



Universidad de Oviedo

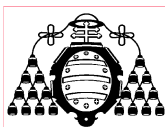
MÁSTER EN CIENCIAS ANALÍTICAS Y BIOANALÍTICAS

Trabajo Fin de Máster

Síntesis, caracterización y empleo de Nanoclusters de Oro en el desarrollo de un inmunoensayo fotoluminiscente: aplicación a la determinación de IgE

María Cruz Alonso

Julio 2014, Oviedo



Dr. José Manuel Costa Fernández, Profesor Titular del Departamento de Química Física y Analítica de la Facultad de Química de la Universidad de Oviedo.

CERTIFICA:

Que el presente Trabajo, titulado “Síntesis, caracterización y empleo de Nanoclusters de Oro en el desarrollo de un inmunoensayo fotoluminiscente: aplicación a la determinación de IgE.”

ha sido realizado por la licenciada María Cruz Alonso, en el Departamento de Química Física y Analítica de la Universidad de Oviedo bajo su dirección, constituyendo el Trabajo de Fin de Máster del interesado en el curso académico 2013-14, y cuya presentación autorizo.

Oviedo, 24 de Junio de 2014

Fdo: José Manuel Costa Fernández

Resumen

Los nanomateriales, son materiales cuyo interés está en continuo crecimiento en las últimas décadas. Particularmente los Nanoclusters metálicos (NCs) son un nuevo tipo de nanomaterial fotoluminiscente que gracias a sus características particulares se convierten en una nueva clase de fluoróforos biocompatibles potencialmente muy útiles en aplicaciones como marcaje biológico, lo cual puede ser de gran interés para determinación de diferentes moléculas biológicas.

Dentro de los Nanocluster, hay que hacer especial mención a los Nanocluster de Oro, en los cuales se ha hecho un gran progreso para optimizar su síntesis con diferentes ligandos. No obstante aún no se ha conseguido solucionar diversos problemas, como su unión a una biomolécula. Por ello, en este trabajo Fin de Máster se va a realizar una optimización de su síntesis y caracterización, así como su bioconjugación con un anticuerpo.

La aplicabilidad de estos Nanoclusters como marcaje biológico, debido a sus propiedades ópticas y biocompatibilidad, ha hecho que se puedan usar en inmunoensayos. Por ello, actualmente es una línea de investigación bastante activa.

Por otra parte, la IgE es una glicoproteína que está relacionada con procesos alérgicos, pudiéndose utilizar como biomarcador de la presencia de alergias en el ser humano. Por esta razón en el presente Trabajo Fin de Máster se va a desarrollar un inmunoensayo para la determinación de IgE para detectar alergias producidas por proteínas de la leche, usando las propiedades características de AuNCs como marcador.

Agradecimientos

En primer lugar me gustaría agradecer a Laura Trapiella Alfonso, por su supervisión, consejo, ayuda y paciencia durante estos meses, en los que gracias a ella he aprendido muchos conceptos nuevos y por ayudarme a introducirme en el mundo de los nanomateriales, que para mí hasta este momento era casi desconocido. He aprendido mucho estos meses y se debe en gran parte a ella, y ha sido una de las personas que me han enseñado que, al final, con trabajo y perseverancia, se llega a obtener todo lo que me proponía.

Gracias al Dr. José M. Costa-Fernández, Profesor Titular de la Universidad de Oviedo, por sus enseñanzas y por guiarme por el mundo de la investigación como ha hecho, con optimismo y tesón. Me siento muy agradecida por haberlo tenido tanto como profesor durante el Máster, así como tutor en este Trabajo Fin de Máster. Ha sido un placer poder realizar este trabajo con él.

Por otra parte me gustaría agradecer al Grupo de Investigación de Espectrometría Analítica, por permitirme formar parte durante estos meses de una de sus investigaciones y poder realizar así el Trabajo Fin de Máster.

Mención especial quiero hacer, como agradecimiento, a mis compañeros del Máster, ya que muchas veces sin su ayuda no hubiera sido posible estar terminando el Trabajo Fin de Máster, tanto en el aspecto académico como en el apoyo recibido.

Índice

I.	INTRODUCCIÓN	1
1.	Nanociencia y Nanotecnología	1
1.1.	Nanomateriales	3
2.	Nanoclusters Metálicos	5
2.1.	Propiedades	7
2.2.	Síntesis y Caracterización de Nanoclusters	8
2.3.	Aplicaciones	8
2.4.	Nanoclusters de Oro	10
3.	Inmunoensayos	11
3.1.	Tipos de inmunoensayos	12
3.2.	Fluoroimmunoensayos basados en nanoclusters	14
4.	Inmunoglobulina IgE	14
II.	OBJETIVOS	17
III.	EXPERIMENTAL	19
1.	Instrumentación	19
2.	Material utilizado	20
3.	Reactivos empleados	20
4.	Procedimientos experimentales	22
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
1.	Síntesis, purificación y caracterización de Nanocluster de Oro.	27
1.1.	Caracterización por Fluorescencia	27
1.2.	Estudios de Fluorescencia en Nanoclusters de Oro	28
1.3.	Caracterización de AuNCs mediante ICP-MS	32
1.4.	Caracterización de AuNCs mediante HR-TEM	33

2.	Bioconjugación	36
2.1.	Caracterización por Fluorescencia	37
2.2.	Inmunoensayo espectrofotométrico	38
2.3.	Conclusiones finales a la Bioconjugación	41
3.	Inmunoensayo para la determinación de IgE	42
3.1.	En placa	42
3.2.	Microscopía confocal	43
V.	CONCLUSIONES	49
VI.	TRABAJOS FUTUROS	51
VII.	BIBLIOGRAFÍA	52
VIII.	ANEXOS	56
1.	Anexo 1: Nanoclusters de Oro	56
2.	Anexo 2: Bioconjugación	59
3.	Anexo 3: Inmunoensayo	61

I. Introducción

1. Nanociencia y Nanotecnología

En las últimas décadas los conceptos de Nanociencia y Nanotecnología han ido alcanzando un alto grado de desarrollo en el mundo científico y de investigación, así como presentando un impacto cada vez más apreciable en la sociedad actual. Muchos productos y aplicaciones basados en el empleo de los materiales aparecidos como resultado de los desarrollos en el ámbito de la Nanociencia y Nanotecnología ya se han empezado a comercializar. De manera particular, las aplicaciones actuales más exitosas de la Nanotecnología se centran principalmente en los siguientes sectores: la microelectrónica, la informática, las comunicaciones, la automoción, la aeronáutica, la logística militar, la salud humana y animal, la cosmética y el medio ambiente [1].

Los inicios de la Nanotecnología y de la Nanociencia se deben a Richard Feynman, cuya conferencia, en diciembre de 1959, marcó el inicio del interés acerca de esta ciencia. En esta conferencia, titulada "*There's Plenty of Room at the Bottom*" ("Hay mucho sitio al fondo"), Feynman destacó los beneficios que supondría la investigación en este campo preguntándose: "*What would happen if we could arrange the atoms one by one the way we want them?*" (¿Qué pasaría si pudiéramos colocar los átomos uno a uno de la manera que quisiéramos?) [2].

Aún en la actualidad, es difícil establecer una distinción estricta entre los dos términos. Por ello, la manera de definir Nanotecnología y Nanociencia por separado es una tarea difícil, ya que se pueden encontrar diferentes definiciones en la bibliografía las cuales se diferencian en pequeños aspectos. Aun así se podría decir que la **Nanociencia** es un área de la ciencia que centra su estudio en la síntesis, análisis y manipulación de materiales a nivel atómico o molecular, donde las características o propiedades fisicoquímicas son diferentes a las que presenta el mismo material a escala macroscópica. Por otra parte, la **Nanotecnología** es el conjunto de técnicas multidisciplinares que se usan para el estudio, diseño, creación, síntesis, manipulación y aplicación de materiales, aparatos o sistemas, cuya forma y tamaño se controlan en la nanoescala [3,4].

Hay que destacar el carácter multidisciplinar que tienen estas dos áreas de la ciencia. De esta manera, tanto la Nanociencia como la Nanotecnología aúnan diferentes áreas de la investigación. Como se puede observar en la Figura 1, las diferentes áreas que convergen en la Nanotecnología son la electrónica, la biotecnología, la química, la medicina, la ingeniería, la farmacia, la física, entre otros [5].

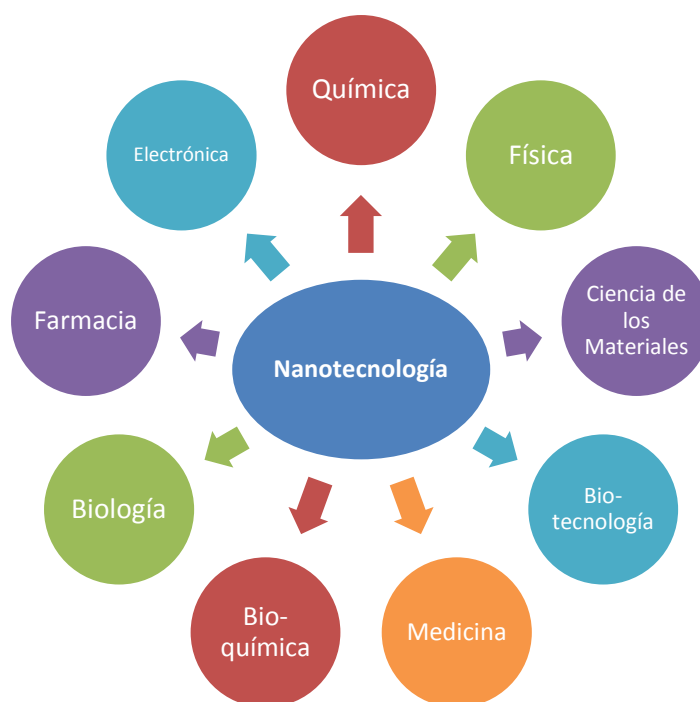


Figura 1: Diferentes áreas relacionadas con la Nanotecnología

Un aspecto importante a destacar es el impacto que ha tenido la Nanotecnología dentro del ámbito de la Química Analítica. Así, actualmente existe una relación bidireccional entre la Nanotecnología y la Química Analítica. En efecto, la Nanotecnología genera nuevos materiales “nano” que pueden considerarse como una nueva generación de analitos, dando lugar a la necesidad de nuevos (o mejorados) métodos de detección, caracterización y cuantificación adaptados a las dimensiones y propiedades de estos nanomateriales. Pero estos nanomateriales a su vez pueden usarse como herramientas para el desarrollo o la mejora de diferentes procesos analíticos, como por ejemplo de medida de la señal analítica, debido a sus interesantes propiedades.

Estas áreas de investigación, la Nanociencia y la Nanotecnología, se centran en el estudio de objetos que están en lo que se denomina “*escala nanométrica*”. Dicha escala hace referencia directa al nanómetro, unidad de longitud que equivale a una mil millonésima parte de un metro ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$). Así, de manera general se considera que la nanoescala está comprendida entre 1 a 100 nm, como se puede observar en la Figura 2, con una comparativa de los materiales “nano”, con respecto a otros sistemas de diferentes tamaños [6].

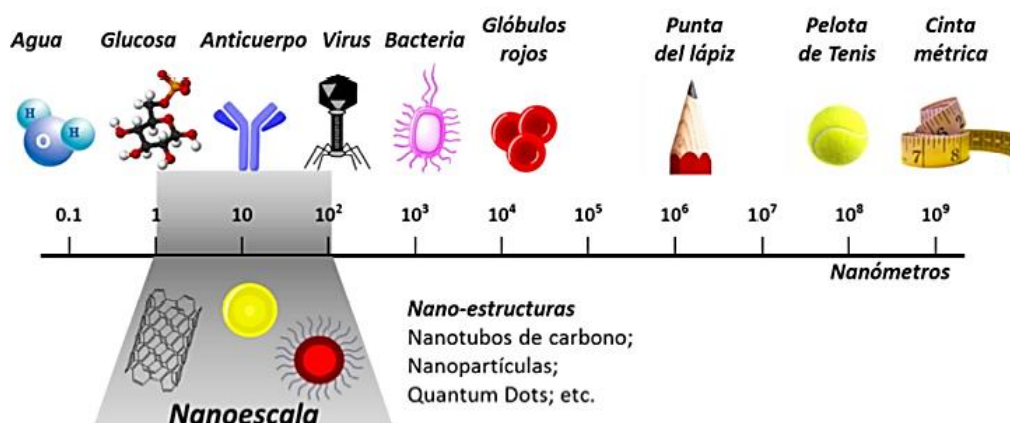


Figura 2: Diagrama representativo de especies en diferentes escalas de tamaños. En sombreado aparece resultado materiales típicos que se consideran en el ámbito de la Nanoescala [3]

Por ello, el aspecto diferencial en estas áreas de investigación y en desarrollo, es el tamaño. La disminución del tamaño es lo que provoca el interés en investigar estos nuevos confines de la ciencia, ya que al disminuir el tamaño de las partículas y alcanzar un determinado tamaño, las partículas comienza a comportarse según la mecánica cuántica. Así muchas de las propiedades físicoquímicas se modifican al disminuir de tamaño. Una característica derivada de la disminución del tamaño es el incremento de la relación superficie/volumen, de manera que al disminuir el tamaño el área superficial por unidad de masa aumenta, lo que provoca un mayor número de átomos en la superficie. Se consigue así una mayor reactividad y por tanto se amplía el campo de aplicaciones, siendo ideal para el uso en materiales compuestos, reacciones químicas, liberación controlada de medicamentos y almacenamiento de energía. [5]

1.1. Nanomateriales

Hoy en día se considera **nanomaterial** a todos aquellos materiales que contienen al menos una dimensión en la nanoescala [7]. Este término es muy amplio y engloba diferentes tipos de estructuras como por ejemplo liposomas, dendrímeros, nanorods de carbono, nanotubos de carbono, fullerenos, derivados de grafeno, óxidos de titanio, nanohilos de nitruro de gadolinio, nanopartículas de plata, oro y magnéticas y puntos cuánticos [8].

Debido a la variedad de los nanomateriales hay diferentes criterios de clasificación, como su homogeneidad, su naturaleza o su dimensionalidad, siendo éste último el criterio el más habitual para realizar la clasificación de los mismos. Así, se establecen cuatro categorías, de manera que en cada una de ellas se relaciona con el número de dimensiones de la nanoestructura que superan la nanoescala [3,5]. Estas cuatro categorías son las siguientes:

- Nanoestructuras 0-D: son los materiales que tienen todas sus dimensiones en el orden de la nanoescala y además su tamaño global también debe encontrarse dentro de la nanoescala. Como ejemplo de este tipo se pueden mencionar las nanopartículas metálicas, los quantum dots y los nanoclusters metálicos.
- Nanoestructuras 1-D: en esta clase una de las dimensiones del nanomaterial se encuentra en la escala micro/macrométrica. Ejemplos de este tipo son los nanotubos de carbono, los nanoalambres (nanowires) y las nanovarillas (nanorods).
- Nanoestructuras 2-D: en este caso dos de las dimensiones del nanomaterial se encuentran en la escala micro/macrométrica. Como ejemplo se pueden citar los nanorrecubrimientos superficiales.
- Nanoestructuras 3-D: las tres dimensiones del material son superiores a 100 nm, pero el material está formado por un conjunto de nanoestructuras de los grupos anteriores. Un ejemplo son las nanopartículas ensambladas formando bloques de tamaño micro/macrométrico.

En cuanto a la síntesis de estos nanomateriales, se pueden encontrar dos grandes metodologías. Por una parte se encuentra la *síntesis de arriba a abajo o “top-down”*, la cual se basa en comenzar con el material macroscópico respectivo y reducir el tamaño hasta llegar al nanomaterial. Por otro lado tenemos la aproximación de la *síntesis de abajo a arriba o “bottom-up”*, en la cual la síntesis del nanomaterial se hace a partir del crecimiento de sus componentes más pequeños como por ejemplo átomo a átomo o molécula a molécula. Con este último tipo de síntesis se consigue un gran control tanto de tamaño como de las propiedades del nanomaterial [1,5].

Por último, cabe destacar que existe una imperiosa necesidad de disponer de nuevas herramientas de caracterización de los nanomateriales. Existen un variado número de técnicas y metodologías de caracterización de nanomateriales que deben emplearse de manera rutinaria. Esta variedad y complementariedad de técnicas se justifica ya que, características tales como la estructura molecular, la composición química, el punto de fusión y punto de ebullición, el pH, la solubilidad, entre otras deben determinarse para estos nuevos materiales de la misma manera que ya fueron determinadas para sus respectivos materiales macroscópicos. Además, la caracterización de nanomateriales hace especial hincapié en parámetros como la distribución del tamaño, el tamaño, la porosidad, la superficie, la forma entre otras características. Así, las técnicas más utilizadas actualmente para la caracterización de nanomateriales se recogen a modo de resumen en la Tabla 1 [8,9].

CARACTERIZACIÓN DE	TÉCNICAS
Tamaño y distribución de tamaño	<ul style="list-style-type: none">- DLS (Dynamic Light Scattering)- TEM (Microscopio electrónico de transmisión)- SEM (Microscopía Electrónica de Barrido)
Análisis morfológico	<ul style="list-style-type: none">- TEM- SEM
Determinación de la carga superficial	<ul style="list-style-type: none">- Potencial Z
Composición química y estructural	<ul style="list-style-type: none">- EDX (Espectroscopía de Rayos X.)- Espectrometría de masas molecular (MALDI-, ESI-MS)- Espectrometría de masas elemental (ICP-MS)- FTIR (Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier)- XPS (Espectroscopía Fotoelectrónica de Rayos X)- RMN (Resonancia Magnética Nuclear)- TGA (Análisis Termogravimétrico)
Propiedades intrínsecas	<ul style="list-style-type: none">- SQUID (propiedades magnéticas)- UV-Vis (Absorción del plasmón superficial)- Fotoluminiscencia (fluorescencia y fosforescencia)

Tabla 1: Técnicas más comunes de caracterización de nanomateriales

2. Nanoclusters Metálicos

Los Nanoclusters metálicos (NCs) están formados por unos pocos hasta las pocas centenas de átomos y son un nuevo tipo de nanomaterial fotoluminiscente que en la actualidad está siendo de gran interés [10]. Los nanoclusters son, por definición, un tipo de nanopartícula metálica que cuando su tamaño comienza a ser comparable con la longitud de onda de Fermi de un electrón, la estructura en bandas se rompe en niveles discretos de energía (ver Figura 3) debido a que en ese momento tanto el tamaño como en número de átomos comienza a ser limitado [11].

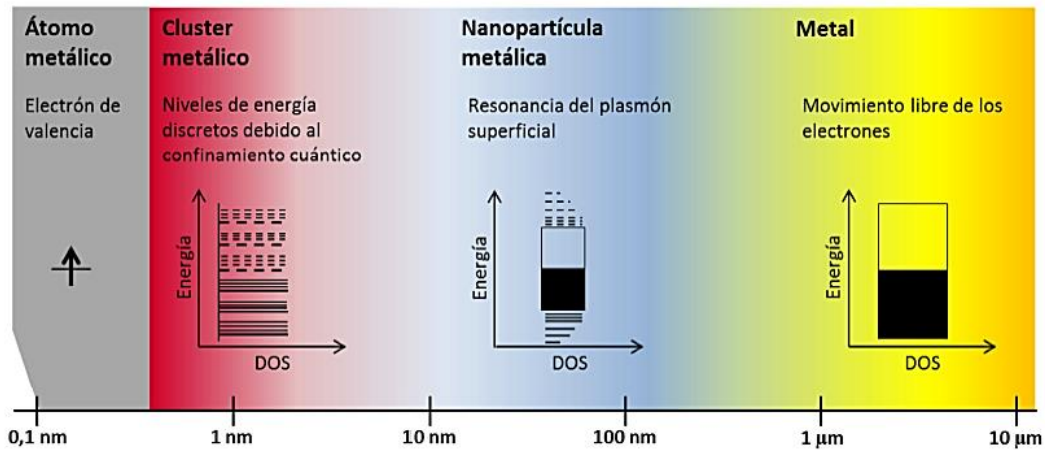


Figura 3: Transformación de la banda de energía al pasar a NCs, creándose niveles de energía discretos

[3]

La separación en niveles de energía cuantizados, que tiene lugar cuando se reduce la dimensión del material a la escala nanométrica, hace que las propiedades de estos nanoclusters se modifiquen drásticamente, presentando nuevas características ópticas, eléctricas y químicas con respecto a los metales macroscópicos [10]. Su característica distintiva y principal es su alta fotoluminiscencia, además de poseer una buena fotoestabilidad y largos desplazamientos de Stokes. Los NCs metálicos presentan un intervalo de tamaños comprendido entre los 0,2 a 2-3 nm (Figura 4). Actualmente es posible realizar la síntesis de NCs metálicos fluorescentes solubles en agua con diferentes ligandos y con diferentes colores de emisión con posibilidad de ser biocompatibles con diferentes moléculas. De esta manera se crea una nueva clase de ultrapequeños fluoróforos biocompatibles para aplicaciones tales como marcaje biológico [10].

