

PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN 2015

MEMORIA DEL PROYECTO Nº 14

1. DATOS DEL PROYECTO

Título: NanoSensor: detección y cuantificación de bacterias mediante nanopartículas magnéticas

Investigador/a/es responsable/es: José Carlos Martínez García

Tfno: 985.18.20.79

E-mail: jcmg@uniovi.es

Otros investigadores: Montserrat Rivas Ardisana, David Lago Cachón, José Ángel García Díaz, Francisco J. Carrizo Medina, Rosario Díaz Crespo y Laura Elbaile Viñuales.

Empresas o instituciones colaboradoras:

2. MEMORIA DESCRIPTIVA DEL PROYECTO

2.1. Resumen ejecutivo

Los métodos más habituales de detección de bacterias (microscopía, cultivos o amplificación genética) requieren instrumental caro y pesado o conllevan mucho tiempo de análisis en el laboratorio. Por ello, resulta especialmente interesante poner a punto un método más barato, rápido y sencillo de detección de patógenos. En esa línea, el presente trabajo consiste en el desarrollo un sistema automatizado de detección y cuantificación de entidades biológicas denominado NanoSensor, cuyo principio básico de funcionamiento fue identificado en 2013 por el equipo solicitante (*Nanotechnology* **24** 245501 2013) y cuenta con la ventaja de que el elemento sensor es extremadamente barato.

El uso del sistema NanoSensor requiere utilizar nanopartículas superparamagnéticas (NP) para el marcaje biológico de la entidad seleccionada. Este proceso de marcaje debe ser específico, lo que hace necesaria la funcionalización y correspondiente conjugación de las nanopartículas. La funcionalización permite “activar” las NP de forma que puedan detectar la entidad biológica deseada. Suele llevarse a cabo mediante la incorporación de un anticuerpo, a través de diferentes reacciones bioquímicas, que sea capaz de reconocer la entidad requerida. La conjugación, por su parte, es el proceso mediante el cual, la NP funcionalizada reconoce la entidad biológica buscada vía dicho anticuerpo.

A lo largo de este proyecto, además de establecerse los protocolos concretos para la detección de la bacteria *Escherichia coli* y del antígeno específico de próstata (*Prostate Specific Antigen*, PSA), se ha implementado un sistema tridimensional de micro-posicionamiento de la muestra biológica sobre el NanoSensor, con el objetivo de reducir la incertidumbre de las medidas y mejorar la repetibilidad del proceso.

El trabajo realizado es fácilmente generalizable para la detección de cualquier patógeno, lo que da una idea del gran número de posibles beneficiarios del sistema NanoSensor en desarrollo, tanto desde el punto de vista de la explotación (todo tipo de empresas especializadas en equipos de laboratorios de análisis) como del aprovechamiento (empresas de gestión de aguas o de alimentos, hospitales, centros de salud, etc).

2.2. Objetivos iniciales del proyecto y grado de consecución

Los objetivos concretos del proyecto son los siguientes:

- Implementar un método específico de marcaje de bacterias (en particular, *Escherichia coli*) mediante nanopartículas magnéticas.
- Desarrollar un sistema de microposicionamiento automático 3D de la muestra respecto al sensor.
- Estudiar teóricamente y simular numéricamente el circuito sensor, así como el efecto que sobre él produce la proximidad de las nanopartículas.
- Incorporar los resultados del proyecto al desarrollo del NanoSensor.

Como podrá comprobarse en los siguientes apartados, el trabajo ha excedido ampliamente sus objetivos iniciales: se han establecido (y se sigue trabajando en ellos) protocolos para la detección mediante el NanoSensor de *E. coli* y de PSA; el desarrollo del sistema de microposicionamiento automático 3D de la muestra dio lugar a un Proyecto Fin de Carreta de Ingeniería Industrial que se leyó este año; el estudio teórico y de simulación del circuito sensor fue el tema de un trabajo fin de grado de Ingeniería en Tecnologías y Servicios de Telecomunicación también defendido este año. Los resultados de todo estos trabajos se están incorporando de forma progresiva al sistema NanoSensor. Además, se han estudiado y puesto en práctica diversos métodos de síntesis de nanopartículas magnéticas para la optimización de su detección y cuantificación con el NanoSensor.

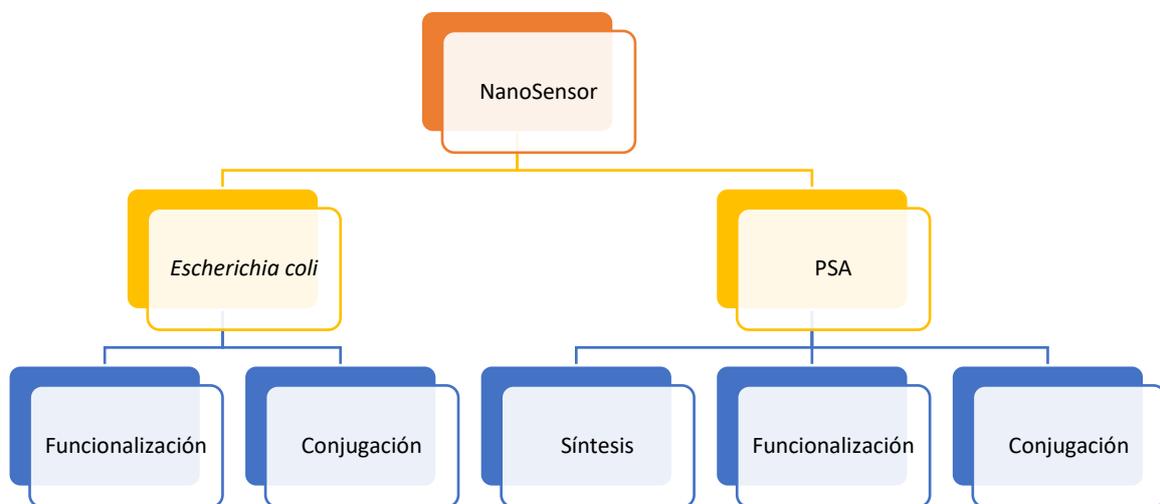


Figura 1. Esquema de los puntos claves que se desarrollaron dentro del proyecto.

2.3. Tareas realizadas

Durante el desarrollo del proyecto se establecieron diferentes metodologías que se detallan a continuación. Como esquema preliminar, la Figura 1 representa a grandes rasgos los puntos del proyecto. Como actor principal del mismo se encuentra el NanoSensor, en el que gracias a las variaciones de impedancia que provocan las nanopartículas puede obtenerse la cantidad de determinados analitos presentes en las muestras. En este caso, los dos analitos

cuantificados han sido la bacteria *Escherichia coli* y el biomarcador del cáncer de próstata comúnmente conocido como PSA. Para la consecución de estas dos metas se han establecido diferentes protocolos, en algunos casos comunes en cuanto a su planteamiento pero con particularidades específicas de cada analito. Estas tareas son la funcionalización de las nanopartículas y su conjugación con la entidad biológica deseada. Por último, en cuanto a la detección del PSA se dio un paso más allá y se intentó abarcar todo el proceso, incluyendo en lo anterior la propia síntesis de las nanopartículas.

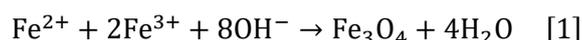
Síntesis de nanopartículas magnéticas

El primer paso del proceso es la síntesis de las nanopartículas de magnetita, que posteriormente se funcionalizarán para su uso específico. Según recoge la bibliografía [2-4] existen varios métodos para esta síntesis. Algunos de ellos se encuentran recogidos en la Tabla 1. Tanto la metodología como la tecnología de cada uno de ellos son diferentes, cada uno con sus ventajas y sus inconvenientes.

Tabla 1. Métodos descritos en la bibliografía para la síntesis de Nanopartículas magnéticas.

