



**FABRICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NANOBIOHÍBRIDOS:
Optimización de la interfaz entre nanoestructuras de oro y proteínas para
posibles aplicaciones biosensoras.**

Memoria presentada por Edurne Tellechea Malda para optar al grado de Doctor
con mención de “Doctor Internacional”

Pamplona, Junio 2017

AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR DE LA TESIS PARA LA PRESENTACIÓN

Dr. José Fernando Morán Juez, Profesor Titular del Área de Fisiología Vegetal del Departamento de Ciencias del Medio Natural de la Universidad Pública de Navarra,

CERTIFICA,

Que el trabajo titulado “**FABRICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NANOBIOHÍBRIDOS: Optimización de la interfaz entre nanoestructuras de oro y proteínas para posibles aplicaciones biosensoras**” presentado por **Edurne Tellechea Malda** para optar al grado de Doctor con mención de “Doctor Internacional”, ha sido desarrollado bajo su dirección en los laboratorios de Fisiología Vegetal, del Departamento de Ciencias del Medio Natural de la Universidad Pública de Navarra y del Instituto de Agrobiotecnología del Consejo Superior de Investigaciones Científicas–Universidad Pública de Navarra-Gobierno de Navarra, en colaboración con los centros Fundación para la investigación y desarrollo de nanotecnología en Navarra (FideNa), Centro Multidisciplinar de Tecnologías para la Industria (CEMITEC), y el Instituto Tecnológico de Massachusetts (MIT).

Revisado el trabajo, autoriza la presentación de la citada Tesis Doctoral, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

En Pamplona, a 1 de Junio de 2017

Fdo. José Fernando Morán Juez

Agradecimientos

A Moran y a Ernesto por darme la oportunidad a doctorarme y apoyarme en todo lo que he necesitado.

To Kimberly, for the great experience of working in your lab.

A todos los FideN@s, en especial a los NANO BIO forever.

A las Xarbotak de patoquilla ;)

Nire familiari, eskeinitako laguntzagatik eta batez ere nigan sinesteagatik.

A Iban, por todo.

Mila esker denei

Nire familia berriarentzat,

Ekiñe, Uxue eta Iban.

Esta tesis ha sido financiada en gran parte por el Departamento de Innovación, Empresa y Empleo del Gobierno de Navarra a través de los siguientes proyectos de investigación, desarrollo e innovación y becas:

- SANBioNS: “Self assembly of nanoparticles and biomolecules on nanopatterned surfaces for catalytic and biochemical applications” (IIQ011902.R11)

- SABioD: “Self Assembled Bio-Active Devices (IIQ14076.R11).

- AGROSENSOR: “Biosensor LSPR para la industria alimentaria”

-Beca Jeronimo de Ayanz 485/2010

ABREVIATURAS

ABE	Ancho de banda espectral
Abs	Absorbancia
ADN	Acido desoxirribonucleico
Anti-IgG	Anti-inmunoglobulina de conejo producida en cabra
ANOVA	Análisis de varianza
ARC	Capa anti-reflejante
ATR	Atenuador total de reflexiones
Au	Oro
AuNP	Nanopartículas de oro
BPS	Bis(p-sulfonatofenil) fenilfosfina
BSA	Albumina de suero bovino
BRI	Índice de refracción del conjunto
CD	Dicroísmo Circular
CF4	Tetrafluorometano
CG	Cromatografía de gases
COOH	Grupo carboxilo
CYS	Cisteina
DA	Dalton
DLS	Dispersión de luz dinámica
DTT	Ditiotreitol
EA	Etanolamina
EDC	1-etil-3-(3-dimetiamino-propil) carbodiimida
EDTA	Ácido etilenendiaminetetraacético
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
Fab	Fragmento de unión al antígeno
FAD	Flavín adenín dinucleótido en su forma oxidada
FDAH2	Flavín adenín dinucleótido en su forma reducida
FE-SEM	Microscopio electrónico de barrido de emisión de campo
Fc	Fragmento cristalizable del anticuerpo
FOM	Figura de Mérito
Fv	Fragmento variable del anticuerpo
FWHM	Anchura a media altura
GOx	Glucosa oxidasa
H	Cadenas pesadas del anticuerpo
HPLC	Cromatografía líquida
HRP	Peroxidasa de rábano
HSA	Albúmina sérica humana

ID	Intervalo de datos
IgG	Inmunoglobulina de conejo de tipo G
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
ITC	calorimetría de titulación isotérmica
IR	Índice de refracción
Ka	Constante de equilibrio
K _M	Constante de afinidad
K _{cat}	Constante catalítica
L	Cadenas ligeras de los anticuerpos
LIL	Litografía por interferencia láser
LoD	Límite de detección
LSPR	Resonancia del Plasmon Superficial Localizado
MCH	Mercaptohexanol
mPEG	Metoxi polietilenglicol
MUA	Ácido mercaptoundecanóico
N	Nivel de ruido
NaP	Solución tampón de fosfato de sodio
NBH	Nanobiohíbridos
NBT	Nitrozul de tetrazolio
NHS	N-hidroxisuccinimida
NI-NTA	ácido nitrilotriacético de níquel
NP	Nanopartícula
O ₂ ⁻	Anión súperóxido
OCT	1-Octanotiol
P	Periodo
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	Solución tampón de fosfato
PEG	Polietilenglicol
PNA _s	Ácidos nucleicos peptídicos
RIE	Grabado por iones reactivos
RIU	Unidades de índice de refracción
S	Sensibilidad
SAM	Monocapa autoensamblada
SDS	Sodio dodecil sulfato
Sim	Simultaneamente
SiO ₂	Óxido de silicio
SH	Grupo tiol o grupo sulfhidrilo
SOD	Super óxido dismutasa
SPR	Resonancia del plasmón superficial
SDS	Dodecilsulfato sódico

ROS	Especies reactivas de oxígeno
rVuFeSOD	Súper oxido dismutasa de hierro recombinante de coupí
SOD	Superoxide Dismutase
T	Transmitancia
TEM	Microscopio electrónico de transmisión
TEMED	N´N´N´N´-Tetrametiletilediamina
TIR	Reflexión interna total
TMB	3,3',5,5'-Tetrametilbencidina
Tris	Tris(hidroximetil) aminometano
Tween 20	Polioxietileno (20) sorbitan monolaurate
Trp	Triptófano
Try	Tirosina
UV-VIS	Ultravioleta-Visible
VS	Velocidad de escaneo
W	Ancho del motivo (línea o disco)
XOD	Xantina oxidasa
XOR	Xantina Oxidorreductasa

SUMMARY

The research on nanomaterials has experienced, in the past years, a growing interest due to their potential applications in different industrial sectors and, in particular, in the field of biomedicine. The combination of nanomaterials and biomolecules to form new hybrid structures called nanobiohybrids (NBH) is considered a new strategy adopted to reach completely new properties and functions, extending the range of application of such structures. However, achieving functional interfaces between proteins and surfaces is not straightforward and requires extensive optimization and validation to control the structure and function of proteins linked to the nanomaterials which are strongly influenced by its size, shape and surface chemistry. Therefore, the understanding of the mechanisms involved in the interaction of biological systems with nanomaterials is of great interest in both the fundamental and applied disciplines.

The content of this thesis is mainly focused on the development of an efficient immobilization of proteins on gold nanostructures (gold nanoparticles and periodic nanostructured surfaces). Once the protein is attached to the nanomaterial, retains its functional configuration and, hence, the mechanisms related to the interaction between proteins and gold nanostructures can be elucidated. The thesis has been divided into two main parts: In the first one, the development of biofunctionalisation methods of gold nanoparticles with enzymes is described. The second one relates to the optimization of covalent immobilization of anti-casein monoclonal antibodies to periodic surfaces of gold nanodiscs, for the development of an optical immunosensor based on localized superficial plasmon resonance (LSPR).

Regarding the first part of the thesis, the biofunctionalisation of 9.6 nm diameter gold nanoparticles with iron superoxide dismutase and glucose oxidase has been studied in order to optimize the activity and structure of the enzymes on the nanoparticles. The behavior of proteins as a function of the nanoparticle surface chemistry, protein microenvironment, protein additives, and the binding method (physical adsorption and covalent bonding) have been explored. Recombinant iron superoxide dismutase (rVuFeSOD) protein from cowpea (*Vigna unguiculata*) has been conjugated to AuNPs covalently and electrostatically, using mercaptoundecanoic acid as a ligand. The effect of the concentration of the ligand on the coverage and activity of the protein has been determined, inducing an opposite effect depending on the binding method. Thus, it has been found that in physical adsorption, the concentration of the ligand has a more pronounced effect in the coverage than in the activity whereas in the covalent union has a more negative effect on the activity, leading to the denaturation of the protein due to an excess of attachment points to the surface. For this particular system, physical adsorption has resulted in a better binding method.

In order to gain more insight regarding the physical adsorption, glucose oxidase was conjugated to gold nanoparticles, following by the characterization of the coverage, enzymatic

activity, and protein secondary structure onto AuNP. It has been shown that interactions with gold nanoparticles can significantly alter the structure and function of glucose oxidase. Nanoparticles can improve substrate binding while reducing catalytic turnover, indicating that steric effects are not as much of an issue as is denaturation. Modifying the protein microenvironment by addition of salt and the substrate glucose can help improve activity and folding. Incubation with its substrate glucose helps stabilize secondary structure, but does not result in major improvements in activity, and NaCl improves activity but not results in large improvements in the secondary structure. This means that when immobilization is planned, both structure and activity of the enzyme must be properly assessed, as they may not always be correlated.

The second part of work has focused on the covalent immobilization of anti-casein monoclonal antibodies to periodic surfaces of gold nanodiscs, for the construction of an optical immunosensor based on LSPR. The biofunctionalisation of the sensor is a key step in the development of an immunosensor, since it determines the specificity, sensitivity, reproducibility and stability of the system. As a preliminary step to the biofunctionalization, the characterization of the optical response of a wafer formed by nanostructures of lines and discs was performed by considering a laboratory spectrophotometer, being the nanodiscs configuration 2.6 times more sensitive when the system is working at a constant wavelength (6,7 Abs·RIU⁻¹).

Finally, a protocol for measuring casein was developed. The antibody has been covalently attached to the surface through the EDC / NHS chemistry. The optimization of the immobilization process was based on the systematic study of parameters such as the composition of the SAM, different buffer solutions, the concentration of antibody at the surface, and the immobilization flow. Additionally, the antigen-antibody binding process has also been optimized. For this purpose, recognition was monitored in terms of buffer solution, workflow, regeneration solution, and non-specific binding. The chips have been reused for more than 10 days, with more than 40 bonding and regeneration cycles with very little signal loss, demonstrating the robustness of the method. A detection limit of 0.5 µg·mL⁻¹ and a dynamic range of 1-10 µg·mL⁻¹ were obtained. The reproducibility of the method is proven by the low variation coefficients of intra- and inter-assay.

RESUMEN

En las últimas décadas, la investigación en el campo de los nanomateriales se ha desarrollado considerablemente, debido a las potenciales aplicaciones de estos materiales en muy diversos campos de la ciencia. En muchas de estas aplicaciones los nanomateriales se combinan con biomoléculas para formar nuevas estructuras híbridas. Estos nanobiohíbridos (NBH), presenta nuevas propiedades y funciones, pues de la combinación de ambos, el nanomaterial y las biomoléculas, origina respuestas totalmente diferentes, lo cual incrementa el rango de aplicaciones. Sin embargo, conseguir interfaces funcionales entre proteínas y superficies presenta grandes desafíos. La estructura y función de las proteínas están fuertemente influenciadas por el material, el tamaño, la forma y por la química superficial, que puede ser altamente variable. Por lo tanto, la comprensión de los mecanismos implicados en la interacción de sistemas biológicos con nanomateriales es de interés tanto en las disciplinas fundamentales como en las aplicadas.

El contenido de esta tesis está principalmente enfocado en llevar a cabo una eficiente inmovilización de proteínas en nanoestructuras de oro (nanopartículas de oro y superficies nanoestructuradas periódicas de oro), de manera que una vez unido al nanomaterial, éstas conserven su configuración funcional, y así poder entender los mecanismos relacionados con la interacción entre proteínas y nanoestructuras de oro.

Para ello, la tesis se ha dividido en dos grandes bloques. En el primero de ellos se ha descrito el desarrollo de métodos de biofuncionalización de nanopartículas de oro con enzimas. Así, se ha estudiado la biofuncionalización de nanopartículas de oro de 9,6 nm de diámetro con la superóxido dismutasa de hierro, y la glucosa oxidasa, con el objetivo de optimizar la actividad y estructura de las enzimas en las nanopartículas. Se ha explorado el comportamiento de las proteínas en función de la química superficial de la nanopartícula, del microambiente, del uso de aditivos proteicos estabilizadores, y del método de unión (adsorción física y unión covalente).

Se ha conjugado la proteína recombinante superóxido-dismutasa de hierro (rVuFeSOD) de caupí (*Vigna unguiculata*) a Au NPs covalentemente y electrostáticamente, utilizando ácido mercaptoundecanoico como nexo de unión. Se ha determinado el efecto de la concentración del ligando en la cobertura y la actividad de la proteína, produciendo un efecto contrario dependiendo del método de unión. Así, se ha comprobado que en la adsorción física, la concentración de ligando tiene un efecto más pronunciado en la cobertura que en la actividad mientras que en la unión covalente tiene un efecto más negativo en la actividad, llegando a producir la desnaturalización de la proteína debido a un exceso de puntos de unión con la superficie. Para este particular sistema, la adsorción física ha resultado un mejor método de unión. Con el objetivo de profundizar más en la adsorción física, la glucosa oxidasa se ha conjugado a nanopartículas de oro. Esta vez se ha caracterizado tanto la cobertura, la actividad

enzimática, así como la estructura secundaria de la proteína una vez inmovilizada en la superficie de la NP. Se ha comprobado que las interacciones con las nanopartículas de oro pueden alterar significativamente la estructura y la función de la glucosa oxidasa. Las nanopartículas, pueden mejorar la unión del sustrato, al tiempo que reducen la actividad catalítica, indicando que los efectos estéricos no son tan importantes como la propia desnaturalización. La modificación del microambiente de la proteína mediante la adición de NaCl y glucosa mejora la actividad y el plegamiento. La glucosa es capaz de estabilizar el plegado de la proteína, pero no da lugar a grandes mejoras en la actividad, y el NaCl mejora la actividad, pero no la estructura secundaria. Esto significa que al planificar la inmovilización, es necesario investigar tanto la estructura como la actividad de la enzima, ya que no siempre se correlacionan.

El segundo bloque del trabajo se ha centrado en la inmovilización covalente de anticuerpos monoclonales anti-caseína a superficies periódicas de nanodiscos de oro, para la construcción de un inmunosensor óptico basado en el fenómeno de la resonancia del plasmón superficial localizado (LSPR). La biofuncionalización de la superficie sensora es un paso clave en el desarrollo de un inmunosensor, ya que determina la especificidad, sensibilidad, reproducibilidad y estabilidad del mismo. Como paso previo a la biofuncionalización se ha realizado la caracterización de la respuesta óptica de obleas formadas por nanoestructuras de líneas y discos con un espectrofotómetro de laboratorio, siendo los nanodiscos 2,6 veces más sensibles al trabajar a una longitud de onda constante (6,7 Abs·RIU⁻¹). Para terminar, se ha desarrollado un protocolo de medida de caseína. El anticuerpo se ha unido covalentemente a la superficie a través de la química EDC/NHS. La optimización de proceso de inmovilización ha consistido en el estudio sistemático de parámetros tales como la composición de la SAM, diferentes soluciones tampón, la concentración de anticuerpo en la superficie, y el flujo de inmovilización. Asimismo se ha optimizado el proceso de unión antígeno-anticuerpo. Para ello se han estudiado el reconocimiento en función de la solución tampón, flujo de trabajo, solución de regeneración, y unión inespecífica. Se han reutilizado los chips durante más de 10 días llegando a realizar más de 40 ciclos de unión y regeneración con muy poca pérdida de señal, demostrando la robustez del método. Se ha obtenido un límite de detección de 0,5 µg·mL⁻¹ y un rango dinámico de 1-10 µg·mL⁻¹. La reproducibilidad del método queda probada por los bajos coeficientes de variación intra- e inter-ensayo.

Abreviaturas	i
Summary	ii
Resumen	iii
Índice general	iv
MOTIVACIÓN Y ESTRUCTURA DE LA TESIS	1
CAPITULO 1	7
INTRODUCCIÓN GENERAL	7
1.1. CONJUGADOS NANOPARTÍCULAS PROTEÍNAS	9
1.1.1. NANOPARTÍCULAS DE ORO (Au NPs)	11
1.1.1.1. Síntesis y química superficial de AuNPs	12
1.1.2. BIOFUNCIONALIZACIÓN DE Au NPs CON PROTEÍNAS	15
1.1.2.1. Estrategias no covalente	15
1.1.2.2. Conjugación covalente	17
1.1.3. CARACTERIZACIÓN BIOFÍSICA DE LOS CONJUGADOS	19
1.2. BIOSENSORES ÓPTICOS LSPR	23
1.2.1. BIOSENSORES	25
1.2.1.1. Clasificación de biosensores	26
1.2.2. BIOSENSORES ÓPTICOS	27
1.2.3. BIOSENSORES ÓPTICOS LSPR	28
1.2.3.1. Principio de funcionamiento	28
1.2.3.2. Detección de cambios de índice de refracción	32
1.2.3.3. Sensibilidad y resolución del biosensor	33
1.2.3.4. Configuraciones ópticas	35
1.2.3.5. Comparación de biosensores SPR vs. LSPR	37
1.2.4. BIOSENSORES DE AFINIDAD LSPR	39
1.2.4.1. Elementos de bio-reconocimiento	41
1.2.4.2. Formatos de detección	43
1.2.4.3. Inmovilización de los bio-reactivos	45
1.2.4.4. Detección de interacciones biomoleculares	47
CAPÍTULO 2	51
ENGINEERING THE INTERFACE BETWEEN THE rVuFeSOD AND THE NANOPARTICLES	51
2.1. INTRODUCTION	53
2.1.1. SUPEROXIDE OXIDE DISMUTASE ENZYMES	55
2.1.2. IMPORTANCE OF SODS IN MEDICINE	57
2.1.3. SOD-AuNP APPLICATIONS	57
2.2. MATERIALS AND METHODS	59
2.2.1. CHEMICALS AND BIOLOGICAL MATERIAL	61
2.2.2. METHODS	61
2.2.2.1. Overexpression of recombinant VuFeSOD	61

2.2.2.2. Gold nanoparticles synthesis (Au NPs)	63
2.2.2.3. Surface modification of Au NPs	65
2.2.2.4. Protein conjugation with AuNPs	65
2.2.2.5. Coverage	66
2.2.2.6. In-gel activity assays	66
2.2.2.7. Spectrophotometric activity assay	67
2.3. RESULTS AND DISCUSSION	69
2.3.1. IRON SUPEROXIDE DISMUTASE CHARACTERIZATION	71
2.3.1.1. A self-induction system for rVuFeSOD overexpression and purification	71
2.3.2. ENGINEERING THE NANOPARTICLE SURFACE CHEMISTRY	73
2.3.3. AU NPS AND rVuFeSOD CONJUGATION: PHYSICAL ADSORPTION VS COVALENT	76
2.3.3.1. Gold nanoparticle protein conjugation.	76
2.3.3.2. Gel electrophoresis	80
2.3.3.3. Quantifying the enzyme coverage on the Au NPs	81
2.3.3.4. Size and stability of conjugated rVuFeSOD – Au NPs	82
2.3.3.5. <i>Enzymatic activity</i>	83
2.4. CONCLUSION	87
CAPÍTULO 3	91
ENGINEERING THE INTERFACE BETWEEN THE GLUCOSE OXIDASE AND THE NP	91
3.1. INTRODUCTION	93
3.1.1. GLUCOSE OXIDASE	95
3.2. MATERIALS AND METHODS	97
3.2.1. CHEMICALS AND BIOLOGICAL MATERIAL	99
3.2.2. METHODS	99
3.2.2.1. Gold nanoparticles synthesis (Au NPs)	99
3.2.2.2. Surface modification of Au NPs	99
3.2.2.3. Conjugation of GOx to Au NPs	100
3.2.2.4. Displacement of GOx from Au NPs	100
3.2.2.5. Fluorescence spectroscopy	101
3.2.2.6. Activity of GOx	101
3.2.2.7. Circular Dichroism spectroscopy	103
3.3. RESULTS	105
3.3.1. GLUCOSE OXIDASE CHARACTERIZATION	107
3.3.2. ENGINEERING THE NP SURFACE CHEMISTRY	111
3.3.3. STABILIZATION OF GO _x BY OTHER PROTEINS	119
3.3.4. MANIPULATING THE GO _x MICROENVIRONMENT	121
3.3.5. PROTEIN AFTER DISPLACEMENT FROM THE NP SURFACE	125
3.4. CONCLUSIONS	130

CAPÍTULO 4	133
ANÁLISIS DE NANOESTRUCTURAS PERIÓDICAS DE ORO PARA CONFORMAR UN BIOSENSOR LSPR	133
4.1. INTRODUCCIÓN	135
4.1.1. PLATAFORMA EMPLEADA PARA LA CARACTERIZACIÓN Y MONITOREO DE LA DETECCIÓN DE LOS SISTEMAS BIOLÓGICOS	137
4.2. MATERIALES Y MÉTODOS	141
4.2.1. MATERIALES	143
4.2.2. MÉTODOS	144
4.2.2.1. Fabricación de nanoestructuras de oro	144
4.2.2.2. Plataforma empleada para la caracterización y monitoreo de la detección de los sistemas biológicos	145
4.2.2.3. Determinación de la sensibilidad y nivel de ruido	147
4.2.2.4. Biofuncionalización de superficies con biomoléculas	148
4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	151
4.3.1. CARACTERIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS INSTRUMENTALES DEL ESPECTROFOTÓMETRO	153
4.3.1.1. Modo espectral	153
4.3.1.2. Modo sensograma	156
4.3.2. NANOESTRUCTURAS COMO TRANSDUCTORES PLASMÓNICOS	158
4.3.2.1. Caracterización física de nanoestructuras de líneas	159
4.3.2.2. Caracterización física de nanoestructuras de discos	168
4.3.2.3. Caracterización física de nanoestructuras en absorbancia	176
4.3.2.4. Respuesta sensora	182
4.3.3. DISTANCIA DE PENETRACIÓN	183
4.3.4. LIMPIEZA DE NANOESTRUCTURAS	185
4.3.5. ENSAYOS PRELIMINARES Y PUESTA EN MARCHA DEL BIOSENSOR LSPR	189
4.4. CONCLUSIONES	195
CAPÍTULO 5	199
DETERMINACIÓN DE CASEÍNA EN SUPERFICIES MEDIANTE LSPR	199
5.1. INTRODUCCIÓN	201
5.1.1. ALERGENOS	203
5.1.2. SELECCIÓN DE MOLÉCULA DIANA	204
5.1.3. MONITORIZACIÓN DE CASEÍNA	206
5.1.3.1. Detección de caseína mediante ELISA	206
5.1.3.2. Detección de caseína mediante Test de tiras	207
5.1.3.3. Detección de Caseína mediante biosensores	208
5.2. MATERIALES Y MÉTODOS	209
5.2.1. MATERIALES	211

5.2.2. MÉTODOS	211
5.2.2.1. Fabricación de nanoestructuras de oro	211
5.2.2.2. Plataforma empleada para la detección de los sistemas biológicos	211
5.2.2.3. ELISA indirecto 2D	212
5.2.2.4. Bio-funcionalización de superficies con biomoléculas	212
5.2.2.5. Pruebas en superficies de acero	213
5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	215
5.3.1. INMUNOENSAYO LSPR PARA LA DETERMINACIÓN DE CASEÍNA EN MUESTRAS DE SUPERFICIE	217
5.3.1.1. Selección de condiciones de inmunización	217
5.3.1.2. Caracterización de caseína y anticuerpos anti-caseína	218
5.3.1.3. Inmovilización del anticuerpo en la nanoestructura	221
5.3.1.4. Inmunoensayo LSPR para la determinación de caseína en PBS	226
5.3.1.5. Primeras pruebas en superficie.	233
5.4. CONCLUSIONES	235
CONCLUSIONES GENERALES	239
APÉNDICE	245
PUBLICACIONES CIENTÍFICAS	257
CONTRIBUCIONES A CONGRESOS CIENTÍFICOS	257
BIBLIOGRAFÍA	259

MOTIVACIÓN Y ESTRUCTURA DE LA TESIS

En las últimas décadas, la investigación en el campo de los nanomateriales se ha desarrollado considerablemente, debido a las potenciales aplicaciones de estos materiales en muy diversos campos de la ciencia. En muchas de estas aplicaciones los nanomateriales se combinan con biomoléculas para formar nuevas estructuras híbridas. Estos nanobiohíbridos (NBH), presenta nuevas propiedades y funciones, pues de la combinación de ambos, el nanomaterial y las biomoléculas, origina respuestas totalmente diferentes, lo cual incrementa el rango de aplicaciones. (Tseng et al. 2006). Esta variedad de NBH, así como las numerosas aplicaciones crean una compleja gama de posibilidades y áreas de investigación. Dentro del campo de la biotecnología, encontramos aplicaciones de NBH tan diversas como, la detección óptica (F. Fernández et al. 2016) y electroquímica de sustancias (Govindhan, Liu, and Chen 2016), el marcaje e imagen (J. F. Hainfeld et al. 2000), catálisis (Xiao et al. 2003), y diagnóstico y terapia para diversas enfermedades, en particular una de las más estudiadas el cáncer (Elzoghby et al. 2016).

Estos NBH, ya existen en el mundo natural, y resultan en funciones muy útiles e interesantes, por ejemplo las proteínas anticongelantes de los insectos. Estas proteínas presentan unas cadenas laterales posicionadas de manera regular, de tal forma que el aminoácido treonina de las cadenas puede unirse a los núcleos del cristal de hielo, previniendo la propagación de la cristalización (Liou et al. 2000). Un segundo ejemplo bien conocido son las proteínas implicadas en la deposición de carbonato de calcio en conchas de abulón (Jackson, Vincent et al. 1988). Las proteínas ameloblastina y amelogenina también son conocidas por controlar la formación de hidroxiapatita en el esmalte de los dientes (Forien et al. 2016; Paine et al. 2003). La interacción de proteínas con nanosuperficies sólidas por lo tanto no sólo es un fenómeno fundamental sino que es clave para su aplicación final.

Sin embargo, conseguir interfaces funcionales entre proteínas y superficies presenta grandes desafíos. La estructura y función de las proteínas están fuertemente influenciadas por el material, tamaño, forma y por la química superficial, que puede ser altamente variable (Cheung-Lau et al. 2014). La forma en que las propiedades superficiales afectan a las proteínas inmovilizadas es increíblemente compleja, y a menudo las interacciones no covalentes entre la superficie y las proteínas dan lugar a una disminución de la función de la proteína, llegando en algunos casos a la desnaturalización irreversible (Z. J. Deng et al. 2011; Gagner et al. 2011a).

Aunque se han logrado avances importantes, los detalles de la interface entre las nanoestructuras y las proteínas siguen siendo desconocidos y en muchos casos faltos por caracterizar y comprenderlos. En muchas de las investigaciones los esfuerzos se han centrado en crear nuevas y originales aplicaciones para los conjugados, pero carecen de un estudio riguroso de los propios complejos. Se ha comprobado que las interacciones entre las nanoestructuras y proteínas pueden ser modificadas a través de la química superficial mejorando la estructura y función de la proteína (Bailes et al. 2012). La unión covalente o

adsorción de proteínas sobre nanosuperficies también puede afectar en gran medida la estructura y función de la proteína, dando lugar a efectos beneficiosos o a efectos impredecibles y potencialmente indeseables.

El modo en que vayan a interactuar las nanoestructuras y las proteínas depende en gran medida de la naturaleza individual de la proteína y de la superficie involucrada. La fabricación de estos nuevos NBH requiere por lo tanto una comprensión detallada de las estructuras individuales que lo componen (biomoléculas y nanomaterial), así como de los mecanismos implicados en la interacción de sistemas biológicos con nanomateriales. La comprensión de estos mecanismos es de interés tanto en las disciplinas fundamentales como en las aplicadas.

Es precisamente en esta línea de trabajo en la que se ha basado esta tesis doctoral, cuyo objetivo principal consiste en llevar a cabo una eficiente inmovilización de proteínas en nanoestructuras de oro (nanopartículas de oro y superficies nanoestructuradas periódicas), de manera que una vez unido al nanomaterial, éstas conserven su configuración funcional, y así poder entender los mecanismos relacionados con la interacción entre proteínas y nanoestructuras de oro.

Con este fin, el trabajo de tesis se divide en dos grandes bloques:

1.- Desarrollo y optimización de conjugados entre nanopartículas de oro y enzimas: El objetivo fundamental de este bloque es avanzar en el conocimiento de la interface entre nanopartículas de oro y proteínas. Para ello, es necesario realizar un estudio de los diferentes parámetros que afectan tanto a la estructura como a la actividad de la proteína, como por ejemplo la química superficial de la NP, la naturaleza de fijación, y el microambiente que rodea las proteínas. Con este fin se han realizado estudios experimentales para explicar el comportamiento de la proteína en las superficies de Au NP, en función de estos parámetros.

2.- Desarrollo de un inmunosensor LSPR basado en superficies nanoestructuradas. La biofuncionalización de la superficie sensora con anticuerpos es un paso clave en el desarrollo de un inmunosensor, ya que determina la especificidad, sensibilidad, reproducibilidad y estabilidad del mismo. El objetivo fundamental de este bloque es el desarrollar y optimizar un método de inmovilización de anticuerpos en superficies nanoestructuradas de oro con la finalidad de obtener un inmunosensor de alto rendimiento. Pero el rendimiento del inmunosensor no solo va a depender del proceso de inmovilización. Las nanoestructuras así como el sistema óptico empleado, juegan un papel muy importante, por lo que es necesario la caracterización conjunta de estos dos elementos.

Para la consecución de estos objetivos, la estructura de esta Tesis sigue el siguiente esquema:

El capítulo 1, introducción general. El capítulo 1 se divide en dos bloques. La primera parte consiste en una visión general de las principales estrategias de biofuncionalización entre proteínas y Au NPs, haciendo especial hincapié en las ventajas y limitaciones de cada una de ellas. Además, se mencionan las principales técnicas de caracterización de conjugados. En la segunda parte, en primer lugar se da una visión general de los biosensores y en especial los biosensores LSPR, y en segundo lugar se da una visión general de los inmunosensores donde también se describen las principales estrategias de biofuncionalización de anticuerpos a superficies de oro.

Los siguientes dos capítulos (capítulo 2 y capítulo 3) se centran en los complejos proteínas-Au NPs. Así, se ha estudiado la biofuncionalización de nanopartículas de oro con la superóxido dismutasa de hierro (capítulo 2) y la glucosa oxidasa (capítulo 3), con el objetivo de optimizar la actividad y estructura de las enzimas en las Au NPs.

En el capítulo 2 se ha conjugado la proteína recombinante superóxido dismutasa de hierro (rVuFeSOD) a Au NPs covalentemente y por adsorción física, utilizando ácido mercaptoundecanoico como nexo de unión. Se ha determinado el efecto de la concentración del ligando en la cobertura y la actividad de la proteína. Con el objetivo de profundizar el método de unión por adsorción física, en el capítulo 3, la glucosa oxidasa se ha conjugado a Au NPs en función de la química superficial de la nanopartícula, del microambiente, y del uso de aditivos proteicos estabilizadores. Esta vez se ha caracterizado la cobertura, la actividad enzimática, y la estructura secundaria de la proteína una vez inmovilizada en la superficie de la NP.

Los siguientes dos capítulos (capítulo 4 y capítulo 5) se centran en el desarrollo de un inmunosensor LSPR. En el capítulo 4 se realiza la caracterización óptica de dos tipos de nanoestructuras de oro periódicas, nanolíneas y nanadiscos, con un espectrofotómetro común de laboratorio como plataforma de medida. Por último, con el fin de verificar la capacidad biosensora de la plataforma, se aplican dos formatos de medida con un modelo bien conocido y estable formado por una Inmunoglobulina de conejo (IgG) y una anti-inmunoglobulina de conejo producida en cabra (Anti-IgG).

El capítulo 5 contempla la aplicación final del biosensor LSPR para la detección y cuantificación de la caseína. Se describe el estudio sistemático realizado para el proceso de inmovilización del anticuerpo en superficie, así como para la detección de la caseína. Finalmente se determina el límite de detección, el rango dinámico, y la reproducibilidad del protocolo.

Finalmente, este trabajo doctoral concluye con la exposición de las conclusiones generales y las aportaciones más significativas y relevantes de esta investigación en las dos áreas de trabajo.

CAPITULO 1

Introducción general

1. 1. CONJUGADOS NANOPARTÍCULAS PROTEÍNAS

Existe una gran variedad de métodos para la preparación de conjugados entre proteínas y Au NPs. Esta sección pretende dar una visión general sobre las principales estrategias de biofuncionalización entre proteínas y Au NPs, haciendo especial hincapié en las ventajas y desventajas de cada una de ellas. Además se describirán los principales métodos de caracterización de estos conjugados.

1.1.1. NANOPARTÍCULAS DE ORO (Au NPs)

Las nanopartículas de oro (AuNP) fueron el primer tipo de nanopartículas que se estudiaron extensamente por la ciencia moderna (Daniel and Astruc 2004). Los estudios de los procesos de nucleación y crecimiento se publicaron ya en 1951 (Turkevich et al. 1951a), sin embargo, la historia de AuNPs se extiende mucho más allá del siglo XX. Las propiedades ópticas de las nanopartículas de oro fueron explotadas en los siglos IV y V para colorear el vidrio y más tarde en la Edad Media para el diagnóstico y tratamiento de una variedad de enfermedades (Daniel and Astruc 2004). Recientemente, las nanopartículas de oro han recibido mucha atención dentro de la óptica y la electrónica, además gracias a su biocompatibilidad, facilidad de conjugación con biomoléculas y alta estabilidad han sido y siguen siendo de gran interés. Por ello, no es sorprendente su uso como sistemas modelo para estudiar la interfaz nano-bio, ya que las ventajas que presentan son muchas.

Las propiedades físicas de AuNPs están dominadas por su tamaño nano, siendo diferentes a las propiedades del material masivo, así como a las de los átomos individuales. Cuando el tamaño del material disminuye a escala nano, se produce un incremento enorme en la fracción de átomos superficiales, adquiriendo mucha importancia los efectos de superficie. Estos átomos localizados en la superficie del nanomaterial presentan diferentes características a los átomos de volumen, al tener menos coordinación y estar más expuestos al medio. Debido a este efecto las Au NPs presentan la resonancia del plasmón superficial localizado (LSPR). Este fenómeno consiste en una oscilación colectiva de los electrones en el seno del material cuando son excitados con la luz (Mie 1976). Esto da lugar a un pico de absorción característico que varía desde el infrarrojo hasta el ultravioleta dependiendo del material, la forma, las dimensiones y el índice de refracción del medio (Haynes and Van Duyne 2001). Por ejemplo, las Au NPs esféricas con tamaños entre 10 y 25 nm presentan un pico de absorción característico alrededor de ~ 520 nm. Esta frecuencia de absorción depende en gran medida de la distancia entre las partículas. Cuando AuNPs se acercan unas a otras y comienzan a agregar, la longitud de onda de la frecuencia de absorción se desplaza hacia el infrarrojo a unos ~ 650 nm. Este cambio se aprecia a simple vista ya que se produce un cambio en el color de la solución, pasando de un color rojizo a un color azul (Pissuwan et al. 2007), lo que hace que AuNPs sean un excelente indicador de los eventos de unión e hibridación (J.-S. Lee et al. 2007; Sato et al. 2003).

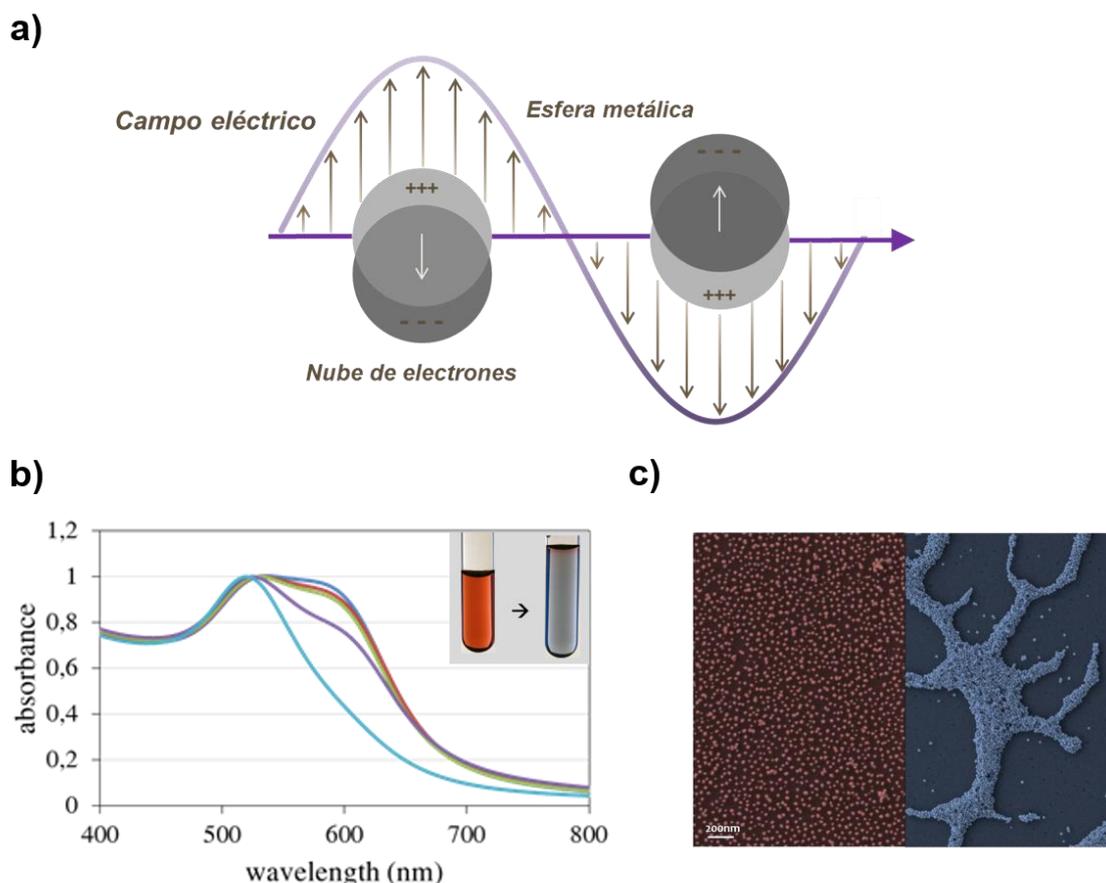


Figura 1.1. a) Resonancia del plasmón superficial localizado (LSPR): oscilación colectiva de los electrones de las AuNPs al incidir con la luz, b) espectros de absorbancia de nanopartículas de oro de 9,6 nm (negro) y espectro de absorción de nanopartículas de oro de 9,6 nm agregadas, y c) imágenes de FeSEM coloreadas de nanopartículas de oro sin agregar y agregadas.

1.1.1.1. Síntesis y química superficial de AuNPs

Hoy en día existe una amplia variedad de técnicas para sintetizar AuNPs de diferentes tamaños y formas, así como para pasivar las superficies de las mismas (Daniel and Astruc 2004). Las síntesis de AuNPs esféricas se puede realizar en medios acuosos, orgánicos y de dos fases, produciendo una gama de nanopartículas de tamaño entre 1,5 y 200 nm (Turkevich et al. 1991b; Brust et al. 1994; Weare et al. 2000; Bastús, Comenge et al. 2011). Es posible sintetizar con un alto grado de pureza y concentración (coeficiente de extinción $\sim 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). La solubilidad, estabilidad y reactividad de las AuNP estarán dominadas por las moléculas de ligando que se utilizan para pasivar la superficie (G. Zhang et al. 2009).

Las nanopartículas se pueden sintetizar con numerosos ligandos desde el citrato, a diversos tioles de alcano, moléculas lipídicas y poliméricas (Daniel and Astruc 2004). Estos ligandos pueden actuar simplemente como estabilizador o como ambos, reductor y estabilizador durante la síntesis. Además, los ligandos pueden estar adsorbidos en la superficie

o bien pueden unirse fácilmente mediante unión covalente a través de enlaces directos del grupo tiol con los átomos del oro.

Una vez sintetizadas las Au NPs es posible intercambiar ligandos que proporcionen nuevas propiedades o funcionalidades (Wijaya et al. 2008). En la mayoría de los casos, las nuevas moléculas de ligando entrantes presentan mayor afinidad por la superficie de la NP y se unen fuertemente de tal manera que son capaces de reemplazar de forma eficaz y rápidamente los ligandos originales. Un ejemplo típico son las Au NPs sintetizadas con citrato. Los iones de citrato cargados negativamente quedan adsorbidos en la superficie y las NPs se estabilizan por repulsión electrostática, siendo muy estables durante mucho tiempo en el medio que se han sintetizado. Sin embargo, al añadir NaCl a una concentración elevada éstas suelen agregar irreversiblemente. Generalmente para evitar esta agregación irreversible es muy común sustituir el citrato por otras moléculas que estabilizan mejor las NP, siendo las más comunes las fosfinas sulfonadas o los ácidos mercaptocarboxílicos (Sperling et al. 2010).

Las Au NPs modificadas con fosfinas sulfonadas, permite lograr soluciones de partículas altamente concentradas, además, aunque agregan en concentraciones altas de sal, esta agregación es reversible. Dentro de los ácidos mercaptocarboxílicos, el ácido mercaptoundecanoico (MUA) ha sido uno de los más estudiados (Siriwardana et al. 2013), pero podemos encontrar muchos más como el ácido mercaptopropiónico (MPA) (Yu and Tseng 2008) o ácido mercaptohexadecanoico (MHDA) (S. Xu et al. 2013). Estos ligandos son ligandos heterobifuncionales, por un lado presentan un grupo afin al oro (el grupo tiol generalmente) y por el otro extremo un grupo funcional, en los cuatro ejemplos arriba mencionados, un grupo carboxilo (-COOH), pero existen de diferente naturaleza como metilos (-CH₃), aminos (-NH₂), hidroxilos (-OH), tiol (-SH), azida (-N₃), biotina, maleimida y muchos más. Este grupo funcional reactivo como veremos más adelante determinará la estrategia de unión con biomoléculas.

La naturaleza de la parte espaciadora de los ligandos heterobifuncionales suele ser lineal y puede ser muy diversa. Por ejemplo, encontramos los ligandos que están formados por alcanos lineales (como por ejemplo, el MUA). Estos ligandos presentan propiedades hidrofóbicas y se suelen organizar en monocapas ordenadas autoensambladas en superficies planas (SAM, del inglés *self assembled monolayers*) (Vericat et al. 2010). En las NPs este ordenamiento es más complicado de realizar ya que las NPs son mucho más complejas que una simple esfera y puede interactuar de muchas maneras con los ligandos. La superficie de las NPs no son uniformes, presentan vértices y bordes, cada uno de los cuales pueden tener diferentes afinidades químicas a la adsorción de los ligandos (Fenoglio et al. 2011). Además, los ligandos unidos a las nanopartículas presentan un cierto grado de libertad, y son capaces de difundir en cierto modo por la superficie (Hostetler et al. 1999). También se ha descrito que los ligandos di-tiol proporcionan una estabilidad coloidal mejorada respecto a los monotioles (Yonezawa et al. 2001), sin afectar significativamente en el empaquetamiento de las moléculas en superficie.

Otros ligandos heterobifuncionales muy interesantes son los formados por polietilenglicol. El PEG es un polímero lineal constituido por monómeros de etilenglicol (-CH₂-CH₂-O-). En este caso la cadena lineal es hidrofílica. Estos ligandos no proporcionan estructuras tan ordenadas, aportando grados adicionales de libertad para los grupos funcionales terminales. Se ha comprobado que estos ligandos pueden mejorar significativamente la estabilidad de las nanopartículas *in vitro* e *in vivo*, además de prevenir las adsorciones inespecífica de biomoléculas debido principalmente al impedimento estérico y el alto grado de hidratación (Manson et al. 2011). Estos ligandos, al igual que los alcanos lineales, pueden presentar grupos terminales de diferente naturaleza.

Otra opción muy interesante, son los ligando heterobifuncionales que combinan cadenas de alcanos y cadenas de PEG en la parte lineal, aprovechando las propiedades de ambas: empaquetamiento y biocompatibilidad (Lucarini et al. 2010). También se han descrito NPs cubiertas por una combinación de ligandos, por ejemplo, un ligando con grupo reactivo (-COOH) y el otro no (-CH₃). Esta estrategia se suele utilizar para disminuir la densidad de carga y controlar el grado de biofuncionalización (Fernández et al. 2012). También es posible la combinación de dos ligandos con grupos reactivos distintos para formar sistemas más complejos donde dos biomoléculas distintas se pueden unir a la nanopartícula (Pillai et al. 2016).

Los ligandos zwitteriónicos heterobifuncionales también son muy interesantes. Un zwitterión es un compuesto químico que es eléctricamente neutro pero que tiene cargas formales positivas y negativas sobre átomos diferentes. Los ligandos zwitteriónicos presentan una excelente bio-estabilidad y bio-compatibilidad, y son muy interesantes para minimizar la adsorción inespecífica, mejorando las propiedades de los PEG (Susumu et al. 2011a, 2011b; Jin et al. 2008)

Los ligandos poliméricos solubles en agua, también se han utilizado extensamente para estabilizar las NPs. Estos polímeros rodean las NPs, generando un aumento sustancial del radio hidrodinámico, e impidiendo que las NPs entren en contacto entre si y agreguen. Algunos de estos ligando poliméricos son la polivinil pirrolidona (PVP), (Ma et al. 2004), la polietilenimina (PEI) (Tavahodi et al. 2017) y algunos carbohidratos tales como el dextrano (S. Lee et al. 2005), y el quitosano (Luo et al. 2004). También se han descrito, metodologías sencilla y versátiles para funcionalizar las nanopartículas con azúcares (glicon nanopartículas) (Barrientos et al. 2003) y dendrímeros. Esta funcionalización se obtiene a partir de una molécula central unida a la NPs que se hace crecer hacia fuera para formar estructuras tridimensionales globulares (Guo et al. 2007).

1.1.2. BIOFUNCIONALIZACIÓN DE Au NPs CON PROTEÍNAS

En los últimos años se han desarrollado numerosas técnicas de inmovilización, las cuales están basadas principalmente en dos tipos de interacciones. El primero es en la inmovilización no covalente entre la proteína y la NP, que incluye la inmovilización por adsorción física y por afinidad. El segundo consiste la unión covalente que implica la formación de un enlace covalente estable entre la molécula a inmovilizar y la NP. Se diferencian entre la unión covalente directa de la proteína a la AuNP mediante grupos cisteína, y la unión covalente de la proteína a través de ligandos unidos a la superficie. Ambos enfoques presentan una serie de ventajas e inconvenientes y por lo tanto, tienen un lugar en el "conjunto de herramientas" de la bionanotecnología. La estrategia a seguir y la elección del método va a depender de las propiedades de las nanopartículas, de las biomoléculas así como de la aplicación final.

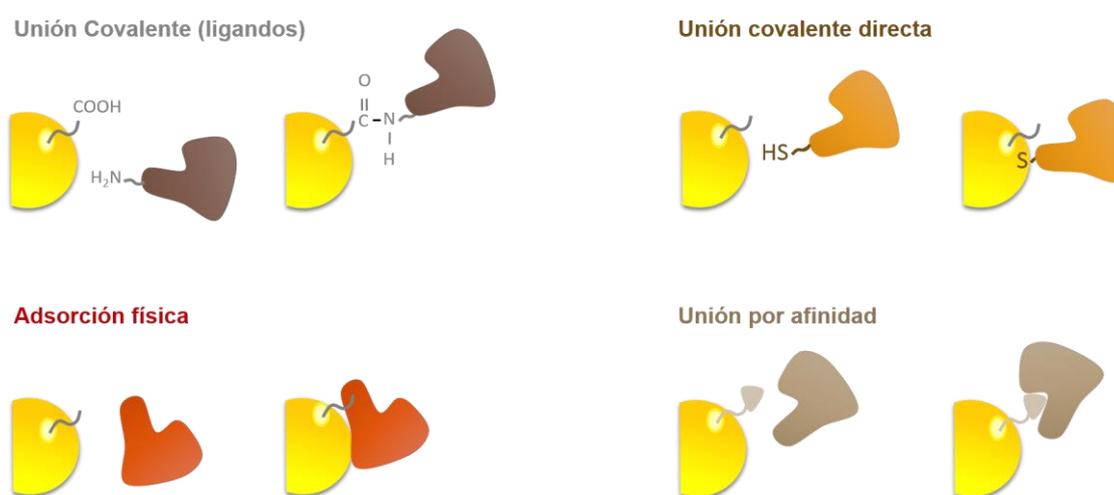


Figura 1.2. Estrategias de inmovilización entre AuNP y proteínas: Unión covalente mediante ligandos, Unión covalente directa, Adsorción física y unión por afinidad.

1.1.2.1. Estrategias no covalente

Adsorción física

La adsorción física sobre AuNPs se emplea comúnmente como método de inmovilización, debido a su simplicidad y rapidez. De hecho, se ha comprobado que la adición de una proteína a una solución de AuNPs recubiertas con citrato, resulta en la adsorción espontánea de la proteína a la AuNPs, debido a interacciones electrostáticas, hidrofóbicas, y de Van der Waals (Brewer et al. 2005). Esta estrategia se ha utilizado satisfactoriamente en muchas aplicaciones como marcador electrónico (Seekell et al. 2011), ensayos tipo test de tiras (Choi et al. 2010), o como sondas para amplificar la señal de inmunoensayos (Ciaurriz et al. 2017)

Sin embargo, este método carece de especificidad química, lo que es un hándicap en la formación de bioconjugados bien definidos. Esta unión resulta débil, y por tanto poco estable

ante variaciones de pH, temperatura, fuerza iónica o ante la naturaleza química del microambiente, por lo que la pérdida de proteína inmovilizada se puede producir con facilidad. Además, el escaso control sobre el proceso de inmovilización que caracteriza a esta estrategia conduce a una disminución considerablemente de la reproducibilidad del conjugado.

Sin embargo en los últimos años, a través de la modificación estratégica de la química superficial de NP (Bayraktar et al. 2007), así como a través del control del pH (Parolo et al. 2013), se han obtenido interacciones regio-específicas con proteínas.

Afinidad

Se ha mostrado un gran interés creciente en los sistemas basados en el reconocimiento molecular encontrados en la naturaleza, como el que se produce entre la avidina-biotina. Las ventajas son muchas. La biotina (vitamina H) es soluble en agua y puede unirse fácilmente a ligandos pequeños como a moléculas grandes. El complejo formado por avidina biotina es la interacción no covalente más fuerte conocida hasta ahora ($K_d \sim 10^{-15}$ M) (Takeuchi et al. 1991). El enlace es extremadamente estable, resistiendo a condiciones químicas extremas y a alta temperatura. La proteína avidina globular está constituida por cuatro subunidades idénticas, dando lugar a cuatro puntos de unión para la biotina. Además de la avidina, existen disponibles proteínas análogas expresadas en bacterias o proteínas recombinantes siendo las más frecuentes la estreptavidina y la neutravidina.

La estrategia que comúnmente se utiliza es la inmovilización de la avidina en la NP y la biotinización de la proteína. La biotina se puede sintetizar con grupos reactivos como amina, tiol, carboxilo y otros grupos funcionales, que luego pueden utilizarse para funcionalizar la proteína (Hermanson, 2008). Aunque el sistema avidina-biotina es fácil de configurar y usar, tiene ciertas limitaciones, por un lado es necesario modificar la proteína y por otro lado es necesario lograr que la biotinización sea específica, para poder controlar la orientación de la unión.

Las denominadas etiquetas proteicas son otra clase de sistemas que se pueden utilizar para formar conjugados a través de la interacción por afinidad. Estas etiquetas se suelen añadir a la secuencia de aminoácidos de la proteína recombinante comúnmente formadas por seis o más residuos de histidina en uno de los extremos terminales de la proteína. Estas etiquetas se utilizan para la purificación de la proteína. La polihistidina se une específicamente y fuertemente al ácido nitrilotriacético (NTA) a través de un complejo quelante formado con el Ni^{2+} u otros iones metálicos bivalente. La estrategia general consiste en modificar la superficie con un agente quelante como el ácido nitrilotriacético (NTA) (James F. Hainfeld et al. 1999; Hu et al. 2007; H.-Y. Xie et al. 2010).

1.1.2.2. Conjugación covalente

La unión covalente de proteínas a NPs proporciona conjugados que son estables frente a la disociación, una cuestión muy importante para muchas aplicaciones. En particular, esta estrategia es muy interesante cuando la aplicación del conjugado se da en medios biológicos complejos donde pueden interactuar con otras especies. Estos conjugados son más estables a cambios de pH y fuerza iónica que los conjugados formados por adsorción.

Unión covalente directa

La unión covalente directa entre proteínas y nanopartículas implica la formación de un enlace covalente estable entre el grupo tiol de la cisteína y la Au NP (-S-Au-). A menudo las proteínas presentan grupos cisteínas enlazados entre sí para formar puentes disulfuros, que tienen como finalidad mantener la estructura, el plegamiento y la función de las proteínas. En otros casos las proteínas presentan grupos cisteínas sueltas que pueden formar un enlace covalente con el oro. Esta capacidad se ha explotado como método de unión a través de la inserción de residuos de cisteína en la estructura de la proteína mediante mutagénesis dirigida. La capacidad de poder elegir el lugar de inserción de un grupo cisteína en la secuencia de AA permite controlar la orientación de la proteína en la superficie, ya sea para bloquear e inactivar la enzima o para mantener el centro activo libre. En general, la introducción de cisteínas a la proteína no suele mejorar la cinética de unión pero sí la estabilidad del conjunto (Siriwardana et al. 2013). Cada biomolécula es particular, y por lo tanto no es sencillo identificar el mejor lugar para introducir un grupo cisteína, ya que no sólo interactúa la cisteína con la nanopartícula, los aminoácidos adyacentes también interactuarán. Se ha comprobado para el caso del citocromo c que la introducción de un residuo de cisteína en los motivos flexibles de la proteína es mejor, ya que la perturbación producida en la proteína es local y no general (Aubin-Tam et al. 2009). La mayor desventaja de esta estrategia es que requiere de mutagénesis dirigida.

Enlace covalente mediante ligandos (moléculas enlazadoras)

El enlace covalente mediante moléculas enlazadoras se basa en una reacción entre grupos reactivos de la biomolécula a inmovilizar y grupos reactivos de la AuNPs.

En el caso de las biomoléculas, en la mayoría de las reacciones químicas, intervienen los grupos nucleófilos de las biomoléculas, como grupos amino (-NH₂), grupos carboxílicos (-COOH), grupos tiol (-SH) y también grupos hidroxilo (-OH). De entre los 20 aminoácidos diferentes que se encuentran en la estructura de las proteínas, los más empleados para la formación de enlaces con las Au NPs son principalmente la lisina, la cisteína, la tirosina y la histidina, y en menor medida la metionina, el triptófano, la arginina, la serina, el ácido aspártico y glutámico. La reacción química que hemos utilizado en este trabajo para enlazar covalentemente la proteína a la Au NPS, se basa en la química de carbodiimidias (EDC/sulfo-NHS).

Reacción de acoplamiento a través de EDC: Las Au NPs estabilizadas con ligandos que presentan grupos carboxílicos pueden ser utilizadas para la bioconjugación con biomoléculas. Los grupos carboxílicos se pueden hacer reaccionar con aminas primarias de las proteínas a través de un enlace amida por medio de una reacción de condensación. Para ello, comúnmente se utiliza una carbodiimida soluble en agua (por ejemplo, el EDC, ver Figura 1.3-A). Una carbodiimida es un compuesto orgánico caracterizado por presentar un grupo funcional $RN=C=NR$. La carbodiimida activa los ácidos carboxílicos de tal manera que se forma la *O*-acilisourea que puede ser considerada como un éster carboxílico con un grupo saliente activado. Este compuesto intermediario posteriormente puede reaccionar con aminas para producir la amida deseada y una urea. Sin embargo, la reacción de acoplamiento tiene que llevarse a cabo rápidamente, ya que el éster reactivo que se forma puede hidrolizarse rápidamente en soluciones acuosas. Para aumentar la estabilidad y la eficiencia de la reacción se suele añadir N-hidroxisuccinimida (NHS) o N-hidroxisulfoxuccinimida (sulfo-NHS) (Jang and Keng 2008). De esta manera, es posible eliminar el exceso de EDC de las partículas antes de añadir la proteína, así previniendo la polimerización de proteínas vía EDC. Para conjugación de partículas es más aconsejable utilizar el sulfo-NHS ya que el éster activo formado con éste, presenta carga negativa, lo que fomenta la estabilidad de las Au NPs. Los parámetros clave que se deben controlar cuando se utiliza EDC son el pH (ya que la hidrólisis depende en gran medida del pH), la cantidad de EDC de modo que las Au NPs no agregan debido a la pérdida de fuerzas repulsivas electrostáticas entre NPs y la relación EDC / NHS.

Una de las principales ventajas del acoplamiento a través de EDC es la solubilidad en agua del mismo. Además, el exceso de reactivos y subproductos pueden eliminarse fácilmente mediante centrifugación. La unión de la proteína al ligando es directa a través de un enlace amida, lo que permite minimizar el radio hidrodinámico del conjugado. La mayor desventaja radica en que no garantiza una inmovilización orientada en la mayoría de los casos, con anticuerpos ha sido posible generar cierta orientación (Sara Puertas et al. 2011) pero no siempre es fácil.

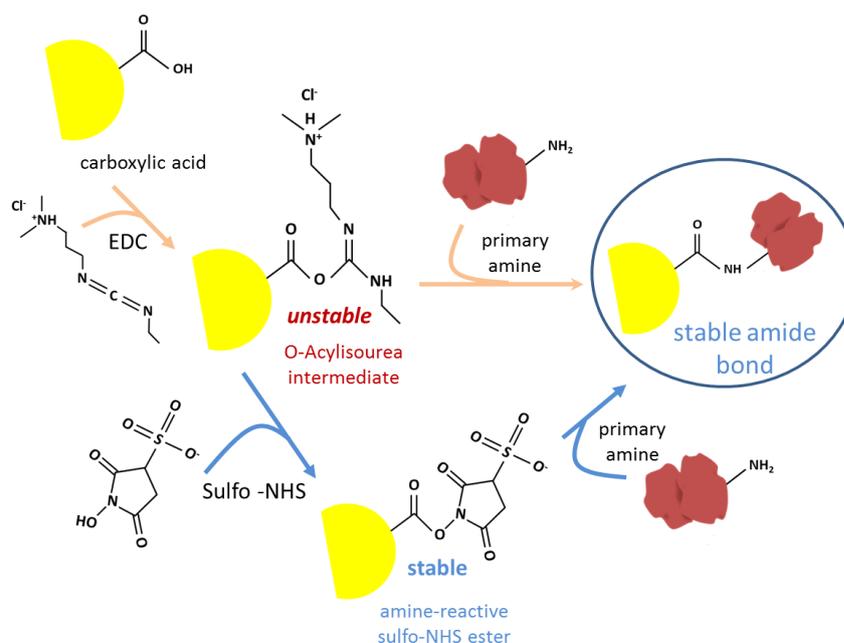


Figura 1.3. Unión covalente entre nanopartículas de oro funcionalizadas con grupo carboxilo y proteínas a través de un enlace amida. Los grupos carboxilos se activan con el reactivo EDC, para formar un grupo reactivo inestable (O-acilisourea). Este grupo puede reaccionar con los grupos aminos de la proteína. La adición de sulfo-NHS reacciona con el O-acilisourea para formar un éster-NSH más estable, que a su vez también puede reaccionar con los grupos aminos de la proteína para formar un enlace amida.

Reacción química "click": Más recientemente, se ha utilizado la reacción "click" para unir proteínas a NPs. Esta estrategia es rápida, sencilla de usar, fácil de purificar, regio-específica y se obtienen altos rendimientos de reacción. Una de las reacciones más populares dentro del concepto de la química click es la cicloadición de azidas y alquinos de Huisgen usando un catalizador de cobre (Cu) a temperatura ambiente. La estrategia común consiste en usar un ligando con grupo funcional ácido ($-\text{N}_3$) y unir un grupo alquino a la proteína. Una variedad de proteínas se han unido de forma funcional utilizando este método, incluyendo la lipasa (Brennan et al. 2006) y la tripsina (Gole and Murphy 2008).

Las principales limitaciones de este tipo de bioconjugación son dos. La primera está relacionada con la posible deficiencia de electrones del grupo azida. En este caso, la azida no es capaz de interactuar con el alquino y no se da la reacción (Hein, Liu, and Wang 2008). La segunda limitación está relacionada con la capacidad que tiene un alquino de reaccionar con un segundo alquino en lugar de con la azida. Este proceso se puede minimizar usando una base estéricamente voluminosa. Además de estas limitaciones, una de las desventajas más obvias es la necesidad de un catalizador de cobre.

1.1.3. CARACTERIZACIÓN BIOFÍSICA DE LOS CONJUGADOS

Una vez se ha producido la biofuncionalización entre la AuNPs y la proteína y se ha purificado, los NBH deben ser caracterizados. Esta caracterización requiere medir la estructura

secundaria, la función de la proteína, así como la estequiometría y afinidad de la unión, ya que esta información revelará el grado de organización de las proteínas en NPs.

La estructura de la proteína está relacionada con su función biológica. Las Au NPs pueden perturbar la estructura de la proteína, por lo que es muy importante caracterizar la estructura de la proteína una vez se ha unido a la nanopartícula. Existen diferentes técnicas capaces de estudiar la estructura de las proteínas, pero sólo unas pocas se pueden utilizar para el estudio de la estructura de las proteínas una vez se han conjugado a NPs. Uno de los más utilizados es el dicroísmo circular.

Dicroísmo circular: Tradicionalmente la espectroscopia de dicroísmo circular (CD) se ha utilizado para medir la estructura secundaria de las proteínas. También se puede utilizar como una herramienta útil para determinar la estructura de la proteína una vez se ha unido a la NP (Vertegel et al. 2004). La espectroscopia CD se define como la diferencia entre la absorción de luz polarizada circularmente a la izquierda y a la derecha por compuestos ópticamente activos. En el caso particular de las proteínas, el CD es una técnica muy valiosa, ya que permite llevar a cabo estudios estructurales en las condiciones donde las biomoléculas funcionan normalmente: en solución, proporcionando así medidas de cambios estructurales esenciales para su función biológica. Los espectros de CD de proteínas en el UV-lejano (260-178 nm) son intensos, y se requieren cantidades relativamente pequeñas para registrarlas. Debido a que todos los enlaces peptídicos contribuyen al espectro observado. En esta zona es donde absorbe el enlace peptídico y refleja el contenido de la estructura secundaria (hélice α , hoja β , y ovillo al azar) pudiendo determinar las cantidades relativas de cada motivo.

Se ha conseguido caracterizar la estructura de proteínas en NPs satisfactoriamente con DC. Algunos ejemplos son los conjugados formados por lisozima-partículas de sílice (Vertegel, Siegel, and Dordick 2004); lisozima-nanocubos y α -quimotripsina-nanocubos de oro (Gagner et al. 2012), ferritina-Au NPs y citocromo c-Au NPs (Aubin-Tam et al. 2009; Cheung-Lau et al. 2014),.

Sin embargo, obtener espectros satisfactorios de los conjugados es muy complicado. Aunque no son necesarias grandes cantidades de proteína para realizar los espectros, las NPs pueden distorsionar la señal significativamente. Uno de los principales problemas en las medidas de DC es que las señales se distorsionan si no llega la suficiente luz al fotomultiplicador y, en términos prácticos, esto quiere decir que no se pueden hacer medidas confiables en muestras con una absorbancia mayor a 1.

Resonancia magnética nuclear (RMN): La resonancia magnética nuclear es una técnica que se puede utilizar para examinar tanto la estructura como la estequiometría en los conjugados formados por Au NP y proteína. Se basa en la medición de los cambios químicos isotrópicos. El desplazamiento químico del protón amida es muy sensible a su entorno y a través de un espectro 2D HSQC es posible determinar la posición de cada uno de ellos a lo largo de la

cadena polipeptídica (Medek et al. 2000). Por lo tanto, está técnica puede elucidar qué residuos están en contacto con la superficie de la partícula. Generalmente se han obtenido resultados satisfactorios con Au NPs de tamaño inferiores a 10 nm. En los últimos años se ha conseguido resolver la estructura de las proteínas con Au NP de tamaño superior a 10. El sistema formado por ubiquitina-Au NP (12 nm) (Calzolari et al. 2010) y el sistema formado por 6 proteína de diferente tamaño y AuNP de 15 nm (A. Wang et al. 2014) son dos ejemplos.

Espectroscopia de absorción ultravioleta-visible: Es una de las técnicas más utilizadas para caracterizar la unión de la proteína a las Au NPs. Tal y como se ha comentado en el apartado 1.1.1 Nanopartículas de oro, las Au NPs presenta la resonancia del plasmón superficial localizado (LSPR), lo que da lugar a un pico de absorción característico que depende del material, la forma, las dimensiones, estado de agregación y el índice de refracción del medio. A medida que las proteínas se adsorben en la superficie de las NP metálicas, el índice de refracción del medio cambia dando lugar a un cambio en la resonancia del plasmón superficial localizado. Además de para caracterizar la unión de la proteína a la NP, también es una técnica útil para observar cambios conformacionales de la proteína. Se ha observado que la desnaturalización de la proteína puede provocar un cambio en la posición del plasmón. Este efecto se ha aprovechado para el desarrollo de sensores colorimétricos para monitorizar la desnaturalización de proteínas en superficies de NP. Algunas de estas proteínas son el citocromo c (Chah et al. 2005) y la SOD1 (Hong et al. 2009a)

Dispersión de luz dinámica: la dispersión de luz dinámica (DLS, del inglés Dynamic light scattering) es una técnica no invasiva y bien establecida para medir el tamaño y distribución de tamaño de moléculas y partículas típicamente en la región submicrométrica, y con la última tecnología, inferiores a 1 nm en muestra líquidas. La DLS es una herramienta útil para para caracterizar el tamaño de los conjugados y la agregación de los mismos. La medida se basa, en el movimiento Browniano de las partículas o moléculas en suspensión que hace que la luz láser se disperse en diferentes intensidades. Con el análisis de estas fluctuaciones en la intensidad se obtiene la velocidad del movimiento Browniano, y por lo tanto del tamaño de partícula mediante la relación de Stokes-Einstein. Esta técnica es un método frecuentemente utilizado para el estudio sistemático de las interacciones NP-proteína ya se puede obtener información acerca de la agregación, tamaños hidrodinámicos de la monocapa, o si las proteínas forman o no multicapas (Radauer-Preiml et al. 2016; Giri et al. 2014; Gagner et al. 2011b).

Gel de electroforesis: la electroforesis es una técnica para separar moléculas de una mezcla bajo la influencia de un campo eléctrico. Las moléculas disueltas migran por el gel debido al campo eléctrico a una velocidad que es función de la carga y la masa de la molécula. Para los conjugados de proteína y AuNPs se suele emplear geles de agarosa ya que presenta un tamaño de poro adecuado. Puede servir como método de purificación, así como para

caracterizar la biofuncionalización de las AuNPs (Aubin-Tam et al. 2009; Cheung-Lau et al. 2014) .

Espectroscopia de fluorescencia: La fluorescencia de una proteína plegada es una mezcla de la fluorescencia individual de los residuos aromáticos. La mayoría de las emisiones fluorescentes intrínsecas de una proteína plegada son debido a la excitación de los residuos de triptófano, con algunas emisiones debidas a la tirosina y a la fenilalanina. El triptófano tiene una longitud de onda de máxima absorción de 280 nm y un pico de emisión que es solvatocrómico, puede variar entre 300 y 350 nm dependiendo de la polaridad del medio (Ghisaidoobe and Chung 2014). A medida que la proteína cambia de conformación, la fluorescencia intrínseca de la proteína también cambiará, por lo tanto, la fluorescencia puede ser un método para detectar cambios en la conformación de las proteínas una vez se ha unido a la NP. Las medidas de fluorescencia pueden monitorizar tanto la disminución como el aumento de la fluorescencia de la proteína a medida que se va uniendo a la Au NPs. Sin embargo, la interpretación de las medidas suele ser bastante compleja ya que las AuNPs pueden absorber a la longitud de excitación de los fluoróforos así como la fluorescencia del fotón (Ameer et al. 2012).

La **Calorimetría isoterma de titulación** (ICT del inglés, *Isothermal Titration Calorimetry, ITC*) es una técnica experimental calorimétrica, frecuentemente usada en estudios de bioquímica física y de farmacología, que permite determinar cuantitativamente de manera directa la entalpía de unión de una molécula o de un complejo molecular, mediante la medición del calor liberado o absorbido a presión constante durante una reacción diseñada específicamente para el experimento. La ITC se ha utilizado satisfactoriamente para la determinar los parámetros termodinámicos de la formación de corona de las proteínas sobre la NPs (Gagner et al. 2012). Se determinan parámetros tales como la constante de afinidad, la estequiometría y el cambio de entalpía. La ITC mide el calor incremental que se produce cuando se añade a una solución de NPs inyecciones secuenciales de proteína. Una de las mayores limitaciones es que requiere concentraciones altas de muestra y los experimentos pueden ser muy largos. Además, la oxidación de los tioles puede contribuir al calor observado (A. Wang et al. 2014).

1.2. BIOSENSORES ÓPTICOS LSPR

1.2.1. BIOSENSORES

Los biosensores son dispositivos analíticos compactos capaces de convertir la interacción selectiva entre un bio-receptor y un analito (sustancia a determinar por el bio-receptor) en una señal cuantificable. Se componen por dos elementos fundamentales: (1) un **receptor biológico** (un anticuerpo, un ADN, una enzima, un receptor, etc.) o biomimético (un aptámero, polímeros molecularmente impresos, etc.) preparado para interactuar de forma selectiva con una sustancia (analito), y (2) un **transductor** o sensor fisicoquímico, capaz de interpretar la interacción biológica y traducirla en una señal cuantificable.

El funcionamiento general consiste en inmovilizar el bio-receptor en la superficie sensora y ponerlo en contacto con una muestra compleja, donde el elemento de reconocimiento biológico es capaz de discriminar entre los distintos componentes de la misma e interactuar con el compuesto a analizar. Cuando la interacción tiene lugar se producen una serie de cambios físico-químicos (propiedades de la luz, masa, transferencia de electrones, de calor, etc.) que el transductor es capaz de detectar, produciendo una señal cuantificable y proporcional a la concentración del analito detectado. Para que el transductor sea capaz de detectar la interacción entre el bio-receptor y el analito es necesario que el bio-receptor y el transductor, se encuentren estrechamente asociados, y esta asociación es la que confiere a los dispositivos biosensores sus especiales características de **selectividad** y **sensibilidad**.

Hoy en día los biosensores están representando una alternativa económica a los métodos clásicos de detección que requieren instrumentación compleja y de escritorio (cromatografía líquida (HPLC), cromatografía de gases (CG), etc.), tiempos largos de ensayos (ELISA), además de personal cualificado para su uso e interpretación de resultados. Esto se debe a que los biosensores además de caracterizarse por su selectividad y sensibilidad presentan una serie de ventajas respecto a las técnicas convencionales de análisis. Una de la más importante es la posibilidad de realizar análisis rápidos de sustancias en **tiempo real** y **de forma directa**, sin marcadores, lo que posibilita evaluar la **cinética** de la interacción entre dos biomoléculas (constantes de afinidad, asociación, disociación...) y por lo tanto elucidar los mecanismos fundamentales de dicha interacción. El volumen de muestra necesario para realizar las medidas por lo general es muy pequeño y necesita de un mínimo tratamiento de muestra. Además, es posible diseñar dispositivos portátiles, fáciles de usar y con un alto grado de **automatización**, manteniendo idealmente estándares analíticos de alta calidad. En la Tabla 1.1 se presenta resumidamente la comparativa general entre los biosensores y las técnicas analíticas convencionales.

En 1962 Clark y Lyons desarrollaron el primer biosensor, un analizador de glucosa, el cual se comercializó por *Yellow Spring Instrument Company* a partir de 1975. Desde entonces la tecnología de biosensores no ha parado de crecer. Inicialmente el desarrollo de biosensores se centró en el campo de la biomedicina, especialmente en el diagnóstico clínico, pero poco a

poco esta tecnología se ha transferido a otros campos, tales como el medioambiental, químico, farmacéutico, agroalimentario y militar.

El número de artículos científicos, patentes y equipos comerciales ha aumentado mucho en los últimos años, lo que demuestra el gran interés de esta tecnología. Un análisis reciente de Frost & Sullivan considera que el mercado de biosensores generó ingresos de 11,5 billones de dólares en 2014 y estima en más del doble en 2021, unos 28,8 billones de dólares (<http://www.frost.com/nee9>).

Tabla 1.1. Comparativa general entre biosensores y técnicas analíticas convencionales

<i>BIOSENSORES</i>	<i>TÉCNICAS ANALÍTICAS CONVENCIONALES</i>
Técnica portátil, miniaturizable y automatizable	Técnica de laboratorio, automatizable
Fácil de usar e interpretar	Personal cualificado y especializado
Sensible, preciso y fiable	Sensible, preciso y fiable
Análisis rápidos (en tiempo real)	Largos tiempos de análisis
Técnicas relativamente baratas	Técnicas caras
Generalmente monoanalito, pero cada vez más equipos multianalito.	Multianalito
Pequeño volumen de muestra	Pequeño volumen de muestra
Mínimo pretratamiento de muestra	Pretratamiento de muestra.
Libre de marcador	Con marcadores

1.2.1.1. Clasificación de biosensores

Existen numerosos tipos de biosensores y la clasificación es compleja. Nosotros los clasificaremos teniendo en cuenta los dos elementos fundamentales que lo componen, que son el **tipo de interacción** que se produce entre el bio-receptor y el analito, y el **tipo de transductor**. Teniendo en cuenta el tipo de interacción se diferencia los catalíticos y los de afinidad. Los *catalíticos* son aquellos en los que el bio-reconocimiento se da a través de una reacción química, por ejemplo aquellos que funcionan con enzimas. Los de *afinidad*, son aquellos en los que el bio-reconocimiento se da por la formación de un complejo entre el bio-receptor y el analito, por ejemplo los que trabajan con anticuerpos. Si tenemos en cuenta el tipo de transductor, podemos encontrar biosensores ópticos, electroquímicos, piezoeléctricos, termométricos y nanomecánicos (Figura 1.4). En los sensores electroquímicos, el transductor es un electrodo y se monitorizan cambios en la señal eléctrica (Grieshaber et al. 2008). En los piezoeléctricos o másicos, el transductor es un material piezoeléctrico y se monitorizan cambios en la frecuencia de vibración (Cady 1946; Tellechea et al. 2009) . En los termométricos, el transductor es un termistor y se monitoriza el calor generado en las reacciones enzimáticas exotérmicas (Ramanathan et al. 2001). En los nanomecánicos, el transductor es una micropalanca de silicio y se monitoriza la deflexión de la micropalanca o la frecuencia de

resonancia dependiendo del modo de trabajo, si es estático o dinámico (Carrascosa et al. 2006). Y por último, en los biosensores ópticos, el transductor es una superficie que interacciona con la luz y se monitorizan los cambios en las propiedades de la misma (Fan et al. 2008).

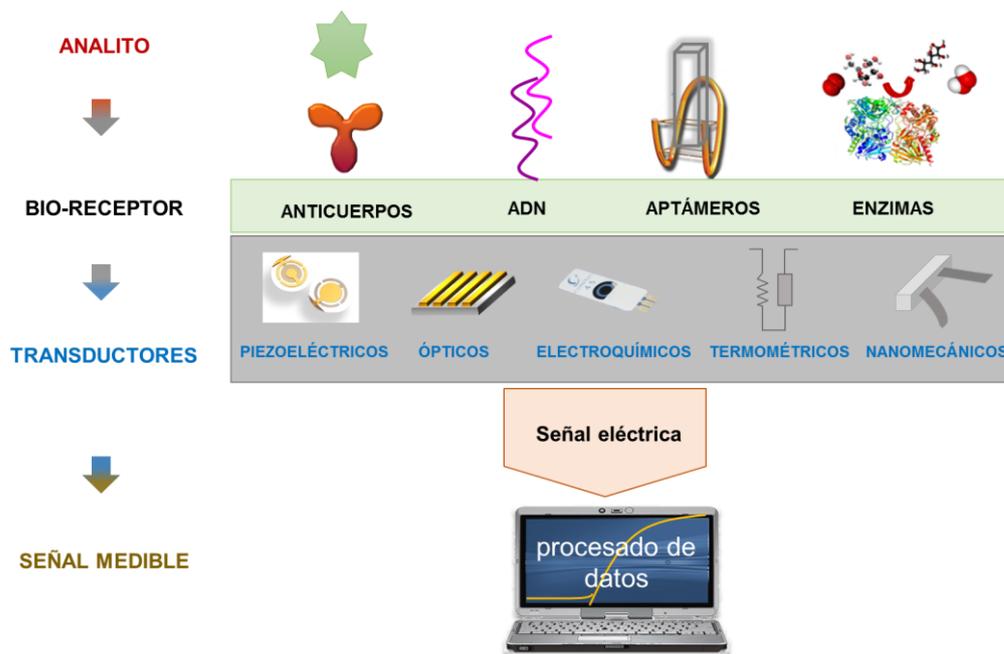


Figura 1.4. Esquema básico del funcionamiento de un biosensor.

Dentro de los diferentes biosensores, los dispositivos electroquímicos han dominado claramente el mercado debido a su bajo coste, rápida respuesta y fácil fabricación en serie (H. Li, Guo, and Xu 2015). Sin embargo en los últimos años, los biosensores ópticos y en especial los basados en plasmones superficiales, se están proponiendo como alternativa tecnológica comercial.

1.2.2. BIOSENSORES ÓPTICOS

Los biosensores ópticos son aquellos que se basan en la medición de los cambios que se producen en las propiedades ópticas de la luz debido a la interacción bio-receptor-analito. Entre los diferentes biosensores ópticos, en esta tesis nos centraremos en los **inmunosensores ópticos** basados en **la resonancia del plasmón superficial localizado** (en inglés, *Localized Surface plasmón resonance* –LSPR–). Estos biosensores son sensibles a pequeños **cambios de índice de refracción** y se caracterizan por realizar las medidas **sin marcadores y en tiempo real**. Antes de centrarnos en esta clase de biosensores, nos gustaría realizar una breve introducción a los diferentes biosensores ópticos.

Los biosensores ópticos se dividen en dos grupos, aquellos que la detección la realizan con marcaje y aquellos que la detección la realizan en ausencia de marcaje. En el primero, el principal método de detección se basa en la medición de cambios en fluorescencia (L. Liu et al.

2017). Para ello, es necesario marcar las biomoléculas con sondas fluorescentes (Cox et al. 2004). Por otro lado están los biosensores ópticos que realizan la detección sin marcaje (Fan et al. 2008). Estos biosensores, son muy interesantes principalmente debido a dos razones. Por un lado, el proceso de marcaje de moléculas normalmente presenta ciertos problemas como pueden ser los cambios inducidos en la molécula marcada por el marcador en sí mismo, lo cual puede afectar la posterior interacción con la molécula que se quiere detectar. Y por otro lado, el proceso de marcaje puede llegar a ser en algunos casos una labor costosa y compleja, y difícil de caracterizar. Bajo la categoría de detección sin marcaje, existen tres métodos de detección, que incluyen la detección de cambios en el índice de refracción (IR), en la absorción óptica y la detección por espectroscópica Raman (Fan et al. 2008).

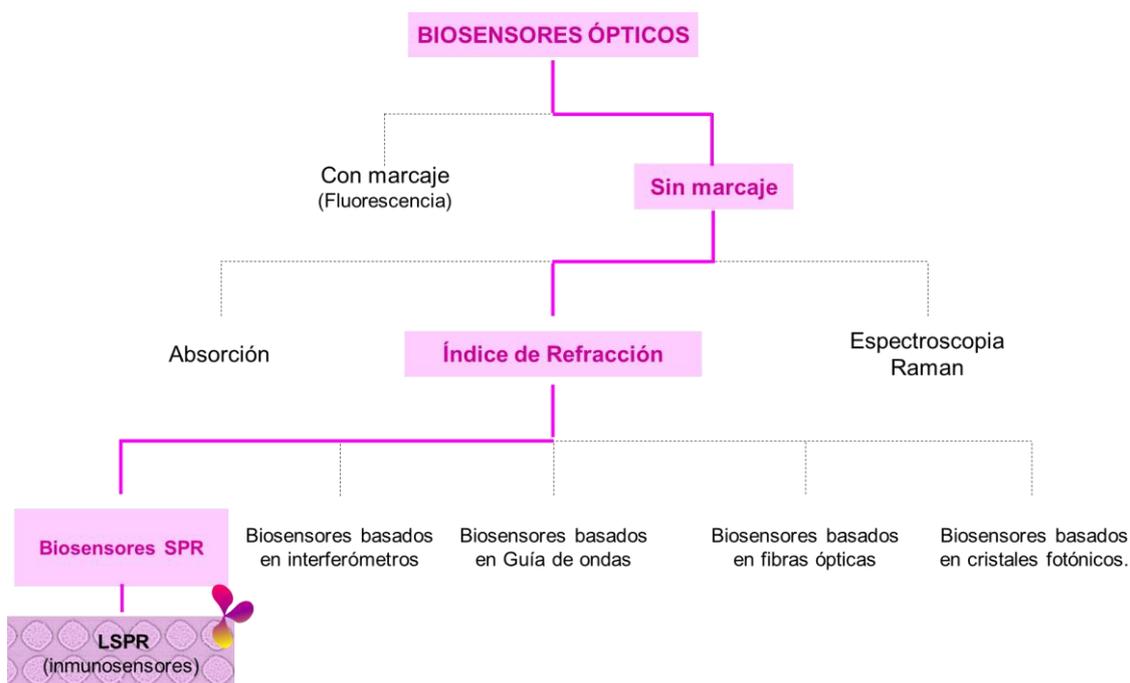


Figura 1.5. Esquema de los diferentes biosensores ópticos.

Dentro de los que miden cambios de índice de refracción se diferencian los biosensores ópticos basados en interferómetros, en guía de ondas, en fibras ópticas, en cristales fotónicos y en la **resonancia del plasmón superficial (SPR)**, siendo este último el más desarrollado y en el que nos centraremos en esta tesis, ya que los sensores LSPR pertenecen a este grupo.

1.2.3. BIOSENSORES ÓPTICOS LSPR

1.2.3.1. Principio de funcionamiento

En los metales existe un gran número de electrones no asociados al núcleo que se mueven libremente dentro del material formando un plasma. Al hacer incidir radiación electromagnética sobre el material, es posible inducir la excitación colectiva de estos electrones libres, denominados plasmones superficiales. Además cuando los plasmones superficiales se

excitan mediante fotones, los electrones libres oscilarán en resonancia a la misma frecuencia que la luz incidente. Estas oscilaciones electrónicas se pueden propagar en forma de onda en la interface entre dos medios, cuyas constantes dieléctricas poseen partes reales de signos opuestos, generalmente un metal y un dieléctrico (Homola 2003).

Existen dos tipos de plasmones superficiales, los propagantes y los localizados. Los plasmones superficiales propagantes (los biosensores SPR se basan en estos plasmones), se producen en la frontera plana entre un metal y un dieléctrico. La oscilación colectiva genera una onda electromagnética que se propaga a lo largo de la interface entre ambos medios entre decenas y centenas de micras, generando un campo electromagnético muy intenso, cuyo máximo de intensidad se localiza en la interface metal/dieléctrico y decae exponencialmente a ambos lados de la interface (Homola 2003) (Figura 1.6-a).

La capacidad de la onda de penetrar dentro del medio dieléctrico sin experimentar pérdidas significativas, será indicativo del volumen de sensado, definido como la región alrededor de la superficie que un cambio en el índice de refracción provoca un cambio en las propiedades ópticas. El plasmón de propagación presentan distancias de penetración (l_d) que varían entre 500 y 1000 nm.

Los plasmones superficiales localizados (LSPR) sin embargo, se generan en nanoestructuras metálicas aisladas. La LSPR se produce cuando la luz interactúa con materiales conductores que presentan un tamaño inferior a la longitud de onda incidente. Esto conduce a un plasmón que oscila localmente alrededor de las nanoestructuras con una frecuencia conocida denominada LSPR (Kelly et al. 2003). En este caso el LSPR no se propaga tal y como ocurre en el SPR, se localiza en la región de la nanoestructura (Sepúlveda et al. 2009) (Figura 1.6-b). Los plasmones superficiales localizados presentan distancias de penetración menores que los plasmones de propagación, entre 20 nm y 250 nm dependiendo de la nanoestructura. Por ejemplo, las nanopartículas de oro, presentan distancias de penetración del orden de 20-40 nm en función del diámetro de la nanopartícula (Nath and Chilkoti 2004), los nanobastones sin embargo, se saturan a una distancia entre 50 nm y 80 nm. La nanoestructuras de triángulos y microagujeros presentaron distancias de penetración entre 30 nm y 250 nm dependiendo de la relación diámetro/periodo (Live, Bolduc, and Masson 2010). Por lo tanto, la región alrededor de la nanoestructura que produce un cambio de las propiedades ópticas debido a un cambio de índice de refracción es mucho menor, pero esto no siempre representa una desventaja como veremos más adelante.

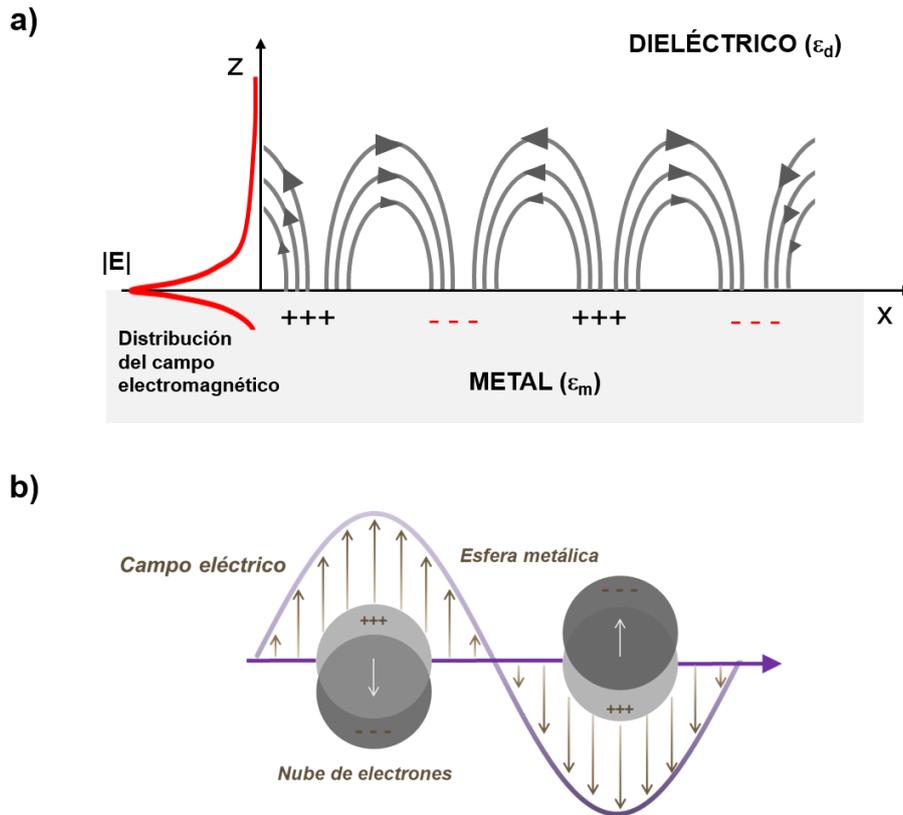


Figura 1.6. Diagramas esquemáticos que ilustran los plasmones superficiales a) propagantes (SPR) y b) Localizados (LSPR).

La frecuencia de resonancia del plasmón localizado está determinada por la función dieléctrica que depende de la frecuencia del metal y del material del medio que la rodea. Además es fuertemente dependiente del tamaño y de la forma de la nanoestructura (Haynes et al. 2001; X. Zhang et al. 2005). Típicamente, las frecuencias de LSPR de las nanoestructuras metálicas se localizan en las regiones del espectro electromagnético visible o cercano al infrarrojo. En la Figura 1.7 se han representado a modo de ejemplo los espectros de absorción de dos nanoestructuras de oro diferentes en tamaño y forma: AuNPs (Φ 9,6nm) y nanodiscos de oro (Φ 450 nm, h 50 nm). Las AuNPs presentan el máximo de absorción en agua a $\lambda_{LSPR} = 518$ nm y los nanodiscos de oro a $\lambda_{LSPR} = 818$ nm. Además se presentan los espectros de absorción de una misma nanoestructura de nanodiscos en contacto con dos medios diferentes. Los nanodiscos presentan el máximo de absorción en aire a $\lambda_{LSPR} = 649$ nm (IR 1,0003), mientras que en agua a $\lambda_{LSPR} = 818$ nm (IR 1,3330).

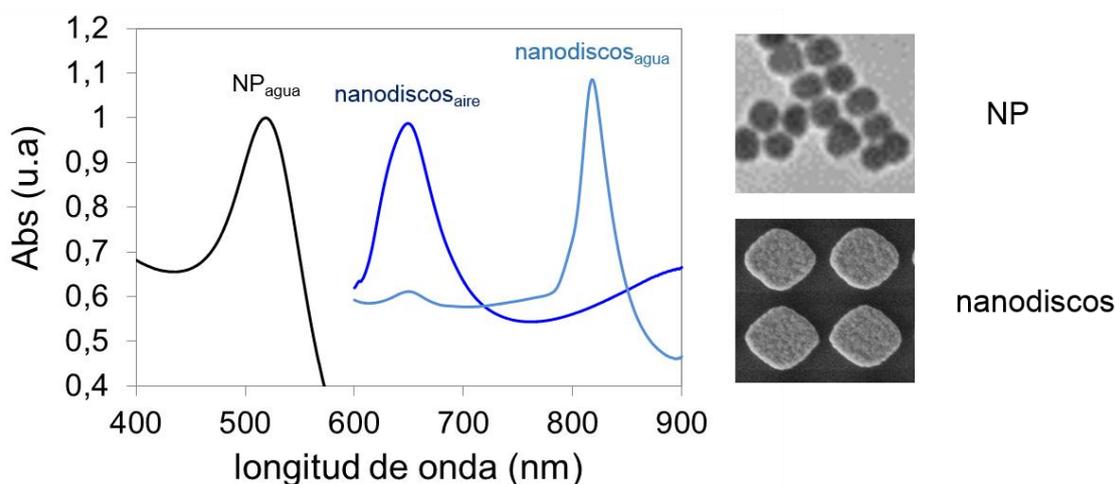


Figura 1.7. Espectro de absorción de nanopartículas de oro de tamaño 9,6 nm (negro) y dos espectro de absorción de una nanoestructura de oro de nanodiscos en contacto con aire (azul oscuro) y agua (azul claro).

En la literatura encontramos diversos transductores ópticos basados en nanoestructuras metálicas. Los más estudiados han sido las NPs de metales nobles, principalmente el oro y la plata. La habilidad de fabricar nanopartículas variando la forma, tamaño y material ha sido uno de los factores más importante para avanzar en el conocimiento y aplicación de los biosensores LSPR. Se han realizado diversas investigaciones sobre las propiedades ópticas de las nanopartículas metálicas y su relación directa con la forma y tamaño de las mismas (Haynes et al. 2001; X. Zhang et al. 2005). Se ha comprobado en sistemas no esféricos, que en las zonas de máxima curvatura, como los vértices de un prisma o las crestas y valles de superficies nanorrugosas presentan puntos de máxima intensificación del campo electromagnético, denominadas ‘hot spot’ en inglés (Kleinman et al. 2013), dando lugar a propiedades ópticas mejoradas aquellos que presentan mayor número de puntos de máxima intensificación.

Mientras que las técnicas de síntesis química ofrecen la habilidad de fabricar grandes cantidades de nanopartículas (generalmente con arquitecturas novedosas y cristalinidad controlada), las técnicas de litografía permiten la fabricación de estructuras periódicas con motivos bien definidos, que están posicionados y orientados específicamente en una superficie. En los últimos años, ha incrementado el interés en el estudio de las propiedades ópticas de estos transductores formados por nanoestructuras periódicas por su capacidad biosensora, ya que el aumento de simetría conduce a un incremento en la intensidad del LSPR (Petryayeva and Krull 2011).

Se pueden fabricar superficies nanoestructuradas periódicas a través de litografía por haz de electrones (Kanamori, et al. 1999), litografía por nanoimpresión (Sainiemi et al. 2011), litografía coloidal (C.-H. Sun, Jiang, and Jiang 2008) o litografía por interferometría láser (LIL) (Domínguez et al. 2012; Tellechea et al. 2012). Entre las diferentes técnicas de litografía, las características de la LIL hacen que sea una buena técnica para fabricar nanoestructuras de oro

(líneas, pilares, o agujeros) que presentan el fenómeno LSPR, ya que pueden fabricarse superficies de varios cm^2 con una densidad baja de defectos en relativamente poco tiempo. El proceso de fabricación es muy homogéneo y reproducible, por lo que estas superficies se pueden cortar en pequeños chips para utilizarlos como transductores en biosensores ópticos (Cornago Santos 2015).

1.2.3.2. Detección de cambios de índice de refracción

Tal y como se ha comentado, la frecuencia de resonancia del plasmón localizado está determinada por el material del medio que rodea la superficie sensora, y es extremadamente sensible a los cambios en el índice de refracción del medio. Gracias a esta propiedad, se pueden utilizar estos transductores como biosensores.

En los biosensores de afinidad, los elementos de reconocimiento biomolecular inmovilizados en la superficie de la nanoestructura reconocen el analito presente en una muestra líquida produciendo un aumento local del índice de refracción en la superficie debido a la unión bio-receptor-analito. El aumento del índice de refracción da lugar a un desplazamiento de la frecuencia de resonancia que puede medirse con precisión por medidas ópticas.

