

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ**  
**ESCUELA DE POSGRADO**



**DESARROLLO DE UN SISTEMA DE DETECCIÓN DE OCRATOXINA A BASADO EN  
NANOSENSORES APTAMÉRICOS EN MICROPLACAS**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE MAGÍSTER EN QUÍMICA**

**AUTOR**

ANGELINE STEFANY SALDAÑA RAMOS

**ASESOR**

BETTY CRISTINA GALARRETA ASIAN

Junio, 2020

## Resumen

La ocratoxina A (OTA) es una micotoxina producida por algunas variedades de hongos capaces de contaminar productos agroindustriales como granos, cereales, hortalizas y especias. Este metabolito es altamente tóxico y su ingestión trae consigo efectos adversos, representando una gran amenaza para animales y humanos. Las autoridades internacionales han establecido límites máximos permitidos para el consumo de esta micotoxina, y por esta razón es importante contar con métodos de detección rápidos, efectivos y aplicables al control de calidad en la industria de alimentos.

Entre las técnicas tradicionales de detección de micotoxinas se encuentran los métodos basados en cromatografía líquida acoplada a detectores de masas en tándem (LC-MS/MS); sin embargo, son métodos costosos y poco accesibles. Por otro lado, existen métodos basados en inmunoensayos (ELISA) pero no son muy robustos y cuentan con tiempos de vida cortos. Una de las alternativas en el desarrollo de nuevos métodos de detección es el uso de sensores basados en nanoestructuras de metales nobles, las cuales cuentan con excelentes propiedades ópticas debido a la resonancia del plasmón superficial localizado (LSPR). Además, la gran área superficial que presentan estos materiales permite modificarlas químicamente en la superficie con un gran número de moléculas, p.ej. con aptámeros que actúen como agentes de reconocimiento selectivo a analitos de interés.

En este trabajo se realizó un procedimiento de modificación de microplacas NUNC® Immobilizer Amino con oligonucleótidos como un aptámero selectivo a OTA y la hebra complementaria a dicho aptámero, a fin de desarrollar un sistema alternativo de detección de OTA, basado en el análisis colorimétrico con nanosensores aptaméricos. El procedimiento también contempló la síntesis de nanoesferas de oro (AuNEs), seguido por la modificación superficial con oligonucleótidos tiolados y su caracterización por espectroscopía UV-Vis y microscopía electrónica. Posteriormente, se evaluaron diferentes parámetros en la optimización del proceso de modificación de microplacas, así como en la hibridación entre los oligonucleótidos presentes en la microplaca y los acoplados a las AuNEs. Con las condiciones óptimas encontradas se realizaron pruebas de concepto para detectar la presencia o ausencia de OTA en solución. El diseño de este método pretende ser la base para la elaboración de un kit que potencialmente facilite el análisis rutinario de control de calidad de alimentos, de manera que se pueda contar rápido y económico en la detección de micotoxinas en alimentos.



En memoria de mi padre José Eduardo Saldaña Díaz,  
quien me impulsó a seguir en el camino de la ciencia  
y quien me cuida siempre desde donde esté.

## Agradecimientos

A mis padres y a mi hermano, por su cariño, por su apoyo, por cada palabra de aliento y por estar siempre presentes, aun estando lejos.

A la Dra. Betty Galarreta, por confiar en mí desde mis inicios en el mundo de la investigación, por su paciencia, sus enseñanzas y su exigencia a lo largo de todo el desarrollo de esta tesis, además por siempre estar dispuesta a ayudarme.

A la Dra. Yulán Hernández, por su apoyo constante en toda la parte experimental de este trabajo, por compartir sus conocimientos y por resolver con paciencia todas mis dudas. También por su preocupación y apoyo emocional durante los momentos difíciles de los últimos años.

A mis compañeros del grupo de investigación Química y Nanoplasmónica (QNano+): Fátima, Lorena, Andrés, Johan, Sara y Mary, por la amena compañía y los momentos de risa compartidos en el laboratorio.

A Ricardito, por su comprensión y su apoyo constante en los momentos difíciles. Por alegrar mis días y por brindarme su compañía, a distancia, en el proceso de redacción de esta tesis.

A todos mis amigos del pregrado, por siempre darme ánimos en todo lo que emprendo y confiar siempre en mí, incluso en los momentos en los que yo no lo hago.

A Mariela y Luis, mis compañeros de clase de la maestría, por todos los buenos momentos de estudio y risas compartidos.

A la Dirección de Gestión de la investigación de la PUCP por el apoyo económico brindado mediante el PAIP 2019 y el CAP 2017 #431.

Al Programa Nacional de Innovación Agraria del Instituto Nacional de Innovación Agraria (Pr. N°021-2016-INIA-PNIA/UPMSI/IE) por el financiamiento otorgado en el desarrollo de este trabajo de investigación.

## Índice General

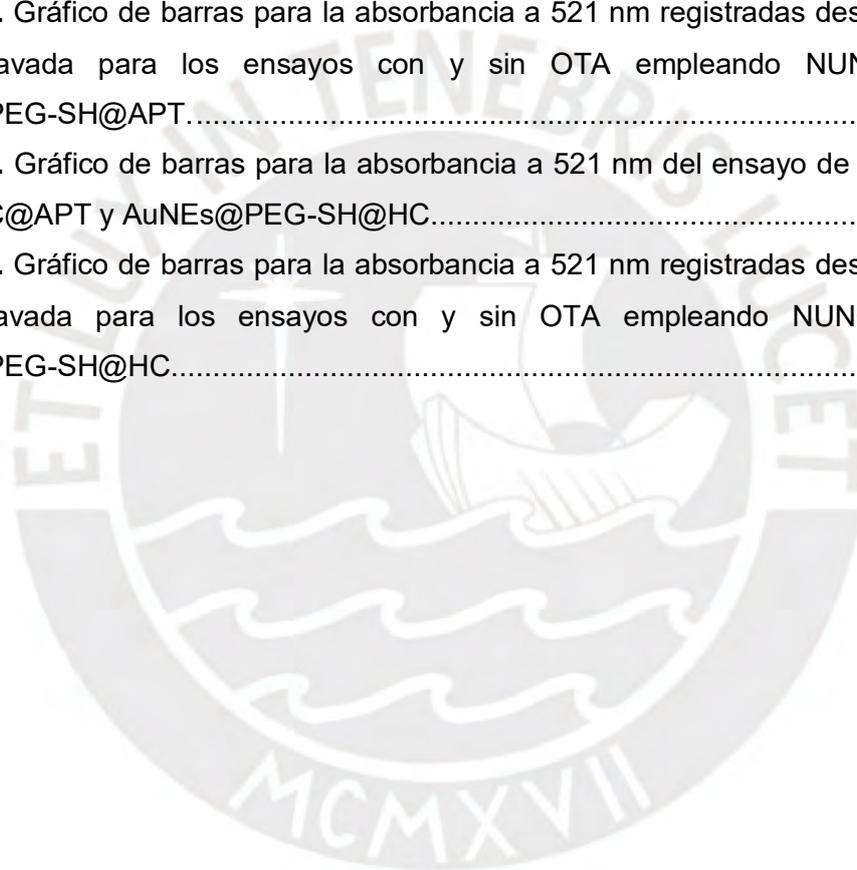
Índice General .....	i
Índice de figuras .....	iii
Índice de tablas .....	v
Abreviaturas .....	vi
1. Introducción .....	1
2. Objetivos: .....	3
2.1 Objetivo principal: .....	3
2.2 Objetivos específicos: .....	3
3. Marco teórico .....	4
3.1 Importancia del análisis de micotoxinas .....	4
3.1.1 Ocratoxina A (OTA) .....	5
3.1.2 Técnicas analíticas empleadas en la detección y cuantificación de micotoxinas como la OTA .....	6
3.2 Sensores aptaméricos en la detección de OTA .....	8
3.2.1 Aptámeros .....	9
3.2.2 Nanomateriales de metales nobles .....	9
3.2.3 Nanosensores aptaméricos .....	15
3.3 Análisis de muestras en microplacas .....	16
3.3.1 Modificación superficial de microplacas .....	16
4. Parte experimental .....	19
4.1 Reactivos utilizados, materiales y equipos .....	19
4.1.1 Reactivos y materiales .....	19
4.1.2 Equipos .....	20
4.2 Metodología .....	21
4.2.1 Síntesis y caracterización de nanoesferas de oro (AuNEs): .....	21
4.2.2 Funcionalización de nanoesferas de oro con oligonucleótidos específicos .....	22
4.2.3 Modificación superficial de microplacas .....	24
4.2.4 Hibridación de oligonucleótidos .....	26
4.2.5 Detección del estándar de OTA empleando microplacas modificadas superficialmente .....	28
4.3 Resultados experimentales .....	31
4.3.1 Síntesis y caracterización de AuNEs por espectroscopía UV-Vis .....	31
4.3.2 Caracterización de AuNEs por microscopía electrónica de transmisión (TEM) .....	31
4.3.3 Funcionalización de AuNEs con oligonucleótidos específicos .....	32
4.3.4 Modificación superficial de las microplacas e hibridación de oligonucleótidos .....	35

4.3.5	<b>Detección de OTA empleando microplacas modificadas superficialmente</b> .....	49
5.	<b>Discusión de resultados</b> .....	55
5.1	<b>Síntesis y caracterización de nanoesferas de oro</b> .....	55
5.2	<b>Funcionalización de AuNEs con oligonucleótidos específicos</b> .....	56
5.2.1	<b>Funcionalización con PEG-SH y con los oligonucleótidos tiolados</b> .....	56
5.3	<b>Modificación superficial de microplacas e hibridación de oligonucleótidos</b> .....	57
5.3.1	<b>Efecto de la concentración de la HC en la funcionalización e hibridación de la placa</b> .....	58
5.3.2	<b>Efecto de la concentración de la AuNEs modificadas con el APT en la hibridación de la placa</b> .....	58
5.3.3	<b>Efecto de la concentración de NaCl en la hibridación de oligonucleótidos</b> .....	59
5.3.4	<b>Efecto de la temperatura de funcionalización e hibridación de oligonucleótidos</b> .....	59
5.3.5	<b>Efecto de la adición de un agente de relleno en la funcionalización de la placa</b> .....	60
5.3.6	<b>Efecto del doble recubrimiento con PEG-SH en las pruebas control</b> .....	61
5.4	<b>Detección de OTA empleando microplacas modificadas superficialmente</b> .....	62
5.4.1	<b>Detección de OTA empleando una microplaca modificada con la HC</b> .....	62
5.4.2	<b>Detección de OTA empleando una microplaca modificada con el APT</b> .....	63
6.	<b>Conclusiones y recomendaciones</b> .....	65
6.1	<b>Conclusiones</b> .....	65
6.2	<b>Recomendaciones</b> .....	66
7.	<b>Referencias bibliográficas</b> .....	67

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Estructura química de la ocratoxina A. ....	6
<b>Figura 2.</b> Representación esquemática que muestra el fenómeno LSPR. ....	10
<b>Figura 3.</b> Ejemplo de la modulación de LSPR para diferentes composiciones de NPs de una aleación de oro y plata .....	11
<b>Figura 4.</b> Esquema de la síntesis de AuNEs utilizando citrato como agente reductor y estabilizante.....	12
<b>Figura 5.</b> Micrografías TEM de AuNEs con un diámetro promedio de 15 nm preparadas con el método de reducción con citrato.....	13
<b>Figura 6.</b> Espectros UV-Vis-NIR de nanopartículas de metales nobles .....	14
<b>Figura 7.</b> Esquema de un nanosensor aptamérico. ....	15
<b>Figura 8.</b> Esquema del acoplamiento covalente entre un péptido y la superficie de una microplaca NUNC® Immobilizer Amino.....	18
<b>Figura 9.</b> Esquema del procedimiento de síntesis para las AuNEs empleadas. ....	21
<b>Figura 10.</b> Procedimiento general para la funcionalización de AuNEs con oligonucleótidos. ....	22
<b>Figura 11.</b> Esquema de funcionalización de microplacas AuNEs con oligonucleótidos. ....	25
<b>Figura 12.</b> Esquemas de hibridación desarrollada.....	27
<b>Figura 13.</b> Esquema de detección de OTA desarrollado. ....	29
<b>Figura 14.</b> Espectro UV-Vis normalizado (a $\lambda = 450$ nm) de AuNEs sintetizadas. ....	31
<b>Figura 15.</b> Micrografía TEM de las AuNEs sintetizadas y gráfico de distribución de tamaños.....	32
<b>Figura 16.</b> Fotografías de las AuNEs evaluadas. ....	33
<b>Figura 17.</b> Espectro UV-Vis normalizado (a $\lambda = 450$ nm) de AuNEs@PEG-SH.....	34
<b>Figura 18.</b> Espectros UV-Vis normalizados (a $\lambda = 450$ nm) de AuNEs@PEG-SH, AuNEs@PEG-SH@APT y AuNEs@PEG-SH@HC. ....	35
<b>Figura 19.</b> Gráfico de barras para la absorbancia a 521 nm de la microplaca recubierta con diferentes concentraciones de HC.....	37
<b>Figura 20.</b> Gráfico de barras para la absorbancia a 521 nm de la microplaca recubierta con [HC] = 2,0 $\mu$ M, en la cual se empleó diferentes concentraciones de AuNEs.....	39
<b>Figura 21.</b> Gráfico de barras para la absorbancia a 521 nm de la microplaca recubierta con la HC, en la cual se empleó diferentes concentraciones de NaCl en la hibridación.....	41

<b>Figura 22.</b> Gráfico de barras para la absorbancia a 521 nm de la microplaca recubierta con la HC analizado a diferente temperatura de funcionalización de la microplaca y de la hibridación.....	44
<b>Figura 23.</b> Gráfico de barras para la absorbancia a 521 nm de la microplaca recubierta con hebra complementaria en la cual se empleó diferentes agentes de relleno en la modificación de la microplaca .....	46
<b>Figura 24.</b> Gráfico de barras para la absorbancia a 521 nm de la microplaca recubierta con la HC en la cual se emplearon AuNES.@PEG-SH_2 como prueba control.....	48
<b>Figura 25.</b> Gráfico de barras para la absorbancia a 521 nm del ensayo de hibridación empleando NUNC@HC y AuNEs@PEG-SH@APT.....	51
<b>Figura 26.</b> Gráfico de barras para la absorbancia a 521 nm registradas después de la primera lavada para los ensayos con y sin OTA empleando NUNC@HC y AuNEs@PEG-SH@APT.....	52
<b>Figura 27.</b> Gráfico de barras para la absorbancia a 521 nm del ensayo de hibridación con NUNC@APT y AuNEs@PEG-SH@HC.....	53
<b>Figura 28.</b> Gráfico de barras para la absorbancia a 521 nm registradas después de la primera lavada para los ensayos con y sin OTA empleando NUNC@APT y AuNEs@PEG-SH@HC.....	54



## Índice de tablas

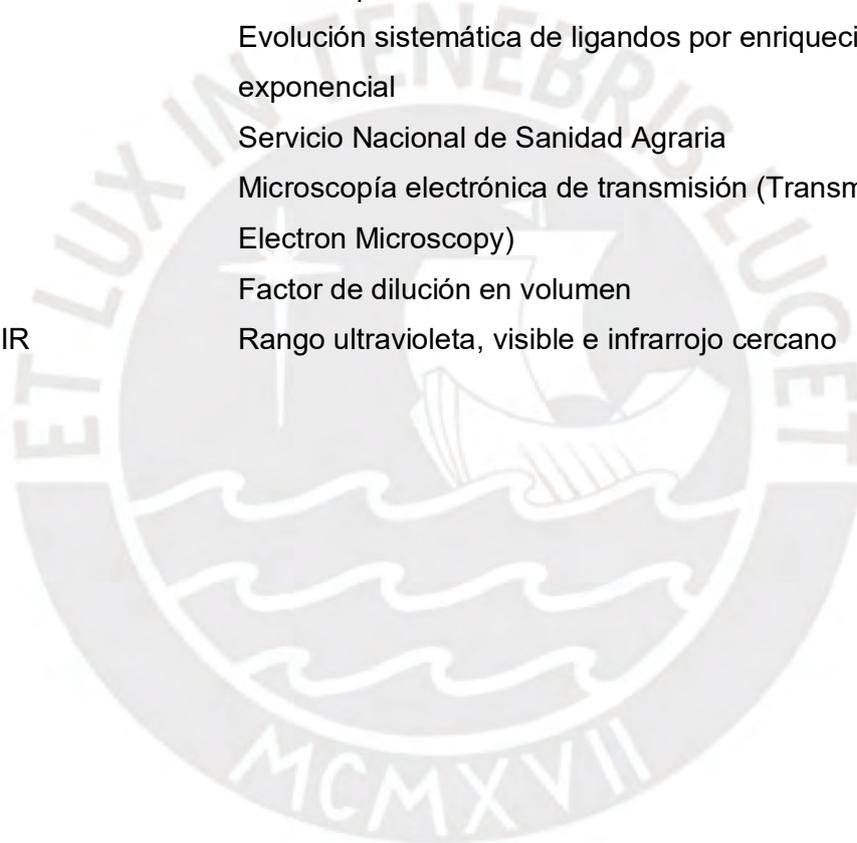
<b>Tabla 1.</b> Micotoxinas de mayor ocurrencia, género de los hongos que las producen y efectos nocivos para la salud humana. ....	5
<b>Tabla 2.</b> Lista de reactivos utilizados para la síntesis de AuNEs y para la funcionalización de las microplacas. ....	19
<b>Tabla3.</b> Condiciones de funcionalización con el oligonucleótido tiolado probadas inicialmente para las AuNEs. ....	23
<b>Tabla 4.</b> Condiciones de funcionalización de microplacas NUNC® Immobilizer Amino .....	25
<b>Tabla 5.</b> Condiciones analizadas para la hibridación de oligonucleótidos. ....	27
<b>Tabla 6.</b> Condiciones óptimas analizadas para la funcionalización de microplacas NUNC® Immobilizer Amino con la hebra complementaria al aptámero de OTA. ....	49
<b>Tabla 7.</b> Condiciones óptimas analizadas para la hibridación de oligonucleótidos. ....	49



## Abreviaturas

1x	Concentración 1x para una solución
10x	Concentración 10 veces mayor que 1x para una solución
AFB1	Aflatoxina B1
AFM	Microscopía de fuerza atómica
AgNEs	Nanoesferas de plata
APT	Aptámero de OTA
AuNEs	Nanoesferas de oro
AuNEs@OLIG	Nanoesferas de oro modificadas con oligonucleótidos
AuNEs@PEG-SH	Nanoesferas de oro funcionalizadas con PEG-SH
AuNEs@PEG-SH_2	Nanoesferas de oro doblemente funcionalizadas con PEG-SH
AuNEs@PEG-SH@APT	Nanoesferas de oro funcionalizadas con PEG-SH y aptámero de OTA
AuNEs@PEG-SH@HC	Nanoesferas de oro funcionalizadas con PEG-SH y la hebra complementaria al aptámero de OTA
AuNTs	Nanotriángulos de oro
CE	Comisión Europea
DLS	Dispersión de luz dinámica
DRX	Difracción de rayos X
ELISA	Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (Enzyme- Linked ImmunoSorbent Assay)
ETG	Etiltioglicolato
FAO/WHO	Programa conjunto de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación/ Organización Mundial de la Salud
[HC] <sub>final</sub>	Concentración final de hebra complementaria
HC	Hebra complementaria
IARC	Agencia Internacional de Investigación contra el Cáncer
JECFA	Comité Mixto FAO/WHO de expertos sobre aditivos alimentarios
LC-MS/MS	Cromatografía líquida acoplada a detectores de masas en tándem
LSPR	Resonancia de plasmón superficial localizado (Localized Surface Plasmon Resonance)
m <sub>v</sub>	Factor de concentración masa - volumen

MPA	Ácido 3-mercaptopropiónico
NPs	Nanopartículas
NUNC@APT	Microplaca Placas NUNC® Immobilizer Amino modificadas superficialmente con aptámero de OTA
OLIG	Oligonucleótidos
OTA	Ocratoxina A
PBS	Buffer de fosfato salino (Phosphate-Buffered Saline)
Phe	Fenilalanina
Phe-tARN	Fenilalanil-ARNt-sintetasa
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SEM	Microscopía de barrido electrónico
SELEX	Evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial
SENASA	Servicio Nacional de Sanidad Agraria
TEM	Microscopía electrónica de transmisión (Transmission Electron Microscopy)
$v/v$	Factor de dilución en volumen
UV-Vis-NIR	Rango ultravioleta, visible e infrarrojo cercano



## 1. Introducción

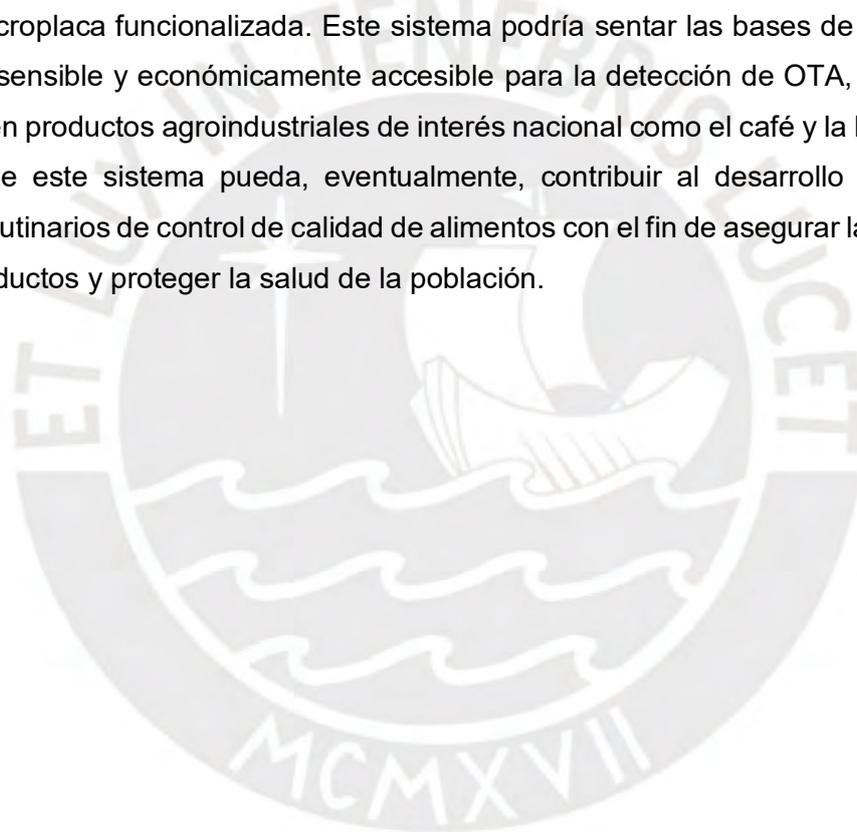
Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos naturalmente por ciertos hongos capaces de contaminar alimentos como granos, especias, frutos y hortalizas.<sup>1</sup> La mayoría de estas toxinas son químicamente estables y resisten a las etapas de producción de alimentos en la industria. La ingesta directa de estos productos contaminados está ligada a efectos nocivos en la salud. Las autoridades en diversos países se han visto obligadas a establecer normas de regulación de los niveles máximos permitidos para diversas micotoxinas.<sup>2</sup> Por tal motivo, se considera necesario contar con métodos analíticos accesibles y efectivos que aseguren la inocuidad de los productos alimenticios en el proceso de control de calidad, con el fin de proteger a la población que los consume.

Actualmente, los métodos de cuantificación de OTA se basan en técnicas como cromatografía líquida acoplada a detectores de masas en tándem (LC-MS/MS),<sup>3,4</sup> con etapas previas de extracción y purificación de muestra. Estos métodos son, en la mayoría de los casos, difíciles de implementar debido al elevado costo de los equipos y la infraestructura que se precisa para el análisis de muestras. Por otro lado, existen métodos basados en inmunoensayos (ELISA),<sup>1,5</sup> los cuales suelen ser rápidos y portátiles. Sin embargo, los kits de ensayo empleados utilizan anticuerpos que requieren de condiciones ambientales bastante específicas para evitar su desnaturalización y, al ser kits no reutilizables, representan un costo global significativo.<sup>1</sup>

En los últimos años, se han reportado métodos alternativos de detección basados en el uso de nanopartículas (NPs) de metales nobles como oro y plata.<sup>6,7</sup> Entre las ventajas de usar estos materiales se encuentran la eficiente adsorción de los analitos sobre la superficie de las NPs y las propiedades ópticas excelentes debido a la resonancia del plasmón superficial localizado (LSPR). Estas dos características propician el desarrollo de un sistema de detección que podría mejorar la sensibilidad respecto a los métodos convencionales para el análisis de micotoxinas como la ocratoxina A.<sup>6-10</sup> La amplia área superficial de estas NPs se puede modificar químicamente con agentes de reconocimiento selectivos a una sustancia de interés, y sus señales espectrales de LSPR son muy sensibles a los cambios en sus entorno, permitiendo el diseño de sistemas de detección eficientes y selectivos.<sup>8,9</sup> Actualmente, existen métodos basados en la adsorción de toxinas mediante el uso de aptámeros (oligonucleótidos diseñados para unirse de manera específica con algún analito de interés) inmovilizados en la

superficie de las NPs.<sup>11,12</sup> Los aptámeros son estables frente a cambios ambientales (temperatura y pH), su costo es menor que el de los tradicionales anticuerpos y, además, pueden ser sintetizados y modificados químicamente.<sup>13</sup> Estos beneficios, en combinación con métodos analíticos conocidos, como la espectroscopía UV-Vis, y que estos sensores se puedan integrar a otros sistemas ya establecidos, por ejemplo en microplacas, permiten el desarrollo de métodos de detección más sencillos y aplicables en el proceso de control de calidad en la industria alimentaria.

Aprovechando los avances en la nanotecnología y en la generación de aptámeros selectivos, el presente proyecto de investigación propone implementar un sistema de detección de OTA basado en nanosensores aptaméricos que se encuentren integrados en una microplaca funcionalizada. Este sistema podría sentar las bases de un método selectivo, sensible y económicamente accesible para la detección de OTA, micotoxina presente en productos agroindustriales de interés nacional como el café y la kiwicha. Se espera que este sistema pueda, eventualmente, contribuir al desarrollo de nuevos procesos rutinarios de control de calidad de alimentos con el fin de asegurar la inocuidad de los productos y proteger la salud de la población.



