

Síntesis y caracterización de nanopartículas de oro bioconjugadas para aplicaciones bioanalíticas

Pablo Martín Fagúndez Ferrón

Tesis de Doctorado

Presentada como uno de los requisitos para el título de

Doctor en Química

Programa de Posgrado en Química de la Facultad de Química, Universidad de la República Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas 2023

Síntesis y caracterización de nanopartículas de oro bioconjugadas para aplicaciones bioanalíticas

Tribunal:

Dra. Lorena Betancor

Dr. Ignacio Machado

Dr. Ricardo Faccio

Directores:

Dr. Eduardo Méndez

Dr. Juan Pablo Tosar

Síntesis y caracterización de nanopartículas de oro bioconjugadas para aplicaciones bioanalíticas

Pablo Martín Fagúndez Ferrón

Programa de Posgrado en Química de la Facultad de QuímicaUniversidad de la República Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas

> 2023 DIRECTORES: Dr. Eduardo Méndez¹ y Dr. Juan Pablo Tosar²

¹ Laboratorio de Biomateriales, Facultad de Ciencias, UdelaR ² Unidad de Bioquímica Analítica, Facultad de Ciencias, UdelaR

Resumen

Las nanopartículas de oro posiblemente sean una de las nanoestructuras con más uso a lo largo de la historia. Esto es en gran parte se debe a su ruta de síntesis sencilla, y a sus propiedades fisicoquímicas particulares donde se destaca su gran capacidad de absorción de luz y los cambios espectrales que surgen de la variación del tamaño y estado de agregación. Esto es particularmente usado en sensores de tipo colorimétrico e inmunocromatográfico, donde el evento de reconocimiento tiene lugar a través de alguna molécula inmovilizada en la superficie de la AuNP. Cuando esta molécula es de naturaleza biológica hablamos de bioconjugación y de biosensores. En este trabajo se exploró la inmovilización de diferentes proteínas (anticuerpos, BSA, estreptavidina y proteína A/G) sobre la superficie de AuNPs, y al mismo tiempo cada uno de los bioconjugados fue interrogado por diferentes técnicas experimentales a fin de evaluar la calidad del bioconjugado obtenido y las propiedades del sistema coloidal resultante. Entre las técnicas comúnmente empleadas en nanoquímica se destacaron por la contundencia de la información obtenida la espectrofotometría, microscopía electrónica de transmisión (TEM), dispersión dinámica de luz (DLS), potencial Z, estudio de la estabilidad coloidal y espectroscopía Raman aumentada por superficie (SERS). Al mismo tiempo ensayos de movilidad electroforética, exclusión molecular (SEC) o voltamperometría cíclica se destacaron también por su utilidad en la evaluación de protocolos de bioconjugación. De los conjugados más estables obtenidos se destacaron las AuNPs conjugadas a proteína A/G, las cuales fueron empleadas exitosamente en un inmunoensayo mediante TEM para detección de vesículas extracelulares (EVs). Además de posibilitar la detección de EVs, el inmunoensayo permitió caracterizar el nivel de expresión relativo de dos marcadores de superficie (tetraspaninas CD9 y CD81) de las EVs, obteniéndose resultados similares a técnicas ortogonales como la citometría de flujo y ExoView.

Por último, se evaluó la inmovilización de una proteína ingenierizada (SpyCatcher) modificada con una cisteína terminal, de cara a permitir su anclaje covalente vía formación de un enlace S-Au. Los conjugados AuNP-SpyCatcher pueden ser empleados a futuro como sistema de inmovilización covalente de proteínas que incorporen la secuencia SpyTag que se une de forma específica a SpyCatcher. Con las técnicas de caracterización optimizadas en este trabajo se obtuvo evidencia de la inmovilización de SpyCatcher sobre AuNPs, y de su capacidad de unión a una proteína conteniendo la secuencia SpyTag. Sin embargo, no fue posible obtener evidencia contundente de que la unión se realizara vía tiol de la cisteína, aunque se presentan ensayos preliminares que apuntan en dicha dirección.

Synthesis and Characterization of Bioconjugated Gold Nanoparticles for Bioanalytical Applications

Pablo Martín Fagúndez Ferrón Graduate Program in Chemistry, Faculty of Chemistry University of Republic Basic Sciences Development Program 2023 DIRECTORS: PhD. Eduardo Méndez¹ and PhD. Juan Pablo Tosar²

¹ Biomaterials Laboratory, Faculty of Sciences, UdelaR ² Analytical Biochemistry Unit, Faculty of Sciences, UdelaR

Abstract

Gold nanoparticles have been one of the most widely used nanostructures throughout history, largely due to their straightforward synthesis route and unique physicochemical properties, such as their exceptional light absorption capacity and spectral changes resulting from variations in size and aggregation state. These attributes are precious in colorimetric and immunochromatographic sensors, where recognition events occur through immobilized molecules on the AuNP surface. When these molecules are of a biological nature, it's called bioconjugation and biosensors. In this study, the immobilization of various proteins (antibodies, BSA, streptavidin, and protein A/G) on the AuNP surface was explored, and each bioconjugate was assessed using various experimental techniques to evaluate the quality of the bioconjugation. Spectrophotometry, transmission electron microscopy (TEM), dynamic light scattering (DLS), zeta potential, colloid stability studies, and surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) were the standout techniques in nanotechnology for the robust information they provided. Additionally, electrophoretic mobility assays, size-exclusion chromatography (SEC), and

cyclic voltammetry were also found to be useful for evaluating bioconjugation protocols. Among the most stable conjugates obtained, AuNPs conjugated to protein A/G stood out and were successfully employed in an immunoassay using TEM for the detection of extracellular vesicles (EVs). The immunoassay not only enabled EV detection but also allowed the characterization of the expression level of two surface markers (tetraspanins CD9 and CD81) on EVs, yielding results similar to orthogonal techniques like flow cytometry and ExoView. Finally, the immobilization of a recombinant protein (SpyCatcher) modified with a terminal cysteine for covalent anchoring via an S-Au bond was evaluated. The AuNP-SpyCatcher conjugates could serve as a covalent immobilization system for proteins containing the SpyTag sequence, which specifically binds to SpyCatcher. With the characterization techniques optimized in this study, evidence was obtained for the immobilization of SpyCatcher on AuNPs and its ability to bind to a protein containing the SpyTag sequence. However, compelling evidence for thiol cysteine mediated binding was not obtained, although preliminary trials pointing in that direction are presented. "Cuando creíamos que teníamos todas las respuestas, de pronto, cambiaron todas las preguntas"

Mario Benedetti

Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis orientadores, Eduardo Méndez y Juan Pablo Tosar por su paciencia y dedicación en todos estos años, donde cada uno desde su *expertise*, hicieron posible este trabajo, y de mi, un mejor investigador.

Sin ningún criterio de orden, me gustaría además extender mi agradecimiento a quienes colaboraron de diversas formas con la realización de este trabajo. Particularmente agradecer al Lic. Álvaro Olivera, por su disposición y aporte de su experiencia en los ensayos de microscopía electrónica, claves en los resultados de este trabajo. Agradecer también al Dr. Mariano Romero, por la amabilidad, tiempo y asistencia para la obtención de los espectros SERS. A la Mag. Paula Céspedes, por su colaboración en los ensayos por citometría de flujo, así como por el aporte de anticuerpos necesarios para el ensayo.

A los integrantes del Laboratorio de Biomateriales, con quienes he compartido mesada y en especial al Dr. Santiago Botasini, por el tiempo compartido y disposición a la hora de discutir resultados.

Especialmente también quisiera agradecer al Dr. Agustín Correa del Núcleo de Ingeniería de Proteínas del Instituto Pasteur de Montevideo, por el diseño y aporte desinteresado de algunas de las proteínas ingenierizadas empleadas en este trabajo.

A quienes colaboraron con las determinaciones de vesículas por ExoView y nanoFCM, Dra. Olesia Gololobova y Dr. Kenneth Witwer.

A mis compañeros desde hace más de 10 años de la Unidad de Bioquímica Analítica, y a los integrantes del grupo de Genómica Funcional, especialmente a el Mag. Marco LiCalzi & Mag. Valentina Blanco, por sus aportes en el cultivo de células, y en la purificación de vesículas para las determinaciones por ExoView / nanoFCM.

Quisiera también agradecer al PEDECIBA por el apoyo institucional y económico recibido,

y a la ANII y CAP (UdelaR) por la financiación de becas que me posibilitaron dedicarme a esta tesis. Además, agradecer a CSIC por la financiación recibida para realizar gran parte de este trabajo, mediante un proyecto de iniciación a la investigación del cual fui responsable y por el apoyo en la adquisición del equipo de MRPS mediante el programa de fortalecimiento de equipamiento 2021.

Tabla de Contenidos

| RI | ESUMEN | I |
|----|---|-----|
| AI | 3STRACT | 111 |
| A | GRADECIMIENTOS | VI |
| LI | STA DE ABREVIATURAS | IX |
| 1. | INTRODUCCIÓN | 12 |
| | 1.1 NANOTECNOLOGÍA Y NANOMATERIALES | 12 |
| | 1.2 NANOPARTÍCULAS METÁLICAS | 15 |
| | 1.3 GENERALIDADES DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ORO (AUNPS) | 25 |
| | 1.4 Estrategias de Bioconjugación de proteínas a AuNPs | 34 |
| | 1.5 CONSIDERACIONES FISICOQUÍMICAS SOBRE EL PROCESO DE ADSORCIÓN DE PROTEÍNAS A NPS. | 53 |
| | 1.6 TÉCNICAS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE AUNPS Y AUNPS BIOCONJUGADAS | 66 |
| | 1.7 APLICACIONES BIONANALÍTICAS DE LAS AUNPS | 92 |
| | 1.8 GENERALIDADES DE EXOSOMAS Y OTRAS VESÍCULAS EXTRACELULARES (EVS) | 98 |
| 2. | OBJETIVOS | 111 |
| | 2.1. OBJETIVOS GENERALES | 111 |
| | 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 111 |
| 3. | MATERIALES Y MÉTODOS | 113 |
| | 3.1 REACTIVOS Y SOLUCIONES | 113 |
| | 3.2 PROCEDIMIENTOS DE SÍNTESIS | 115 |
| | 3.3 PROCEDIMIENTOS DE CARACTERIZACIÓN DE AUNPS | 118 |
| | 3.4 OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE VESÍCULAS EXTRACELULARES (EVS) | 126 |
| | 3.5 CUANTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE EVS | 126 |
| | 3.6 ENSAYOS COLORIMÉTRICOS PARA DETECCIÓN DE EVS CON AUNPS | 129 |
| | 3.7 CARACTERIZACIÓN DE EVS CON AUNPS MEDIANTE TEM | 130 |
| | 3.8 ESTUDIO DE LA INMOVILIZACIÓN DE PROTEÍNAS INGENIERIZADAS SOBRE AUNPS | 132 |
| 4. | RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 134 |
| | CAPÍTULO 1: SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y MODIFICACIÓN DE AUNPS | 134 |
| | CAPÍTULO 2: NANOPARTÍCULAS DE ORO MODIFICADAS CON PROTEÍNA A/G PARA DETECCIÓN DE VESÍCULAS EXTRACELULARES (EVS) | 177 |
| | CAPÍTULO 3: INMOVILIZACIÓN DE LA PROTEÍNA SPYCATCHER Y SUS FORMAS MODIFICADAS SOBRE AUNP | 196 |
| 5. | CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS | 219 |
| 6. | BIBLIOGRAFÍA | 222 |
| 7. | ANEXOS | 255 |
| | ANEXO 1 | 255 |
| | ANEXO 2 | 317 |
| | ANEXO 3 | 335 |
| | TRABAJOS DERIVADOS O INVOLUCRADOS CON ESTA TESIS | 354 |

Lista de abreviaturas

| Ab | Anticuerpo |
|--------------------|---|
| AuNP | Nanopartícula de oro |
| AuNP-cit | Nanopartícula de oro recubiertas con citrato |
| AuNP-cit-Ab | Nanopartícula de oro modificada con anticuerpo |
| AuNP-cit-A/G | Nanopartícula modificada con proteína A/G |
| AuNP-cit-BSA | Nanopartícula modificada con BSA |
| AuNP-cit-Strp | Nanopartícula modificada con proteína estreptavidina |
| BSA | Seroalbúmina bovina |
| dтем | Diámetro de AuNP determinado por TEM (solo núcleo metálico) |
| dh | Diámetro hidrodinámico |
| $d_{ m hmed}$ | Diámetro hidrodinámico medio |
| DLS | Dispersión dinámica de luz |
| EDC | 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida |
| E _P | Potencial de pico (oxidación o reducción) |
| EVs | Vesículas extracelulares |
| FCM | Citometría de flujo |
| FTIR | Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier |
| ko | Constante de transferencia de carga heterogénea |
| LSPR | Resonancia superficial del plasmón localizada |
| MES | Buffer ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico, 5 mM pH=5. |
| MES _{low} | Buffer ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico, 5 mM, NaCl 5 Mm, pH=5 |
| MRPS | Sensado de pulsos resistivos por microfluídica |
| MUA | ácido 11-mercaptoundecanoico |
| nanoFCM | Citometría de flujo de nanopartículas |
| NP | Nanopartícula |

| NHS/s-NHS | N-hidroxisuccinimida/ N-Sulfo-hidroxisuccinimida |
|--------------------|--|
| РВ | <i>Buffer</i> fosfato 5 mM, pH = 7.4 |
| PB _{high} | <i>Buffer</i> fosfato 5 mM, NaCl 50 mM, pH = 7.4 |
| PBlow | <i>Buffer</i> fosfato 5 mM, NaCl 5 mM, pH = 7.4 |
| DDC | Buffer fosfato salino, NaH2PO4/ Na2HPO4 10 mM, NaCl 150 mM, KCl 2 mM, |
| 1 05 | pH = 7.4 |
| PI | Índice de polidispersión. |
| pI | Punto isoeléctrico |
| potencial-Ç | Potencial zeta |
| Rf | Relación de frente (electroforesis) |
| SEC | Cromatografía de exclusión molecular |
| SERS | Espectroscopía Raman intensificada por superficie |
| SP-IRIS | Sensado de partícula única por imágenes de reflectancia interferométrica |
| SpyCatcher | SpyCatcher wt |
| SpyCatcherCys(D) | SpyCatcher modificado con cisteína (forma dimérica) |
| SpyCatcherCys(M) | SpyCatcher modificado con cisteína (forma monomérica) |
| Strp | Estreptavidina |
| Tamb | Temperatura ambiente |
| TEM | Microscopía electrónica de transmisión |
| tGFP | Proteína verde fluorescente unida a spyTag |
| UV/VIS | Espectroscopía ultravioleta-visible |
| VC | Voltamperometría cíclica |
| Ve | Volumen de elución |
| $\Delta d_{ m h}$ | Cambio en d_h (en general con respecto a AuNP sin modificar) |
| $\Delta E_{ m p}$ | Diferencia de potencial de pico |

| 1. cpp | Posición de la longitud de onda máxima de la banda de resonancia |
|---------|---|
| ALSPK | superficial del plasmón |
| A 1 | Cambio en la posición de λ_{LSPR} (en general con respecto a AuNP sin |
| ΔΛ | modificar) |
| ELSPR | Coeficiente de atenuación molar a la longitud de onda λ_{LSPR} |
| % (v/v) | Porcentaje volumen/volumen |
| % (p/v) | Porcentaje masa/volumen |

1. Introducción

1.1 Nanotecnología y Nanomateriales

La Nanotecnología es un campo de investigación interdisciplinario que se centra en el estudio de las diversas estructuras de la materia a escala nanométrica. El prefijo "nano" se refiere a la milmillonésima parte de una unidad, en este caso, la milmillonésima parte de un metro. A esta escala, es posible manipular la materia directamente a nivel atómico y molecular ¹.

La Fundación de Ciencias de los Estados Unidos define la Nanociencia/Nanotecnología como la disciplina que estudia materiales que poseen determinadas propiedades clave:

- Al menos una de las dimensiones del sistema debe ser menor de 100 nm.
- Deben ser diseñadas utilizando metodologías que permitan controlar los atributos físicos y químicos de las estructuras a escala molecular.
- Propiedades de "construcción-en-bloque": Los sistemas nanoestructurados pueden combinarse para formar estructuras más grandes, pero conservan las propiedades de sus componentes constituyentes ².

La Nanotecnología se nutre de diversas disciplinas científicas clásicas, como la física, la química y la informática. Sus avances y la creación de nuevas estructuras tienen aplicaciones en una amplia variedad de campos, que abarcan desde la medicina hasta la agroindustria y las telecomunicaciones ^{1,2}. Las razones de la ganancia de relevancia en las últimas décadas se pueden resumir en que:

- las propiedades cuánticas de los electrones se ven afectadas por las variaciones en su entorno más cercano, que se define en un radio de unos pocos nanómetros. En los elementos nanoestructurados, donde la distribución se controla a escala atómica durante la síntesis, las propiedades macroscópicas y microscópicas del sistema, (ópticas, magnéticas y electrónicas) pueden variar sin cambiar la composición química original
- los nanomateriales tienen una relación superficie/volumen extremadamente alto y pueden exhibir una mayor densidad electrónica y conductividad en comparación con las estructuras macroscópicas. Estas propiedades hacen que sean adecuados para una amplia gama de aplicaciones, desde el almacenamiento de energía hasta el transporte de fármacos y el desarrollo de dispositivos electrónicos y semiconductores
- la escala de tamaño similar a la de moléculas biológicas, conlleva la posibilidad de la investigación y desarrollo de nanomateriales que pueden interactuar con estos sistemas en aplicaciones muy prometedoras. Esto permitirá la construcción de nanoestructuras artificiales y su vinculación con sistemas vivos para mejorar funciones específicas en células y tejidos ³.

La nanotecnología como disciplina científica tuvo sus raíces teóricas varios años antes de establecerse como un campo de investigación concreto. En 1959, el físico Richard Feynman presentó la famosa conferencia titulada "*There's Plenty of Room at the Bottom*," donde planteó la idea de que la manipulación de la materia a nivel de átomos no infringía ninguna ley de la naturaleza. Explicó que la falta de control en ese nivel se debía únicamente a limitaciones

tecnológicas en ese momento 4.

A partir de este razonamiento, Feynman también destacó cómo la manipulación a escala nanométrica podía influir en diversos fenómenos físicos y especuló sobre el potencial de las estructuras creadas con esta tecnología. Sin embargo, no fue hasta la década de los 80 que la nanotecnología dejó de ser una mera hipótesis. Esto se debió a la convergencia de varios avances técnicos y científicos. La invención del microscopio de efecto túnel (STM) en 1981, el desarrollo de la microscopía de fuerza atómica (AFM) en 1984 y el descubrimiento de los fulerenos en 1985 son tres eventos clave que marcaron el inicio de esta disciplina².

Una vez consolidada como una disciplina científica, la nanotecnología se fusionó con otras áreas de investigación existentes, como el estudio de interfaces y sistemas coloidales ⁵. A lo largo de las décadas siguientes, la nanotecnología experimentó un crecimiento constante y se convirtió en una disciplina con un gran potencial en la comunidad científica. En la actualidad, la investigación en nanotecnología abarca casi todas las disciplinas científicas tradicionales y se vislumbra como la base de la próxima revolución industrial. Sin embargo, el rápido desarrollo de estas tecnologías y sus implicaciones plantean importantes debates sobre regulaciones, aplicaciones y consecuencias sociales, éticas y ambientales. Organismos internacionales y gubernamentales, en colaboración con la comunidad científica, deben evaluar exhaustivamente el impacto en todos los aspectos, incluyendo los sociales, éticos, ambientales y políticos, con el objetivo de garantizar que la investigación en este campo beneficie a la sociedad en su conjunto^{1,2}.

1.2 Nanopartículas metálicas

Las nanopartículas metálicas (NPs) son las nanoestructuras más populares. El estudio de estos sistemas coloidales metálicos y sus aplicaciones precede a la consolidación de la Nanotecnología como disciplina científica. Durante varios siglos, las nanopartículas de oro (AuNPs), plata (AgNPs) y hierro, conocidas como coloides metálicos en ese momento, se utilizaron como pigmentos en vidrios y telas debido a sus propiedades ópticas y colores únicos. La síntesis de estas estructuras no difería mucho de los métodos químicos convencionales, lo que permitió el desarrollo de diversas técnicas previo a comprender plenamente los fenómenos físicos subyacentes a estos sistemas ¹.

Propiedades ópticas

En la década de 1850, Michael Faraday inició la investigación científica de los coloides metálicos, centrándose en los coloides de oro en particular. Su trabajo en esta área lo llevó a desarrollar un método de síntesis de nanopartículas de oro puro mediante la reducción con fósforo. Posteriormente, en 1861, las ecuaciones de Maxwell describieron las bases físicas de los fenómenos ópticos observados en las nanopartículas. Uno de los fenómenos más destacados es el de resonancia de plasmón. Cuando una partícula metálica esférica se irradia con una onda electromagnética, la oscilación del campo eléctrico genera una oscilación coherente de los electrones del metal, fenómeno que se denomina resonancia del plasmón por analogía al movimiento de los iones en el plasma (Figura 1) ^{1,6,7}.

El alcance de la resonancia depende de la relación superficie/volumen, la forma y el tamaño de las partículas. En objetos de escala macroscópica la gran mayoría de los electrones se encuentran confinados dentro de la red metálica, y como consecuencia la cantidad de electrones en la interface metal/ambiente no son suficientes para generar una resonancia significativa. En contrapartida, en objetos nanoestructurados, con geometrías específicas, y con una relación superficie/volumen mayor la incidencia de las ondas electromagnéticas en la extensa superficie origina una resonancia apreciable de los electrones, lo que se denomina *resonancia de plasmón superficial localizada* (LSPR, por su sigla en inglés) ^{7,8}. Aquellas NPs cuya banda del plasmón superficial se encuentra en la región visible del espectro se denomina "nanopartículas plasmónicas".



Figura 1. Esquema ilustrativo del fenómeno de resonancia del plasmón. Se representa la oscilación de la nube electrónica (azul) cuando una onda electromagnética (verde) incide sobre la NP (amarillo).

La frecuencia de vibración de la nube electrónica es llamada frecuencia del plasma, ω_{P} , que en el marco de la mecánica cuántica se denomina plasmón, y que se relaciona con su energía (E_{P}) de acuerdo con:

$$E_P = h\omega_p \tag{ec.1}$$

donde *h* es la constante de Planck.

Existen diferentes modos de oscilación de los electrones; en el más simple la nube de electrones se mueve paralela al campo generado y recibe el nombre de modo dipolar. Existe un modo cuadrupolar, en el que la mitad de los electrones se mueve en forma paralela al campo, y la otra mitad de forma antiparalela ⁶.

En 1904, Gustav Mie presentó soluciones algebraicas exactas para las ecuaciones de Maxwell, lo que permitió describir la dispersión de las ondas electromagnéticas por cuerpos esféricos que facilitaron el cálculo de coeficientes de extinción molar (σ_{ext}) y propiedades ópticas de las nanopartículas esféricas de oro, entre otros ^{1,7}. En general, cuando la longitud de onda de la radiación incidente es mayor al diámetro de la NP (λ >>d), la teoría de Mie predice con gran exactitud los fenómenos de absorción y dispersión observados para NPs metálicas, con predominio de modos de oscilación dipolares ⁶. En la aproximación dipolar, el coeficiente de extinción puede expresarse como:

$$\sigma_{ext} = \frac{9V\epsilon_m^{\frac{3}{2}}\omega\epsilon_i(\omega)}{c(\epsilon_r(\omega) + 2\epsilon_m)^2 + \epsilon_i(\omega)^2}$$
(ec.2)

donde *V* es el volumen de la partícula, *c* la velocidad de la luz, ω la frecuencia de la onda electromagnética incidente (relacionada a λ), ϵ_m la constante dieléctrica del medio externo, y ϵ_r y ϵ_i describen las componentes real e imaginaria respectivamente de la función dieléctrica del material de la partícula ^{6,9}.

De acuerdo a la ecuación 2, el fenómeno de resonancia (y por tanto de máximo σ_{ext}) se da cuando se minimiza el denominador, lo que ocurre con $\epsilon_i = -2 \epsilon_m$. Se desprende además que el tamaño, naturaleza del material, y el entorno inmediato de la NP influyen sobre el valor de σ_{ext} , y el valor de frecuencia al que se produce el fenómeno de resonancia ω_p ⁸. Por simplicidad, en el resto del texto llamaremos λ_{LSPR} al valor de longitud de onda asociado a dicha frecuencia.

Para el caso de NPs, que pueden desviar la luz incidente, al fenómeno de absorción se le debe sumar el fenómeno de dispersión. Para el sistema de medición utilizado en los espectrofotómetros, la IUPAC recomienda el uso del término "atenuación", aunque no sugiere un término específico para el coeficiente de absorción molar ¹⁰. Sin embargo, y dada la forma experimental por la que se obtienen estos valores, la denominación correcta sería "coeficiente de atenuación molar". En lo que sigue, nos referiremos a este coeficiente como \mathcal{E} LSPR.

Estabilidad de los sistemas coloidales de NPs

El modelo Derjaguin, Landau, Verwey y Overbeek (DLVO)

La teoría DLVO (por sus autores), propuesta de forma independiente por Derjaguin-Landau (1941) y Verwey-Overbeek (1948) explica los fenómenos de atracción y repulsión entre partículas coloidales que presentan cargas en sus superficies. Básicamente establece que la estabilidad de soluciones coloidales depende de la competencia entre las fuerzas de atracción de van der Waals y las repulsiones electroestáticas (por la carga superficial de las NPs), cuyo equilibrio mantiene a las partículas en suspensión, impidiendo su agregación ^{11,12}. La teoría DLVO se fundamenta en las siguientes premisas ^{13,14}:

- Las partículas tienen superficies moleculares sólidas, planas y sin defectos, excepto por las cargas superficial.
- El solvente tiene las mismas propiedades del líquido macroscópico en el seno de la solución, y solo se ve afectado en la interfaz con la partícula.
- Las fuerzas de van der Waals y electroestáticas de la doble capa eléctrica son independientes y acumulativas.
- La carga eléctrica en la frontera de la doble capa electroquímica se mantiene constante.
- Las fuerzas de repulsión debido a la doble capa se calculan mediante la ecuación no lineal de Poisson-Boltzmann.
- Las fuerzas atractivas de van der Waals entre los planos de las partículas se calculan suponiendo una densidad homogénea del líquido donde se dispersa el coloide.
- Se ignora el efecto de la tensión superficial.

Las fuerzas de van der Waals incluyen interacciones débiles como las de dipolo-dipolo, dipolo inducido y fuerzas de dispersión de London, que son responsables de la agregación en ausencia de un agente protector. La teoría DLVO sostiene que la estabilidad se logra cuando estas fuerzas se contrarrestan con fuerzas electroestáticas opuestas generadas por una doble capa electroquímica en la interfaz entre la partícula y la fase dispersante.

La estabilidad coloidal se define por la resultante de energías potenciales de atracción y repulsión, las cuales dependen de la distancia entre las partículas. La Figura 2 ilustra la energía potencial total (V_{Total}) en función de la distancia entre las partículas (r), con al menos dos mínimos energéticos posibles. El primer mínimo describe una floculación débil que

puede revertirse con facilidad. En estos casos, las partículas coloidales pueden coagularse, pero aún mantienen su identidad, lo que permite que el proceso sea reversible al cambiar las condiciones. El segundo proceso ocurre en un mínimo energético a distancias aún más cercanas entre las partículas. Cuando la barrera de energía que mantiene estable al coloide se supera, la agregación se vuelve irreversible y las fuerzas de repulsión electroestáticas ceden por completo, lo que lleva a la coalescencia de los agregados y la pérdida de la identidad de las partículas ¹⁴.



Figura 2. El gráfico esquematiza las dos clases de agregados en función del balance energético generado por las fuerzas de repulsión (electroestática) y las fuerzas atracción (van der Waals) de acuerdo a la ecuación: $V_{Total} = V_{VdW}(r) + V_c(r)$.

El balance de fuerzas de la teoría DLVO (V_{Total}) para dos partículas esféricas de diámetro 2*R* ubicadas a una distancia *r*, puede resumirse matemáticamente en dos ecuaciones ¹³:

$$V_C(r) = 4\pi\varepsilon\varepsilon_0\Psi_0^2 \frac{R-r}{r} \log\left\{1 + \frac{R-r}{r}e^{[-\kappa(r-2R)]}\right\} \qquad (ec.3)$$

$$V_{vdW}(r) = -\frac{H}{6} \left[\frac{2R^2}{r^2 - 4R^2} + \frac{2R^2}{r^2} + \log\left(\frac{r^2 - 4R^2}{r^2}\right) \right] \qquad (ec.4)$$

siendo $V_c(r)$ el potencial coulombimétrico (de repulsión de cargas) resultado de la doble capa electroquímica, Ψ_0 el potencial externo de la superficie de partículas, y κ una variable que describe el radio de la nube electrónica de la doble capa electroquímica determinada en la expresión de Debye-Hückel:

$$\kappa = \frac{e^2}{\varepsilon \varepsilon_0 k_B T} \sum_j n_j z_j^2 \qquad (ec.5)$$

donde ε y ε_0 representan la permitividad eléctrica del medio y del vacío respectivamente, k_B la constante de Boltzmann, T la temperatura absoluta y n_j y z_j la concentración y la carga de los iones de la solución, respectivamente.

Por su parte, las fuerzas atractivas de van der Walls ($V_{vdw}(r)$) quedan descriptas por la ecuación 4, donde *H* corresponde a la constante de Hamaker.

Aunque esta teoría aún se considera válida, otros estudios han señalado desviaciones cuando se trata de explicar la estabilidad de sistemas coloidales, lo que llevó a la incorporación de nuevos factores no considerados en la teoría DLVO clásica ^{15–17}. No obstante, para casos simples de estabilización basada en repulsiones electroestáticas, los modelos matemáticos descritos en las ecuaciones 3 y 4 continúan siendo útiles para interpretar los procesos de agregación de partículas.

En la siguiente sección, se presenta un ejemplo independiente de la teoría DLVO: la estabilización estérica.

Estabilización estérica

La estabilización estérica se produce cuando una molécula, generalmente de gran tamaño (polímeros, proteínas, ác. nucleicos), se une a las nanopartículas, evitando que estas se acerquen demasiado. A diferencia de la estabilización electrostática, que es termodinámica y depende de las fuerzas de atracción y repulsión entre las partículas, la estabilización estérica es principalmente cinética. La presencia de macromoléculas disminuye el movimiento aleatorio de las partículas, reduciendo la probabilidad de colisiones efectivas que puedan superar la barrera de energía potencial necesaria para la agregación del coloide ¹⁸.

La estabilización estérica es simple y en general ofrece la protección más resistente frente a la agregación ante cambios de pH, temperatura o fuerza iónica del medio. La desventaja radica en que cuando la floculación es un mecanismo deseado el proceso se dificulta.

Doble capa electroquímica y potencia Z

El concepto de la doble capa electroquímica es fundamental para entender la estabilidad de los sistemas coloidales. La doble capa, modela el comportamiento de superficies cargadas en la interface electroquímica entre un electrodo y el seno de la solución. El primer modelo planteado por Helmontz ha sufrido modificaciones desde entonces hasta el modelo actual conocido como modelo de Gouy-Champman-Stern ^{19,20}. Como las NPs metálicas presentan cargas superficiales, el mismo modelo se usa para explicar la formación de la doble capa alrededor de una NP. Este modelo plantea la existencia de dos capas en la

interface NP-seno de la solución: una interna compacta (capa de Stern) que contiene moléculas del solvente, moléculas adsorbidas sobre la superficie y/o iones de carga opuesta a la superficie cargada de la NP, y una segunda capa (capa difusa) formada por iones solvatados que se aproximan a la primera por atracción electrostática, pero que también experimentan efectos de movimiento térmico²¹. El balance entre estas fuerzas determina la distribución de iones y por tanto el potencial eléctrico.



Figura 3. Representación esquemática de la distribución de carga sobre una NP de carga negativa, donde se indican los límites de la capa de Stern y capa difusa. La diferencia de potencial entre la capa difusa y el seno de la solución se denomina potencial-ζ (potencial Z).

Este potencial por tanto tiende a disminuir a medida que nos alejamos de la superficie de la NP, alcanzando el mismo valor que el del seno de la solución a distancias grandes (normalmente considerado igual a 0 mV) A la diferencia de potencial entre el seno de la solución y la partícula a la altura de la capa difusa se la conoce como potencial-ζ (potencial Z), definiendo así la carga eléctrica neta de la partícula en solución (Figura 3)^{22–24}.

Factores que afectan la estabilidad de las soluciones coloidales

El fenómeno de agregación de las partículas, depende fundamentalmente de dos factores: el agente protector y el medio en el cual se encuentran las partículas. El poder estabilizante del agente protector dependerá de la naturaleza del mismo. A modo práctico se los pueden clasificar entre protectores de tipo: estérico, electroestático y electroestéricos. En general la protección estérica es mucho más fuerte que la estabilización electroestática, la cual cambia en función de las condiciones del medio (pH, fuerza iónica, etc.). En entornos acuosos, el pH de la solución es un factor significativo que puede influir en el potencial- ζ de las partículas y por tanto en su estabilidad. La carga eléctrica de las partículas se determinará por el estado de protonación de los grupos funcionales en el agente de recubrimiento, así como por las cargas superficiales adsorbidas. En este contexto, proporcionar un valor de potencial- ζ sin establecer las condiciones de medición no tiene sentido. Por definición, el valor de pH en el que el potencial- ζ es cero se llama punto isoeléctrico (pI); y en el contexto de la teoría DLVO, este punto es el de menor estabilidad del coloide.

Desde una perspectiva práctica, los coloides con potenciales entre aproximadamente +30 mV y -30 mV se consideran estables, fuera de estos valores la agregación es un fenómeno favorecido ^{25–28}. Estas consideraciones son válidas para ligandos que estabilizan electrostáticamente, excluyendo la estabilización estérica. Dicho de otra manera, es posible obtener soluciones coloidales estables a potenciales- ζ de 0 mV, siempre que la estabilización sea estérica.

Además del pH, es necesario establecer los valores de conductividad de la solución, ya que la fuerza iónica afecta el tamaño de la doble capa electroquímica y, por lo tanto, modifica el valor del potencial-ζ. La magnitud en que los aniones afectan la doble capa electroquímica depende del tipo de anión y sigue la serie de Hofmeister ²⁹. En todos los casos, la compresión de la doble capa electroquímica afecta la estabilidad del coloide, pudiendo disminuir las energías de separación de las partículas y dar lugar a la formación de agregados.

Además de los factores electrostáticos mencionados, la estabilidad del coloide puede modificarse por otras vías como son la adsorción sobre un precipitado, cuando la formación de un agregado arrastra a las partículas que están en suspensión o la formación de puentes moleculares entre las partículas, cuando las partículas están recubiertas con agentes con estructuras complementarias. Dentro de este último grupo se encuentran la mayoría de los sensores químicos basados en el uso de nanopartículas ^{30,31}.

Por último, un efecto de "añejamiento" de las soluciones coloidales se observa a periodos largos de tiempo. Esto se debe a un fenómeno conocido como maduración de Ostwald, en la cual partículas de menor tamaño coalescen con otras de mayor tamaño. Esto se explica por el desbalance termodinámico existente debido a la gran área superficial existente en los sistemas coloidales, cuya energía asociada puede disminuirse si se logra reducir el área total de la fase dispersa ³².

1.3 Generalidades de las nanopartículas de oro (AuNPs)

Dentro de los elementos capaces de formar nanoestructuras, las nanopartículas de oro

(AuNPs) han sido de los sistemas más usados y estudiados. Sus inusuales propiedades ópticas, sus propiedades dependientes tanto del tamaño como de la forma, sumado a la sencillez de su síntesis, así como su gran estabilidad química, las han situado como modelo de investigación de varios fenómenos. Estas propiedades también han permitido su aplicación e incorporación en varias disciplinas tecnológicas, como la microscopía electrónica, desarrollo de nuevos materiales y sensores para metales, moléculas orgánicas y biomoléculas ^{5,33}. El número de publicaciones encontradas en una búsqueda rápida con el término "gold nanoparticles" en la base de datos ScienceDirect y su comparación con la búsqueda de otras nanopartículas metálicas (Figura 4) muestra el destaque de las AuNPs en la investigación actual.



Figura 4. Número de publicaciones en la base de datos de ScienceDirect bajo el término "metalnanoparticles". Consulta realizada el 29/09/2023. AuNP: nanopartícula de oro, FeNP: nanopartícula de hierro, SiNP: nanopartícula de silicio, AgNP: nanopartícula de plata, PtNP: nanopartícula de platino, CuNP, nanopartícula de cobre.

<u>Síntesis de AuNPs</u>

Se encuentran disponibles una diversidad enorme de métodos de síntesis de AuNPs, sin embargo, la mayoría de ellos comparten el mismo principio químico: se parte de una solución conteniendo iones Au⁺³ (o Au⁺¹) y se realiza una reducción controlada para generar Au⁰. Las condiciones del medio de reacción, la naturaleza y concentración del agente reductor determinan generalmente el tamaño y forma de las AuNPs y con ello sus propiedades. En todos los casos es necesario además la presencia en la mezcla de reacción de un agente estabilizante, que recubra las AuNPs formadas y mantenga la estabilidad del sistema coloidal ^{1,34}.

El método de síntesis más difundido es el desarrollado inicialmente por J. Turkevich en 1951, y mejorado por G. Frens en la década de los 70s, que es universalmente conocido como método de Turkevich-Frens, o simplemente método de Turkevich ^{35,36}. En forma simple, el método parte de una solución acuosa de Au⁴³, (derivados del ácido tetracloroáurico, HAuCl₄), la cual se calienta a 100 °C y se agrega citrato de sodio como agente reductor (Na₃C₆H₅O₇). Visualmente la solución amarrillo pálido de partida se transforma rápidamente a un rojo-bordó intenso pasando en su desarrollo intermedio por un color azul oscuro. En este caso, el mismo citrato (o productos de su oxidación) actúa como agente estabilizante de las AuNPs formadas en la reacción ^{37,38}. La alta energía del sistema (consecuencia del calentamiento), el exceso de agente reductor y el tiempo largo de reacción, determinan que la reacción de Turkevich esté bajo control termodinámico, y por tanto la reacción genera AuNPs esféricas, la forma geométrica más estable termodinámicamente.

El método de Turkevich permite obtener AuNPs de diámetros comprendidos entre 5 y 150 nm, variando la proporción molar [HAuCl₄]/[citrato]. Frens (y más adelante otros autores) estudió por primera vez este efecto, demostrando que el diámetro de las AuNPs obtenidas aumenta cuanto menos agente reductor se añade ^{35,37,38}. El pH es otro factor que determina el diámetro medio de las AuNPs obtenidas, fundamentalmente porque controla la disponibilidad de diferentes complejos de Au⁺³, y los estados de protonación del citrato, lo que influye en las rutas de reacción preferenciales ^{38–41}.

A pesar de ser un método ampliamente usado y estudiado, el mecanismo detrás de la formación de AuNPs por esta técnica de síntesis continúa siendo objeto de debate ^{39,42,43}. Las primeras hipótesis planteadas por Turkevich y Frens, proponían que la síntesis sigue el modelo de LaMer, el cual se basa en dos etapas separadas. Una primera de formación explosiva de núcleos de Au⁰, seguida de una segunda etapa de crecimiento controlado por difusión, de los núcleos (o semillas) formados previamente ^{44,45}.

A pesar de ser el mecanismo más aceptado, estudios posteriores de Polte y Mikhlin, mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) y espectroscopía ultravioletavisible (UV/VIS) detectaron la presencia de cadenas de AuNPs en la etapa de nucleación, lo que contrariamente a la teoría de LaMer sugirió que las AuNPs se formarían a partir de la subdivisión de estructuras más grandes más que por crecimiento de núcleos ^{46,47}. Si bien este mecanismo propuesto por Mikhlin es compatible con los cambios de coloración observados durante la síntesis (no así el mecanismo de LaMer), cuenta con detractores que aseguran que los agregados observados son artefactos de la preparación de muestra (especialmente durante la observación por TEM) ^{48,49}.



Figura 5. A: Representación del dispositivo de síntesis de AuNP. B: AuNPs estabilizadas electrostáticamente por moléculas de citrato adsorbidas. C: Esquema del mecanismo propuesto para la síntesis de AuNPs. Al inicio se forman núcleos pequeños, que a medida que aumentan su tamaño tienden a formar grandes agregados, que finalmente se desensamblan formando las AuNPs finales. Los recuadros de colores indican la coloración de la solución durante el proceso de síntesis y su correspondencia con el mecanismo propuesto. Adaptado de ⁴¹.

En un trabajo de nuestro grupo analizando la mezcla de reacción a tiempos cortos por dispersión dinámica de luz (DLS) y UV/VIS, y en concordancia con resultados de otros investigadores, se planteó una nueva explicación que apoya tanto los defensores como detractores del modelo de LaMer. Según la evidencia experimental, los núcleos iniciales se formarían rápidamente, pero tenderían a formar agregados en las etapas iniciales de la síntesis, que luego se separarían para dar lugar a las AuNPs finales. A diferencia del mecanismo de Mikhlin, estos núcleos iniciales no coalescerían, sino que permanecen cercanos, conservando su identidad (Figura 5)⁴¹.

Fisicoquímica de las AuNPs

Las coloración rojo-intensa de las soluciones coloidales de AuNPs resultantes de la síntesis de Turkevich quizás sean la propiedad óptica más llamativa, más aun considerando que la concentración de AuNPs se encuentra en el orden de 10⁻⁹ M (nM). Para estas soluciones, el valor del coeficiente de atenuación molecular a la longitud de onda donde se produce el efecto de resonancia del plasmón (*ELSPR*) determinado por diferentes aproximaciones (Ver Anexo 1) suele encontrarse en el orden de 10⁸ M⁻¹ cm^{-1 50-53}.

Los espectros de adsorción están fuertemente determinados por el tamaño, típicamente la reacción con las proporciones empleadas por Turkevich da origen a NPs esféricas, cuya media de diámetro poblacional se encuentra entre 13-15 nm. Estas NPs producen espectros donde la banda de plasmón (λ_{LSPR}) se ubica entre los 520 a 525 nm (Figura 6). Diferentes trabajos con simulaciones a partir de las soluciones matemáticas de Mie, y medidas experimentales muestran que a medida que el diámetro de la NP aumenta, el valor de λ_{LSPR} se mueve a longitudes de onda mayores ^{50,54,55}. Macroscópicamente esto se observa como transiciones de color que van desde el rojo intenso, al violeta-azulado, pasando por tonalidades de rojo menos intensas según el tamaño de NP obtenido.



Figura 6. A: Espectros UV/VIS característicos para soluciones de AuNPs (de entre 10-20 nm) dispersas (rojo), coaguladas (violeta) y coalescidas (azul). B: Representación de los diferentes estados de agregación de las AuNPs, y el aspecto macroscópico y microscópico de la solución.

Para soluciones de AuNPs de diámetro definido, el espectro presenta un solo máximo en λ_{LSPR} , pero esta forma puede variar por la presencia de AuNPs no esféricas, o con el grado de dispersión de tamaño poblacional, que influye en el valor del ancho medio de pico (FWHM) ⁵⁶.

Las descripciones espectrales anteriores aplican a sistemas coloidales con AuNPs estables, aisladas y recubiertas por algún agente estabilizante, en donde el entorno de cada AuNP no se ve alterado. Sin embargo, como prevé la propia teoría de Mie (ecuación 2), a medida que dos AuNPs individuales se acercan, el perfil espectral de la solución coloidal sufre modificaciones. Específicamente lo que sucede es que la presencia de la otra NP modifica los valores de constante dieléctrica del medio externo (ε_m), lo que tiene una relación directa con los coeficientes de atenuación del plasmón (ε_{LSPR})⁶. Por ejemplo, para las AuNP de entre 10 y 20 nm, que presentan un máximo de plasmón en el entorno de 520 nm, se observa que a medida que se acercan, la intensidad de esta banda disminuye mientras que aumenta de forma más o menos homogénea la absorción a longitudes de onda entre 550 y 750 nm. Como resultado, macroscópicamente se observa una transición del rojo al violeta-azulado (cuanto más azul, más agregación) (Figura 6) ^{57,58}.

La agregación se puede inducir mediante la adición de un electrolito fuerte. Para el caso de las AuNPs recubiertas con citrato, la agregación se logra a concentraciones de electrolito muy bajas (≈ 5 mM). Esto se explica dado que la presencia de contraiones en solución neutraliza la carga negativa de las moléculas de citrato adsorbidas y, por tanto, elimina la repulsión electrostática que mantenía el sistema coloidal estable. Adicionalmente algunas moléculas de citrato (ionizadas) son removidas (por ser un ligando lábil) y pasan a interaccionar con los iones de carga opuesta en solución, lo que en conjunto provoca el acercamiento y colapso de varias AuNPs en una única macroestructura (coalescencia) ^{59,60}.

