

Desarrollo de una Metodología para la Detección de Agentes Químicos o Biológicos por Medio de Nanopartículas de Oro Conjugadas con Estreptavidina Marcada con Tetrametilrodamina

V. Meléndez Pérez¹, A. Orduña Díaz¹, M. Rojas López¹, L.S. Arcila Lozano¹.

¹Laboratorio de Instrumentación Analítica y Biosensores, Instituto Politécnico Nacional, Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada-Tlaxcala, Ex Hacienda San Juan Molino carretera estatal Tepetitla-Tecuecomac Km 1.5, Tepetitla de Lardizábal, C.P. 90700. Tlaxcala-México. violetamp13@hotmail.com.

Resumen— La detección de agentes químicos y biológicos juega un papel importante en áreas como la física, química, biología, medicina y nanotecnología. Esta última incorpora el uso de nanomateriales como las nanopartículas de oro, las cuales presentan propiedades fisicoquímicas importantes para el desarrollo de nuevas metodologías de reconocimiento y transducción para sensores químicos y biológicos. Algunas de las propiedades más relevantes de las nanopartículas de oro son las eléctricas, ópticas y de biocompatibilidad, además de que poseen un área superficial amplia, que permite la inmovilización de proteínas como la estreptavidina, permitiendo así la estabilización de las nanopartículas de oro, así como para la biofuncionalización con anticuerpos biotinilados, debido a que estos últimos se pueden inmovilizar eficientemente sobre esta proteína. El objetivo del presente estudio es desarrollar una metodología para la obtención de nanopartículas monodispersas de entre 15 y 20 nm, así como determinar la concentración adecuada de estreptavidina marcada con tetrametilrodamina para recubrir a las nanopartículas de oro para su posterior biofuncionalización con elementos de reconocimiento biológico específicos para la detección y cuantificación de agentes químicos y biológicos.

Palabras clave— Nanopartículas de oro, Conjugación, Biosensores.

I. INTRODUCCIÓN

La nanobiotecnología es un campo multidisciplinario que abarca áreas como la ingeniería, física, química, biología y ciencia de los materiales que por definición se ocupa de la ingeniería, construcción y manipulación de materiales en el rango de 1 a 100 nm para alguna aplicación o beneficio [8]. Los enfoques básicos de obtención de nanomateriales son: Botón up (de abajo hacia arriba) busca los medios y las herramientas para construir materiales combinando componentes más pequeños, como moléculas individuales y átomos, que se mantienen unidos por fuerzas covalentes y Top down (de arriba hacia abajo), se refiere al moldeado, tallado y fabricación de pequeños materiales y componentes mediante el uso herramientas mecánicas y láser [3].

Las nanopartículas de oro desde hace varios años se han utilizado en aplicaciones biomédicas como la liberación de medicamentos en un sitio específico en el cuerpo o en una célula para detección, diagnóstico y para fines terapéuticos

[8]. Estas, al ser sintetizadas en estado coloidal (Método Turkevich), adquieren la morfología de esferas cuyo tamaño varía entre 1 a 100 nm, y son ampliamente utilizadas en biosensores por su estabilidad [6]. Además, de que las nanopartículas de oro por sí solo no muestra ningún efecto adverso sobre los elementos de reconocimiento biológico, no desnaturalizan a las biomoléculas, el área de superficie global es amplia por lo que adapta mayor número de elementos de reconocimiento biológico, mejora las señales ópticas (resonancia de plasmon superficial) [2], electroquímicas y la relación señal / ruido [5].

Las nanopartículas estabilizadas por ligandos aniónicos, como derivados de ácido carboxílico, citrato, tartrato y ácido lipoico, permiten la unión efectiva a las cadenas laterales de aminoácidos de la proteína cargada positivamente por los grupos aniónicos cargados negativamente en su superficie, un ejemplo de ellos es la estreptavidina que es una proteína de 66 kDa purificada de la bacteria *Streptomyces avidinii*, se ha utilizado ampliamente en inmunohistoquímica e inmunoensayos debido a su alta especificidad y gran afinidad por la biotina [7]. El objetivo del presente estudio es desarrollar una metodología para la obtención de nanopartículas monodispersas de entre 15 y 20 nm, así como determinar la concentración adecuada de estreptavidina marcada con tetrametilrodamina para recubrir a las nanopartículas de oro, para su posterior biofuncionalización con elementos de reconocimiento biológico específicos para la detección y cuantificación de agentes químicos y biológicos.