En las aplicaciones biosensoras LSPR los cambios de índice de refracción debido a las biomoléculas se producen únicamente en la región próxima a la nanoestructura metálica. La fracción de la onda empleada para la detección de las biomoléculas dependerá del tamaño de las biomoléculas (d) y de la distancia de penetración del campo electromagnético (l_d). En general en los biosensores ópticos LSPR se suele cumplir que el cambio de índice de refracción del medio dieléctrico producido por biomoléculas se produzca en una región de espesor mucho más pequeña que la distancia de penetración del dieléctrico y próxima a la interfaz. El cambio en la señal por un cambio de índice de refracción superficial será siempre menor que el experimentado por un mismo cambio de índice de refracción que abarque todo el volumen de sensado. Ambos parámetros se igualaran cuando el espesor de lo que se quiere sensor abarque toda la longitud total del campo evanescente en el medio dieléctrico Figura 1.8-(3). Por lo tanto, un biosensor LSPR debe ser muy sensible a estas perturbaciones locales ya que únicamente una fracción de la onda interacciona con la capa biológica.

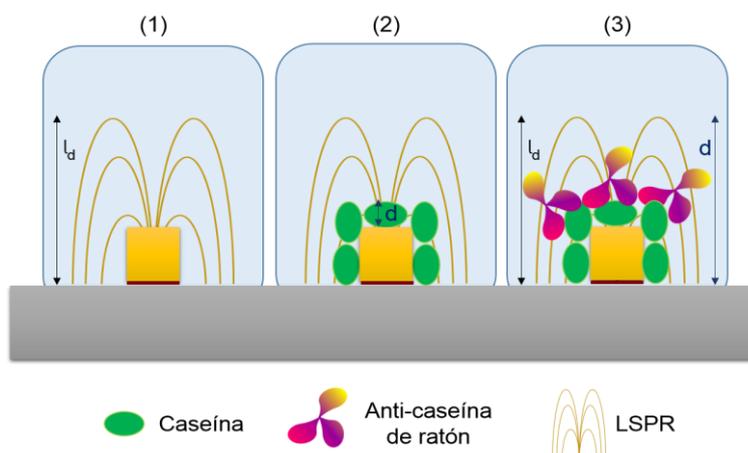


Figura 1.8. Penetración de los campos electromagnéticos en el dieléctrico. (1) Distancia que el campo electromagnético LSPR se introduce en el medio adyacente (l_d), (2) capa biomolecular que abarca un pequeño volumen de sentido respecto a toda la extensión ($d \ll l_d$) y (3) interacción biomolecular que abarca toda la extensión del volumen de sentido.

1.2.3.3. Sensibilidad y resolución del biosensor

A la hora de desarrollar biosensores ópticos, la sensibilidad (S) y la resolución son dos de los parámetros más importantes a evaluar, ya que de ellos depende el límite de detección del sensor.

La sensibilidad se define como la capacidad que tiene el transductor de detectar cambios en el índice de refracción producidos por la unión bio-receptor analito. Sin embargo, la determinación de este valor normalmente se realiza a través de la evaluación de la respuesta de la longitud de onda del pico del LSPR cuando está en contacto con soluciones que presentan distintos índices de refracción. La sensibilidad a cambios de índice de refracción del sensor se obtiene a través de la relación de la resonancia del plasmón λ_{LSPR} con respecto al índice de refracción (IR) del medio (Svedendahl et al. 2009). Esto se conoce como medidas del índice de refracción del conjunto (BRI del inglés *Bulk Refractive Index*) y las unidades de esta sensibilidad son $\text{nm} \cdot \text{RIU}^{-1}$ (Figura 1.9-(1)).

Pero no sólo se puede monitorizar la respuesta del pico LSPR, también es posible medir cambios en la cantidad monitorizada a una absorbancia constante Figura 1.9-(2) ($\text{nm} \cdot \text{RIU}^{-1}$) y a una longitud de onda constante Figura 1.9-(3) ($\text{Abs} \cdot \text{RIU}^{-1}$) (F. Fernández et al. 2016). Para estos dos últimos casos, es necesario seleccionar la absorbancia o longitud de onda, dependiendo del parámetro que se quiere medir, en el cual se obtiene una mayor sensibilidad y linealidad respecto al cambio de IR.

En la Figura 1.9 de han representado los espectros de absorbancia de una nanoestructura de nanolíneas de oro a diferentes índices de refracción y se han representado las 3 sensibilidades susceptibles a ser monitorizadas. A medida que aumenta el índice de refracción del medio, el espectro asociado al LSPR se desplaza hacia el rojo.

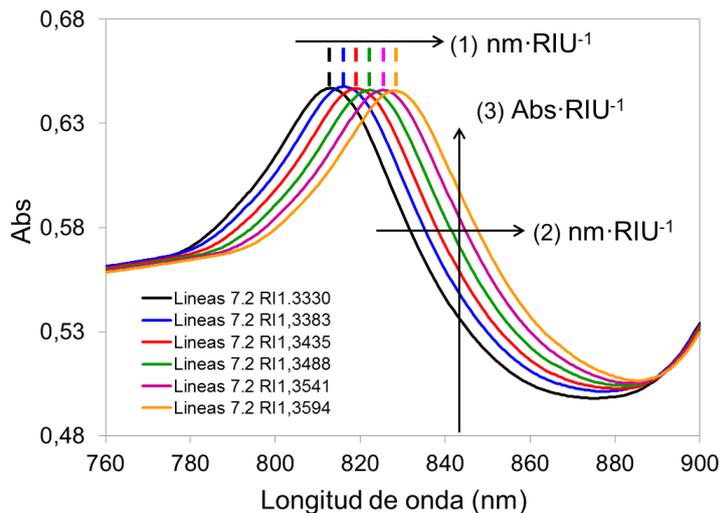


Figura 1.9. Espectros de absorción de una nanoestructura de líneas a diferentes índices de refracción obtenidos con concentraciones crecientes de NaCl. Evaluación de la sensibilidad de las nanoestructura: (1) mediante la determinación del desplazamiento de la longitud de onda del máximo ($\text{nm}\cdot\text{RIU}^{-1}$), (2) mediante la detección del desplazamiento de la longitud de onda a una determinada absorbancia ($\text{nm}\cdot\text{RIU}^{-1}$) y (3) mediante la determinación de la variación de la intensidad de la señal (Abs) a una longitud de onda concreta ($\text{Abs}\cdot\text{RIU}^{-1}$).

Un segundo factor que afecta la capacidad de detección del sensor es su precisión para detectar cambios de la cantidad monitorizada. Este parámetro típicamente se representa por la anchura a media altura (FWHM, del inglés *Full Width at Half Maximum*) del pico de resonancia. Un pico agudo facilita el registro del desplazamiento del pico, mientras que un pico ancho no es tan preciso. Por lo tanto, al considerar el rendimiento de un sensor, es necesario evaluar tanto la sensibilidad como el ancho de pico.

La figura de mérito (FOM, del inglés *Figure of merit*), fue introducida por primera vez por Van Duyne y colaboradores (Sherry et al. 2005) y se define como el ratio de la sensibilidad y FWHM (RIU^{-1}):

$$FOM = \frac{S}{FWHM} \quad \text{Ecuación 4.1}$$

Este parámetro se considera más robusto que el FWHM, ya que cuantifica el rendimiento general de un sensor y permite la comparación con el de otros esquemas de detección, ya que en muchas ocasiones estos valores se suelen presentar en unidades de energía (eV) en lugar de longitud de onda (nm) (Otte et al. 2010).

La resolución del biosensor es otro parámetro muy importante a determinar y que se usa para comparar con otros sistemas de detección. La resolución se define como el mínimo cambio en el índice de refracción (RIU) que produce un cambio estable en la señal de salida del detector. La resolución depende de la sensibilidad del transductor y del ruido de la medida. Las principales fuentes de ruido son las fluctuaciones en la intensidad de luz emitida y el ruido

producido en la conversión de la intensidad de luz en señal eléctrica por el detector. Los sensores SPR más compactos suelen presentar resoluciones de $\sim 2 \cdot 10^{-6}$ RIU, mientras que los dispositivos más sofisticados presentan resoluciones de $\sim 1 \cdot 10^{-6}$ RIU (Santos 2012). Los biosensores LSPR presentan resoluciones entre 10^{-4} y 10^{-6} RIU (REF) dependiendo de la nanoestructura y diseño óptico utilizado.

1.2.3.4. Configuraciones ópticas

Los equipos LSPR que podemos encontrar en literatura, generalmente son configuraciones diseñadas específicamente para un experimento o aplicación en particular. En general, constan de tres componentes principales: una fuente de luz (luz blanca o láser), la muestra y un detector. Entre las técnicas de detección más comunes se encuentran la espectroscopia ultravioleta-visible (UV-VIS), la microscopía de dispersión de campo oscuro, y las mediciones SERS y SEF.

Entre las diferentes geometrías de la espectroscopia UV-VIS, la aproximación más simple es la espectroscopia de transmisión ultravioleta-visible. En este caso, LSPR se mide mediante los espectros de extinción. Es decir, midiendo la cantidad de radiación que no es transmitida por el medio debido a dos efectos principales, absorción y difusión de la luz por las nanoestructuras, efectos considerablemente aumentados en condiciones de LSPR. En el caso de muestras no transparentes, se puede utilizar la geometría que mide la reflexión de las nanoestructuras. Mientras que la geometría de transmisión proporciona la longitud de onda LSPR como un valor máximo en la curva de extinción, la geometría de reflexión proporciona la longitud de onda LSPR como un valor mínimo, ya que la luz absorbida o dispersada por la muestra no es reflejada. Estas dos geometrías son muy interesantes a la hora de desarrollar biosensores, principalmente por presentar una óptica muy sencilla. No necesitan acopladores de luz, ni elementos ópticos complejos, con una fuente de luz y un detector es suficiente. Estos sensores presentan ventajas como la posibilidad de miniaturización, portabilidad, y equipos de bajo coste.

Las geometrías de dispersión de luz de campo oscuro o reflexión interna total, son sistemas mucho más complejos, pero tienen la ventaja de que presentan un mayor rango dinámico. Para muestras en las que se interrogan pequeñas regiones o incluso nanopartículas individuales, las mediciones de la dispersión de luz de campo oscuro son extremadamente potentes. Se utiliza un condensador de alta apertura numérica para iluminar el transductor, y un objetivo de baja apertura numérica para recoger la luz dispersada. La luz dispersa es dirigida a un detector (generalmente una cámara CCD), produciendo un espectro LSPR de la muestra.

Para la medición de LSPR bajo configuración de reflexión interna total (TIR) y libre de acoplador, la muestra es excitada por un diodo láser tras atravesar un polarizador lineal y un prisma. Una vez excitado la onda evanescente de la nanoestructura se recoge la luz reflejada a

través de un polarizador y mediante un fotodetector se extraer la información (C.-T. Li et al. 2012).

Las técnicas espectroscópicas intensificadas por superficies metálicas nanoestructuradas han suscitado gran interés en los últimos años. El efecto SERS (del inglés, *Surface-enhanced Raman Scattering*) se descubrió en los años setenta y consiste en un aumento de la difusión inelástica (señal Raman), procedente de determinadas moléculas en presencia de una nanoestructura metálica rugosa especialmente preparada. Actualmente se acepta que el aumento gigantesco de la intensidad Raman se debe a dos mecanismos fundamentales: a) el modelo electromagnético (EM), y b) el modelo químico o de transferencia de carga (TC). Ambos contribuyen al efecto SERS aunque la contribución de cada uno depende del sistema a estudiar. La técnica SERS implica un aumento tanto de la sensibilidad como de la selectividad, lo que hace del Raman una técnica analítica con prometedoras aplicaciones analíticas. Normalmente se usa una fuente de luz láser para experimentos SERS, y la luz dispersa Raman se recoge y procesa usando una combinación de filtro de muesca holográfica con un espectrógrafo para aislar bandas de energía de radiación dispersa. La orientación de la radiación incidente con respecto a la muestra está típicamente en un ángulo de mira, o puede estar asociada con una configuración de microscopio de epi-iluminación.

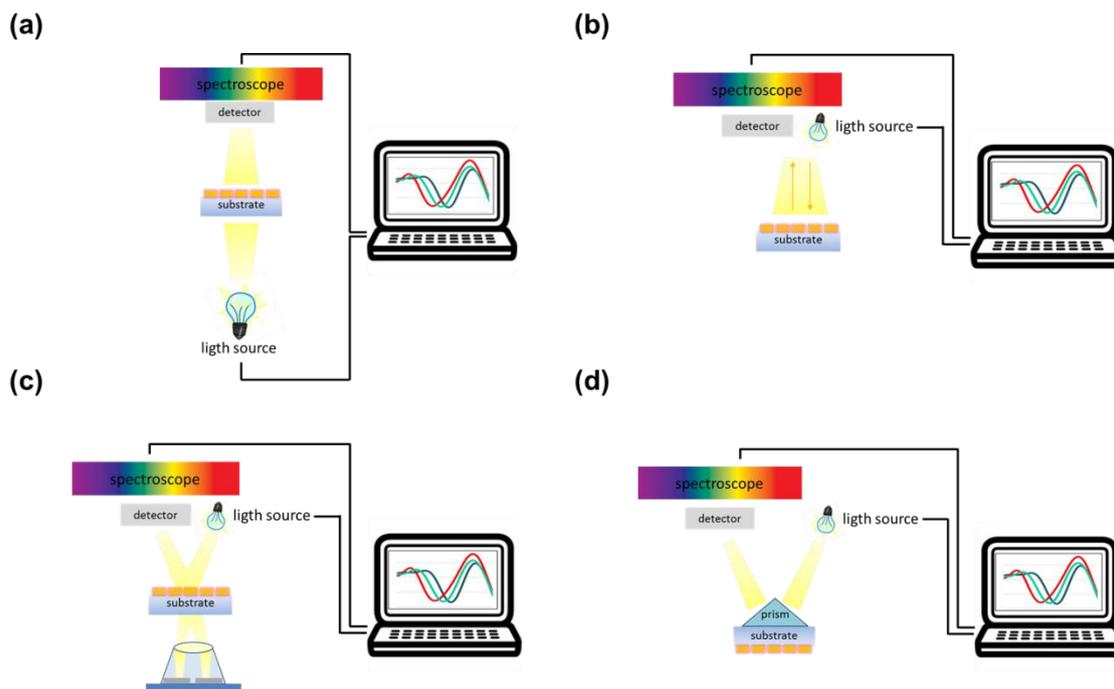


Figura 1.10. Geometrías ópticas: esquema de las geometrías de transmisión (a), reflexión (b), dispersión de campo oscuro (c) y reflexión total interna (TIR) (d).

1.2.3.5. Comparación de biosensores SPR vs. LSPR

Los Biosensores SPR fueron creados por Ingemar Lundström y su equipo de la Universidad de Linköping junto con la compañía BIACore™. Hoy en día es propiedad de General Electric, tras pasar por manos de Pharmacia.

Tal y como hemos comentado, la resonancia de los plasmones superficiales es un fenómeno físico que ocurre cuando se excitan los electrones libres de una capa metálica, mediante la incidencia de luz polarizada. Los plasmones superficiales no se pueden excitar con una fuente de luz directamente. Existen cuatro configuraciones diferentes capaces de excitar el plasmón superficial de películas delgadas, que son el acoplamiento de luz mediante un prisma, una guía de ondas, una fibra óptica o mediante un *grating*. La configuración Kreshman, ha sido una de las configuraciones más utilizadas. Se compone de un prisma de vidrio que es un atenuador total de reflexiones (ATR). Los biosensores de ATR se consideran uno de los biosensores más sensibles a pequeños cambios superficiales.

Las empresas productoras de estos instrumentos (configuración Kreshman principalmente) han prestado considerable atención en optimizar la inmovilización de las biomoléculas en el chip de detección, refinar la microfluídica y automatización, y crear un software fácil de usar. El resultado final ha sido una serie de equipos de investigación altamente exitosos que han encontrado una utilidad particular en el descubrimiento de fármacos y en la investigación de las ciencias de la vida. Dado que el mercado de estos instrumentos está dirigido a la investigación e industria farmacéutica, los precios se han mantenido altos tanto para los chips desechables como para los equipos.

Recientemente, ha habido una proliferación de equipos SPR. Actualmente, son comercializados por más de doce compañías a nivel mundial. Además, los instrumentos SPR originales ahora se enfrentan a una competencia dura de otros instrumentos ópticos basados en medidas multiparamétricas, como el BIONAVIS (MP-SPR), basados en rejillas de ondas resonantes, como el Corning EPIC™, y una gama de sistemas basados en impedancia eléctrica tales como CellKey™ (Molecular Devices) y XCELLigence™ (Roche). También se han desarrollado, dispositivos SPR basados en array con la introducción de imagen, lo que permite monitorizar simultáneamente múltiples puntos de ensayo. La compañía GWC technology tiene el equipo SPRImager®II que puede monitorizar 20 puntos a la vez, y BIORAD tiene el equipo ProteOn™ XPR36 que puede monitorizar 36 puntos a la vez.

Como se podría haber esperado, ha habido varios intentos de reducir los costes de los instrumentos asociados con SPR y tecnologías de medición similares. Un intento notable fue la introducción del chip SPR de bajo coste (SPREETA) por Texas Instruments (EE.UU.) y varias compañías han desarrollado instrumentos en el rango de precios de gama media de decenas de miles de dólares, en comparación con los cientos de miles necesarios para comprar un Biacore por ejemplo. Hasta ahora, sin embargo, estas alternativas más baratas no han sido

muy exitosas. Los usuarios prefieren las ventajas que presentan los equipos de altas prestaciones como son una flúidica sofisticada y automatizada, la facilidad de uso y el alto rendimiento.

Sin embargo, a partir de los últimos 20 años, gracias a la continua investigación en nanotecnología y biosensores ópticos, se ha producido una pequeña revolución en el desarrollo de los sistemas basados en la resonancia del plasmón superficial localizado (LSPR). Estos biosensores, en lugar de basarse en películas delgadas de oro, se basan en nanoestructuras metálicas y están siendo una alternativa tecnológica comercial a los dispositivos SPR. La comercialización tecnológica basada en sistemas de traducción empleando LSPR ha comenzado. La compañía Landagen (EE.UU.) comercializa el equipo LightPath S4™ basado en nanopartículas de oro, y la compañía Nicoya (Canadá) el equipo OpenSPR basado en films de nano-oro. Ambos equipos son capaces de medir interacciones biológicas (cinéticas).

A continuación se presenta una breve comparación de estos dos dispositivos; SPR y LSPR:

(1) **VOLUMEN DE SENSADO:** Los plasmones de resonancia superficiales (SPR) se extienden mucho más lejos dentro de la matriz del analito, que los plasmones localizados. Por lo tanto, los biosensores SPR son capaces de detectar mucho más lejos de la superficie que los biosensores LSPR. La distancia de penetración en algunos casos es un orden de magnitud menor para los biosensores LSPR. Aunque puede parecer una desventaja, se ha comprobado que presentan una mayor ventaja desde el punto de vista de la detección biomolecular. Los volúmenes de sensado de los sistemas SPR, son tan grandes, que además de sensar los cambios producidos por el reconocimiento biomolecular en la superficie, también son capaces de sensar el efecto de otras moléculas que se mueven libremente por el tampón (efecto matriz). Esto demuestra la ventaja del uso de LSPR para la detección de analitos en muestras cuya matriz es bastante compleja como en el caso de muestras clínicas (por ejemplo, sangre, suero).

(2) **RESOLUCIÓN:** Los sensores SPR con acoplamiento por prisma presentan resoluciones entre 10^{-6} y 10^{-8} RIU [Homola y col, 1999]. Esto significa que el límite de detección actual de estos dispositivos es de $1 \text{ pg}\cdot\text{mm}^{-2}$ de material analizado. Los sensores LSPR presentan resoluciones entre 10^{-4} y 10^{-6} RIU dependiendo de la nanoestructura. Generalmente equipos con una alta resolución son inversamente proporcionales al grado de miniaturización, simplicidad y coste de ensayo (Homola 2006).

(3) **SUSTRATOS:** Por lo general, los sustratos empleados en SPR consisten en una superficie de vidrio con una delgada capa de oro depositada sobre ella (~50 nm). Estos sustratos son económicos y fáciles de fabricar. Los sustratos empleados en LSPR consisten en una superficie de vidrio con nanoestructuras metálicas depositadas en ella. La fabricación de estos sustratos es más compleja y cara, ya que precisa de más pasos y técnicas más sofisticadas. Sin embargo el acelerado avance en las técnicas de nanofabricación, como por

ejemplo nanoimpresión, permitirá que el coste de los sustratos LSPR pueda ser reducido significativamente.

(4) QUIMICA SUPERFICIAL: En general la mayoría de los protocolos que se han estudiado para los biosensores SPR se pueden trasladar y emplear con los biosensores LSPR, ya que en muchos casos el transductor se compone por nanoestructuras de oro. El mayor inconveniente de los sistemas LSPR, es que requiere un mayor control en la pasivación de las nanoestructuras. Esto se debe a que las nanoestructuras en la mayoría de los casos, están compuestos por nanoestructuras de oro sobre una superficie de vidrio. Es en el vidrio donde las biomoléculas pueden adsorberse inespecíficamente e interferir en la medida. Por otro lado, los sensores LSPR al presentar distancias de penetración del campo electromagnético en el dieléctrico, no es aconsejable utilizar elementos de unión (ligandos) entre la superficie y el bio-receptor muy grandes o de varios pasos, ya que a medida que nos alejamos de la superficie la sensibilidad disminuye exponencialmente.

(5) OPTICA: Una de las diferencias más significativa entre los dos sistemas es la óptica empleada por cada uno de ellos. Los sensores SPR requieren una óptica especial (un prisma, una guía de onda, o rejillas) para poder excitar el plasmón superficial. El LSPR sin embargo se puede excitar directamente con la luz, lo que permite utilizar una óptica mucho más simple y barata.

(6) INTEGRACIÓN EN SISTEMAS: Una de las mayores ventajas de los dos sistemas es la alta compatibilidad con la microfluídica y con componentes fotónicos integrados. Es posible realizar multidetección simultánea, ya sea de un mismo analito (para obtener réplicas), o multianalito, y el consumo de muestras es muy pequeño en ambos sistemas. Los biosensores LSPR además presentan las ventajas de miniaturización, portabilidad, y detección remota, principalmente por su configuración óptica.

La pregunta sobre cuál es el mejor sistema para ser empleado en biosensado sigue abierta. Los sistemas SPR son más sensibles y robustos. Alcanzar esta sensibilidad con sistemas LSPR es complicado, todavía es necesario el estudio sistemático de las propiedades de la geometría, la distribución y las características de las nanoestructuras. Las aplicaciones más relevantes de los dispositivos LSPR son la de desarrollos de dispositivos de detección de sustancias y de medición de cinéticas, de bajo coste con altas prestaciones, y el desarrollo de dispositivos de diagnóstico inmediato conocidos en inglés como *Point-of-Care*.

1.2.4. BIOCENSORES DE AFINIDAD LSPR

Los sensores de bio-afinidad son aquellos en los que el bio-reconocimiento se da por la formación de un complejo entre el bio-receptor y el analito, produciéndose una reacción de equilibrio.

En líneas generales, un biosensor de afinidad basado en LSPR consiste en una fuente de luz (1), que interroga una nanoestructura (2), por lo general hecha de oro o plata y fabricada sobre un sustrato (normalmente de vidrio), que es recubierto con un bio-receptor (3) capaz de proporcionar un reconocimiento específico, y un detector (4) capaz de recoger la señal del bio-reconocimiento y transmitirla para que sea tratada correctamente (Figura 1.11-A)

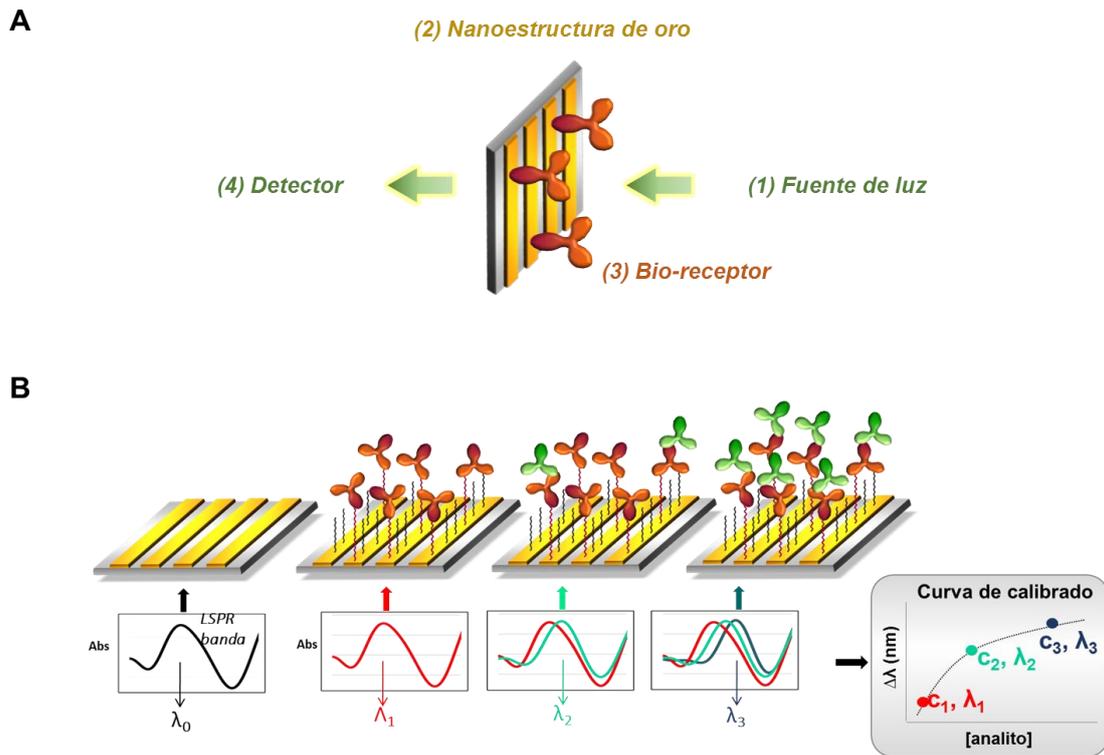


Figura 1.11. A) Esquema donde se representan los principales elementos de un biosensor basado en LSPR en transmisión. 1) Fuente de luz, 2) nanoestructuras de oro 3) Bio-receptor y 4) Detector, B) Cambios del pico de absorción de la nanoestructura en función de la concentración de analito.

El uso del fenómeno LSPR con fines analíticos se debe a la posibilidad de inmovilizar un elemento de reconocimiento adecuado sobre una nanoestructura metálica. La interacción del bio-receptor inmovilizado y un determinado analito da lugar a un cambio en el índice de refracción del medio que produce un desplazamiento de la curva de resonancia. Para una proteína típica, el índice de refracción es del orden de 1.46, comparado con el agua que presenta un índice de refracción de 1.33. El desplazamiento de la curva de resonancia se puede monitorizar a tiempo real, posibilitando la detección del analito cuantitativamente. Si se monitoriza el desplazamiento de la curva a diferentes concentraciones de analito es posible construir una curva de calibrado representado el desplazamiento de la curva frente a la concentración de analito tal y como se muestra en la Figura 1.11-B.

El desarrollo de un sensor LSPR con fines analíticos, sin embargo, no es una tarea fácil. Existen 4 pasos de mucha importancia tal y como veremos en los siguientes apartados:

- i. Selección del bio-receptor
- ii. Selección del formato de medida
- iii. Inmovilización del bio-receptor a la superficie
- iv. Desarrollo de protocolo de medida.

Todos estos pasos van a ser críticos, ya que tendrán un impacto directo en la sensibilidad, especificidad y límite de detección (LoD) del sensor.

1.2.4.1. Elementos de bio-reconocimiento

En los sensores de bio-afinidad, se pueden utilizar distintos tipos de moléculas como anticuerpos, ácido nucleicos, receptores, lectinas, células completas, aptámeros, ácidos nucleicos peptídicos (PNAs) y polímeros de impresión molecular (MIPs). Hoy en día, los anticuerpos siguen siendo el elemento biológico de reconocimiento más utilizado en el desarrollo de biosensores. A estos sensores se les conoce como inmunosensores y se basan en la cuantificación del complejo anticuerpo-antígeno (Ruigrok et al. 2011). Además de determinar la presencia de un determinado compuesto en muestras complejas, permite estudiar las cinéticas de las interacciones biomoleculares a tiempo real entre el bio-receptor y el analito. Las principales ventajas de estas técnicas son su elevada sensibilidad y especificidad, por lo que son muy apropiadas para analizar una proteína minoritaria contenida en una mezcla compleja.

Un anticuerpo (Ab) es una proteína de la familia de las inmunoglobulinas (Ig) producidas por el sistema inmune como respuesta a un agente externo o antígeno (At). Las más utilizadas en las técnicas inmunoquímicas son las Ig tipo G (IgG). Su estructura consta de cuatro cadenas polipeptídicas: dos pares de cadenas pesadas (H) y dos ligeras (L), iguales entre sí, y unidas por puentes disulfuro. Presentan regiones constantes (Fc) y variables (Fab) en cuanto a la secuencia de aminoácidos. Los puntos de interacción con el antígeno, por el que muestran afinidad, se localizan en la región variable (Fab). Esta última fracción está formada por el extremo amino terminal (N-terminal). El peso molecular de las IgG ronda los 155.000 Dalton, y las dimensiones aproximadas son de 15 x 12 x 5 nm.

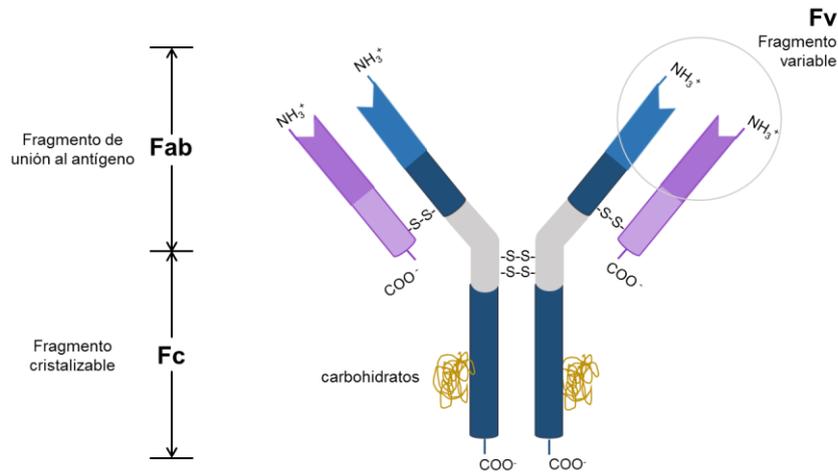


Figura 1.12. Ilustración de una inmunoglobulina tipo G (IgG), Fab región variable y Fc región constante para todas las IgG.

La interacción del antígeno con el anticuerpo se produce entre el epítipo (los residuos que interaccionan del antígeno) y el fragmento Fv de las regiones variables. Esta unión es altamente específica y la elevada afinidad de esta unión viene determinada por la ley de acción de masas, basada en fuerzas de naturaleza no covalentes, tales como interacciones electrostáticas, puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y fuerzas de Van der Waals. La suma de todas estas fuerzas se conoce como la afinidad del anticuerpo por un antígeno. La unión puede deshacerse mediante cambios de pH, fuerza iónica o mediante el uso de surfactantes. La constante de equilibrio K_a puede alcanzar valores extremadamente altos (10^7 - $10^{11} M^{-1}$), lo que dota a las técnicas inmunoquímicas de altas detectabilidades.

Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales. Los anticuerpos policlonales son poblaciones complejas de anticuerpos formadas por distintos tipos de anticuerpos que reconocen diferentes regiones o epítopos, del antígeno, mientras que los monoclonales son moléculas idénticas y poseen la misma especificidad por un único epítipo. Los anticuerpos policlonales poseen mayor sensibilidad y menor especificidad que los monoclonales, de modo que en función de qué características se quiera potenciar se elegirán unos u otros.

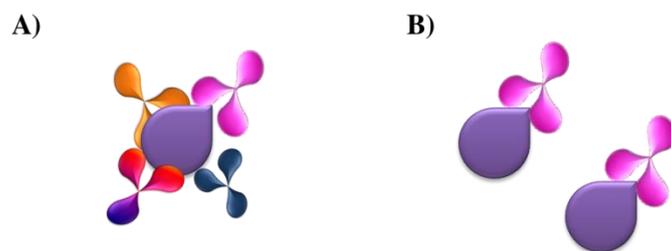


Figura 1.13. A) Los anticuerpos policlonales son poblaciones complejas de anticuerpos formados por distintos tipos de anticuerpos que reconocen diferentes regiones del antígeno, y B) los anticuerpos monoclonales son moléculas idénticas que solo reconocen una parte del antígeno.

Actualmente, es posible encontrar numerosos anticuerpos comerciales pero que además cumplan las características necesarias para el desarrollo de inmunosensores no suele ser muy común. La mejor opción suele ser el desarrollo de anticuerpos de alta calidad propios, sin embargo, esto es un proceso bastante costoso y laborioso.

1.2.4.2. Formatos de detección

En los inmunosensores LSPR, se pueden aplicar varios formatos de medida para la detección de los compuestos biológicos o químicos de interés. El formato de detección se determina en función del tamaño de la molécula a detectar, de las características del elemento de reconocimiento biomolecular disponible, del rango de concentraciones del compuesto que se quiere medir, y de la matriz de la muestra. Los formatos de detección más frecuentemente utilizados en los sensores ópticos son (A) detección directa, (B) detección en formato sándwich, (C) formato competitivo, y (D) detección de la inhibición.

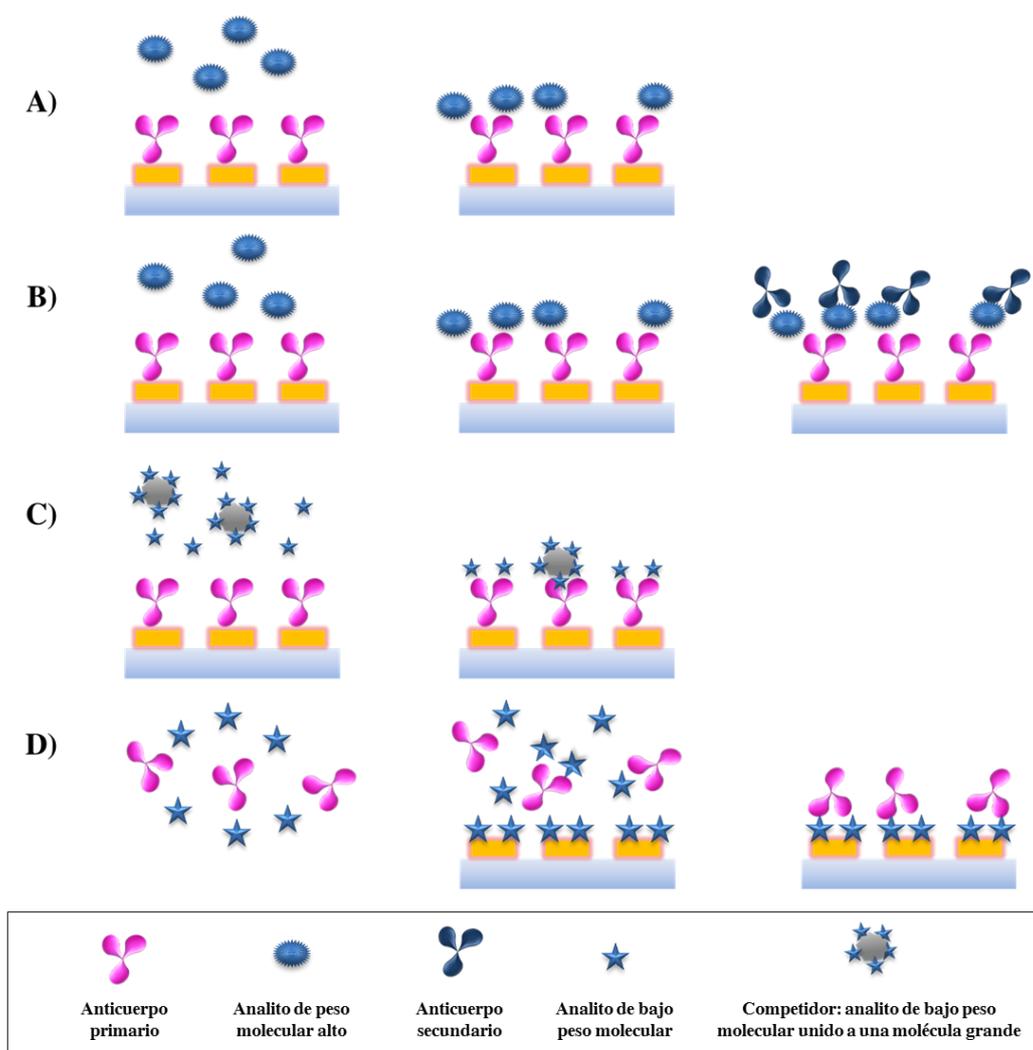


Figura 1.14. Formatos de detección (A) detección directa, (B) detección en formato sándwich, (C) formato competitivo, y (D) detección de la inhibición.

En el método de detección directa (Figura 1.14-A), el elemento reconocedor (anticuerpo primario) se inmoviliza en la superficie del sensor. El analito que se encuentra en solución libre, se une al anticuerpo, produciendo un cambio de índice de refracción en la superficie del sensor. Este formato representa el método más rápido y sencillo, puesto que la detección del analito se lleva a cabo en un único paso y la respuesta es directamente proporcional a la concentración del mismo. Además el consumo de anticuerpo es mucho menor lo que reduce los costes considerablemente. La mayor limitación de este formato está relacionada con el tamaño del analito. Únicamente se utiliza cuando se quiere detectar una molécula grande (>5000 Da), ya que el cambio de índice de refracción producido por moléculas menores no producen una señal (respuesta) detectable.

La especificidad y el límite de detección de la medida se pueden mejorar utilizando un formato sándwich (Figura 1.14-B). En este caso se aplica un paso más a la detección directa, que es incubar con otro anticuerpo capaz de detectar el analito previamente unido al anticuerpo primario (o de captura) de la superficie. La principal desventaja de este formato es que se añaden pasos. En los últimos años, para amplificar aún más la señal, se han utilizado complejos de anticuerpos unidos a micropartículas de látex o nanopartículas de oro (L. Xie et al. 2014). Estos elementos al presentar un índice de refracción mayor que el de las proteínas, amplifican en mayor medida la señal respecto al segundo anticuerpo por sí solo.

Los analitos de peso molecular inferior a 5000 Da, generalmente se suelen determinar mediante formato competitivo o por inhibición.

El formato competitivo (Figura 1.14-C), consiste en inmovilizar la superficie sensora con el anticuerpo de captura. Luego se hace pasar una solución de analito y competidor. El competidor es una molécula grande por ejemplo una proteína (BSA), a la cual se le han unido varias moléculas de analito objeto de estudio. Tanto el analito como el competidor tienen una estructura relacionada y presentan afinidad por el anticuerpo primario, compitiendo entre ellos por los puntos de unión en la superficie. Así, a concentraciones bajas de analito, la probabilidad de que el competidor se una a la superficie será alta, obteniendo una señal detectable en el sensor, mientras que a concentraciones altas de analito, la probabilidad de que se una el competidor a la superficie será baja, y en este caso no se obtendrá una señal detectable. La respuesta de la unión es inversamente proporcional a la concentración de analito (Yockell-Lelievre et al. 2015; Lin et al. 2016).

En el formato de detección por inhibición también se suele aplicar a moléculas de bajo peso molecular. Una concentración conocida de anticuerpo primario se mezcla con la muestra que contiene una concentración desconocida de analito. En la incubación el anticuerpo se unirá al analito. Tras la incubación, la muestra se inyecta para hacerla pasar por la superficie sensora, donde un análogo (competidor) o el propio analito estará inmovilizado. El anticuerpo que quede libre se unirá a la superficie. La respuesta de la unión en este formato también es inversamente proporcional a la concentración de analito.

1.2.4.3. Inmovilización de los bio-reactivos

Uno de los mayores retos en la fabricación de un inmunosensor es la inmovilización del anticuerpo o el antígeno sobre la superficie sensora. El tipo de formato de detección determina cual de las moléculas ha de inmovilizarse sobre la superficie y por lo tanto el método de inmovilización. Dado que en esta tesis se ha trabajado en formato directo, se resumirán los principales métodos de inmovilización de anticuerpos a superficies de oro. Muchos de los métodos descritos en el apartado 1.1.3. Biofuncionalización de Au NPs con proteínas, son aplicables a superficies.

El método de inmovilización ideal debe de obtener una alta densidad de anticuerpos en superficie, correctamente orientados para que puedan interactuar con el analito, que preserven la funcionalidad de los mismos, que minimice el efecto del impedimento estérico entre moléculas y que no dé lugar a interacciones inespecíficas. Esta etapa puede influir notablemente en la selectividad, sensibilidad y detectabilidad del inmunosensor.

En los últimos años se han desarrollado numerosas técnicas de inmovilización, las cuales están basadas principalmente en dos tipos: 1) inmovilización covalente, que implica la formación de un enlace covalente estable entre la molécula a inmovilizar y la superficie a través de ligandos unidos anteriormente a la superficie, y 2) inmovilización no covalente que incluye la inmovilización por adsorción, por afinidad o por atrapamiento.

La inmovilización de anticuerpos sobre superficies sensoras mediante la adsorción física resulta en una unión muy fácil y rápida de realizar, ya que el anticuerpo no requiere ningún tratamiento, ni tampoco que la superficie sea modificada previamente. Sin embargo este método presenta varias desventajas, como son la desnaturalización del anticuerpo debido a la interacción con la superficie, la unión débil e inestable que se produce entre el anticuerpo y la superficie, y por último el escaso control que existe en el proceso de inmovilización. Todos estos factores hacen que la reproducibilidad y sensibilidad del sensor se reduzcan considerablemente.

Los problemas de la inmovilización del anticuerpo mediante adsorción física se han visto superados con el desarrollo de la técnica basada en autoensamblaje de moléculas alquílicas. Desde que Nuzzo y Allara en 1983 descubrieron que los disulfuros y los alcanotioles formaban espontáneamente monocapas ordenadas sobre el oro (SAM, del inglés *Self-Assembled Monolayers*) se han utilizado ampliamente como herramienta para modificar superficies (Nuzzo et al. 1983). La estrategia es muy similar a la utilizada con Au NPs, y consiste en utilizar moléculas heterobifuncionales, que sean, por un lado reactivos hacia la superficie, como puede ser el grupo tiol (-SH) al oro, y por el otro, reactivos hacia el anticuerpo, como por ejemplo grupos carboxilo (-COOH), aminas (-NH₂), hidroxilos (-OH), tiol (-SH), azida (-N₃), biotina, maleimida y muchos más.

Además, el uso de SAM mixtas, especialmente aquellas formadas por alcanotioles de cadena larga para el anclaje de anticuerpos, y de cadena corta como molécula espaciadora (-OH, -CH₃), ha demostrado que aumenta la prevención de la desnaturalización de anticuerpos y de las interacciones inespecíficas, en comparación con las SAM compuestas por una única molécula (Briand et al. 2006). Por otro lado, dependiendo de la naturaleza de la cadena hidrocarbonada, la SAM puede tener propiedades hidrofóbicas si se trata de un alcano lineal, o propiedades más hidrofílicas si contienen estructuras más polares, tipo polietilenglicol (PEG). Las SAM con PEG no forman estructuras tan ordenadas como los alcanos lineales, pero aumentan la biocompatibilidad y selectividad del sistema y han demostrado reducir de un modo eficaz las adsorciones inespecíficas (Uchida et al. 2005).

Las ventajas de utilizar las SAM consisten en que se evita la formación de multicapas, se consiguen estructuras más reproducibles y la estabilidad de la unión es mayor. El proceso de unión covalente más frecuente utilizado para inmovilizar las biomoléculas, al igual que con las Au NPs, es a través de la química de carbodiimidas. El gran inconveniente de este método es que no permite controlar la orientación de los anticuerpos, ya que se puede unir a la superficie por múltiples sitios y por lo tanto orientado de distinta maneras.

Otro método muy utilizado, principalmente en biosensores SPR, es el de crear hidrogeles de dextrano carboximetilados sobre superficies sensoras. El polímero de dextrano forma una malla o entramado que confiere una estructura tridimensional hidrofílica, con la capacidad de inmovilizar una mayor cantidad de moléculas de anticuerpo. Además, presenta una buena biocompatibilidad y aparecen efectos de carga que ayudan a reducir la unión inespecífica (Österberg et al. 1993). La mayor desventaja de este método está relacionada con la falta de control sobre la distribución del anticuerpo en la superficie.

Con el objetivo de obtener estructuras orientadas, se han desarrollado numerosas estrategias de inmovilización alternativas al método covalente convencional. Uno de ellos consiste en la oxidación de los carbohidratos del anticuerpo localizados en la región Fc, para formar aldehídos a través de los cuales el anticuerpo es inmovilizado covalentemente sobre la SAM formada en la superficie con los reactivos EDC+NHS (J. H. Kang et al. 2007). Otro de los métodos, se basa en la inmovilización de fragmentos Fab del anticuerpo en superficie. Estos fragmentos se obtienen a través de una digestión enzimática seguida de una reducción química (Vikholm-Lundin and Albers 2006). Sin embargo, en ambos métodos, se requieren de tratamientos químicos agresivos que pueden dar lugar a alteraciones funcionales del anticuerpo, además de añadir más pasos al proceso de inmovilización.

Generalmente cuando se quiere controlar la orientación del anticuerpo en la superficie se suelen utilizar una interacción de afinidad. La inmovilización tiene lugar gracias a la alta afinidad entre una molécula (que previamente se ha unido al anticuerpo) y su pareja anclada a la superficie sensora. Uno de los sistemas de afinidad más utilizado es el par biotina/avidina (Dutra et al. 2007). El método consiste en unir la biotina al anticuerpo, y la avidina (o un

análogo como la estreptavidina o neutravidina) a la superficie, bien a través de la unión covalente a la SAM o a través de monocapas biotiniladas. Otra técnica muy parecida es utilizar anticuerpos modificados con una cola de polihistidina, que presenta una gran afinidad con el níquel (Ni^{2+}). En este caso la superficie se modifica con un agente quelante como el ácido nitrilotriacético (NTA) (Sigal et al. 1996). También es posible utilizar anticuerpos con una cola de policisteína en la región Fc, fusionada por ingeniería genética o unida a la molécula mediante un procedimiento químico. De esta manera es posible unir directamente el anticuerpo a la superficie. En todos estos casos, aunque se consigue orientar el anticuerpo, es necesario modificarlo, haciendo más complejo el proceso.

Una de las alternativas a unir los anticuerpos orientados a la superficie sin tener que modificarlos es utilizar proteínas de unión a anticuerpos. Las proteínas A y G, presentan una gran afinidad por la región Fc de los anticuerpos por lo que son herramientas muy útiles para controlar la orientación durante la inmovilización. El mayor inconveniente de este método es que las proteínas también hay que unirlas de forma controlada a la superficie, para que los puntos de unión queden accesibles al anticuerpo.

Por otro lado, también se han estudiado la inmovilización de fragmentos de anticuerpo de forma orientada. A través de reductores fuertes (DTT) consiguen separar las cadenas pesadas del anticuerpo, obteniendo dos fragmentos, quedando los grupos sulfhidrilos expuestos, y capaces de unirse covalentemente a la superficie (Baniukevic et al. 2013).

Por último, se ha utilizado una molécula sintética para la inmovilización orientada de anticuerpos. Se trata de un compuesto derivado de la molécula calixareno, una macromolécula con un núcleo formado por la unión de grupos fenólicos dispuestos en forma de anillo cuyo borde inferior y superior puede modificarse para conseguir estructuras más sofisticadas que presentan cavidades que permiten la inclusión de otras moléculas. Derivados del calixareno con grupos SH en uno de los bordes del anillo, y modificados con un compuesto químico cíclico (éter de corona) en el borde opuesto, han sido propuestos como moléculas de unión para la inmovilización orientada de anticuerpos, en su forma nativa, sobre superficies sensoras de dispositivos SPR con resultados muy satisfactorios (Soler et al. 2014).

1.2.4.4. Detección de interacciones biomoleculares

Tras la inmovilización del anticuerpo, en la etapa de reconocimiento molecular antígeno-anticuerpo, se hace circular sobre la superficie la muestra a analizar. Cuando la molécula de analito se une al elemento de reconocimiento inmovilizado en la superficie sensora se produce un cambio en el índice de refracción, que se detecta en tiempo real por medio de la variación de señal. Normalmente esta etapa se desarrolla en tampones salinos con pH cercanos a 7 como PBS (Fernández, et al. 2012). A esta etapa se la conoce como asociación. En la etapa de lavado, se hace pasar la solución tampón durante un tiempo determinado. En esta etapa comienza el proceso de disociación entre los pares de antígeno-anticuerpo. Tras un

periodo de lavado, se puede tomar la medida. La disociación puede ser un proceso muy largo, por lo que se procede a la regeneración de dicha unión para recuperar la disponibilidad del anticuerpo de la superficie lo más rápido posible, y así tenerla lista para un nuevo ciclo. La regeneración se puede realizar cambiando drásticamente las condiciones de pH, fuerza iónica, o disolventes orgánicos. Todas estas etapas se desarrollan bajo condiciones estables de flujo y que favorecen la unión de bio-receptor y el analito.

En la siguiente figura puede verse un sensograma “modelo” generado en un formato directo.

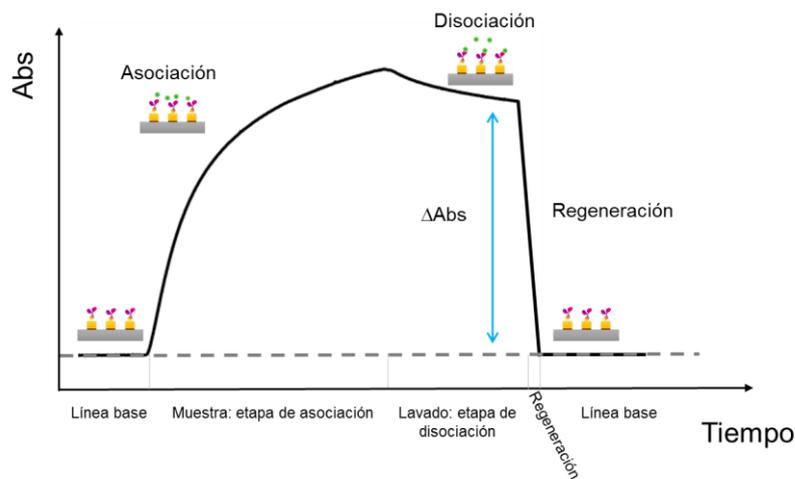


Figura 1.15. Sensograma modelo de un ciclo de unión y regeneración para un biosensor de afinidad, basado en LSPR.

Para poder construir una curva de calibrado es necesario realizar varios ciclos a diferentes concentraciones de analito conocidos. Con el tratamiento de datos del sensograma se construyen las curvas de calibración (Δ señal vs concentración de analito). Las curvas suelen ser de tipo hipérbola y en la parte lineal de la curva la respuesta es directamente proporcional a la concentración de analito.

Para terminar en la siguiente figura se muestra los pasos a realizar en un ensayo típico de biofuncionalización de nanoestructura y detección de analito: (i) Selección de la nanoestructura y limpieza de la misma, (ii) formación de una monocapa autoensamblada, (iii) unión covalente del bio-receptor a la superficie, (iv) y (v) ciclos de unión y regeneración para construcción de curva de calibrado y análisis de muestras, y (v) regeneración total de la nanoestructura para su funcionalización.

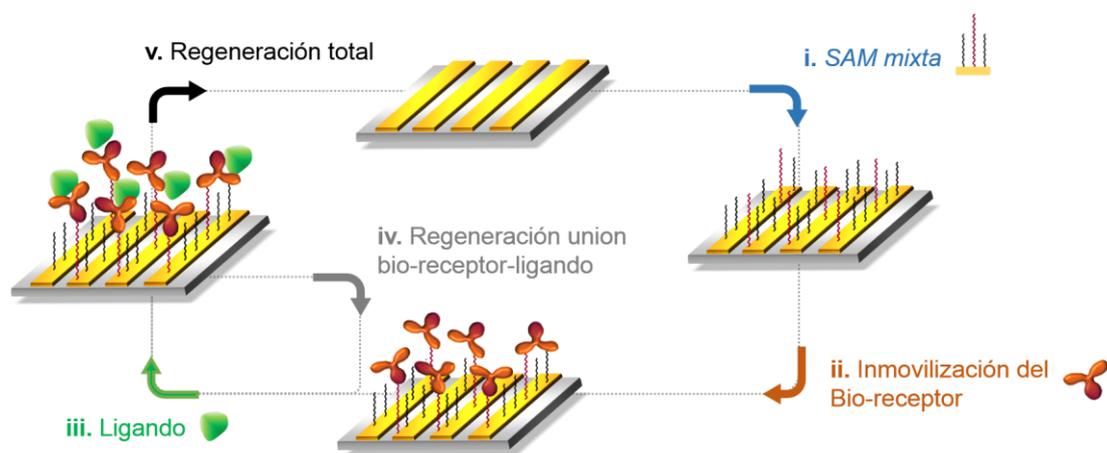
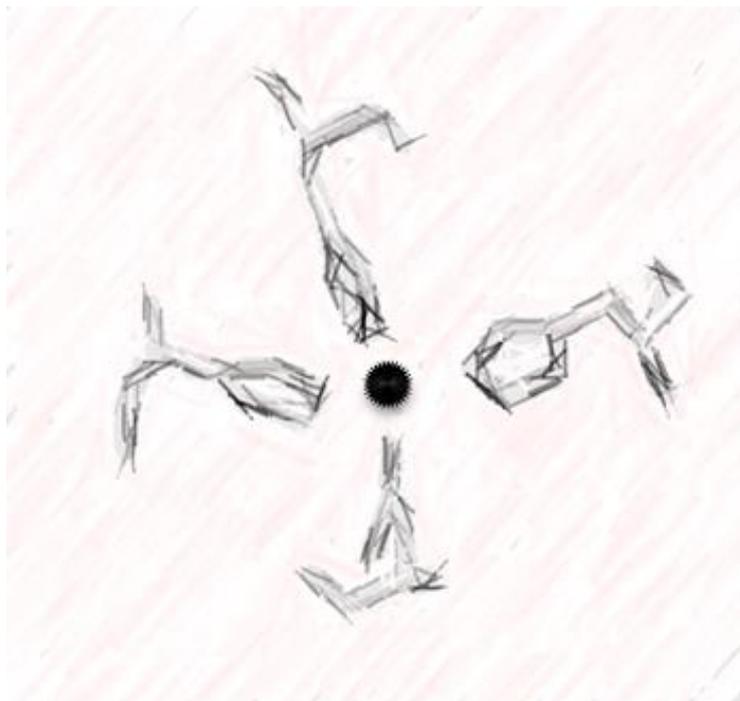


Figura 1.16. Pasos secuenciales de un protocolo de inmovilización y detección de analito: i) Formación de una SAM mixta, ii) Inmovilización del bio-receptor en la superficie sensora, iii) Unión del bio-receptor con el ligando, iv) Regeneración de la unión bio-receptor-ligando y v) Regeneración total de la nanoestructura para un nuevo uso.

CAPÍTULO 2

Engineering the Interface between the *rVuFeSOD* and the Nanoparticles



2.1. INTRODUCTION

Here we investigate the behavior of iron superoxide dismutase (rVuFeSOD) on 9.6 nm Au NPs, which were chosen as model nanoscale surface because they can be synthesized with a high degree of reproducibility, purity and at high concentration. Moreover, Au NPs have highly versatile surface chemistry, where the chemistry can be modified systematically. Recombinant iron superoxide dismutase (rVuFeSOD) protein from cowpea (*Vigna unguiculata*) has been conjugated to AuNPs covalently and non-covalently, using mercaptoundecanoic acid as ligand. The effect of the concentration of the ligand on the coverage and activity of the protein has been determined to allow correlation to surface chemistry. The NP perturbs the activity of the rVuFeSOD, and the effect of the surface chemistry affects the activity and coverage, also the way the protein interacts with the NP (covalent or non-covalent).

2.1.1. SUPEROXIDE OXIDE DISMUTASE ENZYMES

Antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD; superoxide:superoxide oxidoreductase, EC 1.15.1.1) are found in all three domains of life, and may well have been present in LUCA (Last Universal Common Ancestor of life). Virtually all organisms that spend any time in the presence of oxygen possess copies of this enzyme. These enzymes, and probably others, evolved in response to the formation of reactive oxygen intermediates by ultraviolet radiation very early in the history of life (Nick Lane 2002). For that reason, SODs are an essential group of metalloenzymes.

There are three major families of superoxide dismutases, and these families depend on the metal cofactor: the Cu/Zn type (which binds both copper and zinc), the Fe and Mn type (which binds either iron or manganese), and the Ni type, which binds nickel in the active center. CuZnSODs is the type most commonly used by eukaryotes (Richardson et al. 1975), FeSODs and MnSODs are used by prokaryotes and protists (Asensio et al. 2012) and NiSOD is strictly used by prokaryotes (Barondeau et al. 2004). The enzyme used in this work, VuFeSOD, is the least studied of SODs family. It is a plant superoxide dismutase localized to the cytoplasm, an unusual subcellular location, of both infected and uninfected cells of the cowpea plant (*Vigna unguiculata* L.) (Moran et al. 2003, Asensio et al. 2012). This highly active VuFeSOD is part of the first line of defence against free radical and oxidative stress, and participates in the plant response to many abiotic stresses such as drought, salt, high irradiance, and many others which limits field agronomic production.

VuFeSOD has been crystallized and the 3D structure has been established (Figure 2.1) (Munoz et al. 2003, Munoz et al. 2005). The enzyme has two identical subunits that are not covalently bound. VuFeSOD monomer has 245 amino acid residues, 7 α -helices, and 3 β -sheet structures. Its overall size is $\sim 45 \times 31 \times 36$ Å, the isoelectric point is 5.31 and the molecular weight is 27,411 Da. It has an iron atom as cofactor.

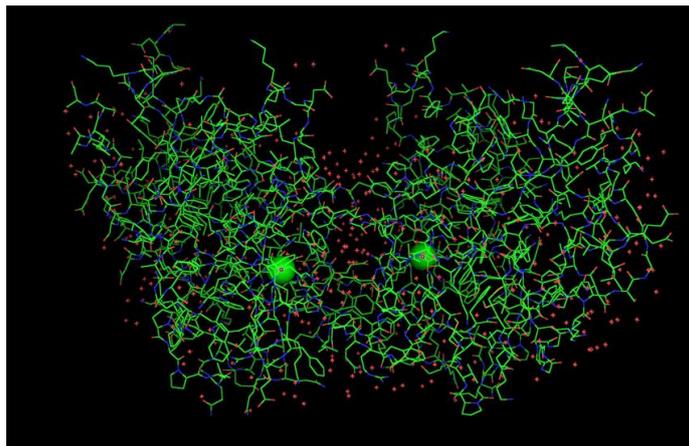


Figure 2.1. VuFeSOD dimer crystal structure: 3-D model for the dimer of the eukaryotic FeSOD from cowpea nodule cytosol, based on X-Ray crystallography of FeSOD crystals. Iron atom can be seen as green circle.

The superoxide anion binding site is located in a cleft close to the dimer interface. The iron of the active site is penta-coordinated by four catalytic residues His54, His102, and His206, and Asp202, and by a solvent molecule (Figure 2.2). The residues that build a shell around the metal center thought to be essential for activity are His47, Try51, Gln91 and Trp197 (F et al. 2002).

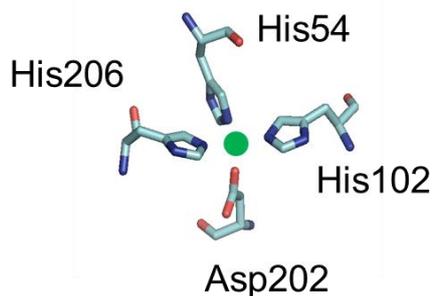


Figure 2.2. The active site in VuFeSOD: The catalytic residues, His54, 102, and 206, and Asp202, Fe atom can be seen as a green circle.

The enzymatic activity of SOD was discovered in 1969 by McCord and Fridovich (J. M. McCord and Fridovich 1969). The mechanism of action of iron superoxide dismutase has been analyzed in detail. SODs catalyze two step reactions in which superoxide anions are dismutase into hydrogen peroxide, while a metal cofactor cycles between the reduced and oxidized forms (Abreu et al. 2010):



The dimer of SOD enzymes appears to be the minimal catalytically active form. This would imply the possibility of inter-subunit cooperation during catalysis. Although, it is not known yet it seems that some motifs from one monomer might participate in the catalysis of the

neighboring active site through its interaction with other amino acids from second monomer (Munoz et al. 2005).

2.1.2. IMPORTANCE OF SODS IN MEDICINE

The SODs enzymes have a great therapeutic potential as they are involved in certain cancers and diseases such as amyotrophic lateral sclerosis, Parkinson's disease, Alzheimer, cataracts, and various neurological disorders (Joe M. McCord and Edeas 2005). Moreover SODs are the first line of defense against free radicals as they eliminate superoxide radicals, and they have been indicated in medicine by different authors and proposals.

For example it has been observed that MnSOD plays a dual role in cancer development, acting as a tumor suppressor during early stages of carcinogenesis and facilitating cancer progression at later stages of development (Holley and St. Clair 2016). On the other hand, it has been shown that the over-expression of MnSOD in neuronal cells of rat prevent apoptosis induced by excess of iron. Also, a complex of Mn (II) specifically designed to have SOD activity has been shown to protect against inflammation and oxidative damage by ischemia / reperfusion in rat cells (Salvemini et al. 1999). The CuZnSODs have been used successfully in the treatment of radiation-induced fibrosis, and in gene therapy experiments (Noor, Mittal, and Iqbal 2002; Macmillan-Crow and Cruthirds 2001). It has recently been shown that the over-expression of CuZnSOD in the brain subfornical organ improves cardiac function in a mouse model of heart failure (Collister et al. 2016). Using small synthetic compounds with SOD / catalase activity, has been greatly extend the lifespan of the worm *Caenorhabditis elegans* by increasing their antioxidant defenses (Melov et al. 2000). Finally, studies of overexpression with full SODs in combination with other antioxidants in animals have shown significant effects in extending life expectancy for example in *Drosophila melanogaster* (Orr et al. 2003).

2.1.3. SOD-AuNP APPLICATIONS

Few studies exploring the attachment of SODs to Au NPs have been conducted. These studies invariably utilize a member of the CuZnSOD family (T. Kang et al. 2006; Hong et al. 2009b; Liping Wang et al. 2008; Y. Wang et al. 2009; Lu Wang et al. 2013). One of the most important applications is electrochemical detection of superoxide anions.

Stimulus-responsive hybrid material: Kang et al. have designed a new class of surface immobilized stimulus-responsive hybrid material based on tethered SOD1 on a Au film and with Au NPs placed atop SOD1. When the pH changes between 2.5 and 12.3, the hybrid material produces an optical response through a conformational change of the protein.

Sensing: Hong et al, have used the SOD1–AuNPs conjugate for highly sensitive and colorimetric detection of the temporal evolution of superoxide dismutase (SOD1) aggregates implicated in the pathology of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). AuNPs were conjugated with

SOD1 monomers (SOD1–AuNPs). Upon exposure of the probes (SOD1–AuNPs) with SOD1 aggregates, significant changes in both surface plasmon resonance spectra and concomitant colors observed which were attributed to the formation of probe aggregates of variable sizes onto the SOD1 aggregates (Hong et al. 2009).

Electrochemical sensors: The measurement of superoxide anions in biological systems is of great interest. Superoxide anions sensors have to be ultra-sensitive, well selective and also should exhibit a rapid response to the high reactivity, short half-life and low basal concentration of superoxide. Generally, SOD protein is used due to its highest affinity for superoxide ions. Currently, the electrochemical method is becoming much more attractive for determining superoxide anions than other methods (X. Zhu et al. 2015) mainly due to its advantages of high sensitivity and selectivity, and its capability in terms of direct and real-time detection.

For electrochemical sensor several strategies have been employed to improve electron transfer between SOD redox protein and electrodes, and it appears a promising way to use nanomaterials as the proteins carrier. CeO₂ nanoparticles (A. Zhu, Sun, and Petty 2012), Pt-Pd multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) (X. Zhu et al. 2015), zinc oxide nanoparticles (Z. Deng et al. 2008) and Au NPs (El-Deab and Ohsaka 2007; Liping Wang et al. 2008; Y. Wang et al. 2009; Lu Wang et al. 2013) are some examples of nanomaterials that have been used to immobilize SOD. Although many immobilization methods have been developed, such as direct binding to a support (covalent and non-covalent binding), encapsulation and cross-linking, generally non-covalent immobilization is used for SOD (X. Zhu et al. 2015; A. Zhu, Sun, and Petty 2012; Z. Deng et al. 2008; Lu Wang et al. 2013).

It has been observed that the ligand used to passivate nanoparticles also plays an important role in SOD activity in the electrochemical sensors. The interactions between ligand carboxylic terminal groups (-COOH) and the SODs are probably responsible for the observed promoted electron transfer between the protein and Au electrode (Love et al. 2005). Although more evidences are still needed to understand the interactions between the ligand and the SOD.

For all these applications it is necessary to optimize the binding of superoxide dismutase to the nanoparticle. A preferred method used in many areas of biochemistry to couple specific protein to solid surface is the bioconjugation by covalent binding. While protein adsorption onto nanoparticles can be reversible depending on pH, salt concentration, temperature or other environment physicochemical characteristics, protein covalent bounds are highly stable. In this chapter we study the covalent and non-covalent binding of rVuFeSOD to AuNPs. For that, a carboxyl terminal group ligand has been selected for two reasons, it can be easily bound to the protein by covalent bonding and because it appears that in electrochemical sensors helps the electron transport.

2.2. MATERIALS AND METHODS

2.2.1. CHEMICALS AND BIOLOGICAL MATERIAL

All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA), except where indicated. HisTrap HP 5 mL chromatography columns were supplied by GE Healthcare (Uppsala, Sweden).

The bacterial strain used to overexpress and produce the cowpea cytosolic Fe-superoxide dismutase was *Escherichia coli* BL21(DE3) containing the pET28a(+):*VuFeSOD* construct (Moran et al. 2003).

The buffer used with the protein contained 10 mM sodium phosphate (NaP) and was adjusted to pH 7.4. MilliQ Water (Millipore) was used throughout this study.

2.2.2. METHODS

2.2.2.1. Overexpression of recombinant *VuFeSOD*

A self-induction method for overexpression of recombinant VuFeSOD

rVuFeSOD was over-expressed using a new over-expression method based on the self-induction of the DE3 lambda lysogen T7 polymerase in *Escherichia coli* cells. The induction takes place automatically in a late log growth phase, due to the depletion of carbon sources other than lactose. At this point, the cells are forced to use lactose and the synthesis of the T7 polymerase is activated. This revised method (Studier 2005) permits to produce higher yields of recombinant protein without the monitoring of the cultures, which can grow overnight and do not need to be manipulated, and avoids the high cost of the lac promoter-inducer IPTG. This overexpression system improves the expression and purification of enzymes containing prosthetic groups, which are often difficult to obtain due to impairment of the carbon backbone and the prosthetic group (Sikorski et al. 1995; Arredondo-Peter et al. 1997).

Growth conditions of the recombinant bacterial lines

Transformed *Escherichia coli* BL21(DE3) cells, containing the pET28a(+):*Vu_FeSOD* construct (Moran et al. 2003) were grown in two 2-L flasks, in a ZYP-5052 media essentially as described by Studier (Studier 2005) but with some modifications. Briefly, to obtain ZYP-5052 the following reagents were mixed in the following sequence: 465 mL of ZY reagent, 0.5 mL of 1 M MgSO₄, 50 µL of 1000 x metal mixture, 10 mL of 50 x 5052, 25 mL of 20 x NPS and 0.5 mL of kanamycin (100 mg·mL⁻¹). ZY reagent contained 5 g peptone and 2.5 g yeast extract in 465 mL of deionized distilled water. 50 x 5052 reagent contained 19.9 mL glycerol (approx. 25 g), 2.5 g glucose and 10 g α-lactose, and 36.5 mL deionized water. Metal mixture (1000 x) was obtained as described by Studier (Studier 2005) except for the addition of Na₂SeO₃. (Urarte et al., 2008) 20 x NPS reagent contained 6.6 g (NH₄)₂SO₄, 13.6 g KH₂PO₄, and 14.2 g Na₂HPO₄ and 90 mL of deionized distilled water. It must be added at the end to avoid precipitate formation. Solutions

were autoclaved for 15 min and stored at room temperature. In this method, kanamycin is used at significantly higher concentrations ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) than is normally the case ($25\text{-}40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), and 0.5 mL were included in each flask after mixing all the reagents. Finally, inoculation of recombinant cell lines was made by transferring of 50 μL from a glycerol stock into each of the 2 L flask. Cultures were incubated at 37°C for 20 hours with shaking at 200 rpm. Cells were harvested by centrifugation at 4,000 g and the cell paste was frozen in liquid N_2 and stored at -80°C until used.

Harvest and breakage of the E. coli cells

The cell paste (approx. 1 g) was thawed on ice and resuspended in 10 mL of the equilibration buffer containing 20 mM sodium phosphate (pH 7.5) and 500 mM sodium chloride; 10 μL DNase ($25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) and 40 mg lysozyme were added. The suspension was incubated at 4°C with gentle agitation for 15 min, and afterwards sonicated on ice with three 30-second pulses at 70% power (Soniprep 150 sonicator, Sanyo). After sonication, the lysed cell suspension was cleared by centrifugation at 48,000 g at 4°C for 20 min.

Purification of the recombinant protein

The resulting supernatant was sterilized through a $0.22 \mu\text{m}$ filter syringe to avoid any bacterial contamination and chromatographed on a 5 mL Ni-nitrilotriacetic acid resin-based column (His-Trap Chelating, GE Healthcare, Uppsala, Sweden), which selectively binds to the poly-His tag-fused of the recombinant proteins. The column was pre-equilibrated with 5 column volumes of 20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.5) containing 500 mM sodium chloride. Chromatography was performed at a $5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ flow rate. Recombinant *VuFeSOD* was eluted with an equilibrating buffer containing 500 mM imidazole. A 50 mL of a linear gradient from 50 to 500 mM imidazole was applied and conductance (mS) and UV-VIS absorption at 280 nm wavelength were followed. *rVuFeSOD* eluted at approximately 225 mM imidazole. The collected yellowish fractions corresponding to *rVuFeSOD* were dialyzed 3 times against 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) and concentrated. Protein purification was assessed by gel electrophoresis and accordingly, fractions were pooled. An aliquot from a fraction of the purified protein was electrophoresed in SDS polyacrylamide gels (10% PAGE, w/v) in order to monitor protein purification. Either 50 μg or 4 μg of protein were loaded into the gels for crude extracts or purified fractions of *rVuFeSOD*, respectively.

Protein concentration

In order to quantify total protein, Bradford dye binding assay was used. A standard curve was developed using a series of Bovine Serum Albumin (BSA) standards in the $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ to $6 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ range. The absorbance of each sample was measured at 595 nm and plotted versus BSA concentration. The resulting line was fit by the linear least squared method. Protein aliquots were stored at -20°C until used.

Protein activity

Protein activity was checked following Beauchamp & Fridovich, 1971 method on acrylamide gel (Beauchamp and Fridovich 1971). This assay is based on the inhibition of the reduction of nitroblue tetrazolium by photochemically generated O_2^- radicals by SOD. The assay utilized photochemical events to generate O_2^- and used nitro blue tetrazolium (NBT) to detect this radical. Due to the ability of SOD to scavenge the oxygen radicals, it inhibits the formation of the blue formazan, and causes achromatic zones on otherwise uniformly blue gels. Briefly, recombinant VuFeSOD was separated on 12.5% (w/v) native PAGE in the cold room. The electrophoresis was run for 2 hours at 200 V, approximately 1 hour after the bromophenol blue reaches the end of the gel. This process provided an improved mobility of SODs into the gels. After the electrophoresis, gels were kept in reaction buffer (50 mM sodium phosphate, pH 7.8) for 30 minutes. Secondly, they were transferred to 0.5 mM nitroblue tetrazolium containing reaction buffer, and further incubated for 20 minutes. Finally, they were incubated in reaction buffer supplemented with con 0.03 mM riboflavin and 0.2% tetramethylethylenediamine (TEMED) (v/v) for 20 minutes. Gels were exposed to white light for 2-5 minutes in order to visualize SOD activity bands. All incubations were performed in darkness.

2.2.2.2. Gold nanoparticles synthesis (Au NPs)

Water soluble, citrate stabilized-Au NPs were synthesized according to literature methods (Beesley 1989). Tannic acid was used to nucleate small Au seeds in the solution and additional Au ions being reduced with citrate were adsorbed on the seeds, therefore Au NPs grew. By changing the amount of tannic acid or the other chemicals in the solution, size distribution of synthesized particles can be tuned (Figure 2.3).

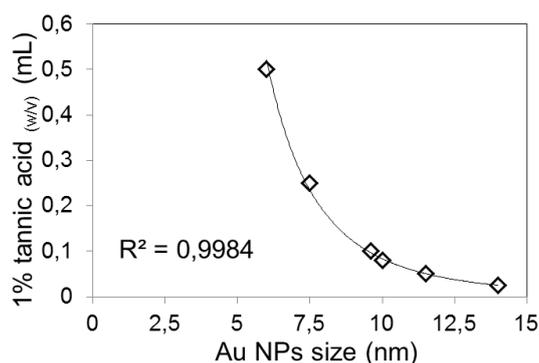


Figure 2.3. The influence of the tannic acid concentration on particles size, during the gold nanoparticles formation.

Here, 9.6 nm Au NPs were synthesized. For that, 80 mL of 1% tetrachloroauric acid ($HAuCl_4$) was reduced by adding a mixture of 4 mL 1% sodium citrate (w/v), 0.1 mL 1% tannic acid (w/v), 1 mL of 25 mM sodium carbonate and 14.9 mL H_2O at 60°C under vigorous stirring. At the beginning the color of the solution was purple but changed into red as reaction went on. After 10 min at stable temperature the colloidal solution was cooled down at room temperature.

After the synthesis was completed, transmission electron microscopy (TEM) pictures were taken to evaluate size distribution of the particles. Average size of the particles was obtained by analysis of TEM images (JEOL 2011) with ImageJ software (Abràmoff, Magalhães, and Ram 2004).

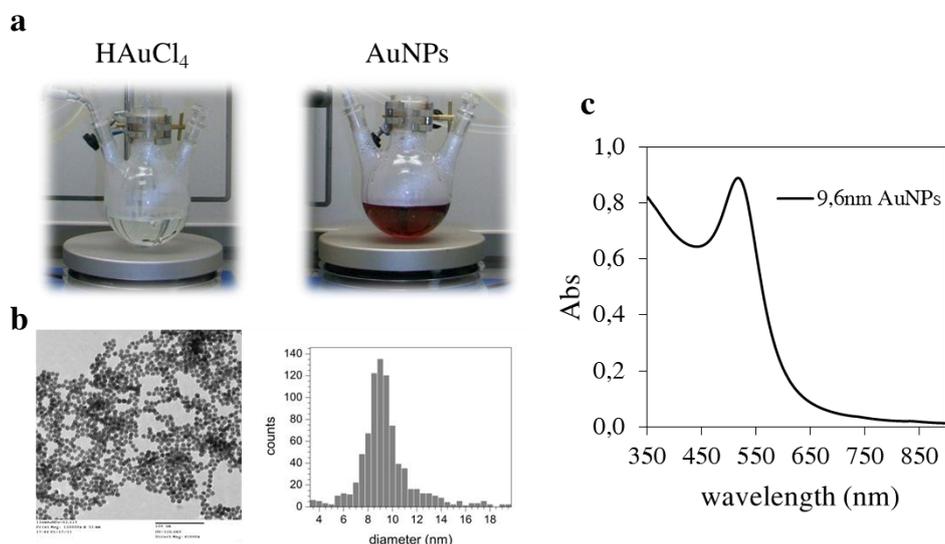


Figure 2.4. 9.6 nm gold nanoparticle synthesis: a) Reduction of tetrachloroauric acid (HAuCl_4 - transparent solution) in the presence of a reducing agent (citrate) to form colloid Au NPs (red solution); b) TEM images of Au NPs and their respective size distribution histograms; and c) UV-VIS absorption spectra of Au NPs with an absorption peak at 517.5 nm.

The Au NP size was determined to be 9.6 nm. Thereafter, the concentration of the Au NPs solution was calculated by absorption spectra. The Au NPs (9.6 nm) showed an absorption peak at 517.5 nm (Figure 2.4) and followed the Lambert-Beer law (equation 2.1), where Abs is the absorbance,

$$\text{Abs} = \varepsilon_{\text{abs}} \cdot l \cdot c \quad \text{Equation 2.3}$$

which is defined as the logarithm of the ratio of light intensity ($\log_{10} I_0/I$); where ε_{abs} [$\text{cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$] is extinction coefficient of particle; l [cm] is the path length of light and c [M] is concentration of particles in the solution.

The absorbance peak of the spectra is a function of the number of gold atoms consisting of a particle (n). A correlation developed from Hamad-Shifferly lab. work is shown in Figure 2.5 (equation 2.4), and n is expressed in equation 2.5. Gold nanoparticles are assumed to have the bulk structure of the gold, and the population of the atoms in volume unit ($\sim 5.9 \times 10^{28} \text{ m}^{-3}$) has been reported elsewhere (S. Park, Brown, and Hamad-Schifferli 2004).

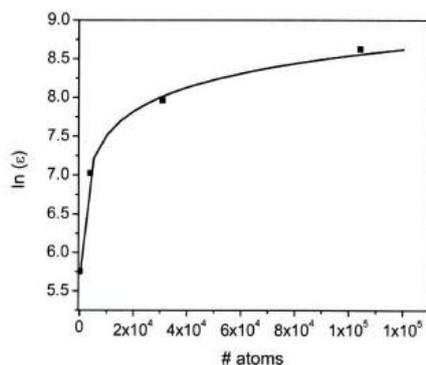


Figure 2.5. Number of atoms in Au NP vs. natural log extinction coefficient (Brown 2008)

$$\ln \varepsilon_{\text{abs}} = 1.1338 \cdot \ln n + 6.7429 \quad \text{Equation 2.4}$$

$$n = \frac{4}{3} \pi R^3 (5.9 \times 10^{28}) \quad \text{Equation 2.5}$$

For example, a 9.6 nm Au NPs is composed of approximately 27,332 atoms and extinction coefficient is about $9.1 \times 10^7 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$. Concentration of a certain Au NPs solution is then calculated by equation 2.6. Absorbance at 800 nm is subtracted from the peak absorbance as a baseline value.

$$C = \frac{Abs_{517.5 \text{ nm}} - Abs_{800 \text{ nm}}}{\varepsilon_{\text{abs}}} \quad \text{Equation 2.6}$$

2.2.2.3. Surface modification of Au NPs

The surfaces of the NPs were modified with mercaptoundecanoic acid (MUA) by using different stoichiometry: NP:ligand 1:100, 1:250, 1:500, 1:750 and 1:1,000. MUA contains a thiol group in one side of the chain which facilitates a covalent bond to Au and a carboxyl group in the other side. Gel electrophoresis, size and VIS spectra were used to assay the surface chemistry.

2.2.2.4. Protein conjugation with AuNPs

Two different approaches had been used to conjugate the protein to nanoparticles. The first approach used electrostatic interaction between the particle and protein to generate supramolecular assemblies (protein adsorption) and the second method used covalent linkage of the protein to the particle by MUA. Gel electrophoresis was used to assay the surface chemistry. Agarose gel electrophoresis (0.5%) was performed in TA at $E = 80 \text{ mA/cm}$ for 60 min.

Protein adsorption

NPs-rVuFeSOD conjugation was achieved by incubating rVuFeSOD with the NPs in solution at room temperature for 1 h. The incubation ratio was 1:500 NPs:rVuFeSOD, which was chosen from the titration method. This ratio most likely represents a large excess of protein, so it helps to ensure the conjugation. NPs-rVuFeSOD were purified by centrifugation at 4°C.

Covalent linkage

First, activation of the carboxylic groups of MUA was accomplished loading the nanoparticles with freshly prepare activation solution EDC:sulfo-NHS (ratio 2:1). The activation solution was different for each NPs:MUA stoichiometry, and it depended on the final carboxylic groups on the nanoparticle surface. The ratio COOH:EDC was always 1:10. After 1 hour of incubation, the nanoparticles were washed with coupling buffer using centrifugation and resuspended using a sonic probe in the same buffer. The proteins were loaded in the solution to produce the covalent attachment via active ester methods. After 2 hour of incubation, NPs-rVuFeSOD were purified by centrifugation at 4°C. The purified conjugates were finally dispersed in NaP buffer and storage at 4°C.

2.2.2.5. Coverage

Protein coverage was quantified by Bradford protein assay. rVuFeSOD protein concentrations were calculated from a standard curve made from BSA. The number of rVuFeSOD per NP was obtained from the difference of initial and final protein concentration in solution divided by the initial NP concentration.

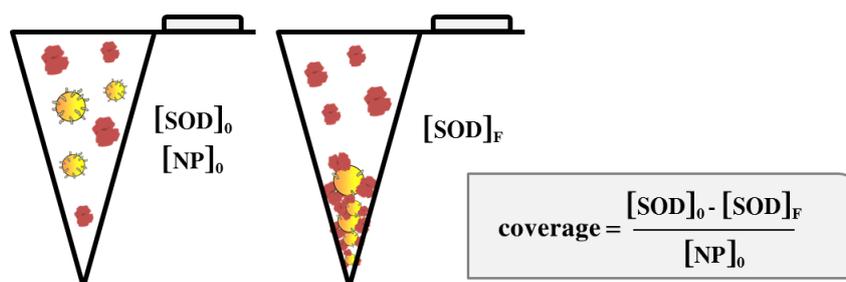


Figure 2.6. Protein coverage calculation.

2.2.2.6. In-gel activity assays

In-gel SOD activity assays for Au NPs-rVuFeSOD conjugated were performed also as described in Beauchamp and Fridovich (1971), but with a small modification. As the pore size of polyacrylamide gel was too small for our conjugates, agarose gel electrophoresis was used instead to separate the NPs-protein conjugate. Agarose (0.5 %) gel electrophoresis was performed in 0.5 x TA pH 8 at 75 V for 90 min in the cold room. After the electrophoresis, agarose gels were kept in reaction buffer (50 mM sodium phosphate, pH 7.8) for 30 minutes.

Secondly, they were transferred to 0.5 mM nitroblue tetrazolium containing reaction buffer, and further incubated for 20 minutes. Finally, they were incubated in reaction buffer supplemented with con 0.03 mM riboflavin and 0.2% tetramethylethylenediamine (TEMED) (v/v) for 20 minutes. Gels were exposed to white light for 2-5 minutes in order to visualize SOD activity bands. All incubations were performed in darkness.

2.2.2.7. Spectrophotometric activity assay

The enzymatic activity of rVuFeSOD was quantified according to literature methods (Y. Sun, Oberley, and Li 1988) with small modifications. SOD activity was measured spectrophotometrically, based on the ability of SODs to inhibit NBT reduction by the xanthine + xanthine oxidase (XOD) system. Briefly, reduction of NBT was monitored at 25°C by following the increase in absorbance at 560 nm for 5 min. The reaction cocktail contained reaction buffer (10 mM potassium phosphate, 0.1 mM Na₂EDTA, pH 7.4), 0.1 mM xanthine and 0.25 mM NBT. The reaction was started by the addition of 40 µL of 1:1600 diluted XOD. Sample volumes of NPs-rVuFeSOD were adjusted in order to reduce activity rate to around 50%. Much higher activity rates may lead to a non-linear kinetic or saturation of the enzymatic activity. Hence, around 10-20 µg of rVuFeSOD were finally employed. A sample without XOD was used as a blank (negative control). Data from different syntheses and experimental replicates were collected to calculate the average (minimum n=3).

2.3. RESULTS AND DISCUSSION

2.3.1. IRON SUPEROXIDE DISMUTASE CHARACTERIZATION

2.3.1.1. A self-induction system for rVuFeSOD overexpression and purification

Transformed *E. coli* BL21(DE3) cells, containing the pET28a(p)::VuFeSOD construct (F et al. 2002) were grown in two 2 L flasks, with kanamycin and in a ZYP-5052 media essentially as described by Urarte et al. (Urarte et al. 2008). Quantities of 3-4 g of cell paste from a 2 L flask using 500 mL of the ZYP-5052 broth had been obtained. One step affinity purification of a 6 x HIS tagged recombinant protein was obtained. Figure 2.7 shows the typical chromatogram obtained for recombinant protein purification on Ni²⁺-NTA resin.

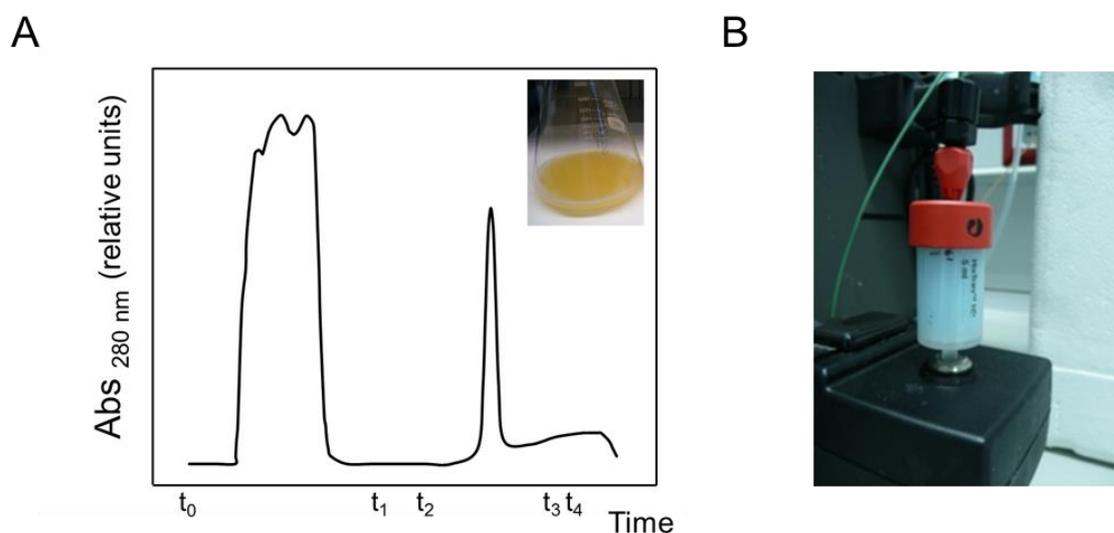


Figure 2.7. rVuFeSOD purification by affinity chromatography: A) One step purification of rVuFeSOD. t_0 : Injection of crude extract of cell disruption; t_1 : 50 mM Imidazol application; t_2 - t_3 : 50 mM - 500 mM Imidazol gradient; t_4 : Wash column with 500 mM Imidazol and B) 5 mL NTA-Ni column.

Under the conditions described here, the purification procedure typically started from 1.0 g of cell paste and it allowed obtaining approximately 6.5 mg of pure rVuFeSOD. All the protein was produced soluble, with none in inclusion bodies and one hour of purification was enough to obtain an extremely pure recombinant protein.

Purity of rVuFeSOD was checked by SDS-PAGE, yielding a single band. The purification steps of rVuFeSOD are shown in Figure 2.8-A. Coomassie stained gel shows that rVuFeSOD is the main overexpressed fraction in the bacterial extract solution (Figure 2.8-A, line 2). The amount of recombinant protein in the pellet fraction of the bacterial extract is also high. Pure protein is efficiently purified as seen in SDS-PAGE (Figure 2.8-A, lines 5, 6 and 7). The gel confirmed that the use of thrombin during overnight dialysis effectively cut the (Hys)₆-tag off the rVuFeSOD, (Figure 2.8-A line 7). Several replica purifications originated equivalent results, indicating high reproducibility.

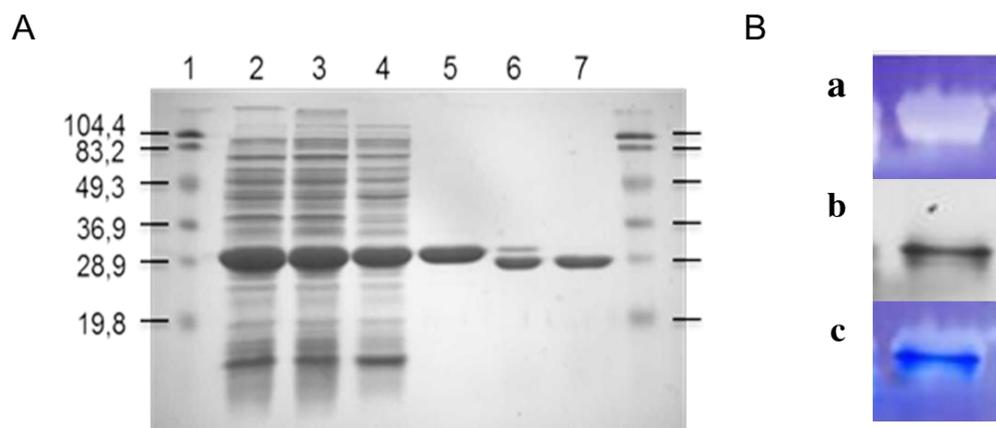


Figure 2.8. A) SDS-PAGE gel of the *rVuFeSOD* purification steps: Samples were electrophoresed in a 12.5% SDS-PAGE gel and stained with Coomassie Blue. Line 1: Molecular mass markers; Line 2: Crude extract, Cell disruption; Line 3: Crude extract, pellet; Line 4: Crude extract, supernatant; Line 5: Pure *rVuFeSOD*; Line 6: Pure *rVuFeSOD* partially digested with thrombin; and Line 7: Pure *rVuFeSOD* digested with thrombin. B) *rVuFeSOD* gel activity: a) Gel stained for SOD activity assay b) Replica Gel stained with Coomassie blue brilliant and c) Superposition of gel stained with coomassie and gel stained for SOD activity. $\sim 2 \mu\text{g}$ of protein was loaded into each lane.

Activity of *rVuFeSOD* was checked by gel stained for SOD activity assay. After electrophoresis on native polyacrylamide gels, the negative banding corresponding to the SOD activity was visualized by soaking the gels in NBT, then riboflavin, and finally exposing to light (Figure 2.8-B, a).

Finally, protein thermal stability was checked. Free protein UV absorbance showed that Trp intensity at 280 nm was flat until about 50°C. The spectrum of the *rVuFeSOD* started shifting at 55°C which probably indicates de-stabilization of the dimer. At 70°C the protein was completely precipitated which indicate that protein had loss secondary and tertiary structure (Figure 2.9).

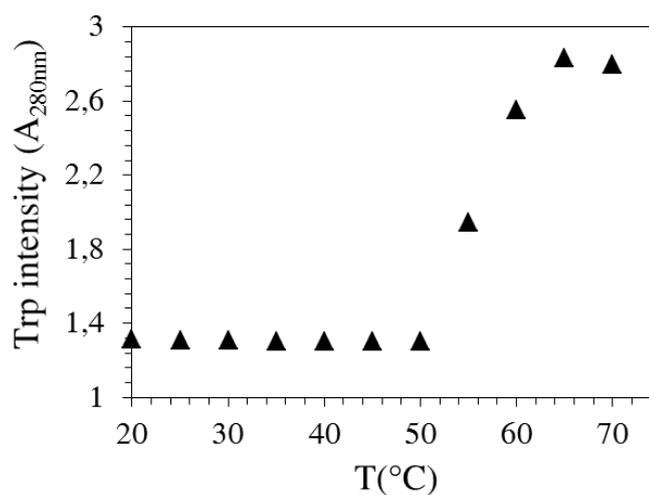


Figure 2.9. Thermal denaturation of *rVuFeSOD*: Spectral characterization of *rVuFeSOD* as a function of temperature.

2.3.2. ENGINEERING THE NANOPARTICLE SURFACE CHEMISTRY

Au NPs were synthesized (Figure 2.10). TEM images of the Au NPs showed spherical particles with an average diameter of 9.6 ± 2.2 nm. Dynamic Light Scattering (DLS) measurements revealed an average hydrodynamic diameter (intensity) of 11.3 ± 0.6 nm. The DLS size was slightly larger than the TEM size as expected, as the TEM results correspond to the size of the dried particles.

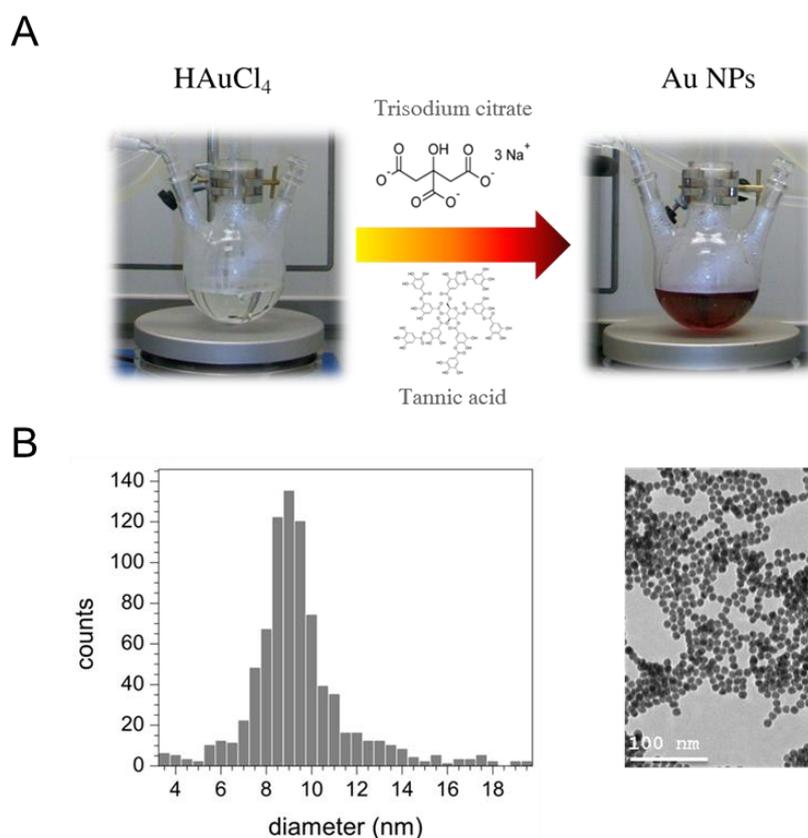


Figure 2.10. 9.6 nm Au NPs synthesis: A) Reduction of HAuCl_4 (transparent solution) by sodium citrate and tannic acid to colloidal gold nanoparticles (red solution) and B) Histogram and TEM image of Au NPs.