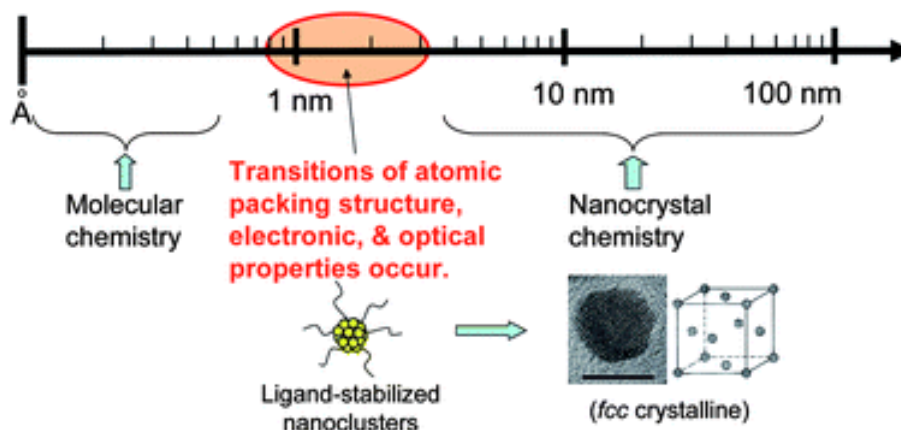


Figura 4: Detalle de la región de la nanoescala en donde se encuentran los nanoclusters [11].

Gracias a los avances en la síntesis de este tipo de nanomateriales y a las extraordinarias propiedades ópticas que presentan, hoy en día se puede decir que los nanoclusters metálicos han adquirido un gran interés analítico. Así, además de su pequeño tamaño (apropiado para ser empleados en marcaje de elementos a nivel celular) presentan una alta fotoestabilidad, elevados rendimientos cuánticos de la luminiscencia, biocompatibilidad, baja toxicidad y alta sensibilidad que los hacen muy atractivos en el desarrollo de aplicaciones como sensores e *imaging* [13].

2.1. Propiedades

Entre las principales propiedades de los nanoclusters hay que mencionar una fuerte emisión fluorescente dependiente de la naturaleza del metal, del tamaño del nanocluster, del tipo de ligando y del medio en el que se encuentra el nanocluster. Por otra parte, este tipo de nanomateriales presenta una elevada fotoestabilidad, largos desplazamientos de Stokes, ausencia en la intermitencia en la emisión, absorción de dos fotones, rendimientos cuánticos de la fluorescencia aceptables, una relación superficie-volumen elevada, propiedades catalíticas y una baja toxicidad [10, 14].

Pero sin lugar a dudas, las propiedades de los nanoclusters que más nos interesan desde un punto de vista bioanalítico son las propiedades ópticas. Debido a su pequeño tamaño, la banda en los estados electrónicos, que suele ser continua en metales, se rompe en niveles discretos. De este modo, cuando los NCs interactúan con la radiación electromagnética se producen diferentes transiciones electrónicas intra e interbanda, provocando la aparición de espectros tanto de absorción como de emisión [10]. Sin embargo, aún a día de hoy no se ha descrito un mecanismo general para explicar la emisión fluorescente de los NCs. Además, dicha emisión luminiscente puede ser modificada dependiendo del tamaño, los ligandos elegidos para recubrir la superficie del nanomaterial y la de la ruta sintética seleccionada para su síntesis, como se ha mencionado con anterioridad. A modo de ejemplo la Figura 5 muestra cómo la emisión de AuNCs se modifica según el tamaño del nanomaterial [3].

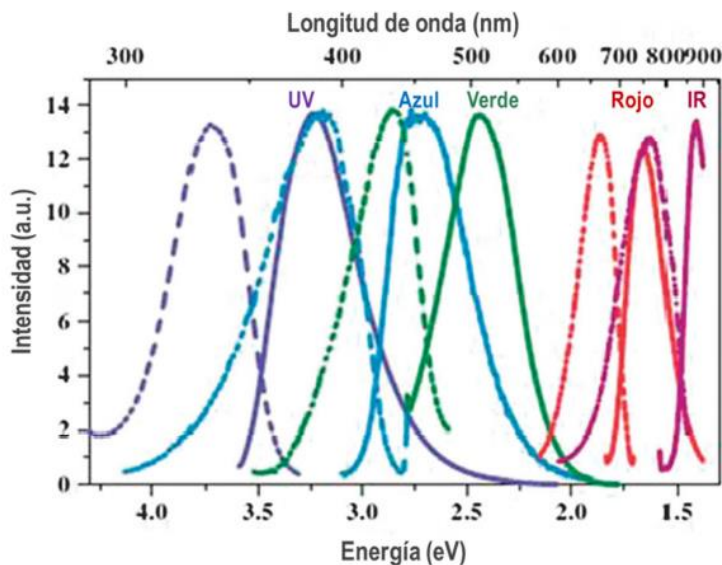


Figura 5: Diferencias en los máximos de emisión de las bandas fotoluminiscente observadas dependiendo del tipo de NCs [3]

2.2. Síntesis y Caracterización de Nanoclusters

Aunque no existe un procedimiento genérico para la síntesis de nanoclusters, de modo general se podría decir que los métodos existentes se basan principalmente en la reducción del ion metálico en presencia de un ligando determinado. Aun así, el proceso de síntesis depende mucho tanto del tipo de metal como del tipo de ligando utilizado y por ello la síntesis de los NCs que se van a desarrollar en el presente Trabajo Fin de Máster se explicará más adelante (ver sección de Experimental, Apartado 4.1).

En cuanto a las técnicas de caracterización utilizadas, en el caso de los nanoclusters metálicos, cobra especial relevancia sus propiedades fotoluminiscentes, al ser tan características de los mismos. Por ello se utilizará con gran frecuencia el análisis fluorescente, midiendo la radiación emitida posteriormente a someter a la muestra a una fuente de radiación que la excita.

2.3. Aplicaciones

A raíz de las propiedades características de estos nanomateriales, los NCs se presentan como alternativas a los fluoróforos convencionales (particularmente moléculas orgánicas fotoluminiscentes) en diferentes campos, tanto de investigación como de aplicaciones tecnológicas. De manera más concreta se establecen como una alternativa interesante a los marcadores luminiscentes convencionales en el campo bioanalítico [15].

Los NCs metálicos fluorescentes muestran un gran potencial como marcadores ópticos para la detección biológica sensible, debido a su buena solubilidad en agua, los grandes desplazamientos de Stokes, su baja toxicidad y su alta emisión [10].

- Sensores químicos fluorescentes

Los NCs metálicos pueden ser utilizados para la detección de distintas moléculas a raíz de la interacción directa de estas moléculas con la superficie del NC provocando modificaciones en sus propiedades fluorescentes.

La determinación de iones de metales pesados en sistemas biológicos y en el medio ambiente tiene una gran importancia debido a los efectos tóxicos que dichos metales presentan tanto al ecosistema como en la salud humana. En la actualidad, diferentes tipos de NCs metálicos fluorescentes se aplican para detectar estos tipos de iones metálicos de interés medioambiental tales como el Hg^{2+} o el Cu^{2+} , los cuales están mayoritariamente basados en la desactivación de la fluorescencia de los NCs, alcanzando unos bajos límites de detección (del orden nM) [15].

Por otra parte, existen biomoléculas pequeñas que poseen una gran relevancia biológica. La cisteína (Cys), la homocisteína (Hcy) y glutatión (GSH), todas ellas ditioles, juegan un papel fundamental tanto en reacciones redox reversibles como en importantes funciones celulares, incluyendo la desintoxicación y el metabolismo. El análisis de sus niveles en fluidos corporales humanos juega un papel importante en el diagnóstico precoz de muchas enfermedades. Así por ejemplo ya se ha desarrollado un método de fluorescencia para la detección de Cys con el uso de AgNCs basado en el quenching de la fluorescencia del NCs [10].

- NCs como marcadores fluorescentes en bioensayos

Una parte importante de aplicación de NCs es la utilización de éstos en bioensayos, para la determinación de tanto proteínas (inmunoensayos) como ácidos nucleicos (ensayos de ADN). Para ello es necesario la conjugación de moléculas que posean receptores selectivos (por ejemplo, anticuerpos) a la superficie de los NC metálicos fluorescentes. Esta es la aplicación de los NCs aún no ha sido muy desarrollada y es la línea en la que se centrará el presente Trabajo Fin de Máster.

- Aplicación de nanoclusters metálicos fluorescentes en imágenes biológicas (imaging)

La técnica de *imaging* fluorescente ofrece varias ventajas sobre otras modalidades de imagen en las siguientes características la sensibilidad, la capacidad de detección múltiple y el coste del equipo. Dicha técnica se basa en marcajes estables, biocompatibles, altamente

específicos y sensibles. Los fluoróforos convencionales que se utilizan suelen incluir colorantes orgánicos y proteínas fluorescentes de ingeniería, que poseen una fotoestabilidad limitada lo que puede ser una desventaja para los experimentos a largo plazo. Como alternativa se pueden usar los NCs metálicos fluorescentes, que muestran una emisión brillante y una buena biocompatibilidad, haciéndolos alternativas atractivas como sondas fluorescentes para *bioimaging*.

2.4. Nanoclusters de Oro

Los Nanoclusters de oro (AuNCs), han generado un gran interés, ya que interesa comprender su crecimiento a la hora de sintetizarlos y la estabilidad de estas estructuras además de los efectos que provoca el confinamiento de portadores de carga en sus propiedades ópticas y espectroscópicas [16]. Debido a su tamaño ultra-pequeño y fotoestabilidad, los AuNCs se pueden utilizar como sondas fluorescentes y potencialmente pueden competir tanto con Quantum Dots y como con proteínas fluorescentes.

Los métodos de síntesis de AuNCs que se han propuesto hasta la fecha son principalmente dos:

- Reducción directa de precursor (s) de oro, con una metodología de abajo a arriba o “bottom-up”.
- Fragmentación del núcleo de las nanopartículas metálicas para obtener un cluster de menor tamaño, con una metodología de arriba abajo o “top-down”.

Entre las vías de síntesis, el enfoque de abajo a arriba o “bottom-up” se ha utilizado con mayor frecuencia. En ese caso el precursor de oro se trata primero con "grupos protectores" adecuados, denominados ligandos, y posteriormente se realiza la reducción del metal a través de un proceso químico, fotoquímico, sonoquímico. Los ligandos usados comúnmente suelen ser los siguientes: moléculas con grupos tiol, dendrímeros, péptidos, proteínas, ADN y polímeros [16].

Los NCs ya sintetizados, como se puede ver en la Figura 6, se componen de núcleos metálicos, cada uno compuesto de un número finito de átomos de oro, cuya superficie está cubierta por una capa de los ligandos. Los ligandos, al presentar diferentes estructuras pueden afectar al tamaño final y a la estabilidad de los NCs junto con sus propiedades fotofísicas.

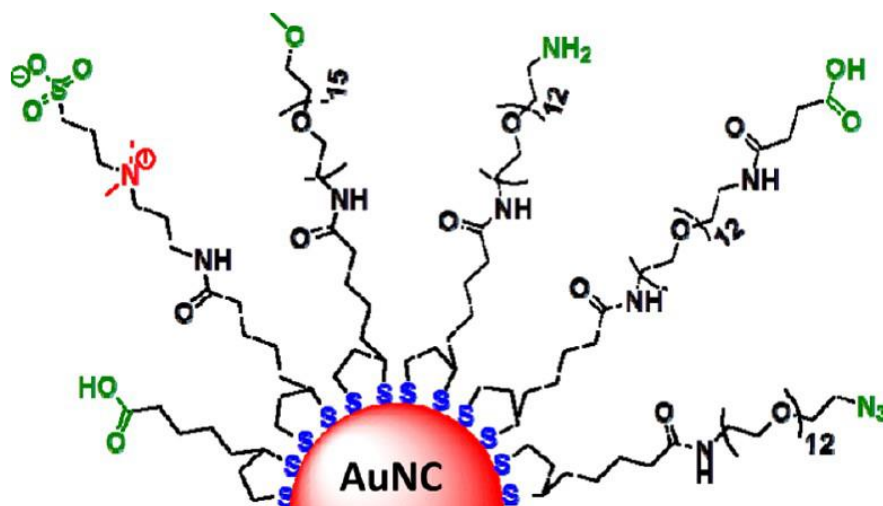


Figura 6: Representación esquemática de un nanocluster de oro funcionalizado [16].

A pesar de los progresos realizados en la última década en el desarrollo de diversas rutas para sintetizar AuNCs luminiscentes, el problema radica en su integración en los sistemas biológicos debido a varias limitaciones:

- La reducción de la estabilidad coloidal en presencia de exceso de sales y los cambios de pH.
- La reducción de la estabilidad frente a los agentes reductores que contienen grupos tiol.
- La falta de control sobre el número de grupos reactivos en los NCs, haciendo que realizar una funcionalización más controlada con biomoléculas sea bastante difícil.

Dichas limitaciones fueron las que nos movieron para que en el presente Trabajo Fin de Máster se realice la síntesis de AuNCs y una caracterización exhaustiva de los mismos, de manera que se llevarán a cabo estudios de diversos aspectos que pueden modificar la estabilidad de los AuNCs.

3. Inmunoensayos

Un inmunoensayo, o las diferentes técnicas inmunoquímicas analíticas de laboratorio tienen en común el usar complejos provenientes del sistema inmune. De esta manera usan la unión o conjugación de anticuerpos y antígenos para la cuantificación de un analito determinado. Este analito puede ser tanto el anticuerpo (Ab) o el antígeno (Ag). Una de las

características principales de los inmunoensayos es la gran especificidad y afinidad que poseen los anticuerpos por antígenos específicos. [17]

Los anticuerpos o inmunoglobulinas son glicoproteínas, con un peso molecular promedio de 150 kDa, los cuales poseen sitios de unión o reconocimiento (dos por cada anticuerpo) frente a biomoléculas específicas. Estos anticuerpos se producen en organismos vivos, producidos por un tipo de leucocito denominado linfocito B como consecuencia de la activación de una respuesta inmune a raíz del contacto de un inmunógeno con el organismo. Un inmunógeno es una sustancia capaz de producir una respuesta inmune y habitualmente son sustancias extrañas al organismo. Al entrar en contacto con el organismo se provoca una cadena de reacciones que llevan a la producción de anticuerpos [18].

Por otra parte un antígeno es una sustancia que desencadena la formación de anticuerpos y puede causar una respuesta inmunitaria. Además se enlazan selectivamente con los anticuerpos. Ahora bien, hay varios tipos de antígenos de tal manera que no todos los antígenos son inmunógenos, como por ejemplo los haptenos. Los haptenos son antígenos de bajo peso molecular que por sí solos no son capaces de producir respuesta inmune.

La unión entre estas dos moléculas es lo que se denomina reconocimiento antígeno-anticuerpo y se caracteriza por ser altamente selectivo y específico. La unión de anticuerpo y antígeno se lleva a cabo por múltiples contactos no covalentes (que dependen en gran medida de la distancia de los grupos que interaccionan) entre el propio antígeno y distintos aminoácidos del sitio de unión del anticuerpo. Estas fuerzas son: puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas, fuerzas de van der Waals e interacciones hidrofóbicas. Todas ellas tienen carácter cooperativo. De este modo, la existencia de múltiples interacciones débiles genera una considerable energía de enlace. Y esa unión es la base de los métodos inmunoquímicos, a raíz de lo cual se busca un alto reconocimiento de la muestra y debido a su gran sensibilidad y especificidad permite la cuantificación de compuestos presentes en fluidos biológicos en concentración reducida, del orden de ng/ml o de pg/ml.

3.1. Tipos de inmunoensayos

Algunos tipos de inmunoensayos pueden ser por sí mismos capaces de indicar la reacción antígeno-anticuerpo. Este tipo de inmunoensayos son las denominadas técnicas inmunoquímicas sin marcadores, y se dividen en: inmunoprecipitación, inmunoelectroforesis, ensayos de aglutinación, medidas de turbidez y ensayos de fijación del complemento [18, 19].

Por otra parte la mayoría de los métodos cuantitativos precisan de marcadores. Un marcador es una molécula que se une covalentemente ya sea al anticuerpo o al antígeno para poder visualizar la interacción Ab-Ag. Dicho marcador debe cumplir una serie de condiciones: ha de ser barato, seguro y fácil de enlazar a la molécula de interés. Además debe tener propiedades que permitan diferenciar con facilidad las formas libre y enlazada sin tener que recurrir a etapas de separación. Por otra parte, ha de ser estable y al realizar el marcaje no se debe alterar la funcionalidad de la biomolécula marcada. Por último la marca ha de ser fácil de medir con elevada sensibilidad mediante instrumentación sencilla y de bajo coste y a ser posible automatizable [20]. No todas las marcas reúnen estas propiedades, pero es un reto de investigación encontrar marcas que reúnan muchas de estas propiedades, como se pretende en este Trabajo Fin de Máster.

Se puede realizar una clasificación dentro de los inmunoensayos con marcaje, que es dependiendo del tipo de marca utilizada [20]:

- Radioinmunoensayo (RIA): el marcador es un isótopo radioactivo.
- Enzimoimmunoanálisis (EIA): el marcador es una enzima como por ejemplo la técnica ELISA.
- Fluoroimmunoanálisis: el marcador es una molécula fluorescente, por ejemplo FPIA.
- Marcas elementales o elemental-tagged immunoassays: en donde la marca son heteroátomos, isótopos estables enriquecidos, nanopartículas que se detectan por ICP-MS.
- Por detección indirecta de un inmunocomplejo: en donde la marca se une al complejo Ag-Ab cuando la reacción ya se ha producido.

Otra manera de clasificar los inmunoensayos es mediante el formato del ensayo, ya que puede ser competitivo o no competitivo [20]. Como se puede observar en la Figura 7; en el inmunoensayo competitivo el analito y el trazador o bioconjugado compiten por un número limitado de sitios de unión correspondiente al anticuerpo o el antígeno inmovilizado (dependiendo de qué tipo sea el analito). En este caso la medida se realiza por la cantidad de trazador sin enlazar, siendo inversamente proporcional al analito. Por otra parte en el inmunoensayo no competitivo o tipo sándwich la cuantificación del inmunocomplejo es directa y se relaciona de manera proporcional con la cantidad de analito presente en la muestra.

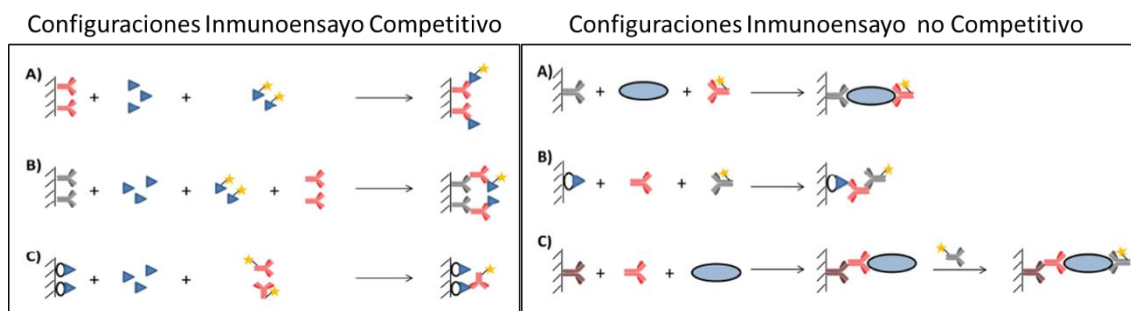


Figura 7: Diferencias en el formato de inmunoensayos competitivos (a) y no competitivos (b).

