



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA



DETECCIÓN DE LISOZIMA EN ORINA

AUTOR: FCO JAVIER FERNÁNDEZ ACEJO

SUPERVISOR: RAFAEL PRADO GOTOR



Universidad de Sevilla
Facultad de Farmacia
Departamento de Química Física
Grado en Farmacia

DETECCIÓN DE LISOZIMA EN ORINA

Experimental

Autor: Fco Javier FernándezAcejo

Supervisor: Rafael Prado Gotor.

Sevilla, Junio 2019.

ABSTRACT

El oro es uno de los metales que primero se descubrieron en su forma nanométrica. Desde su descubrimiento en torno al siglo V, el oro coloidal se ha utilizado con fines médicos, gracias a las propiedades que presenta a tamaño nanométrico. Las nanopartículas de oro (AuNPs) presentan interesantes propiedades ópticas, como la resonancia de plasmón superficial (SPR) que les confiere su característico color rojo. En los últimos años se están desarrollando multitud de herramientas nanotecnológicas para la detección temprana de enfermedades, que podrían dar lugar al desarrollo de sistemas de diagnóstico y proporcionar una mayor calidad de vida para los pacientes. En el presente trabajo se emplea esta banda, y los cambios de color asociados a la agregación de las nanopartículas, como sensor colorimétrico para detectar lisozima en orina en diferentes muestras de sujetos sanos. Aunque normalmente el contenido en proteína de la orina es bajo o nulo, ciertos trastornos, como la leucemia monocítica y mielomonocítica, y diversas alteraciones de la función renal, pueden causar un aumento del nivel de proteínas en orina (proteinuria). Además de lisozima, pueden aparecer otras proteínas como la creatinina, gammaglobulina y la seroalbúmina. De todas ellas, a pH fisiológico solamente la seroalbúmina presenta carga positiva. Dado que el método descrito en el presente trabajo hace uso de nanopartículas de oro protegidas por iones citrato, de carga aniónica, se espera que sea un interferente frente a la lisozima, también positiva. La interferencia producida por la seroalbúmina humana (HSA) puede ser eliminada por precipitación de esta misma con etanol a pH de 4,8-4,9.

Palabras claves: Nanopartículas de oro, lisozima, orina, seroalbúmina humana, biosensor.

Índice

1. Introduction.....	1
1.1.Nanopartículas.....	1
1.1.1. Confinamiento cuántico.....	2
1.1.2. Tamaño.....	4
1.1.3. Síntesis de las nanopartículas de oro.....	5
1.1.4. Aplicaciones de las nanopartículas de oro.....	7
2. Objetivos.....	10
3. Materiales y métodos experimentales.....	11
3.1. Reactivos.....	11
3.2. Espectros de absorción de UV-vis.....	11
3.3. Medidas de TEM	11
3.4.Medidas de índices de refracción	12
3.5.Protocolo del método propuesto	12
4. Resultados y discusión.....	13
4.1.Síntesis y caracterización de nanopartículas de oro.....	13
4.1.1. Síntesis de Turkevich.....	13
4.1.2. Caracterización de las nanopartículas de oro.....	13
4.2.Optimización de las condiciones de trabajo.....	16
4.3.Determinación del límite de detección de lisozima en orina.....	20
4.3.1. Interferentes. Seroalbumina humana.....	24
5. Conclusiones.....	26
6. Bibliografía	27

1. Introducción.

1.1. Nanopartículas

La nanociencia se encarga del estudio, la comprensión y el control de fenómenos a escala nanométrica, así como de la manipulación de materiales a nanoescala. Actualmente es uno de los campos más prometedores de la ciencia. Dentro de ella es importante hablar de la nanotecnología, que son los medios y herramientas tecnológicas empleadas para la síntesis de estructuras de un tamaño inferior a 100 nm. En los últimos años se han dedicado importantes esfuerzos al desarrollo de la bionanotecnología, la cual se centra en investigar las interacciones entre los materiales nanométricos (como las nanopartículas) y los sistemas biológicos. (Oropesa-Nuñez and Jauregui-Haza, 2012) Gracias a estos esfuerzos se han conseguido grandes avances en el campo de la administración y selección de medicamentos. La nanotecnología ofrece, entre otras ventajas, un medio estable para administrar medicamentos de bajo peso molecular, así como macromoléculas por ejemplo péptidos, proteínas o moléculas de ADN mediante una administración dirigida o localizada de fármacos hacia un tipo de célula o tejido específico donde queremos hacer actuar el fármaco.(Oropesa-Nuñez and Jauregui-Haza, 2012; Rani et al., 2017).

Las ventajas del uso de nanopartículas en la administración de fármacos se deben, principalmente, a su tamaño nanométrico y su alta biocompatibilidad. Estos sistemas han demostrado ser de amplia aplicación, por ejemplo, para:

- 1.- La administración dirigida o localizada de fármacos hacia un tipo de célula o tejido específico.
- 2.- Mejorar la biodisponibilidad oral.
- 3.- Mantener el efecto de fármacos o genes en un tejido seleccionado.
- 4.- Mejorar la solubilidad de fármacos para una administración intravascular.
- 5.- Mejorar la estabilidad de los agentes terapéuticos frente a la degradación enzimática.

Además, las nanopartículas pueden imitar o alterar procesos biológicos, por lo que se utilizan en el campo de la medicina para solucionar los problemas asociados con la solubilidad, biodisponibilidad, inmunocompatibilidad y citotoxicidad de muchos medicamentos de uso tradicional (Goldberg et al., 2007; Kroll et al., 2009; Oropesa-Nuñez and Jauregui-Haza, 2012).

Las nanopartículas metálicas se pueden definir como clústers aislados de átomos metálicos, con un tamaño comprendido entre 1-100 nm. Se subdividen en dos grandes grupos: nanopartículas no funcionalizadas (“naked” nanoparticles) y nanopartículas funcionalizadas (“functionalized” nanoparticles). Es destacable la gran capacidad de las nanopartículas para ser funcionalizadas con diversos compuestos, dependiendo de la diana que se desee vehiculizar. (A, 2007; Bhattacharya and Mukherjee, 2008; Oropesa-Nuñez and Jauregui-Haza, 2012).

1.1.1. Confinamiento cuántico

Las nanopartículas metálicas han sido estudiadas ampliamente, dado que presentan una amplia versatilidad en aplicaciones tecnológicas. Una de las principales características de estos sistemas en forma coloidal es la aparición de bandas de absorción en el espectro Ultravioleta-Visible (UV-Vis), y el desplazamiento de dichas bandas debido a cambios en su morfología.

Los metales presentan en su última capa electrónica una gran cantidad de electrones desapareados del núcleo atómico, los cuales se pueden mover libremente dentro del material formando un plasma. Cuando una radiación electromagnética incide sobre el metal, se pueden inducir excitaciones colectivas de los electrones libres, denominadas plasmones. (Criado et al., 2013; Xia and Campbell, 2009) Este fenómeno ocurre porque los electrones en la superficie de una nanopartícula metálica oscilan al interactuar con una onda electromagnética, apareciendo un momento dipolar sobre la partícula en un intervalo de tiempo. Cuando la componente eléctrica de la onda electromagnética que incide sobre la nanopartícula oscila a la misma frecuencia que los electrones de ésta, ocurre el fenómeno de resonancia de plasmón de superficie (SPR, *Surface Plasmon Resonance*). (Jimenez-Ruiz et al., 2015; K and L, 2013).