NP surfaces were modified with 11-mercaptoundecanoic acid (MUA, $\text{SH}-(\text{CH}_2)_{11}-\text{COOH}$). It has been chosen a molecule with a $-\text{COOH}$ terminal group because it is relatively easy to covalently bind it to the protein. Moreover, it has been observed that SAMs with a terminal group of $-\text{COOH}$ promote the direct electron transfer between the SOD and the gold electrode, in contrast to those with terminal group of $-\text{NH}_2$, $-\text{CH}_3$, $-\text{SO}_3^+$ or $-\text{OH}$ (Love et al. 2005). Different amount of surface coating ligand were used so that the effect of NP surface chemistry on $r\text{VuFeSOD}$ behaviour could be studied. We started with NP-citrate as a starting material and then we modified it with different concentration of MUA. MUA binds to the gold atoms by the $-\text{SH}$ group. Au-S bond strength is within the order of $40\text{--}50 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ (Hakkinen 2012; Pensa et al. 2012), close to the S-S bond ($\sim 62 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$).

The molecular weight of MUA is 218.36 and the ligand length is 1.71 nm (Hinterwirth et al. 2013b). The packing density of MUA on spherical gold nanoparticles has been measured by other authors. It has been observed that the packing density of SAMs is nanoparticle size-independent, but ligand-chain length-dependent. Ivanov et al. (2012) determined the packing density for Au NPs modified with MUA of 4.97 ± 0.01 ligand molecules·nm⁻² (Ivanov and Haes 2012), while Hinterwirth et al. reported a value of 5.7 ± 0.13 (Hinterwirth et al. 2013a). The highest possible packing on the 9.6 nm Au NPs modified with MUA is in the range of 1,450-1,650 molecules per nanoparticle.

We probed the following NPs:MUA stoichiometries: 1:100, 1:250, 1:500, 1:750 and 1:1,000. We did not saturate the surface with MUA (between 6-70% of the surface). Our nanoparticles SAMs will have less order or more defects than those that are very dense. This disorder could help the replacement reaction with other molecules containing thiols or disulfide as our protein that contains one Cys per monomer. The replacement occurs faster in disordered regions, which may take from minutes to hours (Love et al. 2005).

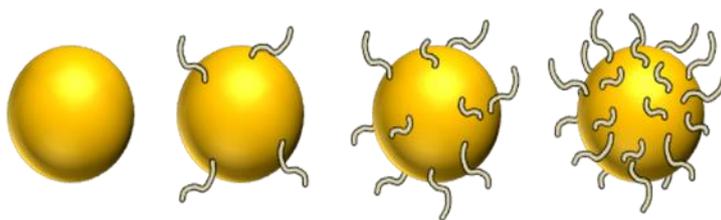


Figure 2.11. Au NPs surface modification with different concentration of MUA.

The nanoparticles with different surface ligand coating presented slight differences in hydrodynamic diameter. The diameter (depicted as Figure 2.12-A) increased linearly from 11.30 to 13.94 nm. This linearity indicates that the surface is still not fully saturated. For 1:1,000 NPs:MUA ratio, the monolayer average size was 1.32 nm, shorter than the length of MUA ligand 1.71 nm. 1.32 nm represents the 76% of 1.71 nm.

The UV-Visible spectra were recorded for Au NPs and Au NPs:MUA samples. 9.6 nm citrate stabilized-Au NPs exhibited an absorption peak at 517.5 nm. This absorption peak did not change significantly with the surface modification (Figure 2.12-B). The ratio 1: 250 NPs:MUA obtained the maximum displacement of the absorption peak (1.5 nm). As we increased the amount of ligand on the surface, absorption peak displacement instead of further increased, decreased until 818.2 nm (0.7 nm). This fact may be related to the ordering of the ligands on nanoparticle surface. It seems that from ratio 1: 500 (NP:MUA) the ligands begin to be ordered in areas of the nanoparticle where it is allowed, so may be we are monitoring conformational changes.

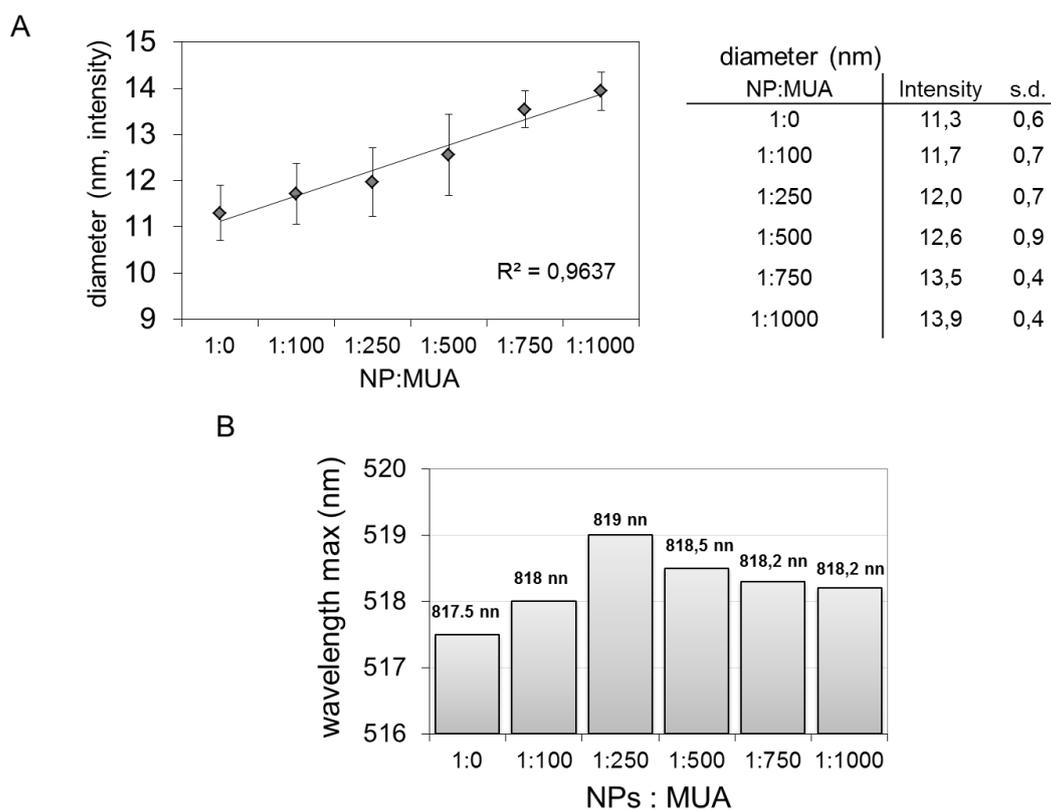


Figure 2.12. A) Au NPs hydrodynamic size measured by ξ -sizer in water. The diameter (intensity) increases linearly with MUA concentration on the surface. B) Maximum absorption peaks of Au NPs:MUA samples.

Gel electrophoresis also showed mobility shifts that varied with surface chemistry (Figure 2.13). NP-citrate was not stable enough in the buffer to run in the gel (lane 1), which has been observed previously. MUA functionalization increased the NP mobility in gel electrophoresis (from lane 2 to line 6) which could be due to the negative charge from MUA and residual citrate. As we increased the concentration of MUA on the NPs surface, the NP began to be more and more stable in the gel (Sperling and Parak 2010), run more homogeneously, and shifted to lower mobility, most likely due to the increase in size.

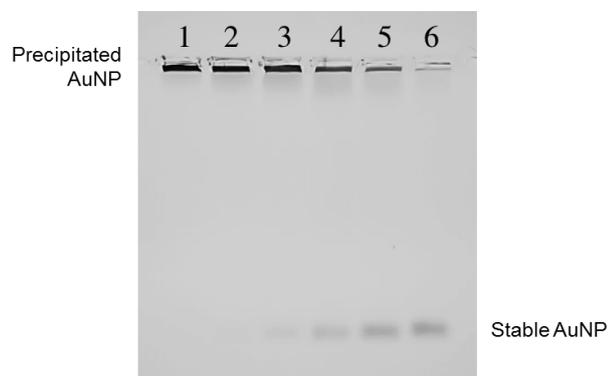


Figure 2.13. Gel electrophoresis mobility shift NP-citrate modified with MUA: Lanes: 1) NP-citrate, and 2) 1:100 NP:MUA ratio, 3) 1:250 NP:MUA ratio 4) 1:500 NP:MUA ratio 5) 1:750 NP:MUA ratio 6) 1:1,000 NP:MUA ratio.

2.3.3. Au NPs AND rVuFeSOD CONJUGATION: PHYSICAL ADSORPTION vs COVALENT

2.3.3.1. Gold nanoparticle protein conjugation.

The NPs with different surface chemistries were then conjugated to rVuFeSOD. Two different approaches have been used to conjugate the protein to nanoparticles.

Physical adsorption

The first approach used physical adsorption of the protein to the particle surface. For that purpose, conjugation was achieved by simple incubation for 1 h at a Au NPs:rVuFeSOD ratio of 1:500. Unbound rVuFeSOD was separated by spin centrifugation.

Determination of the optimal NPs:rVuFeSOD ratio was achieved by using the titration method, which involved the incubation of citrate Au NPs with increasing concentrations of rVuFeSOD. Then NaCl was added. High salt environments collapse the double layer of the Au NPs and cause nanoparticle aggregation if they are not properly stabilized with the protein (Pissuwan et al. 2007). The lowest amount of protein that maintained stable the colloidal solution was selected for the experiments, corresponding to the tube fifth, 1:500 Au NPs – rVuFeSOD (Figure 2.14).

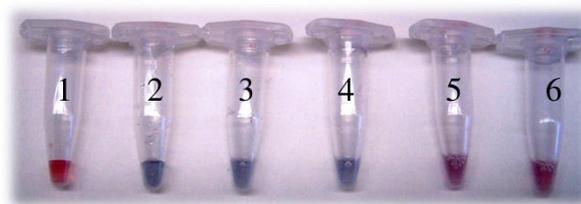


Figure 2.14. Titration method: Lines 1) Citrate Au NPs, 2) 1:1 Citrate Au NPs : rVuFeSOD, 3) 1:10 Citrate Au NPs : rVuFeSOD, 4) 1:100 Citrate Au NPs : rVuFeSOD, 5) 1:500 Citrate Au NPs : rVuFeSOD, and 6) 1:1,000 Citrate Au NPs : rVuFeSOD.

The –COOH terminated MUA (pI =4.9) are mostly negatively charged in phosphate buffer (pH 7.4). Although the rVuFeSOD (pI =5.31) has a net negative charge at pH 7.4, an interaction is still expected to occur between the nanoparticle and protein. Moreover, rVuFeSOD contains a free cysteine near to the protein surface, and it could covalently bind to the nanoparticle (Hong et al. 2009b).

Covalent linkage

The second method used direct covalent linkage of the protein to the particle surface. The covalent attachment was more complex and more critical steps had to be solved. First, activation of the MUA's carboxylic groups was accomplished loading the nanoparticles with activation solution EDC/sulfo-NHS. Briefly, EDC is a water-soluble zero-length carbodiimide crosslinker that activates carboxyl groups (–COOH) for spontaneous reaction with primary

amines ($-\text{NH}_2$) enabling protein conjugation. The strong chemical reactivity of EDC disappears after an hour. The addition of sulfo-NHS to reactions increases efficiency and enables to be activated for storage and later use (Hermanson 2008).

Optical properties of the Au NPs:MUA before and after the addition of EDC/sulfo-NHS solution were characterized by spectroscopy. Figure 2.15 shows a strong absorbance peak around 518 nm in the UV-VIS spectra (-- dashed lines), which is typical of plasmonic bands of spherical Au NPs. When the EDC solution was added to the samples, the second band around 610 nm was developed (- solid line). This shoulder differed from sample to sample, and only the stoichiometry 1:1,000 NPs:MUA did not present it. Shoulder intensity decreased as the number of molecules of MUA increased on the nanoparticle surface.

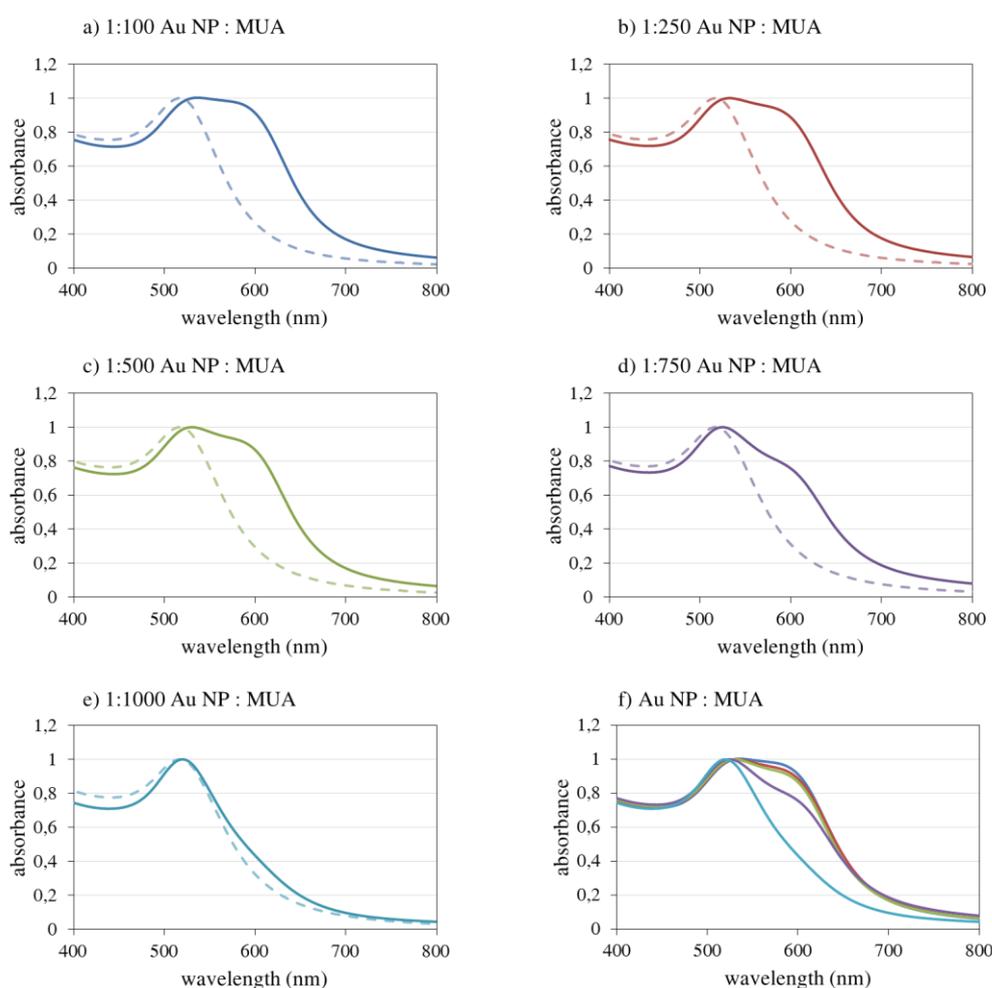


Figure 2.15. VIS spectra of the different surface chemistry Au NPs: *Dot lines* Au NPs modified by MUA, and *solid line*, Au NPs modified with MUA and incubated with EDC/sulfo-NHS solution. a) 1:100 NP:MUA, b) 1:250 NP:MUA, c) 1:500 NP:MUA, d) 1:750 NP:MUA, e) 1:1,000 NP:MUA, f) All samples together NP:MUA after addition of activation solution. All the spectra are normalizing to the max around 518 nm.

This effect also has been observed by others. Under specific conditions it is possible to form Au 1-D assembled nanostructures, when EDC solution is added to citrate stabilized-Au NPs (J. Lee, Zhou, and Lee 2011). They assumed that the second band appeared at 625 nm

corresponds to the longitudinal direction of this nanostructure. Our second band appears at 610 nm probably because we used smaller nanoparticles. The intensity of the shoulder is higher as more citrate is in the NPs surface. In Figure 2.16 is illustrated the reaction of citrate stabilized Au NPs with EDC (J. Lee, Zhou, and Lee 2011).

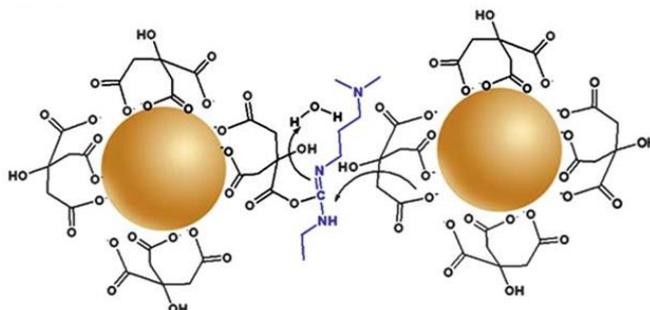


Figure 2.16. Illustration of the reaction of citrate stabilized-Au NPs with EDC (the blue molecule is EDC) (J. Lee, Zhou, and Lee 2011)

In Figure 2.17 we can appreciate this effect visually. After addition of the activating solution the red solution turns into purple solution.

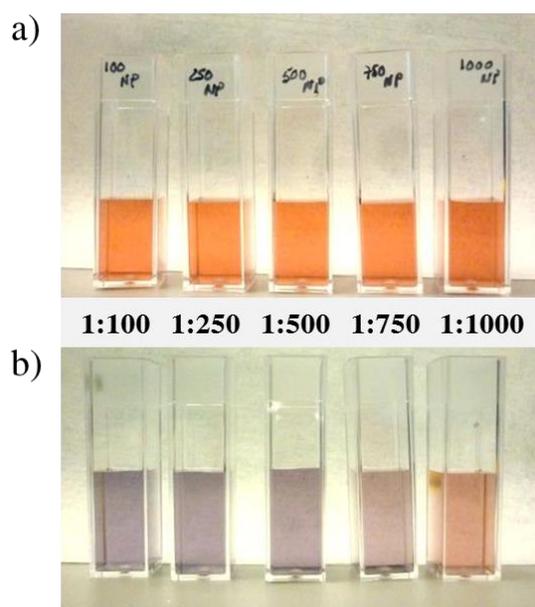


Figure 2.17. Au NPs colour changes from red to blue with the addition of EDC/sulfo-NHS solution to the different Au NPs samples (from left to right 1:100 NPs:MUA, 1:250 NPs:MUA, 1:500 NPs:MUA, 1:750 NPs:MUA and 1:1000 NPs:MUA).

We calculated the ratio between absorbance intensity at 610 nm and 518 nm, before and after addition of activation solution (Figure 2.18). As the concentration of MUA increased on the Au NPs surface, the ratio ($Abs_{610 \text{ nm}} / Abs_{520 \text{ nm}}$) slightly increased linearly (Figure 2.18 black triangles).

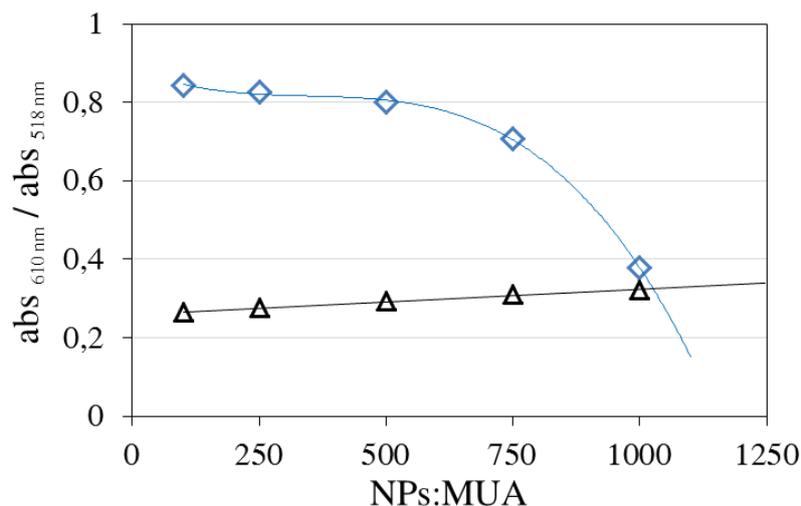


Figure 2.18. Absorbance ratio 610 nm / 518 nm for Au NPs:MUA samples (black triangle Δ), and Au NPs:MUA samples after addition of activation solution (blue diamond, \diamond).

In order to avoid the aggregation of NPs, we seek the activation condition for each NPs:MUA samples, to ensure the protein-Au NP linkage. Several ratios of EDC were proved with each NPs:MUA ratio. Finally, we chose 1:10 ratio (MUA:EDC). At this condition all the samples were stable and the ratio between absorbance intensity at 610 nm and 518 nm was around 3.5-4.

Once the activation conditions were established, protein attachment was analysed. Au NPs were activated 1 hour and then the protein was loaded in the solution to produce the covalent attachment via active ester methods (1:500 NP: protein ratio, same conditions that in physical adsorption). After 2 hour of incubation, Au NPs-rVuFeSOD were purified by centrifugation at 4°C.

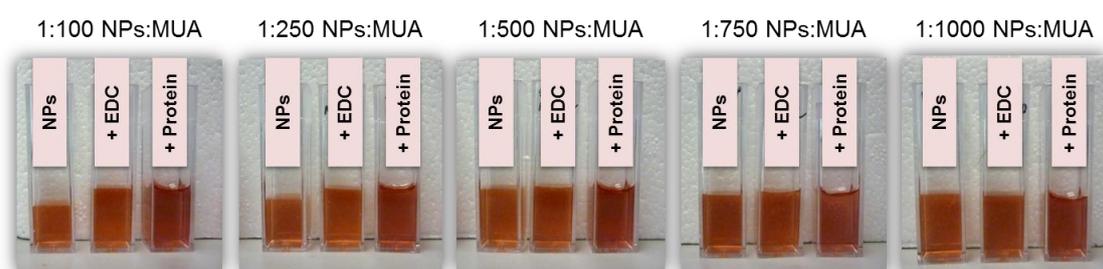


Figure 2.19. NPs-protein covalent conjugation: Au NPs activation with EDC/sulfo-NHS solution and protein loading to yield covalent attachment. Protein addition changes de Au NPs color.

rVuFeSOD has 18 lysine (-NH₂) susceptible to form the covalent bond. They are distributed across the surface of the protein (Figure 2.20). We assumed that the junction between the MUA and protein will be random, having more probability those that are on the surface.

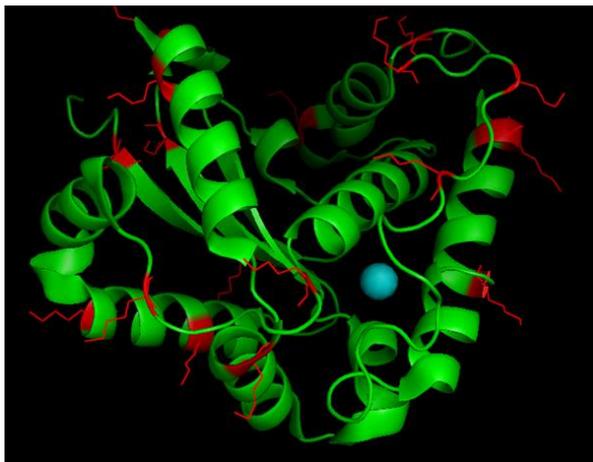


Figure 2.20. 3-D model for a monomer of *VuFeSOD*: Lysine residues are presented in red.

2.3.3.2. Gel electrophoresis

Gel-electrophoresis showed mobility shifts that varied with surface chemistry. The mobility shift is more pronounced for physical adsorption, rather than for covalent attachment.

Gel mobilities of the NPs upon conjugation to rVuFeSOD by physical adsorption

All the conjugates ran in the positive direction, indicating successful NPs stabilization and a net negative charge (Figure 2.21-A electrostatic). In addition, the narrow band indicated a uniform charge distribution and thus uniform protein functionalization. The mobility of the conjugates increased with the concentration of MUA on the NPs surface. The different mobilities could be explained by the protein coverage and by MUA concentration on the NPs surface. As we increase the negative charge of the nanoparticles with MUA less proteins binds to the NPs, probably because *rVuFeSOD* has a net negative charge and the interaction between the negative particles and the protein becomes weaker.

Gel mobilities of the NPs upon conjugation to rVuFeSOD covalently

In this case also, all the conjugates ran in the positive direction indicating a net negative charge (Figure 2.21-B covalent). They presented a similar narrow band, followed by a trace of aggregates. The mobility of conjugates was very similar for all of them, although it seems that the mobility slightly increases on the gel with MUA. Although covalent attachment of proteins to NPs provides conjugates that are stable toward dissociation, in our case, covalently binding nanoparticles presented a light trail of nanoparticles in the gel, which did not appear in physical adsorption, indicating greater heterogeneity of the samples.

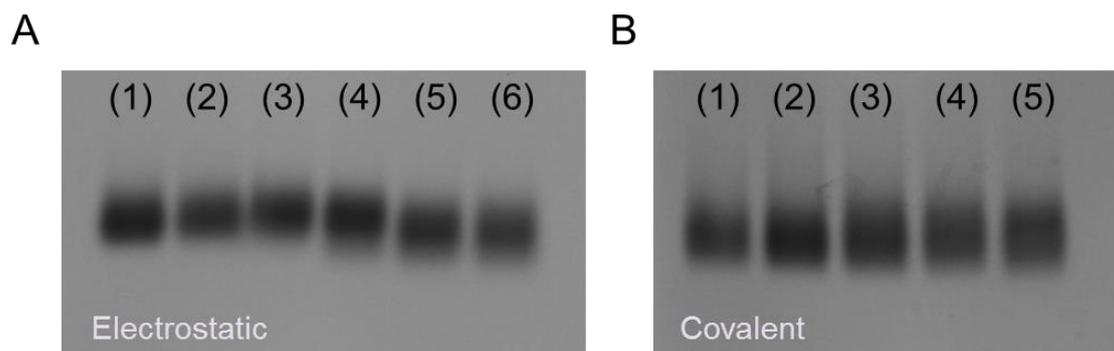


Figure 2.21. Effect of surface chemistry on rVuFeSOD behaviour on Au NPs. Gel electrophoresis of NP-rVuFeSOD. A) Left electrostatically: Lanes: (1) NPs-rVuFeSOD, (2) 1:100 NPs:MUA-rVuFeSOD, (3) 1:250 NPs:MUA-rVuFeSOD (4) 1:500 NPs:MUA-rVuFeSOD, (5) 1:750 NPs:MUA-rVuFeSOD, and (6) 1:1,000 NPs:MUA-rVuFeSOD. B) Right covalently Lanes: (1) 1:100 NPs:MUA-rVuFeSOD, (2) 1:250 NPs:MUA-rVuFeSOD (3) 1:500 NPs:MUA-rVuFeSOD, (4) 1:750 NPs:MUA-rVuFeSOD, and (5) 1:1,000 NPs:MUA-rVuFeSOD.

2.3.3.3. Quantifying the enzyme coverage on the Au NPs

For physical adsorption the coverage was determined to be 49 rVuFeSOD per NPs-citrate. NPs-citrate modified with MUA progressively resulted in lower coverage 48 (1:100 NPs:MUA), 46 (1:250 NPs:MUA), 43 (1:500 NPs:MUA), 38 (1:750 NPs:MUA) and 35 (1:1,000 NPs:MUA), indicating that MUA inhibited conjugation. Au NPs modified with MUA are negatively charged particles; therefore as we increase the MUA concentration on the nanoparticle, the nanoparticles surface becomes more negatively charged. All the bioconjugation assays were performed at the pH 7.4, at which rVuFeSOD is also negatively charged (p.I. 5.31). It seems that the repulsion tendency between negatively charged nanoparticles and negatively charged proteins starts to be more important as the negative charge on the NPs surface increases. These results correlate with those obtained in the gel electrophoresis.

For the covalent attachment the coverage was determined to be 47 (1:100 NPs:MUA), 48 (1:250 NPs:MUA), 45 (1:500 NPs:MUA), 44 (1:750 NPs:MUA) and 45 (1:1,000 NPs:MUA). There were not significant differences on coverage as a function of MUA concentration on the surface. It seems that the number of active carboxyl group on the surface that we have proved, did not have any significant effect on coverage. These results also correlate with those obtained in the gel electrophoresis.

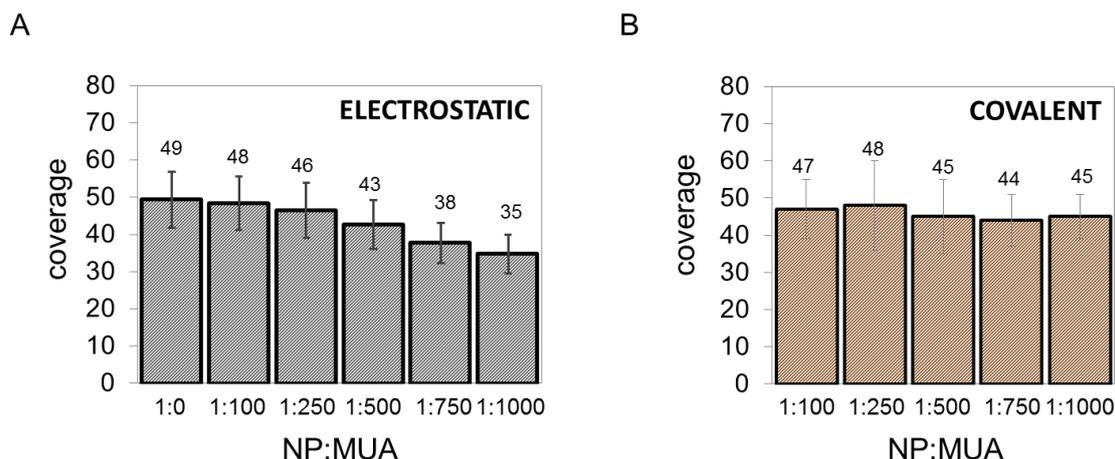


Figure 2.22. NPs coverage: A) Electrostatic and B) covalent linkage.

We have estimated between 20 and 21 monomer proteins (10 full protein dimers) per Au NPs as the maximum theoretical surface coverage for 9.6 nm Au NPs (Figure 2.23-A), using crystallographic overall size of *VuFeSOD* (Munoz et al. 2003). Depending of the protein arrangement, the theoretical number of protein could be duplicated to 40 proteins (20 dimers) per Au NPs if one of the monomer binds to the NPs and the other no (Figure 2.23-B). But it remains below the values obtained. The third possibility would be something intermediate between A and B.

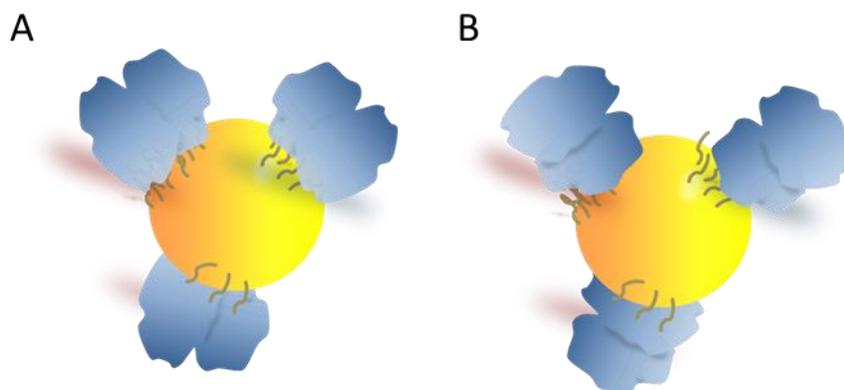


Figure 2.23. Different conformations of conjugates.

However, it is important to note that we have calculated the concentration of *rVuFeSOD* as a function of BSA calibration curve, so these numbers probably are not the real coverage, but an estimate. Thus, NP surface chemistry was found to influence the coverage only when protein was conjugated by physical adsorption.

2.3.3.4. Size and stability of conjugated *rVuFeSOD* – Au NPs

We also checked the size of the conjugates with DLS. We measured the size of the protein, and nanoparticle before and after conjugation. For physical adsorption, the size of the

conjugates decreased as we had more carboxyl group on the NPs surface, agree with the gel electrophoresis and coverage. For covalent binding, the sizes slightly decreased with the number of carboxyl groups on the NPs surface. All results presented a monolayer of protein lower than protein dimer size (7.8 nm) indicating that our conjugates form a monolayer and not a multilayer. This result also agrees with the gel-electrophoresis and coverage results.

Conjugated stability was monitored through absorption measurements of the particle. Absorption spectra for all conjugates showed that the LSPR peak underwent red shifts between 7 and 4 nm, accompanied by an increase of the intensity, indicating a proper bioconjugation. These results correlate with the DLS measurements.

Table 2.1. LSPR shift (nm) and protein layer thickness por Au NPs-VuFeSOD conjugates (physical adsorption and covalent linkage).

NP : MUA	$\Delta \lambda_{\text{LSPR}}$ (nm)		Protein layer thickness (DLS, intensity nm)	
	physical adsorption	covalent	physical adsorption	covalent
1:0	7.0	--	6.1	--
1:100	6.8	7.2	5.4	5.6
1:250	6.5	7.1	4.7	6.0
1:500	5.6	7.2	4.3	4.8
1:750	5.0	7.0	3.5	4.7
1:1,000	4.3	6.0	3.1	4.9
rVuFeSOD (dimer size)			7.8 nm	

2.3.3.5. Enzymatic activity

To understand how these structural changes impact function, enzymatic activity of rVuFeSOD on the different NPs was measured. SOD activity can be measured by both activity gels and activity assays in solution.

First, activity gel was measured. Conjugates SOD activity was performed as described in Beauchamp and Fridovich (1971) but with a small modification. Agarose gel was used to separate the NPs-protein conjugates (Figure 2.24).

In the physical adsorption, a gel activity decrease was observed as we increased the MUA concentration on the surface. Apparently, this could be related to the decrease of the coverage observed in the previous sections, so would indicate that the $-\text{COOH}$ groups did not affect the activity of the protein (Figure 2.24-A).

However, MUA caused a clear reduction of rVuFeSOD activity onto Au NPs with covalent attachment (Figure 2.24-B). We have observed before that MUA did not affect

coverage, so this result shows that the high concentration of MUA on the surface damages the protein activity.

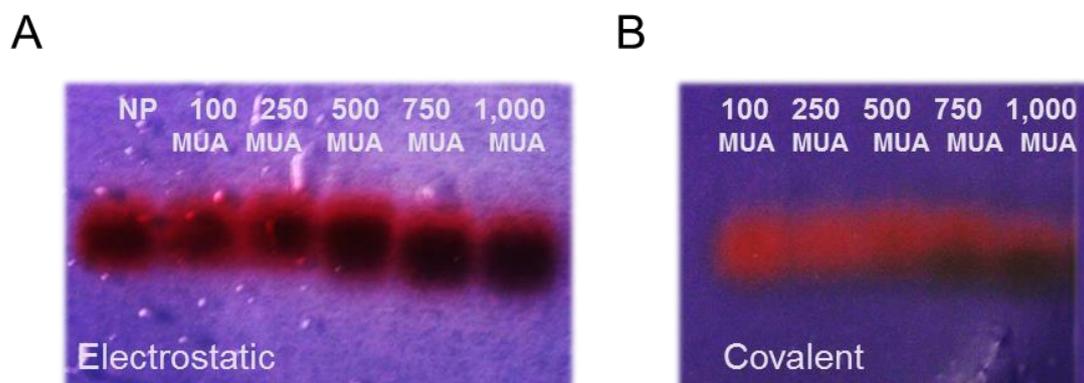


Figure 2.24: *VuFesOD* activity gel: Enzyme activity for the electrostatic or covalent conjugates for different MUA coverage as indicated.

Secondly, activity assay in the solution method was measured. Xanthine-XOD was used to generate superoxide anions and NBT reduction was used as an indicator of superoxide anions production. SOD competes with NBT for superoxide anions, thus the percentage of inhibition of NBT reduction is a measure of the amount of SOD actively present. NBT reduction product formation was monitored by absorption at 560 nm and the initial rate of the reaction determined.

For electrostatic interaction, the active protein (%) for *rVuFeSOD* on all the NPs was in the range of 30-40%, indicating that *rVuFeSOD* activity was compromised when bound to NPs. The activity measurements showed that modifying citrate stabilized-NPs with MUA did not importantly influence *rVuFeSOD* enzymatic activity, although the coverage was affected. This could be due to the MUA has not effect on enzymatic activity of the protein, only on coverage, and consequently the coverage do no have effect on the activity.

Table 2.2. *The coverage, the percentage of active protein and the number of active proteins on the NPs for physical adsorption and covalent linkage.*

<i>electrostatic</i>				<i>covalent</i>			
<i>NPs:MUA</i>	<i>Coverage</i>	<i>% Actives</i>	<i># of active proteins</i>	<i>NPs:MUA</i>	<i>Coverage</i>	<i>% Actives</i>	<i># of active proteins</i>
1:0	49	31	16	1:0	--	--	--
1:100	48	37	18	1:100	47	31	15
1:250	47	31	15	1:250	48	27	13
1:500	43	31	13	1:500	45	25	11
1:750	38	36	14	1:750	44	21	9
1:1000	35	38	13	1:1000	45	9	4

On the basis of the rVuFeSOD activity, and the fact that the retained activity is quite low, we tried to explain the protein behavior based on the interaction between the two monomers of the protein and the amino acid that could be interacting with the NPs.

It has been observed in *Escherichia coli* MnSOD that the disruption of the interaction between Tyr202 from one monomer with the neighboring monomer, His47, reduces the SOD activity to 30% to 40% (Edwards et al. 2001). In our case, the activity reduction is between 60-70%, indicating that probably this kind of disruption is taking place. Also, rVuFeSOD has only one Cys108 in each monomer. It is not on the surface of the protein but relatively close to it (Figure 2.25), so it could potentially bind to the nanoparticles, destabilizing protein 3D structure, similar to what has been observed for yeast cytochrome *c* (*Saccharomyces cerevisiae*) (Aubin-Tam and Hamad-Schifferli 2005). It is important to note, that the cysteine is not between the interface of two protein and neither near the active center (the Iron-Cys distance is 12,93 Å), but quite near from His102, which is one of the four catalytic residues. Moreover, the cys connect a loop with an alpha helix (Figure 2.25) and is near of two Lisines(-NH₂) Lys 110 and Lys 226, which may interact with the carboxyl groups of the surface. Thus, it may be that the thiol from one monomer of rVuFeSOD links to the NPs, forcing to unfold this monomer and distort the dimer (Figure 2.23-B). In this situation the protein involved may well lose an important part of its activity. It is worth noting that it has been indicated for FeSODs that they seem to have a cooperativity mechanism between the two monomers. Indeed, in nature FeSODs, and also MnSOD, are always found as dimers, or tetramers, but in the later case they behave as a pair of dimers (Muñoz et al., 2015). Considering that something similar to Ec_MnSOD is taking place in our samples, the remaining activity of our complex could be between 30-35 %, which strengthens the hypothesis that the protein arrangement on the NPs is that one in which only one of the monomers is linked to the NPs. In addition the monolayer formed by the protein at its maximum coverage (DLS, 7.0 nm) is very close to the 7.8 nm of the protein diameter, contributing to this hypothesis.

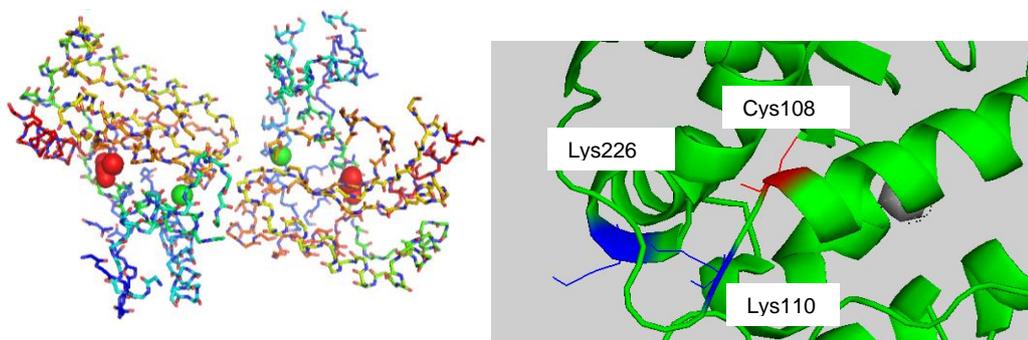


Figure 2.25. VuFeSOD dimer crystal structure: 3-D model for the monomer of the eukaryotic FeSOD from cowpea nodule cytosol, based on X-Ray crystallography of FeSOD crystals. Up) Iron atom can be seen as green circle and cysteine in red. The distance between the two Fe atoms is 18.01 Å and between the Fe atom and Cys from the same monomer 12.93 Å. Down) Dimer surface, in red Cys.

Nevertheless, the active protein for *rVuFeSOD* on all the covalently bound NPs was lower than 31%, indicating that *rVuFeSOD* activity was also compromised when bound to NPs. Changing the NP surface chemistry varied the percentage of active protein. Generally, active protein for *rVuFeSOD* decreased when MUA concentration increased on the surface. The 1:100 NP:MUA had 31 % of active protein, 1:250 NP:MUA 27%, 1:500 NP:MUA 25%, 1:750 NP:MUA 21% and 1:1,000 NP:MUA decreased down to 9%. The activity measurements showed that MUA concentration on the surface was accompanied by a loss in activity upon NPs conjugation. Although the coverage was very similar in all conjugates, the impact of MUA on covalent bound is very important. This suggests that increasing the probability of covalent linkage with highest MUA concentration reduces the stability of the *VuFeSOD* protein dimer. The coverage was very similar in all samples but the monolayer size measured by DLS decreased slightly with MUA, suggesting that the surface cause the protein to change conformation. This conformational change will have a direct impact on the activity.

2.4. CONCLUSION

In this chapter, a recombinant iron-superoxide dismutase from cowpea (rVuFeSOD - *Vigna unguiculata*) was conjugated to 9.6 nm Au NPs covalently and by physical adsorption, using 11-mercaptopundecanoic acid as a ligand. We have overexpressed rVuFeSOD and purified it to homogeneity in high yields using self-induction over expression system. We have also synthesized 9.6 nm Au NPs with a high degree of control and we have modified surface chemistry very easily.

Interactions with NPs can significantly alter the coverage and function of rVuFeSOD. The NPs is generally a strongly perturbing agent for the rVuFeSOD, and interactions between the protein and the NPs and, NPs ligand result in inactivation of the protein activity.

Different bioconjugation strategies produce different effects in the interaction between rVuFeSOD and NPs. For physical adsorption the impact of MUA concentration on the surface was more important on coverage than in activity. The MUA ligand acted more as a steric barrier that was also enhanced by the electrostatic repulsion, producing a reduction on coverage. However, MUA did not almost affect the activity, indicating that the strongly perturbing agent is the NPs itself. This result is very interesting for applications in electrochemical biosensor, because MUA does not affect the activity, and has also been shown to promote the transfer of electrons to the electrode. Evaluation of functional properties of the conjugate indicated that upon conjugation, protein retained around 35% of its activity.

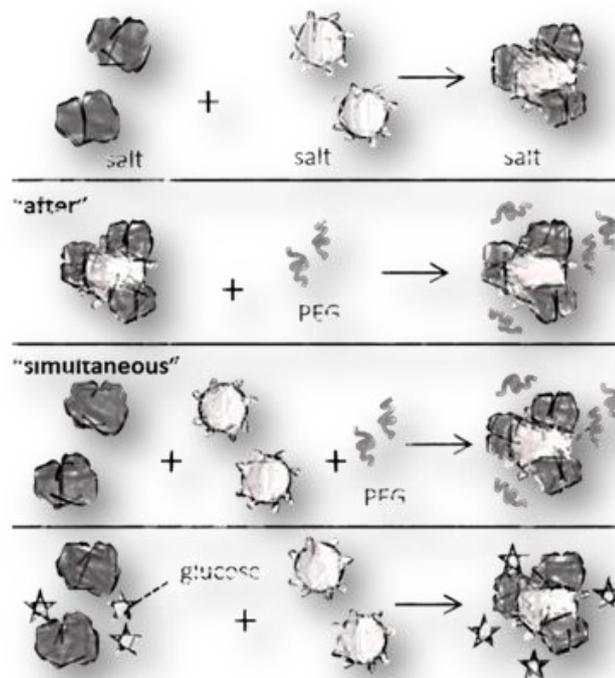
It is likely that the free Cys in rVuFeSOD has an affinity for the NPs surface when is conjugated by physical adsorption, and formation of the thiol-Au bond either causes or accompanies rVuFeSOD unfolding.

For covalent attachment however, the opposite effect was observed. The impact of MUA concentration is more important in activity than on coverage. As the concentration of MUA increase on the surface the inactivation of the protein is higher; protein can lose the 90% of its activity. This suggests that the covalent linkage destabilize the protein more than physical adsorption, probably due to an excess attachment points to the surface.

Thus, the binding method, either physical adsorption or covalent linkage can help to improve or worse the activity. For this particular NBH system (Au NPs-rVuFeSOD) although covalent attachment of proteins to NPs should provided conjugates that are stable toward dissociation, in general have been less active. For this particular system, physical adsorption has resulted in a better strategy but more optimization is needed. These strategies can be useful for applications which require tethering the rVuFeSOD and other enzymes to a surface.

CAPÍTULO 3

Engineering the Interface between the Glucose Oxidase and the Nanoparticles



3.1. INTRODUCTION

In this chapter we investigate the behavior of GOx on Au NPs, which were chosen as model nanoscale surfaces, as we did in the chapter 2. In this case, only physical adsorption was explored. We characterized both the enzymatic activity and the secondary structure of GOx on the NPs to allow correlation to surface properties. We systematically changed NP surface chemistry, protein microenvironment, and protein additives to help with folding (Figure 3.1). In addition, we examined the properties of GOx after it was displaced from the NP.

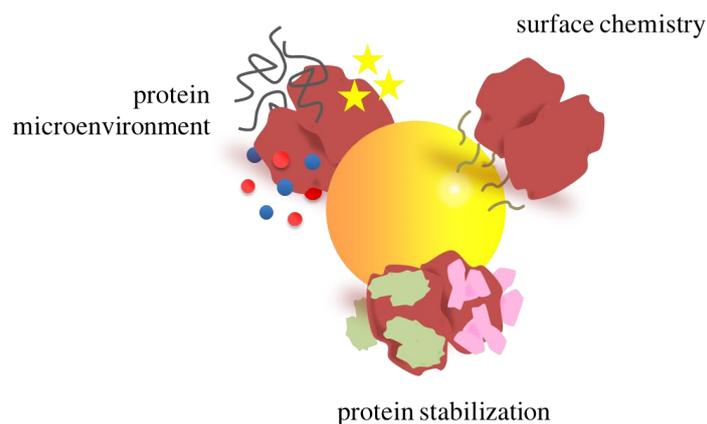


Figure 3.1. Schematic of the three strategies explored: (1) Surface Chemistry: Au NPs surface modification with different surface coating ligands, (2) Protein Stabilization: gold nanoparticle-GOx complex stabilization by addition of proteins, and (3) Protein Microenvironment: addition of small molecules to alter the protein microenvironment.

3.1.1. GLUCOSE OXIDASE

Glucose oxidase (GOx) is a flavoprotein which catalyzes the oxidation of β -D-glucose by molecular oxygen to δ -gluconolactone and hydrogen peroxide. GOx is one of the most important enzymes used for many applications (Wilson and Turner 1992). It is relatively easy to obtain, cheap, and can resist greater extremes of pH, ionic strength, and temperature than many other enzymes (Bankar et al. 2009).

It has been widely used in a diverse range of commercial applications. Due to its ability to convert glucose into δ -gluconolactone, it has been used to detect glucose in sensors for diabetics (Newman and Turner 2005; Miranda, Creran, and Rotello 2010; Miranda et al. 2010), fermentations (Vodopivec et al. 2000), and soft drinks (Chudobová et al. 1996). Clark & Lyons described in 1962 the first specific glucose electrode based on glucose oxidase (Clark and Lyons 1962).

GOx is present in honey where it acts as a natural food preservative because it converts O_2 to H_2O_2 , which is antibacterial. Thus, it has been adopted by the food industry for food preservation (Rasiah et al. 2005; Fogarty and Kelly 2012), and by chemical industry for oral care products (Afseth and Rølla 1983). Furthermore, because GOx activity involves electron transfer, it has been attractive for biofuel cells (Cooney et al. 2008; Ramanavicius et al. 2015) which can

potentially utilize glucose and oxygen as a fuel as both can be found in body fluids (Otsuka et al. 2004; Ivnitski et al. 2006; Rauf et al. 2006; Bankar et al. 2009).

For many of these applications GOx needs to be immobilized onto a substrate, either for direct electrical connection in biosensing and biofuel cells (Ren et al. 2005; Neto et al. 2015), or for increasing surface area, which would enable efficient scale-up. These surfaces have been chemically and physically diverse, including carbon electrodes, cellulose, flat or structured metal surfaces, or polymer and glass matrices. In particular, nanoparticles (NPs) have been attractive due to their high surface to volume ratios and due to their versatility.

Unfortunately, making functional interfaces between proteins and surfaces presents significant challenges (Nel et al. 2009). Protein structure and function are both strongly influenced by the NP surface chemistry, which can be highly variable (Gagner et al. 2011b). How surface properties affect immobilized enzymes is incredibly complex (Bickerstaff 1997; Keighron and Keating 2010), and often the numerous non-covalent interactions between the surface and the protein results in irreversible denaturation and loss of function. This is particularly crucial for electrochemical applications, as electron transfer is highly dependent on the distance between the protein and the substrate, and even the protein orientation can influence electron transfer efficiencies (Ivnitski et al. 2006; Xiao et al. 2003). Generally, these surface and interface effects worsen for NP and nanostructured surfaces, where curvature, the inhomogeneous nature of the surface, and the chemical passivation all contribute significantly to enzyme destabilization, unfolding, and loss of function (Vertegel, Siegel, and Dordick 2004; Aubin-Tam and Hamad-Schifferli 2008).

Making functional and optimized interfaces to proteins has been hindered by the fact that there are no good direct experimental probes, so the understanding of the NP-protein interface is still limited. Some devices have been able to improve electron transfer rates using matrices and different nanomaterials (Shan et al. 2009). Occasionally the surface can unexpectedly improve enzyme folding and activity (Asuri et al. 2007), as it has been observed for GOx confined to microscale channels (G. Wang and Yau 2007). However, a consistently successful approach has yet to be discovered. This has been due to the fact that we still have little control over the interface. There are few studies that try to correlate how surface properties affect GOx structure and subsequently how this impacts activity. Often, the robustness of the enzyme is gauged by cyclic voltammetry, which yields only indirect information about activity. Consequently, there are no good general strategies or design rules for surface parameters that optimize GOx structure and activity. Therefore, there is a need to understand how the interface affects protein structure and function of GOx. Such information would enable strategic design of the interface to optimize both structure and function, thus improving GOx activity for biosensors, food preservation, and the numerous other applications where GOx is used.

3.2. MATERIALS AND METHODS

3.2.1. CHEMICALS AND BIOLOGICAL MATERIAL

All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich or Strem Chemicals Inc (USA). Glucose oxidase Type X-S (GOx) was purchased in powder form and stored at -20°C . The buffer used with the protein contained 10 mM sodium phosphate was adjusted to pH 7.4. The buffer used with salt contained either additional 25 mM NaCl, 100 mM NaCl, 150 mM NaCl or 100 mM K_2SO_4 . Polyethylene glycol (PEG) in solution was added to the buffer used at concentrations of 0.1% or 1% (w/v). Water used throughout this study was purified by a MilliQ purification system (Millipore).

3.2.2. METHODS

3.2.2.1. Gold nanoparticles synthesis (Au NPs)

The nanoparticles were synthesized following the protocol of CHAPTER 2, Materials and Methods Gold nanoparticles synthesis (Au NPs), page 63.

3.2.2.2. Surface modification of Au NPs

The surfaces of the NPs were modified with different ligands (negative, neutral and zwitterionic). Citrate stabilized-NPs (NP-citrate) were divided in two batches. Small amounts of the negatively charged ligand bis(p-sulfonatophenyl) phenylphosphine dihydrate dipotassium salt (BPS) was added to one batch and mildly stirred overnight. Each batch was divided into three aliquots. The first one was retained. The second was incubated with the neutral polymer methoxypolyethylene glycol thiol (mPEG-SH; MW = 356.5), and the third with L-cysteine, a zwitterion. The incubation ratio for m-PEG-SH and L-cysteine was 1:300. mPEG-SH and L-cysteine both contain a thiol group which facilitates a covalent bond to Au on the NP, while the P in BPS forms a dipolar bond with Au. On the whole, six different samples were utilized: NP-citrate; NP-citrate-PEG; NP-citrate-Cys; NP-BPS; NP-BPS-PEG; NP-BPS-Cys (Figure 3.2).

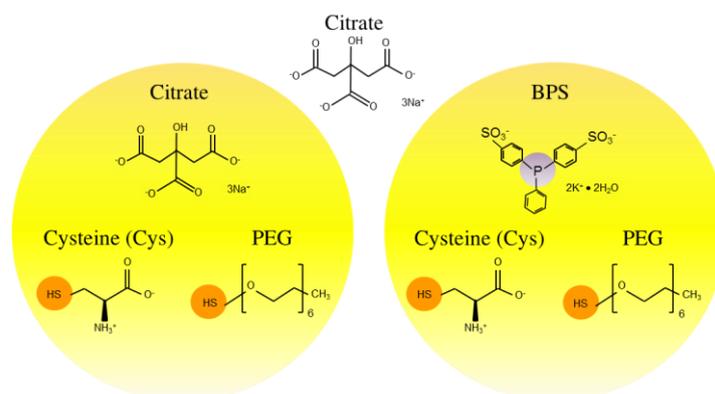


Figure 3.2. Nanoparticle surface chemistry. The surfaces of the citrate stabilize NPs were modified with 3 ligands (1) BPS (negative charge), (2) PEG (neutral charge) and L-Cysteine (zwitterionic) to obtain 6 different samples: NP-citrate; NP-citrate-PEG; NP-citrate-Cys; NP-BPS; NP-BPS-PEG; and NP-BPS-Cys.

Gel electrophoresis was used to assay the surface chemistry. Agarose gel electrophoresis (2%) was performed in 0.5x TBE at $E = 80 \text{ mA/cm}$ for 60 min.

3.2.2.3. Conjugation of GOx to Au NPs

NP-GOx conjugation was achieved by incubating the GOx with the NPs in solution at room temperature for 1 h. Before incubation, GOx was kept in 10 mM NaP pH 7.4 for 1 h at 4°C. The incubation ratio was 1:500 NPs:GOx, which was chosen because it resulted in significant mobility shifts in gel electrophoresis (3.3.2. Engineering the NP surface chemistry, Figure 3.14, line 5). This ratio most likely represents a large excess of protein, so it helps to ensure the conjugation. In addition, the narrow band indicated a uniform charge distribution and functionalization. NPs-GOx were purified by centrifugation at 4°C.

3.2.2.4. Displacement of GOx from Au NPs

The GOx was displaced from the NPs using overnight incubation in mercaptohexanol 1 mM (MCH) at 4°C, a strategy that has been utilized for quantification of thiolated DNA on NP surfaces (Sunho Park, Brown, and Hamad-Schifferli 2004). MCH has greater affinity to Au NPs than the protein and thus displaces GOx from the surface upon binding via Au-S bonding. Changes in color and aggregation of the NPs occurred, which indicated the exchange of GOx for MCH (Figure 3.3). After incubation, the sample was centrifuged and the supernatant was collected for further measurements of protein concentration, activity and secondary structure.

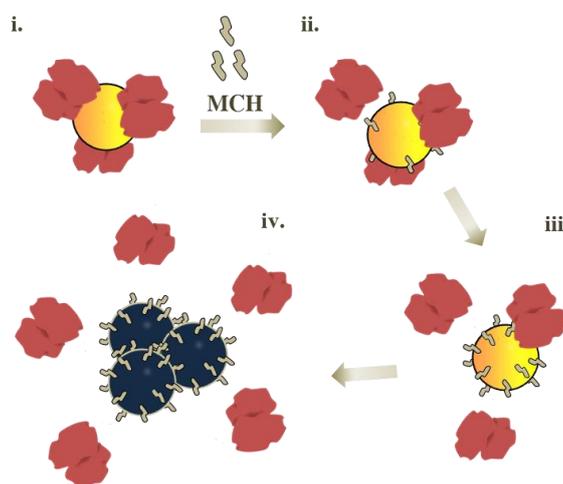


Figure 3.3. Schematic illustrations of GOx displacement from the NPs. GOx were displaced from the NP by mercaptohexanol (MCH). i. Purified Au NP-GOx conjugate are incubated with MCH overnight. ii-iv. MCH has greater affinity to Au NPs than the protein and thus displaces GOx from the surface. iv. Changes in color and aggregation of the NPs occur, which indicate the exchange of GOx for MCH.

The evidence for successful displacement of the GOx from the NP by MCH was the color change of the solution from red to blue, due to aggregation of the NPs because the GOx is no longer on the surface to help stabilizing it. However, it is important to note that MCH displacement may not necessarily completely displace all the GOx.

3.2.2.5. Fluorescence spectroscopy

Fluorescence due to aminoacids tryptophan, tyrosine, and phenylalanine (Trp, Tyr, and Phe, respectively), and due to FAD were recorded on GOx with a Fluoromax spectrofluorometer. All the fluorescence spectra were measured with 10 mm path length cell and the excitation and emission slits were set at 8 nm each.

The intrinsic (emission) fluorescence spectrum of Trp was obtained by exciting at 290 nm, and the emission spectra was recorded from 310 to 440 nm. For FAD fluorescence, excitation wavelength was set at 467 nm and the emission was recorded from 490 to 750 nm (Figure 3.4).

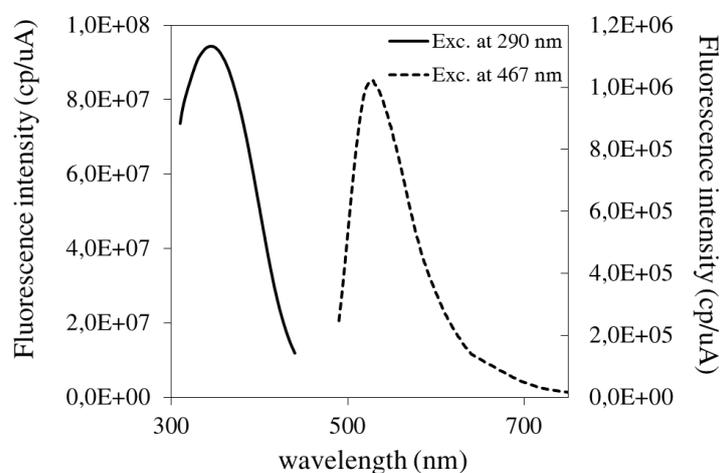


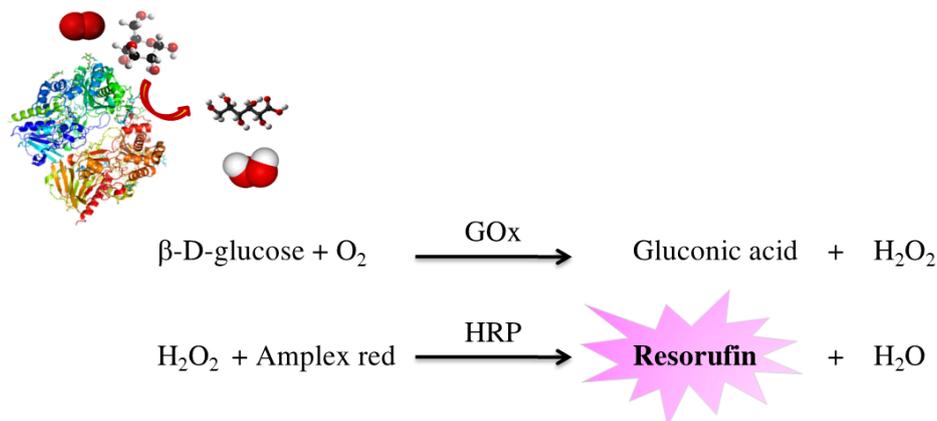
Figure 3.4. Intrinsic emission fluorescence spectra of GOx. GOx fluorescence intensity is plotted as a function of wavelength. GOx presents two groups of fluorescence species, the aromatic residues (Trp, Tyr and Phe) and the cofactor FAD. Both of them exhibit fluorescence emission when are excited in the wavelength range of their excitation/absorption spectra. The aromatic residues emission spectrum when the GOx is excited at 290 nm (– Solid line) and FAD emission spectrum when the GOx is excited at 467 nm (-- dot line) are depicted.

Nanoparticle protein coverage and folding on the NPs were quantified by fluorescence. GOx was displaced by MCH from the NPs. The number of GOx per NP was obtained from the ratio between protein Trp fluorescence on the supernatant solution and the initial NP concentration. MCH displacement may not necessarily completely displace all the GOx, so these numbers are lower limits for coverages. Protein folding was probed by measuring the shift of the maximum emission peak of Trp fluorescence (λ_{max}) and the changes in the FAD intensity fluorescence.

3.2.2.6. Activity of GOx

When GOx is active, it converts glucose in present of O_2 to make gluconic acid and H_2O_2 . The enzymatic activity of GOx was quantified by a standard assay, which is the

conversion of 0.05 mM Amplex Red to resorufin by the enzyme peroxidase (0.1 Unit/mL) in the presence of H_2O_2 (glucose: H_2O_2 ratio of 1:1).



The kinetics measurements of wild type, Au NP-conjugated, and MCH-displaced GOx were carried out at 25 °C in a Thermo-Electron plate reader; data were collected over 30 minutes in triplicate experiments each time. The assay was performed spectrophotometrically and the production of the colorimetric product resorufin was monitored by absorption at 571 nm ($\epsilon=54,000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$). The activity were measured at substrate concentration of $[\text{D-glucose}] = 0\text{-}50 \text{ mM}$ and at enzyme concentration $[\text{GOx}] = 5 \times 10^{-9}\text{-}5 \times 10^{-8} \text{ M}$. K_M and k_{cat}/K_M were calculated using Lineweaver-Burk and Eadie-Hofstee diagrams and only the data that matched were used (Figure 3.5).

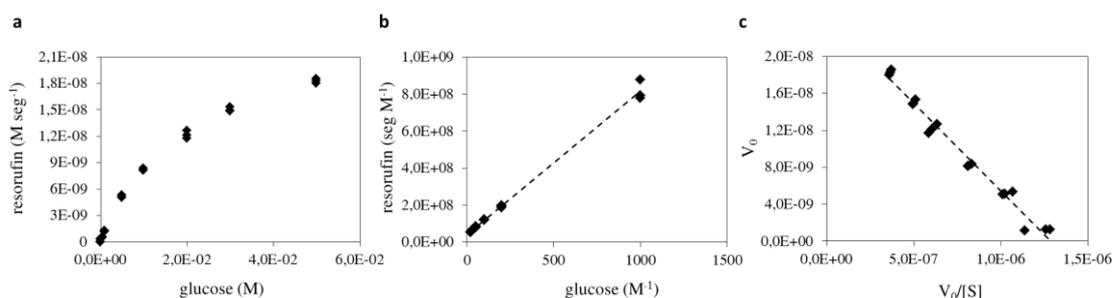


Figure 3.5. Kinetics measurement: In this figure, the kinetics measurements for NP-BPS-GOx are presented as an example. K_M and k_{cat}/K_M were calculated using Lineweaver-Burk and Eadie-Hofstee diagrams and only the data that matched the linear fit were used. a) Initial velocity of the glucose oxidase activity on the nanoparticle, b) Lineweaver-Burk double reciprocal plot, and c) Eadie-Hofstee diagram.

Data from different syntheses and experimental replicates were collected to calculate the average. The data obtained from this study were analyzed by the SPSS program PAWS Statistics (v.19.0). The mean was used as a measure of central tendency and the standard error (SE) as a measure of dispersion. Statistical calculations were performed using unifactorial analysis of variance (ANOVA). In order to confirm homoscedasticity of variances, the Levene test was used. The DMS and Dunnett T3 post hoc statistical tests were applied to the homogeneity and non-homogeneity of variances cases, respectively. In all cases, statistical analyses were conducted at a significance level of 5% ($P \leq 0.05$).

3.2.2.7. Circular Dichroism spectroscopy

Secondary structure of the GOx both on and off the NP was probed by circular dichroism (CD) spectroscopy. CD measurements were carried out at 25 °C on an Aviv Model 202 using a 1 mm path-length quartz cuvette. The CD signal was recorded between 260 and 190 nm, with a digital integration time of 3-5 s /data point and reported data were averaged over 15-20 accumulations. The results are expressed as the mean residual molar ellipticity $[\Theta]$, which is defined as:

$$[\Theta] = \frac{100 \times \Theta}{c \times l} \quad \text{equation 3.1}$$

where Θ is the observed ellipticity in degrees, c is the concentration in moles of residue per liter, and l is the length of the light path in centimeters. The CD spectra were measured at enzyme concentration of $[\text{GOx}] = 2 \times 10^{-7} - 7.5 \times 10^{-7}$ M. The values that were obtained were normalized by subtracting the baseline.

3.3. RESULTS

3.3.1. GLUCOSE OXIDASE CHARACTERIZATION

GOx (β -D-glucose:oxygen 1-oxireductase, EC 1.1.3.4) was discovered in 1928 by Müller in extracts of *Aspergillus niger*. The enzyme has been purified from both *Aspergillus* (Pazur and Kleppe 1964; Swoboda and Massey 1965) and *Penicillium* species (Kusai et al. 1960). Here we utilized GOx from *Aspergillus niger* (UnitProtKB accession number P13006) (Hecht, Kalisz, et al. 1993).

GOx is a homodimeric glycoprotein with one, tight, non-covalently bound, flavine adenine dinucleotide (FAD) cofactor per monomer. The dimer molecular weight is 160 kDa and the isoelectric point is 4.2. GOx is a highly glycosylated protein, the carbohydrate content accounts for about 16 % (w/w) of its molecular weight.

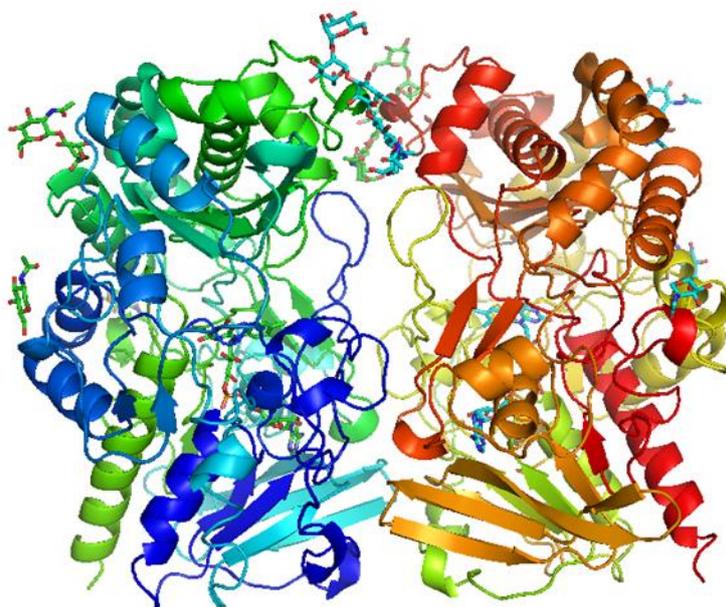


Figure 3.6. Glucosa Oxidase. 3-D model for the dimer of the GOx from *Aspergillus Niger* based on X-Ray crystallography (UnitProtKB accession number P13006).

The GOx monomer has 583 amino acid residues, 17 α -helices and 30 β -strand structures, and consist of two separate structural domains: d1cf3a1 (AA: 3-324 and AA: 521-583) and d1cf3a2 (AA: 325-520). Its overall size is $\sim 6.0 \times 5.2 \times 3.7$ nm (Zhong and Zewail 2001).

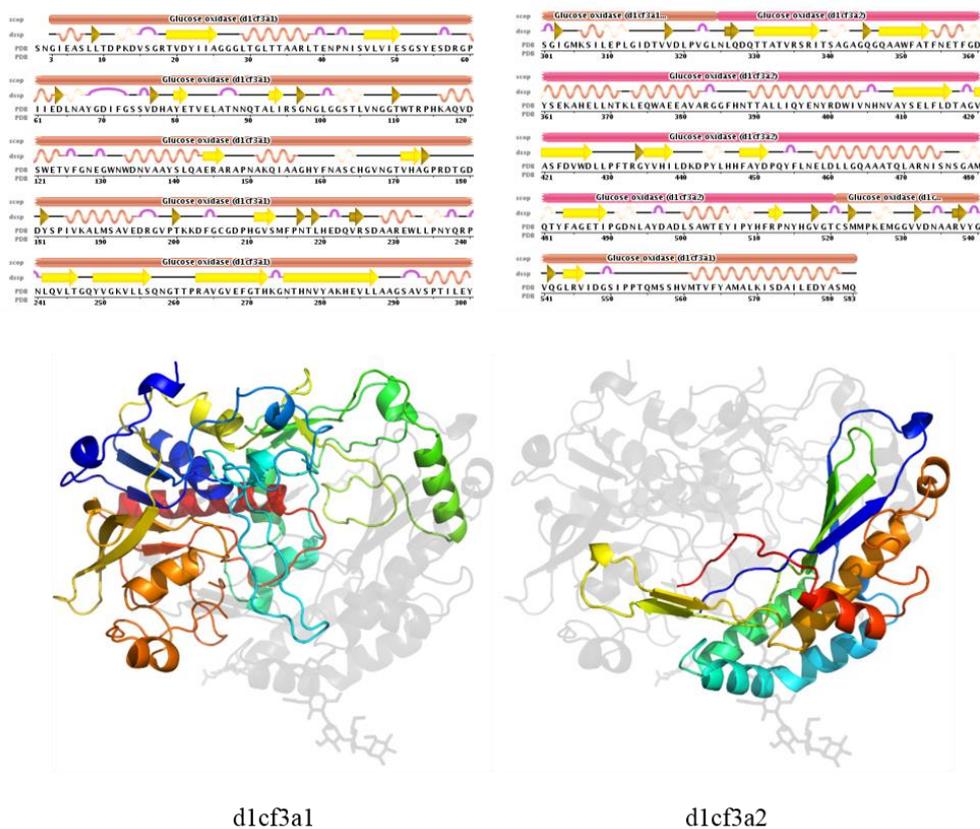


Figure 3.7. GOx monomer. GOx amino acid sequence and 3-D model of the two separate structural domains of the GOx monomer: d1cf3a1 and d1cf3a2.

The FAD cofactor is situated in the first domain, which consists of two beta sheets and three alpha helices, and occupies a narrow channel outlined by 31 residues actions with a covering lid formed by residues 75-98. The active site for catalysis is a large deep pocket, shaped like a funnel and formed on one side by the lid from both subunits of the dimer (Zhong and Zewail 2001).

FAD - flavine adenine dinucleotide -

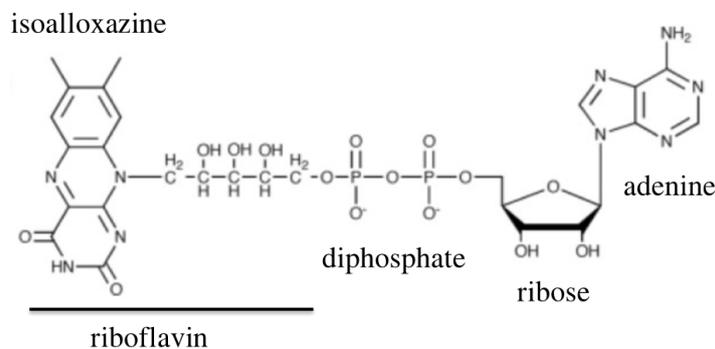


Figure 3.8. Chemical structure of FAD.

The mechanism of action of GOx has been analyzed in some details (Gibson, Swoboda, and Massey 1964; Bright and Appleby 1969). GOx catalyzes the oxidation of β -D-glucose to δ -gluconolactone, which subsequently hydrolyzes spontaneously to gluconic acid, and hydrogen peroxide. FAD works as the initial electron acceptor and is reduced to FADH₂ then is oxidized by the final electron acceptor, molecular oxygen (O₂). O₂ is then reduced to hydrogen peroxide (H₂O₂).

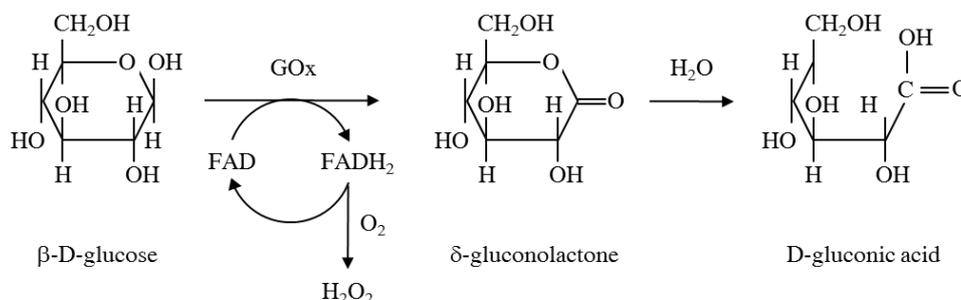


Figure 3.9. GOx reaction: oxidation of β -D-glucose to δ -gluconolactone.

GOx monomer has 3 Cys, two of which form a disulfide bond (Cys164 and Cys206). The remaining Cys, Cys521, is not a disulfide but on a loop. It is not on the surface of the protein but relatively close to it. All cysteines could bind directly to gold.

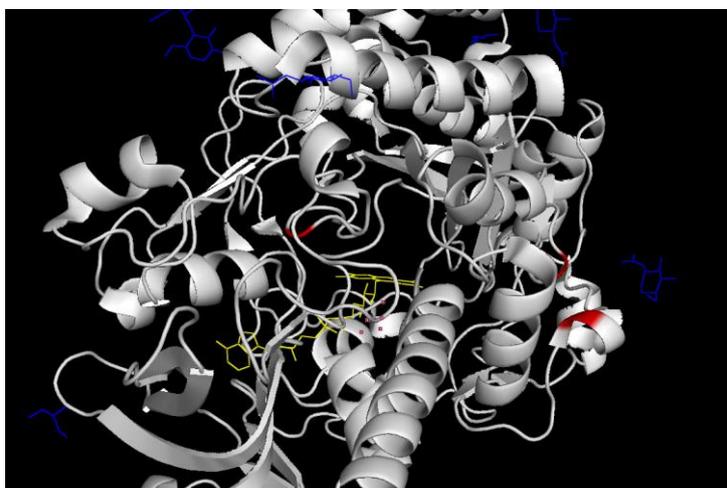


Figure 3.10. 3D model for the monomer of the GOx. In this figure, the cofactor FAD (yellow), the Cysteine aminoacids (red) and carbohydrates (blue) are illustrated.

GOx was a pale yellow powder which dissolved freely in buffer to give a bright yellow solution. The absorption curve of a solution of GOx in 10 mM phosphate buffer pH 7.4 was determined (Figure 3.11 black line) using a spectrophotometer. A typical flavine type of absorption spectrum was obtained with maxima at 377 nm and 452 nm. The addition of glucose to the solution gave rise to the autoxidizable leuco form of the enzyme which was practically colourless (Figure 3.11 dotted line). The absorption band of FAD, with a peak at 452 nm, is assigned to the π - π transition of the isoalloxazine moiety of FAD.

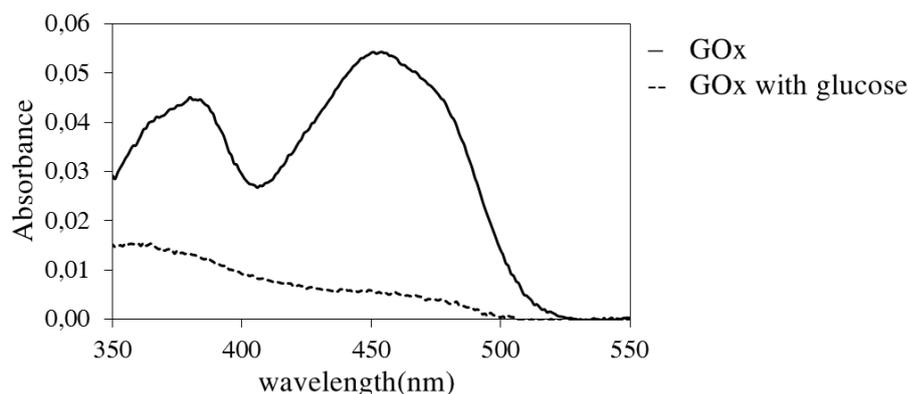


Figure 3.11. GOx absorption spectra. Absorbance spectra of GOx absorbance at 25°C. (- Solid line) represents oxidized GOx and reduced GOx with glucose (-- Dotted line). The spectra were obtained in 10 mM phosphate buffer pH 7.4.

GOx has two fluorescent species, the aromatic residues (Trp, Tyr and Phe) and the cofactor FAD. Both of them exhibit fluorescence emission when are excited in the wavelength range of their absorption spectra. GOx contains 10 Trp, 26 Tyr, 17 Phe, and 2 FAD prosthetic group. The fluorescence with a peak in the range of 300-400 nm comes from aromatic residues and the fluorescence with a peak in the region of 500–600 nm comes from the FAD's isoalloxazine moiety (Figure 3.4) (Islam et al. 2013). In proteins that contain all three aromatic amino acids, the emitted fluorescence is usually dominated by the contribution of Trp residues, because both the wavelength of excitation and the quantum yield are considerably greater than the corresponding values for Tyr and Phe. Therefore we will say Trp fluorescence instead of aromatic residues fluorescence.

In order to characterize GOx by fluorescence, we first measured the fluorescence intensity of the two species as a function of the concentration in order to obtain a calibration curve. Second, we denatured the protein with temperature. Trp, Phe and Tyr, measured as total Trp fluorescence, and FAD fluorescence were measured.

Free protein fluorescence showed that Trp intensity at 342 nm was relatively flat until about 60°C (Figure 3.12 a), when GOx inactivates ($T_{50} = 62^{\circ}\text{C}$), indicating that Trp intensity was suitable for determining concentration for moderately unfolded proteins from the calibration curve. These results are in agreement with others, which obtained a midpoint for thermal inactivation of residual activity and the dissociation of FAD of 59°C, and a corresponding midpoint for loss of secondary and tertiary structure of 62°C (Mudeppa Devaraja Gouda et al. 2003).

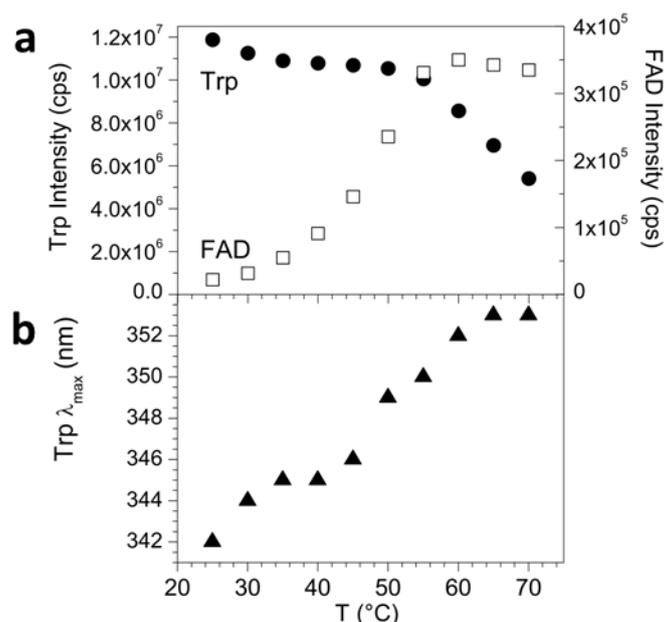


Figure 3.12. Thermal denaturation of glucose oxidase: a) Fluorescence intensity changes of Trp ($\lambda_{ex}=340$ nm) and FAD ($\lambda_{ex}=467$ nm) intensity vs. temperature. Trp fluorescence was relatively flat with temperature until about 60°C, and then decrease; FAD fluorescence increases sigmoidally in intensity with temperature. b) Aromatic residues fluorescence spectral shift, Trp λ_{max} vs. temperature. λ_{max} of Trp fluorescence for free GOx shifts with temperature in almost a linear fashion from shorter 342 nm wavelength to near 354 nm.

FAD fluorescence intensity ($\lambda_{ex} = 467$ nm, emission $\lambda_{max} = 525$ nm) is also temperature sensitive. FAD fluorescence is quenched by the aromatic residues Tyr515, Trp426, Tyr68, and Trp111, and increases when the protein is unfolded (Zhong and Zewail 2001). For extreme denaturation, FAD can become dissociated from the protein and exhibit even higher fluorescence (Jones, Manley, and Wilkinson 1982; O'Malley and Weaver 1972). Temperature dependence of FAD fluorescence was confirmed (Figure 3.12 a, open squares.), which increased sigmoidally in intensity with increasing temperature, and had a midpoint of $T_m \sim 50^\circ\text{C}$.

The emission maximum of aromatic residues shifted from shorter 342 nm wavelength to about 354 nm (Figure 3.12 b), which corresponds to the fluorescence maximum of tryptophan in aqueous solution. λ_{max} of Trp fluorescence for free GOx increased with temperature in almost a linear fashion over $T = 25^\circ\text{C} - 75^\circ\text{C}$, indicating that Trp λ_{max} can be used to monitor GOx unfolding.

3.3.2. ENGINEERING THE NP SURFACE CHEMISTRY

9.6 nm diameter NPs were synthesized. NP surfaces were modified with different surface coating ligands so that the effect of NP surface chemistry on GOx behavior could be studied (Figure 3.2). We started with either NP-citrate as a starting material, and then modified it with PEG-SH or L-Cysteine (Cys), which bind to the Au NP by the SH group. Because L-Cysteine presents both NH_3^+ and COO^- groups, it is a zwitterion. Zwitterionic ligands are known to minimize non-specific adsorption better than PEG and thus have been of interest for

antifouling (Estephan, Schlenoff, and Schlenoff 2011). Alternatively, the citrate ligand was replaced with BPS, which is known to better stabilize the NPs in buffer solutions and improve DNA and protein conjugation (Zanchet et al. 2001; S. Park, Brown, and Hamad-Schifferli 2004). NP-BPS was then modified with PEG-SH and Cys as described above. Therefore 6 different samples were prepared: NP-citrate; NP-citrate-PEG; NP-citrate-Cys; NP-BPS; NP-BPS-PEG; NP-BPS-Cys.

9.6 nm citrate stabilized-Au NPs were incubated with mPEG-SH at various ratios. After overnight incubation, the particles were purified by centrifugation. Then, Au NP-PEG were incubated with GOx 1 hour and purified by centrifugation. Gel electrophoresis showed mobility shift that varied with mPEG-SH incubation ratio. NPs mobility decreased with mPEG-SH, which could be due to an increase in size because of the larger mPEG-SH ligand and/or decrease in charge, as mPEG-SH is neutral (Figure 3.13 a, lines 1-5).

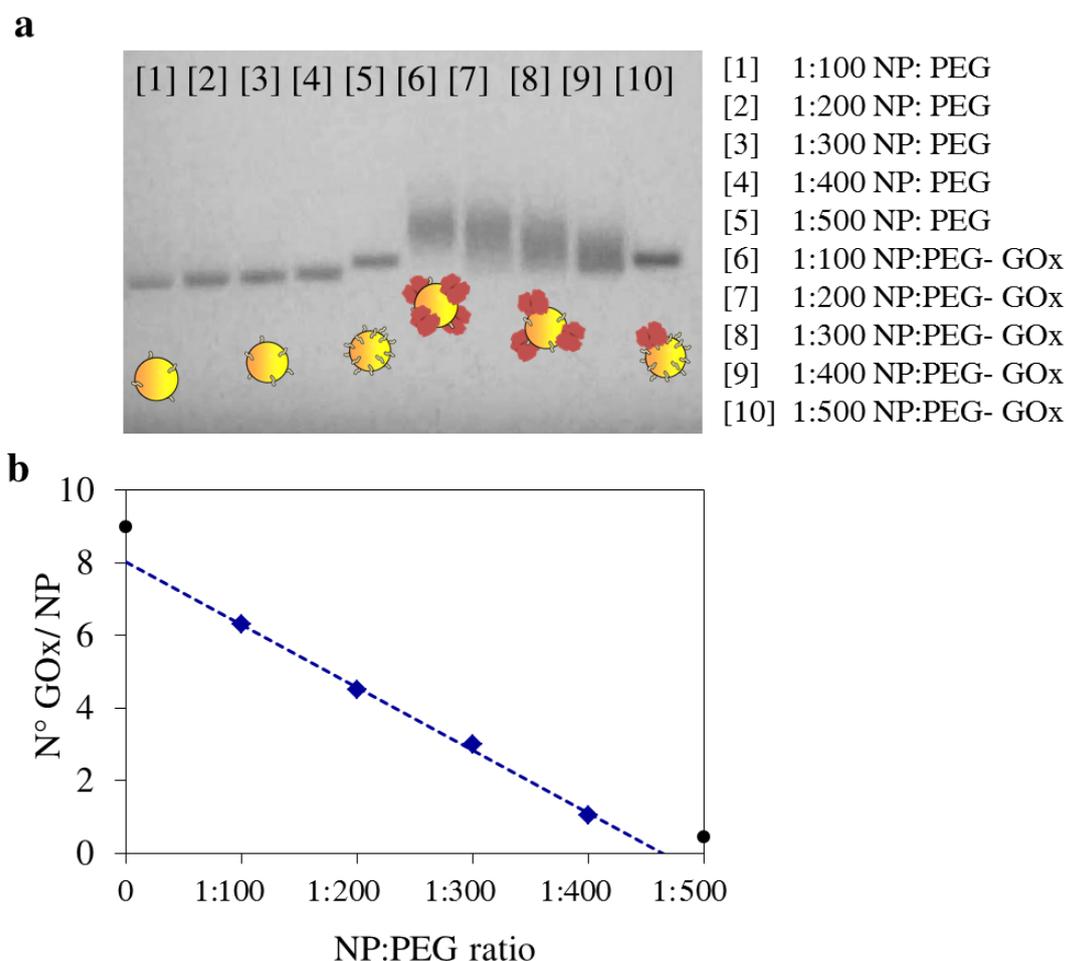


Figure 3.13. mPEG-SH stabilized gold nanoparticles. a) Gel electrophoresis of NP-PEG and NP-PEG-GOx. Lanes: 1) 1:100 NP-PEG ratio, 2) 1:200 NP-PEG ratio, 3) 1:300 NP-PEG ratio, 4) 1:400 NP-PEG ratio, 5) 1:500 NP-PEG ratio, 6) 1:100 NP-PEG-GOx, 7) 1:200 NP-PEG-GOx, 8) 1:300 NP-PEG-GOx, 9) 1:400 NP-PEG-GOx, 10) 1:500 NP-PEG-GOx; and b) nanoparticle coverage as a function of NP-PEG ratio. The coverage decreased in a linear fashion over 1:100 and 1:400 NP-PEG ratios.

Gel mobilities of the NP-PEG shifted also upon conjugation to GOx (Figure 3.13 a, lines 6-10). Au NPs-PEG-GOx conjugates had higher mobility as we increase mPEG-SH ratio, which could be due to the decrease in coverage. We calculated the coverage in each sample, and we observed that nanoparticles coverage decreased linearly with mPEG-SH (Figure 3.13 b). The narrow band of 1:500 NP:PEG-GOx ratio indicated a uniform charge distribution compare with other samples (Figure 3.13 a line 10) but it presented very low coverage (> 1 GOx/NP), similar to bare 1:500 (NP:PEG) nanoparticles. Finally, we chose 1:300 NP:PEG ratio because most likely represents a medium coverage of nanoparticles (3 GOx/NP). The incubation ratio for L-Cysteine was also chosen 1:300 (NP-CYS).

NPs with different surface chemistries were then conjugated to GOx. Conjugation was achieved by simple incubation for 1 hour at a NP:GOx ratio of 1:500. This incubation ratio was chosen because it resulted in significant mobility shifts in gel electrophoresis (Figure 3.14 line 5). This ratio represents a large excess of protein, so it helps ensure conjugation. In addition, the narrow band indicated a uniform charge distribution and functionalization.

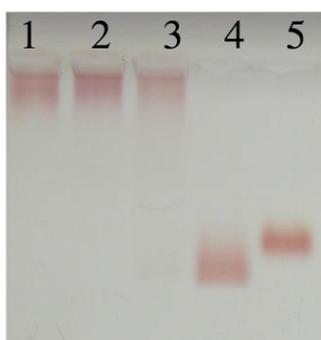


Figure 3.14. Glucose oxidase stabilized Au NP. In this figure gel electrophoresis of citrate Au NP and NP-GOx at various ratios is presented. Citrate Au NP were incubated with GOx 1 hour and purified by centrifugation. Lanes: 1) NP-citrate; 2) NP-citrate-GOx (ratio 1:1); 3) NP-citrate-GOx (ratio 1:10); 4) NP-citrate-GOx (ratio 1:100); and 5) NP-citrate-GOx (ratio 1:500).

Free GOx was separated from the NPs-GOx conjugates by spin centrifugation. Gel electrophoresis showed mobility shifts that varied with surface chemistry (Figure 3.15). NPs-citrate were not stable enough in the buffer to run in the gel (Lane 1), which has been observed previously (Reed and Metallo 2010). PEG-SH functionalization increased the NP mobility (Lane 2). The NPs retained a negative charge, and were able to migrate, which could be due to retained charges from residual citrate or surface charges of the NP, and incomplete PEGylation (Aubin-Tam and Hamad-Schifferli 2005). Functionalization with Cys resulted in NPs that did not move from the well, most likely due to decreased stability and charge (Lane 3). NP-BPS ran to the anode, indicating successful NP stabilization and a net negative charge (Lane 4). In addition, the narrow band indicated a uniform charge distribution and thus uniform BPS functionalization. NP-BPS functionalized with PEG-SH resulted in a slight mobility shift to lower mobility, which could be due to an increase in size because of the larger PEG ligand, and/or a decrease in charge, as PEG-SH is neutral (Lane 5). Cys functionalization of NP-BPS resulted in

no noticeable shift. Most of the shifts in the gel were small, consistent with previous observations (Park, Brown, and Hamad-Schifferli 2004; Aubin-Tam and Hamad-Schifferli 2005).

Gel mobilities of the NPs shifted upon conjugation to GOx. NP-citrate-GOx had a higher mobility relative to NP-citrate, indicating that the negatively charged GOx was bound to the NP, stabilizing it (Lane 7). For the other NPs, conjugation to GOx resulted in shifts to lower mobility, most likely due to the increase in size of the NP upon conjugation. NP-PEG decreased in mobility upon GOx conjugation (Lane 8), while NP-Cys increased in mobility (Lane 9). Conjugation to NP-BPS (Lane 10) resulted in lowest mobility compared to NP-citrate-PEG-GOx (Lane 11) and NP-citrate-GOx-Cys (Lane 12). The different mobilities could be explained for citrate gold NPs and BPS by the different surface coverages. For both NP-citrate and NP-BPS, the mobility of the GOx conjugates exhibited the trend of PEG > Cys > NPs.

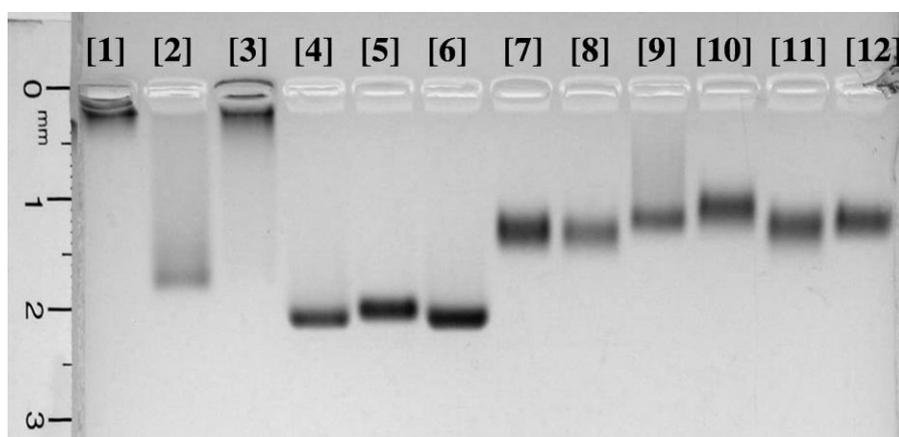


Figure 3.15. Effect of Au NPs surface chemistry on gel electrophoresis mobility shift (with and without GOx). Lanes: 1) NP-citrate, 2) NP-citrate modified with PEG (NP-citrate-PEG), 3) NP-citrate modified with Cys (NP-citrate-Cys) 4) NP-BPS 5) NP-BPS modified with PEG 6) NP-BPS modified with Cys 7) NP-citrate-GOx 8) NP-citrate-PEG-GOx 9) NP-citrate-Cys-GOx 10) NP-BPS-GOx 11) NP-BPS-PEG-GOx 12) NP-BPS-Cys-GOx.

Fluorescence spectroscopy was used to quantify both the amount of GOx on the NP surface as well as the GOx denaturation. Trp intensity was suitable for determining coverage for moderately unfolded proteins, and Trp maximum emission shift and FAD intensity for unfolding.

By quantifying Trp fluorescence of GOx displaced from the NPs by MCH, the coverage was determined to be 10 GOx/NPs for NPs -citrate, or ~ 1 GOx monomer/25 nm² (Figure 3.16). For NPs-citrate modified with PEG-SH, the resulting coverage was lower, 3 GOx/NPs, indicating that the PEG-SH inhibited conjugation. Cys modification of NPs-citrate also inhibited conjugation, resulting in only 6.5 GOx/NPs. NPs-BPS resulted in coverages similar to NPs-citrate (9 GOx/NPs). Likewise, modification with PEG-SH and Cys resulted in lower coverages of ~ 3 GOx/NPs. Thus, NP surface chemistry was found to influence the efficiency of protein conjugation.

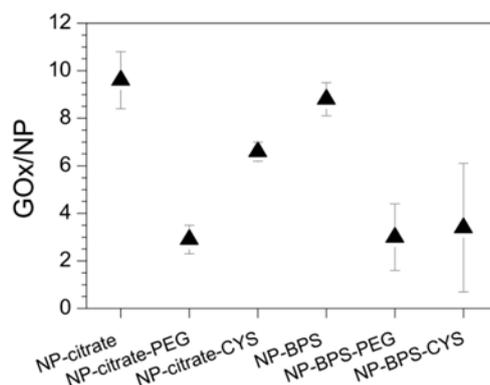


Figure 3.16. Effect of surface chemistry on NP coverage.