Métodos Físicos	Métodos Químicos
<ul style="list-style-type: none"> - Deposición en fase gas - Litografía con haz de electrones 	<ul style="list-style-type: none"> - Coprecipitación - Descomposición térmica a alta temperatura y/o reducción - Métodos electroquímicos - Métodos con fluidos supercríticos - Nanoreactores

La coprecipitación de sales de hierro es uno de los métodos que más se ha utilizado hasta la fecha, y el que se llevó a cabo en nuestro laboratorio, ya que permite la síntesis de grandes cantidades. Sin embargo, tiene como desventaja que el control del tamaño de partícula es limitado, ya que no sólo el factor cinético controla el crecimiento de la nanopartícula [2]. La reacción que tiene lugar se muestra a continuación.



En la Figura 3 se puede ver el esquema del proceso llevado a cabo para la síntesis de las nanopartículas de magnetita. Dicha síntesis se llevó a cabo en tres ocasiones: en dos de ellas se realizó en condiciones de atmósfera oxidante (O₂), mientras que en la última de ellas, el proceso se llevó a cabo en atmósfera no oxidante (N₂), para determinar el posible efecto provocado. A partir de ahora, y para referirse a las nanopartículas obtenidas se citarán como Lote I, Lote II y Lote III, en el mismo orden al citado anteriormente.

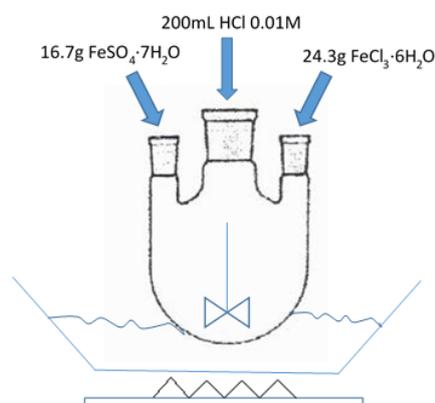


Figura 2. Dibujo esquemático del matraz de tres bocas utilizado en el proceso de síntesis.

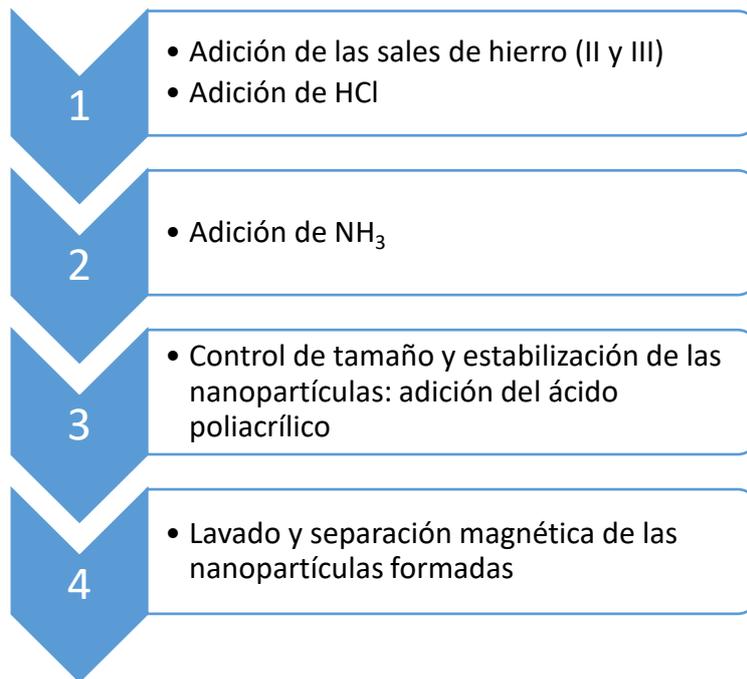


Figura 3. Esquema del proceso de síntesis de las nanopartículas llevado a cabo.

El paso crítico del procedimiento es el control del tamaño de partícula, que se lleva a cabo mediante la adición de un compuesto que se adhiere a la superficie de la nanopartícula en crecimiento e impide su progreso. En este caso, el recubrimiento utilizado fue ácido poliacrílico, que además de lograr el objetivo anterior, permitirá más adelante la correcta funcionalización de las nanopartículas.

Los últimos pasos del procedimiento son diferentes lavados con agua, a la que se añade finalmente amoníaco para obtener un pH básico que permita una buena conservación de las nanopartículas hasta su uso.

A estos tres lotes obtenidos en el laboratorio se le suma un cuarto lote fruto de una colaboración, y que fue sintetizado bajo el mismo método de coprecipitación bajo atmósfera oxidante.

Detección y cuantificación de la bacteria *Escherichia coli*

En este caso, se unió a la superficie de las nanopartículas un anticuerpo anti-E. coli, que reconoce cierta región de la membrana bacteriana, provocando la interacción.

Las nanopartículas utilizadas fueron dos nanopartículas obtenidas de dos casas comerciales diferentes, Chemicell GmbH y Nanogap SL, y ambas con diferentes recubrimientos. Las principales características de las mismas se encuentran recopiladas en la Tabla 2.

Tabla 2. Características principales de las nanopartículas utilizadas para el marcaje de *E. coli*.

	Chemicell GmbH	Nanogap SL
Denominación	FLUIDMAG – STREPTAVIDIN	NGAP10nm
Material	Magnetita en matriz de almidón	Magnetita
Recubrimiento	Estreptavidina	Ácido Poliacrílico

Diámetro	D hidrodinámico = 100 nm	10 nm ± 2.5 nm
	D núcleos magnetita = 12.3 nm ± 20%	

El recubrimiento que tiene cada una de las nanopartículas utilizadas no es el mismo, lo que implica diferentes procesos de funcionalización. Sin embargo, el esquema general seguido en los ambos casos se recoge en la Figura 4.

Sin entrar en detalles, la forma de unión entre las nanopartículas de Chemicell y el anticuerpo depende de dos factores clave: el primero es el uso de un anticuerpo secundario que se encuentra biotinilado, es decir, tiene una gran cantidad de residuos de biotina en sus cadenas y que actuará como puente de unión entre las nanopartículas y el anticuerpo de reconocimiento de la bacteria; y el segundo, es que dichas nanopartículas están recubiertas de estreptavidina. La unión estreptavidina – biotina es un enlace no covalente, pero de gran fuerza.

Por otro lado, la funcionalización de las nanopartículas proporcionadas por Nanogap se llevó a cabo mediante reacciones químicas, primero para permitir que los grupos carboxilos del recubrimiento se activen y segundo para que las aminas presentes en los anticuerpos reaccionen con los grupos anteriores, formándose un enlace amida entre ambos.

Una vez que ambos conjuntos de nanopartículas se hubieron funcionalizado, se procedió a la conjugación, es decir, a la unión específica entre dichas partículas funcionalizadas y la bacteria *E. coli*. Los parámetros utilizados en esta operación son determinantes para lograr un máximo rendimiento y por eso se estudiaron algunos de ellos, como la temperatura, el tiempo o la agitación.

Tras este proceso, las muestras resultantes están compuestas por varias fracciones: la fracción positiva comprende todo aquello que posee carácter magnético (nanopartículas funcionalizadas con y sin bacteria) y la fracción negativa está compuesta por todo aquello que no posee propiedades magnéticas (principalmente bacterias). Para llevar a cabo su separación se utilizaron unas columnas magnéticas, cuyo funcionamiento se esquematiza en la Figura 5. Como puede observarse en ella, el principio de separación se basa en el carácter magnético que presentan ciertos elementos de la muestra. Para ello, se aplica un campo magnético en las columnas por las que se hará fluir la muestra y ahí quedarán retenidos todos aquellos elementos que se vean atraídos por dicho campo magnético, que serán única y exclusivamente lo que se denominó anteriormente como fracción positiva. Para recuperar dichos elementos, se procede a la elución de los mismos, previa eliminación del campo magnético que los retenía.



Figura 4 Esquema del proceso para el marcaje, detección y cuantificación de *E. coli*.