Como se mencionó anteriormente, en otras formas de agregación, las AuNPs pueden acercarse sin entrar en contacto directo, y mantener cada una su identidad (coagulación), lo que a priori es un estado reversible. En este caso es necesario su recubrimiento con algún agente que propicie la interacción entre AuNPs, sin embargo, este agente debe conformar una capa lo suficientemente delgada como para permitir el acoplamiento de plasmones. En algunos trabajos con simulaciones de sistemas de AuNPs, esta distancia mínima en la que una AuNP se ve afectada por la cercanía de otra (y por tanto se observan cambios en la posición del plasmón) se sitúa en el entorno de 10 nm ^{61,62}.

Otra de las propiedades por las que las AuNPs son interesantes es que presentan la

posibilidad de ser modificadas en su superficie (vía enlaces covalentes entre los átomos de la superficie y determinadas especies químicas). Este proceso, conocido como derivatización (o funcionalización), permite la creación de nuevas estructuras, con propiedades únicas y novedosas surgidas de la asociación de la nanopartícula y la molécula unida a ella. A través de la derivatización, es posible funcionalizar a la nanopartícula y lograr sistemas adaptables a varias funciones, como el reconocimiento molecular o la promoción de la formación de aglomerados ^{59,60}.

Las AuNPs pueden derivatizarse fácilmente con grupos tiol (-SH) a través de la formación de enlaces covalentes entre los átomos de oro de la superficie de la nanopartícula y el átomo de azufre del grupo funcional. La presencia del grupo tiol en determinadas moléculas orgánicas y biomoléculas permite construir las estructuras mencionadas y funcionalizar a la nanopartícula con una especie de interés ^{63,64}.

Si la molécula a unir es una biomolécula, el proceso se suele conocer como biofuncionalización o bioconjugación, y si las biomoléculas unidas a la nanopartícula tienen afinidad por otras especies químicas o biológicas es posible promover la formación de agregados de AuNPs a través del reconocimiento y la unión de estos elementos ^{65,66}. Esto usualmente requiere que los analitos responsables de inducir la agregación sean multiméricos, con varios sitios de reconocimiento por molécula. El acoplamiento entre las biomoléculas derivatizadas produce el acercamiento espacial de las AuNPs, y como consecuencia, el cambio de color del sistema coloidal. Este fenómeno de acoplamiento y cambio de color a nivel macroscópico es el principio en el que se basan la mayoría de los sensores colorimétricos que emplean AuNPs.

1.4 Estrategias de bioconjugación de proteínas a AuNPs

La mayoría de las aplicaciones en estrategias de detección basadas en AuNPs, requieren de la modificación de la superficie de la NP. Principalmente estos cambios buscan darle a la NP una nueva propiedad o posibilitar la interacción con analitos de interés de forma selectiva o específica. Dentro del campo del bioanálisis, las moléculas más empleadas son los polímeros de alto peso molecular como polietilenglicol (PEG) o biomoléculas, tales como ácidos nucleicos, proteínas o carbohidratos. Dentro de las proteínas, las más frecuentemente empleadas son las inmunoglobulinas (en adelante: anticuerpos, "Ab") dada su gran especificidad por antígenos de interés, aunque enzimas y receptores celulares son también objeto de inmovilización ⁶⁵.

La conjugación (o bioconjugación si hablamos de biomoléculas) busca inmovilizar la molécula de interés sobre la superficie de la NP, manteniendo la estabilidad de la misma, así como la estructura y funcionalidad de la molécula ⁶⁷. Muchas estrategias pueden ser encontradas en la literatura, sin embargo, pueden agruparse en términos generales en dos categorías: A. Inmovilización covalente, y B. Adsorción física ⁶⁸.

Inmovilización covalente

La estrategia de inmovilización covalente se basa en la capacidad de algunos grupos funcionales de reaccionar bajo ciertas condiciones con grupos presentes en las biomoléculas, formando un enlace covalente ⁶⁹. En la Tabla 1, se reúnen algunas de las estrategias químicas más usadas.


Tabla 1. Representación de algunas de las estrategias químicas de conjugación covalente de biomoléculas a NPs. Adaptado de 69

De todas las estrategias, una de las más empleadas es la de activación química de la superficie vía carbodiimida, dado que para la inmovilización de proteínas no requiere la incorporación de grupos funcionales a la misma, al anclar las biomoléculas vía aminas primarias. Brevemente la reacción se desarrolla a partir de grupos carboxilo expuestos sobre la NP, que son activados empleando 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida hidrocloruro (EDC). El agregado de N-hidroxisuccinimida (NHS) contribuye a la formación de un éster semi-estable capaz de reaccionar con aminas primarias formando así un enlace tipo amida (Figura 7). La variante N-hidroxisulfosuccinimida (sulfo-NHS) suele ser preferida por otorgar mayor estabilidad al sistema coloidal, debido a la formación de NPs de carga negativa, más fácilmente solubles en medio acuoso. Si bien el paso de adición de NHS (o sulfo-NHS) no es necesario para la formación del enlace amida con las aminas de la proteína, su agregado contribuye a una mayor eficiencia de la reacción debido a que el intermediario resultante de la activación con EDC es extremadamente inestable, y se hidroliza fácilmente ⁷⁰. La estabilidad de los ésteres de NHS (o sulfo-NHS) suele ser de horas a minutos dependiendo del pH. Por ejemplo, la vida media se encuentra entre 3-4 hs a pH 7, siendo de menos de 10 min para pH \ge 8. Es por ello que la reacción de activación suele ser eficiente en rangos de pH comprendidos entre 4.5 a 7.5, en soluciones amortiguadoras ("buffer") libres de grupos carboxilo. Se suele emplear para tal fin soluciones *buffer* 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES) en la etapa de activación con EDC y solución buffer fosfato salino (PBS) para la esterificación con sulfo-NHS y reacción con aminas primarias. El éxito de la reacción queda en primer lugar determinado por el grado de exposición que tengan los grupos amino de la biomolécula, normalmente derivados de cadenas laterales de residuos de lisina en el caso de proteínas, así como de su extremo amino-terminal 71-73.



Figura 7. Esquema de reacción para la conjugación de proteínas a NPs vía la química de la carbodiimida.

Las estrategias de inmovilización covalente (mostradas en la Tabla 1 y Figura 7) conllevan la modificación de la superficie de la NP a fin de introducir los grupos funcionales reactivos. Este paso se conoce como funcionalización de la NP, y se puede lograr mediante varias estrategias ⁶⁹.

La funcionalización puede realizarse durante la síntesis de las NP, incorporando el agente de recubrimiento en alguna de las etapas de formación, contribuyendo a la estabilidad de la solución coloidal, o puede realizarse posteriormente a la síntesis, en un proceso que se conoce como intercambio de ligando, en el cual la NPs debe ser incubada con un ligando de mayor afinidad, el cual desplaza al ligando original derivado de la síntesis de NP (citrato en el caso de las AuNP obtenidas mediante método de Turkevich) ⁶⁵. Además de modificar la superficie de la NP de forma de exponer nuevos grupos funcionales, la funcionalización suele emplearse también para modificar la solubilidad de las NPs, obtener sistemas coloidalmente más estables, o incluso cuando se realiza durante la síntesis, regular el tamaño y forma de las NPs ^{74–76}.

A continuación, se exponen brevemente algunas de estas estrategias con foco en nanopartículas metálicas de oro.

Recubrimiento con moléculas de bajo peso molecular

El empleo de moléculas pequeñas es una de las formas de funcionalización más usada. En general, se emplean moléculas con grupos funcionales capaces de interactuar con átomos de la superficie de las NPs metálicas, es por ello que suelen contener grupos carboxilo/carboxilato o grupos amino, capaces de formar enlaces de coordinación con átomos de la superficie. Además, al tratarse de grupos ionizables en función del pH pueden conferir estabilización por carga al sistema coloidal ^{77–79}. Algunos ejemplos son el citrato (empleado también en la síntesis), aminoácidos, o ácidos grasos como el ác. oleico, aunque estos últimos se reservan para síntesis en fase orgánica.

Especialmente para el caso de NPs de oro y plata, son de utilidad tioles orgánicos capaces de unirse covalentemente a la superficie metálica vía el grupo tiol (-SH). Algunos ejemplos de los más empleados incluyen el ác. tiobarbitúrico (TBA), ác. 3-mercaptopropiónico (MPA), o moléculas biológicas como el aminoácido cisteína o glutatión. Particularmente útiles son tioles de cadena larga como el ác. 11-mercaptoundecanoico (MUA) los cuales, además de unirse covalentemente a la superficie del oro, son capaces de formar monocapas autoensambladas por interacciones débiles entre sus cadenas laterales. El grado de compactación de esta monocapa puede regularse variando la concentración del agente de recubrimiento, logrando así diferentes grados de estabilización electrostática y estérica ^{80,81}.

Recubrimiento con sílice

El uso de revestimientos de dióxido de silicio ha sido ampliamente extendido por varias razones: aumentan la solubilidad de las nanopartículas sin modificar sus propiedades químicas, son compatibles con sistemas biológicos y otorgan estabilidad a las partículas frente a cambios en las condiciones ambientales, como el pH y la concentración de iones ^{69,82}. Además, su preparación es relativamente sencilla: se sigue una técnica de microemulsión que permite un control preciso del grosor y la cristalinidad de la capa superficial mediante la variación de los parámetros de síntesis ⁸³. Además, los grupos silanol presentes en la superficie facilitan la funcionalización de las partículas mediante la unión covalente de otros ligandos a través de diversas reacciones químicas ^{84,85}.

Otra ventaja de estos sistemas de funcionalización, es la posibilidad de encapsulamiento de una o más de una NP dentro del mismo núcleo de sílice, ofreciendo la posibilidad de atrapar dos tipos diferentes de NPs, combinando así las propiedades de ambas en un solo nanomaterial; por ejemplo, una nanopartícula magnética y una de oro ^{69,86}.

Recubrimientos poliméricos

Con frecuencia, se opta por los recubrimientos poliméricos para la funcionalización superficial de nanopartículas, ya que permiten la creación de nanocompuestos que presentan propiedades sinérgicas ^{87,88}. El tipo de recubrimiento logrado depende de muchos factores como ser la composición, carga y tamaño del polímero. Si el polímero es de cadena larga, no ramificado, interactuará formando bucles, envolviendo o encapsulando a la NP. En cambio, si es de cadena corta, se formará una envoltura tipo cerdas. Este tipo de recubrimiento se verá afectado además de si se trata de polímeros lineales o ramificados.

Uno de los polímeros lineales más empleados es el polietilenglicol (PEG), mientras que dentro de los ramificados suele emplearse la polietilenoimina (PEI). Cuando estos se empleen en formatos de bajo peso molecular (cadena corta) se lograrán recubrimientos de tipo cerda, mientras que sus versiones de alto peso molecular tenderán a formar recubrimientos de tipo envoltura, dado que una gran cantidad de grupos funcionales intentarán interaccionar con la superficie de la NP.

La conformación también está relacionada con el grado de cobertura superficial, conocido como densidad de cobertura. Densidades de cobertura elevadas llevarán a configuraciones tipo cerdas, mientras que densidades de cobertura bajas probablemente se traduzcan en una configuración de tipo envoltura ^{69,89}. Cuanto más alta sea la densidad de recubrimiento, mayor estabilidad del sistema coloidal se logra, principalmente frente al aumento de fuerza iónica del medio ⁹⁰. El proceso de síntesis de estos polímeros permite incorporarles grupos funcionales particulares; un caso típico son las versiones de PEG con grupos tiol (de forma de lograr anclaje covalente al oro) y/o grupos carboxílico capaces de ser empleados en pasos posteriores de anclaje de biomoléculas.

Polímeros más complejos como el almidón y el dextrano también suelen ser empleados, aunque por lo general sean lineales, pueden ser modificados para generar cadenas ramificadas.



Figura 8. Representación esquemática de algunas estrategias de funcionalización de AuNPs con a: aminoácidos (ej. cisteína), b: monocapas autoensambladas (ej. tioles de cadena larga, MUA), c: sílice, d: polímeros de alto peso molecular (lineales y ramificados), e: ác. grasos, f: bicapas lipídicas. Se esquematiza el intercambio de ligando mediante desplazamiento del citrato de la superficie de una AuNP.

Formación de bicapas

Muchos grupos de trabajo han recurrido a la construcción de estructuras micelares o bicapas lipídicas como método de encapsulación de NPs. Esto es particularmente útil cuando la síntesis de NPs se realiza en fase orgánica, dado que la formación de una bicapa con grupos hidrofílicos externos posibilita su pasaje a fase acuosa. Particularmente útil es este método para aplicaciones en sistemas vivos, donde el sistema inmune puede reconocer las NPs como un elemento extraño y conducir a su eliminación antes del que alcance el tejido blanco. Adicionalmente a la gran estabilidad conseguida, la bicapa puede exponer grupos funcionales que sirvan de anclaje de otras biomoléculas, como proteínas, ácidos nucleicos o anticuerpos ^{78,91,92}.

Consideraciones sobre la estrategia de inmovilización covalente

La inmovilización covalente suele ser la estrategia preferible a la hora de obtener conjugados de NPs, dada la formación de una unión más estable de la molécula y la posibilidad de obtener reproducibilidad en el producto obtenido ⁹³. Sin embargo, además de requerir en algunos casos múltiples pasos, implica someter al sistema coloidal a pasos de modificación y etapas de separación que pueden implicar un riesgo para la estabilidad. Además, algunas de las estrategias requieren modificaciones químicas para la incorporación de grupos funcionales particulares en la molécula a inmovilizar, lo cual puede ser engorroso en el caso de biomoléculas. Adicionalmente, y aunque no sea necesario incorporar nuevos grupos funcionales en la biomolécula, cabe la posibilidad de que la funcionalización involucre grupos funcionales presentes en el sitio activo de la biomolécula y disrumpa su funcionalidad. A modo de ejemplo, la inmovilización de anticuerpos es comúnmente realizada mediante la química de la carbodiimida, aprovechando la presencia de grupos amino en residuos de lisina de la proteína; sin embargo, muchas de estas lisinas se encuentran en la región de reconocimiento del antígeno (región Fab de la inmunoglobulina), con lo cual muchas moléculas de anticuerpo pueden perder capacidad

de unión durante la conjugación ⁹³. En la misma línea, ninguna de las estrategias de inmovilización covalente mostradas en la Tabla 1, asegura un control de la orientación de la biomolécula; aspecto muchas veces crucial a la hora de la aplicación de los sistemas NP-biomolécula. Si bien, como se menciona más adelante en este capítulo, se pueden realizar algunas estrategias para aumentar la probabilidad de orientación, estas no siempre son efectivas y requieren el estudio caso a caso de la molécula a inmovilizar. Por lo que el éxito del anclaje covalente como estrategia de inmovilización dependerá fuertemente de la biomolécula de interés y de la aplicación que se pretenda desarrollar.

Adsorción física

La adsorción física sobre NPs es una metodología ampliamente utilizada para la unión potencialmente reversible de biomoléculas a la superficie de las NPs ⁹⁴. Esta adsorción física está gobernada por fuerzas atractivas hidrofóbicas, electrostáticas, de enlace de hidrógeno y de van der Waals entre la biomolécula y la superficie de la NP. Esta estrategia de unión es la más sencilla de lograr, ya que no implica la modificación química de la NP ni de la molécula a inmovilizar. Sin embargo, en esta metodología es necesario tener en consideración algunos efectos derivados de la interacción directa de la biomolécula con la superficie de la NP. Por ejemplo, para el caso de proteínas, las interacciones hidrofóbicas pueden llevar a la desnaturalización y pérdida de actividad de la misma una vez inmovilizada, como consecuencia de los cambios conformacionales inducidos en el proceso de adsorción^{95,%}. Por otro lado, las interacciones electrostáticas entre NPs cargadas de manera opuesta y biomoléculas pueden dar lugar a uniones débiles, pudiendo estas últimas desprenderse luego de cambios en el pH o en la fuerza iónica ⁹⁷. Al igual que la estrategia de inmovilización covalente, la unión orientada de la biomolécula no está

asegurada.

Estrategias hacia la inmovilización orientada

Inmovilización mediante proteínas adaptadoras

Esta estrategia es fundamentalmente empleada para la inmovilización de anticuerpos, aunque también se puede emplear para inmovilizar otro tipo de moléculas. En general hacen uso de interacciones moleculares fuertes observadas en sistemas biológicos, y con ellas es posible lograr una inmovilización orientada. Entre algunos de los sistemas empleados se encuentra las proteínas de unión a biotina, donde la proteína más representativa es la estreptavidina. La interacción estreptavidina-biotina es una de las más fuertes de tipo no covalente conocidas (Figura 9). La unión de estreptavidina (\approx 66 kDa) a moléculas biotiniladas ocurre de forma espontánea, con una constante de afinidad alta (constante de disociación, $K_D \approx 10^{-14}$ M) y es resistente a diferentes condiciones del medio (pH, fuerza iónica, temperatura) ⁹⁸. Pese a ser una estrategia relativamente simple, su éxito depende en gran medida de la capacidad de biotinilar la biomolécula de interés. Si se logra dirigir el sitio de biotinilación dentro de la biomolécula, se puede lograr una inmovilización orientada, como en el caso de anticuerpos biotinilados en su región Fc. La unión de los mismos asegura por tanto que la región Fab (de reonocimiento de antígeno) quede expuesta con posibilidad de interacción con el antígeno de interés (Figura 9) ^{93,99}.

Otro sistema comúnmente empleado para la inmovilización de anticuerpos es el uso de proteínas de unión a la región Fc de inmunoglobulinas, tales como la proteína A o la proteína G (Figura 9), o constructos recombinantes de ambas, incluyendo quimeras (proteína A/G). A pesar de que la interacción es no covalente, la fuerza de unión es considerablemente fuerte. Por ejemplo, los valores de *K*_D para un anticuerpo tipo IgG con

la proteína A o G son 10⁻⁸ y 10⁻⁷ M, respectivamente ¹⁰⁰. La ventaja de esta estrategia es que es específica, no requiere la modificación del anticuerpo, y logra una inmovilización orientada ⁹³.



Figura 9. A: Estructura general de un anticuerpo. B: Estructura tetramérica de la proteína estreptavidina. Se señala la interacción de una subunidad con una molécula de biotina.

Adicionalmente, la estructura tetramérica de la estreptavidina, o la posibilidad de las proteínas A y G de obtenerse en forma multimérica (sea separadamente o en constructos de ambas) ofrece la posibilidad de contar con múltiples sitios de unión (a biotina o a la región Fc de los anticuerpos, respectivamente). Considerando la posibilidad de que al interaccionar con la superficie de la NP la proteína puede cambiar su conformación y perder así funcionalidad, contar con múltiples subunidades, posibilita que mientras algunas participen en la unión (y posiblemente pierdan su estructura), otras quedan disponibles para interaccionar. Al mismo tiempo, al actuar como proteínas intermediarias, son capaces de formar una corona proteica capaz de estabilizar a la NP (de forma estérica),

y evitan la interacción directa de la biomolécula a inmovilizar con la misma ¹⁰¹. Independientemente de esto, el punto clave de estas estrategias es la inmovilización primaria de la proteína adaptadora, la cual puede realizarse de forma covalente o no.

Aproximaciones biotecnológicas para la inmovilización de proteínas

Otro tipo de estrategias han surgido a raíz de aproximaciones comúnmente empleadas en la producción recombinante de proteínas. La ventaja de los sistemas basados en ingeniería de proteínas radica en la posibilidad de introducir aminoácidos adicionales que propicien la inmovilización orientada de la proteína de interés (sea covalente o no).

Por ejemplo, en una aproximación de este tipo Torres et. al., inmovilizaron una hemoglobina derivada del bivalvo *Lucina pectinata* modificada con una secuencia de seis residuos de histidina ((His)₆-rHbI) con la finalidad de crear un sensor de sulfuro de hidrógeno (H₂S)¹⁰². Los repetidos de histidina son empleados en sistemas de purificación de proteínas recombinantes, empleando columnas cromatográficas conteniendo Ni⁺² (cromatografías de afinidad a metales inmovilizados: IMAC), dada la afinidad de estos repetidos por dicho ion mediante enlaces de coordinación. En el trabajo los autores recubrieron nanopartículas de oro con ác. 3-mercaptopropiónico, el cual es capaz de complejar iones Ni⁺², vía sus carboxilos terminales, exponiendo así una capa de iones Ni⁺² disponible para la interacción con la proteína (His)₆-rHbI ¹⁰². En una estrategia similar Abad et. al., inmovilizaron una peroxidasa derivada de rábano ingenierizada y una NADPH reductasa sobre la superficie de nanopartículas de oro modificadas con ác. tióctico, e iones Co^{+2 103}. Otras aproximaciones que involucran péptidos cortos aprovechan la afinidad de la glutatión-S-transferasa (GST) por el glutatión, o de la secuencia peptídica Strep-tag que, al igual que la biotina, presenta afinidad por la estreptavidina ⁶⁸. Estos abordajes suelen

funcionar en condiciones de pH neutro, a baja fuerza iónica y temperaturas fisiológicas, por lo que ha sido de interés crear sistemas de inmovilización más robustos. Con este propósito en un trabajo de 2017 los autores diseñaron y sintetizaron un polipéptido llamado NanoLock, derivado de las proteínas SNARE (*Soluble NSF Attachment protein Receptor*), capaz de formar un complejo notablemente estable con la proteína derivada de SNARE SNAP25 (*Synaptosome Associated Protein, 25 kDa*). En el trabajo también lograron la adsorción a AuNPs de una fusión recombinante de SNAP25 a glutatión S-Transferasas (GST) llamada GST-SNAP25. Utilizando estas AuNPs recubiertas con GST-SNAP25 lograron inmovilizar NanoLock de manera estable a las AuNPs. Esto abrió las puertas a un sistema de anclaje orientado, de cualquier proteína de interés al que se le incorpore como marca la secuencia NanoLock, sobre AuNPs modificadas con GST-SNAP25 mediante una simple mezcla ^{104,105}. Además, la interacción SNAP25-NanoLock ha sido reportada resistente a tratamientos con urea o dodecil sulfato de sodio (SDS), salvo para el caso de tratamientos con SDS en condiciones de ebullición ¹⁰⁵.

En la misma línea de conseguir anclajes resistentes, se ha explorado el sistema SpyCatcher/SpyTag. Este sistema consiste en un método de acoplamiento de proteínas creado al dividir el dominio CnaB2 de la proteína de unión a la fibronectina FbaB de *Streptococcus pyogenes*. SpyCatcher es una proteína de 113 residuos que contiene una lisina reactiva (Lys31), mientras que SpyTag, la segunda parte, es un péptido de 13 residuos que contiene un residuo de ác. aspártico (Asp117) reactivo. Cuando se combinan SpyTag y SpyCatcher, se asocian mediante una reacción de amidación espontánea formando un enlace isopeptídico intermolecular entre Lys31 y Asp117, promovida por el residuo de ác. Glutámico (Glu77) ubicado en SpyCatcher ¹⁰⁶.

Esta amidación espontánea entre SpyTag/SpyCatcher ocurre en un amplio rango de temperaturas (4 a 37 °C), en diferentes tipos de soluciones *buffer* y en rangos de pH extensos.

Tanto SpyTag como SpyCatcher pueden fusionarse genéticamente en el extremo N- o Cterminal de otras proteínas, o incluso en bucles internos ^{106,107}. Lo atractivo de este sistema es que la reacción es irreversible y tiene una conversión que supera el 99 % ¹⁰⁸. Este método posibilita el acoplamiento covalente específico de proteínas conteniendo la secuencia SpyTag sobre NPs recubiertas con SpyCatcher.

En un paso más de diseño, y pensando en AuNPs, la proteína SpyCatcher puede diseñarse de forma de incorporar aminoácidos como la cisteína y posibilitar su anclaje covalente a la NP vía enlace Au-S. Esto permite que todas las uniones del sistema sean covalentes, asegurando una mayor estabilidad a las proteínas inmovilizadas. Una estrategia similar fue abordada en los trabajos de Ma et. al., en donde se fusionó al extremo N-terminal de SpyCatcher a la proteína GST, la cual es conocida por su habilidad de unión a oro vía enlaces Au-S, lográndose ensamblados AuNP-GST- SpyCatcher capaces de unirse a una proteína modificada con SpyTag ¹⁰⁹. En esta tesis exploraremos la posibilidad de anclaje de una versión modificada de SpyCatcher, diseñada específicamente a estos fines, conteniendo en su extremo N-terminal un residuo de cisteína en el contexto de una secuencia corta y flexible de aminoácidos (*linker*).

Estas aproximaciones biotecnológicas son ideales cuando se quiere tener un control estricto de la orientación. Sin embargo, se requiere capacidad para la producción, caracterización y purificación de la proteína recombinante de interés, o la producción de la misma en el contexto de una colaboración científica o de un servicio tecnológico.



Figura 10. A: Representación de la estrategia de anclaje de proteínas a AuNPs mediante el sistema SpyCatcher/SpyTag. B: Esquema de la formación del enlace isopeptídico entre los aminoácidos lisina 31 (SpyCatcher) y ác. aspártico 117 (SpyTag). C: Estructura del complejo SpyCatcher/SpyTag. Se resaltan los tres aminoácidos involucrados en la reacción. La visualización fue representada con el *software* Chimera X, a partir de la estructura PDB: 4MLI.

Otras estrategias para lograr orientación definida de biomoléculas inmovilizadas

El conocimiento estructural y fisicoquímico de la biomolécula a inmovilizar puede brindar pistas a la hora de favorecer el anclaje de la misma a través regiones particulares. Esto es particularmente desafiante para el caso de biomoléculas más complejas como las proteínas. En términos simples, lo que se busca es identificar regiones de la biomolécula que expongan cargas o concentren en regiones grupos funcionales específicos (-COOH, NH₂, -SH, etc.), de forma de modificar la superficie de la NP para favorecer la unión de la biomolécula por alguna de estas regiones ¹¹⁰. Por ejemplo, en un trabajo de Puertas et. al., plantean una estrategia de dos pasos para inmovilizar anticuerpos covalentemente sobre la superficie de nanopartículas magnéticas ¹¹¹. La estrategia toma ventaja de que las interacciones de tipo iónico ocurren de forma más rápida que la formación de un enlace covalente. De esta forma, trabajando a pH < pI del anticuerpo, revelan que existe una mayor concentración de cargas positivas en la región Fc del anticuerpo. Funcionalizando la NP con grupos que presenten carga negativa al pH de trabajo, la adsorción del anticuerpo se dará con mayor probabilidad por la región Fc. Adicionalmente esto requiere que las NP sean parcialmente pre-activadas con EDC/NHS, de forma de exponer sitios reactivos para los grupos amino del anticuerpo, que al adsorberse previamente por su región Fc asegura que la formación del enlace covalente se de por esta región. Obviamente esta estrategia requiere el conocimiento del pI de la biomolécula, y un control estricto de las cantidades de EDC/NHS de forma de asegurar que solo algunos grupos de la NP se encuentren pre-activados, mientras que otros expongan cargas negativas ⁹³. En el mismo trabajo demostraron para varios anticuerpos que con su estrategia de dos pasos la actividad del anticuerpo es mayor en comparación a la estrategia clásica de inmovilización covalente, y adicionalmente prueban la estrategia en otras biomoléculas como enzimas 111.

Algunas estrategias específicas para los anticuerpos se basan en la modificación química de los mismos, previo a la inmovilización (Figura 9). Por ejemplo, la reducción con DTT de los puentes disulfuro que mantienen unidas las cadenas pesadas de un anticuerpo deja grupos -SH expuestos que pueden ser usados para el anclaje covalente sobre NP reactivas a grupos tioles. Como los puentes disulfuro más reactivos de un anticuerpo suelen ubicarse hacia la región Fc, esto asegura una mayor chance de inmovilización orientada, sin modificación de la región de reconocimiento de antígeno ⁹³. Sin embargo, es importante considerar que la unión entre las cadenas pesadas y livianas también depende muchas veces de puentes disulfuro, cuya ruptura podría alterar el sitio de reconocimiento del antígeno. En la misma línea, algunos anticuerpos presentan modificaciones con carbohidratos en la región Fc, los cuales pueden ser oxidados con periodato de sodio (NaIO4) para formar grupos aldehídos reactivos, que puedan anclarse vía la química de la hidrazina sobre la superficie de NPs con grupos amino expuestos (Ver Tabla 1) ¹¹⁰.

La orientación basada únicamente en interacciones débiles (mayoritariamente por interacciones iónicas) suele ser poco utilizada debido al efecto que podrían tener los cambios en las propiedades fisicoquímicas del medio (pH, fuerza iónica, temperatura) o la competencia con otras moléculas. Sin embargo, es viable ajustar la intensidad de la interacción de adsorción iónica de proteínas sobre NPs mediante el recubrimiento previo con polímeros de carga múltiple ¹¹².

Una superficie plana de carga múltiple solo permite interactuar con un área superficial que no excede el 15 % o 20 % de la superficie de la proteína. No obstante, los polímeros de carga múltiple facilitan la interacción con un mayor porcentaje de la superficie proteica. Este fenómeno deriva de una adsorción iónica tridimensional intensa en múltiples puntos, ya que la superficie no es plana y la proteína puede penetrar dentro de la matriz de polímero inmovilizada. Esta estrategia no solo contribuye a aumentar la fuerza de unión, sino que también permite la adsorción de proteínas que no presentan regiones de elevada densidad de carga superficial, sino numerosos grupos cargados dispersos en su superficie ¹¹³. De ahí la popularidad de recubrir las NP con polímeros polianiónicos o policatiónicos¹¹⁴⁻¹¹⁶.

En la Tabla 2 se intenta realizar un análisis comparativo de las diferentes estrategias de inmovilización de biomoléculas (con foco en proteínas). Sin embargo, la diversidad de materiales de los que puede estar hecha una NP, sumado a la complejidad y diversidad de las biomoléculas a inmovilizar, hace que no exista una estrategia de inmovilización que se imponga, y la elección de la misma dependerá de cada caso particular.

 Tabla 2. Cuadro comparativo de las diferentes estrategias empleadas en la inmovilización de biomoléculas sobre NPs. (+) Bajo, (++) Medio, (+++) Alto.

| Estrategia | Costo temporal | ¿Control de la orientación? | ¿Aplicable a diversas biomoléculas? | ¿Cantidad de biomolécula requerida? | Costo |
|-----------------------------------|---|-----------------------------------|---|---|-------|
| Adsorción física | + | + (se puede favorecer) | +++ | +++ | + |
| Inmovilización covalente | ++ | ++ (se puede favorecer) | ++ | ++ | ++ |
| Proteínas adaptadoras | ++ | +++ | + + (principalmente proteínas) | ++ | ++ |
| Aproximaciones biotecnológicas | +++ (sobre todo la obtención de la biomolécula) | +++ | + (solo proteínas) | + | +++ |

1.5 Consideraciones fisicoquímicas sobre el proceso de adsorción de proteínas a NPs.

Como primera aproximación, el fenómeno de adsorción de una proteína sobre una NP puede asumirse similar al de adsorción sobre superficies planas. Esto es verdadero siempre y cuando se cumpla la relación:

$$r_{NP} = 2d_P \tag{ec.5}$$

Donde r_{NP} es el radio de una NP y d_P el diámetro de una proteína (asumida como globular) ¹¹⁷. Más adelante se expondrán algunos efectos adicionales considerando la curvatura de la superficie. Es ampliamente aceptado que cuando una NP entra en contacto con soluciones de proteínas, estas se adsorben rápidamente formando lo que se conoce como "corona proteica" ¹¹⁸.

El proceso de adsorción se verá favorecido siempre que la energía de Gibbs (ΔG) del sistema (proteína-superficie y resto de la solución) disminuya, y se puede describir termodinámicamente considerando presión (p) y temperatura constante (T, absoluta) mediante:

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S \qquad (ec.6)$$

siendo ΔH el cambio de entalpía, y ΔS el cambio de entropía. El cambio de entalpía puede describirse por:

$$\Delta H = \Delta U + p \Delta V \qquad (ec.7)$$

donde ΔU representa el cambio en la energía interna del sistema. El segundo término de la ecuación 7 tiene validez para un sistema gaseoso, por lo que el cambio de entalpía del proceso se corresponde únicamente con su cambio en la energía interna para sistemas

acuosos. En una visión reduccionista, el cambio en la energía interna queda determinado fundamentalmente por los cambios producidos en el proceso de adsorción (ruptura y formación de enlaces e interacciones no-covalentes).

Como se describirá brevemente más adelante el proceso global de adsorción de proteínas, está dirigido fundamentalmente por cambios entrópicos más que entálpicos ^{119,120}.

Factores que afectan la adsorción

Factores externos a la proteína

Los parámetros externos fundamentales son la temperatura, el pH, la fuerza iónica y la composición de la solución *buffer*.

La temperatura influye tanto en el estado de equilibrio como en la velocidad de la adsorción de proteínas. Se puede anticipar un aumento en las tasas de adsorción debido a una mayor difusión de las proteínas hacia la superficie a temperaturas más altas (asumiendo que la proteína mantiene su conformación nativa a dichas temperaturas).

Desde un punto de vista del cambio de entropía del sistema NP-proteína ($\Delta S_{\text{sistema}}$) el proceso de adsorción no se encuentra favorecido dado que la unión de proteínas a la superficie conlleva una disminución en el número de estados energéticos posibles del sistema (disminución de entropía). Sin embargo, de acuerdo con la segunda ley de la termodinámica, debe analizarse además el cambio del ambiente, ya que para que el proceso tenga lugar, se deberá cumplir que la entropía del universo ($\Delta S_{\text{universo}}$) aumente:

$$\Delta S_{universo} = \Delta S_{sistema} + \Delta S_{ambiente} \qquad (ec.8)$$

El proceso de adsorción de proteínas implica además la liberación de moléculas de agua de

hidratación e iones, tanto de la superficie de la proteína como de la superficie de la NP. Ambos procesos implican un mayor número de estados posibles, con lo que la entropía del ambiente aumenta y por tanto es el cambio de entropía del ambiente ($\Delta S_{ambiente}$) lo que termina gobernando el proceso de adsorción. El número de interacciones no suele cambiar significativamente durante la adsorción, por lo que el factor entálpico (ΔH , ecuación 7) suele contribuir poco. Por lo tanto, la principal fuerza impulsora detrás del proceso de la adsorción de proteínas es la ganancia de entropía que resulta de la liberación de moléculas de agua adsorbidas en la superficie y de iones de sal ¹²¹.

El pH determina el estado electrostático de las proteínas. En el punto isoeléctrico (pI), las repulsiones electrostáticas entre las proteínas se minimizan, permitiendo una mayor densidad de empaque en la superficie. Las tasas de adsorción son más altas cuando la proteína y el sustrato tienen cargas opuestas, ya que las atracciones electrostáticas aceleran la migración hacia la superficie. Sin embargo, generalmente se observa que la densidad superficial de proteína se maximiza si se trabaja a pH = pI ^{122,123}. Posiblemente dado que esto minimiza las repulsiones electrostáticas entre proteínas fuertemente cargadas a valores de pH más apartados del pI.

Otro parámetro que influye en los procesos de adsorción de proteínas es la concentración de iones disueltos, expresada en términos de fuerza iónica. En términos simples, a medida que aumenta la fuerza iónica, las interacciones electrostáticas entre las entidades cargadas disminuyen. Como resultado, la adsorción de proteínas cargadas o dominios proteicos en superficies con carga opuesta se ve obstaculizada, mientras que se ve favorecida en superficies con cargas similares. Estos efectos electrostáticos pueden influir en la cinética de adsorción. La eficiente disminución del potencial eléctrico de las proteínas reduce las interacciones laterales, que generalmente son de naturaleza electrostática. Esto, a su vez,

puede llevar a un aumento en la densidad de empaque, o a la supresión de efectos cooperativos ^{119,123}.

Influencia de las propiedades de la superficie

Además de considerar las propiedades individuales de la proteína, parámetros de la superficie de la NP tales como energía superficial, carga, polaridad y morfología deben ser también considerados ^{122,123}. En términos generales las proteínas tienden a adsorberse más a superficies no polares que polares. Esto se entiende termodinámicamente considerando que las moléculas de agua cercanas a la superficie de la NP con superficies polares se encuentran en un estado de energía libre mayor, con lo que su desplazamiento al seno de la solución ocasionado por la adsorción de otra molécula contribuye a disminuir la energía libre. Adicionalmente el desplazamiento de aguas de solvatación de grupos no polares en la superficie de la proteína también contribuye a la disminución de la energía libre, con lo cual los efectos combinados crean un incentivo termodinámico para que las proteínas se adsorban a superficies de NP no polares. Sin embargo, estas fuerzas pueden facilitar la desestabilización de la proteína, promoviendo reordenamientos conformacionales y llevando a interacciones proteína-proteína y proteína-superficie fuertes ^{122,124}.

En el caso de superficies polares no cargadas, el principal factor a considerar es la formación de enlaces de hidrogeno entre la proteína y la superficie de la NP. Al tener una molécula de proteína la posibilidad de formar múltiples enlaces de hidrogeno, el desplazamiento de las moléculas de agua de la superficie (que se encuentran formando enlaces de hidrogeno) es el principal factor termodinámico que favorece la adsorción. Dado que en términos generales la cantidad neta de enlaces de hidrógeno del sistema antes y después de la adsorción permanece relativamente constante, es el aumento de entropía lo que favorece la

adsorción.

Típicamente la adsorción sobre superficies cargadas se piensa que es un evento dirigido por el cambio en la energía de enlace (ΔU), debido a la atracción de grupos con carga opuesta. Sin embargo, debe tenerse en cuenta la presencia de especies iónicas en la solución, en interacción con los grupos cargados de la proteína y de la superficie de la NP. Entonces lo que ocurre cuando los grupos cargados de una proteína interaccionan con grupos de carga opuesta de la superficie es un desplazamiento de iones, que se dirigen al seno de la solución. De forma similar a lo que ocurre con el desplazamiento de moléculas de agua, el proceso estará de hecho entrópicamente favorecido siempre y cuando existan múltiples grupos cargados capaces de interaccionar con la superficie, por cada molécula de proteína ¹²³.

Consideraciones extra sobre el proceso de adsorción

A diferencia de las pequeñas moléculas (que se comportan como estructuras rígidas), la mayoría de las proteínas no simplemente se adhieren o liberan de una interfaz con ciertas probabilidades de adsorción y desorción. En su lugar, la compleja composición y estructura de las proteínas dan lugar a fenómenos mucho más interesantes como los reordenamientos estructurales, cambios en las afinidades superficiales durante la adsorción, efectos cooperativos positivos, efectos de exclusión por tamaño, cinética de sobre-adsorción o la formación de agregados en la superficie ¹²².

Las proteínas suelen ser moléculas asimétricas, con formas tendiendo a elípticas, de bastón o incluso más complejas como en el caso de los anticuerpos (forma-Y).



Figura 11. Orientaciones posibles durante la adsorción de un anticuerpo sobre la superficie de una NP. A: Dimensiones para un anticuerpo de tipo IgG genérico. B: Posibles orientaciones que puede adoptar un anticuerpo sobre una superficie, con la estimación de área proyectada ocupada (en nm²). 1IGY, 1IGT: código de dos estructuras cristalográficas de inmunoglobulinas de ratón depositadas en la base de datos PDB. Adaptado de ¹²⁵

Considerando una proteína estructuralmente estable y de forma elíptica se pueden definir dos orientaciones posibles, según la orientación de sus ejes de simetría. Si el eje de simetría más largo queda paralelo a la superficie hablamos de una orientación *side-on* (de lado), mientras que si lo hace el eje más corto hablamos de una orientación *end-on* (por el extremo). Como se muestra en la Figura 11, a medida que la forma se complejiza, como el caso de un anticuerpo, aparecen otras orientaciones posibles ^{122,125}. La orientación preferida dependerá de las posibilidades de interacción de la biomolécula, puede cambiar una vez adsorbida a medida que aumenta la densidad de recubrimiento o incluso coexistir múltiples orientaciones.

Es un hecho ampliamente aceptado el que las proteínas sufren cambios conformacionales

cuando se adsorben a superficies. Esto es así debido a que la conformación que corresponde a un estado de energía libre mínimo es diferente en solución que cuando se encuentra sobre una superficie sólida. Luego del acercamiento inicial de la proteína a la superficie de la NP, suele ocurrir un reordenamiento estructural, con pérdida de estructura secundaria que contribuye al aumento de entropía del sistema. Que tan extendido es este fenómeno depende de cada proteína, y conlleva a clasificarlas como proteínas duras o suaves. Esto, a su vez, puede impactar en mayor o menor grado en la función de las proteínas adsorbidas. En no pocos casos, las proteínas inmovilizadas pueden ser completamente carentes de función debido a la pérdida de estructura. Más allá de efectos dependientes de la orientación con la que la proteína se une a la superficie.

Las proteínas se adsorben hasta alcanzar un punto de saturación de la superficie, tendiendo a formar monocapas, aunque bajo condiciones que favorecen la agregación de proteínas o disminuyen las fuerzas de repulsión puede observarse formación de multicapas ¹²¹. Las monocapas se favorecen para proteínas con bajas fuerzas de atracción o con fuerzas electrostáticas repulsivas. En general en estas monocapas, la densidad de empaquetado suele ser baja para proteínas con carga neta alta (pH \neq pI y baja fuerza iónica) y alta para proteínas con carga neta neutra (pH = pI y alta fuerza iónica). La densidad de empaquetado también se ve afectada por la concentración de proteína en el seno de la solución; soluciones más concentradas suelen formar monocapas más densamente empaquetadas ^{126,127}. Esto suele deberse a que a bajas concentraciones la ocupación de la superficie se realiza en forma más lenta, y cambios estructurales y de orientación pueden tener lugar. En cambio, si la concentración de la proteína es alta, el recubrimiento de la superficie se realiza de forma rápida, lo que, al no dejar sitios libres, entorpece los cambios conformacionales o de orientación ¹²⁸.

Adicionalmente se han observado efectos cooperativos y no cooperativos, o cinéticas de

sobre-adsorción, aunque los mecanismos detrás de estos fenómenos aún no han sido completamente entendidos ^{129–133}.

Tamaño relativo NP-proteína

Un aspecto no muchas veces tenido en cuenta a la hora de inmovilizar biomoléculas sobre NPs es el tamaño relativo entre la NP y la biomolécula. En la Figura 13 se representa a escala el tamaño de diferentes macromoléculas sobre una NP de 10 nm de diámetro (núcleo de oro de 5 nm más una monocapa de 2.5 nm de espesor). El primer efecto evidente en relación al tamaño de la NP es la cantidad de moléculas (*N*) que es posible inmovilizar sobre la superficie. Para el caso de proteínas, con forma relativamente globular, la cantidad de moléculas máxima que se pueden adsorber puede estimarse a partir del radio de giro de la proteína (R_g , distancia cuadrática media de cada átomo de la proteína a su centroide) y el radio de la NP, según la ecuación:

$$N = 4 \frac{r_{NP}^{2}}{R_{g}^{2}}$$
 (ec.9)

En un trabajo de Wang et. al., se demostró una gran concordancia entre valores de *N* calculados (ecuación 9) y determinados experimentalmente mediante resonancia magnética nuclear (NMR) para una AuNPs de 15 nm de diámetro ¹¹⁷. A modo de ejemplo, según la ecuación 9, 155 moléculas de una proteína pequeña como la ubiquitina (76 aminoácidos, 8.6 *k*Da) cabrían sobre la superficie de estas NP, mientras que solo cabrían 33 moléculas de una proteína de mayor tamaño como la seroalbúmina bovina (BSA, 583 aminoácidos, 66 *k*Da) ¹³⁴. Más aún, considerando el *R*^g para un anticuerpo de tipo IgG (4.7 nm ¹³⁵) cabrían como máximo 10 moléculas de anticuerpo por nanopartícula.



Figura 12. Representación a escala del tamaño relativo de una NP de d=10 nm y diferentes moléculas de alto peso molecular. Adaptado de ¹³⁶.