Based on the Trp fluorescence shifts, the secondary structure of GOx was found to be highly perturbed. Trp fluorescence has been used to assay protein unfolding because it changes as the protein unfolds, which exposes the Trp to water, a different environment from the hydrophobic pocket that it normally occupies. Different NPs surface chemistries resulted in similar λ_{max} values, with the highest for the NPs-PEG, NPs-Cys and NPs-BPS-Cys Figure 3.17 a). Compared to λ_{max} with thermal denaturation for free GOx, the amount of unfolding corresponded to a temperature of ~ 58 °C. Unfolding was the greatest for GOx on NPs-Cys and NPs-PEG, and the least for NPs-BPS and NPs-BPS-PEG.

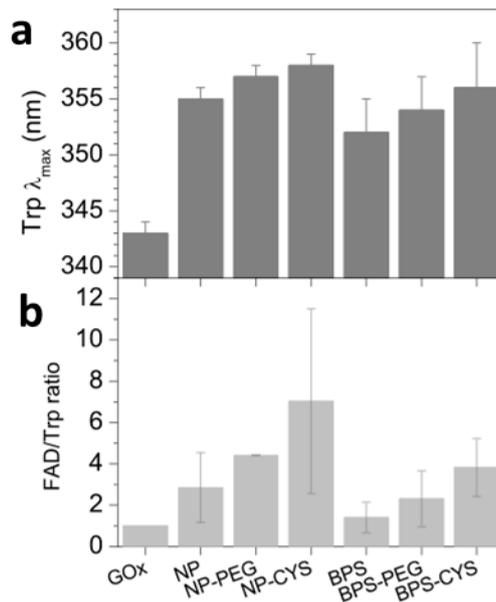


Figure 3.17. Effect of surface chemistry on GOx fluorescence behavior. a) Trp λ_{max} and b) FAD / Trp ratio as a function of NPs surface chemistry.

The ratio of FAD/Trp fluorescence can be used to evaluate GOx denaturation. We compared FAD/Trp ratios of GOx on the different NPs (Figure 3.17 b). For all the NPs surface chemistries, the FAD/Trp was higher than for free GOx (normalized to FAD/Trp = 1.0), indicating again that the GOx was unfolded on the NPs. This can be due to FAD intensity increasing

and/or Trp fluorescence decreasing with unfolding. PEG and Cys samples had higher ratios (4.41 and 7.03, respectively) than NPs-citrate (2.85) and NPs-BPS (2.3). Generally, surface chemistries originating from NPs-citrate had higher ratios than those originating from NPs-BPS. NPs-Cys mostly had the worst values and thus greatest denaturation, while NPs-BPS and NPs-BPS-PEG were more similar.

Circular dichroism (CD) spectroscopy of the GOx on the NPs also confirmed GOx unfolding. Free GOx has a strongly α -helical structure (28% helix, 18% sheet), which has been observed previously (Hecht, Schomburg, et al. 1993; Haq, Ahmad, and Khan 2003; Zhao et al. 2010; Caves et al. 2011). The GOx far-UV CD spectrum for the native state has two minima at 208 and 222 nm, supporting a α -helical structure (black line, Figure 3.18 a, b) (Hecht, Schomburg, et al. 1993). However, for NPs-GOx, the CD spectra changed dramatically to resemble that of a random coil structure, suggesting that the GOx was strongly denatured on the NPs surfaces. Secondary structure differed slightly depending on NPs surface chemistry. GOx was the least denatured on NPs-BPS. The ligands PEG-SH and Cys did not improve GOx structure, but instead contributed to GOx unfolding.

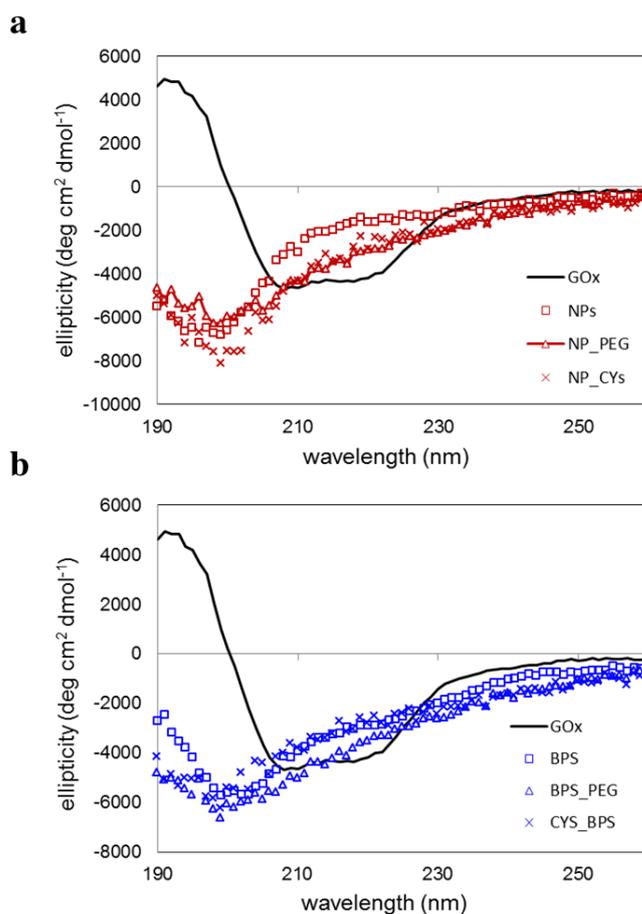


Figure 3.18. Surface chemistry | CD spectra. In this figure, CD spectra of a) free GOx (black line) GOx on NPs-citrate (red solid line), NPs-citrate-PEG (red dots/line), and NPs-citrate-Cys (red dashed line), and b) free GOx (black line), GOx on NPs-BPS (blue solid line), NPs-BPS-PEG (blue dots/line), and NPs-BPS-Cys (blue dashed line) are presented.

NPs by themselves did not exhibit any negative CD signals in the same spectral range, and were very similar to the buffer spectra (Figure 3.19).

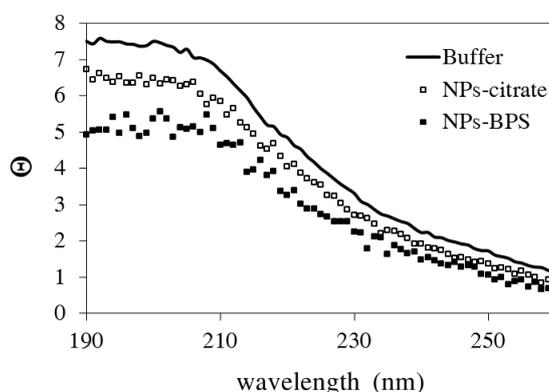


Figure 3.19. Surface chemistry, control CD spectra. CD spectra of 10 mM sodium phosphate pH 7.4 buffer (black line), NPs-citrate (open squares) and NPs-BPS (filled squares).

Additionally, it is important to note that CD spectra for NPs-protein conjugates are difficult to obtain without significant spectral noise, even with extensive signal averaging. This can be attributed to the fact that the CD signal is due to an absorption difference in the UV, where the NPs absorb strongly. Furthermore, NPs-protein conjugates are generally at a much lower concentration than what is typically used for free proteins, which are on the order of $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ or greater. This can lead to challenges in obtaining CD spectra of NPs-protein conjugates.

Based on the GOx structure, and the fact that the denaturation is strongest for NPs-Cys, we tried to explain the protein behavior based on the amino acids that could be interacting with the NPs and NPs ligand. GOx has 3 Cys, two of which form a disulfide bond (Cys164 and Cys206). The remaining Cys, Cys521, is not a disulfide but on a loop. It is not on the surface of the protein but relatively close to it, so it could potentially bind to the NPs, especially if it is accompanied by protein denaturation.

In addition, Cys521 is close to the active site His516. Thus, it could be that the thiol links to the NP, forcing the GOx to unfold, similar to what has been observed for yeast cytochrome *c* (*Saccharomyces cerevisiae*) (Aubin-Tam and Hamad-Schifferli 2005). In these previous studies, when NPs were conjugated to cytochrome *c* from horse heart (*Equus caballus*) which lacks a surface cysteine, the protein stayed folded, showing that Cys binding to NPs can be detrimental to folding. The disulfide bond in GOx (Cys164 and Cys206) is quite stable, but it is near the GOx surface and in an area that is basic. The intrachain disulfide bond can contribute to protein folding and stability, but depending on the protein environment, some disulfide bonds are more labile, forming transient redox-active disulfide bonds that are alternately reduced and oxidized in the course of an enzymatic reaction. Clearly, GOx interaction with the NPs compromises

secondary structure, and possibly could be exposing internal amino acids to enable binding to the NPs (Otsuka et al. 2004).

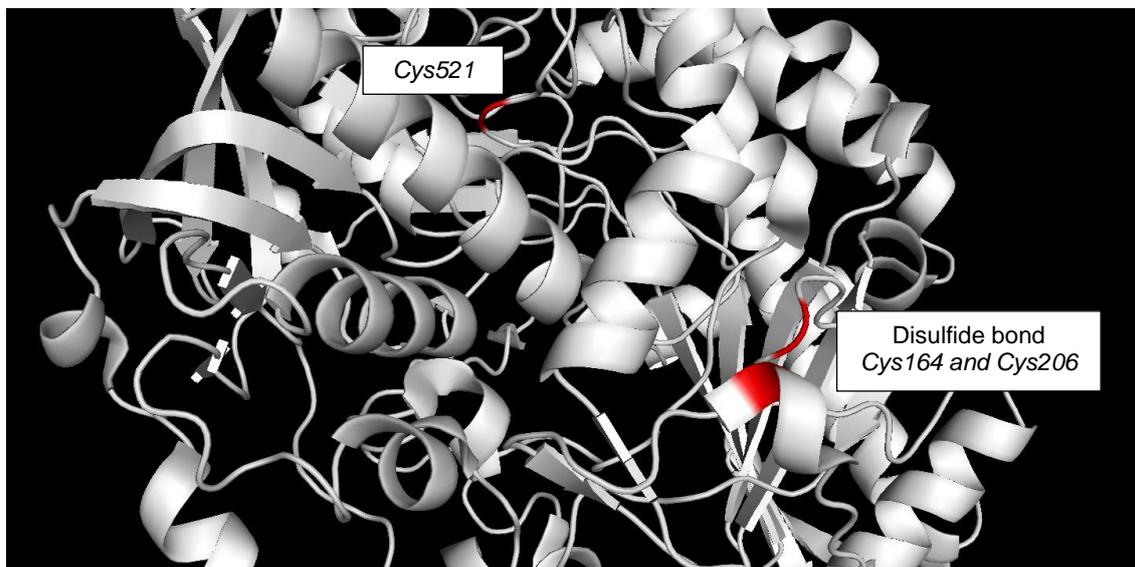


Figure 3.20. 3D model for the monomer of the GOx. In red cysteine aminoacids: disulfide bond Cys164 and Cys206, and Cys521.

To understand how these structural changes impact function, enzymatic activity of GOx on the different NPs was measured by a colorimetric assay. NPs-GOx were incubated with its substrate glucose, Amplex Red, and horse radish peroxidase (HRP). The products of GOx are H_2O_2 and gluconic acid. In the presence of H_2O_2 , HRP converts Amplex Red into resorufin, which is a chromophore that can be detected optically and thus can serve as a measure of GOx activity. Resorufin concentration was monitored by absorption at 571 nm as a function of time for different glucose concentrations in order to obtain Lineweaver-Burk plots and Eadie-Hofstee diagrams. Only the data that matched were used, which enabled quantification of K_M and k_{cat}/K_M (Figure 3.21). Kinetic curves were obtained for glucose concentrations ranging from 0.1×10^{-3} M to 50×10^{-3} M.

K_M (Figure 3.21, black squares) generally decreased when GOx was conjugated to the NPs. NPs-citrate-GOx showed a $K_M = 0.019$ M while free GOx had a $K_M = 0.029$ M, which agreed with previous reports (Swoboda and Massey 1965; Ahmad, Akhtar, and Bhakuni 2001). This suggested that the binding affinity for the substrate glucose was improved upon immobilization. This could be either due to the binding pocket being sterically more accessible because of interactions of the Cys521 and/or to the disulfide with the NPs, and/or to partial unfolding of the GOx. Modifying the NPs-citrate with PEG-SH resulted in similar K_M values to NPs-citrate ($K_M = 0.020$ M) and Cys resulted in higher value of K_M (0.027 M), indicating that this surface chemistry did not affect substrate affinity. Apparently the Cys ligand either hinders the substrate from reaching the binding site (Estephan, Jaber, and Schlenoff 2010), or affects GOx structure and/or orientation. For NPs-BPS-GOx, K_M was lower (0.017 M), demonstrating a stronger substrate binding. Modifying NPs-BPS surface with PEG-SH or Cys increased the K_M ,

indicating that these ligands weaken substrate binding, although K_M was still lower than for free GOx.

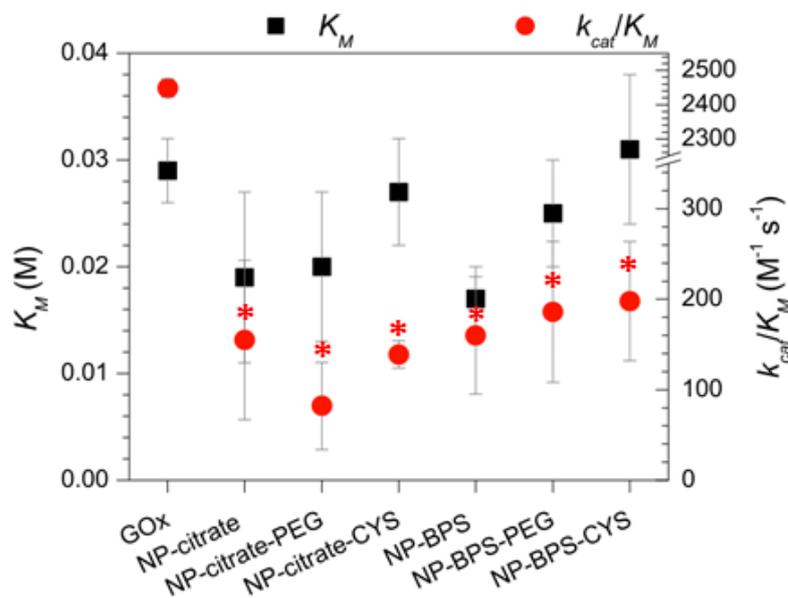


Figure 3.21. Surface chemistry kinetics measurements. Effect of surface chemistry on K_M (black squares) and k_{cat}/K_M (red circles). k_{cat}/K_M of free GOx after y-axis break. Data are represented as average value \pm SE ($n=4-8$). The * represents significant differences ($P \leq 0.05$).

Changing NPs surface chemistry varied k_{cat}/K_M . Generally, k_{cat}/K_M for GOx on all the NPs was in the range of 100-200 $M^{-1}s^{-1}$ (red circles, Figure 3.21), more than an order of magnitude less than that of free GOx ($k_{cat}/K_M = 2450 M^{-1}s^{-1}$, after y-axis break), indicating that GOx activity was compromised when bound to a NPs. NPs-citrate-GOx had $k_{cat}/K_M = 155 M^{-1}s^{-1}$. Modifying NPs-citrate with PEG-SH and Cys decreased k_{cat}/K_M . NP-BPS-GOx had an approximately same turnover rate (160 $M^{-1}s^{-1}$) and modifying the surface chemistry to PEG-SH increased k_{cat}/K_M (186 $M^{-1}s^{-1}$). Cys modification increased k_{cat}/K_M even more (198 $M^{-1}s^{-1}$), showing that surface modification strategies can have some positive impact for NPs-BPS. The activity measurements show that the structural changes in the GOx are accompanied by an increase in substrate binding strength but loss in activity upon NPs conjugation. These results show that the NPs and NPs surface chemistry can strongly influence GOx structure and consequently enzymatic activity.

3.3.3. STABILIZATION OF GO_x BY OTHER PROTEINS

We probed the effect of proteins additives that could potentially stabilize GOx on the NPs surface. This strategy has been used by others successfully to improve folding of immobilized proteins (Tyhach et al. 1981; M. D. Gouda et al. 2002). We used human serum albumin (HSA), as it is a negatively charged carrier protein found in the blood in great abundance, and has been employed to stabilize biomolecules and small molecules. We also used lysozyme, which is often chosen as a model for a small, positively charged protein. Lysozyme has also been found to significantly increase (3 fold) the thermal stability of soluble

GOx, where apparently the ionic interactions between two proteins minimize the unfolding and nonspecific aggregation (M. D. Gouda, Thakur, and Karanth 2001).

Two surface chemistries were chosen for this approach, NPs-citrate and NPs-BPS, because both their GOx conjugates exhibited lower K_M values (Figure 3.21). The strategy consisted of incubating NPs first with GOx, followed by incubation with HSA or lysozyme. Free protein was purified from the NPs by centrifugation. The incubation ratio was selected 1:10 (NPs:Lysozyme) because at higher concentration the conjugate precipitated (Figure 3.22 sample 3 and 4). This effect has been observed by others (D. Zhang et al. 2009). When AuNPs met lysozyme, the breakage of S-S bonds to form Au-S bonds changes in the conformation of lysozyme on the surface of AuNPs, induces protein unfolding, forms protein-AuNPs assemblies, and produces protein aggregates. HSA was incubated at a final concentration of 0.1% HSA.

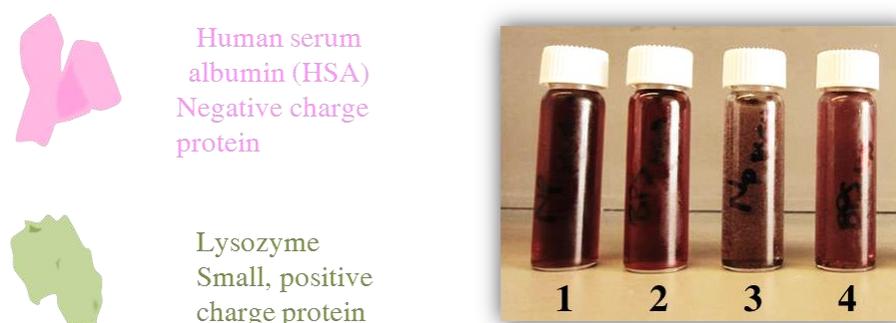


Figure 3.22. Stabilization of GOx by proteins. Au NPs-GOx conjugate were incubated with human serum albumin (negative charged) and Lysozyme (positive charge). Sample 1) NPs-citrate-GOx- HSA, 2) NPs-BPS-GOx-HSA, 3) NPs-citrate-GOx-Lysozyme and 4) NPs-BPS-GOx-Lysozyme. At high concentration of Lysozyme the conjugate precipitated (Sample 3 and 4).

NPs-GOx activity measurement (Figure 3.23 b, black squares) determined that K_M was higher with both HSA and lysozyme incubation, indicating that these other proteins inhibited substrate binding. In addition, changing NPs surface chemistry (citrate vs. BPS) did not significantly affect substrate binding, as K_M values were approximately the same ($K_M \sim 0.025$ M). Also, addition of HSA and lysozyme tended to lower k_{cat}/K_M , indicating that activity was also compromised in the presence of these two proteins (red circles). However, for NP-citrate-GOx, lysozyme had little effect on k_{cat}/K_M . These results show that these protein additives negatively affected GOx activity on the NPs surface.

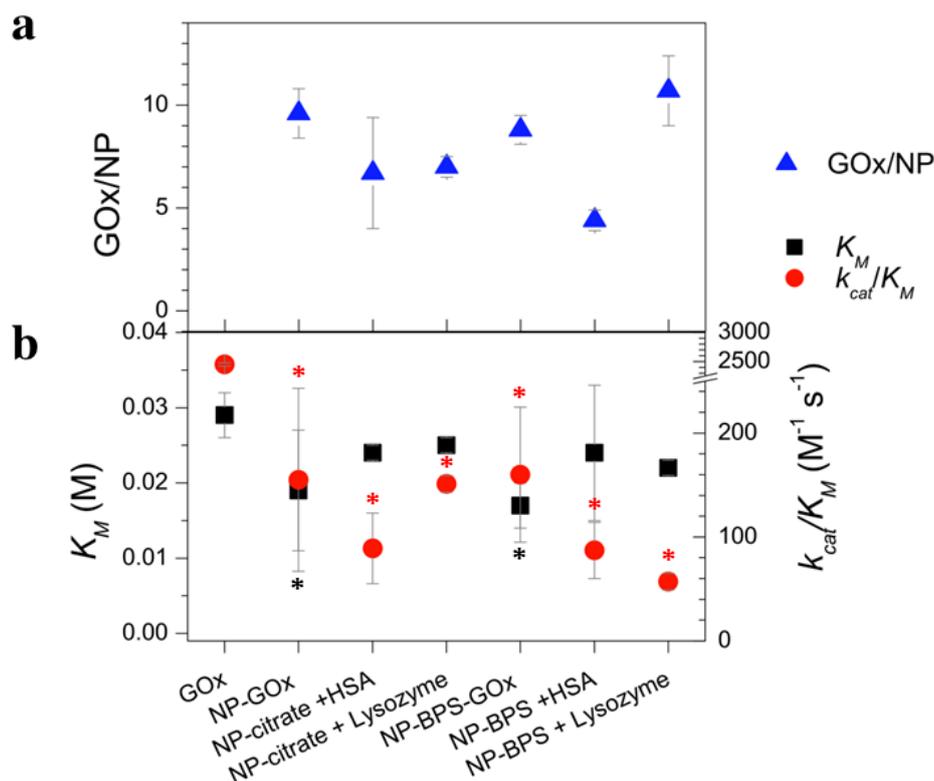


Figure 3.23. Stabilization of GOx by proteins: Coverage and Kinetics measurement. Effect of stabilization by other proteins on a) coverage (blue triangles) and b) on K_M (black squares) and k_{cat}/K_M (red circles). k_{cat}/K_M of free GOx after y-axis break. Data are represented as average value \pm SE ($n=4-8$). The * represents significant differences ($P \leq 0.05$).

3.3.4. MANIPULATING THE GO_x MICROENVIRONMENT

We altered the protein microenvironment using salts and small molecules that are known to affect GOx folding and stability. NPs-citrate and NPs-BPS were chosen for this approach. We explored the use of NaCl, which has been known to improve the tertiary structure and stability of free GOx (Ahmad, Akhtar, and Bhakuni 2001). Cations can induce compaction of negatively charge proteins, significant reducing their hydrodynamic radius. Additionally, they can affect the surface water structure or interact with charged groups on the amino acid side chains. Also, addition of NaCl to NPs-protein conjugates for covalently linked cytochrome c has been shown to improve folding (Aubin-Tam, Hwang, and Hamad-Schifferli 2009) due to increased screening between the charged amino acid side chains on the protein and the negatively charged NPs ligands, which are thought to perturb protein structure due to electrostatic repulsion/attraction.

The effect of incubating NPs-GOx conjugates (NPs-citrate and NPs-BPS) with free PEG in solution was explored, as it has been used to stabilize proteins. PEG (MW = 3000 g/mol) and no thiol was introduced to NPs-GOx in two different ways (Figure 3.24). First, pre-made NPs-citrate-GOx or NPs-BPS-GOx conjugates were incubated with free PEG (“after”). The second

approach was to incubate NPs-citrate or NPs-BPS with free PEG and GOx simultaneously ("sim").

Finally, we investigated the effect of conjugating GOx to NPs in the presence of glucose, which could potentially stabilize the protein by sitting in the binding pocket. Similar strategies have been used with cofactors for orienting GOx on solid surfaces.

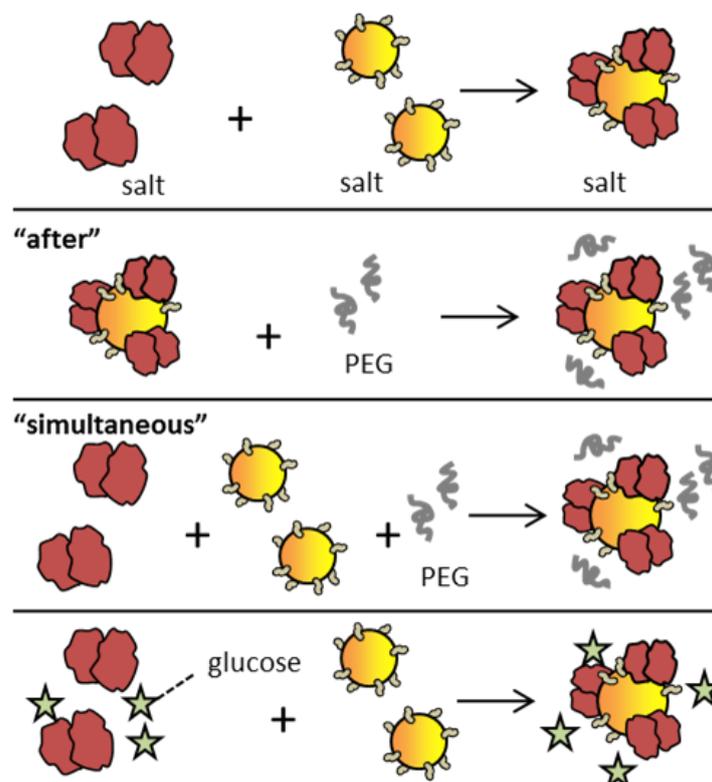


Figure 3.24. Effect of protein microenvironment stabilization on activity. Schematic of protein microenvironment modifications used. 1) NaCl, 2) PEG and 3) Glucose.

Only NPs-BPS were tested with NaCl due to their high stability. Coverage of GOx on NPs-BPS was found to be dependent on NaCl concentration (Figure 3.25 a, blue triangles). NPs-BPS with no NaCl resulted in ~9 GOx/NPs-BPS. As NaCl was increased, coverage decreased. For 150 mM NaCl, the resulting coverage was only 2 GOx/NPs. This trend is opposite to the expected result of higher coverages with higher NaCl due to increased screening of the electrostatic repulsion between the negatively charged NPs-BPS and the negatively charged GOx. It could be possible that both electrostatic and hydrophobic interactions are involved in conjugation (Sunho Park, Brown, and Hamad-Schifferli 2004; Lindman et al. 2007). If hydrophobic interactions play an important role, addition of salt could increase the surface ionic charge, making the NPs surface less hydrophobic due to the interactions with the negatively charged BPS, consequently diminishing GOx coverage.

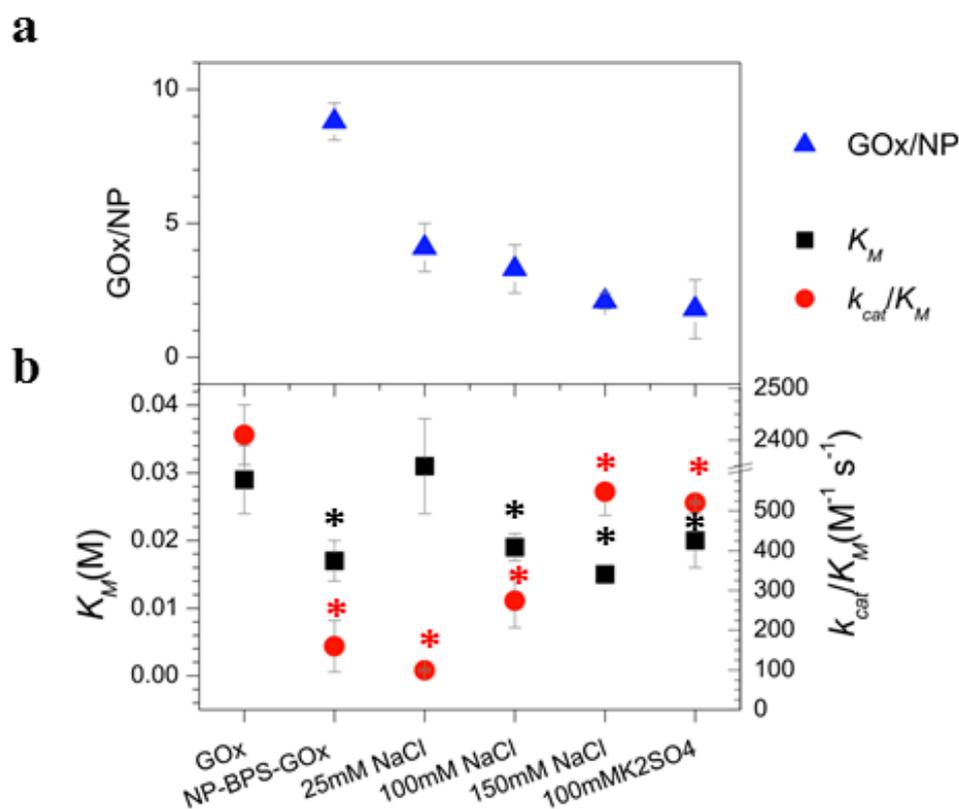


Figure 3.25. Effect of protein microenvironment stabilization on activity by NaCl for NP-BPS-GOx. a) Coverage (blue triangles), and b) K_M (black squares) and k_{cat}/K_M (red circles). Data are represented as average value \pm SE ($n=3-8$). The * represents significant differences ($P \leq 0.05$).

NaCl also affected the conjugated GOx activity. K_M exhibited a non-monotonic dependence on NaCl concentration (Figure 3.25 b, black squares). At low NaCl K_M increased to ~ 0.030 M. For $[NaCl] > 25$ mM, K_M decreased back to the original value for NPs-BPS-GOx ($K_M = 0.017$ M). However k_{cat}/K_M increased with NaCl, reaching $550 M^{-1}s^{-1}$ for $[NaCl] = 150$ mM, showing that activity could be improved. This improvement in activity was not observed for the free GOx. In previous reports, addition of NaCl to free GOx was found to actually reduce enzymatic activity, even though it stabilized tertiary and quaternary structure (Ahmad, Akhtar, and Bhakuni 2001). In our case addition of 150 mM NaCl to GOx did not significantly change K_M (0.029 M) or k_{cat}/K_M ($2410 M^{-1}s^{-1}$, above y-axis break).

Addition of 100 mM K_2SO_4 was also explored as it has been used previously to stabilize GOx due to increased hydrophobic interactions in the protein (Srere and Uyeda 1976). Substrate binding was not affected by K_2SO_4 , as K_M was approximately the same with or without K_2SO_4 , but k_{cat}/K_M increased to $\sim 520 M^{-1}s^{-1}$ (Figure 3.25 b). Addition of K_2SO_4 to free GOx causes the K_M to decrease from 0.029 M to 0.020 M, but k_{cat}/K_M does not change. The K_M on the NPs and free protein in K_2SO_4 was found to be the same.

The effect of incubating NPs-GOx conjugates (NPs-citrate and NPs-BPS) with free PEG in solution was explored, as it has been used to stabilize GOx (Ye, Combes, and Monsan 1988).

PEG (MW = 3000 g/mol) and no thiol was introduced to NPs-GOx in two different ways (Figure 3.26). First, pre-made NPs-citrate-GOx or NPs-BPS-GOx conjugates were incubated with free PEG (“after”). The second approach was to incubate NPs-citrate or NPs-BPS with free PEG and GOx simultaneously (“sim”). For NPs-citrate, addition of free PEG increased K_M , especially for simultaneous incubations (black squares, Figure 3.26 b). This phenomenon was also observed for NPs-BPS but resulted in smaller changes in K_M . Presence of free PEG tended to decrease k_{cat}/K_M from its value of $150 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, and the lowest k_{cat}/K_M were observed for NPs-BPS incubated simultaneously (red circles, Figure 3.26 d). Generally, free PEG is detrimental for NPs-GOx activity. Furthermore, the order of incubation matters, where simultaneous incubation results tended to compromise the GOx function more.

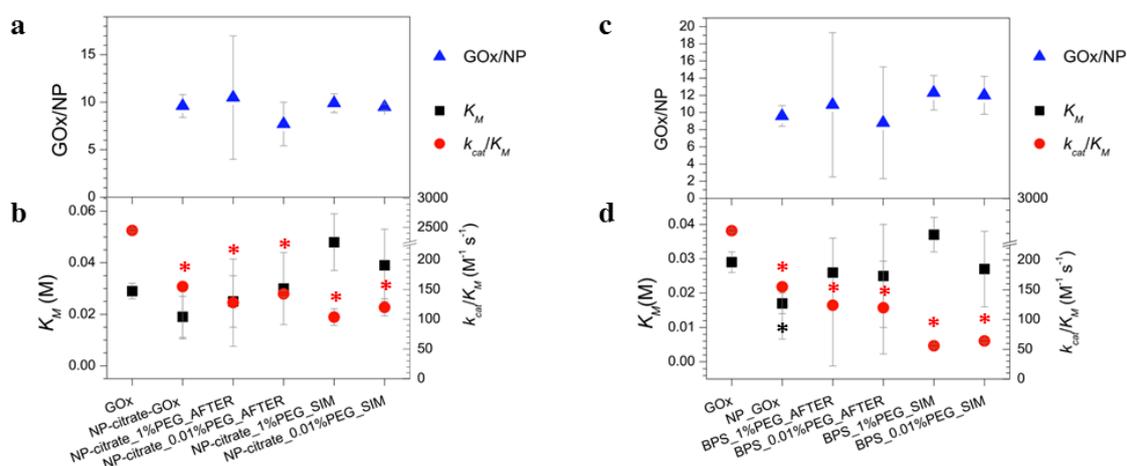


Figure 3.26. Effect of protein microenvironment stabilization on activity by PEG in solution on NP-BPS-GOx. a) Coverage (blue triangles) and b) K_M (black squares) and k_{cat}/K_M (red circles). Data are represented as average value \pm SE ($n=3-8$). The * represents significant differences ($P \leq 0.05$).

Finally, we investigated the effect of conjugating GOx to NPs in the presence of glucose, which could potentially stabilize the protein by sitting in the binding pocket. Similar strategies have been used with cofactors for orienting GOx on solid surfaces (Srere and Uyeda 1976; Xiao et al. 2003). First, GOx was incubated with a high concentration of glucose (500 \times excess), and then conjugated to the NPs. Following conjugation, free glucose was separated from the NPs-GOx conjugates by centrifugation. Incubation with glucose influenced the resulting GOx coverage on the NPs. Coverage decreased for NPs-citrate-GOx from 10 to 7 GOx/NPs (blue triangles, Figure 3. 27 a). For NPs-BPS-GOx, coverage increased from 9 to 15 GOx/NPs, and for BPS-PEG-GOx, coverage increased slightly from 3 - 4 GOx/NPs. Addition of glucose improved GOx activity. K_M decreased with glucose incubation, from 0.019 to 0.017 M for NPs-citrate, and from 0.017 M to 0.013 M for NPs-BPS (black squares, Figure 3. 27 b). This shows that for these surface chemistries, conjugation in the presence of glucose could help maintain the substrate binding site. On the other hand, k_{cat}/K_M for NPs-citrate and NPs-BPS-PEG when they are incubated with glucose and NPs-BPS experienced a slight decrease (red circles, Figure 3. 27 b). This behavior of BPS-PEG-GOx with glucose differed from the other surface chemistries. NPs-BPS-PEG-GOx incubated with glucose exhibited an increase in K_M (0.025 M

to 0.030 M), so the glucose did not help substrate binding. However, k_{cat}/K_M increased slightly with glucose incubation, from 186 $M^{-1}s^{-1}$ to 235 $M^{-1}s^{-1}$. For this surface chemistry, substrate incubation can help enzymatic activity.

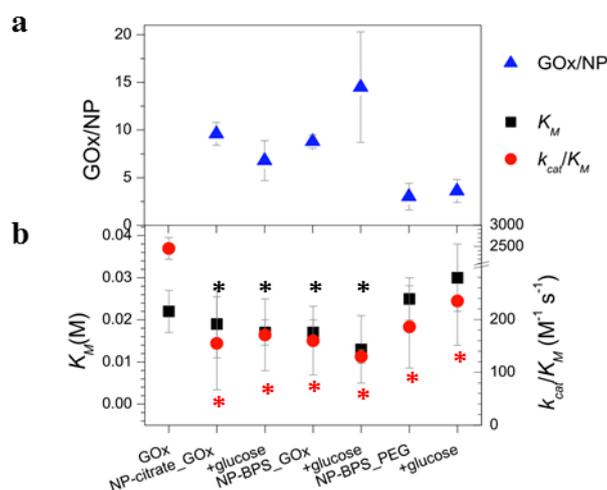


Figure 3.27. Effect of protein microenvironment stabilization on activity by glucose on NPs-citrate-GOx and NPs-BPS-GOx. a) Coverage (blue triangles), and b) K_M (black squares) and k_{cat}/K_M (red circles). Data are represented as average value \pm SE ($n=3-8$). The * represents significant differences ($P \leq 0.05$).

3.3.5. PROTEIN AFTER DISPLACEMENT FROM THE NP SURFACE

We probed the structure and activity of GOx after it was displaced from the NPs surface, as it could yield information about how GOx interacts with the NPs and the NPs ligands. GOx was displaced from the NPs by adding high concentrations of mercaptohexanol (MCH), which binds to the Au NPs via its thiol (Figure 3.28). Displaced GOx was separated from the NPs by spin centrifugation and then quantified in solution for structure and activity.

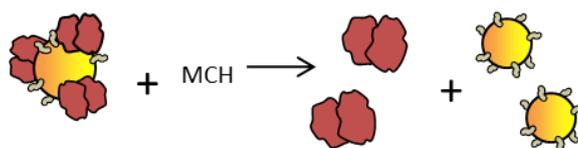


Figure 3.28. Schematic illustrations of GOx displacement from the

Trp λ_{max} of GOx after displacement from NPs was 355 nm on the NPs-citrate and 352 nm on the NP-BPS, which indicated that the GOx was unfolded on the NPs (Figure 3.32). For all the NPs surface treatments, K_M decreased on the order of 40 % once GOx displaced was from NPs-citrate (Figure 3.29 a). This indicates that the binding site was blocked when the GOx was on the NPs surface.

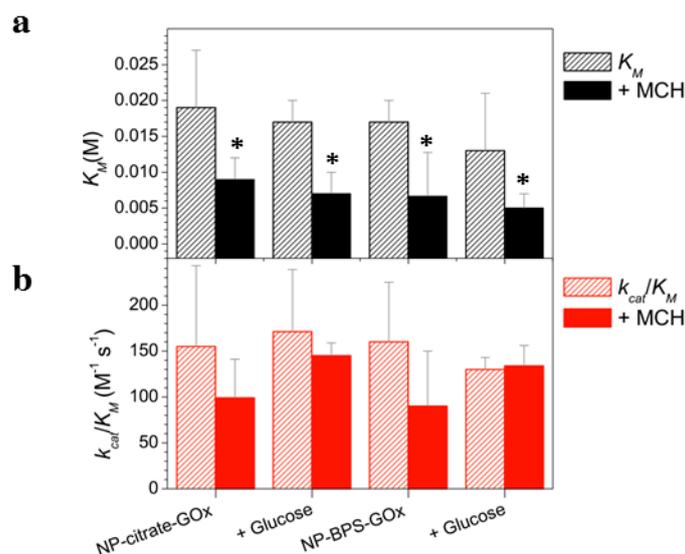


Figure 3.29. Activity of GOx before and after displacement from the NP surface. a) k_{cat}/K_M on the NPs (red dashed) and after displacement by MCH (solid red), and b) K_M on the NPs (red dashed) and after displacement (solid black). Data are represented as average value \pm SE ($n=4-8$). The * represents significant differences ($P \leq 0.05$).

Chemical displacement by MCH most likely allows the active site to be exposed again, thus increasing substrate binding strength. This suggests that the GOx most likely binds with the substrate binding pocket facing the NPs, which is possibly aided by interactions between with the Cys in the disulfide bond and Cys521. However, k_{cat}/K_M also decreased after displacement for all the NPs surface chemistries (Figure 3.29 b). Values went from $150 M^{-1} s^{-1}$ for GOx on NPs-citrate (hatched red) to $100 M^{-1} s^{-1}$ when displaced from the NPs by MCH (solid red). NP-BPS and with glucose incubation also resulted in similar decreases in k_{cat}/K_M (~50 %). This suggests that even though the NPs causes a great amount of denaturation and loss of activity, removing it from the NPs makes it worse. In addition, because the K_M and k_{cat}/K_M values are not restored to their original values for the free GOx, this indicates that the binding to the NPs has strongly and irreversibly destabilized the protein. Removing it from the NPs surface results in even more denaturation, indicating that when the GOx interacts with the NPs-citrate surface, there is some stabilization involved. Similar decreases in K_M and k_{cat}/K_M were observed for NPs-BPS-GOx (Figure 3.29 b). In addition, this denaturation is not a consequence of the MCH. Control experiments probing the effect of MCH on the activity of free GOx showed that the activity was not significantly different from free GOx with no MCH, where k_{cat}/K_M decreased from 2450 to 2220 $M^{-1} s^{-1}$, and K_M increased from 0.029 M to 0.037 M.

Secondary structure of GOx after MCH displacement from the NPs was probed. Comparing GOx on NPs-citrate (gray dots/lines) vs. after displacement (black line), the minimum in the CD spectrum shifted to shorter wavelengths (Figure 3.30 a). In addition, the signal at 222 nm became more positive. Deconvolution (Andrade et al. 1993) (Table 3.1) showed that the α -helical contribution decreased from 32% to 8% upon conjugation to NPs-citrate, suggesting unfolding. After MCH displacement, α -helicity remained low (6%), and

β -strand and random coil proportions remained approximately the same, suggesting that once the GOx is displaced from the NP-citrate, it cannot refold. Similar behavior was observed for NPs-BPS-GOx (Figure 3.30 b) and NPs-citrate-PEG-GOx (Figure 3.30 c).

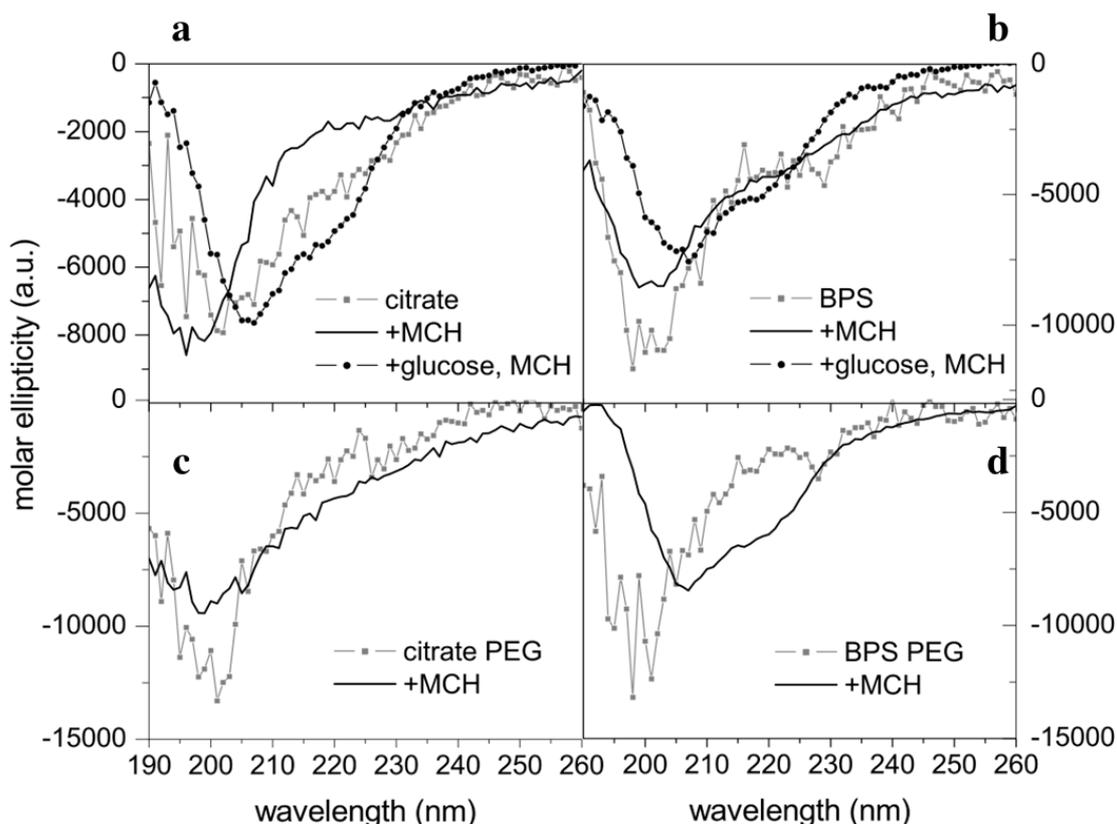


Figure 3.30. CD of GOx before and after displacement from the NP surface. a) on NPs-citrate (grey dot/line), after displacement (solid black line), and glucose incubated GOx after displacement (black dot/line) b) on NPs-BPS (grey dot/line), after displacement (solid black line), and glucose incubated GOx after displacement (black dots/line) c) on NPs-citrate-PEG (grey dots/line) and after displacement (solid black line), d) on NPs-BPS-PEG (grey dot/line) and after displacement (solid black line).

From the deconvolution (Table 3.1), the proportions of α -helicity, β -strand, and random coil did not change significantly after MCH displacement. This shows that the NPs can have irreversible effects on the secondary structure. Control experiments of free GOx incubated only with BPS and MCH resulted in no change in CD spectra compared to that of the free GOx (Figure 3.31).

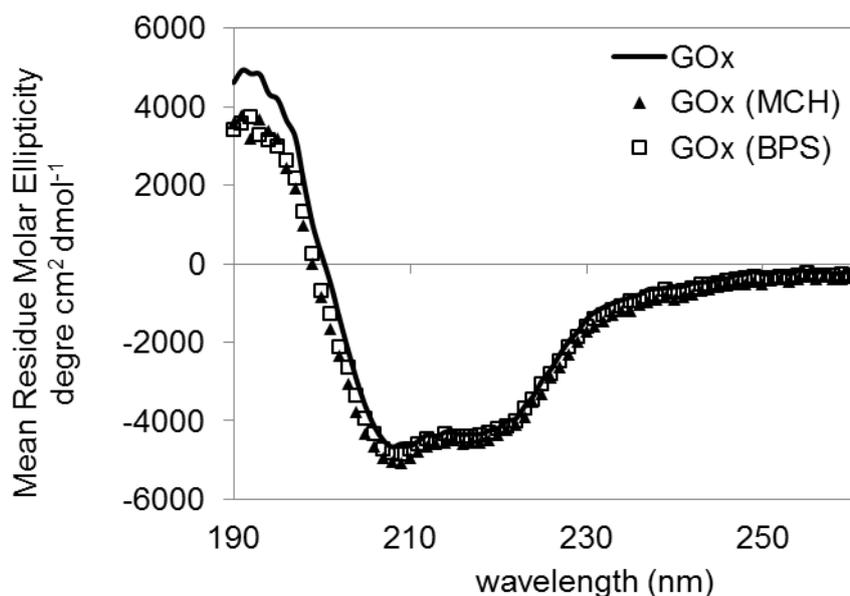


Figure 3.31. Glucose oxidase control CD spectra. GOx with MCH (triangles), GOx with BPS (squares) compared to free GOx (black line).

Table 3.1. CD deconvolution results using K2d (Andrade et al. 1993).

	GOx	NP-citrate	NP-citrate MCH	NP-citrate-glucose MCH		GOx	NP-citrate-PEG	NP-citrate-PEG MCH
helix (%)	32	8	6	28	helix (%)	32	7	9
strand (%)	18	41	36	28	strand (%)	18	50	35
random coil (%)	50	50	58	44	random coil (%)	50	43	56
Re distance	124	78	74	107	Re distance	124	49	31
MAX error	>0.227	0.18	0.18	>0.227	MAX error	>0.227	0.10	0.08

	GOx	NP-BPS	NP-BPS MCH	NP-BPS-glucose MCH		GOx	NP-BPS-PEG	NP-BPS-PEG MCH
helix (%)	32	9	9	28	helix (%)	32	8	13
strand (%)	18	36	35	28	strand (%)	18	46	32
random coil (%)	50	55	56	44	random coil (%)	50	46	54
Re distance	124	35	94	96	Re distance	124	74	50
MAX error	>0.227	0.08	0.18	0.18	MAX error	>0.227	0.18	0.10

However, for NPs-BPS-PEG-GOx, the GOx secondary structure improved after displacement from the NPs (Figure 3.30 d). GOx on the NPs was strongly denatured, with a random coil spectra signature (gray dots/lines). However, after displacement (black), the CD spectrum exhibited two minima at 208 and 222 nm, indicative of the α -helical structure. Spectral deconvolution showed that α -helicity increased from 8% to 13% and β strand proportion decreased from 46% to 32%. Still, even though folding improves, it does not fully recover.

This also shows that functionalization conditions can make a difference in the residual effect on the protein structure. Both NPs surface chemistries result in denaturation of the GOx. However, when released from the NPs, apparently the refolding of the protein differs. Others authors have observed a residual denaturation for bovine serum albumin (BSA) on Au NPs. Brewer et al. (Brewer et al. 2005) suggested that the protein spreads on the NPs-ligand surface, resulting in denaturation, and when displaced from the NPs surface, some of the NPs ligand comes off with the protein. This ligand can remain complexed with the protein and maintain its denatured state. We also detected the presence of BPS in the solution after displacement by

fluorescence ($\lambda_{em} = 585$ nm, data not shown). Due to the nature of PEG-SH and citrate, their presence could not be probed by fluorescence. Presumably, either PEG is not released, or when it is released from the NPs it does not bind to the GOx in a way that maintains its denatured state.

Glucose incubation also made a marked difference in the GOx secondary structure after displacement. NPs-GOx conjugates that were performed with glucose present also showed recovery of secondary structure after displacement from the NPs. For NPs-citrate-GOx incubated with glucose, (Figure 3.30 a, black dots/lines) the displaced GOx exhibited minima at 208 nm and 222 nm, a signature of α -helicity. Compared to incubations without glucose (black line), GOx was able to retain much of its secondary structure. Deconvolution (Table 3.1) showed that the α -helicity was 28% with glucose, close to the free GOx (32%) and significantly higher for NPs-citrate-GOx without glucose (6%). Similar behavior was observed for NPs-BPS-GOx incubated with glucose (Figure 3.30 b, black dots/lines), exhibiting 28% α -helicity with glucose and 9% without. Evidently, glucose allows GOx to maintain its structure during conjugation, which is retained after displacement from the NPs. It is possible that when the GOx is bound to glucose, it is more stable and does not permit the disulfide and/or Cys521 to interact with the NPs. In addition, glucose positively impacted activity both before and after displacement from the NPs. K_M of GOx on NPs-citrate and NPs-BPS with glucose incubations was lower relative to K_M without glucose both before and after displacement (Figure 3.29 a). Also, k_{cat}/K_M of the displaced protein was higher than for GOx which lacked glucose incubation during the conjugation (Figure 3.29 b). However, glucose incubation did not blue shift λ_{max} , indicating that denaturation was still present (Figure 3.32). Nevertheless, glucose incubation had net a positive effect on the protein after displacement.

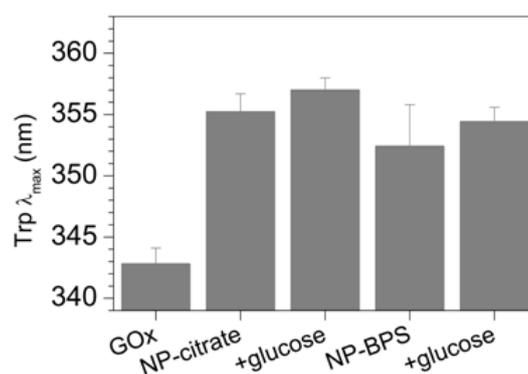


Figure 3.32. GOx fluorescence before and after displacement from the NP surface. Trp λ_{max} of GOx on NPs with and without glucose. Data are represented as average value \pm SE ($n=4-8$).

These results show that for certain surface chemistries, the NPs irreversibly affects the protein denaturation and activity. In addition, the degree of recovery of protein structure/activity depends on NPs surface chemistry and protein microenvironment.

3.4. CONCLUSIONS

In summary, interactions with NPs can significantly alter the structure and function of GOx. The NPs is generally a strongly perturbing agent for the GOx, and interactions between the protein and the NPs and NPs ligand result in irreversible denaturation. In addition, the NPs can improve substrate binding while reducing catalytic turnover. This indicates that sterics are not as much of an issue as is denaturation. This is based on the fact that the K_M values for NPs-GOx were lower than for free GOx, and that secondary structure in CD is often greatly compromised by the NPs. It is likely that the three Cys in GOx have an affinity for the NPs surface, and formation of the thiol-Au bonds either cause or accompany GOx unfolding.

Choice of surface chemistry can influence GOx coverage, structure, and activity. Neutral and zwitterionic ligands are generally not helpful, where they act more as a steric barrier for the active site and simultaneously reduce the coverage of the GOx on the NPs. The order of chemical modifications also influences behavior, though to a lesser extent.

Modifying the protein microenvironment by addition of salt and the substrate glucose can help improve activity and folding. Salt screening was found to be successful for improving activity. Incubation with its substrate glucose helps stabilize secondary structure, indicating that preserving the active site is likely to be occurring. Protein additives did not help as expected, despite their success for 2D surfaces. Apparently, steric inhibition becomes significant, and protein activity is not improved.

Displacement of GOx from the NPs yielded information about the interface between the GOx and NPs. Because the K_M decreased after displacement from the NPs, the interface most likely involves interactions with the GOx substrate binding pocket. Because in some cases the GOx was irreversibly denatured and unable to recover its structure and activity after displacement, these interactions at the NPs-GOx interface significantly perturb GOx structure and probably the active site.

However, stabilization of secondary structure does not necessarily mean preservation of activity. Glucose was able to stabilize folding, but did not result in large improvements in activity. Also, charge stabilization (NaCl) improved activity, but did not greatly improve secondary structure. This means that when strategizing immobilization, one needs to probe both structure and activity of the enzyme, as they may not always be correlated. These strategies can be useful for applications which require tethering the GOx and other enzymes to a surface.

CAPÍTULO 4

Análisis de nanoestructuras periódicas de oro para conformar un biosensor LSPR



4.1. INTRODUCCIÓN

En los últimos 15 años, las técnicas basadas en el fenómeno de resonancia del plasmon superficial localizado (denotado como LSPR, del inglés *Localized Surface Plasmon Resonance*) han ganado mucho interés. Además de ser una técnica muy sensible para la detección del índice de refracción, ha resultado ser una herramienta esencial para el análisis y detección de sustancias químicas y biológicas. Así mismo, los recientes avances en técnicas de nanofabricación (nanolitografía y nanoimpresión) han permitido el desarrollo de nuevas estructuras capaces de mejorar la sensibilidad y la complejidad de los sistemas empleados en la detección de biomoléculas.

El fenómeno de LSPR fue utilizado en sensado por primera vez por Englebienne in 1998 (Englebienne 1998), a partir de aquí, el desarrollo de biosensores basados en LSPR ha tenido un gran potencial en diversas áreas.

En este capítulo hemos estudiado la posibilidad de utilizar un espectrofotómetro común de laboratorio como plataforma de medida con nanoestructuras periódicas de oro que presentan el LSPR. Primero, se presenta el estudio de las diferentes variables del espectrofotómetro para su uso óptimo con nanoestructuras periódica. Posteriormente se analiza la viabilidad de utilizar superficies nanoestructuradas como transductores ópticos. Para ello, se analizan los espectros de transmitancia y de absorbancia de una serie de chips obtenidos de un mismo sustrato de vidrio para dos tipos de nanoestructuras (nanolíneas de oro y nanodiscos de oro), y así poder caracterizar la homogeneidad del proceso de fabricación de nanoestructuras mediante Litografía de Interferometría Láser (LIL). Por ultimo, con el fin de verificar la capacidad biosensora de nuestra plataforma, se aplican dos formatos de medida con un modelo bien conocido formado por una Inmunoglobulina de conejo (IgG) y una anti-inmunoglobulina de conejo producida en cabra (Anti-IgG). Los formatos de medida que se han estudiado son el formato directo y el formato indirecto.

4.1.1. PLATAFORMA EMPLEADA PARA LA CARACTERIZACIÓN Y MONITOREO DE LA DETECCIÓN DE LOS SISTEMAS BIOLÓGICOS

Un biosensor basado en LSPR generalmente consiste en una nanoestructura de oro o plata fabricada sobre un sustrato de vidrio y que es recubierto con un receptor biológico para proporcionar un reconocimiento específico, sin marcador y a tiempo real. Tal y como se ha comentado en el capítulo 1 definiciones generales, el reconocimiento selectivo y específico de las moléculas de interés provocan un cambio en el máximo del espectro de extinción de la nanoestructura, lo que puede usarse como parámetro analítico para la detección. Los espectros de extinción se pueden medir, midiendo la cantidad de radiación que no se transmite debido a dos efectos principales, absorción y difusión de la luz por las nanoestructuras, efectos

considerablemente aumentados en condiciones de LSPR. De esta manera controlando y monitorizando los cambios de estos espectros es posible detectar la presencia o ausencia de moléculas en muestras complejas.

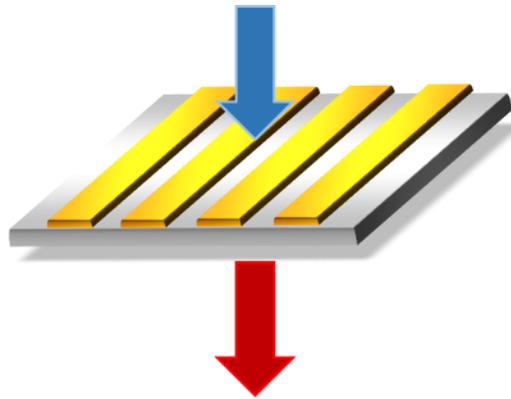


Figura 4.1. Configuración óptica en transmisión.

Las configuraciones ópticas de los biosensores LSPR que trabajan en transmisión se componen por una fuente de luz que interroga la nanoestructura y un detector que recoge la luz transmitida. Se suele utilizar fuente de luz policromática o monocromática, aunque son más habituales los que utilizan luz monocromática. Además, algunas configuraciones suelen utilizar luz polarizada TM. El sistema de detección de luz generalmente suele ser o un fotomultiplicador o una cámara CCD. Estas configuraciones descritas en literatura se asemejan en gran medida a un espectrofotómetro común de laboratorio.

El espectrofotómetro es un dispositivo de laboratorio que permite medir la reflectancia ($R(\lambda)$), transmitancia ($\%T(\lambda)$) o absorbancia ($Abs(\lambda)$) de un objeto, comparando el flujo radiante que incide al objeto frente al flujo reflejado o transmitido por el objeto en función de la longitud de onda (Figura 4.2).

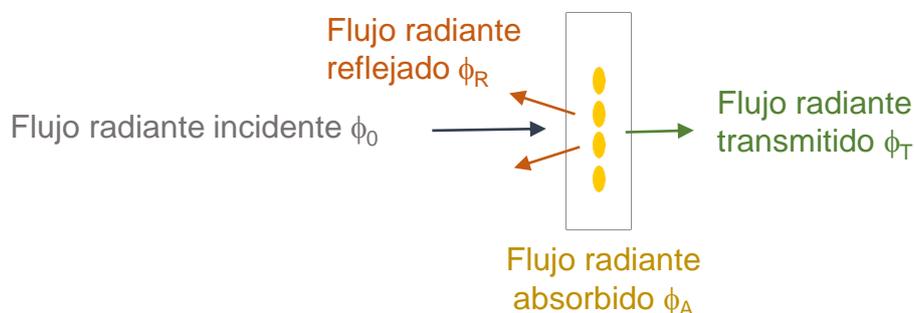


Figura 4.2. Diagrama esquemático de la transmitancia, absorbancia y reflectancia.

Las principales partes del espectrofotómetro son tres, el sistema de iluminación, el sistema monocromador, y el sistema de detección y registro. Los requerimientos para el

sistema de iluminación dependen de la región espectral de interés. Las nanoestructuras suelen presentar el pico LSPR en la región visible. La fuente que dispone el espectrofotómetro de nuestro laboratorio para esta región (visible) es una lámpara de tungsteno de espectro continuo. El monocromador cuenta con una red de difracción 1200 líneas·mm⁻¹ para la región UV-VIS y la detección se realiza a través de un tubo fotomultiplicador (PMT).

El espectrofotómetro permite realizar dos tipos de medida.

(i) Espectros (% transmitancia / absorbancia vs. longitud de onda): En esta configuración se monitoriza la transmitancia (%) o absorbancia (u.a) a cada longitud de onda obteniendo un espectro de transmitancia o absorción. La transmitancia (T) es la relación directa entre la intensidad de radiación inicial (I) y la intensidad de radiación tras atravesar la muestra (I₀). La absorbancia (Abs) se denomina al logaritmo con signo cambiado de la transmitancia.

$$\%T = \frac{I}{I_0} \times 100 \quad Abs = -\log T$$

(ii) Sensogramas (transmitancia / absorbancia vs. tiempo): En esta configuración se monitoriza las variaciones de intensidad en transmitancia o en absorbancia a tiempo real y a una longitud de onda concreta.

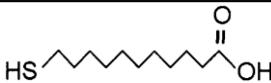
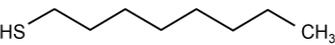
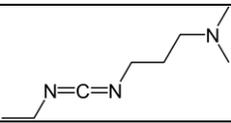
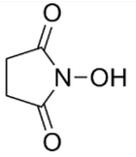
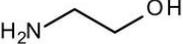
La mayor limitación que presenta el espectrofotómetro para utilizarlo como plataforma de medida LSPR es que sólo permite realizar sensogramas a una longitud de onda concreta, no es posible monitorizar el desplazamiento del pico LSPR en el tiempo, parámetro que se suele utilizar generalmente en los biosensores LSPR.

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1. MATERIALES

El sustrato de vidrio (coverglasses ref L42394-3; 35mm x 64 mm No.2, espesor: 0.3–0.4 mm) se compró en Agar Scientific. El amonio, hidróxido sódico, etanol, ácido sulfúrico y peróxido de hidrógeno para la limpieza de los sustratos se compraron en Panreac. La capa anti-reflejante XHRIC-16 (ARC) fue adquirida en Brewer Science (Rolla, MO). La fotoresina negativa (PR) se adquirió en TOK (Amersfoort, Países bajos). El ácido mercaptoundecanoico y octanotiol para la formación de las monocapas autoensambladas (SAM) en superficies nanoestructuradas de oro se compraron en Sigma Aldrich. 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida para la activación de los grupos carboxilos se adquirió de Thermo Scientific Pierce y el N-hidroxisuccinimida para la inmovilización del anticuerpo se adquirió de Sigma Aldrich. Los anticuerpos Inmunoglobulina de conejo y Anti-Inmunoglobulina de conejo producida en cabra, albumina de suero bovino (BSA), como la solución de bloqueo, etanolamina, se obtuvieron de Sigma Aldrich.

Tabla 4.1. Reactivos para la formación de la monocapa autoensamblada, para la activación de la reacción de unión entre la monocapa y las biomoléculas y para el bloqueo de la superficie.

ABREVIATURA	NOMBRE	PESO MOLECULAR (g/mol)	FÓRMULA QUÍMICA
MUA	Ácido 11-mercaptoundecanoico	218	
OCT	1-Octanotiol	146	
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida	192	
NHS	N-Hidroxisuccinimida	115	
EA	Etanolamina	61	

Soluciones, soluciones tampón y estándares

Para la medición de la sensibilidad de las nanoestructuras, se prepararon soluciones de NaCl (0-15% en peso) disolviendo diferentes cantidades de sal en agua ultrapura.

Para la biofuncionalización y detección de analito se utilizó 10 mM de tampón fosfato salino (PBS) pH 7,5. La regeneración de la unión IgG-anti IgG se obtuvo con 0,02 M de HCl. La solución *Piraña*, H₂SO₄ (96%-98%): H₂O₂ (30%): H₂O en una relación (1:1:1) se utilizó para la regeneración total de la superficie nanoestructurada.

4.2.2. MÉTODOS

4.2.2.1. Fabricación de nanoestructuras de oro

La fabricación de las nanoestructuras se realizaron mediante metodologías habituales en CEMITEC (Noain, Navarra) (Fernandez et al. 2014). A continuación se presenta una breve descripción de la fabricación de las nanoestructuras que se han utilizado en este trabajo.

Las nanoestructuras de oro se fabricaron sobre una superficie de vidrio (boro silicato) de 35 mm x 64 mm x 0.35 mm. Para la fabricación de las nanoestructuras se combinó la Litografía por Interferencia Láser (LIL) con varios procesos de grabado por iones reactivos (RIE, del inglés *Reactive Ion Etching*) y proceso *lift-off* (Fernandez et al. 2014).

El proceso de fabricación comienza con la deposición de tres películas de diferentes materiales sobre la superficie de vidrio. La primera capa es un anti-reflejante (ARC, del inglés *Anti-Reflective Coating*), que se deposita a través de un equipo de deposición de películas delgadas por centrifugación (en inglés, *Spin Coater* de la casa Laurell). Esta capa es necesaria para minimizar las reflexiones indeseadas que se forman en la superficie del sustrato cuando la muestra es expuesta a la luz láser en el proceso de LIL. La siguiente capa, es una capa fina de SiO₂, que se evapora sobre el ARC con el evaporador de haz de electrones (Pfeiffer Classic 5000). Esta capa tiene como objetivo mejorar la transferencia del patrón desde la fotoresina hasta el sustrato. Finalmente se deposita una capa de fotoresina con el *Spin Coater*, donde se marcará el patrón que se desea obtener. Las fotoresinas son materiales poliméricos sensibles a la luz, es decir, la solubilidad de las mismas en un revelador se ve afectada cuando son expuestas a determinada radiación con su correspondiente longitud de onda.

Los sustratos con las tres capas depositadas se colocan en el equipo Lloyd's mirror LIL, y se exponen a un láser de He-Cd ($\lambda = 325\text{nm}$) para obtener un patrón de líneas. Si el sustrato se expone al laser dos veces, girando la muestra 90°, se obtiene un patrón de agujeros o pilares (la resina negativa formará una estructura periódica de agujeros mientras que la resina positiva formará una estructura periódica de pilares). Estos patrones se transfieren al ARC y SiO₂ a través del grabado por iones reactivos (RIE, de la casa *Plasma Lab System 80; Oxford Instruments*) con plasmas de CF₄ y O₂ respectivamente dando lugar a patrones de líneas o agujeros.

Posteriormente se deposita una capa de oro de unos 50 nm para crear la nanoestructura de oro. Es necesario añadir una capa delgada de cromo (~ 3 nm) entre el oro y el sustrato de vidrio para favorecer la adherencia del oro al vidrio y así conferir mayor estabilidad al transductor plasmónico. Para terminar, las muestras son sumergidas en una solución de H₂O₂:NH₃:H₂O (1:1.5:4) para realizar el proceso denominado en inglés *lift-off*. Los patrones de oro se forman con la forma correspondiente a la versión negativa del ARC/SiO₂ ya que son eliminados de la superficie con este último proceso. Por lo tanto, los patrones de oro

de líneas o discos se obtienen utilizando inicialmente fotoresinas de líneas o agujeros respectivamente. En la siguiente figura se presenta el esquema del proceso de fabricación:

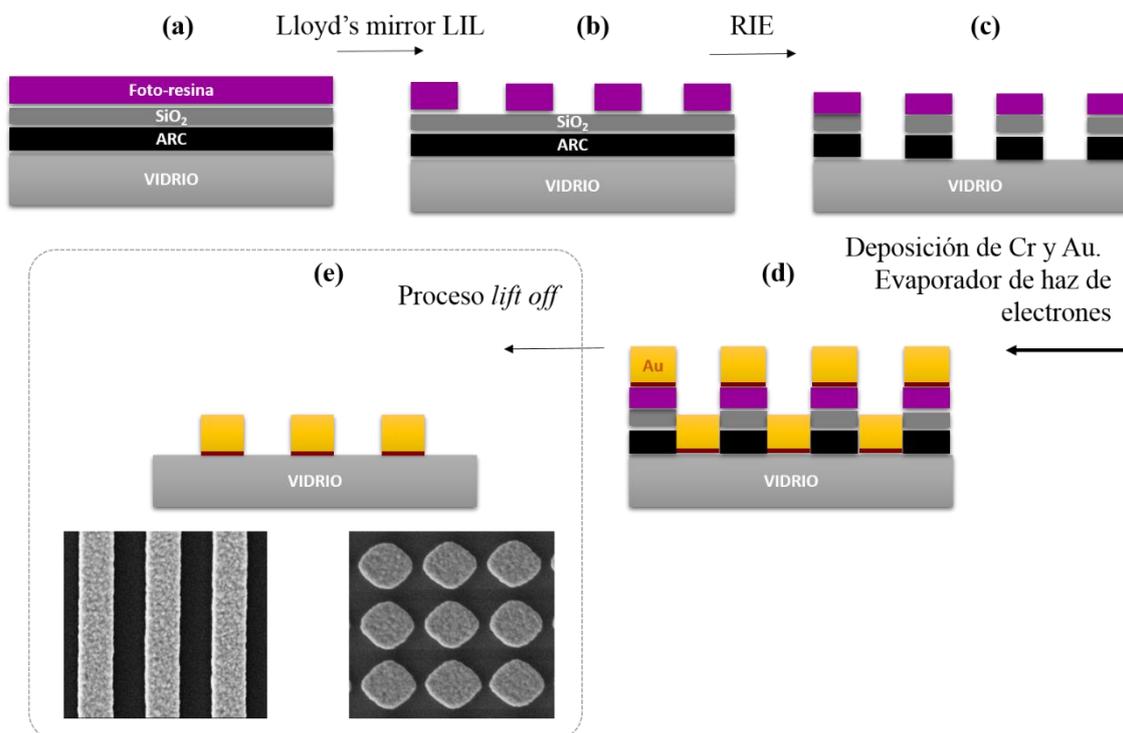


Figura 4.3. Esquema del proceso de fabricación de nanoestructuras de líneas y discos: (a) deposición de ARC, SiO₂ y fotoresina sobre superficie de vidrio, (b) patrón formado en la fotoresina a través de LIL con la configuración Lloyd's mirror y su posterior revelado, (c) transferencia del patrón hasta el sustrato, (d) evaporación de cromo y oro sobre el patrón y (e) nanoestructuras de nanolíneas o nanodiscos de oro tras el proceso lift-off.

Se fabricaron dos nanoestructuras, una de nanolíneas de oro y otra de nanodiscos de oro. A continuación se presentan las dimensiones y características de las nanoestructuras que se han utilizado en este trabajo:

Nanoestructuras	Periodo (nm)	Motivo (nm)	Cromo (nm)	Oro (nm)
Nanolíneas	600	330 ⁽¹⁾	3	50
Nanodiscos	600	450 ⁽²⁾	3	50

(1) Anchura de línea

(2) Diámetro de disco

Las superficies se cortaron en fragmentos con dimensiones aproximadas de 22 mm x 7 mm, obteniendo unos 10-12 fragmentos de nanoestructuras por sustrato de vidrio. Todas las nanoestructuras se caracterizaron frente a diferentes índices de refracción y se observaron al microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FE-SEM).

4.2.2.2. Plataforma empleada para la caracterización y monitoreo de la detección de los sistemas biológicos

Celda fluidica y sistema fluidico:

La celda fluídica consiste en un único canal fluídico de 2 mm de ancho por 17 mm de largo, formado por una máscara de silicona de 500 μm de espesor, entre la nanoestructura y la ventana de metacrilato. El volumen del canal es de 17 μL . Los agujeros de entrada y salida de los tubos de los fluidos están taladrados en la ventana de metacrilato y se insertan por presión. Los agujeros de entrada y salida coinciden con los extremos de la máscara de silicona, para minimizar volúmenes muertos. El líquido fluye de abajo hacia arriba, tal y como se muestra en la Figura 4.4. El sistema se cierra mediante dos tapas de aluminio anodizados, que lleva en su interior un hueco donde acomodar la nanoestructura, la membrana de silicona y la ventana de metacrilato. Las dimensiones externas de la celda se asemejan a las de una cubeta de espectrofotómetro y encaja en cualquier compartimento para cubetas:

Dimensiones externas de la celda: 11,4 x 12,6 x 45 mm
 Geometría del canal: rectangular
 Longitud del canal: 17 mm
 Anchura del canal: 2 mm
 Profundidad del canal: 0,5 mm
 Volumen del canal: 17 μL

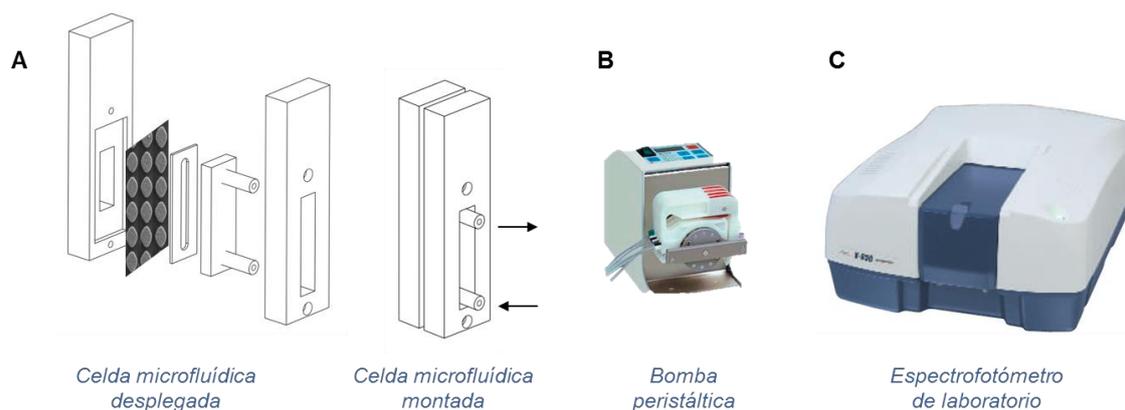


Figura 4.4. A) Celda fluídica: A la izquierda, la celda desplegada: tapa, nanoestructura, máscara de silicona, ventana de metacrilato con los tubos de entrada y salida, y tapa para cerrar y sellar la celda. A la derecha la celda montada, con la entrada y salida de fluidos. B) Bomba peristáltica y C) Espectrofotómetro de laboratorio.

Para que el flujo sea continuo se utilizó una bomba peristáltica (ISMATEC modelo ISM834). Se utilizaron tubos de *tygon*[®] con un diámetro interno de 0,25 mm y se trabajó a un flujo constante de 50 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ (Figura 4.4-B).

Equipo de medida: espectrofotómetro

La respuesta óptica de la nanoestructura se midió con el espectrofotómetro JASCO-V670 (Figura 4.4-C). El espectrofotómetro de doble haz, utiliza un monocromador capaz de cubrir un rango de longitud de onda desde el ultravioleta (UV) hasta el infrarrojo cercano (NIR) (190-2500 nm). El monocromador cuenta con dos redes de difracción intercambiables, para la región UV-VIS, 1200 líneas- mm^{-1} y para la región NIR, 300 líneas- mm^{-1} . La detección se realiza

a través de dos detectores, un tubo fotomultiplicador (PMT) para la región UV-VIS y un detector de PbS para la región NIR. El pico LSPR de las nanoestructuras se encuentra en la región visible del espectro.

Se realizaron dos tipos de medida, espectrales y sensogramas, en función de los diferentes parámetros instrumentales del equipo: (1) ancho de banda espectral (ABE), (2) Intervalo de datos (ID) y (3) velocidad de escaneo (VE).

(i) Espectros (transmitancia o absorbancia vs. longitud de onda): Se midieron los espectro desde 900 nm hasta 600 nm de longitud de onda a dos velocidad de escaneo (40 y 200 nm·min⁻¹), con un intervalo de datos de (0,1 y 0,025 nm) a varios ancho de banda (0,1 nm, 0,5 nm, 1 nm, 2 nm, 5 nm y 10 nm).

(ii) Sensogramas (absorbancia vs. tiempo): los sensogramas se midieron a una longitud de onda concreta que varía en función de la nanoestructura, con un intervalo de recogida de datos de 0,5- 1 segundos y a dos anchos de banda 1 y 2 nm.

4.2.2.3. Determinación de la sensibilidad y nivel de ruido

La sensibilidad de las nanoestructuras de nanolíneas y nanodiscos se midió haciendo pasar por el sensor soluciones de índice de refracción (IR) crecientes. Para ello se prepararon soluciones de 0, 1, 3, 6, y 10 % de NaCl (en peso), obteniendo soluciones de IR de 1,333, 1,3347, 1,3383, 1,3435, y 1,3505 respectivamente (20°C). Se adquirieron los espectros de transmisión para cada IR y se midió la sensibilidad en tres zonas del espectro:

1.- El desplazamiento de λ_{LSPR} (nm) en transmitancia y en absorbancia registrada frente al cambio del índice de refracción experimentado por el medio externo. La pendiente de la regresión lineal representa la sensibilidad (nm·RIU⁻¹).

2.- El desplazamiento de la $\lambda_{\%Tcte}$ (nm) a una transmitancia constante o la $\lambda_{Abs\ cte}$ (nm) a una absorbancia constante en una zona intermedia entre el mínimo o máximo del pico LSPR frente al cambio del índice de refracción experimentado por el medio externo. La pendiente de la curva representa la sensibilidad (nm·RIU⁻¹).

3.- La variación de la Transmitancia (%T) o Absorbancia (Abs) a una longitud de onda constante registrada frente al cambio del índice de refracción experimentado por el medio externo. La pendiente de la regresión lineal representa la sensibilidad (%T·RIU⁻¹ o Abs·RIU⁻¹).

El nivel del ruido (N) de los sensogramas se calculó como el nivel de incertidumbre en la variación de la señal cuando las soluciones de sal están fluyendo por la celda. El límite de detección (la señal mínima detectable) de las nanoestructuras se calculó como el mínimo cambio de índice de refracción que genera una señal detectable:

$$SO = 3 \cdot N$$

Ecuación 4.1

donde SO (unidades de absorbancia) es la señal óptica y N es el ruido. La resolución del sistema en RIUs se calculó dividiendo la señal detectable (SO) por la sensibilidad de la nanoestructura ($\text{Abs} \cdot \text{RIU}^{-1}$).

La anchura a media altura (FWHM, nm) se calculó teniendo en cuenta la altura máxima del pico LSPR tal y como se muestra en la siguiente figura. La figura de mérito (FOM) se calculó dividiendo la sensibilidad λ_{LSPR} por FWHM (RIUs^{-1}).

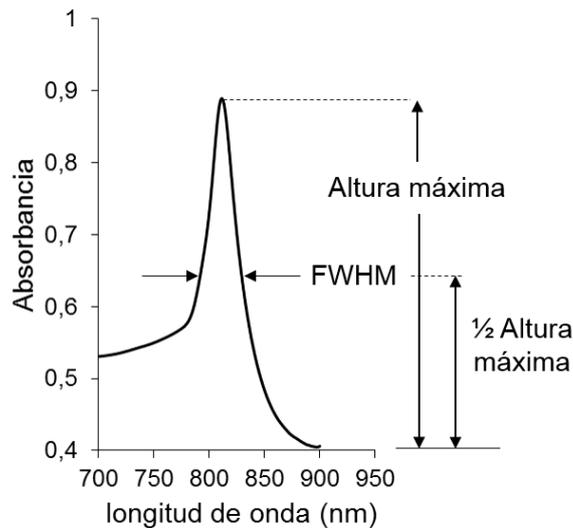


Figura 4.5. Representación gráfica de la anchura a media altura (FWHM).

4.2.2.4. Biofuncionalización de superficies con biomoléculas

Formación de la monocapa auto-ensamblada (SAM): Como nexo de unión entre la nanoestructura y las biomoléculas, se ha utilizado una SAM mixta compuesta por dos alcanotioles. Ambas moléculas son de cadena corta y en uno de sus extremos presentan un grupo tiol por donde se unirá al oro, quedando el otro grupo expuesto al exterior. El MUA presenta un grupo funcional carboxilo y el OCT un grupo metilo, siendo el OCT más corto que el MUA.

Sobre las nanoestructuras de oro se crearon monocapas ordenada mediante la inmersión de éstas en una disolución de 3.5 mM de MUA y de 7.5 mM de OCT en etanol absoluto (desgasado previamente) durante 20 horas como mínimo.

Tras la formación de la monocapa, las nanoestructuras se limpiaron con etanol y agua, y finalmente se secaron con nitrógeno. Posteriormente la nanoestructura se introdujo en la celda fluidica para luego introducirla en el espectrofotómetro. A partir de aquí los siguientes pasos, se realizaron a flujo constante y monitorizado por el espectrofotómetro.

Biofuncionalización de nanoestructuras de oro con el bioreceptor: El anticuerpo (IgG o anti-IgG) se inmovilizó covalentemente a la superficie del sensor. La inmovilización del anticuerpo se realizó en la celda fluidica a flujo continuo ($50 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$). En primer lugar se realizó la activación de los grupos carboxilos de la monocapa de alcanotioles creada en la superficie con una mezcla de 40 mM EDC (Clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilamino-propil) carbodiimida) y 20 mM NHS (N-hidroxisuccinimida), en agua miliQ durante 15 min. De esta manera se crean compuestos reactivos intermedios que pueden reaccionar con grupos aminos libres del anticuerpo. Seguidamente, se hizo pasar tampón PBS y a continuación se realizó la inmovilización de $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de anticuerpo en tampón PBS, pH 7.4 durante 30 min. Posteriormente, se hizo pasar el tampón PBS para limpiar la superficie y dos ciclos de 15 mM de HCl durante 2 min para desorber el anticuerpo que podría haberse unido a la superficie por adsorción y no por una unión covalente. Finalmente el proceso de tapizado se terminó con el bloqueo de la superficie con 0,25 M de etanolamina (EA) a pH 8,5, que inactiva todos los grupos libres activados que quedan libres en la superficie.

En la siguiente figura se observa esquemáticamente los pasos que se dan en la inmovilización del anticuerpo:

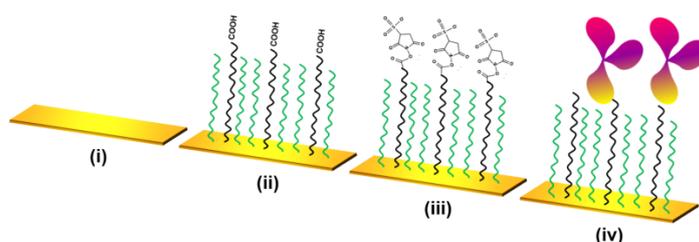


Figura 4.6: Inmovilización del bio-receptor en una superficie de oro: (i) superficie limpia de oro, (ii) Desarrollo de una monocapa ordenada de alcanotioles en una superficie de oro. (iii) activación de los grupos carboxilos a través de los reactivos EDC + NHS, (iv) unión covalente entre las aminas del anticuerpo y los grupos carboxilos activados.

Curva de calibrado: se hizo pasar una serie de estándares de Anti-IgG (0-666 nM) o IgG (0-133 nM) dependiendo del formato de medida durante 10 min por la celda, posteriormente se limpió la superficie durante 5 min con PBS. Se inyectó desde la concentración más baja a la más alta. Tras cada solución de estándar, se regeneró la unión antígeno-anticuerpo, inyectando una solución de 20 mM de HCl. El tiempo de regeneración dependió de la concentración del estándar inyectado. La curva de calibración se construyó representando la variación de absorbancia (ΔAbs) frente a la concentración de analito (nM). La curva se ajustó a una función hiperbólica.

Regeneración total de la nanoestructura: se llevaron a cabo dos métodos de limpieza para aplicarlo a las nanoestructuras: (a) Tratamiento con plasma de oxígeno (RIE): siendo las condiciones óptimas las siguientes: Presión de cámara: 20 mTorr; Potencia de radiofrecuencia:

20 W y Tiempo de grabado: 10 min. Y (b) ataque químico con solución piraña ($\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{O}$) durante 1 min 30 s por cada ciclo.

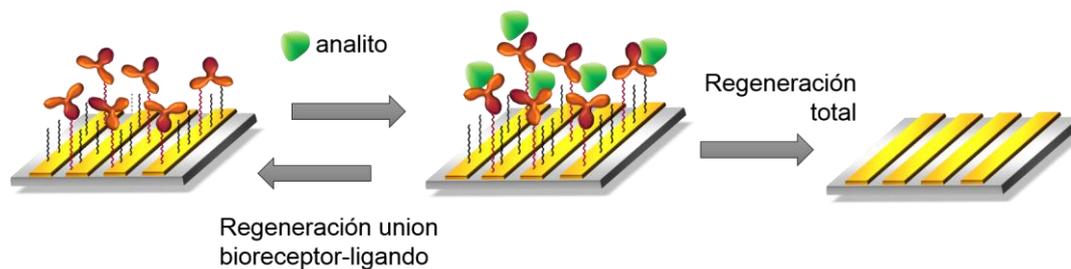


Figura 4.7. Se han representado dos tipos de regeneraciones. La regeneración de la unión bioreceptor-analito y la regeneración total de la superficie nanoestructurada (eliminación de toda materia orgánica).

4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1. CARACTERIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS INSTRUMENTALES DEL ESPECTROFOTÓMETRO

El ruido del sistema óptico depende de diversos factores como la fuente de luz, el detector, la estabilidad mecánica y térmica, el tipo y herramientas de procesado de señal y el sistema de flujo utilizado. En un espectrofotómetro, muchos de estos parámetros vienen definidos por el equipo, sin embargo, algunos parámetros como el ancho de banda espectral, la velocidad de escaneo o el intervalo de recogida de datos pueden ser seleccionados entre varios valores.

En primer lugar se realizó una caracterización de estos parámetros instrumentales del espectrofotómetro, con el objeto de encontrar las condiciones óptimas de trabajo con nanoestructuras periódicas de oro, tanto en modo espectral como en modo sensograma.

4.3.1.1. Modo espectral

Al trabajar en modo espectral el espectrofotómetro permite seleccionar los parámetros de ancho de banda espectral, velocidad de escaneo e intervalo espectral.

El **ancho de banda espectral (ABE)** se define como el intervalo de longitudes de onda de radiación saliente de la rendija de salida del monocromador medido en la mitad de un pico del flujo radiante detectado. Así el ABE determina el rasgo espectral más estrecho que puede resolver un espectrofotómetro. El espectrofotómetro posee los siguientes anchos de banda: 0,1 nm, 0,5 nm, 1 nm, 2 nm, 5 nm, y 10 nm.

El área iluminada de la celda dependerá del ancho de banda que se seleccione en el equipo. En la Figura 4.8, se puede observar cómo el área iluminada de la celda varía en función del ancho de banda espectral. Para el caso de un ABE de 2 nm las dimensiones del haz de luz son de 1,5 x 11 mm mientras que para un ABE de 10 nm son de 6 x 11 mm.

Las dimensiones de la ventana óptica de la celda fluidica que se ha utilizado en este trabajo sin embargo son de 2 x 12 mm, y la base de la ventana se sitúa a 9 mm de la base del portacelda (Figura 4.13 y Figura 4.8). La altura del haz de luz sin embargo es de 11 mm e ilumina de la base del portacelda a 7,5 mm. Estas pequeñas diferencias hacen que al trabajar con un ABE de 2 nm se aprovecha el 86% del área de iluminación del espectrofotómetro, mientras que al trabajar con un ABE de 10 nm únicamente se aprovecha un 29 %. Este efecto se debe únicamente al diseño de la celda fluidica.

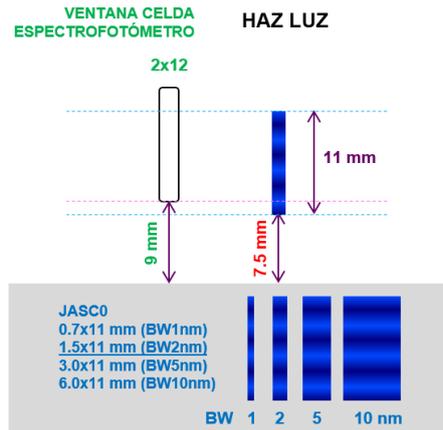


Figura 4.8. Dimensiones de la ventana óptica de la celda (2 mm x 12 mm) y el haz de luz. Área de iluminación del espectrofotómetro JASCO V670 para los anchos de banda espectrales de 1 nm, 2 nm, 5 nm y 10 nm.

Para caracterizar el efecto del ABE en la respuesta óptica de las nanoestructuras, se seleccionaron una velocidad de escaneo ($200 \text{ nm}\cdot\text{min}^{-1}$) y un intervalo de datos ($0,1 \text{ nm}$) constantes y se fue variando el ABE. Para cada medida se realizó inicialmente la referencia con su correspondiente ABE. Se midieron los espectros de transmitancia en agua en la región donde presenta el pico LSPR, entre 900 nm y 600 nm, para una nanoestructura de nanodiscos (Figura 4.9).

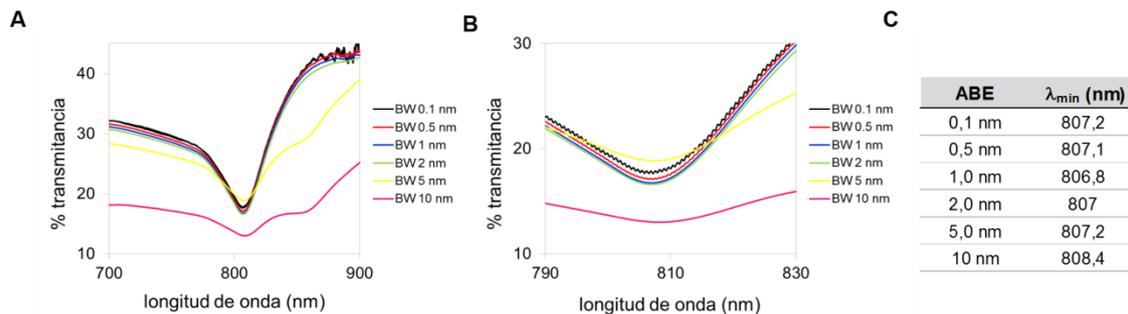


Figura 4.9. Espectros de transmitancia de una nanoestructura de nanodiscos a diferentes ABE: 0,1 nm (negro), 0,5 nm (rojo), 1 nm (azul), 2 nm (verde), 5 nm (amarillo) y 10 nm (rosa) (A) de 700 a 900 nm y (B) de 790 a 830 nm. C) Longitud de onda del mínimo a los diferentes ABE.

Los espectros obtenidos con anchos de banda de 0,1 nm, 0,5 nm, 1 nm y 2 nm, fueron parecidos en cuanto a forma e intensidad de señal, mientras que los espectros obtenidos con anchos de banda de 5 nm y 10 nm fueron diferentes tanto en forma como en intensidad de señal. Para estos dos anchos de banda, el mínimo de transmitancia tendió a desaparecer.

A medida que se disminuyó el ABE, el ruido en el espectro fue mayor (Figura 4.9-B). Los espectros obtenidos con anchos de banda de 0,1 nm y 0,2 nm fueron muy ruidosos comparando con el ruido del resto de espectros.

La posición del mínimo también varió en función del ancho de banda, aunque esta variación no fue muy significativa en la mayoría de los casos encontrándose alrededor de ~ 807

nm. El ancho de banda de 10 nm fue el único que presentó el mínimo ligeramente desplazado al infrarrojo (808,4 nm) y diferente al resto.

A partir de los resultados obtenidos, los ABE más indicados para trabajar en modo espectral con nanoestructuras y con el espectrofotómetros JASCO fueron 1 nm y 2 nm.

La velocidad de escaneo (VS), es la velocidad de barrido del rango de longitudes de onda que se han seleccionado para realizar el espectro ($\text{nm}\cdot\text{min}^{-1}$). El equipo presenta velocidades desde $10 \text{ nm}\cdot\text{min}^{-1}$ hasta $4000 \text{ nm}\cdot\text{min}^{-1}$. El intervalo de recogida de datos (ID), es el intervalo de longitud de onda de recogida de datos (nm). El espectrofotómetro presenta las opciones de 0,025, 0,05, 0,1, 0,2, 0,5, 1, 2, y 5 nm. Estos parámetros están interrelacionados, por ejemplo a una velocidad de $200 \text{ nm}\cdot\text{min}^{-1}$ no es posible recoger datos con un intervalo espectral menor a 0,1 nm. Por lo tanto, los valores de intervalos de datos que se pueden seleccionar en el espectrofotómetro varían dependiendo de la velocidad de escaneo o viceversa. En función de estas condiciones se seleccionaron tres condiciones diferentes.

Se probaron dos velocidades de escaneo, una intermedia $200 \text{ nm}\cdot\text{min}^{-1}$ y otra más lenta $40 \text{ nm}\cdot\text{min}^{-1}$. Se seleccionaron dos intervalos de datos (0,2 nm y 0,025 nm) a un ABE de 2 nm. En la Figura 4.10 se muestran las condiciones de ensayo y los espectros obtenidos a dos índices de refracción, líneas sólidas IR: 1,3330 y líneas discontinuas IR: 1,3505.

Parámetros	Exp1	Exp2	Exp3
Velocidad de escaneo (nm/min)	200	40	40
Intervalo de datos ¹ (nm)	0,1	0,1	0,025
ABE (nm)	2	2	2

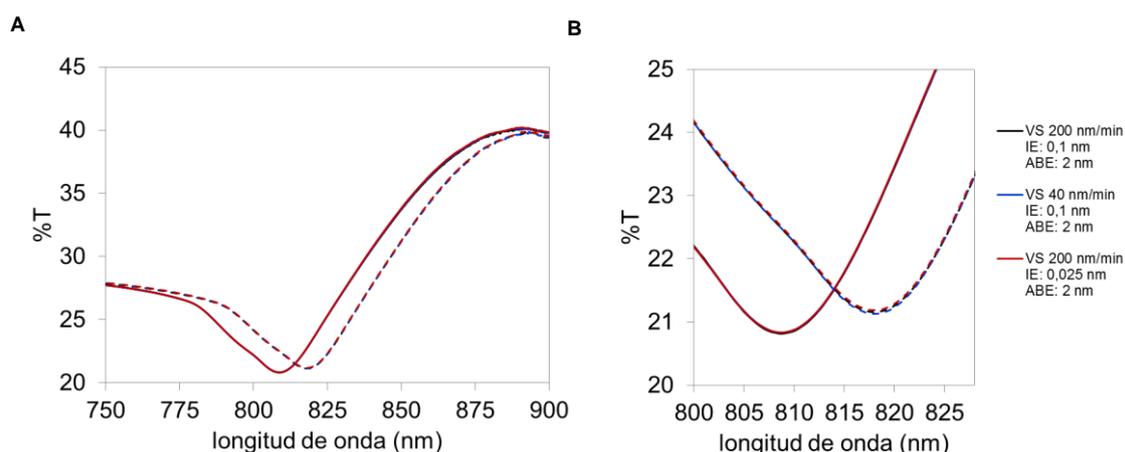


Figura 4.10. Condiciones de ensayos. Espectros de transmitancia de una nanoestructura de nanodiscos, (A) de 750 a 900 nm y (B) de 800 a 825 nm. - Línea sólida IR: 1,3330, - - Líneas discontinua IR: 1,3505. En negro: VS: $200 \text{ nm}\cdot\text{min}^{-1}$; IE: 0,1 nm; ABE: 2 nm. En azul: VS $40 \text{ nm}\cdot\text{min}^{-1}$; IE: 0,1 nm; ABE: 2 nm. En rojo: VS $40 \text{ nm}\cdot\text{min}^{-1}$; IE: 0,025 nm; ABE: 2. VS: velocidad de escaneo; IE: intervalo de datos; ABE: ancho de banda espectral.

