

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CORDOBA

Facultad de Ciencias Químicas

Departamento de Físicoquímica

**Determinación ultrasensible de gluten en alimentos aptos para celíacos mediante inmunoensayos utilizando nanopartículas de metales nobles**

**Tesis presentada para optar por el título de  
Magister en Ciencia y Tecnología de los Alimentos**

**Mercadal Pablo Agustín**

Director de Tesis: Prof. Dr. Eduardo A. Coronado

Córdoba, 2017



***“Somos lo que hacemos repetidamente. La excelencia entonces, no es un acto sino un hábito.”***

***Aristóteles.***

## Agradecimientos

Dedico mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado en la realización del presente trabajo, en especial a mi mamá Norma por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor. A mi papá Miguel por los ejemplos de perseverancia y constancia que lo caracterizan y que me ha infundado siempre, por el valor mostrado para salir adelante y por su amor. A mi hermana Carolina por ser el ejemplo de una hermana menor y de la cual aprendí que la felicidad está en los pequeños momentos que nos brinda la vida.

Al Dr. Eduardo Coronado director de esta investigación, por la orientación, el seguimiento y supervisión continua de la misma, pero por sobre todo por siempre confiar en mí, motivarme y apoyarme a lo largo de este tiempo. Al Dr. Rubén Motrich por colaborar con este proyecto de manera desinteresada y brindarme un espacio de trabajo confortable. También me gustaría agradecer la ayuda recibida durante esta tesis y por todos los momentos compartidos a mis compañeros de trabajo (Chino, Nico, Juan, Francesca, Luis y Facundo). A mis amigos de la vida por confiar, creer en mí y haber hecho de esta etapa un trayecto de vivencias que nunca olvidare (Consu, Nico, Maciel, Ana, Celeste, Mariela, Nadia, Soledad, Nelia). También quiero agradecer a todas las personas que integran el Departamento de Físicoquímica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Córdoba no solo por haberme brindado el espacio físico para llevar a cabo este trabajo, sino también por recibirme con los brazos abiertos haciéndome sentir parte de la institución.

A todos ellos muchas gracias.

**Lugar de trabajo:** Departamento de Fisicoquímica de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba (UNC),

**Director:**

Prof. Dr. Eduardo Andrés Coronado.

**Comisión de Tesis:**

Prof. Dr. Daniel García.

Prof. Dra. Cinthia Stempin.

**Evaluador Externo:**

Prof. Dr. Ismael Darío Bianco.

## Abreviaturas y Símbolos

1.  $\sigma_{abs}$ : Sección eficaz de absorción
2.  $\sigma_{ext}$ : Sección eficaz de extinción
3.  $\sigma_{scat}$ : Sección eficaz de dispersión
4.  $\epsilon_0$ : Permitividad del vacío
5.  $\epsilon$ : Constante dieléctrica
6.  $\alpha$ : Polarizabilidad
7.  $\mu$ : Momento dipolar inducido
8.  $\epsilon_m$ : Constante dieléctrica del medio
9.  $\Re\epsilon$ : Parte real de la constante dieléctrica
10.  $\chi$ : Factor geométrico
11.  $\omega$ : Frecuencia
12.  $\omega_p$ : Frecuencia del plasmón
13.  $\gamma$ : Constante de amortiguamiento
14. Ag NSs: Nanopartículas de plata
15. Biot: Biotina
16.  $\vec{E}$ : Campo eléctrico
17.  $e$ : Carga del electrón
18. ELISA: Ensayo por Inmunoabsorción ligado a enzimas
19. GMM: Teoría de Mie generalizada para múltiples partículas
20.  $\vec{H}$ : Campo magnético

21. I(E): Intensidad de extinción
22. IgG: inmunoglobulina G
23. IgG-Biot: Inmunoglobulina G biotinilada
24. IDILA: Intensity Depletion Immuno Linked Assay
25. LoD: Limite de Detección
26.  $L_{ef}$ : Cuerda media
27.  $m$ : Masa efectiva
28. NE: Nanoestructura
29. NEs: Nanoestructuras
30. NP: Nanopartícula
31. NPs: Nanopartículas
32. PBS: Buffer fosfato salino
33.  $Q_{ext}$ : Eficiencia de extinción
34. SERS: Espectroscopia Raman Incrementada por Superficie
35. STV: Estreptavidina
36.  $S$ : Superficie externa de la nanopartícula
37. RPS: Resonancia Plasmónica Superficial.
38. LSPR: Resonancia Plasmónica Superficial Localizada.
39.  $V$ : volumen
40.  $v_F$ : Velocidad de Fermi
41. TEM: Microscopia electrónica de transmisión

# Listado de gráficos.

## 1.1 Introducción.

**Figura I1:** Diferentes estrategias para generar nano-biosensores de campo cercano y campo lejano. A) Nano-biosensor plasmónico de campo cercano utilizando los incrementos de procesos inelásticos de moléculas activas en Raman (SERS). B) Nano-biosensor plasmónico de campo lejano utilizando los cambios en el índice de refracción de NEs plasmónicas al adsorberse moléculas de analíto. C) Esquema de la técnica bioquímica ELISA de tipo sándwich.

**Figura I2:** A). Representación esquemática de la estrategia de funcionalización de nanopartículas con el sistema de estreptavidina (STV) biotina (arriba), y la evolución del espectro de extinción de nanopartículas de Ag funcionalizadas con el sistema STV-biotina usando un NPs / STV / biotina 1: 1: 1. B), Representación esquemática de la estrategia de la aglomeración de nanopartículas controlada (formación de dímeros) en presencia de un anticuerpo biotinilado (Biot-IgG), y la evolución del espectro de extinción de nanopartículas de Ag funcionalizadas en presencia de Biot-IgG.

## Capítulo 1 “introducción al sistema de estudio”

### 1.1 Introducción

**Figura1.1:** Representación esquemática de una onda plana con su componente magnética, eléctrica y dirección de propagación.

**Figura 1.2:** Ilustración simplificada de una resonancia plasmónica superficial localizada para una nanoesfera metálica.

**Figura 1.3:** Dependencia de la parte real ( $\epsilon'$ ) y de la parte imaginaria ( $\epsilon''$ ) de la constante dieléctrica con la longitud de onda ( $\lambda$ ) para Au. Los valores corresponden a determinaciones experimentales tabulados por Palik<sup>3</sup>. En azul y verde se han graficado los valores obtenidos mediante la teoría de Drude.

## 1.2 Modelado para partículas con dimensiones menores a la longitud de onda incidente.

**Figura 1.4:** Esquema de la dependencia de la posición espectral de la LSPR con la forma de la NP (esferas y esferoides) para una partícula de Ag.

**Figura 1.5:** Representación del cambio en la posición del máximo espectral de la LSPR para nanoestrellas de Ag sin modificar (línea azul) y para nanoestrellas de Ag modificadas con 1-Hexadecantol (línea roja).

## 1.3 Modelado para partículas con dimensiones mayores el limite cuasiestático.

**Figura 1.6:** Esquema de la dependencia con el tamaño de la posición espectral si el ancho de la LSPR para esferas de Ag de distinto tamaño. A medida que el radio aumenta, se produce un corrimiento hacia mayores longitudes de onda y un aumento del ancho a la media altura de la LSPR, para nanopartículas esféricas de Ag.

**Figura 1.7:** Contribución de la eficiencia de absorción y dispersión a la extinción (Q) para NP esféricas de plata a distintos diámetro en el vacío. A. 10nm. B 50nm.C 100nm. Q es la relación entre la sección eficaz y la sección eficaz geométrica del área de la NP proyectada.

## 1.4 Interacción nanopartícula-nanopartícula (acoplamiento plasmónico)

**Figura 1.8:** Cálculos electrodinámicos para dímeros de NPs. A) espectros de extinción de dímeros de Ag NSs de 60 nm en vacío a diferentes valores de  $\sigma$ . B) Comportamiento del incremento de campo eléctrico ( $\frac{E}{E_0}$ ) para dímeros de NPs de Au de 20 nm en función  $\sigma$  a) 1, b) 2, c) 10 y d) 20 nm. El medio dieléctrico considerado en el cálculo es agua.

## 1.5 Aplicaciones de las propiedades de las Resonancias Plasmonicas Superficiales Localizadas.

**Figura 1.9:** Representación de las propiedades de campo cercano A. campo eléctrico incrementado en la cercanía de la superficie de una NP aislada. B Campo eléctrico altamente incrementado y localizado en la región interparticula para NE dimericas.

**Figura 1.10:** Representación esquemática de A. Espectro Raman y SERS de la biotina utilizando nanoagregados de Ag de 56 nm para una concentración  $7.6 \times 10^{-12}$  M de biotina, irradiando a  $\lambda=488$  nm. Se encuentran remarcadas en la figura las dos señales de Stokes utilizadas para calcular los

factores de incremento (525 y 519 nm) B. Espectro de absorción y cambio de color de nanopartículas de oro funcionalizadas con cysteina en ausencia de trifosgeno (a) y en presencia de 40 mM de trifosgeno (b). El espectro (c) fue obtenido midiendo la absorbancia del espectro b descontando la absorbancia del espectro a (el blanco de reactivo correspondiente)

## **Capítulo 2 “Materiales y Métodos”**

### **2.3 Funcionalización de las nanopartículas.**

**Figura 2.1:** A. Representación de una molécula de Biotina HPDP, Biotina (SH) y una Piridin 2-tiona. B Representación de la funcionalización de la NP con Biotina (SH) y Piridin-2-tiona.

**Figura 2.2:** Representación de la interacción de Ag NSs-Biotina-estreptaivina con una relación molar 1:1:1.

### **2.5 Técnicas Microscópicas:**

#### **2.5.1 Microscopia electrónica de transmisión (TEM):**

**Figura 2.3:** Representación de las diferentes señales generadas cuando un haz de electrones interactúa con la muestra.

### **2.6 Técnicas Ópticas.**

#### **2.6.2 Espectroscopia FT-IR ATR (Espectroscopía Infrarroja medida por transformada de Fourier con reflectancia total atenuada).**

**Figura 2.4:** Representación de la reflexión del haz de luz IR en un sistema ATR.

### **2.7 Inmunoensayos.**

#### **2.7.1 ELISA (Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas)**

**Figura 2.5:** Esquema simplificado de la técnica ELISA tipo “Sandwich”.

## **Capítulo 3 “Diseño de un biosensor de nanoesferas de plata (IDILA) aplicado para la detección y cuantificación de gliadina”**

### **3.2 Resultados y Discusión.**

#### **3.2.1 Síntesis y caracterización morfológica-óptica de nanopartículas de Ag**

**Figura 3.1:** A. Imagen representativa de las NPs de Ag fabricadas. B Histograma de la polidispersión de NPs de Ag sintetizadas por el método de Turkevich. El diámetro promedio de las NPs de Ag es de  $58 \pm 7$  nm.

**Figura 3.2:** a. Espectro experimental y simulación electrodinámica mediante la teoría de Mie para nanopartículas de plata con un promedio de 58 nm de diámetro. b. Imagen TEM de una nanoesfera de plata de 58nm.

### 3.2.2 Funcionalización de nanopartículas de Ag

**Figura 3.3:** Estabilidad en función del tiempo de 1 mL de solución coloidal de Ag NSs de 58 nm con una concentración de  $9.03 \times 10^{-11}$  M funcionalizadas con STV-Biot en relación molar 1:1:1

**Figura 3.4:** Variación de la intensidad de extinción de Ag NSs a una longitud de onda de 450 nm en un lector de microplacas en función de las diferentes concentraciones de IgG-Biot agregadas, al cabo de 20 minutos de transcurrida la reacción.

**Figura 3.5:** A. Evolución espectral de 0.5mL de Ag NSs previamente funcionalizadas en presencia de 1 ng/mL de IgG-Biot anti gliadina. B. Evolucion espectral de 0.5mL de Ag NSs previamente funcionalizadas en presencia de 3 ng/mL de IgG-Biot anti gliadina.

### 3.2.4 Caracterización morfológica y óptica de las estructuras diméricas.

**Figura 3.6** Imagen TEM representativa de las nanoestructuras formadas luego de 30 minutos del agregado de 1 ng/mL IgG-Biot anti gliadina a la dispersión coloidal de Ag NSs. Nótese el predominio de de estructuras dimericas frente a otros tipos de nanoestructuras (NSs aisladas, trímeros o aglomerados de mayor número de Ag NSs).

**Figura 3.7:** A. Imagen TEM de los dímeros de Ag NSs formados luego de 30 minutos del agregado de 1 ng/mL IgG-Biot anti gliadina. B. Esquema de la distancia interpartícula estimada para el puente molecular que une las Ag NSs formado por el “sándwich” Biotina – STV – Biot-IgG – STV – Biotina.

**Figura 3.8:** Espectro de la distribución de intensidad en función del diámetro de las NPs. La distribución con símbolos en negro representa las Ag NSs antes del agregado del anticuerpo mientras que la distribución con símbolos azules corresponde a la obtenida a los 27 minutos del agregado de 1 ng/mL de IgG-Biot a las NPs de Ag.

### 3.2.5 Comparación entre los experimentos y las simulaciones teóricas.

**Figura 3.9:** A. Modelado teórico utilizando la teoría de Mie y teoría de Mie generalizada para múltiples partículas de la sección eficaz de 1 monómero (línea negra), 2 monómeros (línea azul) y 1 dímero con polarización promediada (línea roja), para explicar el fenómeno de la disminución de la intensidad de extinción cuando se forman estructuras diméricas. B. Simulación teórica en función de la extinción de Ag NSs y dímeros comparada con los espectros experimentales obtenidos teniendo en cuenta un 90% de NEs diméricas y un 10% de monómeros.

### 3.2.6 Inhibición de la formación de dímeros en presencia del antígeno específico para gliadina.

**Figura 3.10:** A Evolución espectral para un tiempo de 27 minutos de Ag NSs de 58 nm previamente funcionalizadas con STV-Biot con el agregado de 1 ng/mL de IgG-Biot y sin añadir antígeno. B Evolución espectral para un tiempo de 27 minutos de Ag NSs de 58 nm previamente funcionalizadas con STV-Biot con el agregado de 5 pg/mL de antígeno y 1ng/mL de IgG-Biot. C. Evolución espectral para un tiempo de 27 minutos de Ag NSs de 58 nm previamente funcionalizadas con STV-Biot con el agregado de 15 pg/mL de antígeno y 1ng/mL de IgG-Biot.

### 3.3Análisis de muestras problema.

#### 3.3.1Estabilidad de las NPs de Ag y corroboración de la extracción de gliadina.

**Figura 4.0:** Espectro Uv-Vis que muestra la estabilidad de Ag NSs en presencia de una solución de alcohol al 60%. Se utilizó un volumen de 0.5ml de partículas 0.4 ml de PBS1X-BSA5% y 0.1 ml de alcohol en una cubeta de plástico.

**Figura 4.1:** A Western Blot con anticuerpos específicos para gliadina, la primera columna es el marcador de peso molecular (rango de KDa de gliadina 30-50), la segunda columna representa el contenido extraído de gliadina para harina de trigo, la tercera para Avena y la cuarta para Harina de maíz, el contenido de Almidón de maíz es tan bajo que por medio de esta técnica no ha podido ser revelado. B. Espectro FT-IR ATR para harina de trigo, de maíz, avena y almidón de maíz donde se encuentran diferenciadas las bandas amida 1° ( $1650\text{ cm}^{-1}$ ), 2° ( $1550\text{ cm}^{-1}$ ), 3° ( $1450\text{ cm}^{-1}$ ) correspondiente a estructuras proteicas y la banda del almidón ( $1050\text{ cm}^{-1}$ ).

### 3.3.2 Ensayo ELISA tipo Sándwich

**Figura 4.2:** Curva de calibración del ensayo ELISA realizado para muestras de almidón de maíz y harina de maíz. Con un LoD de 1.82 ng/mL, se observa que los valores detectados para almidón de maíz están por debajo del LoD y la cantidad hallada para harina de maíz es de  $2,2 \pm 0,1$  ng/mL.

### 3.3.3 ENSAYO IDILA

**Figura 4.4:** A. Representación esquemática de la estrategia de funcionalización de las Ag NSs con el sistema STV-Biot. B Representación esquemática del procedimiento de la técnica IDILA. Añadiendo las NSs funcionalizadas en un microplato de 96 wells conjuntamente con el anticuerpo biotinilado (IgG-Biot), y el antígeno o la muestra real. Para la obtención de la curva de calibración se modifica la concentración de antígeno agregado mientras la cantidad de NSs y IgG-Biot se mantienen constantes. En todos los casos el volumen final de la solución se ajusta con búfer hasta llegar a los 200  $\mu$ L.

**Figura 4.5:** A. Curva de calibración experimental de IDILA para antígeno de gliadina en presencia de 1 ng/mL de anticuerpo específico para gliadina. B. Ajuste lineal de la porción de la curva comprendida entre 0-8 pg/mL de antígeno de la curva experimental y resultados experimentales en muestras reales de harina de maíz y maicena.

## Conclusiones Generales

**Figura 5.0:** Comparación del procedimiento de los métodos ELISA e IDILA.

## Listado de Tablas

### Capítulo 3 “Diseño de un biosensor de nanoesferas de plata (IDILA) aplicado para la detección y cuantificación de gliadina”

#### 3.3 Análisis de muestras problema.

##### 3.3.2 Ensayo ELISA tipo Sándwich

**Tabla 4.3:** Resultados obtenidos por ensayo ELISA tipo Sándwich específico para gliadina en muestras de maicena y harina de maíz.

##### 3.3.3 ENSAYO IDILA

**Tabla 4.6** Resultados obtenidos para el ensayo IDILA específico para gliadina en muestras de maicena y harina de maíz.

##### 3.3.4 Comparación entre IDILA VS ELISA

**Tabla 4.7:** Comparación de los resultados obtenidos para IDILA (usando 1 ng/mL de anticuerpo específico de gliadina) y ELISA. Para la muestra de harina de maíz hay una gran concordancia entre los valores obtenidos entre ELISA e IDILA. Para la muestra de polenta ELISA no es capaz de detectar la presencia del antígeno mientras que IDILA cuantifica una concentración de  $2 \pm 0.5$  pg/mL (usando el factor de dilución correspondiente, da una concentración de  $0.1 \pm 0.08$  mg / Kg ).

**Tabla 4.8:** Parámetros analíticos de IDILA vs ELISA.

# Resumen

El presente trabajo de tesis tiene como objetivo extender y analizar la utilidad de una metodología analítica para la detección de antígenos mediante técnicas ópticas desarrollada por el grupo de Investigación de Nano Plasmónica del INFIQC (Instituto de investigaciones en Físicoquímica Córdoba – CONICET). Esta metodología que originalmente se utilizó en el área de las Ciencias de la Salud para la detección de citoquinas en cantidades sub-picomolares, se aplicara al campo de la Ciencia y Tecnología de Alimentos, aplicándola específicamente a la detección de gliadina. Esta nueva técnica denominada DILA (Intensity Depletion Inmu Linked Assay) se basa en combinar las propiedades ópticas de una dispersión coloidal de nanoesferas de plata funcionalizadas previamente con estreptavidina y biotina en relación molar (1:1:1) con la capacidad de bioreconocimiento específico del anticuerpo (Inmunoglobulina G biotinilada) para un determinado antígeno. En una primera etapa se induce la aglomeración controlada de nanoesferas de plata (formación de dímeros de nanoesferas de plata en presencia de una inmunoglobulina G biotinilada que actúa como puente molecular entre las nanoesferas de plata que previamente han sido funcionalizadas con estreptavidina-biotina). La formación de estructuras diméricas se evidencia espectralmente por una disminución en la intensidad del espectro de extinción. Una vez seleccionada la concentración óptima de Inmunoglobulina G biotinilada para favorecer la mayor formación de dímeros, en una segunda etapa, se efectúa el mismo experimento en presencia de un antígeno el cual inhibe la formación de estructuras diméricas lo que se traduce espectralmente en una menor disminución de la intensidad de extinción que depende de la concentración de antígeno utilizada. Este hecho permite construir una curva de calibración y cuantificar específicamente el analito (antígeno a cuantificar).

En este trabajo de tesis de maestría se aplicó esta técnica para la detección de gliadina en distintas muestras de alimentos.

Los experimentos se realizaron en muestras de almidón de maíz y harina de maíz comparando los resultados obtenidos con la técnica ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) homologada por el Código Alimentario Argentino para la detección de gluten en alimentos. Los resultados obtenidos utilizando IDILA concuerdan con la cuantificación utilizando la técnica homologada ELISA. Sin embargo, se demuestra que IDILA presenta una sensibilidad considerablemente mayor que ELISA, permitiendo la detección ultrasensible y específica de gliadina en muestras con baja concentración de gliadina que la técnica ELISA no logra cuantificar, alcanzándose límites de detección 10000 veces mayores.

Por otra parte destacamos la robustez de la técnica, su mayor rapidez (aproximadamente 2 horas) y menor costo (debido al uso de reactivos en menores cantidades) comparada con ELISA, su potencial aplicación a la detección de cualquier antígeno de relevancia en Ciencia y tecnología de los Alimentos como así también su fácil implementación para análisis de rutina en laboratorios, ya que utiliza el mismo instrumental que la técnica ELISA.

# Índice

Abreviaturas y Símbolos	I
Listado de gráficos	III
Listado de Tablas	IX
Resumen	X
Introducción	4
Referencias	12
<b>Capítulo 1 “Introducción al Sistema de Estudio”</b>	<b>15</b>
1.1 Introducción	15
1.2 Modelado para partículas con dimensiones menores a la longitud de onda incidente.	21
1.3 Modelado para partículas con dimensiones mayores el limite cuasiestático	25
1.4 Interacción entre nanopartículas (acoplamiento plasmónico)	29
1.5 Aplicaciones de las propiedades de las resonancias plasmónicas superficiales localizadas.	34
Referencias	37
<b>Capitulo 2 “Materiales y Métodos”</b>	<b>40</b>
2.1 Reactivos	41
2.2 Síntesis de nanopartículas de Ag	42
2.3 Funcionalización de las nanopartículas.	43

2.4 Extracción de gliadina de las muestras problema.	46
2.5 Técnicas Microscópicas	47
2.5.1 Microscopia electrónica de transmisión (TEM)	47
2.6 Técnicas Ópticas.	49
2.6.1 <i>Espectroscopia de absorción UV-Visible.</i>	49
2.6.2 <i>Espectroscopia FT-IR ATR (Espectroscopia Infrarroja medida por transformada de Fourier con reflectancia total atenuada).</i>	50
2.6.3 <i>Dispersión de Luz Dinámica (DLS)</i>	51
2.7 Inmunoensayos.	52
2.7.1 <i>ELISA (Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas)</i>	52
2.7.2 <i>Western Blot</i>	54
2.8 Métodos Computacionales	55
2.8.1 <i>Interacción de la radiación con esferas: Teoría de Gustav Mie</i>	55
2.8.2 <i>Teoría de Mie Generalizada para Múltiples Partículas (GMM)</i>	59
Referencias	65
<b>Capítulo 3 “Diseño de un biosensor de nanoesferas de plata (IDILA) aplicado para la detección y cuantificación de gliadina.”</b>	<b>67</b>
3.1 Introducción	67
3.2 Resultados y Discusión.	70
3.2.1 <i>Síntesis y caracterización morfológica-óptica de nanopartículas de Ag</i>	70
3.2.2 <i>Funcionalización de nanopartículas de Ag</i>	72

3.2.3 <i>Formación de dímeros de Ag</i>	73
3.2.4 <i>Caracterización morfológica y óptica de las estructuras diméricas.</i>	76
3.2.5 <i>Comparación entre los experimentos y las simulaciones teóricas.</i>	79
3.2.6 <i>Inhibición de la formación de dímeros en presencia del antígeno específico para gliadina.</i>	82
3.3 <i>Análisis de muestras problema.</i>	84
3.3.1 <i>Estabilidad de las NPs de Ag y corroboración de la extracción de gliadina.</i>	84
3.3.2 <i>Ensayo ELISA tipo Sándwich</i>	87
3.3.3 <i>Ensayo IDILA</i>	89
3.3.4 <i>Comparación entre IDILA VS ELISA</i>	92
3.4 <i>Perspectivas de la técnica IDILA</i>	95
Referencias	96
<b>Conclusiones Generales</b>	98

## Introducción

El objetivo general de esta tesis es establecer bases fisicoquímicas y analíticas para la determinación ultrasensible de gluten en alimentos aptos para celíacos mediante inmunoensayos utilizando nanopartículas de plata.

El gluten es un complejo proteico presente en cereales como trigo, avena, cebada y centeno, cuyo uso se masificó debido a su capacidad de retener aire en la matriz proteica, fenómeno que favorece la elaboración del pan. Este complejo está compuesto por gliadina y glutenina.

La celiaquía o enfermedad celíaca (CD, del inglés Celiac Disease) es una enteropatía inmunomediada desencadenada en individuos genéticamente susceptibles a la ingestión de gluten. La prevalencia de la CD ha sido estimada en aproximadamente el 0,5% - 1% de la población, en diferentes partes del mundo. Sin embargo, individuos con diabetes, trastornos autoinmunes o familiares de individuos con CD tienen un riesgo aún mayor para el desarrollo de esta enteropatía. Por lo que llevar a cabo un diagnóstico serológico temprano así como un tratamiento dietético puede prevenir complicaciones severas<sup>1</sup>.

Por lo tanto, es importante desarrollar una metodología que permita detectar el gluten de forma rápida y específica en alimentos que van a ser objeto de consumo por esta porción significativa de la población.