II. METODOLOGÍA

1) *Síntesis de nanopartículas de oro*: Se realizó por el método Turkevich que consiste en disolver ácido tetracloroáurico (HAuCl_4) en agua desionizada, para posteriormente calentar con agitación de 200 rpm, posteriormente se adiciono solución de citrato de sodio con las siguientes concentraciones 2.9% (Reacción 1), 1.7% (Reacción 2), 1.5% (Reacción 3), 1.3% (Reacción 4) dejando sintetizar por 30 min, posteriormente se caracterizaron individualmente por de espectroscopia UV-visible. La solución obtenida se centrifugan a 9000 rpm durante 40 minutos a 4 °C y se resuspendiendo en agua desionizada.

2) *Determinación del tamaño y concentración de nanopartículas de oro:* Para la determinación del tamaño (d) y concentración (N) de nanopartículas de oro, se emplearon las ecuaciones descritas por Haiss et al. 2007.

3) *Conjugación de nanopartículas de oro con estreptavidina marcada con tetrametilrodamina:* Para la conjugación de las nanopartículas de oro con estreptavidina marcada con tetrametilrodamina (TRITC), se emplearon concentraciones crecientes de estreptavidina marcada con tetrametilrodamina 0 $\mu\text{g/ml}$ (Conjugado 1), 100 $\mu\text{g/ml}$ (Conjugado 2), 150 $\mu\text{g/ml}$ (Conjugado 3), 200 $\mu\text{g/ml}$ (Conjugado 4), 250 $\mu\text{g/ml}$ (Conjugado 5) y 300 $\mu\text{g/ml}$ (Conjugado 6) para los diferentes conjugados, incubando por 5 minutos a temperatura ambiente.

4) *Determinación de la concentración de estreptavidina marcada con TRITC:* En la determinación de la concentración de estreptavidina se realizó una titulación con cloruro de sodio al 10%, observando algún cambio de coloración si las nanopartículas de oro no fueron conjugadas en su totalidad por la estreptavidina marcada con TRITC.

5) *Caracterización del conjugado por espectroscopia UV-Visible:* Se realizaron mediciones de cada uno de los conjugados obtenidos en el equipo en un equipo UV/Vis Evolution 300 (ThermoScientific™) con una celda de cuarzo con paso óptico de 1cm, analizando los espectros obtenidos con el programa Origin 6.0.

III. RESULTADOS

1) *Síntesis de nanopartículas de oro:* La caracterización de las nanopartículas de oro por UV-visible se muestra en la Figura 1, en donde la banda intensa entre 520-550 nm es asociada a la resonancia de plasmon superficial, para cada una de las reacciones, la cual es característica de las nanopartículas de oro esféricas.

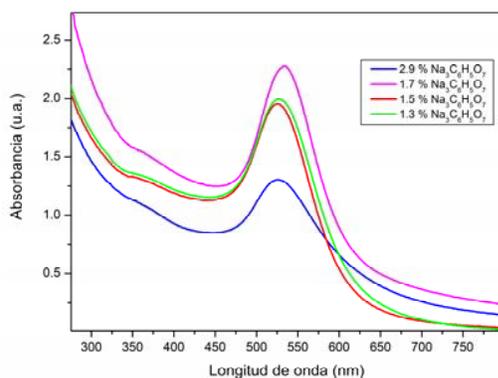


Fig. 1. Espectros UV-visible de las síntesis de nanopartículas de oro.

A partir del espectro UV-visible de cada una de las reacciones se obtuvieron los parámetros mostrados en la Tabla 1, observándose que la concentración de citrato de sodio influye en el desplazamiento del pico.