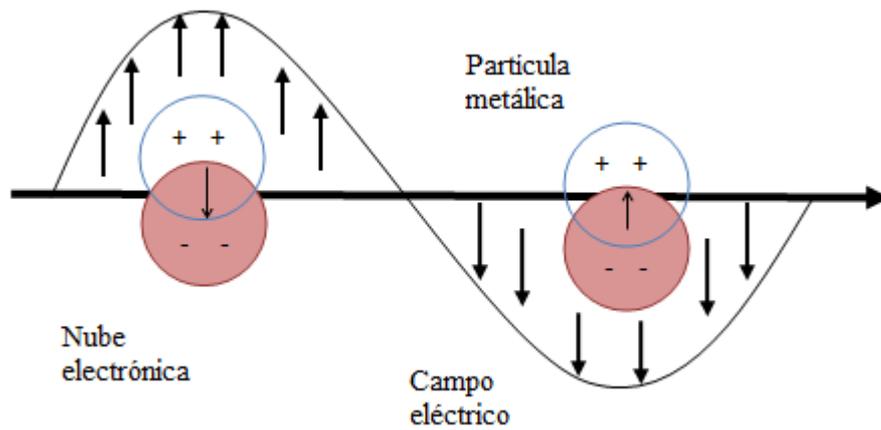


Figura 1. Representación esquemática de los electrones de la superficie de las nanopartículas tras incidir un haz de luz a una determinada frecuencia.

En el caso de las nanopartículas de metales nobles, como la plata y el oro, la banda del plasmon superficial aparece en la zona ultravioleta-visible, de modo que las soluciones coloidales de dichas nanopartículas presentan un color distinto al que se puede observar en sus análogos macroscópicos. En la figura 2A se puede observar el espectro UV-Vis de una suspensión de nanopartículas de oro, donde aparece una banda de absorción sobre 520 nm. (Criado et al., 2013; Daniel and Astruc, 2004).

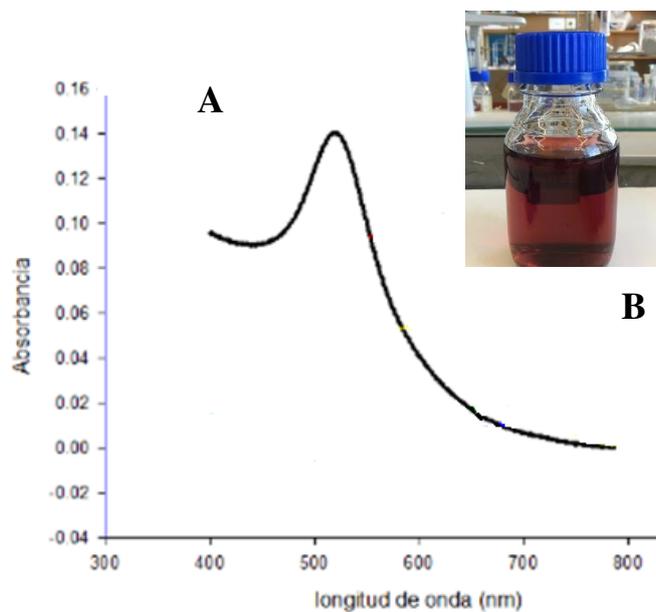


Figura 2. A: Espectro de absorción de una suspensión de nanopartículas de oro. B: Color rojo tinto típico de las nanopartículas de oro.

La energía de la luz que induce la aparición la banda de plasmón superficial en una nanopartícula metálica depende de diversos factores: tamaño y forma de la partícula, naturaleza del metal y composición del medio circundante de la misma. Cuando un haz de luz incide sobre una partícula metálica, se producen tres fenómenos diferenciados: a) su campo electromagnético induce la excitación colectiva de los electrones de valencia, b) dicha partícula irradia radiaciones electromagnéticas dando lugar a un proceso de dispersión, c) en el proceso de transferencia de energía de la luz a la partícula, parte de dicha energía se disipa en forma de calor. A este fenómeno se le denomina absorción.(Cruz et al., 2012; Xia and Campbell, 2009).

La interacción del haz de luz con las partículas metálicas queda perfectamente descrita por la teoría de Mie, basándose en la solución exacta de las ecuaciones de Maxwell (Mie, 1908). Esta teoría predice correctamente qué fracción de luz será absorbida y qué fracción será dispersada.

1.1.2. Tamaño

Las nanopartículas de metales nobles presentan propiedades físico-químicas y biológicas, propias de su tamaño nanométrico. El control del tamaño en los procesos de síntesis de nanopartículas es uno de los aspectos más importantes en la química de los materiales, así como en el campo ambiental y clínico.(Jimenez-Ruiz et al., 2015). En el caso de las aplicaciones clínicas, el tamaño de las partículas y la distribución de tamaño determinan, entre otros factores, la toxicidad, el destino biológico, la distribución in vivo y la capacidad de orientación de estos sistemas de suministro.

Es importante destacar que, incluso dentro del rango nanométrico, la variación de tamaño afecta fuertemente a la biodisponibilidad y el tiempo de circulación sanguínea de las nanopartículas. Por ello, presentan numerosas ventajas frente a las micropartículas. Por ejemplo, algunas nanopartículas pueden atravesar la barrera hematoencefálica, proporcionando una vía de entrada de agentes terapéuticos para enfermedades difíciles de tratar, como son los tumores cerebrales.(Oropesa-Nuñez and Jauregui-Haza, 2012).

Tras la administración sistémica, las nanopartículas con un diámetro inferior a 10 nm son eliminadas rápidamente mediante extravasación y aclaramiento renal. Las partículas cuyo diámetro oscila entre 10-70 nm pueden penetrar en pequeños capilares, llegando al torrente sanguíneo. Las partículas de diámetro entre 70-200 nm penetran en el torrente

sanguíneo, sin entrar en capilares, permaneciendo un tiempo más prolongado en circulación sistémica. Las de diámetro mayor de 200 nm son retenidas en el bazo y finalmente eliminadas por fagocitosis. Por ello, se suele considerar que el rango de diámetro óptimo para la administración de fármacos es de entre 10-100 nm (Goldberg et al., 2007).

1.1.3. Síntesis de las nanopartículas de oro

Las AuNPs pueden ser sintetizadas por diferentes métodos, admitiendo la conjugación una gran variedad de ligandos, lo que permite una gran flexibilidad en los procesos de síntesis. (Jimenez-Ruiz et al., 2015). Durante la síntesis en suspensión, la polidispersidad y la geometría son rigurosamente controladas mediante la adición de agentes reductores, como por ejemplo el citrato de sodio.(Croft, 2002).

La síntesis de coloides nanométricos se puede llevar a cabo mediante dos vías principales. Una de ellas es conocida como *top-down*, donde se obtienen nanoestructuras a partir de materiales macroscópicos. Por lo general, estos métodos involucran procedimientos físicos como la evaporación térmica, la preparación de clusters gaseosos, el depósito químico en fase vapor y la molienda o activación mecanoquímica (Nano, 2005) y una posterior estabilización, a través del uso de un agente protector coloidal. También se han descritos técnicas litográficas para el mismo fin. (Zhou et al., 2009).

Los métodos *top-down* más representativos son:

- a) **La evaporación térmica:** Se basa en calentar hasta la total evaporación el material de partida. Se realiza en una cámara de vacío en la que el vapor se condensa al pasar por una lámina fría, requiriendo en todo momento un control de las condiciones de crecimiento para que no se modifique la morfología del depositado.
- b) **El depósito químico en fase de vapor:** Dentro de una cámara de vacío o cerca de la superficie de un sólido se descomponen uno o varios compuestos volátiles, para dar lugar a la formación de un material en forma de capa delgada de tamaño nanométrico.
- c) **Clusters gaseosos:** Se utiliza un láser pulsado de alta potencia que producirá vapores atómicos metálicos que son acarreados en un gas inerte, y depositados sobre un óxido monocristalino u otro sustrato en condiciones de ultra-alto vacío.

- d) **Molienda de partículas:** Se realiza sobre partículas de tamaño macro o micrométrico, a través de molinos de alta eficiencia. Posteriormente, estas partículas se separan por medios físicos seleccionando el tamaño deseado.(Rao et al., 2004).

La segunda familia de procedimientos se conoce como *bottom-up*, y son con diferencia los más extendidos en la preparación de las nanopartículas. En ellos, la síntesis se realiza a partir de átomos o moléculas precursoras, siendo una de las vías, más importantes la reducción química de una sal metálica. Se utilizan agentes estabilizantes o protectores (como polímeros y surfactantes), los cuales realizan una doble función: controlar el crecimiento de la nanopartícula, y evitar la aglomeración.