La gliadina es la fracción soluble en alcohol del gluten y contiene la mayor parte de los componentes tóxicos para los celíacos. Sus componentes mayoritarios son los aminoácidos glutamina y prolina, cuya digestión en el tracto gastrointestinal es más difícil que el de otros péptidos<sup>2,3</sup>. El consumo de productos manufacturados conlleva a asumir riesgos potenciales a las personas con

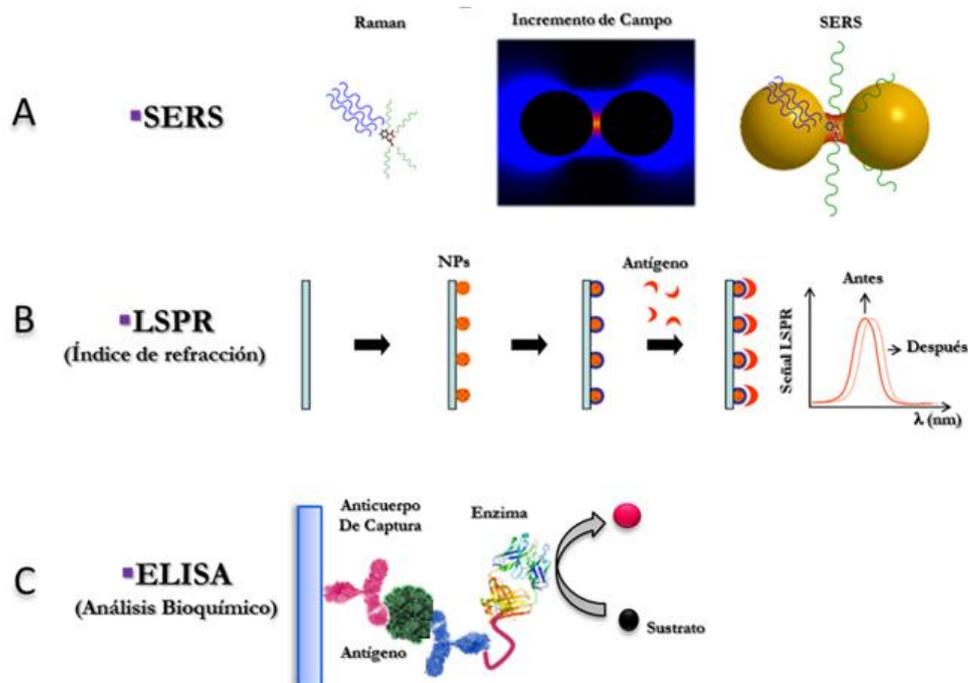
patología celíaca, por lo que es de fundamental importancia conocer el contenido de gluten en diversos productos alimenticios, ya que el mismo puede ser añadido en forma equivocada por contaminación cruzada o bien como ingrediente, aditivo, o por razones tecnológicas del proceso de fabricación. Actualmente el contenido de gluten en un alimento se determina por medio de la técnica ELISA R5 (método de Méndez)<sup>4</sup>, que emplea anticuerpos monoclonales o policlonales frente a una gran variedad de componentes del trigo (extractos, fracciones o péptidos sintéticos de gliadina, presentando un límite de detección de 10 mg/kg equivalente a 0,5 % de gliadina, utilizando relativamente grandes cantidades de reactivos y requiriendo varias etapas que demandan un considerable tiempo.<sup>5-6</sup>

Recientemente los progresos efectuados en la sensibilidad de los transductores ópticos en combinación con la especificidad, afinidad y versatilidad de las interacciones biomoleculares ha impulsado el desarrollo de una amplia variedad de biosensores ópticos con aplicaciones en diversos campos, incluyendo el diagnóstico clínico, la ingeniería biomolecular, el diseño de fármacos, etc.<sup>7</sup> Los nano-biosensores ópticos diseñados utilizando metales nanoestructurados permiten cubrir las necesidades de análisis y de alto rendimiento en el diagnóstico, debido a las propiedades ópticas que surgen de la excitación de las denominadas resonancias plasmónicas superficiales localizadas (LSPR, del inglés Localized Surface Plasmon Resonance). Los incrementos de campos electromagnéticos (campo cercano) creados en los espacios interpartícula (denominados en inglés “hot spots”), que se producen dentro de agregados de nanopartículas (NPs), permiten incrementar en varios órdenes de magnitud la sección eficaz de procesos ópticos inelásticos, dando lugar a sensores de señales Raman incrementados por superficie SERS (del inglés Surface Enhanced Raman Spectroscopy) (Figura I1 A). En el laboratorio de Nanoplasmonica del INFIQC se han efectuado estudios de los diferentes factores que permiten controlar la respuesta SERS de un sustrato plasmónico, y se han generado diferentes estrategias que permitan sintetizar nanoestructuras (NEs) capaces de generar incrementos considerables de las señales SERS de analitos localizados en los espacios interpartícula. En años recientes se han desarrollado estrategias para

obtener estructuras diméricas de nanopartículas (NPs) con incrementos SERS experimentales que rondan los máximos incrementos reportados para sustratos SERS en dispersión coloidal, en el orden de  $10^{7-10}$ .<sup>8-10</sup>

Otro tipo de técnicas de detección son las que se basan en las propiedades ópticas de campo lejano, como la extinción, ya que la posición espectral de las LSPR es muy sensible ante pequeños cambios en el entorno dieléctrico alrededor de las NEs, y depende de la naturaleza del metal, tamaño y la forma de las NPs, así como el índice de refracción del medio dieléctrico que las rodea. La dependencia con el tamaño y la forma nos brinda la capacidad de sintonizar la posición espectral a lo largo de todo el espectro visible. Por otro lado, el desplazamiento hacia el rojo de la (LSPR), inducido por un aumento del índice de refracción alrededor de las NEs metálicas, es la base de otro tipo de sensor: sensores de índice de refracción (Figura I1 B).<sup>11</sup> Cambios locales del índice de refracción, tales como los inducidos por interacciones biomoleculares en la superficie de las NEs, pueden ser observados a través de la intensidad máxima LSPR. La principal desventaja de los sensores LSPR de índice de refracción es que, al ser una técnica no específica, la señal sólo depende del índice de refracción alrededor de la partícula metálica. A su vez, para alcanzar límites de detección aceptables se requiere de volúmenes de muestra muy grandes o de equipos especiales para detectar el cambio del índice de refracción en NPs aisladas (microscopios de campo oscuro y espectroscopia Rayleigh), lo cual hace que estas técnicas sean poco viables en laboratorios convencionales. Si bien los límites de detección alcanzados por sustratos SERS son ideales para el desarrollo de biosensores en aplicaciones directas, como por ejemplo la detección clínica de enfermedades, estos sustratos son utilizados en microscopios Raman que requieren de láseres y detectores muy sensibles. Esto hace que estos biosensores sean poco prácticos y costosos.<sup>11</sup> La miniaturización es uno de los principales aspectos que se pueden implementar para reducir el volumen de la muestra, una cuestión importante en varias pruebas de diagnóstico clínico, a través del uso de detectores con una resolución mayor (mejor relación señal/ruido) y el diseño de equipos específicos para cada biosensor. Una alternativa a esto sería generar un

biosensor LSPR que pueda ser aplicado en algún equipo de uso común en laboratorios de análisis clínicos. En este sentido, los nanosensores basados en campo lejano presentan una ventaja con respecto a los sensores de campo cercano, ya que pueden ser utilizados con cualquier espectrofotómetro UV-vis, los cuales son equipos relativamente poco costosos y que se encuentran en muchos laboratorios de análisis. Esto permite sortear los problemas de portabilidad y costos de los equipos necesarios para utilizar nanosensores basados en propiedades de campo cercano, permitiendo una aplicación directa de los nanosensores de campo lejano, como por ejemplo en la detección de enfermedades en laboratorios de análisis clínicos. En particular, cuando se quiere desarrollar un biosensor para realizar análisis de diagnóstico clínico, o para detectar un antígeno específico en muestras de alimentos, hay que tener en cuenta que la detección rápida y sensible de los mismos es crucial para el diagnóstico precoz de enfermedades, para mejorar la atención del paciente o para alertar rápidamente la presencia de antígenos no deseados en muestras para consumo humano.<sup>12-13</sup>



**Figura I1:** Diferentes estrategias para generar nano-biosensores de campo cercano y campo lejano. A) Nano-biosensor plasmónico de campo cercano utilizando los incrementos de procesos

inelásticos de moléculas activas en Raman (SERS). B) Nano-biosensor plasmónico de campo lejano utilizando los cambios en el índice de refracción de NEs plasmónicas al adsorberse moléculas de analito. C) Esquema de la técnica bioquímica ELISA de tipo sándwich.

En particular, una de las principales estrategias utilizadas como herramienta de diagnóstico para la detección y cuantificación de antígenos o anticuerpos específicos en una muestra, es el ensayo por Inmunoabsorción ligado a enzimas o enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). ELISA utiliza el concepto básico de inmunología de la unión de un antígeno a su anticuerpo específico, lo que permite la detección de cantidades muy pequeñas de antígenos en un fluido. El anticuerpo es inmovilizado, en placas de 96 wells, al cual se le agrega su correspondiente antígeno el cual es detectado posteriormente por un anticuerpo secundario acoplado a una enzima que produce un cambio de color visible o de fluorescencia, indicando la presencia del antígeno (Ver Figura I1 C).

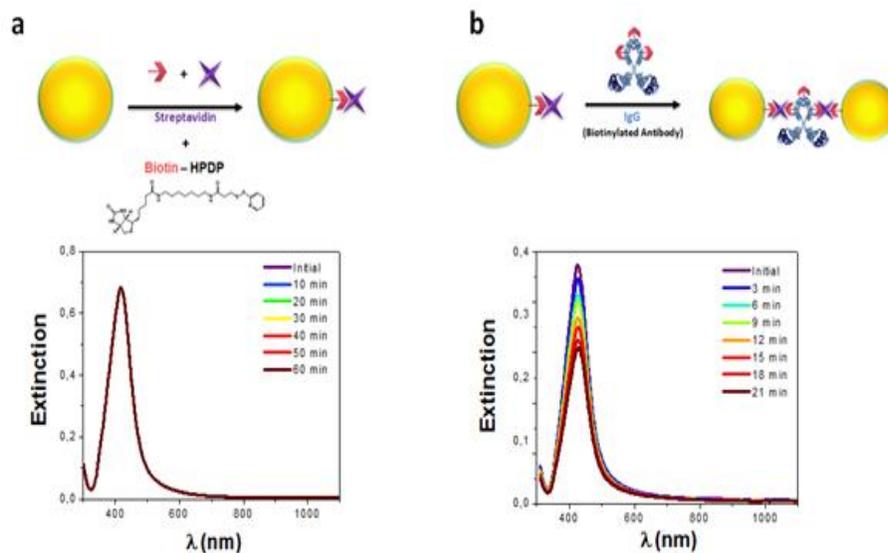
Sin embargo, la metodología ELISA posee ciertas limitaciones debido a la unión no específica a la placa o a la reacción de cambio de color mediada por enzimas, que podrían conducir a resultados falsos positivos.<sup>14</sup> Por otra parte, esta técnica utiliza grandes cantidades de reactivos utilizados en el proceso de inmovilización en la placa, y requiere varios pasos de lavado que consumen mucho tiempo.<sup>15</sup> Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar plataformas precisas y capaces de efectuar una cuantificación rápida y específica de antígenos en muestras clínicas. En ese sentido, los ensayos basados en NPs tienen el potencial de ser usados para detectar procesos en sistemas biológicos con niveles de sensibilidad y localización sin precedentes (detección y cuantificación de receptores de membrana celulares<sup>16-18</sup>, estudios de procesos celulares<sup>19</sup>, generación de imágenes celulares<sup>20-21</sup>, etc.), proporcionando nuevas herramientas para el diagnóstico clínico<sup>22-26</sup>.

Las NPs metálicas, especialmente de Ag y Au, presentan propiedades ópticas únicas, ya que al ser iluminadas con luz se produce la oscilación colectiva de los electrones de la banda de conducción del metal, conocidas como resonancias plasmónicas. La frecuencia de resonancia puede ser sintonizada en

un gran intervalo espectral, desde el UV-Vis al infrarrojo cercano, con sólo cambiar parámetros, tales como tamaño, forma, espacio partícula-partícula y entorno químico<sup>27-29</sup>. Además, sus propiedades superficiales son adecuadas para el desarrollo de diversas estrategias de funcionalización con biomoléculas, ya que pueden actuar como agentes de bio-reconocimiento capaces de interactuar específicamente con ciertas moléculas.

Recientemente hemos desarrollado una novedosa técnica para la detección y cuantificación rápida de antígenos en muestras reales llamada IDILA (Intensity Depletion Immuno-Linked Assay) como una plataforma genérica, precisa y de cuantificación rápida y específica de antígenos<sup>30</sup>. El ensayo IDILA se basa en el cambio que experimenta la respuesta óptica utilizando un espectrofotómetro Uv-Vis de una dispersión coloidal de nanoesferas de plata (Ag NSs) y las fuertes interacciones de la estreptavidina (STV)-biotina relación molar (1:1:1) en combinación con la capacidad de reconocimiento biomolecular específica de la inmunoglobulina. Este biosensor consiste en una aglomeración controlada (formación de dímeros de nanoesferas de Ag) en presencia de una inmunoglobulina G Biotinilada (IgG-Biot) actuando como un lazo de unión entre Ag NSs funcionalizadas con Estreptavidina-Biotina. La formación de estas estructuras diméricas (figura I2 A y B) se evidencia experimentalmente por una disminución de la intensidad del espectro de extinción.

Para poder racionalizar este comportamiento óptico es necesario tener en cuenta que el espectro de extinción de dímeros y monómeros sigue la misma forma espectral (teniendo en cuenta la polarización promedio de dímeros en solución y la distancia inter-partícula), pero la sección eficaz de extinción de dos monómeros aislados (sin formar dímeros) es mayor que la sección eficaz del dímero aislado a la longitud de onda donde presentan un máximo tanto el monómero como el dímero. Por otra parte, también se observa que la concentración de partículas (monómeros más dímeros) disminuye a medida que se van formando los dímeros.



**Figura 12:** A). Representación esquemática de la estrategia de funcionalización de nanopartículas con el sistema de estreptavidina (STV) biotina (arriba), y la evolución del espectro de extinción de nanopartículas de Ag funcionalizadas con el sistema STV-biotina usando NPs / STV / biotina 1: 1: 1. B), Representación esquemática de la estrategia de la aglomeración de nanopartículas controlada (formación de dímeros) en presencia de un anticuerpo biotinilado (Biot-IgG), y la evolución del espectro de extinción de nanopartículas de Ag funcionalizadas en presencia de Biot-IgG.

Para lograr el objetivo general de la tesis se aplicó una novedosa metodología analítica ultrasensible desarrollada por nuestro grupo de trabajo llamada IDILA (Intensity Depletion Immuno Liked Assay)<sup>30</sup>. En una primera etapa se fabricaron nanoesferas metálicas de plata (Ag NSs), con una posterior caracterización morfológica y óptica. Luego se funcionalizaron con una relación molar (1:1:1) con estreptavidina (STV) y biotina (Biot). Una hora después se agregaron diferentes cantidades de Inmunoglobulina G biotinilada (IgG-Biot) específica para gliadina directamente sobre las mezcla de NPs-biot-STV lo que induce a la formación de estructuras diméricas. Esta reacción se evidencia espectralmente por una disminución en la intensidad del espectro de extinción. Una vez elegida la concentración IgG- Biot que más favorezca la formación de dímeros se agregaron diferentes concentraciones del antígeno específico para

gliadina provocando la inhibición en la formación de dímeros. Esto que se traduce en una respuesta óptica diferente en el espectro del Uv-Vis lo que permite elaborar una curva de calibración. Luego se analizaron muestras de polenta y maicena a las que se le ha extraído la gliadina con una solución de a etanol al 60 %<sup>31</sup>. Por último se comparan los resultados obtenidos para IDILA con la técnica ELISA homologada por el Código Alimentario Argentino.<sup>32</sup>

El presente trabajo está organizado en tres secciones, la primera sección corresponde al “capítulo 1” donde se describe el marco teórico en el cual se estudian las propiedades ópticas de nanopartículas de metales nobles y sus principales aplicaciones. En la segunda sección “capítulo 2” se describen en detalle las técnicas y metodologías utilizadas durante el desarrollo de esta tesis. Por último en la sección 3 “capítulo 3” se muestran los resultados obtenidos durante el desarrollo de los experimentos y cuáles son las perspectivas que se abren de esta novedosa metodología denominada “IDILA” para el análisis de proteínas en alimentos.

## Referencias

1. Fasano A, Berti I, Gerarduzzi T, Not T, Colletti RB, Drago S, Elitsur Y, Green PHR, Guandalini S, Hill ID, Pietzak M, Ventura A, Thorpe M, Kryszak D, Fornaroli F, Wasserman SS, Murray JA, Horvath K. Prevalence of Celiac Disease in At-Risk and Not-At-Risk Groups in the United States A Large Multicenter Study. *Arch Intern Med.* 2003;163(3):286-292.
2. Gorinstein, S; Pawelzik, E; Delgado-Licon, E; Haruenkit, R; Weisz, M; Trakhtenberg, S Characterization of pseudocereal and cereal proteins by protein and amino acid analyses. *J Sci Food Agr.* 2002, 82 (8): 886-91.
3. Abdel-Aal, ESM; Hucl, P (2002). «Amino acid composition and in vitro protein digestibility of selected ancient wheats and their end products». *J Food Comp Anal.* 2002, 15 (6): 737-47.
4. Skerritt, J.H. y Hill, A.S. Monoclonal antibody sandwich enzyme immunoassays for determination of gluten in foods. *J. Agric. Food Chem.* 1990, 38: 1771-1778.
5. Hochegger, R., Mayer, W., Prochaska, M. Comparison of R5 and G12 Antibody-Based ELISA used for the determination of the gluten content in official food samples. *Foods.* 2015, 4, 654-664
6. Sorell, L. et al. (1998). An innovative sandwich ELISA system based on an antibody cocktail for gluten analysis. *FEBS Lett.*, 439(1-2): 46-50.
7. Sepúlveda, B.; Angelome, P. C.; Lechuga, L. M.; Liz-Marzan, L. M. LSPR based nanosensors *Nano Today* 2009, 4, 244-251.
8. Fraire, J. C.; Pérez, L. A.; Coronado, E. A.. Rational Design of Plasmonic Nanostructures for Biomolecular Detection: Interplay between Theory and Experiments *ACS Nano* 2012, 6, 3441–3452.
9. Fraire, J. C.; Sueldo Ocello, V. N.; Allende, L. G.; Veglia, A. V.; Coronado, E. A.. Towards the Design of Highly Stable Small Colloidal SERS Substrates with Supramolecular Host-Guest Interactions for Ultrasensitive Detection *J. Phys. Chem. C* 2015, 119, 8876–8888.
10. Fraire, J. C.; Pérez, L. A.; Coronado, E. A.. Cluster Size Effects in the Surface Enhanced Raman Scattering Response of Ag and Au Nanoparticle Aggregates: Experimental and Theoretical Insights. *J. Phys. Chem. C* 2013, 117, 23090–23107
11. Anker, A.J.; Paige Hall, W.; Lyandres O.; Shah, N.C.; Zhao, J.; Van Duyne, R.P. Biosensing with plasmonic sensors. *Nature Materials*, 2008, 7, 442-453.
12. Castro, C.; Gourley, M.; Diagnostic testing and Interpretation of tests for autoimmunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2010, 125, 238-247.
13. Lequin, R.M.; Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Clinical Chemistry.* 2005, 51:12, 2415-24.

14. Gan, S. D.; Patel, K. R.; Enzyme Immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay *J. Invest. Dermatol.* 2013, *133*, 1-3.
15. Baker, G.; Lajtha, A.; Dunn, S.; Holt, A.: *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology* Practical Neurochemistry Methods Ch. 8 (Springer Science, New York, 2007).
16. Fraire, J. C.; Masseroni, M. L.; Jausoro, I.; Perassi, E. M.; Diaz Añel, A. M.; Coronado, E. A. Identification, localization, and quantification of neuronal cell membrane receptors with plasmonic probes: role of protein kinase D1 in their distribution. *ACS Nano* 2014, *8*, 8942–8958.
17. Wang, J.; Boriskina, S. V.; Wang, H.; Reinhard, B. M. Illuminating Epidermal Growth Factor Receptor Densities on Filopodia through Plasmon Coupling. *ACS Nano* 2011, *5*, 6619-6628.
18. Wang, J.; Yu, X.; Boriskina, S. V.; Reinhard, B. M. Illuminating the Lateral Organization of Cell-Surface CD24 and CD44 through Plasmon Coupling between Au Nanoparticle Immunolabels. *Nano Lett.* 2012, *6*, 3231–3237.
19. Rong, G. X.; Wang, H. Y.; Skewis, L. R.; Reinhard, B. M. Resolving Sub-Diffraction Limit Encounters in Nanoparticle Tracking Using Live Cell Plasmon Coupling Microscopy. *Nano Lett.* 2008, *8*, 3386–3393.
20. Crow, M. J.; Grant, G.; Provenzale, J. M.; Wax A.; Molecular Imaging and Quantitative Measurement of Epidermal Growth Factor Receptor Expression in Live Cancer Cells Using Immunolabeled Gold Nanoparticles. *Am. J. Roentgenol.* 2009, *192*, 1021–1028.
21. Aaron, J.; Travis, K.; Harrison, N.; Sokolov, K. Dynamic Imaging of Molecular Assemblies in Live Cells Based on Nanoparticle Plasmon Resonance Coupling. *Nano Lett.* 2009, *9*, 3612–3618.
22. De la Rica, R.; Stevens, M. M. Plasmonic ELISA for the ultrasensitive detection of disease biomarkers with the naked eye. *Nature Nanotechnology* 2012, *7*, 821-824.
23. Rodriguez-Lorenzo, L.; De la Rica, R.; Álvarez-Puebla, R. A.; Liz-Marzán, L. M.; Stevens, M. M. Plasmonic nanosensors with inverse sensitivity by means of enzyme-guided crystal growth. *Nature Materials* 2012, *11*, 604-607.
24. Mayilo, S.; Kloster, M. A.; Wunderlich, M.; Lutich, A.; Klar, T. A.; Nichtl, A.; Kürzinger, K.; Stefani, F. D.; Feldmann, J.; Long-Range Fluorescence Quenching by Gold Nanoparticles in a Sandwich Immunoassay for Cardiac Troponin T. *Nano Lett.* 2009, *9*, 4558-4563.
25. Tang, S; Hewlett, I. Nanoparticle-based immunoassays for sensitive and early detection of HIV-1 capsid (p24) antigen. *J. Infect. Dis.* 2010, *201*, S59–S64.
26. Wang, C.; Luconi, M.; Masi, A.; Fernandez, L. *Silver Nanoparticles as Optical Sensors*, Silver Nanoparticles (2010), David Pozo Perez (Ed.), ISBN: 978-953-307-028-5.
27. Kelly, K. L., Coronado, E. A., Zhao, L. L. & Schatz, G. C. The optical properties of metal nanoparticles: the influence of size, shape, and dielectric Environment. *J. Phys. Chem. B* 107, 668–677 (2003).

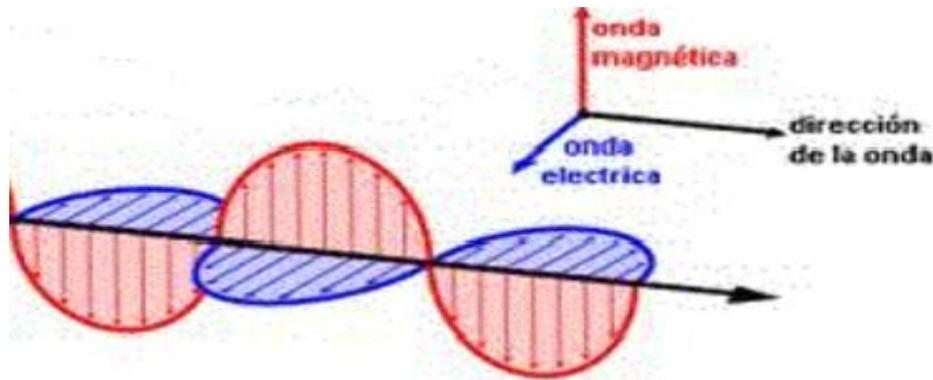
28. Su, K. H. *et al.* Interparticle coupling effects on plasmon resonances of nanogold particles. *Nano Lett.* 3, 1087–1090 (2003).
29. Gunnarsson, L. *et al.* Interparticle coupling effects in nanofabricated substrates for surface-enhanced raman scattering. *Appl. Phys. Lett.* 78, 802–804 (2001).
30. Fraire, J. C.; Motrich, R.; Coronado, E. A. Design of a Novel Plasmonic Nanoconjugated Analytical Tool for Ultrasensitive Antigens Quantification. *Nanoscale*, 2016, 8, 17169-17180.
31. Garcia, E., Llorente, M., Hernando, A., Kieffer, R., Wieser, H, Mendez, E,. Development of a general procedure for complete extraction of gliadins for heat processed and unheated foods. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*. 2005, Vol 17 No5.
32. Código Alimentario Argentino. Año 2004. Capítulo XVII. Art. 1383.

# Capítulo 1

## Introducción al Sistema de Estudio

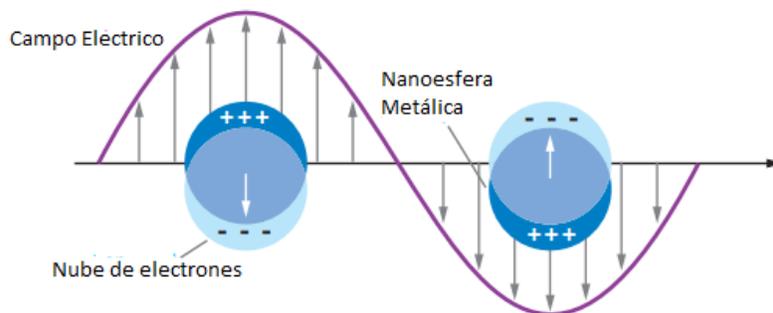
### 1.1 Introducción

La luz es una onda de radiación electromagnética, en la que un campo eléctrico y uno magnético oscilan rápidamente en el espacio y tiempo. Para una onda plana, esta oscilación periódica se caracteriza por tener una frecuencia ( $\omega$ ), un vector de campo eléctrico ( $\vec{E}$ ) y un vector de campo magnético ( $\vec{H}$ ) ambos perpendiculares al vector de propagación de onda ( $\vec{K}$ ) (ver figura 1.1)<sup>1</sup>.



**Figura 1.1:** Representación esquemática de una onda plana con su componente magnética, eléctrica y dirección de propagación.

Al interactuar la luz con nanopartículas (NPs) se producen fenómenos ópticos únicos que han dado lugar a una nueva área del conocimiento llamada Plasmónica. Cuando las NPs de metales (especialmente metales nobles como Au y Ag) son iluminadas por una radiación electromagnética (a una determinada frecuencia), se genera una resonancia plasmónica localizada (LSPR, del inglés localized surface plasmon resonance) que consiste en la oscilación colectiva de los electrones de la banda de conducción del metal (electrones libres) en respuesta al campo electromagnético incidente. (Ver figura 1.2).



**Figura 1.2:** Ilustración simplificada de una resonancia plasmonica superficial localizada para una nanoesfera metálica.

La frecuencia de resonancia de la LSPR, depende fuertemente de la forma, tamaño, material y entorno químico de la NP metálica <sup>2</sup>.

Las propiedades ópticas pueden clasificarse en dos grupos: propiedades ópticas de campo cercano y propiedades ópticas de campo lejano.

Las propiedades ópticas de campo cercano se definen como la región próxima a la superficie de la partícula. En esta región se cumple la condición de que  $r < \lambda$ , siendo  $\lambda$  la longitud de onda incidente y  $r$  la distancia hacia el detector. Siendo de particular interés porque en ella existen campos evanescentes que se generan perpendiculares a la superficie de una NP metálica. Estos campos evanescentes del metal pueden interactuar con una onda electromagnética, si esta tiene al menos una componente imaginaria del vector de onda ( $k$ ) que describe su dirección de propagación. En la dirección perpendicular a la superficie, que es la dirección espacial definida por la componente imaginaria de  $k$ , la onda no se propaga sino que decae exponencialmente, y es de particular interés para las espectroscopias incrementadas por superficie.

Las propiedades de campo lejano se definen como la región donde la distancia entre la NP metálica y el detector, es lo suficientemente grande tal que se cumple la relación  $kr \gg 1$ , donde  $k = 2\pi N/\lambda$ , siendo  $N$  el índice de refracción del medio homogéneo a través del cual se propaga la misma.

La sección eficaz de extinción ( $\sigma_{ext}$ ) es un ejemplo de propiedad óptica que pertenece a la región de campo lejano y se puede escribir como:

$$\sigma_{ext} = \sigma_{abs} + \sigma_{scat} \quad (1.1)$$

donde las componentes debidas a la sección eficaz de absorción ( $\sigma_{abs}$ ) y a la sección eficaz de dispersión ( $\sigma_{scat}$ ) son  $\sigma_{abs} = W_a/I_i$  y  $\sigma_{scat} = W_{scat}/I_i$ , respectivamente. Los valores de  $W_a$  y  $W_{scat}$  corresponden a la potencia de las radiaciones absorbida y dispersada, en relación a la incidencia ( $I_i$ ). Una característica que define esta región es que los campos eléctrico y magnético de la onda electromagnética son transversales a su dirección de propagación (especificada por el vector de onda  $k$ ).

En general la constante dieléctrica  $\varepsilon$  de un material está dada por:

$$\varepsilon = (1 + \chi) + i \frac{\sigma}{\varepsilon_0 \omega} \quad (1.2)$$

donde  $\varepsilon_0$  es la permitividad del espacio vacío, mientras que  $\sigma$  y  $\chi$  son la conductividad y la susceptibilidad eléctrica, respectivamente. Aunque  $\varepsilon$  es una función compleja que depende de  $\omega$ , comúnmente se la denomina *constante dieléctrica*, y en adelante nos referiremos a ella de esta manera.

La  $\varepsilon$  está compuesta por una parte real  $\varepsilon'$  y la parte imaginaria  $\varepsilon''$  que no son independientes entre sí, sino que están conectadas por relaciones integrales llamadas de Kramers-Kronig.

$$\varepsilon' = \frac{\varepsilon'}{\varepsilon_0} = n^2 - k^2 \quad (1.3)$$

$$\varepsilon'' = \frac{\varepsilon''}{\varepsilon_0} = 2nk \quad (1.4)$$

donde  $n$  y  $k$  son las partes real e imaginaria del índice de refracción, respectivamente.