Por último, los inmunoensayos también se pueden clasificar según si es necesario una separación o no [20]. De esta manera se tienen los inmunoensayos homogéneos (en los cuales tras la reacción de reconocimiento no es necesaria una etapa de separación y se produce un cambio en la señal) y los heterogéneos. Éstos últimos precisan de una etapa de separación tras la reacción de reconocimiento, para poder realizar la medida de la señal.

3.2. Fluoroimmunoensayos basados en nanoclusters

Los fluoroimmunoensayos son un tipo de los inmunoensayos en los cuales se utiliza la fluorescencia como metodología de medida de la reacción de reconocimiento Antígeno-Anticuerpo. La fluorescencia es el método más aplicado y es el enfoque analítico dominante en una gran variedad de esquemas. En concreto el inmunoensayo de fluorescencia es una de la técnica más común en el campo de los biosensores ópticos, combinando la alta sensibilidad de detección de la fluorescencia con la alta selectividad de inmunoensayo [21].

Debido a las propiedades ópticas de los NCs y que son biocompatibles, tal y como se ha descrito anteriormente, cabe esperar que se puedan aplicar satisfactoriamente en inmunoensayos. Además la capacidad de los conjugados nanopartícula-anticuerpo de mantener la funcionalidad de la biomolécula a la que se une el nanomaterial hace que sean muy atractivos para aplicarse en las técnicas inmunológicas [9]. Por ello no es de extrañar que este campo sea una línea de investigación bastante activa actualmente. El empleo de NCs en inmunoensayos aún no está muy investigado, pero existen ciertos trabajos que siguen esta línea de investigación.

La primera aplicación de los NCs metálicos fluorescentes es un inmunoensayo para la determinación de IgG humana fue desarrollada en 2006 [22]. Después de esta aplicación sólo se han descrito trabajos relacionados con el análisis de proteínas de factor de crecimiento y otras proteínas como la concavalina A [23] o la inmunoglobulina G [24].

4. Inmunoglobulina IgE

Las inmunoglobulinas (Ig) son la base proteica de la respuesta inmune humoral, la cual está dirigida contra infecciones bacterianas y virus extracelulares, además de proteínas externas individuales. Como ya se ha comentado con anterioridad son un grupo de glicoproteínas séricas, producidas por los linfocitos B y se caracterizan por su capacidad para unirse a un antígeno [25, 26].

Aunque casi todas las inmonugoblinas presentan una estructura bastante homogénea, presentan diferencias en la estructura primaria y secundaria de sus cadenas pesadas, dando lugar a cinco clases de moléculas denominadas IgM, IgD, IgG IgA, e IgE. Los diferentes miembros de cada clase tienen el mismo isotipo, aunque pueden tener distinta especificidad, diferencias por variaciones en la secuencia de aminoácidos determinan la existencia de subclases: en la clase IgA se diferencian dos, IgA1 e IgA2 y la clase IgG se subdivide en IgG1, IgG2, IgG3 y IgG4 [27].

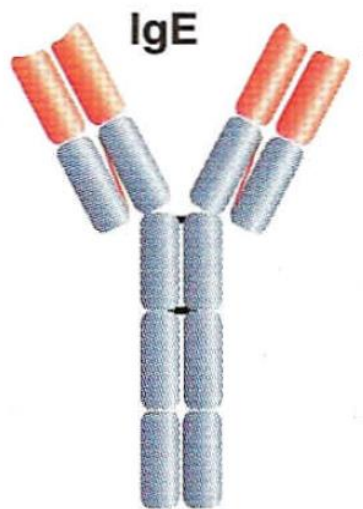


Figura 8: Estructura de la IgE [25].

La IgE es una glicoproteína de aproximadamente 190 kDa. Como otros anticuerpos monoméricos, está compuesta de dos cadenas pesadas y dos ligeras, unidas por puentes disulfuro. Como se puede ver en la Figura 8 su cadena pesada consta de 5 dominios, uno variable (en rojo) y cuatro constantes de tipo ϵ (coloreados en gris) [28].

Además la IgE se caracteriza por manifestarse sólo en mamíferos, está implicada en procesos alérgicos y en la respuesta inmune efectiva contra diversos agentes patógenos, especialmente parásitos. La IgE es el tipo de anticuerpo menos abundante en el suero, con una

concentración de $3 \cdot 10^{-4}$ mg/mL [29], en comparación con 10 mg/mL de IgG en la circulación sanguínea en el caso de individuos sin alergia [27]. Las concentraciones de IgE en circulación son un reflejo del número de células B que están sintetizando IgE. Por ello cabe esperar que si la concentración en sangre aumenta, es porque se está sintetizando más IgE.

La producción de mayor cantidad de IgE se puede dar por dos razones: por la presencia en el organismo de antígenos no patogénicos, como los encontrados en fármacos, alimentos, y alérgenos estacionales, o por la presencia de diversos agentes patógenos, especialmente parásitos [28]. Así, si una persona es alérgica a una sustancia en particular, el sistema inmunitario cree, erróneamente, que está bajo una invasión antigénica por parásitos, y produce la IgE, en un intento de "proteger" el organismo. Pero la reacción alérgica propiamente dicha se inicia cuando la IgE se une a receptores encontrados en mastocitos, eosinófilos, y basófilos de la sangre, por los cuales tiene una alta afinidad. Inmediatamente se desencadenan complejas reacciones inmunitarias, como por ejemplo, la desgranulación de los mastocitos, que liberan sustancias vasoactivas como la histamina, así como la intervención de los eosinófilos en la respuesta inflamatoria. De este modo se provocan los síntomas de la alergia.

De manera más concreta, uno de los primeros antígenos con los que se encuentra el ser humano al nacer son las proteínas de la leche de vaca. Este tipo de alergias a las proteínas de la leche de vaca no son las mismas que las denominadas intolerancias, ya que éstas últimas no están mediadas por la IgE [30]. La leche de vaca contiene más de 40 proteínas y todas ellas pueden actuar como antígenos en la especie humana. Sin embargo, los alérgenos principales son la betalactoglobulina, caseínas, alfa lactoalbúmina y seroalbúmina. En concreto, la betalactoglobulina es una proteína que no existe en la especie humana y se encuentra en la leche materna en cantidades de microgramos debido a los lácteos ingeridos por la madre. Por otro lado también está presente en los preparados de leche fórmula para lactantes. Son estas mínimas cantidades las causantes de que sea la proteína a la cual se encuentran mayor número de sensibilizaciones nada más nacer y posteriormente se prolonga al iniciar la lactancia artificial. La incidencia de las alergias a las proteínas de la leche de vaca es bastante elevada, siendo la tercera alergia alimentaria más importante, después del huevo y el pescado. Por ello es tan importante encontrar la manera de detectarla rápidamente.

Por esta razón en el presente Trabajo Fin de Máster se persigue el desarrollo de un inmunoensayo para la determinación de IgE con la orientación de detectar estas alergias producidas por proteínas de la leche. Para ello se va a tratar de utilizar AuNCs aprovechando las propiedades y características que previamente se han relatado.

II. Objetivos

1. Objetivos académicos:

De acuerdo con lo expuesto en la introducción, el objetivo principal que se persigue mediante la realización del presente Trabajo Fin de Máster es la síntesis de Nanoclusters de Oro para su aplicación en el desarrollo de un biosensor para la determinación de IgE en el suero humano. Este objetivo principal se perseguirá a través de los siguientes objetivos parciales:

1.1. Síntesis y caracterización de Nanoclusters de Oro:

- Llevar a cabo la síntesis de nanoclusters de oro solubles en medios acuosos y su posterior purificación.
- Caracterización de sus propiedades ópticas y de su estabilidad. Se realizará un estudio de los AuNCs en diferentes aspectos, como su caracterización por fluorescencia y su estabilidad. En cuanto a la estabilidad se realizarán diferentes estudios, como por ejemplo su estabilidad con respecto al tiempo, al medio de disolución, a la exposición continuada a la luz, entre otros.
- Estudio estructural y cálculo de concentración: La caracterización de los AuNCs incluye un análisis mediante ICP-MS, así como un estudio de su morfología mediante la técnica de HR-TEM. Con estos dos estudios lo que se pretende es conocer la estructura, forma, homogeneidad de los nanocluster y junto con el dato de concentración de oro poder establecer una relación para determinar la concentración de nanocluster en una disolución dada.

1.2. Bioconjugación de los Nanocluster de Oro con biomoléculas:

- Se optimizará la unión de los AuNCs al anticuerpo anti-hIgE, y se procederá a caracterizar dicho bioconjugado evaluando tanto propiedades ópticas como la funcionalidad del anticuerpo.

1.3. Fluoroinmunoensayo competitivo basado en nanoclusters para la determinación de IgE en suero humano

- Se llevará a cabo el diseño y completo desarrollo de un inmunoensayo competitivo basado en la detección fluorescente de los nanoclusters.

2. Objetivos de competencias profesionales:

Los objetivos personales correspondientes a la realización de este Trabajo Fin de Máster son los siguientes:

- Aprendizaje de la metodología que se sigue en la investigación científica tanto a nivel de procedimientos experimentales como a nivel de exposición de resultados y de conclusiones.
- Aprendizaje de nuevas vías de investigación dentro del emergente y prometedor campo de la Nanociencia y la Nanotecnología.
- Formación en nuevas técnicas de caracterización y determinación de diferentes analitos y muestras, así como continuación y mejora del aprendizaje ya adquirido durante la formación previa.

III. Experimental

1. Instrumentación

- Espectrómetro de Luminiscencia Cary Eclipse, de la casa comercial Agilent Technologies, con una lámpara de descarga de Xenón, monocromadores Czerny-Turner y tubo fotomultiplicador como detector. Presenta como accesorio un lector de placas ELISA.
- Espectrómetro de Luminiscencia Perkin Elmer Modelo LS-50B, para medir en celda de 1 cm de paso óptico, con una lámpara de Xenón.
- Espectrómetro de Masas de cuadrupolo tipo ICP-MS con celda de colisión, modelo de la serie 7500 de Agilent.
- Microscopio de Transmisión Electrónica del alta resolución (HR-TEM) modelo JEOL JEM-2100F que alcanza una que con una lente de alta resolución alcanza resoluciones de 1.9 Å entre puntos y 1,0 Å entre líneas. Posee una cámara CCD de alta resolución.
- Microscopio Confocal Leica DM IRE2.
- Lector de placas Vis-UV modelo ELx800 de la casa comercial Bio-Tek.
- Centrifuga Biofuge Stratus (Heraeus, Alemania).
- pHmetro Crison modelo micropH 2000 (Crisol instruments S.A., España).
- Balanza analítica NewClassic MF con precisión de hasta $\pm 0,01$ mg (Mettler Toledo Barcelona, España).
- Granatario SCALTEC con precisión de hasta $\pm 0,01$ g.
- Estufa de laboratorio de la casa Memmert, modelo 100.
- Agitador magnético RCT basic safety control (IKA, Staufen, Alemania).
- Baño Ultrasonidos (J.P. Selecta, Barcelona, España).
- Sistemas de purificación de agua ultrapura Milli-Q Advantage A10 (MD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA), acoplado a la unidad Q-POD (Quality-Point-of-Delivery) que permite generar agua ultrapura.

2. Material utilizado

- Cubeta de fluorescencia de cuarzo SUPRASIL de Hellma, modelo 114F-QS, con paso óptico de 10 mm y volumen de cámara de 3 mL.
- Cubeta de fluorescencia de cuarzo SUPRASIL de Hellma, modelo 101-QS, con paso óptico de 10 mm y volumen de cámara de 1.5 mL.
- Cubeta de fluorescencia de cuarzo SUPRASIL de Hellma, modelo 114F-QS, con paso óptico de 10 mm y volumen de cámara de 45 μ L.
- Micropipetas de volúmenes comprendidos entre 1 μ L y 1 mL (Labmate).
- Micropipeta multicanal de volumen comprendido entre 30-300 μ L (Labmate).
- Filtros de ultrafiltración Amicon Ultra con un tamaño de poro de membrana de 10 kDa de 100 kDa (Millipore).
- Placa transparente de poliestireno de titración de 96 pocillos no esterilizada (Sterilin Limited, U.K.).
- Portas de microscopio recubiertos con poly-L-lisina (Electron Microscopy Sciences, USA).
- Adhesivos de silicona aislantes (Grace bio-labs, USA).
- Botes de plástico de 20 y 50 mL.
- Viales de vidrio de 50 mL.
- Tubos Eppendorf con volúmenes de 0,5 y 1,5 mL.

3. Reactivos empleados:

3.1. Síntesis AuNCs

- Sal de tetracloraurato de sodio dihidratado, $\text{AuCl}_4\text{Na}\cdot\text{H}_2\text{O}$, (REF: 298174-16), de la casa comercial Sigma con una pureza de del 99 %.
- Borohidruro de Sodio, H_4BNa , (REF: 71320-25G) de la casa comercial Sigma, con una pureza ≥ 96 %.
- Ácido lipoico, $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{O}_2\text{S}_2$, (REF: 138720250) de la casa comercial Acros Organics, con un pureza > 98 %.
- Hidróxido de Sodio, NaOH , (REF: 1.06498.1000) de la casa comercial Merk, con una pureza > 97 %.

3.2. Bioconjugación

- Anticuerpo secundario Anti-Goat IgG producido en burro, (REF: G6638) de la casa comercial Sigma, con una concentración 1.47 mg/mL.
- Anticuerpo primario Anti-Human IgE producido en cabra, (REF: I6284) de la casa comercial Sigma, con una concentración 1 mg/mL.
- 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida(EDC), (REF: AC171440100) de la casa comercial Acros Organics, con una pureza del 98.0 %.
- N- hidroxisuccinimida (NHS), (REF: 24510) de la casa comercial Thermo Scientific, con una pureza > 95 %.

3.3. Inmunoensayos

- Human-IgE protein, (REF: ab65866) de la casa comercial Abcam, con una concentración 1 mg/mL.
- Albúmina de suero bovino, (BSA), (REF: 12657) de la casa comercial Merck.
- Tween20, (REF: P9416) de la casa comercial Sigma.
- Anticuerpo primario Anti-Human IgE producido en cabra, (REF: I6284) de la casa comercial Sigma, con una concentración 1 mg/mL.
- Anticuerpo secundario Anti-Goat IgG producido en burro, (REF: G6638) de la casa comercial Sigma.
- Anticuerpo secundario Anti-Goat IgG producido en conejo, marcado con HRP, (REF: A5420) de la casa comercial Sigma, con una concentración 1 mg/mL.
- TMB substrate KIT, (REF: 1854050) de la casa comercial Thermo Scientific.
- Ácido sulfúrico, H₂SO₄ al 37% (REF: 10184763) de la casa comercial Fisher Chemical.

3.4. Disoluciones Reguladoras

- Disolución reguladora de fosfatos (PBS):
 - o Cloruro de sodio, NaCl, (REF: 27800) de la casa comercial VWR Chemical.
 - o Cloruro de potasio, KCl, (REF: 141494) de la casa comercial Panreac.
 - o Hidrogeno fosfato de sodio, Na₂HPO₄ (REF: 119753) de la casa comercial Merck.
 - o Dihidrógeno fosfato de potasio, KH₂PO₄ (REF: A215573015) de la casa comercial Merck.

- Disolución reguladora de boratos (SBB):
 - o Ácido bórico, H_3BO_3 (REF: A015.4260) de la casa comercial Merck.
 - o Cloruro de sodio, $NaCl$ (REF: 27800) de la casa comercial VWR Chemical.
 - o Hidróxido de Sodio, $NaOH$, (REF: 1.06498.1000) de la casa comercial Merk, con una pureza $> 97 \%$.

4. Procedimientos experimentales:

4.1. Síntesis de Nanoclusters de Oro:

En un vial, protegido de la luz y conteniendo un imán agitador, se añaden 19.95 mL de H_2O Mili-Q, junto con 50 μL de hidróxido de sodio 2M. Posteriormente se añaden 30 $\mu moles$ del ligando (el ácido lipoico). El vial conteniendo la mezcla se introduce en un baño de ultrasonidos durante 5 minutos para favorecer la disolución del ligando. Posteriormente se añaden 200 μL de la sal de oro (Tetracloraurato de sodio dihidratado) y se comienza la agitación constante de la mezcla. Paralelamente se prepara una disolución de Borohidruro de Sodio (50 mM) y tras los primeros 5 min de agitación de la mezcla de reacción se añaden 400 μL de esta disolución de $NaBH_4$ al vial de la reacción, gota a gota y sin dejar de agitar. Se deja que la reacción tenga lugar a temperatura ambiente y con agitación constante durante 15 horas [16]. La reacción que se produce aparece esquematizada en la Figura 9.

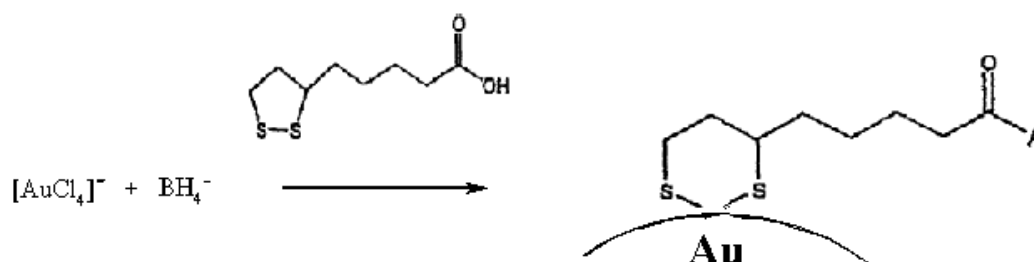


Figura 9: Reacción principal involucrada en la síntesis de AuNCs.

4.2. Purificación y Caracterización de AuNCs:

Posteriormente a la síntesis de los NCs, se realiza la purificación de los mismos, eliminando el exceso de ligando y de agente reductor además de eliminar subproductos de la reacción. Dicha purificación se realiza mediante ultrafiltración, utilizando filtros de membrana con un tamaño de poro de 10 kDa. Los ciclos que se han realizado son los siguientes:

- i. Un ciclo de centrifugado a 1600 g durante 5 min.
- ii. Un segundo ciclo de centrifugado a 1600 g durante 10 min.
- iii. Tres lavados con H₂O a 1600 g durante 10 min.

La disolución final purificada se almacena a temperatura ambiente y protegida de la luz.

La caracterización se realiza por fluorescencia, estableciendo los siguientes parámetros en el equipo Perkin Elmer: modo Scan; rendijas de exc/em: 10/20 nm; y velocidad de barrido 300 nm/min. Se ensayaron distintas λ_{exc} (300; 390; y 550 nm) recogiendo la emisión en un intervalo de λ_{em} comprendido entre 450-900 nm.

4.3. Bioconjugación de nanoclusters de Oro:

La bioconjugación del nanocluster con una biomolécula, en este caso con un anticuerpo se realiza mediante el método de la carbodiimida [31]. En este método de síntesis orgánica, lo que se establece es un enlace covalente entre el nanomaterial y la biomolécula por la formación de un enlace amida entre los grupos carboxilo y amino presentes en cada una de las moléculas, respectivamente. Un esquema del proceso de bioconjugación se recoge en las Figuras 10 A y B.

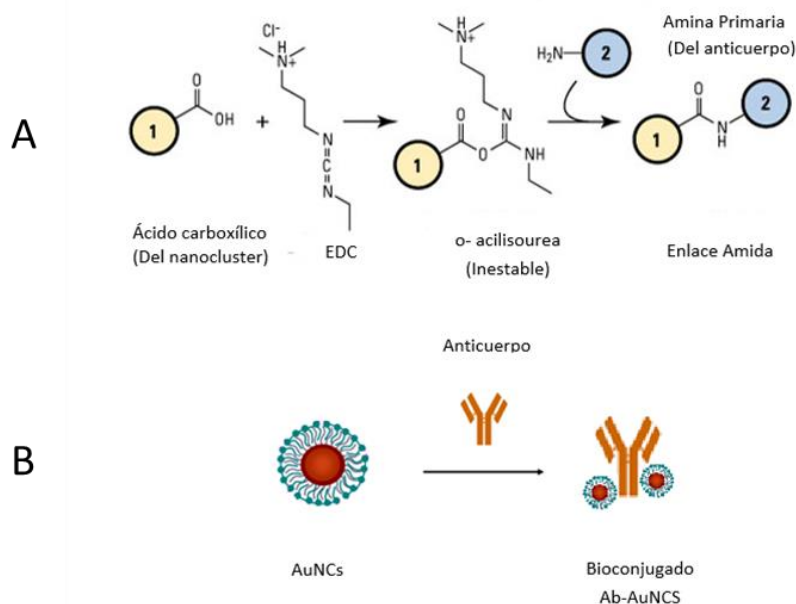


Figura 10: A) esquema general de reacción según la química de la carbodiimida. B) Representación esquemática del proceso de bioconjugación.