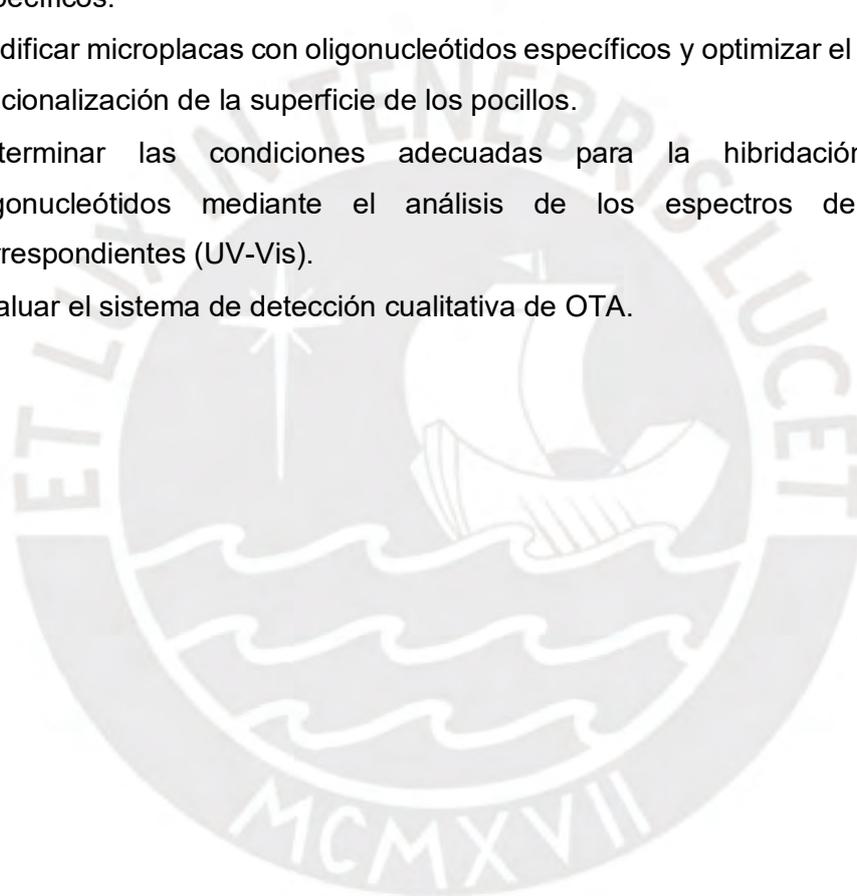
## **2. Objetivos:**

### **2.1 Objetivo principal:**

- Implementar un proceso de funcionalización de microplacas que permita la detección cualitativa de OTA mediante el uso de nanosensores aptaméricos.

### **2.2 Objetivos específicos:**

- Sintetizar, funcionalizar y caracterizar nanopartículas de oro con oligonucleótidos específicos.
- Modificar microplacas con oligonucleótidos específicos y optimizar el proceso de funcionalización de la superficie de los pocillos.
- Determinar las condiciones adecuadas para la hibridación de los oligonucleótidos mediante el análisis de los espectros de extinción correspondientes (UV-Vis).
- Evaluar el sistema de detección cualitativa de OTA.



### 3. Marco teórico

#### 3.1 Importancia del análisis de micotoxinas

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por hongos en climas tropicales, que contaminan los alimentos y afectan a la salud de los seres humanos y animales. Estos compuestos son altamente tóxicos y representan una gran amenaza para animales y humanos, debido a los efectos adversos que pueden causar su ingestión, inhalación o contacto con la piel.<sup>2</sup>

Las micotoxinas están presentes en numerosos productos alimenticios como granos, especias, frutos y hortalizas.<sup>1</sup> La aparición de micotoxinas en los alimentos puede ocurrir antes o después de la cosecha y durante el almacenamiento de estos, a menudo bajo condiciones cálidas y húmedas. Uno de los principales problemas es que la mayoría de estas toxinas son químicamente estables y resisten a las etapas de producción de alimentos en la industria.<sup>14</sup>

Actualmente, más de 400 micotoxinas han sido reportadas e identificadas, la mayoría de las cuales son producidas por hongos de los géneros: *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*.<sup>15</sup> Las micotoxinas más relevantes encontradas en alimentos, sus efectos nocivos en humanos y el género de hongos al que pertenecen se muestran en la Tabla 1.

Dentro de las toxinas presentadas, la OTA es una de las más recurrentes en productos alimentarios de consumo masivo tanto para animales como para humanos, afectando así a la seguridad alimentaria y a la salud.

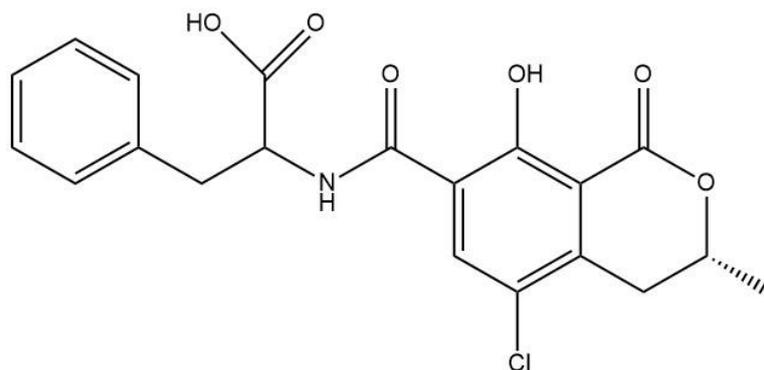
**Tabla 1.** Resumen de las micotoxinas de mayor ocurrencia en alimentos, su procedencia y efectos nocivos para la salud humana.<sup>2</sup>

<b>Micotoxinas</b>	<b>Género de los hongos que las producen</b>	<b>Efectos nocivos</b>
Aflatoxinas	<i>Aspergillus</i>	Cancerígeno, hepatitis aguda, alteración del sistema inmunológico.
Ocratoxina A	<i>Aspergillus</i> <i>Penicillium verrucosum</i> <i>Penicillium nordicum</i>	Cancerígeno, nefrotóxico, teratogénico, hepatotóxico.
Patulina	<i>Penicillium expansum</i> <i>Bysochlamis nívea</i> <i>clavatus</i>	Hemorragia pulmonar y cerebral.
Fumonisinias	<i>Fusarium</i>	Cancerígeno, hepatotóxico y nefrotóxico.
Deoxinivalenol	<i>Fusarium graminearum</i> <i>Fusarium culmorum</i> <i>Fusarium cerealis</i>	Dolores de cabeza, diarrea, vómitos, gastroenteritis.
Zearalenona	<i>Fusarium graminearum</i> <i>Fusarium equiseti</i> <i>Fusarium cerealis</i>	Actividad estrogénica, infertilidad.

### 3.1.1 Ocratoxina A (OTA)

La ocratoxina A (figura 1) es un metabolito secundario tóxico producido por varias especies de hongos filamentosos de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium verrucosum* y *nordicum*.<sup>1</sup> Se puede encontrar mayormente en alimentos con contenido en almidón, cereales, café, especias y frutos secos.<sup>15</sup> Esta toxina también se encuentra en alimentos y bebidas procesados como el vino y la cerveza.<sup>15</sup>

Entre sus efectos nocivos se encuentra su naturaleza inmunosupresora, como agente teratogénico, mutagénico y además inhibidor de la fertilidad. Por otro lado, la Agencia Internacional de Investigación contra el Cáncer (IARC) ha calificado a la OTA como un posible agente carcinógeno en humanos.<sup>16</sup>



**Figura 1.** Estructura química de la ocratoxina A.

Su toxicidad está asociada a la inhibición de ciertas enzimas que tienen al aminoácido fenilalanina (Phe) como sustrato debido a la semejanza estructural de este con OTA. Una de las enzimas que la toxina puede inhibir es la fenilalanil-ARNt-sintetasa (Phe-tARN), la cual está asociada a la síntesis de proteínas. La OTA también causa daño mitocondrial y preoxidación lipídica, además de interferencias en la fosforilación oxidativa y puede inducir la apoptosis en diversos tipos de células.<sup>2</sup>

El Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA) en Perú ha establecido disposiciones para garantizar la inocuidad de alimentos, fijando el contenido máximo de OTA según los reglamentos establecidos por el Comité Científico de la Unión Europea.<sup>17</sup> El Reglamento N° 472/2002 de Comisión Europea (CE) fija los límites máximos de OTA en 5 µg/kg para cereales; 3 µg/kg para derivados elaborados a base de cereales, 10 µg/kg en pasa y 4 µg/kg en café tostado e instantáneo.<sup>18</sup> Asimismo, recomiendan que los niveles de OTA deben ser inferiores a 5 ng/kg de peso corporal por día en humanos.<sup>16</sup> Por otro lado, el Comité Mixto FAO/WHO de expertos sobre aditivos alimentarios (JECFA) estableció un valor máximo de ingesta diaria de 14 ng/kg de peso corporal.<sup>15</sup>

### **3.1.2 Técnicas analíticas empleadas en la detección y cuantificación de micotoxinas como la OTA**

La mayoría de las micotoxinas son bastante tóxicas y tienen diversos efectos adversos incluso a concentraciones bajas. Al ser químicamente estables, resisten diversos pasos del procesamiento de alimentos como, por ejemplo, las altas temperaturas en la cocción de cereales para el desayuno. Debido a esto, es de suma importancia contar con métodos confiables y sensibles para su detección temprana.<sup>1</sup>

Al ser variadas y tener diversas estructuras químicas, no es factible emplear una única técnica estándar para detectar a todas las micotoxinas; por lo que se considera que los métodos de detección deben ser robustos, sensibles y tener una amplia flexibilidad para la gama de micotoxinas existentes. Asimismo, se debe considerar que, para el análisis rutinario y el trabajo de campo, idealmente, se debe contar con métodos rápidos y portátiles que disminuyan la necesidad de contar con una gran infraestructura.

Existen diversos métodos empleados para la detección, de las cuales los que más sobresalen son la cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas y los métodos basados en inmunoensayos (ELISA).<sup>1,5</sup>

#### 3.1.2.1 Cromatografía líquida acoplada a un detector de masas en tándem (LC-MS/MS)

Esta técnica es una opción adecuada para el análisis selectivo y la detección de diversas micotoxinas, además de que los límites de detección en este método son bajos y suelen estar en el rango de 0,01 ppb para OTA,<sup>19</sup> lo cual representa una ventaja sobre los demás. Sin embargo, se requiere de etapas complejas en la preparación de muestra como extracción y purificación.<sup>3,4</sup> Por ejemplo, la extracción en fase sólida y las técnicas de inmunoafinidad suelen ser empleadas para remover interferentes y mejorar la detección de toxinas en la muestra,<sup>20</sup> pero estos procedimientos pueden ser bastante extensos, lo cual representa un problema en los procesos de análisis y control de calidad de alimentos.

Además, LC-MS/MS requiere de equipos costosos, laboratorios especializados y personal calificado para realizar el análisis. Estos requerimientos limitan la accesibilidad del análisis e imposibilita su implementación en el trabajo de campo en zonas de cultivo agrícola.

#### 3.1.2.2 Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA)

Es una técnica bastante empleada en el análisis de rutina debido a que es portátil, rápida y de bajo costo en comparación a otras técnicas. Una de sus características principales es el análisis en simultáneo de un número amplio de muestras debido a la configuración de los kits de ensayo que se emplean.<sup>1</sup> La detección de micotoxinas mediante ELISA está basado en un ensayo competitivo que usa un anticuerpo para distinguir la estructura de una micotoxina específica.<sup>1,5,20</sup>

Una de las desventajas de emplear este método es que los kits de ensayo solo pueden ser usados una vez, lo cual incrementa el costo global del ensayo. Por otro lado, los anticuerpos empleados en este método requieren de condiciones ambientales muy específicas para evitar su desnaturalización.<sup>1</sup>

### **3.2 Sensores aptaméricos en la detección de OTA**

Las técnicas analíticas convencionales para la detección de OTA descritas previamente, pueden ser sensibles, selectivas y en algunos casos, rápidas; sin embargo, presentan algunas desventajas. En los últimos años, los sensores aptaméricos se han presentado como un método alternativo de detección que puede ser implementado en el control de calidad o en el campo de seguridad alimentaria. Los estudios basados en nanosensores aptaméricos<sup>10,11,21-23</sup> los presentan como herramientas para desarrollar técnicas simples, selectivas y eficientes en la detección de OTA.

Un sensor tiene dos componentes funcionales: un elemento de reconocimiento para proporcionar la unión con el analito, con cierto grado de selectividad y especificidad, y un componente transductor para señalar dicha unión<sup>6</sup>. Estos dos componentes son muy importantes en el proceso de reconocimiento en términos del tiempo de respuesta, de la relación señal/ ruido (S/N), de la selectividad y de los límites de detección (LOD).<sup>24</sup> Por tal motivo, si se desea desarrollar sensores altamente eficaces se debe contar con materiales que mejoren ambos procesos: reconocimiento y transducción.

Muchos sensores utilizan anticuerpos para el reconocimiento,<sup>1,5,20</sup> tal y como se describió previamente para los ensayos ELISA; sin embargo, como se había mencionado, el uso de anticuerpos tiene una serie de limitaciones, como su costosa obtención o el requerimiento de condiciones específicas. Frente a esto, el uso de aptámeros como elementos de reconocimiento en la construcción de este tipo de sensores representa una herramienta altamente selectiva debido a que pueden unirse, dependiendo de su secuencia y su estructura, a diversos objetivos que van desde pequeñas moléculas hasta proteínas.<sup>25</sup>

Por otro lado, en los últimos años el uso de nanomateriales metálicos como agentes transductores en la construcción de sensores aptaméricos, representa una mejora en la sensibilidad de estos sistemas.<sup>26</sup> Esto se debe a sus propiedades ópticas excelentes (relacionadas con el tamaño, forma y composición química) y a la gran plataforma de funcionalización que ofrecen, debido a su gran área superficial.

### 3.2.1 Aptámeros

Los aptámeros son cadenas cortas de ADN o ARN, con una longitud inferior a los 100 nucleótidos (oligonucleótidos), que tienen una alta afinidad y selectividad por objetivos específicos desde pequeñas moléculas como iones metálicos hasta macromoléculas como proteínas.<sup>13,25,27</sup> Además, en contraste con los convencionales anticuerpos, los aptámeros pueden ser químicamente sintetizados y fácilmente modificados con un grupo funcional o marcador molecular de interés.

La selección de un determinado aptámero se basa en el proceso de evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial (SELEX).<sup>13</sup> El proceso se inicia con la incubación del analito de interés con una librería de hasta  $10^{16}$  secuencias de oligonucleótidos bajo condiciones definidas en solución. De esta manera, parte de los oligonucleótidos con menor afinidad al analito se eliminan con un lavado y las especies unidas al analito se eluyen para separarlas del analito. Las secuencias se amplifican por PCR y se purifican para tomarlas como punto de partida en ciclos posteriores. Este proceso normalmente se realiza de 10 a 20 veces dependiendo de la naturaleza del analito objetivo. Finalmente las secuencias obtenidas se clonan y se realiza la caracterización del aptámero.<sup>13,27</sup>

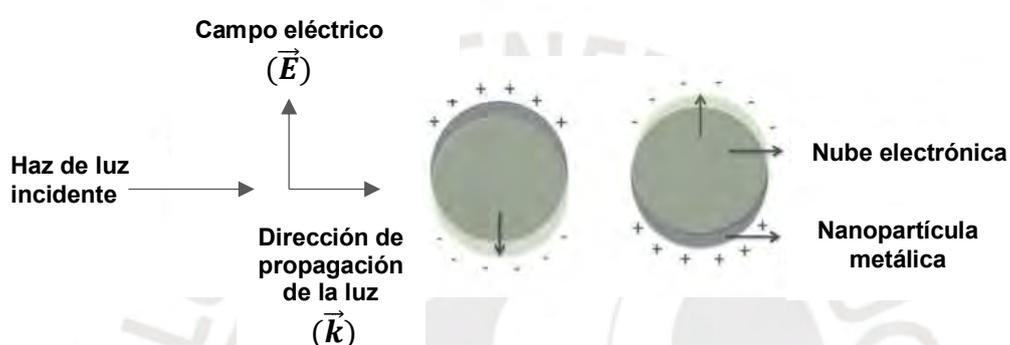
### 3.2.2 Nanomateriales de metales nobles

Las nanopartículas son estructuras con al menos una dimensión entre 1-100 nm y que pueden presentar diferentes geometrías. Debido a su minúsculo tamaño, exhiben propiedades significativamente diferentes a las partículas de mayores dimensiones de este material. En el caso de las nanopartículas de metales, estas diferencias surgen debido a los efectos del confinamiento cuántico que origina un cambio de los estados de densidad en la banda de conducción debido a la reducción del tamaño.<sup>26</sup> Es así que, el tamaño, la forma y la composición que presentan estos materiales están relacionados directamente con sus propiedades físicas, ópticas y electrónicas, permitiendo que estas puedan ser moduladas con el propósito de convertirlos en nuevos sensores químicos y biológicos.<sup>28</sup>

Dentro de este grupo, las nanopartículas metálicas, de oro y de plata, han sido ampliamente estudiadas y representan una alternativa para el desarrollo de nuevos sensores eficientes, rápidos y económicos.<sup>6,7,11,24</sup>

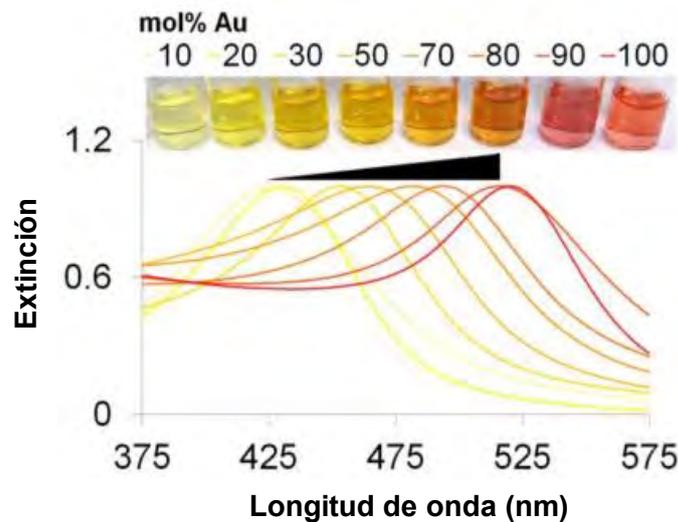
### 3.2.2.1 Propiedades ópticas de los nanomateriales de metales nobles

Las propiedades ópticas que poseen los nanomateriales de metales nobles se deben, en gran medida, al fenómeno conocido como resonancia del plasmón superficial localizado (LSPR, por sus siglas en inglés: *Localized surface plasmon resonance*). Este fenómeno consiste en la oscilación colectiva de los electrones en la banda de conducción de las nanopartículas metálicas al ser irradiadas con una onda electromagnética (ver figura 2). La frecuencia de resonancia está directamente relacionada con el tamaño, la forma, la composición de las nanopartículas y el medio que las rodea.<sup>28-30</sup>



**Figura 2.** Representación esquemática que muestra el fenómeno LSPR.<sup>30</sup>

En el caso de las nanopartículas de oro y plata, este fenómeno produce espectros de extinción (es decir, de absorción y de dispersión) dentro del rango UV-Vis-NIR, lo cual les permite ser excelentes candidatos en el desarrollo de biosensores colorimétricos.<sup>6,23</sup> De este modo, las señales propias de la LSPR pueden ser fácilmente moduladas de acuerdo al tamaño, la forma, la composición y al medio próximo que rodea a las NPs, y pueden analizarse mediante sus espectros de extinción.<sup>8,26,31</sup> En la figura 3 se presentan diversos espectros de extinción de NPs de aleación de oro y plata, donde se aprecia que la banda de extinción se desplaza a mayores longitudes de onda con el incremento de la composición de oro y la reducción del contenido de plata.



**Figura 3.** Ejemplo de la modulación de LSPR para diferentes composiciones de NPs de una aleación de oro y plata.<sup>26</sup>

### 3.2.2.2 Métodos de síntesis de nanoesferas de oro (AuNEs)

Como se ha mencionado, las propiedades de las NPs dependen del tamaño, la forma y la composición, por tal motivo, uno de los pasos más críticos en el desarrollo de este tipo de nanosensores es la síntesis. Existen diversas técnicas para sintetizar NPs de metales nobles, las cuales pueden ser divididas en dos categorías: métodos químicos, p.ej. reducción química, reducción fotoquímica, co-precipitación, descomposición térmica, hidrólisis) y métodos físicos, p.ej. deposición de vapor, ablación láser, etc.<sup>26</sup>

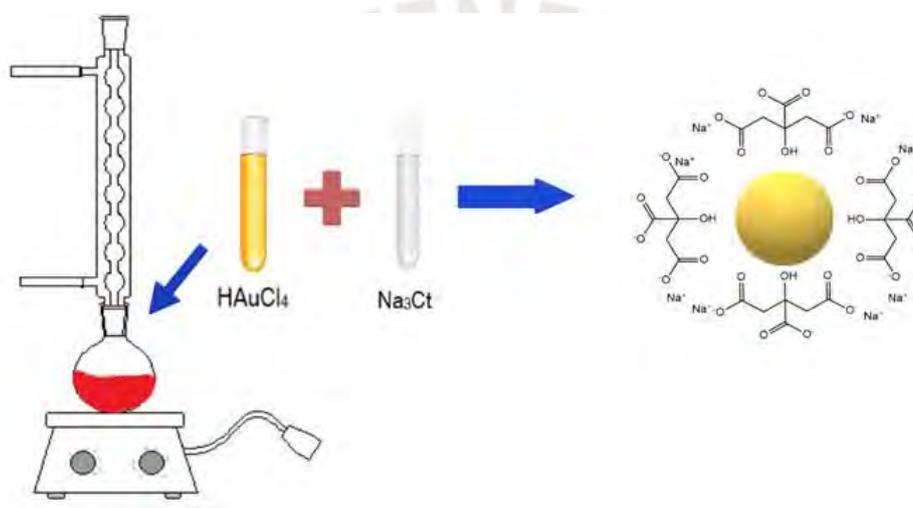
Por otro lado, según los procesos involucrados en la síntesis de nanoestructuras se sugieren dos categorías. En la primera categoría, la síntesis se realiza a partir de átomos generados de iones en solución, los cuales son ensamblados para formar los nanomateriales. Por tal motivo, las técnicas que parten de esta vía de síntesis son llamadas también como métodos *bottom-up*.<sup>28</sup>

En la segunda categoría, la síntesis parte del constituyente macroscópico del nanomaterial deseado, debido a esto las técnicas basadas en esta ruta son conocidas como métodos *top-down*. Estos métodos pueden fabricar grandes cantidades de nanomateriales de manera efectiva, sin embargo, la población de NPs producidas suele ser polidispersa.<sup>28</sup>

Diversas aplicaciones de biosensores basados en NPs emplean oro debido a las características de este material, como su resistencia a la corrosión y su baja toxicidad.<sup>6,32</sup> Adicionalmente, diversos estudios han demostrado que se pueden sintetizar de forma

sencilla nanoesferas de oro (AuNEs) monodispersas en un medio acuoso, con diámetros que oscilan entre 3 a 150 nm.<sup>26,33</sup>

El método más empleado para la síntesis fue desarrollado por Turkevich *et al.*<sup>34</sup> y optimizada por Frens,<sup>35</sup> el cual se basa en la reducción química de iones Au (III) a Au (0) utilizando citrato de sodio como agente reductor (figura 4). En esta ruta, el citrato actúa como agente reductor y agente estabilizante, ya que se genera una repulsión electrostática entre la AuNEs debido a la carga negativa de la cubierta de citrato. Además, al bloquear la superficie a medida de que se van formando las AuNEs, evita que estas sigan creciendo y se formen partículas de mayor tamaño.<sup>26</sup>



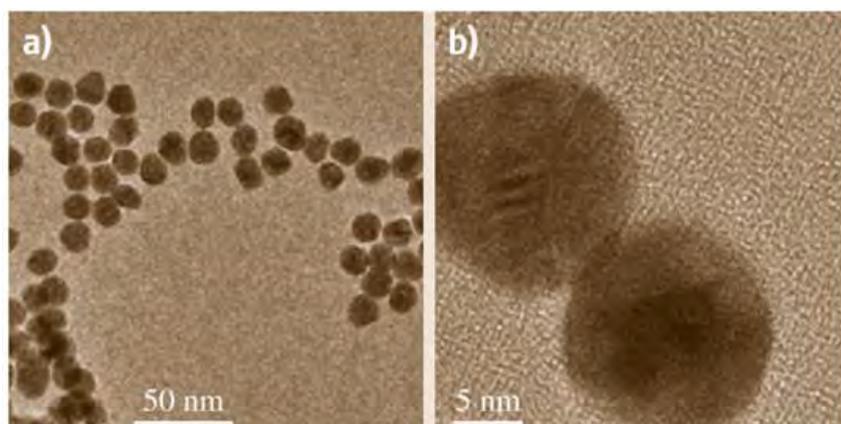
**Figura 4.** Esquema de la síntesis de AuNEs utilizando citrato como agente reductor y estabilizante.

### 3.2.2.3 Caracterización de AuNEs

Existen diversas técnicas para la caracterización de NPs, entre estas se encuentran la microscopía de transmisión electrónica (TEM), la microscopía de barrido electrónico (SEM) y la microscopía de fuerza atómica (AFM), que pueden ser usadas para determinar diversas propiedades, como el tamaño, la geometría y el área superficial. Además de estas, otras técnicas permiten determinar otras características como la dispersión dinámica de luz (DLS) el diámetro hidrodinámico de las partículas; la difracción de rayos X (DRX) la cristalinidad de las nanopartículas; y la espectroscopía de UV-Vis-NIR la longitud de onda máxima de extinción, asociada a las bandas LSPR.<sup>36</sup>

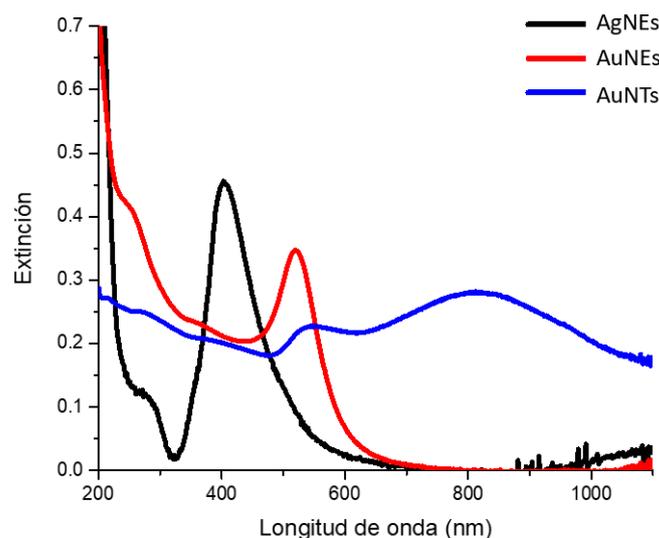
La caracterización por microscopía de transmisión electrónica (TEM) implica el paso de electrones a través de la muestra, por lo que esta técnica requiere que las

nanopartículas estén bien dispersas, generalmente sobre una rejilla de cobre recubierta de carbono. Las micrografías obtenidas por TEM tienen la ventaja de mostrar un alto contraste entre los átomos del metal y cualquier molécula orgánica o polímero pasivante.<sup>36</sup> La figura 5 muestra micrografías TEM de AuNEs de 15 nm sintetizadas empleando el método de reducción con citrato de sodio.



**Figura 5.** Micrografías TEM de AuNEs con un diámetro promedio de 15 nm preparadas con el método de reducción con citrato. Las imágenes muestran los detalles de las AuNEs analizadas a baja (a) y a alta (b) magnificación.<sup>28</sup>

Una técnica mucho más rápida y sencilla en el proceso de caracterización es la espectroscopía UV-Vis-NIR, la cual permite obtener información de las propiedades ópticas de las características morfológicas y del tamaño aproximado de las nanopartículas. Además, se pueden estudiar los procesos de funcionalización y formación de agregados de AuNEs mediante los cambios que se puedan observar en los espectros de extinción en este rango de longitudes de onda.<sup>31, 36, 37</sup> La figura 6 muestra los espectros UV-Vis-NIR de 3 diferentes nanoestructuras: nanoesferas de plata (AgNEs), nanoesferas de oro (AuNEs) y nanotriángulos de oro (AuNTs). Como se observa en la figura se presentan espectros diferentes debido a las características propias que presentan cada nanoestructura.



