCAM protein. On the other side, Ti₃C₂ MXene nanosheets were modified with CD63 aptamers to recognize the exosomes that were already captured (Fig. 7c). The catalytic and conductivity characteristics of the nanosheets together with the possibility of improving the electron transfer on the electrode interface led to a luminol amplification signal. A LOD of 1.25×10^5 particles per mL for EVs derived from MCF-7 cells was reported. Similarly, black phosphorus quantum dots (BPQDs) functionalized with MXenes have also been used to develop a ECL biosensor to detect EVs with a LOD of

3.7×10^4 exosomes per mL.¹⁹¹ Other examples could be found in the literature reporting ECL aptasensors for exosome detection using mercaptopropionic acid (MPA)-modified Eu³⁺-doped CdS nanocrystals (MPA-CdS:Eu NCs) functionalized with CD63 aptamers.¹⁹² MPA-CdS:Eu NCs were immobilized on glassy carbon electrodes and they behaved as ECL emitters in the presence of H₂O₂. Exosomes were added and the ECL intensity recorded. Subsequently, a DNA sequence that could fold into a G-quadruplex/hemin DNAzyme was introduced. This structure had HRP-like activity, and could catalyze the reduction of H₂O₂. This decomposition of H₂O₂ resulted in a decrease of the ECL signal of the MPA-CdS:Eu NCs. A LOD of 7.41×10^4 exosomes per mL for MCF-7 breast tumor cells was achieved. The platform was applied to detect exosomes in serum, showing potential application in real sample diagnosis.

3.2.5. Surface enhanced Raman spectroscopy. Raman spectroscopy based biosensors can be used to detect and analyse the composition of EVs. This spectroscopy technique is based on the light that is inelastically scattered from a sample when a source of light (laser) interacts with it.¹⁹³ The scattered photons have a



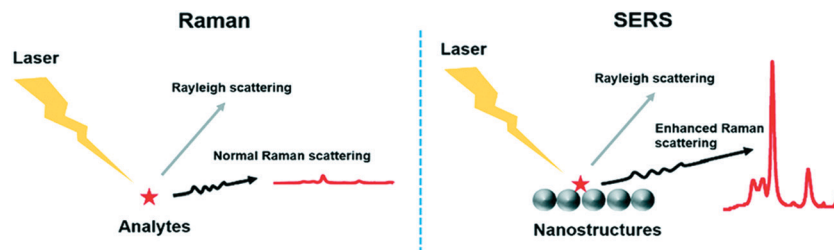


Fig. 8 Comparison between the Raman technique and the SERS technique. The main difference lies in the enhanced Raman scattering from the nanostructures used as substrates in SERS. Reproduced from ref. 197 with permission from The Royal Society of Chemistry.

different wavelength than the incident photons, and this difference in energy depends on the chemical bonds present in the sample. By measuring the wavelength of these scattered photons, it is possible to obtain a detailed molecular fingerprint.¹⁹⁴ The main advantages of this technique are the high spatial resolution, combined with a non-invasive label free methodology. By contrast, the Raman scattering effect is generally very weak.

The presence of metals can solve this weakness, as they can enhance the signal up to 10^{15} times, depending of the geometry (thickness, size and shape) and the composition of the metal nanostructures.^{195,196} This technique is referred to as SERS (Fig. 8).¹⁹⁷ SERS is a plasmonic-based spectroscopic technique that combines a laser with the optical properties of metallic nanostructures to obtain detailed chemical information of molecules adsorbed or attached to them.¹⁹⁸ The technique is supported by the formation of regions of intense field enhancement, caused by local surface plasmon resonances (LSPR) at the metal–dielectric interface.¹⁹⁹ LSPR excitation will induce an enhanced electromagnetic field, increasing the number of scattered photons in the presence of a Raman-active molecule. Therefore, SERS is a powerful technique that can provide particular signals in complex environments, offering at the same time high sensitivity and multiplexing ability. Furthermore, it allows the analysis of small sample concentrations with short acquisition times, which is ideal for the measurement of biological samples in the clinic and medical research. Because of these advantages, SERS biosensors comprising NPs are currently being used to detect and identify the molecular differences between different groups of EVs.

SERS biosensors can be divided into two types:⁸ (i) solution-based, where an EV is generally captured between 2 NPs and afterwards deposited on a substrate to perform the measurement (Fig. 9a and b); (ii) solid-based, where an EV is directly captured on a substrate where the measurement will be done. Glass slides non-coated or coated with a metal layer or NPs (to increase the sensitivity) can be used as the substrate (Fig. 9c and d).

Zong *et al.*²⁰³ were the first to report a SERS-based strategy to detect exosomes from tumor cell lines. The methodology used magnetic beads and SERS nanoprobe (Au@Ag NRs@SERS reporter) functionalized with specific Abs able to recognize CD63 and the tumoral marker HER2 (epidermal growth factor receptor-2). When exosomes were present, both the magnetic beads and SERS nanoprobe attached to the exosome, forming

a sandwich type immunocomplex. Magnetic beads were then used to separate the exosomes from the cell media and SERS signals were detected in the isolated vesicles. Exosomes derived from a breast cancer cell line were specifically detected, reaching a LOD of 6×10^4 exosomes per mL. Going a step forward, Wang *et al.* used aptamers and the multiplexing ability of SERS to simultaneously detect multiple exosomes.²⁰⁴ Magnetic beads coated with a layer of silica and a layer of Au (MB@SiO₂@Au) were functionalized with CD63 aptamers to capture extracellular vesicles. On the other hand, AuNPs decorated with a SERS reporter and with a specific aptamer were fabricated (AuNP@aptamer) as SERS probes. To allow multiplexing, three kinds of SERS probes were synthesized using different SERS reporters. Breast cancer (SKBR3), prostate cancer (LNCaP) and colorectal cancer (T84) cells were selected as model cells, and the aptamers designed accordingly to target proteins overexpressed in exosomes derived from these cancer cell lines. If only one type of exosomes is present, its specific probe will recognize it, forming a sandwich-type apta-immunocomplex containing MB@SiO₂@Au, the target exosomes and the SERS probes. After magnetic separation, SERS signals of the supernatant are measured, finding a decreased signal of this probe when compared with the other SERS probes. If three populations of exosomes are present, the signal of the three types of probes will decrease. The possibility to detect and distinguish different types of exosomes at the same time was demonstrated experimentally. The methodology was tested using exosomes already purified from the aforementioned cell lines, obtaining LODs of 32, 73 and 203×10^3 exosomes per mL for SKBR3, T84 and LNCaP, respectively. The biosensor was also used to detect exosomes from patients suffering from breast, colorectal and prostate cancer, matching in all cases their corresponding type of exosomes.

Other groups have reported the possibility to detect EVs in a non-specific way, that is, without adding Abs or aptamers to recognize the EVs. For instance, Tian *et al.* reported the use of SERS probes composed of gold nanostars and reporter molecules, further modified with a bivalent cholesterol-labelled DNA anchor (Fig. 9a and b).²⁰⁰ Target exosomes were captured using magnetic beads functionalized with anti CD9 Abs. The captured exosomes were then labelled with the SERS nanoprobe *via* hydrophobic interactions between the cholesterol moieties and the exosomal lipid membranes, resulting in a sandwich complex. This complex could be magnetically captured and



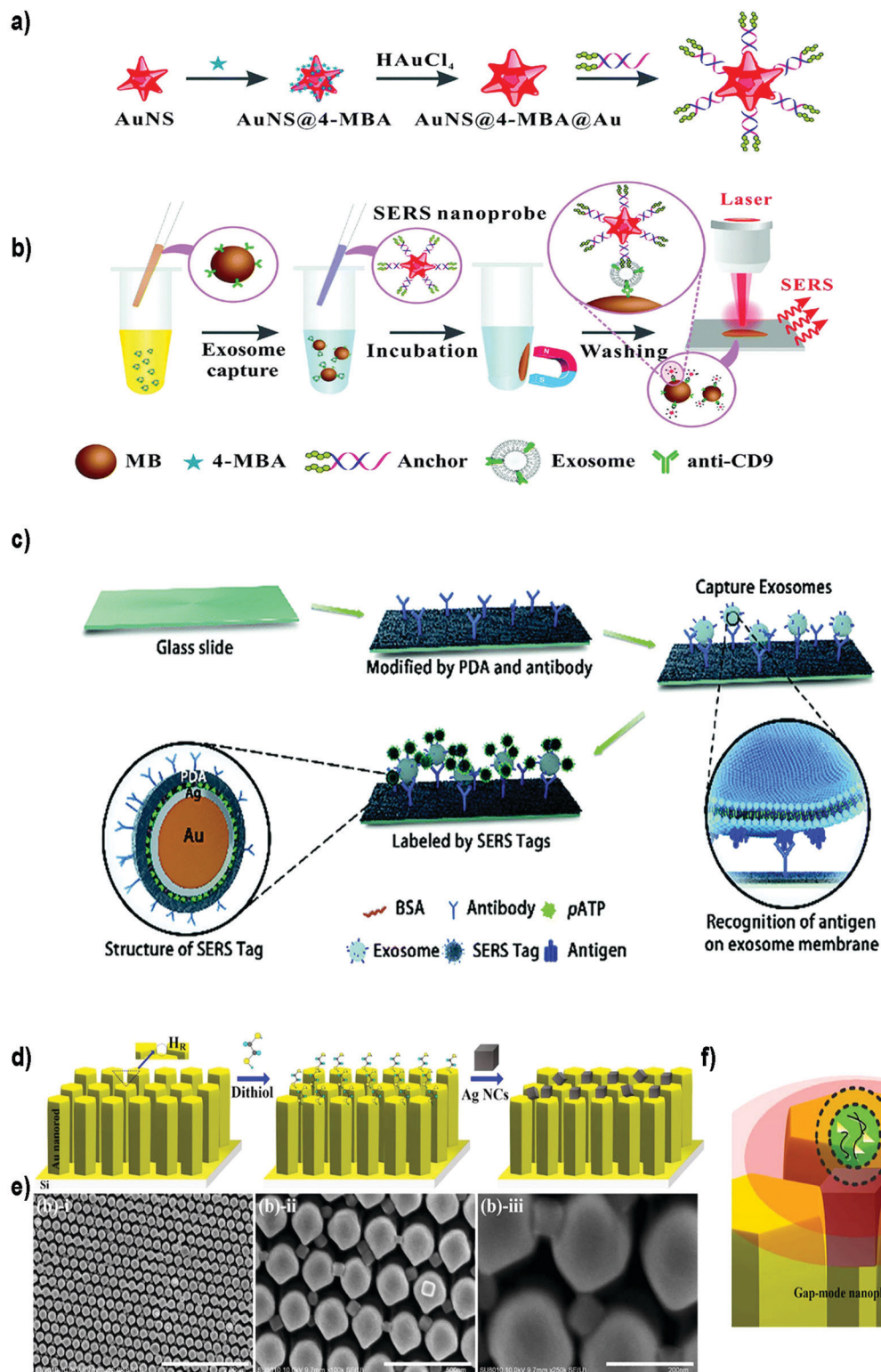


Fig. 9 Different SERS-based biosensors for the detection of exosomes. (a) Fabrication of SERS probes: Au nanostars containing reporter molecules (4-MBA) and modified with a bivalent cholesterol-labelled DNA anchor. (b) SERS sensing strategy for exosome detection. Reproduced from ref. 200 with permission from The Royal Society of Chemistry. (c) A schematic view of a PDA chip and Au@Ag@PDA SERS tag-based exosome sensors. Reproduced from ref. 201 with permission from The Royal Society of Chemistry. (d) Schematic illustration of the experimental process of AgNCs on a specified high-density hot-ring diameter area Au NR array substrate. (e) Field-emission scanning electron microscopy images of as-fabricated samples and (f) schematic illustration of electromagnetic enhancement. Adapted from ref. 202 with permission from Elsevier.



deposited on a silica slide for detection using a Raman spectrometer. Exosomes derived from HepG2 hepatocellular carcinoma cells were used as a model for liver cancer diagnosis. A LOD of 27×10^3 exosomes per mL was reported, with a linear relation between exosome concentration and corresponding SERS signal ranging from 40 to 4×10^7 exosomes per μL . As a proof of concept, serum samples from healthy and liver cancer patients were tested. As already reported, the number of exosomes was elevated in cancer patients, and the results were comparable with those obtained using state-of-the-art technologies (purification using the ExoEasy kit and quantification with qNano). Meanwhile, Stremersch *et al.* used cationic AuNPs to ionically adsorb exosome-like vesicles (ELVs), demonstrating the possibility to discriminate ELVs isolated from B16F10 melanoma cell cultures and red blood cells (RBCs) with SERS.²⁰⁵ The same group subsequently improved the system by applying an extra silver layer *in situ* to remove interfering signals generated by the AuNP coating.²⁰⁶ The Au@AgNPs core-shell system resulted in SERS signals with improved signal-to-noise ratio, and consequently, more vibrational modes could be identified. Furthermore, the improved system decreased the acquisition time by a factor of 20. Lee *et al.* took advantage of $\alpha 3\beta 1$ integrin overexpression in exosomes derived from some cancerous cell lines to detect exosomes isolated and purified from human ovarian carcinoma cell lines (SKOV-3).²⁰⁷ In this case, SERS probes were prepared using AgNPs functionalized with the LXY30 peptide, able to selectively label the aforementioned integrin, and allowed a specific detection of exosomes derived from SKOV-3 cells.