En otro orden, el tamaño de la NP también afecta la afinidad de la proteína por la superficie. En varios trabajos donde se han determinado las constantes de adsorción (*K*) de diferentes proteínas por NPs del mismo material, pero diferentes tamaños, se observa un incremento en el valor de *K* a medida que aumenta el tamaño de la NP ^{137–144}. Lacerda et. al, evaluaron la unión a AuNPs de diferentes tamaños (15-100 nm) de algunas proteínas comunes en el suero humano como la albúmina, fibrinógeno, inmunoglobulinas e insulina, evidenciando valores de *K* que pasan de 10⁵ a 10⁷ cuando el tamaño de la NP se incrementa ¹⁴¹. La explicación mayormente aceptada es que a medida que se incrementa el diámetro de la NP, las proteínas "ven" su superficie como un plano, y esto posibilita el establecimiento de un mayor número de interacciones ^{141,143}. En otros trabajos se ha demostrado que el tamaño también afecta la densidad de empaquetado de la corona proteica y su grosor. A tamaños de NP muy pequeños (3-5 nm), en lugar de corona proteica se suele hablar de complejos NP-proteína, dada la capacidad de unión de pocas moléculas. Sin embargo, a medida que el tamaño de la NP aumenta, se observa la formación de coronas proteicas densamente empaquetadas. Esto obedece nuevamente a un efecto de curvatura, dado que se impone una limitante geométrica a la hora de establecer interaccione laterales con proteínas vecinas, lo cual en NP de mayor tamaño al asemejarse a un plano no sucede ¹³⁷. Este efecto impone una limitante al valor de *N* que se desprende de la ecuación 10 cuando las nanopartículas son pequeñas y por tanto muy curvadas. Además, por la misma razón suelen verse efectos cooperativos a tamaños mayores, y en general, el proceso de adsorción es más rápido sobre NP de menor tamaño, mientras que la formación de la corona proteica

Modelos cinéticos de adsorción

Dado que los mecanismos detrás de la adsorción de proteínas a superficies afectan principalmente a la cinética, varios modelos de este estilo han sido propuestos o adaptados. En general, para el caso de NPs un modelo de tres etapas suele ser aceptado, en donde el primer paso es la adsorción rápida e irreversible de la proteína (Figura 13). Hasta esta etapa la proteína conservaría en gran medida su estructura nativa. Luego de esto, la proteína sufre reorientaciones o cambios conformacionales tendientes a disminuir la energía libre. Aquí empiezan a jugar aspectos como la interacción con moléculas vecinas, o la posibilidad de pérdida de estructura secundaria de la proteína (proteínas duras vs suaves) de forma de alcanzar un estado de mínima energía. Por último, se daría la etapa de "endurecimiento" de la corona proteica, y es en este punto donde la unión puede tornarse irreversible, sobre todo para proteínas conteniendo grupos funcionales capaces de interaccionar o formar enlaces covalentes con la NP ^{122,123,134}.



Figura 13. Modelo de tres-estados propuesto por Rabe para el proceso de adsorción de proteínas sobre NPs. En rojo y en azul se representan diferentes subunidades de una proteína.

El modelo matemático más simple empleado para analizar parámetros termodinámicos y cinéticos de la adsorción de proteínas a NP y superficies sólidas en general es el modelo descripto por Irving Langmuir en 1932 para la adsorción reversible de gases sobre superficies sólidas ¹⁴⁵. La ecuación general del modelo es:

$$\theta_{eq} = \frac{KC_{eq}}{1 + KC_{eq}} \tag{ec. 10}$$

siendo θ_{eq} el grado de recubrimiento superficial en el equilibrio, C_{eq} la concentración de adsorbato (proteína) en solución en equilibrio y *K* la constante de equilibrio de adsorción.

En su versión cinética el modelo se representa como:

$$\frac{d\theta}{dt} = k^{on}C_s \left(1 - \frac{\theta}{\theta_{max}}\right) - k^{off}.\theta \qquad (ec.11)$$

$$K = \frac{k^{on}}{k^{off}} \tag{ec. 12}$$

siendo θ y θ_{max} el grado de recubrimiento superficial al tiempo *t* y máximo respectivamente, k^{on} , k^{off} las constantes cinéticas y C_s la concentración de proteína en la cercanía de la superficie (usualmente considerada igual a la concentración en el seno de la solución). El término 1 – θ/θ_{max} da cuenta de la disminución progresiva de sitios de adsorción disponibles a medida que se unen más moléculas.

A pesar de ser un modelo extremadamente simplificado, suele ser empleado en la literatura como modelo de ajuste y obtención de valores termodinámicos del proceso de adsorción de proteínas a superficies. Sin embargo, el modelo de isoterma de Langmuir se basa en que todos los sitios de adsorción son iguales, cada sitio de unión permite la adsorción de moléculas individuales y que no interactúan entre ellas, y se establece un equilibrio reversible de adsorción/desorción ¹⁴⁶. Como se describió anteriormente, la adsorción de proteínas involucra interacciones complejas que violan los postulados del modelo, y a pesar de que los datos experimentales se ajusten matemáticamente a una isoterma, esto no significa que el comportamiento real sea tal. Es por ello que los valores de *K* derivados de este ajuste deban ser usados con cuidado, y tenidos en cuenta a fines comparativos dentro de un mismo ensayo más que como parámetros termodinámicos reales.

En la misma línea otras isotermas clásicas de adsorción han sido evaluadas, como ser el

modelo de Freundlich o Brunauer-Emmett-Teller (BET), con resultados favorables. Sin embargo, los mismos reparos deben hacerse con respecto a los valores de parámetros termodinámicos derivados de ellas ^{122,126,146,147}.

Algunos modelos más complejos han surgido mediante modificaciones de la isoterma de Langmuir como el modelo RSA (adsorción secuencial aleatoria) que sustituye el término (1 – θ/θ_{max}) por una función de disponibilidad superficial ($\phi(\theta)$). Esta función y el modelo RSA en general considera el hecho de que, como resultado de la adsorción aleatoria de macromoléculas, sitios ya ocupados no están disponibles, y que además se originan "huecos" sin moléculas, en donde espacialmente no es posible la adsorción de otra molécula de proteína.

Otros intentan incorporar los efectos de interacciones laterales entre proteínas ya adsorbidas, expresando las constantes cinéticas en función del grado de recubrimiento de la superficie (k^{on} , $k^{\text{off}} = f(\theta)$), lo cual también permite tener en cuenta posibles efectos de cooperatividad ¹²².

Para considerar observaciones experimentales de que las proteínas adsorbidas sobre una NP solo son parcialmente removidas en contacto con soluciones libres de proteínas McGuire et. al., propusieron el modelo de "dos-estados" ¹⁴⁸. En el mismo una proteína puede adsorberse de forma reversible o irreversible, pero estos son dos estados diferentes, siendo posible que una vez adsorbida de forma reversible una molécula, realice una transición (con una k^{trans} asociada) hacia el estado irreversible. Así conviven proteínas adsorbidas en ambos estados, lo que explica la desorción parcial observada ^{148,149}.

Como podría preverse, también se han propuesto modelos que involucran múltiples estados y transiciones, y que requieren sistemas de ecuaciones para su resolución. Si bien es aceptado que las proteínas pueden adsorberse en más de dos estados, existe una limitación técnica/experimental a la hora de evidenciarlos y rastrearlos. Por ello se considera que el modelo de "tres-estados" propuesto por Rabe et. al. estudiando la adsorción de β -lactoglobulina, contempla de forma simple la gran mayoría de los fenómenos que ocurren sobre la superficie ¹⁵⁰. Según este las proteínas se adsorben en un estado inicial (no reversible) mientras la superficie disponible sea grande. Cuando se alcanza una concentración superficial crítica, en donde las interacciones laterales empiezan a tener lugar, ocurre una transición rápida al segundo estado, que involucra cambios de orientación más que de estructura. En este estado intermedio, algunas moléculas pueden desorberse de forma reversible. Finalmente, y en forma más lenta, se da la transición hacia un estado irreversible, que involucra ya rearreglos conformacionales ^{122,150}.

1.6 Técnicas para la caracterización de AuNPs y AuNPs bioconjugadas

La nanotecnología ha avanzado a gran escala a nivel mundial. La síntesis de nuevos nanomateriales crece año a año tanto a nivel industrial como biotecnológico. Ahora bien, este auge debe acompañarse con técnicas y protocolos adecuados de medición para materiales a escala nanométrica no solo pensando en el estudio del material en sí, luego de su síntesis y/o modificación, sino también en la necesidad de su detección ambiental dado su posible impacto en los ecosistemas o en la salud. En la literatura se encuentran variedad de metodologías al respecto y cada día surgen nuevas variaciones de técnicas ya existentes, pero la mayoría no obedece a un programa de estandarización y calibración, o son únicamente aplicables a un nanomaterial en concreto. Un problema general es la existencia de escasos estándares aprobados para ensayos con nanopartículas. Por ejemplo, el *National Institute of Standars and Technology* (NIST, EEUU) cuenta únicamente con estándares para tres tamaños de AuNP recubiertas con citrato. A esto se le suma la diversidad de formas, tamaños y materiales en los que las NP pueden ser sintetizadas lo que hace que contar con

estándares adecuados para cada caso sea algo inalcanzable. El peso del análisis recae entonces en contar con metodologías confiables que permitan una metrología adecuada de las mismas. Es necesario por tanto contar con equipos correctamente calibrados y protocolos definidos que permitan caracterizar de forma confiable nanopartículas. Por otra parte, tampoco existen (debido a la gran variedad) estándares de AuNPs bioconjugadas, con lo que su detección y estudio debe realizarse a partir de la información derivada de varias técnicas en simultaneo.

A continuación, se exponen algunas de las técnicas empleadas en este trabajo, resaltando la información que se puede extraer, el alcance y las limitaciones de cada una.

Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

El origen de la nanociencia se encuentra estrechamente vinculado a la historia del microscopio electrónico de transmisión (TEM), dado que la técnica permite la visualización directa de partículas a escala nanométrica. De hecho, se asocia el nacimiento de la "moda nano" a mediados del siglo XX, dado el surgimiento de la técnica ¹⁵¹.

Lo atractivo de la técnica es el gran poder de resolución que se logra a partir de la incidencia sobre la muestra de un haz de electrones acelerado, mediante una diferencia de potencial. A modo de ejemplo, con potenciales del orden de 100 kV, la longitud de onda del haz es de 0.0037 nm, la cual es unas 100000 veces menor a la de la luz visible, lo que conlleva a un poder de resolución tan chico como 0.15 nm ^{152,153}.

Este poder de resolución hace posible que pueda realizarse una caracterización estructural de los nanomateriales a partir de las imágenes TEM. Particularmente para el caso de NPs, permite evaluar la forma y tamaño. El análisis de múltiples imágenes permite mediante la medida de diámetro de partículas únicas construir histogramas de distribución de tamaños de la población 154.

El desarrollo tecnológico ha permitido corregir defectos asociados a los "lentes" electromagnéticos que conforman un TEM (principalmente las aberraciones cromática y esférica) y conjuntamente con técnicas de procesamiento de señales pueden obtenerse imágenes de alta resolución (HRTEM). A este nivel pueden observarse átomos (o más correctamente posiciones atómicas) lo que permite caracterizar un nanomaterial a nivel de su estructura cristalina, pudiendo incluso evaluar defectos en la red. La resolución atómica se logra siempre y cuando el material tenga zonas o bordes bien aislados y delgados (menores a los 50 nm de espesor) y que se encuentren bien orientados en un eje de zona "amplio" ^{155–157}.



Figura 14. A: Evolución de las resoluciones alcanzadas mediante TEM. Adaptado de ¹⁵⁶. B: Micrografía de AuNPs obtenida mediante HRTEM. Obtención propia. propia (créditos: Lic. Álvaro Olivera, CURE (Rocha)-UdelaR). En la misma puede observarse el arreglo cristalino de los átomos de oro de las AuNP sintetizadas y utilizadas a lo largo de esta tesis.

La gran ventaja de TEM para la caracterización de nanopartículas metálicas es la simpleza en la preparación de la muestra. En términos generales consiste en depositar la solución de NPs sobre una grilla de cobre-carbono, dejar secar (o secar de forma asistida) y observar. Los cuidados principales radican en la cantidad y concentración de la solución depositada. El exceso de NPs puede afectar la visualización, por generarse fenómenos de agregación durante el secado, que no permitan evaluar la forma y tamaño. Mientras que el defecto puede dificultar el hallazgo de partículas sobre la grilla.

En cuanto a la evaluación de la modificación de la superficie de una NP por TEM, la información que se obtiene es indirecta y limitada. Básicamente se puede inferir el éxito de una modificación en base a cambios en los patrones de ensamblaje y agregación de las NPs. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que artefactos derivados de la preparación de la muestra pueden afectar el estado de agregación y por tanto la imagen obtenida no siempre es un reflejo del estado de las NPs en solución. Algunas estrategias como el congelamiento rápido de las NPs en una matriz polimérica han sido evaluadas, pero aún no son ampliamente aplicadas, por lo que TEM continúa siendo más que nada una técnica de caracterización estructural del núcleo metálico de una NP ¹⁵⁸.

Espectroscopía ultravioleta-visible (UV/VIS)

La espectroscopía UV/VIS suele ser la caracterización primaria más simple a la hora de evaluar soluciones coloidales. Particularmente útil resulta para el caso de NP metálicas, donde tiene lugar el fenómeno de resonancia del plasmón superficial descripto anteriormente. Además, los espectros para estas NPs dependen de la naturaleza del metal, su tamaño, forma y entorno fisicoquímico. Si bien estos espectros no constituyen huellas dactilares de las NPs, en conocimiento y control de otras variables del sistema pueden inferirse otras propiedades.

Lo primero que se determina a partir de los espectros UV/VIS es la posición del máximo del plasmón (λ_{LSPR}), la cual da cuenta del modo de oscilación predominante de las NPs, y por tanto depende de su tamaño y forma. Por ejemplo, para AgNPs esféricas se obtiene una banda en el entorno de 400 nm, y para AgNPs triangulares este máximo se corre hasta los 800 nm. Como se mencionó en la sección sobre AuNPs, el aumento de tamaño de la NP ocasiona corrimientos de λ_{LSPR} a longitudes de onda mayores. Para las AuNPs de tamaño cercano a 20 nm este se encuentra en torno a 520 nm, mientras que para NPs de 100 nm se registran valores en torno a 580 nm, por lo que los espectros pueden ser usados para evaluar el producto de síntesis ^{159,160}.

Dado que en esencia los fenómenos de agregación de NPs originan NPs de mayor tamaño, la espectroscopía UV/VIS también puede emplearse para evaluar este fenómeno, donde se esperan corrimientos a longitudes de onda de menor energía, debido al fenómeno de acoplamiento de plasmones. Dependiendo del grado de agregación, al corrimiento de λ_{LSPR} puede sumarse el fenómeno de incremento en la línea de base por causa del aumento de turbidez de la solución (y por tanto mayor dispersión de luz).

De acuerdo a la ecuación 2, la posición de λ_{LSPR} es dependiente además del entorno fisicoquímico inmediato de la NP (reflejado en el valor de ε_{m}). A raíz de esto, los espectros pueden ser empleados para evaluar procesos de modificación de la superficie (intercambio de ligando, adsorción de proteínas) dado que estos originarán pequeños corrimientos en λ_{LSPR} . Por ejemplo, en un trabajo de Ghosh et al. se analizó el efecto sobre λ_{LSPR} del cambio de solvente orgánico y ligando sobre AuNPs ¹⁶¹. Allí se vio un corrimiento hacia el rojo gradual en los valores de λ_{LSPR} a medida que se incrementaba el largo de cadena del surfactante (tanto aniónico como catiónico) empleado como ligando ¹⁶¹. En otros trabajos,
la magnitud del corrimiento de λ_{LSPR} ($\Delta\lambda_{LSPR}$) se asocia a el grado de recubrimiento de la NP con el ligando. Por ejemplo, Xu et al., emplearon el valor de $\Delta\lambda_{LSPR}$ para estudiar mediante isotermas de Langmuir la unión de variantes de la proteína GB3 (mutadas en un solo aminoácido) sobre AuNPs ¹⁶².

Por otra parte, el ancho medio de pico (FWHM) da cuenta de inhomogeneidades de la solución de NPs, por lo que puede emplearse tener una aproximación a la distribución de tamaños. Cuanto mayor sea el ancho, mayor variabilidad en los tamaños de partícula. Adicionalmente, el incremento en FWHM también se relaciona con la disminución de la distancia inter-partícula, por lo que evidencia procesos de agregación^{56,163}.

La espectroscopía UV/VIS, es un análisis simple y rápido, considerado de rutina a la hora de caracterizar las nanopartículas metálicas. Brinda información sobre la naturaleza, forma, tamaño, y estado de agregación de la solución coloidal. Al mismo tiempo permite evidenciar cambios en el agente de recubrimiento y por tanto es una herramienta valiosa a la hora de caracterizar los sistemas coloidales. Las medidas de FWHM por UV/VIS en conjunto con las simulaciones del espectro de absorción, siguiendo la teoría de Mie, permiten estimar a grandes rasgos el tamaño de la población de nanopartículas. Es por ello que, si bien el corrimiento de escasos nm en λ_{LSPR} (\approx 3 nm) suele tomarse como evidencia inequívoca del evento de modificación de la superficie de la NP, este debe interpretarse con cuidado, dado que cambios en el tamaño o estado de agregación de la solución coloidal pueden tener el mismo efecto⁵¹.

Dispersión dinámica de luz (DLS)

De entre las técnicas para determinar el tamaño de partícula de una solución coloidal, la medida por dispersión de luz (*Dynamic Light Scattering*, DLS) es una de las más empleadas. La técnica extrapola los tamaños de partículas a partir de la determinación de los coeficientes de difusión que surgen como resultado del movimiento browniano ¹⁶⁴. Para la técnica, el diámetro de partícula o diámetro hidrodinámico (*d*_h) se refiere al diámetro de una esfera que difunde a la misma velocidad que la partícula medida, es decir que asume que todas las partículas son esféricas y que los agregados se comportan como una sola partícula de mayor tamaño. La determinación se fundamenta en que cuando la luz atraviesa una solución coloidal, parte de los rayos siguen su trayectoria normal, mientras que otra se desvía dispersándose en todas direcciones, dependiendo de la posición relativa de cada partícula en ese instante. Es por ello que el equipo de DLS incorpora un fotodetector en un ángulo de 90° con respecto al haz incidente de manera de detectar las variaciones de intensidad en la luz dispersada ¹⁶⁵.

El cambio de intensidad que llega al detector es totalmente al azar (la intensidad puede aumentar o disminuir), sin embargo, la magnitud del cambio respecto al tiempo depende del coeficiente de difusión, y por tanto del tamaño de partícula. En consecuencia, existe una correlación entre la intensidad medida en un instante y la medida en el instante siguiente, que en términos matemáticos se expresa mediante una función de autocorrelación (G(τ)). Esta compara la intensidad al tiempo *t*, consigo misma un instante después (*t*+ τ) (Figura 15).



Figura 15. Esquema del principio de funcionamiento del DLS. El fotodetector ubicado a 90° respecto al haz incidente capta las fluctuaciones aleatorias en la intensidad de la luz dispersada. La función de autocorrelación $g(\tau)$ compara estas fluctuaciones a instantes de tiempo cortos (τ). Al inicio la correlación es alta, y decae en dependencia con el tamaño de partícula para valores de τ grandes.

Al inicio la función toma su valor máximo (dado que las intensidades son iguales) y disminuye hasta llegar a 0 para intervalos de tiempo grandes (dado que el valor de intensidades ya es completamente aleatorio) (Figura 15).

Experimentalmente se observa que $G(\tau)$ tiene una caída exponencial con el tiempo dependiente del valor del coeficiente de difusión (*D*) de las partículas según:

$$G(\tau) = A[1 + B(g(\tau)^2)]$$
 (ec. 13)

$$g(\tau) = \exp(-Dq^2\tau) \qquad (ec. 14)$$

donde *A* y *B* son constantes que representan la línea de base y factores instrumentales, y g(τ) representa el término exponencial, que incluye el factor $q = \frac{4\pi_0}{\lambda_0} sen(\theta/2)$, donde θ es el ángulo entre la radiación incidente sobre la muestra y la luz dispersada, y *D* el coeficiente de difusión.

Las partículas pequeñas, que se mueven rápidamente, harán que la caída exponencial sea pronunciada, mientras que, para partículas grandes, de movimiento lento, la caída será menos pronunciada (Figura 16) ^{165,166}. A partir de g(τ) para partículas monodispersas se puede entonces obtener el coeficiente de difusión medio (*D*) y, mediante la ecuación de Einstein-Stokes, derivar el tamaño de partícula (*r*):

$$D = \frac{RT}{N_A} \frac{1}{6\pi\eta r} \tag{ec. 15}$$

donde *R* es la constante universal de los gases, *T* es la temperatura absoluta, N_A es el número de Avogadro, η la viscosidad y *r* el radio de las partículas ¹⁶⁷.

Para muestras polidispersas, tales como mezclas de partículas de muy distinto tamaño, $g(\tau)$ queda definida por una combinación lineal de funciones exponenciales, que permite obtener un resultado aproximado de la función de autocorrelación e inferir la distribución de tamaños de la población. Esta aproximación conlleva un error asociado, el cual trata de minimizarse mediante diferentes algoritmos. El *algoritmo de cumulantes* es el más simple y utilizado, y se basa en el ajuste de la función de autocorrelación a un desarrollo de Taylor ¹⁶⁸. En la norma ISO 22412:2017 se establece como el método más adecuado para determinar el diámetro hidrodinámico de partículas, sin embargo, no permite diferenciar distribuciones de tamaño, sino que calcula un diámetro promedio de todas las poblaciones existentes (diámetro medio, *d*_{imed}) ¹⁶⁹.



Figura 16. Esquema de la función de autocorrelación para una solución de partículas pequeñas y grandes.

Una idea de la distribución de tamaños se puede obtener a partir del *índice de polidispersión* (*PI*) que se relaciona con el ancho de la distribución de tamaño poblacional. El *algoritmo CONTIN*, utiliza la transformada inversa de Laplace. Este tratamiento matemático se lleva a cabo por métodos numéricos, y logra diferenciar diferentes poblaciones de partículas, pero como contraparte requiere de una gran cantidad de valores para lograr minimizar el error, dado que la presencia de ruido hace que existan más de una posible solución matemática. Otro algoritmo empleado es el *algoritmo NNLS* (*Non-Negative Least Squares*), que se basa en minimizar de forma iterativa los coeficientes de ajuste para determinar g(τ),

imponiendo además la restricción de considerar solo valores positivos en el ajuste (dado que son los que tienen sentido físico). Esto minimiza la cantidad de soluciones posibles. En la práctica, para obtener un buen ajuste de resultados se utilizan ambos métodos (CONTIN y NNLS) dependiendo de la muestra. En general se sugiere utilizar el primero para muestras polidispersas con distribuciones monomodales y el segundo para distribuciones multimodales^{168,170}.

Gráficos de distribución

A partir de los algoritmos mencionados, se puede obtener la distribución de tamaño de partículas, que se representa en un gráfico de intensidad vs. diámetro. La capacidad de la técnica de distinguir poblaciones de partículas de diferentes tamaños solo es posible para poblaciones bien diferenciadas, donde sea posible definir curvas de ajuste tipo logNormal. Dado que el valor en sí de intensidad es mayor para partículas grandes, por dispersar más cantidad de luz, la determinación de la población mayoritaria de partículas debe incorporar una corrección de la intensidad ponderada por tamaño, incorporando las ecuaciones de Mie y propiedades ópticas de las partículas como el índice de refracción. Como resultado de esta ponderación se obtiene un gráfico de número vs. diámetro, que para poblaciones monodispersas debería coincidir con el de intensidad. Adicionalmente, se puede expresar la distribución de tamaños mediante volumen o superficie, cuyas determinaciones también requieren conocimiento previo de propiedades ópticas de las nanopartículas, y asume que todas tienen la misma densidad y forma esférica ¹⁶⁵. Es importante señalar que para poblaciones polidispersas las gráficas de intensidad vs. diámetro y de número vs. diámetro son muy diferentes, y brindan información complementaria. Mientras que las primeras son extremadamente sensibles para la detección de agregados o de partículas grandes, no

reflejan la proporción de agregados que realmente existe en una solución.

Como consideraciones generales a la hora de utilizar la técnica, la presencia de polvo es el principal enemigo, por lo que las soluciones a medir deben ser filtradas. Se sugiere emplear filtros de tamaño de al menos un orden superior al diámetro de la población de partículas a analizar. Si bien los cambios en la intensidad medidos no dependen de la concentración de partículas, se sugiere trabajar a valores de conteo de entre 100 kcps a 300 kcps. Muestras muy diluidas necesitarán mayor tiempo de medida, mientras que muy concentradas pueden acarrear efectos no deseados de interferencia en el movimiento que por lo general conllevan a medidas de poblaciones con tamaño aparente superior. Finalmente, la muestra debe ser translúcida y no absorber o fluorescer a la longitud de onda del láser ¹⁶⁹.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, la utilidad de la información obtenida por DLS dependerá de la naturaleza de la muestra. Para muestras monodispersas (bajo *PI*, < 0.2) conteniendo una única población de partículas, el valor del diámetro hidrodinámico constituye un insumo muy importante a la hora de evaluar eventos de modificación de la superficie de las NPs. Si la molécula a inmovilizar tiene un tamaño apreciable, el evento de unión puede ser monitorizado por DLS ¹⁰⁹. Por ejemplo, Mishra et al. midiendo el aumento en el diámetro hidrodinámico en función de la concentración de diferentes proteínas, determinaron algunos parámetros de unión, así como la formación de multicapas proteicas sobre AuNPs de diferente diámetro ¹²¹. Para el caso de poblaciones muy polidispersas (alto *PI*, > 0.2), o con más de una población de NPs se debería recurrir a los diámetros derivados de los gráficos de número. Sin embargo, para construir estos gráficos, se debe contar con los valores de índice de refracción de las NPs modificadas, lo cual no siempre es posible. Por ello en este caso, en lugar del valor absoluto de diámetro hidrodinámico, una medida más adecuada sería la magnitud de cambio en el diámetro (Δd_b).

Claro está, las conclusiones anteriores dependerán de la ausencia de agregados, los cuales pueden apantallar la detección de partículas pequeñas. En relación a esto, y por el hecho de que las partículas grandes dispersan más luz, el DLS permite la evaluación de la formación temprana de agregados, incluso antes de que sean detectables mediante espectroscopía UV/VIS ⁵¹.

Potencial Z

El potencial- ζ (definido anteriormente) se determina de forma indirecta, mediante la inferencia de la movilidad electroforética (U_E) de una partícula en presencia de un campo eléctrico (E) a partir de calcular su velocidad electroforética (v_E). Los analizadores de potencial- ζ más populares se basan en la dispersión de luz láser, ya sea electroforética (ELS, *Electrophoretic Light Scattering*) o por análisis de fase (PALS, *Phase Analysis Light Scattering*). En la aproximación ELS (empleada en la mayoría de los equipos de la marca Brookhaven), la velocidad electroforética se determina a partir del cambio en la frecuencia *Doppler* de la luz dispersada, y se obtiene U_E según la ecuación:

$$v_E = U_E E \tag{ec. 16}$$

Esto es posible dado que, ante un campo eléctrico, las partículas se mueven como una unidad, acompañadas de sus iones más estrechamente unidos. La ecuación que relaciona el potencial-ζ y la movilidad electroforética es:

$$U_E = \frac{2\varepsilon z f(Ka)}{3\rho\eta} \qquad (ec.17)$$

78

siendo $U_{\rm E}$ la movilidad electroforética, *z* el potencial- ζ , ε la constante dieléctrica del medio, η la viscosidad, ϱ la densidad de la partícula y $f(K_{\rm a})$ la función de Henry (que usualmente vale 1 o 1.5). El valor de η y ε dependen del solvente empleado, mientras que $U_{\rm E}$ se determina a partir de las medidas de luz dispersada (como en DLS) ^{22,171}. El valor de la función de Henry depende del tamaño de partícula, y la concentración salina del solvente y se determina teóricamente. Por ello es que existen dos métodos principales para la determinación del potencial- ζ : el método de Hückel y el de Smoluchowski. El primero se usa para partículas pequeñas y/o solventes no acuosos o de muy baja concentración salina, y básicamente aproxima la función de Henry a 1. El segundo se emplea para partículas mayores a 200 nm y/o concentraciones salinas superiores a 10 mM, que generan una doble capa electroquímica estrecha. En este caso la función de Henry se aproxima a un valor de 1.5 ²⁵.

Estudio de la estabilidad coloidal

El análisis de la estabilidad coloidal constituye una estrategia experimental que permite no solo caracterizar una solución coloidal de NPs, sino que también permite evidenciar el intercambio de ligandos, siempre que este ocasione un aumento en la estabilidad ¹⁷². Como se explicó anteriormente, para el caso de NPs metálicas, uno de los procedimientos desestabilizantes más comunes es el aumento de fuerza iónica de la solución por el agregado de sales. En este caso el estudio se realiza mediante el incremento de concentración salina (típicamente con NaCl, NaNO₃ o KCl) sobre la solución de NPs y se evalúa la formación de agregados sea mediante UV/VIS o por cambios en el *d*^h determinado por DLS. Para el caso de UV/VIS se puede seguir tanto la disminución de agregados genera

una señal de absorción en una región del espectro se puede evaluar la relación $Abs(\lambda_{LSPR})/Abs(\lambda_{agr})$. Para el caso de AuNPs obtenidas mediante el método de Turkevich, esto se puede seguir por ejemplo midiendo la disminución de la absorbancia a \approx 520 nm, o la relación Abs_{520}/Abs_{650} . Este ensayo permite obtener curvas de tipo sigmoideo, donde la caída de la curva da idea de la estabilidad de la solución coloidal. En este caso se puede definir la concentración crítica de sal (*C*_{crit}), entendida como aquella que provoca una disminución del 50 % en el valor de la propiedad medida (por ejemplo, absorbancia) (Figura 17).



Figura 17. Ejemplos de curva de estabilidad para AuNPs recubiertas con citrato y un agente con estabilización estérica (ej. Proteína). Se muestran los colores observados (esperables) para las soluciones a medida que aumenta la concentración de sales. En la sección resultados se muestran curvas obtenidas con datos reales.

En otra estrategia experimental, se puede analizar la estabilidad del sistema a concentración

fija de sales. Esto permite evaluar de forma rápida la estabilidad de NPs que fueron incubadas por ejemplo con diferentes concentraciones de ligando, determinando así la concentración a partir de la cual el sistema logra la estabilidad. Se debe tener en cuenta que la concentración de sal a trabajar debe ser superior a la *C*_{crit} previamente determinada para la solución de NPs previo a la modificación con el nuevo agente de recubrimiento. Particularmente para ensayos en medios biológicos es de interés que las NPs sean estables a concentraciones salinas \geq 150 mM ¹⁷³.

Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

La espectroscopía infrarroja constituye una técnica de análisis cualitativo y cuantitativo aplicado a lo largo de los años en diferentes disciplinas, desde la industria farmacéutica y alimentaria, a la caracterización de materiales. El principio general se basa en la capacidad de absorción de luz en la región del infrarrojo por una molécula o estructura química, la cual se asocia a movimientos vibracionales característicos de los grupos funcionales presentes. Clásicamente esta vibración de los enlaces se ha aproximado a un modelo de oscilación de resorte, que vibrará con una frecuencia que se determina mediante la ecuación:

$$\nu_0 = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \tag{ec. 18}$$

$$\frac{1}{\mu} = \frac{1}{m_1} + \frac{1}{m_2} \tag{ec. 19}$$

siendo μ la masa reducida de dos átomos de masa m_1 y m_2 , y k la constante del resorte relacionada a la rigidez del enlace ¹⁷⁴.

Solo algunas vibraciones se producen por la absorción de la luz infrarroja, y en general se establece que para que un enlace genere una señal en el infrarrojo el momento dipolar debe cambiar durante la vibración. Esto se conoce como "regla de selección" y por tanto la interpretación de las señales de absorción dependerá de lo que formalmente se conoce como modos normales de vibración ¹⁷⁴. Para una molécula diatómica la cantidad de modos posibles son dos, siendo uno el que representa el acercamiento de un átomo a otro (estrechamiento) y el otro el que representa el movimiento de la molécula fuera del plano que contiene sus átomos y el enlace (aleteo o *bending* en inglés). Para sistemas con más de dos átomos la lista de modos posibles se amplía a 3*N*-6 o 3*N*-5 para moléculas no lineales y lineales respectivamente, pero no todos serán activos según las reglas de selección.

A diferencia de la espectroscopía tradicional, la absorbancia (o transmitancia) de la muestra no se obtiene de forma directa, sino que se infiere a partir del análisis de un interferograma formado por los haces de luz infrarroja que atraviesan la muestra. Como las muestras absorben luz a diferentes longitudes de onda, la forma del interferograma de salida contiene la información del espectro de absorción. Para esto se utiliza una función matemática que permite calcular la intensidad de luz para cada longitud de onda a partir del interferograma, y se conoce como "transformada de Fourier" ¹⁷⁵.

Los espectros FTIR suelen representarse como transmitancia (o absorbancia) en función del número de onda (v, cm⁻¹), en lugar de longitud de onda (λ , nm) y su análisis suele dividirse en dos partes ¹⁷⁴. Por un lado, la región entre 400 a 1200 cm⁻¹, denominada región de "huella dactilar", caracterizada por un gran número de señales, la mayoría producto de modos vibracionales acoplados de diferentes grupos funcionales que componen las moléculas presentes en la muestra y al esqueleto hidrocarbonado. Dada la gran complejidad, y a que

pequeños cambios en los átomos de la molécula se traducen en cambios significativos, los patrones de señales de esta región son característicos de cada sustancia y se usan para caracterización y/o identificación de compuestos. En la segunda región, por encima de los 1200 cm⁻¹, las señales observadas brindan información sobre los grupos funcionales presentes en las moléculas, que pueden identificarse con ayuda de bases de datos bien catalogadas construida con información recabada a partir de diferentes moléculas que presentan grupos funcionales similares ¹⁷⁴.

Dado que las NPs metálicas en si no presentan señales vibracionales, la utilidad de esta técnica radica en la caracterización de las moléculas que recubren la NP. Particularmente puede emplearse como primer abordaje para identificar ligandos en procesos de síntesis de NPs, o evidenciar procesos de derivatización y conjugación de moléculas a NPs. En algunos trabajos se ejemplifica la utilidad de la técnica para caracterizar las moléculas de citrato adsorbidas en AuNPs, pudiendo establecerse modos de coordinación de los grupos carboxilato de la molécula de citrato con los átomos de oro ^{34,176,177}. En otros se ha empleado FTIR para evidenciar y caracterizar formaciones de monocapas autoensambladas sobre superficies de AuNPs, o estudiar la interacción con diferentes aminoácidos ^{178–180}. Para el caso de biomoléculas, además de observar la presencia de grupos funcionales característicos, y confirmar su inmovilización, el FTIR puede emplearse para caracterizar cambios estructurales comparando los espectros de la biomolécula pura e inmovilizada. Por ejemplo, la información de las bandas amida I y II características de proteínas puede emplearse para evaluar posibles cambios en la estructura secundaria que puedan surgir de la interacción de la biomolécula con la superficie ^{67,181,182}.

En cuanto a la lo procedimental, se deben realizar algunas consideraciones para el trabajo

con NPs. Tradicionalmente el análisis más extendido es en fase sólida, empleando discos o pastillas de sales como el bromuro de potasio (KBr) que son transparentes en el infrarrojo. Para el caso de NPs en suspensión esto requiere una etapa previa de obtención de un producto sólido, que pueda mezclarse con el KBr para la obtención de una pastilla. Esto puede lograrse por centrifugación de la suspensión coloidal, con posterior secado mediante corriente de N₂ o algún gas inerte. La pastilla debe ser fina, y transparente y las partículas de sólido a analizar no deben ser muy grandes, de lo contrario generarán un incremento en la dispersión de luz. Esto puede ser particularmente difícil de lograr para suspensiones de NPs donde el efecto de la centrifugación puede generar formación de agregados. Alternativamente se puede analizar la suspensión de NPs en un líquido, en celdas desmontables formadas por un soporte y dos ventanas de algún material transparente en el infrarrojo (fluoruro de bario, BaF₂ o de calcio, CaF₂). En este caso la principal dificultad radica en preparar soluciones de NPs lo suficientemente diluidas para que la dispersión no interfiera, pero al mismo tiempo que la señal de los ligandos unidos sea detectable. Adicionalmente se suma la dificultad de trabajar con muestras acuosas donde la propia absorción de las moléculas de agua reduce el rango de numero de onda de medida (esto puede solventarse trabajando con agua deuterada).

Sumado a esto, el análisis de ligandos inmovilizados sobre NPs requiere de la previa remoción de las moléculas no unidas, las cuales de lo contrario darán señales en el espectro al quedar incorporadas a la pastilla de KBr.

Espectroscopía Raman intensificada por superficie (SERS)

La espectroscopia Raman intensificada por superficie (SERS, por sus siglas en inglés, *Surface-Enhanced Raman Spectroscopy*) es una técnica poderosa y versátil que se ha

convertido en una herramienta esencial en una variedad de campos científicos y aplicaciones, que incluyen la química analítica, la nanotecnología, la bioquímica, la investigación de materiales y la detección de contaminantes y biomarcadores. Su capacidad para detectar moléculas individuales y proporcionar información química y estructural detallada a nivel molecular la convierte en una técnica valiosa para el estudio de sistemas complejos y la caracterización de nanoestructuras ¹⁸³.

Esta técnica combina los principios de la espectroscopia Raman convencional con la amplificación de señales proporcionada por nanoestructuras metálicas en la superficie de un sustrato. La espectroscopia Raman se basa en el fenómeno de dispersión inelástica de la luz (dispersión de Stokes). Cuando un fotón de luz incidente interactúa con una molécula, parte de la energía del fotón se transfiere a la molécula en forma de vibraciones moleculares. Esto resulta en un cambio en la energía del fotón dispersado, y este cambio es medido como un desplazamiento en la longitud de onda de la luz dispersada. Este cambio de longitud de onda (Raman *shift*) está directamente relacionado con las vibraciones moleculares de la molécula analizada. La señal Raman (a diferencia de FTIR) es sensible al cambio en la polarizabilidad de la molécula, y por eso enlaces homoatómicos pueden dar señal Raman. Sin embargo, la intensidad de las señales Raman suele ser débil, por lo que la detección de moléculas en concentraciones bajas o en superficies no optimizadas resulta desafiante. Es en este contexto es que el efecto SERS entra en juego ¹⁸⁴.

La SERS se basa en la capacidad de nanoestructuras metálicas, como nanopartículas de oro o plata, nanobastones etc. en aumentar significativamente la señal Raman de las moléculas adsorbidas en su superficie. Esta amplificación puede alcanzar factores de mejora de entre 10⁶-10⁸, lo que permite la detección de moléculas individuales y la realización de análisis altamente sensibles ^{183–185} (Figura 18).



Figura 18. Esquema mostrando las diferencias en intensidad de los espectros Raman y SERS para una misma molécula. Las esferas amarillas representan AuNPs.

El origen del efecto SERS no está del todo claro, y coexisten dos interpretaciones. Por un lado, la explicación física, radica en que el efecto de resonancia superficial de plasmón (LSPR) de algunos nanomateriales genera un campo electromagnético aumentado el cual sería el responsable del incremento de señal observado. Para el caso de NPs metálicas, la interacción de estas genera un acoplamiento de plasmones, generando "puntos calientes" con campos electromagnéticos particularmente intensos ¹⁸⁶. Por otro lado, la explicación química propone que el aumento de señal se relaciona con las interacciones entre las moléculas adsorbidas y la superficie metálica, lo que altera las energías de transición vibracionales de las moléculas y modifica sus espectros Raman ¹⁸³.

En cualquier caso, la cercanía de la molécula es necesaria (< 5 nm), por lo que la técnica resulta particularmente útil para evaluar moléculas inmovilizadas sobre la superficie de NPs metálicas, haciendo posible caracterizar ligandos de superficie o evidenciar reacciones de derivatización ¹⁸⁵.

Uno de los aspectos fascinantes de la SERS es su capacidad para proporcionar información química y estructural detallada a nivel molecular. Además, la técnica es no destructiva y se puede aplicar en una amplia gama de muestras, desde líquidos y sólidos hasta gases, lo que la convierte en una herramienta invaluable en campos tan diversos como la química analítica, la nanotecnología, la biología, la ciencia de materiales y la investigación en superficies ¹⁸³.

A diferencia de FTIR, la preparación de la muestra para espectroscopía SERS (y Raman en general) es mínima, y la determinación se puede hacer tanto en muestras sólidas como líquidas, ya que no existe interferencia de las moléculas de agua, siendo una técnica no destructiva para la muestra.

Además, particularmente para el caso de las NPs metálicas (que generan efecto SERS), la separación del ligando libre previo a la medida no es estrictamente necesaria, debido a que comparativamente las señales Raman que se pudieran originar de estas moléculas en solución son muy débiles comparadas a las de las moléculas inmovilizadas.

Desventajas con respecto a FTIR son que algunas señales características presentes en FTIR no son observadas en Raman (ej. banda amida I de proteínas), y se generarán efectos de interferencia si la molécula de estudio es capaz de fluorescer en longitudes de onda cercanas a la del láser del equipo ¹⁸⁷.

Análisis electroquímico: voltamperometría cíclica (VC)

El uso de NPs metálicas como elementos electrocatalíticos o de modificación de superficies de electrodos se ha investigado en innumerables trabajos ¹⁸⁸. En general los efectos observados se asocian a la mejora en las propiedades electrónicas de la superficie. Sin embargo, el uso de técnicas electroquímicas para caracterización de NPs y sus modificaciones no es tan ampliamente usado. El concepto detrás de esto es simple, dado que las NPs modifican las propiedades de la interface electrodo-solución, la deposición de NPs que tengan diferentes agentes de recubrimiento, deberá provocar cambios diferenciales en las propiedades de la interface. Es así que mediante la deposición de NPs sobre la superficie de un electrodo y agregando una especie electroactiva, se puede interrogar a la superficie del electrodo y obtener parámetros como el área real o la constante de velocidad heterogénea de transferencia electrónica (k_0). Como especies electroactivas, se emplean moléculas cuya naturaleza química no limite la información que se obtiene de la interface, entre ellas una de las más usadas es la cupla ferricianuro/ferrocianuro ([Fe(CN)₆]⁴ /[Fe(CN)₆]³⁻) ¹⁸⁹.

De entre las técnicas electroanalíticas más simples, se encuentra la voltamperometría cíclica (VC), la cual consiste en un barrido de potenciales en ambos sentidos (anódico, catódico) registrándose al mismo tiempo la intensidad de corriente, cuyos picos de intensidad corresponden a procesos de electro-reducción y/o electro-oxidación de la especie electroactiva que se superpone sobre una corriente capacitiva aproximadamente constante. El barrido puede repetirse n veces, de ahí la calificación de cíclica ^{190,191}. A partir de los voltamperogramas, puede obtenerse el valor de potencial de pico (E_P , catódico y anódico),

de cuya diferencia (ΔE_P) puede estimarse el valor de k_0 . Para sistemas cuasi-reversibles (en los que se pueden detectar ambos picos voltamperométricos) se puede seguir el método de Nicholson para estimar k_0 , a partir del parámetro de Matsuda (Ψ) según la ecuación:

$$\psi = k_0 \left(\frac{\pi D n F v}{RT}\right)^{-\frac{1}{2}} \qquad (ec. \ 20)$$

donde *n* corresponde al número de electrones intercambiados, F la constante de Faraday y *v* corresponde a la velocidad de barrido de potencial. El parámetro de Matsuda puede obtenerse a partir de ΔE_P (hasta valores de $\approx 200 \text{ mV}$) empleando el ajuste lineal propuesto por Lavagnini et al. ¹⁹²:

$$\psi = \frac{-0.6288 + 0.0021n\Delta E_p}{1 - 0.017n\Delta E_p} \tag{ec. 21}$$



Figura 18. Voltamperograma representativo para AuNPs modificadas y sin modificar. Se representa la obtención del parámetro ΔE_P y se un esquema del proceso redox en la interface.

En términos generales, el valor de *k*⁰ para especies en la cercanía del electrodo dependerá de la cantidad de sitios activos disponibles para el intercambio electrónico. Dado que estos varían en función del grado de modificación de las NPs, la determinación de *k*⁰ aporta información sobre la presencia del agente de recubrimiento ^{190,191}. Cuando el agente de recubrimiento entorpece la transferencia electrónica, se observará una disminución de la constante de velocidad heterogénea.