TABLA 1.
TAMAÑO Y CONCENTRACIÓN DE PARTÍCULAS ESTIMADA MEDIANTE LAS ECUACIONES DE HAISS^[4].

No. Reacción	λ (nm)	Abs _{7ps}	Abs ₄₅₀	Tamaño de partícula (nm)	N (partículas/mL)
1	529	1.24	0.84	8	2×10^{13}
2	526	1.31	0.85	9	1×10^{13}
3	527	1.95	1.13	16	1.75×10^{12}
4	524	1.99	1.17	20	1.34×10^{12}
5	534	2.27	1.25	26	6.3×10^{11}

También se puede ver una correlación entre tamaño de partícula (d) y la concentración de partículas por mililitro (N), donde el tamaño de partícula es inversamente proporcional a la concentración de partículas, como se muestra en la Figura 2.

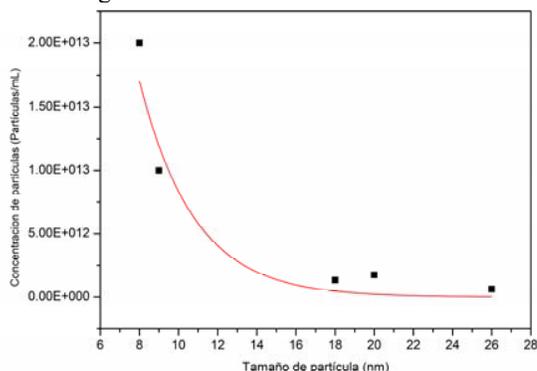


Fig. 2. Relación entre Tamaño de nanopartícula (nm) y Concentración de partículas (Partículas/mL) de las síntesis de nanopartículas de oro

2) *Conjugación de Nanopartículas de oro con estreptavidina marcada con TRITC:* Los espectros UV-visible del conjugado nanopartícula de oro – estreptavidina muestran un desplazamiento hacia longitudes de onda mayor, debido a la presencia de esta proteína sobre la superficie de nanopartículas de oro [1]. Esto lleva a que la frecuencia de resonancia del plasmon superficial sea más baja, y por lo tanto la longitud de onda sea más alta, con respecto a las nanopartículas de oro como se observa en la Figura 2. Igualmente se puede observar que la banda característica de las nanopartículas de oro sufre un ensanchamiento.

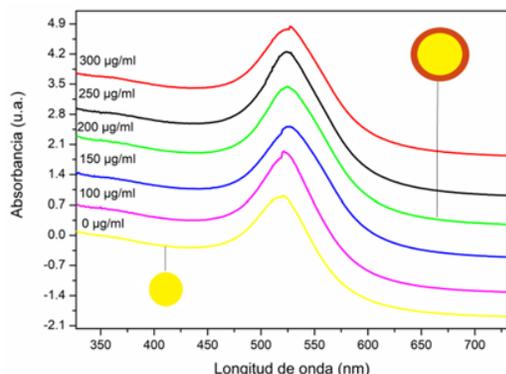


Fig. 3. Espectro UV-visible de las conjugaciones de nanopartículas de oro con estreptavidina marcada con TRITC.

Lo descrito anteriormente se puede verificar en la Tabla 2, donde se especifican las concentraciones utilizadas, así como la determinación de la concentración adecuada de estreptavidina marcada con TRITC para cubrir a las nanopartículas de oro.

TABLA 2.

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ESTREPTAVIDINA MARCADA CON TETRAMETILRODAMINA

No. Conjugado	Concentración de estreptavidina marcada con tetrametilrodamina	Longitud de onda (nm)	Cambio de coloración	
			Positivo	Negativo
1	0 µg/ml	520	+	
2	100 µg/ml	523	+	
3	150 µg/ml	525		+
4	200 µg/ml	526		+
5	250 µg/ml	527		+
6	300 µg/ml	528		+

IV. DISCUSIÓN

De los resultados experimentales se observó que la concentración y el tamaño de las nanopartículas de oro, se ve afectada por la concentración de citrato de sodio, es decir que el aumento o disminución de la concentración de este, afecta el tamaño de nanopartícula y por lo tanto la concentración de partículas disminuye o aumenta, como se muestra en la Tabla 1 y Figura 2.