Recently, Pang *et al.* developed a smart system to test the expression of programmed death-ligand 1 (PD-L1) on the exosome membrane using magnetite@TiO₂ particles to capture the exosomes.²⁰⁸ In recent years, several reports have revealed the correlation of exosomal PD-L1 expression and anti-PD-L1/PD-1 therapy in order to treat tumours.^{209,210} The possibility to predict if a patient will respond to anti-PD-L1/PD-1 therapy is of utmost importance, considering the high price and side effects of immune drugs. To study PD-L1 expression, exosomes purified from A549 non-small cell lung cancer (NSCLC) cells and BEAS-2B normal human bronchial epithelial cells were incubated with magnetite@TiO₂ particles to enrich and separate exosomes from cell culture media or serum samples. No aptamers or Abs were needed, as TiO₂ can specifically interact with the phosphate groups present on the lipid bilayer of exosomes.²¹¹ Once separated, exosomes were labelled with the SERS tags, consisting of Ag@Au@SERS reporter nanoprobe functionalized with anti-PD-L1 Abs. With this methodology exosomes containing PD-L1 were detected with a LOD of 1000 exosomes per mL. Interestingly, the authors tested the possibility to detect the individual level of exosomal PD-L1 in NSCLC patients at different stages, using undiluted serum. Differences in exosomal PD-L1 expression could be found among healthy patients and both early and late NSCLC groups. Moreover, only 4 μL of serum sample and 40 minutes were needed to complete the assay.

SERS biosensors can also be built by directly immobilizing the EVs on a substrate before adding the SERS tag. For instance, Li *et al.* created a SERS immunosensor for clinical pancreatic

cancer diagnosis using a polydopamine (PDA) polymerized substrate to encapsulate Abs in order to capture exosomes isolated from real samples or from culture media (Fig. 9c).²⁰¹ Au@Ag@Raman reporter@PDA NPs modified with an Ab were subsequently used as SERS tags. PDA substrates were used to capture exosomes and Au@Ag@PDA SERS tags. Both the substrate and the NPs were functionalized with diverse Abs to detect common exosomal proteins (CD63 and CD9) or specific pancreatic cancer-derived exosomal proteins (GPC1, EGFR, EpCAM and Macrophage migration inhibitory factor). Importantly, this immunosensor was able to distinguish healthy from pancreatic cancer patients, as well as metastatic from non-metastatic tumors.

On the other side, efforts have been also devoted to enhance the SERS signal by improving the SERS substrate. Kwizera *et al.* combined SERS technology with a 3D printing methodology to develop a chip platform functionalized with Abs to detect exosomes.²¹² In this case, 35 nm AuNRs functionalized with a Raman reporter were used as SERS tags. This platform had microliter sample requirement and allowed the detection of 2×10^6 exosomes per mL from breast cancer cell lines in 2 hours. Further, they showed that exosomes derived from different cancer cells gave different protein profiles when compared to exosomes derived from healthy cells. Other authors have developed a strong plasmonic gap-mode SERS substrate by assembling silver nanocubes (AgNCs) on an AuNR pillar array surface, in order to enhance the SERS signal (Fig. 9d-f).²⁰² The Raman reporter molecule was directly deposited on this substrate. Using this approach, the possibility to distinguish exosomes derived from lung normal and cancer cell lines was demonstrated. Exosomes could be detected at concentrations 10^4 – 10^5 times lower than that found in general blood samples (10^{11} exosomes per mL) in a short time.

Remarkably, SERS can also serve as a valuable tool to characterize subpopulations of exosomes from different origin if combined with a multivariate method able to condense the SERS data. For instance, Carmichael *et al.* used principal component and differential function analyses (PC-DFA) in conjunction with SERS data in order to classify exosomes from various cellular origins.²¹³ Using this method, the authors were able to differentiate serum-derived exosomes isolated from healthy and pancreatic cancer patients with high sensitivity and specificity. Meanwhile, Choi *et al.* used PCA to classify SERS spectra (Fig. 10).^{214,215} By using this approach, NSCLC derived exosomes were distinguished from normal alveolar cell-derived exosomes with 95.3% sensitivity and 97.3% specificity. Thereafter, the same group identified the unique SERS profiles of NSCLC derived exosomes and correlated the unique peaks with the Raman profiles of different exosomal protein markers that could contribute to them (Fig. 10).²¹⁵ In these approaches exosomes were deposited onto a slide containing AuNPs.

Lastly, SERS-based biosensors have been also used for the detection of microRNAs in EVs. In this context, exosomal microRNAs have attracted attention in recent years due to their significant role in regulating cancer progression.²¹⁶ Pang *et al.* proposed a one-step and one-pot assay for exosomal microRNA



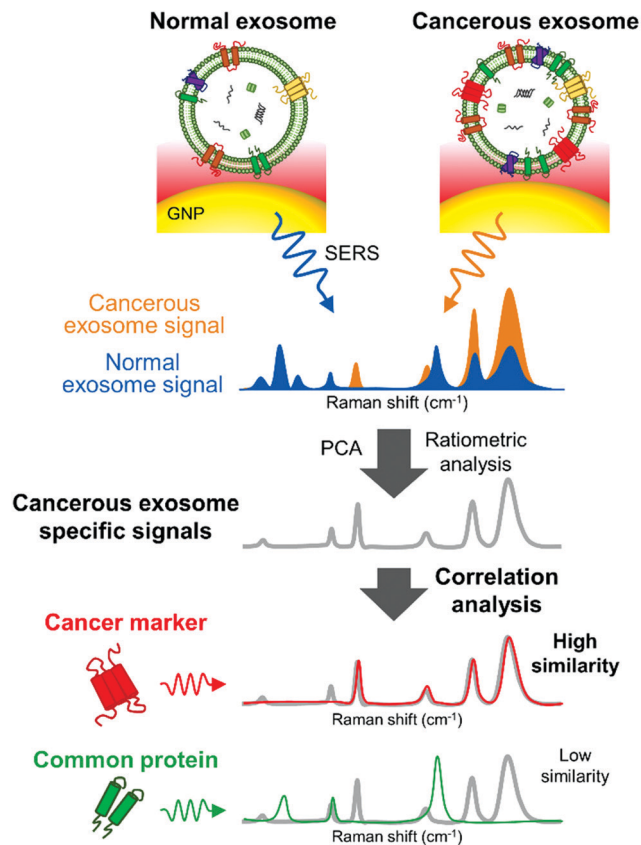


Fig. 10 Detection of unique Raman scattering profiles of lung cancer cell-derived exosomes and comparison to their potential surface protein markers. Cancerous exosome-specific protein markers are associated in terms of signal similarity. Reprinted with permission from ref. 215. Copyright (2018) American Chemical Society.

detection, based on a duplex-specific nuclease (DSN) assisted SERS biosensor.²¹⁷ To this end, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag-DNA}$ NPs were used to capture the exosomes and as SERS substrate, while $\text{Au}@Ag@SERS$ reporter structures were used as SERS tags. The $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag-Au}@Ag$ SERS tag conjugates were formed through the DNA linking between both types of structures. DNA probes were specifically designed to recognize miRNA from plasma-derived exosomes from pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) and chronic pancreatitis (CP) patients. The Raman signal was induced by the “hot spots” between the $\text{Au}@Ag$ of SERS tag and the Ag shell of the $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}$ substrate, especially after magnetic isolation. When exosomal microRNA was present, DNA could hybridize with it. DSN nuclease was added to selectively cleave the DNA of the DNA/microRNA duplex, so that the SERS tags could be separated from the $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}$ substrate. This induced SERS signal quenching which could be correlated with the original concentration of microRNA. Using this technology, a detection limit of 1 aM (microRNA 10b) was achieved. It was also reported that microRNA 10b levels were higher in exosomes derived from PDAC patients when compared to those derived from CP or normal patients. Similarly, Ma *et al.* proposed the use of MNPs linked *via* DNA to $\text{Au}@SERS$ reporter@AgAu nanoparticles (SERS tags).²¹⁸ DNA could specifically bind with

the complementary exosomal miRNA, while MNPs were used to separate exosomes from serum and plasma media. Once again miRNA/DNA duplexes could be specifically cleaved by DSN, releasing SERS tags while miRNA was involved in other rounds of signal amplification. This technique could detect a concentration of 5 fM of miRNA21.

3.2.6. Surface plasmon resonance. SPR is a label-free technology that has been used to detect in real time the binding of biomolecules onto a metal surface.²¹⁹ Planar metal surfaces composed of for instance gold or silver or nanostructured surfaces can be used to fabricate these biosensors. The receptor molecules such as Abs or aptamers are generally immobilized on these surfaces; the subsequent binding of an EV will cause changes in the local refractive index that will affect the optical properties of the SP modes, and can be detected. Therefore, SPR platforms are a label-free and powerful tool to detect and quantify EVs. The presence of AuNPs can enhance the sensitivity by electronic coupling interaction of their LSPR and the SP wave associated with the metal surface.¹⁸⁵ Currently, however, the great majority of examples to detect EVs do not include NPs, but only surfaces.^{8,9}

A remarkable example of a SPR-based platform was reported by Im *et al.*⁷⁹ The nano-plasmonic exosome (nPLEX) sensor comprised arrays of periodic nanoholes patterned in a gold film. Nanoholes were designed for matching their dimensions (<200 nm) to exosome size, enhancing the detection sensitivity. Three-dimensional simulation studies were performed to optimize the geometry of the nanoholes, finding enhanced electromagnetic fields tightly confined within the exosome size range. A multi-channel multifluidics system was integrated to perform high-throughput analyses. The surface was passivated using PEG, and anti CD63 Abs were functionalized onto PEG chains. As a proof of concept, exosomes isolated from a human ovarian cancer cell line (CaOV3) were tested. Upon binding of exosomes, a change in the local refractive index took place, shifting the spectral peaks. The magnitude of spectral shift correlated with the molecular mass density covering the sensor surface and thus enabled quantitative analysis of EV proteins. The LOD was ~ 3000 exosomes, 10^2 -fold higher than that of an ELISA performed using the same exosomes. Importantly, the signal could be significantly increased by using AuNPs as secondary labels. 10 nm spherical AuNPs showed a 20% increase, while the signal could be enhanced by 300% when using 50 nm Au nanostars. Subsequently, the platform was functionalized with Abs against various exosomal targets and tested using samples from ovarian cancer patients and healthy patients as controls. It was found that the levels of EpCAM and CD24 were elevated in the ovarian cancer patient samples. An intrinsic diagnosis accuracy of 97% was reported, although a larger cohort of patients should be used to validate the platform. Importantly, the whole analysis could be accomplished in less than 30 min, and ascites samples from patients were used with minimal processing, as they were only membrane filtered to remove cells and debris.