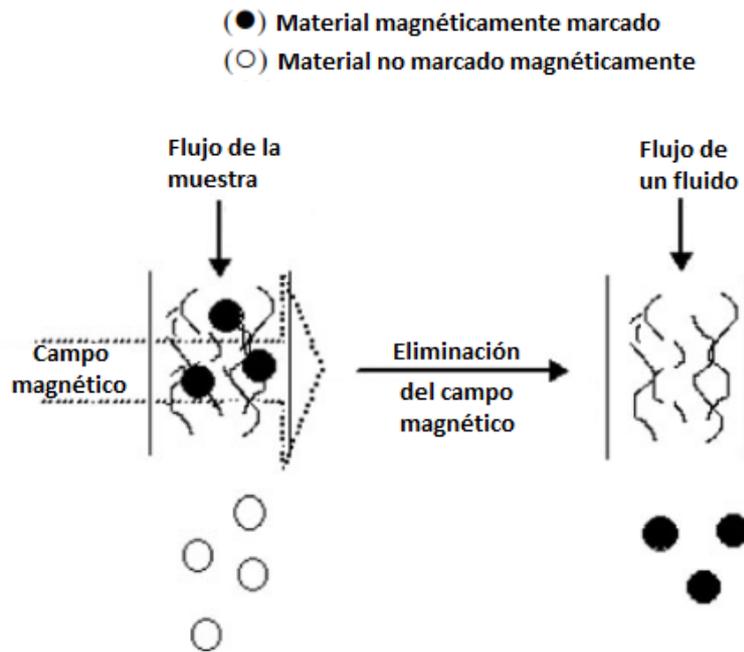


Figura 5 Esquema del funcionamiento de las columnas magnéticas de separación. (Adaptado de[5]).

Una vez que se ha obtenido la fracción positiva y antes de la determinación en el NanoSensor, es necesario separar las nanopartículas que tienen bacterias adheridas de las que no, ya que estas últimas influirían en las medidas posteriores. Para ello se realiza una centrifugación de las muestras, obteniendo en el sobrenadante únicamente las nanopartículas que no tienen bacterias, ya que las que sí se encontrarán en el fondo debido a su mayor peso.

Por último, se llevó a cabo la medida de las muestras obtenidas en el sensor, no sin antes realizar la pertinente curva de calibrado correspondiente, que permitirá posteriormente obtener la relación entre la señal obtenida en el sensor y la cantidad de nanopartículas en las muestras. La medida se realizaba mediante la deposición de una parte de la muestra en un papel de filtro (Figura 6), que se dejaba secar previamente.



Figura 6. Muestra depositada en el papel de filtro y lista para su medida.

Inmunoensayos en tiras de flujo lateral para la detección de PSA

El antígeno prostático específico, comúnmente conocido como PSA, es una proteína que se produce única y exclusivamente en las glándulas prostáticas. Cuando existe algún problema en la próstata, como cáncer o prostatitis, una parte del PSA producido pasa a la sangre, y su medida sirve como indicador de estas enfermedades.

El NanoSensor desarrollado permite la detección de otras entidades biológicas, sin embargo, la problemática se presenta en el procedimiento por el que se llega a una muestra que pueda ser medida. En el caso descrito anteriormente, el tamaño típico de una bacteria ronda los micrómetros, por lo que le hace susceptible de una separación ya sea por filtración o centrifugación. Sin embargo, otras entidades biológicas como proteínas o virus son mucho más pequeñas, lo que hace bastante difícil esta operación. En este caso, el PSA es una proteína que presenta dicho problema y que para solventarlo se la utiliza en ensayos en tiras de flujo lateral.

Los ensayos en tiras de flujo lateral han sido desarrollados para muchos y diferentes analitos. Los primeros en comercializarse lo hicieron en 1988 y fueron los que permitían la detección de la hormona gonadotropina coriónica (hCG), en lo que se conoció como test de embarazo. Actualmente existen multitud de tests en el mercado que permiten detectar, por ejemplo, la ovulación o el abuso de drogas. Cabe destacar que los primeros tests desarrollados y muchos en la actualidad, se basan en medidas cualitativas de los analitos. Sin embargo, es necesario el desarrollo y evolución hacia medidas semi-cuantitativas o cuantitativas.

En esta dirección se encaja el trabajo realizado, ya que se propone un test basado en los tests de tiras de flujo lateral que permita, no sólo la separación de la molécula de interés, en este caso PSA, sino también la posterior cuantificación mediante el NanoSensor. Para ello, es necesario la funcionalización de las nanopartículas que fueron sintetizadas en el laboratorio, de forma que se unan a un anticuerpo específico para el PSA. A este anticuerpo se le denomina anticuerpo de detección, ya que se encarga de detectar el analito en la muestra. Por otro lado, se deberá incorporar en la línea de test de las tiras otro anticuerpo que sea capaz de reconocer también al PSA y que se denomina anticuerpo de captura, ya que se encarga de retener el PSA que previamente se unió a las nanopartículas. Este tipo de ensayos se denominan ensayos 'tipo sandwich', ya que la molécula a detectar queda embebida entre los dos anticuerpos antes mencionados.

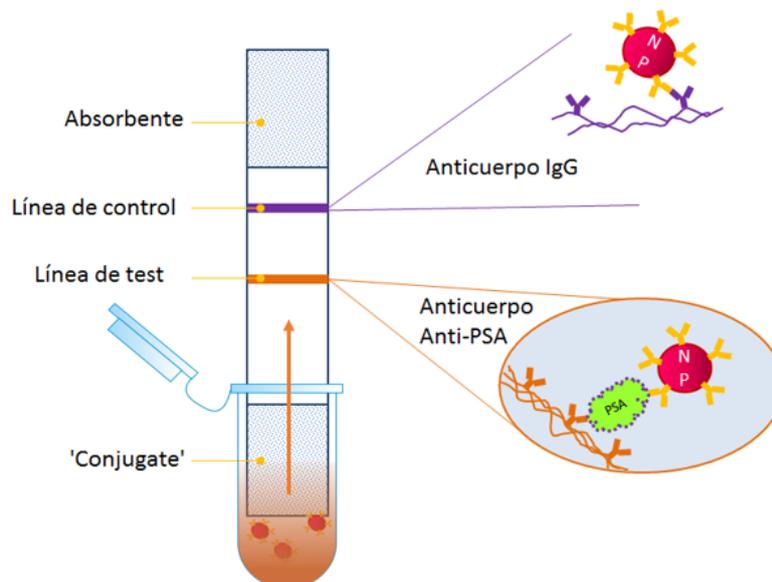


Figura 7. Esquema del inmuno-ensayo propuesto para la detección de PSA en el que se observan las diferentes partes de la tira de flujo lateral. Autor: Monserrat Ribas

En la Figura 7 se puede observar un esquema del ensayo propuesto. La tira lateral está compuesta por tres partes: el conjugate, que es donde se pone en contacto la muestra y la

tira, la membrana, por donde sube la muestra y el absorbente, situado al final de la tira. En dicha figura también pueden observarse las dos líneas que forman el ensayo:

- Línea de test: donde se encuentra el anticuerpo de captura antiPSA
- Línea de control: donde se encuentra un anticuerpo que detecta el anticuerpo de detección, y permite determinar si la muestra ha fluido correctamente, es decir, la validez del test

El procedimiento para realizar el ensayo es sencillo, ya que una vez que se han funcionalizado las nanopartículas con el anticuerpo de detección, se introduce en un eppendorf una muestra de las mismas junto con una muestra de PSA, se resuspenden bien y se añade la tira del ensayo en el mismo eppendorf por la parte del conjugate, permitiendo que la muestra fluya ascendentemente. A lo largo de este ascenso se darán las interacciones pertinentes y el PSA unido al anticuerpo de las nanopartículas se unirá al anticuerpo inmovilizado en la tira, produciéndose el 'sandwich' anteriormente descrito. Los resultados se obtienen en menos de 5 minutos y la cuantificación se realizaría midiendo en el NanoSensor la variación de impedancia que produciría la línea de test. Esta variación, mediante la curva de calibrado correspondiente, será proporcional a la cantidad de PSA que se encontraba en la muestra.

2.4. Resultados obtenidos

Los resultados obtenidos en cada uno de los procesos anteriormente descritos se detallan a continuación.