Los espectros obtenidos aplicando los diferentes parámetros de velocidad de escaneo e intervalo espectral, fueron prácticamente idénticos entre sí, en los dos IR. Se probaron otros IR intermedios obteniendo el mismo resultado, indicando que estos dos parámetros no son críticos a la hora de trabajar con nanoestructuras en modo espectral.

Finalmente, tras el análisis completo se seleccionaron los siguientes parámetros para trabajar en modo espectral:

<i>Parámetros espectrofotómetro</i>	<i>Modo espectral</i>
<i>Velocidad de escaneo (nm/min)</i>	200
<i>Intervalo espectral (nm)</i>	0,1
<i>ABE (nm)</i>	2

4.3.1.2. Modo sensograma

En esta configuración se pueden monitorizar las variaciones de intensidad en transmitancia o en absorbancia a tiempo real y a una longitud de onda concreta. Debido a las características de nuestras nanoestructuras, siempre monitorizamos las variaciones en absorbancia al trabajar en modo sensograma. Esto se debe a que las longitudes de onda más sensibles a cambios de índice de refracción debido a biomoléculas, presentan un cambio positivo en absorbancia al incrementar el índice de refracción.

Al trabajar en modo sensograma, el único parámetro que se puede modificar es el ABE. Con el objetivo de encontrar las condiciones óptimas para el modo sensograma, se adquirieron datos de absorbancia de una nanoestructura de nanodiscos a un flujo constante de agua ($50 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$) durante un cierto tiempo a la longitud de onda donde la sensibilidad era máxima. Se midió el ruido del sensograma como las fluctuaciones de la absorbancia al hacer pasar un flujo constante de agua ($50 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$). En la Figura 4.11 se presentan los resultados obtenidos:

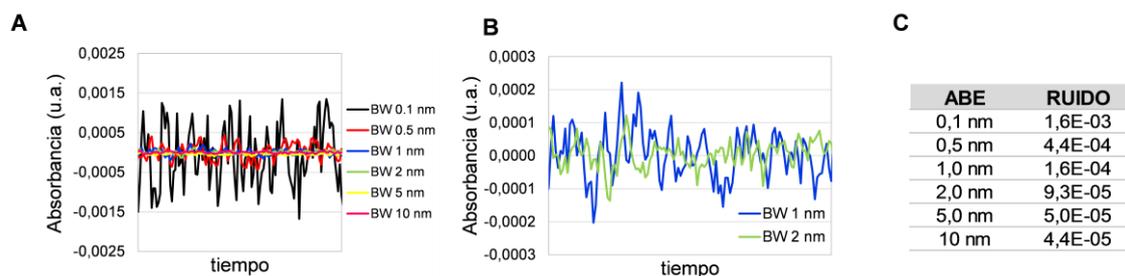


Figura 4.11. **A)** Sensograma (absorbancia vs. tiempo) de una nanoestructuras de nanodiscos a un ABE de 0,1 nm (negro), 0,5 nm (rojo), 1 nm (azul), 2 nm (verde), 5 nm (amarillo) y 10 nm (rosa). **B)** Sensograma (absorbancia vs. tiempo) de una nanoestructuras de nanodiscos a un ABE de 1 nm y 2 nm. **C)** Tabla con valores del ruido obtenido para cada ABE (Abs).

A medida que disminuye el ABE el ruido aumenta. Si comparamos entre el ABE de 0,1 nm y 10 nm, el ruido aumenta 36 veces para el ABE de 0,1 nm. Los ABE de 5 y 10 nm fueron

los menos ruidosos, pero teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la caracterización espectral, al no presentar un mínimo de transmitancia LSPR pronunciado, no resultan ser adecuados.

Al igual que en el modo espectral, los ABE de 1 nm y 2 nm parecían ser los más adecuados. En la Figura 4.11-B, se han representado los sensogramas de los anchos de banda de 1 nm y 2 nm. El ruido fue 1,7 veces mayor para el ancho de banda de 1 nm.

Para terminar, se calculó la sensibilidad y el ruido con los dos anchos de banda seleccionados, 1 nm y 2 nm. Para ello se hizo pasar soluciones de NaCl, con diferentes índices de refracción por la celda (IR: 1,3330, 1,3347, 1,3383, 1,3435, 1,3505, y 1,3594) a un flujo constante ($50 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$) y se midió cómo variaba la absorbancia en el tiempo a una longitud de onda determinada ($\lambda = 820 \text{ nm}$). En la Figura 4.12-A, se observa como la nanoestructura no presenta histéresis en la medida, obteniendo tanto al aumentar como al disminuir el índice de refracción, el mismo salto y volviendo al punto inicial con los dos anchos de banda.

El ancho de banda de 1 nm presentó saltos más grandes. Para el cálculo de sensibilidad, se utilizaron los valores obtenidos entre 1,3330, 1,3347, 1,3383, 1,3435 y 1,3505, ya que con índices de refracciones mayores se perdía ligeramente la linealidad (Figura 4.12 B). Se obtuvieron sensibilidades de λ_{LSPR} de $6,2 \text{ Abs}\cdot\text{RIU}^{-1}$ y $5,9 \text{ Abs}\cdot\text{RIU}^{-1}$ para los anchos de banda de 1 nm y 2 nm respectivamente (Figura 4.12-B). En cuanto al ruido, se obtuvieron valores promedio de ruido de 2×10^{-4} y 1×10^{-4} Abs con el ABE de 1 nm y 2 nm respectivamente, 1,8 veces más ruidoso con el ABE de 1 nm, Figura 4.12-C.

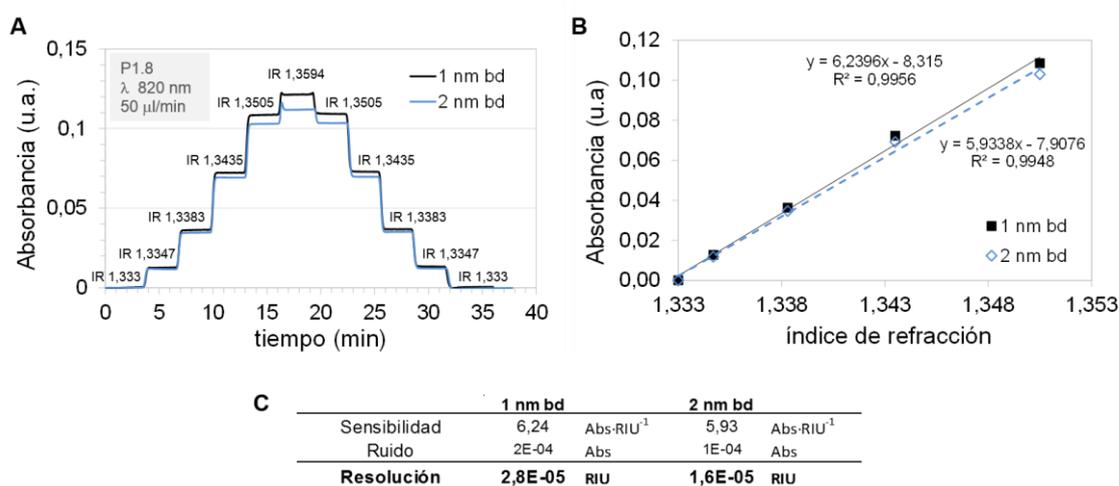


Figura 4.12. A) Sensograma a $\lambda_{820 \text{ nm}}$ (absorción vs. tiempo) para una nanoestructura de nanodiscos en función de diferentes índices de refracción (IR: 1,3330, 1,3347, 1,3383, 1,3435, 1,3505, 1,3594, 1,3505, 1,3383, 1,3347, y 1,3330): - ABE 1 nm y - ABE 2 nm. **B)** Variación de la absorbancia a $\lambda_{820 \text{ nm}}$ en función del índice de refracción del medio dieléctrico para ABE de ■ 1 nm y ◇ 2 nm; y **C)** Tabla donde se presentan la sensibilidad ($\text{Abs}\cdot\text{RIU}^{-1}$), el ruido (Abs) y la resolución (RIU) de la nanoestructura a un ABE de 1 nm y 2 nm.

La respuesta sensora de un dispositivo depende de la resolución, es decir del cociente entre la variación de señal producida en la absorbancia ante los cambios de índice de refracción del medio externo (sensibilidad) y el nivel de incertidumbre de esa variación de señal (el ruido del sistema). Se obtuvieron resoluciones de $2,8 \cdot 10^{-5}$ RIU y $1,6 \cdot 10^{-5}$ RIU⁻¹ para ABE de 1 nm y 2 nm respectivamente para esta nanoestructura en concreto (la resolución fue 1,7 veces mejor para un ABE de 2 nm). A partir de estos resultados se estableció trabajar con un ABE de 2 nm tanto en modo sensograma como espectral.

4.3.2. NANOESTRUCTURAS COMO TRANSDUCTORES PLASMÓNICOS

En el transcurso de este trabajo se han estudiado dos tipos de nanoestructuras periódicas de oro: nanolíneas rectangulares y nanodiscos. Entre todos los metales que pueden presentar la resonancia del plasmón superficial localizado (Au, Ag, Al, etc (W. Li, Ren, and Zhou 2016)), se seleccionó el oro, principalmente por dos razones: (i) La química superficial de oro se ha estudiado durante muchos años y es bien conocida, y (ii) es un metal inerte que no reacciona con el agua y el oxígeno, imprescindible para el desarrollo de un biosensor. La nanoestructuras de plata por ejemplo, presenta una mayor sensibilidad a cambios de índice de refracción, sin embargo químicamente no son tan inertes, y como material para desarrollar biosensor no son tan interesantes.

Se eligieron las nanoestructuras de nanolíneas y nanodiscos por dos razones: (i) la fabricación de estas dos nanoestructuras estaba optimizada, (ii) las sensibilidades que se obtenían eran buenas y correspondían con valores obtenidos en literatura y (iii) debido a la simetría de los nanodiscos (red cuadrada), estas estructuras son independientes a la polarización (el espectrofotómetro no utiliza luz polarizada) (Callewaert et al. 2016).

Las nanoestructuras periódicas se fabricaron mediante litografía por interferometría láser (LIL). Esta técnica tal y como se ha comentado anteriormente, presenta como principal ventaja, la fabricación de nanoestructuras periódicas homogéneas en grandes superficies (35 mm x 64 mm) y en poco tiempo. Sin embargo, experimentalmente, se observó que existían pequeñas diferencias entre los diferentes fragmentos de nanoestructuras de una misma oblea, más pronunciado para el caso de los nanodiscos. Con el fin de conocer la variabilidad que existía en una misma oblea, se realizó una caracterización física de los dos tipos de nanoestructuras seleccionados.

Dado que el espectrofotómetro compara el flujo radiante que incide al objeto frente al flujo transmitido por el objeto en función de la longitud de onda, el primer lugar se realizó un estudio de los espectros en transmitancia. Posteriormente se realizó el mismo estudio pero con los espectros en absorbancia. Recordar que la absorbancia (Abs) se denomina al logaritmo con signo cambiado de la transmitancia.

4.3.2.1. Caracterización física de nanoestructuras de líneas

Las nanoestructuras de nanolíneas se fabricaron sobre una superficie de vidrio (borosilicato) de 35 mm x 64 mm x 0.3-0.4 mm. La superficie de vidrio se partió por la mitad, y de cada mitad se obtuvieron 5 fragmentos, en total, 10, tal y como se muestran en la Figura 4.13 (los fragmentos 7.02, 7.03, 7.04, 7.05 y 7.06 de la mitad de arriba y los fragmentos 7.07, 7.08, 7.09, 7.10 y 7.11 de la mitad de abajo). Las dimensiones de cada fragmento fue de unos 22 mm x 7 mm aproximadamente.

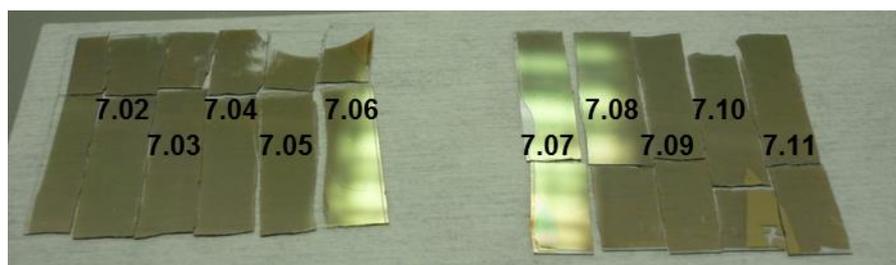
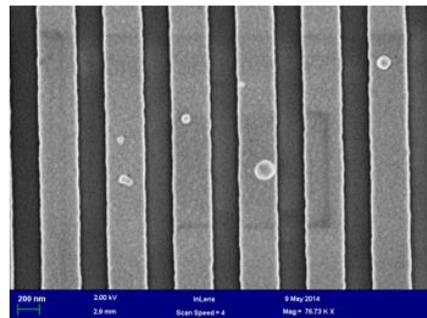
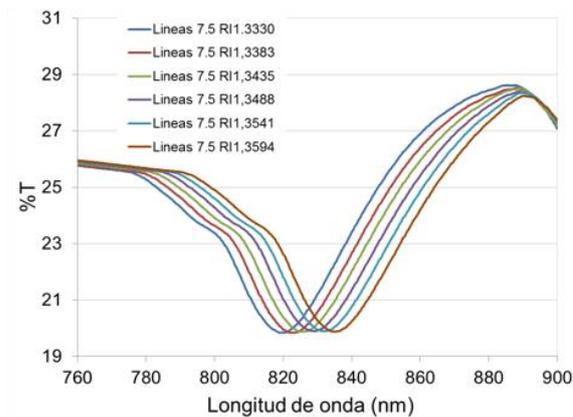
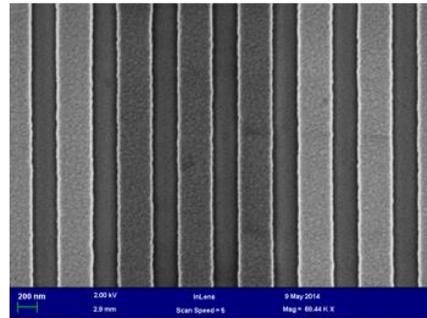
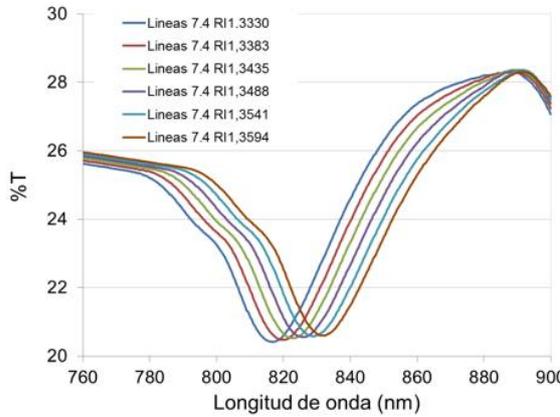
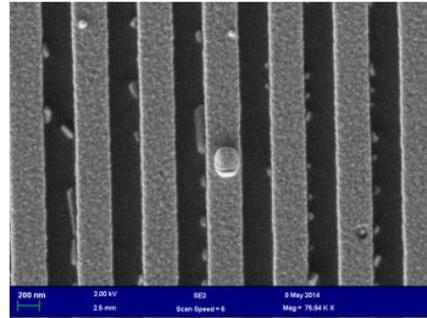
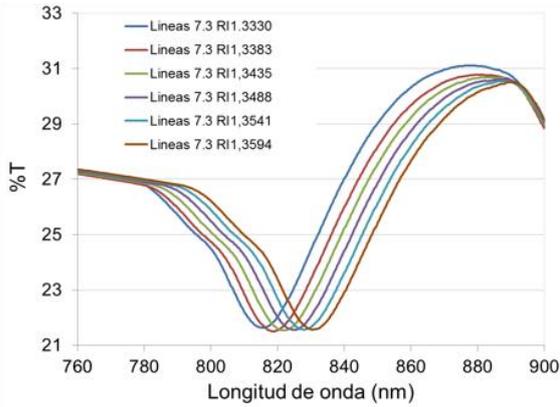
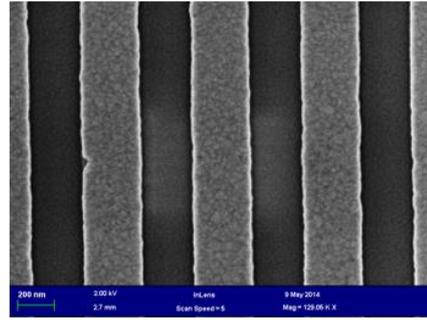
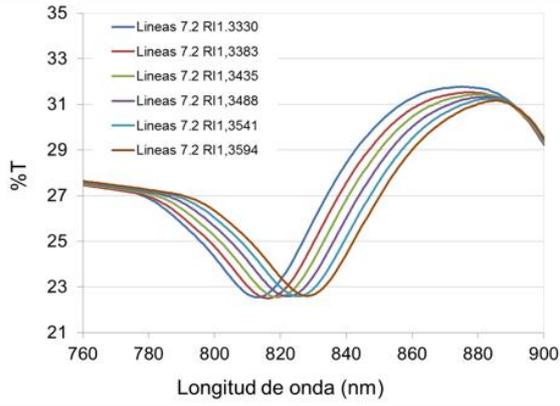
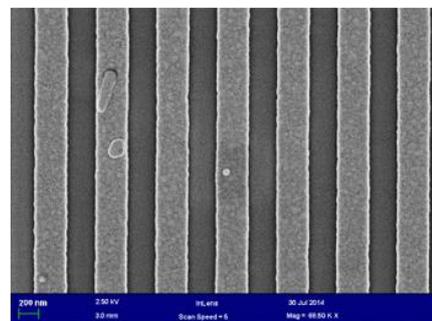
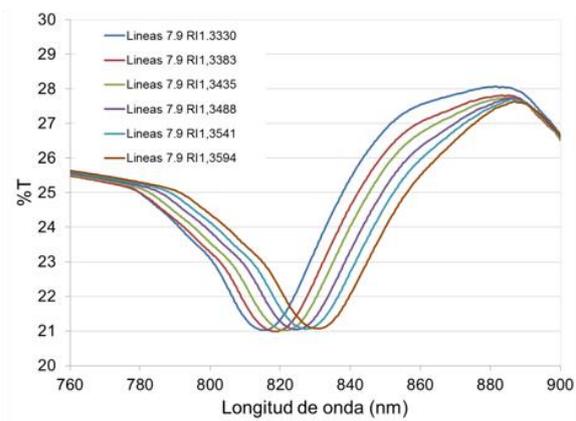
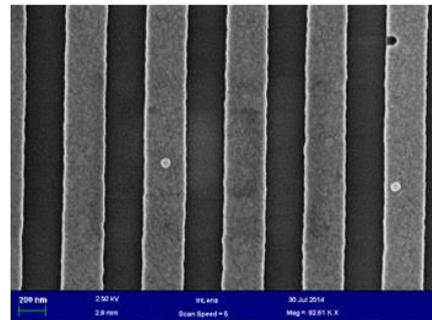
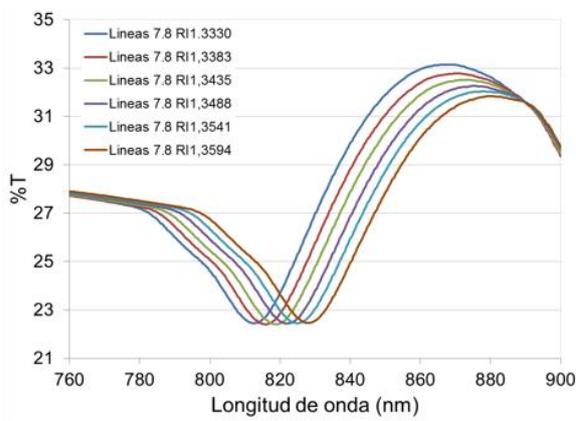
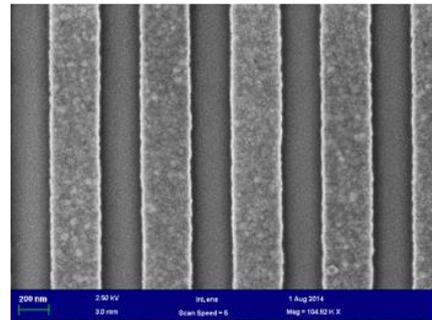
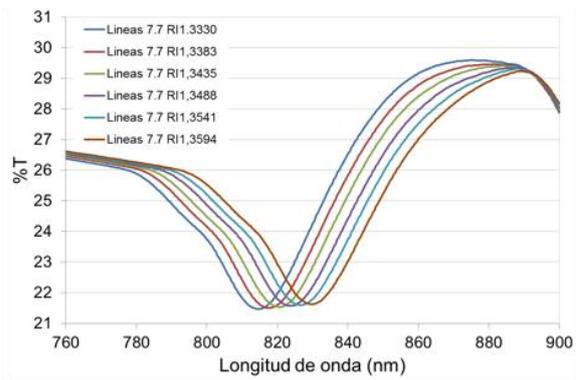
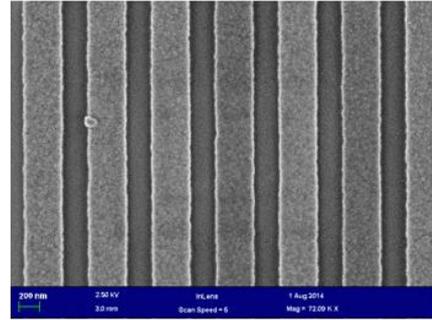
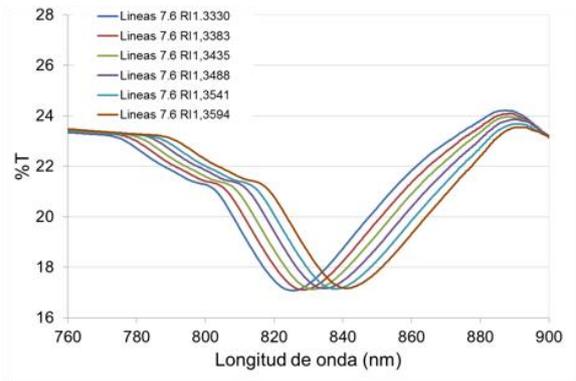


Figura 4.13. Oblea de vidrio (35 mm x 64 mm) partida en dos mitades. A la izquierda la mitad de la parte de arriba de la oblea (nanoestructuras de líneas, 7.02, 7.03, 7.04, 7.05 y 7.06); A la derecha la mitad de la parte de abajo de la oblea (nanoestructuras de líneas, 7.07, 7.08, 7.09, 7.10 y 7.11). Cada nanoestructura cortada en fragmentos de 22 mm x 7 mm.

Una vez los parámetros del espectrofotómetro fueron optimizados, los primeros experimentos fueron realizados para la determinación de la sensibilidad de los diferentes fragmentos de nanoestructuras fabricados. Paralelamente, todas las nanoestructuras se observaron al FE-SEM para la comprobación de las dimensiones de las nanolíneas.

En la siguiente Figura 4.14 se muestran en cada fila los espectros de transmisión (%T) de cada fragmento de nanoestructura de líneas a diferentes índices de refracción (IR 1,3330, 1,3383, 1,3435, 1,3488, 1,3541 y 1,3594) junto a una imagen de FE-SEM característica de cada fragmento analizado (desde el fragmento de Líneas 7.02 hasta el fragmento 7.11).





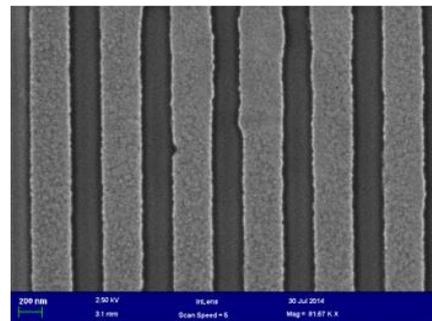
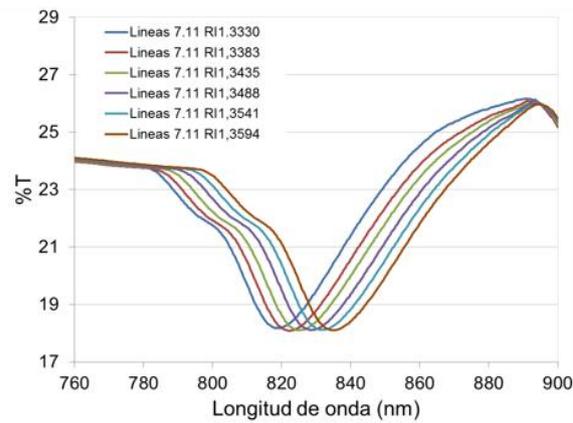
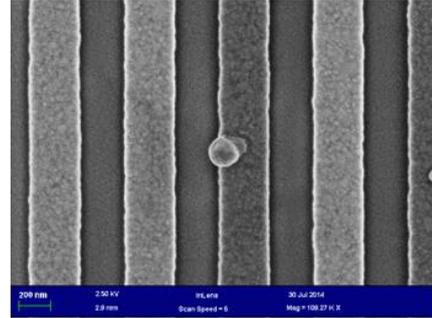
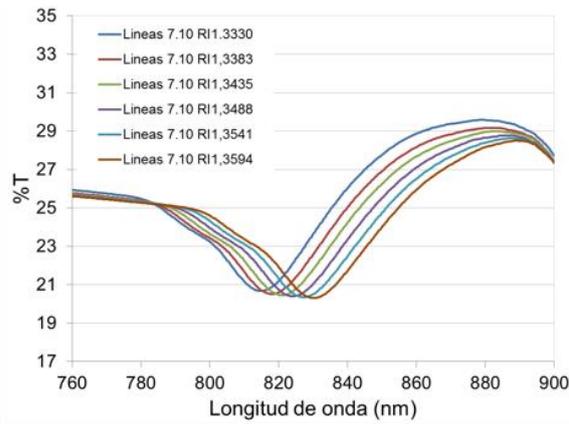


Figura 4.14. Izq. Espectros %T vs. longitud de onda (nm) de los diferentes fragmentos de nanoestructuras de Líneas (7.02; 7.03; 7.04; 7.05; 7.06; 7.07; 7.08; 7.09; 7.10; y 7.11) para distintos índice de refracción. En los espectros se observa la variación de la longitud de onda de excitación del plasmon de la curva espectral de resonancia debida a cambios de índice de refracción. **Der.** Imágenes de FE-SEM de los diferentes fragmentos de nanoestructuras anteriormente mencionadas.

La sensibilidad de cada fragmento de nanoestructura se midió monitorizando el desplazamiento o respuesta en el mínimo de transmisión del plasmón localizado de la nanoestructura comparando las soluciones que presentaban diferentes índices de refracción: 1,3330, 1,3383, 1,3435, 1,3488, 1,3541 y 1,3594 concretamente (Figura 4.14). Si se grafica el desplazamiento de la longitud de onda del mínimo obtenido con la variación en el índice de refracción correspondiente, la pendiente de dicha gráfica nos arroja la sensibilidad del sistema, y este valor se expresa como el desplazamiento de la longitud de onda del plasmón (λ_{LSPR}) por unidades de índice de refracción ($nm \cdot RIU^{-1}$) (Tabla 4.2).

Tabla 4.2: Sensibilidades de los fragmentos obtenidos para una oblea de nanoestructuras de Líneas (nm·RIU⁻¹). λ_{LSPR} : desplazamiento de la posición del mínimo frente al índice de refracción y $\lambda_{T\%cte}$: desplazamiento de la longitud de onda a una transmitancia constante frente al índice de refracción. La anchura a media altura (FWHM, nm) y la figura de mérito que se define como la relación entre la sensibilidad de (λ_{LSPR}) y FWHM (FOM, RIU⁻¹).

FRAGMENTO	λ_{LSPR}		Abs	$\lambda_{T\%cte}$		FWHM (nm)	FOM (RIU ⁻¹)
	nm·RIU ⁻¹	R ²		nm·RIU ⁻¹	R ²		
Nanolíneas 7.02	576,6	0,9989	0,56	617,2	0,9989	60,1	9,6
Nanolíneas 7.03	554,9	0,9946	0,58	619,9	0,9936	52,2	10,6
Nanolíneas 7.04	576,5	0,9976	0,60	603,7	0,9976	49,7	11,6
Nanolíneas 7.05	582,0	0,9992	0,64	603,7	0,9986	53,2	10,9
Nanolíneas 7.06	582,0	0,9994	0,71	628,1	0,9992	46,5	12,5
Nanolíneas 7.07	568,5	1,0000	0,58	619,9	0,9996	50,5	11,3
Nanolíneas 7.08	582,0	0,9992	0,55	641,6	0,9994	76,1	7,6
Nanolíneas 7.09	568,5	1,0000	0,60	676,8	0,9994	50,0	11,4
Nanolíneas 7.10	576,6	0,9989	0,59	736,3	0,9990	51,2	11,3
Nanolíneas 7.11	606,4	0,9985	0,66	668,6	0,9939	49,0	12,4
Promedio	577,4			641,6		53,9	10,9
Desv.estand.	13,2			41,5		8,6	1,4

Las sensibilidades obtenidas para el desplazamiento de λ_{LSPR} frente al índice de refracción, varían entre 555 nm·RIU⁻¹ y 606 nm·RIU⁻¹, obteniendo un valor promedio de **577 ± 13,2 nm·RIU⁻¹**. La sensibilidad obtenida, es muy próxima al período de la nanoestructura. Estos valores de sensibilidades se asemejan a otras nanoestructuras encontradas en literatura con el mismo periodo, entre 400-590 nm·RIU⁻¹ (Tabla 4.3). Por otro lado, la sensibilidad obtenida es superior a sensibilidades obtenidas con nanoparticulas (44-76 nm·RIU⁻¹), nanobastones (195-288 nm·RIU⁻¹), nanocubos (83 nm·RIU⁻¹) y nanobipirámides (159-540 nm·RIU⁻¹) (Petrayeva and Krull 2011).

Tabla 4.3: Ejemplos de sensibilidades de λ_{LSPR} en diferentes nanoestructuras de Periodo 600 nm: líneas, discos, nanoslit y agujeros.

Nanoestructura	Dimensiones (nm)	Sensibilidad (nm/RIU)	REF
Nanolíneas	P600 W360, h50	587	(Fernandez et al. 2014)
Nanolíneas	P600 W360, h50	576	(F. Fernández et al. 2016)
Nanodiscos	P600 W440, h50	565	(F. Fernández et al. 2016)
Nanoslit	P600, W500, h150	575	(Kuang-Li Lee, Wu, and Wei 2009)
Nanoagujeros	P600, W200, h100	400	(Brolo et al. 2004a)
Nanoagujeros dobles	P600, W 200*, h100	600	(Lesuffleur et al. 2007)
Nanodiscos	P600, W175, h	327	(Acimovic 2012)

* Dos nanoagujeros de 200 nm de diámetro. Distancia entre centro de agujeros 190 nm.

Además de la sensibilidad del mínimo de transmisión (λ_{LSPR}), se evaluó la sensibilidad a una transmisión constante. Esta sensibilidad se midió monitorizando el cambio o respuesta de

la longitud de onda a una transmisión constante para soluciones que presentaban diferentes índices de refracción: 1,3330, 1,3383, 1,3435, 1,3488, 1,3541 y 1,3594 concretamente. La sensibilidad obtenida se expresa como el cambio de longitud de onda a una transmisión constante ($\lambda_{\%Tcte}$) por unidades de índice de refracción ($\text{nm}\cdot\text{RIU}^{-1}$).

Para cada fragmento de nanoestructura de nanolíneas se buscó el valor máximo de sensibilidad a una transmisión constante. Los valores obtenidos se presentan Tabla 4.2 y oscilan entre 604 y 736 $\text{nm}\cdot\text{RIU}^{-1}$, obteniendo un valor promedio de **642 ± 42 $\text{nm}\cdot\text{RIU}^{-1}$** . La sensibilidad de las líneas medida a una transmisión constante fue superior a la sensibilidad obtenida con λ_{LSPR} (577 ± 13 $\text{nm}\cdot\text{RIU}^{-1}$).

Además se calculó la anchura a media altura (FWHM) y la figura de mérito (FOM). Los valores de FWHM obtenidos se presentan Tabla 4.2 y oscilan entre 46 y 76 nm, obteniendo un valor promedio de **54 ± 9 nm**. Los valores de FOM variaron entre 7,6 y 12,5 RIU^{-1} , obteniendo un valor promedio de **11 ± 1 RIU^{-1}** . Este valor es superior a los obtenidos por otros biosensores LSPR formados por nanopartículas (desde 0,6 para nanopartículas de oro y 4,5 para nanopirámides 7 y 28), y por nanoestructuras plasmónicas y metamateriales con resonancias tipo Fano. Por ejemplo, cavidades no-concéntrico anillo/disco (Sensibilidad de 541 $\text{nm}\cdot\text{RIU}^{-1}$ y FOM de 8,34 RIU^{-1}) (Hao et al. 2008), cluster de nanopartículas plasmónicas (Sensibilidad de 515 $\text{nm}\cdot\text{RIU}^{-1}$ y FOM de 10,6 RIU^{-1}) (Mirin, Bao, and Nordlander 2009), metamateriales planos basado en la transparencia inducida electromagnéticamente (EIT) (Sensibilidad de 588 $\text{nm}\cdot\text{RIU}^{-1}$ y FOM de 3,8 RIU^{-1}) (N. Liu et al. 2009). Sin embargo, otros biosensores LSPR formados por nanoagujeros de oro (Sensibilidad de 331 $\text{nm}\cdot\text{RIU}^{-1}$ y FOM de 23 RIU^{-1}) (Henzie, Lee, and Odom 2007), o nanoslit con hendiduras periódicas (Sensibilidad de 615 $\text{nm}\cdot\text{RIU}^{-1}$ y FOM de 32 RIU^{-1}) (Kuang-Li Lee et al. 2011) presentaron valores de FOM superiores.

Para terminar, se calculó la sensibilidad de las nanoestructuras de líneas a una longitud de onda constante. Esta sensibilidad se midió monitorizando el cambio de respuesta en % transmisión a una longitud de onda concreta para soluciones que presentaban diferentes índices de refracción: 1,3330, 1,3383, 1,3435, 1,3488, 1,3541 y 1,3594 concretamente. La sensibilidad obtenida se expresa como el cambio de % en transmitancia a una longitud de onda constante por unidades de índice de refracción ($\%T\cdot\text{RIU}^{-1}$). Para cada fragmento de nanoestructura de nanolíneas se buscó el valor máximo de sensibilidad a una longitud de onda constante. Los valores obtenidos se presentan en la Tabla 4.4 y oscilan ente -99 $\%T\cdot\text{RIU}^{-1}$ y -190 $\%T\cdot\text{RIU}^{-1}$, obteniendo un valor medio de **-139 ± 26 $\%T\cdot\text{RIU}^{-1}$** . El valor obtenido es negativo y se debe a que las longitudes de onda seleccionadas se encuentran a la derecha del mínimo, produciendo un cambio negativo en la transmitancia al incrementar el índice de refracción.

Tabla 4.4: Sensibilidades de los fragmentos obtenidos para una oblea de nanoestructuras de nanolíneas a una longitud de onda concreta (%T·RIU⁻¹).

FRAGMENTO	λ (nm) cte		
	λ (nm)	%T·RIU ⁻¹	R ²
Nanolíneas 7.02	838	-153	0,9992
Nanolíneas 7.03	840	-154	0,9968
Nanolíneas 7.04	842	-120	0,9997
Nanolíneas 7.05	846	-128	0,9999
Nanolíneas 7.06	854	-99	0,9998
Nanolíneas 7.07	838	-133	0,9997
Nanolíneas 7.08	835	-190	0,9979
Nanolíneas 7.09	840	-126	0,9984
Nanolíneas 7.10	838	-163	0,9975
Nanolíneas 7.11	846	-121	0,9968
Promedio		-138,6	
Desv.estand.		26,2	

Por otro lado una vez analizadas las sensibilidades, se analizaron las dimensiones de las nanoestructuras de nanolíneas con el FE-SEM. Se midieron tanto el periodo (P), como el ancho de línea (W) y se calculó la relación entre ambos (P/W) (Figura 4.15-A). El valor del periodo en los diferentes fragmentos fue bastante constante obteniendo un valor medio de 609 ± 4 nm. Las dimensiones del ancho de línea sin embargo, oscilaron entre 314 nm y 362 nm, obteniendo un valor medio de 331 ± 15 nm. Los valores obtenidos para la relación periodo/ancho de línea (P/W) oscilan entre 1,7 y 2. En general se observó tanto en la parte de arriba de la oblea como en la parte de abajo, que a medida que nos desplazamos hacia la derecha el ancho de línea incrementaba ligeramente, aunque el periodo se mantenía constante. Este efecto es intrínseco al proceso de fabricación. Entre las características del láser utilizado en estos procesos de fabricación está que la intensidad del haz tiene una distribución gaussiana en el plano perpendicular a la dirección de propagación. El máximo de intensidad del spot se sitúa en el centro del conjunto de espejo y porta-muestras, de tal forma que la densidad de potencia óptica es menor en las zonas de la muestra más alejadas del espejo, por lo que reciben una menor dosis de exposición. Las nanoestructuras se han fabricado con una fotoresina negativa. En las fotoresinas negativas, si se aumenta la dosis de exposición (potencia óptica en la zona de la muestra por el tiempo de exposición) se consigue un aumento en la anchura de las líneas (Figura 4.15-B).

A

	λ_{LSPR} (nm)	P (nm)	W (nm)	P/W
Nanolíneas 7.02	813	606	317	1,9
Nanolíneas 7.03	816	605	325	1,9
Nanolíneas 7.04	817	607	331	1,8
Nanolíneas 7.05	820	610	349	1,7
Nanolíneas 7.06	826	606	362	1,7
Nanolíneas 7.07	815	605	325	1,9
Nanolíneas 7.08	813	614	314	2,0
Nanolíneas 7.09	816	616	325	1,9
Nanolíneas 7.10	815	610	322	1,9
Nanolíneas 7.11	819	609	340	1,8
Promedio		609	331	
Desv.estand.		4	15	

B

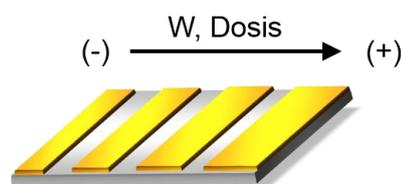


Figura 4.15. Tabla con los valores de λ_{LSPR} , P (periodo, nm), W (ancho de línea, nm) y P/W (ratio entre el periodo y el ancho de línea) y B) representación gráfica de cómo varía el ancho de línea en la oblea y la dosis de exposición.

En la Figura 4.16-A se han representado todos los espectros de transmisión de los diferentes fragmentos de líneas en agua (IR 1,3330). Aunque la sensibilidad de λ_{LSPR} no es muy diferente de fragmento a fragmento, cada fragmento presenta un espectro diferente, demostrando la heterogeneidad de la oblea. Se observa, como a medida que los espectros disminuyen en intensidad el mínimo se desplaza hacia la derecha. En las Figura 4.16-B y Figura 4.16-C, se han representado los espectros obtenidos con los fragmentos de nanoestructuras de la mitad de arriba de la oblea (de izquierda a derecha, nanolíneas 7.02, 7.03, 7.04, 7.05 y 7.06), y los obtenidos con los fragmentos de nanoestructuras de la mitad de abajo (de izquierda a derecha, nanolíneas 7.07, 7.08, 7.09, 7.10 y 7.11) en agua respectivamente. En las dos gráficas se observó la misma tendencia, a medida que nos desplazamos en la oblea hacia la derecha (tanto arriba, como abajo), los espectros presentan una menor intensidad y λ_{LSPR} se desplaza a longitudes de onda mayores.

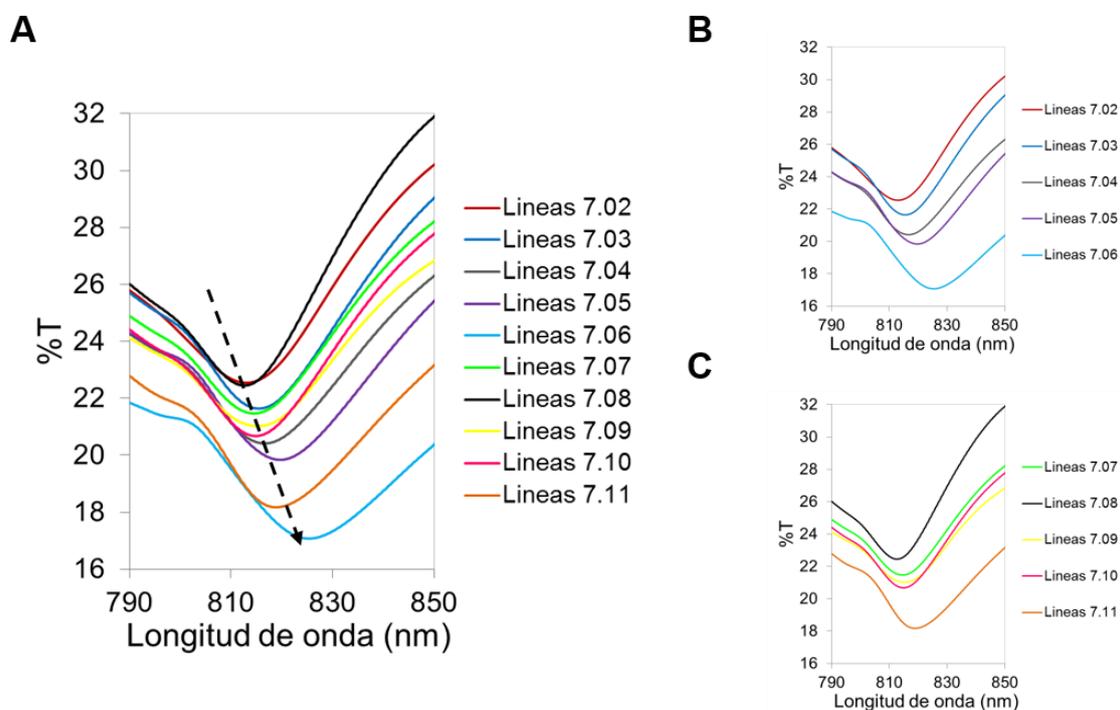


Figura 4.16 – A) Espectros de transmisión en agua vs. Longitud de onda de todos los fragmentos de la oblea 7 nanoestructura de nanolíneas. A medida que el espectro disminuye en intensidad del mínimo se desplaza a longitudes de onda mayores. **B)** Espectros de transmisión en agua vs. Longitud de onda de todos los fragmentos de la parte de arriba de la oblea 7 nanoestructura de nanolíneas, y **C)** Espectros de transmisión en agua vs. Longitud de onda de todos los fragmentos de la parte de abajo de la oblea 7 nanoestructura de nanolíneas.

Si relacionamos este efecto con las dimensiones de las nanolíneas, los fragmentos con menor intensidad de señal y mayor λ_{LSPR} son aquellos que presentan un ancho de línea mayor. Al representar el ratio P/W frente a λ_{LSPR} , se observó que la respuesta era lineal (Figura 4.17-A). Es decir, aquellos fragmentos que presentaban anchos de línea mayores, presentaban valores de λ_{LSPR} mayores y por consecuencia los espectros en intensidad también eran menores.

En la Figura 4.17-B se ha representado el ratio P/W respecto al % de transmisión en el mínimo. A medida que disminuye el ratio P/W la intensidad del espectro de transmisión disminuye. Esto podría estar relacionado con la cantidad de oro de la nanoestructura. Al aumentar el ancho de línea, mayor cantidad de oro hay capaz absorber y de dispersar luz y como consecuencia, menor es la luz transmitida.

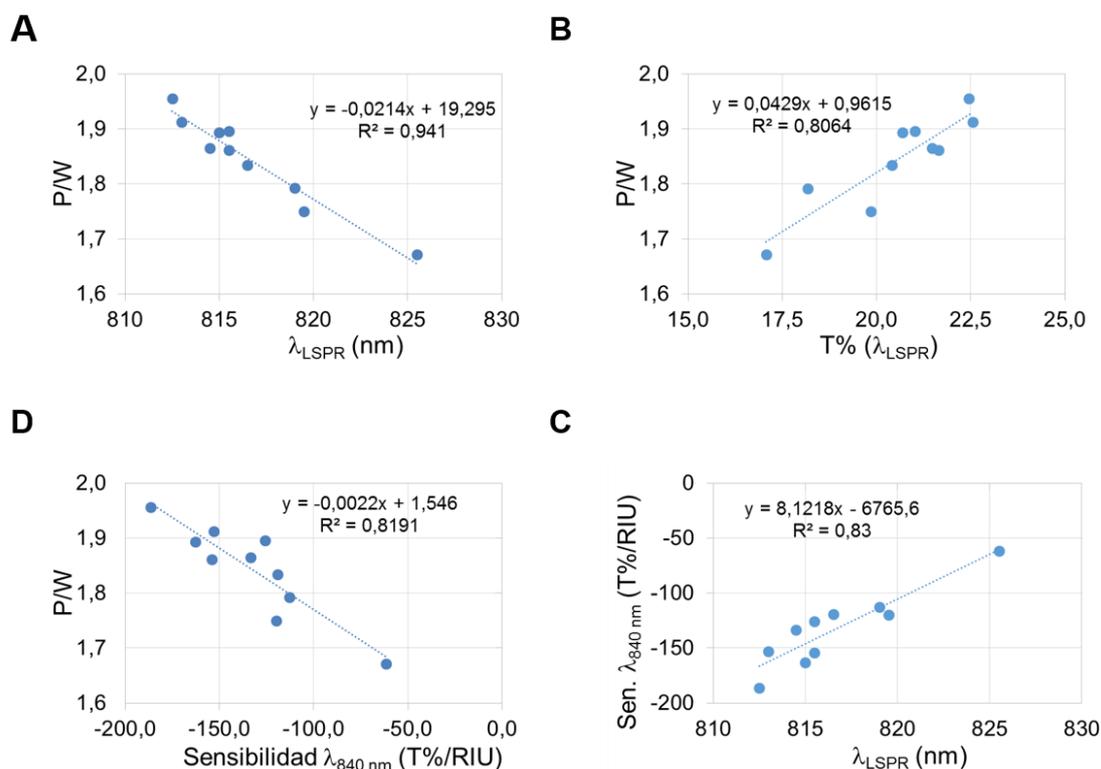


Figura 4.17. A) P/W vs. λ_{LSPR} (nm), B) P/W vs. %T en λ_{LSPR} , C) P/W vs. Sensibilidad ($\%T \cdot RIU^{-1}$) a λ_{840} nm, y D) La sensibilidad a λ_{840} nm ($\%T \cdot RIU^{-1}$) vs. λ_{LSPR} (nm) y

Asimismo, se representó P/W frente a la sensibilidad a una longitud de onda en concreta $\lambda = 840$ nm (Figura 4.17-C). La sensibilidad de la nanoestructura aumenta a medida que aumenta el ratio P/W , favoreciendo la distancia entre líneas a la sensibilidad.

Finalmente se representó la sensibilidad a una longitud de onda ($\lambda = 840$ nm) frente a λ_{LSPR} , obteniendo también una respuesta lineal (Figura 4.17-D). Tal y como se esperaba la sensibilidad aumenta cuando el espectro de transmitancia presenta el mínimo a longitudes de onda menores.

Sin embargo, no se obtuvo ningún tipo de correlación entre P/W respecto a la sensibilidad de λ_{LSPR} ($nm \cdot RIU^{-1}$), ni respecto a la sensibilidad a una transmisión constante ($nm \cdot RIU^{-1}$). Estas dos sensibilidades parecen depender más del periodo de la nanoestructura y no tanto del ancho de línea.

4.3.2.2. Caracterización física de nanoestructuras de discos

Las nanoestructuras de nanodiscos, al igual que las de nanolíneas, se fabricaron sobre una superficie de vidrio (borosilicato) de 35 mm x 64 mm x 0.3-0.4 mm de dimensión. La superficie de vidrio se partió por la mitad, y de cada mitad se obtuvieron 6 fragmentos, en total, 12 fragmentos, tal y como se muestran en la figura (fragmentos 9.01, 9.02, 9.03, 9.04, 9.05 y 9.06 de la mitad de arriba y fragmentos 9.07, 9.08, 9.09, 9.10, 9.11 y 9.12 de la mitad de abajo). Las dimensiones de los fragmentos de las nanoestructuras fue de 22 mm x 6 mm aproximadamente.

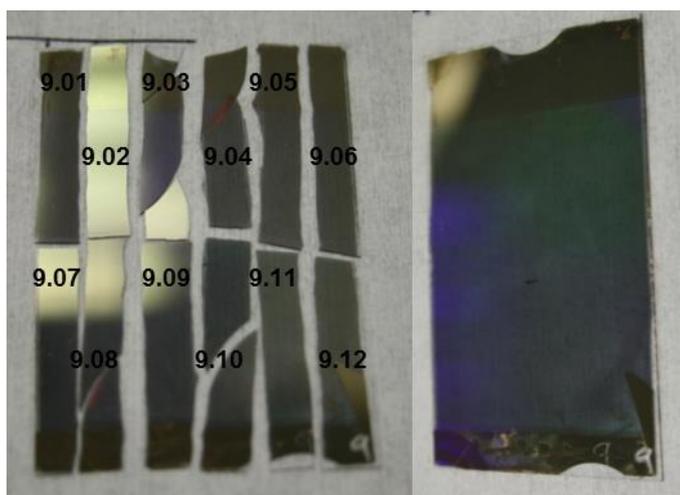
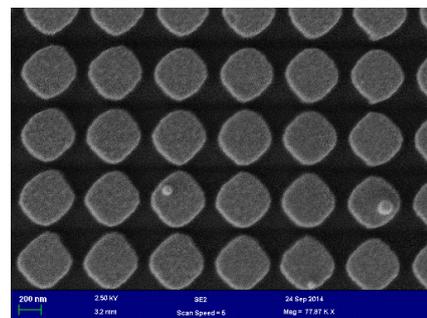
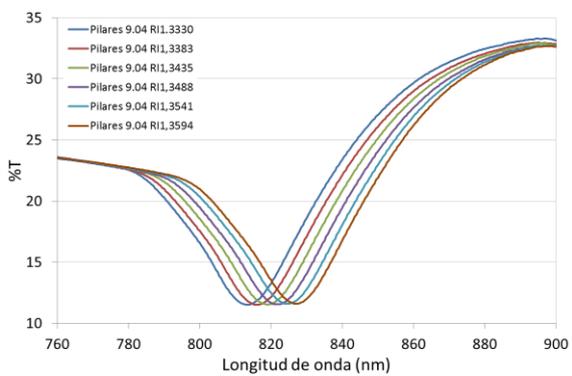
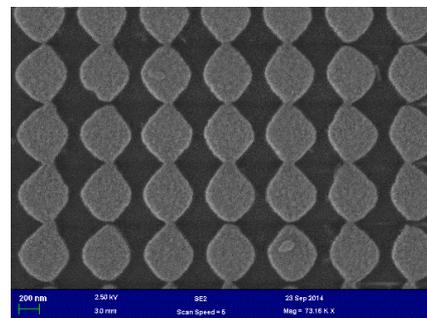
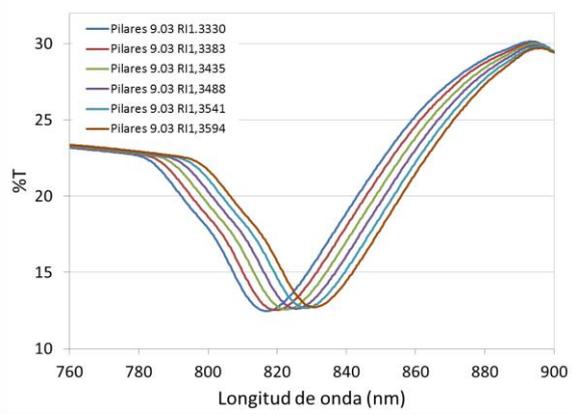
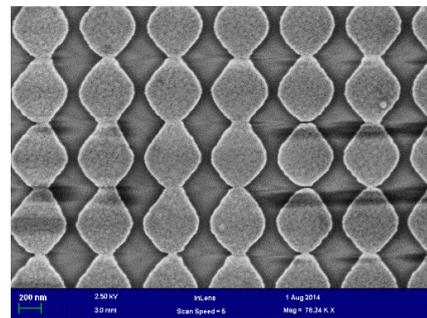
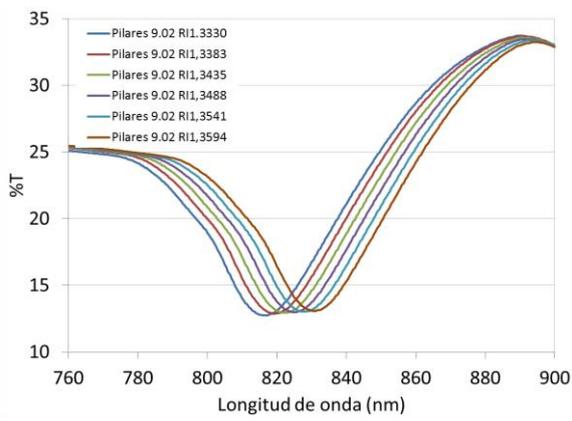
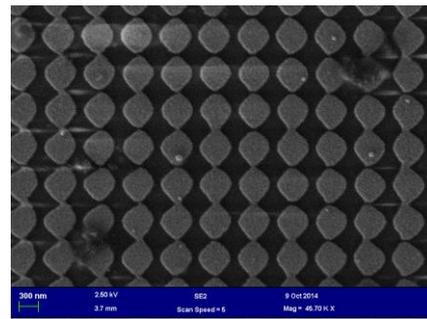
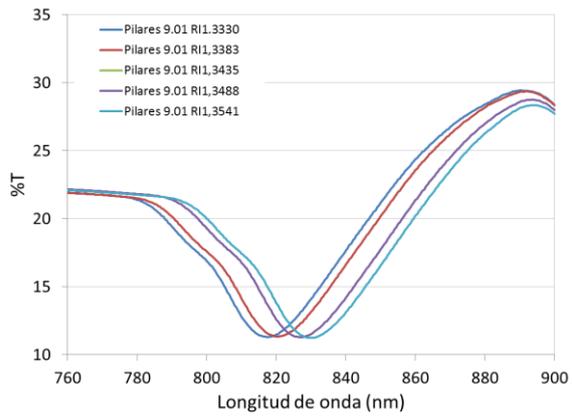


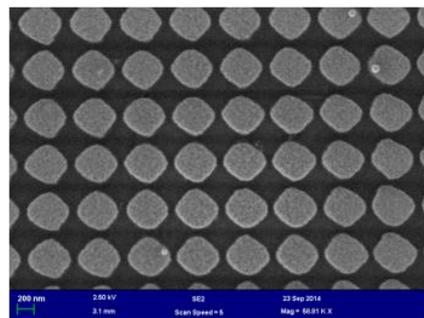
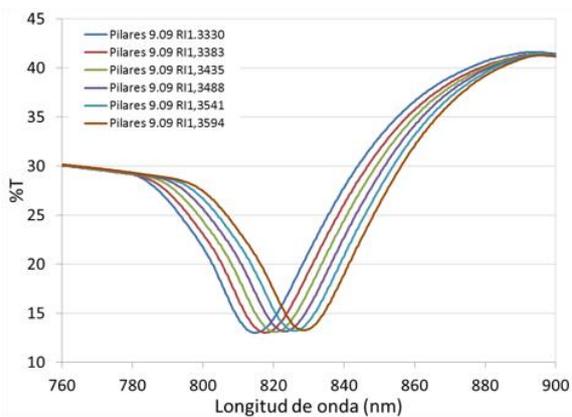
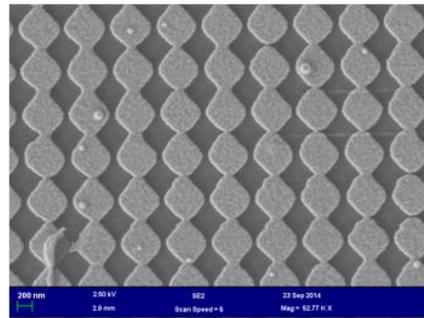
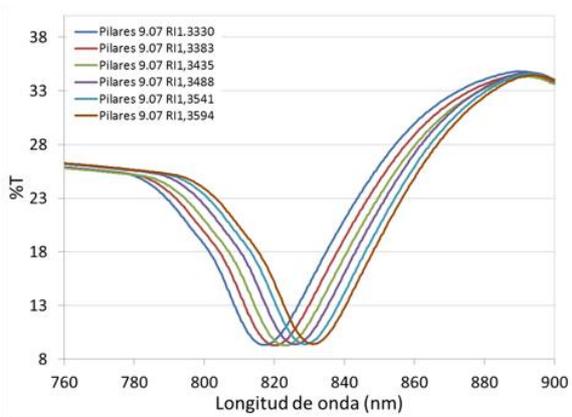
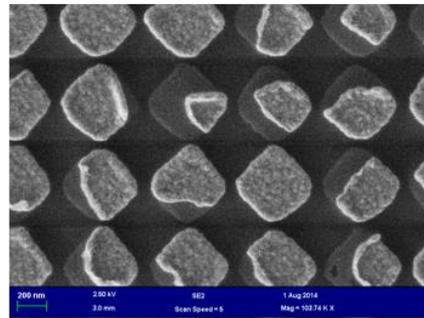
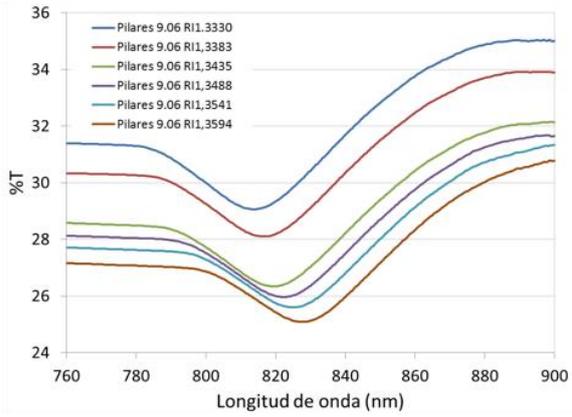
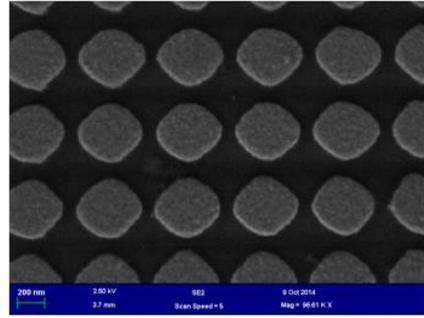
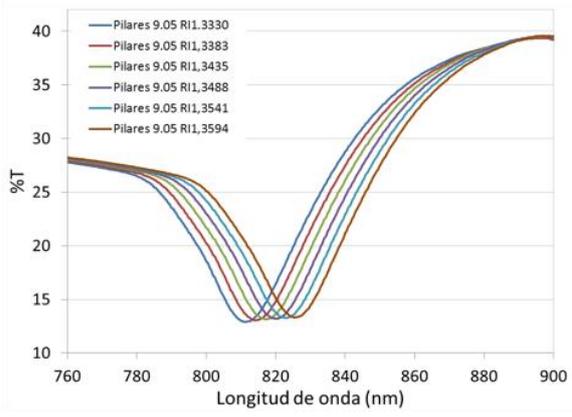
Figura 4.18. Oblea de vidrio (35 mm x 64 mm) partida en dos mitades. De la parte de arriba de la oblea se obtuvieron las nanoestructuras de nanodiscos 9.01, 9.02, 9.03, 9.04, 9.05 y 9.06, y de la parte de abajo de la oblea las nanoestructuras de nanodiscos 9.07, 9.08, 9.09, 9.10, 9.11 y 9.12. Cada mitad cortada en fragmentos de 22 mm x 6 mm.

Las nanoestructuras de la parte de arriba de la oblea, desde la 9.01 hasta 9.06, se pudieron aprovechar todas excepto la 9.06. Esta nanoestructura se estropeó en la fase inicial de limpieza, tal y como se muestra en la Figura 4.19 (Nanodiscos 9.06). Entre las nanoestructuras de la parte de debajo de la oblea, desde la 9.07 hasta 9.12, se pudieron aprovechar todas excepto la 9.08. Al cortar este fragmento, se partió en otros dos fragmentos demasiado pequeños para poder ser utilizados en la celda (Figura 4.18). Al final se obtuvieron 10 muestras de nanodiscos.

Al igual que con las nanolíneas, los primeros experimentos fueron realizados para la determinación de la sensibilidad de los diferentes fragmentos de nanoestructuras de nanodiscos fabricados. Paralelamente, todas las nanoestructuras se observaron al FE-SEM para la comprobación de las dimensiones de los nanodiscos.

En la Figura 4.19 se muestran en cada fila los espectros de transmisión de cada fragmento de nanoestructuras de nanodiscos a diferentes índices de refracción (IR 1,3330, 1,3383, 1,3435, 1,3488, 13541 y 1,3594) y una imagen de FE-SEM de la misma (desde el fragmento discos 9.01 hasta el fragmento 9.12, excepto el fragmento 9.08).





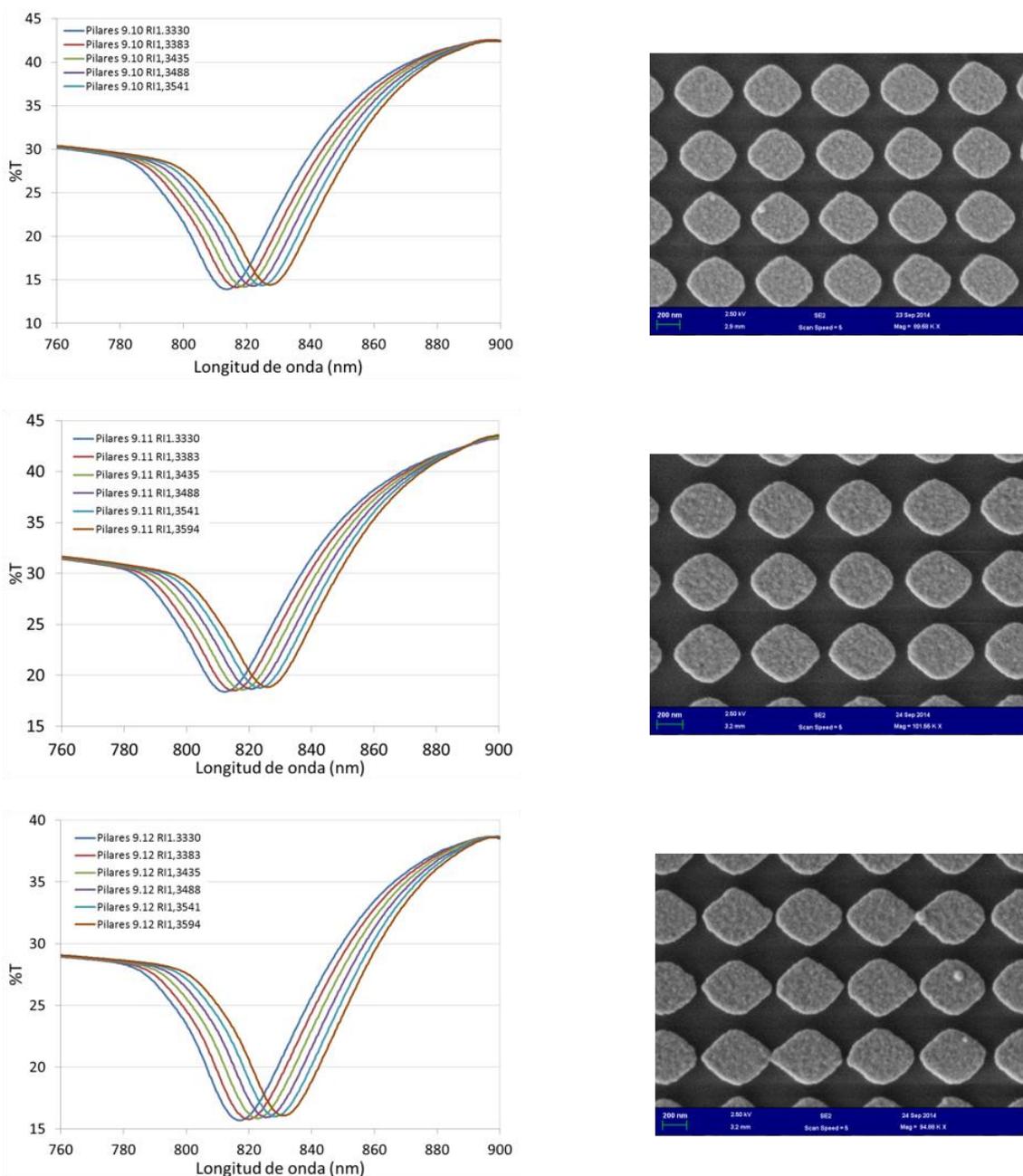


Figura 4.19. Izq. Espectros %T vs. longitud de onda (nm) de los diferentes fragmentos de nanoestructuras de nanodiscos (9.01; 9.02; 9.03; 9.04; 9.05; 9.06; 9.07; 9.09; 9.10; 9.11 y 9.12) para distintos índice de refracción. En los espectros se observa la variación de la longitud de onda de excitación del SPP de la curva espectral de resonancia debida a cambios de índice de refracción. Der. Imágenes de SEM de los diferentes fragmentos de nanoestructuras anteriormente mencionados.

La sensibilidad de cada fragmento de nanoestructura se midió monitorizando el cambio o respuesta del mínimo de transmisión del plasmón localizado de la nanoestructura, para soluciones que presentaban diferentes índices de refracción: 1,3330, 1,3383, 1,3435, 1,3488, 13541 y 1,3594 concretamente (Figura 4.19). Si se grafica el cambio de longitud de onda del mínimo obtenido con la variación en el IR correspondiente, la pendiente de dicha gráfica nos arroja la sensibilidad del sistema, y este valor se expresa como el cambio de longitud de onda del plasmón (λ_{LSPR}) por unidades de índice de refracción ($\text{nm}\cdot\text{RIU}^{-1}$) (Tabla 4.5).

Tabla 4.5: Sensibilidad de los fragmentos obtenidos para una oblea de nanoestructuras de nanodiscos ($\text{nm}\cdot\text{RIU}^{-1}$). λ_{LSPR} : desplazamiento de la posición del mínimo frente al índice de refracción y $\lambda_{\%T_{\text{cte}}}$: desplazamiento de la longitud de onda a una transmitancia constante frente al índice de refracción.

FRAGMENTO	λ_{min}		Abs	$\lambda_{\%T_{\text{cte}}}$		FWHM (nm)	FOM (RIU ⁻¹)
	$\text{nm}\cdot\text{RIU}^{-1}$	R ²		$\text{nm}\cdot\text{RIU}^{-1}$	R ²		
Nanodiscos 9.01	569,3	1,0000	0,80	573,0	0,9916	61,3	9,3
Nanodiscos 9.02	544,1	0,9994	0,75	495,4	0,9992	53,4	9,3
Nanodiscos 9.03	527,8	0,9969	0,77	503,5	0,9976	59,0	8,5
Nanodiscos 9.04	519,7	0,9985	0,73	519,7	0,9985	55,7	9,3
Nanodiscos 9.05	533,3	0,9993	0,74	498,1	0,9993	52,9	9,4
Nanodiscos 9.07	541,4	0,9965	0,77	517,0	0,9966	50,2	10,3
Nanodiscos 9.09	517,0	0,9993	0,72	487,3	0,9989	51,3	9,5
Nanodiscos 9.10	517,1	0,9970	0,70	487,3	0,9989	52,8	9,2
Nanodiscos 9.11	517,0	0,9993	0,64	473,7	1,0000	64,5	7,3
Nanodiscos 9.12	530,6	0,9989	0,70	508,9	0,9992	54,4	9,4
Promedio	531,7			506,4		55,5	9,2
Desv.estand.	16,5			27,3		4,6	0,8

Las sensibilidades obtenidas para el desplazamiento de λ_{LSPR} frente al índice de refracción, varían entre $517 \text{ nm}\cdot\text{RIU}^{-1}$ y $569 \text{ nm}\cdot\text{RIU}^{-1}$, obteniendo un valor promedio de **$532 \pm 17 \text{ nm}\cdot\text{RIU}^{-1}$** . Estos valores de sensibilidades se asemejan a otras nanoestructuras encontradas en literatura con el mismo periodo, entre $400\text{-}590 \text{ nm}\cdot\text{RIU}^{-1}$ (Tabla 4.3). (Fernandez et al. 2014)(F. Fernández et al. 2016)(Kun-Li Lee, Lee, and Wei 2007)(Kuang-Li Lee, Wu, and Wei 2009)(Kuang-Li Lee et al. 2007; Brolo et al. 2004b).

Al comparar las sensibilidades de las nanolíneas y la de los nanodiscos, observamos que las **nanolíneas son más sensibles**, $577 \pm 13 \text{ nm}\cdot\text{RIU}^{-1}$ frente a $532 \pm 17 \text{ nm}\cdot\text{RIU}^{-1}$ de los nanodiscos.

Además se calculó la anchura a media altura (FWHM) y la figura de mérito (FOM) tal y como se había realizado con las nanolíneas. Los valores de FWHM obtenidos se presentan en la Tabla 4.5 y oscilan entre 50 y 64 nm, obteniendo un valor promedio de **$55 \pm 5 \text{ nm}$** . Los valores de FOM obtenidos, varían desde 7 hasta 10 RIU^{-1} , obteniendo un valor promedio de **$9 \pm 1 \text{ RIU}^{-1}$** . Al comparar estos valores con los valores obtenidos con las nanolíneas, se observa que los valores de FWHM son menores para las nanolíneas, y en general como son más sensible los valores de la FOM más altos, 12 RIU^{-1} , respecto a los 9 RIU^{-1} de los nanodiscos, confirmando que las nanolíneas son más sensibles cuando se monitoriza los cambios de λ_{LSPR} .

Para el caso partículas de nanodiscos, Acimovic y colaboradores, han determinado la sensibilidad, FWHM y FOM en función del periodo y el diámetro del disco de oro en sustratos de vidrio y sustratos de vidrio con una capa de 44 nm de TiO_2 . Obtuvieron valores de FOM entre 1.2 y 25 RIU^{-1} . La sensibilidad, como el FOM obtenido en sustratos de vidrio fue en muchos casos inferior, y el máximo obtenido alrededor de 9 RIU^{-1} , al igual que nuestras nanoestructuras. En las estructuras optimizadas que llevaban TiO_2 , las sensibilidades fueron

mayores, y cercanas a nuestras nanoestructuras ($\sim 600 \text{ nm}\cdot\text{RIU}^{-1}$), pero los picos obtenidos fueron más estrechos llegando a obtener FOM de 25 RIU^{-1} (Acimovic 2012).

Para los nanodiscos también se evaluó la sensibilidad a una transmisión constante. Esta sensibilidad se midió monitorizando el cambio o respuesta de la longitud de onda a una transmisión constante para soluciones que presentaban diferentes índices de refracción: 1,3330, 1,3383, 1,3435, 1,3488, 1,3541 y 1,3594 concretamente. Para cada fragmento de nanoestructuras de nanodiscos se buscó el valor máximo de sensibilidad a una transmisión constante. Los valores obtenidos se presentan en la Tabla 4.5 y oscilan entre 474 y 573 $\text{nm}\cdot\text{RIU}^{-1}$, obteniendo un valor promedio de $506 \pm 27 \text{ nm}\cdot\text{RIU}^{-1}$. En este caso, y al contrario a lo que ocurría con las nanoestructuras de nanolíneas, la sensibilidad obtenida fue mayor para el desplazamiento del λ_{LSPR} ($532 \pm 17 \text{ nm}\cdot\text{RIU}^{-1}$).

Al comparar las sensibilidades de las nanolíneas y la de los nanodiscos a una transmisión constante, observamos que las **líneas siguen siendo más sensibles**, aumentando aún más la diferencia, $642 \pm 42 \text{ nm}\cdot\text{RIU}^{-1}$ frente a $506 \pm 27 \text{ nm}\cdot\text{RIU}^{-1}$.

Para terminar, se calculó la sensibilidad de las nanoestructuras de nanodiscos a una longitud de onda constante. Para cada fragmento de nanoestructura de nanodiscos se buscó el valor máximo de sensibilidad a una longitud de onda constante. Los valores obtenidos se presentan en la Tabla 4.6 y oscilan entre $-174 \text{ T}\%\cdot\text{RIU}^{-1}$ y $-351 \text{ T}\%\cdot\text{RIU}^{-1}$, obteniendo un valor medio de $-276 \pm 58 \text{ T}\%\cdot\text{RIU}^{-1}$.

Al comparar estos resultados con los obtenidos con las nanolíneas, **la sensibilidad** promedio de los **nanodiscos** ($-276 \pm 58 \text{ T}\%\cdot\text{RIU}^{-1}$) es **dos veces mayor** que la sensibilidad promedio de las nanolíneas ($-139 \pm 26 \text{ T}\%\cdot\text{RIU}^{-1}$). Cabe destacar que las sensibilidades de los nanodiscos a una longitud de onda constante presentan más variabilidad entre los diferentes fragmentos que las líneas. Esta variabilidad es 2,2 veces mayor para los nanodiscos.

Tabla 4.6: Sensibilidades de los fragmentos obtenidos para una oblea de nanoestructuras de nanodiscos a una longitud de onda concreta ($\text{T}\%\cdot\text{RIU}^{-1}$).

FRAGMENTO	λ (nm) cte		
	λ (nm)	$\text{T}\%\cdot\text{RIU}^{-1}$	R^2
Discos 9.01	844	-223	0,9992
Discos 9.02	840	-222	0,9996
Discos 9.03	844	-174	0,9993
Discos 9.04	835	-272	0,9995
Discos 9.05	830	-336	0,9993
Discos 9.07	840	-313	0,9989
Discos 9.09	835	-351	0,9998
Discos 9.10	835	-337	0,9991
Discos 9.11	835	-272	0,9996
Discos 9.12	840	-262	0,9997
Promedio		-276,3	
Desv.estand.		58,4	

En la siguiente Figura 4.20, se han representado a modo de ejemplo los espectros de transmisión a diferentes índices de refracción de una nanoestructura de nanolíneas (7.10) y una nanoestructuras de nanodiscos (9.07). Los nanodiscos presentan picos más pronunciados. La distancia promedio en agua entre el mínimo (~ 815 nm) y el máximo (~ 890 nm) para las nanolíneas es de 64 ± 5 nm y para los nanodiscos es de 79 ± 6 nm. El cambio de % de transmisión en agua entre el mínimo (~ 815 nm) y el máximo (~ 890 nm) en nanolíneas es de 9 ± 1 % transmisión, y en nanodiscos es de 24 ± 4 % transmisión, 2,7 veces mayor para el caso de los nanodiscos. Se ha comprobado que aquellas nanoestructuras que presenta un $\Delta\%T$ mayor suelen presentar una sensibilidad mayor en $\%T \cdot RIU^{-1}$.

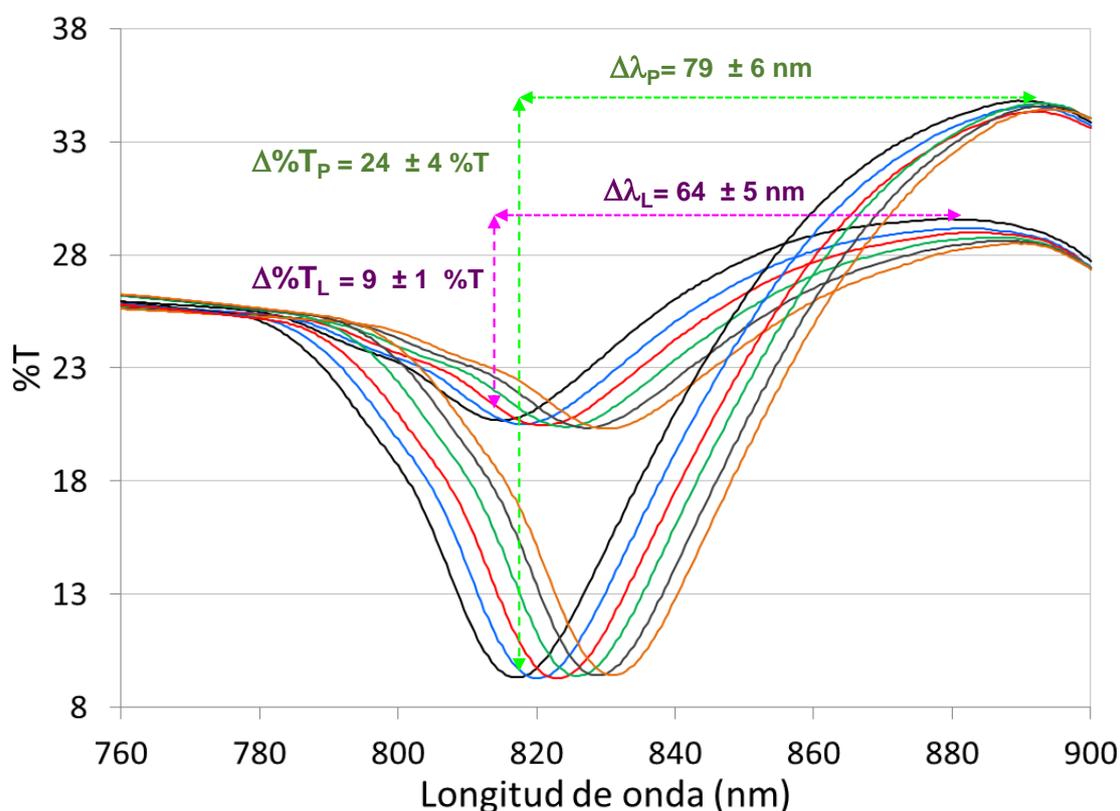


Figura 4.20. Espectros de transmisión de nanoestructuras de nanolíneas (7.10) y nanodiscos (9.07). En la gráfica se presenta los valores promedio en agua de $\Delta\lambda$ entre el mínimo y el máximo y $\Delta\%T$ entre el mínimo y el máximo para las nanoestructuras de nanolíneas (L) y nanodiscos (P).

En la Figura 4.21-A se han representado todos los espectros de transmisión de los diferentes fragmentos de nanodiscos en agua (IR 1,3330). En los nanodiscos no se observa ninguna tendencia clara, tal y como se observa con las nanolíneas. En las Figura 4.21-B y Figura 4.21-C, se han representado los espectros obtenidos con los fragmentos de nanoestructuras de la mitad de arriba de la oblea (de izquierda a derecha, nanodiscos 9.01, 9.02, 9.03, 9.04, y 9.05), y los obtenidos con los fragmentos de nanoestructuras de la mitad de abajo (de izquierda a derecha, nanodiscos 9.07, 9.09, 9.10, 9.11, y 9.12) en agua respectivamente. Con las nanoestructuras de la parte de arriba no se observa ninguna

tendencia a simple vista. Con las nanoestructuras de la parte de debajo de la oblea sin embargo, los espectros presentan una mayor intensidad y un valor de λ_{LSPR} menor a medida que se desplaza en la oblea hacia la derecha.

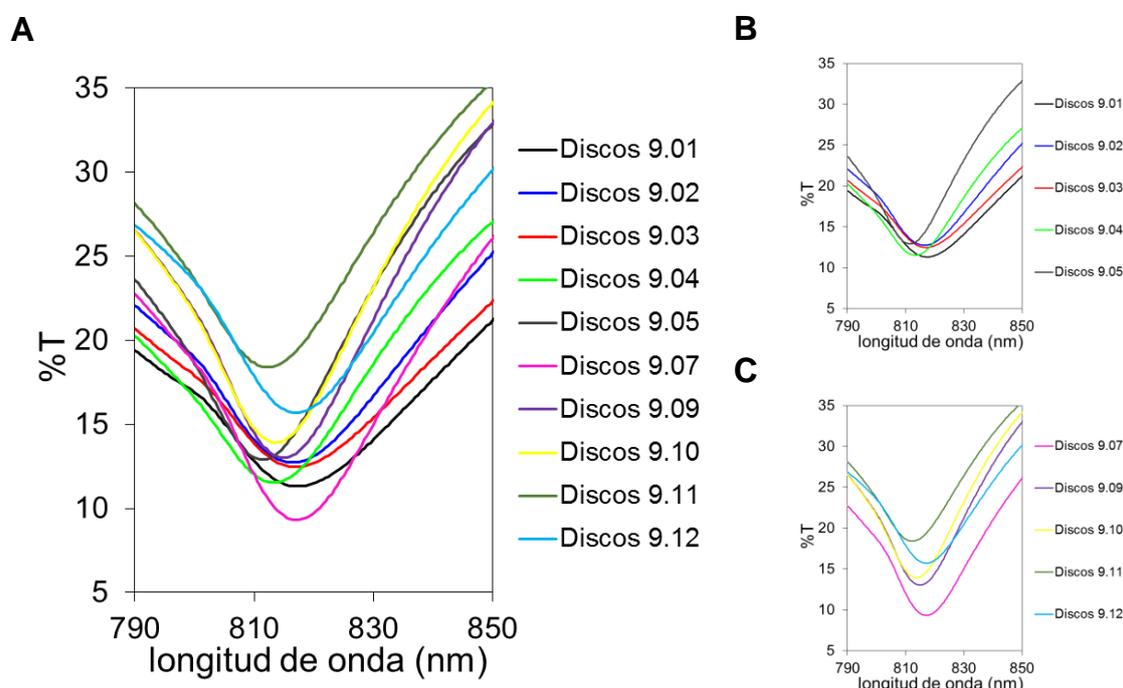


Figura 4.21. **A)** Espectros de transmisión en agua vs. Longitud de onda de todas las nanoestructuras de la oblea 9 de nanodiscos. **B)** Espectros de transmisión en agua vs. Longitud de onda de todas las nanoestructuras de la oblea 9 de nanodiscos de la parte de arriba de la oblea (9.01, 9.02, 9.03, 9.04, y 9.05), **C)** Espectros de transmisión en agua vs. Longitud de onda de todas las nanoestructuras de la oblea 9 de discos de la parte de debajo de la oblea (9.07, 9.09, 9.10, 9.11, y 9.12).

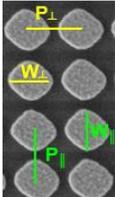
Por otro lado, se evaluaron las dimensiones de las nanoestructuras de nanodiscos con el FE-SEM. Tal y como se observa en las imágenes de la Figura 4.19, los nanodiscos obtenidos no fueron redondos en general. La mayoría de los fragmentos presentaban una forma romboides o forma cuadrada. En algunos casos, los nanodiscos llegaban a tocarse, tal y como se observa en los fragmentos de nanodiscos 9.01, 9.02, 9.03, 9.07, y 9.12. Curiosamente estas nanoestructuras presentaban mayor sensibilidad en λ_{LSPR} .

El proceso de fabricación de pilares circulares de oro es similar al de fabricación de líneas. La principal modificación es que se realiza una doble exposición durante la LIL para obtener un patrón de agujeros en la película de fotoresina. El diámetro del agujero (lo que luego será el diámetro del nanodisco) se intentó que fuera de unos 500 nm, ya que experimentalmente se había comprobado que estas estructuras presentaban mejores sensibilidades. Para fabricar estas nanoestructuras es necesario trabajar a bajas dosis, lo que dificulta la homogeneidad de los motivos (Cornago Santos 2015), y hace que los motivos tengan formas romboides e incluso se lleguen a tocar.

Se midieron tanto el periodo (P), como el diámetro del disco (W) en el eje perpendicular y paralelo. A continuación se presentan los resultados obtenidos:

Tabla 4.7: Dimensiones promedio del periodo (P) y diámetro de disco (W) de las nanoestructuras de discos. Los valores de periodo y diámetro del disco se dan como los valores perpendiculares y paralelos al corte longitudinal de la nanoestructura tal y como se muestra en la figura.

	⊥ al corte longitudinal de la nanoestructura	∥ al corte longitudinal de la nanoestructura
Período	603 ± 7	600 ± 13
Diámetro del disco	498 ± 20	514 ± 55



El valor promedio del periodo de la nanoestructura en las dos direcciones se mantiene bastante constante, mientras que la variabilidad del diámetro del nanodisco es mayor. El diámetro del nanodisco presentó valores superiores para el corte paralelo, acercándose a valores del periodo. En esta dirección es donde los discos tienden a pegarse unos a otros.

Tabla 4. 8. Valores de λ_{min} , P (periodo, nm), W (diámetro de disco, nm) y P/W (ratio entre el periodo y el diámetro del disco) para las dimensiones perpendicular y paralelos al corte longitudinal de la nanoestructura.

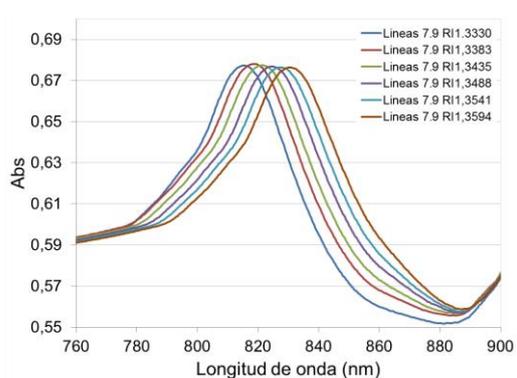
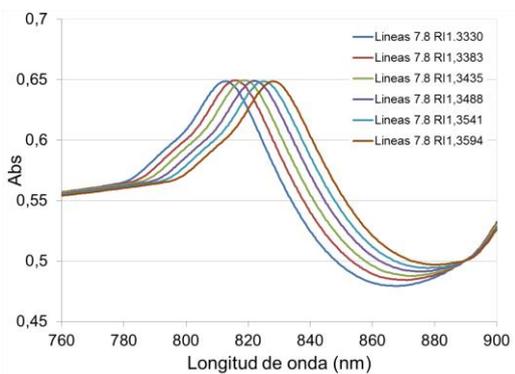
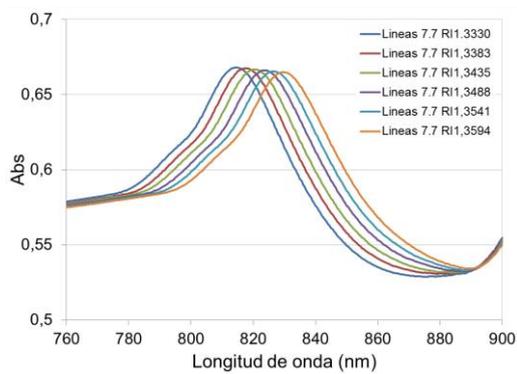
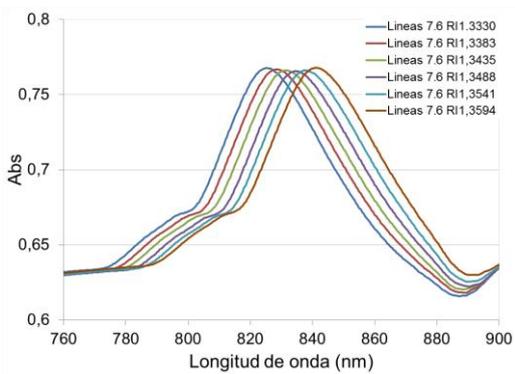
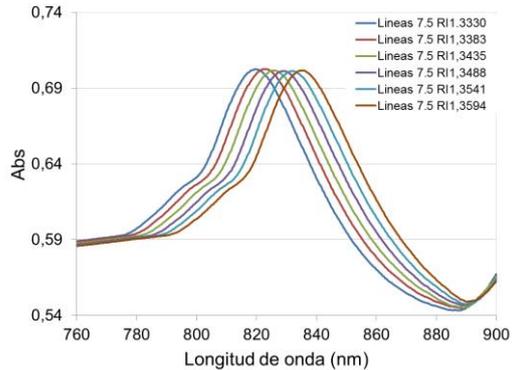
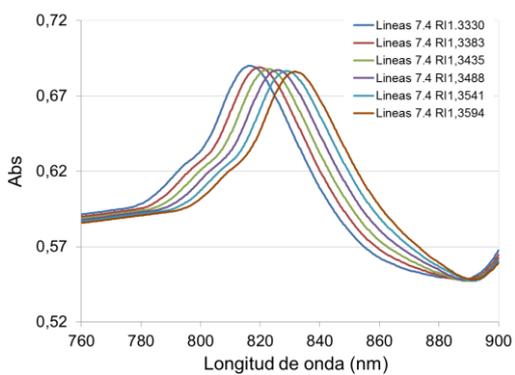
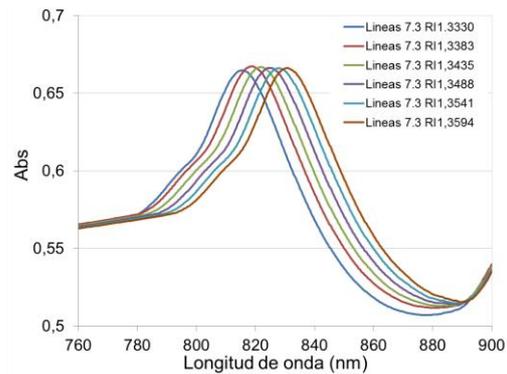
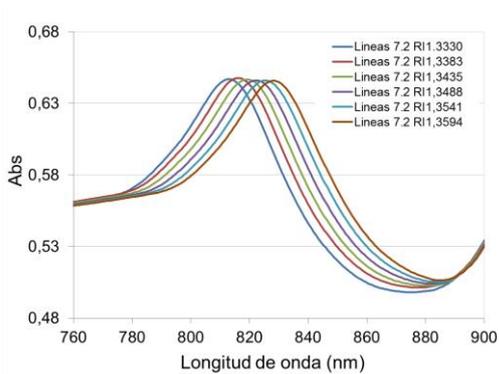
	λ_{min} (nm)	P⊥	W⊥	P∥	W∥	P⊥/W⊥	P∥/W∥	P⊥/P∥	W⊥/W∥	P⊥/W⊥ / P∥ / W∥
Discos 9.01	817,5	608,6	491,6	617,9	552,0	1,24	1,12	0,98	0,89	1,11
Discos 9.02	816,5	609,7	495,3	609,4	609,4	1,23	1,00	1,00	0,81	1,23
Discos 9.03	817,0	600,6	472,6	604,0	576,3	1,27	1,05	0,99	0,82	1,21
Discos 9.04	812,0	604,1	477,5	586,7	489,7	1,27	1,20	1,03	0,98	1,06
Discos 9.05	811,5	587,3	478,7	582,4	451,2	1,23	1,29	1,01	1,06	0,95
Discos 9.07	815,5	607,1	526,2	617,5	560,8	1,15	1,10	0,98	0,94	1,05
Discos 9.09	813,5	600,5	506,6	591,5	469,3	1,19	1,26	1,02	1,08	0,94
Discos 9.10	812,0	600,2	497,1	603,4	484,5	1,21	1,25	0,99	1,03	0,97
Discos 9.11	811,0	610,3	507,0	587,2	463,8	1,20	1,27	1,04	1,09	0,95
Discos 9.12	815,5	597,7	532,2	600,1	485,2	1,12	1,24	1,00	1,10	0,91

Una vez analizado las diferentes sensibilidades de los fragmentos de discos, al igual que con las líneas, se intentó relacionar los diferentes parámetros entre sí (λ_{LSPR} , relación periodo/ancho de nanodiscos (P/W), sensibilidad, etc.). En este caso, no se obtuvieron relaciones tan directas como en las nanolíneas.

4.3.2.3. Caracterización física de nanoestructuras en absorbancia

Tal y como se ha comentado en la introducción de este capítulo, el espectrofotómetro permite medir la transmitancia de una nanoestructura comparando el flujo radiante que incide al objeto frente al flujo reflejado o transmitido por el objeto en función de la longitud de onda. El espectrofotómetro este valor puede convertirlo en absorbancia, denominado como al logaritmo con signo cambiado de la transmitancia.