La bioconjugación se lleva a cabo en un eppendorf con agitación constante y a temperatura ambiente. De esta manera se introduce en el eppendorf 100 μL de una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ de anticuerpo y se añade la cantidad necesaria de AuNCs. En los estudios llevados a cabo se han ensayado diferentes relaciones molares anticuerpo:nanocluster con el objeto de optimizar el proceso de bioconjugación de manera que la relación óptima no afecte a la funcionalidad del anticuerpo y a su vez tampoco afecte a las propiedades luminiscentes de los NCs. Por ello las cantidades empleadas de AuNCs en el proceso de la bioconjugación son variables y fueron las siguientes:

- Para un Bioconjugado 1:1 se añaden al vial 94.34 μL de la disolución de AuNCs.
- Para un Bioconjugado 1:3 se añaden al vial 283.03 μL de la disolución de AuNCs.
- Para un Bioconjugado 1:5 se añaden al vial 471.71 μL de la disolución de AuNCs.
- Para un Bioconjugado 1:7 se añaden al vial 660.40 μL de la disolución de AuNCs.
- Para un Bioconjugado 1:10 se añaden al vial 943.42 μL de la disolución de AuNCs.

Una vez añadidos tanto el anticuerpo como los AuNCs se comienza la agitación. Posteriormente, se añade el EDC y NHS, los cuales han sido puestos en disolución de PBS. El EDC está en exceso, en una relación molar de Ab:EDC de 1:1500. La cantidad de NHS está relacionada con la cantidad de EDC, de manera que se encuentren en una relación molar EDC:NHS de 1:0.5. Al añadir la disolución que contiene EDC y NHS, comienza la reacción de manera que se mantiene la agitación durante 2h.

4.4. Purificación y Caracterización de la Bioconjugación:

Una vez transcurridas las dos horas de reacción de bioconjugación, ésta se da por finalizada y es necesario recurrir a una etapa de purificación para eliminar el exceso de reactivos y subproductos de la reacción. Como anteriormente se ha procedido con los AuNCs, dicha purificación se realiza recurriendo a un procedimiento de ultrafiltración, empleando filtros de membrana de 100 kDa, de manera que se retiene en el filtro el anticuerpo marcado (los AuNCs no bioconjugados pasarán a través de la membrana de filtración). Las disoluciones resultantes se conservan en tubos cerrados en la oscuridad y en la nevera.

Los ciclos de limpieza-purificación que se han realizado son los siguientes:

- Un ciclo de centrifugado a 700 g durante 7 min.
- Dos lavados con H₂O a 700 g durante 7 min.

Finalmente se lleva a cabo una primera caracterización del “supuesto” bioconjugado registrando la emisión de fluorescencia, utilizando los parámetros anteriormente descritos para la caracterización de los NCs. Con este estudio se pretende comprobar que la reacción de bioconjugación no ha afectado a las propiedades ópticas de las marcas seleccionadas (AuNCs).

4.5. Inmunoensayo espectrofotométrico:

Al realizar la bioconjugación de NCs con anticuerpos es primordial saber si la funcionalidad del anticuerpo se mantiene, de manera que el anticuerpo sea aún capaz de reconocer específicamente a su antígeno. Para comprobar dicha funcionalidad se realizó un inmunoensayo espectrofotométrico empleando un anticuerpo secundario marcado con peroxidasa de rábano silvestre [32].

En una placa de ELISA se inmoviliza el antígeno (3 µg/mL de IgE (100 µL/pocillo) en estufa a 38 °C durante 6 h), se bloquea (BSA al 5% (200 µL/pocillo) a 4°C durante 12 h) y posteriormente se añade el anticuerpo anti-IgE marcado con NCs (concentración 100 µL/pocillo, en estufa a 38 °C durante 2 h). Se realiza un lavado y luego se añade el anticuerpo marcado con peroxidasa anti-goatIgG-HRP (100 µL/pocillo), con una dilución 1:1000 en un buffer de PBS-BSA-Tween20. Se deja incubar (a 38 °C en estufa durante 2 h) y se elimina el exceso de reactivo. Por último se realiza la etapa de revelado con el Kit “TMB substrate”, el cual contiene los substratos de la enzima peroxidasa:

- Disolución de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) 0,4 g/L
- Disolución de peróxido de hidrógeno al 0,02% en una disolución reguladora de ácido cítrico.

Se prepara una mezcla 1:1 de estas dos disoluciones que se añaden a la placa ELISA (100 µL/pocillo), de tal manera que donde haya anticuerpo anti-IgE activo se generará una coloración azul, comprobándose si mantiene su funcionalidad. Para detener la reacción enzimática se añaden 100 µL/pocillo de ácido sulfúrico 2 M, provocando un cambio de color de azul a amarillo. La medida de la señal se realiza en un lector de placas de absorbancia Elix 800 a 490 nm (ver Figura 11).



Figura 11: Pasos a seguir en el inmunoensayo espectrofotométrico.

4.6. Inmunoensayo competitivo:

En el inmunoensayo de tipo competitivo aquí desarrollado el analito inmovilizado en la placa y el analito presente en la muestra en disolución compiten por los sitios de unión limitados del anticuerpo (bioconjugado). En este caso se llevan a cabo las siguientes etapas optimizadas en un trabajo previo del Grupo de Investigación en el que se llevó a cabo el presente TFM [33]:

1. Tapizado: se añaden 100 μL en cada uno de los pocillos de la placa, de la disolución de IgE, con una concentración de 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se procede a la incubación a 38 $^{\circ}\text{C}$ durante 6 horas.

2. Bloqueo: se añaden 200 μL en cada pocillo de la disolución de bloqueo, la cual es una disolución de BSA al 5%. Se procede a la incubación a 4 $^{\circ}\text{C}$ durante 12 horas.

3. Lavado 1: se añaden 200 μL a cada uno de los pocillos, una disolución de PBS-Tween20. Esta etapa se realiza tres veces, eliminando el líquido de lavado cada vez.

4. Reacción inmunológica: se añade a cada pocillo 100 μL de una mezcla del anticuerpo marcado con AuNCs y una cantidad determinada de analito (IgE) y se incuba la placa a 37 $^{\circ}\text{C}$ durante 2 horas.

5. Lavado 2: se lleva a cabo del mismo modo que el primer lavado.

6. Detección: se realiza la medida de fluorescencia en un lector de placas o por microscopía confocal.

IV. Resultados y Discusión

1. Síntesis, purificación y caracterización de los Nanocluster de Oro.

Los nanoclusters de oro empleados en el presente trabajo se han sintetizado siguiendo la metodología explicada en la sección de Experimental (Apartado 4.1). La caracterización de estos compuestos se realizó siguiendo varias etapas:

- a. En un primer lugar se registró la emisión fotoluminiscente, seleccionando las longitudes de onda óptimas a las que se observa apropiadamente la banda de emisión de los nanoclusters.
- b. Posteriormente se realizó un estudio de estabilidad con respecto a distintos factores (tiempo, entorno químico, exposición a la luz)
- c. En una etapa posterior se realizaron dos análisis, uno por ICP-MS y otro por HR-TEM de las disoluciones que contienen los NCs sintetizados, con objeto de determinar la concentración de oro y de AuNCs en la disolución final de la síntesis.

1.1. Caracterización por Fluorescencia de la síntesis de AuNCs

La caracterización de AuNCs, se realiza en un primer momento, tal y como se ha comentado anteriormente, mediante la espectrofotometría de fluorescencia. Para ello se realiza una primera aproximación, realizando un espectro de fluorescencia con una longitud de onda de excitación buscada en la bibliografía, a 550 nm. Se considera una primera aproximación ya que dependiendo del ligando utilizado para realizar la síntesis, se pueden modificar en un gran grado las propiedades fotoluminiscentes de los NCs [16].

Se han registrado espectros de excitación/emisión hasta encontrar el par que caracterice apropiadamente a nuestros AuNCs. En el Anexo 1 (Figura 1 y 2) se recogen todos los espectros correspondientes a este estudio de caracterización. Finalmente, como se puede ver en la Figura 12, el par excitación/emisión donde mejor se observan las propiedades ópticas de nuestros AuNCs es 300/720 nm.

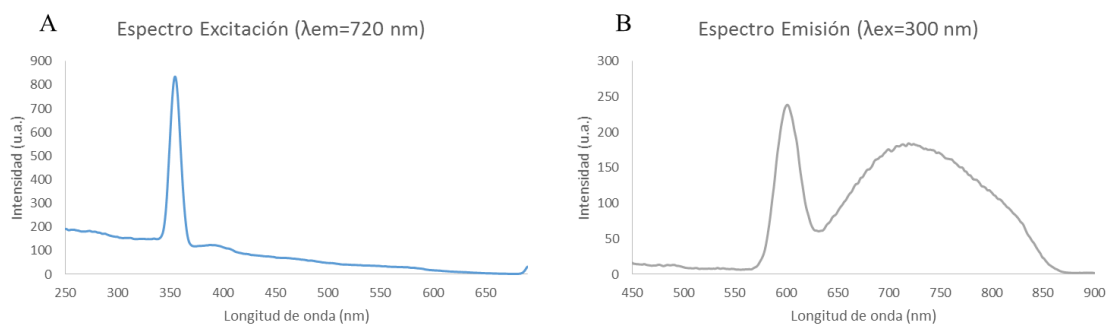


Figura 12: Espectros de emisión fotoluminiscente de los AuNCS sintetizados. A) Espectro de excitación (obtenido empleando un longitud de onda de emisión constante de 720 nm) y B) Espectro de emisión (obtenido empleando un longitud de onda de excitación constante de 300 nm).

1.2. Estudios de estabilidad de los Nanoclusters de Oro:

Se han realizado diferentes estudios orientados a evaluar la estabilidad de los AuNCs con objeto de determinar inequívocamente los factores que pueden afectar a la estabilidad de los mismos, paso previo para una futura manipulación y desarrollo de posibles aplicaciones. De este modo se analizaron la estabilidad frente al tiempo, frente a la luz solar, frente a una excitación continuada, y frente al pH de la disolución.

- Estabilidad a lo largo del tiempo

Se realizó un estudio para observar la estabilidad de los AuNCs respecto al tiempo, ya que interesan que sean estables para su posterior desarrollo en inmunoensayos. Por ello, se ha medido a los largo de diferentes días, la fluorescencia de dichos AuNCs (Ver espectros Figura 3, Anexo 1) que se mantuvieron almacenados a temperatura ambiente y en la oscuridad. Los resultados obtenidos se recogen en la Figura 13, en donde se observa que no hay diferencias significativas con respecto a las intensidad obtenidas, se podría concluir que sus propiedades ópticas se mantienen estables al menos durante 33 días, siempre que tengamos los NCs almacenados en la oscuridad.

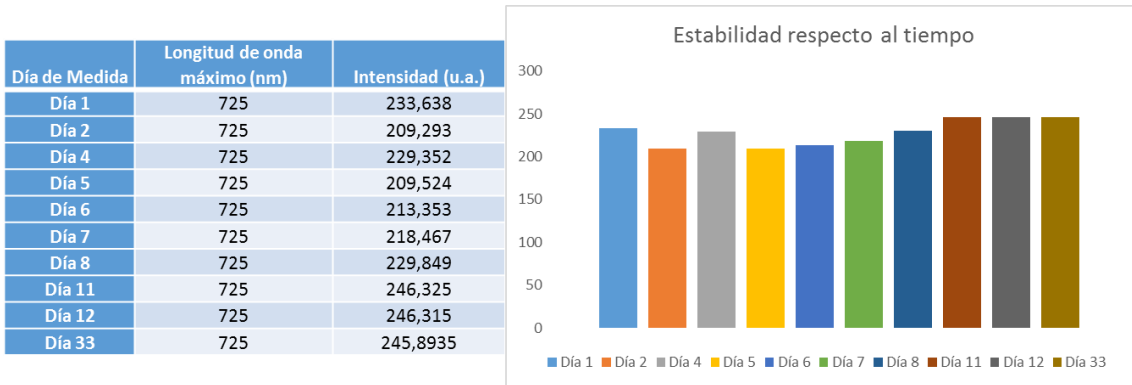


Tabla 2 y Figura 13: Resultados del estudio de estabilidad de AuNCs almacenados en la oscuridad, con respecto al tiempo.

- Estabilidad a la luz solar.

Otro aspecto importante es la estabilidad ante la luz solar, ya que hay ciertos NCs de otros metales que son estables a la luz como los CuNCs [34], pero también existen otros como los AgNCs que son inestables [3]. Por ello, se realizó un estudio consistente en registrar la emisión fluorescente de dos muestras de AuNCs. Una de las muestras se mantuvo protegida de la luz del sol, mientras que la otra muestra monitorizada se mantiene expuesta a la luz del sol. Los espectros de emisión fluorescente se registraron a lo largo de diferentes días para observar la evolución de su emisión.

Tal y como se puede observar en la Figura 14, en el que se compara la evolución de la disolución de AuNCs sin proteger a lo largo del tiempo con una disolución AuNCs protegida (Ver espectros Figura 4, Anexo 1), no se observan diferencias significativas entre ambos tipos de muestra. Por ello podemos concluir que los AuNCs son estables a la luz ambiental.

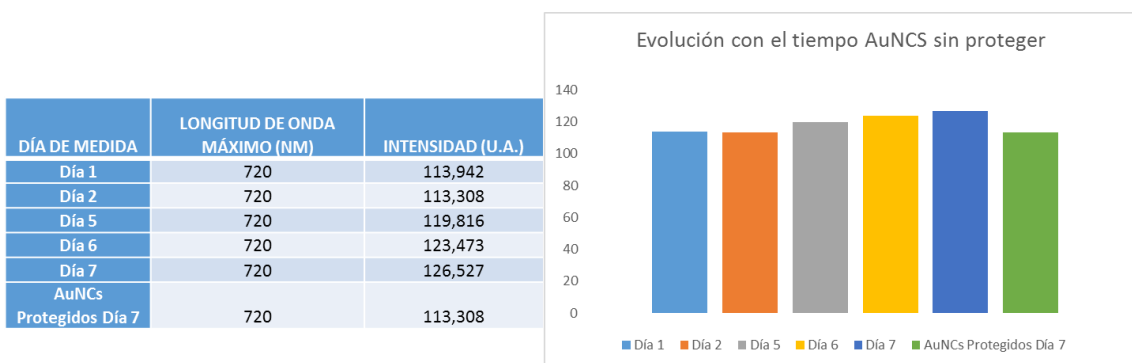


Tabla 3 y Figura 14: Resultados para el estudio de estabilidad de AuNCs con respecto a la luz.

- Estudio de estabilidad frente a una exposición continuada a la radiación UV (Time Drive):

En una etapa posterior se ha estudiado la estabilidad de la señal fluorescente de los AuNCs a lo largo de un tiempo continuado de excitación de la muestra (a una longitud de onda constante 390 nm). Así, se recogió la intensidad de emisión luminiscente de los AuNCs, a la longitud de onda característica del nanomaterial, 720 nm, a lo largo del tiempo (ver Figura 15).

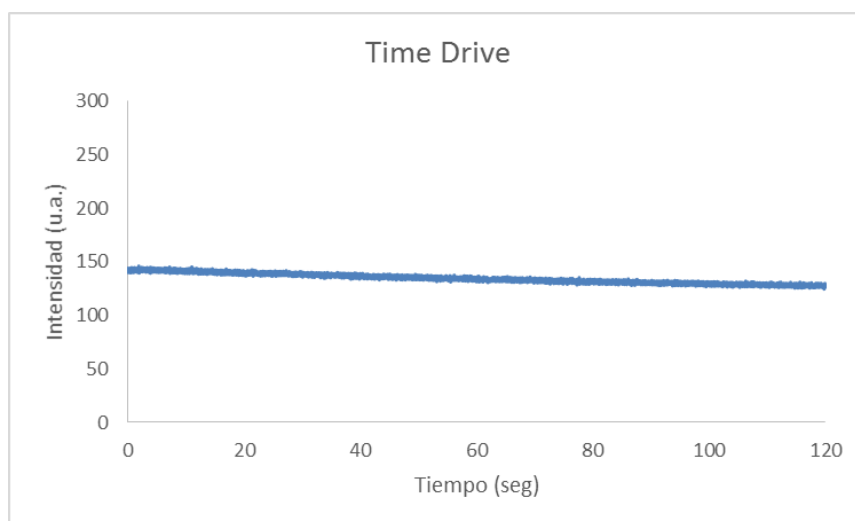


Figura 15: Evolución de la intensidad de emisión fluorescente de los AuNCs con el tiempo.

Aunque se observa un ligero decaimiento en la señal (ver Figura 15), ésta caída no es suficientemente significativa como para afirmar que la fluorescencia se atenúa de manera drástica con respecto al tiempo.

- Estudio de la estabilidad dependiente del pH:

Por otra parte, una característica que modifica la estabilidad de los AuNCs es el pH del medio en el que se encuentran [35, 36]. Por ello es necesario realizar un estudio de la emisión de fluorescencia a lo largo de todo el rango de pH. Se realizaron cinco disoluciones de AuNCs, que representaran todo el rango pH, de tal manera que mediante un pHmetro se consiguiera establecer un pH en cada una de ellas. Los pHs estudiados fueron los siguientes: 1,0, 4,3, 7,25, 9,41 y 12,06. Posteriormente, se procedió a efectuar la medida de la emisión de fluorescencia a cada una de las disoluciones, obteniendo las intensidades de emisión fluorescentes recogidas en la Figura 16.

pH	LONGITUD DE ONDA MÁXIMO (NM)	INTENSIDAD (U.A.)
pH 1,0	725	13,002
pH=4,3	725	6,73
pH= 7,25	725	23,558
pH=9,41	725	23,411
pH=12,06	725	22,656

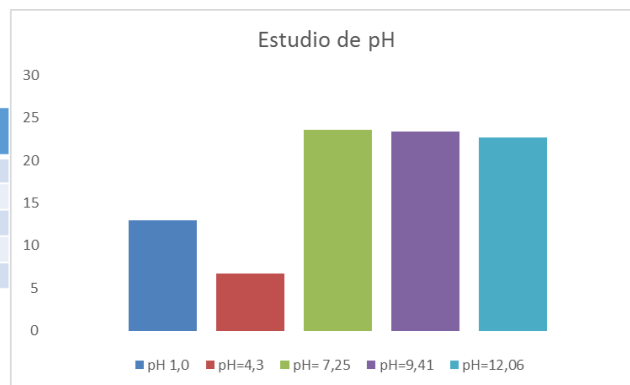


Tabla 4 y Figura 16: Intensidades y longitudes de onda máximas de emisión fluorescente de los AuNCs en función del pH del medio

De esta manera se comprueba que en medios neutros y básicos los AuNCs son estables, manteniéndose la señal de fluorescencia, mientras que a medios ácidos la señal disminuye drásticamente (Ver espectros Figura 5, Anexo 1).

A continuación, se estudió la estabilidad frente a dos medios de disolución de los AuNCs. El primero de ellos es el disolvente que se utiliza para la realización de la síntesis de los AuNCs, es decir, el agua. Por otro lado el otro disolvente sobre el que se realiza el estudio es el PBS, que será el disolvente que se utilizará en posteriores análisis, como para la reacción de bioconjugación del AuNCs con un anticuerpo. En la Figura 17 se recogen los espectros de emisión obtenidos en ambas condiciones, observando un aumento de la señal de fluorescencia al utilizar el medio tamponado con PBS, que sugiere que se produce una estabilización de los AuNCs en dicho medio. Otro aspecto que se observa es un ligero desplazamiento de la longitud de onda de emisión pasando de 720 nm en agua a 730 nm en PBS.