Los métodos *bottom-up* pueden basarse en un enfoque termodinámico o de equilibrio o bien en un enfoque cinético. Los métodos termodinámicos se basan en generar una sobresaturación de la disolución que conduce a procesos de nucleación y subsiguiente crecimiento. La nucleación puede ser homogénea o heterogénea. La nucleación homogénea puede desarrollarse tanto en método líquido, como la síntesis coloidal por reducción de sales de metales nobles y la deposición electroquímica; gaseoso, como la síntesis en fase de vapor; o sólido, como la síntesis por segregación desde fase sólida. En el método de la nucleación heterogénea, la formación de la nueva fase tiene lugar sobre la superficie de un segundo material. Algunos ejemplos de síntesis según este mecanismo son la síntesis de nanopartículas de plata y oro sobre grafito pirolítico. (Yonezawa and Toshima, 1998; Zhou et al., 2009).

En el presente trabajo, las AuNPs protegidas por citrato se sintetizaron por una variante del método de Turkevich, es decir, a través de la reducción de un complejo de oro (HAuCl_4) por citrato sódico en fase acuosa.(P. C. Lee, 1982).

1.1.4. Aplicaciones de las nanopartículas de oro

Las AuNPs tienen varias propiedades físicas, químicas y biológicas, intrínsecas a su forma y tamaño nanométrico, que las hacen atractivas para aplicaciones en el campo de la medicina (véase Figura 3). El núcleo de oro de las nanopartículas se considera no tóxico; sin embargo, la biocompatibilidad de las soluciones en las que van disueltas resulta todavía un tema discutible. (Alkilany and Murphy, 2010). Las AuNPs pueden ser producidas en distintos tamaños y formas y pueden ser fácilmente funcionalizadas con un amplio abanico de ligandos (anticuerpos, polímeros, sondas de diagnóstico, fármacos, material genético, etc.). También se pueden incorporar en estructuras más grandes, como en el caso de las nanopartículas poliméricas o liposomas, que presentan grandes cargas, útiles para aplicaciones de diagnóstico o la encapsulación de medicamentos, para una posterior vectorización.

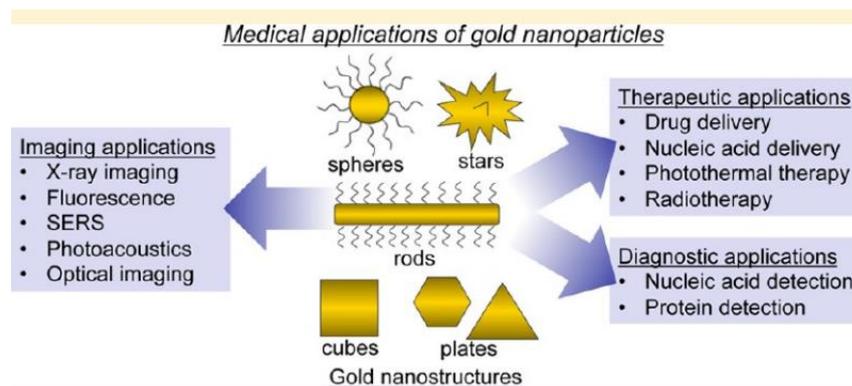


Figura 3. Aplicaciones de las AuNPs según su estructura y tamaño. (Mieszawska et al., 2013).

1.1.4.1. Evolución del oro coloidal a lo largo de la historia

El oro es uno de los metales que primero se descubrieron en su forma nanométrica. Es probable que el oro en estado coloidal fuese ya conocido en torno a los siglos V o IV a.C. en Egipto y China. Sus aplicaciones incluían fines médicos, como la “solución dorada” china, y el “oro líquido” indio. En la Antigua Roma también se utilizó el oro coloidal con fines decorativos, como se puede observar en la copa Lycurgus del siglo IV. (Jensen et al., 2018).

En la Edad Media, el oro coloidal se investigó y se utilizó por los alquimistas. El denominado “oro bebible” alcanzó una gran reputación como elixir curativo y se utilizó como tratamientos sobre una serie de enfermedades, por ejemplo, trastornos mentales, infecciones venéreas y cardíacas, disentería, epilepsia y tumores, empleándose asimismo para diagnóstico de la sífilis. El uso del oro coloidal en el ámbito medicinal se recoge de manera detallada en el libro “*Panacea aurea-auro potabile*”, escrito en 1618 por el filósofo y doctor en medicina Francisco Antonii.(Dykman et al., 2018).

Los primeros estudios científicos más rigurosos sobre el oro coloidal fueron llevadas a cabo en 1857 por Michael Faraday, quien se considera el fundador de la ciencia de los coloides metálicos. La contribución conceptual más importante de Faraday fue el reconocimiento de que, en las suspensiones coloidales, el oro está presente en estado metálico y no en disolución en estado de sal. Además, desarrolló métodos nuevos, tanto químicos como físicos, para la elaboración de oro coloidal, e investigó las propiedades ópticas de películas finas preparadas con suspensiones coloidales secas, obteniendo cambios reversibles de color de las películas bajo compresión mecánica. (Faraday, 1857).

En el siglo XX se publicaron una gran cantidad de métodos para la elaboración de oro coloidal, basándose principalmente en la reducción de las sales de oro a través de compuestos orgánicos reductores.(Dykman and Khlebtsov, 2018). En 1906, Zsigmondy describió el método de “sembrado y crecimiento”, basado en el control de las condiciones de reacción de manera que se inhiben la nucleación de nuevas partículas, por lo que la reducción de iones metálicos sólo da lugar al crecimiento de las pequeñas semillas coloidales.(Sharma et al., 2009) El método de síntesis química más conocido y utilizado en la actualidad es el que desarrolló Turkevich en 1940, donde el oro coloidal se reduce con citrato sódico, dando lugar a partículas homogéneas en un rango de tamaño comprendido entre 10-40 nm.(Turkevich J., Stevenson, 1951).

En 1971, se obtuvo un gran avance por parte de Faulk y Taylor asociado al uso terapéutico de nanopartículas de oro. En lo que se denominó “ La revolución en la inmunoquímica”, los autores describieron un método de conjugación de anticuerpos con oro coloidal para la visualización directa de los antígenos de superficie de las salmonellas mediante microscopía electrónica.(Page Faulk and Malcolm Taylor, 1971).

Durante los últimos 40 años se han realizado numerosos estudios con nanopartículas, tanto no funcionalizadas como funcionalizadas, para el reconocimiento de ciertas biomoléculas: proteínas, ADN, enzimas y anticuerpos, entre otros.(Dykman et al., 2018).

Actualmente se están desarrollando herramientas nanotecnológicas para la detección temprana de enfermedades, su tratamiento precoz personalizado y el seguimiento posterior de su evolución. Estos avances podrían dar lugar al desarrollo de sistemas de diagnóstico y proporcionar una mayor calidad de vida para los pacientes.

El uso de las nanopartículas de oro como herramienta de diagnóstico o biosensor cada vez toma mayor importancia. Por ejemplo, se han desarrollado detectores de ADN basados en el cambio de color de nanopartículas de oro, donde la detección se lleva a cabo a partir de la agregación. La conjugación de las nanopartículas marcadas con cadenas de ADN complementarias a las que se intenta reconocer, produciendo así una huella única, fácilmente identificable. Los grupos pioneros en la inmovilización de ADN en nanopartículas de oro son los de Alivisatos-Schultz en Berkeley y el de Mirkin-Letsinger en Northwestern.(1996 Alivisatos Organization of nanocrystal molecules using DNA.pdf, n.d.; Lechuga Laura, 2005; Storhoff et al., 1997).

Otra de las aplicaciones más características de las nanopartículas de oro es el reconocimiento antígeno-anticuerpo.(Dykman et al., 2018) Igualmente, se han formado bioconjugados de nanopartículas de oro con enzimas (Jia et al., 2002), lípidos (Burkett and Mann, 1996) y virus (Dragnea et al., 2003).