Esta conexión impone una restricción respecto de los valores que  $\varepsilon'$  y  $\varepsilon''$  pueden tener. Un valor de  $\varepsilon''$  distinto de cero se manifiesta por la absorción de energía electromagnética en un medio, en tanto que los valores de  $\varepsilon'$  guardan mayor relación con la velocidad de propagación de la onda electromagnética en tal medio.

La teoría electromagnética es incapaz de predecir los valores de  $\varepsilon$ , es decir describir las propiedades de un material, por ello se utilizan modelos propios de la teoría del estado sólido. A principios del siglo pasado Lorentz desarrolló un modelo relativamente simple, basado en la estructura microscópica de la materia, donde los electrones y los núcleos son tratados como simples osciladores armónicos para describir la dependencia de la constante dieléctrica con la frecuencia. El modelo de Lorentz se puede aplicar tanto a materiales conductores como no conductores. Además el modelo del oscilador simple es capaz de describir muchos tipos diferentes de excitaciones ópticas.

En los metales, los electrones pueden considerarse esencialmente “libres”. Este caso particular del modelo de Lorentz se conoce como modelo de Drude para la constante dieléctrica de un metal de electrones libres, donde  $\varepsilon$  viene dada por la siguiente expresión:

$$\varepsilon = 1 - \left( \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + i\gamma\omega} \right) \quad (1.5)$$

donde  $\gamma$  es la constante de amortiguamiento y la frecuencia del plasmón  $\omega_p$  está dada por:

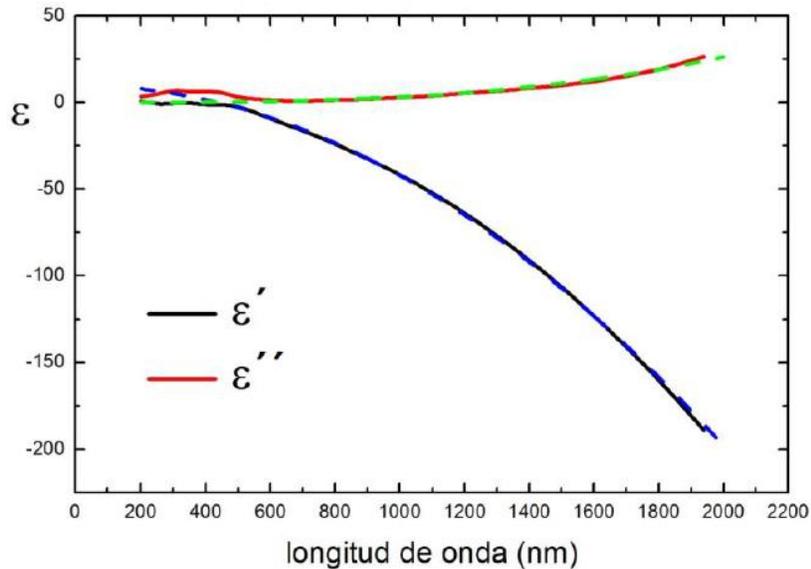
$$\omega_p^2 = \mathfrak{R}e^2 / m\varepsilon_0 \quad (1.6)$$

siendo  $\mathfrak{R}$  la densidad de electrones libres,  $m$  la masa efectiva de un electrón y  $e$  su carga eléctrica. La parte real e imaginaria de  $\varepsilon$ ,  $\varepsilon'$  y  $\varepsilon''$ , respectivamente, están dadas por:

$$\varepsilon' = 1 - \left( \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + \gamma^2} \right) \quad (1.7)$$

$$\varepsilon'' = 1 - \left( \frac{\omega_p^2 \gamma}{\omega(\omega^2 + \gamma^2)} \right) \quad (1.8)$$

En general, el modelo de Drude es de gran utilidad para describir las propiedades ópticas de los metales y, consecuentemente, para explicar su comportamiento, como puede observarse en la figura 1.3. A longitudes de onda cortas hay diferencias con respecto a los valores experimentales debido a la presencia de las transiciones inter-bandas, las cuales no se tienen en cuenta en la teoría de Drude.



**Figura 1.3:** Dependencia de la parte real ( $\epsilon'$ ) y de la parte imaginaria ( $\epsilon''$ ) de la constante dieléctrica con la longitud de onda ( $\lambda$ ) para Au. Los valores corresponden a determinaciones experimentales tabulados por Palik<sup>3</sup>. En azul y verde se han graficado los valores obtenidos mediante la teoría de Drude.

La constante de amortiguamiento  $\gamma_0$  corresponde a la frecuencia natural de colisiones de los electrones en el metal masivo, relacionada con el recorrido libre medio del electrón en el mismo material y con el ancho de la banda plasmónica. En la teoría de Drude una forma clásica de explicar esto es mediante los procesos de dispersión que se producen durante el movimiento del electrón por parte de los fonones (modo cuantizado vibratorio que se halla en redes cristalinas como la red atómica de un sólido), defectos en la red cristalina, etc. La atenuación  $\gamma_0$  depende de la velocidad de Fermi ( $v_F$ ) de los electrones en el material y del recorrido libre medio de éstos ( $L_\infty$ ):  $\gamma_0 = v_F / L_\infty$

## 1.2 Modelado para partículas con dimensiones menores a la longitud de onda incidente.

Para partículas de dimensiones mucho menores a la longitud de onda incidente, el campo eléctrico se puede considerar constante y el problema de determinar las frecuencias de resonancias para formas sencillas como esferas y esferoides resulta sencilla ya que no es necesario resolver las ecuaciones de Maxwell de la electrodinámica sino basta con la electrostática. En este régimen, denominado cuasiestático (ya que se utiliza la dependencia de la constante dieléctrica con la frecuencia), la teoría de Rayleigh provee un modelo con solución analítica aproximado. Especialmente para nanoesferas (NSs) de radio menor a un 1% de la longitud de onda del haz de luz incidente.

La intensidad de extinción,  $I(E)$ , que es la magnitud que se mide en un espectrómetro UV- Vis convencional, está dada por la siguiente expresión ( Ley de Beer):

$$I(E) = \sigma_{ext} \cdot b \cdot c \quad (1.9)$$

donde  $\sigma_{ext}$  es la sección eficaz de extinción,  $b$  es el paso óptico y  $c$  es la concentración de NPs.

En esta aproximación (cuasiestática), el momento dipolar  $\mu$  inducido en una esfera, cuando incide un campo electromagnético  $E$ , está dado por:

$$\mu = \alpha E \quad (1.10)$$

siendo  $\alpha$  la polarizabilidad, descrita de la siguiente manera:

$$\alpha = vol \left( \frac{\varepsilon - \varepsilon_m}{\varepsilon - 2\varepsilon_m} \right) \quad (1.11)$$

donde  $\varepsilon_m$  es la constante dieléctrica del medio respectivamente,  $vol$  es el volumen de la partícula irradiada, siendo igual a  $\frac{4}{3}\pi a^3$  para una esfera.

Bajo esta aproximación, el máximo de la polarizabilidad es a su vez el máximo de la extinción, debido a la siguiente relación:

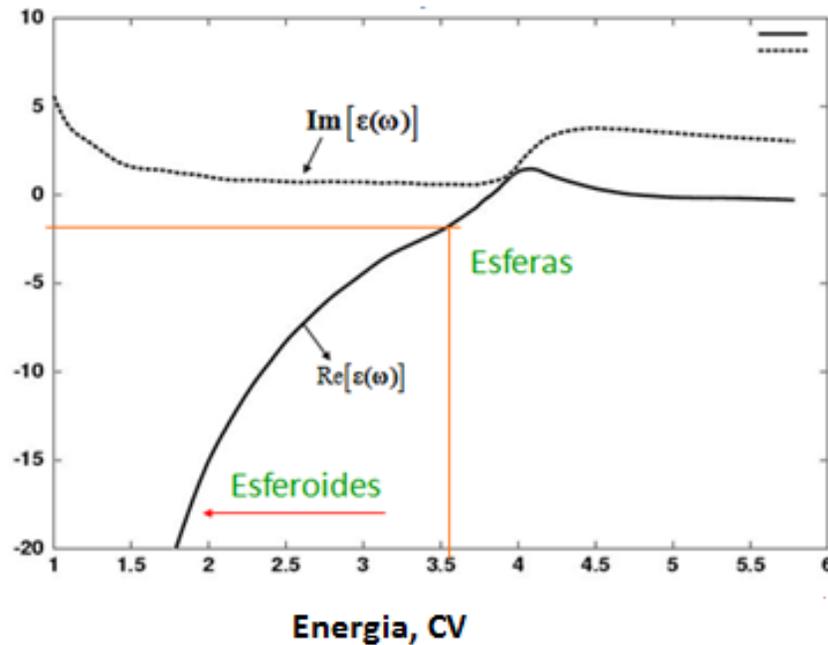
$$\sigma_{ext} = kI_m(\alpha) \quad (1.12)$$

por lo que el máximo en la extinción ocurrirá cuando la parte real del denominador de la ecuación 1.11 cumpla con la siguiente ecuación:

$$\Re(\varepsilon) = -2\varepsilon_m \quad (1.13)$$

Esta condición se conoce como *condición de resonancia* plasmónica para esferas y es aplicable a NPs muy pequeñas. Por ejemplo, para una esfera en vacío el máximo de extinción se producirá a la frecuencia donde la parte real de la constante dieléctrica sea igual a -2, independientemente del tamaño de la esfera. En este límite, entonces la longitud de onda de resonancia no tiene dependencia con el tamaño de la NP, sin embargo depende fuertemente de la constante dieléctrica del medio externo<sup>2,6</sup>.

Para esferoides, la polarizabilidad está dada por una expresión similar que para esferas,  $\alpha = vol(\frac{\epsilon - \epsilon_m}{\epsilon + \chi \epsilon_m})$  donde  $\chi$  que es un factor que depende de la forma de la nanopartícula (NP) y de la dirección de propagación del campo eléctrico. La frecuencia de resonancia para esferoides se producirá cuando  $\Re(\epsilon) = -\chi \epsilon_m$ . En general  $\chi < 2$  cuando el campo eléctrico oscila en una dirección perpendicular al eje mayor (Excitación transversal) y  $\chi > 2$  para polarizaciones longitudinales (oscilación del campo eléctrico paralelo al eje mayor). (ver figura 1.4)

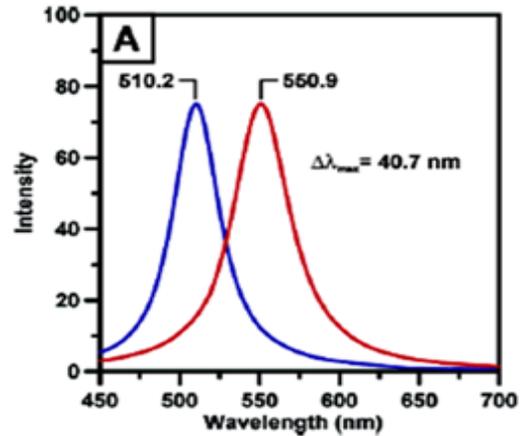


**Figura 1.4:** Esquema de la dependencia de la posición espectral de la LSPR con la forma de la NP (esferas y esferoides) para una partícula de Ag.

Como se mencionó anteriormente, otro factor que afecta a la frecuencia de resonancia del plasmón localizado es el entorno químico que rodea a la NP y depende de la constante dieléctrica del medio  $\epsilon_m$ . A medida que aumenta  $\epsilon_m$  la posición del máximo espectral se desplaza a mayores longitudes de onda<sup>6</sup>. En la

figura 1.5 se ilustra este efecto para nanoestrellas de Ag antes y después de funcionalizar su superficie con 1 hexanotiol, donde se observa un corrimiento de 40.7 nm en la longitud de onda de resonancia.

### NPs de Ag modificadas con 1-hexadecanotiol



**Figura 1.5:** Representación del cambio en la posición del máximo espectral de la LSPR para nanoestrellas de Ag sin modificar (línea azul) y para nanoestrellas de Ag modificadas con 1-Hexadecanotiol (línea roja).

### 1.3 Modelado para partículas con dimensiones mayores el limite cuasiestático.

La expresión para la polarizabilidad puede ser extendida a mayores tamaños, incluyendo correcciones perturbativas a la ecuación de Laplace. Incluyendo efectos electrodinámicos la ecuación 1.10 puede reescribirse como:

$$\mu = \alpha (E + E_{rad}) \quad (1.14)$$

donde  $E_{rad}$  es la corrección por el campo radiante o dispersado por la NP

$$(E_{rad} = (\frac{2}{3} ik^3 \mu + \frac{k^2}{a} \mu).$$

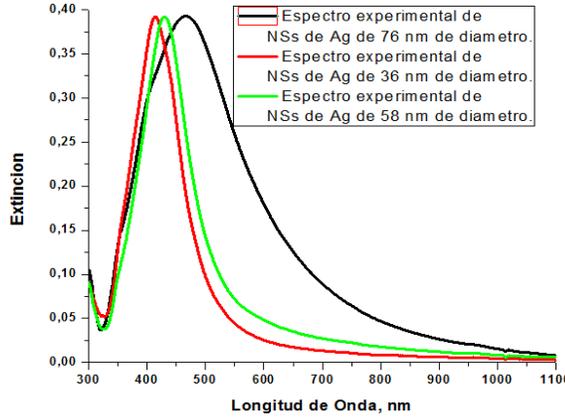
Debido a estas correcciones la polarizabilidad puede describirse como:

$$\alpha = \frac{\alpha_0}{1 - i \frac{2}{3} k^3 \alpha_0 - \frac{k^2}{r} \alpha_0} \quad (1.15)$$

donde  $\alpha_0$  es la polarizabilidad sin correcciones dada por la ecuación 1.11. La corrección efectuada puede interpretarse en término de dos efectos. El primero, se debe al término  $\frac{2}{3} ik^3$  donde  $k$  es el vector de onda incidente ( $2\pi/\lambda$ ), y describe la emisión espontánea de la radiación del dipolo inducido (atenuación radiativa). Esta emisión crece rápidamente con el tamaño de la partícula, disminuyendo el dipolo inducido e incrementando el ancho de banda de la resonancia plasmónica. El segundo efecto se debe al término  $\frac{k^2}{a}$  y describe que el máximo en la longitud de onda de la resonancia del plasmón superficial, se desplaza hacia el rojo a medida

que el tamaño de la NP es mayor. Este efecto es denominado "depolarización dinámica de la radiación" y es causado por el tamaño finito de la partícula con respecto a la longitud de onda incidente.

Esta aproximación permite extender la aproximación cuasi-estática a partículas del orden de 10% de la longitud de onda incidente (ver figura 1.6).



**Figura 1.6:** Esquema de la dependencia con el tamaño de la posición espectral y el ancho de la LSPR para esferas de Ag de distinto tamaño. A medida que el diámetro aumenta, se produce un corrimiento hacia mayores longitudes de onda y un aumento del ancho a la media altura de la LSPR, para nanopartículas esféricas de Ag.

Para partículas por encima del límite cuasi-estático la resolución exacta para las secciones eficaces de extinción y dispersión, vienen dadas por la solución completa formulada por Mie:

$$\sigma_{ext} = \frac{2\pi}{k^2} \sum_{n=1}^{\infty} (2n + 1) Re(a_n + b_n) \quad (1.18)$$

$$\sigma_{scat} = \frac{2\pi}{k^2} \sum_{n=1}^{\infty} (2n + 1) (|a_n|^2 + |b_n|^2) \quad (1.19)$$

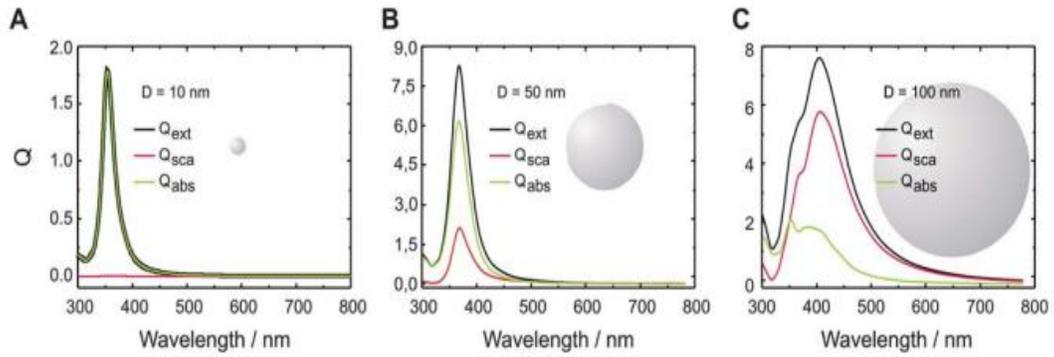
donde  $k = 2\pi/\lambda$  es el número de onda incidente, "Re" es la parte real,  $a_n$  y  $b_n$  son coeficientes dados por:

$$a_n = \frac{m\Psi_n(mx)\Psi_m(x) - \Psi_m(mx)}{m\Psi_n(mx)\xi_m(x) - \xi_n(x)\Psi_m(mx)} \quad (1.20)$$

$$b_n = \frac{\Psi_n(mx)\Psi_m(x) - m\Psi_n(x)\Psi_m(mx)}{\Psi_n(mx)\xi_m(x) - m\xi_n(x)\Psi_m(mx)} \quad (1.21)$$

donde  $\Psi_n$  y  $\xi_n$  son las funciones de Ricatti-Bessel,  $x = ka$ ,  $a$  es el radio de la esfera,  $m = (\epsilon_1 / \epsilon_0)^{1/2}$  siendo  $\epsilon_1$  la función dieléctrica de la esfera y  $\epsilon_0$  la función dieléctrica del entorno y  $n$  a la contribución del  $n$  – ésimo polo en la expansión multipolar del campo ( $n = 1, 2, 3, \dots$  etc.) que se corresponde con la contribución parcial del término dipolar, cuadrupolar, octupolar, etc., a la sección eficaz total. Para los fines de esta tesis solo se tuvo en cuenta hasta el modo multipolar  $n = 2$  ya que ordenes mayores no contribuyen a la ecuación 1.20 y 1.21 debido a el tamaño de las NPs utilizadas en este trabajo.

Si comparamos NSs de distinto tamaño, se observa que a medida que aumenta el radio de la NP, la contribución de la dispersión a la extinción es mayor que el de la absorción<sup>7-8</sup> (ver figura 1.7 a y b), también se debe tener en cuenta que a medida que aumenta la dimensión de la NP se evidencian espectralmente órdenes multipolares mayores al dipolar a menores longitudes de onda como es en el caso de la figura 1. 7 C, donde a una longitud de onda de 390 nm se puede observar la aparición de un pequeño hombro que corresponde a un orden cuadrupolar, mientras que a una  $\lambda = 430$  nm se encuentra el orden dipolar.



**Figura 1.7:** Contribución de la eficiencia de absorción y dispersión a la extinción (Q) para NP esféricas de plata a distintos diámetro en el vacío. A. 10nm. B 50nm.C 100nm. Q es la relación entre la sección eficaz y la sección eficaz geométrica del área de la NP proyectada.

## 1.4 Interacción entre nanopartículas (acoplamiento plasmónico).

Una de las nanoestructuras más simples son las partículas esféricas. Las propiedades ópticas de estos sistemas han sido ampliamente estudiadas. Es conocido que debido al fenómeno de la resonancia del plasmón superficial, en las inmediaciones de las NPs, el campo electromagnético se encuentra exaltado. Además, las secciones eficaces de absorción, extinción y dispersión son grandes. Estas propiedades dependen del material, la forma, el medio dieléctrico, etc. Así por ejemplo, la  $\lambda$  máxima de un espectro de extinción para nanoesferas de Au de 10 nm de diámetro dispersas en agua se encuentra cercana a ~520 nm, mientras que para nanoesferas de Ag, del mismo diámetro, la  $\lambda$  máxima ocurre a ~410 nm en agua.

Sin embargo, cuando dos de éstas partículas se aproximan entre sí, la respuesta óptica global del sistema se modifica drásticamente. Este fenómeno es el **acoplamiento plasmónico**, de gran interés por parte de la comunidad científica debido a múltiples motivos. Al acoplarse las NPs, en el espacio interpartícula (del inglés "gap"), la exaltación del campo electromagnético es órdenes de magnitud superior respecto a la nanopartícula aislada. Como se ha visto, numerosas señales en diversas espectroscopías son incrementadas por medio de mecanismos electromagnéticos, por lo tanto en los llamados "agregados" de NPs la señales obtenidas son también órdenes de magnitud mayores en relación al incremento logrado por las NPs aisladas. Los primeros estudios reportados a partir de espectros SERS de moléculas únicas por ejemplo, han empleado agregados de NPs de Ag. Además, mediante el acoplamiento plasmónico se han logrado diseñar dispositivos dobladores de frecuencia<sup>9</sup>, sensores bioquímicos<sup>10</sup>, etc.

Las propiedades de campo lejano también se ven afectadas por la presencia de otra nanopartícula. En términos generales, la banda característica de una nanoesfera se desdobra en presencia de otra nanopartícula. Como se ha mencionado anteriormente, la condición de resonancia en el límite cuasi-

electrostático para una esfera es  $\Re(\varepsilon) = -2\varepsilon_m$  donde  $\Re(\varepsilon)$  es el valor de la parte real de la constante dieléctrica del metal a la longitud de onda de resonancia y  $\varepsilon_m$  es la constante dieléctrica del medio.

En el caso de nanoesferas acopladas existen dos condiciones de resonancia.

Si se considera que una estructura dimérica está formada por 2 nanoesferas la forma geométrica de esta NE se puede asemejar a la de una nanovarilla, que al interactuar con un haz de luz aparecen dos modos resonantes que corresponden a los modos longitudinal y transversal.

El modo longitudinal (es decir, cuando el vector campo eléctrico es paralelo al eje interpartícula corresponde a la ecuación 1.22.

$$\Re(\varepsilon) = -\frac{8s^3+1}{4s^3-1}\varepsilon_m \quad (1.22)$$

En este caso, la dependencia de la constante dieléctrica no sólo ocurre con relación al material y al medio, sino que intervienen también el parámetro  $s$ , el cual es un parámetro geométrico que da cuenta de la distancia interpartícula relativa, es decir la separación entre las NPs, normalizada con el valor del diámetro.

$$s = D/2a \quad (1.23)$$

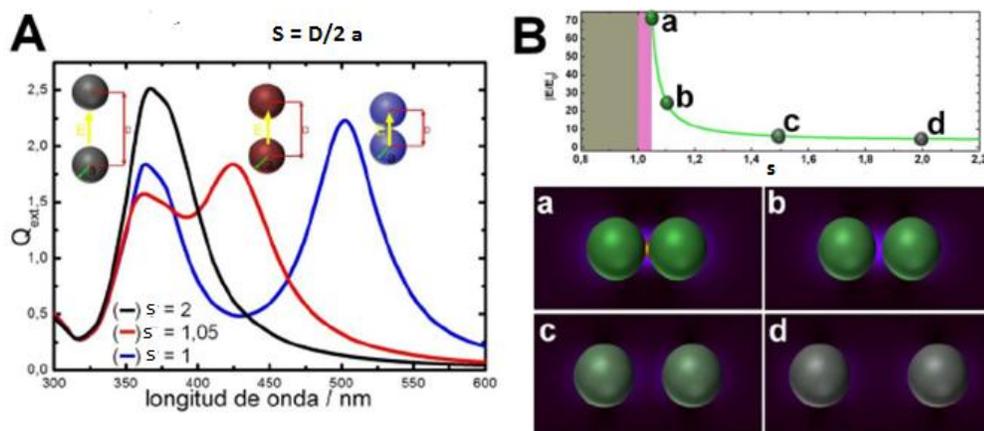
En la ecuación 1.23,  $D$  corresponde a la distancia entre los centros de las NPs, mientras que  $a$  corresponde al radio de las NPs.

El modo transversal se debe al acoplamiento cuando el vector campo eléctrico es perpendicular al eje interpartícula (modo transversal). En ese caso la condición de resonancia está dada por la ecuación 1.24

$$\Re(\varepsilon) = -\frac{16s^3-1}{8s^3+1}\varepsilon_m \quad (1.24)$$

En el límite cuando la distancia entre las NPs es muy grande como es en el caso de esta tesis debido al sándwich (Biot-STV-IgG-Biot-STV-Biot  $\sim 20$  nm) ( $s$  tiende a infinito) y ambas ecuaciones (1.22 y 1.24), convergen en el valor de la ecuación (1.15). Esto es razonable dado que a esta distancia no hay acoplamiento plasmónico y por lo tanto la condición de resonancia es la de una nanopartícula aislada. En el otro extremo, cuando la distancia entre dos NPs es nula por lo que  $s = 1$ , la condición de resonancia para el modo longitudinal es  $\Re(\varepsilon) = -3\varepsilon_m$ . En ambos casos, oro y plata, la parte real de la constante dieléctrica es más negativa a mayores longitudes de onda, siendo esperable que este modo se desplace batocrómicamente, cuando las NPs están acopladas. (Figura 1.8).

Las características del cambio en las propiedades ópticas de campo lejano en función de la distancia entre las NPs ha inspirado a diversos grupos de investigación a utilizar este efecto para medir distancias nanométricas, por lo que un par de NPs plasmónicas funciona como una "*regla plasmónica*"<sup>11-12</sup>, ya que la longitud de onda del máximo de extinción dependerá de la distancia entre las NPs



**Figura 1.8:** Cálculos electrodinámicos para dímeros de NPs. A) espectros de extinción de dímeros de NPs de Ag de 60 nm en vacío a diferentes valores de  $s$ . B) Comportamiento del incremento de campo eléctrico ( $\frac{E}{E_0}$ ) para dímeros de NPs de Au de 20 nm en función  $s$  a) 1, b) 2, c) 10 y d) 20 nm. El medio dieléctrico considerado en el cálculo es agua.

En el panel A de la figura 1.8 se muestran los resultados obtenidos con cálculos electrodinámicos de campo lejano en dímeros de NPs de Ag de 60 nm de diámetro en el vacío. En el panel B, se muestra la dependencia del incremento del campo electromagnético, en función de  $s$  para dímeros de NPs Au de 20 nm de diámetro.

Como puede observarse en la figura 1.8 A, a medida que las NPs de Ag se aproximan, se aprecia un desdoblamiento de la banda plasmónica a 370 nm, y la aparición de la señal correspondiente al modo longitudinal que se desplaza hasta aproximadamente los 500 nm, cuando las NPs están en contacto. Además como también puede determinarse a partir del análisis de la ecuación 1.21, el corrimiento del modo longitudinal es más notable, cuando  $s$  tiene valores entre 1,2 y 1.

Como se ha comentado, una de las características destacables del acoplamiento de NPs es la gran exaltación de campo eléctrico generado en la región interpartícula. En la figura 1.8 B se pueden diferenciar 3 regiones en la curva de aproximación. La primera región corresponde a valores de  $s > 1,05$ ,

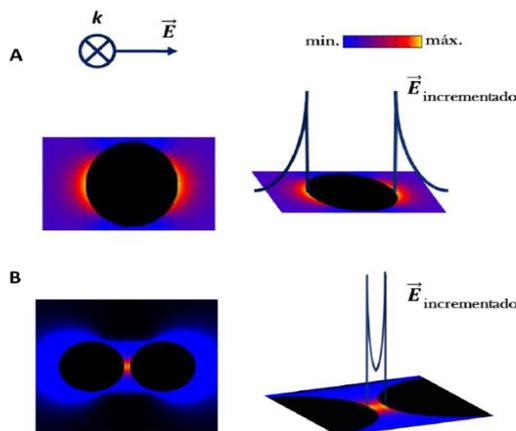
cuando la distancia entre la superficie de las NPs es mayor a 1 nm. En esta región se observa una exaltación de campo eléctrico  $(\frac{E}{E_0})$  la cual adquiere valores de  $(\frac{E}{E_0})=4,35$  cuando  $s = 6$ , y un valor incremento de campo eléctrico de  $(\frac{E}{E_0})=73,6$  para un  $s = 1,05$ . Veremos así que el incremento del campo está localizado en el "gap" entre las partículas. Por ejemplo para una molécula localizada en esa región, considerando la aproximación de  $(\frac{E}{E_0})^4$  tendría un incremento SERS estimado de  $2,9 \times 10^7$ . Otra región resaltada en la figura 1.8 panel B (zona color magenta) es la correspondiente a valores de  $s$  entre 1 – 1.05. Cabe destacar que la distancia interpartícula limita el tamaño de las moléculas prueba. En esta región los cálculos electrodinámicos convencionales, no describen correctamente el sistema, debido a los efectos no-locales<sup>13,14</sup>. En la actualidad se están realizando esfuerzos para que mediante correcciones a la constante dieléctrica del material sea posible describir correctamente esta región. En una visión simplificada del fenómeno, debido a los efectos no-locales, el aumento exponencial del incremento de campo que predice la electrodinámica clásica, a medida que las NPs se aproximan a esas distancias, se atenúa e incluso se observa una disminución del campo<sup>15</sup>.