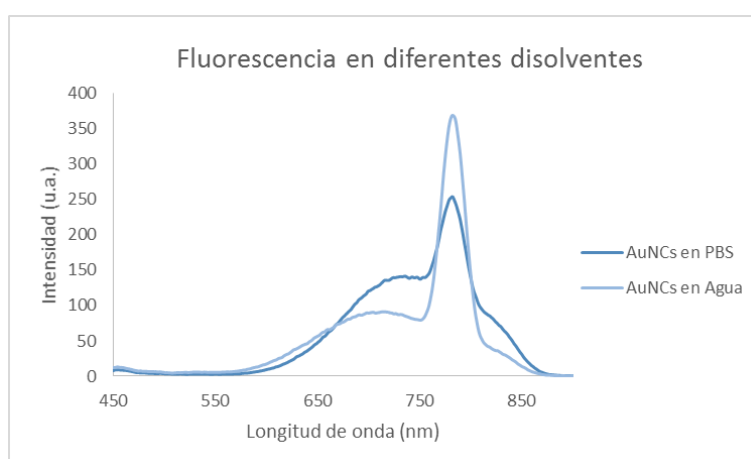


Figura 17: Comparación espectros de emisión de los AuNCs suspendidos en distintos disolventes.

Debido a este desplazamiento de la λ_{em} máxima en el caso del PBS, se decidió realizar un espectro de excitación para ver si se puede conseguir un espectro de emisión en el

que la Dispersión Rayleigh no perturbe el pico de emisión (ver Figura 18 A). En la Figura 20 A (espectro de excitación) se observa que los AuNCs tienen una mayor intensidad a $\lambda < 390$ nm, y se establece una longitud de onda de excitación de 300 nm para que la Dispersión se sitúe a una longitud de onda de 600 nm. Con estas condiciones se hace un espectro de emisión obteniendo la Figura 20 B.

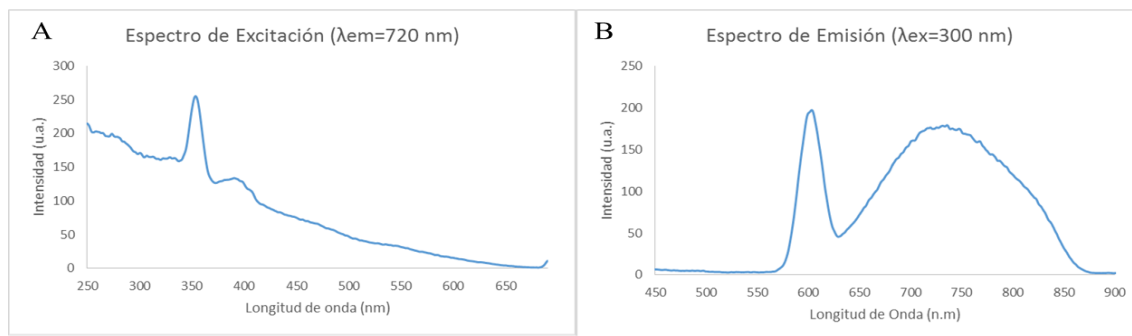


Figura 18: Espectros de fluorescencia de los AuNCs suspendidos en PBS A) espectro de excitación con $\lambda_{(em)}=720$ nm. B) espectro de emisión con $\lambda_{(exc)}=300$ nm

1.3. Caracterización de los AuNCs mediante ICP-MS

Emplendo la Espectrometría de Masas con fuente de Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-MS) se llevó a cabo la determinación de la cantidad de oro presente en las suspensiones de AuNCs obtenidas tras el proceso de síntesis. Así, mediante este análisis se consigue determinar el rendimiento de la síntesis de AuNCs así como llevar a cabo una estimación de la concentración de NCs en la disolución.

De esta manera se realizó la determinación, por ICP-MS, del contenido en oro en tres disoluciones:

1. Una disolución madre, la cual contiene la disolución precursora de la síntesis, la sal de Tetracloraurato de sodio dihidratado en el volumen final al que se lleva a cabo la síntesis.
2. Por otra parte se tiene la disolución de AuNCs final ya purificada, posteriormente a la ultrafiltración
3. Y por último la disolución filtrada recogida durante el proceso de purificación.

La técnica de Espectrometría de Masas con fuente de Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-MS) es una técnica de análisis inorgánico que es capaz de determinar y cuantificar la mayoría de los elementos de la tabla periódica en un rango dinámico lineal de ocho órdenes de magnitud (ng/l – mg/l). En este instrumento, la muestra se vaporiza y posteriormente se ioniza gracias a un plasma inductivo de Ar. Los iones generados pasan al

espectrómetro de masas donde se separan mediante un analizador, que es un cuadrupolo, y se detectan [37].

En este caso se va a realizar un análisis de cantidad de oro total, obteniendo dos resultados. Por una parte se obtiene la cantidad de oro que se consigue tras la purificación, de tal manera que este resultado va a ser útil que para posteriores estudios para hallar la concentración de nanoclusters presentes en disolución. Por otra parte, se pretende realizar un balance de masas para obtener el rendimiento de la síntesis y confirmar que la reacción se lleva a cabo y con un rendimiento suficientemente bueno como para poder continuar con el resto de experimentos.

Los resultados obtenidos son los recogidos en la Tabla 2.

DISOLUCIÓN	RESULTADO OBTENIDO (Mg/g)	PESO DISOLUCIÓN (g)	CONCENTRACIÓN Au (mM)
MADRE	112	20,2369	57,47
PURIFICADA	211	7,7000	0,41
FILTRADO	19	41,9963	0,2

Tabla 5: Determinación del contenido de Au mediante ICP-MS

Con estos resultados se puede concluir que el rendimiento molar es de 71.68 %, confirmando que se realiza la síntesis y con un buen rendimiento haciendo posible que se pueda continuar con los siguientes análisis.

1.4. Caracterización de AuNCs mediante HR-TEM

Otra manera de caracterizar los nanoclusters de oro, es usando la microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HR-TEM). El microscopio electrónico de transmisión (TEM) es un instrumento que aprovecha los fenómenos físico-atómicos que se producen cuando un haz de electrones suficientemente acelerado colisiona con una muestra. Cuando los electrones colisionan en la muestra, en función del grosor y de los tipos de átomos que forman dicha muestra, parte de ellos son dispersados y la otra parte atraviesan la muestra. Así la imagen que se forma, aporta información acerca de la estructura de la muestra, ya sea la muestra amorfa o cristalina.

De una manera más concreta, HR-TEM permite llegar a niveles de mejor resolución que el TEM, pudiendo generar imágenes de la estructura de una muestra a un nivel atómico. Por

ello se utiliza en el estudio de nanomateriales y más concretamente es útil para el estudio de nanoclusters, como es el caso [38].

La Figura 19 A recoge las imágenes obtenidas por HR-TEM de las muestras sintetizadas. Se puede observar que se han obtenido NCs con forma esférica y con una baja distribución de tamaños.

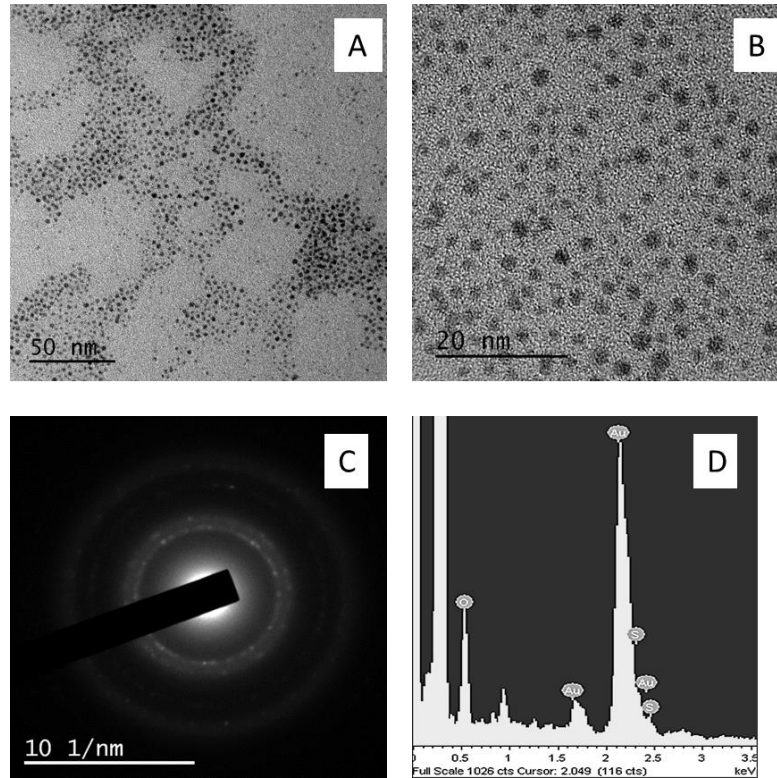


Figura 19: Imágenes obtenidas por HR-TEM. A) Imagen de HR-TEM no ampliada; B) imagen de HR-TEM no ampliada, C) imagen de Saed Pattern, D) Diagrama de resultados obtenidos por cuantificación.

La figura 19 B es una ampliación de una zona seleccionada, en donde se observa que la distribución de tamaños es baja (muestra muy homogénea). La figura 19 C es una imagen SAED Pattern, o patrón de difracción de área seleccionada. Es una técnica cristalográfica experimental que se puede obtener gracias al TEM. De esta manera una lámina delgada de muestra se somete a un haz de electrones de alta energía, de manera que los electrones pasan a través de la muestra fácilmente. Así, los átomos actúan como una red de difracción de los electrones de manera que los electrones son difractados. Es decir, una fracción de ellos se dispersará en determinados ángulos particulares, proporcionando la estructura cristalina del material. Así se obtiene una estructura cúbica centrada en las caras de los átomos de oro, como se representa en la Figura 20.

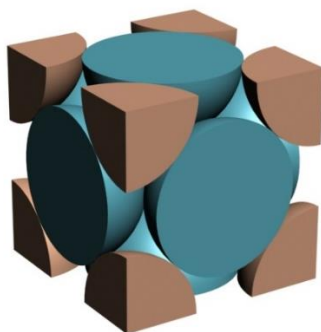


Figura 20: Estructura cristalina cúbica centrada en la caras

Por último, la Figura 19 D muestra los resultados correspondientes al detector de de la difracción de rayos X, un microanalizador por energía de rayos X dispersados (EDX) que permite la detección y cuantificación de los elementos presentes. De esta manera se comprueba que los elementos mayoritarios son el Oro con un 33,56 %, el Oxígeno con 58,03 % y el Azufre con un 8,42 %. Estos resultados concuerda con lo esperado, ya que no se comprueba que no hay impurezas, por lo que la purificación se ha llevado a cabo correctamente, y se encuentra oro y azufre, éste último correspondiente al ligando.

Mediante las imágenes obtenidas se realiza la determinación del tamaño promedio del nanocluster de oro. De esta manera, aleatoriamente se van realizando medidas de los diámetros de los nanoclusters recogidos en las imágenes. Se han analizado 194 valores, obteniendo un valor de tamaño promedio de:

$$2,66 \pm 0,12 \text{ nm}$$

Como la estructura cristalina es una cubica centrada en las caras, se puede calcular el volumen que ocupa una celda unitaria con esa estructura, conociendo tanto la densidad del oro (19.3 g/cm^3), como la masa de una celda unidad ($1.31 \cdot 10^{-21} \text{ g/celda}$). Así el volumen obtenido es el siguiente:

$$\text{Volumen celda unitaria} = 6,79 \times 10^{-2} \frac{\text{nm}^3}{\text{celda}}$$

Mediante el diámetro obtenido experimentalmente, se puede hallar el volumen del AuNCs, obteniéndose un valor:

$$\text{Volumen AuNCs} = 9,810 \text{ nm}^3$$

Si se dividen los volúmenes anteriores, se obtiene cuantas redes cristalinas hay en cada AuNCs, obteniéndose un valor de 145 redes/NCs. Como una estructura cúbica centrada en las caras posee 4 átomos reales de Oro, se puede determinar que cada nanoclusters contiene 579 átomos de Oro. De esta manera, se obtiene un resultado que concuerda con la bibliografía con

respecto al tamaño experimental que se ha encontrado [39]. Además, al tener tanto número de átomos de Au y ser el nanocluster de mayor tamaño que otros encontrados en bibliografía, como se explicaba en la Figura 5, al aumentar el tamaño del NCs la emisión se desplaza mayores longitudes de onda [40]

Con este dato de número de átomos de oro en el NCs se puede, mediante el número de Avogadro, determinar los moles de Au que hay en cada NCs. Con los datos de concentración de oro obtenidos en el análisis de ICP-MS y estos últimos datos obtenidos se puede calcular la concentración de NCs presente en la disolución purificada proveniente de la síntesis. Se obtuvo una concentración de Au de 0.41 mM, por lo que relacionando el número de moles Au que hay en esa disolución con el número de moles de Au que hay en cada NCs, resulta que la concentración de NCs es de:

$$4,26 \times 10^4 \text{NCs/mL}$$

Este dato obtenido va a ser primordial en posteriores experimentos. Con este dato se va a para poder determinar de forma correcta la relación molar que se debe utilizar para poder realizar la unión de nanocluster a una biomolécula. De esta manera la relación molar se establece entre moles de biomolécula y moles de NCs.

2. Bioconjugación

Durante la Bioconjugación lo que se pretende es enlazar una biomolécula junto con un nanomaterial, para formar un complejo nuevo que tiene propiedades combinadas de los dos componentes individuales. Así, se intenta conseguir crear un conjugado biológicamente activo y que mantenga la estructura de la biomolécula, así como las propiedades características del nanomaterial.

En concreto, en este caso se va a enlazar los AuNCs con un anticuerpo, el Anti-IgE y se va a usar el método de la carbodiimida, siguiendo el protocolo que se describe en la Figura 10 (Sección Experimental Apartado 4.3.). En los estudios preliminares sólo se añadió EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida) para llevar a cabo la bioconjugación, con el que se siguió un método simple, pero obteniendo un rendimiento más bajo [31]. Por ello se ensayó la adición de NHS (N-hidroxisuccinimida) con la cual la reacción es mucho más eficaz. De esta manera se observó una mejora de la señal de fluorescencia. Por ello se decidió realizar el resto de las bioconjugaciones empleando los dos reactivos (EDC + NHS) conjuntamente.

Además, se ha optimizado la relación molar con respecto a anticuerpo y nanocluster que hay que mantener para llevar a cabo la reacción de bioconjugación. De esta manera, se han

ensayado las siguientes relaciones Ab:AuNCs, 1:1, 1:3, 1:5, 1:7 y 1:10. Mediante el procedimiento explicado en la sección de Experimental (sección 4.3.) y la posterior purificación para eliminar el exceso de reactivos sobrantes (sección 4.4.), se dispone a realizar diferentes estudios analizando dos aspectos: por un lado se analiza que se mantenga la fluorescencia de nanocluster y por otro lado se estudia que se mantenga la funcionalidad del anticuerpo.

2.1. Caracterización Fotoluminiscente

La caracterización fotoluminiscente de los AuNCs se realizó empleando un espectrofluorímetro molecular.

En primer lugar se ha realizado un estudio para seleccionar las longitudes de onda óptimas del bioconjugado Ab:AuNCs. En el Anexo 2 (Figuras 1 y 2) se recogen todos los espectros registrados correspondientes a este estudio de caracterización. Como se recoge en la Figura 21, el par excitación/emisión donde mejor se observan la emisión fotoluminiscente del bioconjugado es 300/730 nm,

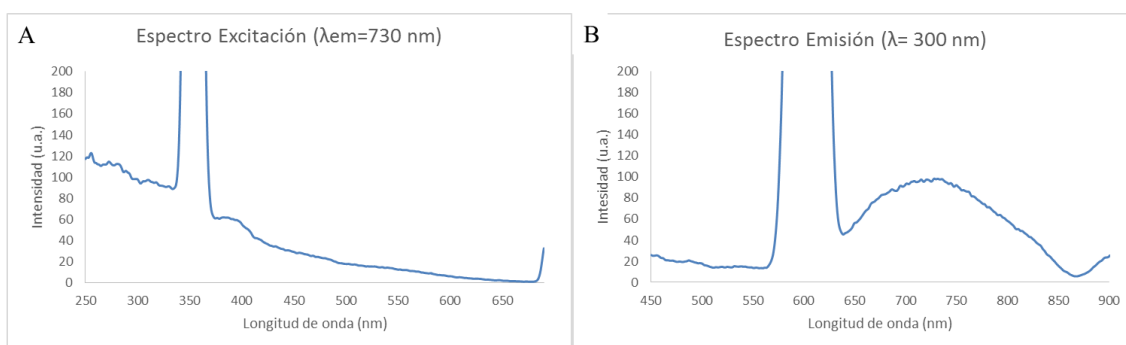


Figura 21: Espectros optimizados para el Bioconjugado. A) Espectro de excitación y B) Espectro de emisión.

En segundo lugar se estudió el efecto producido por las diferentes relaciones molares utilizadas para realizar la Bioconjugación, con respecto a Anticuerpo-AuNCs. Como se ha comentado anteriormente se han utilizado las siguientes relaciones Ab:AuNCs: 1:1, 1:3, 1:5, 1:7 y 1:10. Los espectros de fluorescencia obtenidos se recogen en la Figura 26.

Las intensidades máximas de pico se pueden observar en la Figura 22 (Ver espectros Figura 3; Anexo 2). En dicha representación se podrían descartar como bioconjugados óptimos, las relaciones 1:1 y 1:10, ya que proporcionan intensidades de fluorescencia lo suficientemente buenas, por lo que a la hora de hacer el inmunoensayo no serían suficientes para poder hacer la detección. Esto concuerda con que en el caso de la relación 1:1, no haya suficiente marca para

bioconjugar correctamente, además de no proporcionar una señal de fluorescencia lo suficientemente intensa para obtener la banda de emisión. Por otra parte, la relación 1:10 supone el empleo de una excesiva cantidad de marca.

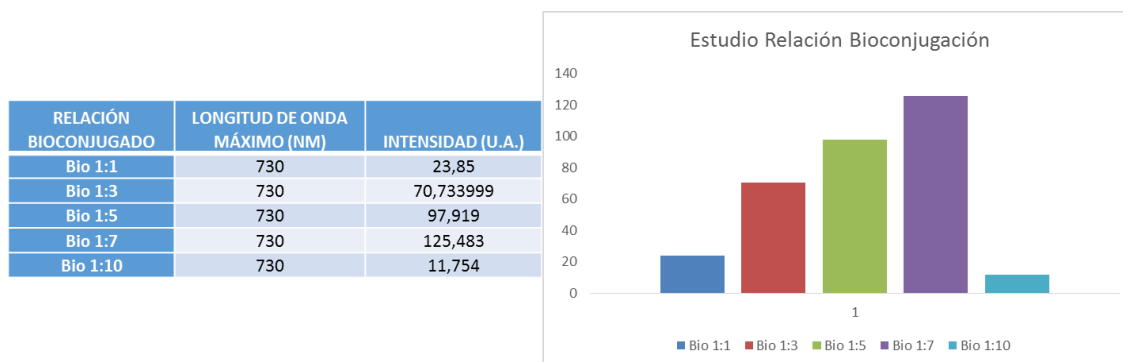


Tabla 6 y Figura 22: Relación de longitudes de onda obtenidas e intensidades fotoluminiscentes de los diferentes Bioconjugados obtenidos.

Las mejores señales de emisión las proporcionan los bioconjugados sintetizados manteniendo las relaciones 1:3, 1:5 y 1:7, siendo la relación que ofrece la mayor señal fotoluminiscente la del 1:7. Sin embargo, antes de seleccionar dicha relación, es preciso comprobar que el anticuerpo marcado posea aún su funcionalidad. Para llevar a cabo esta comprobación se diseñó el siguiente inmunoensayo espectrofotométrico.

2.2. Inmunoensayo-espectrofotométrico

El inmunoensayo espectrofotométrico se realiza para con diferentes objetivos. Uno de ellos es comprobar que se mantiene la funcionalidad del anticuerpo al realizar la bioconjugación, de manera que al añadir el marcador, es decir, el nanocluster, no se ocupen los sitios de reconocimiento del anticuerpo que se pretende marcar. Otro de los objetivos es determinar cuál de los biocojugados es el óptimo en cuanto la parte de inmunoensayo. Anteriormente, en la caracterización por fluorescencia se ha obtenido una relación de anticuerpo-NCs óptima a la hora de realizar la bioconjugación, con respecto a la señal de fluorescencia obtenida. Pero puede ocurrir que dicha relación óptima no lo sea en cuanto al inmunoensayo, de manera que afecte a la funcionalidad del anticuerpo, remitiéndose al primer objetivo. El riesgo esperable radica en el hecho de que al aumentar la cantidad de NCs empleada en la bioconjugación, éstos ocuparán más parte del anticuerpo pudiendo así apantallar las zonas de reconocimiento de dicho anticuerpo.