**Figura 6.** Espectros UV-Vis-NIR de nanopartículas de metales nobles: nanoesferas de plata (AgNEs), nanoesferas de oro (AuNEs) y nanotriángulos de oro (AuNTs).<sup>35</sup>

#### 3.2.2.4 Funcionalización de AuNEs

La gran área superficial que presentan las AuNEs ofrece una plataforma de multifuncionalización adecuada para la unión de un amplio rango de ligandos orgánicos o biológicos, para la conjugación selectiva y la detección de pequeñas moléculas y analitos biológicos.<sup>6</sup>

Una vez sintetizadas las AuNEs, las moléculas del estabilizador pueden ser reemplazadas por otras moléculas en una reacción de intercambio de ligandos. Las moléculas utilizadas para la funcionalización se pueden unir a la superficie de las AuNEs mediante diversas estrategias, de forma que es posible controlar que un extremo permanezca libre. Los grupos funcionales libres presentes en estas moléculas pueden unirse o interactuar con un objetivo de interés.<sup>38</sup>

La funcionalización de AuNEs ha sido ampliamente estudiada para la detección de sustancias biológicas (ADN, ARN, células),<sup>6,32</sup> iones metálicos,<sup>39</sup> proteínas<sup>38</sup> y otras moléculas pequeñas.<sup>18,40</sup> La alta afinidad de la superficie de las AuNEs para unirse con tioles y aminas,<sup>6,32</sup> es bastante conveniente en el diseño de sensores específicos basados en la funcionalización de estas nanoestructuras con proteínas o anticuerpos en diversas aplicaciones.<sup>41</sup>

Asimismo, en los últimos años se han desarrollado nanopartículas funcionalizadas con polímeros, más específicamente con polímeros hidrofílicos como el polietilenglicol (PEG). Estos sistemas tienen la habilidad de evadir la respuesta del sistema inmune y circular prolongadamente por el torrente sanguíneo, de tal manera que, pueden actuar como portadores de ADN o ARN en terapia génica y administrar proteínas, péptidos o medicamentos hacia un determinado órgano. <sup>6,41-43</sup>

### 3.2.3 Nanosensores aptáméricos

La funcionalización de las NPs con otras moléculas modifica el índice de refracción del sistema y desplaza la frecuencia de resonancia del plasmón superficial localizado. Por tal motivo, en las últimas décadas las NPs de metales nobles han contribuido al desarrollo de sensores sensibles, estables y selectivos para la detección de moléculas o analitos de interés. Una de las aplicaciones más interesantes de los nanomateriales de oro como sensores es su combinación con aptámeros para mejorar la detección de analitos específicos, <sup>44-46</sup> p.ej. la adsorción de toxinas usando nanopartículas modificadas superficialmente con aptámeros tiolados selectivos. <sup>11,12</sup>

Las nanopartículas metálicas funcionalizadas con aptámeros específicos, a las cuales vamos a llamar nanosensores aptaméricos, se pueden emplear como receptores sensoriales. En este caso, los aptámeros actuarán como agentes de reconocimiento capaces de unirse selectivamente al analito de interés, como en el ejemplo mostrado en la figura 7, y las nanopartículas como transductores. Aquí, el aptámero es selectivo a una determinada micotoxina y experimenta un cambio conformacional por la adsorción del analito, que puede registrarse mediante técnicas analíticas como la fluorescencia, <sup>47,48</sup> la colorimetría, <sup>23,49,50</sup> o la espectroscopía Raman, <sup>10,11</sup> gracias a las propiedades ópticas de las nanopartículas.

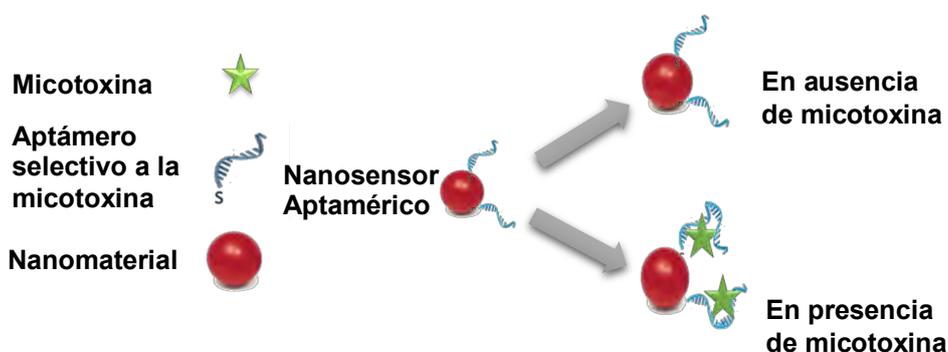


Figura 7. Esquema de un nanosensor aptamérico.

### **3.3 Análisis de muestras en microplacas**

La automatización de los métodos bioanalíticos se ha desarrollado, a lo largo de los años, en base a reacciones individuales y principios de medición. Diversos métodos se han adaptado para emplear microplacas y sus sistemas asociados de hardware/software, lo cual permite reacciones y mediciones simultáneas para un gran número de muestras.<sup>51</sup>

Las microplacas son bandejas de plástico desechables que cuentan con pocillos en los cuales se llevan a cabo las reacciones. El número de pocillos puede ser tan pequeño como 6 o tan grande como 1536, con volúmenes que van desde varios mililitros hasta decenas de nanolitros.<sup>51</sup> Por ejemplo, la microplaca más empleada en ensayos de ELISA cuenta con 96 pocillos, dispuestos en 8 columnas y 12 filas. El poliestireno es el material más empleado para fabricar microplacas; sin embargo también se emplean otros materiales como polipropileno, policarbonato, ciclo-olefina y cloruro de polivinilo,<sup>51-53</sup> dependiendo de las propiedades de la superficie y del método de detección deseados.

El análisis de las muestras presentes en estas placas se realiza mediante lectoras de microplacas, las cuales se basan principalmente en principios ópticos de absorción, fluorescencia y quimioluminiscencia.<sup>51</sup> Las mediciones en estos equipos involucran el uso de monocromadores o filtros de selección de longitud de onda. Existen lectoras de alta gama equipadas con monocromadores duales que permiten múltiples modos de medición (absorbancia, intensidad de fluorescencia y luminiscencia).<sup>51</sup> Por otro lado, también existen lectoras de microplacas de bajo costo para medir la absorción UV-Vis, que se basan en filtros extraíbles que pueden ser adquiridos para una longitud de onda de interés, dependiendo del análisis deseado.<sup>51</sup> Estos últimos suelen ser los más usados en aplicaciones que requieran mediciones rápidas.

#### **3.3.1 Modificación superficial de microplacas**

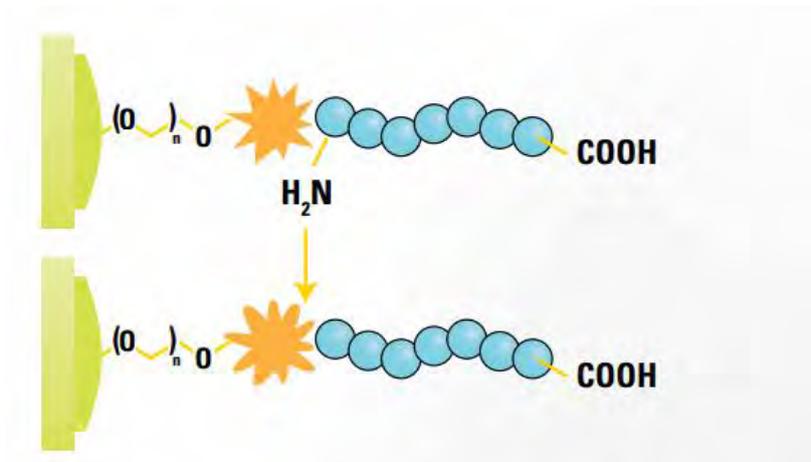
Existe un gran número de microplacas desarrolladas por diversas casas comerciales para diferentes aplicaciones. La elección de una microplaca para un determinado uso, está delimitado por varios factores, entre ellos se encuentran el material del cual está fabricada, su capacidad de modificación superficial y el componente que se desee inmovilizar en esta.<sup>54,55</sup> Por ejemplo, en el caso de las técnicas basadas en inmunoensayos, el primer paso es modificar de manera efectiva su superficie con anticuerpos o antígenos, para lo cual es importante elegir una superficie adecuada para establecer las condiciones óptimas de conjugación.<sup>52</sup>

Dependiendo del ensayo que se quiera realizar, se puede modificar una microplaca con algún compuesto de interés inmovilizándolo en su superficie. Factores como la velocidad de difusión dentro de los pocillos, el medio de reacción, la temperatura, la concentración y el tamaño de las moléculas que se requieran inmovilizar, y el tipo de enlace que se necesita entre dichas moléculas y la microplaca, son determinantes en el proceso de recubrimiento.<sup>55</sup> En el presente trabajo se necesita tener en cuenta, además, la orientación de las moléculas que recubren la superficie modificada de la microplaca. Esto se puede lograr con microplacas comerciales que permiten la modificación superficial de los pocillos con moléculas de interés que puedan unirse covalentemente a dicha superficie.<sup>54</sup>

#### 3.3.1.1 Acoplamiento covalente en microplacas.

Este acoplamiento se basa en la formación de un enlace covalente único entre la superficie de la microplaca y la molécula que se quiera inmovilizar en la superficie. Mediante esta técnica se pueden inmovilizar moléculas de un gran rango de tamaños que cuenten con grupos funcionales específicos. En este caso, la orientación de las moléculas con las que se va a modificar superficialmente la microplaca puede ser controlada debido a que el acoplamiento se realiza a través de los grupos funcionales específicos presentes en las moléculas de interés.<sup>54</sup>

Para fines de este trabajo, se emplearán microplacas NUNC® Immobilizer Amino de Thermo Scientific™. Como se observa en la figura 8, esta microplaca contiene un espaciador etilenglicol y un grupo electrofílico estable, que reacciona con nucleófilos como aminas libres o tioles en medio básico. El diseño del espaciador y la densidad de los grupos electrofílicos en su superficie están optimizados para ensayos con péptidos y proteínas.<sup>54,56</sup>



**Figura 8.** Esquema del acoplamiento covalente entre un péptido y la superficie de una microplaca NUNC® Immobilizer Amino.<sup>52</sup>



## 4. Parte experimental

### 4.1 Reactivos utilizados, materiales y equipos

#### 4.1.1 Reactivos y materiales

Los reactivos empleados para la síntesis de las AuNEs y para la funcionalización de las microplacas se pueden visualizar en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Lista de reactivos utilizados para la síntesis de AuNEs y para la funcionalización de las microplacas.

Reactivo	Fórmula	Marca
Ácido tetracloroáurico trihidratado	$\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	Sigma - Aldrich
Citrato de sodio dihidratado	$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	JT Baker
Dodecilsulfato sódico	$\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$	Sigma - Aldrich
Fosfato de potasio monobásico	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	Sigma - Aldrich
Fosfato de potasio dibásico	$\text{K}_2\text{HPO}_4$	Sigma - Aldrich
Fosfato de sodio monobásico	$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	Sigma - Aldrich
Fosfato de sodio dibásico	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	Sigma - Aldrich
Cloruro de sodio	$\text{NaCl}$	JT Baker
Hidróxido de sodio	$\text{NaOH}$	JT Baker
$\alpha$ -tio- $\omega$ -(ácido propiónico)octa(etilenglicol)	$\text{HS}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_8\text{-CH}_2\text{COOH}$	IRIS Biotech
Tween 40	$\text{C}_6\text{H}_{122}\text{O}_{26}$	Fluka
Ocratoxina A de <i>Aspergillus ochraceus</i> (CAT #32937)	$\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{ClNO}_6$	Sigma Aldrich
Etilioglicolato (ETG)	$\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2\text{S}$	Merck
Ácido 3-mercaptopropiónico (MPA)	$\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_2\text{S}$	Sigma Aldrich

En todos los experimentos se empleó agua Milli-Q®, la cual fue obtenida de un sistema conformado por ósmosis inversa y filtración mediante un filtro de fibra hueca con tamaño de poro 0,2  $\mu\text{m}$ .

Las microplacas empleadas en los ensayos fueron:

- Placas Nunc® Immobilizer Amino

Se emplearon los siguientes oligonucleótidos tiolados (en solución acuosa de concentración 200  $\mu$ M):

- Aptámero de OTA de secuencia (APT): 5'-HS-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-GAT-CGG-GTG-TGG-GTG-GCG-TAA-AGG-GAG-CAT-CGG-ACA-3' (36 bases nitrogenadas).
- Hebra complementaria al aptámero de OTA de secuencia (HC): 5'-HS-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-TTT-TTT-GTC-CGA-TGC (15 bases nitrogenadas).

Ambos oligonucleótidos fueron sintetizados, purificados por RP-HPLC y analizados mediante MALDI-MS por Eurogentec.

#### 4.1.2 Equipos

Los equipos empleados en la caracterización de las AuNEs y la modificación superficial de microplacas con oligonucleótidos fueron los siguientes:

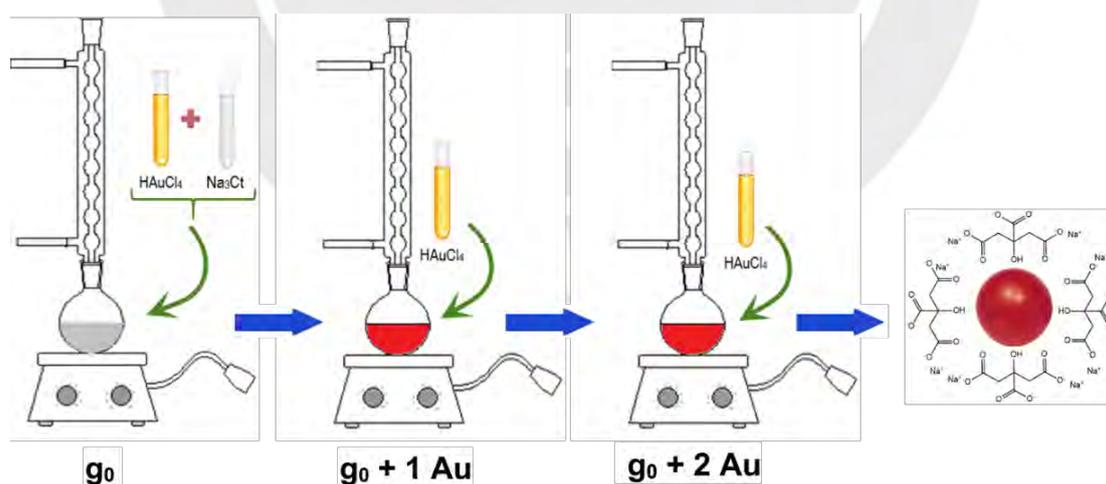
- Espectrofotómetro UV-VIS modelo Genesys 10S de Thermo Scientific™- Estados Unidos, el análisis se realizó empleando una celda de cuarzo semi-micro con un paso óptico de 10 mm y 1 mL de volumen de Agilent. La adquisición de espectros se realizó en un rango de 200 nm a 1100 nm y mediante el uso del software VISIONlite™ versión 5.2.
- Microscopio electrónico LVEM5, Delong Instruments-República Checa.
- Lectora de microplacas Multiskan de Thermo Scientific™- Estados Unidos, equipada con 6 filtros: 405 nm, 450 nm, 521 nm, 595 nm, 620 nm, 739 nm. El instrumento se controló mediante el software SkanIt versión 5.0.
- Agitador digital Thermo Scientific™ con calefacción Cimarec™- Estados Unidos.
- Agitador con incubadora Polymax1040 Heidolph-Alemania.
- Termómetro digital Traceable®- Estados Unidos
- Centrífuga Eppendorf modelo 5430R-Alemania. Velocidad máxima del rotor: 30130 x G (17 500 rpm).
- Agitador Vortex MVOR 03 de SBS-España.
- Mini incubadora digital MyTemp™ Benchmark Scientific-Estados Unidos.
- pH-metro Basic 20 Crison-España.
- Agitador de ultrasonido modelo 97043-930, VWR-Estados Unidos.

## 4.2 Metodología

### 4.2.1 Síntesis y caracterización de nanoesferas de oro (AuNEs):

La síntesis nanoesferas de oro (AuNEs) de aproximadamente 32 nm de diámetro, se realizó usando un procedimiento basado en la reducción de  $\text{HAuCl}_4$  con citrato de sodio en medio acuoso, inicialmente desarrollado por Turkevich *et al.* y mejorado por Frens *et al.*;<sup>34,35</sup> y que finalmente contempla una técnica de nucleación y crecimiento desarrollada por Bastus *et al.*<sup>33</sup> y adaptada por Hernández, *et al.*<sup>40</sup> Para ello, inicialmente se sintetizan AuNEs pequeñas que sirven como semillas, a las cuales se les va agregando pequeñas cantidades de oro a fin de promover el crecimiento de las esferas hasta alcanzar el tamaño deseado.

El procedimiento consiste en agregar 1,83 mL de citrato de sodio 17,646 g/L a un balón de reacción y completar el volumen hasta 50 mL con agua Milli-Q<sup>®</sup>. El balón se coloca en un sistema de reflujo y se calienta en un baño de silicona con agitación constante hasta llegar a ebullición. Una vez que el contenido hierve, se agrega la primera adición de 167  $\mu\text{L}$  de  $\text{HAuCl}_4$  50 mM, y a este producto se le denomina  $g_0$ . Después de 30 minutos se enfría el baño de silicona hasta aproximadamente 90°C, y se agregan finalmente, dos adiciones sucesivas de 167  $\mu\text{L}$  de  $\text{HAuCl}_4$  50 mM en un intervalo de 30 minutos cada una. El producto final se denomina ( $g_0 + 2 \text{ Au}$ ), el cual se almacena refrigerado a 4°C y protegido de la luz con papel aluminio.



**Figura 9.** Esquema del procedimiento de síntesis para las AuNEs empleadas.

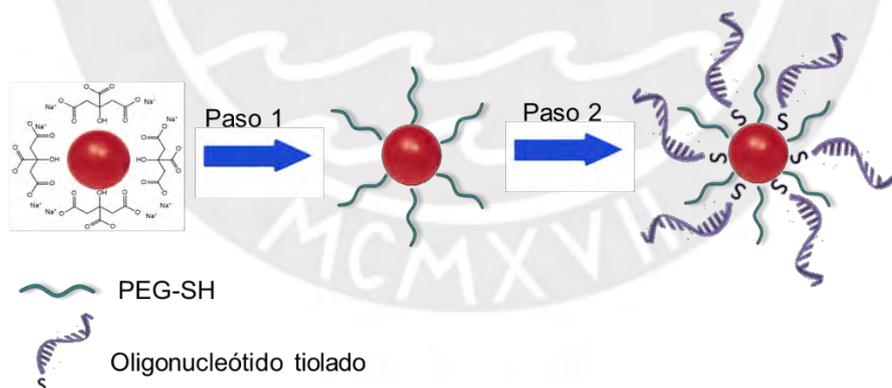
Una vez sintetizadas las AuNEs, estas quedan recubiertas con citrato de sodio que, además de ser el agente reductor, actúa como estabilizante. El esquema de síntesis se muestra en la figura 9.

Las AuNEs se caracterizaron mediante espectroscopía UV-Vis-NIR, para lo cual se diluyó cada solución de AuNEs en agua Milli-Q® (dilución 1:10  $v/v$ ) y se midió el espectro de extinción en el rango de longitudes de onda de 200 – 1100 nm. La concentración de las AuNEs y su tamaño teórico se estimó a partir de los valores del espectro obtenido y siguiendo los parámetros reportados en la literatura.<sup>37</sup>

Asimismo, las AuNEs sintetizadas fueron caracterizadas mediante TEM, para lo cual se tomó una alícuota de 5  $\mu$ L de la dilución de AuNEs 1:10  $v/v$  y se colocó sobre una rejilla de cobre recubierta de carbono hasta que la muestra estuviera seca. Las micrografías fueron adquiridas utilizando un microscopio electrónico de transmisión LVEM5 de Delong Instruments y las imágenes fueron analizadas utilizando el software Image J. El diámetro aproximado de las AuNEs se reporta como el promedio del diámetro  $\pm$  la desviación estándar de 100 nanopartículas analizadas.

#### 4.2.2 Funcionalización de nanoesferas de oro con oligonucleótidos específicos

El procedimiento de funcionalización de las AuNEs con oligonucleótidos tiolados contempló la modificación superficial de las nanoestructuras con uno de estos oligonucleótidos: APT o HC. Este procedimiento consta de dos pasos como se presenta en la figura 10, el primer paso implica un recubrimiento parcial de las AuNEs con  $\alpha$ -tio- $\omega$ -(ácido propiónico)octa(etilenglicol) (PEG-SH) y luego la funcionalización con el oligonucleótido tiolado seleccionado.



**Figura 10.** Procedimiento general para la funcionalización de AuNEs con oligonucleótidos.

##### 4.2.2.1 Optimización de la funcionalización de AuNEs

Como parte de este procedimiento se decidió usar inicialmente APT y una vez encontradas las condiciones ideales para la funcionalización poder aplicarlas en la funcionalización de AuNEs con la HC.

La optimización del procedimiento de modificación superficial de AuNEs se desarrolló inicialmente, con la funcionalización directa de las nanoestructuras sin contemplar el paso 1 de recubrimiento parcial de las AuNEs (esquema mostrado en la figura 10). Para ello, se realizaron 4 ensayos en los que se evaluaron distintos volúmenes de AuNEs y APT. En este paso inicial de funcionalización se empleó agua Mili-Q®, SDS 10%  $m/v$ , la solución de AuNEs, buffer de fosfato 0,1 M pH 8, APT 200  $\mu M$  y NaCl 1 M. Las condiciones empleadas en las pruebas se detallan en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Condiciones de funcionalización con el oligonucleótido tiolado probadas inicialmente para las AuNEs.

Reactivo	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3	Prueba 4
	Volumen ( $\mu L$ )			
<b>Agua Milli-Q®</b>	201,5	535	701	696
<b>SDS 10%</b>	2,5	2,5	2,5	2,5
<b>AuNEs</b>	666	333	167	167
<b>Buffer de fosfato 0,1 M pH 8</b>	100	100	100	100
<b>Oligonucleótido 200 <math>\mu M</math></b>	5	5	5	10
<b>NaCl 1 M</b>	25	25	25	25

Además de evaluar los ensayos con las condiciones anteriores se realizó la funcionalización contemplando los pasos 1 y 2 mostrados en la figura 10 y que se detallan a continuación.

#### Paso 1: Funcionalización con PEG-SH

Para este paso de modificación superficial se empleó un compuesto tiolado por un extremo y con un grupo carboxilo en el otro: PEG-SH. Este procedimiento se realizó en tubos de centrifuga de 15 mL, siendo el orden de adición de las soluciones el siguiente: 4995  $\mu L$  de AuNEs, 2505  $\mu L$  de agua Milli-Q®, 22,5  $\mu L$  SDS 10%  $m/v$ , y 75  $\mu L$  de PEG-SH 0,1 g/L. Se homogenizó con cuidado y se añadió finalmente 150  $\mu L$  de NaOH 1 M.

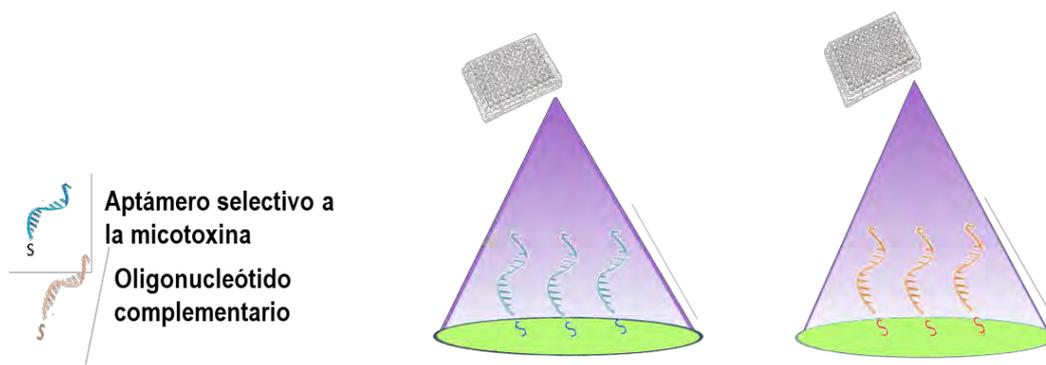
Los tubos se dejaron agitando en un vortex toda la noche. Para eliminar el exceso de reactivos, los tubos se centrifugaron a 6000 RPM, 10°C y por 30 min. Este paso se repitió tres veces, en cada una se retiró el sobrenadante (aproximadamente 6750 µL) y se resuspendió con agua Milli-Q®. Al final, las AuNEs funcionalizadas con PEG-SH (AuNEs@PEG-SH) se almacenaron concentradas (sin resuspender) luego de la tercera centrifugación. Adicionalmente se contempló un segundo recubrimiento de las AuNEs con PEG-SH, para poder evaluarlas como prueba control, al igual que en el caso anterior. Para ello se añadió un paso adicional previo a la etapa de centrifugación, que consistió en agregar 4,6 µL de PEG-SH 1 g/L a 500 µL de la solución de AuNEs@PEG-SH y dejarlo agitando toda la noche. Por último, estas muestras se centrifugaron 3 veces durante 1 hora a 6000 RPM y 10°C. Después de la última centrifugación, se retiró el sobrenadante (aproximadamente 450 µL) y se obtuvieron las AuNEs doblemente funcionalizadas con PEG-SH (AuNEs@PEG-SH\_2).

#### Paso 2: Funcionalización con los oligonucleótidos tiolados

Una vez recubiertas con PEG-SH, las AuNEs se funcionalizaron con los oligonucleótidos tiolados. Este procedimiento se realizó en microtubos de 2 mL, siendo el orden de adición de las soluciones el siguiente: 820 µL de agua Milli-Q®, 2,5 µL SDS 10% m/v, 50 µL de AuNEs@PEG-SH, 100 µL buffer de fosfato 0,1 M pH 8, 10 µL de oligonucleótido (APT o HC) 200 µM y, finalmente, 25 µL de NaCl 1 M. La solución de cloruro de sodio se añadió en 4 tandas de igual volumen: 25 µL al inicio de la funcionalización, la segunda adición después de 4 horas, la tercera adición entre 10 y 12 horas y la última adición 4 horas después, de tal manera que se agregó un total de 100 µL. Luego de cada adición de la solución de NaCl, se sonicó la solución entre 1 a 2 minutos y se dejó en agitación. Después de retirar los tubos del agitador, estos se centrifugaron a 6000 RPM, 10°C y por 30 min. La centrifugación se realizó tres veces, en cada una se retiró el sobrenadante (aproximadamente 1000 µL) y se resuspendió con agua Milli-Q®. Al final, las AuNEs@PEG-SH funcionalizadas con el aptámero de OTA (AuNEs@PEG-SH@APT) o con la hebra complementaria (AuNEs@PEG-SH@HC) se almacenaron concentradas (sin resuspender) luego de la tercera centrifugación.