Finalmente, la región de  $s$  inferiores a 1 (zona de color gris) es una región prohibida porque no se considera la situación de percolación de las NPs. Cabe destacar que los análisis realizados para el acoplamiento entre dos NPs pueden ser extrapolados a la descripción del comportamiento colectivo de agregados de NPs.

## 1.5 Aplicaciones de las propiedades de las resonancias plasmónicas superficiales localizadas.

En la sección anterior se definió lo que es una LSPR, este fenómeno ocurre porque los electrones libres del metal al interactuar con el campo eléctrico del haz de luz incidente se desplazan de su posición de equilibrio respecto a su núcleo atómico. Debido a esto una fuerza restauradora proveniente del núcleo positivo tiende a volverlos a su posición de origen generando la oscilación del plasmón. Como consecuencia de la excitación de la LSPR se produce un aumento en la sección eficaz de extinción de la NP y un incremento en el campo eléctrico de la misma<sup>2</sup>, estos incrementos están en su máximo en la cercanía de la NP y disminuyen a medida que nos alejamos de la superficie de la NP, esta propiedad es conocida como campo cercano y se define como la región del espacio adyacente a la superficie de la NP donde el campo electromagnético está altamente incrementado.

Además se mencionó que cuando tenemos agregados de NPs el campo eléctrico en la región interpartícula se encuentra altamente localizado e incrementado, cuyo valor depende de la distancia interpartícula, donde a menor gap los incrementos del campo son mayores (ver figura 1.9)<sup>16,20</sup>.

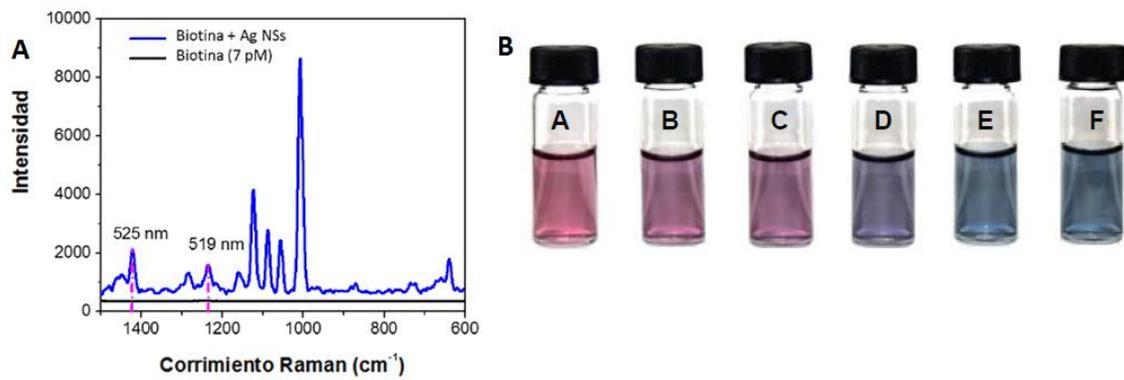


**Figura 1.9:** Representación de las propiedades de campo cercano A. campo eléctrico incrementado en la cercanía de la superficie de una NP aislada. B Campo eléctrico altamente incrementado y localizado en la región interpartícula para NE diméricas.

Otro tipo de propiedades ópticas definidas anteriormente y de interés amplio en la plasmónica y ciencias aplicadas son las de campo lejano definidas como la región del espacio alejada de la NP donde la radiación se propaga indefinidamente si no es absorbida o dispersada por el medio en el cual viaja, este tipo de propiedad óptica es muy utilizado para caracterizar la respuesta óptica de una NP como la extinción<sup>3</sup>.

Como consecuencia de las propiedades ópticas únicas de distintos tipos de nanoestructuras (NEs) una amplia gama de aplicaciones están teniendo un crecimiento exponencial tanto en la ciencia básica como la aplicada, por ejemplo el desarrollo de NEs capaces de generar incrementos en el campo eléctrico de moléculas en la cercanía a la superficie de la NP (figura 1.10 A) permitiendo mediante técnicas ópticas la detección ultrasensible de moléculas ( por ejemplo la Espectroscopia Raman Incrementada por Superficie del inglés SERS)<sup>21,22</sup>.

Otro tipo de aplicación es el diseño de nanosensores que ante pequeños cambios en el entorno químico, morfología o tamaño presentan grandes cambios espectrales en la región del Visible-NIR. Esto se debe a que su sección eficaz de dispersión y extinción incrementada, lo que permite la detección de distintos tipos de analitos con extrema sensibilidad, tal como se puede ver en la figura 1.10 B. En esta figura el trifosgeno en presencia de NPs de oro funcionalizadas con cisteína produce la aglomeración de las mismas. El cambio de color en la suspensión coloidal depende del grado de aglomeración de las NPs de oro inducido por diferentes concentraciones de trifosgeno<sup>23-35</sup>.



**Figura 1.10:** Representación esquemática de A. Espectro Raman y SERS de la biotina utilizando nanoagregados de Ag de 56 nm para una concentración  $7.6 \times 10^{-12}$  M de biotina, irradiando a  $\lambda=488$  nm. Se encuentran remarcadas en la figura las dos señales de Stokes utilizadas para calcular los factores de incremento ( $525$  y  $519 \text{ cm}^{-1}$ )<sup>36</sup> B. Cambios de color de NPs de oro funcionalizadas con cisteína en presencia de diferentes concentraciones de trifosgeno A 0, B 10, C 20, D 25, E 30 y F  $40 \mu\text{M}$ .<sup>35</sup>

# Referencias

1. Hecht, Eugene (2001). Optics (4th ed.). Pearson Education. ISBN 0-8053-8566-5.
2. Kelly, K. L.; Coronado, E. A.; Zhao, L. L.; Schatz, G. C. The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment. *J. Phys. Chem. B* 2003, 107, 668–677.
3. Palik, E. D. *Handbook of Optical Constant of Solids*; Ed.; Academic Press: NewYork 1985.
4. E. A. Coronado, G. C. Schatz, Surface plasmon broadening for arbitrary shape nanoparticles: A geometrical probability approach *J. Chem. Phys.*, 2003, 119, 3926-3934.
5. Coronado, E. A.; Encina, E. R.; Stefani, F. D. Optical Properties of Metallic Nanoparticles: Manipulating Light, Heat and Forces at the Nanoscale. *Nanoscale* 2011, 3, 4042–4059.
6. Adam, D. McFarland.; and Richard, P. Van Duyne. Single Silver Nanoparticles as Real-Time Optical Sensors with Zeptomole Sensitivity. *Nano Lett.*, Vol. 3, No. 8, 2003.
7. Bohren, C. F.; Huffman, D. R. Absorption and Scattering of Light by Small Particles. Wiley Science Paperback Series, New York (1998).
8. Mie, G. Beiträge zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metallösungen. *Ann. d.Phys.* 1908, 25, 377-445.
9. G. Grinblat, M Rahmani, E. Cortés, M. Caldarola, D. Comedi, S. A. Maier, A. V. Bragas. *Nano Lett.*, 2014, 14, 6660-6665.
10. Fraire, J. C.; Pérez, L. A.; Coronado, E. A. Rational Design of Plasmonic Nanostructures for Biomolecular Detection: Interplay between Theory and Experiments. *ACS Nano* 2012, 6, 3441–3452.
11. R. T. Hill, J. J. Mock, A. Hucknall, S. D. Wolter, N. M. Jokerst, D. R. Smith, A. Chilkoti. *ACS Nano*, 2012, 6, 9237-9246.
12. P. K. Jain, W. Huang, M. A. El-Sayed. *Nano Lett.*, 2007, 7, 2080-2088.
13. N. A. Mortensen, S. Raza, M. Wubs, T. Søndergaard, S. Bozhevolnyi. *Nature Comm.*, 2014, 5, 3809-3816.
14. K. J. Savage, M. M. Hawkeye, R. Esteban, A. G. Borisov, J. Aizpurúa, J. Baumberg. *Nature*, 2012, 491, 574-577.
15. C. F. A. Negre, E. M. Perassi, E. A. Coronado, C. G. Sanchez. *J. Phys: Cond.Mat.*, 2013, 25, 125304.
16. Draine, B. T. The discrete-dipole approximation and its application to interstellar graphite grains. *Astrophysical Journal*, Part 1 vol. 333, 1988, p. 848-872.
17. Prodan, E.; Radloff, C.; Halas, N. J.; Nordlander, P. A Hybridization Model for The Plasmon Response of Complex Nanostructures. *Science* 2003, 302, 419–422.
18. Halas, N. J.; Lal, S.; Chang, W. S.; Link, S.; Nordlander, P. Plasmons in Strongly Coupled Metallic Nanostructures. *Chem. Rev.* 2011, 111, 3913–3961.

19. Gunnarsson, L.; Bjerneld, E. J.; Xu, H.; Petronis, S.; Kasemo, B.; Kall, M. Interparticle Coupling Effects in Nanofabricated Substrates for Surface-Enhanced Raman Scattering. *Appl. Phys. Lett.* 2001, 78, 802–804.
20. Jain, P. K.; El-Sayed, M. A. Surface Plasmon Coupling and Its Universal Size Scaling in Metal Nanostructures of Complex Geometry: Elongated Particle Pairs and Nanosphere Trimers. *J. Phys. Chem. C* 2008, 112, 4954–4960.
21. Rechberger, W.; Hohenau, A.; Leitner, A.; Krenn, J. R.; Lamprecht, B.; Aussenegg, F. R. Optical Properties of Two Interacting Gold Nanoparticles. *Opt. Commun.* 2003, 220, 137–141.
22. Perassi, E. M.; Coronado, E. A. The Structure, Energy, Confinement, and Enhancement of Hot Spots between Two Nanoparticles. *J. Phys. Chem. C* 2013, 117, 7744–7750.
23. Henry, A.-I.; Bingham, J. M.; Ringe, E.; Marks, L. D.; Schatz, G. C.; Van Duyne, R. P. Correlated Structure and Optical Property Studies of Plasmonic Nanoparticles. *J. Chem. Phys. C* 2011, 115, 9291–9305.
24. Romo-Herrera, J. M.; Alvarez-Puebla, R. A.; Marzan, L. M. Controlled assembly of plasmonic colloidal nanoparticle clusters. *Nanoscale* 2011, 3, 1304–1315.
25. Haes, A. J.; Haynes, C. L.; MacFarland, A. D.; Schatz, G. C.; Van Duyne, R. P.; Zou, S. Plasmonic Materials for Surface-Enhanced Sensing and Spectroscopy. *MRS BULLETIN* 2005, 30, 368–375.
26. Encina, E. R.; Coronado, E. A. Near Field Enhancement in Ag Au Nanospheres Heterodimers. *J. Phys. Chem. C* 2011, 115, 15908–15914.
27. Le Ru, E.; Etchegoin, P. G. Principles of Surface Enhanced Raman Spectroscopy Vol 1. *Elsevier, Amsterdam* (2009).
28. Sokolov, K.; Follen, M.; Aaron, J.; Pavlova, I.; Malpica, A.; Lotan R.; Richartz-Kortum, R. Real-time vital optical imaging of precancer using anti-epidermal growth factor receptor antibodies conjugated to gold nanoparticles. *Cancer Res.* 2003, 63, 1999–2004.
29. El-Sayed, I. H.; Huang X.; El-Sayed, M. A. Surface plasmon resonance scattering and absorption of anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles in cancer diagnostics: Applications in oral cancer. *Nano Lett.* 2005, 5, 829–834.
30. Sonnichsen, C.; Alivisatos, A. P. Gold nanorods as novel nonbleaching plasmonbased orientation sensors for polarized single-particle microscopy. *Nano Lett.* 2005, 5, 301–304.
31. Wang, H.; Huff, T. B.; Zweifel, D. A.; He, W.; Low, P. S.; Wei, A.; Cheng, J.-X. In vitro and in vivo two-photon luminescence imaging of single gold nanorods. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2005, 102, 15752–15756.
32. Yu, C.; Irudayaraj, J. Multiplex biosensor using gold nanorods. *Anal. Chem.* 2007, 79, 572–579.

33. Murphy, C. J.; Gole, A. M.; Hunyadi, S. E.; Stone, J. W.; Sisco, P. N.; Alkilany, A.; Kinard, B. E.; Hankins, P. Chemical sensing and imaging with metallic nanorods. *Chem. Commun.* 2008, 5, 544–557.
34. Anker, J. N.; Hall, W. P.; Lyandres, O.; Shah, N. C.; Zhao, J.; Van Duyne, R. P. Biosensing with plasmonic nanosensors. *Nat. Mater.* 2008, 7, 442–453.
35. Duan, Feng.; Yangyang, Zhang.; Wen, Shi.; Xiaohua Li.; and Huimin Ma. A simple and sensitive method for visual detection of phosgene based on the aggregation of gold nanoparticles. *Chem. Commun.* 2010,46, 9203-9205.
36. Fraire, J. C.; Pérez, L. A.; Coronado, E. A. Cluster Size Effects in the SERS Response of Ag and Au Nanoparticle Aggregates: Experimental and Theoretical Insight. *J. Phys. Chem. C* 2013, 117, 23090–23107.

# Capítulo 2

## Materiales y Métodos

Para el desarrollo de esta tesis se fabricaron Ag NSs, que posteriormente fueron funcionalizadas con STV y Biot (relación molar 1:1:1) por bioconjugación. La caracterización morfológica de las NPs como de los dímeros formados se efectuó mediante microscopia TEM, mientras que la caracterización óptica se efectuó mediante espectroscopia UV-Vis y dispersión dinámica de luz (DLS, del inglés Dynamic Light Scattering). Luego se indujo la formación de dímeros mediante adiciones de diferentes cantidades de IgG-Biot (antigliadina). Para cada concentración de anticuerpo, la fracción de dímeros de NPs de Ag que se forma es diferente, pero en cualquier caso esto se traduce en una disminución de la intensidad de extinción, la que disminuye a medida que aumenta la cantidad de dímeros alcanzando un valor de intensidad límite a un dado tiempo  $t$ . Una vez elegido un intervalo de concentraciones de IgG que favorezca la formación de dímeros, se realiza el mismo experimento en presencia de distintas concentraciones del antígeno a cuantificar (gliadina). El antígeno se une a la IgG inhibiendo la formación de nanoestructuras diméricas. Este hecho se traduce en una respuesta espectral diferente. La intensidad espectral disminuye a medida que la fracción de dímeros formada incrementa. Debido a que el antígeno disminuye la fracción de dímeros que se generan, a medida que aumenta la concentración de antígenos, menor será la disminución de la intensidad. Esta característica permite de esta manera elaborar una curva de calibración y posteriormente efectuar una detección cuantitativa del analito. Para el análisis del sistema de estudio y caracterización fisicoquímica, se utilizaron distintos tipos de técnicas ópticas correlacionadas con cálculos teóricos de modelado electrodinámico, además se realizaron técnicas de electrotransferencia para la identificación de proteínas (gliadina) e inmunoensayos (ELISA) para correlacionar los datos obtenidos con la técnica IDILA.

## 2.1 Reactivos.

- Se utilizaron los siguientes reactivos:

**Síntesis de Nanoesferas de plata:** AgNO<sub>3</sub> (Blaker – Sigma Aldrich); Citrato de Sodio (Anedra); Acido Ascórbico (Cicarelli).

**Funcionalización de Nanoesferas de plata:** Biotina EZ-Link Biotin-HPDP (Pierce); Estreptavidina (Invitrogen);

**Inmunoensayos:** IgG policlonal de conejo biotinilado específico para gliadina (LSBio); IgG policlonal de conejo específico para gliadina de trigo (LSBio), Gliadina extraída de planta de trigo (LSBio); Buffer Fosfato Salino; Polisorbato 20 (Tween 20) (Sigma Aldrich); NeutrAvidina (Thermo Scientific); Acido Sulfúrico; Dodecil-Sulfato Sódico; Gel de Poliacrilamida; PBS-Tween 20 0.05%; Buffer carbonato-bicarbonato pH 9,6 (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1,59 g, NaHCO<sub>3</sub> 2,93 g, agua destilada c.s.p. 1000 ml); Solución bloqueante (Albúmina sérica bovina 4,00 g, PBS 100 ml); Solución diluyente (Albúmina sérica bovina 1,00 g, PBS 100 ml); Buffer de corrida western blot : (25mM Tris; 190mM glicina; 0,1% SDS a pH 8,3); TBST (Tris Buffer salino Tween 20) BioRad (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20); Substrato para Western Blot ECL (Pierce).

## 2.2 Síntesis de nanopartículas de plata.

Se realizó la síntesis de las NSs de Ag por el método de Turkevich<sup>1</sup> el cual se basa en la reducción de sal metálica ( $\text{AgNO}_3$ ) con citrato de sodio que además cumple el rol de estabilizante, la síntesis debe ser llevada a cabo en un medio acuoso a 100 °C. Para obtener distintos diámetros de NP se debe modificar la relación sal/reductor, que cuando esta disminuye permite obtener nanoesferas de mayor diámetro, pero a expensas de aumentar la polidispersión de las NPs fabricadas.

Para esta tesis se fabricaron Ag NSs con un diámetro promedio de  $58 \pm 7$  nm. El procedimiento se efectuó mezclando en un volumen de 150 mL de agua a 100 °C con agitación magnética, 1 mL de citrato de sodio 0.01 M con 1 mL de Nitrato de Plata 0.01 M. Al cabo de 15 minutos se agregaron 90  $\mu\text{L}$  de ácido ascórbico 0.01 M, obteniéndose una dispersión coloidal de color amarillo.

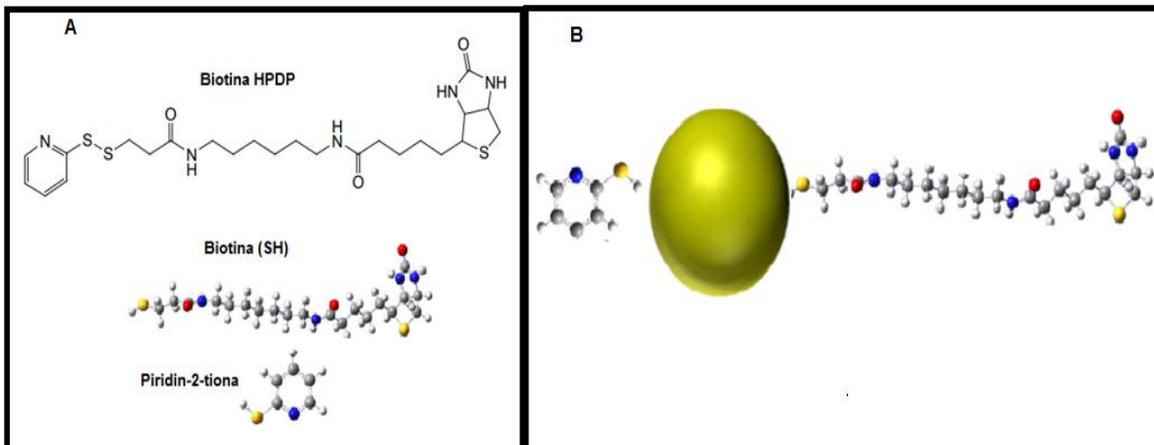
La caracterización morfológica y óptica se realizó a través de espectroscopía de absorción UV-Vis en el rango de 300 a 1100 nm, dispersión dinámica de la luz, microscopía de transmisión electrónica y se compararon los espectros obtenidos experimentalmente con simulaciones teóricas utilizando la teoría de Mie.

## 2.3 Funcionalización de las nanopartículas.

Una vez sintetizadas las NPs de plata se realizó la modificación de su superficie. La conjugación de biomoléculas con NPs metálicas se conoce como bioconjugación, y reúne las propiedades ópticas únicas de las NPs plasmónicas y la capacidad de reconocimiento molecular altamente específico de las biomoléculas. Las estrategias de bioconjugación de NPs plasmónicas generalmente se divide en cuatro clases:

1. Adsorción electrostática (adsorción no específica).
2. Unión tipo ligando a la superficie del metal, comúnmente por quimisorción (grupos tiol).
3. Uniones no covalentes basadas en sistemas de afinidad ligando-receptor o covalente, a base de afinidad sistemas de receptor-ligando.
4. Unión covalente mediante química de conjugación (click chemistry), haciendo reaccionar grupos funcionales del ligando y la biomolécula<sup>2-5</sup>.

Para la funcionalización de las NPs de Ag se utilizó Biotina EZ-Link Biotin-HPDP (Pierce) y Estreptavidina (Invitrogen) y la estrategia de bioconjugación 4. El motivo por el cual se empleó este tipo particular de biotina HPDP se debe a que cuando esta molécula se encuentra en presencia de la nanopartícula metálica su puente disulfuro se disocia generando dos compuestos, el primero es una mercapto biotina(SH) y el segundo una mercapto piridin-2-tiona, ambas moléculas tienen en su extremo un grupo (SH) el cual interactúa con la superficie de las NPs de Ag ligándose por medio de un enlace covalente debido a la alta afinidad del grupo tiol por el metal. Se debe tener en cuenta que si bien la piridin-2-tiona también se unirá a la superficie de la NP de Ag, la presencia de esta molécula en la superficie de la NP no afecta su funcionalización con biotina (SH), ni inhibe la interacción de la biotina con la estreptavidina, ni los posteriores eventos de unión con el anticuerpo específico o con el antígeno<sup>3</sup>. (Ver figura 2.1).



**Figura 2.1:** A. Representación de una molécula de Biotina HPDP, Biotina (SH) y una Piridin 2-tiona. B Representación de la funcionalización de la NP con Biotina (SH) y Piridin-2-tiona.

Para esta tesis se fabricaron Ag NSs con un tamaño promedio de  $58 \pm 7$  nm. Para la funcionalización de las Ag NSs se utilizó una relación molar 1:1:1 con STV-Biot incubándolas durante 1 hora a temperatura ambiente. Para lograr esto, una vez determinada a partir del espectro de extinción la concentración de NPs ( $1.5 \times 10^{-12}$  M), se adicionó biotina simultáneamente con la proteína STV a la dispersión coloidal en cantidades tales que sus concentraciones sean iguales a la concentración de NPs. Se utilizó la combinación STV-Biot debido a que las altas constantes cinéticas y termodinámicas de esta interacción evitan la quimisorción previa de moléculas de biotina sobre la superficie de las NSs lo que podría conducir a la formación de agregados no deseados. De esta forma queda la superficie de la NP modificada con Biot-STV dejando a la proteína 3 sitios de unión disponible de unión para interactuar con el anticuerpo biotinilado (Ver figura 2.2) y generar las estructuras diméricas<sup>4</sup>.



**Figura 2.2:** Representación de la interacción de Ag NSs-Biotina-estreptaivina con una relación molar 1:1:1.

## 2.4 Extracción de gliadina de las muestras problema.

Para la extracción de gliadina en las muestras de harina de maíz y almidón de maíz se utilizó una solución de extracción compuesta por alcohol al 60% en agua ya que la gliadina es la fracción soluble en alcohol del gluten.

El protocolo fue el siguiente:

- (1) 0.25 g de muestra previamente secada y molida fueron pesados y transferidos a tubos de propileno de 10 mL.
- (2) 10 mL de una solución de alcohol al 60% en agua fue agregada a los tubos de propileno, que luego se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente con un agitador rotatorio a 45 vueltas por minuto.
- (3) Los tubos fueron centrifugados por 10 minutos a 2500 g a temperatura ambiente. Transfiriendo posteriormente 1 mL del sobrenadante usando una micropipeta a tubos Eppendorf de 1.5 mL que se centrifugaron por 5 minutos a 2500 g a temperatura ambiente.
- (4) El sobrenadante fue transferido a tubos Eppendorf de 1.5 mL usando pipetas pasteur<sup>6</sup>

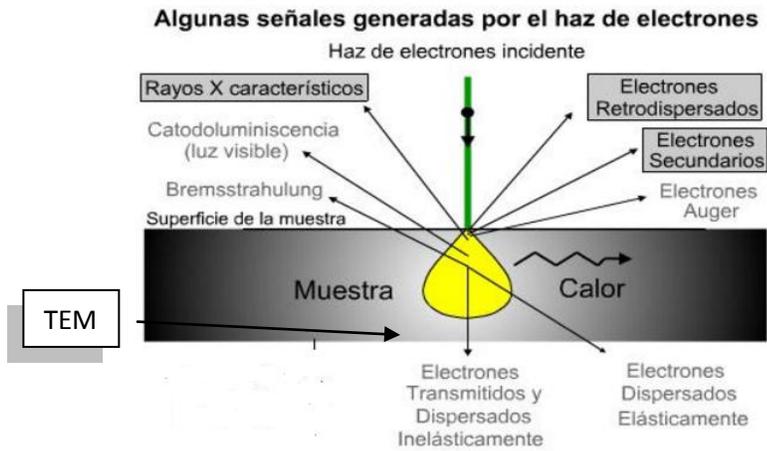
## **2.5 Técnicas Microscópicas:**

### **2.5.1 Microscopia electrónica de transmisión (TEM):**

Las microscopías electrónicas son en la actualidad una de las herramientas de caracterización más poderosas para determinar características morfológicas en estos sistemas.

Para este trabajo de tesis se utilizó esta técnica para la caracterización morfológica y análisis estadístico de la distribución entre monómeros, dímeros y otro tipo de nanoestructuras obtenidas. Las imágenes fueron obtenidas con un microscopio electrónico JEM-Jeol 1120, empleando un voltaje de aceleración de 80 kV situado en (IFFIVE, INTA), Córdoba, Argentina. Las muestras fueron preparadas colocando una gota de la muestra de interés sobre una grilla para TEM dejando que se evapore a temperatura ambiente.

Este tipo de microscopía utiliza un fino haz de electrones acelerados que, al impactar con la muestra, genera una serie de señales directamente relacionadas con la estructura del objeto investigado. Cuando los electrones colisionan con la muestra, en función de la naturaleza química y del espesor de la misma, parte de ellos son dispersados selectivamente, es decir, hay una gradación entre los electrones que la atraviesan directamente y los que son totalmente desviados. Los electrones transmitidos con y sin dispersión se utilizan para crear imágenes de transmisión convencionales o de campo oscuro. La TEM de alta resolución, puede revelar la estructura interna de las muestras, tamaño y distribución de partículas, su red cristalina, interfases y defectos puntuales de la red atómica, etc<sup>7</sup>. (Ver figura 2.3).



**Figura 2.3:** Representación de las diferentes señales generadas cuando un haz de electrones interactúa con la muestra.

## 2.6 Técnicas Ópticas.

### 2.6.1 Espectroscopía de absorción UV-Visible.

Esta técnica es ampliamente utilizada en el área de la plasmónica debido a que las grandes secciones eficaces de extinción, dispersión y absorción de las NEs de metales nobles permiten que ante pequeños cambios en su morfología, tamaño y entorno químico se traduzcan cambios espectrales significativos.

La magnitud que mide un espectrofotómetro UV-Vis convencional es la extinción (absorción + dispersión) de la dispersión coloidal de las nanopartículas.