La lisozima es una proteína catiónicas a pH fisiológico, de carácter fuertemente básica, descrita por primera vez por Fleming en 1922.(Fleming, 2006) En los humanos, la lisozima tiene un papel muy importante frente a las infecciones, debido a su poder de destrucción de las paredes celulares de ciertas bacterias Gram-positivas por rotura del enlace β (1-4) entre el ácido N-acetilmurámico (NAM) y la N-acetilglucosamina del peptidoglicano (NAG) , debilitando así la pared celular.(Carrillo, 2013). Sin embargo, una producción excesiva de lisozima, detectable en orina y otros fluidos, como el plasma sanguíneo, puede ser un síntoma propio de leucemia monocítica y mielomonocítica, atribuyéndose su aparición en orina a su pequeño peso molecular que permite el paso por el riñón. Las leucemias son un conjunto de enfermedades caracterizadas por un desarrollo anormal del sistema leucocitario, aumentando los niveles de glóbulos blancos en sangre. (Elliott F. Osserman, M.D., 1966). Sin embargo, es importante señalar que la lisozimuria

puede también aparecer en pacientes con trastornos renales, tales como síndrome nefrótico o ciertas infecciones del tracto urinario.(Harrison et al., 2003). La lisoziuria asociada a leucemia monocítica y mielomonocítica fue encontrada en un rango entre 25 y 420 $\mu\text{g/ml}$ de lisozima. (Osserman et al., 1966).

2. Objetivos

Como se ha mencionado en la introducción, una producción excesiva de lisozima, detectable en orina y otros fluidos biológicos, puede ser un síntoma propio de leucemia monocítica y mielomonocítica. En el actual trabajo se pretende desarrollar un método colorimétrico para la detección temprana de estas enfermedades, utilizando nanopartículas de oro protegidas por iones citrato, como herramienta de diagnóstico o biosensor.

A fin de asegurar el perfecto funcionamiento del método, es preciso realizar la eliminación diferencial de la seroalbúmina humana, si la hubiera, en la muestra previamente a su análisis.

3. Materiales y métodos

3.1. Reactivos

Los reactivos utilizados fueron H₄AuCl₄ (520918), lisozima de clara de huevo (L6876), seroalbúmina humana (A9511) y citrato sódico (Na₃C₆H₅O₇, W302600), de Sigma Aldrich; cloruro sódico, (NaCl, 1.06404.1000) de Merck; borohidruro de sodio (NaBH₄, 163314.1608) de Panreac. Todos los reactivos eran de grado Anal. R. y se usaron sin purificación adicional.

Las disoluciones se prepararon con agua desionizada, siendo su conductividad menor de 10⁻⁶ S·m⁻¹.

3.2. Espectros de absorción de UV-vis.

Los espectros de absorción de las diferentes muestras de AuNPs se registraron usando un espectrofotómetro Cary 500 UVvisNIR, entre 400 a 800 nm y a temperatura ambiente. A efectos de ilustración, los colores se simularon realizando una conversión del espectro de absorbancia resultante a parámetros colorimétricos RGB.

3.3. Medidas de TEM.

Para la obtención de las imágenes de TEM, se depositó una gota (10 µl) de la suspensión de las AuNPs sobre una rejilla de cobre recubierta por una película de carbono, que se dejó secar durante 24 horas a temperatura ambiente. Las imágenes se obtuvieron en un microscopio Philips CM, a 200 Kv.

El análisis de las imágenes se llevó a cabo con el software *ImageJ*, con el cual se obtuvo el tamaño exacto de las nanopartículas. Posteriormente se usó el software *sigmaplot* para los análisis matemáticos de los resultados obtenidos.

3.4. Medidas de índice de refracción

El índice de refracción de las distintas muestras de orina se midió usando un refractómetro digital Abbe “WYA-1S”. Basado en la calibración de soluciones de índice de refracción conocido, el error absoluto en los índices de refracción fue estimado como ± 0.001 . Los experimentos se realizaron a una temperatura comprendida entre 22,8-23,5 °C.

3.5. Protocolo del método propuesto

Se recogieron muestras de orina de pacientes sanos y se le añadieron distintas concentraciones de lisozima conocidas. Las concentraciones de lisozima añadidas van desde 10^{-5} M (143,1 $\mu\text{g/ml}$) hasta 5×10^{-7} M (7,15 $\mu\text{g/ml}$). Luego se realizó una predilución 1:5, para minimizar la interferencia del color de la orina. En el análisis colorimétrico se llevó a cabo la mezcla de 400 μl de AuNPs (1.9×10^{-8} M) + 500 μl de agua + 400 μl de citrato ($1,16 \times 10^{-3}$ M) + 200 μl de la muestra de orina prediluida + NaCl (0,1 M) cantidad suficiente para observar el cambio de color. La adición fue llevada en ese orden. Se deja reposar un par de minutos hasta la aparición del cambio de color y, en su caso, se mide el espectro de absorbancia. Además, se realizó una muestra control sin lisozima en la muestra de orina, y un blanco para descartar que en las muestras no hayan posibles proteínas (AuNPs + agua + citrato + NaCl).

4. Resultado y discusión

4.1. Síntesis y caracterización de nanopartículas de oro

4.1.1 Síntesis de Turkevich

Las AuNPs protegidas por citrato se sintetizaron utilizando una variante del método de Turkevich, es decir, a través de la reducción de un complejo de oro (HAuCl_4) en disolución acuosa. Se prepararon 194 ml de una disolución de HAuCl_4 0.01% y 6 mL de una disolución de citrato 38.8 mM. La disolución de HAuCl_4 se calentó con agitación magnética, controlando la temperatura. (Turkevich J., Stevenson, 1951).

Cuando la disolución alcanzó los 80°C se añadió la disolución de citrato y se procuró mantener una temperatura estable en torno a 85°C. Tras la adición del citrato, la disolución comenzó a tornarse gris, adquiriendo seguidamente un color violeta muy oscuro. Al cabo de unos minutos la disolución se volvió rojo brillante. Después de este último cambio, se mantuvo el calentamiento durante 10 minutos más; una vez transcurrido este tiempo, se dejó en agitación la disolución a temperatura ambiente durante 24 h.

4.1.2 Caracterización de nanopartículas de oro

Gracias a la presencia de la banda SPR y su relación directa con el tamaño de las nanopartículas de metales nobles, podemos estimar el tamaño del sistema coloidal mediante espectroscopía de absorbanza.

En el caso de nuestra síntesis, se observa un máximo de absorción a 520 nm (véase Figura 3), por lo que, a priori, el tamaño medio se estimó en torno a los 15nm.

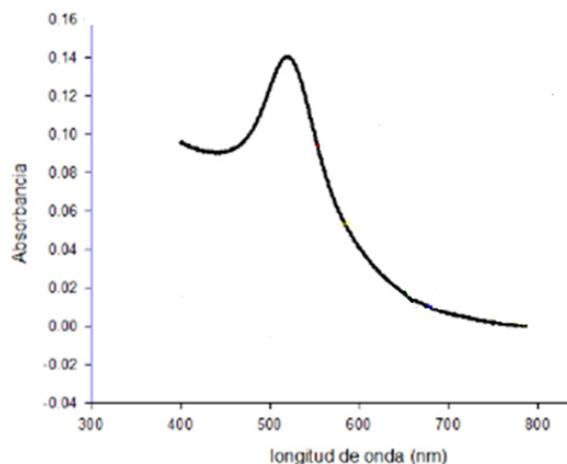


Figura 3: Espectro absorción de una suspensión de nanopartículas de oro. Dilución 1:10 de la madre.

Se tomaron imágenes de las partículas por Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM). El TEM permite determinar el tamaño, forma, estructura interna y, a través de difracción de electrones, la composición química de las nanopartículas.

A partir de la medida del diámetro de más de 200 nanopartículas, se calculó un tamaño medio y una distribución de tamaño, siendo el valor del primero de $17 \pm 1,5$ nm. (véase Figura 4). La dispersión obtenida fue menor del 15%, por lo que las disoluciones se consideran monodispersas.