#### **4.2.3 Modificación superficial de microplacas**

Para este paso se funcionalizaron los pocillos de las microplacas con los oligonucleótidos tiolados: el APT o la HC. Para este trabajo se evaluó la funcionalización de microplacas NUNC® Immobilizer Amino con el aptámero y con la hebra complementaria al aptámero, tal y como se muestra en la figura 11.



**Figura 11.** Esquema de funcionalización de microplacas AuNEs con oligonucleótidos.

#### 4.2.3.1 Optimización de la modificación superficial de microplacas

El acoplamiento covalente de las hebras tioladas seleccionadas con el material polimérico de la microplaca empleada se optimizó cambiando parámetros como la temperatura, la concentración de las hebras complementarias y el uso de algunos reactivos usados como agentes de relleno. Los ensayos de optimización se realizaron, inicialmente, modificando las microplacas con la hebra complementaria. Una vez optimizados los parámetros se realizó la modificación de la microplaca con el aptámero de OTA para evaluar la hibridación de oligonucleótidos y detección de OTA.

#### Modificación superficial de microplacas NUNC® Immobilizer Amino con la HC

La modificación superficial de estas placas se realizó siguiendo el protocolo recomendado por Thermo Scientific™ NUNC®.<sup>56</sup> El procedimiento para la funcionalización de esta microplaca comenzó añadiendo en cada pocillo 50  $\mu\text{L}$  del oligonucleótido tiolado, 10  $\mu\text{L}$  de buffer de fosfato 0,1 M pH 8 y 40  $\mu\text{L}$  de agua Milli-Q®. Luego de añadir los reactivos, la microplaca se guardó bajo agitación toda la noche. Las condiciones evaluadas para esta funcionalización se detallan en la Tabla 4.

En el proceso de modificación superficial de las microplacas, también se evaluó la adición de un agente de relleno para lo cual se emplearon: ácido mercaptopropiónico (MPA) y etiltioglicolato (ETG). El proceso se realizó al término del procedimiento de modificación superficial de la placa descrito anteriormente, para lo cual se evaluaron tres condiciones: la adición de 22  $\mu\text{L}$  de MPA dilución  $1:10^6 \text{ V/V}$ , 22  $\mu\text{L}$  de ETG dilución  $1:10^6 \text{ V/V}$  y 22  $\mu\text{L}$  de ETG dilución  $5:10^6 \text{ V/V}$ . Estos volúmenes fueron calculados de tal manera que en los dos primeros casos se añada el mismo número de moles empleados que el del oligonucleótido utilizado en la funcionalización de la microplaca (para la

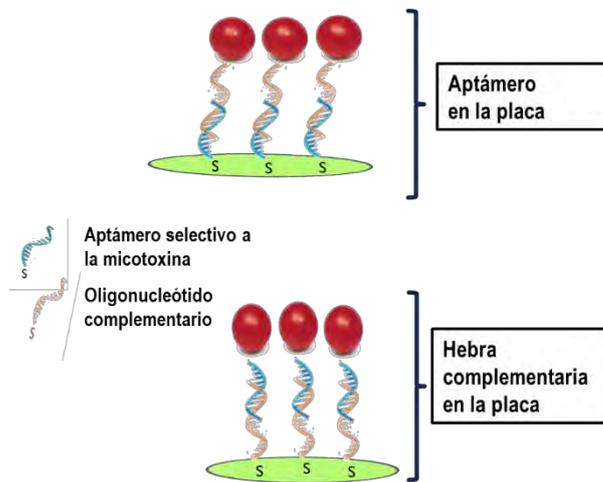
concentración final de 2  $\mu\text{M}$ ), y para el último caso 5 veces más concentrado. Después de agregar el agente de relleno a la microplaca, se dejó agitando por 2 horas a 29°C. Finalmente, la microplaca se retiró del agitador, y cada pocillo modificado se lavó 3 veces con 300  $\mu\text{L}$  de PBS 1X a pH 7,4 (2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 8 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 150 mM NaCl) + 0,1 %  $\text{V/V}$  Tween 40. Una vez lavadas, las microplacas estaban listas para hacer los ensayos de hibridación de oligonucleótidos y detección de micotoxina.

**Tabla 4.** Condiciones de funcionalización de microplacas NUNC® Immobilizer Amino.

	Volumen ( $\mu\text{L}$ )	Condiciones probadas
Oligonucleótido	50	<b>Hebra complementaria:</b> Concentraciones finales de la hebra en la microplaca: <ul style="list-style-type: none"> <li>• 2,0 <math>\mu\text{M}</math></li> <li>• 0,2 <math>\mu\text{M}</math></li> </ul>
		<b>Aptámero de OTA:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 2,0 <math>\mu\text{M}</math></li> </ul>
Buffer	10	Buffer de fosfato de potasio 0,1 M pH 8
Agua Milli-Q®	40	-
Temperatura del ensayo		22°C 25°C 29°C

#### 4.2.4 Hibridación de oligonucleótidos

Se evaluó la hibridación de los oligonucleótidos presentes en las microplacas modificadas con los oligonucleótidos unidos a las AuNEs mediante el análisis de los valores de absorbancia a 521 nm. Para ello se utilizó una lectora de microplacas con un filtro a esta longitud de onda. El proceso de hibridación se realizó en base al protocolo reportado por Mirkin *et al.*<sup>57</sup> En el diseño de este experimento se evaluaron dos formas de hibridación, la primera contempla la hibridación entre APT unido a la microplaca con HC unida a las AuNEs, y la segunda considera la hibridación entre HC unida a la microplaca y APT unido a las AuNEs (ver figura 12).



**Figura 12.** Esquemas de hibridación desarrollada.

Para ambas formas se requieren dos tipos de AuNEs: AuNEs@PEG-SH para la prueba control, y AuNEs@OLIG (AuNEs@PEG-SH@APT o AuNEs@PEG-SH@HC) para la prueba con AuNEs modificadas con oligonucleótidos. Se espera que los oligonucleótidos presentes en las pruebas con AuNEs@OLIG interaccionen con las cadenas complementarias presentes en la microplaca, mientras que las pruebas control no presenten ninguna interacción con estas.

#### 4.2.4.1 Optimización de la hibridación de oligonucleótidos

El procedimiento de hibridación contemplaba agregar, a cada pocillo funcionalizado de la microplaca, las AuNEs modificadas, seguidas de agua Milli-Q®, buffer de fosfato de potasio 0,1 M pH 8 y NaCl 4 M hasta un volumen total de 100 µL. Inmediatamente después de completar el volumen en la microplaca, se tomó una primera lectura de absorbancia con el lector de microplacas, y este paso se repitió cada hora (por 3 o 4 horas), para monitorear la absorbancia a 521 nm en cada pocillo mientras transcurre el tiempo. Entre cada intervalo de lectura, la microplaca se encontró en un agitador dentro de un ambiente a temperatura controlada (22°C - 29°C). Por último, la microplaca se dejó en el agitador toda la noche. Al día siguiente, después de una medida con la lectora, se procedió a lavar cada pocillo con 300 µL PBS 1X a pH 7,4 + 0,1 %  $v/v$  Tween 40 para luego registrar la absorbancia a 521 nm.

Se espera que, debido a la hibridación de los oligonucleótidos, las AuNEs recubiertas con los oligonucleótidos queden unidas a la placa y se pueda monitorear mediante el análisis de absorbancias con el lector de microplacas. La optimización de este proceso se realizó modificando algunos parámetros, los cuales están detallados en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Condiciones analizadas para la hibridación de oligonucleótidos.

Parámetro	Condiciones probadas
AuNEs	<p>CONCENTRACIONES FINALES EN LA HIBRIDACIÓN:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 0,75 nM</li> <li>• 1,5 nM</li> <li>• 2 nM</li> </ul> <p>PRUEBA CONTROL</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• AuNES@PEG-SH</li> <li>• AuNES@PEG-SH_2 (fueron recubiertas con PEG-SH por segunda vez, añadiendo 4,6 µL de PEG-SH 1 g/L y centrifugando como se menciona en el procedimiento reportado en el paso 1 de la sección 4.2.2.1).<sup>a</sup></li> </ul>
Milli-Q®	-
Buffer KP 0,1M pH 8	Concentración final: 0,02 M
NaCl	<p>Concentración final:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 0,1 M</li> <li>• 0,2 M</li> <li>• 0,4 M</li> <li>• 0,6 M</li> </ul>
Temperatura	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 22°C</li> <li>• 25°C</li> <li>• 29°C</li> </ul>

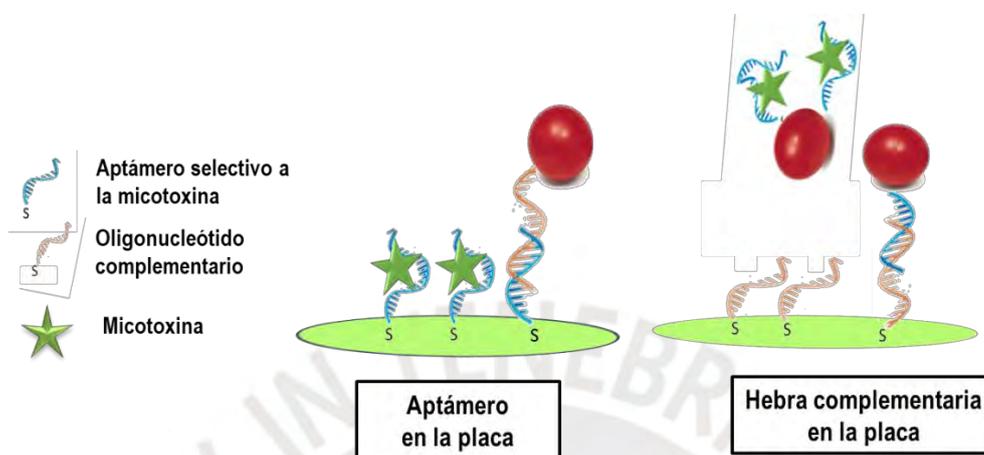
<sup>a</sup> El volumen fue calculado de tal manera que se añada el mismo número de moles de APT empleados en la funcionalización con oligonucleótidos según el paso 2 de la sección 4.2.2.1.

#### 4.2.5 Detección del estándar de OTA empleando microplacas modificadas superficialmente

Con las condiciones evaluadas y optimizadas para la funcionalización de las microplacas y de la hibridación con las AuNEs, se evaluó la respuesta del sistema de detección ante la presencia de un estándar de OTA. Para ello se emplearon las soluciones de la prueba control (AuNES@PEG-SH\_2) y las de esferas de la prueba con AuNEs@OLIG (AuNES@PEG-SH@APT o AuNES@PEG-SH@HC), además de la microplaca funcionalizada con el aptámero o con la hebra complementaria, según corresponda.

En el diseño de este experimento, al igual que en la hibridación, se evaluaron dos formas de detección, la primera empleando una microplaca modificada con APT y la segunda

con una microplaca modificada con la HC. En presencia de la micotoxina, se espera que la hibridación de los oligonucleótidos empleados esté impedida para ambas formas de detección evaluadas, tal y como se observa en la figura 13. Estos cambios fueron registrados con un análisis de absorbancias con el lector de microplacas.



**Figura 13.** Esquema de detección de OTA desarrollado.

#### 4.2.5.1 Detección de OTA empleando una microplaca modificada con la HC

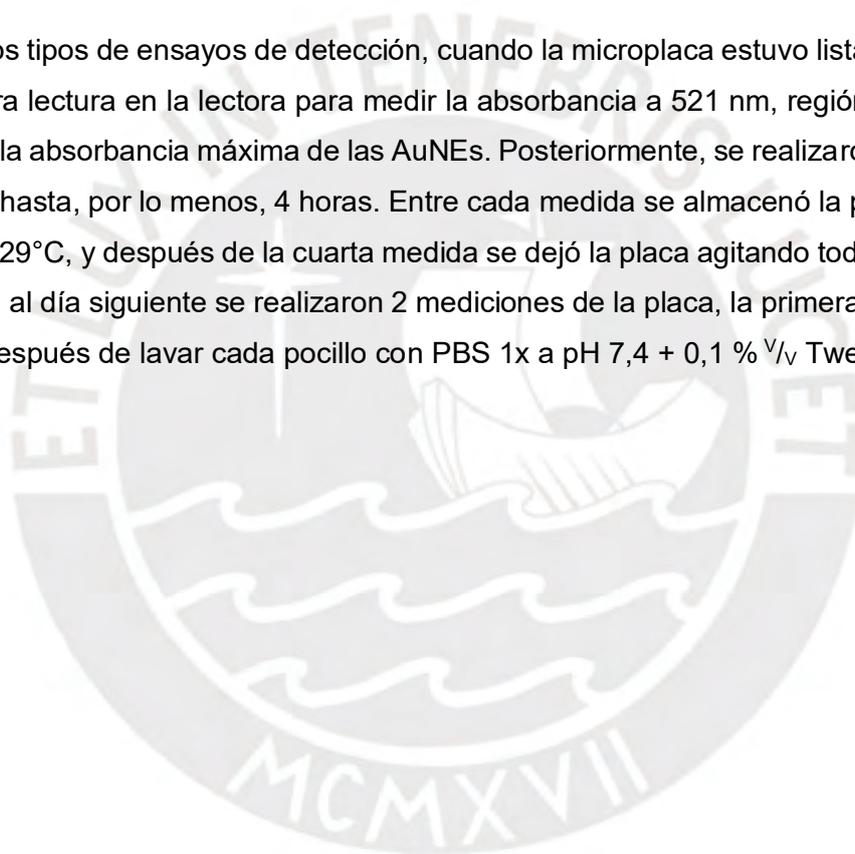
Para el ensayo de detección de OTA se empleó un estándar de  $12,5 \mu\text{M}$  preparado en buffer de OTA 1x a pH 8,5 (10 mM Tris, 120 mM NaCl, 20 mM  $\text{CaCl}_2$ , 5 mM KCl). En este caso, la preparación de la prueba control y la prueba con AuNEs@OLIG para la detección se realizó colocando en un microtubo de 2 mL las siguientes soluciones en orden: 10  $\mu\text{L}$  de OTA  $12,5 \mu\text{M}$ , un volumen calculado de esferas para el ensayo control (AuNES@PEG-SH\_2) o el ensayo con AuNEs modificadas con oligonucleótidos (AuNES@PEG-SH@APT) de tal manera que la concentración final de AuNEs fuera 1,5 nM, 9  $\mu\text{L}$  de buffer de OTA 10x y se completa con agua Milli-Q® hasta 100  $\mu\text{L}$ .

Los tubos que contenían las soluciones para ambas pruebas se agitaron por 15 minutos, al término de la agitación se transfirió el contenido de estos a los pocillos de la microplaca modificada con la cadena complementaria, de tal manera que en cada pocillo se alternase entre prueba control y prueba con AuNEs@OLIG. Finalmente, se agregaron 3,75  $\mu\text{L}$  de NaCl 4 M y 46,2  $\mu\text{L}$  de agua Milli-Q® (completando un volumen de 150  $\mu\text{L}$ ).

#### 4.2.5.2 Detección de OTA empleando una microplaca modificada con APT

En este tipo de ensayo de detección, la preparación de la prueba control y la prueba con AuNEs@OLIG se inició colocando sobre los pocillos de la microplaca modificada, en el mismo orden, las siguientes soluciones: 10  $\mu\text{L}$  de OTA 12,5  $\mu\text{M}$ , 9  $\mu\text{L}$  de buffer de OTA 10x y 81  $\mu\text{L}$  de agua Milli-Q<sup>®</sup>. Luego de esto, la microplaca se dejó agitando por 15 minutos. Al término de la agitación, se añadió a cada pocillo 3,75  $\mu\text{L}$  de NaCl 4 M y un volumen calculado de la solución de esferas para la prueba control (AuNEs@PEG-SH\_2) o de esferas para la prueba con AuNEs modificadas con la hebra complementaria (AuNEs@PEG-SH@HC) de tal manera que la concentración final de AuNEs final fuera 1,5 nM.

Para ambos tipos de ensayos de detección, cuando la microplaca estuvo lista se realizó una primera lectura en la lectora para medir la absorbancia a 521 nm, región donde se encuentra la absorbancia máxima de las AuNEs. Posteriormente, se realizaron medidas cada hora hasta, por lo menos, 4 horas. Entre cada medida se almacenó la placa en un agitador a 29°C, y después de la cuarta medida se dejó la placa agitando toda la noche. Por último, al día siguiente se realizaron 2 mediciones de la placa, la primera sin lavar y la última después de lavar cada pocillo con PBS 1x a pH 7,4 + 0,1 %  $\text{V/V}$  Tween<sup>®</sup> 40.



### 4.3 Resultados experimentales

#### 4.3.1 Síntesis y caracterización de AuNEs por espectroscopía UV-Vis

Las AuNEs se caracterizaron siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 4.2.1. A partir de la longitud de onda máxima de la banda LSPR obtenida experimentalmente ( $\lambda_{\max} = 525 \text{ nm}$ ), el diámetro promedio de las AuNEs fue de 32 nm según los cálculos reportados en la literatura.<sup>37</sup> La figura 14 muestra un espectro UV-Vis-NIR representativo de estas AuNEs.

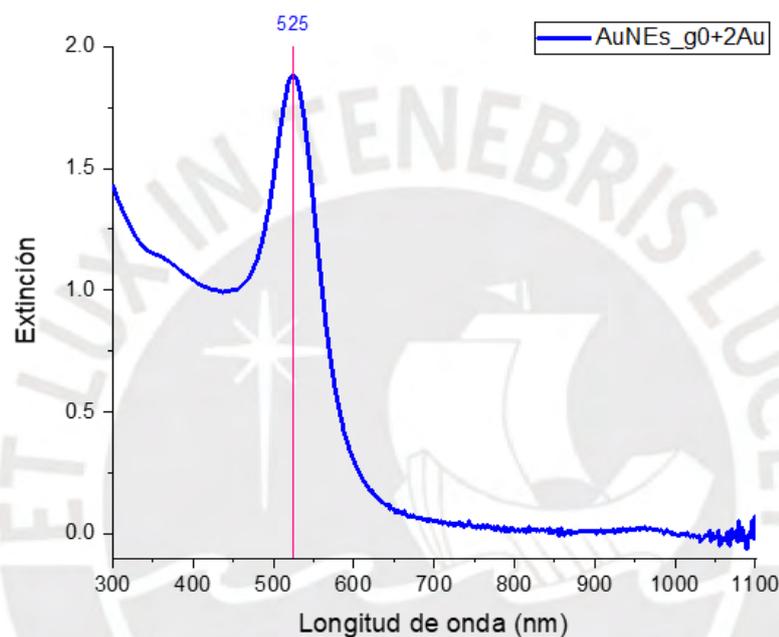
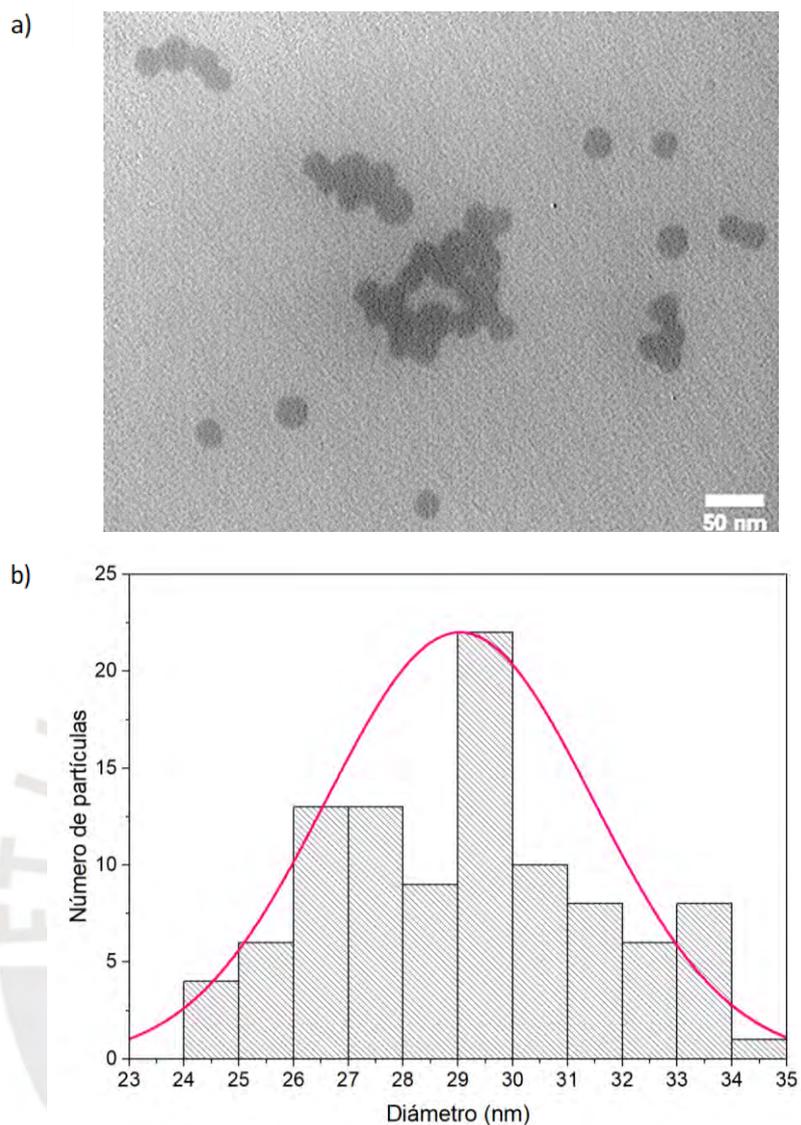


Figura 14. Espectro UV-Vis normalizado (a  $\lambda = 450 \text{ nm}$ ) de AuNEs sintetizadas.

#### 4.3.2 Caracterización de AuNEs por microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Las AuNEs también fueron caracterizadas por TEM siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 4.2.1. La figura 15 muestra una micrografía (15a) y el gráfico de distribuciones de tamaño (15b) de las AuNEs. El diámetro promedio aproximado de las AuNEs fue de  $29 \pm 2 \text{ nm}$ .



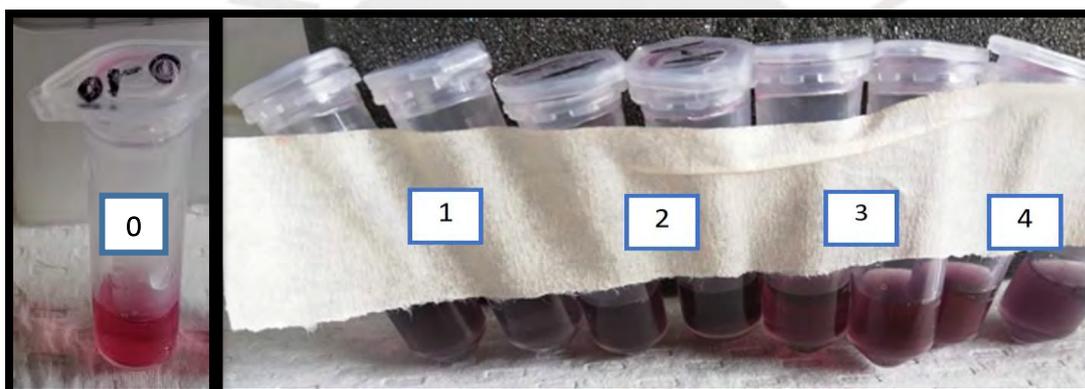
**Figura 15.** a) Micrografía TEM de las AuNEs sintetizadas. b) Gráfico de distribución de tamaños obtenido para 100 nanoesferas de oro.

### 4.3.3 Funcionalización de AuNEs con oligonucleótidos específicos

La funcionalización de AuNEs con oligonucleótidos específicos contempló tres etapas: (1) la búsqueda de condiciones óptimas para la funcionalización, (2) la funcionalización de AuNEs con PEG-SH y (3) la funcionalización de AuNEs con el aptámero de OTA y la hebra complementaria a este aptámero. Cada etapa fue monitoreada mediante el análisis de los espectros UV-Vis.

#### 4.3.3.1 Optimización de la funcionalización de AuNEs

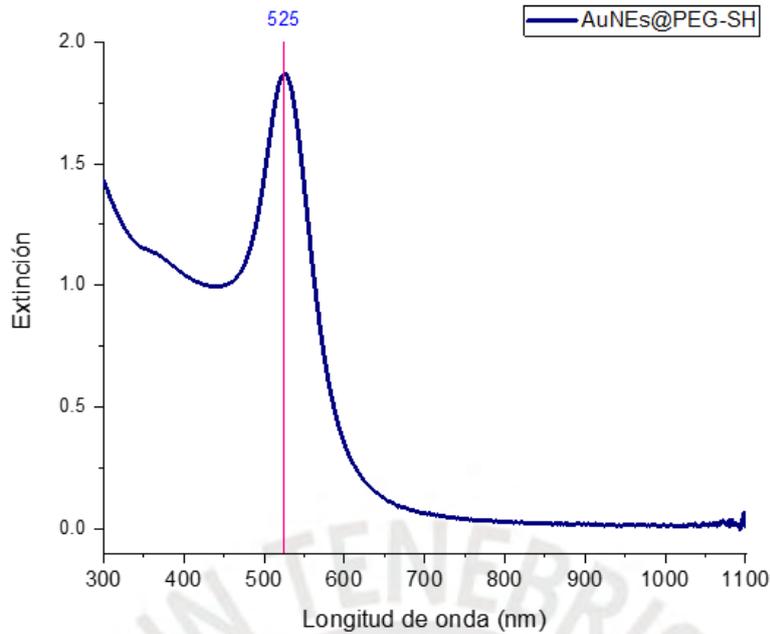
Inicialmente en este proceso se contempló realizar la funcionalización de AuNEs directamente con los oligonucleótidos, para lo cual se realizaron 4 ensayos a diferente concentración de AuNEs o de oligonucleótidos, detalladas en la Tabla 3. La figura 16 muestra dos fotografías de AuNEs sin funcionalizar y AuNEs funcionalizadas (de los 4 ensayos evaluados) luego de la adición de NaCl. El ensayo 1 empleó 666  $\mu\text{L}$  de las AuNEs sintetizadas, para el ensayo 2 se redujo el volumen de AuNEs a la mitad, para el ensayo 3 se redujo el volumen a 167  $\mu\text{L}$  y finalmente para el ensayo 4, se mantuvo el volumen de AuNEs del ensayo 3 pero se incrementó el volumen de aptámero de OTA empleado. Como se puede observar, en los 4 casos se observó agregación de las AuNEs, que inicialmente presentaban un color rojo intenso y después de la adición de NaCl se volvían moradas, lo cual evidenciaba la desestabilización de las nanopartículas.



**Figura 16.** Fotografías de las AuNEs evaluadas. AuNEs sin funcionalizar (0). AuNEs funcionalizadas con aptámero de OTA en 4 diferentes ensayos (1-4).