Síntesis de nanopartículas magnéticas

La caracterización de las nanopartículas se llevó a cabo mediante diversas técnicas, como el Microscopio de Transmisión Electrónica (TEM), Infrarrojo de Transformada de Fourier (FTIR) y Análisis Termo-gravimétrico (ATG).

Las características de las diferentes nanopartículas analizadas se recogen en la siguiente tabla.

Tabla 3. Características de las nanopartículas.

	Lote I	Lote II	Lote III	Lote IV
Síntesis	Bajo atmósfera oxidante	Bajo atmósfera oxidante	Bajo atmósfera de nitrógeno	Bajo atmósfera oxidante
Recubrimiento	Ác. Poliacrílico	Ác. Poliacrílico	Ác. Poliacrílico	Ác. Poliacrílico

I. TEM

Una muestra de cada una de las diferentes nanopartículas sintetizadas así como de las se llevó a analizar a los Servicios Científico Técnico de la Universidad de Oviedo, donde se obtuvieron varias imágenes, de las cuales, algunas se muestran a continuación.

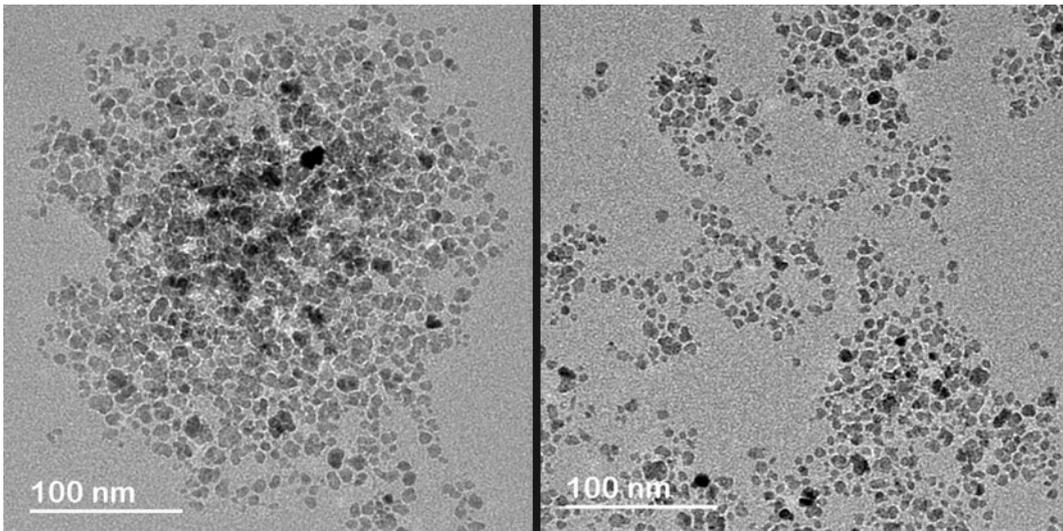


Figura 8. Imágenes obtenidas en el TEM del Lote I de nanopartículas sintetizadas.

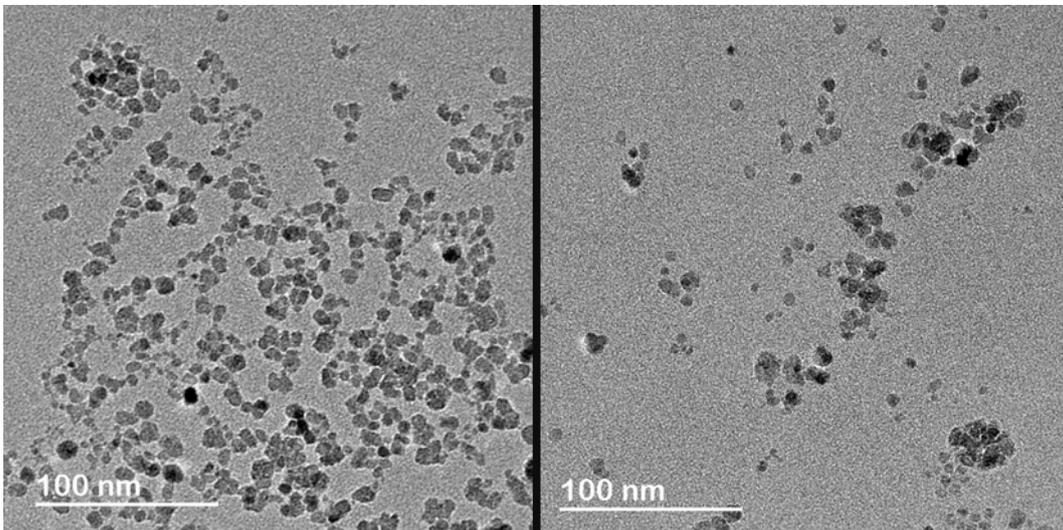


Figura 9. Imágenes obtenidas en el TEM del Lote II de nanopartículas sintetizadas.

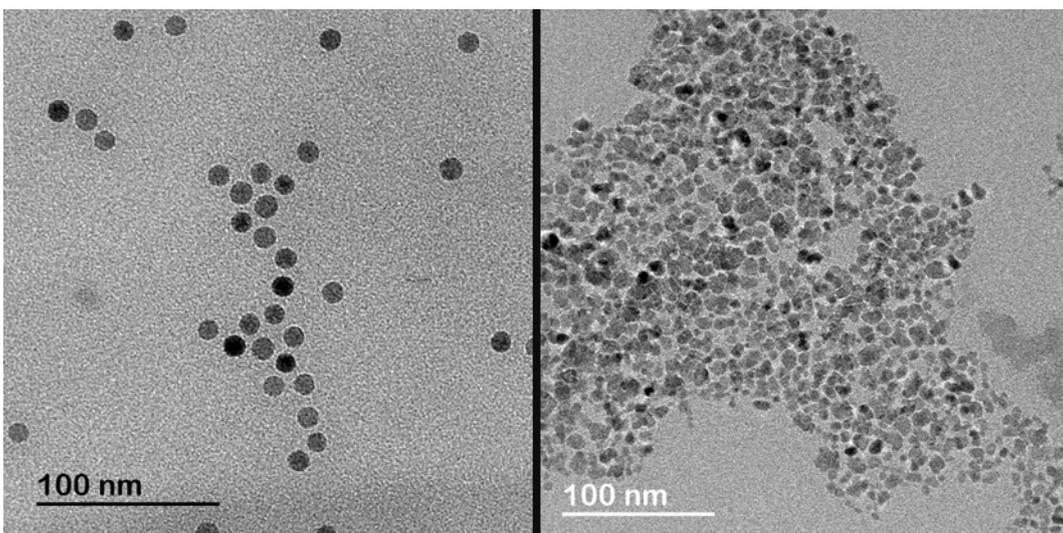


Figura 10. Imágenes obtenidas en el TEM del Lote III de nanopartículas sintetizadas.

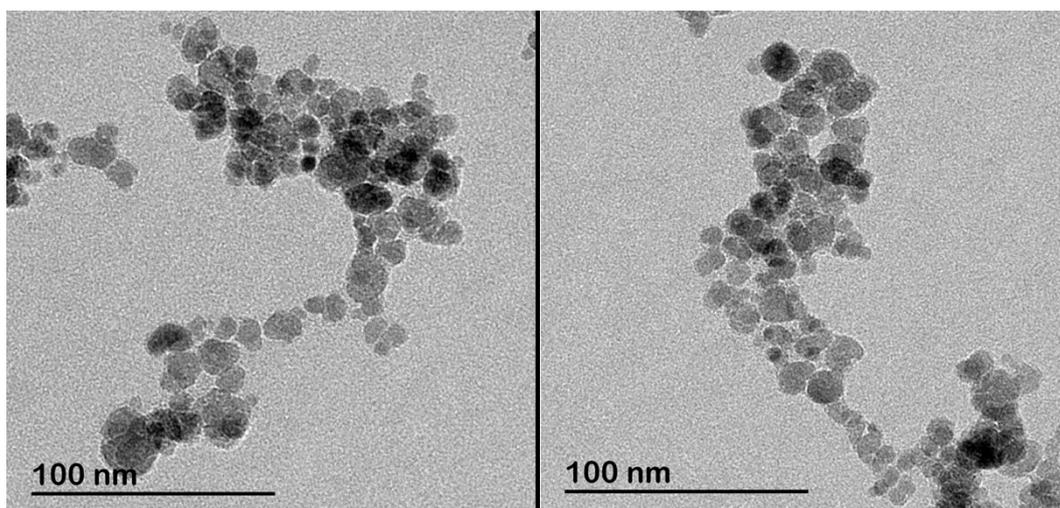


Figura 11. Imágenes obtenidas en el TEM del Lote IV de nanopartículas sintetizadas.