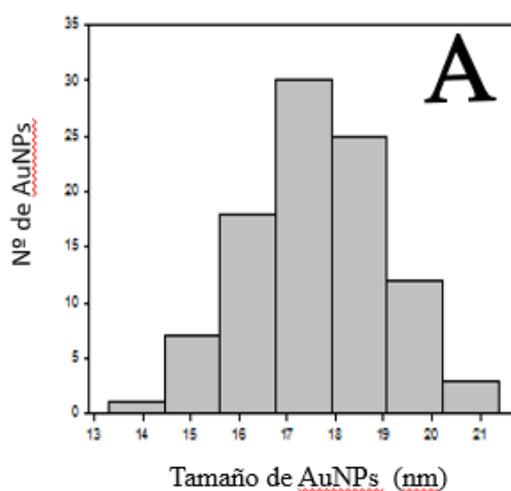


Figura 4: Histograma de la distribución de tamaños en la disolución de AuNPs.

4.2. Optimización de las condiciones de trabajo

4.2.1. Optimización de la concentración de sal.

En la figura 5 aparece la banda de absorbancia del plasmón superficial del oro coloidal en función de la concentración de cloruro sódico. Puede observarse claramente un desplazamiento de λ_{max} hacia valores superiores cuando la sal está presente en disolución. Además, para valores mayores de concentración de cloruro sódico se observa una inestabilidad por parte de las nanopartículas de oro, que tienden a la precipitación.

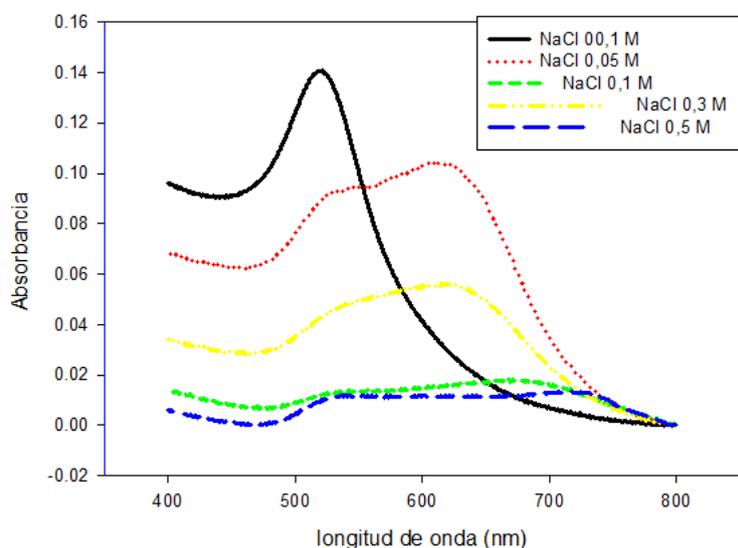


Figura 5: Evolución de la banda de plasmón superficial del oro coloidal en presencia de cloruro sódico en función de la concentración.

El *binding* del cloruro sódico a la nanopartícula neutraliza en parte sus cargas superficiales, provocando la agregación (desplazamiento de λ_{max} hacia el rojo). Esto causa la desestabilización de la disolución coloidal, haciendo precipitar las AuNPs. Se llevó a cabo el mismo procedimiento, utilizando sales de cloruro potásico, observándose el mismo comportamiento.

4.2.2. Estudio del desplazamiento y estabilidad de la banda de plasmón superficial en presencia de lisozima y en presencia de sal.

En la figura 7 se puede ver la banda de plasmón superficial del oro coloidal en presencia de lisozima, en función de la concentración. Puede observarse claramente un desplazamiento de λ_{\max} hacia valores superiores cuando la proteína está presente en disolución. (figura 7A)

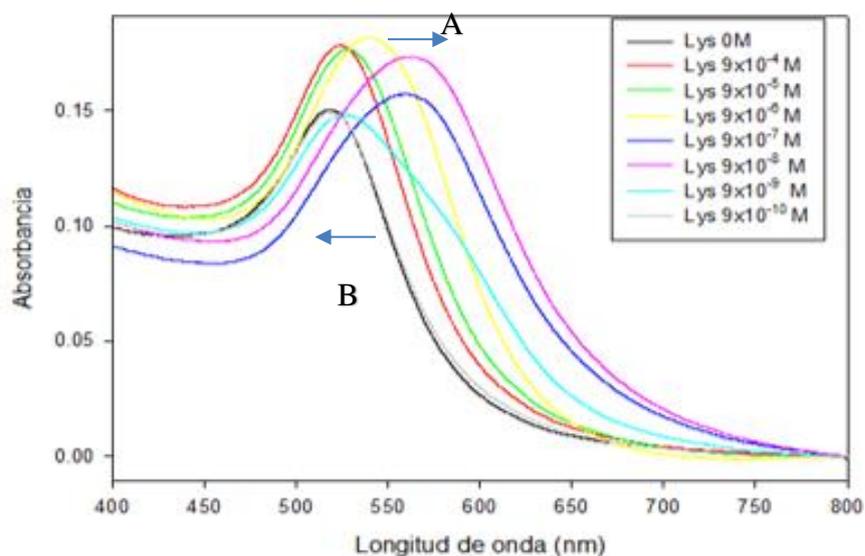


Figura 7: Evolución de la banda de plasmón superficial del oro coloidal en presencia de lisozima en función de la concentración.

Este hecho nos permite, a pH neutro, su detección colorimétrica con las AuNPs protegidas por iones citrato. El desplazamiento observado muestra cómo el *binding* de la lisozima a la nanopartícula neutraliza en parte sus cargas superficiales, tendiendo a neutralizar las AuNPs, provocando agregación (desplazamiento de λ_{\max} hacia el rojo) de éstas a través de fuerza London –van-der-Waals atractivas. Este hecho se observa hasta concentraciones de 9×10^{-7} M, donde el desplazamiento es hacia la derecha. Sin embargo, a concentraciones más altas (9×10^{-6} M hasta 9×10^{-4} M) se observa una regresión (figura 7B) correspondiente con el exceso de carga positiva produciendo estabilización de la disolución de AuNPs-Lisozima, por fuerzas de repulsión.

4.2.3. Comportamiento de las nanopartículas de oro protegidas con lisozima frente a cloruro sódico

En la presente parte experimental queremos estudiar el comportamiento de las AuNPs de oro protegidas con lisozima frente al cloruro sódico. Para ello utilizamos una concentración de lisozima correspondiente a una zona donde la disolución de AuNPs-Lisozima este estabilizada. La concentración utilizada de lisozima y AuNPs es de 8×10^{-4} M y 1.9×10^{-8} M respectivamente.

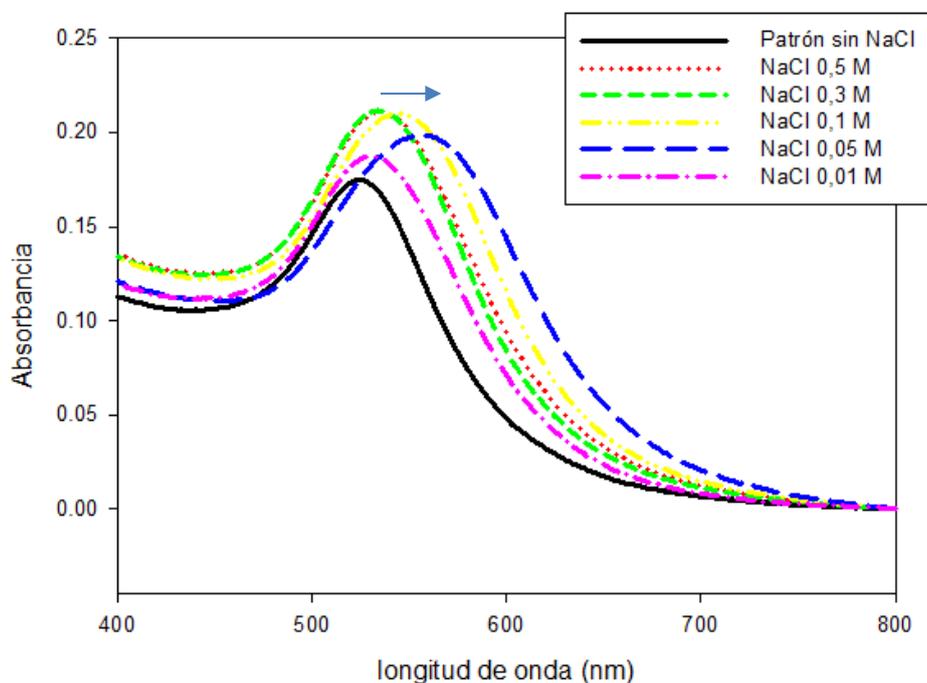


Figura 8: Espectro de absorción de lisozima con AuNPs en función de la concentración de cloruro sódico.