Si se tienen en particular nanopartículas esféricas por ejemplo, la posición espectral de la banda de LSPR, permite corroborar en forma cualitativa el tamaño promedio de las mismas, ya que como se mencionara anteriormente, un aumento de tamaño genera un desplazamiento hacia el rojo de la posición del máximo del espectro de extinción. Una estimación cuantitativa del tamaño promedio (radio) de las NPs se puede efectuar comparando la posición del máximo con cálculos de modelado electrodinámico (como se detalla luego en el capítulo III sección “síntesis de nanopartículas”). La formación de dímeros a distancias cortas se podría evidenciar en el espectro mediante un desdoblamiento de la banda de extinción y la distancia interpartícula promedio puede estimarse a partir de la separación de cada uno de los picos del espectro de extinción (ver capítulo I, sección Interacción NP-NP).

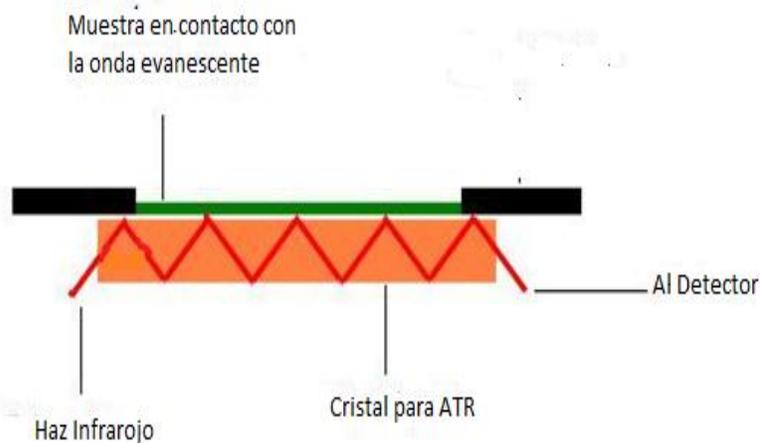
En el sistema objeto de estudio como la distancia interpartícula es lo suficientemente grande no se observa un desdoblamiento de la banda de extinción cuando se forman dímeros. Sin embargo, como se discutirá más adelante, la sección eficaz de extinción de dos nanopartículas esféricas aisladas es mayor que la sección eficaz de un dímero, por lo que para separaciones relativamente grandes, la formación de dímeros se evidencia por una disminución en la intensidad del espectro de extinción. (Siendo prácticamente nulo el desdoblamiento de la banda de extinción).

Otro aspecto que se puede inferir mediante espectroscopia UV-Vis es el grado en que cambia el entorno químico que rodea a la NP. Si la superficie de la NP se funcionaliza con un gran número de moléculas, el cambio del entorno químico cambia el índice de refracción promedio que rodea la NP (o la constante dieléctrica promedio). Este cambio de acuerdo a la ecuación 1.13, capítulo I, cambia la longitud de onda de resonancia y producirá un corrimiento espectral del pico de extinción. Si el grado de funcionalización es muy pequeño, es decir el número de moléculas que están adsorbidas sobre la superficie de la NP es una fracción muy baja, el cambio en el índice de refracción promedio que se genera es poco significativo, por lo que no se observará prácticamente ningún corrimiento espectral de la LSPR. Este hecho es muy importante en el sistema objeto de estudio en el que se requiere que en promedio una molécula de biotina HPDP y una molécula de estreptavidina funcionalicen cada nanoesfera de Ag.

Para esta tesis se utilizó un espectrofotómetro Shimadzu UV-1601 en el intervalo de 300 a 1100 nm con una celda de cuarzo de 1 cm de paso óptico.

### **2.6.2 Espectroscopía FT-IR ATR (Espectroscopía Infrarroja medida por transformada de Fourier con reflectancia total atenuada).**

Este tipo de espectroscopía combina las propiedades características de un FT-IR acoplado a un atenuador de reflectancia, el mecanismo se basa en hacer incidir un haz de luz con un ángulo superior o igual al crítico (ángulo mínimo al que ocurre la reflectancia total del haz sobre el material) sobre un cristal con alto índice de reflexión en el cual está depositada la muestra evaporada (distinto índice de reflexión que el cristal), de este modo la radiación experimenta una reflexión total en la interfaz muestra-cristal. En la región de la muestra se crea lo que se llama una onda evanescente que interactuará con la misma haciendo que esta absorba radiación en las regiones IR en las que lo hace comúnmente. Por consiguiente, la cantidad de radiación de estas regiones que se refleja será menor que la incidente, por lo que la reflexión está atenuada<sup>8-11</sup>. (Ver figura 2.4).



**Figura 2.4:** Representación de la reflexión del haz de luz IR en un sistema ATR.

Se utilizó esta técnica como un método alternativo para corroborar la correcta extracción de gliadina con alcohol al 60% en las muestras analizadas (harina de maíz y almidón de maíz). Los espectros fueron tomados el rango del 800 a 1900  $\text{cm}^{-1}$  en colaboración con el Dr. Guillermo Montich (CIQUIBIC-CONICET) con un espectrómetro FTIR Nicolet Nexus con un accesorio ATR Golden Gate Mk II de la firma Specac con cristal de diamante y reflexión única. El equipo fue purgado con aire seco para eliminar la contribución del vapor de agua y se dejó evaporar a las muestras sobre el cristal de reflectancia para la posterior adquisición de los espectros.

### 2.6.3 Dispersión de Luz Dinámica (DLS)

El DLS es una técnica que se utiliza generalmente para determinar el diámetro de partículas en una solución o dispersión coloidal, basándose en las fluctuaciones temporales de la dispersión de las partículas en solución y correlacionando esas fluctuaciones con el radio hidrodinámico de las partículas.

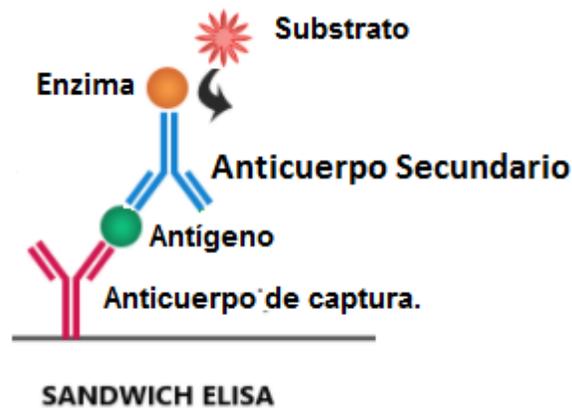
La caracterización óptica por DLS de las diferentes NPs y NEs sintetizadas se realizó utilizando un espectrofotómetro Delsa Nano 2.2 con una celda de cuarzo de 1 cm a temperatura ambiente.

## 2.7 Inmunoensayos.

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

Se utilizó esta técnica analítica para determinar el contenido de gliadina de las muestras analizadas, y comparar los resultados obtenidos con la metodología IDILA (Intensity Depletion Inmuno-Lynked Assay) desarrollada en esta tesis. Se utilizó ELISA tipo sándwich ya que es el método analítico homologado por Código Alimentario Argentino para la verificación de alimentos libres de gluten<sup>12</sup>.

ELISA tipo sándwich consta en una primera etapa de la fijación de anticuerpos específicos para el antígeno a detectar en un micro well. Luego en una segunda etapa se procede al lavado del sustrato funcionalizado en la primera etapa para eliminar los anticuerpos fijados deficientemente o no fijados. Posteriormente se procede a agregar una solución conteniendo proteína inerte (PBS1X-Albumina 3%) para bloquear los sitios libres en la placa. En una tercera etapa se adiciona la muestra problema (extracto vegetal, sangre, suero, plasma, etc.), de tal forma que si está presente el antígeno, reaccionará selectivamente con los anticuerpos fijados al soporte. Posteriormente se realizan varios lavados para eliminar los antígenos que no hayan reaccionado y los restos de la muestra no fijados. En una cuarta etapa se adicionan anticuerpos secundarios específicos del antígeno a detectar (que poseen un epítipo diferente de los anticuerpos con los que se han tapizado el soporte) conjugados con una enzima, los cuales reaccionan con los antígenos añadidos con la muestra problema (que se encuentran fijados a los anticuerpos). En una quinta etapa se realiza otro lavado para eliminar los anticuerpos marcados que no hayan reaccionado y se añade un sustrato sobre el cual actúa la enzima marcadora desencadenando una reacción colorimétrica que permite la detección y cuantificación del antígeno por métodos ópticos<sup>6</sup>. (Figura 2.5).



**Figura 2.5:** Esquema simplificado de la técnica ELISA tipo “Sandwich”.

Para este trabajo, se utilizó un ensayo ELISA tipo sándwich (LSBio) en microplacas de 96 wells.

Inicialmente se incubó 100 µL / pocillo de anticuerpo primario (anticuerpo IgG de conejo policlonal anti gliadina) durante la noche a 4°C, luego se lavo 4 veces con tampón de lavado (PBS suplementado con Tween-20 al 0,05%) y se bloqueó cada pocillo (200 µl / pocillo) con albúmina de suero bovino (4,00 g, PBS 100 ml) durante 1 hora a 37 °C. Posteriormente se lavaron nuevamente los pocillos 4 veces, con tampón de lavado. Seguidamente se añadió el antígeno de gliadina (LSBio) para realizar la curva de calibración y por otro lado las muestras problema (harina de maíz y almidón de maíz) utilizando diluciones seriadas (con factor de dilución ½ ), incubándose durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de efectuar 4 lavados con tampón PBS, se agregó el anticuerpo secundario biotinilado específico para gliadina (LSBio) en cantidades de 100 µL / pocillo, incubándolo durante 1 hora a temperatura ambiente. Seguidamente se lavaron 4 veces los pocillos y se añadieron 100 µL / pocillo de enzima estreptavidina-peroxidasa y se incubaron durante 30 minutos a 35 °C. Por último se efectuó otro lavado de la microplaca: 3 veces con sólo PBS y 3 veces con PBS suplementado con Tween-20 al 0,05% y se añadió el sustrato-cromógeno H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Tetra Methyl Bencidine (TMB). Este sustrato-cromógeno produce una reacción colorimétrica catalizada por la enzima que se inhibe a los 10 minutos mediante el

agregado de ácido sulfúrico 5 M. Las lecturas se realizaron a 450 nm en un lector de Elisa BioRad Hercules, (USA).

### **2.7.2 Western Blot**

Se utilizó este método para confirmar la presencia de gliadina en las muestras analizadas.

El Western blot, inmunoblot o electrotransferencia, es una técnica analítica y molecular que permite separar e identificar proteínas específicas en una mezcla compleja de proteínas. La metodología consiste en tres etapas: separación por tamaño, transferencia a un soporte de nitrocelulosa y, finalmente, visualización mediante la marcación de proteínas con el uso de anticuerpos primarios y secundarios apropiados<sup>13-15</sup>.

El procedimiento utilizado en este trabajo fue, en primer instancia separar por peso molecular el complejo proteico de gliadina extraído previamente de las muestras problema, en un gel de electroforesis de dodecil sulfato sódico (12% de gel de poliacrilamida y un tampón de migración 25 mM BufferTris; Glicina 190 mM; SDS al 0,1%; Ph 8.3). El tiempo de electroforesis fue de 2 horas a 100 V, después se transfirieron las proteínas del gel a una membrana de nitrocelulosa en un medio húmedo con un tampón de transferencia que contenía (BufferTris 25 mM, glicina 190 mM y metanol al 20%). El tiempo de incubación para este proceso de transferencia fue de aproximadamente de 1 hora. Una vez transferidas las macromoléculas, se bloquearon los sitios de unión libres incubando la membrana con albúmina de suero bovino (4,00 g, PBS 100 ml). Posteriormente, la detección se realizó incubando la membrana con el anticuerpo primario específico para gliadina durante 12 hs a 4 °C. Luego de lavados sucesivos con TBST (Tris Buffer Saline Tween 20), se agregó el anticuerpo secundario biotinilado unido a la enzima peroxidasa (Thermo Scientific), efectuándose posteriormente un nuevo lavado con TBST. El revelado se realizó por quimioluminiscencia mediante la adición de un substrato para Western Blot ECL (Pierce) utilizando un equipo ODYSSEY Sistema de imagen infrarroja (LI-COR Bioscience).

## 2.8 Métodos Computacionales

### 2.8.1 Interacción de la radiación con esferas: Teoría de Gustav Mie

En 1908, Gustav Mie aborda el problema matemático de la interacción entre la radiación electromagnética y una partícula esférica, en la búsqueda de explicar la coloración rojo rubí de las soluciones coloidales de Au.<sup>16</sup> En términos generales, la estrategia para llegar a la solución del problema consiste en:

- a) expandir la onda plana incidente en términos de armónicos esféricos vectoriales.
- b) encontrar los coeficientes para la expansión del campo incidente.
- c) encontrar los coeficientes para la expansión del campo generado dentro de la esfera (interno) y del campo dispersado, sujeto a la condición de que en la superficie de la esfera, tanto el campo eléctrico como el magnético, deben ser continuos.

Para satisfacer las ecuaciones de Maxwell, el campo eléctrico ( $E$ ) y el campo magnético ( $H$ ) deben resolver las ecuaciones de onda:

$$\nabla^2 E + k^2 E = 0 \quad (2.1)$$

$$\nabla^2 H + k^2 H = 0 \quad (2.2)$$

donde  $k$  está relacionada con  $\omega$  mediante la relación  $k^2 = \omega^2$ .

A su vez, los campos  $E$  y  $H$  deben ser libres de divergencia ( $\nabla \cdot E = 0$ ,  $\nabla \cdot H = 0$ ), y están relacionados por las siguientes expresiones:

$$\nabla \times E = i\omega\mu H \quad (2.3)$$

$$\nabla \times H = -i\omega\varepsilon E \quad (2.4)$$

donde  $\omega$  es la frecuencia angular,  $\mu$  es la permeabilidad del medio donde se propaga la onda, y  $\varepsilon$  es la constante dieléctrica.

Por otro lado, es posible construir una función vectorial  $M$  a partir de una función escalar  $\Psi$  y un vector constante  $r$  según:

$$M = \nabla \times (r\Psi) \quad (2.5)$$

Utilizando identidades vectoriales se puede demostrar que:

$$\nabla^2 M + k^2 M = \nabla \times [(\nabla^2 \Psi + k^2 \Psi)] \quad (2.6)$$

por lo tanto,  $M$  satisface la ecuación de onda vectorial (2.6) si la función  $\Psi$  es una solución de la ecuación de onda escalar:

$$\nabla^2 \Psi + k^2 \Psi = 0 \quad (2.7)$$

de acuerdo a su definición, la función vectorial  $M$  es libre de divergencia ( $\nabla \cdot M = 0$ ) y, además, es posible construir otra función vectorial  $N$  a partir de  $M$  según:

$$N = k^{-1}(\nabla \times M) \quad (2.8)$$

así, las funciones vectoriales  $M$  y  $N$  tienen todas las propiedades requeridas para un campo electromagnético compatible con las ecuaciones de Maxwell: satisfacen la ecuación de onda vectorial (2.1), son libres de divergencia, la circulación de  $M$  es proporcional a  $N$  y la circulación de  $N$  es proporcional a  $M$ . De esta manera, el problema se reduce a encontrar soluciones a la ecuación de onda escalar (2.7). Dada la simetría del problema, las dos funciones  $\Psi$  que satisfacen la ecuación (2.7) en coordenadas polares esféricas  $r, \theta$  y  $\varphi$ , corresponden a dos funciones de distinta paridad, par  $\Psi_{emn}$  e impar  $\Psi_{omn}$ :

$$\Psi_{emn} = \cos m\varphi P_n^m(\cos \theta) z_n(kr) \quad (2.9)$$

$$\Psi_{omn} = \sin m\varphi P_n^m(\cos \theta) z_n(kr) \quad (2.10)$$

donde  $m = 0, \pm 1, \pm 2, \dots, n$  y  $n = 0, 1, 2, \dots$ . Las funciones  $P_n^m$  son los polinomios asociados de Legendre y  $z_n$  son las funciones de Bessel. Estas últimas pueden ser elegidas de cuatro formas diferentes:  $j_n(kr)$ ,  $y_n(kr)$ ,  $h_n^+(kr)$  y  $h_n^-(kr)$ , dependiendo de cuales sean las condiciones de contorno del problema. El comportamiento asintótico de estas funciones es:  $\sin(kr - n\pi/2)$ ,  $\cos(kr - n\pi/2)$ ,  $e^{ikr - n\pi/2}$  y  $e^{-i(kr - n\pi/2)}$ , respectivamente. Otro aspecto importante es el comportamiento de las funciones de Bessel para  $r = 0$ . Todas las funciones esféricas de Bessel divergen para  $r = 0$ , excepto  $j_0(kr)$ . Esto significa que sólo esta función debe ser usada para representar un campo electromagnético finito en el origen de coordenadas.

Es importante destacar que cualquier función que satisfaga la ecuación de onda (2.7) en coordenadas esféricas polares puede ser expandida como una serie infinita en las funciones (2.9) y (2.10). Las funciones  $\Psi_{omn}$  y  $\Psi_{emn}$  sirven de base para construir cuatro tipos de armónicos esféricos vectoriales diferentes usando las ecuaciones (2.5) y (2.8). El próximo paso es expandir la onda plana incidente en términos de los armónicos esféricos vectoriales  $M_{emn}$ ,  $N_{emn}$ ,  $M_{omn}$  y  $N_{omn}$ . Si se considera una onda polarizada con el vector de onda  $k$  en la dirección del eje  $z$  y la dirección de polarización sobre el eje  $x$ , la expansión del campo incidente en "ondas parciales" está dada por:

$$E_{\text{incidente}} = E_0 e^{ikr \cos \theta} e_x = E_0 \sum_{n=1}^{\infty} i^n \frac{2n+1}{n(n+1)} (M_{omn}^{(1)} - iN_{emn}^{(1)}) \quad (2.11)$$

donde  $e_x$  es el vector unitario en la dirección del eje de polarización  $x$ . La suma consiste en una expansión en serie de la onda plana en términos de ondas esféricas, donde el superíndice (1) en los armónicos esféricos indica que en las soluciones de (2.7) las funciones de Bessel apropiadas son aquellas del tipo  $j_n(kr)$ . Debido a la ortogonalidad de las funciones *seno* y *coseno*, los coeficientes de expansión de los armónicos  $M_{omn}$  y  $N_{emn}$  son cero. Además, los coeficientes restantes se anulan también, excepto para  $m = 1$ , por el mismo motivo. El

correspondiente campo magnético incidente es obtenido calculando la circulación del campo en la ecuación (2.11). Para expandir en armónicos esféricos vectoriales el campo electromagnético dispersado ( $E_{scat}, H_{scat}$ ) y el campo interno ( $E_1, H_1$ ), se impone la siguiente condición en el límite entre la esfera y el medio circundante:

$$E_{incidente} + E_{scat} - E_1) \times e_r = (H_{incidente} + H_{scat} - H_1) \times e_r = 0 \quad (2.12)$$

esta condición de contorno implica que las componentes tangenciales de  $E$  y  $H$  deben ser continuas en la transición desde un medio al otro con propiedades dieléctricas diferentes. Así, el campo dispersado  $E_{scat}$  fuera de la superficie de la esfera, puede definirse como:

$$E_{scat} = E_0 \sum_{n=1}^{\infty} i^n \frac{2n+1}{n(n+1)} (i a_n N_{emn}^{(3)} - b_n N_{omn}^{(3)}) \quad (2.13)$$

donde el superíndice (3) denota funciones de Bessel del tipo  $h_n(kr)$ . Una expresión similar describe el campo interno:

$$E_1 = E_0 \sum_{n=1}^{\infty} i^n \frac{2n+1}{n(n+1)} (c_n M_{omn}^{(1)} - i d_n N_{emn}^{(1)}) \quad (2.14)$$

en este caso, es necesario usar las funciones de Bessel del tipo  $j_n(kr)$  en las funciones generatrices  $\Psi_{omn}$  y  $\Psi_{emn}$  para cumplir con el requerimiento de que el campo sea finito en el origen, lo cual es señalado con el superíndice (1). Los campos magnéticos  $H_1$  y  $H_{scat}$  se pueden conocer calculando la circulación de  $E_1$  y  $E_{scat}$ , respectivamente. A partir de la condición de contorno (2.12) en forma de componentes, se pueden escribir cuatro ecuaciones independientes para un dado valor de  $n$ , las cuales permiten, a su vez, conocer los cuatro coeficientes desconocidos  $a_n, b_n, c_n$  y  $d_n$  para la expansión del campo dispersado e interno, respectivamente.

La teoría de Mie permite calcular propiedades ópticas de campo lejano como, por ejemplo, la sección eficaz de dispersión,  $\sigma_{scat}$ , definida como el

cociente entre el flujo saliente radial y el flujo entrante, y la sección eficaz de extinción,  $\sigma_{ext}$ , definida como el cociente entre el flujo dispersado hacia delante y el flujo entrante que dependen de los coeficientes  $a_n$  y  $b_n$ , y  $\sigma_{abs}$  puede calcularse de la sustracción de ambas.

### 2.8.2 Teoría de Mie Generalizada para Múltiples Partículas (GMM)

El problema de dispersión de luz por un grupo de esferas, posee características distintivas en comparación con la dispersión de una esfera aislada. La principal diferencia radica en que ahora, el campo incidente sobre cada esfera tiene dos componentes: una es el campo incidente sobre el sistema y la otra es la suma de los campos dispersados por el resto de las esferas que forman parte del agregado. El desarrollo del teorema de la adición para armónicos esféricos<sup>16,17</sup>, hizo posible dar una solución cuantitativa de este segundo componente y resolver analíticamente el problema de dispersión de luz por un agregado de esferas con una orientación fija<sup>18,22</sup>. En esta sección se describe en forma breve como se halla la solución analítica de campo lejano para este problema, la cual constituye una extensión de la teoría de Mie y se la conoce como Generalized Multiparticle Mie-solution (GMM)<sup>23</sup>, o Teoría de Mie Generalizada para Múltiples Partículas.

Para resolver este problema, es necesario en un primer paso, expandir la onda plana incidente en armónicos esféricos vectoriales que tienen su origen en sistemas de coordenadas desplazados, donde las orientaciones relativas de cada uno de los diferentes sistemas de coordenadas se corresponden con la ubicación del centro de cada esfera involucrada. Luego se determinan los campos parciales dispersados por cada esfera. Aquí se halla la diferencia más relevante respecto del caso de una esfera aislada, puesto que es necesario considerar explícitamente el hecho de que el campo dispersado por la  $j$  – ésima esfera se convierte luego en campo incidente sobre la  $l$  – ésima esfera. Esta complicación adicional se supera con la ayuda de los coeficientes de traslación vectoriales, los cuales dan cuenta de este efecto. El próximo paso, de vital importancia, es construir una representación única del campo dispersado. Para ello se utiliza una relación simple que existe

entre los coeficientes de dispersión parciales y totales para el campo lejano, la cual implica solamente un término de fase. Por último se computan los valores de los coeficientes de expansión, los cuales, y de igual modo que en el caso de esfera aislada, permiten calcular  $C_{scat}$  y  $C_{ext}$ . Consideremos un agregado de  $L$  esferas, donde  $X^j, Y^j, Z^j$  (con  $j = 1, 2, \dots, L$ ) son las coordenadas del centro de la  $j$ -ésima esfera relativas a un sistema de referencia cartesiano común. A su vez, cada esfera cuenta con un sistema de coordenadas primario, con el origen ubicado en su centro. En un primer paso, los campos incidentes sobre cada esfera individual son expandidos en términos de armónicos esféricos respecto a los sistemas centrados en cada una de ellas. Luego, son expandidos relativos a un sistema cartesiano común:

$$E_{indidente}^j = E_i = \sum_{n=0}^{N^j} \sum_{m=-n}^n i E_{mn} \left[ p_{mn}^j N_{mn}^{(1)}(\rho^j, \theta^j, \varphi^j) + q_{mn}^j M_{mn}^{(1)}(\rho^j, \theta^j, \varphi^j) \right] \quad (2.15)$$

$$H_{indidente}^j = H_i = -\frac{k}{\omega \mu_0} \sum_{n=0}^{N^j} \sum_{m=-n}^n E_{mn} \left[ q_{mn}^j N_{mn}^{(1)}(\rho^j, \theta^j, \varphi^j) + p_{mn}^j M_{mn}^{(1)}(\rho^j, \theta^j, \varphi^j) \right] \quad (2.16)$$

donde  $\rho = kr$  y los coeficientes de la expansión están dados por:

$$p_{mn}^j = e^{ikZ^j} p_{mn}; \quad q_{mn}^j = e^{ikZ^j} q_{mn} \quad (2.17)$$

los cuales difieren de los coeficientes de la expansión primaria sólo por el término de fase constante  $e^{ikZ^j}$ . Es importante mencionar que en este formalismo sólo se emplea la solución para a la ecuación de onda(2.7), es decir la función  $\Psi_{emn}$ , para generar los armónicos esféricos vectoriales  $M_{mn}, N_{mn}$ . En un segundo paso, se

expresan los campos parciales dispersados por cada esfera en términos de los sistemas de coordenadas primarios, los cuales están dados por las ecuaciones:

$$E_{scat}^i = \sum_{n=0}^{N^j} \sum_{m=-n}^n i E_{mn} \left[ a_{mn}^l N_{mn}^{(3)}(\rho^j, \theta^j, \varphi^j) + b_{mn}^l M_{mn}^{(3)}(\rho^j, \theta^j, \varphi^j) \right] \quad (2.18)$$

$$H_{indidente}^j = \frac{k}{\omega \mu_0} \sum_{n=0}^{N^l} \sum_{m=-n}^n E_{mn} \left[ b_{mn}^l N_{mn}^{(3)}(\rho^j, \theta^j, \varphi^j) + a_{mn}^l M_{mn}^{(3)}(\rho^j, \theta^j, \varphi^j) \right] \quad (2.19)$$

donde los coeficientes  $a$  y  $b$  están dados por:

$$a_{mn}^l = a_n^{*l} p_{mn}^l; b_{mn}^l = b_n^{*l} Q_{mn}^l \quad (2.20)$$

donde  $a_n^{*l}$  y  $b_n^{*l}$  son los coeficientes de dispersión de Mie de la  $l$  – ésima esfera aislada mientras que  $p_{mn}^l$  y  $Q_{mn}^l$  son los coeficientes de la expansión del campo incidente total sobre la esfera  $l$  – ésima y contienen dos contribuciones: la onda plana incidente inicial y las ondas dispersadas por todas las otras esferas del agregado. Hallar los coeficientes  $p_{mn}^l$  y  $Q_{mn}^l$ , implica a su vez hallar los coeficientes de translación vectorial  $A_{mn\mu\nu}^{jl}$  y  $B_{mn\mu\nu}^{jl}$ . Estos últimos, juegan un papel clave porque caracterizan la transformación de una onda dispersada por la  $j$  – ésima esfera en una onda incidente sobre la  $l$  – ésima esfera. Estos coeficientes pueden ser expresados explícitamente utilizando, a su vez, los coeficientes de Gaunt, los que pueden obtenerse mediante una relación de recurrencia. Luego de haber obtenido todos los coeficientes de dispersión parciales, el próximo paso es construir una única representación para el campo dispersado total por el agregado como un todo. Este paso es de vital importancia hacia una solución completa de la dispersión de luz por múltiples esferas. Si por ejemplo, se hace común el sistema

de coordenadas primario  $j$  –ésimo, la expansión única del campo dispersado tiene la forma:

$$E_{scat}^t = \sum_{n=1}^{N_{max}} \sum_{m=-n}^n iE_{mn} \left[ a_{mn}^t N_{mn}^{(3)}(\rho^j, \theta^j, \varphi^j) + b_{mn}^t M_{mn}^{(3)}(\rho^j, \theta^j, \varphi^j) \right] \quad (2.21)$$

$$H_{indidente}^j = \frac{k}{\omega \mu_0} \sum_{n=0}^{N_{max}} \sum_{m=-n}^n iE_{mn} \left[ b_{mn}^t N_{mn}^{(3)}(\rho^j, \theta^j, \varphi^j) + a_{mn}^t M_{mn}^{(3)}(\rho^j, \theta^j, \varphi^j) \right] \quad (2.22)$$

existe una relación simple entre los coeficientes de dispersión total y parciales para el campo lejano, la cual implica solamente un término de fase. Esto se debe a que la traslación de armónicos esféricos entre sistemas desplazados tiene una forma asintótica correcta, válida en la zona lejana, dada por las ecuaciones:

$$M_{mn}^{(3)}(\rho^j, \theta^j, \varphi^j) = e^{-ik\Delta^l} M_{mn}^{(3)}(\rho^j, \theta^j, \varphi^j) \quad (2.23)$$

$$N_{mn}^{(3)}(\rho^j, \theta^j, \varphi^j) = e^{-ik\Delta^l} N_{mn}^{(3)}(\rho^j, \theta^j, \varphi^j) \quad (2.24)$$

donde  $\Delta^l = X' \sin\theta \cos\varphi + Y' \sin\theta \sin\varphi + Z' \cos\theta$ . De esta manera, los coeficientes de dispersión total en la ecuación (2.20) están dados por:

$$a_{mn}^{(t)} \sum_{l=1}^L e^{-ik\Delta^l} a_{mn}^l; b_{mn}^t = \sum_{l=1}^L e^{-ik\Delta^l} b_{mn}^l \quad (2.25)$$