Como puede observarse de las imágenes obtenidas, la atmósfera bajo la que se realiza la síntesis de las nanopartículas es determinante en la forma y tamaño de las mismas, influyendo en la homogeneidad de la muestra considerablemente. Si se comparan las imágenes obtenidas de los Lotes I y II con el Lote III se puede observar como el tener una atmósfera oxidante provoca una distribución de tamaño de nanopartículas mucho más heterogénea. Además, las imágenes de las nanopartículas obtenidas en el Lote III muestran determinadas nanopartículas con una forma esférica muy lograda y sin aglomeración entre las mismas, aunque bien es verdad que no toda la muestra presentaba estas características, como puede también observarse en la imagen de la derecha de la Figura 10. Por último, las nanopartículas del Lote IV presentan un tamaño a simple vista algo mayor que los demás lotes, provocando una mayor homogeneidad y, además, se observa también una mayor aglomeración entre ellas.

Las imágenes obtenidas por el TEM permitieron realizar el análisis de los tamaños de partícula, mediante la ayuda del Software ImageJ, a partir del cual se obtuvieron los datos necesarios para realizar las distribuciones de diámetro de cada una de las muestras analizadas con el software MATLAB. La comparativa de los resultados se muestra en la Figura 12, y como puede observarse, las deducciones preliminares que se obtuvieron de la observación de las imágenes referentes a la homogeneidad de las muestras quedan confirmadas, ya que la Figura 12 A y B muestran una campana mucho más ancha que la que se obtiene en las Figura 12 C y D, donde el pico es mucho más pronunciado. Además, también se ve que los dos primeros lotes muestran tamaños medios mucho más pequeños que los otros dos lotes restantes.

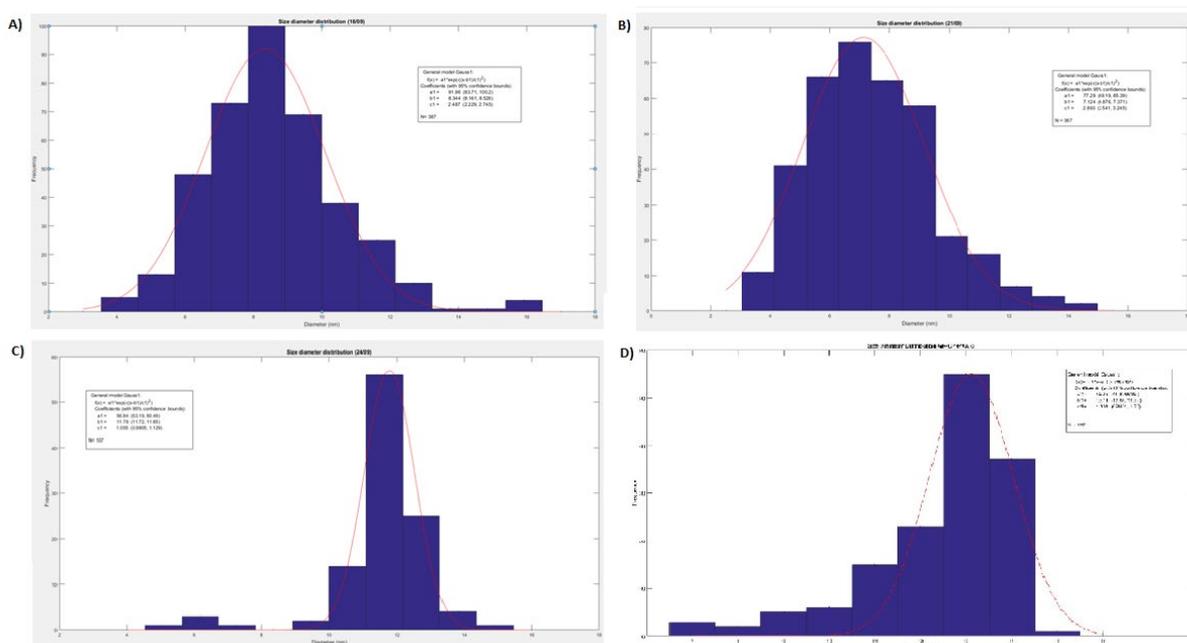


Figura 12. Distribuciones de tamaños obtenidas con MATLAB. A) Lote I B) Lote II C) Lote III y D) Lote IV.

En la Tabla 4 se recogen los diferentes diámetros medios obtenidos para cada uno de los lotes de nanopartículas analizados. En esta perspectiva, se ve nuevamente como los dos primeros lotes presentan unas nanopartículas más pequeñas que los dos últimos.

Tabla 4. Distribución de tamaños de las nanopartículas sintetizadas.

	Lote I	Lote II	Lote III	Lote IV
Síntesis	Bajo atmósfera oxidante	Bajo atmósfera oxidante	Bajo atmósfera de nitrógeno	Bajo atmósfera oxidante
Recubrimiento	Ác. Poliacrílico	Ác. Poliacrílico	Ác. Poliacrílico	Ác. Poliacrílico
Diámetro medio (nm)	8.7	7.4	11.5	12.3

II. Análisis termo-gravimétrico

El análisis termo-gravimétrico permite medir el peso de una muestra en función del tiempo o la temperatura bajo una atmósfera controlada, obteniendo de esta forma, los valores de la concentración a la que se encuentran las nanopartículas en cada uno de los lotes. Los datos obtenidos se recogen en la Tabla 5.

Como puede observarse, la mayor concentración se logra en el lote III de nanopartículas, llegando incluso a más del doble de los lotes I y II.

Tabla 5. Concentraciones obtenidas mediante el análisis termogravimétrico.

	Lote I	Lote II	Lote III	Lote IV
Concentración (mg/mL)	15 ± 2	18 ± 3	21 ± 3	38 ± 4

DetECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LA BACTERIA *Escherichia coli*

En un proceso multietapa es fundamental controlar la consecución de cada una de las etapas, permitiendo detener el proceso en el paso intermedio erróneo y determinar las posibles causas y soluciones. Durante la funcionalización de las nanopartículas utilizadas para la detección de *E. coli* se llevaron a cabo dos ensayos que permitieron comprobar que este proceso se había llevado a cabo con un rendimiento adecuado. Dichos procesos fueron un análisis de dispersión dinámica de luz (Dynamic Light Scattering o DLS en inglés), que permitió comprobar el aumento del radio hidrodinámico de las nanopartículas debido a la unión del anticuerpo a su superficie, y el denominado método Kedhjal, que permite comprobar la cantidad de nitrógeno que se encuentra en los sobrenadantes obtenidos durante el proceso, ya que puede relacionarse con el nitrógeno orgánico presente en los anticuerpos utilizados. El checkpoint en este caso sería comprobar que hay una cantidad nula o mínima de nitrógeno en el sobrenadante, indicando esto que la práctica totalidad del anticuerpo se encuentra adherido a la superficie de las nanopartículas.

La Figura 13 compara los resultados obtenidos del DLS para cada una de las nanopartículas utilizadas. Como puede comprobarse, ambas presentan un aumento del diámetro hidrodinámico después de la funcionalización, indicando que esta se ha producido con éxito.

Por otro lado, los resultados obtenidos para los análisis de nitrógeno realizados también indicaron que el anticuerpo no se encontraba en el sobrenadante de las muestras, demostrando así nuevamente que este se ha adherido a la superficie de las nanopartículas.