Cromatografía de exclusión molecular (SEC) y Electroforesis

La cromatografía de exclusión (SEC) y electroforesis son técnicas bioquímicas empleadas para la separación y estudio de biomoléculas. La separación se basa en las propiedades de tamaño y forma (cromatografía) o tamaño, forma y carga (electroforesis) de las biomoléculas; dado que las NPs se encuentran a una escala de tamaño similar al de las grandes biomoléculas, es que surge la aplicabilidad de ambas técnicas al estudio de NPs ¹⁹³. La SEC se basa en la separación por tamaño y forma, más precisamente el parámetro que influye en la separación es el d_h de la NP. Eligiendo fases estacionarias de tamaño de poro adecuado, se puede lograr entonces la exclusión de NPs grandes y lograr así la separación, por ejemplo, de restos de ligando libre o remanentes de reactivos de síntesis. Como técnica separativa para NPs, presenta la ventaja de ser menos "agresiva" en comparación con la centrifugación, dado que no propicia el acercamiento de las NPs (y por tanto el riesgo de formación de agregados es menor). Además, puede emplearse como técnica de modificación de la fase en la que las NPs se encuentran resuspendidas. Adicionalmente a la elección de una fase estacionaria con un tamaño de poro adecuado, la misma no debe presentar interacción con las NPs (directamente o a través de su agente de recubrimiento) y la fase móvil empleada debe ser inerte y no promover la desestabilización del sistema coloidal ¹⁹⁴.

El uso de SEC como técnica separativa ha sido empleado en varios trabajos, con NPs poliméricas, metálicas e incluso en la separación de mezclas de NPs esféricas y nanobastones ^{195,196}.

Dado que la modificación de la NP puede modificar el valor de d_h , SEC también puede ser usado para la evaluación de la inmovilización de moléculas en NPs, particularmente cuando se trata de moléculas de alto peso molecular, como lo son las biomoléculas. En este caso cambios en los perfiles de elusión, pueden caracterizarse mediante el volumen de elusión (V_e) o los tiempos de retención (t_r) de cada fracción. Si además se cuenta con una técnica de cuantificación lo suficientemente sensible, puede determinarse la concentración de la molécula a inmovilizar que no quedó inmovilizada y por sustracción cuantificar de forma indirecta la cantidad que logró unirse a la superficie de la NP ¹⁹⁷.

La movilidad electroforética (U_{E} , ecuación 17) es otra de las propiedades que puede verse alterada luego de la inmovilización de una molécula sobre la superficie de una NP. En este caso además del efecto que conlleva el cambio en d_h , también se suma el cambio de carga superficial (potencial- ζ) que puede sufrir la NP luego del evento de modificación. Así, mediante la determinación de la relación de frentes (R_i) pueden evaluarse, por ejemplo, diferentes concentraciones de agente de recubrimiento ⁹³. Dado que en general las NPs metálicas son soluciones coloreadas, no es necesario el uso de agentes de revelado. Adicionalmente la electroforesis permite evaluar de forma cualitativa el estado de agregación de la solución coloidal, dado que suspensiones de NPs homogéneas en tamaño, sin grandes agregados migran en un gel como una banda única, mientras que la presencia de NPs de diferente tamaño o agregados ocasionan que no se distingan bandas individuales. Normalmente se emplean geles de agarosa o poliacrilamida, los cuales permiten obtener diferentes resoluciones en función de la concentración del gel. En este caso es requerido el uso de soluciones *buffer* de alta fuerza iónica (dado que deben ser conductoras) por lo que para NPs recubiertas con agentes lábiles o adsorbidos débilmente la agregación puede ser un problema y no podrán ser evaluadas ^{198,199}.

1.7 Aplicaciones bionanalíticas de las AuNPs

El empleo de AuNPs en estrategias analíticas no es nuevo. Por su naturaleza de nanomaterial denso en electrones, la primera aplicación de AuNPs como estrategia de detección estuvo asociada a la microscopía electrónica. Faulk y Taylor en los años 70 describieron el primer protocolo de conjugación de un anticuerpo a AuNPs para el estudio de la distribución de antígenos sobre la superficie de Salmonella mediante TEM, y años más tarde Horisberger y Rosset emplearon la base de este ensayo para la localización de polisacáridos y glicoproteínas en levaduras y eritrocitos tanto por TEM como SEM (microscopía electrónica de barrido) ^{200,201}. Mas adelante, y dadas las capacidades de penetración de las NPs en tejidos, su uso se extendió dentro de las técnicas inmunohistoquímicas para marcar estructuras celulares internas y agentes patógenos como virus y bacterias. Además, el uso de AuNPs de diferentes tamaños y modificadas con diferentes moléculas de reconocimiento permitió la marcación de estructuras en simultaneo, en la misma muestra celular ^{202,203}. Recientemente las AuNPs han sido empleadas como sondas en microscopía de correlación, la cual combina la microscopía electrónica con la basada en luz. Las AuNPs, al ser capaces de visualizarse en ambas técnicas, permiten marcar posiciones de eventos de interés a nivel celular, visualizados por microscopía óptica, que luego pueden observarse con mayor resolución por TEM 204. Al día de hoy la facilidad de síntesis y la disponibilidad comercial de AuNPs modificadas hacen

que la inmunomarcación con AuNPs se siga usando ampliamente.

Quizás el uso más extendido de las AuNPs en diagnóstico clínico es la inmunocromatografía de flujo lateral (LFIA). El diseño más común es en formato *"sándwich"*, en donde sobre una zona de prueba se forma una línea coloreada, producto de la interacción de AuNPs y el soporte sólido (típicamente nitrocelulosa), teniendo como mediador al analito de interés. De esta forma, únicamente se forma la línea de prueba cuando el analito está presente en concentración suficiente ²⁰⁵. En general, las AuNPs son modificadas con algún agente de reconocimiento por el analito de interés, usualmente un anticuerpo. La ventaja de las AuNPs es su facilidad de modificación con diversos agentes de reconocimiento, y la coloración roja intensa propia del reactivo. La simpleza, rapidez y bajo costo, han llevado a que existan muchos *test* de LFIA basados en AuNPs disponibles para detección de múltiples biomarcadores. Entre los más usados se encuentran la detección de gonadotropina coriónica humana (hCG) en *tests* de embarazo, o la detección de componentes virales, (ej. *tests* de antígeno para VIH, Hepatitis B, Hepatitis C o SARS-CoV2) ^{206,207}. Adicionalmente también existe amplia investigación y aplicación de la LFIA en detección de drogas, hormonas, contaminantes alimentarios y ambientales ²⁰⁸.

La propiedad de las AuNPs más interesante a explotar en cuanto a posibilidades analíticas es el efecto de acoplamiento de plasmones. Como se mencionó anteriormente, cuando dos AuNPs interaccionan a cierta distancia, se produce un acoplamiento de los plasmones superficiales, que se traduce en un cambio espectral, que macroscópicamente se observa como un cambio de color de la solución pasando del rojo al azul. También puede darse una coloración violeta dependiendo del grado de cercanía y/o el porcentaje de AuNPs que logran acercarse al punto de acoplar sus plasmones. La gracia de los métodos de detección colorimétricos basados en AuNPs es entonces que el analito de interés genere el acercamiento de las NPs, con el consecuente cambio de color. La ventaja de esta estrategia es que, en ciertas condiciones, la magnitud del cambio espectral (corrimiento hacia el rojo) puede ser empleada con fines cuantitativos (Figura 19).



Figura 19. Esquema representando dos de las estrategias más usadas en sistemas colorimétricos de detección con AuNPs: agregación inducida por el analito (izquierda; cambio de rojo a azul) o desagregación inducida por el analito (derecha; cambio de azul a rojo).

En los 80s Leuvering et al. fueron los primeros en plantear esta metodología de análisis y la aplicaron a la detección de hCG en orina ²⁰⁹. Brevemente prepararon AuNPs (d = 50 nm) modificadas con dos anticuerpos anti-hCG monoclonales distintos. Ante la presencia de la hCG en las muestras, la agregación de AuNPs ocasiona una disminución de la absorbancia a 540 nm (λ_{LSPR} para estas AuNPs) que demostró correlacionarse con la concentración. Adicionalmente la positividad pudo ser evaluada a "ojo-desnudo" mediante los cambios de color de la solución, lo que llevó a que el método se comercializara por la empresa

Chefaro Company (Netherlands) bajo el nombre *Discretest*[™], como uno de los primeros *test* no hospitalarios (descentralizados) de embarazo ^{210,211}.

En una estrategia similar Liu et al. desarrollaron un sensor colorimétrico para detección de virus de influenza A empleando AuNPs anti-hemaglutinina, alcanzando límites de detección cercanos a 8 unidades de hemoaglutinación ²¹².

Mirkin et al. introdujeron las estrategias de detección basadas en ácidos nucleicos ²¹³. A grandes rasgos se dividen en dos tipos, la primera se basa en la agregación por hibridación ante la presencia de una secuencia blanco (el analito). Esta estrategia requiere contar con dos *sets* de AuNPs, sobre las cuales se han inmovilizado de forma covalente (en general vía enlace S-Au) secuencias de ADN complementarias a los extremos de la secuencia blanco, de forma que ambas AuNPs puedan hibridar con el ADN blanco, y así agregarse. Ejemplos de esta estrategia se encuentran para determinación de ADN de *Micobacteria, Estafilococo* y *Estreptococo* en muestras alimenticios y clínicas ^{214–216}. La segunda estrategia hace uso de la alta capacidad estabilizante que presentan las cadenas simple hebra de ADN sobre las AuNPs. En este caso cadenas complementarias a la secuencia blanco se adsorben sobre las AuNPs, y en presencia de su secuencia complementaria libre, se desorben dejando a las AuNPs sin agente protector, provocando así agregados luego del incremento de fuerza iónica de la solución. Ejemplos de esta estrategia se encuentran para la detección de virus de la Hepatitis C, SARS-CoV-2, pesticidas y metales pesados ^{211,217,218}.

En general, estas estrategias dependen fuertemente de la cantidad de material genético del patógeno a detectar en la muestra, por lo que actualmente se trabaja en acoplar estos sistemas a reacciones de amplificación.

En general, la mayoría de trabajos emplean la estrategia de la agregación. Sin embargo, en algunas ocasiones en la que las que la agregación es reversible, se puede usar el cambio de

color inverso (azul al rojo). A modo de ejemplo, induciendo la agregación de AuNPs de carga negativa, mediada por el policatión poli(dialildimetilamonio) (PDDA), se ha desarrollado un sensor de heparina. En presencia de heparina y dado su carácter de polianión, se produce la interacción entre ésta y el PDDA, desensamblando el agregado ²¹⁹. Las estrategias anteriores resumen las bases de las estrategias empleadas por análisis colorimétrico empleando AuNPs. A partir de aquí, se pueden encontrar estrategias tan complejas como creativas, que no pretenden ser abarcadas en este punto. Sin embargo, y a pesar de lo intrincado que pueden resultar los mecanismos subyacentes de estas estrategias, en búsqueda de mejoras en los límites de detección y sensibilidad, no muchos sensores colorimétricos encuentran un lugar en el mercado. Esto obedece principalmente a dos razones. La primera es la complejidad de las muestras reales en donde particularmente para las AuNPs la agregación por fuerza iónica es un enemigo a considerar (sobre todo en muestras biológicas). La segunda desventaja, radica en que la agregación inducida por el analito no siempre se da, o no siempre es evidenciable por espectrofotometría o cambios colorimétricos, lo que limita la sensibilidad de la técnica.

Para lo primero, la única solución posible es el agregado de agentes estabilizantes (polímeros, proteínas, moléculas conteniendo grupos tiol), en especial aquellos que brindan una estabilización estérica, y que, en el mejor de los casos, también cumplen la función de reconocimiento. Esto requiere además de una caracterización exhaustiva del sistema coloidal, previo a su uso en muestras reales, de cara a evitar resultados falso-positivos.

En cuanto a la sensibilidad, se pueden explotar otras propiedades de las AuNPs. Por ejemplo, la técnica de DLS es capaz de detectar la formación de agregados en etapas tempranas, lo que permite su evidencia antes de que se produzcan cambios espectrales (o incluso aunque no se generen). Por ejemplo, Alenichev et al., reportaron buenos resultados en la detección de infecciones por *Aspergillus spp.*, empleando AuNPs conjugadas a

anticuerpo anti-galactomananos, y detección basada en cambio en *d*^h y aumento de la intensidad de luz dispersada ²²⁰. Dentro de las técnicas espectroscópicas el efecto SERS, mencionado anteriormente, ha sido abordado en varias publicaciones, acoplando a la superficie de AuNPs modificadas con anticuerpos, sondas SERS, de forma que la AuNP actúa como un amplificador de señal ^{221,222}. En otros sistemas, las AuNPs son empeladas como reporteras de un evento de bioreconocimiento mediante cambios por el aumento de masa en sensores de tipo piezoeléctricos, por señales electroquímicas/electrocatalíticas propias de las NPs, o aumento de sensibilidad en biosensores basados en resonancia superficial de plasmón, como el caso de la plataforma comercial BiaCore ^{52,188,221,223}.

En otro tipo de abordajes, AuNPs modificadas con diferentes organotioles se emplearon para la detección de especies volátiles, identificadas como biomarcadores de cáncer de pulmón, presentes en el aire exhalado. La detección en este caso se llevó a cabo registrando el cambio en la resistencia eléctrica de las AuNPs, la cual varía en función del tipo y concentración del compuesto adsorbido sobre su superficie. Con esta metodología Gang y Tisch pudieron discriminar, a partir de 4 compuestos presentes en muestras de aire pulmonar, entre pacientes con y sin cáncer pulmonar desarrollado ²²⁴.

En este trabajo, y por ser de interés para nuestro grupo de investigación, se pretende aplicar las AuNPs bioconjugadas a proteína en estrategias de identificación de vesículas extracelulares (EVs), por microscopía electrónica de transmisión y su detección en ensayos colorimétricos.

1.8 Generalidades de exosomas y otras vesículas extracelulares (EVs).

Desde hace años se conoce que las células animales son capaces de secretar vesículas rodeadas de membrana al medio extracelular, pero durante muchos años estás vesículas se racionalizaron como un mecanismo de excreción de desechos celulares. Hoy en día se sabe que, además, las vesículas extracelulares juegan roles claves en la comunicación célulacélula a distancia y están fuertemente implicadas en el cáncer. Mediante la secreción de vesículas, las células son capaces de transferir a otras células juegos específicos de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Un ejemplo paradigmático constituye la transferencia de la proteína mutante truncada del receptor de EGF (EGFRvIII) mediante vesículas extracelulares, lo que permite a las células de tumores nerviosos muy agresivos (gliomas) transferir el factor que confiere la "malignidad" a células no mutadas ²²⁵.

Con fines prácticos, las EVs se han clasificado según su tamaño y mecanismos de biogénesis en: exosomas, microvesículas y cuerpos apoptóticos ²²⁶. Las microvesículas se producen por protrusión hacia el exterior de la membrana plasmática, y la consecuente liberación de vesículas cuyo tamaño oscila entre los 100nm-1µm. Su secreción por lo general es baja, salvo en células activadas como las plaquetas o en células tumorales ^{227,228}. Por el contrario, el mecanismo de biogénesis de los exosomas deriva a partir de las partículas intraluminales que conforman los endosomas tardíos, o cuerpos multivesiculares. Cuando los cuerpos multivesiculares se fusionan con la membrana plasmática liberan su contenido hacia el exterior. A las pequeñas vesículas liberadas, se las denomina exosomas. Tienen un tamaño de 30 nm-150 nm y poseen una serie de proteínas características (ej. ALIX, TSG101, CD63, CD9, CD81, etc., dependiendo en parte del tipo celular). Están presentes en fluidos del cuerpo humano, incluida la sangre ²²⁹. También están presentes en saliva, orina y líquido cefalorraquídeo. A su vez, por lo general, la secreción de exosomas es constitutiva para la mayoría de las células, aunque puede incrementarse en respuesta a la activación celular o el estrés celular ²²⁸.

Exosomas: su implicancia en el cáncer y vehículos de transmisión del material genético regulatorio

Las células tumorales, más allá de su origen, suelen secretar grandes cantidades de exosomas al medio extracelular y se ha demostrado que poseen función inmunomodulatoria. Además, pueden facilitar la invasión y la metástasis, estimular la angiogénesis, modular a las células del estroma, remodelar la matriz extracelular, transferir proteínas oncogénicas a células asociadas al tumor e incluso participan en los mecanismos de resistencia a fármacos ^{225,230–233}.

Otra relevancia de los exosomas es el rol que poseen en la comunicación celular. Desde hace años se conoce que las células son capaces de transferir determinadas proteínas y lípidos mediante la secreción de exosomas; considerándose esta vía como un mecanismo de comunicación célula-célula a distancia. No obstante, el tema cobró un renovado interés cuando se demostró que los exosomas pueden contener ARNs mensajeros y otros ARNs reguladores, tales como los microARNs ²³⁴. Esto último es especialmente relevante, ya que los microARNs son hoy reconocidos como moléculas capaces de regular la expresión de la mayoría de los genes de las células animales, actuando a nivel post-transcripcional ²³⁵. Cuando los exosomas son internalizados por las células receptoras, los ARNs mensajeros transferidos pueden ser traducidos a proteínas y los microARNs mantienen su capacidad de silenciar genes específicos. Por estas razones, la secreción de vesículas extracelulares es aceptada hoy día como un mecanismo mediante el cual las células logran inducir cambios fenotípicos en células vecinas o distantes dentro de un mismo organismo. Además de esto,

debido a que transportan un conjunto de ARNs, proteínas y lípidos que son característicos de las células que le dieron origen, las vesículas extracelulares que circulan por biofluidos como sangre u orina son fuertemente estudiadas por su potencial uso diagnóstico. Se considera que podrían constituir una importante fuente de biomaracadores de enfermedad en biopsias líquidas no invasivas.

Métodos de purificación y aislamiento de EVs.

Se utilizan métodos bioquímicos clásicos como centrifugación diferencial (desecho de detritos celulares y cuerpos apoptóticos a 2000g, purificación de microvesículas y otras vesículas grandes a 10000-16000g, purificación de exosomas y otras vesículas pequeñas a 100000g), a lo que se suele agregar pasos de filtración por 0.22 µm. Otras técnicas muy utilizadas son la centrifugación en gradientes continuos o discontinuos de sacarosa o iodixanol (Optiprep TM) y la inmunocaptura. Si bien estos métodos cuentan con la ventaja de que forman parte de metodologías convencionales de laboratorio, son técnicamente demandantes, requieren centrifugaciones largas y a altas velocidades (>100000g para exosomas), volúmenes de partida grandes, y suelen presentar rendimientos bajos y ser poco reproducibles. Además, es difícil escalar estas técnicas para el procesamiento en paralelo de un gran número de muestras ²³⁶. Últimamente ha cobrado relevancia la cromatografía de exclusión molecular (SEC) como técnica de separación dada su sencillez y buenos resultados, con alteración mínima de las vesículas obtenidas. Existen columnas comerciales, con resinas de tamaño de poro entre 30 y 70 nm, que permiten aislar EVs de proteínas libres en muestras de orina o suero, obteniéndose un muy buen balance entre pureza, rendimiento y facilidad del proceso de purificación 237,238.

Cuantificación y caracterización de EVs

La caracterización básica de EVs se basa en su cuantificación y determinación de tamaños de la población. La mayoría de las técnicas se basa en principios físicos (ópticos o electrónicos, en general), y no difieren demasiado de otros métodos para cuantificación y determinación de tamaños de NPs en general. Es por ello que técnicas como TEM y DLS también son usadas en la caracterización de EVs. Adicionalmente, en muchos casos es de interés caracterizar la población de EVs en términos de sus marcadores de superficie más frecuentes (como CD9, CD81 o CD63) o en términos de marcadores tejido-específicos, dada su potencial relevancia como fuente de biomarcadores ²³⁹.

A continuación, se exponen brevemente los principios detrás de algunas de las técnicas de caracterización de EVs, con énfasis en las técnicas empleadas en este trabajo. Es importante también señalar la capacidad de muchas de estas técnicas de cuantificar la concentración de EVs dentro de un cierto rango de tamaños, algo que no es posible con técnicas tales como TEM y DLS.

Citometría de flujo convencional

La citometría de flujo (FCM) es capaz de caracterizar el tamaño, así como de fenotipar, y en cierta medida también cuantificar, las EVs de manera simultánea. A pesar de que el FCM es un método sencillo y de uso común en la clínica y presenta una alta capacidad para la detección simultánea de varios antígenos de superficie, el análisis preciso de las EVs mediante FCM plantea muchos desafíos ²⁴⁰.

La caracterización del tamaño y cuantificación de las EVs se lleva a cabo en función de la

dispersión de luz y la fluorescencia en el FCM. A medida que un flujo de EVs atraviesa un haz láser que ilumina las vesículas mientras atraviesan un delgado capilar, pasando de una partícula a la vez, se genera una dispersión de luz en todas direcciones. La recolección de la luz dispersada en la dirección del haz de luz incidente constituye la señal de dispersión hacia adelante (FSC, por sus siglas en inglés), mientras que la luz dispersada recogida en dirección perpendicular se manifiesta como la señal de dispersión lateral (SSC, por sus siglas en inglés)²⁴¹⁻²⁴⁶. A partir de las intensidades de SSC y FSC, y teoría de Mie mediante, se puede obtener el tamaño de las EVs. Esto requiere de una calibración previa del citómetro, por lo común realizada con esferas de poliestireno o sílica de tamaño conocidos. Sin embargo, el pequeño tamaño de las EVs, así como su bajo índice de refracción (≈ 1.39) hacen que la señal de luz dispersada sea muy débil 247,248. Sumado a esto, las diferencias entre el índice de refracción de las EVs y los materiales usados para la calibración hacen que existan sesgos y diferencias entre diferentes citómetros. Es por ello que en términos generales la técnica permite en el mejor de los casos detectar partículas de tamaño superior a los 150-200 nm, salvo en el caso de citómetros diseñados específicamente para el estudio de EVs. Además, la distribución de tamaños y concentración observable no es del todo confiable, al menos hasta que se encuentren materiales de calibración más adecuados 244,249-251

Adicionalmente, la citometría permite el fenotipado de EVs, empleando anticuerpos conjugados a fluoróforos, dirigidos contra proteínas u otros componentes superficiales. Nuevamente los resultados dependerán de la sensibilidad del equipo empleado, así como del tamaño y nivel de expresión de marcadores de las EVs. Comúnmente la mayoría de las poblaciones de EVs presentan tamaños menores a 100 nm, y estas poblaciones generan señales de fluorescencia muy débiles en la mayoría de los citómetros convencionales. Por tanto, la señal registrada suele estar asociada a un subconjunto de EVs que presentan un

mayor tamaño ^{252,253}. En muchos casos se logran mejores resultados, capturando previamente las EVs sobre microesferas ^{254,255}.

El marco *MIFlowCyt-EV* se ha desarrollado recientemente con el objetivo de mejorar la presentación y la confiabilidad de los experimentos de citometría de flujo de EVs individuales ²⁵⁶.

Citometría de flujo para nanopartículas (nanoFCM)

Para solventar algunas de las limitaciones de la citometría de flujo convencional, se han desarrollado equipamientos específicos que logran resoluciones de diámetro de partícula menores. La citometría de flujo de nanopartículas (nanoFCM) logra resoluciones de hasta 10 nm para nanopartículas metálicas y entre 30 y 40 nm para nanopartículas lipídicas como las EVs.

Las principales diferencias con respecto a la citometría convencional radican en mejoras a nivel de la fluídica, tipos de láser y sensibilidad de los detectores ²⁵⁷.

Estos equipos incorporan focalización hidrodinámica confinando la corriente de nanopartículas a volúmenes de muestra pequeños dentro de la celda de flujo. Con flujos de menor ancho, mejoran la relación señal-ruido (~ 17 veces) para la señal de fluorescencia ²⁵⁷⁻²⁵⁹. La disminución del ancho del flujo, permite el uso de velocidades de flujo menores, lo que aumenta el tiempo de tránsito y la intensidad de la luz dispersada ^{260,261}. En cuanto a los detectores, los tubos fotomultiplicadores utilizados en la citometría de flujo convencional han sido reemplazados por diodos fotodetectores de avalancha de silicio (APDs); los APDs, que están hechos de material semiconductor, ofrecen una eficiencia cuántica relativamente alta y un bajo ruido electrónico ²⁶². Los APDs se integraron con un sistema de multiplexación por división de longitud de onda (WDM), que separa las bandas

de colores de la luz sin necesidad de espejos dicroicos (como en la citometría de flujo convencional), evitando así pérdidas de señal del 20-50 %. Adicionalmente incorporan láseres de longitud de onda corta, (488 y/o 405 nm) que incrementan la intensidad de la luz dispersada, fundamentalmente la reflejada en incrementos en la señalen SSC ²⁶³.

Esto permite obtener límites de detección menores, y obtener distribuciones de tamaños más certeras, posibilitando mayores sensibilidades en cuanto a la determinación de concentración de EVs. Además, la sensibilidad en los detectores de fluorescencia que permiten la detección de la señal a nivel de molécula única, hace a la nanoFCM más adecuada para la caracterización de marcadores de superficie, sobre todo de aquellos expresados en menor cantidad ^{264,265}. Cabe señalar que aún no hay equipos de estas características en nuestro país, por lo que las medidas obtenidas con esta técnica fueron realizadas en el exterior.

Análisis por seguimiento de nanopartículas (NTA)

Durante mucho tiempo la técnica estándar (y única disponible) que existió para la cuantificación y caracterización de NPs fue el análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA, por su sigla en inglés). El NTA se basa en el análisis del movimiento browniano de las NPs en solución, monitoreadas mediante la dispersión de luz al iluminar la muestra con un láser. La trayectoria de las partículas en un volumen definido se documenta mediante una cámara de video que captura la luz dispersada, lo que permite determinar el coeficiente de difusión de cada NP. Luego empleando la ecuación de Stokes-Einstein (ecuación 15) se calcula el tamaño de cada partícula rastreada ^{266,267}. La técnica permite el recuento de partículas individuales, lo que en relación con el volumen de celda permite determinar la concentración de dichas partículas en las muestras. En general, los equipos comerciales

vienen equipados con entre uno y tres láseres (450, 520 y 635 nm), lo que permite determinar un amplio rango de tamaños de partículas y materiales. Sin embargo, en el caso de EVs, no se han conseguido límites de detección por debajo de los 60-80 nm, y la resolución a nivel de tamaños suele ser baja, obteniéndose una envolvente extendida para el caso de mezclas de nanopartículas de tamaño similar ^{268,269}. Adicionalmente, y a pesar de basarse en el mismo principio físico, se han observado diferencias entre equipos de diferentes fabricantes, así como baja precisión en la determinación de la concentración, fundamentalmente por la variación de la cantidad de partículas detectadas en cada registro de video para réplicas de una misma muestra ²⁷⁰. Algunos equipos de NTA incorporan además detectores de fluorescencia, con lo que se puede realizar la identificación específica de EVs a través de alguno de sus marcadores de superficie y anticuerpos conjugados a fluoróforo.

Sensado de partícula única por imágenes de reflectancia interferométrica (SP-IRIS)

El sensado por reflectancia interferométrica se ha empleado originalmente en la determinación de partículas virales en suero o sangre entera, adaptándose posteriormente para la caracterización de EVs, en una plataforma conocida bajo el nombre ExoView (NanoView Biosciences, Brighton, MA). En esta plataforma, las EVs son capturadas sobre la superficie de un sustrato (que consta de una capa de dióxido de silicio sobre un sustrato de silicio), sobre el que se ha inmovilizado un arreglo de anticuerpos anti-tetraspaninas (anti-CD9, anti-CD81, anti-CD63).

Para detectar y determinar el tamaño de las nanopartículas, se ilumina la superficie con una fuente LED monocromática, y se registra el patrón de interferencia de la luz reflejada. La interferencia de la luz reflejada desde la superficie del sensor se modifica por la presencia de partículas, y genera un contraste aumentado con respecto a la señal de fondo, lo que produce una señal distintiva que se correlaciona con el tamaño de la partícula (Figura 20). Estos patrones de interferencia permiten inferir el tamaño de EVs a nivel de partícula única, en rangos comprendidos entre 50 y 1000 nm ^{271,272} (Figura 20).

Adicionalmente, la plataforma cuenta con detección de fluorescencia en 3 canales, lo que permite que las EVs capturadas sean marcadas con anticuerpos conjugados a fluoróforo, y de esta forma realizar el fenotipado de marcadores de superficie clásico, mapeados a nivel de partículas únicas inmovilizadas. La información derivada del análisis de fluorescencia permite identificar y contar EVs individuales con su correspondiente marca de colocalización de marcadores de superficie. Además de esta ventaja en la caracterización a nivel de fenotipado con marcadores de superficie, pueden marcarse componentes internos luego de la permeabilización y fijado de las EVs capturadas. A pesar de poder contarse EVs individuales, la técnica no permite la determinación de la concentración de la muestra, debido a la imposibilidad de determinar el volumen de muestra que ingresa al *chip*. Además, no necesariamente la totalidad de las EVs son capturadas. Sin embargo, permite comparar el número de EVs conteniendo distintas combinaciones de marcadores de superficie en una misma muestra ^{259,272}. Al igual que nanoFCM, este equipo no está disponible en nuestro país, y el acceso al mismo se obtuvo a través de una colaboración científica con colegas del exterior.


Figura 20. A: Esquema del funcionamiento de la plataforma SP-IRIS (ExoView) indicando como se visualiza el contraste generado por una NP. B: Imagen de las superficies de captura luego del revelado con diferentes anticuerpos conjugados a fluoróforos. Nótese que, del análisis de la gama de colores, puede obtenerse información sobre la presencia de marcadores de superficie a nivel de vesícula única. Por ejemplo, una partícula amarilla será positiva para los marcadores detectados con un anticuerpo conjugado a un fluorocromo verde, y otro anticuerpo conjugado a un fluorocromo rojo. Los distintos paneles de la Figura corresponden a zonas con distintos anticuerpos de inmovilización (anti-CD63, anti-CD81 y anti-CD9). En todos los casos se utilizaron tres anticuerpos de detección (contra CD63, CD81 y CD9), marcados en verde, rojo y azul. Datos propios. C: Gráfico de variación del contraste en función del diámetro de EVs. Adaptado de ²⁷¹.

Sensado de pulsos resistivos acoplado a microfluídica (MRPS)

La técnica de sensado de pulsos resistivos acoplada a microfluídica (MRPS, por si sigla en inglés) es un método de detección de partícula única, que permite determinar la concentración y distribución de tamaños de nanopartículas en suspensión. Basa su funcionamiento en el mismo principio que un contador Coulter, donde un voltaje es aplicado a través de un pequeño poro (de tamaño nanométrico en el caso del MRPS). A medida que las nanopartículas transitan a través del poro, la resistividad eléctrica cambia, debido a la diferencia de conductividad entre el fluido (normalmente una solución *buffer*) y la nanopartícula. Esta alteración es sensada como un pulso de voltaje, cuya amplitud se relaciona con el volumen de partícula y el ancho del pulso (tiempo de tránsito, o transit *time*) se relaciona inversamente con la velocidad de flujo. En conjunto con el registro del tiempo de medida, esto permite calcular el volumen de muestra y por tanto la concentración de nanopartículas ^{253,273,274}. El nanoporo, los electrodos de registro de voltaje y un sistema de prefiltros (de tamaño igual al del nanoporo) se encuentran inmersos en un chip de polidimetilsiloxano (PDMS), el cual es un material muy hidrofóbico (ángulo de contacto con el agua > 100° 275. Por ello las determinaciones de muestras acuosas deben realizarse en presencia de agente humectante, capaz de vencer la tensión superficial, típicamente polisorbato 20 (Tween-20) o BSA, aunque esta última suele registrar medidas inestables ²⁵⁰. La versión comercial del equipo (Spectradyne, LLC) permite determinaciones de nanopartículas > 65 nm, dentro de un rango de concentraciones de 10^7 a 10^{11} partículas/mL²⁵³. Este equipo utiliza un sistema de microfluídica conteniendo bombas que ejercen presión para forzar a las nanopartículas a atravesar el nanoporo. Desde 2020, gracias a un proyecto CSIC Equipamientos (UdelaR), contamos con un equipo de estas características en el Laboratorio de Bioquímica Analítica del Centro de Investigaciones



Figura 21. Esquema de funcionamiento del equipo MRPS y las señales obtenidas. A: imagen del *chip* contenedor de muestra y sistema de electrodos. B: Esquema del arreglo de electrodos y nanoporo. C: Señal de voltaje normalizada de eventos detectados durante 1 s. D: Ampliación de una de las señales marcadas en C, indicando la forma y los parámetros determinados en cada señal. La línea punteada corresponde al valor del ruido de fondo más 3σ. Modificado de ²⁷⁶

Otras técnicas

Existen además en el mercado *kits* ELISA, los cuales se basan típicamente en la detección de los marcadores de superficie CD63, CD9 o CD81. Productos comerciales: *ExoELISA*™

kits (System Biosciences), permiten la cuantificación de exosomas sin el requerimiento de costoso instrumental, pero a un costo por muestra considerable. Además, esta técnica no es compatible con el análisis de rutina hecho fuera del laboratorio.

Atendiendo a este panorama, el desarrollo de estrategias económicas, prácticas, capaces de obtener resultados en el momento y en el lugar en el que se extraen las muestras (en lo que se conoce como análisis *"point-of-care"*), constituye una herramienta poderosa y muy útil tanto en el campo clínico como en la investigación y en el desarrollo de políticas públicas de salud.

.

2. Objetivos

2.1. Objetivos generales

Optimizar los pasos de síntesis, bioconjugación y caracterización de nanopartículas de oro (AuNPs) conjugadas a distintas proteínas adaptadoras (*inmunoglobulinas, estreptavidina, proteína A/G, Spy-catcher*), utilizando distintas estrategias de inmovilización, de modo tal de obtener una serie de nanopartículas modificadas que ofrezcan gran versatilidad de cara a su implementación en futuros ensayos analíticos. Y, recíprocamente, diseñar ensayos analíticos capaces de caracterizar en profundidad a estas nanopartículas modificadas.

2.2. Objetivos específicos

- a) Sintetizar nanopartículas de oro según el método de Turkevich y caracterizarlas mediante diferentes estrategias experimentales clásicas (espectrofotometría UV/VIS, microscopía electrónica, dispersión dinámica de luz y determinación de potencial-ζ.
- b) Obtener AuNPs modificadas con anticuerpo (Ab) mediante inmovilización covalente y adsorción física.
- c) Evaluar la utilidad de la evidencia aportada por estrategias experimentales clásicas en la caracterización de los conjugados AuNP-Ab.
- d) Proponer un conjunto de nuevos abordajes experimentales para caracterizar los conjugados AuNP-Ab, entre ellos, estudio de la estabilidad coloidal, evaluación electroquímica, movilidad electroforética, cromatografía de exclusión molecular y espectroscopía de dispersión Raman intensificada en superficie.

- e) Sintetizar y caracterizar AuNPs modificadas con proteína A/G o estreptavidina, de modo tal de posibilitar el anclaje orientado de anticuerpos no modificados o biotinilados, respectivamente.
- f) Emplear los conjugados AuNP-anticuerpo en una estrategia de detección colorimétrica (cuantitativa) y/o de marcación por microscopía electrónica de transmisión, para vesículas extracelulares (EVs) obtenidas de sobrenadante de cultivo celular.
- g) Cuantificar EVs mediante sensado de pulsos resistivos acoplado a microfluídica (MRPS) y citometría de flujo para nanopartículas (nanoFCM) y caracterizar sus marcadores de superficie mediante citometría de flujo convencional y la plataforma ExoView, comparando estos resultados con los obtenidos por inmunomarcación por TEM, utilizando nuestras propias AuNPs modificadas.
- h) Evaluar la posibilidad de utilizar ingeniería de proteínas a los efectos de obtener nanopartículas unidas de forma covalente y orientada a proteínas de interés. En concreto, evaluar la incorporación de una secuencia aminoacídica conteniendo una cisteína terminal a la proteína SpyCatcher como estrategia de inmovilización covalente (mediante enlace S-Au) de proteínas ingenierizadas, haciendo uso del sistema de anclaje SpyCatcher-SpyTag.

3. Materiales y Métodos

3.1 Reactivos y soluciones

Para la síntesis de AuNPs se empleó ác. cloroaúrico (HAuCl₄.3H₂O, 99.9 %, Sigma-Aldrich), y citrato de sodio (Na₃C₅H₆O₈, 99 % Carlo Erba). Para el intercambio de ligando se empleó ác. 11-mercaptoundecanoico (MUA, 95 %, Sigma-Aldrich), mientras que para la reacción de inmovilización covalente 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida hidrocloruro (EDC, 98 %, Sigma-Aldrich) y N-hidroxisuccinimida (NHS, 98 %, Sigma-Aldrich) o su variante N-hidroxisulfosuccinimida (s-NHS, 98 %, Sigma-Aldrich).

En los ensayos de estabilidad coloidal en placa se empleó cloruro de sodio NaCl (99 %, Anedra) mientras que en el formato titulación se empleó nitrato de sodio (NaNO₃, 98 %, Sigma-Aldrich). Para las determinaciones electroquímicas se empleó hexacianoferrato(III) de potasio (K₃Fe(CN)₆, > 99 %, Fluka) en concentración 1 mM en KCl 0.1 M (KCl, 99 %, MERCK). Para el ajuste de pH se empleó hidróxido de sodio (NaOH, 97 %, Anedra). Las determinaciones electroforéticas se realizaron en geles de agarosa (BioReagent, low EEO).

A lo largo de este trabajo se emplearon las siguientes soluciones buffer:

PB (NaH2PO4/ Na2HPO4 5 mM, pH = 7.4) PB_{low} (NaH2PO4/ Na2HPO4 5 mM, NaCl 5 mM, pH = 7.4) PB_{high} (NaH2PO4/ Na2HPO4 5 mM, NaCl 50 mM, pH = 7.4) PBS (NaH2PO4/ Na2HPO4 10 mM, NaCl 150 mM, KCl 2 mM, pH = 7.4) TAE (Tris 40 mM, ácido acético 20 mM y EDTA 1 mM, pH 8) MES (ác. 2-(N-morfolino)etanosulfónico 5 mM, pH = 5) MES_{low} (ác. 2-(N-morfolino)etanosulfónico 5 mM, NaCl 5 mM pH = 5) Los anticuerpos y proteínas empleados fueron en los ensayos de bioconjugación fueron: anticuerpo monoclonal anti-P15 (Ab, ~150 kDa, 200 µg/mL, IgG1 Santa Cruz Biotechnology), seroalbúmina bovina (BSA, ~66 kDa, libre de proteasas, > 96 %, Capricorn Scientific), estreptavidina (Strp, ~55 kDa, 1 mg/mL, Santa Cruz Biotechnology) y proteína recombinante A/G (A/G, ~50 kDa, 30 mg/mL, Thermo Scientific).

Además, se emplearon para ensayos adicionales, anticuerpo monoclonal de ratón anti-P16 (200 μg/mL, F-12, IgG2aκ, Santa Cruz Biotechnology) y anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD9 (200 μg/mL, C-4 IgG1κ, Santa Cruz Biotechnology).

En los ensayos con EVs mediante TEM se empleó, anti-CD9 (anticuerpo de ratón antihumano CD9, IgG1κ, 500 µg/mL, H19a, BioLegend) y anti-CD81 (anticuerpo de ratón antihumano CD81, IgG2b, 500 µg/mL, MAB4615, R&D Systems). Como control negativo se empleó anticuerpo anti nucleolina (anti-humano C23, IgG1k, 200 µg/mL, sc-8031, Santa Cruz Biotechnology).

Para citometría de flujo se empleó Fc Blocking (Human TruStain FcX[™]), y anticuerpos conjugados a fluoróforo, anti-CD9 (anti-human CD9 Antibody, Biolegend, N^o cat: 312116, PE/Cy7) y anti-CD81 (anti-human CD81 Antibody, Beckman Coulter B19717, CD81-Pacific Blue, JS64, 0.5 mL, ASR).

Los ensayos con proteínas ingenierizadas involucraron las proteínas SpyCatcher (6000 μg/mL), SpyCatcherCys(M) (monómero, 570 μg/mL), SpyCatcherCys(D) (dímero, 1400 μg/mL) y proteína verde fluorescente conjugada a SpyTag (tGFP, 3000 μg/mL).

Todas las soluciones se prepararon en agua ultrapura (resistividad de 18.2 MΩ.cm)

3.2 Procedimientos de síntesis

Síntesis de nanopartículas de oro (AuNP)

El material de vidrio empleado en la síntesis y almacenamiento de las AuNPs fue previamente tratado con una solución de agua regia (HCl:HNO₃ 3:1 (v/v)) por 30 min, enjuagado posteriormente con abundante agua ultrapura (resistividad > 18.2 MΩ/cm) y secado en estufa a 60 °C previo a su uso. La síntesis de AuNPs se llevó a cabo según el método tradicional de Turkevich ³⁶ con modificaciones introducidas por Liu y Lu²⁷⁷. Brevemente, en un matraz de dos bocas con fondo redondo se colocaron 50 mL de agua ultrapura y 1 mL de una solución de ác. cloroáurico 20 g/L (≈ 50 µmol), se completó el sistema con un condensador de agua. Se calentó hasta ebullición y se agregaron inmediatamente 5 mL de solución de citrato de sodio 38.8 mM. La solución se continuó calentando a reflujo hasta la aparición de un color rojo-bordó intenso y se mantuvo por 10 min adicionales. La solución de AuNP-cit se dejó enfriar durante 24 hs en la oscuridad antes de su caracterización.

Modificación de AuNPs con ác. 11-mercaptoundecanoico (MUA)

La síntesis de nanopartículas de oro recubiertas por MUA (AuNPs-MUA) se llevó a cabo mediante el método de intercambio de ligando. Previamente a la síntesis todo el material de vidrio fue tratado con una solución 12 M de NaOH durante 1 h, enjuagado vigorosamente con agua ultrapura y secado en estufa ²⁷⁸. En un vial se agregó 1 mL de solución de AuNP-cit (11-13 nM) seguido de 20 µL de solución etanólica de ác. 11-mercaptoundecanoico 500 mM en una relación molar AuNP-cit:MUA, 1:10⁶, y se incubó

durante 24 hs a temperatura ambiente (*T*_{amb}). Posteriormente se filtró la solución (Whatman Anotop, 0.45 µm, celulosa) para remover el exceso de MUA agregado, y se almacenó a 4 °C para su posterior análisis.

Inmovilización covalente de anticuerpos (Ab) sobre AuNP-MUA

La unión covalente se llevó a cabo sobre AuNP-MUA usando el abordaje clásico de la activación con 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida hidrocloruro (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS), o su variante N-hidroxisulfosuccinimida (s-NHS) ⁷⁰. La activación de EDC/NHS se realizó en *buffer* fosfato de baja fuerza iónica, PB_{low}. En el Anexo 1 se detallan los ensayos previos para la selección de la solución *buffer* para la reacción. Antes de la activación superficial con EDC/NHS, las AuNP-MUA se centrifugaron 3X a 10000 g durante 30 min a 4 °C, descartando el sobrenadante y resuspendiendo en PB_{low}. Posteriormente, se colocaron 400 µL de AuNP-MUA (≈10 nM) en un tubo de polipropileno de 1.5 mL, simultáneamente se añadieron 10 µL de EDC y 20 µL de NHS o s-NHS y se incubaron durante 5 min a *T*_{amb}. Las concentraciones de EDC y NHS/s-NHS ensayadas fueron 7.4, 3.7 y 1.85 mM y 14.8, 7.4 y 3.7 mM, respectivamente, manteniendo una relación molar fija EDC:NHS:s-NHS(NHS) 2:1. Finalmente, se agregaron 40 µL de Ab 66 µg/mL y la mezcla se incubó por 24 hs a 4 °C.

Para el ajuste de la metodología (en este ensayo y posteriores) se empleó el anticuerpo monoclonal anti-P15 y posteriormente el mismo fue sustituido por las diferentes proteínas/anticuerpos ensayados en este trabajo. La solución de Ab se preparó en *buffer* fosfato de mayor fuerza iónica, PB_{high}. Luego de las 24 hs se analizaron los productos de reacción mediante los espectros UV/VIS, movilidad electroforética y DLS.

Adsorción no covalente de proteínas en AuNP-MUA y AuNP-cit

Primeramente, se evaluó el efecto de la concentración de Ab y el pH de incubación sobre el proceso de adsorción sobre las AuNPs. Para ello se incubaron 10 µL de soluciones de Ab a varias concentraciones (33, 66 y 132 µg/mL, en PB_{high}) con 100 µL de AuNP-cit o AuNP-MUA (\approx 10 nM) en una microplaca de 96 pocillos durante 24 hs. El pH se ajustó antes de la adición del Ab, mediante la adición de 5 µL de diferentes soluciones *buffer* de concentración 100 mM, a saber, *buffer* fosfato (PB) en el rango de pH de 5.8 a 7.4, *buffer* borato (BB) para el rango 8.0 a 8.6 y *buffer* carbonato (BC) para el rango de 9.0 a 10.0. Después de la incubación, la estabilidad de las nanopartículas modificadas se midió mediante el ensayo de estabilidad coloidal en placa (ver procedimientos de caracterización más adelante) adicionando 100 µL de solución de NaCl 300 mM, para dar una concentración final de \approx 150 mM. Se realizó una optimización similar con las proteínas seroalbúmina bovina (BSA), estreptavidina (Strp), y proteína recombinante A/G.