Por ello se realiza este inmunoensayo, utilizando como revelado de la reacción un anticuerpo secundario marcado con peroxidasa, enzima que provoca la reacción de revelado. Este inmunoensayo se realiza en placas de ELISA, como la observada en la Figura 9, con el

esquema indicado. En presencia de agua oxigenada, un sustrato adecuado para la peroxidasa se reduce y da un producto soluble y coloreado. En este caso el sustrato utilizado es la 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), el cual produce una coloración azul, como se puede observar en la Figura 23 [32].

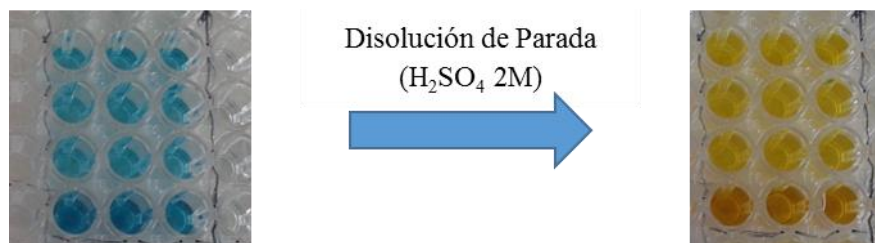


Figura 23: Cambio de color observado al añadir la disolución Stop

Al añadir la disolución de parada, que es H_2SO_4 2 M, se detiene la reacción enzimática, generando un cambio de color instantáneo. Es entonces cuando se realizan las medidas de absorbancia a una longitud de onda de 490 nm (longitud de onda correspondiente al color generado) en un lector de placas de absorbancia.

En este caso se realizó un estudio con los tres bioconjugados que anteriormente se han determinado como los de mayor señal: relaciones Anticuerpo-NCs 1:3, 1:5 y 1:7 (Ver Figura 24). Además se añade otra fila, en la cual se añade una disolución del Anticuerpo sin marcar, pero a la concentración a la que se encuentran los bioconjugados. Los análisis se van a realizar por triplicado. Por otra parte se realiza un tipo de blanco sin añadir el analito, en este caso el anticuerpo marcado con NCs. También se realizarán triplicados.

Como se puede observar en la Figura 23, el inmunoensayo realizado ha dado un resultado positivo, confirmando que se mantiene la funcionalidad del anticuerpo tras realizar el marcaje con los AuNCs. De manera cuantitativa en la Tabla 7 se recogen los valores observados de intensidad de emisión fluorescente.

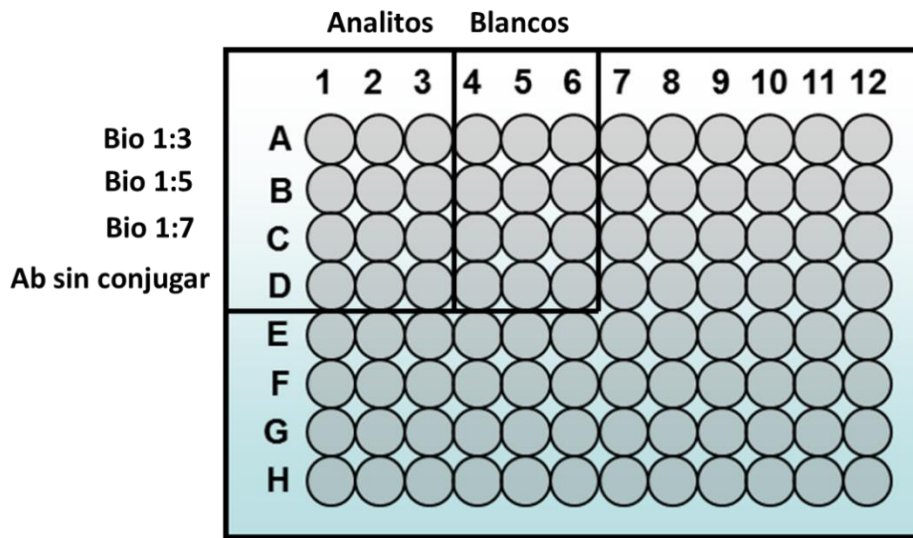


Figura 24: Esquema del inmunoensayo espectrofotométrico.

	RESULTADOS		
Bio 1:3	2,169	±	0,01
Bio 1:5	1,545	±	0,007
Bio 1:7	1,477	±	0,002
Ab sin marcar	2,411	±	0,02

Tabla 7: Resultados obtenidos tras el inmunoensayo espectrofotométrico

Así, observando los resultados obtenidos en la Tabla 7 se confirma que al aumentar la cantidad de marca (AuNCs) empleada en la bioconjugación va disminuyendo la señal luminiscente obtenida, probablemente debido a que conforme se aumenta la cantidad de nanoclusters presente en el medio de reacción se unen más y por ello van bloqueando los sitios activos de reconocimiento del anticuerpo provocando por ello una menor unión con el anticuerpo secundario que está marcado con la peroxidasa y por tanto la reacción enzimática se da en menor medida y por ello la señal de absorbancia es menor.

2.3. Conclusiones de los estudios de optimización de la bioconjugación

Con los resultados obtenidos en los estudios anteriores, se puede concluir que las mejores relaciones, con las cuales se obtiene un compromiso entre señal de fluorescencia y funcionalidad de anticuerpo, son las relaciones 1:3 y 1:5. Para estas relaciones molares de bioconjugación se ha realizado una representación, comparando la señal obtenida con la señal que se tiene en una disolución de AuNCs a la disolución que se obtiene al final de la bioconjugación. Así se puede hacer una determinación de las diferencias detectadas posteriormente a la bioconjugación en las mismas condiciones.

Esta comparación se representa en la Figura 25 A y B.

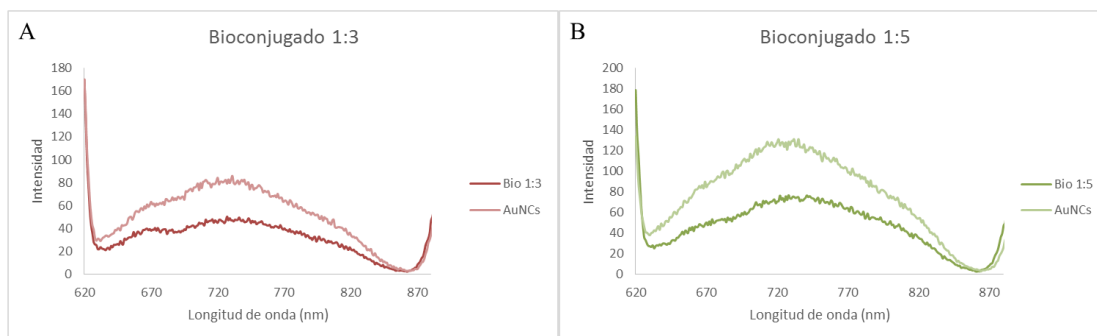


Figura 25: Comparación de los espectros luminisctenes de AuNCs y de los Bioconjugados.

A) Bioconjugado obtenido asegurando una relación molar Ab:AuNCs 1:3.

B) Bioconjugado obtenido asegurando una relación molar Ab:AuNCs 1:5.

De esta manera es posible extraer dos conclusiones principales:

1. Por una parte se confirma, que en igualdad de condiciones, a raíz de la bioconjugación hay una pérdida de la señal de fluorescencia considerable, aumentando conforme se aumenta la relación molar de la bioconjugación.

2. El otro aspecto importante es el ligero desplazamiento de la longitud de onda de emisión obtenida hacia longitudes de onda mayores, debido a la reacción de bioconjugación.

3. Inmunoensayo para la determinación de IgE

La determinación de IgE es importante ya que tal y como se ha comentado en la introducción, la IgE ejerce como biomarcador en alergias. Así, se evaluó la posibilidad de aplicar las propiedades optoluminiscentes de los AuNCs a un bioanálisis para la determinación de la IgE. Dicho bioanálisis consistió en un inmunoensayo luminiscente de tipo competitivo, de manera que la muestra, la IgE, competirá con el anticuerpo inmovilizado por unirse a la marca (un anticuerpo, Anti-hIgE, marcado con AuNCs).

3.1. Ensayo realizado en placa

Previamente a realizar el inmunoensayo hay que observar como la marca se comporta en un inmunoensayo, es decir, observar si al unirse a un anticuerpo enlazado a una placa de ELISA se mantienen las propiedades luminiscentes de la marca. Por ello se realizó un estudio de la fluorescencia en placa, mediante un lector de placas. Este estudio consistió en realizar son las siguientes etapas:

- Inmovilización de la proteína IgE (3 $\mu\text{g/mL}$) en los pocillos de la placa ELISA.
- Bloqueo del soporte sólido para evitar adsorciones inespecíficas.
- Reacción inmunológica: en donde se añade el anticuerpo marcado con AuNCs
- Detección de fluorescencia mediante un lector de placas.

Primero se realizó una medida en el lector de placas, en placa seca, obteniendo las señales fluorescentes que se encuentran en la Figura 26 A. Por una parte se observa un gran ruido de fondo, observando la señal del blanco en órdenes de magnitud muy similares a los obtenidos en las señales que producen los marcajes. Además en la longitud de onda a la que emitían tanto los AuNCs como el anticuerpo bioconjugado con AuNCs, no se observa el pico de emisión, sino que está incluido en un gran pico con el máximo en el rango 670-710 nm, el cual puede ser ruido de fondo.

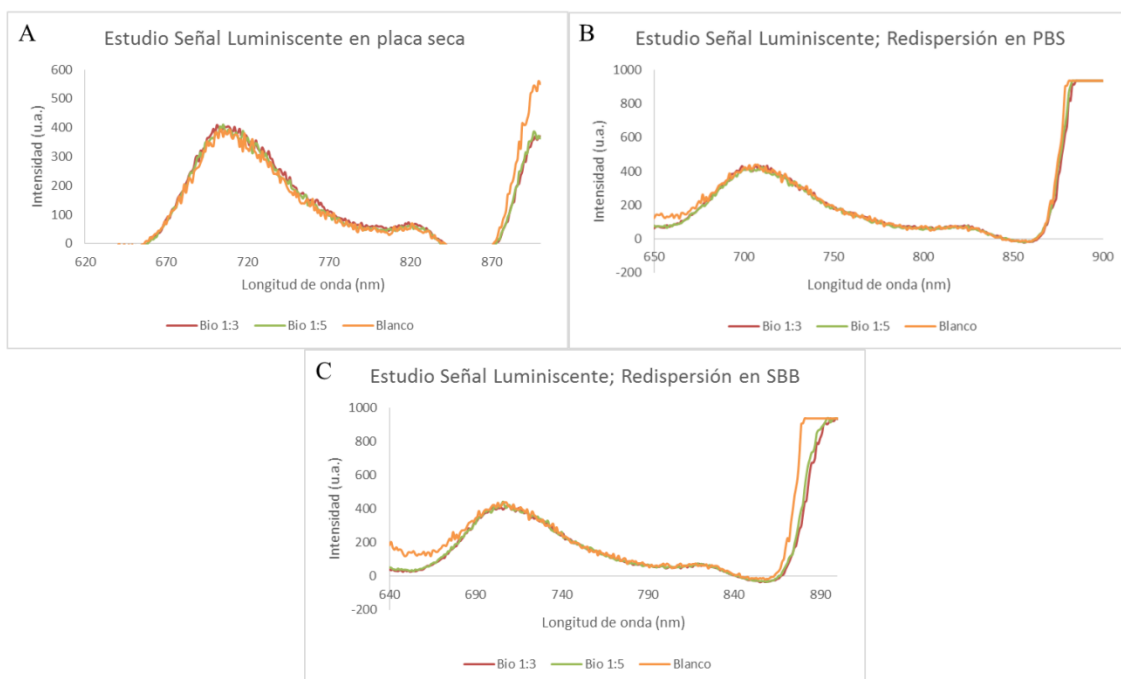


Figura 26: Espectro de emisión fluorescente de los AuNCs tras realizar el inmunoensayo.

- A) Señales medidas en placa seca.
- B) Señales medidas tras redispersión del bioconjugado en PBS.
- C) Señales medidas tras la redispersión del bioconjugado en SBB

Como empleando medidas directamente en la placa seca no dio lugar a señales analíticamente útiles, se intentó redispersar los AuNCs presentes en cada pocillo para poder medir su luminiscencia. Primero se probó a redispersarlos en medio neutro, con PBS (Figura 26 B). Desafortunadamente se obtuvieron los mismos resultados que con placa seca. Por último, una manera de redispersar es con cambios fuertes de pH y dado que anteriormente, en los estudios de estabilidad, se ha determinado que en pH básicos los AuNCs se mantienen estables, se realizó un estudio redispersando los AuNCs en medio a pH 8.5. Los resultados obtenidos se pueden observar en la Figura 26 C. Como se puede observar, tal ocurre como en el caso anterior y la redispersión no ha servido para poder observar la fluorescencia de los nanoclusters. Por ello es necesario optimizar esta etapa del inmunoensayo con diferentes formas de redispersión.

3.2. Microscopia confocal

La microscopía láser confocal es una nueva técnica microscópica que tiene numerosas ventajas frente a la microscopia óptica tradicional, ya que proporciona mayor nitidez y contraste y una mayor resolución vertical y horizontal entre otras. El principio de la microscopía confocal

se basa en eliminar la luz reflejada o fluorescente procedente de los planos fuera de foco, iluminando una pequeña zona de la muestra y tomando el haz luminoso que proviene del plano focal. [41].

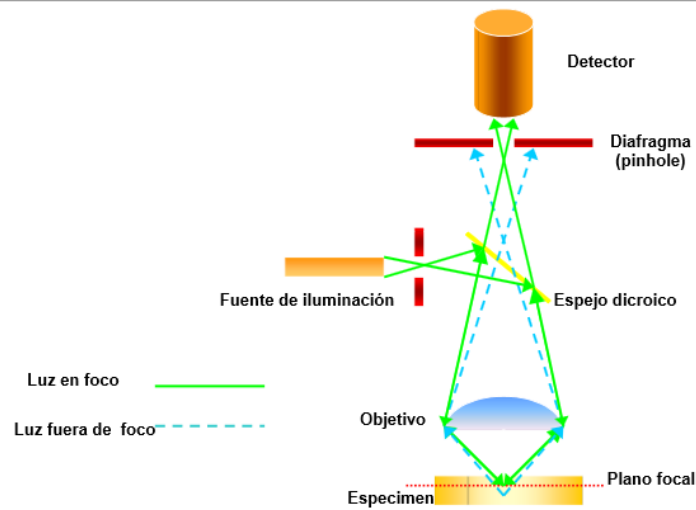


Figura 27: Esquema de un microscopio confocal

Dicho principio no sería posible sin la existencia de dos diafragmas, uno entre la fuente de luz y el objetivo y el otro entre el objetivo y el detector. Ambos diafragmas deben de estar perfectamente alineados de forma que el segundo de ellos únicamente deje llegar al detector la luz procedente del plano focal. La utilización de un láser como fuente de luz permite focalizar la iluminación en una región muy pequeña de la muestra y con una gran intensidad. Como sólo se ilumina un punto de la muestra, es necesario hacer un barrido de puntos para observar la muestra al completo (ver Figura 27).

Debido a que con el lector de placas no ha sido posible, con estudios preliminares, a observar la fluorescencia emitida por los AuNCs, se recurre a esta técnica para poder determinar si se mantiene la fluorescencia posteriormente a realizar el inmunoensayo. Se recurre a este tipo de técnica porque es el láser el que va a provocar que la iluminación focalizada sea más potente y por ello es más probable que haya luminiscencia.

Se realizaron dos análisis. Un primer análisis en donde se buscó la emisión fluorescente del nanocluster tras la reacción inmunológica y un segundo análisis consistente en la realización de un inmunoensayo competitivo sobre un portaobjetos de uso convencional en microscopía óptica, pero recubierto con poly-L-lisina. Este último inmunoensayo lo que se hace es una competencia entre el analito inmovilizado y el añadido (IgE) por la marca. La IgE se va a añadir en los diferentes pocillos en diferentes cantidades, creando así una recta de calibrado de

manera que en el caso de realizar el ensayo con muestra real poder determinar la cantidad de IgE en la muestra de suero humano.

De estos dos análisis se van con uno de los dos bioconjugados que se han comprobado que son los óptimos. Va a ser el caso del 1:5, que es el que muestra un mejor compromiso entre señal de fluorescencia y funcionalidad de anticuerpo. El esquema de cada una de las placas, tanto en inmunoensayo en el primer análisis como en el segundo es el representado por la Figura 28.

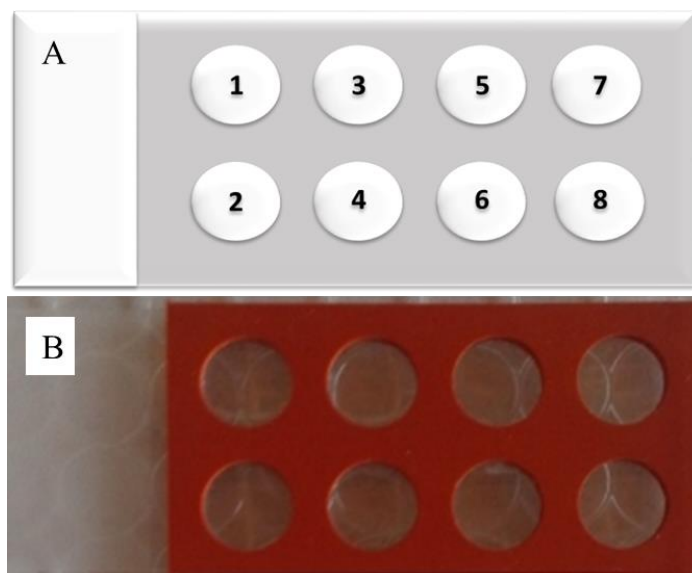


Figura 28: Placa para confocal. A) Esquema para el inmunoensayo en microscopía confocal.
B) Foto de la placa.

En el caso del análisis para comprobar la fluorescencia del AuNCs (Análisis 1), el procedimiento es el mismo que se sigue para realizar las pruebas en placa, inmovilizando la proteína IgE (3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en los pocillos y bloqueando el soporte sólido para evitar adsorciones inespecíficas. Posteriormente se añade el anticuerpo marcado con AuNCs y detecta mediante la microscopía confocal. El esquema que se sigue es el siguiente:

- Los pocillos 1 y 2 son los blancos de reacción: en el 1 no se ha realizado el tapizado y en el 2 no se ha añadido el marcaje.
- Se van a estudiar dos tipos de tapizado, para poder determinar cuál es el tapizado con el que se obtiene un mejor resultado. En los pocillos 3 y 4 el tapizado se realiza por adsorción, mientras que de 5 a 8 el tapizado se realiza por reacción con EDC. Además, se va a analizar si se ven cambios en la señal de fluorescencia mediante la adición de diferentes volúmenes de marcaje:
 - En el pocillo 3 se añadirán 100 μL del anticuerpo marcado.
 - En el pocillo 4 se añadirán 200 μL del anticuerpo marcado.
 - En el pocillo 5 se añadirán 100 μL del anticuerpo marcado.

- En el pocillo 6 se añadirán 50 μL del anticuerpo marcado.
- En el pocillo 7 se añadirán 200 μL del anticuerpo marcado.
- En el pocillo 8 se añadirán 150 μL del anticuerpo marcado.

Para este Análisis 1 se han obtenidos los resultados que se observan en la Figura 29. En esta Figura hay tres tipos de imagen: las imágenes de transmisión (A, D y G), las imágenes de fluorescencia, usando un láser a 405 nm y detectando en el rango de 680 a 900 nm, (B, E y H) las imágenes superpuestas de las dos anteriores (C, F e I).

Además en esta Figura 29 se representa por una parte el blanco sin marcaje (Figura 29 A, B y C) en el que observa ciertos gránulos sin fluorescencia, por lo que se comprueba que no hay fluorescencia sin marcaje. Por otra parte también se representan los resultados correspondientes a tapizar por adsorción (Figura 29 D, E y F) a tapizar por reacción con EDC (Figuras 29 G, H e I), observando que se obtienen mejores señales con la segunda opción, además de comprobar que se conserva la fluorescencia tras la reacción inmunológica, comparado con el blanco.