La conjugación de las nanopartículas funcionalizadas y las bacterias fue el paso siguiente y en el que se estudiaron diferentes parámetros que podrían afectar al rendimiento de dicha unión. Las variables estudiadas fueron la concentración de nanopartículas funcionalizadas, la agitación y la temperatura, teniendo en cuenta que no todas de dichas variables fueron estudiadas para ambas nanopartículas.

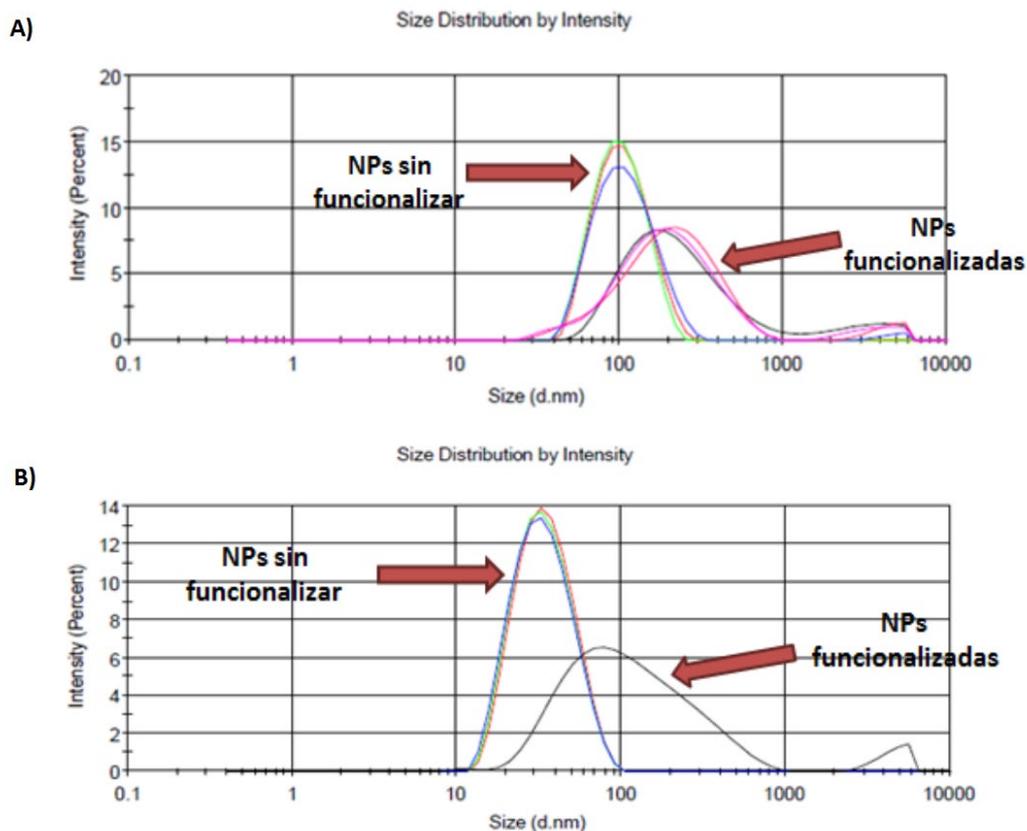


Figura 13. Resultados del DLS para A) Nanopartículas de Chemicell y B) Nanopartículas de Nanogap.

La conjugación de las nanopartículas con la bacteria *E. coli* se comprobó nuevamente mediante análisis de muestras en el TEM, obteniéndose las diferentes imágenes que se muestran en la Figura 14 y Figura 15 para las nanopartículas de Chemicell y Nanogap, respectivamente, en las que puede observarse, además de las nanopartículas y la bacteria por sí solas, la unión entre ambas, quedando demostrado como la conjugación de estas tuvo lugar.

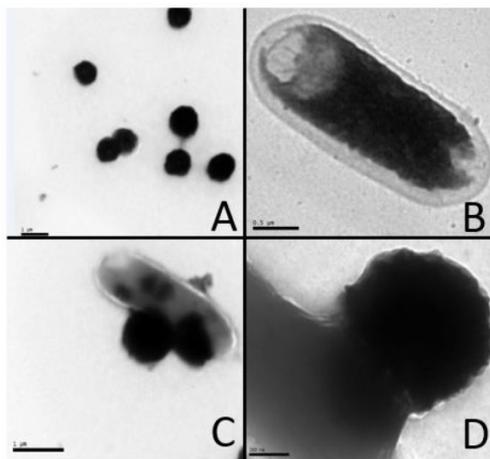


Figura 14. Imágenes obtenidas en el TEM. A) Aglomerados de las nanopartículas de Chemicell B) Bacteria *E. coli* C) Bacteria *E. coli* conjugada con las nanopartículas y D) Detalle de la conjugación.

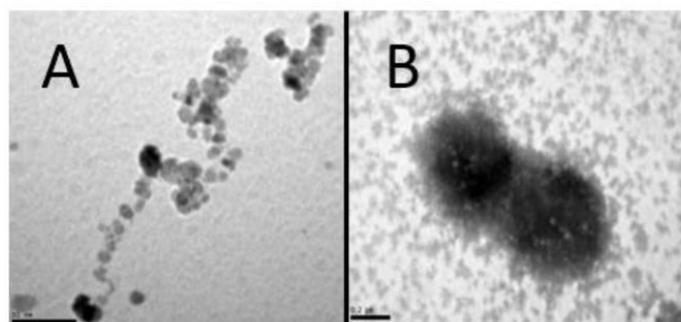


Figura 15. Imágenes obtenidas en el TEM A) Nanopartículas de Nanogap y B) Bacteria *E. coli* conjugada con las nanopartículas.

La detección y cuantificación de las bacterias marcadas inmuno-magnéticamente se llevó a cabo tras la separación de las diferentes fracciones, en primer lugar con las columnas magnéticas cuyo funcionamiento se describió anteriormente (véase Detección y cuantificación de la bacteria *Escherichia coli*) y por último, mediante centrifugación, para separar las bacterias marcadas de las nanopartículas no conjugadas.

El rendimiento de la conjugación se llevó a cabo mediante el cultivo en medio sólido de una porción de las muestras obtenidas tras la separación magnética en las columnas. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 6 y la Tabla 7 para las nanopartículas de Chemicell y Nanogap respectivamente. Como puede observarse, el máximo rendimiento en la conjugación es del 29%, y la media de todos ellos se establece en un 21.5%.

Tabla 6. Resultados de la eficiencia de la conjugación entre las nanopartículas de Chemicell y la bacteria *E. coli*.

EXPERIMENTO	Concentración de bacterias en la fracción positiva (UFC/mL)	Concentración de bacterias en la fracción negativa (UFC/mL)	Concentración de bacterias total (UFC/mL)	Eficiencia de la conjugación (%)
1	2.80×10^5	4.50×10^6	4.78×10^6	6
2	7.80×10^5	1.98×10^6	2.76×10^6	28
3	3.14×10^5	2.61×10^6	2.92×10^6	11
4	6.60×10^5	2.08×10^6	2.74×10^6	24
5	1.09×10^5	2.70×10^6	3.79×10^6	29
6	9.50×10^5	3.70×10^6	4.65×10^6	20
7	9.70×10^5	2.35×10^6	3.32×10^6	29
8	1.03×10^6	2.80×10^6	3.83×10^6	27

Tabla 7. Resultados de la eficiencia de la conjugación entre las nanopartículas de Nanogap y la bacteria *E. coli*.

EXPERIMENTO	Concentración de bacterias en la fracción positiva (UFC/mL)	Concentración de bacterias en la fracción negativa (UFC/mL)	Concentración de bacterias total (UFC/mL)	Eficiencia de la conjugación (%)
1	9.60×10^5	4.20×10^6	5.16×10^6	19
2	5.00×10^5	1.75×10^6	2.25×10^6	22

Para realizar las medidas es necesaria la obtención de las curvas de calibrado, que permitan relacionar a posteriori la señal obtenida de la muestra con la concentración de nanopartículas presentes en dicha muestra. Las dos curvas de calibración obtenidas para cada una de las nanopartículas se muestran en la Figura 16.