Una vez definidas las concentraciones óptimas de proteína, la reacción de bioconjugación se escaló mediante la adición de 100 μ L de soluciones de proteína (Ab, Strp, BSA, A/G) a 1000 μ L de AuNP-cit o AuNP-MUA (solo con Ab). Siempre que fue posible, el exceso de proteínas se removió por centrifugación (3X, 30 min, 10000*g*, 4°C) y las AuNP-proteína fueron resuspendidas en PBS y se caracterizaron mediante varias técnicas, como se muestra en el Esquema 1 del Capítulo 1.

3.3 Procedimientos de caracterización de AuNPs

Determinación del diámetro de partícula mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

Para la adquisición de imágenes de TEM se depositaron 10 µL de solución de AuNPs (≈ 5 nM) en una grilla de cobre recubierta con carbono, y se dejó evaporar el solvente durante 40 min a T_{amb} . Las imágenes se obtuvieron en un microscopio JEOL, modelo JEM 1010 con un voltaje de aceleración de 80 kV (Facultad de Ciencias, UdelaR). Para la determinación del diámetro de partícula (d_{TEM}) se analizaron 14 imágenes (magnificación: 100000X) mediante el *software* FIJI, a partir de imágenes binarias obtenidas con la herramienta "*Make Binary*". Se empleó la herramienta "*Analyze Particles*" restringiendo la circularidad a un valor mínimo de 0.85 ²⁷⁹. Fueron contabilizadas y medidas por el *software* un total de 510 partículas, a partir de las cuales se construyó el histograma de distribución de tamaños.

Espectroscopía UV/VIS

Para la caracterización mediante espectroscopía UV/VIS se empleó un espectrofotómetro Analytika (Alemania) modelo Specord 200. Los espectros fueron registrados con una resolución de 0.2 nm a una velocidad de barrido de 10 nm/s, lo que permitió detectar cambios en la posición de las bandas de absorción con una precisión de 0.4 nm. Para una discusión más detallada de la determinación de estos parámetros ver Figura A1.1 y Tabla A1.1 (Anexo 1). En general se realizaron barridos entre 320 y 800 nm para la determinación de la posición del máximo de la banda de absorción de resonancia superficial del plasmón localizada (λ_{LSPR}). Se realizaron diluciones de AuNP-cit y AuNP-MUA en agua ultrapura y se determinó el rango lineal de trabajo mediante curvas de calibración a partir de la absorbancia obtenida de los espectros UV/VIS.

Simulaciones espectroscópicas basadas en la Teoría de Mie

Se simuló el espectro de absorción + dispersión (atenuación) de las soluciones de AuNP en el rango de 200 a 800 nm mediante el *software* MiePlot v.4.5.01. Se asumió un sistema conteniendo 50 NPs esféricas de oro de 13 nm de diámetro (índice de refracción real = 0.153; imaginario = 3.601), empleando la aproximación de Segelstein para simular el entorno acuoso ²⁸⁰. Se fijó el grado de dispersión de la población, asumiendo una distribución *logNormal*, con un desvío estándar de 3 nm (valores máximos permitidos por el *software*).

Determinación del coeficiente de atenuación molar y cálculo de la concentración de AuNPs

La determinación de la concentración de AuNP se realizó mediante dos abordajes. En primer lugar, considerando partículas esféricas de 13 nm de diámetro (según TEM) se determinó el volumen y masa de cada NP. Con base en la cantidad de HAuCl₄ utilizado y asumiendo su consumo completo (es el reactivo limitante), se determinó el número de partículas presentes en el volumen de reacción, a partir de la cual se estimó la concentración. A partir de esta concentración, y con el valor de absorbancia en el máximo de plasmón (LSPR) se estimó el coeficiente de atenuación molar (ε_{LSPR})

El segundo procedimiento se realizó en base a los trabajos de Haiss et al. ⁵⁰. Brevemente, a partir de la relación AbsLSPR/Abs450nm y empleando las ecuaciones deducidas en dicho trabajo a partir de simulaciones espectroscópicas, se determinó el diámetro de partícula a partir del cual en relación a los datos obtenidos por Haiss et al., se determinó el valor de ε_{450} . A partir de la absorbancia a 450 nm se estimó la concentración de AuNP y una vez obtenida

esta, se calculó el valor de ε_{LSPR} .

En el Anexo 1, se encuentra un mayor detalle de los cálculos de cada determinación.

Medidas de diámetro hidrodinámico mediante Dispersión Dinámica de Luz (DLS)

Para las determinaciones de DLS se empleó un equipo Brookhaven ZetaPlus 90 (EE.UU) equipado con un láser de 659 nm y un correlacionador a un ángulo fijo de 90°. Las determinaciones se realizaron en celdas de poliestireno de 1 cm de camino óptico, a 25 °C, siguiendo recomendaciones de la norma ISO 22412:2017 (International Organization for *Standardization*). Las soluciones de AuNP fueron diluidas hasta ≈ 1 nM empleando NaCl 1 mM como electrolito soporte previamente filtrado (filtro de celulosa, 0.2 µm,). La evaluación del efecto de la concentración de electrolito soporte se detalla en la Figura A1.5 del Anexo 1. Para las medidas se fijó el índice de refracción del medio al valor del índice de refracción del agua y el componente real e imaginario del índice de refracción de las AuNPs, obtenidos de la literatura ²⁸¹. Se realizaron 6 ciclos de medida por muestra, cada uno de 2 min de duración, y se procesaron los datos mediante el software Particle Solutions v. 2.5 mediante el algoritmo CONTIN. Se tomaron los valores de diámetro hidrodinámico medio calculado (*d*_{hmed}), y por número brindado por el *software*, mientras que el análisis de los datos de intensidad se realizó externamente con los datos brutos, ajustando siempre que fuera posible a una distribución *logNormal* para obtener el valor de diámetro hidrodinámico de cada población presente (d_h).

Determinación del potencial-

Para la determinación del potencial-ζ, se empleó un sistema electródico (SZP-*Surface Zeta Potential electrode*, AQ-1244, Brookhaven, EE.UU) que consiste en dos electrodos de paladio

paralelos. Se emplearon para las determinaciones iguales concentraciones de AuNP y electrolito soporte que para las medidas de DLS. Para la obtención de un valor de potencial- ζ se realizaron 10 rondas de medida de 6 ciclos cada una, siendo los datos analizados en el *software Particle Solutions* v. 2.5 mediante el algoritmo de Smoluchowski, reportándose el valor de potencial- ζ medio, luego de la eliminar valores de *outliers* mediante el *test*-Q de Dixon (95 % confianza). El pH de la solución analizada fue registrado luego de cada medida.

Análisis mediante espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

Para la caracterización de los ligandos presentes sobre la superficie de las AuNPs se empleó la técnica de FTIR. Previamente las muestras AuNP-cit y AuNP-MUA fueron sometidas a 3 ciclos de centrifugación (10000*g*, 30 min) y lavado con NaCl 5 mM. Finalmente fueron resuspendidas en solución de NaCl 5 mM, y se depositaron 10 µL sobre una ventana de BaF₂ y secados al vacío. Se realizaron 6 ciclos de depósitos/secado antes de cada medida. Se adquirieron 50 interferogramas con una resolución de 4 cm⁻¹, las señales fueron apodizadas con una función Happ-Genzel y corregidas por humedad y CO₂ ambiente empleado el *software* IR-Resolution. Como blanco se empleó la misma ventana de BaF₂ antes de su modificación, a la humedad y temperatura ambientes.

Análisis mediante espectroscopía Raman intensificada en superficie (SERS)

Para los análisis por espectroscopía Raman se prepararon 500 μ L de solución de AuNP conjugadas a proteínas. Luego de 24 hs de incubación con la proteína de interés se centrifugó a 10000g a 4°C durante 30 min, se retiró el sobrenadante y se resuspendió en *buffer* PBS pH 7.4. Las muestras se conservaron en hielo hasta el momento del análisis en

un microscopio Raman confocal WITec alpha300-RA (Polo Tecnológico de Pando, Facultad de Química, proyecto EQC-X-2012-1-14, UdelaR). Para la obtención de los espectros se depositaron 50 µL de solución de AuNP sobre un soporte de papel aluminio y se iluminó con un diodo laser de 785 nm (potencia < 10 mW, a temperatura ambiente). Los espectros SERS se recopilaron en varias rutinas de series temporales, cada una compuesta por 100 espectros utilizando un tiempo de integración de ~ 0.1 s. Para el procesamiento de los espectros SERS se realizó un suavizado mediante el método Savitzky-Golay (10 puntos, polinomio grado 2) posteriormente se estimó la línea de base mediante el método *Asymmetric Least Squares Smoothing* (factor de asimetría: 0.00005, límite:0.005, factor de suavizado:2, iteraciones:10) para cada espectro, los cuales finalmente se combinaron para obtener el espectro promedio de cada muestra.

Ensayo de estabilidad coloidal (Titulación)

La evaluación de la estabilidad coloidal se determinó automáticamente mediante la adición de volúmenes crecientes (180 ± 30 µL) de NaNO₃ 0,3 M a intervalos de 2 min con una bomba peristáltica (bomba FIA, Metrohm) a una solución por lotes de 10 mL de AuNPs en condiciones de agitación. La solución se bombeó continuamente a una celda de flujo de cuarzo de 1 mL dentro del espectrofotómetro. Un microcontrolador activa la adición de solución de NaNO₃ en intervalos de tiempo preestablecidos, empleando un *software* diseñado por el Dr. Santiago Botasini (Laboratorio de Biomateriales, Facultad de Ciencias, UdelaR). Cada 2 min, se registró un barrido espectral entre 350 nm y 900 nm y la absorbancia máxima λ_{LSRP} (asignada a la presencia de AuNP no agregadas), se corrigió por la dilución, se normalizó y se graficó frente a la concentración creciente de NaNO₃ de la dispersión coloidal. En general se realizaron ensayos por triplicado para cada muestra.

Ensayo de estabilidad coloidal en placa

Para el análisis de la estabilidad coloidal en placa, se depositaron 100 µL de solución de AuNP (con o sin modificaciones) en una placa de 96 pocillos (fondo plano) y se agregaron 100 µL de solución de NaCl 300 mM, de manera que la solución final fuera 150 mM en NaCl (concentración salina habitual en soluciones biológicas). Se incubó durante 10 min y se realizó la lectura espectrofotométrica en lector de placas a 520 nm y 650 nm (Tecan Infinite F50). Para la evaluación de la estabilidad coloidal se determinó la relación Abs520/Abs650 en función de la concentración de proteína. En algunos ensayos se registraron los espectros UV/VIS de las soluciones antes y después del agregado de NaCl entre 320 y 800 nm en un lector de placas Varioskan Lux (Thermo Scientific).

Ensayo de movilidad electroforética

Los ensayos de movilidad electroforética se realizaron en un gel de agarosa al 1 % (p/v) en *buffer* TAE. Se sembraron 10-40 μ L de la muestra y se realizó la corrida a 100 V durante 5 min en una cuba electroforética (Cleaver Scientific, sistema multiSUB-mini horizontal). La mayoría de imágenes de los geles fueron obtenidas mediante fotodocumentador (Image Quant 800) y la distancia de migración relativa (*R*^{*t*}) se determinó en relación a las AuNP-MUA con el *software* IC-Measure.

Cromatografía de exclusión molecular (SEC)

Con el fin de analizar y separar las AuNP modificadas con proteínas de las proteínas libres y las AuNP no conjugadas, se empleó una columna de cromatografía de exclusión molecular preempaquetadas (iZon Science, qEVoriginal, tamaño de poro nominal de 70 nm, volumen muerto = 3 mL). Brevemente, la columna se equilibró con 50 mL de *buffer* fosfato (PB_{low} para AuNP-cit, PBS para las restantes AuNPs) y luego se sembraron 500 μ L de solución de AuNPs en la parte superior, formando una capa delgada. La elución se llevó a cabo en PBS o PB_{low}. Se recogieron alícuotas de 500 μ L hasta un volumen de elución total (*V*_e) de 20 mL, las que se transfirieron a una microplaca de 96 pocillos para su análisis espectrofotométrico. Se midieron las absorbancias a 280 nm (BSA) o 520/650 nm (AuNP libres) utilizando un espectrofotómetro de doble haz (Analytika Spelec 200) o un lector de microplacas (Tecan Infinite F50), respectivamente. Para evaluar el *V*_e de proteínas libres, se empleó una solución de BSA de 3 mg/mL como referencia, según lo reportado por el fabricante de la columna.

Estudios electroquímicos

La voltamperometría cíclica (VC) se realizó a T_{amb} en un sistema electroquímico serigrafiado (220AT, DropSens) que consta de una capa circular de oro de 4 mm de diámetro (área geométrica 0.126 cm²) como electrodo de trabajo, un anillo de oro truncado como contraelectrodo, que se completa con otro anillo que constituye el electrodo de cuasi-referencia de plata. El potencial se controló con un potenciostato STAT400 DropSens. Las soluciones coloidales purificadas se depositaron sobre el electrodo de trabajo y se dejaron secar entre cada adición (20 μ L, 5 adiciones). Posteriormente, se colocaron 70 μ L de una solución que contenía el anión hexacianoferrato(III) ([Fe(CN)₆]³⁻) en concentración 1 mM en KCl 0.1 M, formando una gota que cubría todo el sistema electrolítico. Después de un paso de preacondicionamiento a +0.50 V durante 30 s, el potencial se escaneó a 0.050 V s⁻¹ en dirección negativa hasta -0.15 V, finalizando el ciclo en dirección positiva en un valor de +0.50 V. La diferencia entre los potenciales de pico de oxidación y de reducción, $\Delta E_{\rm P}$, se

anotó para el cálculo de la constante de velocidad heterogénea, ko 282.

Evaluación del pegado de proteínas mediante isotermas de Langmuir

Para el estudio de la inmovilización de las proteínas a las AuNP mediante aproximaciones a una isoterma de Langmuir se obtuvieron los espectros UV/VIS de soluciones de AuNP (\approx 10 nM) en el rango de 400 a 800 nm (resolución: 0.2 nm, velocidad barrido: 10 nm/s) incubadas durante 1 h y 24 hs con diferentes concentraciones de proteína (preparadas en PBS). Los espectros fueron analizados y comparados entre sí mediante la relación Abs₅₂₀/Abs₆₅₀ para descartar la formación de agregados y se determinó el corrimiento de la posición del máximo de absorción, $\Delta\lambda$, para cada concentración de proteína (relativo a la posición del máximo de AuNP-cit). Para la construcción de las isotermas se graficó el valor de $\Delta\lambda$ para cada concentración de proteína normalizado por valor máximo de $\Delta\lambda$ dentro del mismo ensayo ($\Delta\lambda/\Delta\lambda_{máx}$) en función de la concentración de proteína expresada en valores de mol/L. Se realizó un ajuste no lineal a una isoterma de Langmuir de acuerdo con la ecuación ²⁸³:

$$\frac{\Delta\lambda}{\Delta\lambda_{max}} = \frac{K_a[proteina]}{1 + K_a[proteina]}$$
(ec.23)

donde el valor de la constante de asociación, K_a , se estimó a partir del ajuste al modelo, siempre que fue posible.

3.4 Obtención y purificación de vesículas extracelulares (EVs)

Las EVs empleadas en los ensayos fueron obtenidas a partir del sobrenadante de cultivo de células epiteliales humanas de osteosarcoma (U2-OS). Las mismas se cultivaron en botellas T75 con medio condicionado (DMEM, 10 % suero fetal bovino) hasta entre 80 y 90 % de confluencia. Previo a la obtención de EVs se retiró el medio condicionado, las células se lavaron 3 veces con PBS y se agregó 7 mL de medio MEGM (sin suero). A las 24 hs se retiró el medio conteniendo EVs y se centrifugó a 2000g durante 15 min a 4 °C para eliminar restos celulares. Se descartó el pellet y los 7 mL de sobrenadante se concentraron mediante ultrafiltración (Vivaspin 10 kDa, 4 °C, 5000 rpm) hasta 500 µL. En este punto las muestras fueron congeladas a -20 °C para su posterior uso, dentro de una ventana de tiempo no mayor a un mes. Las EVs fueron purificadas empleando buffer a temperatura de heladera en columnas de exclusión molecular (SEC, qEVoriginal, iZON[®], tamaño de poro \leq 70 nm). Brevemente, se sembraron 500 µL de sobrenadante concentrado y se realizó la elución por gravedad con PBS (filtrado por 0.2 µm). Se recolectó un volumen de 2.8 mL (volumen muerto) y se recolectaron fracciones de 1 mL. Las fracciones 1 y 2 (que contienen la mayoría de las EVs) se juntaron y concentraron posteriormente mediante ultrafiltración (Amicon, 10 kDa, 4 °C, 5000 rpm) hasta 100 o 200 μL.

3.5 Cuantificación y caracterización de EVs

Cuantificación y determinación de distribución de tamaños de EVs mediante MRPS

Para la cuantificación de EVs se empleó un equipo de sensado por pulsos resistivos acoplado a microfluídica (MRPS, nCS1, Spectradyne). Para obtener un valor representativo de la concentración y distribución de tamaños de las EVs obtenidas, se creó un *pool* (28 mL)

de sobrenadante de células U2-OS (4 frascos t75, conteniendo 7 mL de medio) el cual se concentró hasta 2 mL y se fraccionó en 4 alícuotas de 500 μ L, una de las cuales se empleó para la separación y cuantificación de EVs por MRPS (las restantes se mantuvieron a -20 °C para su uso posterior). Para la determinación, la muestra de EVs fue concentrada hasta 200 μ L (Amicon, 10 *k*Da, 4 °C, 5000 rpm), y luego se preparó una dilución 1/10 en *buffer* PBS-Tween-20 (0.1 % v/v) previamente filtrado por 0.2 y 0.02 μ m al momento de realizar la dilución. Posteriormente se tomaron 10 μ L de la dilución anterior y se colocaron en un *chip* pre-calibrado de MRPS (C400, rango de tamaño 65-400 nm, Spectradyne), realizándose la medida con un tiempo de integración de 10 ms, hasta recolectar aproximadamente 3000 eventos.

Para la limpieza de datos se construyeron gráficos de dispersión con los parámetros diámetro (nm) *vs. transit-time* (ms) en función de la relación señal/ruido (SN) mediante el *software* OriginPro 2018. De estos gráficos se determinaron los valores de corte óptimos para los parámetros *transit-time* y SN, los cuales se aplicaron posteriormente para la limpieza de datos y eliminación de ruido en el *software* propietario del equipo (nCS1, Viewer). Los resultados finales se utilizaron para la obtención de los gráficos de distribución de tamaño y cuantificación de las muestras de EVs.

<u>Cuantificación y determinación de distribución de tamaños de EVs mediante nanoFCM</u>

La distribución del tamaño y concentración de las EVs se evaluó además mediante citometría de flujo de nanopartículas (NanoFCM Co.) en el laboratorio del Dr. Ken Witwer (Departamento de Fisiopatología Molecular y Comparativa, Universidad Johns Hopkins). Se utilizaron fotodiodos de avalancha de conteo de fotones individuales (APD) para la detección de dispersión lateral (SSC) de partículas individuales. El instrumento se calibró en cuanto a concentración y tamaño utilizando una mezcla de nanopartículas de sílice (proporcionado por NanoFCM como perlas de sílice premezcladas con diámetros de 68, 91, 113 y 151 nm). Las preparaciones de EV se diluyeron al medio en PBS, se pasaron por el detector y se registraron los eventos durante 1 min a una velocidad de flujo de 27.5 nL/min. La velocidad de flujo y la intensidad de dispersión lateral se determinó el número y tamaño de partículas correspondientes, empleando sendas curvas de calibración. A partir del volumen de muestra analizado se determinó la concentración de EVs.

Caracterización de EVs mediante citometría de flujo

Los análisis por citometría de flujo se realizaron en la Unidad de Biología Celular del Instituto Pasteur de Montevideo, en un citómetro Attune NxT - Thermo Fisher Scientific con resolución de partícula de hasta 100 nm. Para la detección de eventos se tomaron datos tanto empleando el láser azul (488 nm) como violeta (405 nm). Las EVs se separaron según el procedimiento descripto anteriormente. 200 µL de la solución concentrada de EVs purificadas el mismo día, se diluyeron hasta 1000 µL con PBS filtrado (0.2 µm) y se trató con 5 µL de Fc Blocking durante 45 min en frio (Human TruStain FcXTM). Luego de esto alícuotas de 200 µL fueron incubadas con 1 µL de anti-CD9 (anti-human CD9 Antibody, Biolegend, Nº cat: 312116, PE/Cy7), 1 µL de anti-CD81 (anti-human CD81 Antibody, Beckman Coulter B19717, CD81-Pacific Blue, JS64, 0.5 mL, ASR) y con una mezcla de ambos anticuerpos durante 1 h a 4 °C, en oscuridad. Además, se analizó una alícuota de EVs sin anticuerpo, y la restante alícuota se diluyó con PBS TritonX 100 (concentración final 10 % v/v) y se incubó durante 30 min. Los datos de citometría se procesaron con el *software* FlowJo v10.9.0.

Caracterización de EVs mediante SP-IRIS (ExoView)

La caracterización mediante ExoView en el laboratorio del Dr. Ken Witwer (Departamento de Fisiopatología Molecular y Comparativa, Universidad Johns Hopkins), según el procedimiento descripto en Mallick et al. 2020²⁵⁸. Brevemente una alícuota de EVs purificadas por SEC se incubó a temperatura ambiente durante 16 hs sobre ExoViews *chips* (NanoView Biosciences, Brighton, MA) que contenían anticuerpos inmovilizados: antihumano-CD81 (JS-81), anti-humano-CD63 (H5C6), anti-humano-CD9 (HI9a), y, como control negativo, anti-mouse IgG1 (MOPC-21). Luego, los *chips* se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con un cóctel de anticuerpos conjugados a fluoróforo, anti-CD81 antihumano (JS-81, CF555), anti-CD63 antihumano (H5C6, CF647) y CD9 antihumano (HI9a, CF488A) a una dilución de 1:1200 (v/v) en una mezcla 1:1 (v/v) de *buffer* de incubación y *buffer* de bloqueo. Luego de varias etapas de lavado, los *chips* fueron analizados mediante reflectancia interferométrica y detección de fluorescencia en un escaner ExoView (NanoView Biosciences, Brighton, MA).

Los datos se analizaron utilizando el software NanoViewer 2.8.10 (NanoView Biosciences).

3.6 Ensayos colorimétricos para detección de EVs con AuNPs

El primer abordaje de cara a un ensayo colorimétrico para detección de EVs se realizó mediante ensayos en placa, evaluando diferentes relaciones EV:AuNP (partícula:partícula). Antes de cada ensayo 500 μ L de las AuNP-cit-A/G se centrifugaron (30 min, 10000*g*, 4 °C), se resuspendieron en 500 μ L de PBS, se le adicionaron 50 μ L de solución de BSA 200 μ g/mL y se incubaron por 1 h. Luego de esto se prepararon diluciones (1/2 a 1/50) y se colocaron 100 μ L de cada una en una placa de 96 pocillos. Inmediatamente se agregaron 10 μ L de solución de EVs previamente incubadas con anticuerpo anti-CD9 y se incubó durante 1 h a

 T_{amb} . Las concentraciones de las preparaciones de EVs ensayadas (determinadas por MRPS) quedaron comprendidas en el rango entre 10^{10} - 10^7 partículas/mL. Como control se realizó el mismo ensayo, pero empleando AuNP-cit-BSA.

En otro abordaje se realizó una titulación espectrofotométrica, en la que 100 µL de solución de EVs ($\approx 10^{10}$ partículas/mL, incubadas previamente con anti-CD9) se diluyó hasta 800 µL en PBS. Se registró el espectro visible (400 a 800 nm) antes y luego de cada agregado de 20 µL de solución de AuNP-A/G (≈ 10 nM).

Finalmente, para ambos ensayos se evaluaron los espectros y la relación Abs₅₂₀/Abs₆₅₀ en busca de posibles cambios originados en la formación de agregados de AuNP y EVs. Los resultados se muestran en la Sección 3 del Anexo 2.

3.7 Caracterización de EVs con AuNPs mediante TEM

Para los ensayos de inmunofenotipado se obtuvieron muestras frescas (obtenidas dentro de las 24 hs previas) de EVs según el procedimiento descripto anteriormente. Para este ensayo, 500 μ L de sobrenadante conteniendo EVs fueron incubados previamente a la separación mediante SEC con 1 μ L de diferentes anticuerpos dirigidos contra las tetraspaninas de superficie, a saber: anti-CD9 y anti-CD81. Como control negativo se emplearon EVs incubadas con anticuerpo anti nucleolina (1 μ L, anti-humano C23) y AuNPs modificadas con BSA.

Para la realización del inmunofenotipado se emplearon grillas de cobre con film de carbono (CF300-Ni-50, Electron Microscopy Sciences). Primeramente, se agregaron 20 μ L de solución de EVs marcadas sobre la grilla y se incubó durante 10 - 15 min a *T*_{amb}. Luego se

secó la gota con papel absorbente para eliminar el exceso de líquido e inmediatamente después la grilla se invirtió y se colocó sobre la superficie de una gota de PBS-BSA 0.1 % durante 30 min a T_{amb} para el bloqueo se sitios de la grilla expuestos. Inmediatamente después se retiró la grilla y se lavó por flotación durante 1 min en *buffer* PBS, se secó y colocó sobre una gota de solución de AuNP-cit-A/G (dilución 1/5 en PBS-BSA, [BSA]^{*t*} = 20 µg/mL, preparada 30 min antes). Posteriormente la grilla se lavó 3 veces con PBS por flotación, incubando la grilla durante 5 min. Después de esto se incubó por 1 min en solución de acetato de uranilo al 2 % (tinción negativa), se lavó 3 veces con agua ultrapura y se incubó nuevamente en solución de acetato de uranilo, realizándose un lavado final con agua ultrapura. Se eliminó el exceso de agua con papel absorbente y se dejó secar la grilla al aire. La observación se realizó en el microscopio electrónico JEOL JEM 2100 de 200 *k*V (cámara CCD Gatan Orius 10, CURE, Rocha).

Para el análisis se tomaron un promedio de 150 imágenes por ensayo a una magnificación de 80000x, las cuales fueron procesadas en el *software* Digital Micrograph (Free License, Gatan Microscopy). De cada imagen se realizó el conteo manual (n = 381) de las EVs marcadas y no marcadas, registrando paralelamente la cantidad de AuNPs unida a cada EV.

Adicionalmente se analizó la distribución de tamaños de las EVs a partir de las imágenes de TEM, midiendo el diámetro de cada EV empleando el *plugin* libre "*measure_features*" (Dave Mitchell's, http://www.dmscripting.com/measure_features.html).

3.8 Estudio de la inmovilización de proteínas ingenierizadas sobre AuNPs

Para esta parte del trabajo se empleó como sistema de trabajo la proteína SpyCatcher, la cual es un derivado de la escisión del domino CnaB2 de la proteína de unión a fibronectina (FbaB) de Streptococcus pyogenes ¹⁰⁷. Una versión modificada fue diseñada específicamente para esta tesis (SpyCatcherCys(M)), incorporando en su extremo N-terminal una secuencia de 20 aminoácidos, siendo el penúltimo un residuo de cisteína, el cual se postula pueda enlazarse covalentemente con los átomos de oro superficiales de la AuNP. Ambas proteínas (modificada y no modificada) fueron expresadas en forma recombinante y purificadas para este trabajo por el Dr. Agustín Correa del Núcleo de Ingeniería de Proteínas del Instituto Pasteur de Montevideo. Adicionalmente, durante el proceso de producción de la proteína modificada, surgió una segunda forma de la proteína correspondiente a una versión dimérica (SpyCatcherCys(D)), generada por oxidación del grupo -SH de la cisteína de cada subunidad para formar un enlace disulfuro. Esta forma dimérica podía apreciarse como un pico que eluía a menor volumen durante la purificación de la proteína por SEC, y se confirmó que correspondía a un dímero covalente mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras (ver Figura A3.1, Anexo 3), como parte del trabajo realizado por el Dr. Agustín Correa. La secuencia aminoacídica de cada constructo se muestra en la Tabla A3.1 del Anexo 3.

Para la inmovilización de las tres formas de la proteína SpyCatcher sobre AuNP-cit se tomaron 500 µL de solución de NPs (\approx 10 nM) y se incubaron a 4 °C durante 1 h o 24 hs con 50 µL de solución de proteína (10 - 400 µg/mL) preparada en *buffer* PBS. Luego de la incubación se evaluó la estabilidad coloidal mediante ensayo en placa y se caracterizaron los conjugados AuNP-SpyCatcher mediante alguno de los procedimientos evaluados en el

Capítulo 1.

Adicionalmente se intentaron ensayos de unión de los conjugados AuNP-SpyCatcher a proteína verde fluorescente conteniendo la secuencia SpyTag, capaz de unirse covalentemente a SpyCatcher (tGFP), y los constructos se evaluaron mediante espectroscopía UV/VIS, electroforesis y SEC. Para el caso de SEC se evaluó además presencia de tGFP en las diferentes fracciones mediante el registro de la intensidad de fluorescencia (λ_{ex} = 488 nm, λ_{em} = 508 nm).

4. Resultados y discusión

Capítulo 1: Síntesis, caracterización y modificación de AuNPs

A continuación, se recaban los resultados más relevantes para la caracterización de AuNPs y su evaluación luego de cada procedimiento de modificación. El Esquema 1 funciona como guía sobre las técnicas aplicadas en cada paso de modificación ¹.



Esquema 1. Descripción general del diseño del estudio de las AuNPs y las técnicas de caracterización empeladas. S: síntesis de AuNP-cit. I: Intercambio de ligandos MUA/citrato. II: adsorción de Ab no covalente a AuNP-MUA. II*: adsorción de Ab covalente a AuNP-MUA. III: adsorción de proteínas (no covalente) a AuNP-cit. Los recuadros grises indican las técnicas utilizadas para evaluar el éxito de cada paso o para comparar entre variables (proteínas o métodos de inmovilización). Los colores representan las características macroscópicas típicas de cada solución/suspensión coloidal obtenida.

¹ **Nota:** En delante en este capítulo se emplea el término AuNP-cit-proteína para referirse a los diferentes conjugados, con el fin de indicar que se obtuvieron a partir de AuNPs sin modificar.

<u>Resultados</u>

Caracterización de AuNP-cit

El protocolo de síntesis desarrollado en este trabajo permitió obtener una población de AuNPs con un diámetro medio de 13 ± 4 nm (n = 510), determinado según TEM (Figura 1.1). Esta población comprende un rango de tamaño entre 8.4 y 17.5 nm (intervalo de confianza al 95 %) y se ajusta a una distribución normal centrada en un diámetro medio de 12.9 ± 0.1 nm. Esto fue acorde a lo esperado según la literatura reportada ^{36,284}. A partir del análisis de los espectros UV/VIS, se determinó un valor para la posición del máximo de absorción del plasmón a una longitud de onda de 522.2 ± 0.2 nm (Figura 1.2), siguiendo el protocolo optimizado previamente (Anexo 1, Sección 1). El valor experimental para λ_{LSPR} coincidió con el valor obtenido por simulaciones basadas en la teoría de Mie para AuNPs de 13 nm, y la forma de los espectros se encuentra simétricamente centrada (Figura 1.2). El mayor ensanchamiento del espectro experimental frente al simulado radica en que para esta última el software solo permite considerar una población polidispersa con un valor de desvío estándar máximo de 3 nm. Adicionalmente las simulaciones empleando las ecuaciones de Mie, evidenciaron que la forma espectral se debe casi exclusivamente a un fenómeno de absorción, donde el aporte de luz dispersada es prácticamente despreciable (ver Figura A1.3 B, Anexo 1, Sección 2).

Cabe señalar que los espectros no mostraron señales de presencia de agregados, que producen espectros con ensanchamientos asimétricos hacía longitudes de onda mayores. El ancho de pico a media altura (FWHM) fue de 51 nm, lo que reflejó la dispersión de tamaños poblacional, pero en concordancia con la distribución de tamaño determinada por TEM ⁵⁶.



Figura 1.1. A: Histograma de distribución de tamaños de las AuNP-cit obtenido a partir del análisis de las imágenes obtenidas por TEM. B: Micrografía TEM, señalándose la medida de diámetro para algunas AuNP-cit

Mediante la construcción de una curva de calibración, se determinó que 1.2 unidades de absorbancia corresponde al valor máximo para el que se satisface la ley de Lambert-Beer (ordenada en el origen nula, P < 0.05), determinado así el límite para el empleo de la absorbancia como propiedad aditiva (Figura 1.2 B y A1.2 Anexo 1).

La determinación del valor de coeficiente de atenuación molar en el máximo de absorción (ε_{LSPR}) se realizó desde dos aproximaciones, una geométrica y otra óptica. En el primer caso se estimó la concentración de la solución de AuNPs a partir de la cantidad total de oro empleada en la síntesis (asumiendo un consumo completo) y del diámetro de las AuNP obtenido mediante TEM. En el abordaje óptico, a partir de los trabajos de Haiss et al., la concentración de AuNP se determinó a partir del valor de ε_{450} (determinado a partir de aproximaciones teóricas empleando la teoría de Mie) y la absorbancia a 450 nm. Este

análisis permitió estimar un valor de concentración de 13 nM mediante la aproximación geométrica, y de 12 nM a partir de la aproximación realizada según la metodología descripta por Haiss et al. (ver Anexo 1, Sección 3 el detalle de los cálculos y aproximaciones realizadas) ⁵⁰.



Figura 1.2. A: Espectros UV/VIS normalizados experimental y simulado, empleando el *software* MiePlot. B: Relación entre la absorbancia a 522 nm (λ_{LSRP}) y la concentración de AuNP expresada en % v/v. Se muestra únicamente el rango lineal. En la Figura A1.2 del Anexo 1 se muestra la curva para todas las concentraciones ensayadas.

Con estos valores de concentración, y considerando la absorbancia en el máximo de plasmón (para valores menores a 1.2 u.a) se estimó un valor de 2.1 x 10⁸ M⁻¹ cm⁻¹

(geométrico) y 2.4 x 10⁸ M⁻¹ cm⁻¹ (según Haiss et al.). Considerando estos dos valores y resultados de interpolaciones con datos de otros trabajos (mostrados en la Tabla A1.2 del Anexo 1), se obtuvo un valor medio representativo de ε_{LSPR} para AuNP de 13 nm de 2.3 x 10⁸ M⁻¹ cm⁻¹. Adicionalmente en el trabajo de Haiss et al. se proporcionan dos aproximaciones para estimar el diámetro de AuNPs (no modificadas) a partir de los espectros UV/VIS. En el Anexo 1 se muestra en detalle las ecuaciones empleadas, de las que se obtuvieron valores de *d* = 11 nm y *d* =14 nm, los cuales quedaron comprendidos dentro de la distribución de tamaños obtenida experimentalmente mediante TEM.

El diámetro hidrodinámico (d_h) de las AuNP-cit se determinó mediante DLS, analizando el número de especies dispersantes y la intensidad de la luz dispersada. Aunque la distribución por intensidad mostró una población con un d_h de 17 nm y otra de 82 nm, esta última se asoció a la presencia de unos pocos agregados (las partículas de mayor tamaño dispersan más la luz, lo que origina que se obtengan valores altos de intensidad). De acuerdo con esto, cuando los datos de DLS se analizaron mediante número en lugar de intensidad, se obtuvo una única población de tamaño medio de 16 ± 5 nm (Figura 1.3).

El índice de polidispersión (PI) fue relativamente alto (0.273) lo cual estuvo de acuerdo con el FWHM de la banda de absorción en el espectro UV/VIS. El valor de d_h mayor obtenido por DLS comparado al obtenido por TEM fue esperable, dado que esta última técnica solo considera los núcleos metálicos mientras que la determinación por DLS tiene en cuenta la doble capa electroquímica.

El valor de potencial- ζ obtenido para las AuNP-cit fue de -36 ± 7 mV (n = 10), valor razonable considerando que al pH de medida (pH 5.4) las moléculas de citrato adsorbidas se encontrarían doblemente desprotonadas (p K_a del ácido cítrico: 3.1, 4.7 y 6.4).



Figura 1.3. Determinación de *d*^h mediante DLS de las AuNP-cit por intensidad (A) y número (B). Las medidas se realizaron en 1 mM NaCl. Las líneas llenas representan el ajuste de los datos a una distribución de tipo *logNormal*.

Estudios de la estabilidad de las AuNP-cit frente al almacenamiento a 4 °C mostraron un leve incremento en la absorbancia en la posición del máximo del plasmón con el tiempo. Las medidas por DLS indicaron la aparición de algunos agregados con diámetro d_{hmed} = 95 ± 5 nm luego de 50 días, lo que correspondería a aproximadamente 400 NPs de 13 nm por agregado. Estos agregados detectados por DLS no son evidenciados en los espectros UV/VIS, resaltando así la capacidad de la primera técnica en la detección de estados de agregación tempranos (ver Figura A1.7, Anexo 1, Sección 5)

Modificación de AuNP-cit con ác. 11-mercaptoundecanoico (MUA)

La modificación de las AuNP-cit se realizó mediante el método de intercambio de ligando. El transcurso de la reacción fue monitoreado durante 24 hs mediante espectrofotometría UV/VIS. Como se observa en la Figura 1.4, pasadas 24 hs se observó un corrimiento hacia el rojo de la posición del máximo de absorción del plasmón, pasando de 522 nm a 525 nm. Este corrimiento representa el valor final alcanzado luego del equilibrio, luego de un rápido corrimiento que se observó desde los 30 min de reacción. Esto está de acuerdo con lo reportado en trabajos previos, sobre un proceso de anclaje rápido, seguido de una etapa de autoensamblaje y ordenamiento molecular más lento ^{285,286}.



Figura 1.4. Evolución de los espectros UV/VIS en función del tiempo durante la formación de AuNP-MUA. En el inserto se muestra en mayor detalle el corrimiento de la posición del máximo de absorción del plasmón (λ_{LSPR}).

El valor de pH luego de la reacción se mantuvo en el entorno de 5.6, lo que sugiere que el grupo carboxílico expuesto del MUA adsorbido se encuentra ionizado, de acuerdo con la medida de potencial- ζ de -23 ± 3 mV (*n* = 6) ²⁸⁷.

Los diámetros hidrodinámicos determinados por DLS de 27 ± 2 nm (número) y 33 ± 2 nm (intensidad, PI = 0.236) fueron consistentes con la formación de AuNP recubiertas con una capa de MUA, sin signos apreciables de agregación (el diámetro medido en número para las AuNP no modificadas fue de 16 ± 5 nm; Figura 1.3). De hecho, al contrario de lo observado para las AuNP-cit en las determinaciones de DLS por intensidad (Figura 1.3 A), para las AuNP-MUA, únicamente se apreció la presencia de una población de NPs tanto por número como por intensidad (Figura 1.5).



Figura 1.5 Determinación de *d*^h mediante DLS de las AuNP-MUA por intensidad (A) y número (B). Las medidas se realizaron en 1 mM NaCl. Las líneas llenas representan el ajuste de los datos a una distribución de tipo *logNormal*.

El coeficiente de atenuación molar para las AuNP depende de su tamaño y forma, pero además del agente de recubrimiento ^{53,288}. Algunos trabajos proveen información de la dependencia del valor de ε_{LSPR} con el tamaño de la AuNP-cit ^{50,53,288,289}. Sin embargo, para otros agentes de recubrimiento, los datos son escasos y usualmente se emplea el valor de ε_{LSPR} para AuNP-cit ²⁹⁰

En este trabajo de Tesis se propone un nuevo método para la determinación de ε_{LSPR} de AuNPs modificadas mediante intercambio de ligando, basado en dos asunciones: a) el proceso de intercambio de ligando entre MUA y citrato fue completo y b) no hay pérdida de átomos de oro durante el proceso. El método propuesto consistió en medir la absorbancia máxima de diluciones seriadas de AuNP-cit y AuNP-MUA. La relación entre las pendientes en el rango lineal entonces es igual a la relación entre los valores de ε_{spr} de cada AuNP. Para los valores experimentales obtenidos, la relación $\varepsilon_{AuNP-cit}/\varepsilon_{AuNP-MUA}$ fue de 1.18, lo que permitió estimar un valor de 2.0 x 10⁸ M⁻¹ cm⁻¹ para el $\varepsilon_{AuNP-MUA}$ (Figura 1.6). En ambos casos, es necesario el estricto cumplimiento de la Ley de Beer, por lo que se evaluó que las ordenadas en el origen fueran nulas (P < 0.05).

En orden de obtener evidencia más contundente acerca de la modificación de la superficie de las AuNP con MUA, se empleó el análisis mediante FTIR. Sin embargo, a pesar de los indicios derivados del análisis FTIR de la formación de una monocapa autoensamblada (SAM) de MUA sobre las AuNP (Figura A1.8, Anexo 1, Sección 6), las similitudes moleculares y espectrales hicieron que el análisis de los espectros FTIR debiera ser interpretado con cautela y no aportara evidencia significativa para diferenciar la adsorción de MUA de la de citrato. Los espectros y más detalles con respecto a esta discusión se encuentran en la Sección 6 del Anexo 1.


Figura 1.6. Curva de calibración para AuNP-cit y AuNP-MUA. Los puntos indican el promedio de 3 valores de absorbancia para cada concentración.

Con el fin de obtener un ensayo experimental que pueda arrojar resultados concluyentes, buscamos métodos alternativos que pudieran confirmar la ocurrencia del intercambio de ligandos. Para ello, se implementó un sistema automatizado para la determinación de la estabilidad coloidal de la dispersión de nanopartículas tras aumentos progresivos de la fuerza iónica del medio con una sal inerte, mientras se monitoriza la banda LSPR en tiempo real (Figura 1.7). Se pudo ver una clara diferencia entre AuNP-cit y AuNP-MUA, de acuerdo con la estabilización esperada conferida por MUA unido covalentemente, evitando la formación de agregados incluso a concentraciones de NaNO₃ del entorno de 100 mM, proporcionando así una evidencia convincente para el intercambio exitoso de ligandos ²⁹¹.

En la Figura A1.9 del Anexo 1 se comparan los espectros UV/VIS para ambas AuNP a baja y alta fuerza iónica, siendo apreciable la formación de agregados para AuNP-cit.



Figura 1.7. Curvas de agregación de soluciones coloidales AuNP-cit (rojo) y AuNP-MUA (negro) con NaNO₃ acuoso 0,30 M. Todos los datos están normalizados a un valor de 1.0 para la absorbancia a 520 nm en el tiempo = 0. Cada curva representa la media ± SD de tres titulaciones independientes.

Inmovilización covalente de anticuerpos mediante la química EDC/NHS

Para la unión covalente de anticuerpos (Ab) con AuNPs, se emplearon AuNP-MUA y EDC en combinación con NHS o s-NHS. En primer lugar, se eliminó el exceso de MUA de la dispersión coloidal de AuNP-MUA mediante centrifugación y las nanopartículas se resuspendieron en *buffer* PB_{low}. En la Sección 6 del Anexo 1 se discute el efecto de la centrifugación y resuspensión en diferentes tipos de *buffer*, destacándose que este procedimiento por sí solo mostró un efecto significativo en la estabilidad de las AuNP-MUA. De hecho, se produjo al menos cierto grado de agregación, evidenciado por la disminución de la relación de Abs₅₂₀/Abs₆₅₀ (Figura A1.10, Anexo 1, Sección 6).