En la siguientes dos figuras se observan los espectros en absorbancia para todos los fragmentos de nanolíneas (Figura 4.22) y nanodiscos (Figura 4.23):



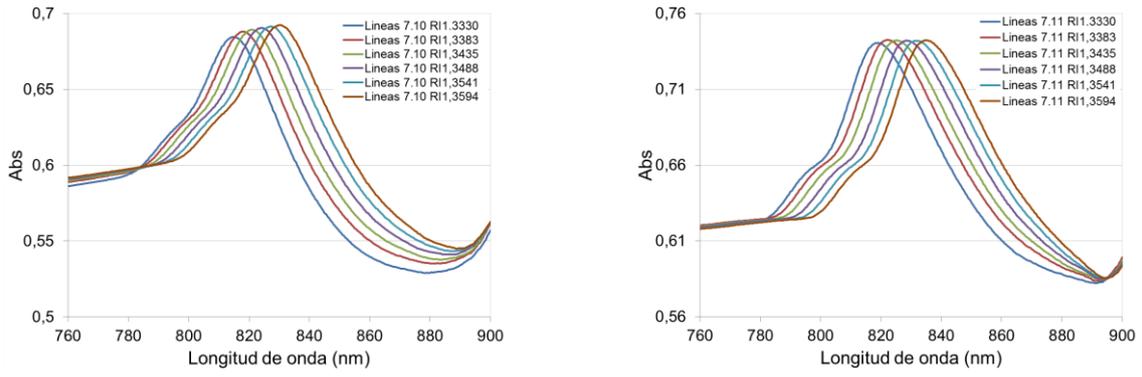
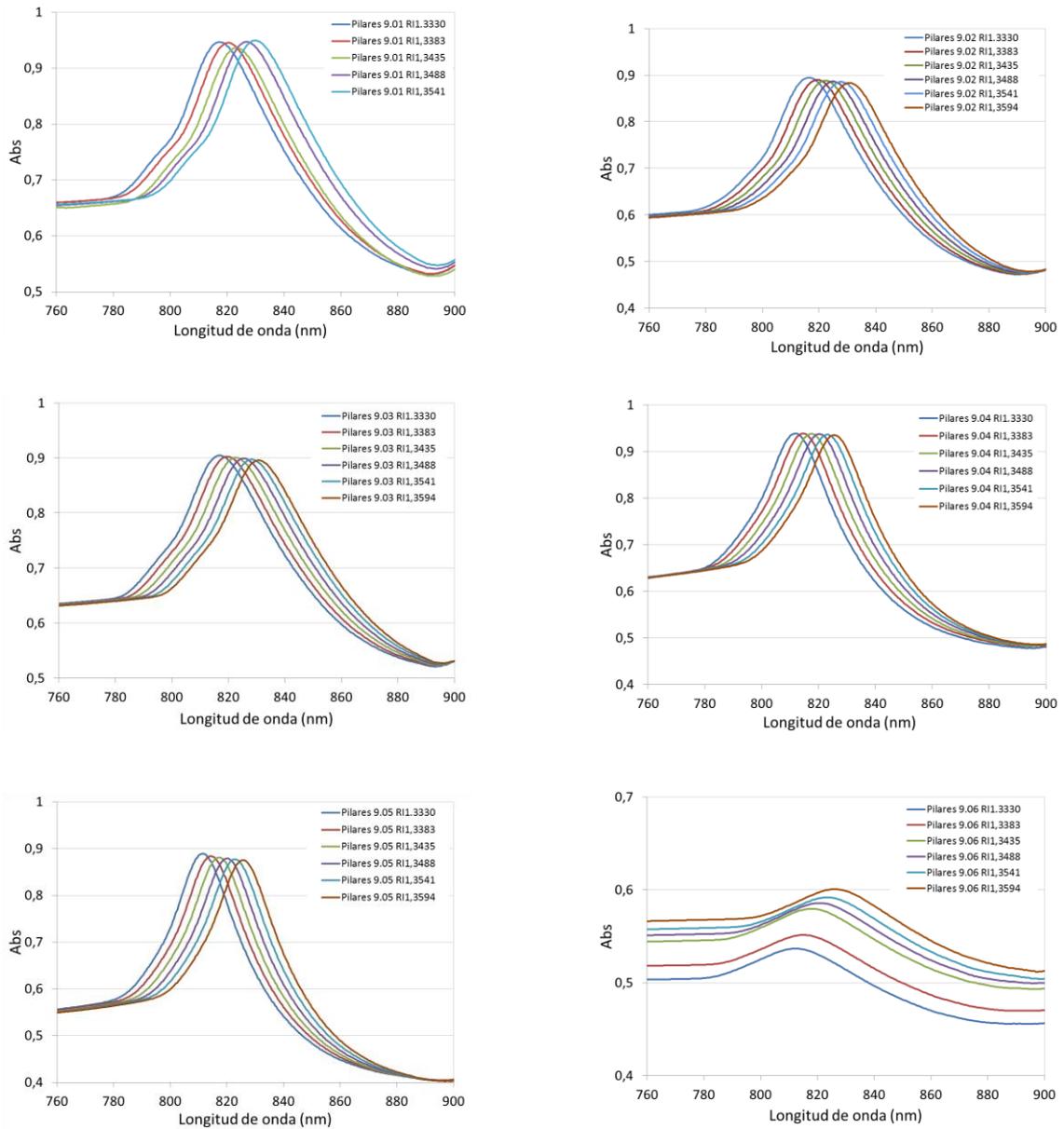


Figura 4.22. Espectros de Abs vs. longitud de onda (nm) de los diferentes fragmentos de nanoestructuras de Líneas (7.02; 7.03; 7.04; 7.05; 7.06; 7.07; 7.08; 7.09; 7.10; y 7.11) para distintos índice de refracción. En los espectros se observa la variación de la longitud de onda de excitación del plasmon de la curva espectral de resonancia debida a cambios de índice de refracción.



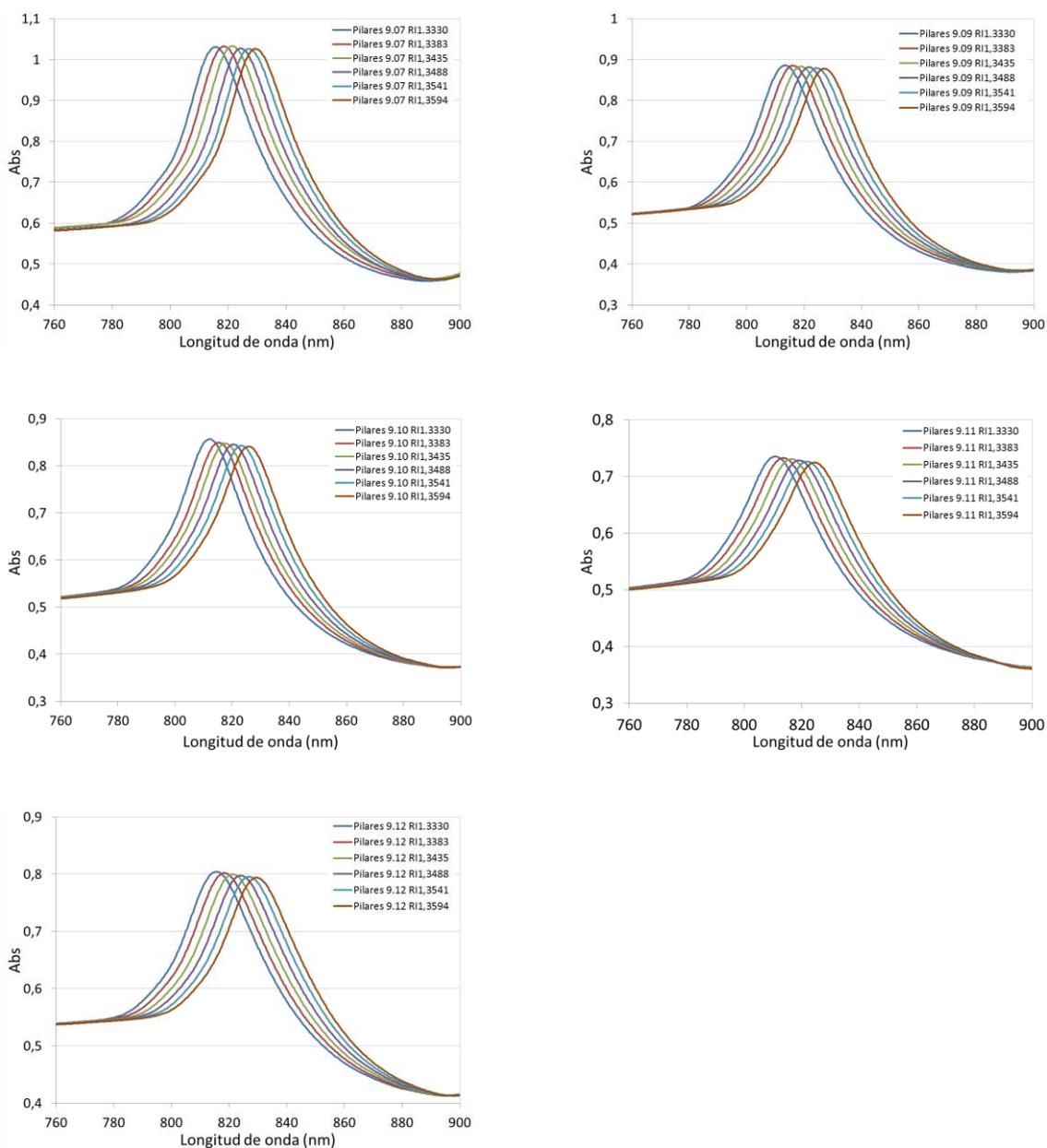


Figura 4.23. Espectros en Absorbancia vs. Longitud de onda (nm) de los diferentes fragmentos de nanoestructuras de discos (9.01; 9.02; 9.03; 9.04; 9.05; 9.06; 9.07; 9.09; 9.10; 9.11 y 9.12) para distintos índice de refracción. En los espectros se observa la variación de la longitud de onda de excitación del SPP de la curva espectral de resonancia debida a cambios de índice de refracción.

Al igual que para los espectros en transmitancia, se calcularon para los espectros en absorbancia las sensibilidades de λ_{LSPR} ($\text{nm}\cdot\text{RIU}^{-1}$), λ_{ABScte} ($\text{nm}\cdot\text{RIU}^{-1}$), y λ_{cte} ($\text{Abs}\cdot\text{RIU}^{-1}$). Tal y como se esperaba, los valores obtenidos para λ_{LSPR} ($\text{nm}\cdot\text{RIU}^{-1}$) y λ_{ABScte} ($\text{nm}\cdot\text{RIU}^{-1}$) fueron los mismos en transmitancia que en absorbancia. Sin embargo, el FWHM disminuyó y en consecuencia la FOM aumentó. Esto se debe a que la absorbancia es el logaritmo de la transmitancia, produciendo un alargamiento de pico de absorción, respecto al de transmitancia. Los valores promedio obtenidos para las nanolíneas de FWHM en transmitancia fue de 54 nm y en absorbancia de 47 nm, mientras que se obtuvieron valores de FOM de 11 RIU^{-1} , y 12 RIU^{-1}

respectivamente en transmitancia y en absorbancia. En el caso de los nanodiscos estas diferencias fueron más significativas, obteniendo valores de 56 nm y 41 nm en transmitancia y absorbancia respectivamente para FWHM y 9 RIU⁻¹ y 13 RIU⁻¹ para FOM.

Los valores de FWHM para los espectros a diferentes índice de refracción fueron constantes. En la Figura 4.24 se han superpuestos los espectros a diferentes índice de refracción. Tanto los espectros de los nanodiscos (Figura 4.24-A) como los espectros de las nanolíneas (Figura 4.24-B) se superponen perfectamente.

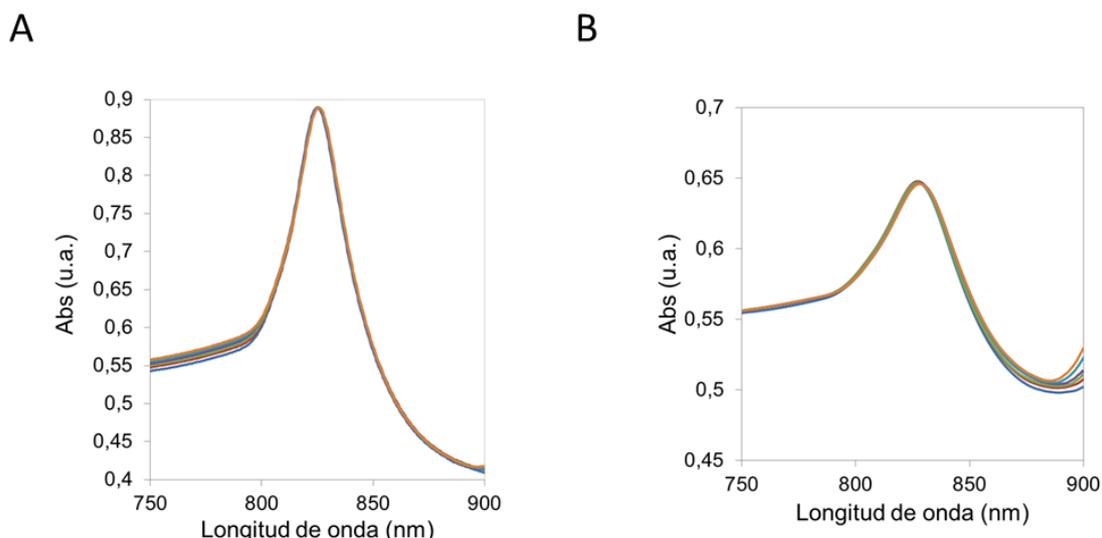


Figura 4.24. Espectros superpuestos de los diferentes índices de refracción de A) nanodiscos, y B) nanolíneas.

Tabla 4.9: Sensibilidad de los fragmentos obtenidos para una oblea de nanoestructuras de nanolíneas y nanodiscos (nm·RIU⁻¹). λ_{LSPR} : desplazamiento de la posición del mínimo frente al índice de refracción y $\lambda_{Abs\ cte}$: desplazamiento de la longitud de onda a una absorbancia constante frente al índice de refracción. Valores de FWHM (nm) y FOM (RIU⁻¹).

FRAGMENTO	λ_{LSPR}		Abs	$\lambda_{T\% \ cte}$		FWHM (nm)	FOM (RIU ⁻¹)
	nm·RIU ⁻¹	R ²		nm·RIU ⁻¹	R ²		
Nanolíneas 7.02	576,6	0,9989	0,56	617,2	0,9989	51,9	11,1
Nanolíneas 7.03	554,9	0,9946	0,58	619,9	0,9936	47,1	11,8
Nanolíneas 7.04	576,5	0,9976	0,60	603,7	0,9976	45,4	12,7
Nanolíneas 7.05	582,0	0,9992	0,64	603,7	0,9986	47,6	12,2
Nanolíneas 7.06	582,0	0,9994	0,71	628,1	0,9992	43,1	13,5
Nanolíneas 7.07	568,5	1,0000	0,58	619,9	0,9996	46,2	12,3
Nanolíneas 7.08	582,0	0,9992	0,55	641,6	0,9994	53,8	10,8
Nanolíneas 7.09	568,5	1,0000	0,60	676,8	0,9994	45,8	12,4
Nanolíneas 7.10	576,6	0,9989	0,59	736,3	0,9990	46,4	12,4
Nanolíneas 7.11	606,4	0,9985	0,66	668,6	0,9939	42,5	14,3
Promedio	577,4			641,6		47,0	12,4
Desv.estand.	13,2			41,5		3,5	1,0

FRAGMENTO	λ_{\min}		Abs	$\lambda_{T\% \text{ cte}}$		FWHM (nm)	FOM (RIU ⁻¹)
	nm·RIU ⁻¹	R ²		nm·RIU ⁻¹	R ²		
Nanodiscos 9.01	569,3	1,0000	0,80	573,0	0,9916	47,0	12,1
Nanodiscos 9.02	544,1	0,9994	0,75	495,4	0,9992	44,9	12,1
Nanodiscos 9.03	527,8	0,9969	0,77	503,5	0,9976	46,9	11,2
Nanodiscos 9.04	519,7	0,9985	0,73	519,7	0,9985	39,9	13,0
Nanodiscos 9.05	533,3	0,9993	0,74	498,1	0,9993	36,8	14,5
Nanodiscos 9.07	541,4	0,9965	0,77	517,0	0,9966	33,4	16,2
Nanodiscos 9.09	517,0	0,9993	0,72	487,3	0,9989	36,1	14,3
Nanodiscos 9.10	517,1	0,9970	0,70	487,3	0,9989	37,1	14,0
Nanodiscos 9.11	517,0	0,9993	0,64	473,7	1,0000	43,7	11,8
Nanodiscos 9.12	530,6	0,9989	0,70	508,9	0,9992	40,7	13,1
Promedio	531,7			506,4		40,7	13,2
Desv.estand.	16,5			27,3		4,8	1,5

FRAGMENTO	λ (nm)	λ_{cte} (nm)	
		Abs·RIU ⁻¹	R ²
Nanolíneas 7.02	836	2,6	0,9997
Nanolíneas 7.03	838	2,7	0,9988
Nanolíneas 7.04	840	2,3	0,9994
Nanolíneas 7.05	844	2,5	0,9993
Nanolíneas 7.06	852	2,3	0,9975
Nanolíneas 7.07	836	2,4	0,9997
Nanolíneas 7.08	835	3,2	0,9996
Nanolíneas 7.09	838	2,3	0,9993
Nanolíneas 7.10	836	3,0	0,9993
Nanolíneas 7.11	845	2,6	0,9986
Promedio		2,6	
Desv.estand.		0,3	

FRAGMENTO	λ (nm)	λ_{cte} (nm)	
		Abs·RIU ⁻¹	R ²
Nanodiscos 9.01	840	6,2	0,9973
Nanodiscos 9.02	835	5,5	0,9965
Nanodiscos 9.03	840	4,5	0,9988
Nanodiscos 9.04	829	7,5	0,9968
Nanodiscos 9.05	828	8,0	0,9962
Nanodiscos 9.07	835	9,3	0,9967
Nanodiscos 9.09	830	8,1	0,9946
Nanodiscos 9.10	829	7,4	0,9926
Nanodiscos 9.11	829	5,0	0,9961
Nanodiscos 9.12	835	5,5	0,9969
Promedio		6,7	
Desv.estand.		1,6	

Sin embargo al medir la sensibilidad a una λ constante, la λ donde se obtuvo la sensibilidad máxima generalmente no coincidió en transmitancia y absorbancia, obteniendo las pendientes máximas a longitudes de onda inferiores (unos 5 nm). Los valores de sensibilidad obtenidos son en este caso positivos al contrario que en transmitancia, y se debe a que las longitudes de onda seleccionadas se encuentran a la derecha del máximo, produciendo un cambio positivo en la absorbancia al incrementar el índice de refracción. Los valores obtenidos para las nanolíneas oscilan entre 2,2 Abs·RIU⁻¹ y 3,2 Abs·RIU⁻¹, obteniendo un valor medio de **2,6 ± 0,3 Abs·RIU⁻¹**. Los valores obtenidos para los nanodiscos sin embargo, oscilan entre 4,5 Abs·RIU⁻¹ y 9,3 Abs·RIU⁻¹, obteniendo un valor medio de **6,7 ± 1,6 Abs·RIU⁻¹**. La sensibilidad promedio de los **nanodiscos** es **2,6 veces mayor** que la sensibilidad promedio de las nanolíneas en **absorbancia**, sin embargo al medir en **transmitancia**, la **sensibilidad de los nanodiscos fue 2 veces mayor**. La variabilidad obtenida en los nanodiscos entre los diferentes fragmentos de nanoestructuras fue 5 veces mayor respecto a las nanolíneas (Tabla 4.9). En transmitancia sin embargo, la variabilidad fue 2,2 veces mayor para los nanodiscos.

Atendiendo a los resultados obtenidos se decidió trabajar siempre en absorbancia al trabajar en modo espectral.

4.3.2.4. Respuesta sensora

Tal y como se ha comentado anteriormente, el espectrofotómetro puede obtener sensogramas monitorizando la transmitancia o la absorbancia a una longitud de onda constante. Todos los sensogramas se han obtenido en absorbancia, principalmente por el mero hecho de que al trabajar en longitudes de onda mayores a λ_{LSPR} el cambio de señal al aumentar en índice de refracción es positivo.

Se analizó la respuesta sensora de las nanoestructuras de nanolíneas y nanodiscos a la longitud de onda donde la pendiente era máxima (Tabla 4.10, apartado anterior), con el objetivo de confirmar que la sensibilidad de los espectros obtenidos coincidían con la sensibilidad obtenida en el sensograma. Para ello, se hizo pasar soluciones de NaCl, con diferentes índices de refracción por la celda (IR 1,3330, 1,3383, 1,3435, 1,3488, 1,3541 y 1,3594) a un flujo constante ($50 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$) y se midió cómo variaba la absorbancia en el tiempo a la longitud de onda donde la sensibilidad era máxima. Las nanoestructuras no presentaron histéresis en la medida, obteniendo tanto al aumentar como al disminuir el índice de refracción, el mismo salto y volviendo al punto inicial. Además las sensibilidades obtenidas en modo sensograma y modo espectral coincidían. En la siguiente figura se muestra a modo de ejemplo la nanoestructura de nanolíneas 7.04 y la nanoestructura de nanodiscos 9.01. Para la nanoestructura de nanolíneas, se obtuvo una sensibilidad de $2,28 \text{ Abs}\cdot\text{RIU}^{-1}$, mientras que al medir los espectros la sensibilidad obtenida a $\lambda = 842 \text{ nm}$ fue de $2,25 \text{ Abs}\cdot\text{RIU}^{-1}$. Para la nanoestructura de nanodiscos se obtuvo una sensibilidad de $6,1 \text{ Abs}\cdot\text{RIU}^{-1}$, mientras que al medir los espectros la sensibilidad obtenida a $\lambda = 840 \text{ nm}$ fue de $6,2 \text{ Abs}\cdot\text{RIU}^{-1}$.

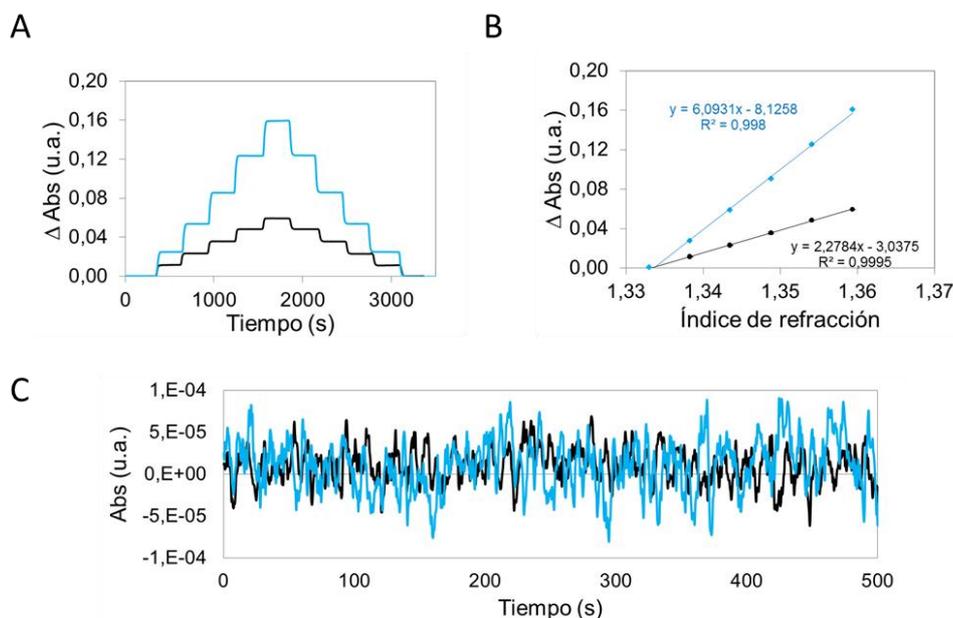


Figura 4.25. Sensograma a $\lambda_{842\text{nm}}$ (absorción vs. tiempo) para la nanoestructura de nanolíneas 7.04 (negro) y a $\lambda_{840\text{nm}}$ para la nanoestructura de nanodiscos 9.01 (azul) en función de diferentes índices de refracción (IR: 1,3330, 1,3347, 1,3383, 1,3435, 1,3505, 1,3594, 1,3505, 1,3383, 1,3347, y 1,3330). B) Variación de la absorbancia de las dos nanoestructuras en función del índice de refracción del medio dieléctrico (negro: nanolíneas 7.04 y azul: nanodiscos 9.01). C) Representación del ruido de nanolíneas (negro) y nanopilares (azul) en el tiempo.

La respuesta sensora de un dispositivo no sólo depende de la sensibilidad, el ruido del sistema también juega un papel muy importante. Se calculó el **ruido promedio** de todos los fragmentos de nanolíneas y nanodiscos en agua. Se obtuvo un valor de $7 \cdot 10^{-5}$ Abs para las **nanolíneas y los nanodiscos**. El **límite de detección**, es decir el mínimo cambio que genera una señal detectable fue de $2.1 \cdot 10^{-4}$ Abs para las nanolíneas y para los nanodiscos. La resolución promedio fue de $8 \cdot 10^{-5}$ RIU para las **nanolíneas** y $3,1 \cdot 10^{-5}$ RIU para los **nanodiscos** (2,6 veces mayor para los nanodiscos).

Soluciones con índice de refracción cercanos a la resolución del sistema se midieron satisfactoriamente en la cubeta LSPR, para comprobar que la resolución calculada del sistema era correcto: 1,3330-1,33327 (0,00-0,16% NaCl) para las nanolíneas y 1,3330- 1,33317 (0,01-0,1% NaCl) para los nanodiscos.

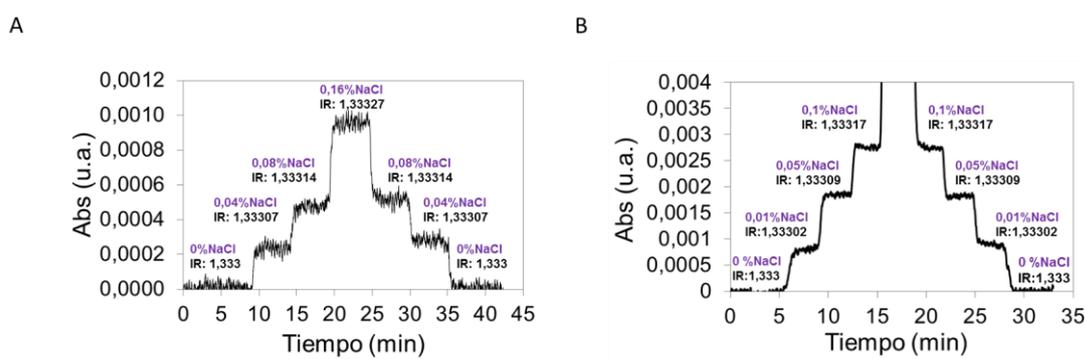


Figura 4.26. A) Sensograma a $\lambda_{835 \text{ nm}}$ (absorción vs. tiempo) para una nanoestructura de nanolíneas en función de diferentes índices de refracción (IR: 1,3330 (0%NaCl), 1,33307 (0,04%NaCl), 1,33314 (0,08%NaCl), 1,33327 (0,16% NaCl), 1,33314 (0,08%NaCl), 1,33307 (0,04%NaCl), y 1,3330 (0%NaCl)). B) Sensograma a $\lambda_{835 \text{ nm}}$ (absorción vs. tiempo) para una nanoestructura de nanodiscos en función de diferentes índices de refracción (IR: 1,3330 (0%NaCl), 1,33302 (0,01%NaCl), 1,33309 (0,05%NaCl), 1,33317 (0,1% NaCl), 1,33309 (0,05%NaCl), 1,33302 (0,01%NaCl), y 1,3330 (0%NaCl)).

Las resoluciones obtenidas con sensores SPR son superiores y se encuentran entre 10^{-6} y 10^{-8} RIU. Al comparar estos resultados con otros sistemas LSPR por ejemplo encontramos que la resolución obtenida con microagujeros es de $1,5 \cdot 10^{-6}$ RIU, sin embargo arrays triángulos presentan una resolución de $1 \cdot 10^{-4}$ RIU (Live, Bolduc, and Masson 2010). Los valores obtenidos son parecidos a los que podemos encontrar en literatura, mejorando en algunos casos.

4.3.3. DISTANCIA DE PENETRACIÓN

Generalmente se considera que los campos electromagnéticos utilizados como sondas de detección en LSPR penetran más profundamente en el dieléctrico que los espesores de capa habituales de las biomoléculas adsorbidas. Se ha comprobado que la sensibilidad de los inmunosensores LSPR se puede reducir considerablemente durante las etapas de biocionalización. Por ejemplo, se comprobó que las nanopartículas de Ag triangulares presentaban una sensibilidad de $191 \text{ nm} \cdot \text{RIU}^{-1}$, pero cuando se modificaban con una SAM la

sensibilidad disminuía hasta $150 \text{ nm}\cdot\text{RIU}^{-1}$. Cuando lo bio-receptores se inmovilizaron en la superficie, observaron que la sensibilidad en la detección de eventos de unión molecular fue notablemente baja.

En este apartado se ha testado la sensibilidad de la nanoestructura en tres situaciones distintas: 1) Una superficie nanoestructurada de oro limpia, (2) la superficie cubierta con un bio-receptor, y (3) la superficie cubierta por dos capas de biomoléculas (bio-receptor y analito).

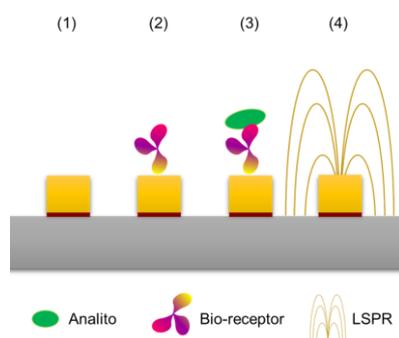


Figura 4.27. Representación gráfica de tres situaciones: (1) superficie nanoestructurada de oro limpia, (2) superficie de oro cubierta con un bio-receptor, (3) superficie cubierta por dos capas de biomoléculas (bio-receptor y analito) y (4) representación de la resonancia del plasmón superficial localizado.

Para ello, se seleccionó una nanoestructura de nanodiscos que presetaba $\lambda_{\text{LSPR}} = 819 \text{ nm}$. Inicialmente, la sensibilidad de la nanoestructura era de $538 \text{ nm}\cdot\text{RIU}^{-1}$ para λ_{LSPR} y $4,95 \text{ Abs}\cdot\text{RIU}^{-1}$ a $\lambda = 835 \text{ nm}$. Mencionar que la sensibilidad a $\lambda = 813 \text{ nm}$ (del λ_{LSPR} a la izquierda) era de $6,6 \text{ Abs}\cdot\text{RIU}^{-1}$, valor superior al obtenido en $\lambda = 835 \text{ nm}$. Sin embargo, esta longitud de onda no es tan sensible como debiera a cambios de IR procedentes de capas delgadas de biomoléculas. En general, las biomoléculas, además de desplazar el pico LSPR, producen un ensanchamiento del pico de absorción. Las longitudes de onda superiores a λ_{LSPR} son más sensibles a cambios de IR procedentes de capas delgadas de biomoléculas, por está razón siempre se ha trabajado con longitudes de onda superiores a λ_{LSPR} (Figura 4.28-B).

Al incorporar un bio-receptor a la superficie nanoestructurada, se observó como se obtuvo una unión óptima que arroja un valor de $\sim 17 \cdot 10^{-3} \text{ Abs}$ a $\lambda = 835 \text{ nm}$ (Figura 4.28-A).

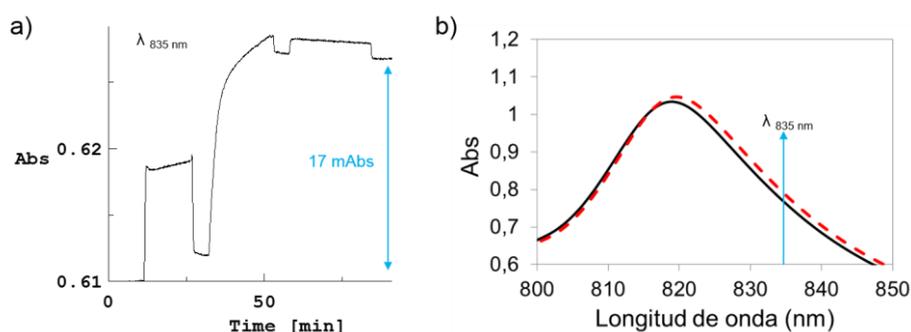


Figura 4.28. A) Señisograma de la unión del bio-receptor a la nanoestructura (17 mAbs) y B) espectros antes y después de la inmovilización del bio-receptor a la superficie.

Una vez realizada la unión, se realizaron las medidas de índice de refracción de nuevo sobre el sensor, esta vez con el bio-receptor incorporado, mostrando una ligera disminución de los valores de sensibilidad, $503 \text{ nm}\cdot\text{RIU}^{-1}$ para λ_{LSPR} y $4,89 \text{ Abs}\cdot\text{RIU}^{-1}$ a $\lambda = 835 \text{ nm}$. La longitud de onda donde la sensibilidad era máxima se mantuvo en $\lambda = 835 \text{ nm}$.

Posteriormente se incubó la superficie a una concentración alta de analito ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) a un flujo de $50 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ durante 30 min. Al incorporar el analito podemos observar en la Figura 4.29 como se obtiene una unión óptima que arroja un valor de $30\cdot 10^{-3} \text{ Abs}$. Una vez realizada la unión, se realizaron las medidas de índice de refracción de nuevo sobre el sensor, esta vez con el analito incorporado, mostrando una ligera disminución de los valores de sensibilidad, tanto para λ_{LSPR} ($488 \text{ nm}\cdot\text{RIU}^{-1}$) como para $\lambda = 835 \text{ nm}$ ($4,64 \text{ Abs}\cdot\text{RIU}^{-1}$). La longitud de onda donde la sensibilidad era máxima se mantuvo en $\lambda = 835 \text{ nm}$.

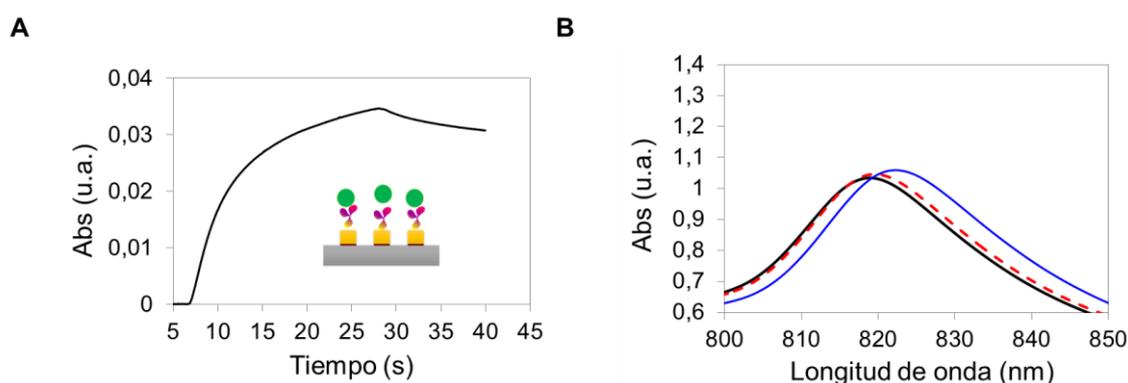


Figura 4.29. A) Sensograma de unión del anticuerpo con el analito. B) Espectros de absorción de la nanoestructura limpia (negro), de la nanoestructura con el bio-receptor (rojo) y con el analito (azul).

Además, se calculó el ruido antes y después de la incorporación de la proteína al sensor obteniendo mayor ruido cuando la superficie sensora está biofuncionalizada ($5,7\cdot 10^{-5} \text{ Abs}$ superficie limpia, $6,05\cdot 10^{-5} \text{ Abs}$ para la superficie biofuncionalizada con caseína y $7,60\cdot 10^{-5}$ para la superficie nanoestructurada con dos capas de biomoléculas). Este resultado es habitual en estos sistemas, ya que a medida que añadimos biomoléculas al sistema, el ruido suele aumentar ligeramente. Esta tendencia se repitió con los diferentes sistemas estudiados.

Estos resultados corroboran la hipótesis de la pérdida de sensibilidad al alejarnos de la superficie. Sin embargo, esta disminución no es muy importante. Además la longitud de onda más sensible en $\text{Abs}\cdot\text{RIU}^{-1}$ no varía en función de las diferentes capas de biomoléculas.

4.3.4. LIMPIEZA DE NANOESTRUCTURAS

La biofuncionalización es un proceso que involucra una secuencia de tratamientos físico-químicos de la superficie de la nanoestructura, cuya finalidad es obtener la inmovilización de moléculas bio-activas sobre ella. Para ello, en primer lugar es necesario limpiar las nanoestructuras de impurezas del proceso de fabricación o de biomoléculas en el caso de que

se quiera reutilizar la nanoestructura. Este último hecho es muy importante para que las nanoestructuras sean competitivas respecto a superficies lisas de oro (utilizadas habitualmente en SPR) o nanopartículas de oro (mucho más económicas y fáciles de sintetizar).

En este apartado se han estudiado dos métodos de limpieza de nanoestructuras. El primero de ellos consiste en aplicar el tratamiento químico denominado piraña a la superficie sensora y el segundo método consiste en aplicar un tratamiento de plasma de oxígeno a la superficie sensora.

a) Ataque químico con solución piraña

El ataque químico con solución piraña, es uno de los métodos más utilizado para la limpieza de residuos orgánicos que suelen haber sobre la superficie de un sustrato. La disolución piraña, es una mezcla de ácido sulfúrico (H_2SO_4) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que provoca una reacción exotérmica y altamente oxidante. La mezcla remueve la mayoría de materia orgánica y también tiene la capacidad de hidroxilar la superficie (adicionar grupos OH^-) haciéndola altamente hidrofílica.

Para la limpieza de la nanoestructura se ha utilizado una mezcla de H_2SO_4 (96%-98%): H_2O_2 (30%): H_2O en una relación 1:1:1, en contacto con la superficie durante 90 s por cada ciclo.

En la siguiente figura se presenta los espectros de absorción de la nanoestructura tras 2 ciclos de piraña:

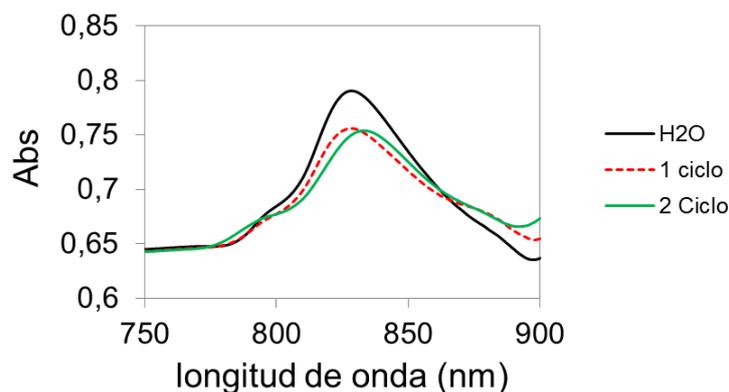


Figura 4.30. Espectros de absorción de una nanoestructura de nanolíneas tras dos ciclos de ataque químico con solución piraña. En negro la superficie limpia, en rojo tras el primer ataque químico y en verde tras el segundo ataque químico.

En la Figura 4.30 se presentan 3 espectros de absorción de una nanoestructura de nanolíneas. En negro, el espectro inicial de la nanoestructura limpia, en rojo tras un ciclo de limpieza en solución piraña, y en verde tras el segundo ciclo de limpieza en piraña. Claramente se observa cómo tras el primer ciclo, la intensidad de la banda de absorción disminuye. Con

el segundo ciclo, la intensidad de la banda de absorción sigue disminuyendo pero casi no es perceptible, no obstante el máximo de absorción se desplaza a longitudes de ondas mayores. Según estos resultados, la solución piraña daña la nanoestructura de oro y modifica el pico de absorción LSPR. Este mismo efecto ha sido observado anteriormente en otras nanoestructuras periódicas de nanodiscos (Rodríguez-Cantó et al. 2011).

Tabla 4.10. Sensibilidad de λ_{LSPR} (nm·RIU⁻¹) y a una λ_{cte} (Abs·RIU⁻¹) de una nanoestructura de nanolíneas al inicio y tras uno y dos ciclos de piraña.

Nanolíneas							
RI	λ_{LSPR}			RI	Abs ($\lambda_{850\text{nm}}$)		
	INICIO	1 CICLO	2 CICLO		INICIO	1 CICLO	2 CICLO
1,3330	828,0	828,0	829,0	1,3330	0,735	0,777	0,767
1,3347	829,5	829,3	830,0	1,3347	0,739	0,780	0,770
1,3365	830,5	830,3	831,3	1,3365	0,742	0,785	0,773
1,3383	831,5	831,3	832,3	1,3383	0,750	0,788	0,776
1,3400	832,5	832,0	833,0	1,3400	0,754	0,792	0,779
1,3418	834,0	833,6	834,3	1,3418	0,758	0,795	0,782
R²	0,994	0,991	0,996	R²	0,987	0,996	0,999
nm·RIU⁻¹	648	603	588	Abs·RIU⁻¹	2,8	2,1	1,7

Tal y como se muestra en la tabla la sensibilidad de λ_{LSPR} se vio afectada por el tratamiento químico en los dos ciclos (desde 648 nm·RIU⁻¹ a 603 nm·RIU⁻¹ en el primer ciclo, y hasta 588 nm·RIU⁻¹ en el segundo). La sensibilidad de la nanoestructura al medir a una longitud de onda también se vio afectada. La sensibilidad máxima se obtuvo a $\lambda = 850$ nm y con cada ciclo disminuyó la sensibilidad de la nanoestructura (desde 2,8 Abs·RIU⁻¹ a 2,1 Abs·RIU⁻¹ en el primer ciclo, y hasta 1,7 Abs·RIU⁻¹ en el segundo).

b) Tratamiento con plasma de oxígeno

Otro de los métodos más utilizados para limpiar y activar las superficies de oro es el plasma de oxígeno. La superficie en contacto con el plasma de oxígeno experimenta interacciones con los iones del gas. Las especies activadas en el gas combinadas con la energía UV crean una reacción química con los contaminantes de la superficie, derivando en una volatilización y eliminación de éstos.

El plasma de oxígeno se realizó con la técnica de grabado por iones reactivos (RIE, del inglés Reactive Ion Etching). Este proceso se realiza dentro de una cámara en alto vacío donde se forma el plasma de oxígeno. La superficie en contacto con el plasma es bombardeada con las moléculas de dicho gas ionizadas, y estas especies energéticas y su energía son transferidas desde el plasma a la superficie del material. Las reacciones con la superficie se dan a una profundidad desde varios cientos de angstroms hasta 10 μm sin cambiar las propiedades del sustrato. Al tratarse de un plasma de oxígeno la superficie también es enriquecida con grupos hidroxilo, los cuales benefician futuros procesos de modificación química.

En primer lugar se establecieron las condiciones óptimas del programa de limpieza con plasma de oxígeno en el RIE.

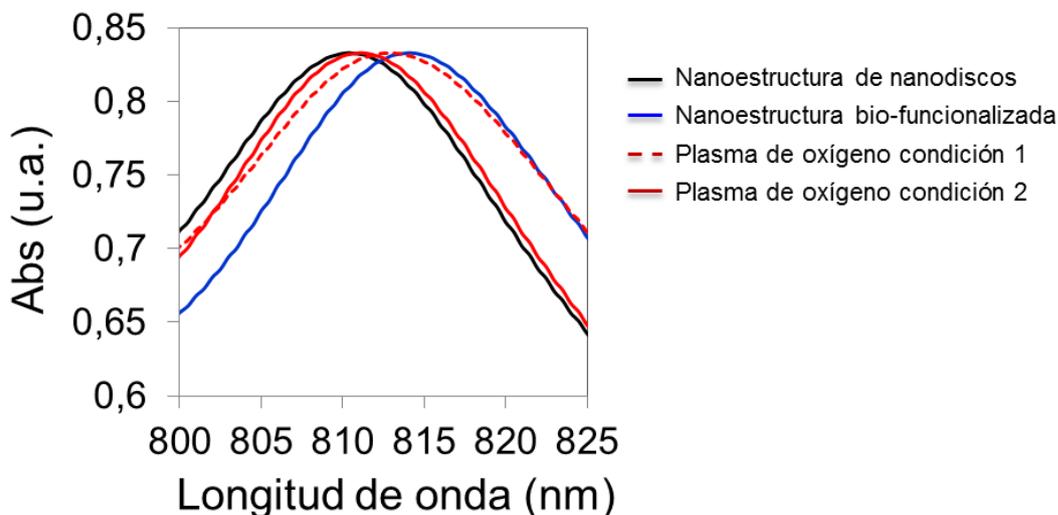


Figura 4.31. Espectros de transmisión de una nanoestructura de nanodiscos tras dos ciclos distintos de ataque de plasma de oxígeno. – Espectro inicial, - Espectro tras un ensayo de inmovilización de anticuerpo, - Espectro tras el primer ciclo de plasma de oxígeno en las condiciones 1: 10 min, 10 mTorr y 10 W, y – Espectro tras el ciclo de plasma de oxígeno en las condiciones 2: 10 min, 20 mTorr y 20 W.

En la Figura 4.31 se presentan 4 espectros de absorbancia de una nanoestructura de nanodiscos. En negro, el espectro inicial de la nanoestructura limpia. En azul, el espectro de la nanoestructura tras la bio-funcionalización con un anticuerpo. λ_{LSPR} se desplaza hacia el rojo, según lo esperado. La línea discontinua en rojo, el espectro de la nanoestructura tras un ciclo de plasma de oxígeno en las condiciones 1, y en rojo, el espectro de la nanoestructura tras un ciclo de plasma de oxígeno en las condiciones 2. Como se puede observar, tras el primer ciclo de plasma de oxígeno (espectro rojo, línea discontinua) en las condiciones 1 (ionización suave):

Tiempo de plasma de oxígeno: 10 min,
Presión de cámara: 10 mTorr,
Potencia de radiofrecuencia: 10 W,

el espectro no recupera el espectro inicial, el mínimo se desplazó ligeramente hacia longitudes de onda menores. Sin embargo, en las condiciones 2 (más energéticas), al aumentar dos veces la presión de cámara y la potencia de radiofrecuencia,

Tiempo de plasma de oxígeno: 10 min,
Presión de cámara: 20 mTorr,
Potencia de radiofrecuencia: 20 W,

el espectro tras la limpieza (rojo) recupera el espectro inicial (espectro negro). Tanto la forma como la intensidad del espectro se mantuvieron tras el tratamiento de plasma. Además, tras cada ciclo de limpieza, se midió la sensibilidad de λ_{LSPR} y en absorbancia (λ_{cte}) a diferentes índices de refracción y se compararon con los valores iniciales de la nanoestructura (Tabla 4.11).

Tabla 4.11. Sensibilidad de λ_L (nm·RIU⁻¹) y a una λ_{cte} (Abs·RIU⁻¹) de una nanoestructura de nanodiscos al inicio y tras uno y dos ciclos de piraña.

Nanodiscos							
RI	λ_{LSPR}			RI	Abs (λ_{828nm})		
	INICIO	1 CICLO	2 CICLO		INICIO	1 CICLO	2 CICLO
1,3330	811,5	810,5	811,0	1,3330	0,659	0,605	0,616
1,3383	814,5	813,5	814,0	1,3383	0,696	0,640	0,651
1,3435	817,0	816,5	817,0	1,3435	0,737	0,678	0,691
1,3488	820,0	819,5	819,5	1,3488	0,784	0,727	0,735
1,3541	823,0	822,0	822,0	1,3541	0,830	0,770	0,776
1,3594	825,5	824,5	825,0	1,3595	0,864	0,800	0,812
R²	0,999	0,998	0,999	R²	0,998	0,996	0,999
nm·RIU⁻¹	533	533	522	Abs·RIU⁻¹	8,0	7,7	7,6

Tal y como se muestra en la tabla la sensibilidad λ_{LSPR} no se vio muy afectada por el tratamiento de plasma. En el segundo ciclo disminuyó ligeramente. Tampoco se vio muy afectada la sensibilidad de la nanoestructura al medir a una longitud de onda (Abs·RIU⁻¹). La sensibilidad máxima de la nanoestructura al inicio y tras los ciclos de plasma se obtuvo a $\lambda = 828$ nm y con cada ciclo disminuyó ligeramente el valor de la sensibilidad.

Por lo tanto, el tratamiento de limpieza con plasma resultó ser satisfactoria en las siguientes condiciones:

- 1.- Tipo de gas: Oxígeno (O₂).
- 2.- Presión de cámara: 20 mTorr.
- 3.- Potencia de radiofrecuencia: 20 W.
- 4.- Tiempo de grabado: 10 min.

Se concluye por lo tanto que el método de limpieza con plasma de oxígeno es preferible al ataque químico con solución piraña.

4.3.5. ENSAYOS PRELIMINARES Y PUESTA EN MARCHA DEL BIOSENSOR LSPR

Para la puesta en marcha del dispositivo se pensó primeramente en la aplicación de un sistema bien conocido formado por anticuerpos IgG - anti-IgG. Este sistema, es altamente específico y su interacción es fuerte y adecuada para este tipo de estudios. El sistema consiste en que la anti-IgG reconoce específicamente la IgG. En este apartado no se ha optimizado la biofuncionalización, ni la detección, simplemente, se ha comprobado la capacidad biosensora de la plataforma.

A continuación, se mostrarán los resultados obtenidos para dos formatos de medida diferentes empleando la interacción IgG-anti-IgG. El primero se basa en un formato indirecto. Este formato consiste en inmovilizar en la superficie el elemento que se reconoce (IgG) y se hace pasar por la superficie el elemento reconocedor (anti-IgG) (Figura 4.32-B). El segundo formato que se ha estudiado es un formato directo. Este formato consiste en inmovilizar en la

superficie el elemento reconocedor (anti-IgG) y se hace pasar por la superficie el elemento a reconocer (IgG) (Figura 4.32-A). La aplicación en la detección de un sistema relevante en el área de agroalimentación, como la detección de caseína se estudiará en el capítulo 5.

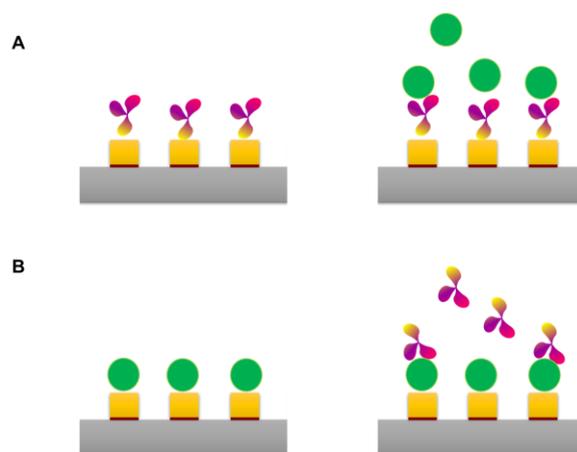


Figura 4.32. A) Formato de detección directo, y B) formato de detección indirecto.

Detección de anti-inmunoglobulina de conejo empleando como receptor inmunoglobulina en nanodiscos de oro: Formato indirecto.

Tal y como hemos visto en los apartados anteriores, al trabajar en modo sensograma la medidas han de realizarse a una longitud de onda constante. Entre las dos nanoestructuras estudiadas los nanodiscos han dado un mejor resultado por lo que se han seleccionado éstas para la aplicación de este modelo.

Como se mencionó en la introducción (definiciones generales) una de las metodologías de funcionalización utilizadas en los sensores está basada en la formación de una monocapa (SAM) mixta. En esta tesis hemos trabajado con SAMs que contiene una mezcla de moléculas cuyos grupos funcionales de cabeza están formados por moléculas de carboxilo o metilo. Siendo las cadenas de carboxilo un poco más largas. Esta funcionalización nos deja una superficie cubierta principalmente de metilos (70%) y en menor medida por moléculas de carboxilo (30%).

Una vez que la SAM está formada sobre la superficie de oro, el chip es ensamblado en la celda y se realizan sobre él las consecutivas reacciones de conjugación. La inmovilización del anticuerpo se realizó en la celda fluídica a flujo continuo ($50 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$). En primer lugar se activaron los grupos carboxilos de la monocapa de alcanotioles creada en la superficie con una mezcla de EDC y NHS. De esta manera se crearon compuestos reactivos intermediarios que reaccionan con los grupos aminos libres del anticuerpo para formar un enlace amida. Los grupos activos se hicieron reaccionar con $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de IgG en tampón PBS, pH 7.4 durante

30 min. Se ha mostrado un esquema general del proceso en materiales y métodos Figura 4.6 y en la Figura 4.33 se observa el sensograma obtenido de la inmovilización del bioreceptor.

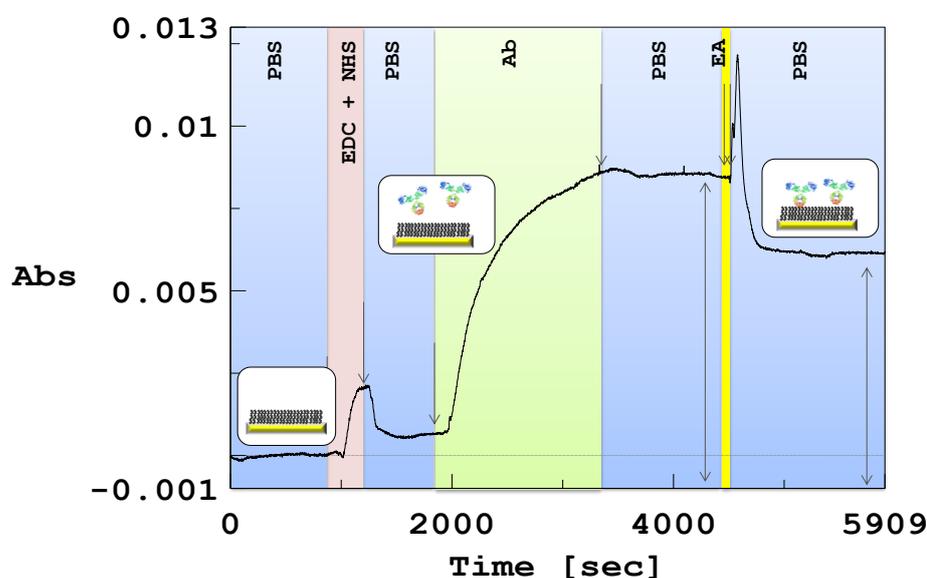


Figura 4.33. Sensograma que muestra la inmovilización de la IgG a $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ sobre la SAM de MUA/OCT formada en los nanodiscos de oro. *Etapa 1: activación de los grupos carboxilos (EDC + NHS). Etapa 2: unión covalente entre las aminas del anticuerpo y los grupos carboxilos activados (Ab). Etapa 3: desactivación de grupos carboxilos sin reaccionar con etanolamina (EA).*

La principal ventaja de utilizar esta metodología es que permite que el bioreceptor esté lo suficientemente cerca y estable de la superficie sensora (1-3 nm), ya que a medida que nos alejamos de la superficie sensora, se va perdiendo sensibilidad. Además el anticuerpo no sufre ningún tipo de tratamiento ya que se ancla en su forma natural.

Cualquier fisoabsorción que se genere en las áreas circundantes al sensor, en particular sobre el sustrato de vidrio, contribuirá en mayor o menor medida a la señal. En los sistemas nanoestructurados el área más sensible se encuentra en la región vidrio/medio/interfaz debido al entorno no homogéneo dieléctrico que experimenta la nanoestructura. El proceso de pasivación de la superficie constituye una etapa crítica y determinante a la hora de desarrollar un biosensor y de aplicarlo en la detección de moléculas biológicas. La pasivación de las superficies nanoestructuradas se consiguió a través de la inyección de ciclos de $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de BSA en solución tampón PBS.

Para la detección de la IgG se inyectaron diferentes concentraciones de la IgG anti-conejo, preparadas en tampón PBS, pH7,4. El rango de concentraciones que se evaluó fue de 8, 10, 17, 33, 67, 133, 267, 333 y 667 nM. Las curvas obtenidas se pueden observar en la Figura 4.34. La unión IgG-anti-IgG se regeneró hasta la línea base con una solución de ácido clorhídrico 20 mM tal y como se observa en el sensograma.

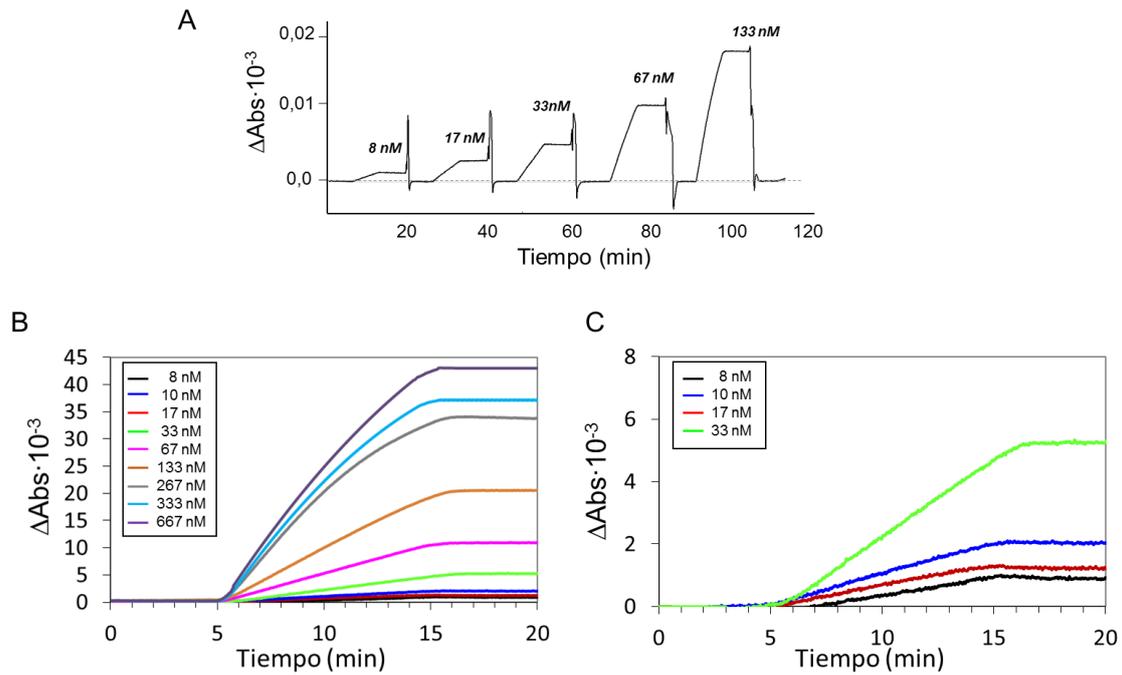


Figura 4.34. A) sensograma para la detección de anti-IgG de conejo. B) Señales de cada concentración y C) Señales de las concentraciones más bajas.

Con estos datos se realizó la curva de calibración. La gráfica se muestra en la Figura 4.35-B. A partir de estos resultados se realizó un ajuste no lineal de tipo hiperbólico para todos los datos con una R^2 de 0,990 y para las concentraciones entre 8 y 133 nM un ajuste lineal con una R^2 de 0,997. El límite de cuantificación fue determinado obteniendo un valor de 1,4 nM. Esta sería la mínima concentración efectiva que este dispositivo puede llegar a detectar para este sistema de anticuerpos en el tampón correspondiente. Este valor nos da un indicio de la viabilidad de nuestro dispositivo como herramienta versátil en la detección específica de un sistema real relevante.

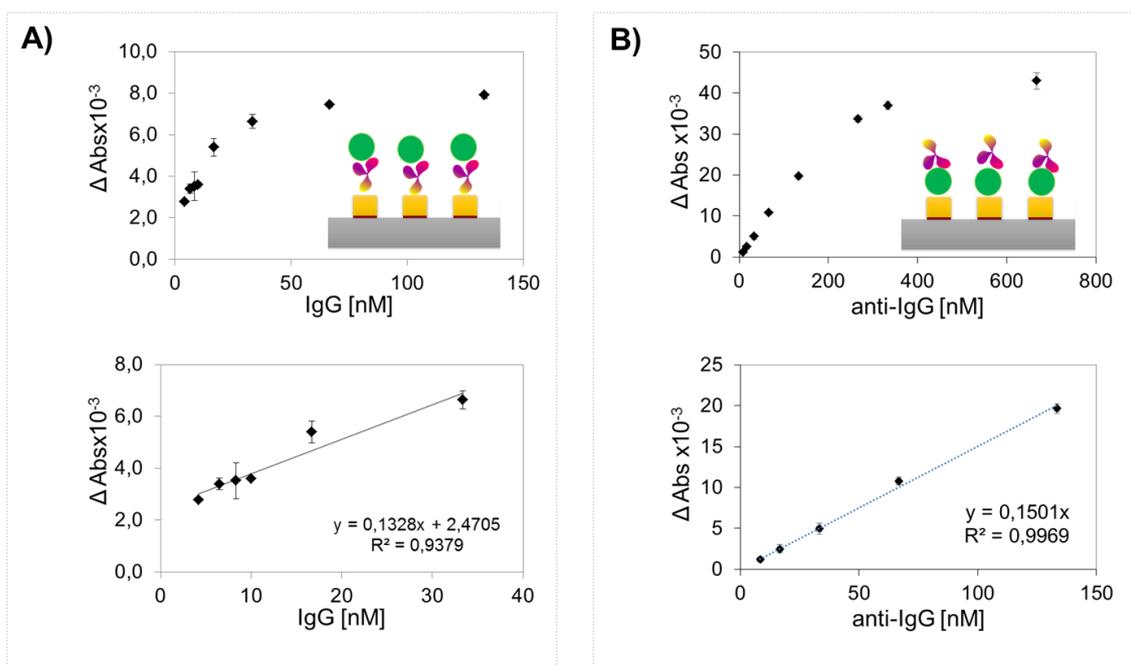


Figura 4.35. Curvas de calibrado para A) diferentes concentraciones de IgG y B) diferentes concentraciones de anti-IgG.

Detección de inmunoglobulina empleando como receptor anti-inmunoglobulina de conejo en nanodiscos de oro: formato directo.

Este mismo estudio se realizó para la detección de IgG, en lugar de anti-IgG de conejo. Para este estudio se utilizó la misma metodología, la funcionalización de la superficie se llevó a cabo con la misma monocapa de SAM mixta. El receptor, en este caso anti-IgG de conejo se unió a la SAM a través de la activación de los grupos carboxilos con los reactivos EDC/NHS a la misma concentración, $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de anti-IgG en tampón PBS, pH 7.4 durante 30 min. Y finalmente se ensayaron disoluciones de IgG en el rango de concentraciones: 4, 6, 8, 10, 17, 33, 67, y 133 nM.

Los sensogramas correspondientes a la detección de la muestra se muestran en la Figura 4.36.

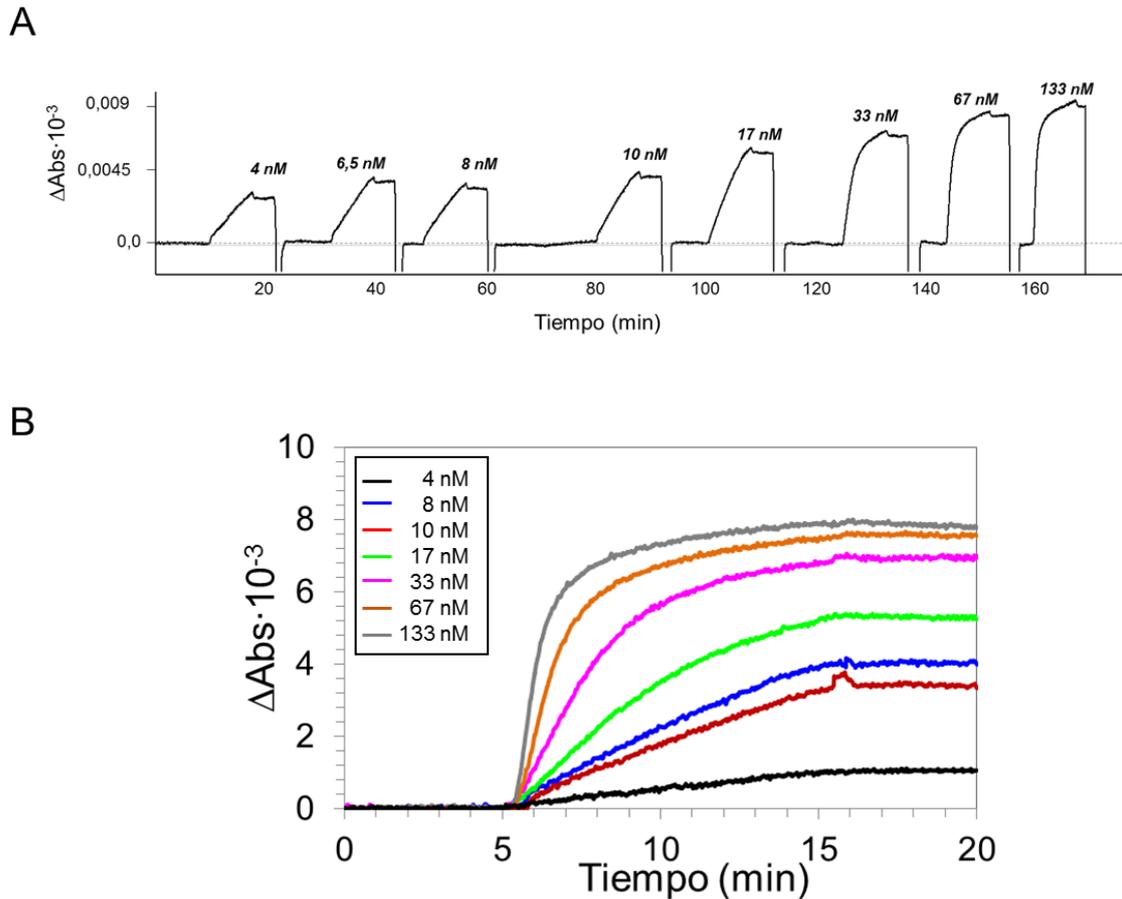


Figura 4.36. A) sensograma para la detección de IgG B) Señales de cada concentración.

Con estos datos se realizó la curva de calibración. La gráfica se muestra en la Figura 4.35-B. A partir de estos resultados se realizó un ajuste no lineal de tipo hiperbólico para todo los datos con una R^2 de 0,9867 y para las concentraciones entre 4 y 33 nM un ajuste lineal con una R^2 de 0,938. El ajuste lineal al no presentar una R^2 aceptable, la cuantificación del límite de detección se realizó con el ajuste no lineal y el límite de detección fue determinado obteniendo un valor de 1 nM. Este valor mejora, el obtenido recientemente con nanopilares resonantes para este sistema modelo (4,7 nM) (Hernández et al. 2016)

Al comparar los dos sistemas, una de las diferencias más significativas consiste en el rango dinámico o parte lineal de la curva de cada formato. El rango lineal es mucho mayor en el formato indirecto. Además en el formato directo la señal se satura muy rápidamente (33 nM) mientras que en el formato indirecto la señal empieza a saturar a partir de 150 nM. La principal razón para que esto ocurra es la orientación del anticuerpo al inmovilizarlo en la nanoestructura. Puede que algunos de los anticuerpos no estén correctamente orientados y debido a eso la señal se sature rápidamente. En el formato indirecto, aunque la IgG también se une aleatoriamente a la superficie, el anti-IgG de cabra al ser policlonal, puede unirse a diferentes epítomos de la molécula y reconocerlo de muchas formas.

4.4. CONCLUSIONES

En este capítulo se ha presentado un biosensor LSPR, conformado por superficies nanoestructuradas altamente sensibles, integradas en una celda fluidica. Esta celda se interroga con un espectrofotómetro de laboratorio que permite el monitoreo de las señales provenientes de los procesos de bio-reconocimiento que se dan sobre las superficies nanoestructuradas. Debido a su compatibilidad con los espectrofotómetros de laboratorio comunes, puede utilizarse como célula universal de flujo LSPR para detección óptica de procesos biológicos.

Dentro de los parámetros estudiados del espectrofotómetro, la única variable influyente fue el ABE, obteniendo los mejores resultados al trabajar con un ABE de 2 nm tanto en modo sensograma como en modo espectral.

Los espectros se pueden representar tanto en transmitancia como en absorbancia. La absorbancia se define como el logaritmo de la transmitancia. Al trabajar en absorbancia se comprobó que se producía un estrechamiento de la banda LSPR lo que mejoró las características del sensor en cuanto a FWHM, obteniendo picos más estrechos y en consecuencia la FOM, obteniendo valores mayores. El estrechamiento de la banda LSPR fue más pronunciado en los nanodiscos que en las nanolíneas, debido principalmente a que los espectros de los nanodiscos son más más intensos.

Se han analizado nanolíneas y nanodiscos como transductores ópticos. La sensibilidad media de las nanolíneas fue de $577 \pm 13 \text{ nm} \cdot \text{RIU}^{-1}$ y la de los nanodiscos de $532 \pm 16 \text{ nm} \cdot \text{RIU}^{-1}$. Los valores medios de FOM para las nanolíneas fue de 11 RIU^{-1} , y para los nanodiscos 12 RIU^{-1} . La sensibilidad medida a una longitud de onda constante sin embargo fue bastante superior para los nanodiscos $6,7 \pm 1,6 \text{ Abs} \cdot \text{RIU}^{-1}$ y una resolución de $3,1 \cdot 10^{-5} \text{ RIU}$, mientras que las nanolíneas presentaron una sensibilidad de $2,6 \pm 0,3 \text{ Abs} \cdot \text{RIU}^{-1}$ y una resolución de $8 \cdot 10^{-5} \text{ RIU}$. A partir de estos resultados se deduce que los nanodiscos son más sensibles para aplicaciones de monitoreo con el espectrofotómetro. A contraposición la variabilidad de la sensibilidad en los nanodiscos es mucho mayor, y por lo tanto la repetitividad entre los diferentes fragmentos será peor.

Los resultados para la detección de IgG muestran que la plataforma formada por el espectrofotómetro y las nanoestructuras es capaz de resolver concentraciones pequeñas. Entre los dos protocolos que se llevaron a cabo, el rango dinámico fue mayor para el formato indirecto (1-130 nM frente a 1-33 nM). Los límites de detección en ambos casos fueron similares $\sim 1 \text{ nM}$. La señal se saturó antes para el formato directo, demostrando lo importante que puede llegar a ser la inmovilización del anticuerpo a la superficie. El protocolo aplicado en ambos sistemas, fue rápido y reproducible.

El protocolo de limpieza obtenido en este trabajo es fundamental para la reutilización de las superficies nanoestructuradas. Prácticamente la nanoestructura no perdió sensibilidad

tras los primeros tres procesos de limpieza. El protocolo consistió en la aplicación de un plasma de oxígeno durante 10 minutos.

CAPÍTULO 5

Determinación de caseína en superficies mediante LSPR

5.1. INTRODUCCIÓN

En este capítulo se describe los estudios realizados para la detección de caseína empleando un biosensor LSPR. Particularmente, este capítulo está centrado en la detección y cuantificación de pequeñas cantidades (trazas) de caseína, del orden de unos pocos microgramos por mililitro ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) mediante técnicas inmunoquímicas. El dispositivo que se empleó está formado por nanoestructuras de nanodiscos de oro, una celda fluidica y el espectrofotómetro JASCO.

Estos estudios se realizaron al amparo del proyecto Agrosensor. Para el desarrollo de biosensor, se han utilizado anticuerpos monoclonales anti-caseína desarrollados en el proyecto por NavarraBiomed. Se desarrollaron protocolos de biofuncionalización de superficies nanoestructuradas y de análisis de caseínas. Después se valoró la repetitividad y selectividad del sensor.

A continuación se explica brevemente a modo de introducción, la problemática de las alergias a la leche, selección de la molécula diana y las técnicas actuales de cuantificación, así como los precedentes en la detección de caseínas con técnicas biosensoras.

5.1.1. ALERGENOS

Existe una creciente preocupación a nivel mundial por el aumento de casos por las alergias alimentarias, principalmente debido a su impacto en la seguridad alimentaria y la salud pública. La alergia es una reacción o respuesta inapropiada del organismo ante una sustancia (alérgeno). En la alergia alimentaria, el alérgeno es principalmente una proteína de un alimento con el que entramos en conexión por ingestión, contacto o inhalación.

Aunque se ha demostrado que la leche de varios mamíferos causa reacciones alérgicas, la más frecuente y mejor estudiada es la leche de vaca. Los lactantes presentan una prevalencia aproximadamente entre el 1% y el 15% (Fiocchi et al. 2010), aunque en el 80% de los casos desaparece al alcanzar los 4-5 años. Ante la potencial gravedad de sus reacciones alérgicas, la leche, sus componentes y derivados son ingredientes o sustancias que deben aparecer obligatoriamente en el etiquetado de los alimentos (anexo III bis de la Directiva 2003/89/CE (UE, 2003)).

Se han detectado proteínas ocultas de leche en diversos productos que no deberían de contenerlas como, mermelada, jamón cocido, salchichas, cereales, galletas, dulces, conservas, atún, chocolate, café, vinos, y queso de soja vegetariano (Gern et al., 1991; Giovannacci et al., 2004). Generalmente esta contaminación suele ser no intencionada y surge como consecuencia de adulteraciones o debido a contaminaciones accidentales durante el transporte, el procesado, o por una limpieza inadecuada de los equipos de procesado de alimentos. Por tanto, para evitar que estas contaminaciones no intencionadas lleguen a los consumidores, las empresas están obligadas a realizar estrictos controles de calidad. Existe por lo tanto, un enorme interés en la industria en disponer de técnicas específicas y lo suficientemente sensibles para poder asegurar la correcta manipulación *in situ* y a tiempo real,

siendo los inmunosensores una alternativa a los métodos analíticos que actualmente se utilizan (ELISA) para la monitorización de alérgenos.

El proyecto Agrosensor, tiene como objetivo el desarrollo de un biosensor LSPR que sea capaz de validar los procesos de limpieza. En los procesos de limpieza, la monitorización de los niveles de alérgenos se puede realizar en muestras de enjuague final del sistema de limpieza o en muestras recogidas de las superficies de los equipos de procesado tras la limpieza. En este trabajo se pretende detectar de forma fácil y rápidamente el contenido de leche en superficies de acero.

5.1.2. SELECCIÓN DE MOLÉCULA DIANA

Las empresas dedicadas al procesado de alimentos, suelen añadir a sus preparados una gran variedad de componentes relacionados con la leche y sus derivados, como pueden ser leche, suero de leche, derivados lácteos, mantequilla, lactosuero, proteínas lácteas, leche en polvo, leche desnatada en polvo, queso, margarina o nata. Además de la gran variedad de componentes y derivados que se suelen utilizar, algunos de ellos han sufrido tratamientos térmicos previos como pueden ser la pasteurización o la esterilización, por lo que el abanico de posibles modificaciones que puede presentar las proteína alergénicas de la leche en los distintos alimentos es muy amplia.

Para el desarrollo de un inmunosensor en primer lugar es necesario seleccionar qué proteína diana se quiere sensor. A partir de la proteína seleccionada, se desarrollaran los anticuerpos para el sensor.

Las **caseínas** y la **β -lactoglobulina**, son las principales causantes de la alergia a la leche (Martín Bermudo 2010). Las caseínas constituyen el 80% de las proteínas de la leche entera (30 gramos por litro de leche), mientras que la β -lactoglobulina supone un porcentaje inferior al 2%. Dado que la caseína es más abundante y está implicada en un mayor número de alergias, se selecciona la caseína como proteína diana.

La caseína bovina está listada por la Unión Internacional de Sociedades Inmunológicas como un solo alérgeno, **Bos d 8**, aunque la caseína este compuesta por 4 principales proteínas con poca homología secuencial: α _s-caseínas (α _{s1} y α _{s2}), β -caseína, κ -caseína y γ -caseína, en proporciones aproximadas de 50%: 30%: 15%: 5%, respectivamente. Las γ -caseínas son subproductos de la proteólisis de β -caseína. Las moléculas individuales de caseína se caracterizan en general por tener un tamaño mediano (unos 200 aminoácidos, siendo algo menor la caseína κ). El peso molecular oscila entre 19.000 y 25.000 Dalton. Una característica distintiva de todas las caseínas es su baja solubilidad a pH 4,6. Otra característica común es que las caseínas son proteínas conjugadas, la mayoría con grupos fosfato esterificados con el aminoácido serina.

Tabla 5.1. Características generales de las caseínas.

Fracción	Proteína	Alérgeno	g·L ⁻¹	% Proteína total	MW (KDa)	#AA	pI
Caseína		Bos d8	30	80			
	α_{s1} caseína		12-15	29	23,6	199	4,9-5,0
	α_{s2} caseína		3-4	8	25,2	207	5,2-5,4
	β -caseína,		9-11	27	24,0	209	5,1-5,4
	γ -caseína		1-2	6	11,8	104	6,4
	κ -caseína		3-4	10	19,0	169	5,4-5,6

A pesar de la pobre homología de secuencias entre proteínas de la fracción de caseína, se observa frecuentemente la poli-sensibilización a muchas caseínas. Esto puede ser debido a la sensibilización cruzada a través de epítomos compartidos o estrechamente relacionados. Los pacientes están casi siempre sensibilizados a la α -caseína (100%) y a las κ -caseínas (91,7%) (Jarvinen et al. 2002).

La conformación de las caseínas es muy similar a la de las proteínas globulares desnaturalizadas. El elevado número de residuos de prolina hace que se dé la flexión de las cadenas de proteínas inhibiendo el empaquetamiento compacto y obteniendo pocos tramos con estructura secundaria organizada. La falta de organización de las moléculas de caseína ha hecho que hasta el momento ninguna haya podido cristalizarse para llevar a cabo estudios detallados de su estructura secundaria y terciaria. La falta de estructura terciaria da cuenta de la estabilidad de las caseínas frente a la desnaturalización por calor.

Sin una estructura terciaria y con una exposición considerable de residuos hidrofóbicos da lugar a fuertes interacciones de asociación de las caseínas. Por ello, la mayoría de las caseínas agregan como partículas coloidales (o micelas de caseína), siendo su función biológica el transportar fosfato de calcio en los mamíferos recién nacidos. Las micelas de caseína son partículas de un tamaño que varía entre 50 y 350 nm, formadas por la asociación de moléculas de caseína junto con fosfato cálcico en forma coloidal (7% peso) (De Kruif and Holt 2003; Farrell et al. 2006).

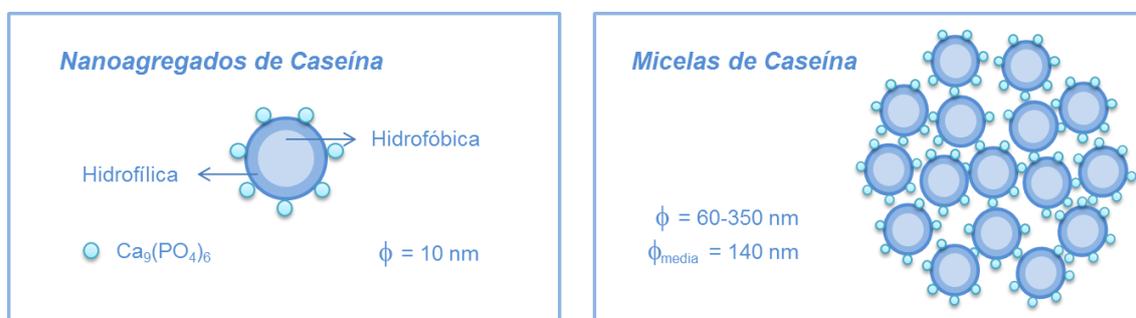


Figura 5.1 Esquema de los nanoagregados y micelas de caseína.

Dentro de las diferentes caseínas la α -caseína y la β -caseína son las más abundantes (aproximadamente 15 y 9 g·L⁻¹ respectivamente en leche de vaca) y las principales proteínas empleadas como inmunógenos para el desarrollo de anticuerpos anti-caseína (Lopez-Calleja et al. 2007; Haza Duaso 2002). Asimismo, se ha visto que la detección selectiva de β -caseína se emplea habitualmente para la identificación del uso fraudulento de leche bovina en productos derivados de leche de cabra u oveja, lo que indica que se trata de una proteína con mayor diferencia entre especies (Lopez-Calleja et al. 2007). Dado que los componentes empleados por las empresas contienen una gran variedad de derivados lácteos, se cree más apropiado emplear como diana una proteína que guarde similitud entre las distintas especies de las que se obtienen derivados lácteos (vaca, oveja, cabra). Por este motivo y dada su mayor abundancia, se seleccionó la α -caseína bovina como proteína diana para el desarrollo de anticuerpos monoclonales.

5.1.3. MONITORIZACIÓN DE CASEÍNA

Actualmente, los métodos para la detección de las proteínas alergénicas de la leche se pueden clasificar en dos grandes grupos: métodos basados en la detección directa, o métodos basados en la detección indirecta. Dentro de los métodos de detección directa se distinguen los que se basan en técnicas inmunológicas, tales como ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*), inmunoelectroforesis, test radio alergoabsorbente, ensayo cohete de inmunoelectroforesis, test de tiras, microarrays y biosensores, y dentro de los que se basan en técnicas no inmunológicas, tales como espectrometría de masas y cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem. Dentro de los métodos indirectos se encuentran los basados en técnicas genéticas, que consisten en el reconocimiento específico de fragmentos de ADN que codifican una determinada proteína a partir de PCR (Martin Bermudo 2010).

Sin embargo, entre todos los métodos disponibles para la detección y cuantificación de caseína, son básicamente los métodos inmunológicos, concretamente los tipo ELISA y los test de tiras los más utilizados. Recientemente los métodos basados en técnicas genéticas PCR también están siendo utilizados, pero principalmente para la identificación del uso fraudulento de la leche de vaca. Hoy por hoy, el resto de métodos se suelen aplicar en el campo de investigación (Schubert-Ullrich et al. 2009).

5.1.3.1. Detección de caseína mediante ELISA

De todos los métodos inmunológicos disponibles, el sistema más utilizado para la detección de alérgenos en alimentos es el ELISA. El método ELISA es una técnica de laboratorio común que se utiliza para medir la concentración de un analito. El método consiste en inmovilizar un antígeno en una superficie y detectarlo mediante un anticuerpo enlazado a una enzima capaz de generar un producto detectable, como cambio de color, fluorescencia o algún otro. Este producto detectable, se puede correlacionar con la cantidad de analito

presente en la muestra original. Con este método es posible separar las interacciones específicas de las inespecíficas, mediante la unión en serie a una placa de pocillos múltiples.

Los ELISA se desarrollaron por primera vez a principios de los años 70 para reemplazar los radioinmunoensayos. Hoy en día, siguen siendo ampliamente utilizados en su formato original, debido a su alta precisión, bajos límites de detección y alta especificidad. Sin embargo, los inconvenientes del ELISA incluyen que su procedimiento necesita anticuerpos sensibles, y fiables, y conlleva procesos laboriosos de detección, y la necesidad de una instrumentación de laboratorio relativamente cara.

Actualmente, se pueden encontrar disponibles en el mercado diversos kits ELISA desarrollados por distintas casas comerciales, destinados a la detección de residuos de leche en superficie. A continuación se presentan algunos ejemplos.

Tabla 5.2. ELISAS comerciales.

Analito	Límite de detección Rango dinámico	Casa comercial
Caseína	0,05 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 0,2-5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	Biomedal
Bovine Alpha-S1-Casein	0,78-50 ng $\cdot\text{mL}^{-1}$	LifeSpan BioSciences
Caseína	0,31 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 0,31-20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	Crystal Chem
Caseína	0,2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 1-25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	Romer Labs
Caseína	0,04 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 0,6-6 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	Romer labs
Caseína bovina	0,12 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 1-20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	BioFront

Estos sistemas ELISA diseñados en formato directo o ELISA sándwich, utilizan anticuerpos monoclonales o policlonales frente a caseínas, aseguran la detección de proteínas nativas y proteínas procesadas de la leche y declaran límites de detección del orden de 0,05-1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

5.1.3.2. Detección de caseína mediante Test de tiras

El test de tiras (tiras de flujo lateral) es una versión simplificada del ensayo ELISA. En una tira membranosa generalmente de nitrocelulosa, se depositan los inmunorreactivos, antígenos o anticuerpos y sobre la que posteriormente se aplican los reactivos que van a reaccionar inmunológicamente. Estos métodos son muy sencillos en cuanto a su manejo y puede interpretarse visualmente o de una forma semicuantitativa, mediante un densitómetro. La finalidad de estos sistemas, es su utilización como sistemas cualitativos de detección *in situ*, debido a su rapidez y facilidad de manejo.

Para la caseína existen disponibles en el mercado sistemas para su detección tanto en alimento como en superficies. El límite de detección de estos sistemas está en torno a $5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ para alimentos y entre $1\text{-}10 \mu\text{g}$ para superficies.

Analito	Límite de detección Alimento y superficie	Casa comercial
Caseína	$5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ $250 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	HyServe
Caseína	$0,1\text{-}1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ $0,2\text{-}10 \mu\text{g}$	r-biopharm
Caseína	$5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	Crystal Chem
Caseína	$5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	MloBS
Caseína	$2,5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	Biomedal
Caseína	$5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	Neogen

5.1.3.3. Detección de Caseína mediante biosensores

En los últimos años se ha demostrado que los biosensores son una alternativa a los métodos de inmunoensayos tradicionales. Ofrecen una sensibilidad y selectividad en algunos casos comparable a los métodos tradicionales, pero con la ventaja que las medidas se realizan libres de marcaje y a tiempo real.

En cuanto a la determinación de caseína, se han utilizado biosensores de microbalanza de cuarzo (QCM), biosensores electroquímicos (Molinari, Moina, and Ybarra 2015), y biosensores ópticos SPR y LSPR (Rebe Raz et al., 2010; Yman et al., 2006). Muy recientemente se ha desarrollado un método de detección de α -caseína basado en la resonancia del plasmón superficial (SPR) para la misma aplicación que se plantea en este capítulo. Sin embargo, en lugar de analizar superficies, analizan las aguas de enjuague de la limpieza. En soluciones tampón (sin efecto matriz) han obtenido un límite de detección de $58 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ y un rango dinámico de $0,195$ a $12,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, en un formato directo utilizando un anticuerpo comercial policlonal y la α -caseína como analito (Ashley et al. 2017). Estos resultados han mejorado los ya obtenidos por otros autores en un biosensor SPR (LoD: $0,87 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) a través de un formato sándwich (Muller-Renaud 2005). También se ha desarrollado un método de detección de caseínas basado en un biosensores LSPR. El inmunosensor LSPR trabaja en modo reflexión y para generar el LSPR se hace valer de una superficie de nanopartículas de sílice recubiertas por oro. El límite de detección obtenido es incluso superior al obtenido con el SPR, $10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, presentando un rango dinámico parecido $0,1$ a $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, (Hiep et al. 2007).

5.2. MATERIALES Y MÉTODOS

5.2.1. MATERIALES

Para la formación de las monocapas autoensambladas (SAM) en superficies nanoestructuradas de oro se adquirieron el ácido mercaptoundecanoico y octanotiol en Sigma Aldrich y el mPEG₆-SH y SH-PEG₁₁-COOH se adquirieron de Millipore. 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida para la activación de los grupos carboxilos se adquirió de Thermo Scientific Pierce y el N-hidroxisulfosuccinimida para la inmovilización del anticuerpo se adquirió de Sigma-Aldrich. Las caseínas (α -caseína, caseína, y caseinato de sodio), albumina de suero bovino (BSA), como la solución de bloqueo etanolamina, se obtuvieron de Sigma-Aldrich.

Los anticuerpos utilizados en este trabajo son anticuerpos monoclonales de ratón del tipo IgG. Los anticuerpos fueron suministrados por Navarrabiomed (Pamplona, Navarra), donde fueron producidos y caracterizados. El anticuerpo monoclonal fue obtenido a partir de ratones inmunizados con α -caseína pasteurizada y desnaturalizada. Aquellos ratones, cuyo suero presentaban un mayor título frente al antígeno, fueron seleccionados para la realización de la fusión celular, con el objeto de inmortalizar las células provenientes de los bazo de los animales inmunizados en cuyo suero se encontró una respuesta específica frente a la α -caseína. Dichas células fueron fusionadas con el mieloma utilizando polietilenglicol (PEG). Los hibridomas se clonaron por dilución límite. Los anticuerpos monoclonales se purificaron a través de una columna de proteína G y se guardaron a -80°C.

Soluciones, soluciones tampón y estándares

Para la bio-funcionalización y detección de analito se utilizó 10 mM de tampón fosfato salino (PBS) pH 7,4. También se utilizaron soluciones tampón 10 mM PBS-T, 10 mM de fosfato sódico pH 6,5, 10 mM de Acetato sódico pH 5,5 y 10 mM HEPES, 0,3 M EDTA, y 0,05% Tween-20 pH 7,4. La regeneración de la unión anti-caseína-caseína se obtuvo con 0,1 M de NaOH.

5.2.2. MÉTODOS

5.2.2.1. Fabricación de nanoestructuras de oro

La fabricación de las nanoestructuras de nanodiscos se realizó según el procedimiento explicado en el apartado 4.1.2.1. Las dimensiones de los nanodiscos fueron Periodo 600 nm, diámetro del disco 500 nm y altura 50 nm.

5.2.2.2. Plataforma empleada para la detección de los sistemas biológicos

Se utilizó la misma plataforma que en el capítulo 4 compuesta por una nanoestructura de nanodiscos introducida en una celda fluidica. La señal óptica se obtuvo mediante el espectrofotómetro JASCO, y las soluciones se hicieron fluir a través de una bomba peristáltica.

5.2.2.3. ELISA indirecto 2D

Las placas Elisa se tapizaron con $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ con las tres caseínas (α -caseína, caseína y caseinato sódico) en sus tres formas, nativa, pasteurizada y desnaturalizada. Se realizó una dilución seriada en la placa hasta $0,08 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. El tapizado se llevó a cabo durante toda la noche a 4°C en buffer carbonato pH 9,6. Para bloquear la superficie se utilizó una solución tampón de PBS-T con BSA al 2%. El anticuerpo primario (anti-caseína) se incubó durante una hora empezando con una dilución de 1:250 hasta 1:4.000 a temperatura ambiente. El anticuerpo secundario se incubó durante 1 hora a una concentración de 1:6000. Entre las diferentes etapas los pocillos se limpiaron tres veces con la solución tampón de PBS-T. Para el revelado se utilizó una mezcla de TMB y H_2O_2 . Se dejó reaccionar durante 15 minutos y se paró la reacción con $50 \mu\text{L}$ de solución 4N H_2SO_4 . La lectura se realizó a 450 nm en el microplacas.

5.2.2.4. Bio-funcionalización de superficies con biomoléculas

Formación de la monocapa auto-ensamblada (SAM): Como nexo de unión entre la nanoestructura y las biomoléculas, se ha utilizado una tres SAMs. La primera de MUA y las otras dos están formadas por una SAM mixta compuesta por un ligando con un grupo reactivo (carboxilo) y el otro ligando como espaciador sin grupo reactivo (metilo). La primera SAM mixta esta formadas por MUA y OCT, y la segunda por mPEG₆-SH y SH-PEG₁₁-COOH

Sobre las nanoestructuras de oro se crearon monocapas ordenada mediante la inmersión de éstas en una disolución de 10 mM de MUA, o 2.5 mM del grupo reactivo y de 7.5 mM del grupo no reactivo en etanol absoluto (desgasado previamente) durante 20 horas como mínimo.

Tras la formación de la monocapa, las nanoestructuras se limpiaron con etanol y agua, y finalmente se secaron con nitrógeno. Posteriormente la nanoestructura se introdujo en la celda fluídica para luego introducirla en el espectrofotómetro. Los siguientes pasos, se realizaron a flujo constante y monitorizado por el espectrofotómetro.

Bio-funcionalización de la nanoestructuras de oro con el bio-receptor: El anticuerpo anti-caseína se inmovilizó covalentemente a la superficie del sensor. La inmovilización del anticuerpo se realizó en la celda fluídica a flujo continuo ($10, 25$ y $50 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$). En primer lugar se realizó la activación de los grupos carboxilos de la monocapa de alcanotioles creada en la superficie con una mezcla de 40 mM EDC y 20 mM Sulfo-NHS, en agua milliQ durante 15 min. De esta manera se crean compuestos reactivos intermedios que pueden reaccionar con grupos aminos libres del anticuerpo. Seguidamente, se hizo pasar tampón PBS y a continuación se realizó la inmovilización de anticuerpo a diferentes concentraciones ($10, 25, 50, 75$ y $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) durante 30 min. Posteriormente, se hizo pasar el tampón de lavado para limpiar la superficie y dos ciclos de 15 mM de HCl durante 2 min para eliminar el anticuerpo que podría

haberse unido a la superficie por unión inespecífica y no por una unión covalente. Todos los grupos libres activados que quedaron libre en la superficie se inactivaron con 0.25 M de etanolamina (EA) a pH 8,5. Finalmente el proceso de tapizado se terminó con el bloqueo de las superficie de vidrio con $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de BSA durante 10 min.

Curva de calibrado: se hizo pasar una serie de estándares de caseína ($1\text{-}50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) durante 10 min por la celda, posteriormente se limpió la superficie durante 5 min con el tampón de medida. Se inyectó desde la concentración más baja a la más alta. Tras cada solución de estándar, se regeneró la unión antígeno-anticuerpo, inyectando una solución de 0,1 M de NaOH. El tiempo de regeneración dependió de la concentración del estándar inyectado. La curva de calibración se construyó representando la variación de absorbancia (ΔAbs) frente a la concentración de analito ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). La curva se ajustó a una función hiperbólica.

Regeneración total de la nanoestructura: las nanoestructuras se regeneraron completamente aplicando un plasma de oxígeno con el RIE, en las condiciones óptimas establecidas en el capítulo 4: presión de cámara: 20 mTorr, potencia de radiofrecuencia: 20 W y un tiempo de grabado de 10 min.

5.2.2.5. Pruebas en superficies de acero

La solución stock de caseína se preparó en una solución tampón 20 mM PBS, 6M Urea, 0,1 %Tween 80, pH 8,4, a una concentración de $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. La solución madre de caseína se preparó diluyendo la solución stock a $0,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Se tuvo en cuenta la pureza del lote empleado a la hora de calcular la caseína real adicionada. Posteriormente la solución de uso de caseína se obtuvo a partir de una dilución de la solución madre de 1:10 en PBS ($0,05 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ caseína).

Finalmente se adicionó 50 μL de la solución de uso de caseína a una superficie de acero galvanizado de unos 10 x 10 cm, y se dejó secar al aire durante toda la noche. Al día siguiente se muestreo la superficie de acero con un hisopo de algodón empapado en un tampón de extracción y se guardaron a 4°C. La recuperación de la caseína del hisopo, se realizó adicionando 800 μL PBS. Se mantuvo 15 min con la solución tampón y 15 minutos sonicando. Cuando se atemperó la muestra se introdujo en el sensor.

5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.3.1. INMUNOENSAYO LSPR PARA LA DETERMINACIÓN DE CASEÍNA EN MUESTRAS DE SUPERFICIE

5.3.1.1. Selección de condiciones de inmunización

La primera fase de producción de anticuerpos contempló la inmunización de 4 ratones con la α -caseína. Se seleccionaron dos condiciones de inmunización, la proteína pasteurizada y la proteína desnaturalizada (Vitkova, Rauch, and Fukal 2002).

Tabla 5.3. Definición de las condiciones de inmunización para el desarrollo de anticuerpos monoclonales contra alérgenos de la leche.

Inmunógeno	α -caseína
Tratamiento 1	Proteína pasteurizada: 70-80°C durante 15-20 segundos
Tratamiento 2	Proteína desnaturalizada: 70-80°C durante 15-20 segundos y aplicación de 110°C durante 10 minutos en el siguiente buffer: <i>Buffer Tris HCl 25mM pH8.6, 2-mercaptoetanol 2,5%, SDS 1,0%, EDTA 0,2%, Urea 2,4%</i>

En el caso particular de la leche y sus derivados, todos ellos deben ser tratados antes de su venta para garantizar su conservación. El tratamiento mínimo al que se somete tanto la leche como sus derivados es la pasteurización, que consiste en la aplicación de 72°C durante 15-20 segundos. En la bibliografía se ha encontrado que varios de los anticuerpos desarrollados contra proteínas en estado nativo, presentan una menor reactividad contra la proteína una vez tratada con calor (Vítková, Pavel, and Ladislav 2002), por ello, se definió que la proteína empleada para inmunizar debía estar tratada previamente con un proceso de pasteurización (Tratamiento 1: 72°C durante 15-20 segundos).