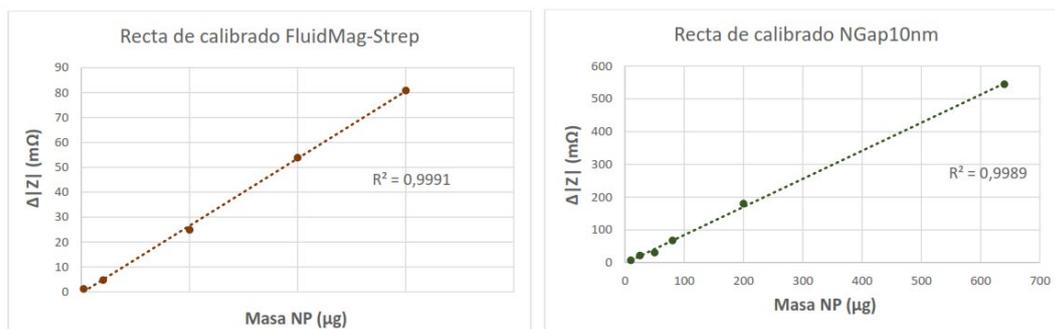


Figura 16. Curvas de calibrado para cada una de las nanopartículas utilizadas. Derecha: Nanogap. Izquierda: Chemicell

Las medidas de la variación de impedancia obtenidas en el NanoSensor con las muestras, así como la estimación de bacterias presentes en dichas muestras se muestran para ambas nanopartículas en las Tabla 8 y Tabla 9. En la primera de estas tablas no se muestran todos los experimentos realizados, únicamente aquellos que se realizaron en condiciones de agitación ya que son los que presentaban reproducibilidad. En estas tablas también se encuentra una estimación de la variación de la impedancia debido a la señal magnética por unidad de masa de bacteria (última columna).

Tabla 8. Medidas obtenidas con el NanoSensor para la cuantificación de las bacterias conjugadas con las nanopartículas de Chemicell

EXPERIMENTO	$\Delta Z $ (mΩ)	m_{NP} (μg)	mE. coli (μg)	$m_{E.coli}$ (μg)/ m_{NP} (μg)	$\Delta Z $ (mΩ)/ mE. coli (μg)
2	6.1 ± 0.2	12	0.083	0.0069	73.7
4	10.6 ± 0.3	20	0.071	0.0036	147.2
6	7.3 ± 0.9	14	0.060	0.0043	121.3
8	11.1 ± 0.8	21	0.080	0.0038	139.1

Tabla 9. Medidas obtenidas con el NanoSensor para la cuantificación de las bacterias conjugadas con las nanopartículas de Nanogap.

EXPERIMENTO	$\Delta Z $ (mΩ)	m_{NP} (μg)	$m_{E.coli}$ (μg)	$m_{E.coli}$ (μg)/ m_{NP} (μg)	$\Delta Z $ (mΩ)/ $m_{E.coli}$ (μg)
1	4.8 ± 0.7	8	0.057	0.0071	84.5
2	5.9 ± 0.5	9	0.066	0.0073	89.8

Como puede comprobarse, el método anteriormente descrito permite la detección y cuantificación de la bacteria Escherichia coli a través de la variación en la impedancia que provocan las nanopartículas a las que se encuentra adherida. Sin embargo, fue necesario comprobar que no existía una unión inespecífica entre las nanopartículas sin funcionalizar y la bacteria. Se comprobó que las nanopartículas de Chemicell no presentaban ninguna unión inespecífica con las bacterias, mientras que en el caso de las nanopartículas de Nanogap, esta unión comenzaba a tener lugar para concentraciones de bacterias iguales o superiores a 109UFC/mL.

Inmunoensayos en tiras de flujo lateral para la detección de PSA

Los ensayos de tiras de flujo lateral se basan en un concepto sencillo, que sin embargo presenta complicaciones a la hora de enfrentar el trabajo en el laboratorio, y es que es muy difícil controlar las uniones entre todos los componentes que entran en juego en dichos ensayos.

La forma en la que los anticuerpos se unen a las nanopartículas será determinante para un buen reconocimiento posterior del antígeno, y no es seguro que esta unión sea perpendicular a la superficie de la nanopartícula. Si así fuese, el paratopo (región del anticuerpo que se une al epítipo del antígeno) quedaría libre y disponible para la unión del antígeno deseado, sin embargo, puede haber impedimentos estéricos que impidan esta unión de no darse así el enlace. Además, y aunque los ensayos en tiras de flujo lateral no son algo nuevo para ciertos biomarcadores, para otros sí lo son, y las técnicas de detección que se han utilizado hasta la fecha se han basado en ensayos ELISA. El paso de estos ensayos a los primeros no es inmediato, ya que las condiciones no son idénticas en uno y otro y parámetros tales como la velocidad de ascensión en la tira que viene determinada por el tipo de material y algo similar a su porosidad o el surfactante utilizado para ayudar en este desplazamiento influyen en el desarrollo del test.

Hasta la fecha, se ha comprobado que el desarrollo de un test para la detección y cuantificación de la proteína PSA es factible, tal y como demuestra la Figura 17 y la Figura 18. En esta última puede observarse la variación que se produce en la impedancia medida por el sensor al cuantificar varias muestras de diferentes concentraciones de PSA en orden creciente, hasta alcanzar un punto de saturación. La forma de la curva que se obtiene es la típica de un ensayo inmunológico.

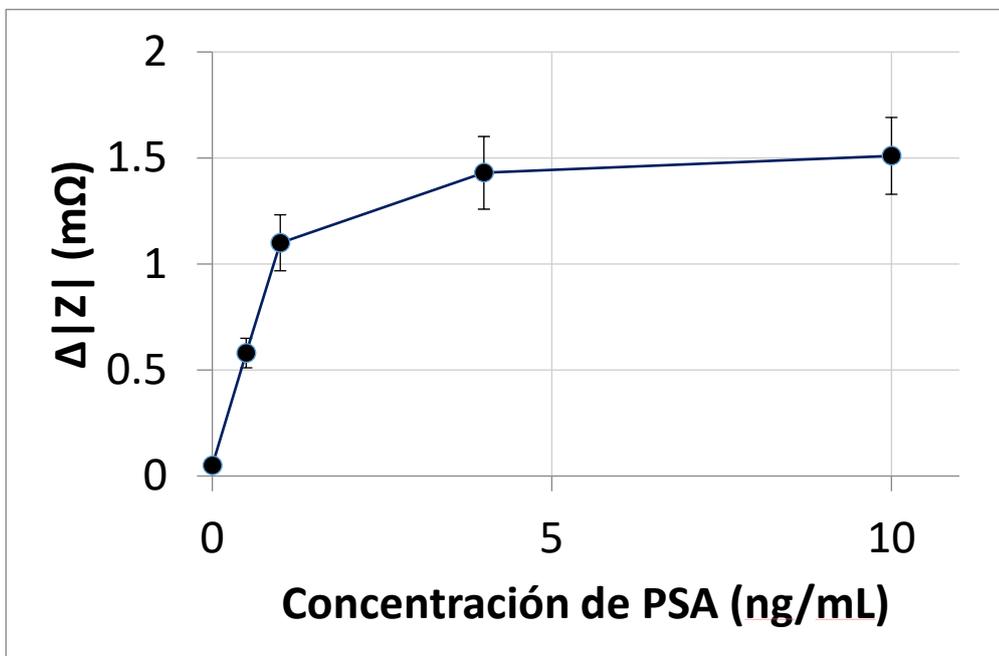


Figura 18. Variación de la impedancia medida con el NanoSensor en muestras con concentración creciente de PSA

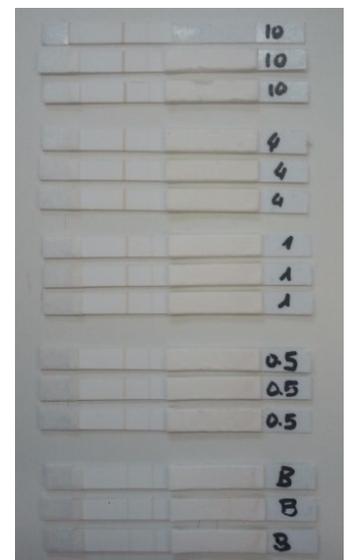


Figura 17. Muestras triplicadas de los ensayos de flujo lateral realizados con las nanopartículas y concentraciones de PSA crecientes. Nótese cómo la intensidad de la línea de test aumenta al aumentar la concentración de PSA.