Después de la activación de EDC/NHS y la incubación de Ab, se observó una completa agregación para las concentraciones de NHS más altas ensayadas. Para la concentración más baja de NHS, 3.7 mM, se observó un corrimiento hacia el rojo en el LSPR de 14 nm, pero no pudo atribuirse a la unión de Ab, ya que la disminución en la relación de Abs₅₂₀/Abs₆₅₀ nm reveló un estado de agregación parcial. El uso de s-NHS en lugar de NHS produjo resultados similares, también observados mediante análisis de DLS. Con una concentración de s-NHS de 3.7 mM, se obtuvo un corrimiento hacia el rojo de 5 nm en la posición de la banda LSPR, sin una disminución neta en la relación Abs520/Abs650 (Figura A1.13, B, Anexo 1, Sección 7). Sin embargo, este corrimiento también se observó en ausencia de Ab y las mediciones de DLS mostraron el mismo aumento en el dh para s-NHS y NHS, por lo que no fue posible confirmar la bioconjugación de Ab basándose únicamente en estas técnicas (Tabla A1.3, Anexo 1, Sección 7). Para intentar resolver este problema, se cargaron las diferentes suspensiones coloidales en un gel de agarosa al 1 % y se realizó un ensayo de movilidad electroforética, registrando su migración hacia el ánodo. Los valores de R_f, determinados en relación con AuNP-MUA, fueron 0.95 y 0.71 para AuNP-MUA-s-NHS y AuNP-MUA-s-NHS-Ab, respectivamente. Esta disminución en la movilidad electroforética podría explicarse por un aumento del tamaño de la partícula y/o un cambio en la relación carga/radio de la misma. En cualquier caso, sugiere la inmovilización de Ab. A pesar de esto, la observación de un patrón "difuminado" en el perfil de migración en ambos casos sugirió que diferentes tamaños de partículas están presentes en la muestra, lo que indicó heterogeneidad inducida por s-NHS (datos no mostrados). Considerando estos resultados, no se obtuvo evidencia fuerte que indicara la inmovilización de Ab de forma covalente, y adicionalmente el producto AuNP-MUA-Ab obtenido mostró gran heterogeneidad de tamaños como se desprendió de los ensayos de movilidad electroforética y DLS (Tabla A1.3, Anexo 1, Sección 7). Por todas estas razones, no consideramos a la inmovilización mediante EDC y NHS (o s-NHS) como un método adecuado para la unión de Ab a AuNPs, al menos en las condiciones de reacción ensayadas.

Inmovilización no covalente de anticuerpos a AuNPs

Como estrategia alternativa, se incubó la solución de anticuerpos directamente sobre AuNP-cit o AuNP-MUA, apostando a una inmovilización no covalente, sea por cambio de ligando con el citrato o por atracción electroestática a los grupos carboxilos del MUA, respectivamente. La adsorción de anticuerpos fue seguida por mediciones UV/VIS y DLS. Los desplazamientos hacia el rojo en la posición de la banda LSPR de 522 a 525 nm (AuNPcit) y de 525 a 530 nm (AuNP-MUA) se asociaron con la modificación de la superficie tras la adsorción de Ab (Figura 1.8). Estos cambios de banda LSPR se observaron tan solo 30 min después de la incubación, y se observó un comportamiento similar para los d_h determinados por análisis DLS (ver Figura A1.15, Anexo 1, Sección 8), alcanzándose un valor final de 139 ± 3 nm y 255 ± 11 nm (por intensidad) o 67 ± 22 y 92 ± 36 (por número), para AuNP-cit-Ab y AuNP-MUA-Ab, respectivamente. Teniendo en cuenta que el d_h informado para una IgG está en el rango de 10 a 12 nm (Hawe et al. 2011), se esperaba un diámetro hidrodinámico de alrededor de 41 o 51 nm para AuNP-cit-Ab y AuNP-MUA-Ab opuestas. Por lo tanto, posiblemente las mediciones de DLS se vieron afectadas por la formación de agregados que involucraron un bajo número de AuNPs, o un pegado multicapa de los Ab. A pesar de esto las mediciones de DLS por número sugirieron que el estado de agregación general de la población fue bajo, consistente con los espectros UV/VIS (Figura A1.14, Anexo 1, Sección 8).



Figura 1.8 Evolución temporal de la banda LSPR en los espectros UV/VIS durante la adsorción de Ab sobre AuNP-cit (A) y AuNP-MUA (B).

Más allá de esto, es importante mencionar que la adsorción de proteínas en la superficie de AuNPs puede cambiar el índice de refracción y la constante dieléctrica del medio circundante. Estos cambios pueden afectar los valores de d_h . Por lo tanto, la evaluación del cambio en el diámetro hidrodinámico Δd_h , ante un evento de modificación (Tabla 1.1) resultó más indicativa de una modificación, frente al valor absoluto de d_h derivado de las medidas por DLS (sobre todo cuando se analizan los datos por número) ²⁸³. En este trabajo, en cada paso hacia un producto bioconjugado final, los valores de d_h aumentaron significativamente, de acuerdo con un aumento esperado en el tamaño del sistema. Consideramos entonces que el Δd_h fue un indicador más apropiado de la bioconjugación dado que el valor absoluto de d_h (sobre todo d_{hmed}) puede ser diferente si algunos agregados están presentes en la solución. Además, cambios en el pH o la fuerza iónica también pueden modificar el diámetro hidrodinámico y por tanto el valor absoluto puede cambiar de una síntesis a otra. Es por ello que esta evidencia por sí sola no se consideró como prueba fehaciente del éxito de la bioconjugación, y debió tomarse en el contexto de resultados aportados por otras técnicas complementarias.

| Etapaª | $\Delta d_{\rm h}$ (nm) ± SD | |
|--------|------------------------------|--------------|
| | Número | Intensidad |
| Ι | 10 ± 4 | 16 ± 4 |
| II | 65 ± 38 | 222 ± 13 |
| III | 51 ± 24 | 122 ± 5 |

Tabla 1.1. Cambio en el diámetro hidrodinámico (Δd_h) para cada etapa de bioconjugación de Ab a AuNPs

^a Cada etapa de bioconjugación corresponden a las mostradas en el Esquema 1.

En los ensayos de movilidad electroforética, en contraste con lo que se observó previamente con AuNP-MUA-s-NHS-Ab, las AuNP con Ab adsorbido físicamente no migraron ($R_f = 0$) tanto en el caso de AuNP-cit-Ab como en AuNP-MUA-Ab (Figura 1.9 y A1.16, Anexo 1). Este resultado sugirió que, en ambos casos, existieron partículas más grandes y/o sin carga que no fueron capaces de migrar fuera de los pocillos de siembra. Para las nanopartículas de AuNP-cit no modificadas, la alta fuerza iónica del *buffer* empleado en la corrida electroforética causó su agregación en el punto de aplicación (evidenciado por el cambio de color de la muestra al azul inmediatamente después de cargada en el gel), pero no fue así para las AuNP-cit-Ab. Las AuNP-MUA, en cambio, sí lograron ingresar al gel y permanecer estables durante la corrida. Por lo tanto, la electroforesis en gel de agarosa ofreció evidencia convincente que sugirió una bioconjugación exitosa de Ab a ambas AuNPs.

| | AuNP-N | IUA | | AuNP-c | cit |
|-----|--------------|---------------|-----|--------------|---------------|
| -Ab | +Ab 24 hs | +Ab 60 min | -Ab | +Ab 24 hs | +Ab 60 min |
| - | | - | - | | - |

Figura 1.9. Ensayo de movilidad electroforética para AuNP-MUA y AuNP-cit 60 min y 24 hs después de la adsorción de Ab. (Recortado de Figura A1.16, Anexo 1, Sección 8).

El potencial- ζ para AuNP-cit-Ab y AuNP-MUA-Ab fue de -8 ± 6 mV y -10 ± 8 mV a pH 5.2 respectivamente, lo que implicó un cambio en los grupos ionizables de superficie de AuNP después de la adsorción de Ab. Este cambio hacia la neutralidad fue consistente con la ausencia observada de movilidad electroforética en nanopartículas conjugadas (Figura 1.9). El efecto de la concentración de Ab y el pH en el proceso de adsorción sobre AuNP-cit fue insignificante, como se dedujo de la constancia en la relación de Abs₅₂₀/Abs₆₅₀ nm luego del

agregado de NaCl (concentración final 140 mM). Sin embargo, para el caso de AuNP-MUA-Ab, se observó una dependencia con la concentración de Ab y el pH de la reacción de bioconjugación (Figura A1.17, Anexo 1, Sección 8), lo que posiblemente indicó una repulsión electrostática entre el Ab y las AuNP recubiertas con MUA desprotonado, cuando el pH se estableció por encima del punto isoeléctrico del anticuerpo (Ver una discusión detallada en el Anexo 1, Sección 8).

Evidencia adicional del éxito de la adsorción de Ab sobre AuNP-cit se obtuvo mediante ensayos electroquímicos sobre electrodos serigrafiados de oro, analizando los voltamperogramas cíclicos luego de la deposición de las AuNPs sobre los mismos. En este caso el aumento del parámetro ΔE_P (diferencia entre los picos anódicos y catódicos de la cupla redox), acompañado de una disminución de la constante de transferencia de carga (k_o) fueron los parámetros indicativos de la inmovilización de Ab (Tabla 1.2). En el Anexo 1 se muestra una discusión más detallada sobre los resultados del análisis electroquímico.

Tabla 1.2 Evaluación por voltamperometría cíclica de AuNPs modificados. Diferencia de potencial máxima (ΔE_P) y constante de velocidad heterogénea (k_0) para la transferencia de carga de la cupla redox soluble $[Fe(CN)_6]^{3-}$ sobre electrodos serigrafiados de oro modificados con sistemas de nanopartículas. Área geométrica del electrodo de oro: 0.126 cm².

| Sistema Electroquímico | $\Delta E_{\rm P}$ (V) | <i>k</i> ₀ (cm/s) |
|------------------------|------------------------|------------------------------|
| Au | 0.106 ± 0.003 | 3.5 x 10 ⁻³ |
| Au-Ab | 0.112 ± 0.003 | 3.0 x 10 ⁻³ |
| Au-AuNP-cit | 0.114 ± 0.002 | 2.8 x 10 ⁻³ |
| Au-AuNP-cit-Ab | 0.190 ± 0.005 | 0.7 x 10 ⁻³ |

La estabilidad de los compuestos proteína-AuNP depende fuertemente de la proteína

A continuación, se evaluó si diferentes proteínas podían conjugarse a AuNP-cit por el método de adsorción no covalente, dado que mostró los mejores resultados para la inmovilización de anticuerpos. Se eligieron tres proteínas adicionales en función de su versatilidad y frecuencia de uso en la literatura científica en sistemas AuNP-proteína. Se incluyeron la proteína A/G y la estreptavidina (Strp) ya que son ampliamente utilizadas como adaptadores para la inmovilización orientada de anticuerpos no modificados y de proteínas modificadas con biotina, respectivamente ²⁹². También se analizó la unión de albúmina de suero bovino (BSA) ya que se usa con frecuencia como agente de bloqueo. La concentración óptima de cada proteína se determinó primero mediante ensayos de estabilidad coloidal en placa (Figura 1.10). Curiosamente, mientras que la agregación de AuNP-cit-Strp inducida por sal se observó independientemente de la concentración de la proteína (hasta 200 µg/mL), Ab, A/G y BSA produjeron nanopartículas estables a partir de concentraciones tan bajas como 80 µg/mL. Por análisis UV/VIS, las AuNPs incubadas con Ab, A/G y BSA mostraron el característico desplazamiento hacia el rojo de entre 3 y 5 nm de la banda LSPR, mientras que Strp indujo la agregación de nanopartículas (Figura 1.11). Esto fue evidente por un cambio rápido en el color de la suspensión y una tendencia de las

nanopartículas resultantes a sedimentar después de períodos de tiempo relativamente

bajos (> 1 h frente a días para AuNP-cit sin modificar) lo que se evidenció por la

disminución de la absorbancia a ≈ 520 nm y un aumento a 650 nm (Figura A1.20, Anexo 1,

Sección 9)

151



Figura 1.10. Ensayo estabilidad coloidal (en placa) para diferentes preparaciones de proteína AuNP-cit en presencia o ausencia de NaCl 150 mM (concentración final). Las barras de error indican la SD para dos mediciones independientes. A: BSA, B: A/G, C: Strp, D: Ab. Los sombreados amarillos indican el rango de concentración de proteína por encima del cual se obtienen nanopartículas modificadas estabilizadas frente al aumento de la fuerza iónica (lo que es indicativo de una inmovilización efectiva)



Figura 1.11. Espectros UV/VIS normalizados para AuNP-cit antes y después de la incubación con diferentes proteínas. La flecha muestra el desplazamiento hacia el rojo observado para todas las proteínas ensayadas.

Se obtuvieron resultados similares mediante DLS (Tabla 1.3) y electroforesis en gel (Figura 1.12 y Figura A1.20, Anexo 1). Los d_h similares obtenidos para AuNP-cit-A/G y BSA son coherentes con la masa molecular y forma similares de ambas proteínas (MM_{BSA} ≈ 66.43 kDa, $d_h \approx 8.4$ nm; MM_{AG} ≈ 50.46 kDa, $d_h \approx 6.2$ nm, ver Anexo 1, Sección 14). Considerando la unión de al menos dos de estas proteínas en caras opuestas de una AuNP-cit, esperaríamos d_h del entorno de entre 30 y 40 nm, por lo que los resultados obtenidos fueron coherentes con la unión de más de una molécula de proteína. Para el caso de la unión de Strp (≈ 60

*k*Da) el gran d^{*h*} obtenido se debió a la formación de agregados evidenciados ya previamente en el análisis UV/VIS. Esta agregación también fue evidenciada mediante electroforesis (al igual que para las AuNP-cit no modificadas), no así para el caso de las AuNP-cit-BSA, AuNP-cit-A/G, y AuNP-cit-Ab, donde además se observaron patrones de migración diferentes, acordes con el tamaño de cada una de las proteínas inmovilizadas (Figura 1.12). La mayor movilidad de las AuNP-cit-BSA y AuNP-cit-A/G se debió a su menor tamaño y/o mayor carga. Los valores de potencial- ζ a pH 5.4 fueron -30 ± 4 mV y -29 ± 6 mV para AuNP modificadas con A/G y BSA respectivamente. Considerando un valor de pI de 4.6 para A/G y 4.5 para BSA, estos valores fueron consistentes con lo esperado.

Tabla 1.3. Diámetro hidrodinámico para AuNP-cit conjugadas a diferentes proteínas. Solo se muestran los datos de intensidad, Δd_h representa la diferencia entre el diámetro hidrodinámico de cada ensamblaje AuNP-cit-proteína y el AuNP-cit libre.

| | <i>d</i> _h (nm) | $\Delta d_{\rm h}$ (nm) ± SD | PI |
|---------------|----------------------------|------------------------------|-----------------|
| | (Intensidad) | | |
| AuNP-cit | 18 ± 1 | | 0.26 ± 0.01 |
| AuNP-cit-BSA | 44 ± 1 | 26 ± 2 | 0.316 ± 0.004 |
| AuNP-cit-A/G | 40 ± 3 | 22 ± 4 | 0.29 ± 0.01 |
| AuNP-cit-Strp | 305 ± 30 | 287 ± 31 | 0.28 ± 0.01 |
| AuNP-cit-Ab | 132 ± 6 | 114 ± 7 | 0.18 ± 0.02 |

Este efecto de agregación observado en las AuNP-cit-Strp, se hipotetizó podría ser desencadenado por la formación de agregados de Strp (multímeros) o por agentes químicos no revelados incluidos en la solución de proteína comercial empleada. Es importante tener en cuenta que Strp es una proteína tetramérica, y, por tanto, con una fuerte tendencia a formar interacciones proteína:proteína. Esto podría inducir la formación de agregados del

tipo (AuNP-cit-Strp-Strp-AuNP)ⁿ. En el Anexo 1, Sección 9 se muestran ensayos adicionales realizados para intentar dilucidar/remediar el efecto de agregación observado; sin embargo, no fueron exitosos, por lo que las AuNP-cit-Strp no fueron posteriormente empleadas en este trabajo.

| MUA | BSA | AG | Strp | sin Proteín: | Ab 1 |
|-----|-----|----|------|-----------------|---------|
| | | | - | - | - |
| | | | | | |
| - | | | | | |
| ю | | | | | |

| AUNE-CILT: | Au | N | P-(| cit | t+ | : |
|------------|----|---|-----|-----|----|---|
|------------|----|---|-----|-----|----|---|

Figura 1.12. Ensayo de movilidad electroforética para AuNP-cit conjugada a MUA, y las proteínas BSA, A/G, Strp (200 μ g/mL), Ab (66 μ g/mL). Adicionalmente se muestra un carril sembrado con AuNPs no modificadas. Nótese cómo, a diferencia de las AuNP no modificadas, o incubadas con Strp, las AuNP-cit-Ab no migran, pero mantienen su coloración roja característica. Esto sugiere que, a diferencia de las anteriores, las AuNP-cit-Ab se mantienen como nanopartículas mayormente dispersas, y su no migración se debe más a su potencial- ζ cercano a la neutralidad.

Caracterización y purificación de AuNP-proteína por SEC

Un paso final en la preparación de AuNP modificadas con proteínas, pensando en su futura aplicación es la separación de las AuNPs modificadas de las proteínas solubles libres que podrían interferir con la aplicación analítica de estos reactivos. Esto generalmente es realizado mediante centrifugación ²⁹³ sin embargo, como se detalla más adelante en este capítulo, suele registrarse formación de agregados luego de este procedimiento de separación. Es por ello que se decidió evaluar la cromatografía de exclusión molecular (SEC) como técnica de purificación de nanopartículas modificadas, ya que se trata de un procedimiento amigable con la muestra, rápido, reproducible, fácil de implementar y que no requiere ningún equipo especializado. Además, a diferencia de la centrifugación, esta técnica no implica un paso de concentración de las nanopartículas, lo que favorece la generación de agregados.

Los cromatogramas (registrados mediante Abs₅₂₀) obtenidos para AuNP-MUA después de la inyección en columnas qEV preempaquetadas comerciales (Izon, volumen muerto = 3 mL) mostraron un pico amplio a un V_e de 7 mL (Figura 1.13). Curiosamente, la inyección de AuNP-MUA-Ab dio como resultado un pico mucho más estrecho a V_e = 3.5 mL (ΔV_e = 3.5 mL, Figura 1.13 A), confirmando que estas nanopartículas poseen un radio hidrovolumétrico mucho mayor. Además, se pudo inferir que la modificación con anticuerpos fue prácticamente completa ya que no se detectó ninguna señal correspondiente a AuNP-MUA sin modificar.

Por el contrario, las AuNP-cit no lograron ingresar a las columnas y se retuvieron en el prefiltro (Figura A1.21, Anexo 1, Sección 9). Curiosamente, los cromatogramas de AuNP-cit-Ab (Figura 1.13 A), AuNP-cit-A/G o AuNP-cit-BSA (Figura 1.13 B y D) mostraron una distribución similar a una curva *logNormal* con un pico en V_e = 4.2 mL (Ab) o V_e = 6 mL (A/G

y BSA). Esto se consideró como una prueba más de la inmovilización de proteínas porque: a) las AuNP-cit modificadas con proteína lograron ingresar en las columnas (a diferencia de las sin modificar) y b) presentaron mayor tamaño que las AuNP-MUA no modificadas $(\Delta V_e \ge 1 \text{ mL})$, de acuerdo con los resultados de DLS y electroforesis. Además, la BSA soluble mostró una $V_e = 8,5 \text{ mL}$, con una banda parcialmente superpuesta a las fracciones en las que eluyó la mayor parte de AuNP-cit-BSA (Figura 1.13, D). De cualquier modo, si se tomasen las primeras fracciones en las que eluyen las AuNP-cit-BSA ($V_e < 6 \text{ mL}$), esta técnica serviría como técnica separativa para eliminar la proteína en exceso no conjugada, aunque se perderían muchas AuNP en el proceso.

Al igual que AuNP-cit, las nanopartículas AuNP-cit-Strp se retuvieron principalmente en el prefiltro de las columnas, que en este caso se visualizó violeta en lugar de rojo (Figura A1.21, Anexo 1, Sección 9). Sin embargo, a diferencia de AuNP-cit, una fracción de la población pudo ingresar en la columna y se observó un pequeño pico con $V_e = 4$ mL (recuperación < 10 % basada en el área bajo la curva *vs.* AuNP-cit-BSA, Figura 1.13, C). Teniendo en cuenta estos resultados y los anteriores, se concluyó que la estreptavidina se está incorporando a las nanopartículas, produciendo AuNP modificadas que tienen una fuerte tendencia a agregarse en conjuntos grandes y heterogéneos; solo una pequeña fracción de ellos puede cruzar los prefiltros e ingresar a las columnas qEV. Por el contrario, los conjugados de BSA, A/G o Ab se mostraron muy estables, incluso en condiciones de alta fuerza iónica dada por el *buffer* de corrida (PBS).



Figura 1.13. Cromatogramas obtenidos para A: AuNP-MUA y AuNP-cit modificado con Ab, B: AuNP-cit modificado con A/G, C: AuNP-cit modificado con Strp y D: AuNP-cit modificado con BSA, y BSA sola. En todos los casos a fines comparativos se acompaña con el cromatograma para AuNP-MUA.

Considerando la SEC como técnica de separación para los conjugados AuNP-proteína, podemos decir que el porcentaje de recuperación de fracciones puras para AuNP-cit-A/G y BSA fue muy bajo, dado la distribución de las AuNP en muchas fracciones, gran parte de

las cuales se solapan con los *V*^e para proteínas (testeado con BSA). Sumado a esto, existió un gran efecto de dilución de las muestras. En el caso de las AuNP-cit-Ab, o AuNP-MUA-Ab el porcentaje de recuperación fue mayor, dada la distribución de las AuNPs en pocas fracciones bien separadas de las fracciones donde se espera que eluyan los Ab no unidos. Sin embargo, las absorbancias registradas denotan soluciones muy diluidas (del entorno de 1:10) por lo que su efectividad como método de separación dependerá de la concentración requerida según la aplicación que se quiera desarrollar.

Con esto, consideramos que, como técnica de caracterización, la SEC aportó resultados contundentes y complementarios a las demás técnicas exploradas en este capítulo, que permitieron confirmar la bioconjugación de algunas de las proteínas ensayadas. Sin embargo, como técnica de separación, la SEC posee algunas limitaciones, discutidas en el párrafo anterior.

Evaluación de los conjugados AuNP-proteína mediante espectroscopía SERS

Los espectros SERS obtenidos para AuNP-cit modificadas con A/G, BSA y Ab se muestran en la Figura 1.14. En términos generales los espectros obtenidos coincidieron con lo esperado, observándose señales en la región amida II (1480-1580 cm⁻¹), comúnmente no detectable en espectroscopía Raman convencional, pero intensificadas por efecto SERS, asociada a vibraciones de aleteo de los grupos N-H y estiramiento (*streching*) del enlace C-N ^{294,295}. Señales asociadas a la región amida III (1200-1400 cm⁻¹) fueron apreciables principalmente para las AuNP-A/G y Ab, siendo débiles para el caso de las AuNP-cit-BSA. Adicionalmente se registraron señales intensas en todos los casos en la región comprendida entre 1100-1200 cm⁻¹ normalmente asociadas a vibraciones de estiramiento de los enlaces C-C y C-N del esqueleto proteico ²⁹⁶. Las señales intensas entre 1400-1450 cm⁻¹ observadas

en los espectros de AuNP-cit-A/G y Ab suelen asociarse a estiramiento simétrico del grupo carboxilo (COOH/COO⁻), cuya posición específica depende del estado de protonación ^{297,298}. En una comparación de intensidades, llamativamente el efecto SERS fue mayor para las AuNP-cit-A/G, donde además se observó la presencia de señales adicionales no identificadas en los otros espectros. Identificar y asociar cada señal a una vibración particular fuera de las regiones espectrales tradicionales para una proteína resulta complejo, sin embargo, se sabe que las señales de los aminoácidos aromáticos suelen verse intensificadas por efecto SERS 295. La fenilalanina suele dar una señal característica en el entorno de 1005-1012 cm⁻¹, y señales menores a 610 y 650 cm⁻¹, las cuales se encontraron presentes en los espectros de las AuNP modificadas con proteína A/G. Las señales observadas a 910 y 950 cm⁻¹ se asociaron a vibraciones v(N–C α -C) y δ (C-C-N) del esqueleto carbonado, mientras que las observadas a 640 cm⁻¹ y 480 cm⁻¹ podrían corresponder a v(C-S) y v(S-S) respectivamente ^{181,299}. Por debajo de 400 cm⁻¹ la asignación resultó aún más compleja debido a la ocurrencia de señales relacionadas a vibraciones propias de la cadena proteica; sin embargo, la señal intensa ubicada en el entorno de 270 cm⁻¹, normalmente se asocia con interacciones de átomos de azufre con superficies metálicas, lo que planteó la posibilidad de que esta proteína pudiera estar uniéndose de forma covalente a las AuNP por interacción del grupo SH de alguna cisteína. La proteína A/G se trata de una proteína recombinante comercial, formada por cuatro subunidades de la proteína A de Estafilococo aureus y dos de la proteína G de Streptococo spp. Al realizar el análisis de la secuencia aminoacídica de ambas proteínas (obtenidas de UniProt, Tabla A1.5, Anexo 1, Sección 13) no se registró la presencia de residuos de cisteína, sin embargo, si de metionina (que contiene un grupo tioéter, -S-CH₃), por lo que se argumentó la posibilidad de que esta proteína, pueda estar interactuando través de este residuo.



Figura 1.14. Espectros SERS para AuNP-cit-A/G, AuNP-cit-BSA y AuNP-cit-Ab

Algunos trabajos, donde se analizó la afinidad de diferentes aminoácidos por la superficie de AuNPs (en el contexto de una proteína) demostraron que la metionina es uno de los aminoácidos con mayor afinidad ¹⁶². Independientemente de dilucidar los aminoácidos específicos a través de los cuales la proteína interaccionó con la superficie de la AuNP, el hecho de observarse mayor número de señales SERS y la mayor intensidad de alguna de ellas en comparación a las observadas para BSA y Ab, dio cuenta de una interacción muy cercana entre la estructura proteica (y por tanto de muchos de sus residuos) y la superficie de la AuNP ³⁰⁰. Llamativamente, en todos los espectros, la banda amida I (1640-1700 cm–1) asociada a la vibración del grupo -C=O no fue detectada. La intensidad de esta banda en SERS se asocia a la facilidad de interacción del enlace peptídico con la superficie metálica, siendo muy débil en cadenas peptídicas que contienen aminoácidos con cadenas laterales voluminosas (como los residuos aromáticos) cuya interacción con la superficie aleja el grupo -C=O del enlace peptídico, haciendo poco probable el efecto SERS ¹⁸⁷. Esto sugirió que la interacción de las proteínas con la superficie de las AuNPs en este caso se dio fundamentalmente a través de las cadenas laterales de residuos voluminosos.

Evaluación de la centrifugación como técnica de separación de AuNP-proteína

Los sistemas AuNP-proteína (Ab, A/G, BSA) obtenidos se analizaron antes y después de ser sometidos a tres ciclos de centrifugación a 10000*g* por 30 min a 4 °C y resuspensión en PBS. Como se muestra en el inserto de la Figura 1.15, C, la solución coloidal de AuNP-cit-Ab luego de la centrifugación mostró claras señales de formación de agregados y adherencia a las paredes del tubo. Cuando se analizaron los espectros obtenidos para dicha solución, se observó principalmente una marcada disminución de la absorbancia a 520 nm, lo cual se debió principalmente a la pérdida considerable de AuNPs (por precipitación y

adherencia a las paredes del tubo). En cambio, las soluciones de AuNP-cit modificadas con BSA y A/G no mostraron (ni visual ni espectralmente) señales de formación de agregados luego de ser sometidas a la centrifugación. Cuando las mismas soluciones fueron analizadas por DLS, como era de esperarse, las AuNP-cit-Ab mostraron agregados de tamaño significativo; > 1000 nm (Figura A1.25, Anexo 1, Sección 10). En el caso de las AuNP-cit-A/G y BSA el efecto de la centrifugación también fue evidente, aunque no en la misma magnitud que para las AuNP-cit-Ab. Como se observa en la Figura 1.16, el histograma obtenido por DLS para AuNP-cit-A/G fue más ancho, alcanzando un valor de d_h del en torno a 120 nm frente al valor de 50 nm previo a la centrifugación.



Figura 1.15. Espectros UV/VIS para AuNP-cit modificadas con proteína A/G (A), BSA (B) y Ab (C) antes ("precent", curva negra) y después ("postcent", curva roja) de ser centrifugadas a 10000*g* durante 30 min. En el inserto se aprecia el aspecto de cada solución coloidal luego de la centrifugación.

Resultados similares se obtuvieron para las AuNP-cit-BSA (Figura A1.26, Anexo 1, Sección 10), aunque en este caso previamente a la centrifugación ya fue detectable por DLS la presencia de algunos agregados.

Considerando la posibilidad de utilizar estas AuNP-proteína en futuros ensayos colorimétricos, los sistemas AuNP-cit-A/G obtenidos, al conservar sus propiedades ópticas, fueron lo suficientemente estables como para ser purificados por centrifugación y ser utilizados como sistema de detección. No así las soluciones de AuNP-cit-Ab, la cuales mostraron claras señales de agregación y precipitación durante el proceso de separación, volviéndolas inútiles para ensayos analíticos basados en cambios de color rojo \rightarrow azul.



Figura 1.16. Distribución obtenida mediante DLS para AuNP-cit-A/G antes (A) y después (B) de ser sometidas al procedimiento de centrifugación y resuspensión en PBS.

Ante estos resultados se intentaron diferentes estrategias para lograr obtener sistemas AuNP-cit-Ab, entre ellas el anclaje de los Ab a las AuNP modificadas con proteína A/G, (dada la capacidad de unirse a la región Fc de las inmunoglobulinas); sin embargo, como indicaron los ensayos discutidos en el Anexo 1, Sección 11, ninguna fue exitosa, con lo que la estrategia de anclaje de Ab a AuNPs (directamente o vía proteína A/G) fue descartada.

Esto no quiere decir que las AuNP-cit-A/G no puedan ser utilizadas como plataforma de anclaje de biomoléculas marcadas previamente con inmunoglobulinas, como se discutirá en el Capítulo 2.

Discusión

El procedimiento de Turkevich para síntesis de nanopartículas de oro recubiertas de citrato se emplea plenamente en nanociencia y nanotecnología ³⁰¹, aunque el mecanismo exacto subyacente a la formación de las AuNPs aún está sujeto a revisiones continuas ^{39,41,43,54}. A pesar de esto, el procedimiento sintético empleado, si se realiza de forma minuciosa, permite obtener AuNP-cit de 13 nm ²⁸⁴.

Según los resultados mostrados en este trabajo, la caracterización de las AuNP-cit sintetizadas necesita el conjunto completo de mediciones experimentales, a saber, UV/VIS, DLS y TEM para logar describir completamente el sistema de nanopartículas. En todas estas técnicas los resultados fueron acordes a lo esperado para este procedimiento de síntesis. Las simulaciones de Mie y las consideraciones geométricas proporcionan un medio para el cálculo del coeficiente de atenuación molar, pero solo considerando el núcleo metálico de las nanopartículas sin reflejar el efecto del entorno fisicoquímico, lo que también puede afectar su capacidad para dispersar la luz.

En el caso de los coeficientes de atenuación molar para AuNPs-cit, los valores calculados

aquí son lo suficientemente consistentes para usarse con confianza. Nuestro procedimiento propuesto para evaluar el coeficiente de atenuación molar para AuNPs recubiertas con otro agente de protección se basa en la suposición de que el intercambio de ligandos es 100 % eficiente. Por lo tanto, los coeficientes de atenuación molar para las soluciones coloidales de AuNP se pueden calcular a partir de diluciones en serie del AuNP-cit original y el AuNP intercambiado con ligando, comparando las pendientes de Lambert-Beer. En este caso los valores calculados para AuNP-MUA y AuNP-cit-A/G o BSA fueron muy similares entre sí. En cuanto a la estabilidad, las mediciones por DLS resultaron en una herramienta eficiente para la detección de las primeras etapas de agregación de nanopartículas ³⁰². En los primeros 15 días de almacenamiento, el valor medio de d_h de los datos de DLS fue de 40 ± 3 nm (por intensidad) (Figura A1.7, Anexo 1). Considerando un intervalo de confianza del 95 %, las partículas superiores a 50 nm de diámetro deben tomarse como los agregados mínimos detectables por la técnica DLS, que correspondería a un agregado representativo de 57 nanopartículas de 13 nm de diámetro (basado en las medidas TEM). Según esto, el aumento del 10 % en la eficiencia de dispersión debería reflejarse en un aumento equivalente en la absorbancia medida, una predicción observada en los espectros de evolución temporal de la solución madre de AuNP-cit (Figura A1.7, Anexo 1). Los agregados iniciales, por lo tanto, se componen de AuNPs que permanecen cerca entre sí, sin representar un aumento real en la sección transversal de absorción. Al mismo tiempo, el acoplamiento de la banda LSPR en las etapas iniciales de agregación, aún no es lo suficientemente fuerte como para ser detectado como un aumento de absorbancia alrededor de 600 nm 303,304. En consecuencia, tanto los espectros UV/VIS como las mediciones de DLS son adecuadas para seguir la agregación temporal de AuNP, pero solamente las mediciones de DLS se pueden usar con confianza para evaluar la presencia de agregados de AuNP en las etapas iniciales.

La reacción de intercambio de ligandos de citrato por MUA se basa en varias suposiciones. Primero, como la molécula de MUA se adsorbe en AuNP a través de un enlace covalente Au-S; consideraciones termodinámicas simples indican que la reacción superficial es muy favorecida ¹⁷⁸. En segundo lugar, se asume que la reacción es cuantitativa, es decir, no queda ningún resto de citrato adherido a la superficie de la AuNP y en el proceso se obtiene una monocapa de MUA ^{76,305}. A pesar de su relativa simplicidad, los métodos para evaluar la efectividad de la reacción pueden ser cuestionables. Un corrimiento al rojo típico entre 2 y 5 nm de la banda LSPR (dependiendo del agente de protección) generalmente se toma como una prueba indirecta de que tuvo lugar la reacción de intercambio y, de hecho, este corrimiento es bastante sólido y está respaldado por varios informes ^{306–308}. Más allá de tal robustez, la detección de este cambio diminuto en la posición del máximo de la banda LSPR requiere que la resolución espectral del espectrofotómetro se ajuste adecuadamente. La mayoría de los espectrofotómetros utilizan un valor predeterminado de 1 nm para la resolución espectral, y un cambio de banda entre 2 y 5 nm implicaría un error de entre el 100 y el 40 % (Figura A1.1, Anexo 1). Por lo tanto, para utilizar el cambio de banda LSPR como prueba de la reacción de intercambio de ligandos, la resolución de la banda espectral debe establecerse lo más baja posible. En nuestro caso, fijamos ese valor en 0.2 nm, y el cambio de banda de LSPR de 3 nm para el intercambio de ligandos de MUA se pudo estimar con un error del 13 %. Solo bajo estas consideraciones experimentales, el cambio de banda LSPR se convierte en un resultado sólido para evaluar la reacción de intercambio de ligandos.

Los resultados de estabilidad electrostática pueden interpretarse en términos de la influencia de la fuerza iónica en la estabilidad coloidal ³⁰⁹. Las curvas comparativas para las soluciones coloidales AuNP-cit y Au-MUA muestran claramente una estabilidad diferente

al aumentar la fuerza iónica del entorno de las nanopartículas. La principal diferencia entre ambos sistemas de nanopartículas es que, en el caso de AuNP-cit, el agente de protección se adsorbe electrostáticamente, mientras que MUA se une covalentemente a la superficie de AuNP. Por lo tanto, el efecto de apantallamiento de potencial electrostático en AuNPcit es más efectivo, posibilitando la desestabilización del sistema coloidal. Como resultado cuantitativo de este análisis, la concentración de sal que produce una disminución del 50 % del valor máximo de absorbancia se denomina "concentración crítica", *C*_{crit}. En el caso de un sistema estable como AuNP-MUA, no se alcanzó el valor de *C*_{crit} en el rango de concentraciones ensayado, mientras que para las AuNP-cit obtuvimos un valor de *C*_{crit} = 37 mM NaNO₃. Es destacable el diferente comportamiento entre ambos sistemas, lo que nos lleva a concluir que el estudio de la estabilidad electrostática de los sistemas coloidales, frente al aumento de fuerza iónica, proporciona un método experimental muy concluyente para evaluar las reacciones de intercambio de ligandos entre citrato y tioles.

La bioconjugación covalente de proteínas a AuNP-MUA implica varios pasos y cada uno de ellos podría afectar la estabilidad del producto final. Por lo tanto, sugerimos más de una técnica para la evaluación del producto final. Por ejemplo, el desplazamiento hacia el rojo de la banda LSPR en los espectros UV/VIS sugiere la unión de Ab mediante la reacción de entrecruzamiento mediado por EDC/NHS, pero un análisis más profundo que incluye DLS y movilidad electroforética mostró agregación inducida por EDC/NHS, incluso cuando se sustituye NHS por su variante s-NHS, la cual debería conceder estabilidad al generar un intermediario de reacción cargado. Si bien esta estrategia de inmovilización suele ser una de las más empleadas en la literatura por la posibilidad de anclaje covalente, no asegura un anclaje orientado, conlleva también el riesgo de la modificación de las proteínas a inmovilizar (pudiendo perder funcionalidad) o, como sucedió en este trabajo con AuNPs

de 13 nm, generó formación de agregados desde las primeras etapas de la reacción. Es por ello que no se continuó con esta estrategia de inmovilización.

Cuando evaluamos el procedimiento de adsorción no covalente de Ab, obtuvimos desplazamientos hacia el rojo en la posición de la banda LSPR después de 60 min de incubación, lo que sugirió la unión efectiva de Ab. En este caso, los espectros eran más definidos y estrechos. Sin embargo, a la luz de nuestros resultados anteriores, las AuNP modificadas fueron analizadas mediante técnicas adicionales, en particular DLS y electroforesis. En el caso de DLS, tanto para AuNP-cit-Ab como para AuNP-MUA-Ab, observamos un aumento esperado en el d_h durante la incubación, con un índice de polidispersión menor en comparación con los resultados del ensayo de unión covalente. En principio consideramos que estos cambios se deben a los productos de bioconjugación y no a un proceso de agregación, aunque las mediciones de DLS por intensidad sugirieron la presencia de algunas partículas más grandes.

En contraste con nuestros resultados de movilidad electroforética para la bioconjugación covalente, los productos de adsorción no covalente de Ab mostraron una disminución significativa de R_f sin un perfil de *smearing*, lo que sugiere una adsorción de Ab más eficaz tanto para AuNP-cit-Ab como para AuNP-MUA-Ab. A la luz de estos resultados, sugerimos que la movilidad electroforética es una técnica útil para confirmar el evento de bioconjugación, pues brinda información sobre tamaño, carga, estabilidad y heterogeneidad de las partículas, en una solución salina.

El efecto de la concentración de Ab y el pH durante la incubación no covalente de Ab se evaluó mediante una modificación del ensayo de estabilidad coloidal por titulación. La unión exitosa de Ab se confirmó en base a una comparación de la relación Abs₅₂₀/Abs₆₅₀ después de un aumento de la fuerza iónica mediante la adición de NaCl. Se obtuvieron valores altos de la relación cuando se empleó AuNP-cit para todas las concentraciones de Ab y pH ensayados. Esto sugiere un efecto protector de la corona proteica, frente al aumento en la fuerza iónica, lo que indirectamente también confirma la unión de Ab. La independencia del pH en el caso de la adsorción física a AuNP-cit de 13 nm podría indicar que los Ab interactúan directamente con la superficie del oro, desplazando las moléculas de citrato. Por el contrario, en el caso de la adsorción a AuNP-MUA, se espera que Ab interactúe con los grupos carboxilo expuestos de la monocapa de MUA sin desplazar dicha molécula por estar unida covalentemente. En este caso, el estado iónico de estos grupos carboxílicos afecta la posibilidad de aproximación de Ab, observándose una fuerte caída en la eficiencia de bioconjugación para pH > 8. Por encima de este pH, esperamos que tanto MUA como Ab estén cargados negativamente, y esto dificultaría su acercamiento ^{287,310}. Más allá de esta interpretación, el ensayo de estabilidad coloidal resultó ser una herramienta rápida y útil para evaluar diferentes condiciones experimentales y confirmar la inmovilización de anticuerpos.

La evaluación electroquímica de la velocidad de transferencia heterogénea de carga con una sonda redox soluble también proporcionó datos muy concluyentes. Por ejemplo, la modificación del electrodo serigrafiado de oro con AuNP-cit produce una disminución de los valores de k_0 del 19 %, determinada por VC a partir del aumento de los valores de ΔE_p de 8 mV. La adsorción adicional de Ab en AuNP-cit-Ab aumenta el valor de ΔE_p en 76 mV, lo que produce una nueva disminución en los valores de k_0 . Siendo la apreciación en los voltajes de pico del orden de 1 mV, los valores obtenidos son muy precisos, por lo que la evaluación electroquímica de los electrodos de oro modificados con nanopartículas proporciona una prueba adicional muy concluyente del proceso de bioconjugación por adsorción no covalente a AuNP-cit. Las nanopartículas modificadas por adsorción de Ab también fueron evaluadas por cromatografía de exclusión por tamaño. Los cromatogramas obtenidos para AuNP-cit-Ab y AuNP-MUA-Ab mostraron valores de *V*_e más bajos para ambos productos y una distribución muy estrecha, en comparación con la distribución obtenida para AuNP-MUA sin modificar (las AuNP-cit quedan retenidas en el prefiltro de la columna). Estos cambios son consistentes con un aumento en el tamaño de AuNP debido a la adsorción de Ab y confirman que Ab permanece unido a las AuNP incluso después de eliminar el exceso de anticuerpos libres. A pesar de que la SEC logró discriminar entre las AuNP-cit-Ab y AuNPs no modificadas, eluyendo a volúmenes diferentes, el efecto de dilución observado en la muestra fue de casi 10 veces. Por lo tanto, SEC puede emplearse como herramienta cualitativa para confirmar el proceso de bioconjugación, pero su utilidad como método separativo dependerá de la aplicación final.

Para todo el procedimiento de bioconjugación (evaluado para la conjugación de Ab), finalmente hemos llegado a una propuesta de herramientas analíticas apropiadas para la verificación del cumplimiento de cada paso, las cuales se resumen en la Tabla 1.4. Con estas técnicas en mente se evaluó la conjugación de las proteínas A/G, BSA y estreptavidina a AuNP-cit mediante adsorción. El corrimiento típico hacia el rojo luego de la incubación con cada proteína fue nuevamente evidenciado. Particularmente para el caso de la Strp, el efecto de agregación fue tal que se evidenció por UV/VIS, y se confirmó por DLS y SEC. Si bien no se indagó en las causas de este fenómeno, sospechamos que puede deberse a componentes del propio *buffer* de la proteína comercial (de los cuales el fabricante no aporta datos) y/o a la tendencia de la estreptavidina a formar agregados multiméricos, favorecido para la proteína en estado liofilizado ³¹¹.

| 1 ++++ (<i>d</i>) ++++ (λ _{LSPR}) | $2 - (dnm) ++ (\Delta \lambda_{LSPR})$ | 3 ND | 4 ND |
|---|--|--|--|
| ++++ (<i>d</i>) +++++ (λ _{LSPR}) | - (dnm) ++ $(\Delta \lambda_{\text{LSPR}})$ | ND +++ (A1 -) | ND |
| (<i>d</i>) ++++ (λ _{LSPR}) | $^{++}_{(\Delta\lambda_{ m LSPR})}$ | ++ | |
| ++++ (λ_{LSPR}) | $^{++}_{(\Delta\lambda_{ m LSPR})}$ | ++ | ++ |
| (λ_{LSPR}) | $(\Delta \lambda_{\text{LSPR}})$ | | 1 1 |
| | | $(\Delta \lambda_{\rm LSPR})$ | (520 / 650 |
| | | | nm) |
| ++++ | +++ | ++ | - |
| $(d_{\rm h}, PI)$ | $(\Delta d_{ m h}, PI)$ | $(\Delta d_{\rm h}, PI)$ | |
| ++ | ++ | + | + |
| (ζ) | $(\Delta \zeta)$ | $(\Delta \zeta)$ | (ζ) |
| ++ | - | ND | ND |
| (υ) | | | |
| ++ | ++++ | AuNP-cit: ++++ | ND |
| $(C_{\rm crit})$ | $(\Delta C_{\rm crit})$ | AuNP-MUA: - | |
| | | $(\Delta C_{\rm crit})$ | |
| - | ++++ | AuNP-cit: ++++ | ++ |
| | (520 / 650 nm) | AuNP-MUA: - | (520 / 650 |
| | | (520 / 650 nm) | nm) |
| - | ++++ (dns) | AuNP-cit: ++++ | ND |
| | $(\Delta E \mathbf{p}, k_{\mathrm{o}})$ | $(\Delta E \mathbf{p}, k_{\mathrm{o}})$ | |
| _ | ++++ | AuNP-cit: - | ++ |
| | $(\Delta R_{ m f})$ | AuNP-MUA: ++++ | $(\Delta R_{ m f})$ |
| | | $(\Delta R_{ m f})$ | |
| - | ++++ | AuNP-cit: ++++ | ++++ |
| | $(V_{\rm e})$ | AuNP-MUA: ++++ | $(V_e, \Delta V_e)$ |
| | | $(V_{\rm e},\Delta V_{\rm e})$ | |
| ND | ND | ND | +++ (v) intensided) |
| | (d _h , <i>PI</i>) ++ (ζ) ++ (υ) ++ (C _{crit}) - - - - - ND | (d_h, PI) ($\Delta d_h, PI$) ++ ++ (ζ) ($\Delta \zeta$) ++ - (υ) - ++ ++++ (C_{crit}) (ΔC_{crit}) - ++++ ($520 / 650 \text{ nm}$) - ++++ ($\Delta Ep, k_o$) - ++++ (ΔR_f) ND ND | Image: Market Marke |

Tabla 1.4. Calidad de la información proporcionada por las diferentes técnicas (y parámetros evaluados) en cada uno de los pasos involucrados en la bioconjugación de AuNPs.^a

^a Basado en el esquema 1. 1) Caracterización de AuNP-cit. 2) Evaluación de intercambio de ligando (cit \rightarrow MUA). 3) Inmovilización de Ab sobre AuNP-cit y AuNP-MUA. 4) Comparación entre proteínas inmovilizadas sobre AuNP-cit. ^b Desde "+" (pobre/ambiguo) a "++++" (conclusivo), "-": sin información relevante. "ND": experimento no realizado. "dnm": datos no mostrados.