3.2.7. Micronuclear magnetic resonance. Using MNPs and magnetic resonance, Shao *et al.* developed a miniaturized micronuclear magnetic resonance (μNMR) biosensor enabling



detection and protein profiling of exosomes.⁸⁰ Importantly, this sensing technique employs NMR magnetic fields, which can penetrate even turbid samples. Thus, assays can be done in complex samples such as blood with minimal interference.²²⁰ Click chemistry was used to label the exosomes with the MNPs.⁸⁰ The microfluidic platform also included a membrane where these targeted exosomes were concentrated, and a micro-coil for NMR detection. Placed in the NMR system, the presence of MNPs caused a change in the transverse relaxation time of the surrounding water molecules. As the signal change is proportional to the concentration of MNPs, CD63-targeted exosomes could be detected with a LOD of 10^4 exosomes. Interestingly, it was possible to profile and differentiate exosomes in blood samples of patients with glioblastoma multiforme from healthy controls. Although the results were really promising, adapting NMR to exosome detection presented many engineering challenges.⁷ The same authors have also reported different integrated platforms using MNPs to capture the exosomes. Subsequently, quantitative polymerase chain reaction or an electrochemical assay was used to detect mRNA or to profile exosomes, respectively.^{221,222}

4. Conclusions

In recent years, much effort has been put into the development of POC devices for the isolation and analysis of EVs.²²³ For instance, the Exochip and Exosearch are smart microfluidic platforms able to capture and quantify EVs, using external fluorometers.^{224,225} Going a step forward, other groups have developed microfluidic devices where the detection system is also included,^{222,226} or have demonstrated the possibility to detect EVs using smartphones.^{227,228} The combination of these platforms with NPs could enhance their performance, speeding up the translation of EVs into clinical settings. Indeed, NPs offer many advantages when compared to bulk materials, such as unique optical properties or a high surface area that can be exploited to design innovative biosensors. Among the different sensing methodologies that can be used to detect EVs, each technique has inherent advantages and drawbacks that need to be taken into account (Table 4). For instance, LFIA tests are easy to use and do not require sophisticated equipment, but their sensitivity is lower than that reported using more complex methodologies. Similarly, colorimetric biosensors using NPs could be implemented as POC assays, as detection can be done by the naked eye; however, an amplification method is routinely needed to enhance the sensitivity, hampering in many cases this portability. Electrochemical and fluorescence-based biosensors are promising candidates for POC analysis as they can be portable and sensitive at the same time,^{227,228} but the use of NPs in these completely portable systems has not been reported. Other methodologies such as SPR in combination with NPs, while promising, have not been extensively explored to date. For instance, although AuNPs have been shown to increase the sensitivity of SPR platforms, their use is still limited.⁷⁹ Similarly, MNPs are widely used to separate EVs,

but their use to analyse them using RMN is limited because of the small size of EVs.⁸⁰

Currently, the majority of the devices reported to detect EVs (Table 3) use Abs or aptamers to recognize them. Although the chemistry to functionalize these biomolecules onto the NPs is crucial, almost any work takes this point into account. As can be seen in Table 3, these NP-based devices can provide higher sensitivities than the ones obtained using standard techniques for EV analyses, such as NTA (10^7 – 10^9 EVs per mL), flow cytometry (10^7 – 10^9 EVs per mL), ELISA (10^9 – 10^{10} EVs per mL) or WB (10^{11} – 10^{12} EVs per mL) (Table 2).^{79–81,229,230} Selecting the appropriate chemistry to couple the biomolecule could further enhance it.

Despite progressive advances in the field, the majority of the devices where NPs are used to analyse EVs require their previous isolation using traditional methods (Table 3). Methodologies such as ultracentrifugation, density gradient centrifugation or size exclusion chromatography are generally time consuming, should be performed by skilled personal and can incur sample loss. On top of that, more than 1000 different protocols to retrieve EVs from biological fluids have been reported.²³⁶ Thus, without standard isolation procedures it is difficult to establish detailed comparisons to evaluate the performance of these detection platforms. These complications are exacerbated by the fact that many reports lack minimal information about the EVs, or important analytical information of the device such as limit of quantification, precision, accuracy or LOD. Even when the LOD is reported, as the units of quantification differ between studies, it is difficult to establish a real comparison. To overcome this issue, recommendations for EV analysis and reporting can be followed.^{28,237}

Lastly, the majority of the studies listed in Table 3 are at the level of proof-of-concept, having being performed with EVs isolated from cell lines. Although some of them included patient samples, statistics should be improved by using large patient cohorts. Advances in these fields will enable the acceleration of EVs incorporation into the clinic.

5. Future outlook

Nowadays the potential of EVs as a source of biomarkers is widely accepted and we believe that liquid biopsies will open a new avenue for early detection of cancer. Proof of this is the fact that the first EV-based biopsies have started to reach the market. One example is the ExoDx Prostate Test, a test based on measurement of specific EV-RNA in urine by PCR that can be used to predict high-grade prostate cancer.²³⁸ We expect that during the next years additional tests will be generated for other cancer types and diseases and that the first EV-protein tests will be developed.

In the last few years, lab on a chip platforms have been attracting more attention as they can improve portability, efficiency, automation and miniaturization among others. The combination of NPs with these platforms could enhance their performance and speed up the translation of liquid



Table 3 Summary of NP-based biosensors for the detection of EVs

Type of biosensor	Nanomaterial	Target	Recognition molecule	EVs' origin	Previous isolation	LOD	Vol EVs (μL)	POC*	Ref.
LFA	AuNPs	CD9, CD81 and CD63	Ab	Metastatic melanoma (Ma-Mel-86C)	Yes (UC)	8.54×10^8 exosomes per mL	<100	Y	77
LFA	AuNPs	CD9, CD81 and CD63	Ab	Plasma (healthy donors)	Yes (ExoQuick™) Yes (UC)	3.4×10^9 EVs per mL	<100	Y	134
LFA	AuNPs	CD9 and MICA	Ab	Metastatic melanoma (Ma-Mel-55)	Yes (UC)	5×10^{10} exosomes per mL	<100	Y	133
LFA	AuNPs	CD9	Ab	Breast cancer (MCF-7)	Yes (TEIR)	1.3×10^6 particles per mL	<100	Y	135
LFAA	AuNPs	CD63	Apt	Lung carcinoma (A549)	Yes (UC)	6.4×10^8 particles per mL	NP	Y	137
LFA	CdSe/ZnS QDs into FNs	Phospholipid membrane	Phospholipid-biotin	Epithelial (Cal 27)	Yes (UC)	2.0×10^6 particles per mL	<100	Y	136
Colorimetric	Fe_3O_4 NPs	EpcAM	Apt	Plasma from healthy patients	Yes (magnetic isolation)	7.0×10^6 particles per mL	<100	N	138
Colorimetric	s-SWCNTs	CD63	Apt	Breast cancer & normal (MCF-7, MCF-10A)	Yes (UC)	5.2×10^8 particles per mL	NP	N	139
Colorimetric	Graphitic carbon nitride nanosheets	CD63	Apt	Breast cancer & normal (MCF-7, MCF-10A)	Yes (UC)	13.52×10^8 particles per mL	<100	N	140
Colorimetric	AuNPs	LMP1	DNA-Ab	Nasopharyngeal carcinoma	No	1×10^2 particles per mL	100	N	142
Colorimetric	AuNR	CD63 and phospholipid membrane	Apt and cholesterol-DNA	Breast cancer (MCF-7)	Yes (UC)	1×10^5 particles per mL	NP	N	144
Fluorescence	CuO NPs	CD63	Cholesterol anchor and Apt	Liver cancer (HepG2)	Yes (magnetic isolation)	5×10^7 exosomes per mL	NP	N	171
Fluorescence	AuNP-linker/complementor	CD63	Apt	Human serum (healthy and cancer patients)	No	4.8×10^7 exosomes per mL	NP	N	172
Fluorescence	Lanthanide chelate-doped polystyrene beads	CD9, CD81, and CD63	Abs and lectins	Liver cancer (HepG2)	No	10^8 exosomes per mL	30	N	179
Fluorescence	Polydiacetylene liposomes	CD63	Ab	Human prostate cancer (LNCaP)	Yes (UC)	0.03 ng mL^{-1}	200	N	179
Fluorescence	QDs	CEA, Cyfra21-1, Pro-GRP	Ab	Human plasma (HansaBioMed Life Science)	Yes (UC)	3×10^8 exosomes per mL	30	N	180
Fluorescence	QDs	CD63	Ab	Lung carcinoma (A549 and H226), SCLC (H446) and umbilical vein endothelial (HUVVEC)	Yes (UC)	N/A	80	N	167
Fluorescence	QDs	CD63	Apt	Plasma (lung cancer patients)	Yes (UC)	N/A	80	N	168
FRET (quenching fluorescence)	MoS ₂ -MWCNT	CD63	Ab	Monocyte-like (THP-1)	Yes (UC)	N/A	NP	N	169
FRET (quenching fluorescence)	GO	CD63 and EpCAM	Apt	Breast cancer (SKBR3)	Yes (ExoQuick™)	N/A	500	N	173
FRET (quenching fluorescence)	GO	CD63	Apt	Breast cancer (MCF-7)	Yes (TEIR and UC)	1.48×10^6 exosomes per mL	50	N	177
FRET (quenching fluorescence)	GO	CD63 and EpCAM	Apt	Colorectal cancer (SW480)	Yes (UC)	2.1×10^7 exosomes per mL	5	N	177
FRET (quenching fluorescence)	GO	CD63	Apt	Breast cancer (MCF-7), cervical cancer (HeLa), gastric cancer	Yes (UC)	1.6×10^5 exosomes per mL	10	N	178



Table 3 (continued)