Por otra parte, debe tenerse en cuenta también el tratamiento de muestra que se aplica a los alimentos para poder detectar el alérgeno de interés. Para el caso de las caseínas, éste suele conllevar el uso de reactivos que facilitan la extracción y solubilidad de los distintos componentes del alimento así como la aplicación de calor. Con este fin se realizó una búsqueda de posibles soluciones y tratamientos empleados para la medición de caseína con diferentes kits y artículos. Tras el análisis se definió un segundo tratamiento a realizar al inmunógeno (Tratamiento 2: desnaturalización).

Se aplicaron los 2 tratamientos distintos a la proteína diana y se inmunizó con cada uno de ellos a dos ratones. De esta forma se intentó obtener anticuerpos monoclonales capaces de detectar la presencia de leche en alimentos procesados y sin procesar y una vez sometidos a los procesos de extracción de muestra.

Una vez inmunizados los ratones, se valoraron los anticuerpos producidos por los mismos para seleccionar aquél que reconocía la presencia de la proteína diana en el mayor número de formas posibles que pueda presentar dicha proteína. Se evaluó la reactividad de los anticuerpos producidos contra la proteína α -caseína nativa, α -caseína sometida al tratamiento

2 y proteína no específica. De esta forma se seleccionó el anticuerpo que presentaba una alta reactividad contra la proteína tanto nativa como tratada y no a otras proteínas.

5.3.1.2. Caracterización de caseína y anticuerpos anti-caseína

Una vez seleccionado el anticuerpo monoclonal anti-caseína por Navarrabiomed, se testó su capacidad de detectar diferentes caseínas en diferentes estados. Para ello se seleccionaron tres caseínas bovinas: la α -caseína utilizada como inmunógeno, caseinato de sodio, y una caseína que laboratorios de referencia suelen utilizar como estándar.

Tabla 5.4. Caseínas testadas en el proyecto.

α-caseína	α -caseína form bovine milk Hammarsten (Sigma Aldrich (SA)).
Caseína	Casein from bovine milk (14.1% N) Ref C5890 Bach 129k0091 (SA).
Caseinato sódico	Casein sodium salt from bovine milk REF C8654 Lot BCBF8389V (SA).

Las caseínas se caracterizan por ser hidrofóbicas y poco solubles. La concentración máxima soluble de caseína es de 1%. Por ello se disolvieron 0,5 mg·mL⁻¹ en PBS. Se mantuvo agitando toda la noche. Un tercio de las muestras se mantuvieron tal y como estaban, a otro tercio se le aplicó el tratamiento de pasteurización y al último tercio el tratamiento de desnaturalización.

Mediante un ensayo ELISA indirecto 2D, se caracterizó por un lado el reconocimiento de diferentes familias de caseínas (α -caseína, caseinato de sodio y caseína) y por otro lado el reconocimiento de las caseínas en su estructura nativa, pasteurizada (tratamiento 1), y desnaturalizada (tratamiento 2).

En la Figura 5.2 se muestran los resultados obtenidos. El anticuerpo monoclonal anti-caseína detectó de forma similar las tres proteínas (α -caseína, caseína y caseinato), en sus tres estados, proteína nativas, pasteurizadas y desnaturalizadas. Además, el anticuerpo detectó de manera similar las 9 formas ensayadas. La caseína se caracteriza por tener poca estructura, por lo que los procesos de pasteurización y desnaturalización no afectan mucho en su estructura y en la capacidad de detección del anticuerpo. Por otro lado, cabría esperar que el anticuerpo anti-caseína detectase mejor la α -caseína, ya que es pura. Sin embargo, detectó las tres caseínas de forma similar, aun conteniendo una proporción menor de α -caseína en su composición. Quizás el anticuerpo anti-caseína esté reconociendo un epítipo común de todas las caseínas (α , β , γ y κ).

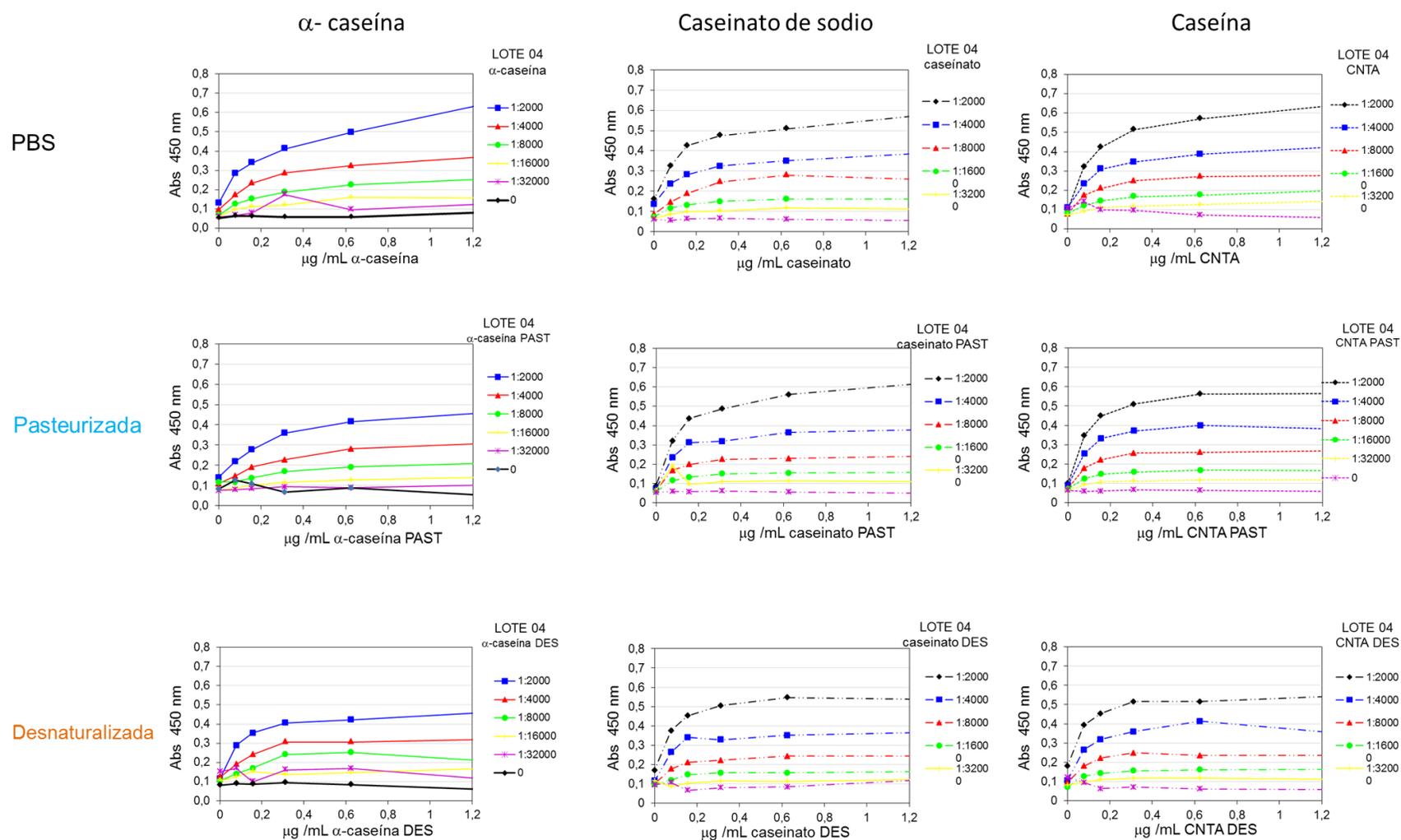


Figura 5.2: ELISA 2D indirecto de las tres caseínas (α -caseína, caseinato de sodio y caseína) y en sus tres estados nativa, pasteurizada y desnaturalizada.

5.3.1.3. Inmovilización del anticuerpo en la nanoestructura

Para llevar a cabo la determinación de caseína se eligió un formato de inmunoensayo directo, con el anticuerpo inmovilizado en la superficie. Este formato permite llevar a cabo una medida directa y a tiempo real, sin necesidad de especies secundarias o marcadores. Se decidió que la mejor opción era la unión covalente entre el anticuerpo y la superficie, ya que es necesario regenerar sucesivamente la unión anticuerpo-analito, donde se utilizan soluciones con pH altos o bajos, que puede producir la desorción de los anticuerpos si no están establemente unidos.

La inmovilización del anticuerpo consiste en la formación de una capa de anticuerpos de forma estable y controlada sobre los nanodiscos de oro. Tal y como se ha explicado en la introducción las SAMs proporcionan un excelente método para la inmovilización de anticuerpos, debido a la simplicidad y fiabilidad del proceso de formación de la monocapa, a la reproducibilidad, y a la flexibilidad para la incorporación de diferentes biomoléculas mediante unión covalente. Además, las SAMs, permiten unir el anticuerpo en su forma natural, y debido al pequeño tamaño de la monocapa, permite que el anticuerpo esté lo suficientemente cerca de la superficie para no comprometer el volumen de sensado.

Sin embargo, existen algunos inconvenientes. La inmovilización covalente puede afectar a la actividad del anticuerpo debido a la modificación química de la zona de reconocimiento del antígeno, al impedimento estérico debido a una densidad superficial excesiva de anticuerpo y a la posible desnaturalización del anticuerpo por causa de la tensión creada por la unión a la superficie por varios puntos de la molécula simultáneamente (H. Xu, Lu, and Williams 2006). Para lograr una inmovilización funcional, es necesario alcanzar una densidad adecuada de los anticuerpos en la superficie y conseguir que se dispongan en una orientación adecuada, que permita que los sitios de reconocimiento antigénico presentes en la molécula se encuentren accesibles. De esta manera se puede alcanzar unas condiciones de inmovilización óptimas que produzcan una mayor proporción superficial de moléculas activas.

A) EFECTO DE LAS MONOCAPAS AUTOENSAMBLADAS

En primer lugar se han ensayado diferentes SAMs de cadena corta. Para este propósito se han empleado, en primer lugar una SAM formada únicamente por MUA, que contiene grupos funcionales carboxilo. En segundo lugar, se ha ensayado una SAM mixta formada por una combinación de MUA y OCT. El OCT no presenta grupo funcional (-CH₃) y tiene la función de separar en la superficie los posibles puntos de unión del MUA. Por último se ha ensayado una SAM mixta parecida a la anterior pero formada por PEG. Las dos SAMs mixtas se prepararon a la misma concentración para tener el mismo número de grupos reactivos en la superficie. Tras la activación de los grupos carboxilos con EDC/Sulfo-NHS, las superficies se pusieron en contacto con una concentración de anti-caseína de 75 µg·mL⁻¹. La

superficie se bloqueó con BSA. Finalmente se construyeron las curvas de calibrado para las tres SAMs, tal y como se muestra en la siguiente figura:

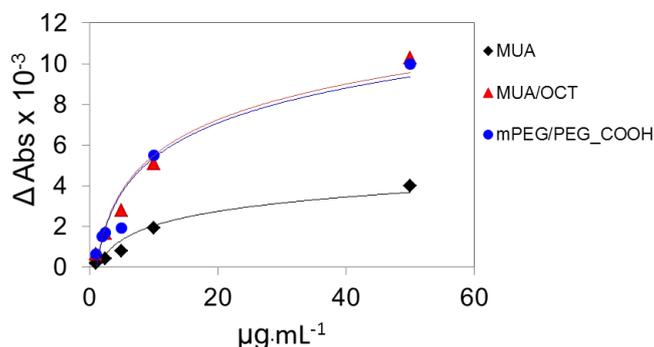


Figura 5.3. Curva de calibrado con MUA, una SAMs mixta de MUA/OCT, y otra SAM mixta de mPEG/PEG-COOH.

En los tres casos se obtuvo una señal de tapizado parecido ($\sim 40 \text{ Abs} \times 10^{-3}$). Los resultados obtenidos con las dos SAM mixtas fueron casi idénticos (MUA/OCT y mPEG/PEG-COOH). Teniendo en cuenta que la inmovilización del anticuerpo se realizó en las mismas condiciones y el número de grupos reactivos en la superficie era el mismo, los resultados obtenidos eran esperables. Se analizó la unión inespecífica haciendo pasar a través de la superficie BSA. Los cambios en absorbancia observados fueron mínimos, y muy inferiores a una cantidad proporcional de caseína.

Las señales obtenidas con la superficie cubierta únicamente con MUA fueron un 35% más bajas. Este resultado se ha observado en otros sistemas (Briand et al. 2006), y como principal causa de este hecho se considera la desnaturalización del anticuerpo por un mayor número de puntos de unión. Cabría esperar que esta disminución en la señal pudiera provenir de impedimentos estéricos, sin embargo al obtener una señal de tapizado tan parecida en los tres casos, es más probable que la disminución de la señal provenga de la desnaturalización del anticuerpo. A partir de estos resultados se determinó continuar trabajando con la SAM mixta formada por MUA/OCT, ya que es una SAM más económica.

B) SOLUCIÓN TAMPÓN DE INMOBILIZACIÓN DE ANTICUERPO

Una vez seleccionada la SAM de la superficie, se procedió a la optimización de la unión del anticuerpo a la superficie. El primer paso a la hora de encontrar las condiciones óptimas es la elección del pH de inmovilización.

La activación de la superficie con EDC/sulfo-NHS es más eficiente a pH entre 4,5 y 7,2, y se ve favorecido a pH superiores al pKa de la SAM ya que en esas condiciones hay una mayor proporción de grupos carboxilos desprotonados. En el caso del MUA el pKa es de 4,8 (Sugihara et al. 1999).

La posterior incorporación del anticuerpo es un proceso más complejo. Hay que tener en cuenta que los grupos aminos son grupos ionizables, y para que se forme el enlace covalente es necesario que estos grupos se encuentren desprotonados. Los anticuerpos presentan dos tipos de grupos aminos, (1) los amino terminales, y (2) los ϵ -aminos de los residuos de lisina, que son los más abundantes. Los grupos amino terminales se encuentran en la fracción variable del anticuerpo y presentan un pKa alrededor de 7-8 mientras que los grupos ϵ -amino de la lisinas presentan un pK cercano a 10. Teniendo en cuenta que a pH superiores a 8 los grupos carboxilos activados con EDC/sulfo-NHS son inestables, los grupos aminos más desprotonados y por tanto más reactivos por debajo de un pH de 8, serán los amino terminales (S. Puertas et al. 2010). Los amino terminales se encuentran justamente en la fracción variables de la proteína, por lo que no es aconsejable unir los anticuerpo por estos puntos. Sin embargo, se ha comprobado que es posible forzar la orientación del anticuerpo jugando con el pH de la solución del anticuerpo. Cuando el pH de la solución tampón es inferior al punto isoelectrico del anticuerpo, el plano principal del anticuerpo se carga positivamente. Dado que la superficie está cargada negativamente, las moléculas de anticuerpo interactúan con la superficie a través de su plano principal, permitiendo que los sitios de unión al antígeno se muevan libremente y por lo tanto alcancen la máxima accesibilidad. Esta interacción iónica dirigida se puede reforzar mediante la formación de un enlace peptídico entre el grupo amino de los residuos de lisina de los anticuerpos y los grupos carboxílicos de la superficie (Parolo et al. 2013).

En nuestro caso particular se desconocía el punto isoelectrico del anticuerpo, por tanto se probaron distintos pH con el objetivo de conocer qué pH favorecía el proceso de biofuncionalización. Así, se inyectaron diferentes soluciones de anti-caseína a $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ en pH comprendidos entre 5 y 7,5. Las señales obtenidas en el sensor con la SAM mixta (MUA/OCT) se muestra en la Figura 5.4 (barras amarillas). Atendiendo a estos resultados se podría pensar que en todos los casos nos encontramos por debajo del punto isoelectrico o cerca para el caso de pH 7,4 ya que a pH por encima del punto isoelectrico la atracción entre la superficie y el anticuerpo suele ser mínima, y cerca del punto isoelectrico máxima. A medida que disminuye el pH, la proporción de grupos carboxilos desprotonados en la superficie también va disminuyendo, por lo que el efecto de cargas va disminuyendo y la adsorción también. Esta misma prueba se realizó pero formando el enlace covalente con los reactivos EDC/sulfo-NHS. La biofuncionalización se realizó tras la limpieza de la nanoestructura, la construcción de la SAM y su activación de su grupo carboxilo (EDC/sulfo-NHS). La superficie ahora no está recubierta de grupos carboxilos, sino del grupo reactivo sulfo-NHS que también presentan carga negativa. Una vez activada la superficie se inyectaron soluciones de anticuerpo ($75 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) en los distintos tampones de biofuncionalización. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 5.4 (barras grises). En este caso, a pH 6,5 y 5 se obtuvieron señales de inmovilización similares, mientras que con pH 7,4 la señal fue ligeramente inferior. Tras la biofuncionalización se realizó una etapa de unión con la caseína ($2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) en PBS para ver

qué pH de biofuncionalización conducía a una mayor señal de unión. Tal y como se observa en la figura (rombos negros) la señal máxima se obtuvo a pH 6,5 aunque las diferencias no son muy significativas. Finalmente, se decidió que el pH de biofuncionalización fuera 6,5.

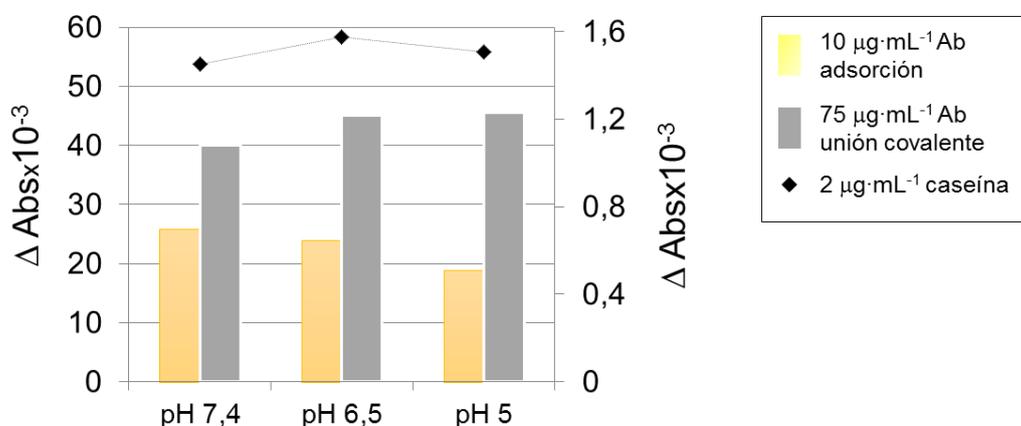


Figura 5.4. Efecto del pH en la proceso de biofuncionalización. Barras amarillas: representación de las señales producidas por la adsorción de $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de anti-caseína sobre una superficie con una SAM mixta de MUA/OCT sin activar utilizando disoluciones a diferentes pH. Barras grises: representación de las señales producidas por la unión covalente entre el anticuerpo anti-caseína ($75 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) y la SAM mixta de MUA/OCT utilizando disoluciones a diferentes pH. Rombos negros: señales obtenidas con una concentración de caseína de $2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ en cada pH de biofuncionalización covalente.

C) FLUJO DE TAPIZADO

Con el objetivo de conocer el flujo mínimo que produjera la máxima señal de tapizado se hicieron pasar soluciones de anticuerpo ($75 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) a tres flujos durante 30 minutos sobre la superficie activada con EDC/sulfo-NHS. En el siguiente gráfico de barras, se muestra la respuesta alcanzada empleando flujos de $10 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, $25 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ y $50 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$.

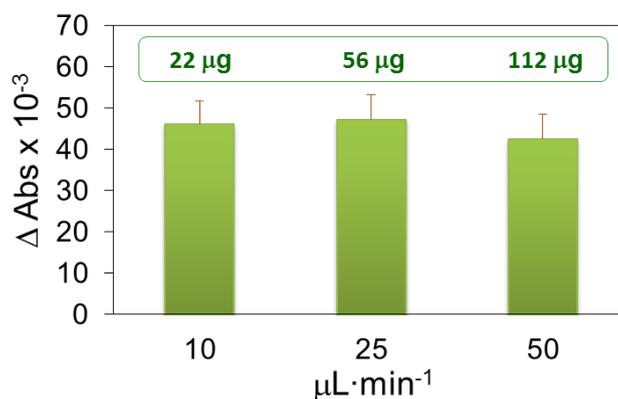


Figura 5.5. Señal de tapizado obtenido a flujos de trabajo de: $10 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, $25 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ y $50 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$.

Encima de cada barra se ha representado la cantidad de anticuerpo (μg) utilizado en cada ensayo. Para un flujo de $10 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ se obtuvo un tapizado de $46 \text{ Abs} \times 10^{-3}$ utilizando 22

μg de anticuerpo. Para un flujo de $25 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ se obtuvo una señal de $47 \text{ Abs} \times 10^{-3}$ con $56 \mu\text{g}$ de anticuerpo y para un flujo $50 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ la señal obtenida fue de $43 \text{ Abs} \times 10^{-3}$ con $112 \mu\text{g}$ de anticuerpo. Los flujos bajos favorecieron la inmovilización de anticuerpo. Por ello, y teniendo en cuenta la cantidad de anticuerpo utilizado en cada ensayo se decidió inmovilizar el anticuerpo al mínimo flujo ensayado ($10 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$).

D) CONCENTRACIÓN DE INMOVILIZACIÓN DE ANTICUERPO EN SUPERFICIE

La concentración del anticuerpo para la inmovilización es otro parámetro de gran importancia y suele situarse entre 10 y $150 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, dependiendo de la eficiencia de la reacción, la naturaleza de la proteína y las necesidades de la aplicación. En el caso de los ensayos como el que se trata en este trabajo, es deseable alcanzar un nivel de inmovilización adecuado para poder medir concentraciones bajas de caseína (del orden de $1\text{-}2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

Se prepararon superficies inmovilizadas con varias concentraciones de anticuerpos: $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $75 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $125 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. En la Figura 5.6-A con barras, se ha representado la señal de tapizado obtenida para cada concentración y con puntos el desplazamiento del pico de absorción LSPR (λ_{LSPR}). Se observa cómo a medida que la concentración de anticuerpo disminuye, ambas señales disminuyen. Teniendo en cuenta que a mayor densidad de anticuerpo en la superficie, obtendremos mayor rango dinámico, se realizaron curvas de calibrado con las tres concentraciones que mayor señal habían dado en el tapizado. En la Figura 5.6-B se observa que los valores más altos se obtuvieron con una concentración de $125 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Las señales obtenidas al tapizar con $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ fueron ligeramente peores, debido probablemente a impedimentos estéricos. Las señales obtenidas a $75 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ fueron inferiores a $125 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Es probable que para este sistema, un tapizado de $125 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ garantice un rendimiento de inmovilización y ordenamiento óptimo del anticuerpo sobre la superficie del sensor, lo que permite reconocer más eficientemente la caseína en las condiciones de trabajo.

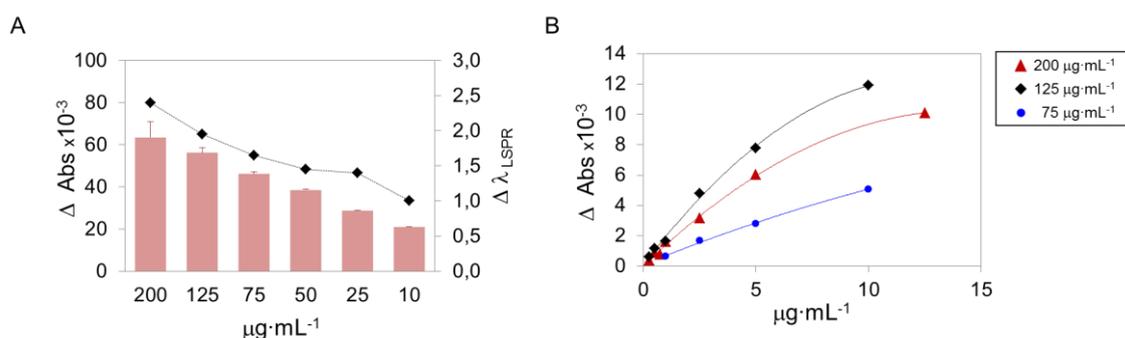


Figura 5.6. A) Señal de tapizado en $\text{Abs} \times 10^{-3}$ (gráfico de barras rosas) y λ_{LSPR} (gráfico de dispersión rombos negros) alcanzado al aplicar varias concentraciones de tapizado durante 30 minutos a un flujo de $10 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. B) Señales $\Delta \text{Abs} \times 10^{-3}$ producidas para varias concentraciones de caseína en superficies inmovilizadas con diferente concentración de anti-caseína ($75 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $125 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

5.3.1.4. Inmunoensayo LSPR para la determinación de caseína en PBS

Una vez optimizado el anclaje del anticuerpo a la superficie, se optimizó la unión anticuerpo-caseína. Para ello se estudiaron los siguientes parámetros:

A) FLUJO DE TRABAJO

Con el objetivo de conocer el flujo mínimo que produjera la máxima señal de unión anticuerpo-caseína se hicieron pasar soluciones de caseína durante 10 minutos a distintas velocidades sobre la superficie funcionalizada con el anticuerpo anti-caseína. En el siguiente gráfico de barras, se muestra la respuesta alcanzada empleando flujos de 0 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, 10 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, 25 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, 50 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, 100 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, 180 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ y 300 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$.

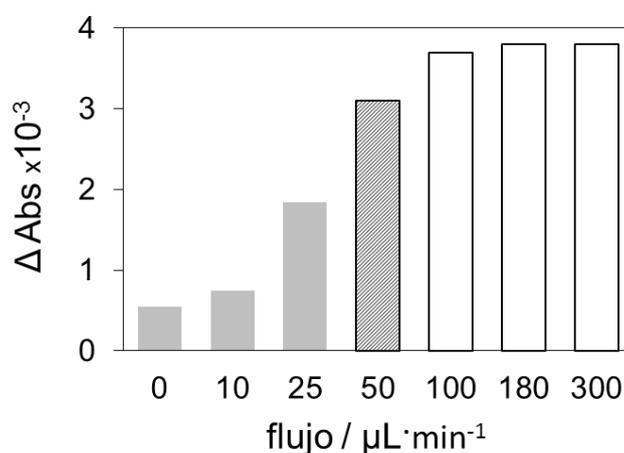


Figura 5.7. Señal de unión de caseína al anticuerpo inmovilizado a varios flujos durante 10 minutos.

Observando la Figura 5.7, se deduce que el mínimo flujo que proporciona la señal máxima es de 100 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Los flujos de 180 y 300 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ no mejoran la señal. También se concluye que trabajar en modo estático (0 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$) o a flujos muy bajos (10 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$) reduce considerablemente la respuesta del sistema. La señal obtenida con un flujo de 50 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ corresponde al 80% de la señal obtenida con 100 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, sin embargo el volumen necesario para el ensayo disminuye a la mitad. Por esta razón, se buscó unas condiciones de compromiso entre la señal y el volumen necesario para el análisis, y se decidió fijar como flujo de trabajo 50 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ y un volumen de muestra de 500 μL .

B) REGENERACIÓN DE LA UNIÓN ANTICUERPO-CASEÍNA

Después de establecer las condiciones de biofuncionalización del chip y unión de la caseína al anticuerpo, se probaron diferentes soluciones de regeneración, haciendo pasar a través de la celda soluciones básicas, ácidas e iónicas varios minutos. Se observó que usando NaOH (0,1M, pH12) se conseguía la completa regeneración de la superficie en ciclos consecutivos de trabajo. En otros trabajos también han conseguido regenerar la unión

anticuerpo-caseína con disoluciones de NaOH 0,05 M (Ashley et al. 2017). En la siguiente Figura 5.8 se muestra la regeneración parcial obtenida con 0,05 M de NaOH (se necesitaron dos ciclos para regenerar completamente la unión) y la regeneración total con 0,1 M de NaOH en un único paso. Con el objetivo de no dañar el anticuerpo inmovilizado, para cada concentración de analito se ajustó el tiempo de regeneración, aplicando menor tiempo a las concentraciones bajas y mayor tiempo a las concentraciones alta.

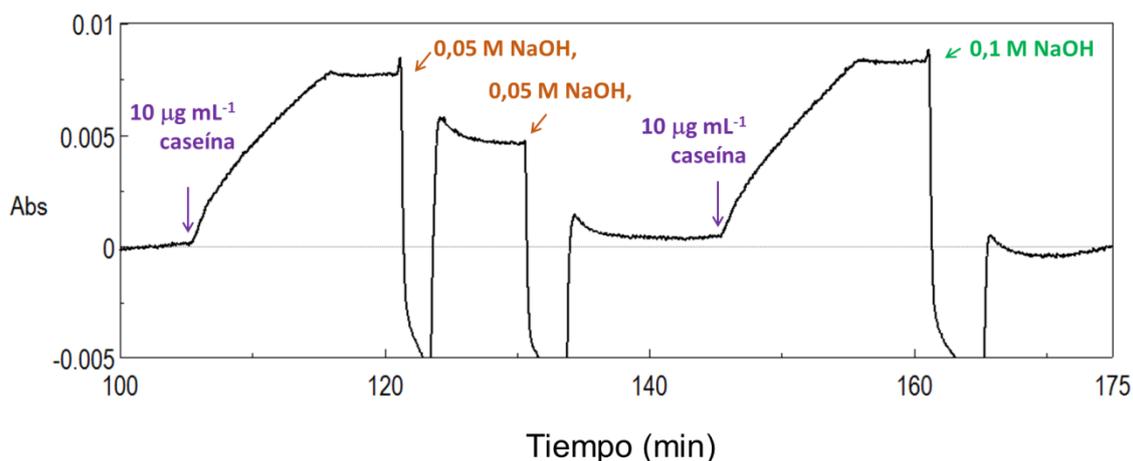


Figura 5.8. Sensograma de regeneración parcial y total de la unión anticuerpo caseína.

Se probaron regeneraciones ácidas, empleando HCl (0,02 M, pH 2). No se observó regeneración ninguna. No se probaron más soluciones ácidas, ya que a pH inferiores a 4 la caseína suele precipitar. Se probaron regeneraciones tipo iónicas suaves 1 M NaCl, e intermedias 2 M MgCl₂. También se probaron disolventes orgánicos, como el etilenglicol (40%), y mezcla de etilenglicol (10%) y NaOH (0,01M). Por último, se probó una mezcla de glicina (0,01 M) y NaOH (0,01 M). En ninguno de los casos anteriormente mencionados se consiguió regeneración alguna.

C) SOLUCIÓN TAMPÓN DE UNIÓN

Normalmente la etapa de reconocimiento antígeno-anticuerpo, se desarrolla en tampones salinos con pH cercanos a 7 (S. Wang et al. 2017; Tomassetti et al. 2017). Se probaron distintas soluciones tampón: 0,01 M PBS pH 7,4, 0,01 M PBS-T pH 7,4, y 0,01 M HEPES, 0,3 M EDTA, y 0,05% Tween-20 pH 7,4. Se observó que con el tampón PBS se obtuvo la señal máxima. Al añadir 0,05 % de Tween-20 a la solución tampón PBS la señal disminuyó ligeramente, mientras que con la solución tampón de HEPES casi no se obtuvo señal. En este último caso, además del Tween 20 (inhibidor de señal) se añadió EDTA, un quelante de Ca²⁺. A concentraciones altas de EDTA se ha comprobado que se da la disgregación y cambios en las características de las micelas de caseína (GRIFFIN, LYSTER, and PRICE 1988) produciendo posiblemente un peor reconocimiento del anticuerpo.

Por otro lado, se midió la señal inespecífica producida por $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de BSA. Tal y como se muestra en la Figura 5.9-A con los tampones PBS y PBS-T no se produjo señal en comparación con la señal obtenida con la caseína. Sin embargo, para el caso de la solución tampón de HEPES, la unión inespecífica sorprendentemente fue superior. Parece ser que de alguna forma esta solución tampón desestabiliza la superficie, por lo que se decidió descartar este tampón (Figura 5.9-A). Se construyeron dos curvas de calibrado con PBS y PBS-T (Figura 5.9-B). El hecho puntual de inhibir la señal de la unión antígeno anticuerpo con PBS-T se vio reflejado en todos los puntos de la curva de calibrado. La inhibición fue del $\sim 30\%$ en todos los puntos. El PBS-T es una solución tampón típica que se utiliza como solución de limpieza principalmente en ensayos tipo ELISA para prevenir interacciones inespecíficas hidrofóbicas. Generalmente las señales obtenidas en los inmunosensores al trabajar con solución tampón PBS-T, suelen disminuir en intensidad, pero suele ser aconsejable su utilización en aquellos sensores donde la unión inespecífica puede ser un problema.

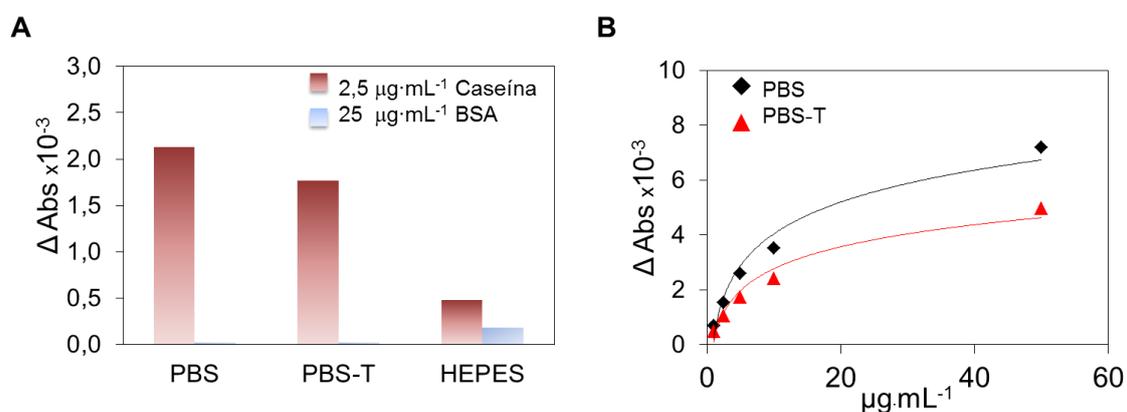


Figura 5.9. A) Señal de unión de caseína (analito) al anticuerpo inmovilizado y BSA (unión inespecífica) en distintas soluciones tampón (PBS, PBST, y HEPES). **B)** Curva de calibrado en PBS y PBST.

D) DETECCIÓN DE α -CASEÍNA, CASEÍNATO DE SODIO, Y CASEÍNA

Una vez seleccionado las condiciones de trabajo, al igual que en el ELISA se caracterizó la detección de las tres caseínas: α -caseína, caseína y caseinato de sodio. Tal y como se muestra en la Figura 5.10, las tres caseínas se detectaron de forma similar obteniendo señales muy parecidas para la caseína ($4,81 \text{ Abs} \times 10^{-3}$) y caseinato de sodio ($4,82 \text{ Abs} \times 10^{-3}$), y ligeramente inferiores para la α -caseína ($4,26 \text{ Abs} \times 10^{-3}$). La pendiente en los tres casos fue muy parecida.

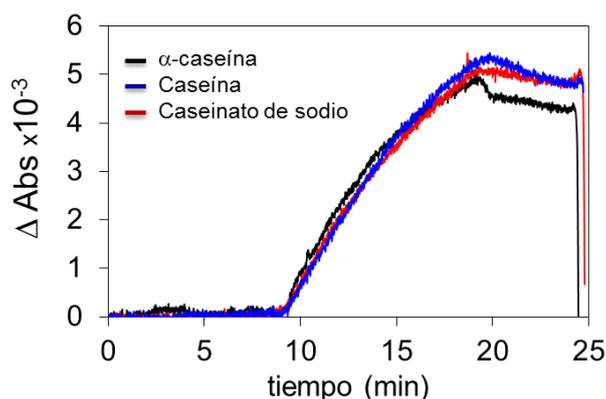


Figura 5.10. Sensograma de unión anticuerpo-analito, α -caseína, caseína y caseinato de sodio

También se introdujeron en el sensor la caseína en sus tres estados, la proteína nativa, pasteurizada y desnaturalizada. En este caso, sí que se obtuvieron diferencias. La caseína nativa y pasteurizada se detectaron de forma similar ($1,3 \text{ Abs} \times 10^{-3}$ y $1,4 \text{ Abs} \times 10^{-3}$), mientras que la proteína desnaturalizada no se detectó, es más, parte del tapizado se despegó de la superficie tal y como se observa en la Figura 5.11. La solución tampón de desnaturalización contiene urea, mercaptoetanol y EDTA, aun estando en concentraciones bajas (se utilizó una dilución 1:100 en PBS) parece que tiene un efecto bastante negativo en el reconocimiento y en el tapizado de la superficie.

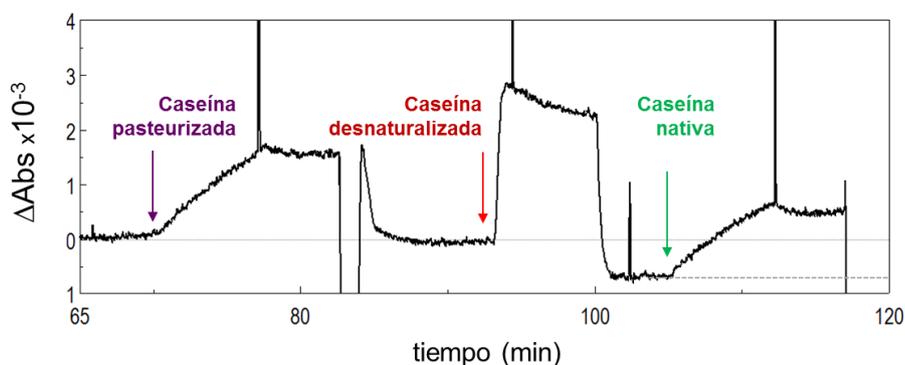


Figura 5.11. Sensograma del proceso de unión de caseína pasteurizada, desnaturalizada y nativa, al anticuerpo inmovilizado en la superficie.

E) UNIÓN INESPECÍFICA

Además de la BSA, se comprobó que otras dos proteínas alergénicas de la leche como la α -lactoalbúmina y la β -lactoglobulina tenían un efecto insignificante de interferencia sobre los anticuerpos inmovilizados en el sensor. Se expusieron al inmunosensor de caseína dos concentraciones de estas proteínas, una concentración baja de $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y otra concentración alta (en exceso) $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. A concentraciones bajas no se observaron cambios en la absorbancia tras el lavado (Figura 5.12-A). A concentraciones altas, los cambios en

absorbancia observados fueron ligeramente superiores, pero muy inferiores a una cantidad proporcional de caseína, tanto para la α -lactoalbúmina como para la β -lactoglobulina. Los cambios de señal observados en los sensogramas son debido a cambios de índice de refracción del medio debido a la concentración de proteínas, siendo más significativa a concentraciones altas (Figura 5.12-B). Tras el lavado con la solución tampón la señal recuperó la línea base.

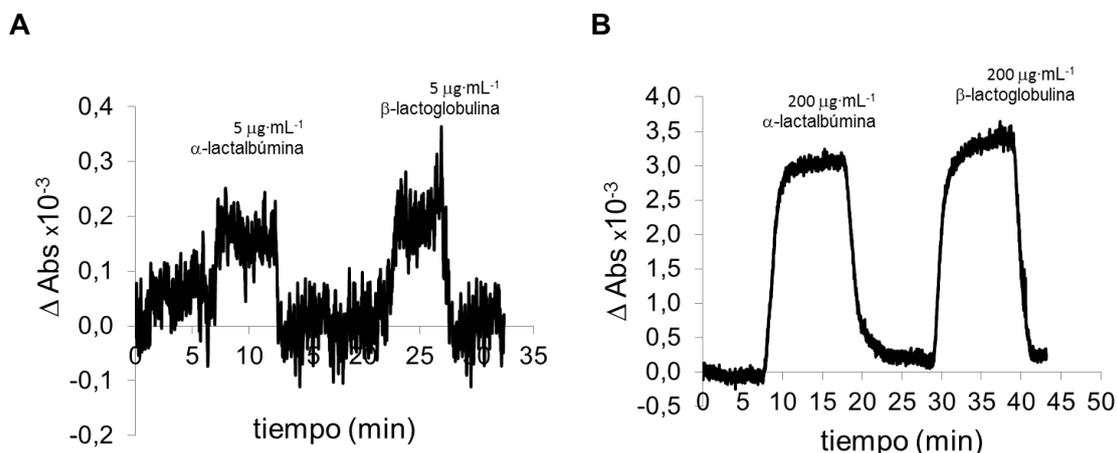


Figura 5.12. Sensogramas típicos del proceso de unión de α -lactalbúmina y β -lactoglobulina al sensor de caseína A) a bajas concentraciones $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y B) altas concentraciones $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Estos resultados confirman la especificidad de la interacción entre el anticuerpo monoclonal desarrollado y la caseína, reforzando aún más la viabilidad del protocolo y del método.

F) REPRODUCIBILIDAD

La reproducibilidad del inmunosensor LSPR se estudió mediante la evaluación de la variabilidad en un mismo día y entre varios días. Para ello se midieron en tres días diferentes muestras por triplicado en dos concentraciones (1 y $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) de caseína en solución tampón PBS.

Los valores medios para la variación intra-ensayo fueron todos menores del 10% y la variación inter-ensayo media fue del 11%. Además, todos los coeficientes de variación individuales fueron menores del 10%. Estos datos se encuentran dentro de la variabilidad aceptable para un método analítico.

Tabla 5.5. Variaciones intra-ensayo e inter-ensayo para la determinación de muestras por triplicado de caseína mediante LSPR a lo largo de un período de tres días.

1 ppm	Punto 1	Punto 2	Punto 3	Promedio	d.s.	CV%
Día 1	0,86	0,91	0,90	0,89	0,03	3%
Día 2	1,00	0,90	1,10	1,00	0,10	10%
Día 3	0,94	0,92	0,89	0,92	0,03	3%
Promedio				0,94	0,07	8%

5 ppm	Punto 1	Punto 2	Punto 3	Promedio	d.s.	CV%
Día 1	4,26	4,50	4,81	4,52	0,28	6%
Día 2	4,43	4,30	5,05	4,59	0,40	9%
Día 3	5,08	5,50	5,85	5,48	0,39	7%
Promedio				4,86	0,56	11%

También se comprobó la variabilidad del ensayo utilizando diferentes superficies sensoras (Tabla 5.6).

Tabla 5.6. Variabilidad del ensayo utilizando 3 superficies sensoras. En la tabla se presenta el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación para las concentraciones de 1, 2,5, 5 y 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

	1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$			2,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$			5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$			10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$		
	Promedio	d.s.	CV%	Promedio	d.s.	CV%	Promedio	d.s.	CV%	Promedio	d.s.	CV%
NS1	0,89	0,03	3%	2,10	0,02	1%	4,63	0,32	7%	7,31	0,65	9%
NS2	1,08	0,07	7%	2,00	0,16	8%	4,69	0,32	7%	7,80	0,56	7%
NS3	1,16	0,10	9%	2,27	0,15	7%	5,48	0,39	7%	8,14	0,61	7%

Se midieron curvas de calibrado con muestras en idénticas condiciones experimentales utilizando tres superficies nanoestructuradas con sensibilidades parecidas ($\sim 8 \text{ Abs}\cdot\text{RIU}^{-1}$). La Figura 5.13 muestra la parte lineal de las tres curvas de calibrado para las tres superficies sensoras probadas. La reproducibilidad entre superficies fue muy buena, con un coeficiente de variación del 10 %.

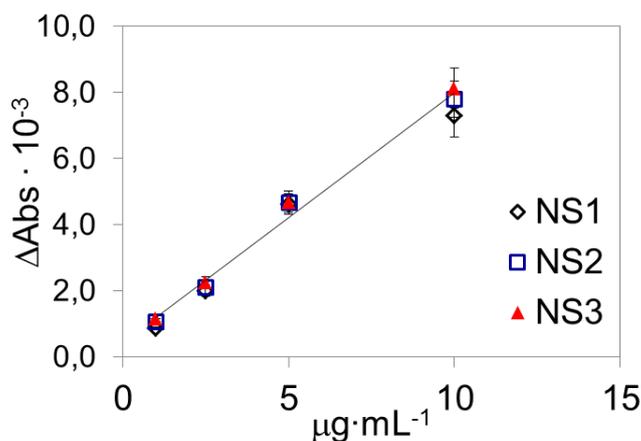


Figura 5.13. Tres curvas de calibrado ($n:3$) con el sistema LSPR para la detección de caseína.

A la vista de estos resultados podemos concluir que se han desarrollado protocolos de biofuncionalización y detección adecuados. El protocolo de análisis es rápido y sencillo y permite medir múltiples muestras en un corto espacio de tiempo, con la misma superficie biofuncionalizada. El límite de detección para la caseína se ha estimado en una concentración de $\sim 0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y un rango lineal desde 1 hasta $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Estos resultados muestran que en algunos casos, estamos en el rango de detectabilidad de los kits ELISA comerciales (LoD entre $0,05$ y $0,8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ dependiendo de la casa comercial).

El límite de detección obtenido con nuestro biosensor fue ligeramente mejor al obtenido por Muller y colaboradores (LoD: $0,87 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) con un formato sándwich (Muller-Renaud 2005) y utilizando un equipo SPR. Sin embargo, todavía estamos lejos del $58 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ obtenido por Ashley y colaboradores (Ashley et al. 2017) y del $10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ obtenido por Hiep y colaboradores con un biosensor LSPR (Hiep et al. 2007).

Se podría mejorar la detectabilidad del inmunosensor, aplicando un formato sándwich, o en base al uso de nanopartículas de oro para conseguir un incremento de la señal en estos sistemas. En ambos casos sería necesario otro anticuerpo (por ejemplo un anticuerpo anti-caseína policlonal). Con AuNPs en otros sistemas, se ha llegado a mejorar el límite de detección hasta 14 veces (Fernández, Sánchez-Baeza, and Marco 2012).

El rango dinámico descrito por todos estos trabajos fue muy similar al obtenido en nuestro sensor ($1\text{-}10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

G) REUTILIZACIÓN

Además de la reproducibilidad, la reutilización de las superficies sensoras, nos indica la robustez del inmunoensayo desarrollado. La reutilización está relacionada con la estabilidad de la superficie sensora a lo largo de un determinado número de ciclos de medida y regeneración. Para comprobar la robustez del inmunosensor, se midieron muestras de $2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ en PBS durante 11 días. Tal y como se ha comentado la unión anticuerpo-caseína se regenera haciendo pasar una solución de $0,1 \text{ M}$ de NaOH durante 1,5 minutos. La superficie sensora tras la realización de las medidas se guardó a 4°C en una solución tampón PBS con $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de BSA. Tras los 11 días, la señal máxima disminuyó un 80% del valor inicial. En este último punto se midió la unión inespecífica de $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ BSA, y no se detectó ninguna señal apreciable. Los motivos pueden ser múltiples, aunque principalmente podrían deberse a una inactivación del anticuerpo debido a los ciclos de unión / regeneración. En la Figura 5.14 se ha representado las señales obtenidas en el periodo de medida. Los días que no hay dato, representan el fin de semana que no se pudieron recoger datos. Se ha conseguido trabajar hasta 40 ciclos sin pérdida de señal (10% de pérdida, hasta el octavo día).



Figura 5.14. Señal obtenida con soluciones de $2,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ en PBS durante 11 días.

5.3.1.5. Primeras pruebas en superficie.

Las pruebas de detección de caseína en superficie se realizaron sobre una superficie de acero galvanizado de 10 cm x 10 cm. El acero galvanizado es el material más susceptible en la mayoría de labores de preparación de alimentos en la industria alimentaria y el de mayor dificultad. Se adicionó a la superficie un volumen de la solución de caseína que contuviera $2,5 \mu\text{g}$ de caseína. Al día siguiente se recogió la muestra con un hisopo empapado en tres soluciones tampón diferentes: PBS, PBS-T y AEP (una solución de la casa Biomedal) y se guardaron los hisopos a 4° hasta su uso. La extracción de la muestra se realizó en solución tampón PBS y se le aplicó dos tratamientos. El primero de los tratamientos consistió en dejar el hisopo durante 15 minutos en contacto con la solución tampón y luego sonificarlo durante 15 minutos. El segundo, consistió en agitar con un vórtex durante 2 minutos a máxima potencia y calentar durante 10 minutos a 60°C .

Con la solución tampón de PBS de empapado de hisopo, no se obtuvieron resultados en el sensor. Con las soluciones tampón de PBS-T y AEP se obtuvieron señales en el sensor, siendo las señales en PBS-T mayores que las obtenidas en AEP. Entre los dos métodos de extracción de muestra se observó que con el primer tratamiento (15 min en contacto con la solución + 15 min sonicando) se conseguía extraer más. Los resultados obtenidos al trabajar en solución PBS o PBS-T fueron bastante parecidos, por lo que se optó por trabajar en PBS. Finalmente, se midieron 10 muestras en PBS con los hisopos empapados en PBS-T y AEP. Tal y como se muestra en la

Tabla 5.7, se consiguió recuperar más muestra (81,5 % de caseína) al empapar el hisopo en PBS-T.

Tabla 5.7: Resultados obtenidos en el análisis de caseína en superficies de acero utilizando el inmunoensayo LSPR. Concentración inicial de caseína en superficie: 2,5 µg.

Solución tampón hisopo	Solución tampón extracción	µg (100 cm ²)	Recuperación
PBS-T	PBS	2,04 ±0,19	81,5%
AEP	PBS	1,7±0,4	67,5%

Los resultados preliminares, han demostrado que el método de recogida de muestra y extracción ha resultado bastante satisfactorio, aunque todavía es necesario optimizar este proceso para que las pérdidas sean mínimas. Además, es preciso realizar la validación del método primeramente con superficies dopadas, tal y como se ha realizado en este apartado, pero comparando los resultados con otro método analítico estandarizado para este fin y así comprobar que no existen discrepancias en los resultados. Por último, se debería realizar una validación conjunta entre el método de referencia y el inmunoensayo, en instalaciones donde se procesan alimentos con muestra real.

5.4 CONCLUSIONES

El método de inmunoensayo de LSPR demuestra la utilidad del biosensor para la determinación de caseína. El método hace posible la determinación rápida, sin necesidad de marcadores, y en tiempo real. El inmunosensor es capaz de detectar de forma directa el analito. Aunque existía algún trabajo previo en el que se describía el desarrollo de un inmunosensor LSPR para la determinación de caseína, es la primera vez que se utiliza los nanodiscos de oro junto con un espectrofotómetro común para este uso particular. Así pues, es la primera vez que se describe un inmunosensor LSPR basado en superficies nanoestructuradas periódicas de oro para el análisis de caseína en un formato óptico de transmisión.

El anticuerpo monoclonal anti-caseína detectó en ELISA de forma similar las tres proteínas ensayadas (α -caseína, caseína y caseinato de sodio), en sus tres estados, proteína nativas, pasteurizadas y desnaturalizadas. Probablemente el anticuerpo anti-caseína está reconociendo un epítipo común de todas las caseínas (α , β , γ y κ). En el sensor, el anticuerpo anti-caseína también detectó de forma similar las tres proteínas ensayadas en su forma natural, sin embargo, la proteína desnaturalizada no se detectó, produciendo además un efecto negativo en el tapizado de la superficie.

La optimización de los diferentes parámetros del protocolo LSPR condujo a un método altamente reproducible. Se ha maximizado la eficiencia del proceso de inmovilización del anticuerpo, para conseguir que la superficie nanoestructurada presente una alta funcionalidad. Para ello se estudiaron parámetros tales como la composición de la SAM, el pH de tampón de inmovilización, la concentración de anticuerpo y la velocidad de flujo. Se comprobó que una superficie con muchos puntos de unión no mejoraba la señal, principalmente debido a la desnaturalización de la proteína. También se comprobó que a concentraciones altas de tapizado la señal empeoraba, principalmente debido a problemas estéricos. Se intentó orientar el anticuerpo a través del pH de la solución, así se comprobó que a un pH 6,5 el anticuerpo inmovilizado era más funcional. Por último se comprobó que a flujos bajos se favorecía la reacción del anticuerpo con la SAM activada.

Por otro lado, también se ha maximizado la eficiencia del proceso de reconocimiento. Se comprobó que el reconocimiento se ve favorecido a flujos altos ($100 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$) y en tampón PBS. Además la regeneración básica (NaOH) permitió la completa regeneración de la unión anticuerpos-antígeno en las diferentes soluciones tampón estudiados, lo que pone de manifiesto el mantenimiento de la línea base de los sensogramas. El bloqueo de la superficie con BSA tras el tapizado, hizo que la α -lactoalbúmina y la β -lactoglobulina tuvieran un efecto insignificante de interferencia sobre los anticuerpos inmovilizados en el sensor.

La funcionalización covalente a través de unas SAM mixta, combinada con el bloqueo a través de la adición de BSA tras el tapizado y unas condiciones de regeneración y almacenamiento óptimos, permitieron reutilizar los mismos chips en días diferentes y realizar hasta 40 ciclos de unión y regeneración con muy poca pérdida de señal (10%), demostrando la

robustez del método. La reproducibilidad del método quedó probada por los bajos coeficientes de variación intra- e inter-ensayo y por la reducida variación entre diferentes superficies nanoestructuradas que presentaban una sensibilidad muy parecida ($\text{Abs}\cdot\text{RIU}^{-1}$). La detectabilidad alcanzada fue buena ($\sim 0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) y el rango lineal fue 1 - $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Se realizaron las primeras pruebas en superficie. El sencillo tratamiento de muestra aplicado, (empapado del hisopo en solución tampón PBS-T para recoger la muestra y extracción en solución tampón PBS) no necesitó de reactivos químicos ni tratamientos especiales. La recuperación de la muestra fue del 80%. Aunque los resultados preliminares son muy satisfactorios, todavía es necesaria la optimización del proceso para que las pérdidas sean mínimas, así como la validación del método.

CONCLUSIONES GENERALES

En este trabajo se han desarrollado distintas estrategias para la inmovilización de proteínas sobre nanoestructuras (Au NPs y superficies nanoestructuradas). El objetivo principal ha sido maximizar la eficiencia del proceso de inmovilización, intentando controlar la orientación, actividad, y estructura secundaria de la proteína.

El contenido de esta tesis se ha dividido en dos bloques distintos. En el primero de ellos se ha descrito el desarrollo de métodos de biofuncionalización entre enzimas y nanopartículas de oro. Se han estudiado la unión covalente como la adsorción física, y dentro de la adsorción física se han llevado a cabo distintas estrategias para desarrollar una metodología de inmovilización.

Se ha conjugado la proteína recombinante superóxido-dismutasa de hierro (rVuFeSOD) a Au NPs covalentemente y electrostáticamente, utilizando ácido mercaptoundecanóico como nexo de unión. Se ha determinado el efecto de la concentración del ligando en la cobertura y la actividad de la proteína, produciendo un efecto contrario dependiendo del método de unión. Así, se ha comprobado que en la adsorción física, la concentración de ligando tiene un efecto más pronunciado en la cobertura que en la actividad mientras que en la unión covalente tiene un efecto más negativo en la actividad, llegando a producir la desnaturalización de la proteína debido a un exceso de puntos de unión con la superficie. Para este particular sistema, la adsorción física ha resultado un mejor método de unión.

Con el objetivo de profundizar más en la adsorción física, la glucosa oxidasa se ha conjugado a nanopartículas de oro. Esta vez se ha caracterizado tanto la cobertura, la actividad enzimática, así como la estructura secundaria de la proteína una vez inmovilizada en la superficie de la NP. Se ha comprobado que las interacciones con las nanopartículas de oro pueden alterar significativamente la estructura y la función de la glucosa oxidasa. Las nanopartículas, pueden mejorar la unión del sustrato, al tiempo que reducen la actividad catalítica, indicando que los efectos estéricos no son tan importantes como la propia desnaturalización. La modificación del microambiente de la proteína mediante la adición de NaCl y glucosa mejora la actividad y el plegamiento. La glucosa es capaz de estabilizar el plegado de la proteína, pero no da lugar a grandes mejoras en la actividad, y el NaCl mejora la actividad, pero no la estructura secundaria. Esto significa que al planificar la inmovilización, es necesario investigar tanto la estructura como la actividad de la enzima, ya que no siempre se correlacionan.

La segunda sección del trabajo se ha centrado en el desarrollo de inmunosensores ópticos tipo LSPR.

El método de inmunoensayo de LSPR desarrollado en este trabajo demuestra la utilidad del biosensor para la determinación de biomoléculas. Este método hace posible la determinación rápida, sin necesidad de marcadores, y en tiempo real. El inmunosensor es capaz de detectar de forma directa analitos de peso molecular grande.

La plataforma de medida consiste en superficies nanoestructuradas de oro altamente sensibles, integradas en una celda fluidica. Esta celda se interroga con un espectrofotómetro de laboratorio que permite el monitoreo de las señales provenientes de los procesos de bio-reconocimiento que se dan sobre las superficies nanoestructuradas. Debido a su compatibilidad con los espectrofotómetros de laboratorio comunes, puede utilizarse como célula universal de flujo LSPR para detección óptica de procesos biológicos.

Se han analizado nanolíneas y nanodiscos como transductores ópticos. La sensibilidad media de las nanolíneas fue de $577 \pm 13 \text{ nm} \cdot \text{RIU}^{-1}$ y la de los nanodiscos de $532 \pm 16 \text{ nm} \cdot \text{RIU}^{-1}$. Los valores medios de FOM para las nanolíneas fue de 11 RIU^{-1} , y para los nanodiscos 12 RIU^{-1} . La sensibilidad medida a una longitud de onda constante sin embargo fue bastante superior para los nanodiscos $6,7 \pm 1,6 \text{ Abs} \cdot \text{RIU}^{-1}$ y una resolución de $3,1 \cdot 10^{-5} \text{ RIU}$, mientras que las nanolíneas presentaron una sensibilidad de $2,6 \pm 0,3 \text{ Abs} \cdot \text{RIU}^{-1}$ y una resolución de $8 \cdot 10^{-5} \text{ RIU}$. A partir de estos resultados se deduce que los nanodiscos son más sensibles para aplicaciones de monitoreo con el espectrofotómetro. A contraposición la variabilidad de la sensibilidad en los nanodiscos es mucho mayor, y por lo tanto la repetitividad entre los diferentes fragmentos es peor.

Los resultados para la detección de IgG muestran que la plataforma formada por el espectrofotómetro y las nanoestructuras es capaz de resolver concentraciones pequeñas. Entre los dos protocolos que se llevaron a cabo, el rango dinámico fue mayor para el formato indirecto. Los límites de detección en ambos casos fueron similares $\sim 1 \text{ nM}$. La señal se saturó antes para el formato directo, demostrando lo importante que puede llegar a ser la inmovilización del anticuerpo a la superficie.

Como aplicación práctica, se ha desarrollado un protocolo de medida para la detección de caseína, a partir de anticuerpos monoclonales anti-caseína.

La optimización de los diferentes parámetros del protocolo LSPR condujo a un método altamente reproducible. Se ha maximizado la eficiencia del proceso de inmovilización del anticuerpo, para conseguir que la superficie nanoestructurada presente una alta funcionalidad. Para ello se estudiaron parámetros tales como la composición de la SAM, el pH de tampón de inmovilización, la concentración de anticuerpo y el flujo de trabajo.

La funcionalización covalente a través de unas SAM mixta, combinada con el bloqueo a través de la adición de BSA tras el tapizado y unas condiciones de regeneración y almacenamiento óptimos, permitieron reutilizar los mismos chips en días diferentes y realizar hasta 40 ciclos de unión y regeneración con muy poca pérdida de señal (10%), demostrando la robustez del método. La reproducibilidad del método quedó probada por los bajos coeficientes de variación intra- e inter-ensayo y por la reducida variación entre diferentes superficies nanoestructuradas que presentaban una sensibilidad muy parecida ($\text{Abs} \cdot \text{RIU}^{-1}$). La detectabilidad alcanzada fue buena ($\sim 0,5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) y el rango lineal fue $1 - 10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$.

Se realizaron las primeras pruebas en superficie. El sencillo tratamiento de muestra aplicado, no necesitó de reactivos químicos ni tratamientos especiales. La recuperación de la muestra fue del 80%.

El protocolo de limpieza de las nanoestructuras fue fundamental para la reutilización de las superficies nanoestructuradas.

APÉNDICE

CAPÍTULO 3: KINETICS MEASUREMENTS

Table S1: Kinetics measurements: Engineering the NP surface chemistry (K_M , k_{cat} , k_{cat}/K_M , and number of GOx per NPs)

Surface chemistry	K_m [M]	k_{cat} [s^{-1}]	k_{cat}/K_m [$M^{-1}s^{-1}$]	Number of GOx per NPs
GOx	0.029 ± 0.003	70.8 ± 8.6	2448 ± 27	
NP_citrate_GOx	0.019 ± 0.008	2.6 ± 1.7	155 ± 88	9.6 ± 1.2
NP_citrate_PEG_GOx	0.020 ± 0.007	1.8 ± 1.6	82 ± 48	2.9 ± 0.6
NPs_CYS_GOx	0.027 ± 0.005	3.7 ± 0.3	139 ± 15	6.6 ± 0.4
NP_BPS_GOx	0.017 ± 0.003	2.8 ± 1.2	160 ± 65	8.8 ± 0.7
NP_BPS_PEG_GOx	0.025 ± 0.005	4.5 ± 1.4	186 ± 78	3.0 ± 1.4
NP_BPS_CYS_GOx	0.031 ± 0.007	5.8 ± 1.2	198 ± 66	3.4 ± 2.7

Table S2: Kinetics measurements: Stabilization of GOx by other protein (K_M , k_{cat} , k_{cat}/K_M , and number of GOx per NPs)

Protein stabilization	K_m [M]	k_{cat} [s^{-1}]	k_{cat}/K_m [$M^{-1}s^{-1}$]	Number of GOx per NPs
GOx	0.029 ± 0.003	70.8 ± 8.6	2448 ± 27	
NP_citrate_GOx	0.019 ± 0.008	2.6 ± 1.7	155 ± 88	9.6 ± 1.2
NP_citrate_GOx_HSA	0.024 ± 0.001	2.2 ± 0.8	89 ± 34	6.7 ± 2.7
NP_citrate_GOx_Lysozyme	0.025 ± 0.001	3.7 ± 0.1	151 ± 8	7.0 ± 0.5
NP_BPS_GOx	0.017 ± 0.003	2.8 ± 1.2	160 ± 65	8.8 ± 0.7
NP_BPS_GOx_HSA	0.024 ± 0.009	2.0 ± 0.7	87 ± 27	4.4 ± 0.5
NP_BPS_GOx_Lysozyme	0.022 ± 0.001	1.3 ± 0.1	57 ± 8	10.7 ± 1.7

Table S3: Kinetics measurements: Manipulating the GOx microenvironment. a) NaCl and K_2SO_4 ; b) PEG (MW=3000 g/mol); c) Glucose (K_M , k_{cat} , k_{cat}/K_M , and number of GOx per NPs)a) NaCl and K_2SO_4

NaCl & K_2SO_4	K_m [M]	k_{cat} [s^{-1}]	k_{cat}/K_m [$M^{-1}s^{-1}$]	Number of GOx per NPs
GOx NaCl	0.029 ± 0.005	69.4 ± 12.1	2410 ± 58	
NP_BPS_GOx	0.017 ± 0.003	2.8 ± 1.2	160 ± 65	8.8 ± 0.7
NP_BPS_GOx_25mM NaCl	0.031 ± 0.007	3.1 ± 0.8	99 ± 3	4.1 ± 0.9
NP_BPS_GOx_100mM NaCl	0.019 ± 0.002	5.1 ± 1.3	274 ± 67	3.3 ± 0.9
NP_BPS_GOx_150mM NaCl	0.015 ± 0.001	8.2 ± 0.7	549 ± 60	2.1 ± 0.3
NP_BPS_GOx_100mM K_2SO_4	0.020 ± 0.004	9.2 ± 0.1	521 ± 4	1.8 ± 1.1

b) PEG (MW=3000 g/mol)

<i>PEG solution stabilization NP-citrate</i>	K_m [M]	k_{cat} [s ⁻¹]	k_{cat}/K_m [M ⁻¹ s ⁻¹]	Number of GOx per NPs
<i>GOx</i>	0.029 ± 0.003	70.8 ± 8.6	2448 ± 27	
<i>NP_citrate_GOx</i>	0.019 ± 0.008	2.6 ± 1.7	155 ± 88	9.6 ± 1.2
<i>NPs_citrate_GOx_1%PEG_AFTER</i>	0.025 ± 0.010	2.9 ± 0.5	128 ± 73	10.5 ± 6.5
<i>NPs_citrate_GOx_0,01%PEG_AFTER</i>	0.030 ± 0.014	4.2 ± 1.8	143 ± 5	7.7 ± 2.3
<i>NPs_citrate_GOx_1%PEG_AT</i>	0.048 ± 0.011	5.1 ± 1.8	104 ± 14	9.9 ± 1.0
<i>NPs_citrate_GOx_0,01%PEG_AT</i>	0.039 ± 0.014	4.8 ± 3.6	120 ± 14	9.5 ± 0.3

<i>PEG solution stabilization NP-BPS</i>	K_m [M]	k_{cat} [s ⁻¹]	k_{cat}/K_m [M ⁻¹ s ⁻¹]	Number of GOx per NPs
<i>GOx</i>	0.029 ± 0.003	70.8 ± 8.6	2448 ± 58	
<i>NP_BPS_GOx</i>	0.017 ± 0.003	2.8 ± 1.2	160 ± 65	8.8 ± 0.7
<i>NPs_BPS_GOx_1%PEG_AFTER</i>	0.026 ± 0.010	2.8 ± 1.8	124 ± 102	10.9 ± 8.4
<i>NPs_BPS_GOx_0,01%PEG_AFTER</i>	0.025 ± 0.015	2.4 ± 0.1	120 ± 78	8.8 ± 6.5
<i>NPs_BPS_GOx_1%PEG_AT</i>	0.037 ± 0.005	2.0 ± 0.2	56 ± 3	12.3 ± 2.0
<i>NPs_BPS_GOx_0,01%PEG_AT</i>	0.027 ± 0.011	1.7 ± 0.6	64 ± 3	12.0 ± 2.2

c) Glucose

<i>Glucose</i>	K_m [M]	k_{cat} [s ⁻¹]	k_{cat}/K_m [M ⁻¹ s ⁻¹]	Number of GOx per NPs
<i>GOx</i>	0.029 ± 0.003	70.8 ± 8.6	2448 ± 27	
<i>NP_citrate_GOx</i>	0.019 ± 0.008	2.6 ± 1.7	155 ± 88	9.6 ± 1.2
<i>NP_citrate_GOx_glucose</i>	0.017 ± 0.003	2.9 ± 1.4	171 ± 68	6.8 ± 2.1
<i>NP_BPS_GOx</i>	0.017 ± 0.003	2.8 ± 1.2	160 ± 65	8.8 ± 0.7
<i>NP_BPS_GOx_glucose</i>	0.013 ± 0.008	2.1 ± 1.1	130 ± 13	14.5 ± 5.8
<i>NP_BPS_PEG_GOx</i>	0.025 ± 0.005	4.5 ± 1.4	186 ± 78	3.0 ± 1.4
<i>NP_BPS_CYS_GOx</i>	0.030 ± 0.008	6.5 ± 2.3	235 ± 84	3.6 ± 1.2

Table S4: Kinetics measurements: Protein after displacement from the NP surface with MCH (K_m , k_{cat} , k_{cat}/K_m , and number of GOx per NPs)

<i>MCH</i>	K_m [M]	k_{cat} [s ⁻¹]	k_{cat}/K_m [M ⁻¹ s ⁻¹]
<i>GOx</i>	0.029 ± 0.003	70.8 ± 8.6	2448 ± 27
<i>GOx_MCH</i>	0.037 ± 0.003	82.9 ± 4.5	2222 ± 44
<i>NP_citrate_GOx</i>	0.019 ± 0.008	2.6 ± 1.7	155 ± 88
<i>NP_citrate_GOx_MCH</i>	0.009 ± 0.003	0.9 ± 0.5	99 ± 42
<i>NP_citrate_GOx_glucose</i>	0.017 ± 0.003	2.9 ± 1.4	171 ± 68
<i>NP_citrate_GOx_glucose_MCH</i>	0.007 ± 0.003	0.9 ± 0.4	145 ± 14
<i>NP_BPS_GOx</i>	0.017 ± 0.003	2.8 ± 1.2	160 ± 65
<i>NP_BPS_GOx_MCH</i>	0.007 ± 0.002	0.7 ± 0.1	107 ± 30
<i>NP_BPS_GOx_glucose</i>	0.013 ± 0.008	1.3 ± 0.9	90 ± 61
<i>NP_BPS_GOx_glucose_MCH</i>	0.005 ± 0.002	0.6 ± 0.1	134 ± 22

Table S5: Statistical analysis of kinetics measurements for K_M and k_{cat}/K_M . Yellow highlights indicate significant differences. All statistical analysis were performed with Statistical Product and Service Solutions (SPSS; v.19.0), using unifactorial analyses of variance. The Levene test was used, and LSD statistics applied for variables with homogeneity of variance and the Dunnett T3 test for cases of non-homoscedasticity.

K_m	Surface chemistry	Average difference (I-J)	Error	Sig.	Confidence interval 95%	
					Limit inferior	Limit superior
NP_citrate_GOx	NP_citrate_PEG_GOx	0.00192	0.00405	1.00	-0.0201	0.0162
	NP_citrate_CYS_GOx	-0.00867	0.00351	0.40	-0.0231	0.0058
	NP_BPS_GOx	0.00111	0.0025	1.00	-0.0078	0.01
	NP_BPS_PEG_GOx	-0.00707	0.00338	0.58	-0.0199	0.0057
	NP_BPS_CYS_GOx	-0.01267	0.00412	0.23	-0.0313	0.006
	GOx	-0.01033	0.00304	0.12	-0.0228	0.0021
NP_citrate_PEG_GOx	NP_citrate_GOx	0.00192	0.00405	1.00	-0.0162	0.0201
	NP_citrate_CYS_GOx	-0.00675	0.00429	0.85	-0.0264	0.0129
	NP_BPS_GOx	0.00303	0.00351	1.00	-0.0174	0.0235
	NP_BPS_PEG_GOx	-0.00515	0.00418	0.96	-0.0241	0.0138
	NP_BPS_CYS_GOx	-0.01075	0.0048	0.52	-0.0323	0.0108
	GOx	-0.00842	0.00392	0.58	-0.0281	0.0112
NP_citrate_CYS_GOx	NP_citrate_GOx	0.00867	0.00351	0.40	-0.0058	0.0231
	NP_citrate_PEG_GOx	0.00675	0.00429	0.85	-0.0129	0.0264
	NP_BPS_GOx	0.00978	0.00287	0.22	-0.006	0.0256
	NP_BPS_PEG_GOx	0.0016	0.00366	1.00	-0.0142	0.0174
	NP_BPS_CYS_GOx	-0.004	0.00436	1.00	-0.024	0.016
	GOx	-0.00167	0.00336	1.00	-0.018	0.0147
NP_BPS_GOx	NP_citrate_GOx	-0.00111	0.0025	1.00	-0.01	0.0078
	NP_citrate_PEG_GOx	-0.00303	0.00351	1.00	-0.0235	0.0174
	NP_citrate_CYS_GOx	-0.00978	0.00287	0.22	-0.0256	0.006
	NP_BPS_PEG_GOx	-0.00818	0.00271	0.25	-0.0209	0.0045
	NP_BPS_CYS_GOx	-0.01378	0.00359	0.17	-0.0348	0.0073
	GOx	-0.01144	0.00228	0.10	-0.026	0.0031
NP_BPS_PEG_GOx	NP_citrate_GOx	0.00707	0.00338	0.58	-0.0057	0.0199
	NP_citrate_PEG_GOx	0.00515	0.00418	0.96	-0.0138	0.0241
	NP_citrate_CYS_GOx	-0.0016	0.00366	1.00	-0.0174	0.0142
	NP_BPS_GOx	0.00818	0.00271	0.25	-0.0045	0.0209
	NP_BPS_CYS_GOx	-0.0056	0.00425	0.94	-0.025	0.0138
	GOx	-0.00327	0.00322	0.99	-0.0178	0.0113
NP_BPS_CYS_GOx	NP_citrate_GOx	0.01267	0.00412	0.23	-0.006	0.0313
	NP_citrate_PEG_GOx	0.01075	0.0048	0.52	-0.0108	0.0323
	NP_citrate_CYS_GOx	0.004	0.00436	1.00	-0.016	0.024
	NP_BPS_GOx	0.01378	0.00359	0.17	-0.0073	0.0348
	NP_BPS_PEG_GOx	0.0056	0.00425	0.94	-0.0138	0.025
	GOx	0.00233	0.00399	1.00	-0.0178	0.0225
GOx	NP_citrate_GOx	0.01033	0.00304	0.12	-0.0021	0.0228
	NP_citrate_PEG_GOx	0.00842	0.00392	0.58	-0.0112	0.0281
	NP_citrate_CYS_GOx	0.00167	0.00336	1.00	-0.0147	0.018
	NP_BPS_GOx	0.01144	0.00228	0.10	-0.0031	0.026
	NP_BPS_PEG_GOx	0.00327	0.00322	0.99	-0.0113	0.0178
	NP_BPS_CYS_GOx	-0.00233	0.00399	1.00	-0.0225	0.0178

k_{cat}/K_m	Surface chemistry	Average difference (I-J)	Error	Sig.	Confidence interval 95%	
(I) Sample	(J) Sample				Limit inferior	Limit superior
NP_citrate_GOx	NP_citrate_PEG_GOx	72.33	46.08	0.1	-21.32	165.99
	NP_citrate_CYS_GOx	16.08	46.08	0.7	-77.57	109.74
	NP_BPS_GOx	-4.83	35.20	0.9	-76.36	66.70
	NP_BPS_PEG_GOx	-30.97	42.49	0.5	-117.31	55.38
	NP_BPS_CYS_GOx	22.67	39.91	0.6	-58.44	103.77
NP_citrate_PEG_GOx	NP_citrate_GOx	-72.33	46.08	0.1	-165.99	21.32
	NP_citrate_CYS_GOx	-56.25	56.44	0.3	-170.95	58.45
	NP_BPS_GOx	-77.17	47.97	0.1	-174.64	20.31
	NP_BPS_PEG_GOx	-103.30	53.54	0.1	-212.12	5.52
	NP_BPS_CYS_GOx	-49.67	51.52	0.3	-154.37	55.04
NP_citrate_CYS_GOx	NP_citrate_GOx	-16.08	46.08	0.7	-109.74	77.57
	NP_citrate_PEG_GOx	56.25	56.44	0.3	-58.45	170.95
	NP_BPS_GOx	-20.92	47.97	0.7	-118.39	76.56
	NP_BPS_PEG_GOx	-47.05	53.54	0.4	-155.87	61.77
	NP_BPS_CYS_GOx	6.58	51.52	0.9	-98.12	111.29
NP_BPS_GOx	NP_citrate_GOx	4.83	35.20	0.9	-66.70	76.36
	NP_citrate_PEG_GOx	77.17	47.97	0.1	-20.31	174.64
	NP_citrate_CYS_GOx	20.92	47.97	0.7	-76.56	118.39
	NP_BPS_PEG_GOx	-26.13	44.52	0.6	-116.61	64.34
	NP_BPS_CYS_GOx	27.50	42.07	0.5	-57.99	112.99
NP_BPS_PEG_GOx	NP_citrate_GOx	30.97	42.49	0.5	-55.38	117.31
	NP_citrate_PEG_GOx	103.30	53.54	0.1	-5.52	212.12
	NP_citrate_CYS_GOx	47.05	53.54	0.4	-61.77	155.87
	NP_BPS_GOx	26.13	44.52	0.6	-64.34	116.61
	NP_BPS_CYS_GOx	53.63	48.33	0.3	-44.59	151.86
NP_BPS_CYS_GOx	NP_citrate_GOx	-22.67	39.91	0.6	-103.77	58.44
	NP_citrate_PEG_GOx	49.67	51.52	0.3	-55.04	154.37
	NP_citrate_CYS_GOx	-6.58	51.52	0.9	-111.29	98.12
	NP_BPS_GOx	-27.50	42.07	0.5	-112.99	57.99
	NP_BPS_PEG_GOx	-53.63	48.33	0.3	-151.86	44.59

K_m		Protein stabilization		Average difference (I-J)	Error	Sig.	Confidence interval 95%	
(I) Sample	(J) Sample	Limit inferior	Limit superior					
NP_citrate_GOx	NP_citrate_GOx_HSA	-0.00633	0.00381	0.108	-0.0141	0.0015		
	NP_citrate_GOx_Lysozyme	-0.00617	0.0045	0.182	-0.0154	0.0031		
	NP_BPS_GOx	0.00111	0.0026	0.673	-0.0042	0.0064		
	NP_BPS_GOx_HSA	-0.00533	0.00381	0.173	-0.0131	0.0025		
	NP_BPS_GOx_Lysozyme	-0.00417	0.0045	0.363	-0.0134	0.0051		
	GOx	-0.01033*	0.00381	0.011	-0.0181	-0.0025		
NP_citrate_GOx_HSA	NP_citrate_GOx	0.00633	0.00381	0.108	-0.0015	0.0141		
	NP_citrate_GOx_Lysozyme	0.00017	0.00538	0.976	-0.0109	0.0112		
	NP_BPS_GOx	0.00744	0.00393	0.069	-0.0006	0.0155		
	NP_BPS_GOx_HSA	0.001	0.00482	0.837	-0.0089	0.0109		
	NP_BPS_GOx_Lysozyme	0.00217	0.00538	0.691	-0.0089	0.0132		
	GOx	-0.004	0.00482	0.413	-0.0139	0.0059		
NP_citrate_GOx_Lysozyme	NP_citrate_GOx	0.00617	0.0045	0.182	-0.0031	0.0154		
	NP_citrate_GOx_HSA	-0.00017	0.00538	0.976	-0.0112	0.0109		
	NP_BPS_GOx	0.00728	0.00461	0.126	-0.0022	0.0167		
	NP_BPS_GOx_HSA	0.00083	0.00538	0.878	-0.0102	0.0119		
	NP_BPS_GOx_Lysozyme	0.002	0.0059	0.737	-0.0101	0.0141		
	GOx	-0.00417	0.00538	0.446	-0.0152	0.0069		
NP_BPS_GOx	NP_citrate_GOx	-0.00111	0.0026	0.673	-0.0064	0.0042		
	NP_citrate_GOx_HSA	-0.00744	0.00393	0.069	-0.0155	0.0006		
	NP_citrate_GOx_Lysozyme	-0.00728	0.00461	0.126	-0.0167	0.0022		
	NP_BPS_GOx_HSA	-0.00644	0.00393	0.113	-0.0145	0.0016		
	NP_BPS_GOx_Lysozyme	-0.00528	0.00461	0.262	-0.0147	0.0042		
	GOx	-0.01144*	0.00393	0.007	-0.0195	-0.0034		
NP_BPS_GOx_HSA	NP_citrate_GOx	0.00533	0.00381	0.173	-0.0025	0.0131		
	NP_citrate_GOx_HSA	-0.001	0.00482	0.837	-0.0109	0.0089		
	NP_citrate_GOx_Lysozyme	-0.00083	0.00538	0.878	-0.0119	0.0102		
	NP_BPS_GOx	0.00644	0.00393	0.113	-0.0016	0.0145		
	NP_BPS_GOx_Lysozyme	0.00117	0.00538	0.83	-0.0099	0.0122		
	GOx	-0.005	0.00482	0.308	-0.0149	0.0049		
NP_BPS_GOx_Lysozyme	NP_citrate_GOx	0.00417	0.0045	0.363	-0.0051	0.0134		
	NP_citrate_GOx_HSA	-0.00217	0.00538	0.691	-0.0132	0.0089		
	NP_citrate_GOx_Lysozyme	-0.002	0.0059	0.737	-0.0141	0.0101		
	NP_BPS_GOx	0.00528	0.00461	0.262	-0.0042	0.0147		
	NP_BPS_GOx_HSA	-0.00117	0.00538	0.83	-0.0122	0.0099		
	GOx	-0.00617	0.00538	0.262	-0.0172	0.0049		
GOx	NP_citrate_GOx	0.01033*	0.00381	0.011	0.0025	0.0181		
	NP_citrate_GOx_HSA	0.004	0.00482	0.413	-0.0059	0.0139		
	NP_citrate_GOx_Lysozyme	0.00417	0.00538	0.446	-0.0069	0.0152		
	NP_BPS_GOx	0.01144*	0.00393	0.007	0.0034	0.0195		
	NP_BPS_GOx_HSA	0.005	0.00482	0.308	-0.0049	0.0149		
	NP_BPS_GOx_Lysozyme	0.00617	0.00538	0.262	-0.0049	0.0172		

k_{cat}/K_m		Protein stabilization		Average difference (I-J)	Error	Sig.	Confidence interval 95%	
(I) Sample	(J) Sample	Limit inferior	Limit superior					
NP_citrate_GOx	NP_citrate_GOx_HSA	65.83333	45.29462	0.159	-27.4527	159.1194		
	NP_citrate_GOx_Lysozyme	3.33333	53.59332	0.951	-107.0442	113.7108		
	NP_BPS_GOx	-4.83333	30.94212	0.877	-68.5598	58.8932		
	NP_BPS_GOx_HSA	67.83333	45.29462	0.147	-25.4527	161.1194		
	NP_BPS_GOx_Lysozyme	97.83333	53.59332	0.08	-12.5442	208.2108		
NP_citrate_GOx_HSA	NP_citrate_GOx	-65.83333	45.29462	0.159	-159.1194	27.4527		
	NP_citrate_GOx_Lysozyme	-62.5	64.05627	0.339	-194.4264	69.4264		
	NP_BPS_GOx	-70.66667	46.78008	0.143	-167.0121	25.6787		
	NP_BPS_GOx_HSA	2	57.29367	0.972	-115.9985	119.9985		
	NP_BPS_GOx_Lysozyme	32	64.05627	0.622	-99.9264	163.9264		
NP_citrate_GOx_Lysozyme	NP_citrate_GOx	-3.33333	53.59332	0.951	-113.7108	107.0442		
	NP_citrate_GOx_HSA	62.5	64.05627	0.339	-69.4264	194.4264		
	NP_BPS_GOx	-8.16667	54.85451	0.883	-121.1416	104.8083		
	NP_BPS_GOx_HSA	64.5	64.05627	0.324	-67.4264	196.4264		
	NP_BPS_GOx_Lysozyme	94.5	70.17013	0.19	-50.0181	239.0181		
NP_BPS_GOx	NP_citrate_GOx	4.83333	30.94212	0.877	-58.8932	68.5598		
	NP_citrate_GOx_HSA	70.66667	46.78008	0.143	-25.6787	167.0121		
	NP_citrate_GOx_Lysozyme	8.16667	54.85451	0.883	-104.8083	121.1416		
	NP_BPS_GOx_HSA	72.66667	46.78008	0.133	-23.6787	169.0121		
	NP_BPS_GOx_Lysozyme	102.66667	54.85451	0.073	-10.3083	215.6416		
NP_BPS_GOx_HSA	NP_citrate_GOx	-67.83333	45.29462	0.147	-161.1194	25.4527		
	NP_citrate_GOx_HSA	-2	57.29367	0.972	-119.9985	115.9985		
	NP_citrate_GOx_Lysozyme	-64.5	64.05627	0.324	-196.4264	67.4264		
	NP_BPS_GOx	-72.66667	46.78008	0.133	-169.0121	23.6787		
	NP_BPS_GOx_Lysozyme	30	64.05627	0.644	-101.9264	161.9264		
NP_BPS_GOx_Lysozyme	NP_citrate_GOx	-97.83333	53.59332	0.08	-208.2108	12.5442		
	NP_citrate_GOx_HSA	-32	64.05627	0.622	-163.9264	99.9264		
	NP_citrate_GOx_Lysozyme	-94.5	70.17013	0.19	-239.0181	50.0181		
	NP_BPS_GOx	-102.66667	54.85451	0.073	-215.6416	10.3083		
	NP_BPS_GOx_HSA	-30	64.05627	0.644	-161.9264	101.9264		

K_m NaCl & K ₂ SO ₄		Average difference (I-J)	Error	Sig.	Confidence interval 95%	
(I) Sample	(J) Sample				Limit inferior	Limit superior
NP_BPS_GOx	NP_BPS_25mM NaCl	-0.01353*	0.00214	0	-0.018	-0.0091
	NP_BPS_100mM NaCl	-0.00153	0.00214	0.482	-0.006	0.0029
	NP_BPS_150mM NaCl	0.00172	0.00214	0.429	-0.0027	0.0062
	NP_BPS_100mM K ₂ SO ₄	-0.00244	0.00237	0.314	-0.0074	0.0025
	GOx	-0.01144*	0.00237	0	-0.0164	-0.0065
NP_BPS_25mM NaCl	NP_BPS	.01353*	0.00214	0	0.0091	0.018
	NP_BPS_100mM NaCl	.01200*	0.00251	0	0.0068	0.0172
	NP_BPS_150mM NaCl	.01525*	0.00251	0	0.01	0.0205
	NP_BPS_100mM K ₂ SO ₄	.01108*	0.00272	0.001	0.0054	0.0167
	GOx	0.00208	0.00272	0.451	-0.0036	0.0077
NP_BPS_100mM NaCl	NP_BPS	0.00153	0.00214	0.482	-0.0029	0.006
	NP_BPS_25mM NaCl	-0.01200*	0.00251	0	-0.0172	-0.0068
	NP_BPS_150mM NaCl	0.00325	0.00251	0.21	-0.002	0.0085
	NP_BPS_100mM K ₂ SO ₄	-0.00092	0.00272	0.739	-0.0066	0.0047
	GOx	-0.00992*	0.00272	0.001	-0.0156	-0.0043
NP_BPS_150mM NaCl	NP_BPS	-0.00172	0.00214	0.429	-0.0062	0.0027
	NP_BPS_25mM NaCl	-0.01525*	0.00251	0	-0.0205	-0.01
	NP_BPS_100mM NaCl	-0.00325	0.00251	0.21	-0.0085	0.002
	NP_BPS_100mM K ₂ SO ₄	-0.00417	0.00272	0.14	-0.0098	0.0015
	GOx	-0.01317*	0.00272	0	-0.0188	-0.0075
NP_BPS_100mM K ₂ SO ₄	NP_BPS	0.00244	0.00237	0.314	-0.0025	0.0074
	NP_BPS_25mM NaCl	-0.01108*	0.00272	0.001	-0.0167	-0.0054
	NP_BPS_100mM NaCl	0.00092	0.00272	0.739	-0.0047	0.0066
	NP_BPS_150mM NaCl	0.00417	0.00272	0.14	-0.0015	0.0098
	GOx	-0.00900*	0.0029	0.005	-0.015	-0.003
GOx	BPS	.01144*	0.00237	0	0.0065	0.0164
	NP_BPS_25mM NaCl	-0.00208	0.00272	0.451	-0.0077	0.0036
	NP_BPS_100mM NaCl	.00992*	0.00272	0.001	0.0043	0.0156
	NP_BPS_150mM NaCl	.01317*	0.00272	0	0.0075	0.0188
	NP_BPS_100mM K ₂ SO ₄	.00900*	0.0029	0.005	0.003	0.015

k_{cat}/K_m NaCl & K ₂ SO ₄		Average difference (I-J)	Error	Sig.	Confidence interval 95%	
(I) Sample	(J) Sample				Limit inferior	Limit superior
BPS	NP_BPS_25mM NaCl	60.16667	33.55345	0.088	-9.8246	130.1579
	NP_BPS_100mM NaCl	-113.93333*	31.144	0.002	-178.8986	-48.9681
	NP_BPS_150mM NaCl	-389.83333*	33.55345	0	-459.8246	-319.8421
	NP_BPS_100mM K ₂ SO ₄	-362.00000*	37.22421	0	-439.6483	-284.3517
NP_BPS_25mM NaCl	NP_BPS	-60.16667	33.55345	0.088	-130.1579	9.8246
	NP_BPS_100mM NaCl	-174.10000*	37.45613	0	-252.2321	-95.9679
	NP_BPS_150mM NaCl	-450.00000*	39.48223	0	-532.3585	-367.6415
	NP_BPS_100mM K ₂ SO ₄	-422.16667*	42.64568	0	-511.124	-333.2093
NP_BPS_100mM NaCl	NP_BPS	113.93333*	31.144	0.002	48.9681	178.8986
	NP_BPS_25mM NaCl	174.10000*	37.45613	0	95.9679	252.2321
	NP_BPS_150mM NaCl	-275.90000*	37.45613	0	-354.0321	-197.7679
	NP_BPS_100mM K ₂ SO ₄	-248.06667*	40.77707	0	-333.1262	-163.0072
NP_BPS_150mM NaCl	NP_BPS	389.83333*	33.55345	0	319.8421	459.8246
	NP_BPS_25mM NaCl	450.00000*	39.48223	0	367.6415	532.3585
	NP_BPS_100mM NaCl	275.90000*	37.45613	0	197.7679	354.0321
	NP_BPS_100mM K ₂ SO ₄	27.83333	42.64568	0.521	-61.124	116.7907
NP_BPS_100mM K ₂ SO ₄	NP_BPS	362.00000*	37.22421	0	284.3517	439.6483
	NP_BPS_25mM NaCl	422.16667*	42.64568	0	333.2093	511.124
	NP_BPS_100mM NaCl	248.06667*	40.77707	0	163.0072	333.1262
	NP_BPS_150mM NaCl	-27.83333	42.64568	0.521	-116.7907	61.124

K_m	NP & PEG		Average difference (I-J)	Error	Sig.	Confidence interval 95%	
	(I) Sample	(J) Sample				Limit inferior	Limit superior
NP_citrate	NP_citrate_1%PEG_after		-0.01	0.01	0.37	-0.02	0.01
	NP_citrate_0.01%PEG_after		-0.01	0.01	0.17	-0.03	0.01
	NP_citrate_1%PEG_Sim		-0.02967*	0.01	0.00	-0.05	-0.01
	NP_citrate_0.01%_PEG_sim		-0.02067*	0.01	0.02	-0.04	0.00
	GOx		-0.01	0.01	0.14	-0.02	0.00
NP_citrate_1%PEG_after	NP_citrate		0.01	0.01	0.37	-0.01	0.02
	NP_citrate_0.01%PEG_after		0.00	0.01	0.70	-0.03	0.02
	NP_citrate_1%PEG_Sim		-0.02250*	0.01	0.04	-0.04	0.00
	NP_citrate_0.01%_PEG_sim		-0.01	0.01	0.20	-0.04	0.01
	GOx		0.00	0.01	0.74	-0.02	0.02
NP_citrate_0.01%PEG_after	NP_citrate		0.01	0.01	0.17	-0.01	0.03
	NP_citrate_1%PEG_after		0.00	0.01	0.70	-0.02	0.03
	NP_citrate_1%PEG_Sim		-0.02	0.01	0.09	-0.04	0.00
	NP_citrate_0.01%_PEG_sim		-0.01	0.01	0.37	-0.03	0.01
	GOx		0.00	0.01	0.93	-0.02	0.02
NP_citrate_1%PEG_Sim	NP_citrate		.02967*	0.01	0.00	0.01	0.05
	NP_citrate_1%PEG_after		.02250*	0.01	0.04	0.00	0.04
	NP_s_0.01%PEG		0.02	0.01	0.09	0.00	0.04
	NP_citrate_0.01%_PEG_sim		0.01	0.01	0.39	-0.01	0.03
	GOx		0.02	0.01	0.05	0.00	0.04
NP_citrate_0.01%_PEG_sim	NP_citrate		.02067*	0.01	0.02	0.00	0.04
	NP_citrate_1%PEG_after		0.01	0.01	0.20	-0.01	0.04
	NP_citrate_0.01%PEG_after		0.01	0.01	0.37	-0.01	0.03
	NP_citrate_1%PEG_Sim		-0.01	0.01	0.39	-0.03	0.01
	GOx		0.01	0.01	0.28	-0.01	0.03
GOx	NP_citrate		0.01	0.01	0.14	0.00	0.02
	NP_citrate_1%PEG_after		0.00	0.01	0.74	-0.02	0.02
	NP_citrate_0.01%PEG_after		0.00	0.01	0.93	-0.02	0.02
	NP_citrate_1%PEG_Sim		-0.02	0.01	0.05	-0.04	0.00
	NP_citrate_0.01%_PEG_sim		-0.01	0.01	0.28	-0.03	0.01

k_{cat}/K_m	NP & PEG		Average difference (I-J)	Error	Sig.	Confidence interval 95%	
	(I) Sample	(J) Sample				Limit inferior	Limit superior
NP_citrate	NP_citrate_1%PEG_after		26.83	59.57	0.66	-100.13	153.80
	NP_citrate_0.01%PEG_after		11.83	59.57	0.85	-115.13	138.80
	NP_citrate_1%PEG_Sim		51.33	59.57	0.40	-75.63	178.30
	NP_citrate_0.01%_PEG_sim		34.83	59.57	0.57	-92.13	161.80
NP_citrate_1%PEG_after	NP_citrate		-26.83	59.57	0.66	-153.80	100.13
	NP_citrate_0.01%PEG_after		-15.00	77.99	0.85	-181.24	151.24
	NP_citrate_1%PEG_Sim		24.50	77.99	0.76	-141.74	190.74
	NP_citrate_0.01%_PEG_sim		8.00	77.99	0.92	-158.24	174.24
NP_citrate_0.01%PEG_after	NP_citrate		-11.83	59.57	0.85	-138.80	115.13
	NP_citrate_1%PEG_after		15.00	77.99	0.85	-151.24	181.24
	NP_citrate_1%PEG_Sim		39.50	77.99	0.62	-126.74	205.74
	NP_citrate_0.01%_PEG_sim		23.00	77.99	0.77	-143.24	189.24
NP_citrate_1%PEG_Sim	NP_citrate		-51.33	59.57	0.40	-178.30	75.63
	NP_citrate_1%PEG_after		-24.50	77.99	0.76	-190.74	141.74
	NP_s_0.01%PEG		-39.50	77.99	0.62	-205.74	126.74
	NP_citrate_0.01%_PEG_sim		-16.50	77.99	0.84	-182.74	149.74
NP_citrate_0.01%_PEG_sim	NP_citrate		-34.83	59.57	0.57	-161.80	92.13
	NP_citrate_1%PEG_after		-8.00	77.99	0.92	-174.24	158.24
	NP_citrate_0.01%PEG_after		-23.00	77.99	0.77	-189.24	143.24
	NP_citrate_1%PEG_Sim		16.50	77.99	0.84	-149.74	182.74