#### Paso 1: Funcionalización con PEG-SH

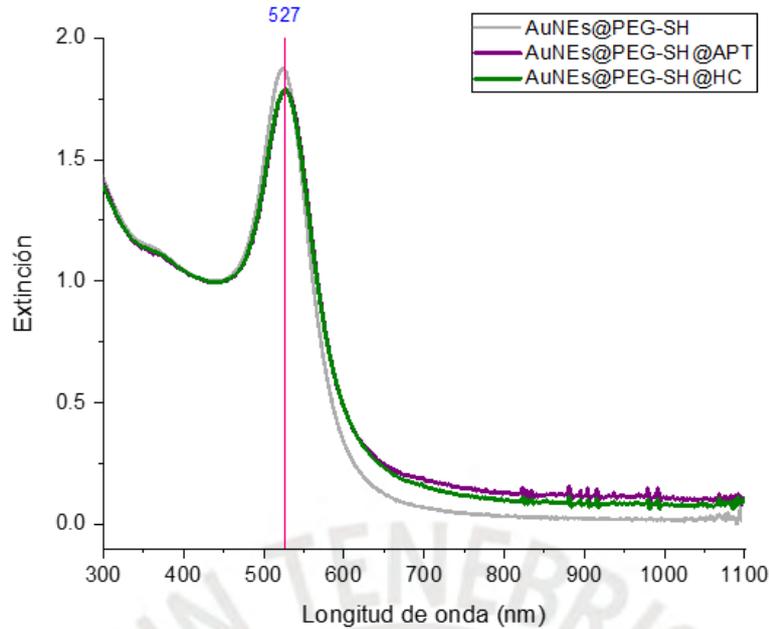
Debido a que el procedimiento de funcionalización realizado directamente con el aptámero de OTA no funcionó, se decidió modificar parcialmente la superficie de las AuNEs con un compuesto tiolado por un extremo y con un grupo carboxilo al otro (PEG-SH), con el objetivo de aumentar la estabilidad a las AuNEs antes de funcionalizarlas con el aptámero. La figura 17 muestra el espectro UV-Vis-NIR de las AuNEs modificadas con PEG-SH siguiendo el protocolo reportado en la sección 4.2.2.1 para la funcionalización con PEG-SH. Esta modificación en la superficie no alteró el espectro de extinción de las AuNEs y el máximo de la banda se mantuvo en 525 nm.



**Figura 17.** Espectro UV-Vis normalizado (a  $\lambda = 450$  nm) de AuNEs@PEG-SH.

#### Paso 2: Funcionalización con los oligonucleótidos tiolados

Después del paso de modificación de AuNEs con PEG-SH, se procedió a funcionalizarlas siguiendo el procedimiento reportado en el paso 2 de la sección 4.2.2. La figura 18 muestra los espectros UV-Vis-NIR de AuNEs@PEG-SH@APT y AuNEs@PEG-SH@HC, además se incluye en la figura el espectro de AuNEs@PEG-SH. El máximo de la banda para los dos primeros mencionados se encuentra en 527 nm, mientras que en el espectro de AuNEs@PEG-SH se encuentra en 525 nm. El cálculo de concentraciones de AuNEs para todos los ensayos se realizó en base a los valores del diámetro de las AuNEs y el coeficiente de absortividad molar a 450 nm, de ese tamaño, reportado en la literatura.<sup>37</sup>



**Figura 18.** Espectros UV-Vis normalizados (a  $\lambda = 450$  nm) de AuNEs@PEG-SH, AuNEs@PEG-SH@APT y AuNEs@PEG-SH@HC.

#### 4.3.4 Modificación superficial de las microplacas e hibridación de oligonucleótidos

Los primeros ensayos se realizaron modificando la superficie de las microplacas con la HC, por tanto, el procedimiento de hibridación de oligonucleótidos sobre estas placas contempló añadir AuNEs@PEG-SH@APT, con el fin de que las hebras del aptámero unidas a las AuNEs interactuaran con las cadenas complementarias unidas a la microplaca. La eficiencia de la modificación superficial de microplacas se evaluó mediante el proceso de hibridación de oligonucleótidos posterior, y para ello se utilizó como prueba control a las AuNEs@PEG-SH y como prueba con AuNEs modificadas con oligonucleótidos a las AuNEs@PEG-SH@APT. La interacción entre las hebras de oligonucleótidos fue monitoreada registrando el valor de absorbancia con el filtro de  $\lambda = 521$  nm de la lectora de microplacas desde el momento inicial de la mezcla, luego una medición cada hora durante 3 horas más, después una medición al día siguiente y, finalmente, luego de lavar la placa. En el caso de la prueba control, se buscaba que después de la primera lavada, el valor de la absorbancia fuera pequeño o no registrable. Por su parte, se esperaba que en la prueba con AuNEs modificadas con los aptámeros, sí se detectara un mayor cambio en la absorbancia debido a la hibridación entre las hebras presentes en las AuNEs@PEG-SH@APT y las hebras complementarias en las microplacas. Si el procedimiento de hibridación era exitoso, el valor de la absorbancia registrada debería ser alto para asegurar que, efectivamente, las AuNEs se encuentran

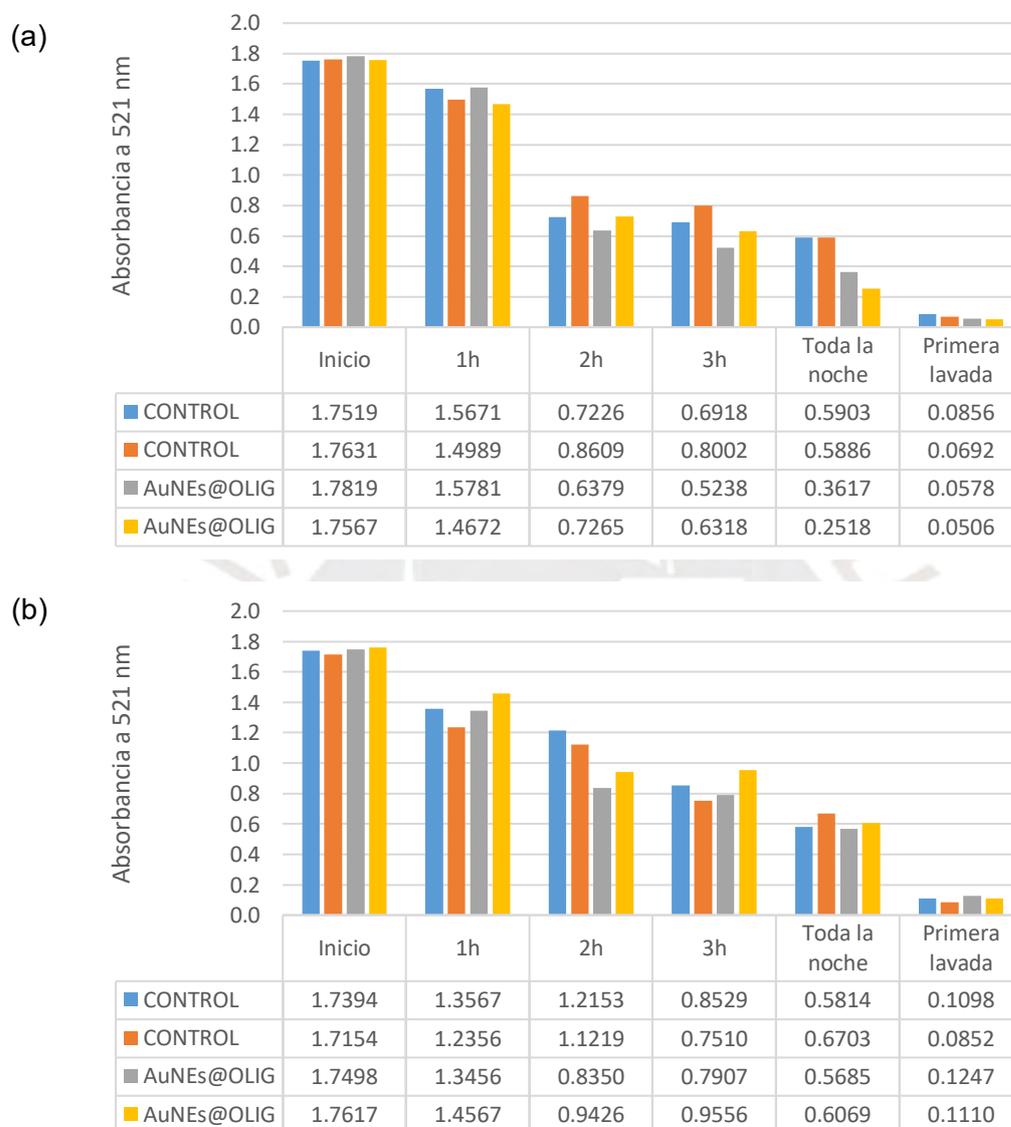
adheridas a la microplaca. Para determinar las condiciones apropiadas tanto para la modificación superficial como para la hibridación entre las hebras, se evaluaron las condiciones descritas en las Tablas 4 y 5. En el caso de la modificación superficial se evaluó la concentración de la HC, la temperatura y la adición de un agente de relleno. Por otro lado, en el caso de la hibridación se evaluaron las concentraciones de AuNEs@PEG-SH@APT, la concentración de NaCl empleado, la temperatura de hibridación y el uso de una prueba control diferente, AuNEs@PEG-SH\_2.

#### 4.3.4.1 Efecto de la concentración de la HC en la funcionalización de la microplaca e hibridación de los oligonucleótidos

Se evaluó la modificación superficial de microplacas con la HC al aptámero de OTA empleando dos concentraciones diferentes de hebra complementaria: 0,2  $\mu\text{M}$  y 2,0  $\mu\text{M}$ , siguiendo el procedimiento reportado en el apartado 4.2.3. Para ello se monitorearon los valores de absorbancia con el filtro de  $\lambda = 521 \text{ nm}$ , luego de la hibridación de oligonucleótidos (procedimiento descrito en la sección 4.2.4) y se empleó una solución 1,5 nM de AuNEs modificadas, tanto para las pruebas control (AuNEs@PEG-SH) como para las pruebas con las esferas modificadas con aptámeros (AuNEs@PEG-SH@APT). Ambos procesos, la modificación superficial de microplacas y la hibridación, se realizaron a 25°C, empleando 0,1 M de NaCl en este último. La figura 19 muestra los gráficos de barras que representan el cambio de la absorbancia monitoreada a lo largo del tiempo de análisis: al inicio de la hibridación, cada hora (durante 3 horas), al día siguiente y, finalmente, después de la primera lavada con PBS 1X a pH 7,4 + Tween® 40. Se presentan dos réplicas de estos resultados.

Se puede observar, al comparar ambas gráficas, que conforme pasa el tiempo, la absorbancia a 521 nm de longitud de onda va disminuyendo debido a la agregación de AuNEs, pero no se aprecia un cambio significativo hasta después de la segunda o tercera hora en las cuales se ven diferencias apreciables entre las pruebas control y las pruebas con AuNEs@OLIG. La eficiencia de la hibridación se midió en función a los resultados obtenidos después de la primera lavada, en los cuales se esperarían tener absorbancias más altas en el caso de las pruebas con AuNEs@OLIG (debido a la hibridación) y menores en las pruebas control (debido a que no ocurre interacción entre cadenas de oligonucleótidos). Ambas figuras no muestran una diferencia notable entre las absorbancias de las pruebas control y las pruebas con AuNEs@OLIG después de la primera lavada. Como se observa, las absorbancias de las pruebas con AuNEs@OLIG para la microplaca modificada con 0,2  $\mu\text{M}$  de hebra complementaria

(figura 19a) son menores en comparación a la microplaca modificada con 2  $\mu\text{M}$  de hebra complementaria (figura 19b), por lo que se decidió emplear esta última concentración para realizar los siguientes ensayos de optimización.



**Figura 19.** Gráfico de barras para la absorbancia a 521 nm de la microplaca recubierta con diferentes concentraciones de HC. (a)  $[\text{HC}]_{\text{final}} = 0,2 \mu\text{M}$ , (b)  $[\text{HC}]_{\text{final}} = 2,0 \mu\text{M}$ .

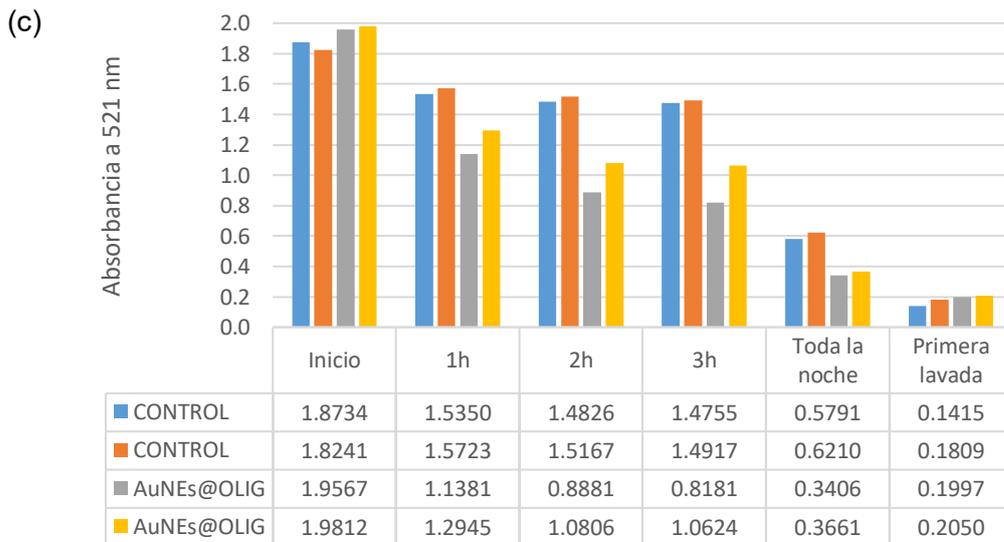
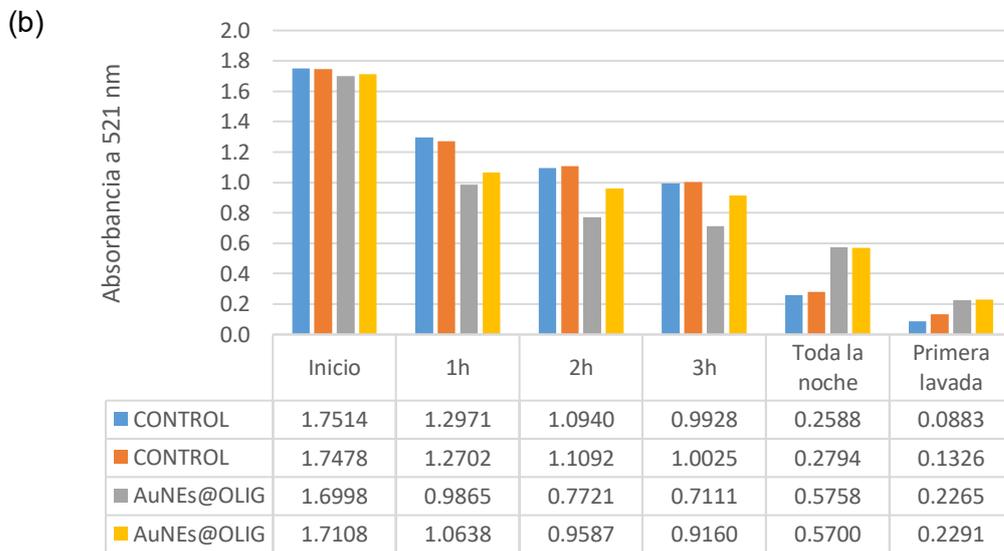
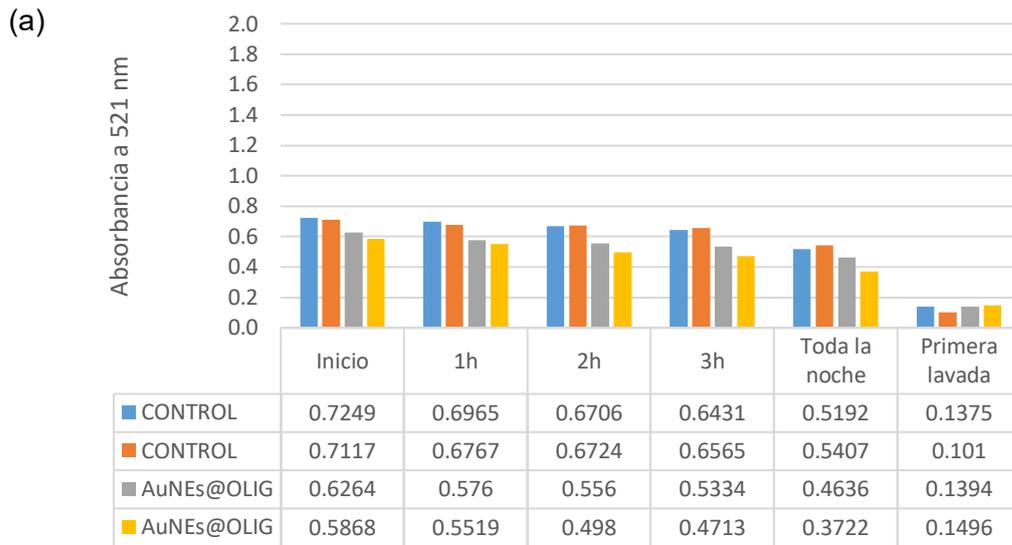
#### 4.3.4.2 Efecto de la concentración de las esferas modificadas con el APT en la hibridación de los oligonucleótidos

Una vez determinada la concentración de la HC para la modificación superficial de las microplacas (2,0  $\mu\text{M}$ ), se evaluó el efecto de la concentración de AuNEs empleadas para las pruebas control y las pruebas con AuNEs@OLIG, debido a que, como se observa en la figura 19b, aún existen problemas en cuanto a las absorbancias de las pruebas control ya que al compararlas con las pruebas con AuNEs@OLIG son bastante similares

y no permiten evidenciar si el procedimiento de hibridación ha sido eficiente o si la absorbancia registrada se debe a problemas de adsorción inespecífica de otros compuestos sobre la microplaca.

En estos ensayos se evaluó el uso de 3 concentraciones finales de AuNEs en el proceso de hibridación: 0,75 nM; 1,5 nM y 2 nM (procedimiento descrito en la sección 4.2.4). Estas condiciones fueron evaluadas mediante el análisis de absorbancias a 521 nm en el periodo de análisis establecido para la hibridación. Ambos procesos, la modificación superficial de microplacas y la hibridación, se realizaron a 25°C, empleando 0,1 M de NaCl en la hibridación. La figura 20 muestra los gráficos de barras que representan el cambio de la absorbancia monitoreada a lo largo del tiempo de análisis: al inicio de la hibridación, cada hora (durante 3 horas), al día siguiente y, finalmente, después de la primera lavada con PBS 1X a pH 7,4 + Tween® 40. Estos resultados se presentan para dos réplicas de la prueba control (AuNEs@PEG-SH) y dos réplicas de la prueba con AuNEs modificadas con oligonucleótidos (AuNEs@PEG-SH@APT).

Al comparar las tres figuras se puede observar que, conforme transcurre el tiempo de análisis, la absorbancia medida a 521 nm va disminuyendo debido a la agregación de AuNEs. El cambio significativo de estas mediciones se presenta después de la segunda o tercera hora, en la cuales se van observando diferencias entre las pruebas control y las pruebas con AuNEs@OLIG. La eficiencia de la hibridación se midió en función a los resultados obtenidos después de la primera lavada. En este caso se esperaría tener absorbancias más altas en el caso de las pruebas con AuNEs@OLIG (debido a la hibridación) y menores en las pruebas control. En la figura 20a, para 0,75 nM de AuNEs empleadas, no se observó mayor diferencia de valores de absorbancia entre las pruebas control (AuNEs@PEG-SH) y las pruebas con AuNEs@PEG-SH@APT después de la primera lavada. En la figura 20b, para 1,5 nM de AuNEs empleadas, se observó una mejor diferencia entre los valores de absorbancia para las pruebas control y las pruebas con AuNEs@OLIG después de la primera lavada; sin embargo, los valores para las pruebas control siguen siendo un poco elevados. Se pudo observar incluso a simple vista, después de la primera lavada, que los pocillos con control estaban recubiertos con AuNEs. En la figura 20c, para 2,0 nM de AuNEs empleadas, se observan que los valores de absorbancia a 521 nm para las pruebas control y las pruebas con AuNEs@OLIG después de la primera lavada no presentan mucha diferencia en comparación al caso de la figura 20b. En este caso también se observó que los pocillos con pruebas control estaban recubiertos con AuNEs incluso después de lavar la microplaca.



**Figura 20.** Gráfico de barras para la absorbancia a 521 nm de la microplaca recubierta con  $[HC] = 2,0 \mu M$ , en la cual se empleó diferentes concentraciones de AuNEs. (a) 0,75 nM, (b) 1,5 nM y (c) 2,0 nM.

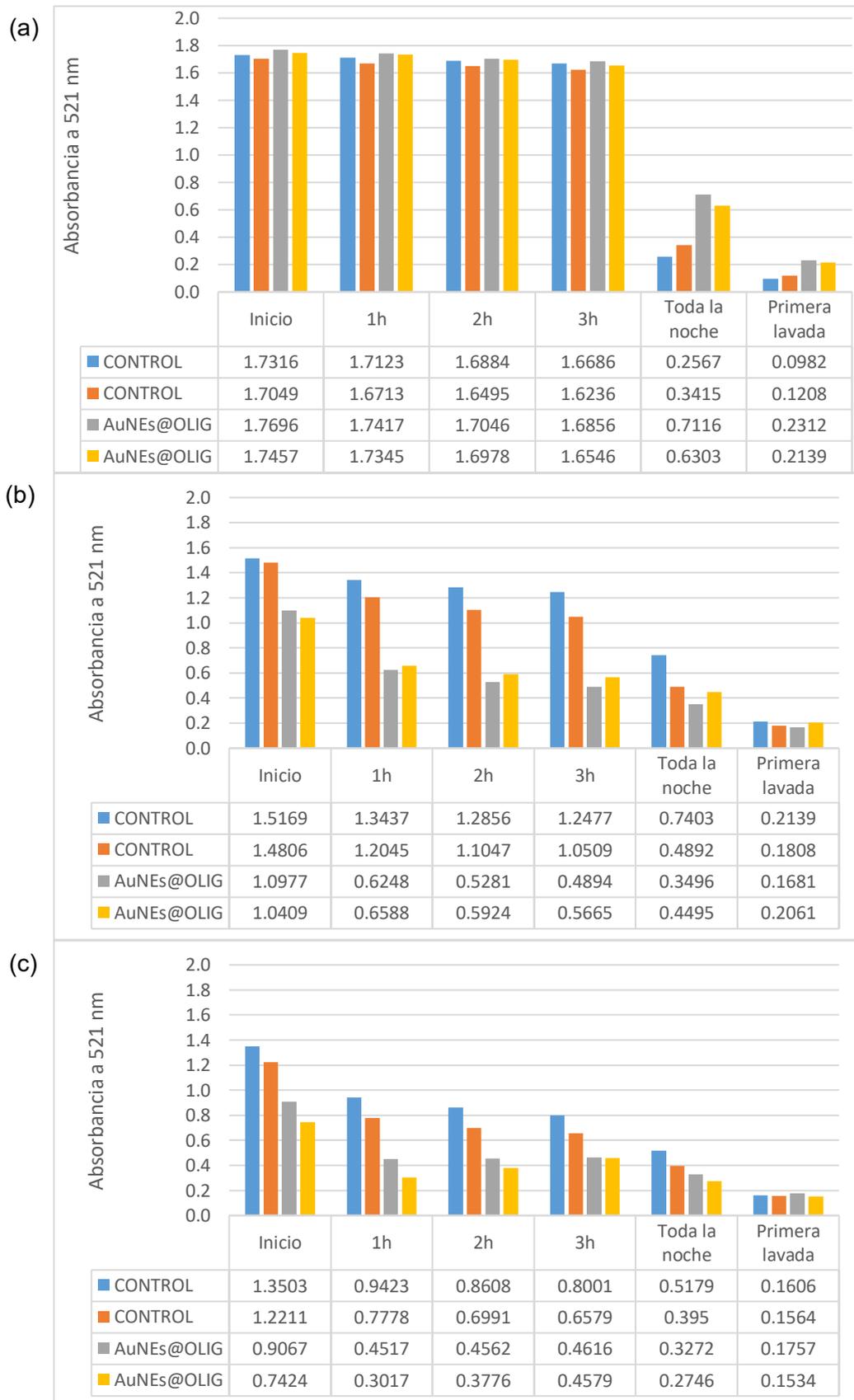
Tras los ensayos mostrados, se decidió trabajar los experimentos de hibridación con la concentración de 1,5 nM para AuNEs modificadas (pruebas control y pruebas con AuNEs@OLIG). Se continuó con el procedimiento de optimización, con el fin de evaluar si era posible reducir los valores de absorbancia para las pruebas control, a fin de poder demostrar que la adsorción de las AuNEs se debe solo a la hibridación de los oligonucleótidos y no a algún tipo de interacción inespecífica.

#### 4.3.4.3 Efecto de la concentración de NaCl en la hibridación de oligonucleótidos

Una vez determinada la concentración de hebra complementaria para la modificación superficial de microplacas (2  $\mu$ M) y la concentración de AuNEs modificadas para usar en la hibridación (1,5 nM), se evaluó el efecto de otro parámetro importante en la hibridación de oligonucleótidos: la concentración final de NaCl. En todos los ensayos anteriores se trabajó con una concentración final de 0,1 M de NaCl.

En estos ensayos se evaluó el uso de 3 concentraciones de NaCl en el proceso de hibridación: 0,2 M; 0,3 M y 0,4 M (procedimiento descrito en la sección 4.2.4). Estas condiciones fueron evaluadas mediante el análisis de las absorbancias a 521 nm en el periodo de análisis establecido para la hibridación. Ambos procesos, la modificación superficial de microplacas y la hibridación, se realizaron a 25°C. La figura 21 muestra los gráficos de barras que representan el cambio de la absorbancia monitoreada a lo largo del tiempo de análisis: al inicio de la hibridación, cada hora (durante 3 horas), al día siguiente y finalmente después de la primera lavada con PBS 1X a pH 7,4 + Tween® 40. Estos resultados se presentan para dos réplicas de la prueba control (AuNEs@PEG-SH) y dos réplicas de la prueba con AuNEs modificadas con oligonucleótidos (AuNEs@PEG-SH@APT).

Se puede observar en los gráficos de la figura 21, que conforme transcurre el tiempo de análisis, la absorbancia medida a 521 nm va disminuyendo debido a la agregación de AuNEs. La eficiencia de la hibridación se midió en función a los resultados obtenidos después de la primera lavada, en los cuales se esperaba tener absorbancias más altas para las pruebas con AuNEs@OLIG.



**Figura 21.** Gráfico de barras para la absorbancia a 521 nm de la microplaca recubierta con la HC, en la cual se empleó diferentes concentraciones de NaCl en la hibridación. (a) 0,2 M, (b) 0,3 M y (c) 0,4 M

En la figura 21a se observa que, al igual que en el caso analizado para la concentración 0,1 M de NaCl en la hibridación (figura 20b), cuando la concentración final de NaCl es de 0,2 M en la hibridación los valores de absorbancia entre pruebas control y pruebas con AuNEs@OLIG fueron muy diferentes después de la primera lavada de la microplaca. Los valores de absorbancia para las pruebas con AuNEs@OLIG siguen siendo altos a comparación de las pruebas control; sin embargo, los valores de absorbancia para las pruebas control son todavía significativos. Al analizar la diferencia de absorbancias entre pruebas control y pruebas con AuNEs@OLIG, aún no se puede concluir que las AuNEs se depositan en la placa por hibridación de los oligonucleótidos y no por interacción inespecífica.