Nótese que, en este caso también, los valores de  $a_{mn}^{(t)}$  y  $b_{mn}^t$  dependen de las propiedades del medio y del material que compone la esfera, las cuales a su vez dependen de  $\omega$ . Basados en expresiones analíticas para la matriz de amplitud de dispersión de un agregado de partículas, han sido derivadas fórmulas rigurosas para todas las otras propiedades de dispersión del agregado. La sección transversal de extinción total  $\sigma_{ext}$  del agregado está dada por:

$$\sigma_{ext} = \sum_{l=1}^L \sigma_{scat}^l = \frac{4\pi}{k^2} \sum_{l=1}^L \sum_{n=1}^{N^l} \sum_{m=-n}^n Re (p_{mn}^{l*} a_{mn}^l + q_{mn}^{l*} b_{mn}^l) \quad (2.26)$$

donde  $\sigma_{scat}^l$  es la contribución de la  $l$  – ésima componente, es decir, la sección transversal de extinción diferencial de la  $l$  – ésima esfera. La sección transversal de dispersión total y diferencial,  $\sigma_{scat}^l$  y  $\sigma_{scat}^l$ , están dadas por:

$$\sigma_{ext} = \sum_{l=1}^L \sigma_{scat}^l = \frac{4\pi}{k^2} \sum_{l=1}^L \sum_{n=1}^{N^l} \sum_{m=-n}^n Re (a_{mn}^{l*} a_{mn}^{(t)l} + b_{mn}^{l*} b_{mn}^{(t)l}) \quad (2.27)$$

la sección transversal de absorción puede calcularse como  $\sigma_{abs} = \sigma_{ext} - \sigma_{scat}$ , de todas maneras  $\sigma_{abs}$  puede también formularse explícitamente. Así, las tres secciones transversales pueden ser computadas independientemente. La diferencia entre los dos resultados numéricos de  $\sigma_{abs}$  puede servir como un test para la precisión de la solución numérica de dispersión. Es importante destacar que la forma en que se calculan las diferentes secciones eficaces permite analizar la respuesta óptica individual de cada una de las esferas que componen el agregado. Esta solución ha sido implementada en un código Fortran para calcular la dispersión producida por un agregado de esferas homogéneas cuando interacciona con una onda plana monocromática y linealmente polarizada que se propaga en un medio no absorbente y homogéneo. Cuando se emplea esta

metodología, al igual que en el caso de la esfera aislada, la propiedades del material son introducidas en el cálculo mediante una tarjeta de entrada, la cual contiene los valores de la parte real e imaginaria de su constante dieléctrica para cada valor de  $\omega$ . Un aspecto importante a tener en cuenta cuando se emplean estas metodologías analíticas es el valor máximo de  $n$  hasta el cual se extienden las sumatorias en las ecuaciones  $\alpha_0 = \frac{\varepsilon(\omega) - \varepsilon_0}{\varepsilon(\omega) + 2\varepsilon_0}$ ,  $\sigma_{scat} = (8\pi/3)4|\alpha|^2$ , (2.26) y (2.27).

Si bien al tratarse de soluciones analíticas los tiempos computacionales de cálculo son relativamente cortos (del orden de los minutos), se encontró que cuando  $n = 30$  los resultados obtenidos alcanzan una convergencia satisfactoria.

## Referencias

1. Turkevich, J.; Stevenson, P. C.; Hillier, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Disc. Faraday Soc.* 1951, 11, 55-75.
2. Fraire, J. C.; Pérez, L. A.; Coronado, E. A. Rational Design of Plasmonic Nanostructures for Biomolecular Detection: Interplay between Theory and Experiments. *ACS Nano* 2012, 6, 3441–3452.
3. Fraire, J. C.; Pérez, L. A.; Coronado, E. A. Cluster Size Effects in the SERS Response of Ag and Au Nanoparticle Aggregates: Experimental and Theoretical Insight. *J. Phys. Chem. C* 2013, 117, 23090–23107.
4. Sperling, R. A.; Parak, W. J. Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles. *Phil. Trans. R. Soc. A* 2010, 368, 1333–1383.
5. Fraire, J. C.; Motrich, R.; Coronado, E. A. Design of a Novel Plasmonic Nanoconjugated Analytical Tool for Ultrasensitive Antigens Quantification. *Nanoscale*, **2016**, 8, 17169-17180.
6. Garcia, E, et al., *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* 2005, Vol 17 No5.
7. Williams, D. B.; Carter, C. B. Transmission electron microscopy. *Springer*,(2009).
8. Michel, P.; Sacha, B.; FranCoise, D.; Yves P. Comparison between functional and solution states as determined by infrared spectroscopy. *FEBS Letters*. Volume 299, Issue 3,1992,.247-250.
9. Y. Popineau, S. Bonenfant, M. Cornec, M. Pezolet, A Study by Infrared Spectroscopy of the Conformations of Gluten Proteins Differing in their Gliadin and Glutenin Compositions, *Journal of Cereal Science*, Volume 20, Issue 1, 1994, 15-22.
10. Francesco, S.; Nicoletta G. ATR-FT/IR Study on the Interactions between Gliadins and Dextrin and Their Effects on Protein Secondary Structure. *J. Agric. Food Chem.*, 2005, 53 (5), pp 1757–1764.
11. Andreas Barth, Infrared spectroscopy of proteins, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, Volume 1767, Issue 9, 2007,1073-1101.
12. Código Alimentario Argentino. Año 2004. Capítulo XVII. Art. 1383.
13. C. P. Sandiford, A. S. Tatham, R. Fido, J. A. Welch, M. G. Jones, R. D. Tee, P. R. Shewry, A. J. Newman Taylor. Identification of the major water/salt insoluble wheat proteins involved in cereal hypersensitivity. *Clinical and Experimental Allergy*. 1997, volume 27, 1120-1129.
14. Freedman A, R, Galfre G, Gal E, Ellis H, J, Ciclitira P, J, Western Immunoblotting of Cereal Proteins with Monoclonal Antibodies to Wheat Gliadin to Investigate Coeliac Disease. *Int Arch Allergy Immunol* 1988, 85:346-350
15. Matsuo, H., Kohno, K. and Morita, E. (2005), Molecular cloning, recombinant expression and IgE-binding epitope of  $\omega$ -5 gliadin, a major allergen in wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *FEBS Journal*, 272: 4431–4438.

16. Mie, G. Beiträge zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metallösungen. *Ann. d. Phys.* 1908, 25, 377-445.
17. Stein, S. Addition theorems for spherical wave functions. *Quart. Appl. Math.* 1961, 19, 15-24.
18. Cruzan, O. R. Translation addition theorems for spherical vector wave function. *Quart. Appl. Math.* 1962, 20, 33-40.
19. Xu, Y. I. Electromagnetic scattering by an aggregate of spheres. *Appl. Opt.* 1995, 34, 4573-4588.
20. Xu, Y. I. Electromagnetic scattering by an aggregate of spheres: far field. *Appl. Opt.* 1997, 36, 9496-9508. Xu, Y. I. Electromagnetic scattering by an aggregate of spheres: asymmetry parameter. *Phys. Lett. A* 1998, 249, 30-36.
21. Xu, Y. I.; Gustafson, B. A. S.; Giovane, F.; Blum, J.; Tehranian, S. *Phys. Rev. E* 1999, 60, 2347-2365.
22. Bohren, C. F.; Huffman, D. R. *Absorption and Scattering of Light by Small Particles*. Wiley Science Paperback Series, New York (1998).
23. Xu, Y. I.; Gustafson, B. A. S. A generalized multiparticle Mie-solution: further experimental verification. *JQSRT*. 2001, 70, 395-419.

## Capítulo 3

### Diseño de un biosensor de nanoesferas de plata (IDILA) aplicado para la detección y cuantificación de gliadina.

#### 3.1 Introducción

Un biosensor es un dispositivo analítico para el análisis de diversos tipos de materiales, permitiendo convertir una respuesta utilizando un detector fisicoquímico. Este tipo de sensores consiste básicamente en un transductor que puede ser del tipo óptico, electroquímico o piezoeléctrico y un elemento de reconocimiento específico para el analito a detectar.

En las últimas dos décadas, el desarrollo de sensores ópticos ha sido un área fascinante y en constante crecimiento ya que son capaces de realizar la detección remota y de proporcionar detección múltiple dentro de un solo dispositivo. En particular, el desarrollo de este tipo de biosensores, incluye la detección mediante quimioluminiscencia, fluorescencia, absorción de luz y dispersión, reflectancia, y resonancia plasmónica superficial (sensores LSPR)<sup>1</sup>.

Recientemente el grupo de trabajo de Bio-nanoplasmónica del INFIQC; desarrolló una novedosa técnica basada en la disminución de la intensidad del espectro de extinción de NPs por Inmunoabsorción o intensity depletion immuno-linked assay (IDILA) para la detección de varios antígenos.

El ensayo de IDILA está basado en la respuesta óptica de una dispersión coloidal de nanoesferas de Ag y la fuerte interacción con el sistema estreptavidina-biotina-HPDP combinado con la capacidad altamente específica de reconocimiento biomolecular de las inmunoglobulinas (Ig). Al agregar un anticuerpo biotinilado a una suspensión de Ag NSs previamente funcionalizada con STV-Biot se favorece la formación de nanoestructuras diméricas lo que se traduce espectralmente en una disminución de la intensidad del espectro de extinción. Sin embargo, la adición de pequeñas cantidades de antígeno específico inhibe la formación de dímeros que se traduce en una respuesta óptica diferente

permitiendo la construcción de una curva de calibración y detección del analito de interés<sup>2</sup>.

Lo que se propone en esta tesis es demostrar la aplicabilidad de esta novedosa metodología "IDILA" para la detección ultrasensible y específica de gliadina en alimentos considerados como "libres de gluten".

Para la lectura de la señal, se utilizó un espectrómetro de UV-Vis común en el rango de 300 a 1100 nm y se evaluó la aplicabilidad del método utilizando el mismo equipamiento que el requerido para realizar el ensayo ELISA es decir un lector de microplacas. Se demostró que IDILA es más sensible, menos costoso, requiere volúmenes más pequeños de muestra y menores tiempos.

Esta técnica de detección está basada en las propiedades ópticas de campo lejano ya que, debido a la extrema sensibilidad de la LSPR a pequeños cambios en el la forma, tamaño y entorno químico de las NPs de metales nobles, especialmente Ag y Au, resultan de gran utilidad para su aplicación para la detección y cuantificación de analitos en muy bajas concentraciones.

Como se discutió en el capítulo 1, la forma, tamaño, tipo de metal y entorno químico que rodea a la NP afectan a la posición espectral de la LSPR<sup>3</sup>. Para esta tesis la respuesta óptica diferenciada que se observa espectralmente cuando se tiene un dímero con respecto a la de 2 monómeros, se traduce en una disminución en la intensidad del espectro de extinción a medida que se forman NEs diméricas en presencia de un anticuerpo biotinilado<sup>3</sup>. Esta propiedad permite la detección sin ninguna perturbación de la señal debido a la inmovilización de los reactivos o reacciones enzimáticas no controladas.

A la hora de pensar en desarrollar un biosensor hay que tener en cuenta la factibilidad, especificidad, detección rápida y sensible. Actualmente el ensayo ELISA es la técnica analítica homologada por el código alimentario Argentino para la detección de gluten en alimentos<sup>4</sup>.

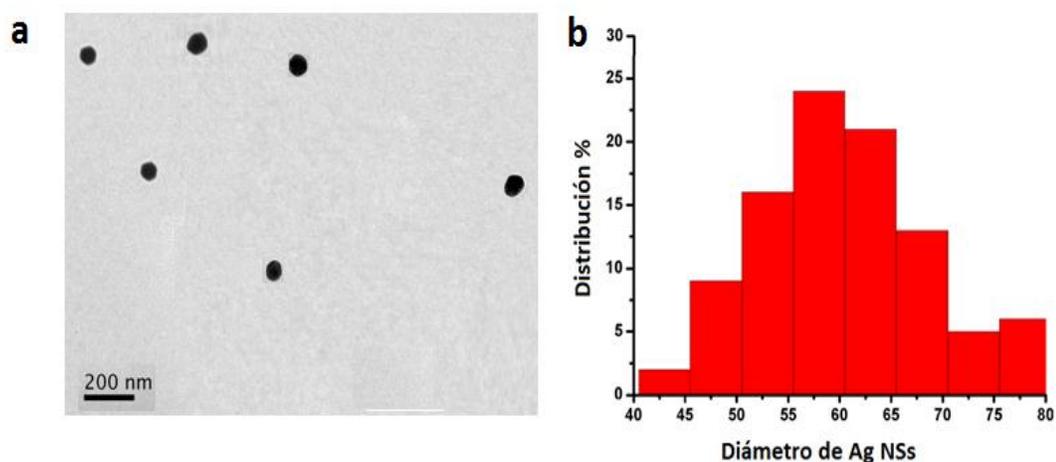
Este inmunoensayo utiliza el concepto básico de inmunología de la unión de un antígeno a su anticuerpo específico, lo que permite la detección de cantidades muy pequeñas de antígenos en un fluido (ver capítulo 2, sección 2.7.1). Sin embargo, la metodología ELISA posee ciertas limitaciones debido a la unión no específica a la placa o a la reacción de cambio de color mediada por enzimas, que podrían conducir a resultados falsos positivos. Por otra parte, esta técnica utiliza grandes cantidades de reactivos utilizados en el proceso de inmovilización en la placa, y requiere varios pasos de lavado e incubación que consumen mucho tiempo<sup>5,7</sup>. Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar plataformas genéricas, precisas capaces de efectuar una cuantificación rápida y específica de los antígenos sin necesidad de equipos costosos que puedan ser utilizados en cualquier laboratorio de análisis de alimentos. En ese sentido, los ensayos que utilizan NPs tienen el potencial de ser usados para detectar procesos con niveles de sensibilidad y localización sin precedentes<sup>8,20</sup>.

## 3.2 Resultados y Discusión.

### 3.2.1 Síntesis y caracterización morfológica-óptica de nanopartículas de Ag

La síntesis de Ag NSs se efectuó utilizando método de Turkevich (ver capítulo 2 sección 2.2).

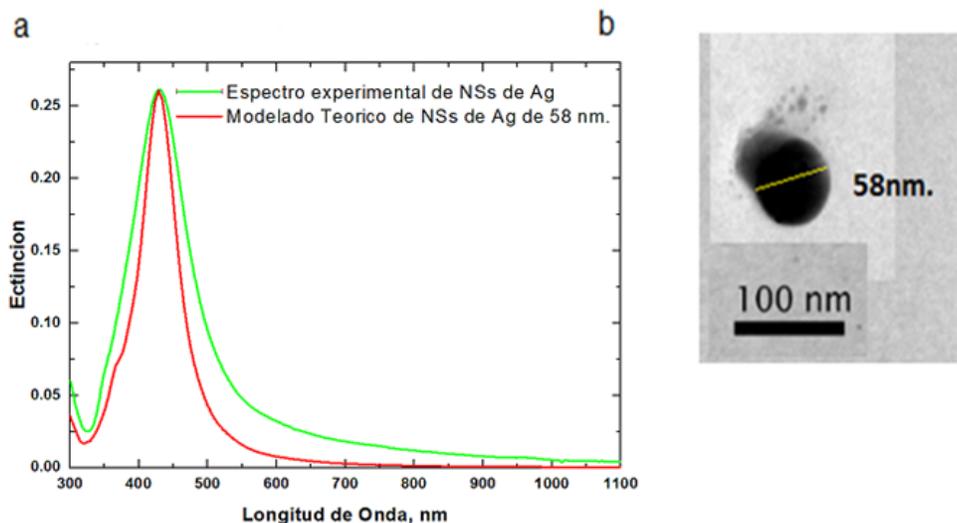
La caracterización morfológica de las NPs de Ag fabricadas se efectuó mediante la obtención de imágenes TEM. La figura 3.1 A es una imagen representativa de las NPs fabricadas donde se puede observar que tienen una geometría aproximadamente esférica y un tamaño uniforme. La muestra se diluyó previamente a su siembra en la grilla TEM con el fin de no observar agregados por efecto de la evaporación del solvente. Para conocer la distribución y tamaño promedio de las Ag NSs se efectuó la estadística de las fotos TEM. La figura 3.1B muestra el porcentaje de distribución de tamaño de 98 NPs de Ag. Para conocer el diámetro promedio y la dispersión de tamaño, se efectuó un ajuste gausseano a la figura 3.1B. El valor de diámetro promedio es de  $58 \pm 7$  nm.



**Figura 3.1:** A. Imagen representativa de las NPs de Ag fabricadas. B Histograma de la polidispersión de NPs de Ag sintetizadas por el método de Turkevich. El diámetro promedio de las NPs de Ag es de  $58 \pm 7$  nm.

El espectro de extinción de las NPs sintetizadas (espectro en verde en la Figura 3.2), conjuntamente con una imagen TEM representativa de las mismas se muestra en la figura 3.2. El máximo del espectro de extinción se observó a una longitud de onda  $\lambda = 430$  nm. Los cálculos de modelado utilizando la teoría de Mie, son consistentes con un diámetro promedio de 58 nm (espectro en rojo en la Figura 3.2) y con el tamaño promedio que se observa en las imágenes TEM.

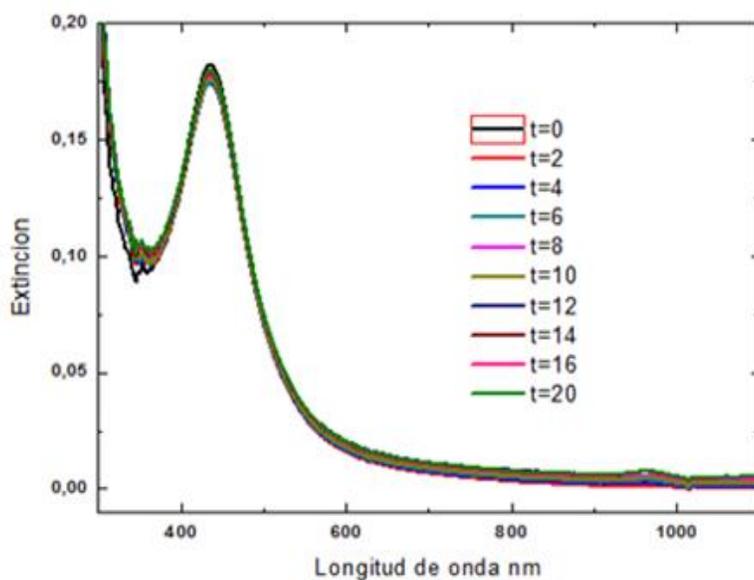
A partir de la intensidad del máximo del espectro de extinción experimental (0.26) y utilizando la  $\sigma_{ext}$  calculada con la teoría de Mie para este diámetro (58nm) la  $\sigma_{ext} = 2.88 \times 10^{-10} \text{ cm}^2$ , la concentración de NPs fue determinada a partir de la ley de Beer  $I(E) = \sigma_{ext} \cdot b \cdot c$ , con un paso óptico de 1 cm de celda resultó una concentración de NPs,  $C = 9.03 \times 10^{-11} \text{ M}$ .



**Figura 3.2:** a. Espectro experimental y simulación electrodinámica mediante la teoría de Mie para nanopartículas de plata con un promedio de 58 nm de diámetro. b. Imagen TEM de una nanoesfera de plata de 58nm.

### 3.2.2 Funcionalización de nanopartículas de Ag

Una vez funcionalizadas las Ag NSs (Capítulo 2, sección 2.3) se analizó la estabilidad de las mismas. Como se puede apreciar en la figura 3.3 la funcionalización de las NPs con STV-Biot no afecta la estabilidad de la suspensión coloidal, el espectro de extinción tomado a distintos intervalos de tiempo (hasta un tiempo de 20 minutos) no experimenta cambios significativos en su intensidad ni tampoco un desplazamiento de la posición del máximo espectral durante el transcurso del tiempo.



**Figura 3.3:** Estabilidad en función del tiempo de 1 mL de solución coloidal de Ag NSs de 58 nm con una concentración de  $9.03 \times 10^{-11}$  M funcionalizadas con STV-Biot en relación molar 1:1:1

### 3.2.3 Formación de dímeros de Ag

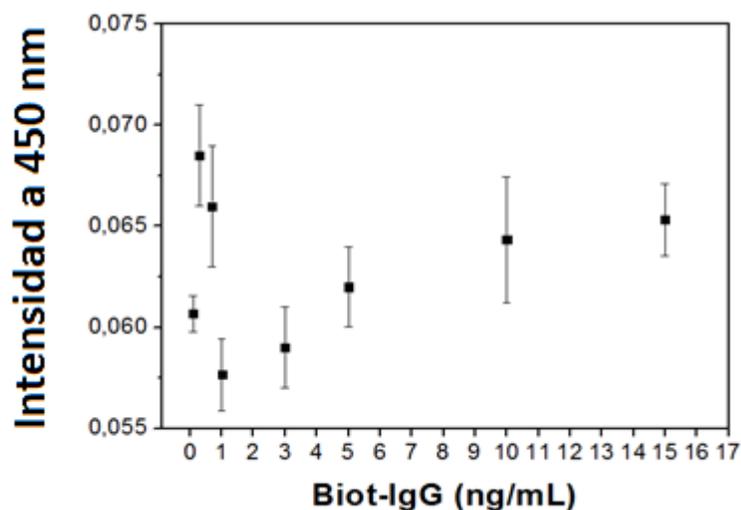
Una vez funcionalizadas las NPs de Ag el siguiente paso consistió en formar aglomerados controlados (dímeros) agregando distintas cantidades de IgG-Biot (Ls Bio). Uno de los requisitos para poder formar las estructuras diméricas es que el anticuerpo se encuentre biotinilado para pueda interactuar con la STV de la NP. Por este motivo se realizó la compra de la IgG ya biotinilada por el fabricante con varias moléculas de biotina en el fragmento de cristalización del anticuerpo (LS Bio) <sup>21</sup>.

Como se mencionó anteriormente la presencia de IgG-Biot induce la formación de NEs diméricas, lo que se evidencia espectralmente por una disminución de la intensidad del espectro de extinción.

Para llevar a cabo la formación de dímeros se realizaron dos diferentes tipos de experimentos.

En el primer tipo de ensayos las mediciones se efectuaron utilizando las mismas microplacas que se utilizan para realizar el ensayo ELISA, mezclando en diferentes pocillos distintas concentraciones de anticuerpo IgG-Biot antigliadina llevando a un volumen de 100  $\mu$ l/pocillo mediante el agregado de PBS1X-BSA5% y luego agregando la dispersión de NPs de Ag previamente funcionalizadas hasta llegar a un volumen final de 200  $\mu$ l/pocillo. La lectura de la intensidad de extinción fue tomada al cabo de 27 minutos en un lector de microplacas utilizando una longitud de onda  $\lambda=450$ nm. Los resultados obtenidos, que se muestran en la figura 3.4 evidencian que a medida que aumenta la concentración de IgG-Biot la intensidad disminuye hasta llegar a un mínimo que corresponde a una cantidad de 1 ng/mL de anticuerpo. Este tramo de la curva corresponde, según lo discutido anteriormente al proceso de formación de dímeros. A partir de esta concentración, a medida que aumenta la cantidad de IgG-Biot también aumenta la intensidad registrada hasta llegar a una concentración de anticuerpo máxima  $\sim 5$  ng/mL donde los valores de intensidad no cambian significativamente. En estas

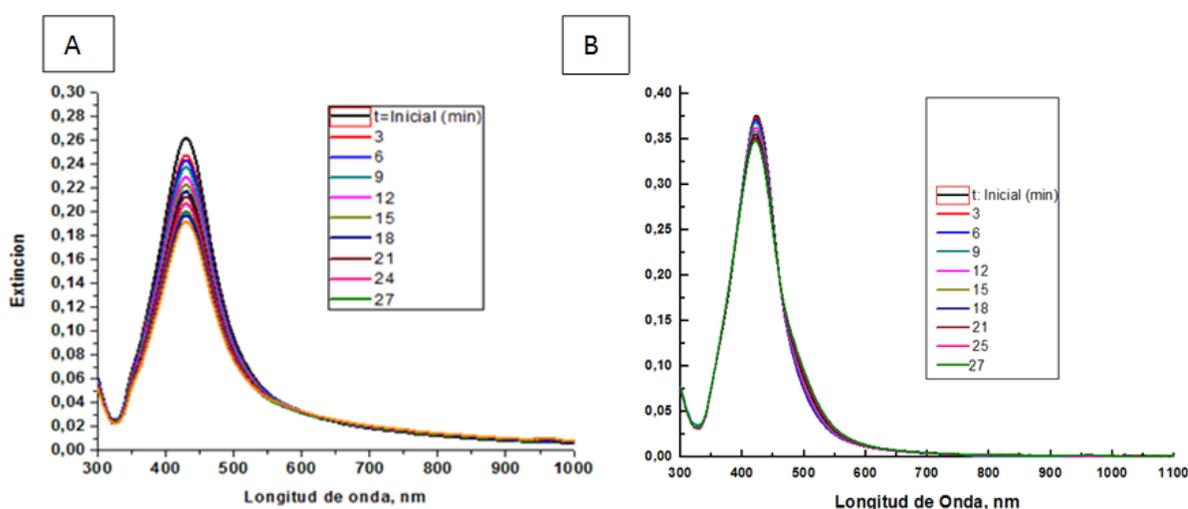
condiciones la concentración de IgG-Biot es tan alta que la mayor parte de los sitios de unión disponibles de las moléculas de STV que se encuentran en la superficie de las Ag NSs están unidos a moléculas de IgG-Biot individuales, por lo que se inhibirá la formación de dímeros.



**Figura 3.4:** Variación de la intensidad de extinción de Ag NSs a una longitud de onda de 450 nm en un lector de microplacas en función de las diferentes concentraciones de IgG-Biot agregadas, al cabo de 20 minutos de transcurrida la reacción.

El segundo tipo de experimentos realizados consistió en seguir la evolución del espectro de extinción global en función del tiempo frente al agregado de distintas concentraciones de antígenos, utilizando un espectrofotómetro UV-Vis convencional. La cinética de dimerización se siguió durante un tiempo de 27 minutos utilizando para cada experimento diferentes concentraciones de anticuerpo biotinilado suplementado con PBS1x-BSA5% hasta llegar a un volumen de 0.5 mL y la misma cantidad de NPs previamente funcionalizadas hasta alcanzar volumen final de 1 mL. Los resultados de estos experimentos se muestran en la figura 3.5 A y B para dos concentraciones diferentes de anticuerpo, a modo ilustrativo. En ambos casos, la disminución de la intensidad de extinción evidencia la formación de dímeros. Sin embargo, es evidente que el grado de

disminución de esta intensidad depende de la concentración de anticuerpo. Cuando se emplean 1 ng/mL y 3 ng/mL de de IgG-Biot, al cabo de 27 minutos la disminución en la intensidad del espectro de extinción es de 0.07 y 0.03 u.a. respectivamente. Esto indica que la formación de dímeros se ve más favorecida utilizando la menor concentración de anticuerpo. Este resultado está de acuerdo con lo observado en los ensayos efectuados en las microplacas y su interpretación es idéntica.