La misma información se obtuvo en los ensayos de estabilidad, donde los conjugados de Strp y AuNPs fueron inestables para todas las concentraciones de proteínas ensayadas, así como por electroforesis y determinación de *d*^h por DLS. En cambio, para las AuNP-cit-BSA, y AuNP-cit-A/G, los ensayos de estabilidad en placa permitieron determinar la concentración mínima de proteína necesaria para estabilizar las AuNP, la cual fue similar para ambos casos, dado que se tratan de proteínas de tamaño similar, con lo que su capacidad de recubrimiento (en términos de superficie) es similar. Las AuNP-cit-BSA mostraron mayor movilidad electroforética frente a las AuNP-cit-A/G, lo cual mostró la capacidad de la electroforesis de distinguir entre sistemas AuNP-proteína con mínimas diferencias de tamaño, que no fueron evidenciadas por DLS ni por SEC. En cuanto a esta última técnica, si bien confirmó la modificación de las AuNP con estas proteínas, gran parte de las fracciones de elución se solapan con las fracciones de elución de BSA libre. Además, el efecto de dilución fue aún mayor que el observado para las AuNP-cit-Ab, confirmando así la utilidad analítica pero no preparativa de la técnica.

En cuanto al análisis mediante SERS, las señales características esperadas para proteínas (amida II y III) fueron observadas en los tres sistemas ensayados. La diferencia destacable entre las muestras analizadas reside en la intensidad de estas señales, destacándose para el caso de las AuNP-cit-A/G la presencia de un mayor número de bandas, típicamente asociadas a grupos laterales de residuos aromáticos. Los espectros SERS confirman por un lado la unión de las proteínas a la AuNP y además permiten de forma cualitativa evidenciar el número de interacciones de cada proteína.

A la hora de separar los sistemas AuNP-proteína de la proteína no unida, las AuNP-A/G, y BSA demostraron ser muy estables frente al proceso de centrifugación, con formación

mínima de agregados solamente detectable mediante DLS. En cambio, para las AuNP-cit-Ab, el efecto de la centrifugación en la estabilidad del sistema fue drástico. Resultados posteriores demostraron que esta inestabilidad aumenta con el tiempo de incubación, es favorecida con la centrifugación, e independiente del anticuerpo empleado. Se ensayaron diferentes condiciones para estabilizar los sistemas AuNP-cit-Ab, sin éxito. Incluso el intento de anclaje de los Ab a las AuNP-cit-A/G desestabilizaron todo el sistema, generando agregados, lo que indica la capacidad de los Ab de unirse o incluso desplazar a la proteína A/G de la superficie. Por ejemplo, la interacción de inmunoglobulinas de tipo G presentan valores de $K_d \approx 15$ nM, permaneciendo el Ab adsorbido frente a la competencia con proteínas plasmáticas ³¹² Todos los resultados con las AuNP-cit-Ab indicaron que la desestabilización era causada por el anticuerpo. En base a esto postulamos que los anticuerpos, aunque unidos, interaccionan de forma inespecífica entre sí favoreciendo la agregación. Tratamientos con detergentes tipo Tween-20 o con BSA no resolvieron el problema. Trabajos similares en la literatura reportaron que el efecto es dependiente del pH, y sugieren trabajar a pH > 7.5 313 ; intentos en esta línea tampoco llevaron a resultados fructíferos. Considerando el tamaño de las AuNPs empleadas en este trabajo (≈ 13 nm) y el *d*_h reportado para una IgG, \approx 10 nm, determinado por DLS ^{314,315}, podrían unirse no más de 2 moléculas de Ab a la superficie (asumiendo una orientación de tipo *flat-on*). Sin embargo, algunas consideraciones geométricas son de orden. Para un Ab, la superficie de una AuNP de este tamaño se presenta como una superficie curvada más que plana, esto podría provocar que, en beneficio de maximizar el número de interacciones a la superficie, el Ab deba asumir conformaciones que lo hagan perder parte de su estructura terciaria y/o cuaternaria, posibilitando la exposición de residuos hidrofóbicos, que induzcan interacciones inespecíficas entre AuNPs-Ab. De hecho, en la mayoría de las aplicaciones analíticas reportadas suelen emplearse AuNPs de diámetros > 40 nm, sin evidencia de fenómenos de agregación ^{66,312,313,316,317}, lo cual puede deberse a que en este contexto el grado de pérdida de estructura nativa del Ab no es extendido.

Algunos trabajos con AuNPs < 20 nm, no reportan agregación durante la inmovilización de anticuerpos, sin embargo, emplean anticuerpos modificados con grupos tiol³¹⁸ o coincuban las AuNPs con polímeros de alto peso molecular como polietilenglicol ³⁰⁷ el cual suele ser empleado como agente estabilizante de AuNPs desnudas. Diferente sería la situación de la proteína A/G y BSA las cuales, al ser de menor tamaño y con forma globular, no se afectarían demasiado por la curvatura de la superficie. Es cierto que la mayor cantidad e intensidad de señales observadas por SERS para las AuNP-cit-A/G pueden indicar la pérdida de parte de la estructura nativa de la proteína. Sin embargo, al conformarse de varias subunidades (cuatro de proteína A y dos de proteína G), cabe la posibilidad que solamente algunas de estas se vean afectadas, conservando la funcionalidad de la proteína en las restantes no unidas directamente a la superficie de oro. Para el caso del Ab unido, los espectros SERS no mostraron señales intensas que se puedan asociar a grupos aromáticos, u otras cadenas laterales de aminoácidos, lo cual no apoyaría la hipótesis de la pérdida de estructura. Sin embargo, hay que señalar que los espectros se obtuvieron en solución, luego de que las AuNPs fueran centrifugadas, haciendo posible que la sedimentación de los grandes agregados los apartara del punto de interacción con el láser de las determinaciones SERS, y por tanto los espectros obtenidos sean de las pocas AuNPcit-Ab (tal vez de tamaño mayor) que permanecen estables en solución.

Si bien lo expuesto anteriormente es solamente una hipótesis construida a partir de nuestros resultados y resultados publicados, deja la puerta abierta a nuevos desafíos de investigación que puedan ser abordados en un futuro.

Además del aprendizaje para el grupo de investigación, que ayudó a diseñar los experimentos que se describirán en los capítulos siguientes, la Tabla 1.4 es una contribución

175

que esta tesis ha realizado a la comunidad científica, pues por primera vez se comparan de forma sistemática distintas técnicas de caracterización pasibles de ser utilizadas para las distintas etapas del proceso de síntesis y bioconjugación de AuNP-proteína. Muchas de estas técnicas son de uso frecuente en la literatura, pero faltaba una visión crítica capaz de evaluar el grado de certidumbre que dichas técnicas confieren, dependiendo de lo que se quiera evaluar (ej. síntesis y concentración, estabilidad, bioconjugación). Otras técnicas son de uso menos frecuente en la literatura especializada en esta temática (electroforesis y, sobre todo, SEC), pero emergen como técnicas idóneas para la caracterización de muchos de los pasos involucrados.

Capítulo 2: Nanopartículas de oro modificadas con proteína A/G para detección de vesículas extracelulares (EVs).

Resultados

Dado que no fue posible obtener AuNPs modificadas con anticuerpos (unidos directamente o por intermedio de proteína A/G), y de cara al desarrollo de un sensor para la detección de EVs, se decidió emplear una estrategia diferente; en lugar de inmovilizar los anticuerpos capaces de reconocer las tetraspaninas de superficie a las AuNPs, se procedió a incubar los mismos directamente sobre las EVs, para luego purificarlas por SEC (y eliminar así el excedente de anticuerpo). De esta forma, se obtendrían EVs marcadas con anticuerpo, que podrían ser reconocidas por las AuNP-A/G². Dicho reconocimiento se planteó que podría tender a la formación de agregados AuNP-A/G-EV detectables de forma colorimétrica (y por consiguiente espectral) y/o por aumento de tamaño.

Caracterización de EVs

Inicialmente se llevaron a cabo métodos de caracterización de EVs purificadas mediante SEC a partir de sobrenadante de cultivo de células U2-OS, con el objetivo de identificar el nivel de expresión de tetraspaninas de superficie, principalmente CD9, CD81 y CD63 (ExoView y Citometría de Flujo) así como determinar la distribución de tamaños y concentración de EVs (MRPS y nanoFCM). Adicionalmente la distribución de tamaños se obtuvo también a partir del análisis de imágenes TEM, DLS y de los resultados de ExoView.

² **Nota:** en lo que sigue las bioconjugaciones de las AuNP-cit omitirán la indicación "cit" en el texto por comodidad.

La cuantificación de EVs, se realizó mediante la técnica de sensado de pulsos resistivos acoplado a microfluídica (MRPS) y citometría de flujo de nanopartículas (nanoFCM). Los resultados de ambas técnicas se muestran en la Tabla 2.1 junto a una estimación de la concentración mediante citometría de flujo convencional (Attune NxT).

Tabla 2.1. Concentraciones de EVs determinadas mediante nanoFCM y MRPS.

| | partículas/mL |
|--------------|---------------------------|
| nanoFCM | $2,0x10^8$ |
| MRPS | 9,6(±0,3)x10 ⁹ |
| Attune NxT * | 1,2x10 ⁵ |
| | |

*Solamente para partículas de diámetro ≥100 nm.

En cuanto a la cuantificación mediante MRPS, si bien la puesta en funcionamiento y operativa del equipo (adquirido durante esta tesis, y, por tanto, estrenado con nuestros datos) fue sencilla, el procesamiento posterior de los datos brutos registrados por el equipo requirió cierta atención para poder extraer conclusiones. Una de las principales razones que hicieron necesario este procesamiento posterior de forma más pormenorizada fue que los tamaños de las EVs medidas se encontraron muy cercanos al límite de detección reportado por el fabricante, y las señales provenientes de ruido eléctrico pueden ser confundidas como eventos correspondientes a partículas discretas. Los detalles del procedimiento de procesamiento de los datos se recaban en el Anexo 2, Sección 1.

La concentración de EVs puede variar en función del tipo celular, condiciones de cultivo y método de obtención ³¹⁹así como la técnica de medición, por lo que no fue posible contar con valores de referencia obtenidos en condiciones similares a las de este trabajo. Sin embargo, las concentraciones determinadas quedaron comprendidas dentro de rangos comúnmente reportados en otros trabajos, i.e. 10⁶ - 10¹⁰ partículas/mL ^{252,258,320,321}. La diferencia en la concentración obtenida por MRPS y nanoFCM pudo deberse a la naturaleza
de cada técnica; mientras que la primera realiza el conteo en base a la alteración de una señal eléctrica a medida que las partículas pasan por un nanoporo, la segunda se basa en la detección de la luz dispersada por cada partícula, donde las partículas de menor tamaño dispersan de forma menos eficiente la luz ²⁴⁷. Dado que la distribución "real" de las EVs está sesgada hacia partículas pequeñas (Figura 2.1), es esperable una mayor concentración medida por MRPS, por su capacidad de detectar partículas de menor tamaño de forma más eficiente.

En cuanto a la citometría de flujo convencional, si bien se pudo estimar un valor de concentración de EVs, este fue inferior al determinado por las otras técnicas, lo cual se debió fundamentalmente a que el límite de detección se encuentra en \approx 100 nm, mientras que los resultados de MRPS y nanoFCM (y ExoView) mostraron que la mayoría de las partículas detectadas se encontraron por debajo de este tamaño (Figura 2.1). Esto es algo conocido en el campo, pues los citómetros de flujo convencionales están diseñados para medir células y no EVs, y poseen por tanto un menor límite de detección en tamaño que los otros dos equipos utilizados.

Los resultados de distribución de tamaños según la técnica empleada se muestran en la Figura 2.1. Dado que en todos los casos las distribuciones presentaron asimetría positiva, la media de tamaños no resultó un parámetro adecuado para caracterizar a la población. En su lugar, a fines comparativos se decidió emplear los valores de mediana y moda de cada población. Un gráfico comparativo de estos parámetros se muestra en la Figura A2.5 (Anexo 2, Sección 2). En términos generales las distribuciones obtenidas coincidieron en que el 75 % de las EVs detectadas presentaron diámetros inferiores a 100 nm. En el caso del histograma obtenido mediante TEM (Figura 2.1, A) fue posible realizar el ajuste a una curva *logNormal*, obteniéndose una distribución con una mediana de 55 nm (moda = 45 nm), quedando la totalidad de las EVs analizadas comprendidas en un rango de tamaños entre

30 y 300 nm (n = 280). En el caso de la determinación por nanoFCM (Figura 2.1, B), la distribución quedó comprendida entre los 50 y 200 nm, con una mediana de 73 nm (moda = 69 nm) superior a lo observado mediante TEM. Además, en la distribución se observó la presencia de dos poblaciones aparentes, una mayoritaria centrada en los 70 nm, y una minoritaria de partículas de mayor tamaño, en el entorno de los 110 nm.

Esta segunda población no se apreció de forma tan definida para las restantes metodologías empleadas. En cuanto a los resultados de MRPS (Figura 2.1, D), se registraron eventos de hasta 300 nm, concentrándose la mayoría de ellos por debajo de 150 nm, con una mediana de 77 nm. La moda en este caso correspondió a 67 nm, similar a la obtenida por nanoFCM y el 75 % de los eventos se encontraron por debajo de 98 nm. Sin embargo, en este caso se debió tener en cuenta la pérdida de eventos de tamaño menor a 65 nm (por el filtro de datos impuesto, asociado al límite de detección de la técnica) lo que llevó la distribución hacia valores mayores. En el caso de la técnica de los datos de ExoView (Figura 2.1, C), si bien fueron detectados eventos de hasta 200 nm, la mayor parte de la población se concentró en un estrecho rango de tamaños (50 a 70 nm), con una mediana y moda similares a las obtenidas por TEM, aunque se debió considerar el límite de detección cercano a 50 nm para esta técnica. En cuanto al análisis mediante DLS, al no ser una técnica cuantitativa, no fue adecuado determinar estadísticos descriptivos de la población; a pesar de esto, a partir de los datos de intensidad se pudo estimar una distribución, descripta a través de una curva logNormal (Figura A2.6, Anexo 2, Sección 2). La forma de la distribución fue concordante con las determinadas previamente, sin embargo, en este caso se observó un sesgo más pronunciado a tamaños mayores, posiblemente debido a que la intensidad de luz dispersada escala con el tamaño (d) en un factor de d⁶. Considerando además las limitaciones de la técnica para poblaciones polidispersas (PI = 0.352 para la población de EVs por DLS) el resultado obtenido fue coherente con los anteriores.



Figura 2.1. Distribuciones de tamaño para EVs purificadas de sobrenadante de cultivo de células, determinado por TEM (A), nanoFCM (B), ExoView (C) y MRPS (D). En todos los casos se muestran los datos normalizados a fin de facilitar la comparación.

Los ensayos de detección de EVs que se buscaron desarrollar en este trabajo, centran su fundamento en la detección con anticuerpos dirigidos contra las tetraspaninas de superficie de las EVs; es por ello que resultó fundamental realizar una caracterización fenotípica de las mismas de forma de determinar el nivel de expresión de las tetraspaninas típicas presentes en EVs (CD9, CD81, CD63). Como primera aproximación se procedió a la caracterización mediante citometría de flujo, empleado anticuerpos anti-CD9 y anti-CD81 conjugados a fluoróforos, a saber, ficoeritrina-cianina-7 (PE-Cy7) y PacificBlue, respectivamente. Inicialmente se definió el "gate" para incluir a los eventos asociados a EVs empleando la señal de "forward" (FSC) y "side scatter" (SSC) adquirida con el láser violeta (405 nm), el cual resultó ser el más adecuado para adquirir un mayor número de eventos. De forma de contar con evidencia de que los eventos observados correspondieron a EVs, se realizó la incubación de la muestra con detergente TritonX 100 (concentración final 10 % v/v, 30 min). Como se muestra en la Figura A2.7 del Anexo 2, luego del tratamiento durante 30 min, prácticamente la totalidad de los eventos desaparecieron. A pesar de esto, el número de eventos adquiridos fue bajo, lo que no permitió compensar adecuadamente la señal de fluorescencia para el análisis de marcación. En el caso de las muestras incubadas solamente con anti-CD9 (Figura 2.2), se evidenció la presencia de EVs positivas (≈ 36 %). Resultados similares se obtuvieron cuando se analizó la muestra incubada con una mezcla de anti-CD9 y anti-CD81 (≈ 50 %), considerando que el porcentaje algo superior pudo deberse a la imposibilidad de realizar la compensación de los datos de fluorescencia. Para el caso del resultado con anti-CD81, la intensidad de fluorescencia obtenida no se diferenció significativamente del control sin marca, indicando una baja marcación tanto en las muestras incubadas solamente con anti-CD81 como en las tratadas con la mezcla de anticuerpos (Figura A2.8, B, Anexo 2). Con estos resultados, se confirmó la presencia de un gran porcentaje de CD9 en las EVs; sin embargo, el bajo nivel de marca observado con antiCD81 se debió a una baja eficiencia de unión del anticuerpo empleado y/o a la limitada cantidad de eventos adquiridos. Es también necesario considerar, en este caso, que el límite de detección de tamaño para el citómetro empleado fue de alrededor de 100 nm cuando, por las técnicas mostradas anteriormente, sabemos que el mayor porcentaje de la población de EVs se encuentra por debajo de este límite.



Figura 2.2. Gráficos de dispersión obtenidos por citometría de flujo, analizando la señal del "*side scatter*" y el canal de fluorescencia para anti-CD9-PE. Se aplicó el gate de selección de EVs, y se definieron las poblaciones CD9+/CD9-. A: EVs incubadas con anti-CD9-PE-Cy7, B: EVs incubadas con anti-CD9-PE-Cy7 y anti-CD81-PB.

La fenotipificación mediante ExoView aportó mayor información; en este caso las EVs fueron capturadas con un anticuerpo anti-tetraspanina diferente en cada spot y luego incubadas con una mezcla de anti-CD9, anti-CD81 y anti-CD63 conjugados a diferentes fluoróforos, por lo que se analizó la expresión de las tres tetraspaninas en simultaneo. En

otras palabras, esta técnica tiene la capacidad de resolver, con resolución de vesícula única, la composición relativa de cada una de estas tres proteínas en su superficie.

Cuando se analizaron los datos observando el número de EVs capturadas por cada anticuerpo (Figura 2.3), el mayor número de EVs capturadas se consiguió con anti-CD9, seguido de anti-CD63 y anti-CD81. A priori esto indicó que un mayor número de EVs presentaban la tetraspanina CD9 o que esta fue más abundante en cada EV, haciendo más probable su captura. En la misma figura se puede observar un análisis más detallado, en donde se estudió el nivel de expresión de las tres tetraspaninas dentro de la población de EVs capturada con cada anticuerpo. Dentro de cada subpoblación capturada, se repitió el patrón de expresión CD9 > CD63 > CD81, lo que en conjunto mostró que todas las EVs capturadas presentaron al menos alguna copia de cada una de las tetraspaninas analizadas, siendo CD9 la de mayor abundancia. Un análisis más exhaustivo de los datos derivados de ensayos de colocalización, a nivel de EV única (Figura A2.9, Anexo 2) mostró que, si bien se identifican EVs que portaron una única tetraspanina, fueron mucho más frecuentes las EVs con combinaciones de dos de ellas, e incluso también EVs que portan las tres en simultaneo. Considerando los resultados anteriores, se determinó que de cara a sistemas de detección de EVs, por su nivel de expresión, era adecuado comenzar ensayos empleando anticuerpos dirigidos contra la tetraspanina CD9.



Figura 2.3. Caracterización fenotípica de EVs derivadas de sobrenadante de cultivo de células U2-OS mediante ExoView. En el eje horizontal se representa el anticuerpo de captura, mientras que los colores indican los anticuerpos empleados en la detección. IM: control negativo con inmunoglobulinas de ratón.

Ensayos colorimétricos para detección de EVs

Se realizaron incubaciones de soluciones de EVs preincubadas con anti-CD9 y separadas por SEC, con AuNP-A/G. Se ensayaron diferentes relaciones EV:AuNP (partícula:partícula), abarcando tanto exceso de EVs como de AuNPs. Como se muestra en la Figura A2.11(Anexo 2, Sección 3), luego de las incubaciones, para ninguna de las relaciones ensayadas se observaron cambios significativos en los espectros UV/VIS. Tampoco fue evidenciado ningún cambio en la relación Abs₅₂₀/Abs₆₅₀ (Figura A2.12, Anexo 2).

En otra estrategia, se realizó una titulación, mediante el agregado de AuNP-A/G a una

alícuota de EVs y se registraron los espectros UV/VIS entre 400 nm y 800 nm luego de cada agregado de solución de AuNP-A/G. Como se aprecia en la Figura A2.13 del Anexo 2, tampoco fueron detectados cambios significativos tendientes a indicar la formación de agregados producto del reconocimiento entre AuNP-A/G y las EVs. Resultados similares se obtuvieron mediante DLS, donde la formación de agregados tampoco fue evidenciada y se obtuvieron diámetros hidrodinámicos similares a los de las AuNP-A/G (datos no mostrados).

En virtud de estos resultados surgió la interrogante de si efectivamente el reconocimiento entre las AuNP-A/G y las EVs marcadas con anticuerpo estaba teniendo lugar. Para ello se recurrió a ensayos de inmunomarcación mediante microscopía electrónica de transmisión, de forma de lograr evidenciar de forma directa el reconocimiento de las AuNPs y las EVs marcadas con anticuerpo.

Identificación de EVs mediante TEM empleando AuNPs

Las AuNP-A/G se emplearon como reactivo de inmunomarcación de EVs (marcadas previamente con anticuerpo) sobre grillas de microscopía electrónica de transmisión. Previamente se optimizó la dilución de AuNPs a emplear, los tiempos de incubación, así como lavados (Datos no mostrados). El efecto de emplear o no AuNP-A/G bloqueadas con BSA también fue analizado en esta oportunidad. Como muestra la Figura A2.14 del Anexo 2, la no inclusión de la etapa de bloqueo de las AuNP con BSA generó un gran pegado inespecífico de las AuNPs a las EVs, como demostraron los resultados obtenidos empleando AuNP-BSA (control negativo). A partir de este resultado, las diluciones de AuNP-A/G ensayadas se realizaron en PBS-BSA, y se incubaron durante 30 min previo a cada ensayo de inmunomarcación. La concentración de BSA empleada fue la máxima

evaluada en los ensayos previos de bloqueo mostrados en el Anexo 1.



Figura 2.4. Micrografías TEM de EVs incubadas con AuNP-A/G (A y C) y AuNP-BSA (B y D). Las EVs fueron previamente incubadas con anticuerpo anti-CD9 (A y B) o anti-CD81 (C y D). En todos los casos las AuNPs fueron previamente incubadas en solución bloqueante PBS conteniendo BSA. Las imágenes se tomaron a una magnificación de 80000x.

Las micrografías de los ensayos con AuNP-A/G evidenciaron interacción entre estas y las EVs marcadas, tanto con anti-CD9 como con anti-CD81. No se observó prácticamente marca para los mismos ensayos realizados con AuNP-BSA, siendo este uno de nuestros controles negativos (Figura 2.4). El análisis cuantitativo de las imágenes tomadas (contando número de EVs con y sin AuNPs), determinó que alrededor del 40 % de las EVs tratadas con anti-CD9 presentó marca, mientras que esta cifra fue del 26 % para las tratadas con anti-

CD81 (Figura 2.5). En paralelo, los controles empleando las mismas EVs tratadas con anticuerpo, pero incubadas con AuNP-BSA mostraron un porcentaje de marca entre el 1.5 y 3 % (Figura 2.5). Adicionalmente se incluyó un control isotípico, incubando las EVs previamente con un anticuerpo inespecífico (anti-C23); para este ensayo el valor de marca fue del entorno al 6 %.



Figura 2.5. Porcentaje total de EVs marcadas luego de la incubación con AuNP-A/G y AuNP-BSA. Las EVs fueron previamente incubadas con anti-CD9 o anti-CD81 (anticuerpos específicos) o anti-C23 (inespecífico).

Estos resultados en su totalidad confirmaron la capacidad de reconocimiento de las AuNP-A/G por anticuerpos inmovilizados sobre las EVs, y que además esta interacción fue específica para EVs marcadas con anticuerpos dirigidos contra las tetraspaninas CD9 y CD81. En un análisis más profundo de las imágenes, se contabilizó el número de AuNPs que interaccionan con cada EV. Los resultados resumidos en el gráfico de la Figura 2.6, mostraron que, si bien la mayoría de las EVs marcadas con AuNP-A/G contabilizadas presentaron una sola marca, para las EVs incubadas con anti-CD9 existió la tendencia a que fueran registradas con mayor frecuencia EVs con 2, 3 o hasta 5 marcas, mientras que esta frecuencia fue menor para las EVs tratadas con anti-CD81. En los ensayos con AuNP-BSA, fueron muy escasas las observaciones de EVs presentando más de una marca, lo que una vez más confirma la especificidad de nuestro inmunoensayo.



Figura 2.6. Gráfico del % EVs marcadas en función del número de AuNPs por cada EV contabilizada, para EVs tratadas con anti-CD9 (rojo) y anti-CD81 (azul). Se comparan los resultados obtenidos para los ensayos con AuNP-A/G y AuNP-BSA (control negativo).

Adicionalmente, cuando se analizaron los datos de porcentaje de EVs marcadas en función del tamaño (medido por TEM), se apreció un incremento rápido de este porcentaje, medido como un acumulado, alcanzando su valor máximo en el entorno de los 90 nm (ver Figura A2.10, Anexo 2), lo indicó que, para las EVs de mayor tamaño, el porcentaje de marca fue menor.

Discusión

El principal objetivo de este capítulo fue el desarrollo de estrategias de detección de EVs a partir de AuNPs modificadas. Un punto clave en estos sistemas de detección basados en inmovilización de proteínas radica en la estabilidad del sistema coloidal (fundamentalmente para aplicaciones biológicas). En este caso el sistema AuNP-A/G fue ampliamente caracterizado previamente (Capítulo 1), confirmándose su estabilidad.

En segundo lugar (no por ser menos importante) se realizó la caracterización de las especies a detectar (EVs, derivadas de sobrenadante de cultivo de la línea celular humana U2-OS), tanto para conocer su concentración y distribución de tamaños, como para conocer el nivel de expresión de ciertos marcadores de superficie. Esto último resulta sumamente relevante a la hora del desarrollo de una estrategia de detección mediada por anticuerpos. En cuanto a la caracterización por tamaño, las técnicas aplicadas muestran resultados comparables, teniendo en cuenta las limitaciones y alcance de cada una de ellas. A nivel cuantitativo, los resultados de nanoFCM y MRPS se diferencian en casi un orden. Esta diferencia pudo relacionarse a la naturaleza de cada técnica, en donde la primera emplea la luz dispersada como sistema de detección y la segunda señales eléctricas. Considerando que la señal en las técnicas basadas en dispersión de luz (Rayleigh) escala con el radio a la sexta potencia, es esperable una menor detección de partículas de pequeño tamaño, lo que podría explicar la menor concentración medida ³²². No se encontraron reportes previos de valores de concentración de EVs derivadas de sobrenadante de cultivo de células U2-OS. No obstante, valores de concentraciones de EVs determinados en la literatura para otras líneas celulares (y purificados mediante SEC) se encuentran dentro de las concentraciones obtenidas en este trabajo. Adicionalmente, algunos trabajos reportan una tendencia a valores menores de concentración cuando se analizan EVs por nanoFCM frente a métodos basados en señales eléctricas ^{258,323}.

Dado que el sistema de detección de las EVs basa su funcionamiento en el reconocimiento por anticuerpos de las tetraspaninas de superficie, fue necesario conocer *a priori* el nivel de expresión de las tetraspaninas más comúnmente encontradas, a saber, CD9, CD81 y CD63 ^{239,324}. La citometría de flujo convencional de EVs (incubadas con anticuerpo contra las tetraspaninas CD81 y CD9) permite una caracterización parcial de la muestra. En las condiciones de los ensayos de este trabajo, permite estimar el nivel de expresión de CD9, sin embargo, más pruebas se requieren para estimar mejor el nivel de expresión de CD81, dado que el nivel de marca fue muy bajo. Entre las posibles explicaciones se destacan: la necesidad de emplear mayor concentración de la técnica, donde partículas de menos de 100 nm no son fácilmente detectables con el equipo utilizado. Esto último podría repercutir en el nivel de marcación observado, debido a que como muestran las demás técnicas de análisis, casi la totalidad de la población de EVs presenta tamaños inferiores a los 100 nm. Por consiguiente, solo estaríamos viendo el nivel de marca de partículas grandes, las cuales no son las mayoritarias en nuestras muestras.

En este sentido los resultados derivados de ExoView aportan evidencia más contundente. El principal resultado es que el nivel de expresión de CD9 es mayor al de CD63 y muy superior al de CD81; siendo mayoritarias las EVs que presentan CD9 en más de una copia.

191

Sin embargo, en la mayoría de las EVs detectadas se encuentra al menos la presencia de dos de las tres tetraspaninas testeadas (Figura A2.9, Anexo 2).

Con los resultados mostrados en este capítulo, la posibilidad de la detección colorimétrica de la interacción AuNP-EV (marcadas) queda descartada. No son detectables cambios (originados de la agregación de AuNPs) ni a nivel espectral ni por DLS. Esto hace pensar en la posibilidad de que, en solución, no exista reconocimiento de la proteína A/G inmovilizada y los anti-CD9, o que la proteína A/G se libere de la superficie de las AuNP en presencia de anticuerpo. Claro está, esto no podría suceder a gran escala, dado que las AuNPs quedarían sin ligando (proteína A/G) y tenderían a la agregación por fuerza iónica. A raíz de la evidencia posterior derivada de los ensayos mediante TEM, la hipótesis del no reconocimiento parece menos probable.

Para que ocurra agregación y/o cambio de color de las AuNPs en nuestro sistema, tendrían que ocurrir dos cosas. Para el caso de la formación de agregados (en un hipotético ensayo de aglutinación), las EVs marcadas con anticuerpo deberían quedar recubiertas con una cierta cantidad de AuNP-A/G, las cuales tendrían que ser capaces, a su vez, de ligarse otras EVs marcadas con anticuerpo en una configuración tipo "puente", dando así lugar a agregados detectables. El problema es que una alta relación AuNP-EV podría provocar el recubrimiento de todas las EVs con AuNPs, y eso conspiraría contra la capacidad de formar puentes del tipo [EV-Ab]-(AuNP-A/G)-[Ab-EV]. Por otra parte, si se apelara a buscar un cambio de color luego de la unión de las AuNPs a las EVs, se debe considerar que existe una distancia interpartícula límite, a partir de la cual el efecto del corrimiento hacia el rojo del máximo de resonancia de plasmón (LSPR), ocasionado por cambios locales en el índice de refracción, ya no es observable. Considerando lo primero, en los ensayos colorimétricos se probaron múltiples relaciones AuNP:EV (con valores desde 0 a más de 10000) para asegurar cantidades por exceso y por defecto de AuNP-A/G, no registrándose cambios en

ninguna de las condiciones. Los resultados de ExoView mostraron que las EVs contienen más de una copia de cada tetraspanina, lo que *a priori* es un requisito para este ensayo. Sin embargo, no contamos con información sobre la distribución de estas proteínas en la superficie de las EVs, lo cual puede ser una limitante a la hora del evento de acercamiento de AuNPs, pudiendo quedar las mismas unidas pero alejadas. Esto podría ser resuelto incubando las EVs con anticuerpos contra más de una tetraspanina, de forma de asegurar muchos sitios de unión de las AuNP-A/G. Aun en el supuesto de que la cantidad de AuNPs y la distribución de las tetraspaninas de superficie fuera favorable a la agregación, pudo existir una limitante en cuanto a la cantidad de anti-CD9 empleada, la cual no fuera cercana a la saturación. Esto último también podría explicar la no formación evidenciable de agregados de EVs entrecruzadas con AuNPs en los ensayos por DLS.

En cuanto a la distancia interpartícula mínima necesaria para evidenciar el efecto del acercamiento de AuNPs por cambios en sus propiedades ópticas, a partir de simulaciones concordantes con datos experimentales, se ha estimado que para AuNPs esféricas de *ca*. 20 nm, esta distancia es del entorno de los 6 nm ⁵⁸. Considerando un d_h = 6.3 nm para la proteína A/G (estimado a partir de la masa molecular de la proteína, Ver Anexo 1) dos AuNP-A/G no podrían acercarse a una distancia menor a *ca*. 12 nm, lo cual se encuentra por encima del límite necesario para que ocurra un cambio en la posición del máximo LSPR. Considerando la evidencia mostrada en el referido trabajo de Montaño et al. para distancias interpartícula de *ca*. 12 nm, son apreciables cambios espectrales empleando AuNPs con *d* ≥ 40 nm, lo cual debería ser tenido en cuenta para futuros desarrollos de esta línea de trabajo.

Los ensayos mediante TEM, en primer lugar, confirman que las AuNP-A/G son capaces de reconocer las EVs marcadas con anticuerpos para tetraspaninas de superficie. Esto es cierto, al menos en un formato de inmunoensayo similar a un ELISA (pero sobre una grilla de

microscopía), pero no en solución. Además, por los resultados con AuNPs modificadas únicamente con BSA, y con EVs incubadas con anticuerpo inespecífico, se confirma la especificidad de la interacción. Esto muestra la potencialidad de emplear los sistemas AuNP-A/G como reactivo para el inmunofenotipado de EVs. En concordancia con los resultados de citometría y ExoView, el inmunoensayo protocolizado en este trabajo determina una mayor positividad para las EVs marcadas con anti-CD9 en comparación a anti-CD81 (considerando que se partía de la misma cantidad de anticuerpo en ambos ensayos). Si bien consideramos este resultado exitoso, también sabemos que aún son posibles algunas optimizaciones en el procedimiento. En primer lugar, basado en los resultados de ExoView, afirmamos que son raros los casos de EVs sin ningún tipo de marca de tetraspaninas, menos aun cuando la marca que se observa es la de CD9. Esto hace pensar que a pesar de haber empleado concentraciones de anticuerpo habituales en protocolos de caracterización de EVs, sea posible que aún no estemos trabajando en condiciones saturantes. Esto además aportaría sustento a los resultados negativos obtenidos en los ensayos en solución. Adicionalmente, resta repetir los ensayos de inmunomarcación empleando anti-CD63. En caso de confirmarse un mayor nivel de marcación al emplear mayores concentraciones de anticuerpo, restará rediseñar los ensayos colorimétricos y evaluar adicionalmente la utilidad de marcar las EVs con anti-CD9, anti-CD81, y anti-CD63 en simultáneo de forma de maximizar los sitios de anclaje de AuNPs.

De suma utilidad sería lograr sintetizar AuNPs de diferente tamaño, de forma de poder evaluar en un solo ensayo, el nivel de expresión de las tres tetraspaninas (asociando cada anticuerpo a un tamaño diferente de AuNP). Bajo el protocolo de marcación de EVs previa a su purificación por SEC, esto quedaría sin efecto, dado que las AuNP-A/G interactúan con los anticuerpos unidos a las EVs por su región Fc. Este desarrollo solo sería posible si el anticuerpo se inmovilizara directamente a la AuNP (directamente o vía proteína A/G). En el Capítulo 1 se exponen evidencias experimentales de las dificultades para obtener estas AuNPs. Sin embargo, también se menciona en la discusión, la posibilidad de que la agregación observada durante la inmovilización de anticuerpos a las AuNPs empleadas en este trabajo fuese producto de su pequeño tamaño. A la luz de esto, queda abierta la interrogante de si las AuNPs de mayor tamaño necesarias para un inmunofenotipado simultaneo de las EVs serían más estables frente a la inmovilización de anticuerpo.

De todas formas, consideramos que estas AuNP-A/G, podrían ser empleadas en cualquier ensayo de "inmunoTEM" dada su capacidad de detectar anticuerpos unidos a estructuras biológicas. Además, generamos un protocolo no convencional de "inmunoTEM", donde se parte de un reactivo sumamente estable y muy bien caracterizado (AuNP-A/G), y son las EVs las que se marcan con el anticuerpo de interés. Este nuevo protocolo es muy versátil, pues no exige la generación de un nuevo tipo de nanopartícula destinado para cada ensayo. Esperamos enviar a publicar el manuscrito con este nuevo protocolo de inmunomarcaje en los próximos meses, que será de gran interés para la comunidad que trabaja con vesículas extracelulares, pero que podría ser fácilmente implementado con otras nanopartículas biológicas (ej. virus, etc.).

Capítulo 3: Inmovilización de la proteína SpyCatcher y sus formas modificadas sobre AuNP

Como se mencionó en la introducción, existe la posibilidad de lograr uniones estables y orientadas mediante proteínas ingenierizadas. En este capítulo se exponen los principales resultados obtenidos, en la inmovilización de la proteína "*linker*" SpyCatcher modificada con un residuo de cisteína con la finalidad de lograr su anclaje covalente al oro. Al mismo tiempo y buscando evidencia de la utilidad de la incorporación de la cisteína, se evaluó la inmovilización de la proteína sin ingenierizar.



Resultados

Esquema 3.1. Resumen de las estrategias de inmovilización de la proteína SpyCatcher y sus variantes modificadas con cisteína. En el cuadro se mencionan las principales técnicas empleadas para su caracterización.

Caracterización de los sistemas AuNP-SpyCatcher

Se incubaron concentraciones diferentes de las variantes de la proteína SpyCatcher durante 1 h o 24 hs con AuNPs-cit y se evaluó su estabilidad coloidal mediante el agregado de solución de NaCl. En la Figura 3.1 se observa la variación de la relación de Abs520/Abs650 en función de la concentración de proteína para las tres variantes de SpyCatcher tanto con 1 h como con 24 hs de incubación. En todos los casos se observó una tendencia creciente de la relación, indicando, como se esperaba, una mayor estabilidad a mayor concentración de proteína. Se apreció una pequeña diferencia en cuanto a la concentración de proteína incubada que estabiliza el sistema coloidal frente al aumento de la fuerza iónica. Para el caso de SpyCatcher se observó que esta estabilidad se logra con concentraciones de proteína iguales o mayores a 100 µg/mL, mientras que para SpyCatcherCys(M) y SpyCatcherCys(D) esta estabilidad se observó ya a partir de los 50 µg/mL. Si bien esto no constituyó una evidencia sustancial que confirmara el anclaje de las variantes ingenierizadas mediante la formación de un enlace S-Au, si hizo pensar en que la interacción proteína-AuNP se dio de forma diferencial, y esto impactó en la estabilidad coloidal de la solución. Si bien a partir de concentraciones de proteína del entorno de los 100 µg/mL ya no se registraron variaciones en la relación Abs520/Abs650, lo que sugirió la adsorción de todas las variantes sobre la AuNP, se decidió emplear una concentración de trabajo de proteína de 200 µg/mL para los siguientes ensayos por encontrarse en el punto medio de la meseta de estabilidad alcanzada por las tres soluciones coloidales.



Figura 3.1 Relación de Abs₅₂₀/Abs₆₅₀ luego de la incubación de AuNPs con las diferentes variantes de la proteína SpyCatcher. En A se muestra el resultado luego de 1 h de incubación y en B luego de 24 hs.

Si bien no se observaron diferencias en este ensayo entre la incubación durante 1 h frente a 24 hs, lo que *a priori* indicó un proceso de adsorción rápido, existe evidencia en la literatura consultada que sugiere que luego de la adsorción ocurren cambios estructurales y organizacionales de las moléculas adsorbidas sobre la superficie de las AuNPs (no así de su número) y que estos procesos transcurren en forma más lenta ^{122,325–327}. Incluso se ha reportado que la unión irreversible a través de cisteínas ocurre en pasos posteriores a la adsorción ¹³⁴. Es por ello que se optó por la incubación durante 24 hs.

En virtud de contar con evidencia cuantitativa de una unión diferencial de las diferentes variantes de la proteína SpyCatcher, se realizó una aproximación mediante un ajuste a una isoterma de Langmuir según se describió en la sección Materiales y Métodos. A partir de las isotermas (mostradas en la Figura A3.4 y A3.5 Anexo 3, Sección 2) se estimó un valor de K_a (constante de asociación) aparente para el proceso de adsorción. Para la determinación de la K_a se descartaron los valores de $\Delta\lambda$ correspondientes a las concentraciones de 10 µg/mL dado que las AuNPs-cit mostraron señales de agregación como se desprendió de los espectros UV/VIS registrados luego de la incubación con las diferentes concentraciones de proteína (Ver Figura A3.2 y A3.3, Anexo 3, Sección 2). Esta agregación se originó por el aumento de la fuerza iónica generado por el agregado de proteína disuelta en *buffer* PBS (NaCl ≈ 150 mM).

Al igual que los resultados de estabilidad coloidal, no se observaron diferencias al evaluar el proceso de adsorción a 1 h o a 24 hs (reflejado en los valores similares de K_a). Esto pareció indicar que la cantidad de proteína adsorbida no cambió luego de la primera hora.

| Tabla 3.1 | Constantes | de asociación | aparente o | determinad | as mediante | e isotermas | de Langmuir | aparentes | para |
|------------|---------------|----------------|------------|------------|-------------|-------------|-------------|-----------|------|
| la unión o | de las difere | ntes variantes | de SpyCat | cher a AuN | JPs. | | | | |

| | Ka M ⁻¹ (1 h) | Ka M ⁻¹ (24 hs) |
|------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| SpyCatcher | $(5.7 \pm 0.6) \times 10^6$ | $(6.7 \pm 0.5) \times 10^6$ |
| SpyCatcherCys(M) | $(4.8 \pm 0.1) \times 10^6$ | $(3.9 \pm 0.4) \times 10^6$ |
| SpyCatcherCys(D) | $(15 \pm 2) \times 10^6$ | $(14.6 \pm 0.6) \times 10^6$ |

Como se aprecia en la Tabla 3.1 los valores de K_a calculados para la adsorción de SpyCatcherCys(D) fueron mayores a los de las otras variantes. Si bien el valor determinado de K_a aparente no representó un valor real termodinámico (debido a los supuestos del modelo de Langmuir, ver Introducción) cuando se consideraron de forma comparativa, apuntaron a un proceso de unión más favorable para SpyCatcherCys(D). Sin embargo, al no ser las diferencias en los valores de K_a tan grandes, no pudimos confirmar que se debieron a una interacción vía cisteína en este constructo.

Cuando se analizaron los espectros UV/VIS para una concentración de proteína de 10 µg/mL, el proceso de agregación se evidenció en menor medida para las AuNP-SpyCatcherCys(D) (Ver Figura A3.2 y A3.3 Anexo 3). Esta mayor estabilidad de AuNP-SpyCatcherCys(D) pudo deberse a la unión de un mayor número de moléculas de proteína y/o a la unión en una orientación particular que minimizó las interacciones entre AuNPs y por tanto no favoreció la agregación.

Considerando la necesidad de separar a las AuNP-SpyCatcher de los remanentes de proteína libre, y que además (como se vio en el Capítulo 1) la centrifugación resultó sumamente desestabilizante para algunos sistemas AuNP-proteína, indagamos la posibilidad de emplearla como método de estudio de estos sistemas, evaluando la relación Abs₅₂₀/Abs₆₅₀ luego de cada ciclo de centrifugación (10000g, 30 min, 4 °C) y resuspensión en PBS (Figura 3.2 y A3.7 Anexo 3). Como se esperaba, existió un efecto notorio con cada ciclo de centrifugación, disminuyendo la absorbancia a 520 nm e incrementándose levemente la correspondiente a 650 nm (ver espectros UV/VIS en la Figura A3.6, Anexo 3). Esta disminución reflejó la pérdida en cantidad de AuNPs dispersas, sea debido a un efecto de adherencia al tubo y/o por la formación de agregados (recordar que $\varepsilon_{650} \ll \varepsilon_{520}$). La pérdida de estabilidad del sistema se apreció mejor en la Figura A3.7, donde se observó una disminución de la relación Abs520/Abs650 ya a partir del segundo ciclo de centrifugación, lo que determinó que la separación de AuNPs modificadas de proteína libre debió realizarse en no más de dos ciclos de centrifugación. No se observaron diferencias significativas en el comportamiento frente a cada ciclo de centrifugación entre las diferentes variantes de proteína, salvo una mayor tendencia de las AuNP-SpyCatcher (la no ingenierizada) a adherirse a las paredes del tubo durante la centrifugación (Figura A3.8).