En la figura 21b, en la cual el ensayo fue realizado con una concentración final de NaCl 0,3 M en la hibridación, se observa que al inicio de la hibridación las absorbancias son menores, en comparación con los ensayos anteriores. Esto puede deberse a la agregación de las AuNEs de las pruebas control y las pruebas con AuNEs@OLIG debido a la concentración de NaCl. Para este caso, los valores de absorbancia de las pruebas control, después de la primera lavada, son más altos que en el caso de las figuras 20b y 21a, por lo que se descartó esta concentración de NaCl optimice el proceso de hibridación.

En la figura 21c, en la cual el ensayo fue realizado con una concentración final de NaCl 0,4 M en la hibridación, al igual que en el caso de la figura 21b, se observa que las absorbancias registradas al inicio de la hibridación son menores, para todos los casos. Como se mencionó anteriormente, esto se debe a la elevada concentración de NaCl que generó la agregación de las AuNEs en las pruebas control y en las pruebas con AuNEs@OLIG. En este caso, los valores de absorbancia de las pruebas control y las pruebas con AuNEs@OLIG son bastante parecidos entre sí, por lo que también se descartó usar esta concentración en la hibridación.

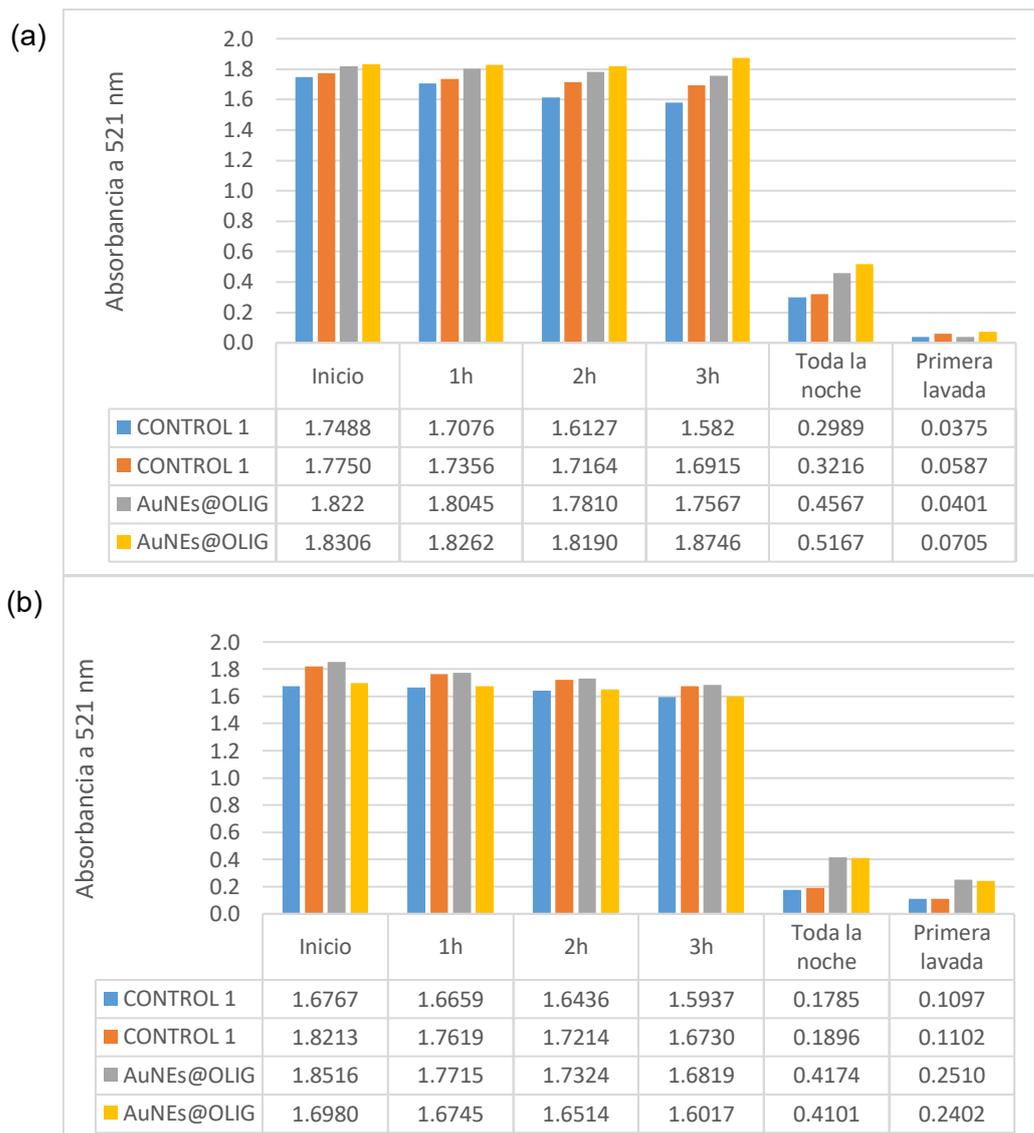
Finalmente, al analizar todos estos casos no se encontró ninguna evidencia de que el aumento de la concentración final de NaCl en la hibridación contribuya a que este proceso sea más eficiente, por lo que se decidió seguir realizando el proceso de hibridación con 0,1 M de NaCl.

#### 4.3.4.4 Efecto de la temperatura de funcionalización de la microplaca e hibridación de oligonucleótidos

Otra condición que también fue evaluada, tanto para el proceso de funcionalización de la microplaca como para la hibridación de oligonucleótidos, fue la temperatura. En los ensayos anteriores, se realizaron ambos procedimientos a 25°C. Para este análisis, se evaluaron los resultados de los ensayos realizados a 22°C y a 29°C (figura 22). En ambos casos, se trabajó con una placa modificada con 2 µM de hebra complementaria, la hibridación se trabajó con 1,5 nM de AuNEs y 0,1 M de NaCl. Al igual que en los casos anteriores, estas condiciones fueron evaluadas mediante el análisis de absorbancias a 521 nm en el periodo de análisis establecido para la hibridación.

La figura 22 muestra los gráficos de barras que representan el cambio de la absorbancia monitoreada a lo largo del tiempo de análisis: al inicio de la hibridación, cada hora (durante 3 horas), al día siguiente y, finalmente, después de la primera lavada con PBS 1X a pH 7,4 + Tween® 40. Estos resultados se presentan para dos réplicas de la prueba control (AuNEs@PEG-SH) y dos réplicas de la prueba con AuNEs modificadas con oligonucleótidos (AuNEs@PEG-SH@APT). Se puede apreciar, al igual que en los casos anteriores, que la absorbancia a 521 nm disminuye conforme transcurre el tiempo de análisis. La eficiencia de la hibridación se midió en función a los resultados obtenidos después de la primera lavada, en los cuales se esperaría tener absorbancias más altas para las pruebas con AuNEs@OLIG.

En la figura 22a, en la cual el ensayo fue realizado a una temperatura de 22°C, para la modificación de microplacas y la hibridación de nucleótidos, se observa que las absorbancias registradas después de la primera lavada tienen valores muy bajos, para las pruebas control y las pruebas con AuNEs@OLIG. Estos valores también se reflejan por simple inspección visual al analizar la microplaca después de la primera lavada, ya que no se observó la adherencia de AuNEs sobre la microplaca para el caso de las pruebas con AuNEs@OLIG, razón por la cual se descartó emplear esta temperatura para los ensayos próximos.



**Figura 22.** Gráfico de barras para la absorbancia a 521 nm de la microplaca recubierta con la HC analizado a diferente temperatura de funcionalización de la microplaca y de la hibridación. Las pruebas de temperatura se realizaron a (a) 22°C y (b) a 29°C.

En la figura 22b, el ensayo fue realizado a una temperatura de 29°C para la modificación de microplacas y la hibridación de nucleótidos. En este caso se observa que las absorbancias registradas después de la primera lavada tienen valores ligeramente más altos para las pruebas con AuNEs@OLIG en comparación al ensayo realizado a las mismas condiciones, pero a 25°C, que se muestra en la figura 20b. Sin embargo, los valores de absorbancia para las pruebas control siguen siendo un poco elevados, parecidos al ensayo de la figura 20b. Dado los valores superiores de absorbancia para los ensayos realizados en la muestra realizada a 29°C, se decidió emplear esta temperatura tanto para el proceso de modificación superficial de la microplaca como de hibridación de oligonucleótidos.

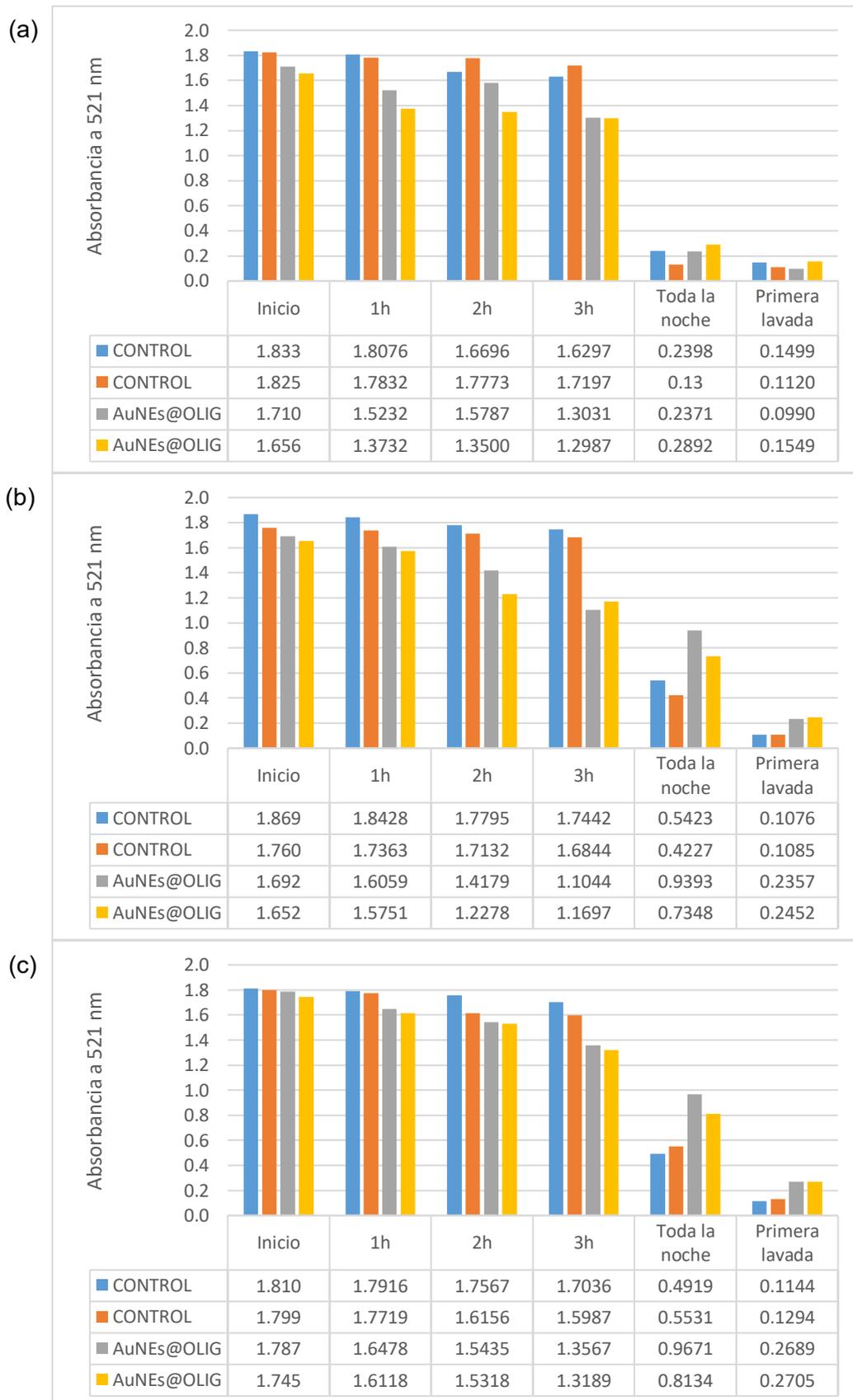
#### 4.3.4.5 Efecto de la adición de un agente de relleno en la funcionalización de la placa

Se analizaron los efectos que genera la adición de una molécula específica, que actuase como agente de relleno en la modificación superficial de las microplacas y pudiese contribuir a disminuir las interacciones inespecíficas. Esta condición se sumó a los otros parámetros ya evaluados: 2  $\mu\text{M}$  de la HC en la modificación de la microplaca, 1,5 nM de AuNEs modificadas para las pruebas control y las pruebas con AuNEs@OLIG y 0,1 M de NaCl en la hibridación, a una temperatura de 29°C para la modificación de la microplaca y la hibridación de oligonucleótidos. De esta manera se tomó en cuenta el efecto de los compuestos tiolados MPA y ETG. La figura 23 muestra los gráficos de barras de las absorbancias a 521 nm registradas a lo largo del proceso de hibridación para dos réplicas de las pruebas control y dos de las pruebas con AuNEs@OLIG, empleando 22  $\mu\text{L}$  de MPA dilución 1:10<sup>6</sup> v/v, ETG dilución 1:10<sup>6</sup> v/v y ETG dilución 5:10<sup>6</sup> v/v, respectivamente (según el procedimiento mencionado en la sección 4.2.3).

Al analizar los gráficos de la figura 23 se observa que los valores de absorbancia a 521 nm disminuyen conforme transcurre el tiempo de análisis, para todos los casos. La eficiencia de la hibridación se midió en función a los resultados obtenidos después de la primera lavada, en los cuales se esperaba tener absorbancias más altas para las pruebas con AuNEs@OLIG y disminuir los valores de absorbancias para las pruebas control, el cual era el principal problema hasta el momento en el proceso de hibridación.

En la figura 23a se muestran los resultados para un ensayo empleando MPA como agente de relleno. Se observa que las absorbancias registradas después de la primera lavada tienen valores bajos las pruebas con AuNEs@OLIG, además los valores para pruebas control y pruebas con AuNEs@OLIG, no presentan mayor diferencia al ser muy cercanos entre sí. Por estos motivos, se descartó el uso de MPA en la modificación de microplacas.

En la figura 23b, se muestran los resultados para un ensayo empleando ETG como agente de relleno. Para este caso, se observa que los valores de absorbancia para las pruebas con AuNEs@OLIG son más altos que los valores mostrados en la figura 23a. Sin embargo, los valores para las pruebas control siguen siendo elevados y estos resultados no evidencian una mejora en comparación a las condiciones analizadas hasta el momento (figura 22b). Por lo cual, se decidió aumentar la concentración de ETG empleada en la modificación de la microplaca, a un valor 5 veces mayor para evaluar si se obtenían mejoras.



**Figura 23.** Gráfico de barras para la absorbancia a 521 nm de la microplaca recubierta con hebra complementaria en la cual se empleó diferentes agentes de relleno en la modificación de la microplaca. Se empleó (a) MPA (dilución  $1:10^6$  v/v), (b) ETG (dilución  $1:10^6$  v/v), y (c) ETG (dilución  $5:10^6$  v/v).

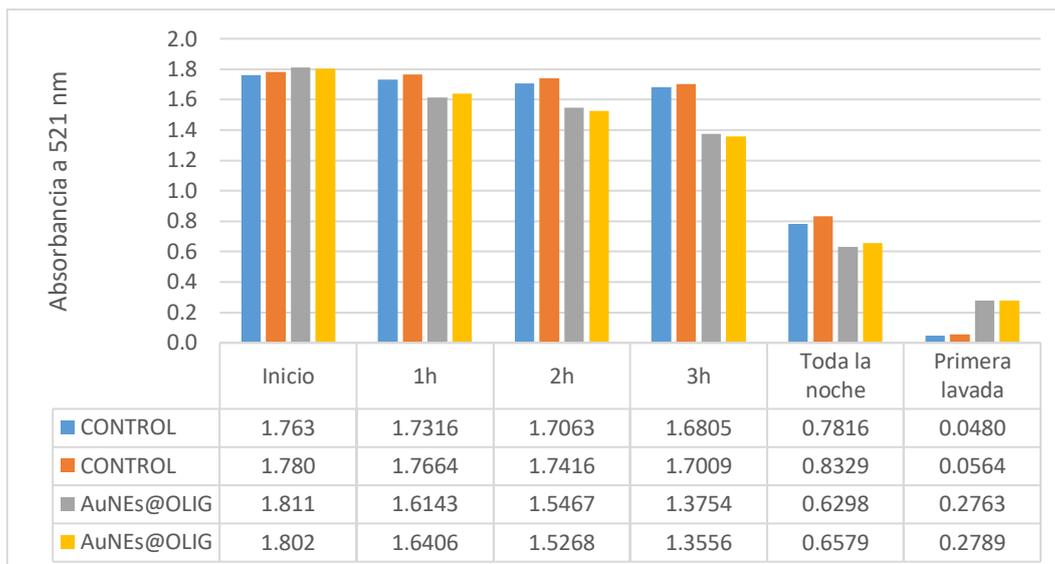
Finalmente, en la figura 23c se muestran los resultados para un ensayo empleando ETG cinco veces más concentrado que en el caso anterior. Se puede observar en la figura que los valores de absorbancia para las pruebas con AuNEs@OLIG mejoran ligeramente en comparación al ensayo de la figura 23b. Sin embargo, nuevamente los valores para las pruebas control siguen siendo elevados. A pesar de estos resultados, se decidió emplear ETG (dilución 5:10<sup>6</sup> v/v) como agente de relleno, ya que se observaron ligeras mejoras en cuanto a las absorbancias de las pruebas con AuNEs@OLIG.

#### 4.3.4.6 Efecto del doble recubrimiento con PEG-SH para las pruebas control

Las condiciones analizadas que tuvieron buenos resultados, hasta este punto, fueron empleando 2 µM de la HC y la adición de 22 µL de ETG dilución 5:10<sup>6</sup> v/v (como agente de relleno) en la modificación de las microplacas; 1,5 nM de AuNEs modificadas, tanto en las pruebas control como en las pruebas con AuNEs@OLIG; y 0,1 M de NaCl en la hibridación, además de la temperatura de 29°C para ambos procedimientos. Sin embargo, ninguna de estas condiciones logró mejorar el problema de las absorbancias de las pruebas control, los cuales no contribuían a conocer si realmente las AuNEs modificadas se depositaban sobre la placa debido a la hibridación o por interacción inespecífica, por lo que se decidió modificar las pruebas control.

Todos los resultados presentados hasta el momento contemplaron como pruebas control a las AuNEs@PEG-SH y para las pruebas con AuNEs@OLIG, a las AuNEs@PEG-SH@APT. Estas últimas presentaban un mayor número de moléculas tioladas unidas a la superficie de las AuNEs que en las AuNEs@PEG-SH. Esta diferencia podría contribuir al problema de las interacciones inespecíficas. Por tanto, para que las pruebas control y las pruebas con AuNEs@OLIG se encontrasen en las mismas condiciones de funcionalización, se decidió recubrir las AuNEs@PEG-SH con más moles de PEG-SH. De este modo se añadió el mismo número de moles de PEG-SH que del APT en la muestra, tal y como se indica en el apartado 4.2.2.5 y en la tabla 5. Finalmente se obtuvo una nueva prueba control: las nanoesferas de oro doblemente recubiertas con PEG tiolado (AuNEs@PEG-SH<sub>2</sub>).

La figura 24 muestra los resultados de la hibridación de oligonucleótidos empleando las AuNEs@PEG-SH<sub>2</sub> como nueva prueba control. Se presentan las absorbancias registradas durante todo el proceso de hibridación para dos réplicas para las pruebas control y dos réplicas para las pruebas con AuNEs@OLIG.



**Figura 24.** Gráfico de barras para la absorbancia a 521 nm de la microplaca recubierta con la HC en la cual se emplearon AuNEs.@PEG-SH\_2 como prueba control.

Como se puede observar, al igual que en los casos anteriores, se observa una mayor diferencia entre los valores de absorbancia para pruebas control y pruebas con AuNEs@OLIG a medida que transcurre el tiempo. En este ensayo se puede apreciar que sí existe una notable diferencia entre los valores de absorbancias, para pruebas control y pruebas con AuNEs@OLIG, después de la primera lavada. A simple vista también se pudo apreciar este detalle, ya que las AuNEs@PEG-SH\_2 agregadas fueron retiradas después de la primera lavada y no se quedaron adheridas a la superficie de la microplaca. Por tanto, se decidió emplear las AuNEs@PEG-SH\_2 como prueba control, en conjunto con las condiciones anteriormente analizadas para el proceso de modificación superficial de microplacas e hibridación de oligonucleótidos, estas condiciones optimizadas se muestran en las Tablas 6 y 7, respectivamente. Con estas condiciones optimizadas se obtuvo que los valores de absorbancia para las pruebas control están en el rango de 0,04-0,05 y los valores de absorbancia para las pruebas con AuNEs@OLIG están en el rango de 0,27-0,31.

**Tabla 6.** Condiciones óptimas analizadas para la funcionalización de microplacas NUNC® Immobilizer Amino con la hebra complementaria al aptámero de OTA.

Parámetro	Volumen (µL)	Condiciones óptimas
<b>Oligonucleótido</b>	50	<b>Hebra complementaria:</b> Concentración final en la microplaca: 2 µM
<b>Buffer</b>	10	Buffer de fosfato de potasio 0,1 M pH 8
<b>Agua Milli-Q®</b>	40	-
<b>Temperatura</b>		29°C
<b>Agente de relleno</b>		2 µL de ETG (dil 5:10 <sup>6</sup> )

**Tabla 7.** Condiciones óptimas analizadas para la hibridación de oligonucleótidos.

Parámetro	Condiciones óptimas
<b>AuNEs</b>	Concentración final en la hibridación: 1,5 nM PRUEBA CONTROL: AuNES@PEG-SH_2 PRUEBA CON AuNEs@OLIG: AuNES@PEG-SH@APT
<b>Agua Milli-Q®</b>	-
<b>Buffer KP 0,1M pH 8</b>	Concentración final: 0,02 M
<b>NaCl</b>	Concentración final: 0,1 M
<b>Temperatura</b>	29 °C

#### 4.3.5 Detección de OTA empleando microplacas modificadas superficialmente

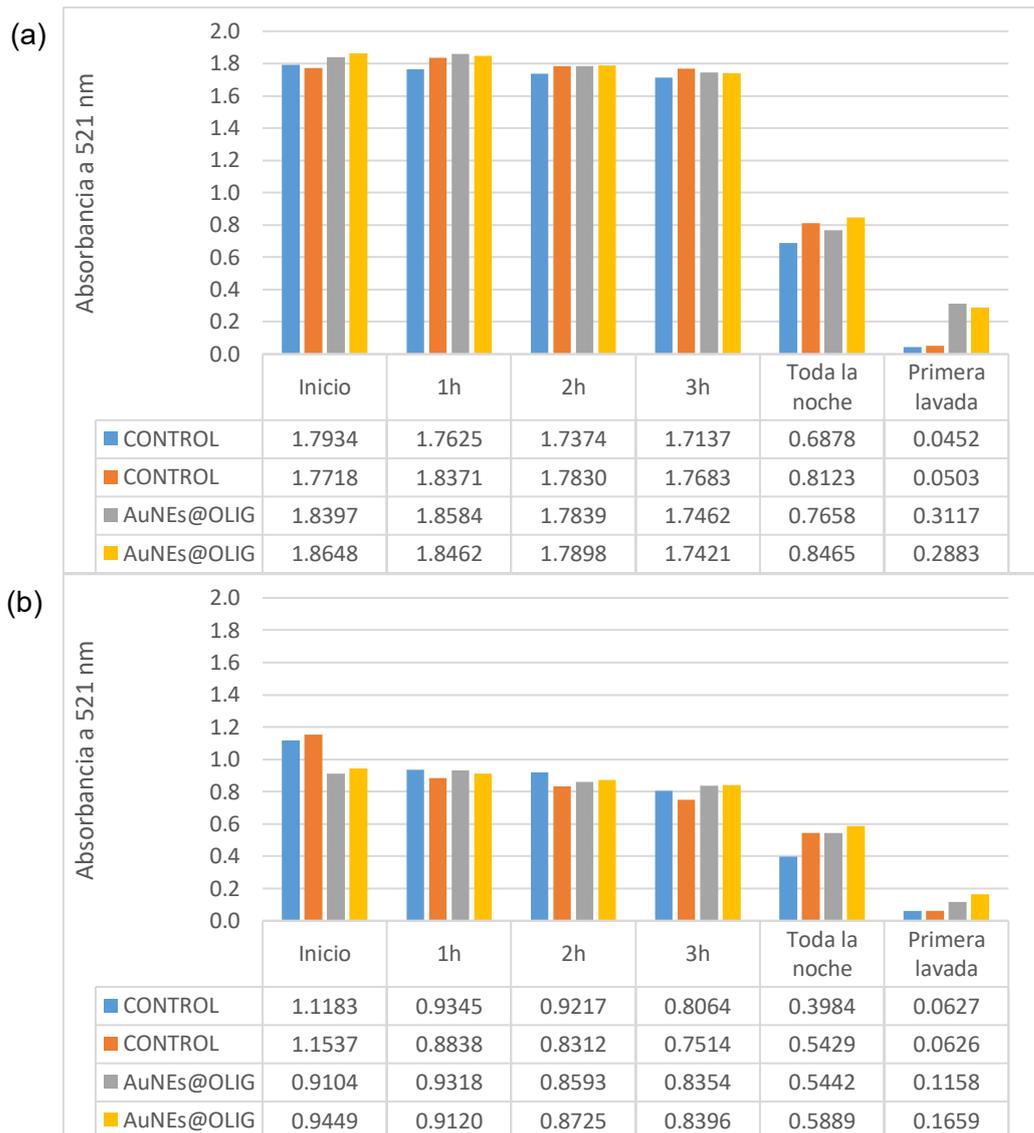
Con las condiciones óptimas encontradas en la modificación de las microplacas y en la hibridación de oligonucleótidos (Tablas 6 y 7), se realizaron los ensayos de detección de OTA. Para ello se evaluaron los resultados de las absorbancias registradas a 521 nm de las pruebas control y las pruebas con AuNEs@OLIG sin y con micotoxina en una misma microplaca modificada con la hebra complementaria al aptámero de OTA. El procedimiento fue el reportado en las secciones 4.2.4 (en ausencia de micotoxina) y 4.2.5.1 (en presencia de micotoxina). Adicionalmente, se evaluó la modificación de las microplacas con el aptámero de OTA y el uso de las AuNEs@PEG-SH@HC, de tal forma que se pudieran comparar los resultados obtenidos en ambos casos y se evaluara cuál de las formas de detección presenta los mejores resultados.

#### 4.3.5.1 Detección de OTA empleando una microplaca modificada con la HC

En este ensayo se compararon los resultados obtenidos en ausencia y presencia de micotoxina, la figura 25 muestra los gráficos de barras que representan el cambio de la absorbancia monitoreada a lo largo del tiempo de análisis: al inicio de la hibridación, cada hora (durante 3 horas), al día siguiente y finalmente después de la primera lavada con PBS 1X a pH 7,4 + Tween® 40. Estos resultados se presentan para dos réplicas de la prueba control (AuNEs@PEG-SH\_2) y dos réplicas de la prueba con AuNEs@OLIG (AuNEs@PEG-SH@APT).