Type of biosensor	Nanomaterial	Target	Recognition molecule	EVs' origin	Previous isolation	LOD	Vol EVs (μL)	POC*	Ref.
FRET (quenching fluorescence)		CD63, EpCAM, PTK7, PSMA, PDGF, CEA, AFP		(SGC7901), liver cancer (HepG2), mammary epithelial (MCF-10A)	Yes (UC)	1.4×10^3 exosomes per mL	30	N	175
FRET (quenching fluorescence)	MXene nanosheets	CD63	Apt	Melanoma (B16), breast cancer (MCF-7), ovarian carcinoma (OVAR-3) and liver cancer (Hep G2)	Yes (UC)	1.1×10^6 exosomes per mL	10	N	165
LRET	AuNRs-UCNPs (paper)	CD63	Apt	Liver cancer (HepG2)	Yes (UC)	8×10^4 exosomes per mL	10	N	164
LRET	UCNPs	EpCAM	Apt	Breast cancer (MDA-MB-231)	Yes (UC)	10^3 exosomes per mL	50	Y (qualitative)	187
Electrochemical (voltammetric)	Au-NPFe ₂ O ₃ NC	CD63	Ab	Placental choriocarcinoma (BeWo)	No (magnetic isolation)	10^5 exosomes per mL	10	N	186
Electrochemical (voltammetric)	CdSeQD	HER-2 and FAM134B	Ab	Serum samples from patients with colorectal carcinoma	Yes (TEIR and UC)	10^5 exosomes per mL	10	N	188
Electrochemical (voltammetric)	AgNPs and CuNPs	EpCAM and PSMA	Ab	Vertebral-Cancer of the Prostate (VCaP)	Yes (UC)	2×10^3 exosomes per mL	25	N	189
Electrochemiluminescence	Ti ₃ C ₂ MXenes	EpCAM	Apt	Blood from PCa patients	Yes (UC)	N/A	25	N	191
Electrochemiluminescence	BQDs and MXenes	EpCAM and CD63	Apt	Melanoma (B16), breast cancer (MCF-7), and liver cancer (HepG2)	Yes (UC)	1.25×10^5 exosomes per mL	100	N	192
Electrochemiluminescence	MPA-CdS:Eu NCS	CD63	Apt	Breast cancer (MCF-7), cervical cancer (HeLa)	Yes (UC)	3.7×10^4 exosomes per mL	NP	N	192
SERS	Au@Ag NRS	CD63, HER2	Ab	Breast cancer (MCF-7)	Yes (UC)	7.41×10^4 exosomes per mL	50	N	203
SERS	AuNPs	CEA, H2 and PSMA	Apt	Plasma and serum samples from breast cancer patients	Yes (ExoQuick™)	6×10^4 exosomes per mL	1	N	204
SERS	AuNPs	Phospholipid membrane	No	Breast cancer (SKBR3), lung fibroblasts (MRC5)	No	N/A	2	N	205
SERS	Au@Ag NPs	Phospholipid membrane	No	Plasma (breast cancer patients)	Yes (UC and ExoQuick™)	32×10^3 exosomes per mL	NP	N	206
SERS	Au NPs	CD 9	Ab	Breast cancer (SKBR3, LNCaP, T84)	No	N/A	60	N	200
SERS	Au NPs	α3β1 integrin	Peptide	Plasma (breast cancer patients)	Yes (UC)	N/A	200	N	205
SERS	Au NPs	CD9, CD63, MIF, GPC1	Ab	Melanoma cancer (B16F10), RBCs	Yes (UC)	1 exosome	NP	N	207
SERS	Ag(shell) Au(core) @PDA particles	CD9, CD63, MIF, GPC1	Ab	Melanoma cancer (B16F10), RBCs	Yes (UC)	2.7×10^4 exosomes per mL	NP	N	208
SERS	Surface with Au pillars and Ag NCS	No	No	Liver cancer (HepG2)	Yes (UC)	N/A	5	N	202
SERS	Ag(shell) Au(core) @PDA particles	CD9, CD63, MIF, GPC1	Ab	Plasma (carcinoma patients)	Yes (UC and ExoQuick™)	N/A	NP	N	207
SERS	Ag(shell) Au(core) @PDA particles	CD9, CD63, MIF, GPC1	Ab	Ovarian carcinoma (SKOV-3) & T lymphocyte (Jurkat)	Yes (UC)	N/A	NP	N	207
SERS	Ag(shell) Au(core) @PDA particles	CD9, CD63, MIF, GPC1	Ab	Pancreatic (PANC-01 and HPDE6-C7)	Yes (UC)	5.44×10^2 exosomes per mL	2	N	201
SERS	Surface with Au pillars and Ag NCS	No	No	Pancreatic (PANC-01 and HPDE6-C7)	No	N/A	5	N	202
SERS	Surface with Au pillars and Ag NCS	No	No	Plasma (pancreatic cancer patients)	Yes (UC)	N/A	5	N	202
SERS	Surface with Au pillars and Ag NCS	No	No	Lung normal (NL-20, BEAS and L929) and cancer (PC-9, H1975, HCC827) cells	Yes (UC)	N/A	5	N	202



Table 3 (continued)

Type of biosensor	Nanomaterial	Target	Recognition molecule	EVs' origin	Previous isolation	LOD	Vol EVs (μL)	POC*	Ref.
SERS	Au@Ag@MBA NPs $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2$ particles	PD-L1	Ab	NSCLC (A549), bronchial epithelial (BEAS-2B)	Yes (UC)	1×10^3 exosomes per mL	NP	N	208
SERS	Au NRS	EpcAM, CD44, HER2, EGFR, IGFR, CD81, CD63, CD9	Ab	Plasma (lung cancer patients) Breast cancer (MM231, MM468, SKBR3) & breast normal (MCF12A)	No Yes (UC)	N/A 2×10^6 exosomes per mL	4 15	N	212
SERS	Au NPs	No	No	Plasma (breast cancer patients) Pancreatic (CD 18/HPAF, MiaPaCa and HPDF)	Yes (UC) Yes (UC)	N/A N/A	NP	N	213
SERS	Surfaces coated with AuNPs	No	No	Lung carcinoma, pulmonary alveolar epithelial (H1299, H522) Plasma (lung cancer patients)	Yes (UC) No	10^9 exosomes per mL N/A	50	N	214
SERS	Au@Ag NPs	Exosomal miRNA	DNA	Pancreatic cancer (PANC-01), normal breast cancer (HPDF6-C7), breast (MCF-10) Plasma (pancreatic and breast cancer patients)	Yes (TEIR)	1 a M (miRNA)	NP	N	217
SERS	Au@R6GAgAu NPs	Exosomal miRNA	DNA	Cervical cancer (HeLa), lung cancer (A549), normal renal (293)	Yes (UC)	5×10^{-18} mol exosomes per mL or 5 fM miRNA	NP	N	218
SPR	Nanoholes patterned in a Au film + Au nanostars	CD63	Ab	Plasma (cervical cancer and lung cancer patients) Ovarian cancer (CaOV3)	Yes (UC) No	N/A 1×10^7 particles per mL	0.3	Y	79
μNMR	MNPs	CD63	Ab	Ovarian cancer and control patients Glioblastoma multiforme (GBM20/3) Plasma (glioblastoma multiforme and healthy patients)	Yes (UC)	1×10^7 particles per mL N/A	1	Y	80

*POC devices: biosensors described in the original reference as fully portable or automatized. Ab = antibody; Apt = aptamer; UC = ultracentrifugation; RBC = red blood cell; R6G = rhodamine 6 G; TEIR = total exosome isolation reagent; Y = yes; N = no; NA = not applicable; NP = not provided



Table 4 Advantages and disadvantages of different sensing methodologies that can be used to detect EVs

	LFIA	Colorimetric	SERS	Fluorescence	Electrochemical	SPR	μ NMR
Principle	Optical properties (coloured particles)	Colour changes	Optical properties (light dispersion)	Fluorescence intensity, FRET or LRET, quenching	Voltammetric and electrochemiluminescence	Optical properties (light reflection)	Magnetic properties (relaxation time of water molecules)
Portability	Always (qualitative measurements)	Yes for qualitative/quantitative measurements (naked eye/smartphone)	Portable devices have been described but integrated platforms are not common	Possible (compact fluorescence detectors)	Possible (miniaturized electrodes integrated into microfluidic devices)	Possible (<i>i.e.</i> fiber-optic sensors for smartphone ^{23,1})	Possible (micro-coils integrated in a platform)
Naked eye detection	Yes	Yes	No	No	Sometimes	No	No
Simple (technique)	Yes	Yes	No	No	No	No	No
Expensive equipment	\$	\$-\$	\$\$\$	\$\$\$	\$	\$\$\$	\$\$\$
Sensitivity	Low	Low	High	High	High	High	High
Unskilled operators	Yes	Possible	No	No	No	No	No
Other advantages	Long shelf life, batches can be prepared in advance, no extra equipment needed, high potential for commercialization	Cost-effective, no additional equipment (for semi-quantitative or qualitative read out)	Can distinguish subpopulations, multiple detection and quantification, analysis can be performed in low concentrated samples, statistical methods can improve the results	Simplicity and targeted and bioimaging	Reproducibility, real-time and fast answer, possibility of automation and robustness	Fast, label free, high throughput analysis	High penetration (can be performed in turbid samples), low background
Other disadvantages	Sample pre-treatment is needed depending on the sample, qualitative or semi-quantitative read-out	Low sensitivity if an amplification method is not included	SERS nanoprobes need to be prepared in advance, sample pre-treatment is necessary, total analysis time	Background fluorescence and spectral interference	Sensitive to the surrounding environment, short or limited shelf life, cross-sensitivity	Portability hindered when using bulk SPR sensors, complicated optics	Difficult to be engineered to detect EVs because of their size
Examples	77,133–137,232	138,142,144,228	201,204,206,208,214,217,233	225,227,234	99,108,235	79	80



biopsies into the clinic; however, there is still a long way to reach this goal as the field faces several important challenges. For instance, EV-based markers should be detectable with a few and simple processing steps, preferentially directly in the cell-free biofluid. Further technology advancements to specifically detect tumor-derived subpopulations of EVs in a complex mixture are also necessary, as human biofluids contain a mixture of EVs released from diverse cell types. Lastly, high-throughput EV separation along with high purity recovery and device standardization should be also pursued.

In conclusion, although nanomaterials are playing a key role in developing novel biosensors with enhanced sensitivity for the detection of EVs, major efforts should be devoted to enhance the portability and reproducibility of the devices to be used in clinical settings. For future prospective, prototypes where EVs isolation and analysis are integrated into the same device are highly promising towards automated and user-friendly POC devices. We also believe that orientation of molecules on NPs could greatly improve the sensitivity, and that by controlling the functionalization processes, many platforms could enhance their performance. We expect that in the next few decades, by addressing the aforementioned challenges, the nanobiosensor field will result in the development of easy platforms with the capacity to test clinical samples with high selectivity and accuracy.

Abbreviations

Abs	Antibodies	EpCAM	Epithelial cell adhesion molecule
Ag NCs	Silver nanocubes	EVs	Extracellular vesicles
AgNPs	Silver nanoparticles	Fab	Antigen binding fragment
ALP	Alkaline phosphatase	FBS	Fetal bovine serum
aM	Attomolar	Fc	Constant fragment
Au-NPPFe ₂ O ₃ NCs	Gold-loaded ferric oxide nanocubes	fM	Femtomolar
AuNPs	Gold nanoparticles	FRET	Fluorescence resonance energy transfer
AuNRs	Gold nanorods	GO	Graphene oxide
BPQDs	Black phosphorus quantum dots	GPC1	Glypican-1
BSA	Bovine serum albumin	HCR	Hybridization chain reaction
CB	Carbon black nanoparticles	HER2	Human epidermal growth factor receptor-2
CEA	Carcinoma embryonic antigen	HRP	Horseradish peroxidase
cfDNA	Circulating cell-free DNA	IgG	Immunoglobulin G
cfRNA	Circulating cell-free RNA	ISEV	International Society for Extracellular Vesicles
CL	Control line	LFAA	Lateral flow aptamer assay
CNTs	Carbon nanotubes	LFIA	Lateral flow immunoassay
CP	Pancreatic cancer	LMP-1	Epstein-Barr virus latent membrane protein 1
CTCs	Circulating tumor cells	LOD	Limit of detection
CuNP	Copper nanoparticles	LRET	Luminescence resonance energy transfer
CuO NPs	Copper oxide nanoparticles	LSPR	Local surface plasmon resonance
Cy3	Cyanine	MICA	MHC class I chain-related protein A
DNA	Deoxyribonucleic acid	MIF	Macrophage migration inhibitory factor
DSN	Duplex-specific nuclease	miRNAs	micro RNAs
ECL	Electrochemiluminescence	MNPs	Magnetic nanoparticles
EGFR	Epidermal growth factor receptor	MPA-CdS:Eu NCs	Mercaptopropionic acid-modified Eu ³⁺ -doped CdS nanocrystals
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay	MWCNTs	Multiwalled carbon nanotubes
EM	Electron microscope	NCs	Nanocubes
		NIR	Near infrared
		NP-TRFIA	NP-based time resolved fluorescence immunoassay
		nPLEX	Nano-plasmonic exosome
		NPs	Nanoparticles
		NRs	Nanorods
		NSCLC	Non-small cell lung cancer
		NTA	Nanoparticle tracking analysis
		PC-DFA	Principal component differential function analysis
		PCa	Prostate cancer
		PCA	Principal component analysis
		PCR	Polymerase chain reaction
		PD-1	Programmed cell death-1
		PD-L1	Programmed cell death-ligand 1
		PDA	Polydopamine
		PDAC	Pancreatic ductal adenocarcinoma
		PEG	Poly ethylene glycol
		POC	Point-of-care
		proGRP	Progastrin-releasing peptide
		PSMA	Prostate-specific membrane antigen
		QDs	Quantum dots
		RCA	Rolling circle amplification reaction
		RNA	Ribonucleic acid
		s-SWCNTs	Single-walled carbon nanotubes
		SELEX	Systematic evolution of ligands by exponential enrichment



SERS	Surface-enhanced Raman spectroscopy
SPR	Surface plasmon resonance
TAMRA	Tetramethyl rhodamine
TCO	<i>trans</i> -Cyclooctene
TL	Test line
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
TR-FIA	Time-revolved fluorescence immunoassay
Tz	Tetrazines
UC FBS	Ultracentrifuged fetal bovine serum
UCNPs	Upconversion nanoparticles
UV-vis	Ultraviolet-visible spectroscopy

Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

Acknowledgements

This work was supported by the TRANSCAN2-JTC2016 call (Project PROSCANEXO), Spanish AEI funds (BIO2017-84246-C2-1-R project and Juan de la Cierva fellowship (IJCI-2016-30520) to M. M.) and Fondo Social de la DGA (grupos DGA). B. M. G. thanks the DGA Fellowship program for her PhD position. The Research Council of Norway, the Norwegian Cancer Society, and the South-Eastern Norway Regional Health Authority are also acknowledged. We acknowledge support of the publication fee by the CSIC Open Access Publication Support Initiative through its Unit of Information Resources for Research (URICI).