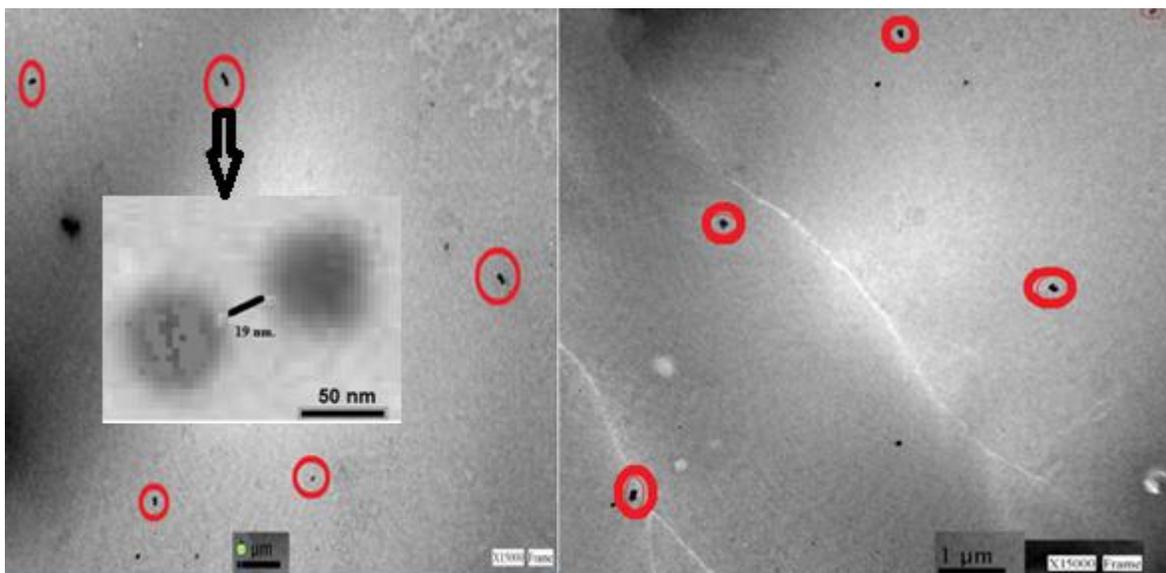


**Figura 3.5:** A. Evolución espectral de 0.5mL de las Ag NSs previamente funcionalizadas en presencia de 1 ng/mL de IgG-Biot anti-glucanase. B. Evolución espectral de 0.5mL de Ag NSs previamente funcionalizadas en presencia de 3 ng/mL de IgG-Biot anti-glucanase.

Tanto en los experimentos realizados en microplacas como en los espectrofotométricos utilizando celdas de cuarzo, indicaron que la concentración de anticuerpo en la que la formación de dímeros se encuentra más favorecida es de 1 ng/mL. Esta concentración de anticuerpo fue la elegida como la “óptima” y es la que se utilizará en todos los experimentos posteriores.

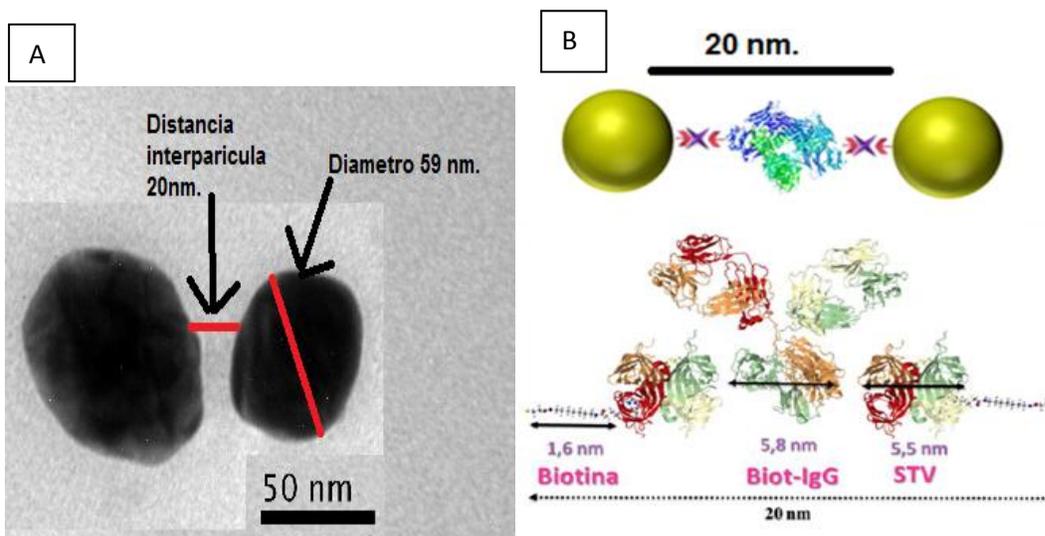
### 3.2.4 Caracterización morfológica y óptica de las estructuras diméricas.

La caracterización morfológica de las estructuras formadas ante el agregado de 1 ng/mL de Biot-IgG al cabo de de 27 minutos de iniciada la reacción se efectuó mediante microscopía electrónica de trasmisión (TEM). Para ello se sembró en un grilla TEM una alícuota de la dispersión coloidal lo suficientemente diluida para evitar procesos de agregación in situ de las nanoestructuras formadas en la dispersión coloidal, que se puedan generar sobre la grilla por efectos evaporación y difusión de los agregados. En la figura 3.6 se muestra una imagen TEM representativa de las nanoestructuras formadas. Se puede observar que la estructura predominante es la de dímeros de NPs de Ag, con una proporción menor de nanoesferas aisladas.



**Figura 3.6** Imagen TEM representativa de las nanoestructuras formadas luego de 30 minutos del agregado de 1 ng/mL IgG-Biot anti gliadina a la dispersión coloidal de Ag NSs. Nótese el predominio de de estructuras diméricas frente a otros tipos de nanoestructuras (NSs aisladas, trímeros o aglomerados de mayor número de Ag NSs).

Otra información de interés que revelan las imágenes TEM obtenidas es que se puede aproximadamente determinar es la distancia interpartícula promedio de los dímeros formados. Como se observa en la imagen TEM esta distancia es del orden de 20 nm (Figura 3.7 A). Este resultado concuerda con la distancia que se puede estimar a partir de la geometría molecular del puente molecular que une los dímeros. En la figura 3.7 B se esquematizan las distancias calculadas para el sándwich formado por las moléculas Biotina – STV – Biot-IgG – STV – Biotina que resulta en un valor de distancia interpartícula de  $\approx 20$  nm.



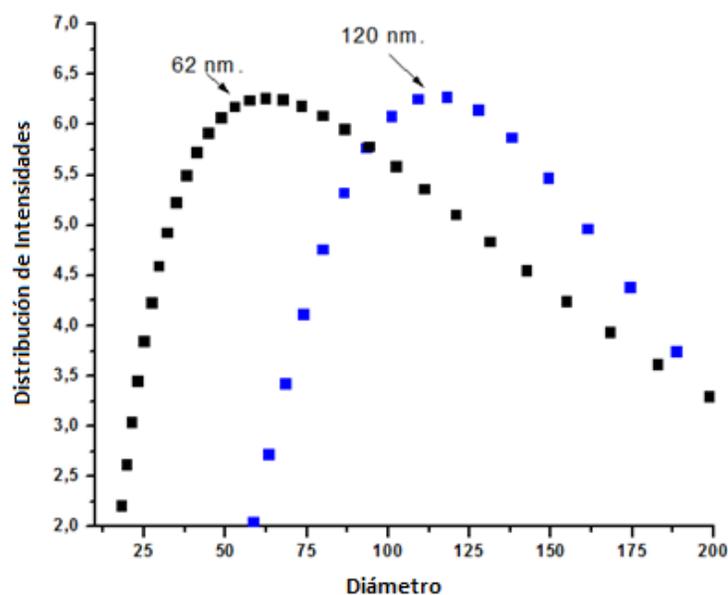
**Figura 3.7:** A. Imagen TEM de los dímeros de Ag NSs formados luego de 30 minutos del agregado de 1 ng/mL IgG-Biot anti gliadina. B. Esquema de la distancia interpartícula estimada para el puente molecular que une las Ag NSs formado por el “sándwich” Biotina – STV – Biot-IgG – STV – Biotina.

La microscopía TEM evidencia claramente la formación de nanoestructuras diméricas de nanoesferas de Ag. Otra forma complementaria que permite caracterizar ópticamente la formación de dímeros en suspensión es mediante la utilización de la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS). Esta técnica, como se mencionara en el capítulo 2 sección 2.6.3 permite medir el radio hidrodinámico de las NEs presentes en la muestra. Cabe destacar que esta técnica no nos permite conocer las dimensiones geométricas de las NPs ya que lo que mide es el

radio hidrodinámico, que está determinado por la dinámica del movimiento browniano de las NPs en la dispersión. Sin embargo permite estimar los cambios en las dimensiones promedio de las nanoestructuras formadas antes y después del agregado del antígeno.

La distribución de intensidades DLS de la dispersión coloidal de Ag NSs (espectro negro, Figura 3.8) evidencia un máximo para un diámetro promedio de 62 nm que concuerda significativamente con el tamaño calculado de las NPs utilizando la teoría de Mie.

La distribución de intensidades DLS después del agregado de 1 ng/mL de IgG-Biot a la suspensión de NPs al cabo de los 27 minutos (espectro azul, figura 3.8), evidencia claramente un desplazamiento del máximo de la distribución hacia mayores diámetros (120 nm). Estos experimentos, conjuntamente con las imágenes TEM permiten corroborar de manera concluyente que la adición controlada de IgG-Biot induce la formación de dímeros.



**Figura 3.8:** Espectro de la distribución de intensidad en función del diámetro de las NPs. La distribución con símbolos en negro representa las NPs de Ag antes del agregado del anticuerpo mientras que la distribución con símbolos azules corresponde a la obtenida a los 27 minutos del agregado de 1 ng/mL de IgG-Biot a las NPs de Ag.

### 3.2.5 Comparación entre los experimentos y las simulaciones teóricas.

Otra forma complementaria de corroborar e interpretar en forma rigurosa las observaciones experimentales observadas, es mediante la simulación teórica de los espectros de extinción obtenidos, teniendo como información los datos de las geometrías de las distintas nanoestructuras observadas, el material que las constituye y el medio en el que están inmersas. El modelado electrodinámico se efectuó utilizando la teoría de Mie (para las Ag NSs aisladas) y la Teoría de Mie Generalizada para Múltiples Partículas (para los dímeros de esferas de Ag).

En todos los cálculos se consideró que las NPs están dispersas en agua ( $n=1.33$ ) y que el diámetro promedio de las NPs es 58 nm.

El primer interrogante que surge es comprender por qué la formación de dímeros se evidencia espectralmente como una disminución en la intensidad del espectro de extinción. La simulación teórica utilizando la teoría de Mie para un monómero de Ag se muestra en la curva negra de figura 3.9.A, dando como resultado un valor de  $\sigma_{ext} = 2.88 \times 10^{-10} \text{ cm}^2$ . Por otra parte la suma de los espectros de dos monómeros Ag aislados (separados a distancias muy grandes) resulta como es de esperar en un valor igual al doble  $\sigma_{ext} = 5.76 \times 10^{-10} \text{ cm}^2$  (línea azul de la figura 3.9.A). Ahora consideremos el caso en que los dos monómeros de Ag ya no se encuentran aislados sino que hay una distancia entre sus centros geométricos de 78 nm (radio monómero 1 = 29 nm + distancia interpartícula 20 nm + radio monómero 2 = 29 nm). Como se adelantara en el “capítulo I”, en este caso la interacción entre las NPs para esta distancia es relativamente débil por lo que no se observará un desdoblamiento de la banda espectral, como se puede ver en la línea negra de la figura 3.9 A. Sin embargo la sección eficaz promedio del dímero, calculada utilizando la Teoría de Mie Generalizada para Múltiples Partículas es de  $\sigma_{Ext} 4.35 \times 10^{-10} \text{ cm}^2$ . Esta sección eficaz se debe calcular tomando el promedio de las secciones eficaces para las distintas orientaciones del campo electromagnético respecto al eje que une las NPs, ya que los dímeros

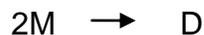
están continuamente rotando en la dispersión coloidal. Una muy buena aproximación para calcular este promedio es tomar el promedio ponderado de las secciones eficaces para cada orientación del campo eléctrico, i.e:  $\sigma_{Ext} = \frac{1}{3}\sigma_x + \frac{1}{3}\sigma_y + \frac{1}{3}\sigma_z$ ; donde los subíndices indican la orientación del campo eléctrico.

Este menor valor de la  $\sigma_{Ext}$  del dímero comparada con la de los dos monómeros de Ag aislados y teniendo en cuenta que la distancia interpartícula es lo suficientemente grande para que no se observe un desdoblamiento de la banda espectral de extinción es uno de los factores que explica porqué al estar generándose estructuras diméricas se observa una disminución en la intensidad del espectro de extinción. Otro factor es que el número total de NPs disminuye debido a la formación de dímeros, respecto a la concentración inicial de NPs.

La comparación directa entre los experimentos (línea rosa) y los cálculos de modelado (línea verde) para el espectro de extinción de Ag NSs aisladas (sin la adición de IgG-Biot) muestra correlación, como se puede observar en la figura 3.9 B, utilizando una concentración de NPs de  $9.03 \times 10^{-11}$  M (obtenida en el “capítulo III Sección Síntesis de NPs de Ag”).

Para poder efectuar una comparación entre el espectro experimental y el modelado teórico a los 27 min del agregado de 1 ng/mL de IgG-Biot, no es tan directa, ya que se requiere conocer la fracción de dímeros formada a este tiempo.

Sea el proceso en el que dos monómeros M dan un dímero D:



Si se denota la concentración inicial de M (concentración inicial de NPs de Ag) como  $[NPs]_i$ , la concentración total de partículas (monómeros más dímeros) y la fracción de dímeros a tiempo  $t$  como  $[NPs]_t$  y  $f_d = \frac{[D]_t}{[NPs]_t}$  respectivamente, teniendo en cuenta la estequiometría del proceso, la  $[NPs]_t$  se puede expresar en función de la  $[NPs]_i$  como:

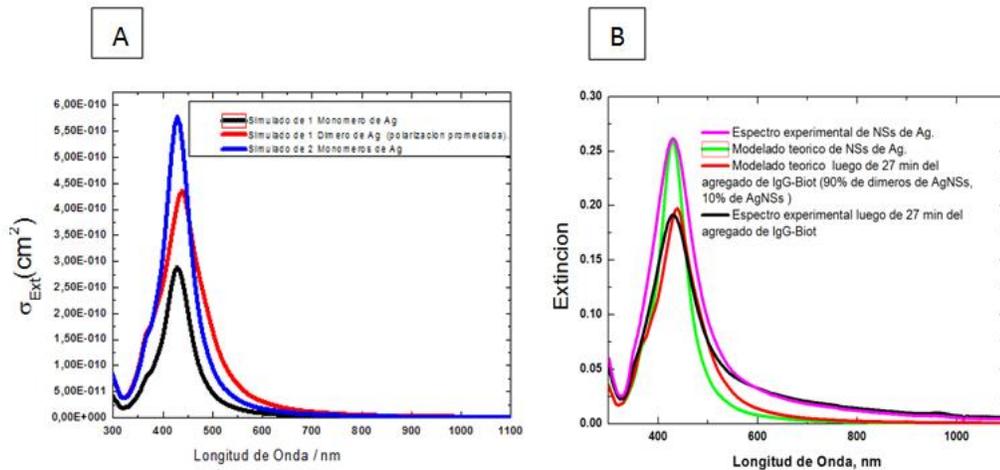
$$[NPS]_t = [NPS]_i \left( \frac{1-f_d}{1+f_d} \right) + [NPS]_i \left( \frac{f_d}{1+f_d} \right) \quad (3.1)$$

por lo que la extinción a un dado tiempo  $t$  estará dada por la siguiente expresión:

$$E_t = [NPS]_i \left( \frac{1-f_d}{1+f_d} \right) \sigma_m + [NPS]_i \left( \frac{f_d}{1+f_d} \right) \sigma_d \quad (3.2)$$

donde  $E_t$  es la extinción a un tiempo  $t$ ,  $\sigma_m$  es la sección eficaz de extinción de los monómeros y  $\sigma_d$  la sección eficaz de extinción de los dímeros

Partiendo de la expresión anterior, para efectuar el cálculo, la única variable desconocida es la fracción de dímeros. Variando sistemáticamente esta fracción hasta hacerla coincidir con la intensidad de extinción experimental, se encontró que  $f_d = 0.9$ . Usando esta valor de  $f_d$  se puede apreciar una excelente correlación entre los cálculos de modelado (línea roja, figura 3.9 B) y el espectro experimental (línea negra, figura 3.9 B) obtenido a los 27 minutos luego de la adición de 1 ng/mL de IgG-Biot.



**Figura 3.9:** A. Modelado teórico utilizando la teoría de Mie y teoría de Mie generalizada para múltiples partículas de la sección eficaz de 1 monómero (línea negra), 2 monómeros (línea azul) y 1 dímero con polarización promediada (línea roja), para explicar el fenómeno de la disminución de la intensidad de extinción cuando se forman estructuras diméricas. B. Simulación teórica en función de la extinción de Ag NSs y dímeros comparada con los espectros experimentales obtenidos teniendo en cuenta un 90% de NEs diméricas y un 10% de monómeros.

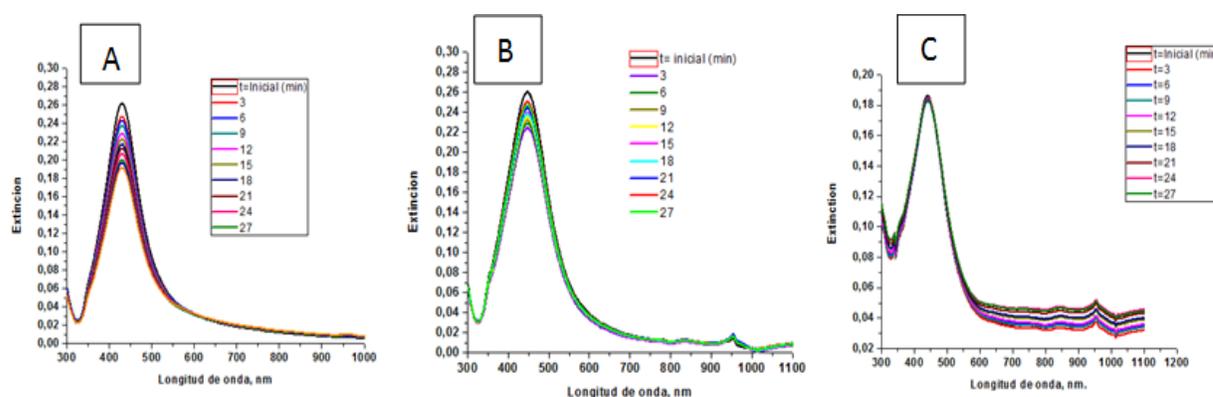
### **3.2.6 Inhibición de la formación de dímeros en presencia del antígeno para gliadina.**

En esta sección se verificará experimentalmente si la formación de dímeros se encuentra inhibida ante la presencia de un antígeno. La razón por la cual la presencia de este, inhibe la formación de estructuras diméricas aun es desconocida y constituye actualmente un objeto de estudio. No obstante, se consideran hipotéticamente dos mecanismos que podrían explicar este hecho. El primero se debe a que la presencia del antígeno produce un cambio conformacional en la estructura del anticuerpo dejando a la biotina en una posición inaccesible para interactuar con la estreptavidina de la NP. El segundo se debe a un impedimento estérico debido a la presencia del antígeno impidiendo la interacción de la biotina de la IgG con la estreptavidina de la NP. Para ello se realizaron experimentos en presencia del anticuerpo específico para gliadina como del antígeno. La inhibición de la formación de NEs diméricas quedará evidenciada espectralmente por una menor disminución de la intensidad de extinción.

Para llevar a cabo estos experimentos se seleccionó la concentración óptima de IgG-Biot que favorezca la formación de dímeros que es de 1ng/mL según lo analizado en secciones anteriores. Una vez seleccionada esta concentración optima, se utilizó un espectrofotómetro convencional en el intervalo de 300-1100 nm y una cubeta de cuarzo con 0.5 mL de Ag NSs previamente funcionalizadas y se agregaron diferentes concentraciones de antígeno. Posteriormente se agrego 1 ng/mL de IgG-Biot y se completó un volumen de 1 mL con PBS1x-BSA5%. La señal se midió por un tiempo de 27 minutos.

Como se analizó anteriormente, en ausencia de antígeno, se observa una disminución en la intensidad del espectro de extinción indicando la formación de dímeros, la cual es máxima a un tiempo de 27 min (la figura 3.10 A). Cuando el mismo experimento es llevado a cabo con el agregado de 5 pg/mL de antígeno, (figura 3.10 B) los resultados obtenidos indican que aunque hay una disminución en la intensidad del espectro de extinción, la disminución de la misma a un tiempo

de 27 minutos es significativamente menor comparada con el mismo ensayo realizado en ausencia de antígeno (figura 3.10 A). Este hecho indica que la formación de dímeros si bien no se encuentra totalmente inhibida, se encuentra disminuida. Si el mismo experimento se efectúa con la adición de 15 pg/mL de antígeno (figura 3.10 C) no se evidencian cambios significativos en la intensidad del espectro de extinción. En estas condiciones de concentración de antígeno la formación de dímeros se encuentra totalmente inhibida.



**Figura 3.10:** A Evolución espectral para un tiempo de 27 minutos de Ag NSs de 58 nm previamente funcionalizadas con STV-Biot con el agregado de 1ng mL de IgG-Biot y sin añadir antígeno. B Evolución espectral para un tiempo de 27 minutos de Ag NSs de 58 nm previamente funcionalizadas con STV-Biot con el agregado de 5 pg/mL de antígeno y 1ng mL de IgG-Biot. C. Evolución espectral para un tiempo de 27 minutos de Ag NSs de 58 nm previamente funcionalizadas con STV-Biot con el agregado de 15 pg/mL de antígeno y 1ng mL de IgG-Biot.

Esta serie de experimentos efectuados con distintas concentraciones de antígeno, evidencian que se produce un cambio en la respuesta óptica dependiendo de la concentración de antígeno. Esta propiedad permitiría, en principio, elaborar una curva de calibración y la posterior cuantificación de las muestras problema.

En las secciones que continúan se detallará cómo efectuamos el análisis de gliadina en muestras reales y la validación de la técnica con la metodología estándar ELISA.

### **3.3 Análisis de muestras problema.**

En esta sección se detalla cómo se llevó a cabo la detección y cuantificación específica de gliadina aplicando la metodología IDILA en muestras problema de harina de maíz y almidón de maíz.

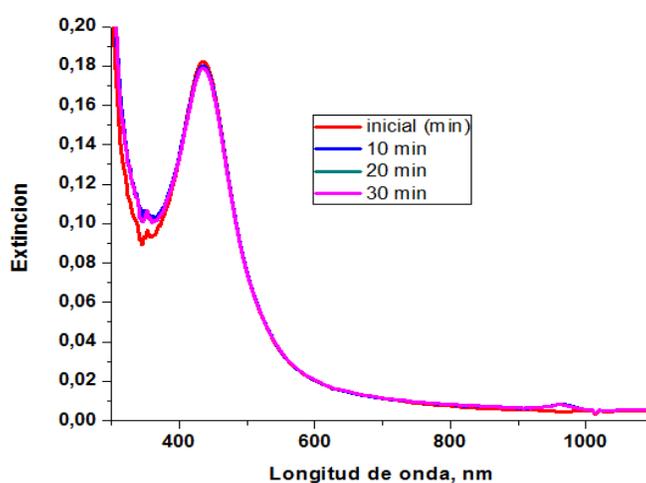
Uno de los principales objetivos en el área de desarrollo de biosensores es lograr la detección específica y ultra sensible de distinto tipo de analitos de interés que las técnicas convencionales no pueden lograr. Partiendo de antecedentes del grupo de trabajo donde se demuestra que la metodología IDILA tiene un menor límite de detección que la técnica ELISA para antígenos de interés clínico<sup>2</sup>. Elegimos este tipo de muestras de interés alimenticio por dos razones. La primera fue determinar si la técnica IDILA es capaz de detectar y cuantificar gliadina en harina y almidón de maíz donde la presencia del antígeno se debe a la contaminación de la muestra ya que se lo considera un alimento libre de gluten. La segunda razón para esta elección fue para estudiar los límites de detección de la técnica IDILA y compararlos con el ensayo ELISA con el fin de poder cuantificar y detectar cantidades del antígeno que la técnica convencional no logra hacer.

Para llevar a cabo lo anteriormente mencionado, en una primera instancia, se procedió a la extracción del analito de las muestras problema con una solución de alcohol al 60%, el protocolo de extracción se encuentra detallado en el capítulo 2 “Materiales y Métodos”.

#### **3.3.1 Estabilidad de las NPs de Ag y corroboración de la extracción de gliadina.**

Para determinar la estabilidad de las Ag NSs en presencia de alcohol al 60% y PBS1X-BSA5% se realizaron ensayos mezclando 0.5 mL de Ag NSs previamente funcionalizadas, adicionando un volumen de 0.1 mL de una solución de alcohol al 60 % en agua que fue suplementado con 0.4 mL de PBS-BSA 5% para llegar a un volumen final de 1 mL. El experimento se llevó a cabo durante 30

minutos en un espectrofotómetro en el intervalo de 1100 a 300 nm utilizando una cubeta de plástico. La figura 4.0 muestra que no se aprecian cambios en la intensidad del espectro de extinción ni tampoco desplazamientos del máximo de extinción, lo que indica que las partículas son estables frente a la presencia de alcohol y buffer. Los resultados de estos ensayos son de relevancia crucial ya que los experimentos que se realizan en microplacas para el análisis de muestras problema utilizan ambos compuestos en cantidades proporcionalmente similares a las utilizadas en estos ensayos.



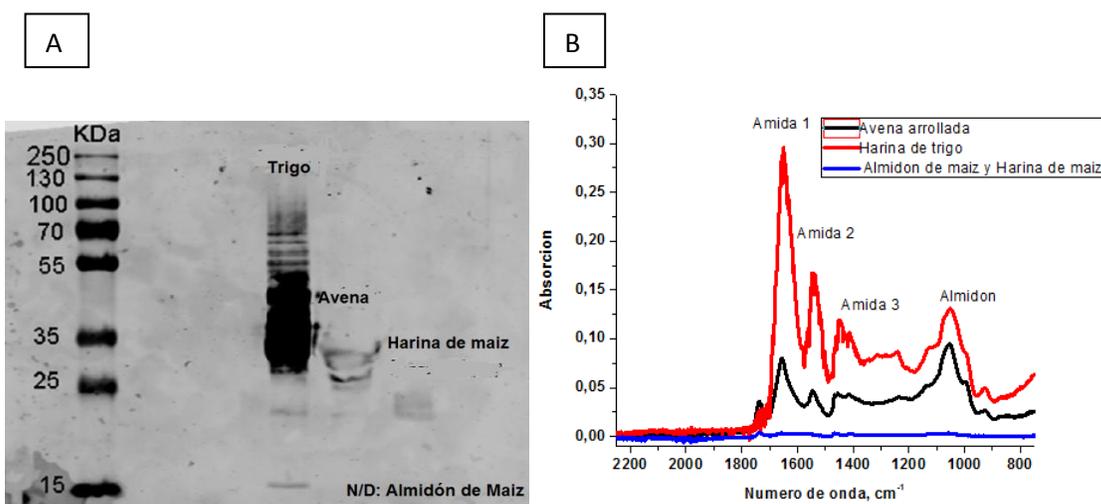
**Figura 4.0:** Espectro Uv-Vis que muestra la estabilidad de Ag NSs en presencia de una solución de alcohol al 60%. Se utilizó un volumen de 0.5ml de partículas 0.4 ml de PBS1X-BSA 5% y 0.1 ml de alcohol en una cubeta de plástico.