En la figura 8 aparece la banda de plasmón superficial de las AuNPs en presencia de una concentración constante de lisozima y variable de cloruro sódico. Claramente, se observa un desplazamiento de λ_{\max} hacia valores superiores a medida que aumenta la concentración de cloruro sódico. (desplazamiento de λ_{\max} del azul hacia el rojo). Estas concentraciones van desde cero hasta 0,05M.

Aunque se esperaba un claro desplazamiento hacia la derecha, al aumentar la concentración de sal, se observó que a concentraciones mayores se producía una disminución del grado de agregación.

Patrón	0,01M	0,05M	0,1M	0,3M	0,5M
--------	-------	-------	------	------	------

Figura 9: Colores simulados de la disolución de lisozima-AuNPs-NaCl, realizando una conversión del espectro de absorbancia resultante a parámetros colorimétricos RGB.

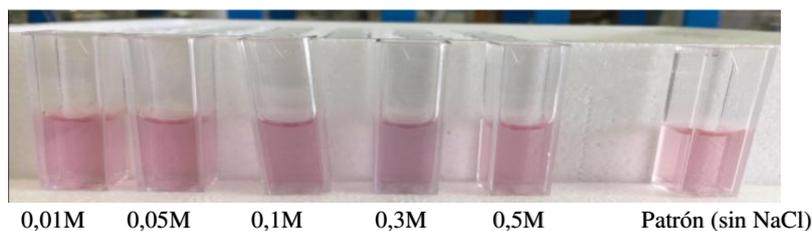


Figura 10: Colores de la disolución de lisozima-AuNPs-NaCl.

Se repitió el mismo modelo experimental cambiando el orden de adición. Se partió de una disolución de cloruro sódico, a la que se le añadió, por este orden, lisozima y AuNPs, observándose el mismo comportamiento de la banda de plasmón superficial. (Véase figura 11).

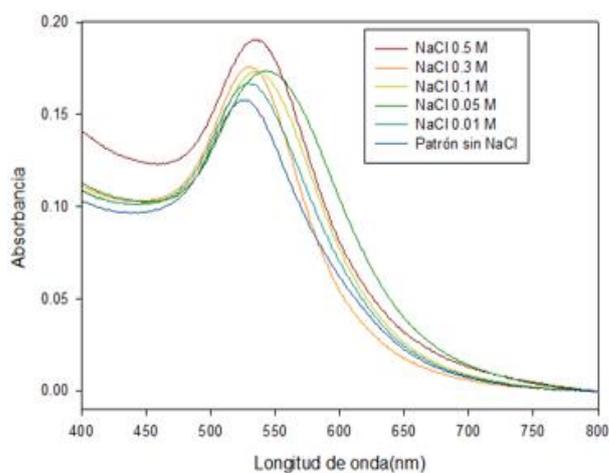


Figura 11: Espectro de absorción de lisozima con AuNPs cambiando el orden de adición.

4.3. Determinación del límite de detección de lisozima en orina

En el presente trabajo vamos a utilizar dicho comportamiento de la lisozima con las nanopartículas de oro para crear un método para detectar lisozima en orina mediante colorimetría. Presentamos un método directo, simple y novedoso que nos permite detectar a simple vista, en un rango micromolar, lisozima en orina.

El tamaño de las nanopartículas, la concentración de todos los reactivos involucrados y el orden de adición se han optimizado para desarrollar un sistema estable, sólido y confiable con señales positivas y negativas claramente distinguibles. Así como se ha optimizado la concentración de sal en la muestra de orina, previamente a la medida.

Con el fin de optimizar el método se realiza una dilución de la muestra previamente a la medida

Para conocer la cantidad de NaCl se realizó una muestra control, conteniendo nanopartículas en agua. Añadiremos gota a gota NaCl hasta observar un cambio de color. Este cambio de color se corresponde con la desestabilización de la disolución coloidal, provocado por el binding del cloruro sódico, haciendo precipitar las nanopartículas. La cantidad de NaCl adicionada será la misma en cada muestra y en el control.

Se obtuvieron diez muestras de orina de voluntarios sanos, las cuales fueron tratadas según el protocolo mencionado anteriormente. Con el fin de establecer pautas cuantitativas para la determinación de un umbral de color de respuesta positiva, se realizaron mediciones de absorbancias.

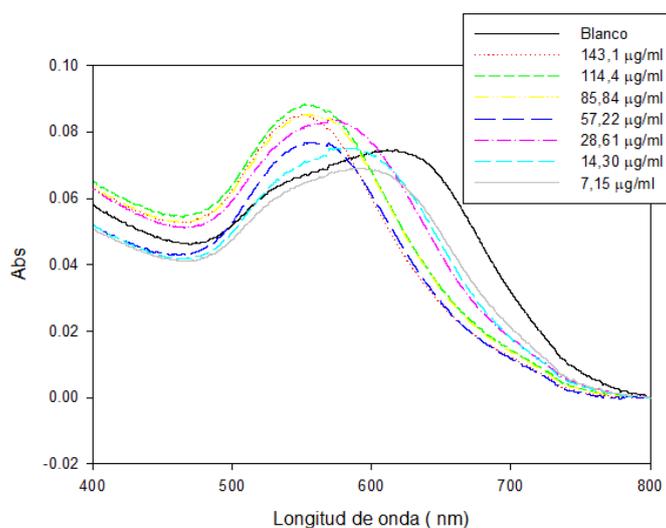


Figura 12: Evolución de la banda de plasmón superficial del oro coloidal en presencia de lisozima en función de la concentración en orina.

En la figura 12 se puede ver la banda de plasmón superficial del oro coloidal en presencia de lisozima, en función de concentraciones fisiológicas, en una de las muestras de orina. Para concentraciones pequeñas de lisozima la banda de plasmón superficial se encuentra desplazada hacia la derecha. Este desplazamiento muestra como el *binding* de la lisozima a las nanopartículas neutraliza en parte las cargas superficiales, provocando agregación. A modo ilustrativo se puede ver en la figura 13 como esta agregación corresponde a tonos azules. A concentraciones mayores de 57,22 $\mu\text{g/ml}$ la banda de plasmón superficial del oro coloidal se encuentra desplazado hacia la izquierda. Este desplazamiento regresivo corresponde con el exceso de cargas positivas, produciendo estabilización de la disolución, por fuerzas de repulsión. A modo ilustrativo se puede ver en la figura 13 como esta estabilización corresponde a tonos rojos. Este comportamiento regresivo hacia colores rojos nos permite la detección visual de lisozima en orina.