Notes and references

- 1 F. Castro-Giner, S. Gkountela, C. Donato, I. Alborelli, L. Quagliata, C. Ng, S. Piscuoglio and N. Aceto, *Diagnostics*, 2018, **8**, 31.
- 2 M. Cordonnier, G. Chanteloup, N. Isambert, R. Seigneuric, P. Fumoleau, C. Garrido and J. Gobbo, *Cell Adhes. Migr.*, 2017, **11**, 151–163.
- 3 Y. Zhang, Y. Liu, H. Liu and W. H. Tang, *Cell Biosci.*, 2019, **9**, 19.
- 4 Z. Zhao, J. Fan, Y.-M. S. Hsu, C. J. Lyon, B. Ning and T. Y. Hu, *Lab Chip*, 2019, **19**, 1114–1140.
- 5 C. Z. J. Lim, L. Zhang, Y. Zhang, N. R. Sundah and H. Shao, *ACS Sens.*, 2020, **5**, 4–12.
- 6 X. Li, A. L. Corbett, E. Taatizadeh, N. Tasnim, J. P. Little, C. Garnis, M. Daugaard, E. Guns, M. Hoorfar and I. T. S. Li, *APL Bioeng.*, 2019, **3**, 011503.
- 7 H. Shao, H. Im, C. M. Castro, X. Breakefield, R. Weissleder and H. Lee, *Chem. Rev.*, 2018, **118**, 1917–1950.
- 8 N. Cheng, D. Du, X. Wang, D. Liu, W. Xu, Y. Luo and Y. Lin, *Trends Biotechnol.*, 2019, **37**, 1236–1254.
- 9 T. Rojalín, B. Phong, H. J. Koster and R. P. Carney, *Front. Chem.*, 2019, **7**, 279.
- 10 B. S. Chia, Y. P. Low, Q. Wang, P. Li and Z. Gao, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2017, **86**, 93–106.
- 11 K. Boriachek, M. N. Islam, A. Möller, C. Salomon, N.-T. Nguyen, M. S. A. Hossain, Y. Yamauchi and M. J. A. Shiddiky, *Small*, 2018, **14**, 1702153.
- 12 D. L. M. Rupert, V. Claudio, C. Lässer and M. Bally, *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.*, 1861, 2017, 3164–3179.
- 13 V. Shpacovitch and R. Hergenröder, *Anal. Chim. Acta*, 2018, **1005**, 1–15.
- 14 W. Wang, J. Luo and S. Wang, *Adv. Healthcare Mater.*, 2018, **7**, 1800484.
- 15 P. G. Febbo, A. M. Martin, H. I. Scher, J. C. Barrett and J. A. Beaver, *et al.*, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 2020, 1–5.
- 16 A. Babayan and K. Pantel, *Genome Med.*, 2018, **10**, 21.
- 17 A. R. Parikh, I. Leshchiner, L. Elagina, L. Goyal and C. Levovitz, *et al.*, *Nat. Med.*, 2019, **25**, 1415–1421.
- 18 M. H. Vasconcelos, H. R. Caires, A. Ábols, C. P. R. Xavier and A. Linē, *Drug Resist. Updates*, 2019, **47**, 100647.
- 19 K. Pantel and C. Alix-Panabières, *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, 2019, **16**, 409–424.
- 20 L. Sorber, K. Zwaenepoel, V. Deschoolmeester, P. E. Y. Van Schil, J. Van Meerbeeck, F. Lardon, C. Rolfo and P. Pauwels, *Lung Cancer*, 2017, **107**, 100–107.
- 21 G. Siravegna, B. Mussolin, T. Venesio, S. Marsoni, J. Seoane, C. Dive, N. Papadopoulos, S. Kopetz, R. B. Corcoran, L. L. Siu and A. Bardelli, *Ann. Oncol.*, 2019, **30**, 1580–1590.
- 22 G. De Rubis, S. Rajeev Krishnan and M. Bebawy, *Trends Pharmacol. Sci.*, 2019, **40**, 172–186.
- 23 V. Müller, S. Riethdorf, B. Rack, W. Janni, P. A. Fasching, E. Solomayer, B. Aktas, S. Kasimir-Bauer, K. Pantel and T. Fehm, *Breast Cancer Res.*, 2012, **14**, R118.
- 24 M. Oellerich, E. Schütz, J. Beck and P. D. Walson, *Ther. Drug Monit.*, 2019, **41**, 115–120.
- 25 G. De Rubis, S. Rajeev Krishnan and M. Bebawy, *Trends Pharmacol. Sci.*, 2019, **40**, 172–186.
- 26 M. Clos-García, A. Loizaga-Iriarte, P. Zuñiga-García, P. Sánchez-Mosquera, A. Rosa Cortazar, E. González, V. Torrano, C. Alonso, M. Pérez-Cormenzana, A. Ugalde-Olano, I. Lacasa-Viscasillas, A. Castro, F. Royo, M. Unda, A. Carracedo and J. M. Falcón-Pérez, *J. Extracell. Vesicles*, 2018, **7**, 1470442.
- 27 T. Skotland, K. Ekroos, D. Kauhanen, H. Simolin, T. Seierstad, V. Berge, K. Sandvig and A. Llorente, *Eur. J. Cancer*, 2017, **70**, 122–132.
- 28 C. Théry, K. W. Witwer, E. Aikawa, M. J. Alcaraz and J. D. Anderson, *et al.*, *J. Extracell. Vesicles*, 2018, **7**, 1535750.
- 29 M. Yáñez-Mó, P. R. M. Siljander, Z. Andreu, A. B. Zavec and F. E. Borràs, *et al.*, *J. Extracell. Vesicles*, 2015, **4**, 27066.
- 30 B. Vestad, A. Llorente, A. Neurauder, S. Phuyal, B. Kierulf, P. Kierulf, T. Skotland, K. Sandvig, K. B. F. Haug and R. Øvstebø, *J. Extracell. Vesicles*, 2017, **6**, 1344087.
- 31 M. Colombo, G. Raposo and C. Théry, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 2014, **30**, 255–289.
- 32 S. Caruso and I. K. H. Poon, *Front. Immunol.*, 2018, **9**, 1486.
- 33 D. Di Vizio, M. Morello, A. C. Dudley, P. W. Schow and R. M. Adam, *et al.*, *Am. J. Pathol.*, 2012, **181**, 1573–1584.
- 34 T. Vagner, C. Spinelli, V. R. Minciacci, L. Balaj, M. Zandian, A. Conley, A. Zijlstra, M. R. Freeman, F. Demichelis, S. De,



- E. M. Posadas, H. Tanaka and D. Di Vizio, *J. Extracell. Vesicles*, 2018, **7**, 1505403.
- 35 R. M. Johnstone, M. Adam, J. R. Hammond, L. Orr and C. Turbide, *J. Biol. Chem.*, 1987, **262**, 9412–9420.
- 36 M. Tkach and C. Théry, *Cell*, 2016, **164**, 1226–1232.
- 37 N. Milman, L. Ginini and Z. Gil, *Drug Resist. Updates*, 2019, **45**, 1–12.
- 38 M. I. Zonneveld, T. G. H. Keulers and K. M. A. Rouschop, *Cancers*, 2019, **11**, 154.
- 39 L. Sadovska, C. B. Santos, Z. Kalniņa and A. Linē, *J. Circ. Biomarkers*, 2015, **4**, 2.
- 40 S. Maacha, A. A. Bhat, L. Jimenez, A. Raza, M. Haris, S. Uddin and J. C. Grivel, *Mol. Cancer*, 2019, **18**, 55.
- 41 T. L. Whiteside, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2017, **1036**, 81–89.
- 42 L. Nogués, A. Benito-Martin, M. Hergueta-Redondo and H. Peinado, *Mol. Aspects Med.*, 2018, **60**, 15–26.
- 43 M. Logozzi, A. De Milito, L. Lugini, M. Borghi and L. Calabrò, *et al.*, *PLoS One*, 2009, **4**, e5219.
- 44 E. Alegre, L. Zubiri, J. L. Perez-Gracia, M. González-Cao, L. Soria, S. Martin-Algarra and A. González, *Clin. Chim. Acta*, 2016, **454**, 28–32.
- 45 A. Caivano, I. Laurenzana, L. De Luca, F. La Rocca, V. Simeon, S. Trino, F. D'Auria, A. Traficante, M. Maietti, T. Izzo, G. D'Arena, G. Mansueto, G. Pietrantuono, L. Laurenti, P. Musto and L. Del Vecchio, *Tumor Biol.*, 2015, **36**, 9739–9752.
- 46 D. Duijvesz, C. Y. L. Versluis, C. A. M. Van Der Fels, M. S. Vredendregt-Van Den Berg, J. Leivo, M. T. Peltola, C. H. Bangma, K. S. I. Pettersson and G. Jenster, *Int. J. Cancer*, 2015, **137**, 2869–2878.
- 47 Y. Matsumoto, M. Kano, Y. Akutsu, N. Hanari, I. Hoshino, K. Murakami, A. Usui, H. Suito, M. Takahashi, R. Otsuka, H. Xin, A. Komatsu, K. Iida and H. Matsubara, *Oncol. Rep.*, 2016, **36**, 2535–2543.
- 48 M. Nawaz, G. Camussi, H. Valadi, I. Nazarenko, K. Ekström, X. Wang, S. Principe, N. Shah, N. M. Ashraf, F. Fatima, L. Neder and T. Kislinger, *Nat. Rev. Urol.*, 2014, **11**, 688–701.
- 49 E. Ogorevc, V. Kralj-Iglic and P. Veranic, *Radiol. Oncol.*, 2013, **47**, 197–205.
- 50 S. R. Zorrilla, M. Pérez-Sayans, S. Fais, M. Logozzi, M. G. Torreira and A. G. García, *Cancers*, 2019, **11**, 429.
- 51 L. König, S. Kasimir-Bauer, A. K. Bittner, O. Hoffmann, B. Wagner, L. F. Santos Manvailier, R. Kimmig, P. A. Horn and V. Rebmann, *Oncoimmunology*, 2018, **7**, e1376153.
- 52 D. Osti, M. Del Bene, G. Rappa, M. Santos, V. Matafora, C. Richichi, S. Faletti, G. V. Beznoussenko, A. Mironov, A. Bachi, L. Fornasari, D. Bongetta, P. Gaetani, F. DiMeco, A. Lorico and G. Pelicci, *Clin. Cancer Res.*, 2019, **25**, 266–276.
- 53 F. Cappello, M. Logozzi, C. Campanella, C. C. Bavisotto, A. Marcilla, F. Properzi and S. Fais, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2017, **96**, 93–98.
- 54 K. Al-Nedawi, B. Meehan, J. Micallef, V. Lhotak, L. May, A. Guha and J. Rak, *Nat. Cell Biol.*, 2008, **10**, 619–624.
- 55 Q. Bao, L. Gong, J. Wang, J. Wen, Y. Shen and W. Zhang, *Ann. Surg. Oncol.*, 2018, **25**, 2642–2651.
- 56 S. García-Silva, A. Benito-Martin, S. Sánchez-Redondo, A. Hernández-Barranco and P. Ximénez-Embún, *et al.*, *J. Exp. Med.*, 2019, **216**, 1061–1070.
- 57 E. Lázaro-Ibáñez, A. Sanz-Garcia, T. Visakorpi, C. Escobedo-Lucea, P. Siljander, Á. Ayuso-Sacido and M. Yliperttula, *Prostate*, 2014, **74**, 1379–1390.
- 58 M. A. S. Broggi, L. Maillat, C. C. Clement, N. Bordry, P. Corthésy, A. Auger, M. Matter, R. Hamelin, L. Potin, D. Demurtas, E. Romano, A. Harari, D. E. Speiser, L. Santambrogio and M. A. Swartz, *J. Exp. Med.*, 2019, **216**, 1091–1107.
- 59 L. Sadovska, J. Eglitis and A. Line, *Anticancer Res.*, 2015, **35**, 6379–6390.
- 60 H. Shao, J. Chung and D. Issadore, *Biosci. Rep.*, 2016, **36**, e00292.
- 61 E. Castellanos-Rizaldos, D. G. Grimm, V. Tadigotla, J. Hurley, J. Healy, P. L. Neal, M. Sher, R. Venkatesan, C. Karlovich, M. Raponi, A. Krug, M. Noerholm, J. Tannous, B. A. Tannous, L. E. Raez and J. K. Skog, *Clin. Cancer Res.*, 2018, **24**, 2944–2950.
- 62 K. Allenson, J. Castillo, F. A. San Lucas, G. Scelo, D. U. Kim, V. Bernard, G. Davis, T. Kumar, M. Katz, M. J. Overman, L. Foretova, E. Fabianova, I. Holcatova, V. Janout, F. Meric-Bernstam, P. Gascoyne, I. Wistuba, G. Varadhachary, P. Brennan, S. Hanash, D. Li, A. Maitra and H. Alvarez, *Ann. Oncol.*, 2017, **28**, 741–747.
- 63 F. A. San Lucas, K. Allenson, V. Bernard, J. Castillo, D. U. Kim, K. Ellis, E. A. Ehli, G. E. Davies, J. L. Petersen, D. Li, R. Wolff, M. Katz, G. Varadhachary, I. Wistuba, A. Maitra and H. Alvarez, *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.*, 2016, **27**, 635–641.
- 64 E. Endzelinš, A. Berger, V. Melne, C. Bajo-Santos, K. Sobolevska, A. Abols, M. Rodriguez, D. Šantare, A. Rudnickiha, V. Lietuvietis, A. Llorente and A. Line, *BMC Cancer*, 2017, **17**, 730.
- 65 S. A. Melo, L. B. Luecke, C. Kahlert, A. F. Fernandez, S. T. Gammon, J. Kaye, V. S. LeBleu, E. A. Mittendorf, J. Weitz, N. Rahbari, C. Reissfelder, C. Pilarsky, M. F. Fraga, D. Piwnicka-Worms and R. Kalluri, *Nature*, 2015, **523**, 177–182.
- 66 J. Y. Qian, Y. L. Tan, Y. Zhang, Y. F. Yang and X. Q. Li, *Oncol. Lett.*, 2018, **16**, 1253–1258.
- 67 Y. H. Park, H. W. Shin, A. R. Jung, O. S. Kwon, Y. J. Choi, J. Park and J. Y. Lee, *Sci. Rep.*, 2016, **6**, 30386.
- 68 C. N. Biggs, K. M. Siddiqui, A. A. Al-Zahrani, S. Pardhan, S. I. Brett, Q. Q. Guo, J. Yang, P. Wolf, N. E. Power, P. N. Durfee, C. D. MacMillan, J. L. Townson, J. C. Brinker, N. E. Fleshner, J. I. Izawa, A. F. Chambers, J. L. Chin and H. S. Leong, *Oncotarget*, 2016, **7**, 8839–8849.
- 69 O. D. Murillo, W. Thistlethwaite, J. Rozowsky, S. L. Subramanian and R. Lucero, *et al.*, *Cell*, 2019, **177**, 463–477.
- 70 C. Pisano, J. Galley, M. Elbahrawy, Y. Wang, A. Farrell, D. Brigstock and G. E. Besner, *J. Clin. Pediatr. Surg.*, 2020, **55**, 54–58.
- 71 J. Y. Hur, J. S. Lee, I. A. Kim, H. J. Kim, W. S. Kim and K. Y. Lee, *Transl. Lung Cancer Res.*, 2019, **8**, 1051–1060.