Para corroborar la correcta extracción de gliadina de las muestras problema se realizó un ensayo Western Blot y una medición por espectroscopía Infrarroja medida por transformada de Fourier con reflectancia total atenuada (Figura 4.1). Ambas técnicas y procedimientos utilizados se encuentran detallados en el capítulo 2 “Materiales y Métodos”.

En la figura 4.1 A. se detalla la imagen obtenida a partir del western Blot realizado. En la columna izquierda se encuentra el marcador de peso molecular en KDa y en las columnas siguientes distintos tipos de muestras, en particular los resultados de la extracción en muestras que son de nuestro interés como harina de maíz y almidón. En la muestra de harina se puede apreciar que se ha

detectado una fracción de proteínas a un peso molecular de alrededor de 25 KDa que concuerda con el peso de una fracción del complejo de gliadina. Para la muestra de almidón de maíz esta técnica no logra detectar la presencia del complejo de gliadina debido a la baja concentración de la misma en esta muestra.

En la figura 4.1 B. se detalla el espectro IR-ATR obtenido una vez evaporada las muestras. En esta figura se observan las bandas amida características de las proteínas, así como la banda del almidón para las muestras de avena arrollada y harina de trigo, pero no se puede apreciar ninguna banda característica de las proteínas para las muestras de almidón de maíz y harina de maíz debido a la baja concentración de gliadina de las mismas.



**Figura 4.1:** A Western Blot para la determinación de gliadina, la primera columna es el marcador de peso molecular (rango de KDa de gliadina 30-50), la segunda columna representa el contenido extraído de gliadina para harina de trigo, la tercera para Avena y la cuarta para Harina de maíz, el contenido de Almidón de maíz es tan bajo que por medio de esta técnica no ha podido ser revelado. B. Espectro FT-IR ATR para harina de trigo, de maíz, avena y almidón de maíz donde se encuentran diferenciadas las bandas amida 1° ( $1650\text{ cm}^{-1}$ ), 2° ( $1550\text{ cm}^{-1}$ ), 3° ( $1450\text{ cm}^{-1}$ ) correspondiente a estructuras proteicas y la banda del almidón ( $1050\text{ cm}^{-1}$ ).

Los resultados obtenidos muestran que el método de extracción del complejo de gliadina es eficaz en muestras de avena y trigo, mientras que para la harina de maíz y el almidón de maíz ninguna de estas técnicas es lo

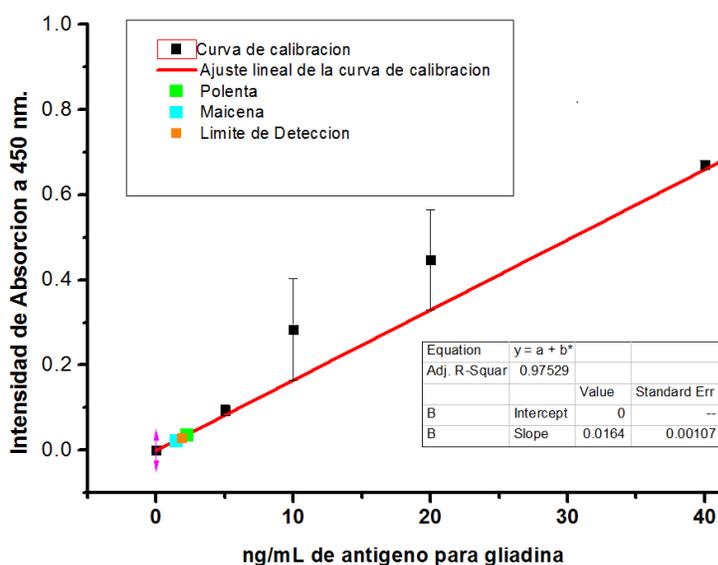
suficientemente sensible para determinar la presencia de gliadina ya que se espera que sean pequeñas cantidades.

Por lo tanto, para cuantificar el contenido de gliadina en estas muestras se debe requerir un método con un LOD muy pequeño. Las técnicas IDILA o ELISA, que tienen menor LOD parecen ser, en principio, adecuadas para este propósito.

### 3.3.2 Ensayo ELISA tipo Sándwich

Los detalles del ensayo ELISA han sido detallado previamente (ver capítulo 2 “Materiales y Métodos”).

Los resultados obtenidos utilizando esta técnica se muestran en la figuras 4.2 y la tabla 4.3. De la curva de calibración, se determinó que el límite de detección (LoD) es de 1.82 ng/mL de gliadina- Para calcular este valor se utilizó como es usual, la medida de intensidad de blanco más 3 desviaciones estándar. La curva de calibración se ajusta a una función lineal con un valor de desviación cuadrática media de 0.97.



**Figura 4.2:** Curva de calibración del ensayo ELISA realizado para muestras de almidón de maíz y harina de maíz. Con un LoD de 1.82 ng/mL, se observa que los valores detectados para almidón de maíz están por debajo del LoD y la cantidad hallada para harina de maíz es de  $2,2 \pm 0,1$  ng/mL.

La concentración de gliadina en las muestras problema se determinó a partir de la curva de calibración (curva roja figura 4.2). Para las muestras de harina de maíz la técnica logra cuantificar valores que están por encima del LoD, del orden de  $2,2 \pm 0,1$  ng/mL. Para las muestras de almidón de maíz, se obtuvieron valores que están por debajo del LoD. Por lo tanto la cantidad de gliadina en estas muestras no es cuantificable. Los errores en las concentraciones determinadas se obtuvieron calculando la desviación estándar a partir del promedio de 3 repeticiones para cada muestra.

**Tabla 4.3:** Resultados obtenidos por ensayo ELISA tipo Sandwich específico para gliadina en muestras de maicena y harina de maíz

	<b>MAICENA</b>	<b>HARINA DE MAIZ</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>N/D</b>	<b>2,2 ± 0,1 ng/mL que usando el factor de dilución correspondiente resulta en una concentración final de 4,5 ± 0,7 mg/Kg.</b>

### 3.3.3 ENSAYO IDILA

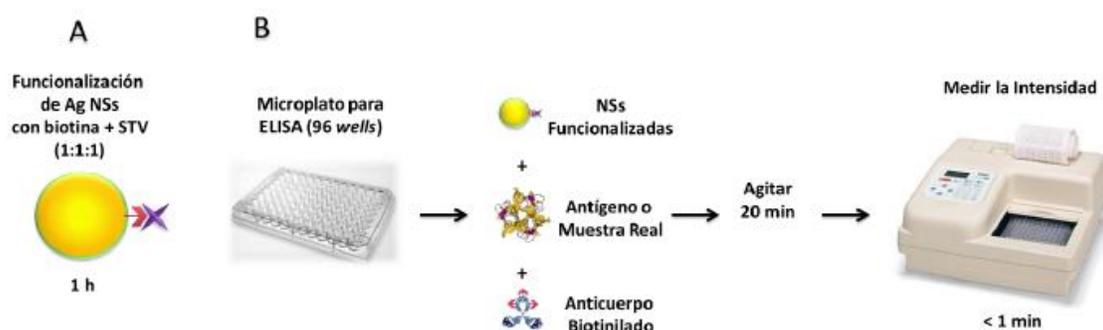
Una vez realizado el ensayo ELISA, se procedió a realizar la metodología IDILA utilizando el mismo equipamiento que el requerido por ELISA es decir una microplaca y un lector de microplacas.

Como se mencionó anteriormente, para este ensayo la concentración óptima de IgG-Biot que favorece la mayor formación de dímeros es de 1 ng/mL, utilizando Ag NSs de un diámetro promedio de 58 nm con una concentración de  $9.03 \times 10^{-11}$  M.

Para la construcción de la curva de calibración, se añadió una cantidad específica de IgG-Biot (1 ng / mL) por pocillo y diferentes cantidades de antígeno de gliadina en diluciones seriadas (con un factor de dilución de  $\frac{1}{2}$ ). Luego se añadió las Ag NSs previamente funcionalizadas utilizando un volumen de 100  $\mu$ L/pocillo. Posteriormente se completó hasta un volumen final de 200  $\mu$ L/pocillos con buffer PBS1X-BSA5%. Finalmente la intensidad de extinción se midió al cabo de 20 minutos de realizada la mezcla, en un lector de microplacas usando un filtro de 450 nm.

Para el análisis de las muestras problema, se añadió una cantidad específica de IgG-Biot (1 ng / mL) por pocillo y diferentes cantidades de muestra problema partiendo de una dilución de 10:1000 de la extracción realizada previamente (ver capítulo 2 “Materiales y Métodos”) a la que posteriormente se le realizaron diluciones seriadas (con un factor de dilución de  $\frac{1}{2}$ ) en cada pocillo de la microplaca. Luego se agregó directamente la suspensión de Ag NSs previamente funcionalizadas en una cantidad de 100  $\mu$ L/pocillo, para luego completar un volumen final de 200  $\mu$ L/pocillo con buffer PBS1X-BSA5%. Posteriormente la intensidad fue medida al cabo de unos 20 minutos de realizada la mezcla en un lector de microplacas usando un filtro de 450 nm (ver figura 4.4).

El blanco se realizó utilizando un volumen de 100 µL/pocillo de una solución de 1ng/ml de IgG-Biot hasta completar un volumen final de 200 µL/pocillo con buffer PBS1X-BSA5%.



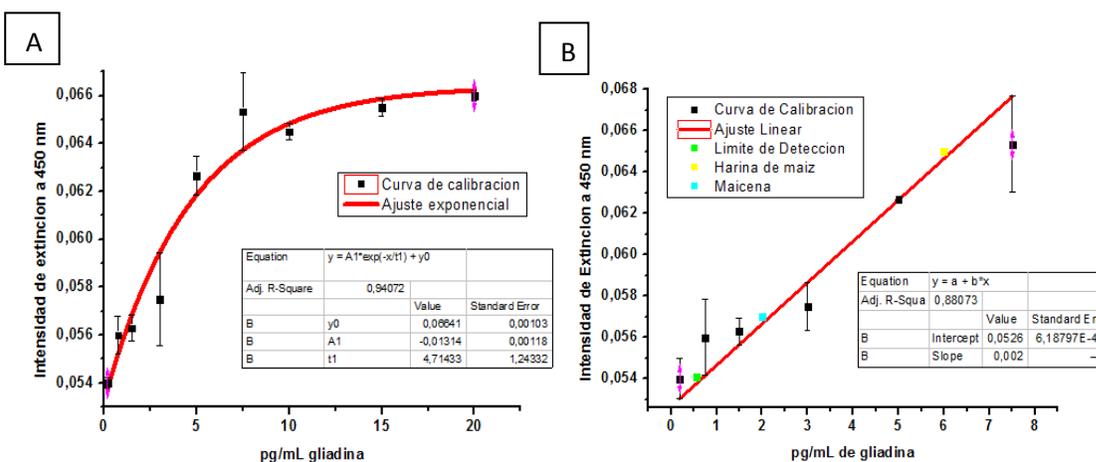
**Figura 4.4:** A. Representación esquemática de la estrategia de funcionalización de las Ag NSs con el sistema STV-Biot. B Representación esquemática del procedimiento de la técnica IDILA. Añadiendo las Ag NSs funcionalizadas en una microplaca de 96 wells conjuntamente con el anticuerpo biotinilado (IgG-Biot), el antígeno para realizar la curva de calibración y la muestra problema. Para la obtención de la curva de calibración se modifica la concentración de antígeno agregado mientras la cantidad de NSs y Biot-IgG se mantienen constantes. En todos los casos el volumen final de la solución se ajusta con buffer hasta llegar a los 200 µL.

La curva de calibración en todo el rango de concentración se ajustó a una función exponencial ( $I = -A_0e^{-bc} + I_0$ ) donde  $I$  = intensidad y  $c$  = concentración, con un valor  $R^2$  de 0,94. Sin embargo, para la cuantificación de las muestras problema se utilizó el intervalo lineal de 0 a 8 pg/mL de antígeno para gliadina de la curva de calibración exponencial y por medio de la ley de Beer se cuantificaron las muestras problema. El ajuste lineal realizado arrojó un valor  $R^2 = 0,88$

Los resultados a la hora de llevar a cabo el ensayo IDILA muestran que el LoD calculado como el blanco mas 3 desvíos estándar es de 0.55 pg/mL de gliadina. La curva de calibración obtenida es del tipo exponencial (Figura 4.5.A)

Este hecho es debido a que inicialmente, a medida que aumenta la concentración de antígeno la intensidad medida a 450 nm aumenta, ya que se está inhibiendo la formación de estructuras diméricas. Luego aumenta más lentamente hasta llegar a una concentración de antígeno tan alta que a partir de la misma y para mayores concentraciones de antígeno la formación de NEs diméricas se encuentra totalmente inhibida, por lo que no se observará ningún cambio en la intensidad.

Para la correcta cuantificación de las muestras problema, se tomó la porción inicial de la curva de calibración de 0 a 8 pg/mL y se realizó un ajuste lineal (Figura 4.5.B)



**Figura 4.5:** A. Curva de calibración experimental de IDILA para antígeno de gliadina en presencia de 1 ng/mL de anticuerpo específico para gliadina. B. Ajuste lineal de la porción de la curva comprendida entre 0-8 pg/mL de antígeno de la curva experimental y resultados experimentales en muestras reales de harina de maíz y maicena.

Los valores cuantificados una vez realizado el ajuste lineal de la curva de calibración, y como se puede ver en la tabla 4.6 muestra que los resultados obtenidos para harina de maíz están en gran concordancia con el valor calculado a la hora de realizar el ensayo ELISA. Un aspecto importante a considerar es que el ensayo IDILA fue capaz de cuantificar una pequeña cantidad de gliadina en la muestra de almidón de maíz, que se encuentra por encima del LoD del ensayo

realizado y que el ensayo ELISA no fue capaz de detectar. Los desvíos estándar fueron tomados como el promedio de 3 repeticiones para cada muestra.

**Tabla 4.6** Resultados obtenidos para el ensayo IDILA específico para gliadina en muestras de maicena y harina de maíz.

	<b>MAICENA</b>	<b>HARINA DE MAIZ</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>2 ± 0.5 pg/mL que usando el factor de dilución correspondiente, da una concentración final de 0.1 ± 0.08.mg/Kg</b>	<b>6 ± 1 pg/mL que usando el factor de dilución correspondiente, resulta en una concentración final de 3 ± 1 mg/Kg.</b>

### 3.3.4 Comparación entre IDILA VS ELISA

La comparación entre ambos ensayos se puede analizar en términos de dos aspectos; El primero corresponde a la información relacionada a la cuantificación de antígeno en muestras reales. Primero hay que destacar que la técnica IDILA es una técnica que permite la detección de muy bajas concentraciones de antígeno utilizando factores de dilución del orden de 1000 veces mayor a los que se utilizan en el ensayo ELISA. Como se puede observar en la tabla 4.7 los resultados muestran que para la cuantificación de harina de maíz hay una gran concordancia entre los valores obtenidos entre ambas

metodologías. Por otra parte el ensayo IDILA para la muestra de almidón de maíz logro detectar una pequeña cantidad de gliadina mientras que la técnica de ELISA no fue capaz de detectar la presencia de antígeno.

**Tabla 4.7:** Comparación de los resultados obtenidos para IDILA (usando 1 ng/mL de anticuerpo específico de gliadina) y ELISA.

<b>RESULTADOS</b>	<b>MAICENA</b>	<b>HARINA DE MAIZ</b>
<b>ELISA</b>	<b>N/D</b>	<b>4,5 ± 0,7 mg/Kg.</b>
<b>IDILA</b>	<b>0.1 ± 0.08 mg/Kg.</b>	<b>3 ± 1 mg/Kg.</b>

El segundo aspecto está relacionado a la comparación de los parámetros analíticos de los valores obtenidos para las curvas de calibración entre ambas técnicas. Nótese que a la hora de realizar el análisis de los parámetros analíticos de la técnica IDILA sólo se tuvo en cuenta la porción lineal de la curva de calibración exponencial.

Para analizar este aspecto, como se puede apreciar en la tabla 4.8 cuando se compara las sensibilidades de ambas técnicas, la técnica IDILA demostró tener una sensibilidad 10000 veces mayor que el ensayo ELISA. En lo que respecta a límite de detección, la técnica IDILA demostró tener un límite de detección 10000 veces menor que ELISA, mientras que el límite de cuantificación calculado como la suma entre el blanco mas diez desvíos estándar resultó ser 1000 veces menor para IDILA respecto a ELISA.

**Tabla 4.8:** Parámetros analíticos de IDILA vs ELISA.

	<b>IDILA 58 nm (pg/mL)</b>	<b>ELISA (ng/mL)</b>
<b>Sensibilidad</b>	<b><math>(1.5 \pm 0.1) \times 10^{-3}</math></b>	<b><math>(1.6 \pm 0.1) \times 10^{-2}</math></b>
<b>Límite de Detección</b>	<b>0.52</b>	<b>1.82</b>
<b>Límite de Cuantificación</b>	<b>2.1</b>	<b>4.87</b>

### **3.4 Perspectivas de la técnica IDILA**

Esta novedosa metodología diseñada por nuestro grupo de trabajo, fue aplicada anteriormente para determinar artritis reumatoide. En esta tesis de maestría se demostró su aplicabilidad para la detección específica y de muy bajas concentraciones de gliadina logrando un LoD de detección 10000 veces mayor que ELISA. La validación del método se demostró contrastándolo con la técnica ELISA, logrando una gran concordancia entre las cantidades detectadas por ambas técnicas. La capacidad de IDILA de detectar cantidades picomolares de gliadina en muestras de maicena, donde el ELISA no logró registrar ninguna señal de antígeno presente, muestra el gran potencial de esta metodología. Otro punto a destacar de esta técnica es su factibilidad: este biosensor tiene un tiempo de ejecución de alrededor de sólo dos horas incluyendo la preparación de antígenos y respectivas diluciones de reactivos, siendo más rápido y simple que ELISA. Además se emplean utilizando los mismos materiales que ELISA como un lector de microplacas y microplacas tradicionales de 96 wells. Este hecho permite efectuar este ensayo con instrumentación de uso común en laboratorios de análisis de alimentos. Otra ventaja de IDILA es que tiene un menor costo debido a que se utilizan menores cantidades de antígeno para realizar la curva de calibración ya que trabaja en concentraciones de pg/mL con respecto a ELISA que detecta cantidades de ng/mL

## Referencias

1. Sepulveda, B.; Angelome, P. C.; Lechuga, L. M.; Liz-Marzan, L. M. LSPR-based Nanobiosensors. *Nano Today*. 2009, 4, 244-251.
2. Fraire, J. C.; Motrich, R.; Coronado, E. A. Design of a Novel Plasmonic Nanoconjugated Analytical Tool for Ultrasensitive Antigens Quantification. *Nanoscale*, **2016**, 8, 17169-17180.
3. Kelly, K. L., Coronado, E. A., Zhao, L. L. & Schatz, G. C. The optical properties of metal nanoparticles: the influence of size, shape, and dielectric Environment. *J. Phys. Chem. B* 107, 668–677 (2003).
4. Código Alimentario Argentino. Año 2004. Capítulo XVII. Art. 1383.
5. Leng, S. X.; McElhaney, J. E.; Walston, J. D.; Xie, D.; Fedarko, N. S.; Kuchel, G. A. ELISA and Multiplex Technologies for Cytokine Measurement in Inflammation and Aging Research. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 2008, 63, 879–884.
6. Gan, S. D.; Patel, K. R. Enzyme Immunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *J. Invest. Dermatol.* 2013, 133, 1-3.
7. Baker, G.; Lajtha, A.; Dunn, S.; Holt, A. Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology: Practical Neurochemistry Methods Ch. 8 (Springer Science, New York, 2007).
8. Fraire, J. C.; Masseroni, M. L.; Jausoro, I.; Perassi, E. M.; Diaz Añel, A. M.; Coronado, E. A. Identification, Localization, and Quantification of Neuronal Cell Membrane Receptors with Plasmonic Probes: Role of Protein Kinase D1 in Their Distribution. *ACS Nano*. 2014, 8, 8942– 8958.
9. Wang, J.; Yu, X.; Boriskina, S. V.; Reinhard, B. M. Quantification of Differential ErbB1 and ErbB2 Cell Surface Expression and Spatial Nanoclustering Through Plasmon Coupling. *Nano Lett.* 2012, 6, 3231–3237.
10. Wang, J.; Boriskina, S. V.; Wang, H.; Reinhard, B. M. Illuminating Epidermal Growth Factor Receptor Densities on Filopodia Through Plasmon Coupling. *ACS Nano* 2011, 5, 6619-6628.
11. Rong, G. X.; Wang, H. Y.; Skewis, L. R.; Reinhard, B. M. Resolving Sub-diffraction Limit Encounters in Nanoparticle Tracking Using Live Cell Plasmon Coupling Microscopy. *Nano Lett.* 2008, 8, 3386–3393.
12. Crow, M. J.; Grant, G.; Provenzale, J. M.; Wax, A. Molecular Imaging and Quantitative Measurement of Epidermal Growth Factor Receptor Expression in Live Cancer Cells Using Immunolabeled Gold Nanoparticles. *Am. J. Roentgenol.* 2009, 192, 1021–1028.

13. Aaron, J.; Travis, K.; Harrison, N.; Sokolov, K. Dynamic Imaging of Molecular Assemblies in Live Cells Based on Nanoparticle Plasmon Resonance Coupling. *Nano Lett.* 2009, 9, 3612–3618.
14. De la Rica, R.; Stevens, M. M. Plasmonic ELISA for the Ultrasensitive Detection of Disease Biomarkers with the Naked Eye. *Nature Nanotechnology.* 2012, 7, 821-824.
15. Rodriguez-Lorenzo, L.; De la Rica, R.; Álvarez-Puebla, R. A.; Liz-Marzán, L. M.; Stevens, M. M. Plasmonic Nanosensors with Inverse Sensitivity by Means of Enzyme- Guided Crystal Growth. *Nature Materials.* 2012, 11, 604-607.
16. Mayilo, S.; Kloster, M. A.; Wunderlich, M.; Lutich, A.; Klar, T. A.; Nichtl, A.; Kürzinger, K.; Stefani, F. D.; Feldmann, J. Long-range Fluorescence Quenching by Gold Nanoparticles in a Sandwich Immunoassay for Cardiac Troponin T. *Nano Lett.* 2009, 9, 4558-4563.
17. Tang, S; Hewlett, I. Nanoparticle-Based Immunoassays for Sensitive and Early Detection of Human Immunodeficiency Type 1 Capsid (p24) Antigen. *J. Infect. Dis.* 2010, 201, S59–S64.
18. Wang, C.; Luconi, M.; Masi, A.; Fernandez, L. Silver Nanoparticles as Optical Sensors, *Silver Nanoparticles (2010)*, David Pozo Perez (Ed.), ISBN: 978-953-307-028-5.
19. Fraire, J. C.; Pérez, L. A.; Coronado, E. A. Cluster Size Effects in the SERS Response of Ag and Au Nanoparticle Aggregates: Experimental and Theoretical Insight. *J. Phys. Chem. C* 2013, 117, 23090–23107.
20. Fraire, J. C.; Pérez, L. A.; Coronado, E. A. Rational Design of Plasmonic Nanostructures for Biomolecular Detection: Interplay between Theory and Experiments. *ACS Nano.* 2012, 6, 3441–3452.
21. Cubelos, B.; Gimenez, C.; Zafra, F.; original Hipótesis glutamatérgica de la esquizofrenia: mecanismos moleculares del transporte de glicina en las sinapsis glutamatérgicas. *An. R. Acad. Nac. Farm.*, 2006, 72: 5-25

## Conclusiones Generales

A lo largo de esta tesis se describieron en detalle las propiedades ópticas únicas de nanopartículas de metales nobles y como interaccionan con la luz. En ese sentido, se describieron de manera muy detallada los fenómenos plasmónicos que surgen de la excitación LSPR y cómo estos fenómenos pueden ser utilizados para diseñar biosensores capaces de detectar moléculas de interés biológico mediante NPs funcionalizadas con biomoléculas.

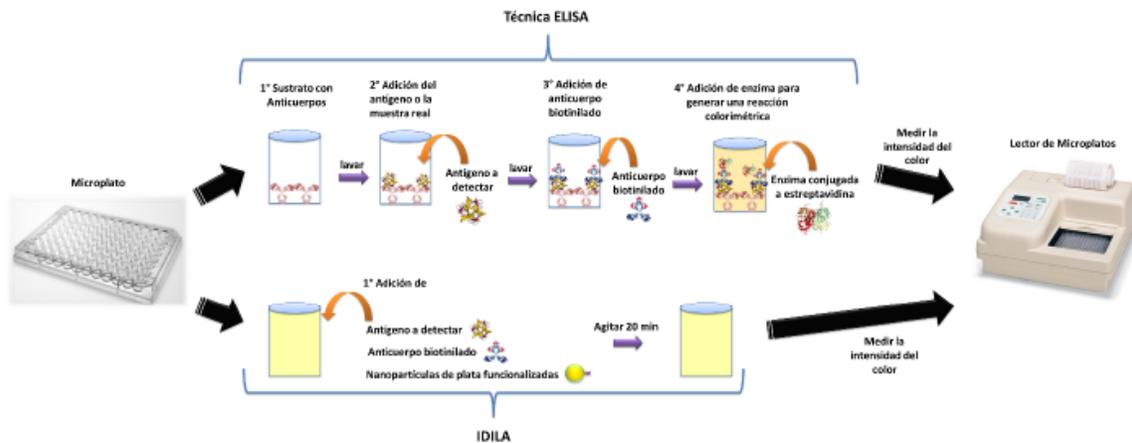
Para este trabajo hemos diseñado un biosensor ultra sensible y que no utiliza enzimas basado en la respuesta óptica de una dispersión coloidal de nanoesferas de Ag y su fuerte interacción con el sistema estreptavidina-biotina HDDP, combinado con la capacidad altamente específica de bio-reconocimiento de las inmunoglobulinas G. Si a una dispersión de Ag NSs funcionalizadas con STV-Biot se le añade una concentración previamente seleccionada de IgG-Biot se induce la formación de estructuras diméricas, lo que se evidencia experimentalmente por una disminución de la intensidad de extinción. La adición de pequeñas cantidades de antígeno específico a un tiempo donde la formación de dímeros es favorecida en ausencia del antígeno, se inhibe la formación de dímeros, provocando una menor disminución de la intensidad a medida que aumenta la concentración de antígeno hasta inhibir totalmente la formación de estructuras diméricas. Esta dependencia de la intensidad de extinción con la concentración de antígeno, permite la construcción de una curva de calibración y cuantificación de muestras problema.

Demostramos que IDILA es una técnica de formato similar a ELISA pero más rápida, simple, sensible y menos costosa, pudiéndose aplicar para detectar antígenos de relevancia alimenticia como la gliadina y con el potencial de ser usada para la detección de cualquier otro antígeno de interés biológico.

Los resultados obtenidos muestran que es un ensayo 10000 veces más sensible que la técnica ELISA, que se puede efectuar en sólo dos horas ya que no requiere de periodos de bloqueo e incubación y que es de implementación directa,

dato que utiliza instrumentación de uso común en laboratorios como microplacas de 96 wells y un lector de microplacas. Además es una técnica de mucho menor costo que ELISA debido que, al detectar menores concentraciones de antígeno, utiliza cantidades mucho menores de antígeno para realizar la curva de calibración.

Este conjunto de ventajas que presenta esta novedosa metodología, abre el camino para su posible aplicación no sólo en el área de ciencia de los alimentos sino también en otros campos como la medicina, química analítica y laboratorios que utilicen el ensayo ELISA como herramienta de cuantificación.



**Figura 5.0:** Comparación del procedimiento de los métodos ELISA e IDILA.