En cuanto la conjugación de las nanopartículas de oro con estreptavidina marcada con tetrametilrodamina se puede observar que al aumentar la concentración de estreptavidina marcada con tetrametilrodamina el desplazamiento de la banda se dirige hacia longitudes mayor, esto se puede deber a un amortiguamiento de la frecuencia de oscilación dipolar del plasmon de superficie, como se muestra en la Figura 3 y Tabla 2. También se puede decir que el aumento de la

concentración de estreptavidina marcada con tetrametilrodamina en los diferentes conjugados, proporciona estabilidad a las nanopartículas de oro esto se puede verificar en la titulación con NaCl donde la coloración del conjugado cambia de color como describe la Tabla 2.

V. CONCLUSIÓN

De acuerdo con el objetivo planteado, las reacciones 3 y 4 que involucra 1.5 % de citrato de sodio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) y 1.7 % de citrato de sodio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) respectivamente, proporcionan el tamaño de partícula requerido para dicho proyecto, además que la concentración de citrato de sodio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) afecta tanto en el tamaño como en la concentración de partículas.

Asimismo que la concentración adecuada de estreptavidina marcada con tetrametilrodamina para cubrir la superficie de las nanopartículas de oro y proporcionarles estabilidad es a partir de 150 µg/ml debido a que no presenta ningún cambio de coloración.

Por lo tanto se puede informar que el conjugado nanopartículas de oro-estreptavidina marcada con TRITC, es adecuado para su posterior biofuncionalización y de esta forma detectar agentes químicos y biológicos.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Arcila-Lozano, L. S. Arcila-Lozano, L. S., Ríos-Corripio, M. A., García-Pérez, B. E., Jaramillo-Flores, M. E., González, C. A., Rocha-Gracia, R. C., Rojas-López, M. (2017). Fluorescent Bioconjugate Based on Gold Nanoparticles for the Determination of *Staphylococcus aureus*. *Analytical Letters*, 50(7), 1150–1167. <https://doi.org/10.1080/00032719.2016.1212204>.
- [2] De Mol, N. J., & Fischer, M. J. E. (2010). *Surface Plasmon Resonance: Methods and Protocols*. *Life Sciences*. <https://doi.org/10.1007/978-1-60761-670-2>.
- [3] Fallis, a. . (2013). *Bioinspired devices and materials of the future. Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 53). <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.
- [4] Haiss, W., Thanh, N. T. K., Aveyard, J., & Fernig, D. G. (2007). Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-Vis spectra. *Analytical Chemistry*, 79(11), 4215–4221. <https://doi.org/10.1021/ac0702084>.
- [5] Iqbal, M., Usanase, G., Aberkane, F., Bendaikha, T., Fessi, H., Zine, N., ... Elaissari, A. (2016). Preparation of gold nanoparticles and determination of their particles size via different methods, 79, 97–104. <https://doi.org/10.1016/j.materresbull.2015.12.026>.
- [6] Kimling, J., Maier, M., Okenve, B., Kotaidis, V., Ballot, H., & Plech, A. (2006). Turkevich Method for Gold Nanoparticle Synthesis Revisited.pdf. *Journal of Physical Chemistry B*, 110(95 mL), 15700–15707. <https://doi.org/10.1021/jp061667w>.
- [7] Yang, Z., Luo, S., Li, J., Shen, J., Yu, S., Hu, X., & Dionysiou, D. D. (2014). A streptavidin functionalized graphene oxide/Au nanoparticles composite for the construction of sensitive chemiluminescent immunosensor. *Analytica Chimica Acta*, 839, 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.05.033>.



- [8] Yoon, J.-Y. (2013). *Introduction to Biosensors. Introduction to Biosensors: From Electric Circuits to Immunosensors*. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6022-1>.

Simposio de Bioinstrumentación, Biosensores y Micro/Nano Tecnologías