- 72 J. Linxweiler and K. Junker, *Nat. Rev. Urol.*, 2020, **17**, 11–27.
- 73 S. Fais, L. O'Driscoll, F. E. Borrás, E. Buzas and G. Camussi, *et al.*, *ACS Nano*, 2016, **10**, 3886–3899.
- 74 U. Erdbrügger and J. Lannigan, *Cytometry, Part A*, 2016, **89**, 123–134.
- 75 P. Ziaei, C. E. Berkman and M. G. Norton, *ACS Appl. Nano Mater.*, 2018, **1**, 2004–2020.
- 76 J. McKiernan, M. J. Donovan, E. Margolis, A. Partin, B. Carter, G. Brown, P. Torkler, M. Noerholm, J. Skog, N. Shore, G. Andriole, I. Thompson and P. Carroll, *Eur. Urol.*, 2018, **74**, 731–738.
- 77 M. Oliveira-Rodríguez, S. López-Cobo, H. T. Reyburn, A. Costa-García, S. López-Martín, M. Yáñez-Mó, E. Cernuda-Morollón, A. Paschen, M. Valés-Gómez and M. C. Blanco-López, *J. Extracell. Vesicles*, 2016, **5**, 31803.
- 78 G. Li, W. Tang and F. Yang, *Biotechnol. J.*, 2020, 1900225.
- 79 H. Im, H. Shao, Y. Il Park, V. M. Peterson, C. M. Castro, R. Weissleder and H. Lee, *Nat. Biotechnol.*, 2014, **32**, 490–495.
- 80 H. Shao, J. Chung, L. Balaj, A. Charest, D. D. Bigner, B. S. Carter, F. H. Hochberg, X. O. Breakefield, R. Weissleder and H. Lee, *Nat. Med.*, 2012, **18**, 1835–1840.
- 81 T. Kilic, A. T. D. S. Valinhas, I. Wall, P. Renaud and S. Carrara, *Sci. Rep.*, 2018, **8**, 9402.
- 82 R. Friedrich, S. Block, M. Alizadehheidari, S. Heider, J. Fritzsche, E. K. Esbjörner, F. Westerlund and M. Bally, *Lab Chip*, 2017, **17**, 830–841.
- 83 M. Sáenz-Cuesta, *Front. Immunol.*, 2015, **6**, 1–12.
- 84 V. Filipe, A. Hawe and W. Jiskoot, *Pharm. Res.*, 2010, **27**, 796–810.
- 85 A. Clayton, D. Buschmann, J. B. Byrd, D. R. F. Carter and L. Cheng, *et al.*, *J. Extracell. Vesicles*, 2018, **7**, 1473707.
- 86 A. Clayton, E. Boilard, E. I. Buzas, L. Cheng and J. M. Falcón-Perez, *et al.*, *J. Extracell. Vesicles*, 2019, **8**, 1647027.
- 87 M. Y. Konoshenko, E. A. Lekchnov, A. V. Vlassov and P. P. Laktionov, *Biomed. Res. Int.*, 2018, **2018**, 8545347.
- 88 P. Li, M. Kaslan, S. H. Lee, J. Yao and Z. Gao, *Theranostics*, 2017, **7**, 789–804.
- 89 B. Y. Chen, C. W. H. Sung, C. Chen, C. M. Cheng, D. P. C. Lin, C. Te Huang and M. Y. Hsu, *Clin. Chim. Acta*, 2019, **493**, 14–19.
- 90 F. Royo, P. Zuñiga-García, P. Sanchez-Mosquera, A. Egia, A. Perez, A. Loizaga, R. Arceo, I. Lacasa, A. Rabade, E. Arrieta, R. Bilbao, M. Unda, A. Carracedo and J. M. Falcon-Perez, *J. Extracell. Vesicles*, 2016, **5**, 29497.
- 91 G. K. Patel, M. A. Khan, H. Zubair, S. K. Srivastava, M. Khushman, S. Singh and A. P. Singh, *Sci. Rep.*, 2019, **9**, 5335.
- 92 Y. Yoshioka, N. Kosaka, Y. Konishi, H. Ohta, H. Okamoto, H. Sonoda, R. Nonaka, H. Yamamoto, H. Ishii, M. Mori, K. Furuta, T. Nakajima, H. Hayashi, H. Sugisaki, H. Higashimoto, T. Kato, F. Takeshita and T. Ochiya, *Nat. Commun.*, 2014, **5**, 3591.
- 93 E. Commission, Off. J. Eur. Union. 2011/696/EU, 2011, 38–40.
- 94 B. A. Kairdolf, X. Qian and S. Nie, *Anal. Chem.*, 2017, **89**, 1015–1031.
- 95 P. Malik, V. Katyal, V. Malik, A. Asatkar, G. Inwati and T. K. Mukherjee, *ISRN Nanomater.*, 2013, **2013**, 327435.
- 96 H. Su, S. Li, Y. Jin, Z. Xian, D. Yang, W. Zhou, F. Mangaran, F. Leung, G. Sithamparanathan and K. Kerman, *Adv. Health Care Technol.*, 2017, **3**, 19–29.
- 97 Z. Farka, T. Juřík, D. Kovář, L. Trnková and P. Skládal, *Chem. Rev.*, 2017, **117**, 9973–10042.
- 98 D. Issadore, C. Min, M. Liong, J. Chung, R. Weissleder and H. Lee, *Lab Chip*, 2011, **11**, 2282–2287.
- 99 S. Jeong, J. Park, D. Pathania, C. M. Castro, R. Weissleder and H. Lee, *ACS Nano*, 2016, **10**, 1802–1809.
- 100 X. Huang, T. Yuan, M. Tschannen, Z. Sun, H. Jacob, M. Du, M. Liang, R. L. Dittmar, Y. Liu, M. Liang, M. Kohli, S. N. Thibodeau, L. Boardman and L. Wang, *BMC Genomics*, 2013, **14**, 319.
- 101 A. K. Trilling, J. Beekwilder and H. Zuilhof, *Analyst*, 2013, **138**, 1619.
- 102 S. Sharma, H. Byrne and R. J. O'Kennedy, *Essays Biochem.*, 2016, **60**, 9–18.
- 103 A. Makaraviciute and A. Ramanaviciene, *Biosens. Bioelectron.*, 2013, **50**, 460–471.
- 104 A. J. Sivaram, A. Wardiana, C. B. Howard, S. M. Mahler and K. J. Thurecht, *Adv. Healthcare Mater.*, 2018, **7**, 1700607.
- 105 J.-M. Montenegro, V. Grazu, A. Sukhanova, S. Agarwal, J. M. de la Fuente, I. Nabiev, A. Greiner and W. J. Parak, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2013, **65**, 677–688.
- 106 M. A. Parracino, B. Martín and V. Grazú, *Photoactive Inorganic Nanoparticles*, Elsevier, 2019, pp. 211–257.
- 107 A. C. Marques, P. J. Costa, S. Velho and M. H. Amaral, *J. Controlled Release*, 2020, **320**, 180–200.
- 108 S. Wang, L. Zhang, S. Wan, S. Cansiz, C. Cui, Y. Liu, R. Cai, C. Hong, I.-T. Teng, M. Shi, Y. Wu, Y. Dong and W. Tan, *ACS Nano*, 2017, **11**, 3943–3949.
- 109 S. Puertas, M. Moros, R. Fernández-Pacheco, M. R. Ibarra, V. Grazú and J. M. de la Fuente, *J. Phys. D: Appl. Phys.*, 2010, **43**, 474012.
- 110 J. B. Haun, N. K. Devaraj, S. A. Hilderbrand, H. Lee and R. Weissleder, *Nat. Nanotechnol.*, 2010, **5**, 660–665.
- 111 M. Liong, M. Fernandez-Suarez, D. Issadore, C. Min, C. Tassa, T. Reiner, S. M. Fortune, M. Toner, H. Lee and R. Weissleder, *Bioconjugate Chem.*, 2011, **22**, 2390–2394.
- 112 V. M. Peterson, C. M. Castro, H. Lee and R. Weissleder, *ACS Nano*, 2012, **6**, 3506–3513.
- 113 E. Polo, S. Puertas, M. Moros, P. Batalla, J. M. Guisán, J. M. de la Fuente and V. Grazú, *Methods Mol. Biol.*, 2013, **1051**, 149–163.
- 114 S. Puertas, P. Batalla, M. Moros, E. Polo, P. Del Pino, J. M. Guisán, V. Grazú and J. M. de la Fuente, *ACS Nano*, 2011, **5**, 4521–4528.
- 115 G. Ruiz, K. Tripathi, S. Okyem and J. D. Driskell, *Bioconjugate Chem.*, 2019, **30**, 1182–1191.
- 116 C. Parolo, A. de la Escosura-Muñiz, E. Polo, V. Grazú, J. M. de la Fuente and A. Merkoçi, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2013, **5**, 10753–10759.
- 117 S. Puertas, M. de Gracia Villa, E. Mendoza, C. Jiménez-Jorquera, J. M. de la Fuente, C. Fernández-Sánchez and V. Grazú, *Biosens. Bioelectron.*, 2013, **43**, 274–280.