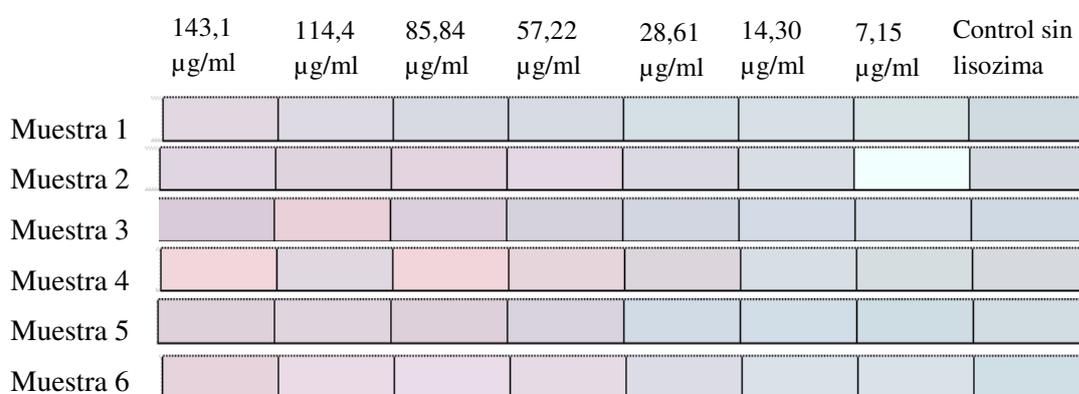


Figura 13: Colores simulados de las distintas concentraciones de lisozima presente en algunas de las muestras, tras la conversión del espectro de absorbancia resultante a parámetros colorimétricos RGB.

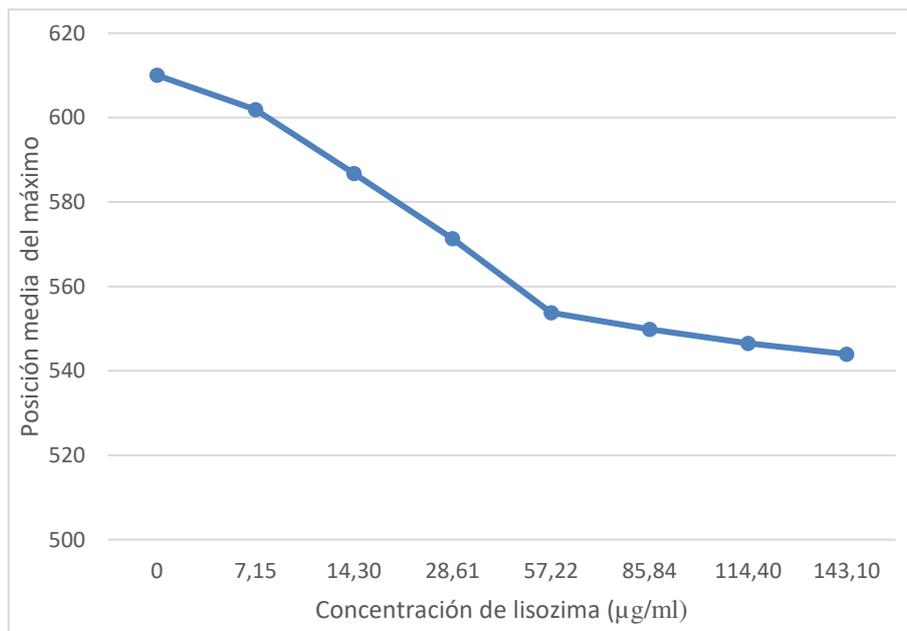


Figura 14: Representación de los valores medios encontrados de λ_{\max} a concentraciones de lisozima fisiológicas.

Se representa los valores medios encontrados de λ_{\max} a cada una de las concentraciones de lisozima. Se observa un desplazamiento de λ_{\max} hacia la zona de menor longitud de onda a medida que aumenta la concentración de lisozima. Sin embargo, se puede observar un segundo comportamiento a partir de 57,22 $\mu\text{g/ml}$ que corresponde con el exceso de cargas positivas, produciendo estabilización de la disolución, por fuerzas de repulsión, llevando λ_{\max} a la zona azul.

A título ilustrativo las medidas de absorbancias se convirtieron a parámetro colorimétricos RGB. Se puede observar a simple vista (véase figura 13), un color rojo (resultado positivo) para concentraciones de lisozima en orina de 57,22 $\mu\text{g/ml}$ o superiores después de la adición de NaCl. En ese punto tendremos el límite de detección, a partir del cual todas las muestras muestran una respuesta positiva frente a lisozima.

Las sales pueden ser uno de los interferentes que afecten a nuestro sistema, haciendo precipitar las nanopartículas de oro. Con el fin de optimizar el método se realiza una dilución de la muestra previamente a la medida. Para conocer la cantidad de sal nos basamos en el índice de refracción. Se trata de la relación existente entre la velocidad de la luz en el vacío ($c = 3 \times 10^8 \text{ m/s}$), respecto a la velocidad que lleva la luz en dicho medio A. ($n=c/v$). El valor de índice de refracción del medio es una medida de su “densidad óptica”: La luz se propaga en el vacío a velocidad máxima pero más lentamente en los demás medios, por lo tanto en todos ellos $n > 1$. Se tomó como referencia el índice de refracción del agua, siendo $n=1,333$. Se midió los índices de refracción de las distintas muestras de orina a una temperatura comprendida entre 22,8-23,5 °C. Se obtuvo el índice de refracción relativo (ver ecuación 1).

$$n_R = \frac{n_i}{n_{\text{agua}}} \quad 1$$

Donde, n_R es el índice de refracción relativo, n_i es el índice de refracción de las muestras y n es el índice de refracción del agua.

Se comprueba dependiendo del valor de n_R de la muestra en que rango se encuentra y se ajusta por dilución hasta que la muestra tenga un índice de refracción relativo inferior de 1,002. El blanco se diluye en la misma proporción que la muestra.

Tabla 1: Cálculo del n_R de la muestra antes y después de la dilución.

Muestra	n de muestra	n_R de muestra	n_R final
1	1,338	1,0038	1,0008
2	1,341	1,0067	1,0013
3	1,339	1,0052	1,0010
4	1,336	1,0030	1,006
5	1,341	1,0067	1,0013
6	1,337	1,0037	1,0007
7	1,340	1,0053	1,0011
8	1,337	1,0037	1,0007
9	1,338	1,0032	1,0006
10	1,40	1,0046	1,0009

En la anterior tabla se puede ver un resumen de los valores obtenidos tras la medición de cada muestra en el refractómetro y su relación nombrada anteriormente con la concentración de sal. De esta forma, podemos eliminar la concentración de sales en la muestra y compensar dicha concentración a través de diluciones.

4.3.1. Interferentes

4.3.1.1. Seroalbúmina humana (HSA)

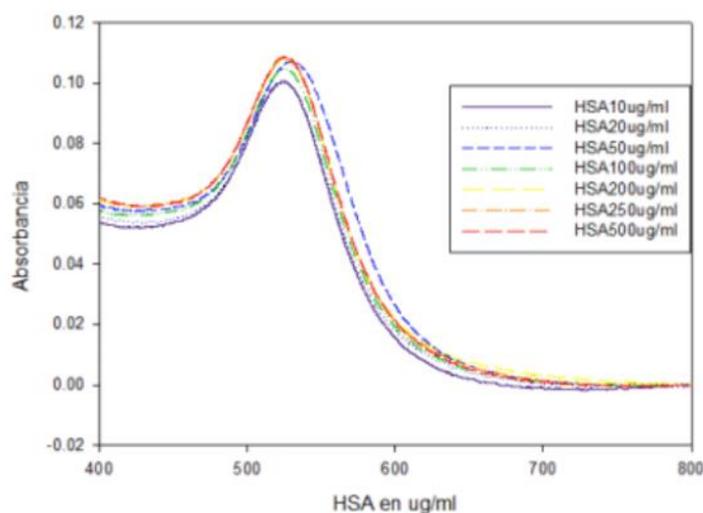


Figura 15: Evolución de la banda de plasmón superficial del oro coloidal en presencia de HSA en función de la concentración.

En la figura 15 se representa la banda de absorción de plasmón superficial del oro coloidal en función de la concentración de HSA. Las concentraciones de HSA utilizadas corresponden a valores fisiológicos reales. Puede observarse claramente un desplazamiento de λ_{\max} hacia valores superiores cuando la proteína está presente en disolución. Por ello, al igual que ocurre con la lisozima, la seroalbúmina, a pH neutro, puede ser detectada colorimétricamente con las AuNPs protegidas por iones citrato, por ser catiónica, aunque la intensidad del cambio de color es mucho menor. Esto hace que sea un inconveniente para el método propuesto de detección de lisozima, debido a que si en un mismo sistema están presentes las dos proteínas podían competir por la unión a las AuNPs, dando lugar a falsos positivos. Por eso, la HSA debe ser eliminada previamente

a la detección de lisozima. Para eliminar la seroalbúmina humana se empleó el método descrito por (Wang et al., 2010).