K_m BPS & PEG		Average difference (I-J)	Error	Sig.	Confidence interval 95%	
(I) Sample	(J) Sample				Limit inferior	Limit superior
NP_BPS	NP_BPS_1%PEG_after	-0.00878	0.0051	0.107	-0.0197	0.0022
	NP_BPS_0.01%PEG_after	-0.00778	0.0051	0.149	-0.0187	0.0032
	NP_BPS_1%PEG_sim	-0.01928*	0.0051	0.002	-0.0302	-0.0083
	NP_BPS_0.01%_PEG_sim	-0.00978	0.0051	0.076	-0.0207	0.0012
	GOx	-0.01144*	0.00435	0.02	-0.0208	-0.0021
NP_BPS_1%PEG_after	NP_BPS	0.00878	0.0051	0.107	-0.0022	0.0197
	NP_BPS_0.01%PEG_after	0.001	0.00652	0.88	-0.013	0.015
	NP_s_1%PEG_AT	-0.0105	0.00652	0.129	-0.0245	0.0035
	NP_BPS_0.01%_PEG_sim	-0.001	0.00652	0.88	-0.015	0.013
	GOx	-0.00267	0.00595	0.661	-0.0154	0.0101
NP_BPS_0.01%PEG_after	NP_BPS	0.00778	0.0051	0.149	-0.0032	0.0187
	NP_BPS_1%PEG_after	-0.001	0.00652	0.88	-0.015	0.013
	NP_BPS_1%PEG_sim	-0.0115	0.00652	0.099	-0.0255	0.0025
	NP_BPS_0.01%_PEG_sim	-0.002	0.00652	0.763	-0.016	0.012
	GOx	-0.00367	0.00595	0.548	-0.0164	0.0091
NP_BPS_1%PEG_sim	NP_BPS	.01928*	0.0051	0.002	0.0083	0.0302
	NP_BPS_1%PEG_after	0.0105	0.00652	0.129	-0.0035	0.0245
	NP_BPS_0.01%PEG_after	0.0115	0.00652	0.099	-0.0025	0.0255
	NP_BPS_0.01%_PEG_sim	0.0095	0.00652	0.167	-0.0045	0.0235
	GOx	0.00783	0.00595	0.209	-0.0049	0.0206
NP_BPS_0.01%_PEG_sim	NP_BPS	0.00978	0.0051	0.076	-0.0012	0.0207
	NP_BPS_1%PEG_after	0.001	0.00652	0.88	-0.013	0.015
	NP_BPS_0.01%PEG_after	0.002	0.00652	0.763	-0.012	0.016
	NP_BPS_1%PEG_sim	-0.0095	0.00652	0.167	-0.0235	0.0045
	GOx	-0.00167	0.00595	0.783	-0.0144	0.0111
GOx	NP_BPS	.01144*	0.00435	0.02	0.0021	0.0208
	NP_BPS_1%PEG_after	0.00267	0.00595	0.661	-0.0101	0.0154
	NP_BPS_0.01%PEG_after	0.00367	0.00595	0.548	-0.0091	0.0164
	NP_BPS_1%PEG_sim	-0.00783	0.00595	0.209	-0.0206	0.0049
	NP_BPS_0.01%_PEG_sim	0.00167	0.00595	0.783	-0.0111	0.0144

k_{cat}/K_m BPS & PEG		Average difference (I-J)	Error	Sig.	Confidence interval 95%	
(I) Sample	(J) Sample				Limit inferior	Limit superior
NP_BPS-GOx	NP_BPS_1%PEG_after	36.16667	75.66153	0.997	-1481.1993	1553.5327
	NP_BPS_0.01%PEG_after	39.66667	59.10513	0.984	-899.8772	979.2105
	NP_BPS_1%PEG_sim	103.66667	21.73515	0.011	24.4642	182.8692
	NP_BPS_0.01%_PEG_sim	95.66667	21.73515	0.018	16.4642	174.8692
NP_BPS_1%PEG_after	NP_BPS_GOx	-36.16667	75.66153	0.997	-1553.5327	1481.1993
	NP_BPS_0.01%PEG_after	3.5	91.00137	1	-847.406	854.406
	NP_s_1%PEG_AT	67.5	72.52758	0.927	-2098.8556	2233.8556
	NP_BPS_0.01%_PEG_sim	59.5	72.52758	0.953	-2106.8556	2225.8556
NP_BPS_0.01%PEG_after	NP_BPS_GOx	-39.66667	59.10513	0.984	-979.2105	899.8772
	NP_BPS_1%PEG_after	-3.5	91.00137	1	-854.406	847.406
	NP_BPS_1%PEG_sim	64	55.03635	0.863	-1575.1269	1703.1269
	NP_BPS_0.01%_PEG_sim	56	55.03635	0.904	-1583.1269	1695.1269
NP_BPS_1%PEG_sim	NP_BPS_GOx	-103.66667	21.73515	0.011	-182.8692	-24.4642
	NP_BPS_1%PEG_after	-67.5	72.52758	0.927	-2233.8556	2098.8556
	NP_BPS_0.01%PEG_after	-64	55.03635	0.863	-1703.1269	1575.1269
	NP_BPS_0.01%_PEG_sim	-8	2.82843	0.358	-32.2473	16.2473
NP_BPS_0.01%_PEG_sim	NP_BPS_GOx	-95.66667	21.73515	0.018	-174.8692	-16.4642
	NP_BPS_1%PEG_after	-59.5	72.52758	0.953	-2225.8556	2106.8556
	NP_BPS_0.01%PEG_after	-56	55.03635	0.904	-1695.1269	1583.1269
	NP_BPS_1%PEG_sim	8	2.82843	0.358	-16.2473	32.2473

Apéndice

K_m		Glucose				
(I) Sample	(J) Sample	Average difference (I-J)	Error	Sig.	Confidence interval 95%	
					Limit inferior	Limit superior
NP_citrate_GOx	NP_citrate_glucose_GOx	0.00144	0.00273	0.599	-0.0041	0.0069
	NP_BPS_GOx	0.00111	0.00273	0.686	-0.0044	0.0066
	NP_BPS_glucose_GOx	0.00521	0.00282	0.072	-0.0005	0.0109
	NP_BPS_PEG_GOx	-0.00707*	0.00329	0.037	-0.0137	-0.0004
	NP_BPS_PEG_glucose_GOx	-0.01167*	0.00357	0.002	-0.0189	-0.0045
	GOx	-0.01033*	0.00399	0.013	-0.0184	-0.0023
NP_citrate_glucose_GOx	NP_citrate_GOx	-0.00144	0.00273	0.599	-0.0069	0.0041
	NP_BPS_GOx	-0.00033	0.00291	0.909	-0.0062	0.0055
	NP_BPS_glucose_GOx	0.00376	0.003	0.217	-0.0023	0.0098
	NP_BPS_PEG_GOx	-0.00851*	0.00345	0.018	-0.0155	-0.0016
	NP_BPS_PEG_glucose_GOx	-0.01311*	0.00372	0.001	-0.0206	-0.0056
	GOx	-0.01178*	0.00412	0.007	-0.0201	-0.0035
NP_BPS_GOx	NP_citrate_GOx	-0.00111	0.00273	0.686	-0.0066	0.0044
	NP_citrate_glucose_GOx	0.00033	0.00291	0.909	-0.0055	0.0062
	NP_BPS_glucose_GOx	0.0041	0.003	0.18	-0.002	0.0102
	NP_BPS_PEG_GOx	-0.00818*	0.00345	0.022	-0.0151	-0.0012
	NP_BPS_PEG_glucose_GOx	-0.01278*	0.00372	0.001	-0.0203	-0.0053
	GOx	-0.01144*	0.00412	0.008	-0.0198	-0.0031
NP_BPS_glucose_GOx	NP_citrate_GOx	-0.00521	0.00282	0.072	-0.0109	0.0005
	NP_citrate_glucose_GOx	-0.00376	0.003	0.217	-0.0098	0.0023
	NP_BPS_GOx	-0.0041	0.003	0.18	-0.0102	0.002
	NP_BPS_PEG_GOx	-0.01227*	0.00352	0.001	-0.0194	-0.0052
	NP_BPS_PEG_glucose_GOx	-0.01687*	0.00379	0	-0.0245	-0.0092
	GOx	-0.01554*	0.00419	0.001	-0.024	-0.0071
NP_BPS_PEG_GOx	NP_citrate_GOx	.00707*	0.00329	0.037	0.0004	0.0137
	NP_citrate_glucose_GOx	.00851*	0.00345	0.018	0.0016	0.0155
	NP_BPS_GOx	.00818*	0.00345	0.022	0.0012	0.0151
	NP_BPS_glucose_GOx	.01227*	0.00352	0.001	0.0052	0.0194
	NP_BPS_PEG_glucose_GOx	-0.0046	0.00415	0.274	-0.013	0.0038
	GOx	-0.00327	0.00452	0.473	-0.0124	0.0058
NP_BPS_PEG_glucose_GOx	NP_citrate_GOx	.01167*	0.00357	0.002	0.0045	0.0189
	NP_citrate_glucose_GOx	.01311*	0.00372	0.001	0.0056	0.0206
	NP_BPS_GOx	.01278*	0.00372	0.001	0.0053	0.0203
	NP_BPS_glucose_GOx	.01687*	0.00379	0	0.0092	0.0245
	NP_BPS_PEG_GOx	0.0046	0.00415	0.274	-0.0038	0.013
	GOx	0.00133	0.00472	0.779	-0.0082	0.0109
GOx	NP_citrate_GOx	.01033*	0.00399	0.013	0.0023	0.0184
	NP_citrate_glucose_GOx	.01178*	0.00412	0.007	0.0035	0.0201
	NP_BPS_GOx	.01144*	0.00412	0.008	0.0031	0.0198
	NP_BPS_glucose_GOx	.01554*	0.00419	0.001	0.0071	0.024
	NP_BPS_PEG_GOx	0.00327	0.00452	0.473	-0.0058	0.0124
	NP_BPS_PEG_glucose_GOx	-0.00133	0.00472	0.779	-0.0109	0.0082

k_{cat}/K_m Glucose		Average difference (I-J)	Error	Sig.	Confidence interval 95%	
(I) Sample	(J) Sample				Limit inferior	Limit superior
NPs	NP_citrate_glucose_GOx	-16.38889	34.04967	1	-128.836	96.0582
	NP_BPS_GOx	-4.83333	33.40031	1	-115.1127	105.446
	NP_BPS_glucose_GOx	46.16667	33.78573	0.914	-69.0221	161.3554
	NP_BPS_PEG_GOx	-30.96667	43.16832	0.999	-196.0872	134.1539
	NP_BPS_PEG_glucose_GOx	-80.16667	49.17992	0.765	-299.4902	139.1568
NPs_glucose	NP_citrate_GOx	16.38889	34.04967	1	-96.0582	128.836
	NP_BPS_GOx	11.55556	31.31506	1	-94.2181	117.3293
	NP_BPS_glucose_GOx	62.55556	31.72581	0.562	-49.075	174.1861
	NP_BPS_PEG_GOx	-14.57778	41.57591	1	-179.949	150.7934
	NP_BPS_PEG_glucose_GOx	-63.77778	47.78824	0.893	-287.5636	160.0081
BPS	NP_citrate_GOx	4.83333	33.40031	1	-105.446	115.1127
	NP_citrate_glucose_GOx	-11.55556	31.31506	1	-117.3293	94.2181
	NP_BPS_glucose_GOx	51	31.02785	0.771	-58.5989	160.5989
	NP_BPS_PEG_GOx	-26.13333	41.04579	1	-191.3292	139.0626
	NP_BPS_PEG_glucose_GOx	-75.33333	47.32776	0.782	-300.5658	149.8991
BPS_glucose	NP_citrate_GOx	-46.16667	33.78573	0.914	-161.3554	69.0221
	NP_citrate_glucose_GOx	-62.55556	31.72581	0.562	-174.1861	49.075
	NP_BPS_GOx	-51	31.02785	0.771	-160.5989	58.5989
	NP_BPS_PEG_GOx	-77.13333	41.36002	0.639	-244.773	90.5063
	NP_BPS_PEG_glucose_GOx	-126.33333	47.60054	0.324	-352.5111	99.8444
BPS_PEG	NP_citrate_GOx	30.96667	43.16832	0.999	-134.1539	196.0872
	NP_citrate_glucose_GOx	14.57778	41.57591	1	-150.7934	179.949
	NP_BPS_GOx	26.13333	41.04579	1	-139.0626	191.3292
	NP_BPS_glucose_GOx	77.13333	41.36002	0.639	-90.5063	244.773
	NP_BPS_PEG_glucose_GOx	-49.2	54.66114	0.992	-278.6631	180.2631
BPS_PEG_glucose	NP_citrate_GOx	80.16667	49.17992	0.765	-139.1568	299.4902
	NPs_citrate_glucose_GOx	63.77778	47.78824	0.893	-160.0081	287.5636
	NP_BPS_GOx	75.33333	47.32776	0.782	-149.8991	300.5658
	NP_BPS_glucose_GOx	126.33333	47.60054	0.324	-99.8444	352.5111
	NP_BPS_PEG_GOx	49.2	54.66114	0.992	-180.2631	278.6631

Apéndice

K_m	MCH	Average difference (I-J)	Error	Sig.	Confidence interval 95%	
					Limit inferior	Limit superior
(I) Sample	(J) Sample					
NP_citrate_GOx	NP_citrate_GOx_MCH	.00933*	0.00317	0.005	0.003	0.0157
	NP_citrate_glucose_GOx	0.00144	0.00242	0.553	-0.0034	0.0063
	NP_citrate_glucose_GOx_MCH	.01183*	0.00419	0.007	0.0034	0.0203
	NP_BPS_GOx	0.00111	0.00242	0.648	-0.0038	0.006
	NP_BPS_GOx_MCH	.01153*	0.00292	0	0.0057	0.0174
	NP_BPS_glucose_GOx	.00521*	0.0025	0.043	0.0002	0.0102
	NP_BPS_glucose_GOx_MCH	.01333*	0.00354	0	0.0062	0.0205
	GOx	-.01033*	0.00354	0.005	-0.0175	-0.0032
NP_citrate_GOx_MCH	NP_citrate_GOx	-.00933*	0.00317	0.005	-0.0157	-0.003
	NP_citrate_glucose_GOx	-.00789*	0.0033	0.021	-0.0145	-0.0013
	NP_citrate_glucose_GOx_MCH	0.0025	0.00475	0.601	-0.0071	0.0121
	NP_BPS_GOx	-.00822*	0.0033	0.016	-0.0149	-0.0016
	NP_BPS_GOx_MCH	0.0022	0.00368	0.553	-0.0052	0.0096
	NP_BPS_glucose_GOx	-0.00413	0.00336	0.226	-0.0109	0.0026
	NP_BPS_glucose_GOx_MCH	0.004	0.00419	0.345	-0.0044	0.0124
	GOx	-.01967*	0.00419	0	-0.0281	-0.0112
NP_citrate_glucose_GOx	NP_citrate_GOx	-0.00144	0.00242	0.553	-0.0063	0.0034
	NP_citrate_GOx_MCH	.00789*	0.0033	0.021	0.0013	0.0145
	NP_citrate_glucose_GOx_MCH	.01039*	0.00429	0.019	0.0018	0.019
	NP_BPS_GOx	-0.00033	0.00259	0.898	-0.0055	0.0049
	NP_BPS_GOx_MCH	.01009*	0.00306	0.002	0.0039	0.0162
	NP_BPS_glucose_GOx	0.00376	0.00267	0.165	-0.0016	0.0091
	NP_BPS_glucose_GOx_MCH	.01189*	0.00366	0.002	0.0045	0.0192
	GOx	-.01178*	0.00366	0.002	-0.0191	-0.0044
NP_citrate_glucose_GOx_MCH	NP_citrate_GOx	-.01183*	0.00419	0.007	-0.0203	-0.0034
	NPs_MCH	-0.0025	0.00475	0.601	-0.0121	0.0071
	NP_citrate_glucose_GOx	-.01039*	0.00429	0.019	-0.019	-0.0018
	NP_BPS_GOx	-.01072*	0.00429	0.016	-0.0194	-0.0021
	NP_BPS_GOx_MCH	-0.0003	0.00459	0.948	-0.0095	0.0089
	NP_BPS_glucose_GOx	-0.00663	0.00434	0.133	-0.0154	0.0021
	NP_BPS_glucose_GOx_MCH	0.0015	0.00501	0.766	-0.0086	0.0116
	GOx	-.02217*	0.00501	0	-0.0322	-0.0121
NP_BPS_GOx	NP_citrate_GOx	-0.00111	0.00242	0.648	-0.006	0.0038
	NP_citrate_GOx_MCH	.00822*	0.0033	0.016	0.0016	0.0149
	NP_citrate_glucose_GOx	0.00033	0.00259	0.898	-0.0049	0.0055
	NP_citrate_glucose_GOx_MCH	.01072*	0.00429	0.016	0.0021	0.0194
	NP_BPS_GOx_MCH	.01042*	0.00306	0.001	0.0043	0.0166
	NP_BPS_glucose_GOx	0.0041	0.00267	0.131	-0.0013	0.0095
	NP_BPS_glucose_GOx_MCH	.01222*	0.00366	0.002	0.0049	0.0196
	GOx	-.01144*	0.00366	0.003	-0.0188	-0.0041
NP_BPS_GOx_MCH	NP_citrate_GOx	-.01153*	0.00292	0	-0.0174	-0.0057
	NP_citrate_GOx_MCH	-0.0022	0.00368	0.553	-0.0096	0.0052
	NP_citrate_glucose_GOx	-.01009*	0.00306	0.002	-0.0162	-0.0039
	NP_citrate_glucose_GOx_MCH	0.0003	0.00459	0.948	-0.0089	0.0095
	NP_BPS_GOx	-.01042*	0.00306	0.001	-0.0166	-0.0043
	NP_BPS_glucose_GOx	-.00633*	0.00313	0.049	-0.0126	0
	NP_BPS_glucose_GOx_MCH	0.0018	0.00401	0.655	-0.0063	0.0099
	GOx	-.02187*	0.00401	0	-0.0299	-0.0138
NP_BPS_glucose_GOx	NP_citrate_GOx	-.00521*	0.0025	0.043	-0.0102	-0.0002
	NP_citrate_GOx_MCH	0.00413	0.00336	0.226	-0.0026	0.0109
	NP_citrate_glucose_GOx	-0.00376	0.00267	0.165	-0.0091	0.0016
	NP_citrate_glucose_GOx_MCH	0.00663	0.00434	0.133	-0.0021	0.0154
	NP_BPS_GOx	-0.0041	0.00267	0.131	-0.0095	0.0013
	NP_BPS_GOx_MCH	.00633*	0.00313	0.049	0	0.0126
	NP_BPS_glucose_GOx_MCH	.00813*	0.00371	0.034	0.0007	0.0156
	GOx	-.01554*	0.00371	0	-0.023	-0.0081
NP_BPS_glucose_GOx_MCH	NP_citrate_GOx	-.01333*	0.00354	0	-0.0205	-0.0062
	NP_citrate_GOx_MCH	-0.004	0.00419	0.345	-0.0124	0.0044
	NP_citrate_glucose_GOx	-.01189*	0.00366	0.002	-0.0192	-0.0045
	NP_citrate_glucose_GOx_MCH	-0.0015	0.00501	0.766	-0.0116	0.0086
	NP_BPS_GOx	-.01222*	0.00366	0.002	-0.0196	-0.0049
	NP_BPS_GOx_MCH	-0.0018	0.00401	0.655	-0.0099	0.0063
	NP_BPS_glucose_GOx	-.00813*	0.00371	0.034	-0.0156	-0.0007
	GOx	-.02367*	0.00448	0	-0.0327	-0.0147
GOx	NP_citrate_GOx	.01033*	0.00354	0.005	0.0032	0.0175
	NP_citrate_GOx_MCH	.01967*	0.00419	0	0.0112	0.0281
	NP_citrate_glucose_GOx	.01178*	0.00366	0.002	0.0044	0.0191
	NP_citrate_glucose_GOx_MCH	.02217*	0.00501	0	0.0121	0.0322
	NP_BPS_GOx	.01144*	0.00366	0.003	0.0041	0.0188
	NP_BPS_GOx_MCH	.02187*	0.00401	0	0.0138	0.0299
	NP_BPS_glucose_GOx	.01554*	0.00371	0	0.0081	0.023
	NP_BPS_glucose_GOx_MCH	.02367*	0.00448	0	0.0147	0.0327

PUBLICACIONES CIENTÍFICAS

- Edurne Tellechea, Aaron C. Asensio, and José F. Moran, **Gold nanoparticle-super oxide dismutase complexes: the effect of nanoparticle ligand on protein function**. En preparación.
- Edurne Tellechea, Aaron C. Asensio, and José F. Moran, **casein LSPR inmunosensor**. En preparación.
- Paula Ciaurriz, Fátima Fernández, Edurne Tellechea, Jose F. Moran and Aaron C. Asensio, **Comparison of four functionalization methods of gold nanoparticles for enhancing the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)**, Beilstein Journal of Nanotechnology, (2017) 244-253.
- Fátima Fernández, Óscar García López, Edurne Tellechea, Aaron C. Asensio and Iñaki Cornago, **Regenerable plasmonic biosensor based on gold nanolines pattern and common laboratory spectrophotometer**, IEEE Transactions on Nanotechnology, (2016) 308 – 315.
- Fátima Fernández, Óscar García López, Edurne Tellechea, Aaron C. Asensio and Iñaki Cornago, **Regenerable plasmonic biosensor based on gold nanolines pattern and common laboratory spectrophotometer**, IEEE Transactions on Nanotechnology, (2014) 308 – 315.
- Estibaliz Urarte, Aaron C. Asensio, Edurne Tellechea, Laura Pires and José F. Moran. **Evaluation of the anti-nitrative effect of plant antioxidants using a cowpea Fe-superoxide dismutase as a target**. Plant Physiol Biochem (2014) 356-364.
- Edurne Tellechea, Kenneth J. Wilson, Ernesto Bravo and Kimberly Hamad-Schifferli, **Engineering the Interface between Glucose Oxidase and Nanoparticles**, Langmuir, 28, (2012), 5190-5200.
- Edurne Tellechea, Iñaki Cornago, Paula Ciaurriz, Jose F. Moran, and Aaron C. Asensio, **Conjugation of Active Iron Superoxide Dismutase to Nanopatterned Surface**, IEEE Transactions on Nanobioscience 2 (2012) 176-180.
- F. Violante-Mota, Edurne Tellechea, J. F. Moran, G. Sarath, R. Arredondo-Peter, **Analysis of peroxidase activity of rice (*Oryza sativa*) recombinant hemoglobin 1: Implications for in vivo function of hexacoordinate non-symbiotic hemoglobins**, Phytochemistry, 71 (2010) 21-26.

CONTRIBUCIONES A CONGRESOS CIENTÍFICOS

PRESENTACIONES ORALES

ENGINEERING THE INTERFACE BETWEEN PROTEIN AND NANOPARTICLES.
E. Tellechea, P.Ciaurriz, F.Fernandez, K. Hamad-Shifferli, J.F. Moran y A.C. Asensio
 19th International Symposium on MICROENCAPSULATION, Pamplona, 2013.

SUPEROXIDE DISMUTASE CONJUGATES TO AU-NANOPARTICLES AND NANOPATTERN SURFACE: CHARACTERIZATION AND DETECTION OF ENZYMATIC ACTIVITY. E. Tellechea, L. Olangua, A.C. Asensio, G. Arzamendi, I. Cornago, R.J. Ortega, L.M. Gandía, J.F. Moran; *BioSpain 2010, Pamplona, 2010.*

BIBLIOGRAFÍA

- Abràmoff, Michael D, Paulo J Magalhães, and Sunanda J Ram. 2004. "Image Processing with ImageJ." *Biophotonics International* 11 (7): 36–42.
- Abreu, Isabel A., and Diane E. Cabelli. 2010. "Superoxide Dismutases-a Review of the Metal-Associated Mechanistic Variations." *Biochimica et Biophysica Acta* 1804 (2): 263–74.
- Acimovic, Srdjan. 2012. "Localized Surface Plasmon Resonance for Biosensing Lab-on-a-Chip Applications." Universitat Politècnica de Catalunya.
- Afseth, J., and G. Rølla. 1983. "Clinical Experiments with a Toothpaste Containing Amyloglucosidase and Glucose Oxidase." *Caries Research* 17 (5): 472–75.
- Ahmad, Atta, Md Sohail Akhtar, and Vinod Bhakuni. 2001. "Monovalent Cation-Induced Conformational Change in Glucose Oxidase Leading to Stabilization of the Enzyme†." *Biochemistry* 40 (7): 1945–55.
- Ameer, Fathima S., Siyam M. Ansar, Wenfang Hu, Shengli Zou, and Dongmao Zhang. 2012. "Inner Filter Effect on Surface Enhanced Raman Spectroscopic Measurement." *Analytical Chemistry* 84 (20): 8437–41.
- Andrade, M. A., P. Chacon, J. J. Merelo, and F. Moran. 1993. "Evaluation of Secondary Structure of Proteins from UV Circular Dichroism Spectra Using an Unsupervised Learning Neural Network." *Protein Engineering* 6 (4): 383–90.
- Arredondo-Peter, R., M. S. Hargrove, G. Sarath, J. F. Moran, J. Lohrman, J. S. Olson, and R. V. Klucas. 1997. "Rice Hemoglobins (Gene Cloning, Analysis, and O₂-Binding Kinetics of a Recombinant Protein Synthesized in Escherichia Coli)." *Plant Physiology* 115 (3): 1259–66.
- Asensio, Aaron C., Miriam Gil-Monreal, Laura Pires, Yolanda Gogorcena, Pedro Maria Aparicio-Tejo, and Jose Fernando Moran. 2012. "Two Fe-Superoxide Dismutase Families Respond Differently to Stress and Senescence in Legumes." *Journal of Plant Physiology* 169 (13): 1253–60.
- Ashley, J., M. Piekarska, C. Segers, L. Trinh, T. Rodgers, R. Willey, and I. E. Tothill. 2017. "An {SPR} Based Sensor for Allergens Detection." *Biosensors and Bioelectronics* 88: 109–13.
- Asuri, Prashanth, Sandeep S. Karajanagi, Alexey A. Vertegel, Jonathan S. Dordick, and Ravi S. Kane. 2007. "Enhanced Stability of Enzymes Adsorbed onto Nanoparticles." *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 7 (4–1): 1675–78.
- Aubin-Tam, Marie-Eve, and Kimberly Hamad-Schifferli. 2005. "Gold Nanoparticle–Cytochrome c Complexes: The Effect of Nanoparticle Ligand Charge on Protein Structure." *Langmuir* 21 (26): 12080–84. doi:10.1021/la052102e.
- Aubin-Tam, Marie-Eve, and Kimberly Hamad-Schifferli. 2008. "Structure and Function of Nanoparticle–protein Conjugates." *Biomedical Materials* 3 (3): 034001.
- Aubin-Tam, Marie-Eve, Wonmuk Hwang, and Kimberly Hamad-Schifferli. 2009. "Site-Directed Nanoparticle Labeling of Cytochrome c." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (11): 4095–4100.

- Bailes, Julian, Sara Gazi, Rositsa Ivanova, and Mikhail Soloviev. 2012. "Effect of Gold Nanoparticle Conjugation on the Activity and Stability of Functional Proteins." *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 906: 89–99.
- Baniukevic, Julija, Justina Kirlyte, Arunas Ramanavicius, and Almira Ramanaviciene. 2013. "Application of Oriented and Random Antibody Immobilization Methods in Immunosensor Design." *Sensors and Actuators B: Chemical* 189: 217–23.
- Bankar, Sandip B., Mahesh V. Bule, Rekha S. Singhal, and Laxmi Ananthanarayan. 2009. "Glucose Oxidase—an Overview." *Biotechnology Advances* 27 (4): 489–501.
- Barondeau, David P., Carey J. Kassmann, Cami K. Bruns, John A. Tainer, and Elizabeth D. Getzoff. 2004. "Nickel Superoxide Dismutase Structure and Mechanism." *Biochemistry* 43 (25): 8038–47.
- Barrientos, África G., Jesús M. de la Fuente, Teresa C. Rojas, Asunción Fernández, and Soledad Penadés. 2003. "Gold Glyconanoparticles: Synthetic Polyvalent Ligands Mimicking Glycocalyx-Like Surfaces as Tools for Glycobiological Studies." *Chemistry—A European Journal* 9 (9): 1909–21.
- Bastús, Neus G., Joan Comenge, and Víctor Puntès. 2011. "Kinetically Controlled Seeded Growth Synthesis of Citrate-Stabilized Gold Nanoparticles of up to 200 Nm: Size Focusing versus Ostwald Ripening." *Langmuir* 27 (17): 11098.
- Bayraktar, Halil, Chang-Cheng You, Vincent M. Rotello, and Michael J. Knapp. 2007. "Facial Control of Nanoparticle Binding to Cytochrome c." *Journal of the American Chemical Society* 129 (10): 2732–33.
- Beauchamp, C., and I. Fridovich. 1971. "Superoxide Dismutase: Improved Assays and an Assay Applicable to Acrylamide Gels." *Analytical Biochemistry* 44 (1): 276–87.
- Beesley, Julian E. 1989. *Colloidal Gold : A New Perspective for Cytochemical Marking*. Oxford [England]; New York; Oxford [England]: Oxford University Press ; Royal Microscopical Society.
- Bickerstaff, Gordon F. 1997. "Characterization of Enzyme Activity, Protein Content, and Thiol Groups in Immobilized Enzymes." *Immobilization of Enzymes and Cells*, 253–59.
- Brennan, Jennifer L., Nikos S. Hatzakis, T. Robert Tshikhudo, Valdemaras Razumas, Shamkant Patkar, Jesper Vind, Allan Svendsen, Roeland J. M. Nolte, Alan E. Rowan, and Mathias Brust. 2006. "Bionanoconjugation via Click Chemistry: The Creation of Functional Hybrids of Lipases and Gold Nanoparticles." *Bioconjugate Chemistry* 17 (6): 1373–75.
- Brewer, Scott H., Wilhelm R. Glomm, Marcus C. Johnson, Magne K. Knag, and Stefan Franzen. 2005. "Probing BSA Binding to Citrate-Coated Gold Nanoparticles and Surfaces." *Langmuir* 21 (20): 9303–7.
- Briand, Elisabeth, Michele Salmain, Jean-Marie Herry, Hubert Perrot, Chantal Compere, and Claire-Marie Pradier. 2006. "Building of an Immunosensor: How Can the Composition and Structure of the Thiol Attachment Layer Affect the Immunosensor Efficiency?" *Biosensors & Bioelectronics* 22 (3): 440–48.
- Bright, Harold J., and Maryanne Appleby. 1969. "The pH Dependence of the Individual Steps in the Glucose Oxidase Reaction." *Journal of Biological Chemistry* 244 (13): 3625–34.
- Brolo, Alexandre G., Reuven Gordon, Brian Leathem, and Karen L. Kavanagh. 2004a. "Surface Plasmon Sensor Based on the Enhanced Light Transmission through Arrays of Nanoholes in Gold Films." *Langmuir* 20 (12): 4813–15.
- Brolo, Alexandre G., Reuven Gordon, Brian Leathem, and Karen L. Kavanagh. 2004b. "Surface Plasmon Sensor Based on the Enhanced Light Transmission through Arrays of Nanoholes in Gold Films." *Langmuir* 20 (12): 4813–15.

- Brown, Katherine Alice. 2008. "Noncovalent Adsorption of Nucleotides in Gold Nanoparticle DNA Conjugates: Bioavailability at the Bio-Nano Interface." Biological Engineering Division, Massachusetts Institute of Technology.
- Brust, Mathias, Merryl Walker, Donald Bethell, David J. Schiffrin, and Robin Whyman. 1994. "Synthesis of Thiol-Derivatized Gold Nanoparticles in a Two-Phase Liquid-Liquid System." *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, no. 7: 801–2.
- Cady, Walter G. 1946. *Piezoelectricity; an Introduction to the Theory and Applications of Electromechanical Phenomena in Crystals*. New York; London: McGraw-Hill Book Company, Inc.
- Callewaert, F., S. Chen, S. Butun, and K. Aydin. 2016. "Narrow Band Absorber Based on a Dielectric Nanodisk Array on Silver Film." *Journal of Optics* 18 (7): 075006.
- Calzolari, Luigi, Fabio Franchini, Douglas Gilliland, and François Rossi. 2010. "Protein– Nanoparticle Interaction: Identification of the Ubiquitin– Gold Nanoparticle Interaction Site." *Nano Letters* 10 (8): 3101–5.
- Carrascosa, Laura G., M. Moreno, Mar Álvarez, and Laura M. Lechuga. 2006. "Nanomechanical Biosensors: A New Sensing Tool." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 25 (3): 196–206.
- Caves, Michael S., Barry K. Derham, Jan Jezek, and Robert B. Freedman. 2011. "The Mechanism of Inactivation of Glucose Oxidase from *Penicillium Amagasakiense* under Ambient Storage Conditions." *Enzyme and Microbial Technology* 49 (1): 79–87.
- Chah, Soonwoo, Matthew R. Hammond, and Richard N. Zare. 2005. "Gold Nanoparticles as a Colorimetric Sensor for Protein Conformational Changes." *Chemistry & Biology* 12 (3): 323–28.
- Cheung-Lau, Jasmina C., Dage Liu, Katherine W. Pulsipher, Weiren Liu, and Ivan J. Dmochowski. 2014. "Engineering a Well-Ordered, Functional Protein-Gold Nanoparticle Assembly." *Journal of Inorganic Biochemistry* 130: 59–68.
- Choi, Dong Hwan, Seok Ki Lee, Young Kyoung Oh, Byeong Woo Bae, Sung Dong Lee, Sanghyo Kim, Yong-Beom Shin, and Min-Gon Kim. 2010. "A Dual Gold Nanoparticle Conjugate-Based Lateral Flow Assay (LFA) Method for the Analysis of Troponin I." *Biosensors and Bioelectronics* 25 (8): 1999–2002.
- Chudobová, Ivana, Eva Vrbová, Milan Kodíček, Jitka Janovcová, and Jan Káš. 1996. "Fibre Optic Biosensor for the Determination of D-Glucose Based on Absorption Changes of Immobilized Glucose Oxidase." *Analytica Chimica Acta* 319 (1–2): 103–10.
- Ciaurriz, Paula, Fátima Fernández, Edurne Tellechea, Jose F. Moran, and Aaron C. Asensio. 2017. "Comparison of Four Functionalization Methods of Gold Nanoparticles for Enhancing the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)." *Beilstein Journal of Nanotechnology* 8: 244.
- Clark, Leland C., and Champ Lyons. 1962. "Electrode Systems for Continuous Monitoring in Cardiovascular Surgery." *Annals of the New York Academy of Sciences* 102 (1): 29–45.
- Collister, John P, Cristina Hartnett, Tim Mayerhofer, David Nahey, Christopher Stauthammer, Maxie Krüger, Anthony Tobias, et al. 2016. "Overexpression of Copper/Zinc Superoxide Dismutase in the Median Preoptic Nucleus Improves Cardiac Function after Myocardial Infarction in the Rat." *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 43 (10): 960–66.
- Cooney, M. J., V. Svoboda, C. Lau, G. Martin, and Shelley D. Minter. 2008. "Enzyme Catalysed Biofuel Cells." *Energy & Environmental Science* 1 (3): 320–37.
- Cornago Santos, Ignacio. 2015. "Desarrollo de Nuevos Procesos de Fabricación de Nanoestructuras Para Aplicaciones Ópticas Avanzadas Basados En Litografía Por Interferencia Láser."
- Cox, W. Gregory, and Victoria L. Singer. 2004. "Fluorescent DNA Hybridization Probe Preparation Using Amine Modification and Reactive Dye Coupling." *BioTechniques* 36 (1): 114–22.

- Daniel, Marie-Christine, and Didier Astruc. 2004. "Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology." *Chemical Reviews* 104 (1): 293–346.
- De Kruif, C. G., and C. Holt. 2003. "Casein Micelle Structure, Functions and Interactions." In *Advanced Dairy Chemistry—1 Proteins*, 233–76. Springer.
- Deng, Zhou J., Mingtao Liang, Michael Monteiro, Istvan Toth, and Rodney F. Minchin. 2011. "Nanoparticle-Induced Unfolding of Fibrinogen Promotes Mac-1 Receptor Activation and Inflammation." *Nature Nanotechnology* 6 (1): 39–44.
- Deng, Zifeng, Yang Tian, Xia Yin, Qi Rui, Haiqing Liu, and Yongping Luo. 2008. "Physical Vapor Deposited Zinc Oxide Nanoparticles for Direct Electron Transfer of Superoxide Dismutase." *Electrochemistry Communications* 10 (5): 818–20.
- Domínguez, S., O. García, M. Ezquer, M. J. Rodríguez, A. R. Lagunas, J. Pérez-Conde, and J. Bravo. 2012. "Optimization of 1D Photonic Crystals to Minimize the Reflectance of Silicon Solar Cells." *Photonics and Nanostructures - Fundamentals and Applications* 10 (1): 46–53.
- Dutra, Rosa Fireman, and Lauro Tatsuo Kubota. 2007. "An SPR Immunosensor for Human Cardiac Troponin T Using Specific Binding Avidin to Biotin at Carboxymethyl-dextran-Modified Gold Chip." *Clinica Chimica Acta* 376 (1): 114–20.
- Edwards, R. A., M. M. Whittaker, J. W. Whittaker, E. N. Baker, and G. B. Jameson. 2001. "Removing a Hydrogen Bond in the Dimer Interface of Escherichia Coli Manganese Superoxide Dismutase Alters Structure and Reactivity." *Biochemistry* 40 (15): 4622–32.
- El-Deab, Mohamed S., and Takeo Ohsaka. 2007. "Direct Electron Transfer of Copper–zinc Superoxide Dismutase (SOD) on Crystallographically Oriented Au Nanoparticles." *Electrochemistry Communications* 9 (4): 651–56.
- Elzoghby, Ahmed O., Ayman L. Hemasa, and May S. Freag. 2016. "Hybrid Protein-Inorganic Nanoparticles: From Tumor-Targeted Drug Delivery to Cancer Imaging." *Journal of Controlled Release* 243: 303–22.
- Englebienne, Patrick. 1998. "Use of Colloidal Gold Surface Plasmon Resonance Peak Shift to Infer Affinity Constants from the Interactions between Protein Antigens and Antibodies Specific for Single or Multiple Epitopes." *Analyst* 123 (7): 1599–1603.
- Estephan, Zaki G., Jad A. Jaber, and Joseph B. Schlenoff. 2010. "Zwitterion-Stabilized Silica Nanoparticles: Toward Nonstick Nano." *Langmuir* 26 (22): 16884–89.
- Estephan, Zaki G., Philip S. Schlenoff, and Joseph B. Schlenoff. 2011. "Zwitteration as an Alternative to PEGylation." *Langmuir* 27 (11): 6794–6800.
- F. Fernández, Ó García-López, E. Tellechea, A. C. Asensio, and I. Cornago. 2016. "LSPR Cuvette for Real-Time Biosensing by Using a Common Spectrophotometer." *IEEE Sensors Journal* 16 (11): 4158–65. doi:10.1109/JSEN.2016.2544953.
- F, MORAN ;Jose, ZHAOHUI SUN, SARATH;Gautam, ARREDONDO-PETER;Raul, JAMES;Euan K, BECANO;Manuel, and KLUCAO;Robert V. 2002. *Molecular cloning, functional characterization, and subcellular localization of soybean nodule dihydrolipoamide reductase*. Vol. 128. Plant physiology. Rockville, MD, ETATS-UNIS: American Society of Plant Biologists.
- Fan, Xudong, Ian M. White, Siyka I. Shopova, Hongying Zhu, Jonathan D. Suter, and Yuze Sun. 2008. "Sensitive Optical Biosensors for Unlabeled Targets: A Review." *Analytica Chimica Acta* 620 (1): 8–26.
- Farrell, H. M., E. L. Malin, E. M. Brown, and P. X. Qi. 2006. "Casein Micelle Structure: What Can Be Learned from Milk Synthesis and Structural Biology?" *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 11 (2): 135–47.

- Fenoglio, Ivana, Bice Fubini, Elena M. Ghibaudi, and Francesco Turci. 2011. "Multiple Aspects of the Interaction of Biomacromolecules with Inorganic Surfaces." *Advanced Drug Delivery Reviews* 63 (13): 1186–1209.
- Fernandez, Fatima, Oscar Garcia Lopez, Edurne Tellechea, Aaron C. Asensio, Jose F. Moran, and Inaki Cornago. 2014. "Regenerable Plasmonic Biosensor Based on Gold Nanolines Pattern and Common Laboratory Spectrophotometer." *IEEE Trans. Nanotechnol.* 13 (2): 308–315.
- Fernández, Fátima, Francisco Sánchez-Baeza, and M.-Pilar Marco. 2012. "Nanogold Probe Enhanced Surface Plasmon Resonance Immunosensor for Improved Detection of Antibiotic Residues." *Biosensors and Bioelectronics* 34 (1): 151–58.
- Fiocchi, Alessandro, Jan Brozek, Holger Schunemann, Sami L. Bahna, Andrea von Berg, Kirsten Beyer, Martin Bozzola, et al. 2010. "World Allergy Organization (WAO) Diagnosis and Rationale for Action against Cow's Milk Allergy (DRACMA) Guidelines." *Pediatric Allergy and Immunology: Official Publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology* 21 Suppl 21 (July): 1–125.
- Fogarty, William M., and Catherine T. Kelly. 2012. *Microbial Enzymes and Biotechnology*. Springer Science & Business Media.
- Forien, Jean-Baptiste, Ivo Zizak, Claudia Fleck, Ansgar Petersen, Peter Fratzl, Emil Zolotoyabko, and Paul Zaslansky. 2016. "Water-Mediated Collagen and Mineral Nanoparticle Interactions Guide Functional Deformation of Human Tooth Dentin." *Chemistry of Materials* 28 (10): 3416–27. doi:10.1021/acs.chemmater.6b00811.
- Gagner, Jennifer E., Marimar D. Lopez, Jonathan S. Dordick, and Richard W. Siegel. 2011a. "Effect of Gold Nanoparticle Morphology on Adsorbed Protein Structure and Function." *Biomaterials* 32 (29): 7241–52.
- Gagner, Jennifer E., Marimar D. Lopez, Jonathan S. Dordick, and Richard W. Siegel. 2011b. "Effect of Gold Nanoparticle Morphology on Adsorbed Protein Structure and Function." *Biomaterials* 32 (29): 7241–52.
- Gagner, Jennifer E., Xi Qian, Maria M. Lopez, Jonathan S. Dordick, and Richard W. Siegel. 2012. "Effect of Gold Nanoparticle Structure on the Conformation and Function of Adsorbed Proteins." *Biomaterials* 33 (33): 8503–16.
- Ghisaidoobe, Amar B T, and Sang J Chung. 2014. "Intrinsic Tryptophan Fluorescence in the Detection and Analysis of Proteins: A Focus on Förster Resonance Energy Transfer Techniques." Edited by Herbert Schneckenburger. *International Journal of Molecular Sciences* 15 (12): 22518–38.
- Gibson, Quentin H., Bennett EP Swoboda, and Vincent Massey. 1964. "Kinetics and Mechanism of Action of Glucose Oxidase." *Journal of Biological Chemistry* 239 (11): 3927–34.
- Giri, Karuna, Khader Shameer, Michael T. Zimmermann, Sounik Saha, Prabir K. Chakraborty, Anirudh Sharma, Rochelle R. Arvizo, Benjamin J. Madden, Daniel J. McCormick, and Jean-Pierre A. Kocher. 2014. "Understanding Protein–Nanoparticle Interaction: A New Gateway to Disease Therapeutics." *Bioconjugate Chemistry* 25 (6): 1078–90.
- Gole, Anand, and Catherine J. Murphy. 2008. "Azide-Derivatized Gold Nanorods: Functional Materials for 'Click' Chemistry." *Langmuir* 24 (1): 266–72..
- Gouda, M. D., M. A. Kumar, M. S. Thakur, and N. G. Karanth. 2002. "Enhancement of Operational Stability of an Enzyme Biosensor for Glucose and Sucrose Using Protein Based Stabilizing Agents." *Biosensors and Bioelectronics* 17 (6): 503–7.
- Gouda, M. D., M. S. Thakur, and N. G. Karanth. 2001. "Stability Studies on Immobilized Glucose Oxidase Using an Amperometric Biosensor—Effect of Protein Based Stabilizing Agents." *Electroanalysis* 13 (10): 849–55.

- Gouda, Mudeppa Devaraja, Sridevi Annapurna Singh, AG Appu Rao, Munna Singh Thakur, and Naikankatte Ganesh Karanth. 2003. "Thermal Inactivation of Glucose Oxidase Mechanism and Stabilization Using Additives." *Journal of Biological Chemistry* 278 (27): 24324–33.
- Govindhan, Maduraiveeran, Zhonggang Liu, and Aicheng Chen. 2016. "Design and Electrochemical Study of Platinum-Based Nanomaterials for Sensitive Detection of Nitric Oxide in Biomedical Applications." *Nanomaterials* 6 (11).
- Grieshaber, Dorothee, Robert MacKenzie, Janos Voeroes, and Erik Reimhult. 2008. "Electrochemical Biosensors-Sensor Principles and Architectures." *Sensors* 8 (3): 1400–1458.
- GRIFFIN, Mary CA, Richard LJ Lyster, and John C. PRICE. 1988. "The Disaggregation of Calcium-depleted Casein Micelles." *European Journal of Biochemistry* 174 (2): 339–43.
- Guo, Shaojun, and Erkang Wang. 2007. "Synthesis and Electrochemical Applications of Gold Nanoparticles." *Analytica Chimica Acta* 598 (2): 181–92.
- Hainfeld, J. F., and R. D. Powell. 2000. "New Frontiers in Gold Labeling." *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry : Official Journal of the Histochemistry Society* 48 (4): 471–80.
- Hainfeld, James F., Wenqiu Liu, Carol M.R. Halsey, Paul Freimuth, and Richard D. Powell. 1999. "Ni-NTA-Gold Clusters Target His-Tagged Proteins." *Journal of Structural Biology* 127 (2): 185–98..
- Hakkinen, Hannu. 2012. "The Gold-Sulfur Interface at the Nanoscale." *Nat Chem* 4 (6): 443–55. doi:10.1038/nchem.1352.
- Hao, Feng, Yannick Sonnefraud, Pol Van Dorpe, Stefan A. Maier, Naomi J. Halas, and Peter Nordlander. 2008. "Symmetry Breaking in Plasmonic Nanocavities: Subradiant LSPR Sensing and a Tunable Fano Resonance." *Nano Letters* 8 (11): 3983–88.
- Haq, Soghra Khatun, Md Faiz Ahmad, and Rizwan Hasan Khan. 2003. "The Acid-Induced State of Glucose Oxidase Exists as a Compact Folded Intermediate." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 303 (2): 685–92.
- Haynes, Christy L., and Richard P. Van Duyne. 2001. *Nanosphere Lithography: A Versatile Nanofabrication Tool for Studies of Size-Dependent Nanoparticle Optics*. ACS Publications.
- Haza Duaso, Ana Isabel. 2002. *Obtención de Anticuerpos Monoclonales Frente a Las Caseínas de La Leche de Cabra Y Su Utilización En La Diferenciación de Mezclas Lácteas Y Quesos*. Universidad Complutense de Madrid, Servicio de Publicaciones.
- Hecht, H. J., H. M. Kalisz, J. Hendle, R. D. Schmid, and D. Schomburg. 1993. "Crystal Structure of Glucose Oxidase from *Aspergillus Niger* Refined at 2.3 Å Resolution." *Journal of Molecular Biology* 229 (1): 153–72.
- Hecht, H. J., D. Schomburg, H. Kalisz, and R. D. Schmid. 1993. "The 3D Structure of Glucose Oxidase from *Aspergillus Niger*. Implications for the Use of GOD as a Biosensor Enzyme." *Biosensors and Bioelectronics* 8 (3–4): 197–203.
- Hein, Christopher D., Xin-Ming Liu, and Dong Wang. 2008. "Click Chemistry, a Powerful Tool for Pharmaceutical Sciences." *Pharmaceutical Research* 25 (10): 2216–30.
- Henzie, Joel, Min Hyung Lee, and Teri W. Odom. 2007. "Multiscale Patterning of Plasmonic Metamaterials." *Nature Nanotechnology* 2 (9): 549–54.
- Hermanson, Greg T. 2008. "Chapter 3 - Zero-Length Crosslinkers." In *Bioconjugate Techniques (Second Edition)*, edited by Greg T. Hermanson, Second Edition, 213–33. New York: Academic Press.

- Hernández, Ana L., Rafael Casquel, Miguel Holgado, Iñaki Cornago, Fátima Fernández, Paula Ciaurriz, Francisco J. Sanza, Beatriz Santamaría, María V. Maigler, and María Fe Laguna. 2016. "Resonant Nanopillars Arrays for Label-Free Biosensing." *Optics Letters* 41 (23): 5430–33.
- Hiep, Ha Minh, Tatsuro Endo, Kagan Kerman, Miyuki Chikae, Do-Kyun Kim, Shohei Yamamura, Yuzuru Takamura, and Eiichi Tamiya. 2007. "A Localized Surface Plasmon Resonance Based Immunosensor for the Detection of Casein in Milk." *Science and Technology of Advanced Materials* 8 (4): 331–38.
- Hinterwirth, Helmut, Stefanie Kappel, Thomas Waitz, Thomas Prohaska, Wolfgang Lindner, and Michael Lämmerhofer. 2013a. "Quantifying Thiol Ligand Density of Self-Assembled Monolayers on Gold Nanoparticles by Inductively Coupled Plasma–Mass Spectrometry." *ACS Nano* 7 (2): 1129–36.
- Hinterwirth, Helmut, Stefanie Kappel, Thomas Waitz, Thomas Prohaska, Wolfgang Lindner, and Michael Lämmerhofer. 2013b. "Quantifying Thiol Ligand Density of Self-Assembled Monolayers on Gold Nanoparticles by Inductively Coupled Plasma–Mass Spectrometry." *ACS Nano* 7 (2): 1129–36.
- Holley, Aaron K., and Daret K. St. Clair. 2016. "Manganese Superoxide Dismutase (MnSOD) and Its Importance in Mitochondrial Function and Cancer." In *Redox-Active Therapeutics*, edited by Ines Batinić-Haberle, Júlio S. Rebouças, and Ivan Spasojević, 11–50. Cham: Springer International Publishing.
- Homola, Jiří. 2003. "Present and Future of Surface Plasmon Resonance Biosensors." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 377 (3): 528–39.
- Homola, Jiří. 2006. "Surface Plasmon Resonance (SPR) Biosensors and Their Applications in Food Safety and Security." In *Frontiers in Planar Lightwave Circuit Technology*, 101–18. Springer.
- Hong, Surin, Inhee Choi, Suseung Lee, Young In Yang, Taewook Kang, and Jongheop Yi. 2009a. "Sensitive and Colorimetric Detection of the Structural Evolution of Superoxide Dismutase with Gold Nanoparticles." *Analytical Chemistry* 81 (4): 1378–82.
- Hong, Surin, Inhee Choi, Suseung Lee, Young In Yang, Taewook Kang, and Jongheop Yi. 2009b. "Sensitive and Colorimetric Detection of the Structural Evolution of Superoxide Dismutase with Gold Nanoparticles." *Analytical Chemistry* 81 (4): 1378–82.
- Hostetler, Michael J., Allen C. Templeton, and Royce W. Murray. 1999. "Dynamics of Place-Exchange Reactions on Monolayer-Protected Gold Cluster Molecules." *Langmuir* 15 (11): 3782–89.
- Hu, Minghui, Luping Qian, Raymond P. Briñas, Elena S. Lymar, and James F. Hainfeld. 2007. "Assembly of Nanoparticle–Protein Binding Complexes: From Monomers to Ordered Arrays." *Angewandte Chemie International Edition* 46 (27): 5111–14.
- Islam, Md Serajul, Masato Honma, Takakazu Nakabayashi, Masataka Kinjo, and Nobuhiro Ohta. 2013. "pH Dependence of the Fluorescence Lifetime of FAD in Solution and in Cells." *International Journal of Molecular Sciences* 14 (1): 1952–63.
- Ivanov, Michael R., and Amanda J. Haes. 2012. "Anionic Functionalized Gold Nanoparticle Continuous Full Filling Separations: Importance of Sample Concentration." *Analytical Chemistry* 84 (3): 1320–26.
- Ivnitski, Dmitri, Brittany Branch, Plamen Atanassov, and Christopher Apblett. 2006. "Glucose Oxidase Anode for Biofuel Cell Based on Direct Electron Transfer." *Electrochemistry Communications* 8 (8): 1204–10.
- Jackson, A. P., J. F. V. Vincent, and R. M. Turner. 1988. "The Mechanical Design of Nacre." *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences* 234 (1277): 415..
- Jang, Ling-Sheng, and Hao-Kai Keng. 2008. "Modified Fabrication Process of Protein Chips Using a Short-Chain Self-Assembled Monolayer." *Biomedical Microdevices* 10 (2): 203–11.

- Jarvinen, Kirsi-Marjut, Kirsten Beyer, Leticia Vila, Pantipa Chatchatee, Paula J. Busse, and Hugh A. Sampson. 2002. "B-Cell Epitopes as a Screening Instrument for Persistent Cow's Milk Allergy." *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 110 (2): 293–97.
- Jin, Qiao, Jian-Ping Xu, Jian Ji, and Jia-Cong Shen. 2008. "Zwitterionic Phosphorylcholine as a Better Ligand for Stabilizing Large Biocompatible Gold Nanoparticles." *Chemical Communications (Cambridge, England)*, no. 26 (July): 3058–60. doi:10.1039/b801959b.
- Jones, Malcolm N., Philip Manley, and Alan Wilkinson. 1982. "The Dissociation of Glucose Oxidase by Sodium N-Dodecyl Sulphate." *Biochemical Journal* 203 (1): 285–91.
- Kanamori, Y., M. Sasaki, and K. Hane. 1999. "Broadband Antireflection Gratings Fabricated upon Silicon Substrates." *Opt. Lett.* 24 (20): 1422–1424.
- Kang, Jung Hye, Hyo Jin Choi, Sang Youn Hwang, Sang Ho Han, Jun Yeoung Jeon, and Eun Kyu Lee. 2007. "Improving Immunobinding Using Oriented Immobilization of an Oxidized Antibody." *Journal of Chromatography. A* 1161 (1–2): 9–14.
- Kang, Taewook, Surin Hong, Inhee Choi, Jung Jun Sung, Younjung Kim, Ji-Sook Hahn, and Jongheop Yi. 2006. "Reversible pH-Driven Conformational Switching of Tethered Superoxide Dismutase with Gold Nanoparticle Enhanced Surface Plasmon Resonance Spectroscopy." *Journal of the American Chemical Society* 128 (39): 12870–78.
- Keighron, Jacqueline D., and Christine D. Keating. 2010. "Enzyme: Nanoparticle Bioconjugates with Two Sequential Enzymes: Stoichiometry and Activity of Malate Dehydrogenase and Citrate Synthase on Au Nanoparticles." *Langmuir* 26 (24): 18992–0.
- Kelly, K. Lance, Eduardo Coronado, Lin Lin Zhao, and George C. Schatz. 2003. "The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment." *The Journal of Physical Chemistry B* 107 (3): 668–77.
- Kleinman, Samuel L., Renee R. Frontiera, Anne-Isabelle Henry, Jon A. Dieringer, and Richard P. Van Duyne. 2013. "Creating, Characterizing, and Controlling Chemistry with SERS Hot Spots." *Physical Chemistry Chemical Physics* 15 (1): 21–36.
- Kusai, Kiyoshi, Ichiro Sekuzu, Bunji Hagihara, Kazuo Okunuki, Saburo Yamauchi, and Masashi Nakai. 1960. "Crystallization of Glucose Oxidase from *Penicillium Amagasakiense*." *Biochimica et Biophysica Acta* 40: 555–57.
- Lee, Jaewook, Hongjian Zhou, and Jaebeom Lee. 2011. "Small Molecule Induced Self-Assembly of Au Nanoparticles." *J. Mater. Chem.* 21 (42): 16935–42..
- Lee, Kuang-Li, Chia-Wei Lee, Way-Seen Wang, and Pei-Kuen Wei. 2007. "Sensitive Biosensor Array Using Surface Plasmon Resonance on Metallic Nanoslits." *Journal of Biomedical Optics* 12 (4): 044023-044023-5..
- Lee, Kuang-Li, Shu-Han Wu, Chia-Wei Lee, and Pei-Kuen Wei. 2011. "Sensitive Biosensors Using Fano Resonance in Single Gold Nanoslit with Periodic Grooves." *Optics Express* 19 (24): 24530–39.
- Lee, Kuang-Li, Shu-Han Wu, and Pei-Kuen Wei. 2009. "Intensity Sensitivity of Gold Nanostructures and Its Application for High-Throughput Biosensing." *Optics Express* 17 (25): 23104–13.
- Lee, Kun-Li, Chia-Wei Lee, and Pei-Kuen Wei. 2007. "Comparisons of the Surface Plasmon Sensitivities for Nanohole and Nanoslit Arrays." In , 6641:66411N–66411N–7.
- Lee, Sunmook, and Víctor H. Pérez-Luna. 2005. "Dextran– Gold Nanoparticle Hybrid Material for Biomolecule Immobilization and Detection." *Analytical Chemistry* 77 (22): 7204–11.

- Lesuffleur, Antoine, Hyungsoon Im, Nathan C. Lindquist, and Sang-Hyun Oh. 2007. "Periodic Nanohole Arrays with Shape-Enhanced Plasmon Resonance as Real-Time Biosensors." *Applied Physics Letters* 90 (24): 243110.
- Li, Chung-Tien, How-foo Chen, Ieng-Wai Un, Hsin-Cheng Lee, and Ta-Jen Yen. 2012. "Study of Optical Phase Transduction on Localized Surface Plasmon Resonance for Ultrasensitive Detection." *Opt. Express* 20 (3): 3250–3260.
- Li, Hua, Chun-Yan Guo, and Cai-Ling Xu. 2015. "A Highly Sensitive Non-Enzymatic Glucose Sensor Based on Bimetallic Cu–Ag Superstructures." *Biosensors and Bioelectronics* 63: 339–46.
- Li, Wanbo, Kangning Ren, and Jianhua Zhou. 2016. "Aluminum-Based Localized Surface Plasmon Resonance for Biosensing." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 80 (June): 486–94.
- Lin, Ding-Zheng, Po-Chun Chuang, Pei-Chen Liao, Jung-Po Chen, and Yih-Fan Chen. 2016. "Increasing the Spectral Shifts in LSPR Biosensing Using DNA-Functionalized Gold Nanorods in a Competitive Assay Format for the Detection of Interferon- γ ." *Biosensors and Bioelectronics* 81 (July): 221–28..
- Lindman, Stina, Iseult Lynch, Eva Thulin, Hanna Nilsson, Kenneth A. Dawson, and Sara Linse. 2007. "Systematic Investigation of the Thermodynamics of HSA Adsorption to N-Iso-Propylacrylamide/N-Tert-Butylacrylamide Copolymer Nanoparticles. Effects of Particle Size and Hydrophobicity." *Nano Letters* 7 (4): 914–20.
- Liou, Yih-Cherng, Ante Tocilj, Peter L. Davies, and Zongchao Jia. 2000. "Mimicry of Ice Structure by Surface Hydroxyls and Water of a [Beta]-Helix Antifreeze Protein." *Nature* 406 (6793): 322–24..
- Liu, Lanhua, Xiaohong Zhou, Mifang Lu, Mingkai Zhang, Chao Yang, Ruiman Ma, Abdul Ghaffar Memon, Hanchang Shi, and Yi Qian. 2017. "An Array Fluorescent Biosensor Based on Planar Waveguide for Multi-Analyte Determination in Water Samples." *Sensors and Actuators B: Chemical* 240: 107–13.
- Liu, Na, Thomas Weiss, Martin Mesch, Lutz Langguth, Ulrike Eigenthaler, Michael Hirscher, Carsten Sonnichsen, and Harald Giessen. 2009. "Planar Metamaterial Analogue of Electromagnetically Induced Transparency for Plasmonic Sensing." *Nano Letters* 10 (4): 1103–7.
- Live, Ludovic S., Olivier R. Bolduc, and Jean-François Masson. 2010. "Propagating Surface Plasmon Resonance on Microhole Arrays." *Analytical Chemistry* 82 (9): 3780–87. doi:10.1021/ac100177j.
- Lopez-Calleja, Ines M., Isabel González, Violeta Fajardo, Pablo E. Hernandez, Teresa García, and Rosario Martín. 2007. "Application of an Indirect ELISA and a PCR Technique for Detection of Cows' Milk in Sheep's and Goats' Milk Cheeses." *International Dairy Journal* 17 (1): 87–93.
- Love, J. C., L. A. Estroff, J. K. Kriebel, R. G. Nuzzo, and G. M. Whitesides. 2005. "Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology." *Chem. Rev.* 105: 1103–69.
- Lucarini, Marco, and Lucia Pasquato. 2010. "ESR Spectroscopy as a Tool to Investigate the Properties of Self-Assembled Monolayers Protecting Gold Nanoparticles." *Nanoscale* 2 (5): 668–76.
- Luo, Xi-Liang, Jing-Juan Xu, Ying Du, and Hong-Yuan Chen. 2004. "A Glucose Biosensor Based on Chitosan–glucose Oxidase–gold Nanoparticles Biocomposite Formed by One-Step Electrodeposition." *Analytical Biochemistry* 334 (2): 284–89.
- Ma, Houyi, Bingsheng Yin, Shuyun Wang, Yongli Jiao, Wei Pan, Shaoxin Huang, Shenhao Chen, and Fanjun Meng. 2004. "Synthesis of Silver and Gold Nanoparticles by a Novel Electrochemical Method." *ChemPhysChem* 5 (1): 68–75.
- Macmillan-Crow, L. A., and D. L. Cruthirds. 2001. "Invited Review: Manganese Superoxide Dismutase in Disease." *Free Radical Research* 34 (4): 325–36.

- Manson, Joanne, Dhiraj Kumar, Brian J. Meenan, and Dorian Dixon. 2011. "Polyethylene Glycol Functionalized Gold Nanoparticles: The Influence of Capping Density on Stability in Various Media." *Gold Bulletin* 44 (2): 99–105.
- Martin Bermudo, Francisco. 2010. "Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre proteínas lácteas, alergias y sus métodos de análisis." *Revista del comité científico* 13.
- McCord, J. M., and I. Fridovich. 1969. "Superoxide Dismutase. An Enzymic Function for Erythrocyte (Hemocytoblast)." *The Journal of Biological Chemistry* 244 (22): 6049–55.
- McCord, Joe M., and Marvin A. Edeas. 2005. "SOD, Oxidative Stress and Human Pathologies: A Brief History and a Future Vision." *Biomedicine & Pharmacotherapy* 59 (4): 139–42.
- Medek, Ales, Philip J. Hajduk, Jamey Mack, and Stephen W. Fesik. 2000. "The Use of Differential Chemical Shifts for Determining the Binding Site Location and Orientation of Protein-Bound Ligands." *Journal of the American Chemical Society* 122 (6): 1241–42.
- Melov, S., J. Ravenscroft, S. Malik, M. S. Gill, D. W. Walker, P. E. Clayton, D. C. Wallace, B. Malfroy, S. R. Doctrow, and G. J. Lithgow. 2000. "Extension of Life-Span with Superoxide Dismutase/Catalase Mimetics." *Science (New York, N.Y.)* 289 (5484): 1567–69.
- Mie, Gustav. 1976. "Contributions to the Optics of Turbid Media, Particularly of Colloidal Metal Solutions." *Contributions to the Optics of Turbid Media, Particularly of Colloidal Metal Solutions Transl. into ENGLISH from Ann. Phys.(Leipzig), v. 25, No. 3, 1908 P 377-445* 1: 377–445.
- Miranda, Oscar R., Hung-Ting Chen, Chang-Cheng You, David E. Mortenson, Xiao-Chao Yang, Uwe HF Bunz, and Vincent M. Rotello. 2010. "Enzyme Amplified Array Sensing of Proteins in Solution and in Biofluids." *Journal of the American Chemical Society* 132 (14): 5285.
- Miranda, Oscar R., Brian Creran, and Vincent M. Rotello. 2010. "Array-Based Sensing with Nanoparticles: 'chemical Noses' for Sensing Biomolecules and Cell Surfaces." *Current Opinion in Chemical Biology* 14 (6): 728–36.
- Mirin, Nikolay A., Kui Bao, and Peter Nordlander. 2009. "Fano Resonances in Plasmonic Nanoparticle Aggregates." *The Journal of Physical Chemistry A* 113 (16): 4028–34.
- Molinari, Judith, Carlos Moina, and Gabriel Ybarra. 2015. "Electrochemical Immunosensor for the Determination of β -Casein." *J. Electrochem. Sci. Eng.* 5 (1): 9–16.
- Moran, Jose F., Euan K. James, Maria C. Rubio, Gautam Sarath, Robert V. Klucas, and Manuel Becana. 2003. "Functional Characterization and Expression of a Cytosolic Iron-Superoxide Dismutase from Cowpea Root Nodules." *Plant Physiology* 133 (2): 773–82.
- Muller-Renaud, Stéphanie. 2005. "Development of a Biosensor Immunoassay for the Quantification of α S1-Casein in Milk." *Journal of Dairy Research* 72 (1): 57–64.
- Munoz, Ines G., Jose F. Moran, Manuel Becana, and Guillermo Montoya. 2005. "The Crystal Structure of an Eukaryotic Iron Superoxide Dismutase Suggests Intersubunit Cooperation during Catalysis." *Protein Science : A Publication of the Protein Society* 14 (2): 387–94.
- Munoz, Ines G., Jose Fernando Moran, Manuel Becana, and Guillermo Montoya. 2003. "Crystallization and Preliminary X-Ray Diffraction Studies of the Eukaryotic Iron Superoxide Dismutase (FeSOD) from *Vigna Unguiculata*." *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography* 59 (Pt 6): 1070–72.
- Nath, Nidhi, and Ashutosh Chilkoti. 2004. "Label-Free Biosensing by Surface Plasmon Resonance of Nanoparticles on Glass: Optimization of Nanoparticle Size." *Analytical Chemistry* 76 (18): 5370–78.

- Nel, Andre E., Lutz Mädler, Darrell Velegol, Tian Xia, Eric MV Hoek, Ponisseril Somasundaran, Fred Klaessig, Vince Castranova, and Mike Thompson. 2009. "Understanding Biophysicochemical Interactions at the Nano-bio Interface." *Nature Materials* 8 (7): 543–57.
- Neto, Sidney Aquino, Ross D. Milton, Laís B. Crepaldi, David P. Hickey, Adalgisa R. De Andrade, and Shelley D. Minter. 2015. "Co-Immobilization of Gold Nanoparticles with Glucose Oxidase to Improve Bioelectrocatalytic Glucose Oxidation." *Journal of Power Sources* 285: 493–98.
- Newman, Jeffrey D., and Anthony PF Turner. 2005. "Home Blood Glucose Biosensors: A Commercial Perspective." *Biosensors and Bioelectronics* 20 (12): 2435–53.
- Noor, Rana, Sonali Mittal, and Jawaid Iqbal. 2002. "Superoxide Dismutase--Applications and Relevance to Human Diseases." *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research* 8 (9): RA210-215.
- Nuzzo, Ralph G., and David L. Allara. 1983. "Adsorption of Bifunctional Organic Disulfides on Gold Surfaces." *Journal of the American Chemical Society* 105 (13): 4481–83.
- O'Malley, James J., and Judy L. Weaver. 1972. "Subunit Structure of Glucose Oxidase from *Aspergillus Niger*." *Biochemistry* 11 (19): 3527–32.
- Orr, William C., Robin J. Mockett, Judith J. Benes, and Rajindar S. Sohal. 2003. "Effects of Overexpression of Copper-Zinc and Manganese Superoxide Dismutases, Catalase, and Thioredoxin Reductase Genes on Longevity in *Drosophila Melanogaster*." *The Journal of Biological Chemistry* 278 (29): 26418–22.
- Österberg, Eva, Karin Bergström, Krister Holmberg, Jennifer A. Riggs, J. M. Van Alstine, Thomas P. Schuman, Norman L. Burns, and J. Milton Harris. 1993. "Comparison of Polysaccharide and Poly(ethylene Glycol) Coatings for Reduction of Protein Adsorption on Polystyrene Surfaces." *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 77 (2): 159–69.
- Otsuka, Ichiro, Masashi Yaoita, Michi Higano, Seiichi Nagashima, and Ryoichi Kataoka. 2004. "Tapping Mode AFM Study on the Surface Dynamics of a Single Glucose Oxidase Molecule on a Au (111) Surface in Water with Implication for a Surface-Induced Unfolding Pathway." *Applied Surface Science* 235 (1): 188–96.
- Otte, Marinus A., Borja Sepúlveda, Weihai Ni, Jorge Pérez Juste, Luis M. Liz-Marzán, and Laura M. Lechuga. 2010. "Identification of the Optimal Spectral Region for Plasmonic and Nanoplasmonic Sensing." *ACS Nano* 4 (1): 349–57.
- Paine, Michael L., Wen Luo, Dan-Hong Zhu, Pablo Jr Bringas, and Malcolm L. Snead. 2003. "Functional Domains for Amelogenin Revealed by Compound Genetic Defects." *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 18 (3): 466–72.
- Park, S., K. A. Brown, and K. Hamad-Schifferli. 2004. "Changes in Oligonucleotide Conformation on Nanoparticle Surfaces by Modification with Mercaptohexanol." *Nano Letters* 4 (October): 1925–29.
- Park, Sunho, Katherine A. Brown, and Kimberly Hamad-Schifferli. 2004. "Changes in Oligonucleotide Conformation on Nanoparticle Surfaces by Modification with Mercaptohexanol." *Nano Letters* 4 (10): 1925–29.
- Parolo, Claudio, Alfredo de la Escosura-Muniz, Ester Polo, Valeria Grazu, Jesus M. de la Fuente, and Arben Merkoci. 2013. "Design, Preparation, and Evaluation of a Fixed-Orientation Antibody/Gold-Nanoparticle Conjugate as an Immunosensing Label." *ACS Applied Materials & Interfaces* 5 (21): 10753–59.
- Pazur, John H., and Kjell Kleppe. 1964. "The Oxidation of Glucose and Related Compounds by Glucose Oxidase from *Aspergillus Niger*." *Biochemistry* 3 (4): 578–83.

- Pensa, Evangelina, Emiliano Cortés, Gastón Corthey, Pilar Carro, Carolina Vericat, Mariano H. Fonticelli, Guillermo Benítez, Aldo A. Rubert, and Roberto C. Salvarezza. 2012. "The Chemistry of the Sulfur–Gold Interface: In Search of a Unified Model." *Accounts of Chemical Research* 45 (8): 1183–92.
- Petryayeva, Eleonora, and Ulrich J. Krull. 2011. "Localized Surface Plasmon Resonance: Nanostructures, Bioassays and biosensing—A Review." *Analytica Chimica Acta* 706 (1): 8–24.
- Pillai, Pramod P., Bartłomiej Kowalczyk, Kristiana Kandere-Grzybowska, Magdalena Borkowska, and Bartosz A. Grzybowski. 2016. "Engineering Gram Selectivity of Mixed-Charge Gold Nanoparticles by Tuning the Balance of Surface Charges." *Angewandte Chemie* 128 (30): 8752–56.
- Pissuwan, D., CH Cortie, SM Valenzuela, and MB Cortie. 2007. "Gold Nanosphere-Antibody Conjugates for Hyperthermal Therapeutic Applications." *Gold Bulletin* 40 (2): 121–29.
- Puertas, S., M. Moros, R. Fernández-Pacheco, M. R. Ibarra, V. Grazú, and J. M. de la Fuente. 2010. "Designing Novel Nano-Immunoassays: Antibody Orientation versus Sensitivity." *Journal of Physics D: Applied Physics* 43 (47): 474012.
- Puertas, Sara, Pilar Batalla, Maria Moros, Ester Polo, Pablo Del Pino, Jose M. Guisan, Valeria Grazu, and Jesus M. de la Fuente. 2011. "Taking Advantage of Unspecific Interactions to Produce Highly Active Magnetic Nanoparticle-Antibody Conjugates." *ACS Nano* 5 (6): 4521–28. doi:10.1021/nn200019s.
- Radauer-Preiml, Isabella, Ancuela Andosch, Thomas Hawranek, Ursula Luetz-Meindl, Markus Wiederstein, Jutta Horejs-Hoeck, Martin Himly, Matthew Boyles, and Albert Duschl. 2016. "Nanoparticle-Allergen Interactions Mediate Human Allergic Responses: Protein Corona Characterization and Cellular Responses." *Particle and Fibre Toxicology* 13 (1): 3.
- Ramanathan, Kumaran, and Bengt Danielsson. 2001. "Principles and Applications of Thermal Biosensors." *Biosensors and Bioelectronics* 16 (6): 417–23.
- Ramanavicius, Arunas, Asta Kausaite-Minkstimiene, Inga Morkvenaite-Vilkonciene, Povilas Genys, Raisa Mikhailova, Tatiana Semashko, Jaroslav Voronovic, and Almira Ramanaviciene. 2015. "Biofuel Cell Based on Glucose Oxidase from *Penicillium Funiculosum* 46.1 and Horseradish Peroxidase." *Chemical Engineering Journal* 264: 165–73.
- Rasiah, I. A., K. H. Sutton, F. L. Low, H.-M. Lin, and J. A. Gerrard. 2005. "Crosslinking of Wheat Dough Proteins by Glucose Oxidase and the Resulting Effects on Bread and Croissants." *Food Chemistry* 89 (3): 325–32.
- Rauf, S., A. Ihsan, K. Akhtar, M. A. Ghauri, M. Rahman, M. A. Anwar, and A. M. Khalid. 2006. "Glucose Oxidase Immobilization on a Novel Cellulose Acetate–polymethylmethacrylate Membrane." *Journal of Biotechnology* 121 (3): 351–60.
- Reed, Alison MW, and Steven J. Metallo. 2010. "Oriented Protein Adsorption to Gold Nanoparticles through a Genetically Encodable Binding Motif." *Langmuir* 26 (24): 18945–50.
- Ren, Xiangling, Xianwei Meng, Dong Chen, Fangqiong Tang, and Jun Jiao. 2005. "Using Silver Nanoparticle to Enhance Current Response of Biosensor." *Biosensors and Bioelectronics* 21 (3): 433–37.
- Richardson, J., Kenneth A. Thomas, Byron H. Rubin, and David C. Richardson. 1975. "Crystal Structure of Bovine Cu, Zn Superoxide Dismutase at 3 Å Resolution: Chain Tracing and Metal Ligands." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 72 (4): 1349–53.
- Rodríguez-Cantó, P. J., M. Martínez-Marco, F. J. Rodríguez-Fortuño, B. Tomás-Navarro, R. Ortuño, S. Peransí-Llopis, and A. Martínez. 2011. "Demonstration of near Infrared Gas Sensing Using Gold Nanodisks on Functionalized Silicon." *Opt. Express* 19 (8): 7664–7672.
- Ruigrok, Vincent J. B., Mark Levisson, Michel H. M. Eppink, Hauke Smidt, and John van der Oost. 2011. "Alternative Affinity Tools: More Attractive than Antibodies?" *Biochemical Journal* 436 (1): 1.

- Sainiemi, Lauri, Ville Jokinen, Ali Shah, Maksim Shpak, Susanna Aura, Pia Suvanto, and Sami Franssila. 2011. "Non-Reflecting Silicon and Polymer Surfaces by Plasma Etching and Replication." *Advanced Materials* 23 (1): 122–126.
- Salvemini, D., Z. Q. Wang, J. L. Zweier, A. Samouilov, H. Macarthur, T. P. Misko, M. G. Currie, S. Cuzzocrea, J. A. Sikorski, and D. P. Riley. 1999. "A Nonpeptidyl Mimic of Superoxide Dismutase with Therapeutic Activity in Rats." *Science (New York, N.Y.)* 286 (5438): 304–6.
- Santos, Fátima Fernandez. 2012. "Biosensores Para La Detección de Antibióticos En Matrices Biológicas de Interés En El Sector Agroalimentario." Tesis.
- Sato, Kae, Kazuo Hosokawa, and Mizuo Maeda. 2003. "Rapid Aggregation of Gold Nanoparticles Induced by Non-Cross-Linking DNA Hybridization." *Journal of the American Chemical Society* 125 (27):
- Schubert-Ullrich, Patricia, Judith Rudolf, Parisa Ansari, Brigitte Galler, Manuela Führer, Alexandra Molinelli, and Sabine Baumgartner. 2009. "Commercialized Rapid Immunoanalytical Tests for Determination of Allergenic Food Proteins: An Overview." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 395 (1): 69–81.
- Seekell, Kevin, Matthew J. Crow, Stella Marinakos, Julie Ostrander, Ashutosh Chilkoti, and Adam Wax. 2011. "Hyperspectral Molecular Imaging of Multiple Receptors Using Immunolabeled Plasmonic Nanoparticles." *Journal of Biomedical Optics* 16 (11): 116003–312.
- Sepúlveda, Borja, Paula C. Angelomé, Laura M. Lechuga, and Luis M. Liz-Marzán. 2009. "LSPR-Based Nanobiosensors." *Nano Today* 4 (3): 244–51.
- Shan, Changsheng, Huafeng Yang, Jiangfeng Song, Dongxue Han, Ari Ivaska, and Li Niu. 2009. "Direct Electrochemistry of Glucose Oxidase and Biosensing for Glucose Based on Graphene." *Analytical Chemistry* 81 (6): 2378–82.
- Sherry, Leif J., Shih-Hui Chang, George C. Schatz, Richard P. Van Duyne, Benjamin J. Wiley, and Younan Xia. 2005. "Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy of Single Silver Nanocubes." *Nano Letters* 5 (10): 2034–38.
- Sigal, George B., Cynthia Bamdad, Alcide Barberis, Jack Strominger, and George M. Whitesides. 1996. "A Self-Assembled Monolayer for the Binding and Study of Histidine-Tagged Proteins by Surface Plasmon Resonance." *Analytical Chemistry* 68 (3): 490–97.
- Sikorski, Michal M., Alexey F. Topunov, Pawel M. Stróycki, Constantin E. Vorgias, Keith S. Wilson, and Andrzej B. Legocki. 1995. "Cloning and Expression of Plant Leghemoglobin cDNA of *Lupinus luteus* in *Escherichia coli* and Purification of the Recombinant Protein." *Plant Science* 108 (1): 109–17.
- Siriwardana, Kumudu, Ailin Wang, Karthikeshwar Vangala, Nicholas Fitzkee, and Dongmao Zhang. 2013. "Probing the Effects of Cysteine Residues on Protein Adsorption onto Gold Nanoparticles Using Wild-Type and Mutated gb3 Proteins." *Langmuir* 29 (35): 10990–96.
- Soler, Maria, M-Carmen Estevez, Mar Alvarez, Marinus A Otte, Borja Sepulveda, and Laura M Lechuga. 2014. "Direct Detection of Protein Biomarkers in Human Fluids Using Site-Specific Antibody Immobilization Strategies." *Sensors (Basel, Switzerland)* 14 (2): 2239–58.
- Sperling, Ralph A., and W. J. Parak. 2010. "Surface Modification, Functionalization and Bioconjugation of Colloidal Inorganic Nanoparticles." *Philosophical Transactions of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* 368 (1915): 1333–83.
- Srere, Paul A., and Kosaku Uyeda. 1976. "[2] Functional Groups on Enzymes Suitable for Binding to Matrices." *Methods in Enzymology* 44: 11–19.
- Studier, F. William. 2005. "Protein Production by Auto-Induction in High-Density Shaking Cultures." *Protein Expression and Purification* 41 (1): 207–34..

- Sugihara, K., T. Teranishi, K. Shimazu, and K. Uosaki. 1999. "Structure Dependence of the Surface pKa of Mercaptoundecanoic Acid SAM on Gold." *Electrochemistry* 67 (12): 1172–74.
- Sun, Chih-Hung, Peng Jiang, and Bin Jiang. 2008. "Broadband Moth-Eye Antireflection Coatings on Silicon." *Applied Physics Letters* 92 (6): 061112.
- Sun, Y, L W Oberley, and Y Li. 1988. "A Simple Method for Clinical Assay of Superoxide Dismutase." *Clinical Chemistry* 34 (3): 497.
- Susumu, Kimihiro, Eunkeu Oh, James B. Delehanty, Juan B. Blanco-Canosa, Brandy J. Johnson, Vaibhav Jain, William Judson 4th Hervey, et al. 2011a. "Multifunctional Compact Zwitterionic Ligands for Preparing Robust Biocompatible Semiconductor Quantum Dots and Gold Nanoparticles." *Journal of the American Chemical Society* 133 (24): 9480–96.
- . 2011b. "Multifunctional Compact Zwitterionic Ligands for Preparing Robust Biocompatible Semiconductor Quantum Dots and Gold Nanoparticles." *Journal of the American Chemical Society* 133 (24): 9480–96.
- Svedendahl, Mikael, Si Chen, Alexandre Dmitriev, and Mikael Käll. 2009. "Refractometric Sensing Using Propagating versus Localized Surface Plasmons: A Direct Comparison." *Nano Letters* 9 (12): 4428–33.
- Swoboda, Bennett EP, and Vincent Massey. 1965. "Purification and Properties of the Glucose Oxidase from *Aspergillus Niger*." *Journal of Biological Chemistry* 240 (5): 2209–15.
- Takeuchi, Toshifumi, Sock Ying Tham, and Garry A. Rechnitz. 1991. "Biotin Binding Assay Utilizing Avidin—peroxidase Conjugate and Iminobiotin Immobilized on Polystyrene Beads." *Analytica Chimica Acta* 251 (1–2): 291–95.
- Tavahodi, Mojtaba, Roberto Ortiz, Christopher Schulz, Ali Ekhtiari, Roland Ludwig, Behzad Haghighi, and Lo Gorton. 2017. "Direct Electron Transfer of Cellobiose Dehydrogenase on Positively Charged Polyethyleneimine Gold Nanoparticles." *ChemPlusChem* 82 (4): 546–52.
- Tellechea, Edurne, Inaki Cornago, Paula Ciaurriz, Jose F. Moran, and Aaron C. Asensio. 2012. "Conjugation of Active Iron Superoxide Dismutase to Nanopatterned Surfaces." *IEEE Transactions on Nanobioscience* 11 (2): 176–80.
- Tellechea, Edurne, Diethelm Johannsmann, Nicole F. Steinmetz, Ralf P. Richter, and Ilya Reviakine. 2009. "Model-Independent Analysis of QCM Data on Colloidal Particle Adsorption." *Langmuir* 25 (9): 5177–84.
- Tomassetti, Mauro, Giovanni Merola, Elisabetta Martini, Luigi Campanella, Gabriella Sanzò, Gabriele Favero, and Franco Mazzei. 2017. "Comparison between a Direct-Flow SPR Immunosensor for Ampicillin and a Competitive Conventional Amperometric Device: Analytical Features and Possible Applications to Real Samples." *Sensors* 17 (4): 819.
- Tseng, Ricky J., Chunglin Tsai, Liping Ma, Jianyong Ouyang, Cengiz S. Ozkan, and Yang Yang. 2006. "Digital Memory Device Based on Tobacco Mosaic Virus Conjugated with Nanoparticles." *Nat Nano* 1 (1): 72–77. doi:10.1038/nnano.2006.55.
- Turkevich, John, Peter Cooper Stevenson, and James Hillier. 1951a. "A Study of the Nucleation and Growth Processes in the Synthesis of Colloidal Gold." *Discuss. Faraday Soc.* 11 (0): 55–75.
- urkevich, John, Peter Cooper Stevenson, and James Hillier.. 1951b. "A Study of the Nucleation and Growth Processes in the Synthesis of Colloidal Gold." *Discussions of the Faraday Society* 11: 55–75.
- Tyhach, R. J., P. A. Rupchock, J. H. Pendergrass, A. C. Skjold, P. J. Smith, R. D. Johnson, J. P. Albarella, and J. A. Profitt. 1981. "Adaptation of Prostatic-Group-Label Homogeneous Immunoassay to Reagent-Strip Format." *Clinical Chemistry* 27 (9): 1499–1504.

- Uchida, Katsumi, Hidenori Otsuka, Mitsuhiro Kaneko, Kazunori Kataoka, and Yukio Nagasaki. 2005. "A Reactive Poly (Ethylene Glycol) Layer to Achieve Specific Surface Plasmon Resonance Sensing with a High S/N Ratio: The Substantial Role of a Short Underbrushed PEG Layer in Minimizing Nonspecific Adsorption." *Analytical Chemistry* 77 (4): 1075–80.
- Urarte, Estibaliz, Iñigo Auzmendi, Selene Rol, Idoia Ariz, Pedro Aparicio-Tejo, Raúl Arredondo-Peter, and Jose F. Moran. 2008. "Chapter Twenty-Three - A Self-Induction Method to Produce High Quantities of Recombinant Functional Flavo-Leghemoglobin Reductase." In *Globins and Other Nitric Oxide-Reactive Proteins, Part A*, edited by Robert K. Poole, 436:411–23. *Methods in Enzymology*. Academic Press.
- urkevich, John, Peter Cooper Stevenson, and James Hillier.
- Vericat, C., M. E. Vela, G. Benitez, P. Carro, and R. C. Salvarezza. 2010. "Self-Assembled Monolayers of Thiols and Dithiols on Gold: New Challenges for a Well-Known System." *Chemical Society Reviews* 39 (5): 1805–34.
- Vertegel, Alexey A., Richard W. Siegel, and Jonathan S. Dordick. 2004. "Silica Nanoparticle Size Influences the Structure and Enzymatic Activity of Adsorbed Lysozyme." *Langmuir* 20 (16): 6800–6807.
- Vikholm-Lundin, Inger, and Willem M. Albers. 2006. "Site-Directed Immobilisation of Antibody Fragments for Detection of C-Reactive Protein." *Biosensors & Bioelectronics* 21 (7): 1141–48.
- Vítková, Michaela, Rauch Pavel, and Fukal Ladislav. 2002. "Optimisation of Indirect Competitive ELISAs of α -, β -, and κ -Caseins for the Recognition of Thermal and Proteolytic Treatment of Milk and Milk Products" 20: 53–62.
- Vitkova, MICHAELA, PAVEL Rauch, and LADISLAV Fukal. 2002. "Optimisation of Indirect Competitive ELISAs of Alpha-, Beta-, and Kappa-Caseins for the Recognition of Thermal and Proteolytic Treatment of Milk and Milk Products." *Czech Journal of Food Sciences* 20 (2): 53–62.
- Vodopivec, M., M. Berovič, J. Jančar, A. Podgornik, and A. Štrancar. 2000. "Application of Convective Interaction Media Disks with Immobilised Glucose Oxidase for on-Line Glucose Measurements." *Analytica Chimica Acta* 407 (1): 105–10.
- Wang, Ailin, Karthikeshwar Vangala, Tam Vo, Dongmao Zhang, and Nicholas C. Fitzkee. 2014. "A Three-Step Model for Protein–gold Nanoparticle Adsorption." *The Journal of Physical Chemistry C* 118 (15): 8134–42.
- Wang, Gang, and Siu-Tung Yau. 2007. "Spatial Confinement Induced Enzyme Stability for Bioelectronic Applications." *The Journal of Physical Chemistry C* 111 (32): 11921–26.
- Wang, Liping, Wei Mao, Dandan Ni, Junwei Di, Ying Wu, and Yifeng Tu. 2008. "Direct Electrodeposition of Gold Nanoparticles onto Indium/Tin Oxide Film Coated Glass and Its Application for Electrochemical Biosensor." *Electrochemistry Communications* 10 (4): 673–76.
- Wang, Lu, Wei Wen, Huayu Xiong, Xiuhua Zhang, Haoshuang Gu, and Shengfu Wang. 2013. "A Novel Amperometric Biosensor for Superoxide Anion Based on Superoxide Dismutase Immobilized on Gold Nanoparticle-Chitosan-Ionic Liquid Biocomposite Film." *Analytica Chimica Acta* 758: 66–71.
- Wang, Sai, Shuai Zhao, Xiao Wei, Shan Zhang, Jiahui Liu, and Yiyang Dong. 2017. "An Improved Label-Free Indirect Competitive SPR Immunosensor and Its Comparison with Conventional ELISA for Ractopamine Detection in Swine Urine." *Sensors* 17 (3): 604.
- Wang, Yuan, Ying Wu, Jianwen Wang, and Junwei Di. 2009. "Disposable Superoxide Anion Biosensor Based on Superoxide Dismutase Entrapped in Silica Sol–gel Matrix at Gold Nanoparticles Modified ITO Electrode." *Bioprocess and Biosystems Engineering* 32 (4): 531–36.
- Weare, Walter W., Scott M. Reed, Marvin G. Warner, and James E. Hutchison. 2000. "Improved Synthesis of Small (D Core \approx 1.5 Nm) Phosphine-Stabilized Gold Nanoparticles." *Journal of the American Chemical Society* 122 (51): 12890–91.

- Wijaya, Andy, and Kimberly Hamad-Schifferli. 2008. "Ligand Customization and DNA Functionalization of Gold Nanorods via Round-Trip Phase Transfer Ligand Exchange." *Langmuir* 24 (18): 9966–69.
- Wilson, R., and A. P. F. Turner. 1992. "Glucose Oxidase: An Ideal Enzyme." *Biosensors and Bioelectronics* 7 (3): 165–85.
- Xiao, Yi, Fernando Patolsky, Eugenio Katz, James F. Hainfeld, and Itamar Willner. 2003. "'Plugging into Enzymes': Nanowiring of Redox Enzymes by a Gold Nanoparticle." *Science* 299 (5614): 1877–81.
- Xie, Hai-Yan, Rui Zhen, Bo Wang, Yong-Jun Feng, Ping Chen, and Jian Hao. 2010. "Fe₃O₄/Au Core/Shell Nanoparticles Modified with Ni²⁺-Nitrilotriacetic Acid Specific to Histidine-Tagged Proteins." *The Journal of Physical Chemistry C* 114 (11): 4825–30.
- Xie, Liping, Xiaojun Yan, and Yanan Du. 2014. "An Aptamer Based Wall-Less LSPR Array Chip for Label-Free and High Throughput Detection of Biomolecules." *Biosensors and Bioelectronics* 53 (March): 58–64.
- Xu, Hai, Jian R. Lu, and David E. Williams. 2006. "Effect of Surface Packing Density of Interfacially Adsorbed Monoclonal Antibody on the Binding of Hormonal Antigen Human Chorionic Gonadotrophin." *The Journal of Physical Chemistry B* 110 (4): 1907–14.
- Xu, Shanling, Jiyang Liu, Tianshu Wang, Hailong Li, Yuqing Miao, Yaqing Liu, Jin Wang, and Erkang Wang. 2013. "A Simple and Rapid Electrochemical Strategy for Non-Invasive, Sensitive and Specific Detection of Cancerous Cell." *Talanta* 104: 122–27.
- Ye, W. N., D. Combes, and P. Monsan. 1988. "Influence of Additives on the Thermostability of Glucose Oxidase." *Enzyme and Microbial Technology* 10 (8): 498–502.
- Yockell-Lelievre, H., N. Bukar, K. S. McKeating, M. Arnaud, P. Cosin, Y. Guo, J. Dupret-Carruel, B. Mougin, and J.-F. Masson. 2015. "Plasmonic Sensors for the Competitive Detection of Testosterone." *Analyst* 140 (15): 5105–11.
- Yonezawa, Tetsu, Kei Yasui, and Nobuo Kimizuka. 2001. "Controlled Formation of Smaller Gold Nanoparticles by the Use of Four-Chained Disulfide Stabilizer." *Langmuir* 17 (2): 271–73.
- Yu, Cheng-Ju, and Wei-Lung Tseng. 2008. "Colorimetric Detection of Mercury (II) in a High-Salinity Solution Using Gold Nanoparticles Capped with 3-Mercaptopropionate Acid and Adenosine Monophosphate." *Langmuir* 24 (21): 12717–22.
- Zanchet, Daniela, Christine M. Micheel, Wolfgang J. Parak, Daniele Gerion, and A. Paul Alivisatos. 2001. "Electrophoretic Isolation of Discrete Au Nanocrystal/DNA Conjugates." *Nano Letters* 1 (1): 32–35.
- Zhang, Dongmao, Oara Neumann, Hui Wang, Virany M. Yuwono, Aoune Barhoumi, Michael Perham, Jeffrey D. Hartgerink, Pernilla Wittung-Stafshede, and Naomi J. Halas. 2009. "Gold Nanoparticles Can Induce the Formation of Protein-Based Aggregates at Physiological pH." *Nano Letters* 9 (2): 666–71.
- Zhang, Guodong, Zhi Yang, Wei Lu, Rui Zhang, Qian Huang, Mei Tian, Li Li, Dong Liang, and Chun Li. 2009. "Influence of Anchoring Ligands and Particle Size on the Colloidal Stability and in Vivo Biodistribution of Polyethylene Glycol-Coated Gold Nanoparticles in Tumor-Xenografted Mice." *Biomaterials* 30 (10): 1928–36.
- Zhang, Xiaoyu, Erin M. Hicks, Jing Zhao, George C. Schatz, and Richard P. Van Duyne. 2005. "Electrochemical Tuning of Silver Nanoparticles Fabricated by Nanosphere Lithography." *Nano Letters* 5 (7): 1503–7.
- Zhao, Hua-Zhang, Juan-Juan Sun, Juan Song, and Qin-Zheng Yang. 2010. "Direct Electron Transfer and Conformational Change of Glucose Oxidase on Carbon Nanotube-Based Electrodes." *Carbon* 48 (5): 1508–14.

Zhong, Dongping, and Ahmed H. Zewail. 2001. "Femtosecond Dynamics of Flavoproteins: Charge Separation and Recombination in Riboflavine (Vitamin B2)-Binding Protein and in Glucose Oxidase Enzyme." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (21): 11867–72.

Zhu, Aiping, Kai Sun, and Howard R. Petty. 2012. "Titanium Doping Reduces Superoxide Dismutase Activity, but Not Oxidase Activity, of Catalytic CeO(2) Nanoparticles." *Inorganic Chemistry Communications* 15 (January): 235–37.

Zhu, Xiang, Xiangheng Niu, Hongli Zhao, Jie Tang, and Minbo Lan. 2015. "Immobilization of Superoxide Dismutase on Pt-Pd/MWCNTs Hybrid Modified Electrode Surface for Superoxide Anion Detection." *Biosensors & Bioelectronics* 67 (May): 79–85.