- 118 B. Saha, P. Songe, T. H. Evers and M. W. J. Prins, *Analyst*, 2017, **142**, 4247–4256.
- 119 K. Tripathi and J. D. Driskell, *ACS Omega*, 2018, **3**, 8253–8259.
- 120 S. van der Heide and D. A. Russell, *J. Colloid Interface Sci.*, 2016, **471**, 127–135.
- 121 C. Tuerk and L. Gold, *Science*, 1990, **249**, 505–510.
- 122 A. D. Ellington and J. W. Szostak, *Nature*, 1990, **346**, 818–822.
- 123 S. Y. Toh, M. Citartan, S. C. B. Gopinath and T.-H. Tang, *Biosens. Bioelectron.*, 2015, **64**, 392–403.
- 124 V. Crivianu-Gaita and M. Thompson, *Biosens. Bioelectron.*, 2016, **85**, 32–45.
- 125 Z. Ge, H. Pei, L. Wang, S. Song and C. Fan, *Sci. China: Chem.*, 2011, **54**, 1273–1276.
- 126 E. Baldrich, A. Restrepo and C. K. O'Sullivan, *Anal. Chem.*, 2004, **76**, 7053–7063.
- 127 M. Lin, P. Song, G. Zhou, X. Zuo, A. Aldalbahi, X. Lou, J. Shi and C. Fan, *Nat. Protoc.*, 2016, **11**, 1244–1263.
- 128 R. Schlapak, J. Danzberger, D. Armitage, D. Morgan, A. Ebner, P. Hinterdorfer, P. Pollheimer, H. J. Gruber, F. Schäffler and S. Howorka, *Small*, 2012, **8**, 89–97.
- 129 NanoComposix, Lateral Flow Assay Development Guide v 1.4, 2018.
- 130 InnovaBioscience, Guide to Lateral Flow Immunoassays, 2017.
- 131 H. V. Hsieh, J. L. Dantzler and B. H. Weigl, *Diagnostics*, 2017, **7**, 29.
- 132 K. M. Koczula and A. Gallotta, *Essays Biochem.*, 2016, **60**, 111–120.
- 133 S. López-Cobo, C. Campos-Silva, A. Moyano, M. Oliveira-Rodríguez, A. Paschen, M. Yáñez-Mó, M. C. Blanco-López and M. Valés-Gómez, *J. Nanobiotechnol.*, 2018, **16**, 47.
- 134 M. Oliveira-rodríguez, E. Serrano, A. C. García, S. López, M. Y. Mo and E. Cernuda-morollón, *Biosens. Bioelectron.*, 2016, **87**, 38–45.
- 135 T. Wu, Y. Yang, Y. Cao, Y. Huang, L. P. Xu, X. Zhang and S. Wang, *Sci. China: Chem.*, 2018, **61**, 1423–1429.
- 136 D. Dong, L. Zhu, J. Hu, D. W. Pang and Z. L. Zhang, *Talanta*, 2019, **200**, 408–414.
- 137 Q. Yu, Q. Zhao, S. Wang, S. Zhao, S. Zhang, Y. Yin and Y. Dong, *Anal. Biochem.*, 2020, **594**, 113591.
- 138 J. Chen, Y. Xu, Y. Lu and W. Xing, *Anal. Chem.*, 2018, **90**, 14207–14215.
- 139 Y. Xia, M. Liu, L. Wang, A. Yan, W. He, M. Chen, J. Lan, J. Xu, L. Guan and J. Chen, *Biosens. Bioelectron.*, 2017, **92**, 8–15.
- 140 Y.-M. Wang, J.-W. Liu, G. B. Adkins, W. Shen, M. P. Trinh, L.-Y. Duan, J.-H. Jiang and W. Zhong, *Anal. Chem.*, 2017, **89**, 12327–12333.
- 141 Y. Jiang, M. Shi, Y. Liu, S. Wan, C. Cui, L. Zhang and W. Tan, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2017, **56**, 11916–11920.
- 142 W. Liu, J. Li, Y. Wu, S. Xing, Y. Lai and G. Zhang, *Biosens. Bioelectron.*, 2018, **102**, 204–210.
- 143 F. He, H. Liu, X. Guo, B.-C. Yin and B.-C. Ye, *Anal. Chem.*, 2017, **89**, 12968–12975.
- 144 Y. Zhang, D. Wang, S. Yue, Y. Lu, C. Yang, J. Fang and Z. Xu, *ACS Sens.*, 2019, **4**, 3210–3218.
- 145 W. Nawrot, K. Drzozga, S. Baluta, J. Cabaj and K. Malecha, *Sensors*, 2018, **18**, 1–21.
- 146 D. Wu, A. C. Sedgwick, T. Gunnlaugsson, E. U. Akkaya, J. Yoon and T. D. James, *Chem. Soc. Rev.*, 2017, **46**, 7105–7123.
- 147 B. S. Chia, Y. P. Low, Q. Wang, P. Li and Z. Gao, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2017, **86**, 93–106.
- 148 S. M. Ng, M. Koneswaran and R. Narayanaswamy, *A review on fluorescent inorganic nanoparticles for optical sensing applications*, Royal Society of Chemistry, 2016, vol. 6.
- 149 L. Huang, S. Yang, J. Chen, J. Tian, Q. Huang, H. Huang, Y. Wen, F. Deng, X. Zhang and Y. Wei, *Mater. Sci. Eng., C*, 2019, **94**, 270–278.
- 150 X. Miao, Z. Cheng, H. Ma, Z. Li, N. Xue and P. Wang, *Anal. Chem.*, 2018, **90**, 1098–1103.
- 151 S. Kailasa, B. G. Rani, M. S. Bhargava Reddy, N. Jayarambabu, P. Munindra, S. Sharma and K. Venkateswara Rao, *Mater. Chem. Phys.*, 2020, **242**, 122524.
- 152 A. Martín-Barreiro, S. de Marcos and J. Galbán, *Microchim. Acta*, 2018, **185**(3), 171.
- 153 A. Martín-Barreiro, S. de Marcos, J. M. de la Fuente, V. Grazú and J. Galbán, *Sens. Actuators, B*, 2018, **277**, 261–270.
- 154 M. Ali, M. Sajid, M. A. U. Khalid, S. W. Kim, J. H. Lim, D. Huh and K. H. Choi, *Spectrochim. Acta, Part A*, 2020, **226**, 117610.
- 155 Y. Wang, Z. Wei, X. Luo, Q. Wan, R. Qiu and S. Wang, *Talanta*, 2019, **195**, 33–39.
- 156 D. Chen, C. Liu, J. Tang, L. Luo and G. Yu, *Polym. Chem.*, 2019, **10**, 1168–1181.
- 157 Y. Liu, P. Dong, Q. Jiang, F. Wang, D. W. Pang and X. Liu, *Sens. Actuators, B*, 2019, **279**, 334–341.
- 158 X. Lu, C. Wang, J. Qian, C. Ren, K. An and K. Wang, *Anal. Chim. Acta*, 2019, **1047**, 163–171.
- 159 H. Yanagawa, A. Inoue, H. Sugimoto, M. Shioi and M. Fujii, *MRS Commun.*, 2019, **9**, 1079–1086.
- 160 R. A. Almotiri, K. J. Ham, V. M. Vijayan and S. A. Catledge, *Materials*, 2019, **12**(13), 2097.
- 161 M. O. Dekaliuk, O. Viagin, Y. V. Malyukin and A. P. Demchenko, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2014, **16**, 16075–16084.
- 162 G. Chen, H. Qiu, P. N. Prasad and X. Chen, *Chem. Rev.*, 2014, **114**, 5161–5214.
- 163 D. Mendez-Gonzalez, E. Lopez-Cabarcos, J. Rubio-Retama and M. Laurenti, *Adv. Colloid Interface Sci.*, 2017, **249**, 66–87.
- 164 Y. Wang, D. Luo, Y. Fang, W. Wu, Y. Wang, Y. Xia, F. Wu, C. Li, J. Lan and J. Chen, *Sens. Actuators, B*, 2019, **298**, 126900.
- 165 X. Chen, J. Lan, Y. Liu, L. Li, L. Yan, Y. Xia, F. Wu, C. Li, S. Li and J. Chen, *Biosens. Bioelectron.*, 2018, **102**, 582–588.
- 166 C. H. R, J. D. Schiffman and R. G. Balakrishna, *Sens. Actuators, B*, 2018, **258**, 1191–1214.
- 167 Y. Bai, Y. Lu, K. Wang, Z. Cheng, Y. Qu, S. Qiu, L. Zhou, Z. Wu, H. Liu, J. Zhao and H. Mao, *Nano-Micro Lett.*, 2019, **11**, 1–11.
- 168 G. Dobhal, D. Ayupova, G. Laufersky, Z. Ayed, T. Nann and R. V. Goreham, *Sensors*, 2018, **18**, 1–12.