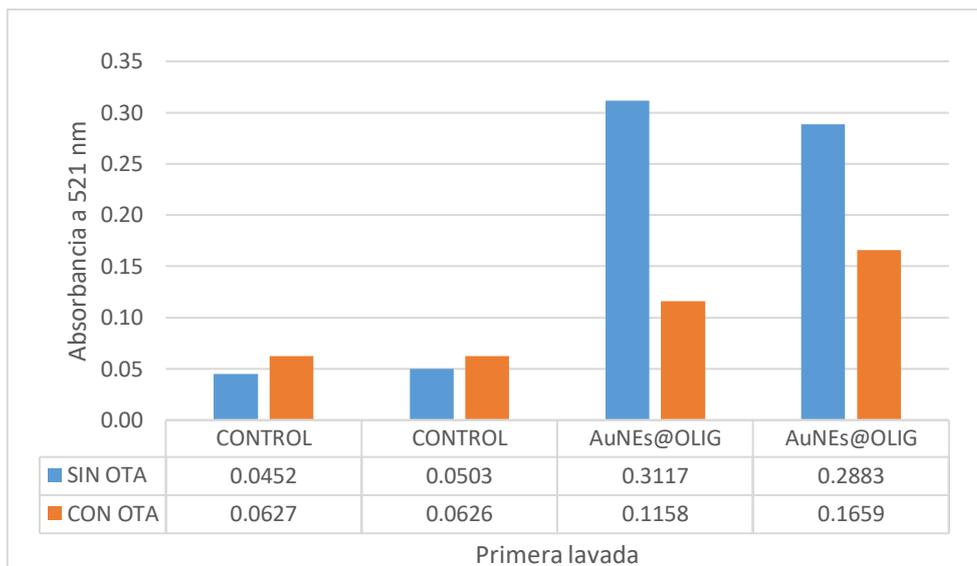
Se espera que en ausencia de micotoxina solo ocurra la hibridación de los oligonucleótidos, tal y como se ha mostrado en los ensayos descritos anteriormente. Por otro lado, en presencia de OTA se espera que cierta cantidad de las AuNEs@PEG-SH@APT interactúe con las moléculas de toxina añadidas, y el resto se adhiera a la microplaca por hibridación con el oligonucleótido complementario.

Como se puede observar, en la figura 25a se presentan los resultados para el ensayo en ausencia de micotoxina empleando NUNC@HC. Los valores de las absorbancias después de la primera lavada evidencian la hibridación de los oligonucleótidos para el caso de las pruebas con AuNEs@OLIG, ya que se obtienen valores aceptables de las absorbancias a 521 nm para estos casos. Por otro lado, en el caso de la figura 25b se presentan los resultados para el ensayo en presencia de micotoxina empleando NUNC@HC. Los resultados para este último caso muestran, tal y como se esperaba, que la absorbancia de las pruebas con AuNEs@OLIG es menor en comparación al ensayo sin OTA, ya que solo parte de las AuNEs depositadas sobre la microplaca se adhirieron a esta, el resto se unió a la micotoxina, agregaron y se retiraron con la primera lavada.



**Figura 25.** Gráfico de barras para la absorbancia a 521 nm del ensayo de hibridación empleando NUNC@HC y AuNEs@PEG-SH@APT. El gráfico de barras en (a) muestra los resultados en ausencia de OTA y en (b) se muestran los resultados en presencia de OTA.

La figura 26 muestra la comparación entre las absorbancias a 521 nm registradas después de la primera lavada para el ensayo en ausencia y presencia de OTA. La diferencia entre los valores de absorbancia de las pruebas con AuNEs@OLIG al comparar ambos casos, muestra la efectividad de las microplacas modificadas con la hebra complementaria en la detección de un estándar de OTA.

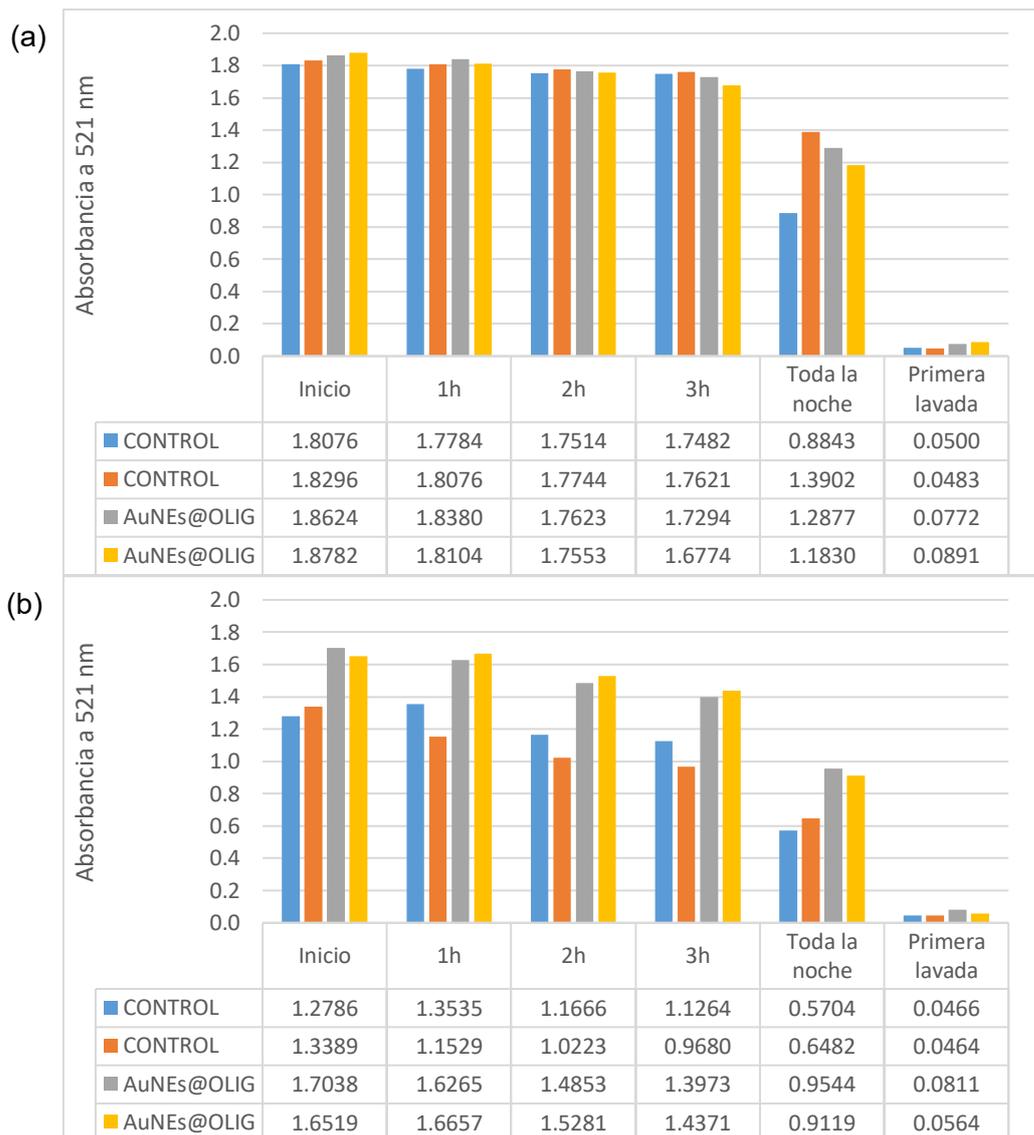


**Figura 26.** Gráfico de barras para la absorbancia a 521 nm registradas después de la primera lavada para los ensayos con y sin OTA empleando NUNC@HC y AuNEs@PEG-SH@APT.

#### 4.3.5.2 Detección de OTA empleando una microplaca modificada con el APT

En el caso de este ensayo, al igual que en el anterior, se compararon los resultados obtenidos en ausencia y presencia de micotoxina, la figura 27 muestra los gráficos de barras que representan el cambio de la absorbancia monitoreada a lo largo del tiempo de análisis: al inicio de la hibridación, cada hora (durante 3 horas), al día siguiente y finalmente después de la primera lavada con PBS 1X a pH 7,4 + Tween® 40, estos resultados se presentan para dos réplicas de la prueba control (AuNEs@PEG-SH\_2) y dos réplicas de la prueba con AuNEs@OLIG (AuNEs@PEG-SH@HC).

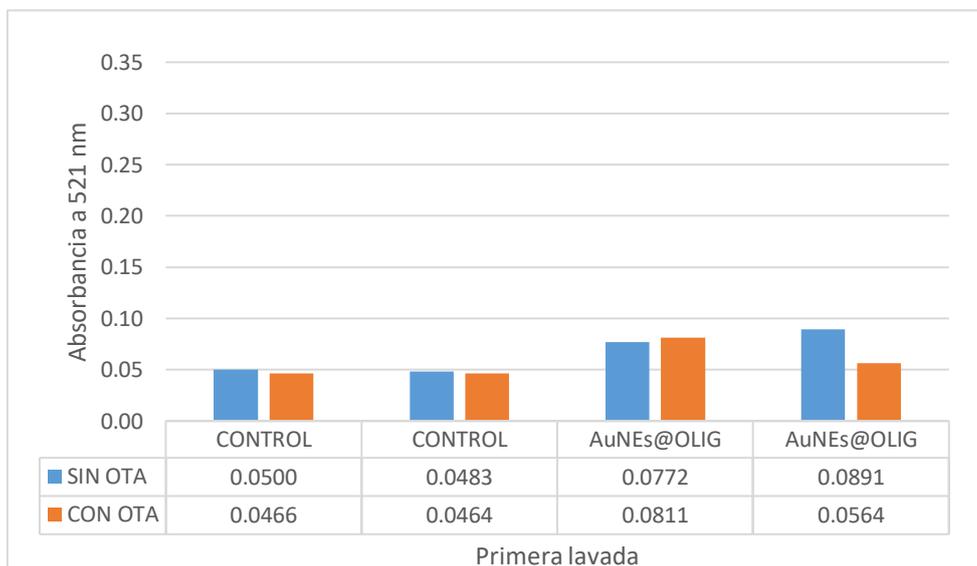
Para este ensayo se utilizó una placa modificada con el aptámero de OTA, con el fin de evaluar si las condiciones óptimas encontradas anteriormente para la hibridación se aplican para este caso y, además, evaluar si es posible la detección de OTA sobre esta microplaca. Como en el ensayo anterior, se espera que en ausencia de micotoxina solo ocurra la hibridación de los oligonucleótidos. Por otro lado, en presencia de OTA se espera que la micotoxina depositada sobre la microplaca interactúe con el aptámero presente en esta, lo cual dejará menos espacio disponible para que las AuNEs@PEG-SH@HC puedan adherirse a la microplaca. Esto, al igual que en el caso anterior, se evidenciaría con una disminución en la absorbancia registrada para las pruebas con AuNEs@OLIG, después de la primera lavada.



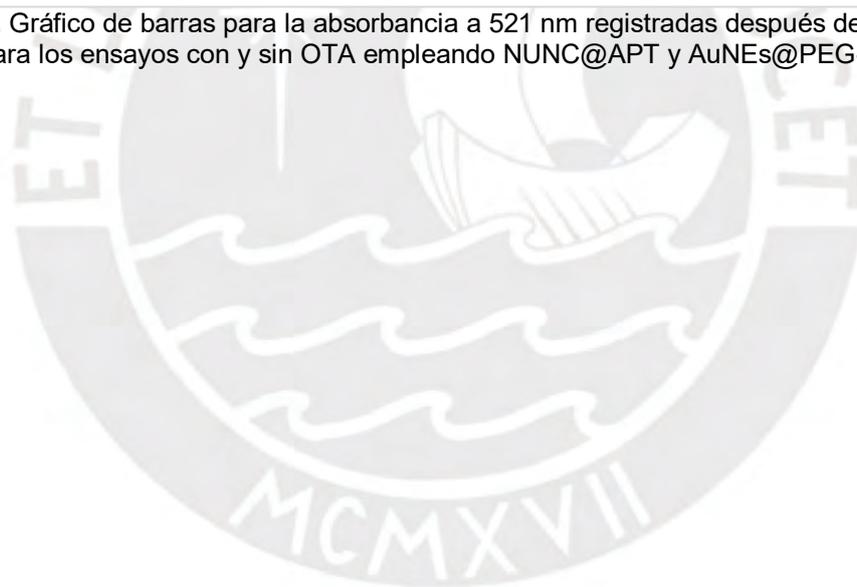
**Figura 27.** Gráfico de barras para la absorbancia a 521 nm del ensayo de hibridación con NUNC@APT y AuNEs@PEG-SH@HC. El gráfico de barras en (a) muestra los resultados en ausencia de OTA y en (b) se muestran los resultados en presencia de OTA.

La figura 27a muestra los resultados para el ensayo en ausencia de micotoxina empleando NUNC@APT. Los valores de absorbancia después de la primera lavada son muy bajos, tanto para las pruebas control como para las pruebas con AuNEs@OLIG, por tanto, para este caso, la hibridación no fue exitosa con las condiciones que se evaluaron en el proceso de optimización para la modificación de microplacas y la hibridación de oligonucleótidos reportadas en este trabajo. De la misma manera, en el caso de la figura 27b los resultados para el ensayo en presencia de micotoxina empleando NUNC@APT no fueron los esperados, debido a que los valores de la absorbancia eran demasiado bajos inclusive en ausencia de OTA.

La figura 28 muestra la comparación entre las absorbancias a 521 nm registradas después de la primera lavada para el ensayo en ausencia y presencia de OTA. Como se mencionó, los valores de absorbancia para las pruebas con AuNEs@OLIG, en ambos casos, son demasiado bajos y no difieren entre ensayos.



**Figura 28.** Gráfico de barras para la absorbancia a 521 nm registradas después de la primera lavada para los ensayos con y sin OTA empleando NUNC@APT y AuNEs@PEG-SH@HC.



## 5. Discusión de resultados

### 5.1 Síntesis y caracterización de nanoesferas de oro

El objetivo inicial de este trabajo contempló la síntesis de AuNEs de 32 nm de diámetro y su caracterización mediante espectroscopía UV-Vis y TEM. La síntesis se realizó a partir del método de nucleación y crecimiento desarrollado por Bastús *et al.*<sup>33</sup> y adaptado por Hernández *et al.*,<sup>40</sup> el cual se basó en la preparación de AuNEs a partir de una sal de oro (HAuCl<sub>4</sub>) y del citrato de sodio, que actúa como agente reductor y estabilizante. Inicialmente, como se describe en la sección 4.2.1, al añadir estos dos reactivos se forman pequeñas nanopartículas que sirven como semillas, a las cuales se les agregó 2 adiciones consecutivas de sal de oro. Esto permitió el recrecimiento de las semillas y obtener el tamaño deseado. Las AuNEs sintetizadas están recubiertas por iones negativos (citrato), como se observa en el esquema de la figura 6, y la repulsión de estos iones en la superficie impide que las interacciones de van der Waals, existentes entre las nanopartículas, causen su agregación.<sup>23</sup>

El tamaño teórico de las AuNEs sintetizadas se estimó según los datos reportados en la literatura,<sup>37</sup> para lo cual se necesita conocer la longitud de onda del máximo de la banda LSPR ( $\lambda_{LSPR}$ ) obtenido a partir del análisis del espectro UV-Vis y reemplazarlo en la siguiente ecuación:

$$\lambda_{LSPR} = \lambda_0 + L_1 \exp(L_2 d)$$

Donde  $d$  es el diámetro de las partículas y  $\lambda_0$ ,  $L_1$  y  $L_2$  son parámetros establecidos. Como muestra la figura 14, el máximo de banda se encuentra a 525 nm de longitud de onda, este valor reporta un diámetro aproximado de 32 nm.

A partir de la caracterización TEM realizada se obtuvieron micrografías de las AuNEs sintetizadas, lo cual permitió corroborar la forma esférica de las nanopartículas, como se observa en la figura 15a. Asimismo, esta caracterización permitió conocer el diámetro promedio aproximado de las AuNEs ( $29 \pm 2$  nm), el cual es cercano al diámetro teórico obtenido a partir del análisis de la longitud de onda del máximo de la banda LSPR.

## 5.2 Funcionalización de AuNEs con oligonucleótidos específicos

Otro de los objetivos del trabajo fue desarrollar un protocolo de funcionalización de AuNEs con dos oligonucleótidos tiolados, APT y HC, aprovechando la buena interacción, casi covalente, que existe entre el oro y el azufre de las sustancias tioladas.<sup>6,32</sup> La estructura del aptámero de OTA posee carga negativa debido a los grupos fosfato presentes que podría resultar en la repulsión de estas cadenas, lo cual deriva en un menor grado de funcionalización sobre la superficie de la nanopartícula. Para minimizar estas repulsiones, se contempló la adición de un agente tensioactivo como el SDS y el uso de NaCl.<sup>45</sup> También se ha reportado que el uso de buffer de fosfato maximiza la unión entre el aptámero y la nanopartícula.<sup>45</sup> Por último, otro factor importante es la sonicación de las muestras, debido a que se ha reportado que contribuye a romper la interacción entre las hebras de los oligonucleótidos y la superficie de las nanopartículas. Esto último, ayuda a mejorar el acceso de más hebras hacia la superficie ya que se encontrarán más extendidas.<sup>45</sup>

Inicialmente se contempló la funcionalización directa de AuNEs con el aptámero de OTA, a fin de encontrar las condiciones óptimas de funcionalización. El procedimiento desarrollado para la funcionalización con el APT está descrito en el apartado 4.2.2.1, y contempla la adición de buffer de fosfato, SDS y NaCl. Los ensayos de funcionalización que contemplaban esta adición directa de las AuNEs con los aptámeros con SDS y NaCl no resultaron exitosos. En los 4 casos analizados se observó la agregación de las AuNEs inmediatamente después de la adición de NaCl (ver figura 16). Se pudo apreciar que al inicio del proceso la solución de AuNEs era de color rojo intenso y luego de añadir la sal la solución presentó una tonalidad morada, producto de esta agregación. Esto se debe a que el proceso de funcionalización de AuNEs con el APT no era lo suficientemente rápido ni eficaz, por lo cual se evaluó modificarlas previamente con algún otro compuesto tiolado para aumentar la estabilidad de las AuNEs en este medio.

### 5.2.1 Funcionalización con PEG-SH y con los oligonucleótidos tiolados

Se evaluó la funcionalización con una cadena corta de PEG tiolado, un polímero hidrofílico que, debido a su estructura y estabilidad química, ha mostrado buenos resultados en contribuir con la estabilidad de las AuNEs, y evitar la adsorción inespecífica de otros compuestos sobre la nanopartícula, en diferentes aplicaciones.<sup>6,32,41</sup> Como se describe en el apartado 4.2.2.1, para realizar esta funcionalización se empleó PEG-SH ( $\alpha$ -tio- $\omega$ -(ácido propiónico)octa(etilenglicol)), un compuesto tiolado por

un extremo y con un grupo carboxilo en el otro. La figura 17, muestra el espectro UV-Vis para una muestra de AuNEs@PEG-SH, en el cual se puede observar que el máximo de banda se encuentra a 525 nm.

El paso siguiente a la funcionalización de AuNEs con PEG-SH fue comprobar si estas eran más estables que las sintetizadas inicialmente y si se podía completar la funcionalización con el APT o con la HC. Para ello, se funcionalizaron estas nuevas nanoesferas con las condiciones reportadas en el apartado 4.2.2.1. El procedimiento de funcionalización con los oligonucleótidos se pudo completar sin la agregación de las AuNEs después de la primera adición de NaCl. Cabe mencionar que se fue aumentando progresivamente la cantidad final de NaCl durante la funcionalización, para mejorar la unión del oligonucleótido sobre la nanopartícula. Esta adición progresiva se realizó en cuatro pasos a lo largo de dos días, para evitar la desestabilización de las AuNEs durante la funcionalización.<sup>45</sup> En el procedimiento de funcionalización también se menciona que después de cada adición de NaCl se sonicó brevemente las muestras, de esta manera se buscó reducir la interacción entre las hebras de los oligonucleótidos y la superficie del oro, y promover a que las hebras estén más extendidas.<sup>45</sup>

La figura 18 muestra los espectros UV-Vis para las AuNEs modificadas con oligonucleótidos (AuNEs@PEG-SH@APT y AuNEs@PEG-SH@HC) y se incluye, además, el espectro de las AuNEs@PEG-SH. Como se observa en esta figura, las AuNEs recubiertas con los oligonucleótidos presentan un máximo de banda a 527 nm, este desplazamiento de 2 nm hacia el infrarrojo (en comparación a las AuNEs@PEG-SH) sugiere que se ha logrado la funcionalización con los oligonucleótidos, y que el procedimiento realizado para la funcionalización de AuNEs fue efectivo.

### **5.3 Modificación superficial de microplacas e hibridación de oligonucleótidos**

Se evaluó la modificación de microplacas NUNC® Immobilizer Amino con la HC mediante la hibridación posterior entre las cadenas de este oligonucleótido y las cadenas de las AuNEs@PEG-SH@APT. La efectividad del sistema se determinó mediante el análisis de los valores de absorbancia a 521 nm, para lo cual se utilizó una lectora de microplacas con un filtro a esta longitud de onda debido a que, para todos los ensayos se utilizaron AuNEs modificadas con PEG y oligonucleótidos, los máximos de banda LSPR se encuentran entre 525 nm y 527 nm. Se buscó reducir las interacciones no específicas, es decir valores bajos de absorbancia a  $\lambda = 521$  nm en las pruebas control; y mejorar la hibridación entre las hebras, que representan mayores valores de absorbancia a  $\lambda = 521$  nm de las pruebas realizadas con las hebras del aptámero y las

hebras complementarias. De este modo se analizaron los parámetros descritos en la Tabla 4 y 5, como la temperatura, las concentraciones de reactivos empleados, y la concentración de AuNEs modificadas y se evaluaron los resultados de absorbancia.

### **5.3.1 Efecto de la concentración de la HC en la funcionalización e hibridación de la placa**

En los primeros ensayos realizados se estudió el efecto de la concentración de la HC en la modificación superficial de la placa. La figura 19 muestra los cambios en las absorbancias cuando solo se modifica la concentración del oligonucleótido empleado en la funcionalización de la microplaca. Los valores de absorbancia mostrados en la figura 19 indican que si se aumenta la concentración de la HC de 0,2  $\mu\text{M}$  (figura 19a) a 2,0  $\mu\text{M}$  en la funcionalización de la microplaca (figura 19b), también se incrementan ligeramente los valores de absorbancia relativas de las pruebas con las AuNEs modificadas. Esto puede deberse a que se requiere una mayor concentración de oligonucleótido complementario sobre la microplaca, para que las hebras de aptámero presentes en la superficie de las AuNEs puedan hibridarse con estos y que la cantidad de AuNEs unidas sobre la microplaca sea la suficiente para ser detectada. Por tanto, se estableció trabajar con la concentración de 2  $\mu\text{M}$  de la HC e ir modificando más parámetros para la optimización de la hibridación de oligonucleótidos, puesto que, a pesar de obtener absorbancias mayores para las pruebas con AuNEs@OLIG, los valores de las pruebas control eran muy parecidos. Esto último no permitía concluir que existía una hibridación, puesto que la absorbancia detectada podría deberse a la adsorción inespecífica de AuNEs sobre la microplaca.

### **5.3.2 Efecto de la concentración de la AuNEs modificadas con el APT en la hibridación de la placa**

Otro factor estudiado fue la concentración de las nanoesferas modificadas (AuNEs@OLIG) necesaria en el proceso de hibridación sobre la microplaca funcionalizada. Se evaluaron 3 concentraciones distintas de AuNEs modificadas: 0,75 nM; 1,5 nM y 2,0 nM, y los resultados, mostrados en la figura 20, permitieron conocer cómo influye este factor en el proceso de optimización. Tal y como se muestra en el apartado 4.3.3.2, los mejores resultados se obtuvieron al aumentar la concentración de esferas modificadas de 0,75 nM a 1,5 nM. Aquí se puede apreciar que los valores de la absorbancia de las pruebas con AuNEs@OLIG, son mayores a 1,5 nM, lo cual nos podría dar un indicio de la mejora existente en la hibridación para las pruebas

con AuNEs@OLIG. Sin embargo, como se muestra en la figura 20c, al incrementar la concentración a 2,0 nM las absorbancias para las pruebas con AuNEs@OLIG, después de la primera lavada, no se vieron incrementadas (en comparación a la figura 20b). Los resultados obtenidos con la solución 2,0 nM de AuNEs modificadas sugieren que el aumento en la concentración podría propiciar que las nanopartículas estén más juntas unas de otras y que se favorezca la agregación de estas estructuras antes que la hibridación y la adsorción de estos agregados sobre la microplaca. De esta forma se estableció trabajar con la concentración de 1,5 nM para las AuNEs modificadas, a pesar de que el problema con los valores de absorbancia para las pruebas control persistía.

### **5.3.3 Efecto de la concentración de NaCl en la hibridación de oligonucleótidos**

Se evaluó el efecto de la concentración de NaCl, al ser considerado como un factor determinante en el proceso de hibridación de oligonucleótidos.<sup>57</sup> Se evaluaron tres concentraciones de NaCl, adicionales a la de 0,1 M con la que se venía trabajando en los ensayos anteriores. Estas concentraciones fueron: 0,2 M; 0,3 M y 0,4 M y la figura 21 muestra los valores de las absorbancias para las pruebas control y las pruebas con AuNEs@OLIG para cada caso. Los resultados del ensayo a 0,2 M de NaCl son bastante parecidos a los del ensayo a 0,1 M NaCl (ensayo de la figura 20b). Por lo cual no se podría confirmar que el aumento de concentración de NaCl beneficie la hibridación. En el caso de los ensayos realizados con soluciones de NaCl 0,3 M y 0,4 M, se observó la formación de agregados de las AuNEs modificadas, y se corroboró debido a que los valores de absorbancia medidos inicialmente, tanto para las pruebas control como las pruebas con AuNEs@OLIG fueron mucho menores en comparación al ensayo a 0,2 M, en el cual se empleó la misma concentración de AuNEs. Esta formación de agregados no permite que el ensayo de hibridación se desarrolle eficazmente. Al no encontrar mejoras significativas con el aumento de la concentración de NaCl, se optó por seguir utilizando la concentración de 0,1 M.

### **5.3.4 Efecto de la temperatura de funcionalización e hibridación de oligonucleótidos**

Un parámetro analizado también fue la temperatura, tanto de la funcionalización como de la hibridación. Todos los ensayos hasta el momento fueron realizados a 25°C, y los mejores resultados se presentan en la figura 20b. En este análisis se evaluó el efecto de disminuir la temperatura a 22°C (figura 22a) y de aumentar la temperatura a 29°C (figura 22b) para la funcionalización y la hibridación. Los resultados de las pruebas

realizadas a 22°C no fueron representativas debido a que los valores tanto de las pruebas control como de las pruebas con AuNEs@OLIG eran muy pequeños. Esto podría indicar que a esta temperatura no se favorece la hibridación en el ensayo. Por otro lado, los resultados de los valores de absorbancia para las pruebas con las nanopartículas modificadas a 29°C son ligeramente mejores que las realizadas a 25°C después del primer lavado. Como se presenta en los resultados, el aumento en los valores de absorbancia se relaciona con el aumento de la temperatura de funcionalización de la placa e hibridación de oligonucleótidos, debido a que al incrementar la temperatura favorecemos que las moléculas disueltas se muevan más rápido y, por tanto, lleguen a la superficie del pocillo más pronto que en el caso de temperaturas más bajas. Por esta razón, se decidió mantener los ensayos a 29°C y evaluar si las deficiencias en los valores de absorbancia de las pruebas control provienen de otros parámetros.