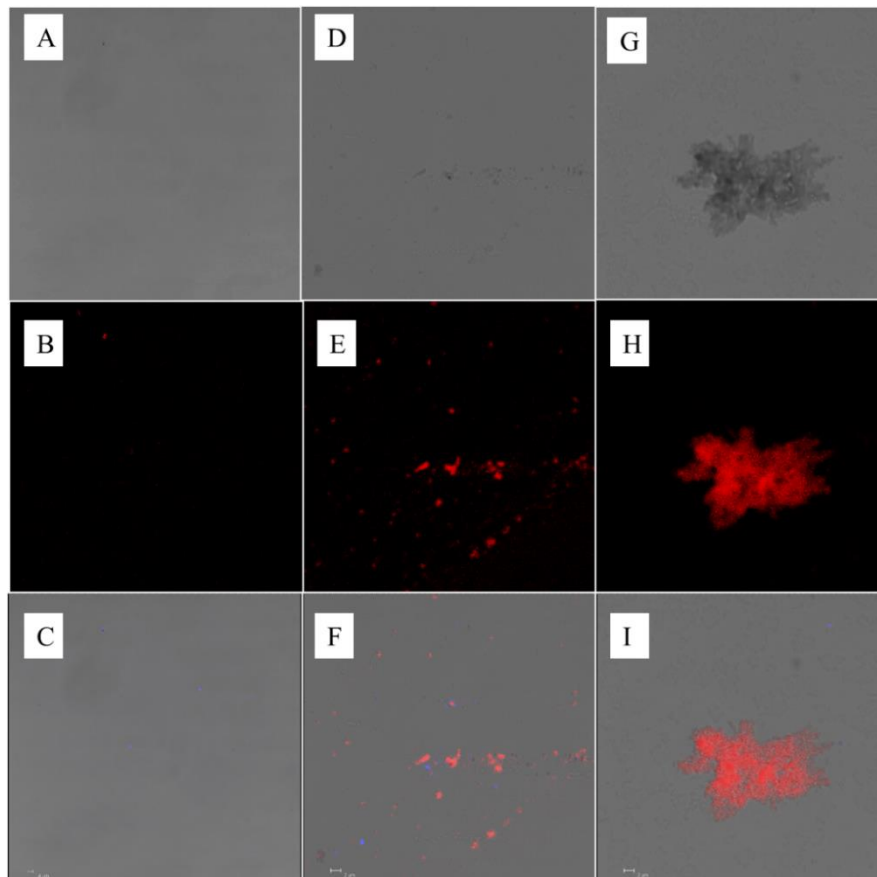


Figura 29: Resultados para el Análisis 1. A) Imagen de Transmisión Blanco. B) Imagen de Fluorescencia Blanco. C) Imagen superpuesta Blanco. D) Imagen de Transmisión Tapizado por Adsorción. E) Imagen de Fluorescencia Tapizado por Adsorción. F) Imagen superpuesta Tapizado por Adsorción. G) Imagen de Transmisión Tapizado por Reacción. H) Imagen de Fluorescencia Tapizado por Reacción. I) Imagen superpuesta Tapizado por Reacción.

Por otra parte, se han comparado diferentes volúmenes de bioconjugados, observando que la diferencia en señal luminiscente es apreciable (Ver Anexo 3 Figura 1). Por último, se ha realizado una comparación con el blanco sin tapizar (Ver Anexo 3 Figura 2), el blanco tapizado pero sin marca y se registró la señal luminiscente de fondo en uno de los pocillos de reacción vacíos, observándose que en el caso del blanco sin tapizar (sin analito) se obtiene que la marca reacciona con el bloqueo (BSA que se representa con coloración azul al añadir un canal adicional de excitación en torno a 450 nm), generando adsorciones inespecíficas. Sin embargo se observa que cuando se añade el analito dichas adsorciones inespecíficas se anulan.

El segundo análisis realizado es el inmunoensayo competitivo. Para ello, se inmovilizó la proteína IgE (3 µg/mL) en los pocillos mediante reacción con EDC y se bloqueó el soporte sólido para evitar adsorciones inespecíficas. Posteriormente se añadió el anticuerpo marcado con AuNCs además de IgE en relación 1:1 con respecto a la marca. Por último se procedió a la detección mediante la microscopía confocal. El esquema seguido (mediante la placa de la Figura 28) es el siguiente:

- Los pocillos 1 y 2 son los blancos de reacción: en el 1 no se ha realizado el tapizado y en el 2 no se ha añadido el marcaje.
- Como se ha comentado anteriormente, en este caso lo que se hace es una recta de calibrado, de manera que se va a añadir cantidades fijas tanto de marca como de IgE (en relación 1:1 y para no sobrepasar la capacidad máxima del pocillo se añaden 75 µL de cada uno), pero en cada pocillo se va añadir una disolución de diferentes concentraciones de IgE:
 - En el pocillo 3 se añade una disolución de IgE de 0 µg/mL.
 - En el pocillo 4 se añade una disolución de IgE de 0,03 µg/mL.
 - En el pocillo 5 se añade una disolución de IgE de 0,1 µg/mL.
 - En el pocillo 6 se añade una disolución de IgE de 0,3 µg/mL.
 - En el pocillo 7 se añade una disolución de IgE de 1 µg/mL.
 - En el pocillo 8 se añade una disolución de IgE de 3 µg/mL.

Los resultados obtenidos para este segundo análisis se representan en la Figura 30. En este caso se han representado las imágenes ya superpuestas, para poder observar en una sola imagen todas las características. El esquema de la Figura 28 sigue el esquema que se ha seguido en la imagen, de tal manera que la numeración corresponde a los pocillos de la placa. En el caso de los blancos, se corresponde de igual manera a lo comentado en el primer análisis por lo que se confirma un mismo comportamiento en diferentes inmunoensayos. Por otra parte, en la zona de la recta de calibración, sí que se puede asegurar que el inmunoensayo competitivo se da correctamente ya que se produce una atenuación de la fluorescencia conforme se va aumentando

la concentración de IgE añadida, de manera que a mayor concentración de IgE menos cantidad de marca se queda inmovilizada en la placa.

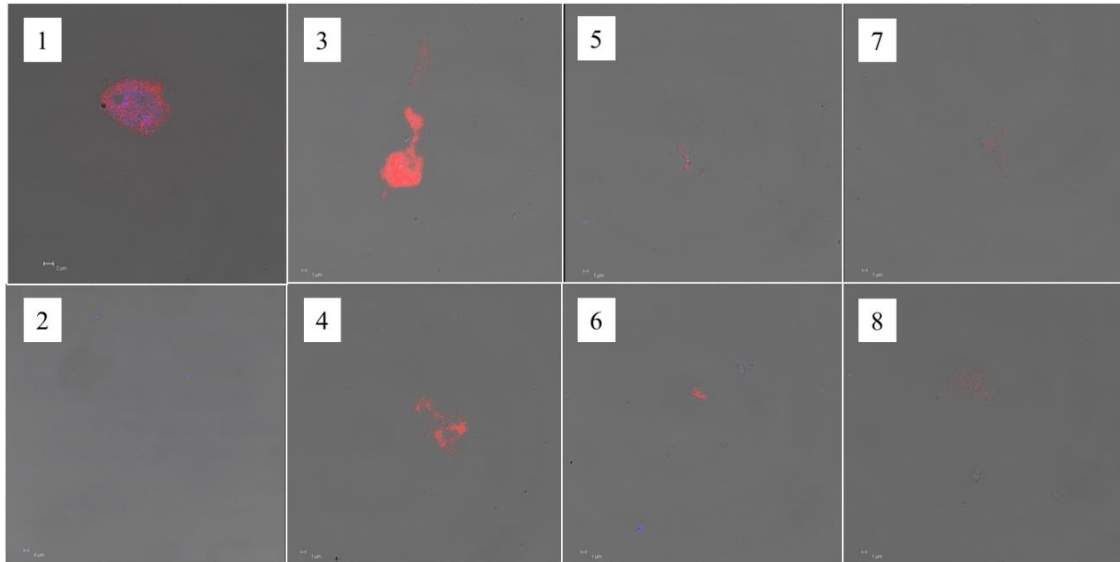


Figura 30: Resultados para el Análisis 2. 1) Blanco sin tapizar. 2) Blanco sin marcaje. 3) Con IgE de 0 µg/mL 4) Con IgE de 0,03 µg/mL. 5) Con IgE de 0,1 µg/mL. 6) Con IgE de 0,3 µg/mL. 7) Con IgE de 3 µg/mL. 8) Con IgE de 1 µg/mL

V. Conclusiones

Las principales conclusiones que se pueden extraer del presente Trabajo Fin de Master se recogen a continuación:

- Se ha realizado la síntesis de Nanoclusters de Oro de manera satisfactoria:
 - Se ha realizado la caracterización de los nanoclusters mediante sus propiedades fotoluminiscentes obteniendo la longitud de onda óptima de excitación para observar correctamente la banda de emisión de los AuNCs, estableciéndose como par de excitación/ emisión óptimo 300/720 nm.
 - Se han realizado estudios de estabilidad, comprobando que los AuNCs son estables a medios básicos, con respecto al tiempo y con respecto a la luz.
 - Se ha realizado también un estudio de su morfología mediante la técnica de HR-TEM obteniéndose que los AuNCs presentan una forma casi esférica y un tamaño promedio de $2,656 \pm 0,117$ nm.
 - Por otra parte se ha realizado análisis mediante ICP-MS para obtener el rendimiento de la reacción, obteniendo un resultado del 71.68 %.
 - Con la información aportada por las dos técnicas complementarias (HR-TEM e ICP-MS) se ha conseguido establecer una relación que nos permite calcular la concentración de NCs y cuantos átomos de oro hay en cada nanocluster.
- Mediante el método de la carbodiimida se ha optimizado la bioconjugación de los AuNCs con un anticuerpo, y se ha caracterizado dicha unión por fluorescencia. Se ha optimizando la relación molar entre anticuerpo y AuNCs para obtener una señal de fluorescencia óptima sin contrarrestar la funcionalidad del anticuerpo, la cual se ha comprobado mediante un inmunoensayo espectrofotométrico.
- También se ha realizado estudios preliminares para el desarrollo de un inmunoensayo competitivo fluorescente basado en AuNCs, para la determinación de IgE en suero humano, obteniendo resultados prometedores utilizando una detección por microscopía confocal.

En cuanto a las competencias personales, cabe concluir que se ha conseguido interpretar la información obtenida en el laboratorio, así como desarrollar la capacidad de tomar decisiones en función de los resultados obtenidos. Por otra parte, se han aprendido nuevas técnicas de caracterización, como por ejemplo el HR-TEM o la microscopía láser confocal, de los cuales se ha aprendido su funcionamiento, su uso y su aplicabilidad.

Por último, se han desarrollado las capacidades para trabajar en un laboratorio de investigación, tanto en el desarrollo experimental del trabajo, como en la parte más teórica como por ejemplo la metodología para realizar esta memoria del Trabajo Fin de Máster.

VI. Trabajos Futuros

Como trabajos futuros en esta línea de investigación se podrían destacar los siguientes aspectos relacionados con el desarrollo y optimización del inmunoensayo para la determinación de IgE en suero humano:

- Es necesario realizar estudios tanto de tapizado como de bloqueo del inmunoensayo, para obtener una señal óptima y poder también evitar adsorciones inespecíficas.
- Otro aspecto que es necesario desarrollar es el calibrado con IgE ajustado a los niveles de concentración de IgE en muestras de suero. De manera que es necesario por una parte optimizar la relación muestra-trazador y por otra parte habría que realizar triplicados del calibrado para observar la reproducibilidad del inmunoensayo y por tanto del sensor.
- Por último habría que observar el comportamiento de la muestra real en el sensor y si es preciso realizar algún tipo de pretratamiento a dicha muestra para poder realizar el inmunoensayo.
- En cuanto a la detección: en este punto es necesario hacer estudios en cuanto a poder detectar dicho inmunoensayo mediante lector de placas de fluorescencia, sin tener que recurrir a la microscopia confocal. Es decir, es necesario encontrar el medio de redispersión adecuado para poder realizar los análisis fluorimétricos en placa, con una señal de fluorescencia aceptable y que se pueda distinguir del blanco.

VII. Bibliografía

- [1] Sánchez, T.; Velasco Rodríguez, V.; Martínez Duart, J.M. (2011). Technology of the present and the future: Nanotechnology. *Journal Boliviano de Ciencia*, 8, 23, 2075-8936.
- [2] Feynman, R.P. (1960). There's plenty of room at the bottom. *Caltech Engineering and Science*, 23, 5, 22-36.
- [3] L. Trapiella Alfonso, Síntesis y evaluación de nanomateriales metálicos fluorescentes como marcadores en el desarrollo de inmunoensayos. Tesis Doctoral, Universidad de Oviedo, 2013.
- [4] Whitesides, G.M. (2005). Nanoscience, Nanotechnology and Chemistry. *Small*, 1, 2, 172-179.
- [5] C. Carrillo Carrión. Contributions of quantum dots to analytical nanoscience and nanotechnology. Tesis Doctoral, Universidad de Córdoba, 2011.
- [6] Serena, P.A.; Correia, A. (2003). Nanotecnología: el motor de la próxima revolución tecnológica. *Apuntes de Ciencia y Tecnología*, 9, 32-42.
- [7] Buzea, C.; Pacheco Blandino, I.; Robbie, K. (2007). Nanomaterials and Nanoparticles: Sources and Toxicity. *Biointerphases*, 2, 4, MR17 - MR172.
- [8] Lin, P.C.; Lin, S.; Wang, P.C.; Sridhar, R. (2014). Techniques for physicochemical characterization of nanomaterials. *Biotechnology Advances*, 32, 4, 711–726.
- [9] Sapsford, K.E.; Tyner, K. M.; Dair, B. J.; Deschamps, J. R.; Medintz, I. L. (2011). Analyzing nanomaterial bioconjugates: a review of current and emerging purification and characterization techniques. *Analytical Chemistry*, 83, 12, 4453-4488.
- [10] Shang, L.; Dong, S.; Nienhaus, G.U. (2011). Ultra-small fluorescent metal nanoclusters: synthesis and biological applications. *Nano Today*, 6, 4, 401-418.
- [11] Díez, I.; Ras, R.H. (2011). Fluorescent silver nanoclusters. *Nanoscale*, 3, 5, 1963-1970.
- [12] Jin, R. (2010). Quantum sized, thiolate-protected gold nanoclusters. *Nanoscale*, 2, 3, 343-362.
- [13] Le Guevel, X (2014). Recent Advances on the Synthesis of Metal Quantum Nanoclusters and Their Application for Bioimaging. *IEEE Journal of selected topics in quantum electronics*, 20, 3, 45-56.

- [14] Lin, C.A.J.; Yang, T.Y.; Lee, C.H.; Huang, S.H.; Sperling, R.A.; Zanella, M.; Chang, W.H. (2009). Synthesis, characterization, and bioconjugation of fluorescent gold nanoclusters toward biological labeling applications. *ACS Nano*, 3, 2, 395-401.
- [15] Zhang, L.B.; Wang, E.K. (2014). Metal nanoclusters: New fluorescent probes for sensors and bioimaging. *Nano Today*, 9, 1, 132-157.
- [16] Aldeek, F.; Muhammed, M.H.; Palui, G.; Zhan, N.; Mattoussi, H. (2013). Growth of highly fluorescent polyethylene glycol-and zwitterion-functionalized gold nanoclusters. *ACS Nano*, 7, 3, 2509-2521.
- [17] Kindt, T.J.; Goldsby, R.A.; Osborne B.A. (2007). "Capítulo 4: Antígenos y Anticuerpos". *Inmunología de Kubly*. McGraw-Hill Interamericana de España S.L., México, 76-110.
- [18] Mikkelsen, S.R.; Cortón, E. (2004). "Capítulo 5: Antibodies". *Bioanalytical Chemistry*. John Wiley & Sons, Inc., United States, 86-98.
- [19] Christopoulos, T.K.; Diamandis, E.P. (1996). "Capítulo 11: Nephelometric and Turbidimetric Immunoassay". *Immunoassay*. Academic Press, Inc. United States, 363-385.
- [20] Mikkelsen, S.R.; Cortón, E. (2004). "Capítulo 6: Quantitative immunoassays with labels". *Bioanalytical Chemistry*, John Wiley & Sons, Inc. United States, 99-127.
- [21] Pei, X.; Zhang, B.; Tang, J.; Liu, B.; Lai, W.; Tang, D. (2013). Sandwich-type immunosensors and immunoassays exploiting nanostructure labels: A review. *Analytica Chimica Acta*, 758,3, 1-18.
- [22] Triulzi, R.C.; Micic, M.; Giordani, S.; Serry, M.; Chiou, W.A.; Leblanc, R.M. (2006). Immunoassay based on the antibody-conjugated PAMAM-dendrimer-gold quantum dot complex, *Chem. Commun.*, 28, 48, 5068-5070.
- [23] Huang, C.C.; Chen, C.T.; Shiang, Y.C.; Lin, Z.H.; Chang, H.T. (2009). Synthesis of fluorescent carbohydrate-protected Au nanodots for detection of Concanavalin A and *Escherichia coli*. *Analytical chemistry*, 81, 3, 875-882.
- [24] Shiang, Y.C.; Lin, C.A.; Huang, C.C.; Chang, H.T. (2011). Protein A-conjugated luminescent gold nanodots as a label-free assay for immunoglobulin G in plasma. *Analyst*, 136, 6, 1177-1182.
- [25] Regueiro González, J.R.; López Larrea, C.; González Rodríguez, S.; Martínez Naves, E. (1997). "Capítulo 4: Los anticuerpos, sus ligandos y sus receptores". *Inmunología Biología y patología del sistema inmunitario*. Editorial Médica Panamericana, Madrid, 29-37.

- [26] Nelson, D.L., Cox, M.M.; Lehninger, A.L., (2009). “Capítulo 5.2.: El sistema inmunitario y las inmunoglobulinas”. Lehninger: Principios de bioquímica. Ediciones Omega S.A., Barcelona, 174-181.
- [27] Álvarez López, M.R.; López Álvarez, M.R; Muro Amador, M. (2008). “Capítulo 4: Inmunoglobulinas”. Rinitis Alérgica. Mra ediciones, Barcelona, 53–78.
- [28] Gould, H. J.; Sutton, B. J.; Beavil, A. J.; Beavil, R. L.; McCloskey, N.; Coker, H. A.; Smurthwaite, L. (2003). The biology of IgE and the basis of allergic disease. Annual review of immunology, 21, 1, 579-628.
- [29] Liu, J. M.; Lin, L. P.; Liu, Z. B.; Yang, M. L.; Wang, X. X.; Zhang, L. H.; Jiao, L. (2012). A promising CdSe@CdS-quantum dots-cysteine for the determination of trace IgE by solid substrate room temperature phosphorescence immunoassay. Journal of fluorescence, 22, 1, 419-429.
- [30] Plaza Martín, A.N. (2013). Capítulo 5: "Alergia a proteínas de leche de vaca". Protocolos diagnósticos y terapéuticos en pediatría, 1, 51-61.
- [31] Hermanson, G. T. (2013). “Capítulo 1: Functional Targets” y “Capítulo 2: The Chemistry of Reactive Groups”. Bioconjugate techniques. Academic press, Londres. 1-125, 127-228.
- [32] Procedimiento para inmunoensayo espectrofotométrico, con etapa de revelado con el TMB Substrate Kit: <http://www.piercenet.com/instructions/2160204.pdf> (Consulta Junio 2014)
- [33] Trapiella-Alfonso, L.; Costa-Fernández, J. M.; Pereiro, R.; & Sanz-Medel, A. (2011). Development of a quantum dot-based fluorescent immunoassay for progesterone determination in bovine milk. Biosensors and Bioelectronics, 26, 12, 4753-4759.
- [34] Fernández-Ujados, M.; Trapiella-Alfonso, L.; Costa-Fernández, J.M.; Pereiro, R.; Sanz-Medel, A. One-step Aqueous Synthesis of Fluorescent Copper Nanoclusters by Direct Metal Reduction (submitted to Nanotechnology, 2013)
- [35] Shiraishi, Y.; Arakawa, D.; Toshima, N. (2002). pH-dependent color change of colloidal dispersions of gold nanoclusters: Effect of stabilizer. The European Physical Journal E: Soft Matter and Biological Physics, 8, 4, 377-383.
- [36] Richards, C.I.; Choi, S.; Hsiang, J. C.; Antoku, Y.; Vosch, T.; Bongiorno, A.; Dickson, R.M. (2008). Oligonucleotide-stabilized Ag nanocluster fluorophores. Journal of the American Chemical Society, 130(15), 5038-5039.
- [37] Skoog, D. A.; West, D. M. (1980). “Capítulo: 11: Espectrometría de Masas”. Principles of instrumental analysis. Saunders College Publishing, New York, 269-288

[38] Brown, P. D. (1999). Transmission Electron Microscopy-A Textbook for Materials Science. *Microscopy and Microanalysis*, 5, 06, 452-453.