- 169 S. Zong, J. Zong, C. Chen, X. Jiang, Y. Zhang, Z. Wang and Y. Cui, *Nanotechnology*, 2018, **29**, 065705.
- 170 X. Jiang, S. Zong, C. Chen, Y. Zhang, Z. Wang and Y. Cui, *Nanotechnology*, 2018, **29**, 175701.
- 171 F. He, J. Wang, B. C. Yin and B. C. Ye, *Anal. Chem.*, 2018, **90**, 8072–8079.
- 172 M. L. Gao, B. C. Yin and B. C. Ye, *Analyst*, 2019, **144**, 5996–6003.
- 173 M. Tayebi, M. Tavakkoli Yarak, H. Y. Yang and Y. Ai, *Nanoscale Adv.*, 2019, **1**, 2866–2872.
- 174 K. Huang, Z. Li, J. Lin, G. Han and P. Huang, *Chem. Soc. Rev.*, 2018, **47**, 5109–5124.
- 175 Q. Zhang, F. Wang, H. Zhang, Y. Zhang, M. Liu and Y. Liu, *Anal. Chem.*, 2018, **90**, 12737–12744.
- 176 C. Zhu, Z. Zeng, H. Li, F. Li, C. Fan and H. Zhang, *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, **135**, 5998–6001.
- 177 H. Wang, H. Chen, Z. Huang, T. Li, A. Deng and J. Kong, *Talanta*, 2018, **184**, 219–226.
- 178 D. Jin, F. Yang, Y. Zhang, L. Liu, Y. Zhou, F. Wang and G. J. Zhang, *Anal. Chem.*, 2018, **90**, 14402–14411.
- 179 M. K. Islam, P. Syed, L. Lehtinen, J. Leivo, K. Gidwani, S. Wittfooth, K. Pettersson and U. Lamminmäki, *Sci. Rep.*, 2019, **9**, 1–9.
- 180 C. Kim and K. Lee, *Biomacromolecules*, 2019, **20**, 3392–3398.
- 181 H. A. Abdulbari and E. A. M. Basheer, *ChemBioEng Rev.*, 2017, **4**, 92–105.
- 182 S. Kaushal, S. S. Nanda, S. Samal and D. K. Yi, *ChemBioChem*, 2020, **21**, 576–600.
- 183 S. Alim, J. Vejjayan, M. M. Yusoff and A. K. M. Kafi, *Biosens. Bioelectron.*, 2018, **121**, 125–136.
- 184 S. Shrivastava, N. Jadon and R. Jain, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2016, **82**, 55–67.
- 185 A. de la Escosura-Muñiz, C. Parolo and A. Merkoçi, *Mater. Today*, 2010, **13**, 24–34.
- 186 K. Boriachek, M. N. Islam, V. Gopalan, A. K. Lam, N. T. Nguyen and M. J. A. Shiddiky, *Analyst*, 2017, **142**, 2211–2219.
- 187 K. Boriachek, M. K. Masud, C. Palma, H. P. Phan, Y. Yamauchi, M. S. A. Hossain, N. T. Nguyen, C. Salomon and M. J. A. Shiddiky, *Anal. Chem.*, 2019, **91**, 3827–3834.
- 188 Y. G. Zhou, R. M. Mohamadi, M. Poudineh, L. Kermanshah, S. Ahmed, T. S. Safaei, J. Stojcic, R. K. Nam, E. H. Sargent and S. O. Kelley, *Small*, 2016, **12**, 727–732.
- 189 H. Zhang, Z. Wang, Q. Zhang, F. Wang and Y. Liu, *Biosens. Bioelectron.*, 2019, **124–125**, 184–190.
- 190 Z. Shi, G. Li and Y. Hu, *Chin. Chem. Lett.*, 2019, **30**, 1600–1606.
- 191 D. Fang, D. Zhao, S. Zhang, Y. Huang, H. Dai and Y. Lin, *Sens. Actuators, B*, 2020, **305**, 127544.
- 192 B. Qiao, Q. Guo, J. Jiang, Y. Qi, H. Zhang, B. He, C. Cai and J. Shen, *Analyst*, 2019, **144**, 3668–3675.
- 193 B. Chase, *Appl. Spectrosc.*, 1994, **48**, 14A–19A.
- 194 D. W. Shipp, F. Sinjab and I. Notingher, *Adv. Opt. Photonics*, 2017, **9**, 315.
- 195 U. K. Sur and J. Chowdhury, *Curr. Sci.*, 2013, **105**, 923.
- 196 M. Fan, G. F. S. Andrade and A. G. Brolo, *Anal. Chim. Acta*, 2020, **1097**, 1–29.
- 197 H. Guo, L. He and B. Xing, *Environ. Sci.: Nano*, 2017, **4**, 2093–2107.
- 198 J. Langer, D. Jimenez de Aberasturi, J. Aizpurua, R. A. Alvarez-Puebla and B. Auguie, *et al.*, *ACS Nano*, 2020, **14**, 28–117.
- 199 M. E. Stewart, C. R. Anderton, L. B. Thompson, J. Maria, S. K. Gray, J. A. Rogers and R. G. Nuzzo, *Chem. Rev.*, 2008, **108**, 494–521.
- 200 Y.-F. Tian, C.-F. Ning, F. He, B.-C. Yin and B.-C. Ye, *Analyst*, 2018, **143**, 4915–4922.
- 201 T.-D. Li, R. Zhang, H. Chen, Z.-P. Huang, X. Ye, H. Wang, A.-M. Deng and J.-L. Kong, *Chem. Sci.*, 2018, **9**, 5372–5382.
- 202 K. Sivashanmugan, W.-L. Huang, C.-H. Lin, J.-D. Liao, C.-C. Lin, W.-C. Su and T.-C. Wen, *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.*, 2017, **80**, 149–155.
- 203 S. Zong, L. Wang, C. Chen, J. Lu, D. Zhu, Y. Zhang, Z. Wang and Y. Cui, *Anal. Methods*, 2016, **8**, 5001–5008.
- 204 Z. Wang, S. Zong, Y. Wang, N. Li, L. Li, J. Lu, Z. Wang, B. Chen and Y. Cui, *Nanoscale*, 2018, **10**, 9053–9062.
- 205 S. Stremersch, M. Marro, B.-E. Pinchasik, P. Baatsen, A. Hendrix, S. C. De Smedt, P. Loza-Alvarez, A. G. Skirtach, K. Raemdonck and K. Braeckmans, *Small*, 2016, **12**, 3292–3301.
- 206 J. C. Fraire, S. Stremersch, D. Bouckaert, T. Monteyne, T. De Beer, P. Wuytens, R. De Rycke, A. G. Skirtach, K. Raemdonck, S. De Smedt and K. Braeckmans, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2019, **11**, 39424–39435.
- 207 C. Lee, R. Carney, K. Lam and J. W. Chan, *J. Raman Spectrosc.*, 2017, **48**, 1771–1776.
- 208 Y. Pang, J. Shi, X. Yang, C. Wang, Z. Sun and R. Xiao, *Biosens. Bioelectron.*, 2020, **148**, 111800.
- 209 G. Chen, A. C. Huang, W. Zhang, G. Zhang, M. Wu, W. Xu, Z. Yu, J. Yang, B. Wang, H. Sun, H. Xia, Q. Man, W. Zhong, L. F. Antelo, B. Wu, X. Xiong, X. Liu, L. Guan, T. Li, S. Liu, R. Yang, Y. Lu, L. Dong, S. McGettigan, R. Somasundaram, R. Radhakrishnan, G. Mills, Y. Lu, J. Kim, Y. H. Chen, H. Dong, Y. Zhao, G. C. Karakousis, T. C. Mitchell, L. M. Schuchter, M. Herlyn, E. J. Wherry, X. Xu and W. Guo, *Nature*, 2018, **560**, 382–386.
- 210 F. L. Ricklefs, Q. Alayo, H. Krenzlin, A. B. Mahmoud and M. C. Speranza, *et al.*, *Sci. Adv.*, 2018, **4**, eaar2766.
- 211 F. Gao, F. Jiao, C. Xia, Y. Zhao, W. Ying, Y. Xie, X. Guan, M. Tao, Y. Zhang, W. Qin and X. Qian, *Chem. Sci.*, 2019, **10**, 1579–1588.
- 212 E. A. Kwizera, R. O'Connor, V. Vinduska, M. Williams, E. R. Butch, S. E. Snyder, X. Chen and X. Huang, *Theranostics*, 2018, **8**, 2722–2738.
- 213 J. Carmicheal, C. Hayashi, X. Huang, L. Liu, Y. Lu, A. Krasnoslobodtsev, A. Lushnikov, P. G. Kshirsagar, A. Patel, M. Jain, Y. L. Lyubchenko, Y. Lu, S. K. Batra and S. Kaur, *Nanomedicine*, 2019, **16**, 88–96.
- 214 J. Park, M. Hwang, B. Choi, H. Jeong, J. Jung, H. K. Kim, S. Hong, J. Park and Y. Choi, *Anal. Chem.*, 2017, **89**, 6695–6701.
- 215 H. Shin, H. Jeong, J. Park, S. Hong and Y. Choi, *ACS Sens.*, 2018, **3**, 2637–2643.



- 216 R. Bhome, F. Del Vecchio, G.-H. Lee, M. D. Bullock, J. N. Primrose, A. E. Sayan and A. H. Mirnezami, *Cancer Lett.*, 2018, **420**, 228–235.
- 217 Y. Pang, C. Wang, L. Lu, C. Wang, Z. Sun and R. Xiao, *Biosens. Bioelectron.*, 2019, **130**, 204–213.
- 218 D. Ma, C. Huang, J. Zheng, J. Tang, J. Li, J. Yang and R. Yang, *Biosens. Bioelectron.*, 2018, **101**, 167–173.
- 219 L. Grasso, R. Wyss, L. Weidenauer, A. Thampi, D. Demurtas, M. Prudent, N. Lion and H. Vogel, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2015, **407**, 5425–5432.
- 220 Y. P. Chen, M. Q. Zou, C. Qi, M.-X. Xie, D.-N. Wang, Y.-F. Wang, Q. Xue, J.-F. Li and Y. Chen, *Biosens. Bioelectron.*, 2013, **39**, 112–117.
- 221 H. Shao, J. Chung, K. Lee, L. Balaj, C. Min, B. S. Carter, F. H. Hochberg, X. O. Breakefield, H. Lee and R. Weissleder, *Nat. Commun.*, 2015, **6**, 6999.
- 222 S. Jeong, J. Park, D. Pathania, C. M. Castro, R. Weissleder and H. Lee, *ACS Nano*, 2016, **10**, 1802–1809.
- 223 J. C. Contreras-Naranjo, H.-J. Wu and V. M. Ugaz, *Lab Chip*, 2017, **17**, 3558–3577.
- 224 S. S. Kanwar, C. J. Dunlay, D. M. Simeone and S. Negrath, *Lab Chip*, 2014, **14**, 1891–1900.
- 225 Z. Zhao, Y. Yang, Y. Zeng and M. He, *Lab Chip*, 2016, **16**, 489–496.
- 226 J. Sierra, J. Marrugo-Ramírez, R. Rodríguez-Trujillo, M. Mir and J. Samitier, *Sensors*, 2020, **20**, 1317.
- 227 J. Ko, M. A. Hemphill, D. Gabrieli, L. Wu, V. Yelleswarapu, G. Lawrence, W. Pennycooke, A. Singh, D. F. Meaney and D. Issadore, *Sci. Rep.*, 2016, **6**, 31215.
- 228 L.-G. Liang, M.-Q. Kong, S. Zhou, Y.-F. Sheng, P. Wang, T. Yu, F. Inci, W. P. Kuo, L.-J. Li, U. Demirci and S. Wang, *Sci. Rep.*, 2017, **7**, 46224.
- 229 R. Xu, D. W. Greening, H.-J. Zhu, N. Takahashi and R. J. Simpson, *J. Clin. Invest.*, 2016, **126**, 1152–1162.
- 230 F. A. W. Coumans, E. L. Gool and R. Nieuwland, *Platelets*, 2017, **28**, 242–248.
- 231 Y. Liu, Q. Liu, S. Chen, F. Cheng, H. Wang and W. Peng, *Sci. Rep.*, 2015, **5**, 12864.
- 232 S. L. Cobo, C. C. Silva, A. Moyano, M. O. Rodríguez, A. Paschen, M. Y. MÓ, M. Carmen, B. López and M. V. Gómez, *J. Nanobiotechnol.*, 2018, **16**, 47.
- 233 K. Sivashanmugan, W. L. Huang, C. H. Lin, J. Der Liao, C. C. Lin, W. C. Su and T. C. Wen, *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.*, 2017, **80**, 149–155.
- 234 S. D. Ibsen, J. Wright, J. M. Lewis, S. Kim, S. Y. Ko, J. Ong, S. Manouchehri, A. Vyas, J. Akers, C. C. Chen, B. S. Carter, S. C. Esener and M. J. Heller, *ACS Nano*, 2017, **11**, 6641–6651.
- 235 Q. Zhou, A. Rahimian, K. Son, D. S. Shin, T. Patel and A. Revzin, *Methods*, 2016, **97**, 88–93.
- 236 J. Van Deun, P. Mestdagh, P. Agostinis, Ö. Akay and S. Anand, *et al.*, *Nat. Methods*, 2017, **14**, 228–232.
- 237 J. A. Welsh, E. Van Der Pol, G. J. A. Arkesteijn, M. Bremer and A. Brisson, *et al.*, *J. Extracell. Vesicles*, 2020, **9**, 1713526.
- 238 J. McKiernan, M. J. Donovan, E. Margolis, A. Partin, B. Carter, G. Brown, P. Torkler, M. Noerholm, J. Skog, N. Shore, G. Andriole, I. Thompson and P. Carroll, *Eur. Urol.*, 2018, **74**, 731–738.