### **5.3.5 Efecto de la adición de un agente de relleno en la funcionalización de la placa**

Otro factor evaluado en la optimización del proceso de modificación superficial de la placa fue añadir un agente de relleno que pueda mejorar los problemas de interacción inespecífica que generaba valores de absorbancia mayores a 0,1 en las pruebas control. Como se mencionó en el apartado 4.2.2, las microplacas empleadas en este trabajo fueron las NUNC® Immobilizer Amino, las cuales presentan un grupo electrofílico en su superficie que reacciona con grupos nucleófilos como aminas y tioles a pH básico.<sup>56</sup> Por este motivo se decidió emplear dos moléculas tioladas, MPA y ETG, para la funcionalización de microplacas, a fin de que puedan usarse para rellenar espacios sobrantes en la placa y que las AuNEs de las pruebas control no puedan adsorberse sobre esta, debido a la repulsión generada por los grupos funcionales expuestos de estas moléculas de relleno.

La figura 23 muestra los resultados de las absorbancias medidas a 521 nm para tanto las pruebas control como las pruebas con AuNEs@OLIG en el uso de MPA (dilución 1:10<sup>6</sup> v/v), ETG (dilución 1:10<sup>6</sup> v/v) y ETG (5:10<sup>6</sup> v/v) como agentes de relleno. Los resultados muestran que en el caso del ensayo con MPA (figura 23a) los valores de absorbancia para las pruebas control son muy parecidos a los obtenidos con ETG (figuras 23b y 23c); sin embargo, los valores de absorbancia para las pruebas con AuNEs@OLIG son menores a los reportados en ensayos previos sin agente de relleno. En el caso del uso de ETG, se observó que los valores de absorbancia para las pruebas

control y las pruebas con AuNEs@OLIG eran parecidos entre sí, aunque los valores de absorbancia para las pruebas con AuNEs@OLIG son mayores en comparación con los otros ensayos analizados previamente.

La estructura del MPA presenta, en el extremo no unido a la placa, un grupo carboxilo que al estar en medio básico se encontrará como carboxilato, el cual generaría una repulsión electrostática entre las AuNEs y la superficie de la microplaca, evitando las adsorciones inespecíficas. Por otro lado, el ETG presenta en el extremo un éster que en medio básico puede hidrolizarse y encontrarse como carboxilato, pero debido a que el pH empleado en la modificación superficial de las microplacas no es demasiado básico (pH 8), a diferencia del caso anterior, la mayor parte de este no reaccionará por lo que no se encontrará como carboxilato. En este último caso, el hecho de que el grupo etoxi del ETG es un grupo más voluminoso y no tenga carga neta, favorece una disminución de las adsorciones inespecíficas.

Como se observó en los resultados el efecto de la adición del agente de relleno en los tres casos no pudo resolver el problema de los valores de absorbancia de las pruebas control después de la primera lavada. Sin embargo, se observan mejores resultados con la adición de ETG en lugar de MPA, tanto para las pruebas control como para las pruebas con oligonucleótido. Esto último sugiere que el ETG funciona mejor como agente de relleno en la funcionalización de la microplaca. Al incrementar la concentración de ETG a  $5:10^6$  v/v se observa una mejora en cuanto a los valores de absorbancia de las pruebas con AuNEs@OLIG, por lo que se decidió emplear las condiciones de este ensayo y seguir optimizando el proceso para encontrar la solución al problema de interacción no específica en las pruebas control.

### **5.3.6 Efecto del doble recubrimiento con PEG-SH en las pruebas control**

Como se ha mencionado, hasta el momento ninguno de los efectos estudiados anteriormente mejoraba el problema con las pruebas control. Se creía que gran parte de las AuNEs añadidas a la microplaca podían estar adsorbiéndose inespecíficamente y por eso se tenían valores de absorbancia un poco altos en las pruebas control y que no permitía asegurar que las AuNEs se adherían a la placa efectivamente por hibridación.

Hasta ese momento no se evaluó la efectividad del recubrimiento de las AuNEs empleadas en las pruebas control sobre las AuNEs recubiertas con oligonucleótidos. Estas últimas, al estar recubiertas con hebras de oligonucleótidos se encuentran más estables que las de las pruebas control, que solo están recubiertas con la misma cantidad de PEG-SH. Por tanto, se evaluó recubrir a las AuNEs@PEG-SH con más moles de PEG-SH, de tal manera que las AuNEs estuvieran expuestas a la misma cantidad de moléculas tioladas. De esta manera, tanto las pruebas con AuNEs@OLIG como las pruebas control se encontrarían en las mismas condiciones antes de hacer el ensayo de hibridación.

Los resultados mostrados en la figura 24 muestran que efectivamente se logró solucionar el problema de los valores de absorbancia relativamente altos en las pruebas control después de la primera lavada. Por lo tanto, el uso de esta prueba control en el proceso de hibridación tuvo éxito y en conjunto con las condiciones encontradas anteriormente, se establecieron los parámetros óptimos para el proceso de funcionalización y el proceso de hibridación, resumidas en las Tablas 6 y 7.

#### **5.4 Detección de OTA empleando microplacas modificadas superficialmente**

Luego de haber encontrado las condiciones óptimas para los procesos de modificación superficial de la placa e hibridación de oligonucleótidos, se realizaron los ensayos de detección de un estándar de OTA. Además, se evaluaron dos maneras de realizar la detección, la primera de ellas contempla la microplaca modificada con la HC y el uso de AuNEs@PEG-SH@APT y la segunda forma, considera a la microplaca modificada con el APT y al uso de AuNEs@PEG-SH@HC. En ambos casos se emplearon las mismas condiciones optimizadas y descritas en las Tablas 6 y 7.

##### **5.4.1 Detección de OTA empleando una microplaca modificada con la HC**

Se evaluó la detección de una solución de 12,5  $\mu\text{M}$  de OTA empleando una microplaca modificada con la hebra complementaria al aptámero de OTA, para lo cual, sobre una misma microplaca modificada se planearon dos ensayos diferentes al mismo tiempo, el primero en ausencia de OTA (figura 25a) y el segundo, en presencia de esta micotoxina (figura 25 b). Tal y como se esperaba, al añadir las AuNEs modificadas, en ausencia de OTA, ocurre la hibridación de los oligonucleótidos.

Al analizar la figura 26, en la cual se presenta la comparación de los resultados de las absorbancias registradas a 521 nm para ambos ensayos, se puede observar que, en presencia de la toxina, los resultados del ensayo con las AuNEs@PEG-SH@APT muestran valores de absorbancia menores que en ausencia de OTA. Esto se debe a que, en comparación al ensayo en ausencia de la toxina, la hibridación se ve mayormente impedida debido a que de las cadenas del aptámero de OTA se encuentran ahora unidas a la micotoxina y no puede interactuar con las hebras complementarias. Solo las cadenas de aptámero que no se encuentran unidas a la OTA pueden hibridarse con las cadenas de la hebra complementaria presentes en la microplaca, pero en menor medida que en el ensayo en ausencia de OTA.

Los resultados mostrados en estos ensayos permitieron demostrar que es posible discriminar la presencia y ausencia de 12,5  $\mu$ M (336 ppb) de OTA empleando una microplaca modificada con la HC y nanopartículas modificadas con APT.

#### **5.4.2 Detección de OTA empleando una microplaca modificada con el APT**

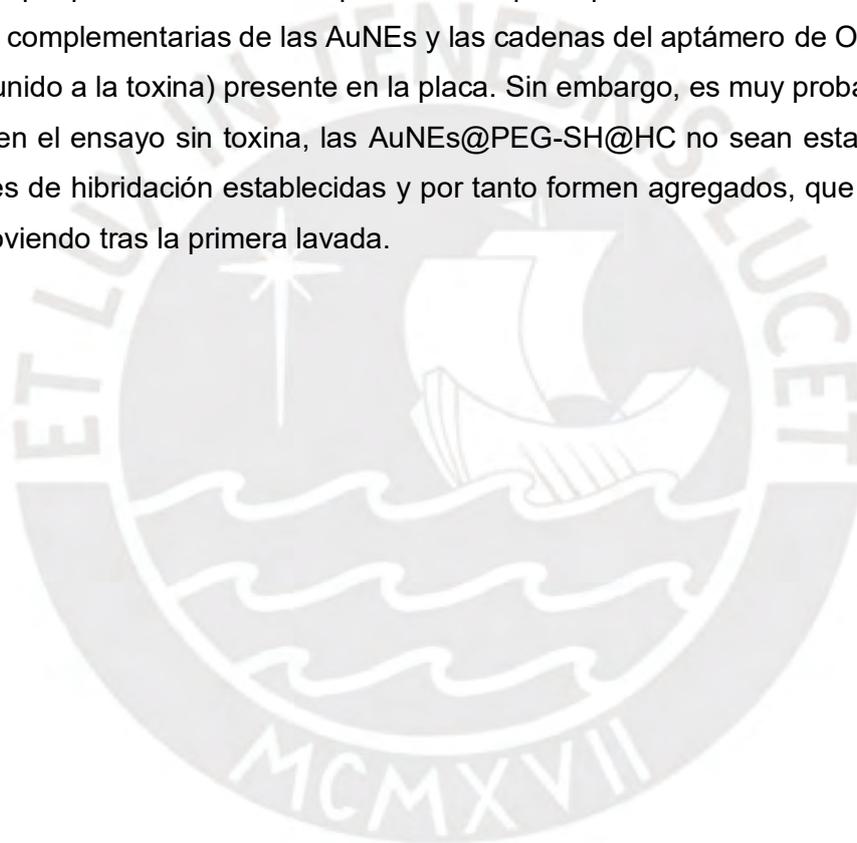
Por último, se evaluó la hibridación de oligonucleótidos empleando una microplaca modificada con el aptámero de OTA y AuNEs@PEG-SH@HC, siguiendo las condiciones optimizadas encontradas en este trabajo. Al igual que en el ensayo anterior, se evaluó si el sistema permite la detección de OTA.

Se esperaba que al igual que en el ensayo anterior, en ausencia de micotoxina ocurra la hibridación de oligonucleótidos; mientras que en presencia de micotoxina la hibridación se vea parcialmente impedida debido a la unión de la toxina con las hebras del aptámero presentes sobre la microplaca. Sin embargo, los valores de absorbancia obtenidos luego de la primera lavada para las pruebas control y las pruebas con AuNEs@OLIG en presencia y en ausencia de OTA, muestran que no fue posible lograr la hibridación de oligonucleótidos en este caso (ver figura 27). Esto también se pudo apreciar visualmente al lavar la microplaca, pues en ningún caso se apreció la adsorción de agregados de AuNEs sobre la placa.

El nulo éxito en el proceso de hibridación de oligonucleótidos puede deberse a que las condiciones óptimas encontradas para los ensayos anteriores no aplican para este caso. Las AuNEs@PEG-SH@HC podrían no ser lo suficientemente estables bajo las condiciones de hibridación encontradas y podría agregar antes de que el proceso ocurra. Al existir agregados estos pudieron haber sido removidos fácilmente con la

primera lavada, lo cual explicaría los valores tan bajos de absorbancias para todos los casos (figura 27a). Además, en el caso anterior, la funcionalización de la microplaca se realizó con la HC, la cual presenta 15 bases nitrogenadas, mientras que en este caso la funcionalización se realizó con el APT, que presenta 36 bases nitrogenadas. Esta diferencia en el número de bases nitrogenadas puede influir en la funcionalización, al haber mayor repulsión entre las cadenas.

Finalmente, en el caso del ensayo con OTA (figura 27b), los valores de absorbancia para todas las pruebas fueron muy bajos y parecidos al ensayo sin OTA. En este caso podría estar ocurriendo que la micotoxina se adhirió a la superficie de la microplaca, de tal manera que podrían no existir espacios libres para que exista una hibridación entre las hebras complementarias de las AuNEs y las cadenas del aptámero de OTA (que no se hayan unido a la toxina) presente en la placa. Sin embargo, es muy probable que, al igual que en el ensayo sin toxina, las AuNEs@PEG-SH@HC no sean estables en las condiciones de hibridación establecidas y por tanto formen agregados, que se puedan estar removiendo tras la primera lavada.



## 6. Conclusiones y recomendaciones

### 6.1 Conclusiones

- Se sintetizaron nanoesferas de oro de aproximadamente  $29 \pm 2$  nm de diámetro mediante el método de nucleación y crecimiento reportado por Bastús y adaptado por Hernández, además se realizó la caracterización de las nanoesferas por espectroscopía UV-Vis y por microscopía electrónica de transmisión.
- Se logró modificar la superficie de las AuNEs sintetizadas con dos oligonucleótidos tiolados: el aptámero de OTA (APT: 36 bases nitrogenadas) y la hebra complementaria al aptámero de OTA (HC: 15 bases nitrogenadas), encontrando las condiciones óptimas para el procedimiento.
- A partir del análisis de los valores de absorbancia a 521 nm de longitud de onda se evaluó el efecto de la concentración de hebra complementaria, la temperatura y la adición de un agente de relleno en el proceso de modificación superficial de microplacas. De la misma manera, se evaluó el efecto de la concentración de las AuNEs@PEG-SH@APT, la concentración de NaCl, la temperatura, la adición de un agente de relleno y el doble recubrimiento con PEG-SH para las pruebas control, en el proceso de hibridación de oligonucleótidos. Las condiciones óptimas del ensayo consideran: 2  $\mu$ M de hebra complementaria, 29°C y la adición de 22  $\mu$ L de ETG (dilución 5:10<sup>6</sup>v/v) para la modificación de microplacas; así como 1,5 nM de AuNEs@PEG-SH@APT, 0,1 M de NaCl, 29°C y el uso de AuNEs@PEG-SH\_2 como prueba control, para la hibridación de oligonucleótidos. Los valores de absorbancia para las pruebas con AuNEs@OLIG están en el rango de 0,27-0,31 y los valores de absorbancia para las pruebas control están en el rango de 0,04-0,05.
- Se logró discriminar la presencia y ausencia de una solución estándar de OTA (336 ppb) empleando las microplacas modificadas con oligonucleótidos y AuNEs@PEG-SH@APT. Las pruebas realizadas con la hebra del aptámero unida a la microplaca no permitió este tipo de discriminación.

## 6.2 Recomendaciones

- El tiempo de hibridación es un parámetro que no se ha estudiado en profundidad, se recomienda evaluar este parámetro para seguir optimizando el sistema de detección propuesto, con el propósito de que pueda presentarse como un método rápido en comparación a las técnicas convencionales de detección para OTA.
- Se recomienda la caracterización de las microplacas por otras técnicas como el análisis por fluorescencia, después del proceso de modificación con el oligonucleótido complementario, con el objetivo de determinar cuan eficaz es el procedimiento.
- Dado que no se logró determinar la hibridación de oligonucleótidos en el sistema de AuNEs modificadas con la hebra complementaria y la microplaca funcionalizada con el aptámero de OTA, se recomienda evaluar los parámetros que permitan establecer una óptima hibridación de oligonucleótidos para el ensayo en ausencia de OTA.
- Se recomienda continuar con el estudio de detección de OTA en el sistema planteado (AuNEs modificadas con el aptámero de OTA y microplaca funcionalizada con el oligonucleótido complementario), de tal manera que se evalué la detección de diferentes estándares de OTA y se encuentren los parámetros óptimos que permitan determinar los límites de detección y cuantificación, los rangos lineales, la selectividad del sistema de detección desarrollado, y el efecto de la matriz a evaluar en el ensayo.
- El desarrollo de este sistema de detección podría ser útil para detectar otras micotoxinas recurrentes en productos agroindustriales (p. ej. Aflatoxina B1 y Fumonisina B1) u otras sustancias de interés en la industria de alimentos, por lo que se recomienda continuar con el estudio del sistema desarrollado.

## 7. Referencias bibliográficas

1. Turner, N. W., Subrahmanyam, S., Piletsky, S. A. Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. *Anal. Chim. Acta* **632**, 168–180 (2009).
2. Marin, S., Ramos, A. J., Cano-Sancho, G., Sanchis, V. Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food Chem. Toxicol.* **60**, 218–237 (2013).
3. Nielsen, K. F., Ngemela, A. F., Jensen, L. B., De Medeiros, L. S., Rasmussen, P. H. UHPLC-MS/MS determination of ochratoxin a and fumonisins in coffee using QuEChERS extraction combined with mixed-mode SPE purification. *J. Agric. Food Chem.* **63**, 1029–1034 (2015).
4. Arroyo-Manzanares, N., Huertas-Pérez, J. F., García-Campaña, A. M., Gámiz-Gracia, L. Simple methodology for the determination of mycotoxins in pseudocereals, spelt and rice. *Food Control* **36**, 94–101 (2014).
5. Wu, S., Duan, N., Zhu, C., Ma, X., Wang, M., Wang, Z. Magnetic nanobead-based immunoassay for the simultaneous detection of aflatoxin B 1 and ochratoxin A using upconversion nanoparticles as multicolor labels. *Biosens. Bioelectron.* **30**, 35–42 (2011).
6. Saha, K., Agasti, S. S., Kim, C., Li, X., Rotello, V. M. Gold Nanoparticles in Chemical and Biological Sensing. *Chem. Rev.* **112**, 2739–2779 (2012).
7. Farahi, R. H., Passian, A., Tetard, L., Thundat, T. Critical issues in sensor science to aid food and water safety. *ACS Nano* **6**, 4548–4556 (2012).
8. Halas, N. J., Lal, S., Chang, W.S., Link, S., Nordlander, P. Plasmons in Strongly Coupled Metallic Nanostructures. *Chem. Rev.* **111**, 3913–3961 (2011).
9. Zhao, J., Zhang, X., Yonzon, C. R., Hoes, A. J., Van Duyne, R. P. Localized surface plasmon resonance biosensors. *Nanomedicine* **1**, 219–228 (2006).
10. Hernández, Y., Lagos, L. K., Galarreta, B. C. Development of a label-free-SERS gold nanoaptasensor for the accessible determination of ochratoxin A. *Sens. Bio-Sensing Res.* **28**, 100331 (2020).
11. Galarreta, B. C., Tabatabaei, M., Guieu, V., Peyrin, E., Lagugné-Labarthe, F. Microfluidic channel with embedded SERS 2D platform for the aptamer detection of ochratoxin A. *Anal. Bioanal. Chem.* **405**, 1613–1621 (2013).
12. Guo, X., Wen, F., Zheng, N., Luo, Q., Wang, H., Li, S., Wang, J. Development of an ultrasensitive aptasensor for the detection of aflatoxin B1. *Biosens. Bioelectron.* **56**, 340–344 (2014).
13. Bunka, D. H. J., Stockley, P. G. Aptamers come of age - At last. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**, 588–596 (2006).

14. World Health Organization. Mycotoxins (2008) Recuperado de: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/mycotoxins>
15. Zinedine, A., Mañes, J. Occurrence and legislation of mycotoxins in food and feed from Morocco. *Food Control* **20**, 334–344 (2009).
16. Bennett, J. W., Klich, M. Mycotoxins. *Society* **16**, 497–516 (2003).
17. SENASA. Residuos químicos y otros contaminantes en alimentos agropecuarios primarios. *Plant J* **45**, 1–132 (2013).
18. Yuan, J., Deng, D., Lauren, D. R., Aguilar, M. I., Wu, Y. Surface plasmon resonance biosensor for the detection of ochratoxin A in cereals and beverages. *Anal. Chim. Acta* **656**, 63–71 (2009).
19. Ha, T. H. Recent advances for the detection of ochratoxin A. *Toxins (Basel)*. **7**, 5276–5300 (2015).
20. Zheng, M. Z., Richard, J. L., Binder, J. A review of rapid methods for the analysis of mycotoxins. *Mycopathologia* **161**, 261–273 (2006).
21. Barthelmebs, L., Jonca, J., Hayat, A., Prieto-Simon, B., Marty, J. L. Enzyme-Linked Aptamer Assays (ELAAs), based on a competition format for a rapid and sensitive detection of Ochratoxin A in wine. *Food Control* **22**, 737–743 (2011).
22. Wei, M., Zhang, W. The determination of Ochratoxin A based on the electrochemical aptasensor by carbon aerogels and methylene blue assisted signal amplification. *Chem. Cent. J.* **12**, 1–8 (2018).
23. Yang, C., Wang, Y., Marty, J. L., Yang, X. Aptamer-based colorimetric biosensing of Ochratoxin A using unmodified gold nanoparticles indicator. *Biosens. Bioelectron.* **26**, 2724–2727 (2011).
24. Anker, J. N.; Hall, W. P.; Lyandres, O.; Shah, N. C.; Zhao, J.; Van Duyne, R. P. Biosensing with plasmonic nanosensors. *Nature Materials*. **7** (6), 442-453. (2008)
25. Costantini, F., Sberna, C., Petrucci, G., Reverberi, M., Domenici, F., Fanelli, C., Manetti, C., De Cesare, G., De Rosa, M., Nascetti, A., Caputo, D. Aptamer-based sandwich assay for on chip detection of Ochratoxin A by an array of amorphous silicon photosensors. *Sensors Actuators, B Chem.* **230**, 31–39 (2016).
26. Doria, G., Conde, J., Veigas, B., Giestas, L., Almeida, C., Assuncao, M., Rosa, J., Baptista, P. V. Noble metal nanoparticles for biosensing applications. *Sensors* **12**, 1657–1687 (2012).
27. Li, F., Zhang, H., Wang, Z., Newbigging, A. M., Reid, M. S., Li, X., Le, X.C. Aptamers facilitating amplified detection of biomolecules. *Anal. Chem.* **87**, 274–292 (2015).

28. Vajtai, R. *Springer handbook of nanomaterials*. 9: 304-367 (2013).
29. Lee, K. S., El-Sayed, M. A. Gold and silver nanoparticles in sensing and imaging: Sensitivity of plasmon response to size, shape, and metal composition. *J. Phys. Chem. B* **110**, 19220–19225 (2006).
30. Peng, H. I., Miller, B. L. Recent advancements in optical DNA biosensors: Exploiting the plasmonic effects of metal nanoparticles. *Analyst* **136**, 436–447 (2011).
31. Hernández García, Y., Sifuentes, J. R., Saldaña, A. S., Galarreta, B. C. Estudio de los factores determinantes para el desarrollo de sensores SERS efectivos y económicos. *Tecnia* **28**, (2018).
32. Her, S., Jaffray, D. A., Allen, C. Gold nanoparticles for applications in cancer radiotherapy: Mechanisms and recent advancements. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **109**, 84–101 (2017).
33. Bastús, N. G., Comenge, J., Puentes, V. Kinetically controlled seeded growth synthesis of citrate-stabilized gold nanoparticles of up to 200 nm: Size focusing versus ostwald ripening. *Langmuir* **27**, 11098–11105 (2011).
34. Turkevich, J., Stevenson, P. C., Hillier, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discuss. Faraday Soc.* **11**, 55–75 (1951).
35. Frens, G. Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions. *Nature Physical Science*. **241** (105), 20–22. (1973).
36. Johnston, R. L. *Metal nanoparticles and nanoalloys*. *Frontiers of Nanoscience* **3**, (Elsevier Ltd, 2012).
37. Haiss, W., Thanh, N. T. K., Aveyard, J., Fernig, D. G. Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-Vis spectra. *Anal. Chem.* **79**, 4215–4221 (2007).
38. Zeng, S., Yong, K., Roy, I., Dinh, X., Yu, X., Luan, F. A Review on Functionalized Gold Nanoparticles for Biosensing Applications. *Plasmonics* **6**, 491–506 (2011).
39. Priyadarshini, E., Pradhan, N. Gold nanoparticles as efficient sensors in colorimetric detection of toxic metal ions: A review. *Sensors Actuators, B Chem.* **238**, 888–902 (2017).
40. Hernández, Y., Coello, Y., Fratila, R. M., De la Fuente, J. M., Lionberger, T. A. Highly sensitive ratiometric quantification of cyanide in water with gold nanoparticles via Resonance Rayleigh Scattering. *Talanta* **167**, 51–58 (2017).

41. Sanz, V., Conde, J., Hernández, Y., Baptista, P. V., Ibarra, M. R., De la Fuente, J. M Effect of PEG biofunctional spacers and TAT peptide on dsRNA loading on gold nanoparticles. *J. Nanoparticle Res.* **14**, (2012).
42. Sperling R. A., Rivera P., Zhang F., Zanella M., Parak, W. Biological applications of gold nanoparticles. *Chem. Soc. Rev.* **37**, 1896–1908 (2008).
43. Kommareddy, S., Tiwari, S. B., Amiji, M. M. Long-circulating polymeric nanovectors for tumor-selective gene delivery. *Technol. Cancer Res. Treat.* **4**, 615–625 (2005).
44. Yang, X., Wang, X., Zhu, H., Xu, X. Noble metal nanoparticles in bioanalysis. *ACS Symp. Ser.* **1112**, 241–279 (2012).
45. Hurst, S. J., Lytton-Jean, A. K. R., Mirkin, C. A. Maximizing DNA loading on a range of gold nanoparticle sizes. *Anal. Chem.* **78**, 8313–8318 (2006).
46. Stoeva, S. I., Lee, J. S., Thaxton, C. S., Mirkin, C. A. Multiplexed DNA detection with biobarcode nanoparticle probes. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **45**, 3303–3306 (2006).
47. Cruz-Aguado, J. A., Penner, G. Fluorescence polarization based displacement assay for the determination of small molecules with aptamers. *Anal. Chem.* **80**, 8853–8855 (2008).
48. Wang, B., Chen, Y., Wu, Y., Weng, B., Liu, Y., Lu, Z., Li, C., Yu, C. Aptamer induced assembly of fluorescent nitrogen-doped carbon dots on gold nanoparticles for sensitive detection of AFB 1. *Biosens. Bioelectron.* **78**, 23–30 (2016).
49. Luan, Y., Chen, J., Xie, G., Li, C., Ping, H., Ma, Z., Lu, A. Visual and microplate detection of aflatoxin B2 based on NaCl-induced aggregation of aptamer-modified gold nanoparticles. *Microchim. Acta* **182**, 995–1001 (2015).
50. Storhoff, J. J., Elghanian, R., Mucic, R. C., Mirkin, C. A., Letsinger, R. L. One-pot colorimetric differentiation of polynucleotides with single base imperfections using gold nanoparticle probes. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 1959–1964 (1998).
51. Mikkelsen, S. R., Cortón, E. *Bioanalytical Chemistry*. **1**: 16-17 (Wiley,2016).
52. Crowther, J. R. *The ELISA guidebook*. **3**: 45-48, (Humana Press Inc, 2001.)
53. Gibbs, J., Vessels, M., Rothenberg, M., Ph, D. Immobilization Principles – Selecting the Surface for ELISA Assays Application Note. 1–6 (2001).
54. Thermo Scientific™. Thermo Scientific™ Immunoassay Plate Guide The right surface for your assay (2018).
55. Thermo Fisher Scientific™. An introduction to solid phase techniques. 176 (2011).
56. Andersen, T., Thermo Fisher Scientific™, Roskilde, Denmark. Thermo Scientific™ Nunc® Immobilizer Amino Instruction protocol. (2012).

57. Mirkin, C. A., Letsinger R. L., Mucic R.C., Storhoff J.J. A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials. *Nature*, 382(6592), 607–609 (1996).