Se prepara una disolución hidroalcohólica con un 40% de la disolución de HSA de 500 µg/ml, y un 60% de etanol. Posteriormente se reduce a pH hasta 4,8-4,9 añadiendo ácido acético. La disolución resultante se incuba a 4 °C durante 1h. Pasada esa hora, se filtra con un filtro de membrana de 0,22 µm. El etanol reduce la solubilidad de la seroalbúmina, haciéndola precipitar, lo que permite su eliminación por filtración.

5. Conclusiones

Se ha optimizado un método directo, simple y novedoso que nos permite detectar a simple vista, en un rango micromolar, lisozima en orina mediante nanopartículas de oro, protegidas por iones citrato.

A la luz de los datos expuestos a lo largo de este trabajo, se hace evidente que nuestro método es capaz de detectar claramente las concentraciones de lisozima en orina dentro del rango asociado a leucemia monocítica y mielomonocítica.

A fin de asegurar el perfecto funcionamiento del método, es preciso realizar la eliminación diferencial de la seroalbúmina humana, si la hubiera, así como ajustar por dilución la concentración de sal presente en la muestra previamente a su análisis, según los métodos propuestos.

6. Bibliografía.

- A HG. Nanotecnología y nanopartículas Magnéticas: La Física actual en Lucha contra la enfermedad. *Rev Soluciones Postgrado EIA* 2007;101:321–7.
- Alkilany AM, Murphy CJ. Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: What we have learned so far? *J Nanoparticle Res* 2010;12:2313–33.
- Bhattacharya R, Mukherjee P. Biological properties of “naked” metal nanoparticles. *Adv Drug Deliv Rev* 2008;60:1289–306.
- Burkett SL, Mann S. Spatial organization and patterning of gold nanoparticles on self-assembled biolipid tubular templates. *Chem Commun* 1996:321–2.
- Carrillo W. Lysozyme: Antibacterial Activity and Allergenicity. *Actual En Nutr* 2013;14:314–26.
- Criado C, Castañeda D, Rosas RA, Sánchez BP. Fenómenos físicos de las nanopartículas de oro. *Celerinet* 2013;18:97–103.
- Croft SL. Colloidal gold. *Electron Microsc Rev* 2002;5:iii–iv. Cruz DA, Rodríguez MC, López JM, Herrera VM, Orive AG, Creus AH. Metallic Nanoparticles and Surface Plasmon : a Deep Relationship. *Av En Cienc e Ing* 2012;3:67–78.
- Daniel M-C, Astruc D. Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology. *Chem Rev* 2004;104:293–346.
- Dragnea B, Chen C, Kwak ES, Stein B, Kao CC. Gold nanoparticles as spectroscopic enhancers for in vitro studies on single viruses. *J Am Chem Soc* 2003;125:6374–5.
- Dykman L, Khlebtsov N, Dykman L, Khlebtsov N. Gold Nanoparticles in Biology and Medicine. *Gold Nanoparticles Biomed Appl* 2018;3:43–110.
- Dykman LA, Khlebtsov NG. Methods for chemical synthesis of colloidal gold. *Russ Chem Rev* 2018;88:229–47.
- E.F. Osserman, D.P. Lawlor, *J. Exp. Med.* 1966, 124, 921-52.
- Faraday M. X. The Bakerian Lecture. —Experimental relations of gold (and other

metals) to light. *Philos Trans R Soc London* 1857;147:145–81.

Fleming A. On a Remarkable Bacteriolytic Element Found in Tissues and Secretions. *Proc R Soc B Biol Sci* 2006;93:306–17.

Goldberg M, Langer R, Jia X. Nanostructured materials for applications in drug delivery and tissue engineering. *J Biomater Sci Polym Ed* 2007;18:241–68.

Harrison JF, Lunt G, Scott P, Blainey JD. Urinary Lysozyme, Ribonuclease, and Low-Molecular-Weight Protein in Renal Disease. *Lancet* 2003;291:371–5.

Jensen GR, Johnson RR, Washer KM. All that's gold does not glitter. *Financ Anal J* 2018;74:59–76.

Jia J, Wang B, Wu A, Cheng G, Li Z, Dong S. A method to construct a third-generation horseradish peroxidase biosensor: Self-assembling gold nanoparticles to three-dimensional sol-gel network. *Anal Chem* 2002;74:2217–23.

Jimenez-Ruiz A, Perez-Tejeda P, Grueso E, Castillo PM, Prado-Gotor R. ChemInform Abstract: Nonfunctionalized Gold Nanoparticles: Synthetic Routes and Synthesis Condition Dependence. *ChemInform* 2015;46:no-no.

K A, L S. Método de síntesis de nanopartículas de plata adaptable a laboratorios de docencia relacionado con la nanotecnología Fernando M . M artinez ,* E dgar Z ñiga G .,* 2013;6:101–8.

Kroll A, Pillukat MH, Hahn D, Schnekenburger J. Current in vitro methods in nanoparticle risk assessment: Limitations and challenges. *Eur J Pharm Biopharm* 2009;72:370–7.

Lechuga Laura. Nanomedicina: aplicacion de la nanotecnologia en la salud 2005.

Mie G. On the optics of turbid media, especially colloidal metal solutions. *Ann Phys Berlin* 1908;25:377–445.

Mieszawska AJ, Mulder WJM, Fayad ZA, Cormode DP. Multifunctional gold nanoparticles for diagnosis and therapy of disease. *Mol Pharm* 2013;10:831–47.

Nano M. Editor's Note: *Conserv Biol* 2005;19:2039–2039.

- Oropesa-Nuñez R, Jauregui-Haza UJ. Nanoparticles as drug carriers : characteristics and perspectives. *Rev CENIC Ciencias Biológicas* 2012;43.
- P. C. Lee DM. Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols. *J Phys Chem* 1982;86:3391–3395.
- Page Faulk W, Malcolm Taylor G. An immunocolloid method for the electron microscope. *Immunochemistry*, vol. 8, 1971, p. 1081–3.
- Rani S, Sharma AK, Khan I, Gothwal A, Chaudhary S, Gupta U. *Polymeric Nanoparticles in Targeting and Delivery of Drugs*. Elsevier Inc.; 2017.
- Rao CN., Muller A, Eds AKC. *Further Titles of Interest Nanoparticles Molecular Clusters of the Main Group Elements Electrochemistry of Nanomaterials*. 2004.
- Sharma V, Park K, Srinivasarao M. Colloidal dispersion of gold nanorods: Historical background, optical properties, seed-mediated synthesis, shape separation and self-assembly. *Mater Sci Eng R Reports* 2009;65:1–38.
- Storhoff JJ, Mucic RC, Mirkin CA. Strategies for Organizing Nanoparticles into Aggregate Structures and Functional Materials. *J Clust Sci* 1997;8:179–216.
- Turkevich J., Stevenson P. a Study of the Nucleation and Growth Processes I N the Synthesis of. *J Homepage* 1951;55.
- Wang X, Xu Y, Xu X, Hu K, Xiang M, Li L, et al. Direct determination of urinary lysozyme using surface Plasmon Resonance Light-Scattering of Gold Nanoparticles. *Talanta* 2010;82:693–7.
- Xia Y, Campbell DJ. Plasmons: Why Should We Care? *J Chem Educ* 2009;84:91.
- Yonezawa T, Toshima N. Bimetallic nanoparticles-novel materials for chemical and physical applications. *New J Chem* 1998;22:1179–201.
- Zhou J, Ralston J, Sedev R, Beattie DA. Functionalized gold nanoparticles: Synthesis, structure and colloid stability. *J Colloid Interface Sci* 2009;331:251–62.