Por otro lado, los desafíos que presenta el desarrollo de este tipo de test no sólo están del lado de las entidades biológicas, sino que también se presentan en pasos previos cuyas consecuencias se atisban ahora, como fueron la síntesis de las nanopartículas y la aglomeración que presentaban las mismas. En la Figura 19 pueden verse los resultados que se obtuvieron con dos nanopartículas diferentes: las primeras de ellas sintetizadas en el laboratorio (Lote III) y la segunda las de la casa comercial Chemicell (usadas en experimentos anteriores). Como puede comprobarse, las intensidades obtenidas en la línea de test y control parecen intercambiarse de una a otra tira, quedando más nanopartículas en la línea de control cuando estas están menos aglomeradas, y viceversa. Si las partículas no están aglomeradas fluyen mejor por la membrana, y la interacción con el anticuerpo de captura se produce en menor medida. Por el contrario, si las nanopartículas se encuentran agregadas, la fluidez de ascensión es menor y las interacciones con el anticuerpo de captura podrán darse con más facilidad. Aunque estos resultados sean preliminares y se necesite de más datos para confirmar o refutar estas teorías, parece que la aglomeración de las partículas jugaría un papel importante en el desarrollo de los ensayos en tiras de flujo lateral.

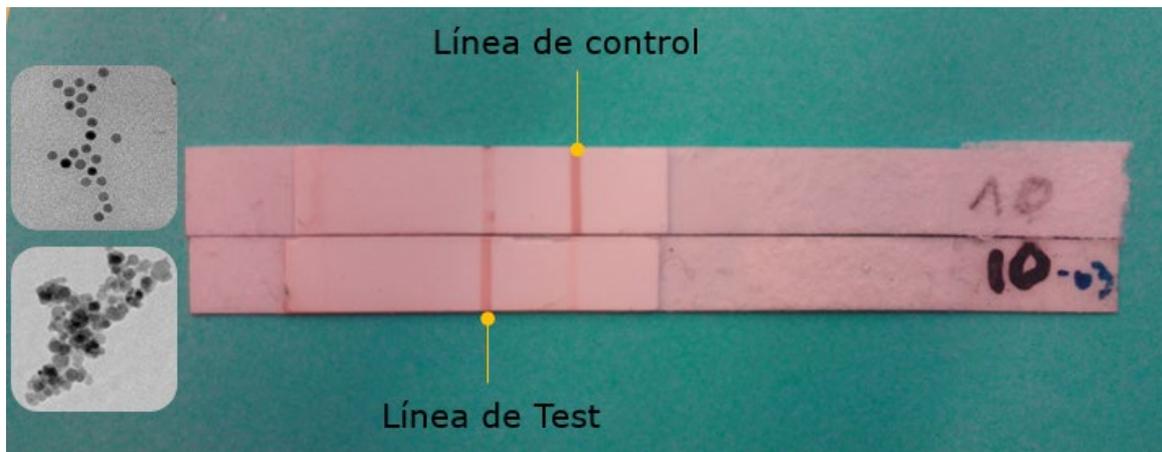


Figura 19. Comparación de los resultados obtenidos con las diferentes nanopartículas y una concentración de PSA de ng/mL. El aglomeramiento de las nanopartículas parece influir en cómo estas fluyen por la tira e interaccionan con los anticuerpos de la misma.

Actualmente se está trabajando en la optimización de los ensayos, trabajando con las diferentes nanopartículas que se sintetizaron y observando cuáles son las mejores condiciones de los diferentes factores que afectan al desarrollo del test, como son por ejemplo el buffer, el pH o el surfactante.

2.5. Trabajos o necesidades futuras

El interés en el campo de la nanobiotecnología ha crecido exponencialmente en los últimos años, con el desarrollo de nuevas técnicas y métodos que permiten la exploración y el avance en esta nueva dimensión. Sin embargo, aún no ha tocado techo y son muchos los objetivos que la comunidad científica pretende alcanzar a largo plazo, como por ejemplo la liberación dirigida de fármacos en los tejidos enfermos o la hipertermia.

Dentro de este trabajo se han llevado a cabo muchas tareas, sin embargo, es necesario llevar a cabo una optimización de las mismas, ahora que se ha demostrado el gran potencial que poseen ciertas metodologías. Es de gran interés, por ejemplo, la mejora y la optimización de la síntesis de las nanopartículas, en la que se debería de hacer hincapié en el mejor control de parámetros tan determinantes como el tamaño de partícula y la aglomeración de las mismas, de las que depende fuertemente la señal que se obtiene posteriormente en el sensor. Para ello podría estudiarse diferentes variables del proceso, como por ejemplo la temperatura, el tiempo o el pH.

Interesante también es comprobar cómo afecta la aglomeración de las nanopartículas a los ensayos de tiras de flujo lateral, ya que los estudios preliminares realizados indican que una mayor aglomeración de las mismas provoca una mayor señal, tanto visual en la tira como en el sensor, aumentando así la sensibilidad del método. En caso de ser así, la aglomeración controlada de las nanopartículas mediante polímeros o cadenas de aminoácidos podría propiciar grandes mejoras en la detección.

Por último, cabe resaltar que el sensor desarrollado ofrece multitud de posibilidades y no sólo permitiría la detección de las entidades biológicas antes mencionadas. El factor clave está en el hecho de que al poder sintetizar las nanopartículas in situ y eligiendo el recubrimiento adecuado para una posterior funcionalización, se permite abarcar un sinnúmero de posibles entidades biológicas a las que unir dichas nanopartículas para su detección. Esto abre no sólo nuevas posibles investigaciones en el campo de la salud, sino también en campos como el control de contaminantes o la industria alimentaria o veterinaria, etc.

2.6. Divulgación de los resultados (publicaciones, artículos, ponencias...)

Los resultados obtenidos durante la realización de este proyecto han sido en parte divulgados, mientras que otros se encuentran aún a la espera de hacerlo.

El trabajo referente al marcaje y detección de la bacteria *Escherichia coli* se ha presentado en el congreso 3rd International Conference on Nanotechnology and Medicine (NANOMED), en Manchester, bajo la suscripción de un póster.

Por otro lado, los resultados obtenidos para las tiras de flujo lateral, al encontrarse todavía bajo desarrollo, han sido presentados como una prueba de concepto en el mismo congreso citado anteriormente, a la espera de obtener más resultados y poder llevar a cabo las publicaciones pertinentes.

3. MEMORIA ECONÓMICA

Financiación		Personal	Inventariable	Fungible	Otros gastos
IUTA	SV-15-GIJÓN-1.	4500			
Otras fuentes	Referencia proyecto/contrato		7500	3300	4100
Estudiante con ayuda a la investigación	Nombre	María Salvador Fernández			
	Tareas	Síntesis de nanopartículas magnéticas Funcionalización y conjugación contra E. coli y PSA Preparación de Tiras de Flujo Lateral Calibración del NanoSensor para cuantificación de PSA			
	Período	Septiembre a diciembre de 2015			

5. BIBLIOGRAFÍA

1. Lago-Cachon, D., et al., *Cu impedance-based detection of superparamagnetic nanoparticles*. Nanotechnology, 2013. **24**(24): p. 245501.
2. Laurent, S., et al., *Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications*. Chemical Reviews, 2008. **108**(6): p. 2064-2110.
3. Netto, C.G.C.M., H.E. Toma, and L.H. Andrade, *Superparamagnetic nanoparticles as versatile carriers and supporting materials for enzymes*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2013. **85–86**: p. 71-92.
4. Rocha-Santos, T.A.P., *Sensors and biosensors based on magnetic nanoparticles*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2014. **62**: p. 28-36.
5. Pankhurst, Q.A., et al., *Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine*. Journal of physics D: Applied physics, 2003. **36**(13): p. R167.