[38] Jin, R. (2010). Quantum sized, thiolate-protected gold nanoclusters. *Nanoscale*, 2, 3, 343-362.

[39] Zheng, J.; Zhang, C.; Dickson, R. M. (2004). Highly fluorescent, water-soluble, size-tunable gold quantum dots. *Physical Review Letters*, 93, 7, 077402.

[40] Nistal, Á. M. (2013). *Microscopía Láser Confocal*. Universidad de Oviedo. Disponible en: <http://www.unioviado.es/BOS/Novedades/Libro/0prefac.pdf>. (Consulta junio 2014)

VIII. Anexos

1. Anexo 1: Nanoclusters de Oro

Figura 1:

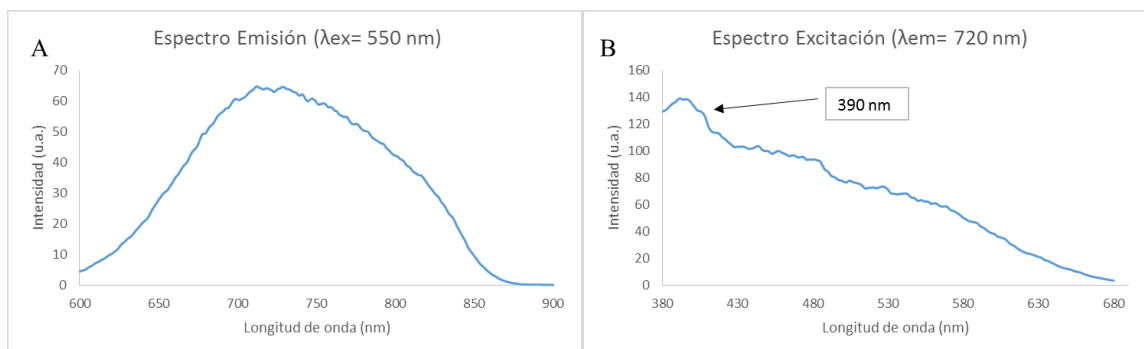


Figura 1, Anexo 1 A) Espectro de emisión de AuNCs con $\lambda_{exc}= 550 \text{ nm}$ B) espectro de excitación de AuNCs con $\lambda_{em}= 720 \text{ nm}$

Figura 2:

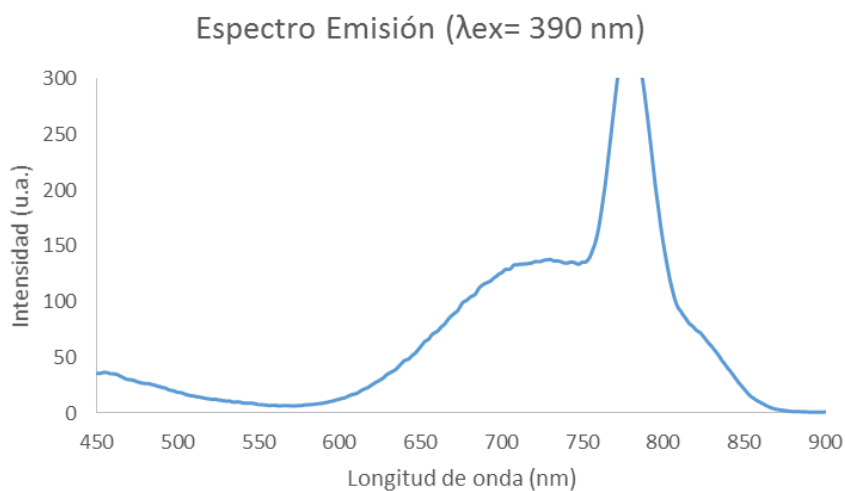


Figura 2, Anexo 1: Espectro de emisión de AuNCs con $\lambda_{exc}= 390 \text{ nm}$

Se realizó un espectro de emisión con una longitud de onda de excitación de 550 nm (Figura 1 A). Posteriormente se realizó el correspondiente espectro de excitación, para comprobar que se está excitando a la longitud de onda de máxima intensidad o por si al contrario hay otras longitudes de onda que proporcionan mayores intensidades de fluorescencia. Así, se obtuvo en el espectro de excitación un pico máximo a una longitud de onda correspondiente a 390 nm (ver Figura 1 B).

Se vuelve a realizar un espectro de emisión a 390 nm como longitud de onda de excitación (Figura 2), en el que se observa una mayor intensidad de la señal de fluorescencia que en los anteriores espectros de emisión obtenidos. El único problema que se refleja en este espectro es la aparición de banda de la dispersión Rayleigh en mitad de la banda de emisión pero no es del todo un problema ya que se observa el máximo de la emisión fuera del rango de dicha banda de dispersión. Sin embargo se busca una longitud de onda alternativa, que resulta ser 300 en donde ya no supone un problema la dispersión Rayleigh (ver Figura 12).

Figura 3:

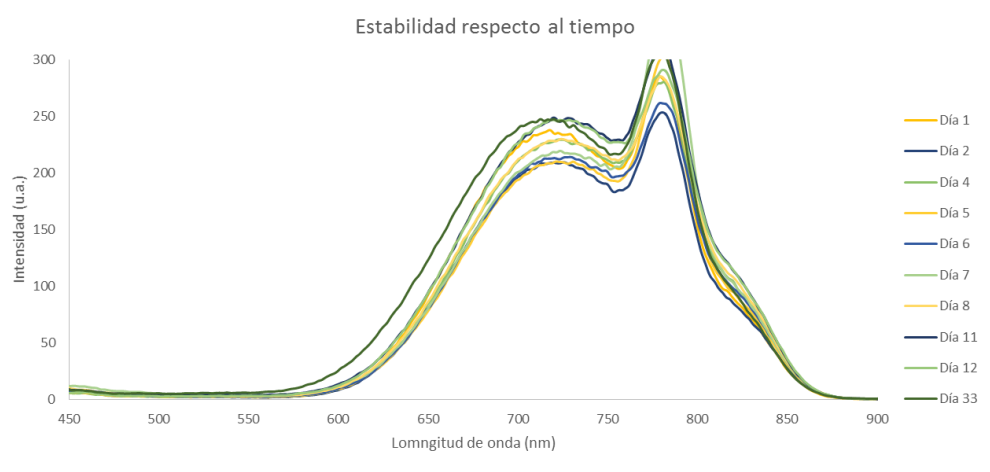


Figura 3, Anexo 1: Espectros estudios estabilidad respecto al tiempo

Figura 4:

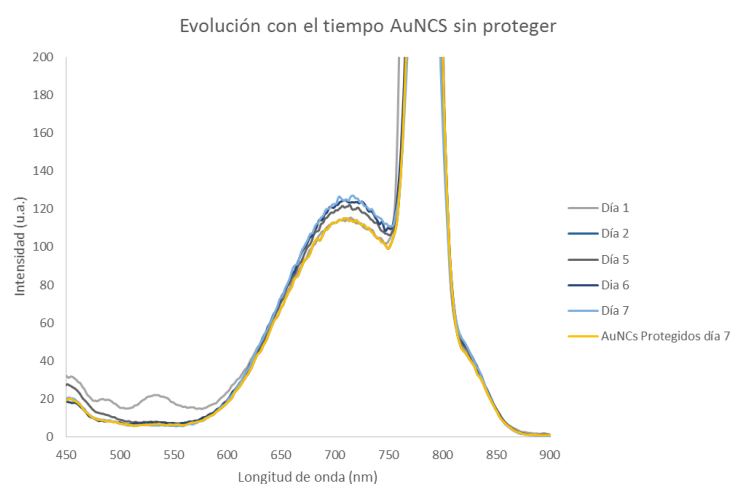


Figura 4, Anexo 1: Espectros estudios estabilidad respecto a la luz.

Figura 5:

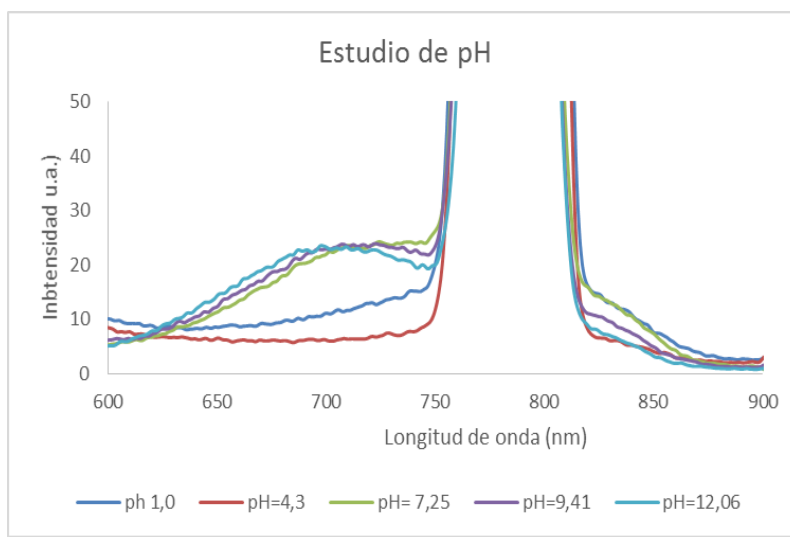
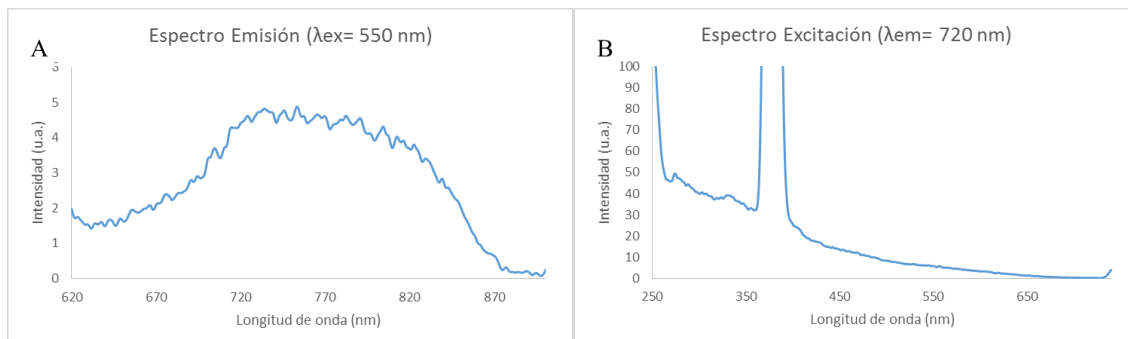


Figura 5, Anexo 1: Espectros estudio de pH.

2. Anexo 2: Bioconjugación:

3. Figura 1:



Figuras 1, Anexo 2 A) Espectro de emisión Bioconjugado con $\lambda_{exc}= 550 \text{ nm}$ B) Espectro de excitación Bioconjugado con $\lambda_{em}= 720 \text{ nm}$

Figura 2:

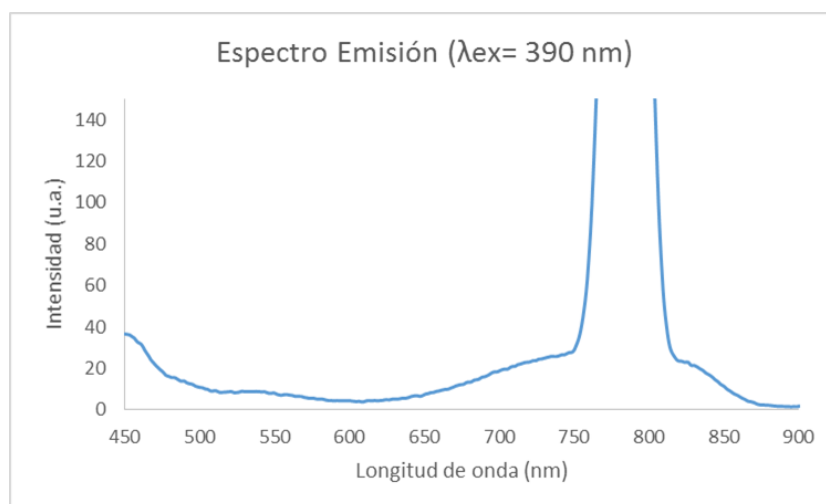


Figura 2, Anexo 2 Espectro de emisión (longitud de onda de excitación 390 nm)

A modo de ejemplo la comprobación de longitud de onda de excitación óptima, se hace para un bioconjugado intermedio, con una señal de fluorescencia adecuada, como es el bioconjugado 1:5. Primero se prueba a una longitud de onda de excitación de 550 nm, como se ha realizado anteriormente para los AuNCs, y se hace el par emisión-excitación (Ver Figura 1, Anexo 2 A y B). A continuación se hace un espectro de emisión a una longitud de onda de 390 nm (Figura 2, Anexo 2), observando que la banda de Dispersión de Rayleigh se sitúa en el centro de la señal de fluorescencia que interesa, por lo que se intenta excitar a otra longitud de onda como por ejemplo a 300 nm (Figura 21 A y B). A esta longitud de onda ya se observa que la banda de dispersión Rayleigh se desplaza a longitudes menores por lo que se puede observar el

pico de señal de fluorescencia correctamente, con un máximo a 730 nm, correspondiente a la luminiscencia del bioconjugado anticuerpo-AuNCs.

Figura 3:

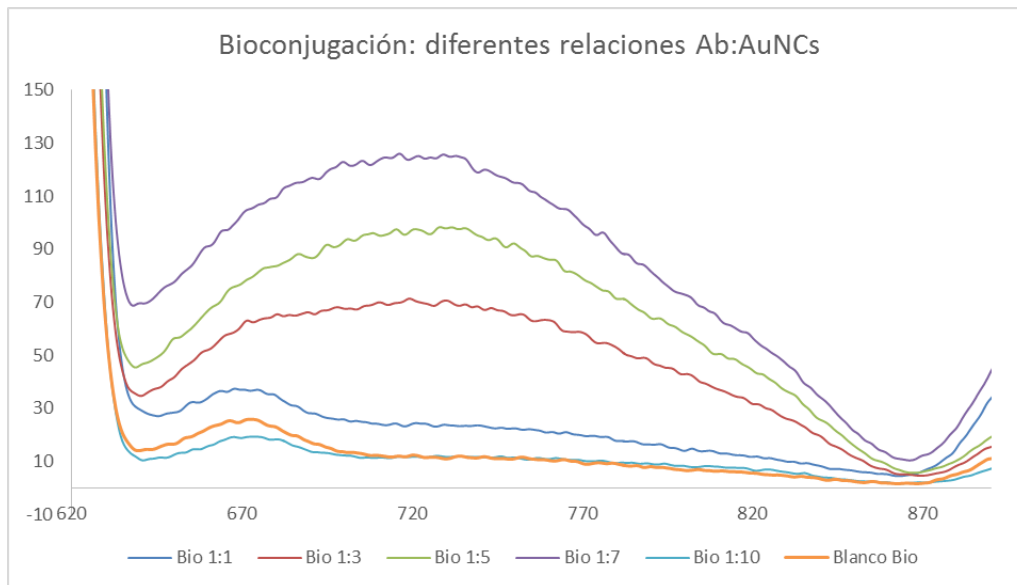


Figura 3, Anexo 2: Comparación de diferentes relaciones en la Bioconjugación

Destacar que se ha realizado un blanco de la bioconjugación, sin llegar a añadir los AuNCs, observando que aunque hay un poco de señal en la zona de emisión, no es significativamente importante en el caso de los tres bioconjugados en los que se obtiene una señal de fluorescencia aceptable. Además así se confirma que la relación 1:10 no es apta, ya que se obtiene una señal de fluorescencia igual que el blanco. Por otra parte se puede determinar que pico que se observa a 670 nm corresponde a anticuerpo.

3 Anexo 3: Inmunoensayo

Figura 1:

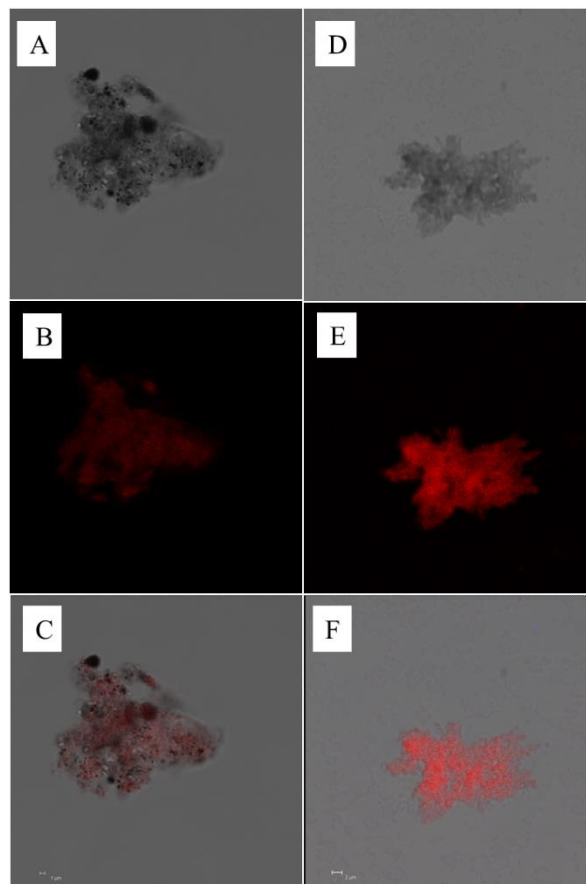


Figura 1, Anexo 3: Diferencias de cantidad de bioconjugado. A) Imagen de Transmisión con 100 μ L. B) Imagen de Fluorescencia con 100 μ L. C) Imagen superpuesta con 100 μ L. D) Imagen de Transmisión con 200 μ L. E) Imagen de Fluorescencia con 200 μ L. F) Imagen superpuesta Tapizado con 200 μ L.

Figura 2:

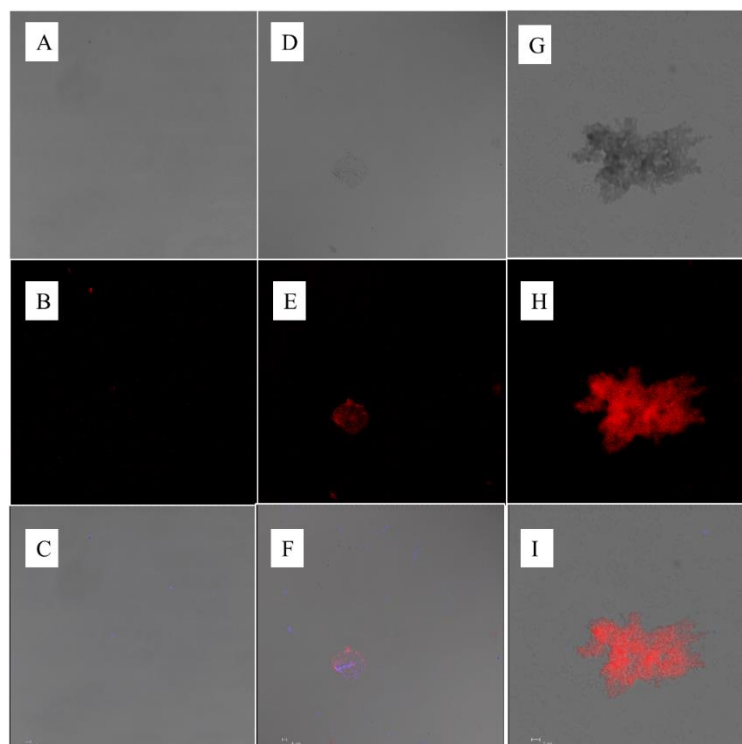


Figura 2, Anexo 3: Comprobación adsorciones inespecíficas. A) Imagen de Transmisión Blanco sin marca. B) Imagen de Fluorescencia Blanco sin marca. C) Imagen superpuesta Blanco sin marca. D) Imagen de Transmisión Tapizado Blanco sin tapizar. E) Imagen de Fluorescencia Blanco sin tapizar. F) Imagen superpuesta Tapizado Blanco sin tapizar. G) Imagen de Transmisión Tapizado Reacción. H) Imagen de Fluorescencia Tapizado Reacción. I) Imagen superpuesta Tapizado Reacción.