Figura 3.2 A: Relación Abs₅₂₀/Abs₆₅₀ antes (pre) y después (post) de centrifugar durante 30 min a 10.000g las soluciones de AuNPs incubadas por 24 hs con las variantes de SpyCatcher. B: Variación en la posición del máximo de absorción ($\Delta\lambda$) para las mismas soluciones.

En la Figura 3.2 se observan los valores de Abs₅₂₀/Abs₆₅₀ y $\Delta\lambda$ obtenidos a partir de los espectros UV/VIS para las AuNP-cit y modificadas con las variantes de SpyCatcher. Como ya se observó anteriormente no existieron diferencias significativas en la relación Abs₅₂₀/Abs₆₅₀ entre las diferentes AuNP modificadas con SpyCatcher; además esta relación se mantuvo prácticamente incambiada luego de dos ciclos de centrifugación, por lo que el posible efecto de este procedimiento sobre la estabilidad de las AuNPs no fue evidenciable

mediante espectrofotometría. Los espectros normalizados para todas las soluciones coloidales antes y después de someterse a centrifugación, fueron similares, sin señales de agregación (ver Figura A3.9, Anexo 3).

Sin embargo, un análisis más detallado de los espectros mostró que existieron diferencias en el parámetro $\Delta\lambda$ según la variante de SpyCatcher inmovilizada. Como se observa en la Figura 3.2 B, el mayor cambio en la posición del máximo de absorción se registró para la inmovilización de SpyCatcher, mientras que el menor para la variante SpyCatcherCys(D). En este sentido, trabajos previos relacionaron el parámetro de $\Delta\lambda$ con la cantidad de proteína adsorbida, la cual modifica el valor de constante dieléctrica del entorno de la AuNP afectando así sus propiedades ópticas 162,328. Según esto entonces, la variante SpyCatcher se adsorbería en mayor medida y la variante SpyCatcherCys(D) en menor medida. Este hecho no se vio afectado luego de someter a las soluciones coloidales a dos ciclos de centrifugación dado que se mantuvieron las diferencias en los valores de $\Delta\lambda$. En concordancia con este resultado, del análisis de movilidad electroforética se desprendió que las AuNP-SpyCatcher presentaron una menor migración dentro del gel (Ver Figura 3.3), mientras que las AuNPs modificadas con SpyCatcherCys (tanto su forma monomérica como dimérica) registraron movilidades similares. Esto fue coherente con el mayor cambió en $\Delta\lambda$ observado para SpyCatcher, que indicó que una mayor cantidad de moléculas de proteína se adsorbieron sobre la superficie de las AuNP aumentando así su tamaño y/o disminuyendo su carga.



C Centrifugadas



La movilidad electroforética se redujo luego de someter los sistemas AuNP-SpyCatcher a centrifugación. Para AuNP-SpyCatcher y AuNP-SpyCatcherCys(D), se evidenció además una migración con patrones de *"smearing"*, indicando la existencia de poblaciones de AuNPs heterogéneas, posiblemente por formación de agregados que no fueron detectables mediante UV/VIS.

Las determinaciones por DLS mostraron resultados coherentes con los valores de R_i del ensayo de movilidad electroforética (Tabla A3.3 y A3.4, Anexo 3). Las AuNP-SpyCatcherCys(M) mostraron una distribución de tamaños más estrecha (*PI*: 0.260), con d_h de 33 ± 5 nm (por intensidad) y 15 ± 5 nm (por número). En cambio, en los preparados de AuNP-SpyCatcher o SpyCatcherCys(D) la presencia de agregados de mayor tamaño fue detectada (en algunos casos visualizándose dos poblaciones) y los valores de d_{hmed} por tanto fueron algo mayores. Cuando el mismo ensayo se repitió para los mismos sistemas luego de ser centrifugados, la aparición de poblaciones de mayor tamaño fue evidente para AuNP-SpyCatcher (Figura 3.4 B) no así para las AuNP- SpyCatcherCys(M), que mantuvieron la misma distribución de tamaños. Para el caso de SpyCatcherCys(D), aunque en menor medida, se detectaron algunas partículas para d_h mayores a 300 nm (Figura 3.4, F. Este hecho determinó al igual que el ensayo de movilidad electroforética que SpyCatcherCys(M) estabilizó mejor los sistemas coloidales frente a la agregación inducida por centrifugación. Sin embargo, estos agregados no fueron suficientes como para evidenciar cambios en los espectros UV/VIS como mostraron los resultados anteriores.



Figura 3.4. Determinación de distribución de tamaños por DLS para AuNP: SpyCatcher (A y B), SpyCatcherCys(M) (C y D) y SpyCatcherCys(D) (E y F) antes (gris) y después (celeste) de ser centrifugados.

En busca de indagar en mayor profundidad sobre la interacción de las variantes SpyCatcher con la superficie de las AuNP se realizaron medidas de espectrometría SERS. La principal ventaja de este tipo de análisis es la posibilidad de detectar señales particulares que se ven aumentadas por la interacción de grupos particulares de la molécula con la superficie metálica. En base a esto, lo primero a destacar del análisis de los espectros SERS fue la aparición de señales muy intensas en las muestras de AuNP-SpyCatcher y AuNP-SpyCatcher(M) (ver Figura A3.10, Anexo 3, Sección 3). La mayoría de estas señales se originaron en la región amida II y III correspondiente a vibraciones de los enlaces N-H y C-N del esqueleto proteico. Por debajo de los 1200 cm⁻¹ se observaron diversas señales que pueden asignarse de forma tentativa a diferentes modos vibracionales del esqueleto proteico y particularmente a algunas cadenas laterales aminoácidos particulares, fundamentalmente aromáticos, como también se discutió en el Capítulo 1 ^{295,297,298}. En la tabla A3.5 del Anexo 3, se muestran asignaciones tentativas más detalladas para algunas de las bandas observadas.

Particularmente de interés fue la señal observada entorno a los 270 cm⁻¹, que pudo corresponder al estiramiento del enlace Au-S, y es particularmente intensa por efecto SERS ^{329,330}. A modo comparativo se realizó la sustracción del espectro de SpyCatcher a los espectros de las variantes con cisteína y de estas últimas entre si resultando en los espectros de la Figura 3.5. Para el caso de la sustracción del espectro de AuNP-SpyCatcherCys(M) y AuNP-SpyCatcher, se constató que esta señal permaneció entre las de mayor intensidad, siendo prácticamente la única señal que se mantuvo para AuNP-SpyCatcherCys(D) luego de la sustracción.



Figura 3.5 Espectros SERS obtenidos por sustracción entre las diferentes variantes de SpyCatcher adsorbidas sobre AuNPs. La flecha indica algunas señales relevantes para el análisis de los espectros comparativos. En A se muestra la comparación entre SpyCatcherCys(M) y SpyCatcherCys(D), en B entre SpyCatcherCys(D) y SpyCatcher, y en C entre SpyCatcherCys(M) y SpyCatcher.

Considerando que esta señal fue de baja intensidad para SpyCatcher y que esta no cuenta con ninguna cisteína en su secuencia aminoacídica (Tabla A3.1, Anexo 3), esto aportó indicios de que al menos una cierta fracción de las versiones modificadas de SpyCatcher podrían estar uniéndose mediante un enlace S-Au, conforme a lo esperado. El enlace S-S, al igual que el S, también presenta afinidad por la superficie de oro, y dependiendo de su contexto molecular, el oro es capaz de catalizar la rotura de los disulfuros (formando enlaces S-Au)³³¹ y las moléculas pueden igualmente adsorberse con gran afinidad ^{286,332,333}. El hecho de que las señales SERS de SpyCatcherCys(M) y SpyCatcher fueran de mayor intensidad apoyó los resultados previos de espectroscopia UV/VIS ($\Delta\lambda$), que apuntaban a una mayor cantidad de moléculas adsorbidas sobre la superficie de la nanopartícula, haciendo más probable la generación de efecto SERS.

Adicionalmente se determinaron los potenciales- ζ para las tres variantes de AuNP-SpyCatcher, cuyos resultados se reúnen en la Tabla 3.2. Sorpresivamente el valor medido para SpyCatcher y SpyCatcherCys(M) fue similar, mientras que algo más negativo para SpyCatcherCys(D). Realizando un estudio de la superficie de potencial de estas estructuras proteicas, a pH 5 - 6 se identificaron dos regiones, una de potencial mayormente positivo hacia el extremo C-terminal, y otra más negativa hacia el extremo N-terminal (donde se encuentra la cadena adicionada conteniendo el residuo de cisteína) (Figura A3.12 y A3.13, Anexo 3). Esto sugirió (tomado en conjunto con los valores de potencial- ζ) una orientación diferencial sobre la AuNP de SpyCatcherCys(D), donde más regiones de potencial negativo quedarían expuestas.

| | Potencial-ζ (mV) |
|------------------|------------------|
| SpyCatcher | -15±9 |
| SpyCatcherCys(M) | -17±10 |
| SpyCatcherCys(D) | -33±16 |

Tabla 3.2. Potenciales- ζ determinados a pH 5.2 para las AuNP-cit-SpyCatcher

Ensayos de unión de los sistemas AuNP-cit-SpyCatcher a SpyTag-GFP (tGFP)

Según los resultados de la sección anterior, existieron indicios de una unión diferencial de cada especie de SpyCatcher a las AuNPs. Sin embargo, los resultados no aportaron evidencia fehaciente de que la unión a la AuNP se realizara vía el grupo SH de la cisteína incorporada, aunque los ensayos de SERS sugieren dicha posibilidad. Para estudiar mejor este aspecto, se buscó evidencia en ensayos funcionales, evaluando la capacidad de unión a cada uno de los sistemas AuNP-cit-SpyCatcher de una proteína verde fluorescente modificada con la secuencia tag de unión a SpyCatcher (tGFP).

En primer lugar, cada uno de los sistemas fue evaluado antes y después de la incubación con un exceso de tGFP durante 1 h en PBS mediante electroforesis (Figura 3.6). Lo que se observó en todos los casos fue un retraso en la migración electroforética, la cual se asoció a la unión de tGFP a la AuNP (directamente o vía SpyCatcher) y/o a un cambio de la carga superficial producto de la unión de tGFP. Para el caso de las AuNP-SpyCatcher, la incubación con tGFP ocasionó un patrón de migración más difuso, dando cuenta de la formación de una población de AuNPs heterogénea. Para el caso de los sistemas AuNP-SpyCatcherCys(M) o AuNP-SpyCatcherCys(D), la incubación con tGFP mejoró la

heterogeneidad de la población de AuNPs, al generar patrones de migración menos difusos.



Figura 3.6. Ensayo de movilidad electroforética para los sistemas AuNP-SpyCatcher antes y después de la incubación con tGFP (400 µg/mL).

También fueron analizados los espectros UV/VIS para las diferentes AuNP-SpyCatcher antes y después de la incubación con tGFP. De los espectros mostrados en la Figura A3.14 (Anexo 3), se destacó la ausencia de indicios de agregación para AuNP-SpyCatcherCys(M) y AuNP-cit-SpyCatcherCys(D), siendo llamativo el aumento de la absorbancia (a 520 nm) obtenidos para las AuNP-SpyCatcher luego de la incubación con tGFP. Posiblemente esto (como se mencionó en la discusión del Capítulo 1), se debió a un aumento en la eficiencia en la dispersión de luz por la presencia de algunos agregados. De los espectros también se evaluó la magnitud del corrimiento de la posición del máximo LSPR ($\Delta\lambda$) tomando como referencia la posición LSPR de las AuNP-cit no modificadas. En este caso se evaluó el $\Delta\lambda$ luego de la incubación de las AuNPs con las diferentes proteínas



Figura 3.7. Cambio en el valor de λ_{LSPR} ($\Delta\lambda$, con respecto a AuNP-cit) para los sistemas AuNP-SpyCatcher incubados y no incubados con tGFP. Adicionalmente se analizó $\Delta\lambda$ para AuNP-cit incubadas con la misma concentración de tGFP.

SpyCatcher y luego de la incubación con tGFP. En paralelo, se analizaron AuNPs incubadas únicamente con tGFP. Llamativamente para todos los casos, el valor de $\Delta\lambda$ fue superior luego del agregado de tGPF; más aún se acercaron al valor obtenido para las AuNP-cit incubadas con tGPF. Ante esta situación no fue posible diferenciar si los cambios se debieron a la unión de tGFP vía las proteínas SpyCatcher, o a la unión directa de tGFP a la superficie de las AuNPs, sea en sitios libres o desplazando a las proteínas SpyCatcher. Tratando de dilucidar esta situación, los sistemas AuNP-SpyCatcher, incubados con tGFP, fueron analizados por SEC y detectados mediante absorbancia a 520 nm y fluorescencia (λ_{ex} = 488 nm, λ_{em} = 508 nm) de forma de rastrear la proteína tGFP. Paralelamente, como control, también se analizaron AuNP-cit y AuNP- -BSA incubadas con tGFP y soluciones de tGFP a dos concentraciones diferentes.



Figura 3.8. A: Cromatogramas obtenidos para para los sistemas AuNP-SpyCatcher luego de ser incubados con tGFP (400 μg/mL). B: Cromatogramas para soluciones de tGFP (25 y 400 μg/mL). Adicionalmente se muestran los cromatogramas obtenidos para AuNP-cit y AuNP-BSA incubados con la misma concentración de tGFP. Tanto en A como en B los cromatogramas se obtuvieron mediante el registro de la absorbancia a 520 nm.

En la Figura 3.8 se muestran los cromatogramas obtenidos mediante el registro de la absorbancia a 520 nm. El V_e para las AuNP-cit-tGFP fue sensiblemente menor (\approx 4.5 mL), al de las AuNP-cit-SpyCatcher (en todas sus variantes) y AuNP-BSA (entre 6 y 7 mL). Sin embargo, en todos los casos se observó la elución de las AuNPs hasta \approx 14 mL. Cuando los cromatogramas se analizaron por fluorescencia (Figura 3.9), se determinó que tGPF sola eluyó con un V_e \approx 9 mL, detectándose desde los 6 mL hasta los 12 mL.



Figura 3.9. A: Cromatogramas obtenidos para para los sistemas AuNP-SpyCatcher luego de ser incubados con tGFP (400 μ g/mL). B: Cromatogramas para soluciones de tGFP (25 y 400 μ g/mL). Adicionalmente se muestran los cromatogramas obtenidos para AuNP-cit y AuNP-BSA incubados con la misma concentración de tGFP. Tanto en A como en B los cromatogramas se obtuvieron mediante el registro de la emisión de fluorescencia a 508 nm.

Para el caso de las AuNPs, en todos los casos fue detectada tGFP a $V_e \approx 9$ mL, correspondiendo a la tGFP no unida. En este caso se observaron diferencias en cuanto al área del pico del cromatograma, y en base a esta se calculó el porcentaje de diminución con respecto al área del cromatograma para tGFP 400 µg/mL (la misma concentración empleada en las incubaciones con AuNPs). Los datos se muestran en la Tabla A3.6 (Anexo 3).

Dado que el área reflejó la cantidad de tGFP libre, esta disminución se pudo asociar indirectamente con la cantidad de tGFP unida a las AuNPs. Fue notoria la disminución observada para AuNP-cit (91 %), muy similar para los tres sistemas AuNP-cit-SpyCatcher (\approx 57 %) y algo menor para las AuNP-BSA (40 %). Si tGFP se encontró unida a las AuNPs entonces era de esperar su detección en las fracciones donde eluyen las AuNPs, sin embargo, es conocido el efecto de "*quenching*" de las AuNP sobre moléculas próximas a su superficie ³³⁴⁻³³⁷. La efectividad del quenching depende de la distancia a la superficie, si bien esto varía según la molécula de estudio, normalmente el efecto se observa para distancias menores a 15 nm ³³⁸; dado que la proteína SpyCatcher (MM \approx 13 *k*Da) tiene un *d*_h estimado en 4 nm, inclusive si tGFP se anclase a través de esta a la AuNP, el efecto de quenching sería observado. Esto imposibilitó la medición directa de tGFP unido a las nanopartículas, obligándonos a realizar una estimación indirecta mediante sustracción del valor de fluorescencia de la tGFP libre.

Los resultados anteriores no nos permitieron concluir sobre la unión de tGFP vía SpyCatcher, pero la mayor cantidad de tGFP libre (en comparación a AuNP-cit) indicó que para los sistemas AuNP-cit-SpyCatcher los sitios disponibles para la interacción de tGFP fueron menores, sea por estar ocupados por la propia SpyCatcher, o porque la unión se da a través de esta. Esto confirmó que SpyCatcher (en todas sus variantes) no fue desplazada por tGFP. Esta misma conclusión se extrapoló a las AuNP-BSA. Asumiendo, pues, que
ambos tipos de nanopartículas están "bloqueadas" de forma similar (es decir, sin sitios libres a nivel del oro), la presencia de SpyCatcher – en todas sus versiones – parecería favorecer la captura de tGFP, sugiriendo un pegado covalente mediado por la interacción SpyCatcher-SpyTag. La prueba definitiva de esto sería el empleo de proteína GFP no ingenierizada (es decir, sin SpyTag), a la misma concentración.

Discusión

El sistema SpyCatcher-SpyTag es ampliamente usado como estrategia de anclaje de proteínas. Dada su estabilidad mecánica ha sido empleado como medio de unión de proteínas sobre nanopartículas o interfaces aire/agua ¹⁰⁷. En este trabajo pretendimos emplear las ventajas de este sistema, y evaluar si un constructo ingenierizado de SpyCatcher, al que se le añadió una secuencia aminoacídica con una cisteína terminal (en N-terminal) fuera capaz de formar un enlace S-Au y así unir al sistema covalentemente a las AuNP, en un solo paso y sin la necesidad de reactivos adicionales. Teniendo en mente las técnicas mostradas en el Capítulo 1, evaluamos la unión de la proteína sin cisteína (SpyCatcher), y modificada (SpyCatcherCys(M)) que a su vez en el proceso de producción generó una forma dimérica (vía puente disulfuro, SpyCatcherCys(D)). El principal objetivo fue evidenciar la unión diferencial entre estas proteínas, a favor de las versiones modificadas.

Los ensayos de estabilidad coloidal no aportan evidencia al respecto, siendo las tres proteínas capaces de estabilizar a las AuNPs frente al agregado de sal ya a partir de concentraciones *ca*. 100 µg/mL. Llamativamente, como mostraron los espectros UV/VIS para la mínima cantidad de proteína ensayada, las AuNP recubiertas con SpyCatcherCys(D) fueron más estables frente al agregado de sal. Esto podría explicarse con

el hecho de que el potencial- ζ fue mayor para estas AuNPs, lo que sumado al mayor volumen de la molécula de SpyCatcherCys(D) podría dar origen a una estabilización electrostática y estérica. La determinación del cambio en la posición LSPR ($\Delta\lambda$), que se relaciona indirectamente con el grado de recubrimiento de la AuNP¹⁶², muestra que este es mayor para SpyCatcher en comparación a las variantes modificadas con cisteína. Sin embargo, esto no necesariamente se acompañó de una mayor estabilidad durante el proceso de centrifugación. Según los resultados de electroforesis y determinaciones mediante DLS, las AuNP-cit-SpyCatcherCys(M) fueron las menos afectadas. Sin embargo, a nivel espectral la presencia de agregados fue indetectable. Estas mismas AuNPs fueron las que presentaron mayor número e intensidad de señales en las determinaciones SERS. Algunas de ellas como la banda a 270 cm⁻¹ sugieren la posibilidad de un enlace S-Au, o interacciones vía cisteína, por señales de vibraciones relacionadas a los enlaces C-S (entre 400 y 500 cm⁻¹). Estas (con menor intensidad) fueron las únicas señales, que se registraron para el espectro SERS de AuNP-cit-SpyCatcherCys(D). Esto sugirió que, si bien se trata de la misma molécula en ambos casos, SpyCatcherCys(M) tendría la capacidad de interaccionar a través de más grupos con la superficie metálica en comparación con su forma dimérica. Esto es coherente con la mayor estabilidad observada para AuNP-cit-SpyCatcherCys(M) luego de la centrifugación (según DLS). Una posibilidad es que la forma dimérica se acerque a la superficie vía el enlace S-S, pero la presencia cercana de la otra unidad de SpyCatcher impida estéricamente la interacción de otros aminoácidos con la superficie de Au. Además, la cadena de aminoácidos adicionada le otorgaría la posibilidad de quedar anclada, pero a cierta distancia de la superficie, lo que podría explicar el valor de potencial- ζ superior, al quedar los grupos cargados menos apantallados. Si se confirma esta hipótesis derivada de la interpretación de los resultados aquí mostrados (particularmente de los datos de SERS), SpyCatcher(D) permitiría el tipo de orientación que estábamos buscando al diseñar esta proteína: una unión covalente a las AuNP vía su cisteína terminal, y el resto de la proteína separada de la superficie vía un *linker* flexible, facilitando el reconocimiento del SpyTag por la cara opuesta de la proteína. Sin embargo, no se logró obtener evidencia directa, mediante ensayos funcionales, de que las AuNPs modificadas con SpyCatcher(D) sean superiores al resto. Aunque esa posibilidad sigue abierta.

Como una primera aproximación a un ensayo funcional (es decir: midiendo la capacidad de las AuNP-SpyCatcher de reconocer su ligando específico) se utilizó una versión de GFP conteniendo la secuencia SpyTag (tGFP). Los corrimientos en el máximo LSPR ($\Delta\lambda$) así como los cambios observados en la movilidad electroforética sugieren la unión de la proteína tGFP. Sin embargo, estos ensayos no logran discriminar si esta unión se realiza vía las proteínas SpyCatcher o por desplazamiento de las mismas, directamente a la superficie de las AuNPs. El efecto de "quenching" de las AuNPs sobre la fluorescencia de tGFP no permite registrar de forma directa su unión a las AuNP en los ensayos de SEC, aunque puede obtenerse evidencia indirecta de esto a partir del seguimiento de la fluorescencia de tGFP libre en solución. Comparativamente, tGFP se une menos a los sistemas AuNP-SpyCatcher que a las AuNPs no modificadas con proteína (AuNP-cit), lo que confirma que, al menos en parte, las moléculas de SpyCatcher permanecen unidas y no son desplazadas por tGFP. Además, las AuNP-cit-tGFP presentan un tamaño mucho mayor – medido por SEC – que las AuNP-cit-SpyCatcher-tGFP, lo que de nuevo sugiere un tipo de pegado diferente, y no una simple sustitución de ligando. Sin embargo, esto no permite confirmar que la unión sea vía SpyCatcher, y tampoco brinda información sobre diferencias de unión entre las diferentes AuNP-SpyCatcher.

En este punto entonces, no contamos con evidencia suficiente para determinar la efectividad del anclaje covalente del sistema SpyCatcher vía enlace S-Au, ni tampoco de su

capacidad de unión de proteínas con secuencia SpyTag, por lo que nuevos diseños experimentales serán requeridos. La comparación entre AuNPs modificadas con SpyCatcher vs BSA sugiere la posibilidad de un pegado específico, pero esto implica asumir que el efecto de "bloqueo" conferido por ambos tipos de proteínas es el mismo, lo que deberá demostrarse empíricamente.

Entre los diseños que se plantean a futuro, se encuentra la posibilidad de registrar electroquímicamente la reducción del enlace S-Au en medio básico, o realizar análisis mediante espectrometría de masas a partir de AuNPs purificadas por centrifugación o por SEC, y luego del tratamiento de las mismas con proteasas. En estos ensayos se esperaría obtener péptidos diferentes luego del tratamiento con proteasas según SpyCatcherCys se una o no a través de la cisteína adicionada. Pero, sobre todo, podría intentar encontrarse el péptido surgido a partir de la unión covalente entre SpyCatcher y el SpyTag, lo que demostraría fehacientemente el tipo de unión involucrado. Un ensayo mucho más simple, que deberíamos hacer antes, es repetir todos los ensayos funcionales con GFP carente del SpyTag, a los efectos de ver si las diferencias entre las AuNPs modificadas con SpyCatcher y con BSA se mantienen o no.

5. Conclusiones y perspectivas

Se necesita una combinación de técnicas para obtener una interpretación correcta de los fenómenos físicos involucrados en cada paso del proceso de conjugación de moléculas y biomoléculas a AuNPs. Hemos corroborado que algunas técnicas, tal como la estabilidad coloidal, son suficientemente informativas para una prueba concluyente del cumplimiento de los diferentes pasos, mientras que otras pueden ser engañosas si se consideran de forma aislada. Cabe señalar que esto último es usual en la literatura científica. Por el contrario, hemos proporcionado aquí una evaluación crítica de al menos diez técnicas de caracterización diferentes y determinado su utilidad para informar sobre las diferentes etapas del proceso.

Las técnicas como la electroforesis en gel y SEC se utilizan ampliamente en bioquímica y biología molecular y nos aportaron resultados muy concluyentes para todos los pasos principales de bioconjugación. Sin embargo, no se utilizan mucho en los laboratorios de nanomateriales a pesar de ser relativamente rápidos, sencillos y no requerir equipos costosos. Por lo tanto, recomendamos que estas técnicas se incluyan como parte de la caja de herramientas esencial para el control del proceso de bioconjugación. Adicionalmente algunas de ellas permiten incluso arrojar luz sobre mecanismos que podrían estar detrás de la ineficacia de la unión de algunas proteínas.

Con la evaluación de la bioconjugación propuesta en este trabajo, se obtuvo un reactivo de calidad, resultado de la combinación de AuNPs y proteína A/G. La funcionalidad del mismo quedó demostrada en los ensayos de inmunomarcación de EVs por TEM, obteniéndose resultados comparables a otras técnicas de caracterización de EVs como ser ExoView y citometría de flujo. El protocolo de obtención de las AuNP-A/G y su empleo

como reactivo para inmunomarcación por TEM, puede ser desarrollado fuera de laboratorios especializados en nanopartículas inorgánicas o biológicas. Más aún, al tratarse de un reactivo capaz de reconocer anticuerpos, puede ser empleado fuera del campo de las EVs, para detección o marcación de estructuras biológicas por TEM. El protocolo que hemos diseñado, basado en la marcación de nanoestructuras biológicas con anticuerpos (en solución), la purificación de las mismas por SEC, y la posterior realización de un inmunoensayo en grilla de microscopía utilizando AuNP-A/G, puede ser extendido perfectamente, por ejemplo, al campo de la virología.

A pesar de esto, el desarrollo de un sensor colorimétrico para detección de EVs no fue posible. Entre algunas razones argumentamos la incapacidad de las AuNP-A/G de unirse y permanecer lo suficientemente cercanas para generar un acoplamiento de plasmón efectivo. Posibles mejoras al respecto, podrían ser el uso simultáneo de anticuerpos dirigidos contra CD9, CD81 y CD63 de forma de asegurar la saturación de la superficie de EVs con AuNPs. Sin perjuicio de esto, cabe la posibilidad de que para AuNPs de este tamaño (≈ 13 nm) la corona proteica no permita el acoplamiento del plasmón buscado, por lo que ensayos con AuNPs de mayor tamaño serían necesarios.

Unir NPs de mayor tamaño a EVs, podrían ser una herramienta útil para cuantificar EVs mediante MRPS apartándolas (al aumentar su tamaño) del límite de detección de la técnica (≈ 65 nm).

Estrategias novedosas de bioconjugación de proteínas a NPs son necesarias, fundamentalmente si se realizan de forma racional, asegurando una unión fuerte y orientada de la biomolécula. Intentos de esto se realizaron en ensayos con el sistema SpyCatcher-SpyTag, incluyendo una cisteína terminal en la biomolécula. Sin embargo, las técnicas empleadas en este trabajo solo aportaron indicios del anclaje covalente vía cisteínas de esta proteína. Nuevas técnicas de estudio de la interacción proteína-AuNP son necesarias, a nivel computacional y experimental, de forma de dar respuesta a la posibilidad de lograr una unión covalente vía S-Au.

En resumen, este trabajo constituye un importante paso adelante hacia la estandarización de los procedimientos de control "paso-a-paso" para nanomateriales como los conjugados proteína-AuNP. Esperamos que este esfuerzo aumente la reproducibilidad en este campo, ayudando tanto a los productores como a los usuarios finales de ensayos analíticos basados en nanopartículas. También ofrecemos un nuevo protocolo de inmuno-TEM de vesículas extracelulares, muy versátil y fácil de implementar en casi cualquier laboratorio que trabaje en la temática, dado que la técnica de SEC se ha convertido en una de las técnicas más utilizadas para purificar EVs. Por último, generamos avances hacia un sistema de pegado orientado y covalente de proteínas (ingenierizadas con un SpyTag) a AuNPs, mediante el sistema SpyCatcherCys(M/D). Si bien este sistema debe ser caracterizado más exhaustivamente, los resultados preliminares aquí presentados revisten un gran potencial.

6. Bibliografía

- (1) Fedlheim, D. L.; Foss, C. A. Metal Nanoparticles, Synthesis, Characterization, and *Applications*; CRC Press, 2001. https://doi.org/10.1201/9780367800475.
- (2) Mansoori, G. A. *Principles of Nanotechnology;* WORLD SCIENTIFIC, 2005. https://doi.org/10.1142/5749.
- M. C. Roco (IWGN Chair), R. S. W. (private sector), P. A. (academe). Nanotechnology Research Directions: IWGN Workshop Report; Roco, M. C., Williams, R. S., Alivisatos, P., Eds.; Springer Netherlands: Dordrecht, 2000. https://doi.org/10.1007/978-94-015-9576-6.
- (4) Gribbin, J.; M. Gribbin. *Richard Feynman: A Life in Science*, 1°Ed.; Plume, Ed.; New York, 1997.
- (5) Sardar, R.; Funston, A. M.; Mulvaney, P.; Murray, R. W. Gold Nanoparticles: Past, Present, and Future. *Langmuir* 2009, 25 (24), 13840–13851. https://doi.org/10.1021/la9019475.
- (6) Kelly, K. L.; Coronado, E.; Zhao, L. L.; Schatz, G. C. The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment. *J Phys Chem B* 2003, 107 (3), 668–677. https://doi.org/10.1021/jp026731y.
- (7) Botasini, S. Estudio de La Estabilidad de Las Nanopartículas y Desarrollo de Un Sensor Colorimétrico. Tesis de Doctorado en Química, Universidad de la República. , Montevideo, 2016.
- (8) Lismont, M.; Dreesen, L. Comparative Study of Ag and Au Nanoparticles Biosensors Based on Surface Plasmon Resonance Phenomenon. *Materials Science and Engineering* C 2012, 32 (6), 1437–1442. https://doi.org/10.1016/j.msec.2012.04.023.
- (9) Brioude, A.; Pileni, M. P. Silver Nanodisks: Optical Properties Study Using the Discrete Dipole Approximation Method. *J Phys Chem B* 2005, 109 (49), 23371–23377. https://doi.org/10.1021/jp055265k.
- (10) Braslavsky, S. E. Glossary of Terms Used in Photochemistry, 3rd Edition (IUPAC Recommendations 2006). *Pure and Applied Chemistry* 2007, 79 (3), 293–465. https://doi.org/10.1351/pac200779030293.
- (11) Xing, X.; Sun, G.; Li, Z.; Ngai, T. Stabilization of Colloidal Suspensions: Competing Effects of Nanoparticle Halos and Depletion Mechanism. *Langmuir* 2012, 28 (46), 16022–16028. https://doi.org/10.1021/la303547m.
- (12) Ninham, B. W. On Progress in Forces since the DLVO Theory. *Adv Colloid Interface Sci* **1999**, *83* (1–3), 1–17. https://doi.org/10.1016/S0001-8686(99)00008-1.
- (13) McCartney, L. N.; Levine, S. An Improvement on Derjaguin's Expression at Small Potentials for the Double Layer Interaction Energy of Two Spherical Colloidal

Particles. J Colloid Interface Sci 1969, 30 (3), 345–354. https://doi.org/10.1016/0021-9797(69)90401-9.

- (14) Filippov, A. V.; Starov, V. Interaction of Nanoparticles in Electrolyte Solutions. *J Phys Chem B* **2023**, *127* (29), 6562–6572. https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.3c01220.
- (15) Petersen, N.; Girard, M.; Riedinger, A.; Valsson, O. The Crucial Role of Solvation Forces in the Steric Stabilization of Nanoplatelets. *Nano Lett* **2022**, 22 (24), 9847–9853. https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.2c02848.
- (16) Pashley, R. M. DLVO and Hydration Forces between Mica Surfaces in Li+, Na+, K+, and Cs+ Electrolyte Solutions: A Correlation of Double-Layer and Hydration Forces with Surface Cation Exchange Properties. *J Colloid Interface Sci* **1981**, *83* (2), 531–546. https://doi.org/10.1016/0021-9797(81)90348-9.
- (17) Boström, M.; Williams, D. R. M.; Ninham, B. W. Specific Ion Effects: Why DLVO Theory Fails for Biology and Colloid Systems. *Phys Rev Lett* 2001, *87* (16), 168103. https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.87.168103.
- (18) Tadros, T. Steric Stabilization. In *Encyclopedia of Colloid and Interface Science*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2013; pp 1048–1049. https://doi.org/10.1007/978-3-642-20665-8_146.
- (19) Allagui, A.; Benaoum, H.; Olendski, O. On the Gouy–Chapman–Stern Model of the Electrical Double-Layer Structure with a Generalized Boltzmann Factor. *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications* **2021**, 582, 126252. https://doi.org/10.1016/j.physa.2021.126252.
- (20) Helmholtz, H. Ueber Einige Gesetze Der Vertheilung Elektrischer Ströme in Körperlichen Leitern Mit Anwendung Auf Die Thierisch-Elektrischen Versuche. Annalen der Physik und Chemie 1853, 165 (6), 211–233. https://doi.org/10.1002/andp.18531650603.
- (21) Gavrilyuk, A. P.; Isaev, I. L.; Gerasimov, V. S.; Karpov, S. V. Physical Principles of the Formation of a Nanoparticle Electric Double Layer in Metal Hydrosols. *Colloid Polym Sci* **2020**, *298* (1), 1–7. https://doi.org/10.1007/s00396-019-04573-8.
- (22) Hunter RJ. Zeta Potential in Colloid Science; Elsevier, 1981. https://doi.org/10.1016/C2013-0-07389-6.
- (23) Brookhaven Instruments. *What is Zeta Potential?* https://www.brookhaveninstruments.com/particle-characterizationapplications/zeta-potential/ (accessed 2023-10-23).
- (24) Clogston, J. D.; Patri, A. K. Zeta Potential Measurement; 2011; pp 63–70. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-198-1_6.
- (25) Malvern Instruments Worldwide. ZetaPotential-Introduction-in-30min-Malvern. *Technical Note*.

- (26) Samimi, S.; Maghsoudnia, N.; Eftekhari, R. B.; Dorkoosh, F. Lipid-Based Nanoparticles for Drug Delivery Systems. In *Characterization and Biology of Nanomaterials for Drug Delivery*; Elsevier, 2019; pp 47–76. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814031-4.00003-9.
- (27) Lu, G. W.; Gao, P. Emulsions and Microemulsions for Topical and Transdermal Drug Delivery. In *Handbook of Non-Invasive Drug Delivery Systems*; Elsevier, 2010; pp 59–94. https://doi.org/10.1016/B978-0-8155-2025-2.10003-4.
- (28) Shnoudeh, A. J.; Hamad, I.; Abdo, R. W.; Qadumii, L.; Jaber, A. Y.; Surchi, H. S.; Alkelany, S. Z. Synthesis, Characterization, and Applications of Metal Nanoparticles. In *Biomaterials and Bionanotechnology*; Elsevier, 2019; pp 527–612. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814427-5.00015-9.
- (29) Park, S.-J.; Seo, M.-K. Intermolecular Force. In *Interface Science and Technology*; 2011; Vol. 18, pp 1–57. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-375049-5.00001-3.
- (30) Zhang, Y.; Huang, R.; Zhu, X.; Wang, L.; Wu, C. Synthesis, Properties, and Optical Applications of Noble Metal Nanoparticle-Biomolecule Conjugates. *Chinese Science Bulletin* 2012, 57 (2–3), 238–246. https://doi.org/10.1007/s11434-011-4747-x.
- (31) Botasini, S.; Heijo, G.; Méndez, E. Toward Decentralized Analysis of Mercury (II) in Real Samples. A Critical Review on Nanotechnology-Based Methodologies. *Anal Chim Acta* **2013**, *800*, 1–11. https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.07.067.
- (32) Kabalnov, A. S.; Shchukin, E. D. Ostwald Ripening Theory: Applications to Fluorocarbon Emulsion Stability. *Adv Colloid Interface Sci* **1992**, *38*, 69–97. https://doi.org/10.1016/0001-8686(92)80043-W.
- Wilson, R. The Use of Gold Nanoparticles in Diagnostics and Detection. *Chem Soc Rev* 2008, 37 (9), 2028. https://doi.org/10.1039/b712179m.
- (34) Park, J. W.; Shumaker-Parry, J. S. Structural Study of Citrate Layers on Gold Nanoparticles: Role of Intermolecular Interactions in Stabilizing Nanoparticles. *J Am Chem Soc* 2014, 136 (5), 1907–1921. https://doi.org/10.1021/JA4097384/SUPPL_FILE/JA4097384_SI_001.PDF.
- (35) Frens, G. Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Solutions. *Nature Physical Science* **1973**, 241 (1), 20–22.
- (36) Turkevich, J., P.C. Stevenson, and J. H. A Study of the Nucleation and Growth Processes in the Synthesis of Colloidal Gold Discuss. *Faraday Soc* **1951**, *11*, 55–75.
- (37) Shi, L.; Buhler, E.; Boué, F.; Carn, F. How Does the Size of Gold Nanoparticles Depend on Citrate to Gold Ratio in Turkevich Synthesis? Final Answer to a Debated Question. *J Colloid Interface Sci* **2017**, 492, 191–198. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2016.10.065.
- (38) Ji, X.; Song, X.; Li, J.; Bai, Y.; Yang, W.; Peng, X. Size Control of Gold Nanocrystals in Citrate Reduction: The Third Role of Citrate. *J Am Chem Soc* **2007**, *129* (45), 13939–

13948. https://doi.org/10.1021/ja074447k.

- (39) Wuithschick, M.; Birnbaum, A.; Witte, S.; Sztucki, M.; Vainio, U.; Pinna, N.; Rademann, K.; Emmerling, F.; Kraehnert, R.; Polte, J. Turkevich in New Robes: Key Questions Answered for the Most Common Gold Nanoparticle Synthesis. *ACS Nano* 2015, 9 (7), 7052–7071. https://doi.org/10.1021/ACSNANO.5B01579.
- (40) Ojea-Jiménez, I.; Campanera, J. M. Molecular Modeling of the Reduction Mechanism in the Citrate-Mediated Synthesis of Gold Nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry C* 2012, 116 (44), 23682–23691. https://doi.org/10.1021/jp305830p.
- (41) Méndez, E.; Fagúndez, P.; Sosa, P.; Gutiérrez, M. V.; Botasini, S. Experimental Evidences Support the Existence of an Aggregation/Disaggregation Step in the Turkevich Synthesis of Gold Nanoparticles. *Nanotechnology* **2021**, 32 (4). https://doi.org/10.1088/1361-6528/ABBFD5.
- (42) Yao, Q.; Yuan, X.; Fung, V.; Yu, Y.; Leong, D. T.; Jiang, D.; Xie, J. Understanding Seed-Mediated Growth of Gold Nanoclusters at Molecular Level. *Nat Commun* 2017, 8 (1), 927. https://doi.org/10.1038/s41467-017-00970-1.
- (43) Kettemann, F.; Birnbaum, A.; Witte, S.; Wuithschick, M.; Pinna, N.; Kraehnert, R.; Rademann, K.; Polte, J. Missing Piece of the Mechanism of the Turkevich Method: The Critical Role of Citrate Protonation. *Chemistry of Materials* **2016**, *28* (11), 4072– 4081. https://doi.org/10.1021/ACS.CHEMMATER.6B01796.
- (44) Lamer, V. K.; Dinegar, R. H. Theory, Production and Mechanism of Formation of Monodispersed Hydrosols. *J Am Chem Soc* **1950**, *72*, 4847–4854.
- (45) Mer, V. K. La. Nucleation in Phase Transitions. *Ind Eng Chem* **1952**, *44* (6), 1270–1277. https://doi.org/10.1021/ie50510a027.
- (46) Polte, J. Fundamental Growth Principles of Colloidal Metal Nanoparticles a New Perspective. *CrystEngComm* 2015, 17 (36), 6809–6830. https://doi.org/10.1039/C5CE01014D.
- (47) Mikhlin, Y.; Karacharov, A.; Likhatski, M.; Podlipskaya, T.; Zubavichus, Y.; Veligzhanin, A.; Zaikovski, V. Submicrometer Intermediates in the Citrate Synthesis of Gold Nanoparticles: New Insights into the Nucleation and Crystal Growth Mechanisms. *J Colloid Interface Sci* **2011**, 362 (2), 330–336. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2011.06.077.
- (48) Thanh, N. T. K.; Maclean, N.; Mahiddine, S. Mechanisms of Nucleation and Growth of Nanoparticles in Solution. *Chem Rev* 2014, 114 (15), 7610–7630. https://doi.org/10.1021/cr400544s.
- (49) Finney, E. E.; Finke, R. G. Nanocluster Nucleation and Growth Kinetic and Mechanistic Studies: A Review Emphasizing Transition-Metal Nanoclusters. *J Colloid Interface Sci* 2008, 317 (2), 351–374. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2007.05.092.

- (50) Haiss, W.; Thanh, N. T. K.; Aveyard, J.; Fernig, D. G. Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from UV-Vis Spectra. *Anal Chem* 2007, 79 (11), 4215–4221. https://doi.org/10.1021/AC0702084/SUPPL_FILE/AC0702084SI20070321_014144.PDF
- (51) Fagúndez, P.; Botasini, S.; Tosar, J. P.; Méndez, E. Systematic Process Evaluation of the Conjugation of Proteins to Gold Nanoparticles. *Heliyon* 2021, 7 (6). https://doi.org/10.1016/J.HELIYON.2021.E07392.
- (52) Navarro, J. R. G.; Werts, M. H. V. Resonant Light Scattering Spectroscopy of Gold, Silver and Gold–Silver Alloy Nanoparticles and Optical Detection in Microfluidic Channels. *Analyst* 2012, 138 (2), 583–592. https://doi.org/10.1039/C2AN36135C.
- (53) Liu, X.; Atwater, M.; Wang, J.; Huo, Q. Extinction Coefficient of Gold Nanoparticles with Different Sizes and Different Capping Ligands. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2007, 58 (1), 3–7. https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2006.08.005.
- (54) Kimling, J.; Maier, M.; Okenve, B.; Kotaidis, V.; Ballot, H.; Plech, A. Turkevich Method for Gold Nanoparticle Synthesis Revisited. *Journal of Physical Chemistry B* 2006, 110 (32), 15700–15707. https://doi.org/10.1021/JP061667W.
- (55) Yguerabide, J.; Yguerabide, E. E. Light-Scattering Submicroscopic Particles as Highly Fluorescent Analogs and Their Use as Tracer Labels in Clinical and Biological Applications. *Anal Biochem* **1998**, 262 (2), 157–176. https://doi.org/10.1006/abio.1998.2760.
- (56) Ngumbi, P. K.; Mugo, S. W.; Ngaruiya, J. M.; King'ondu, C. K. Multiple Plasmon Resonances in Small-Sized Citrate Reduced Gold Nanoparticles. *Mater Chem Phys* 2019, 233, 263–266. https://doi.org/10.1016/J.MATCHEMPHYS.2019.05.077.
- (57) Khlebtsov, B.; Zharov, V.; Melnikov, A.; Tuchin, V.; Khlebtsov, N. Optical Amplification of Photothermal Therapy with Gold Nanoparticles and Nanoclusters. *Nanotechnology* **2006**, *17* (20), 5167–5179. https://doi.org/10.1088/0957-4484/17/20/022.
- (58) Luis Montaño-Priede, J.; Sanromán-Iglesias, M.; Zabala, N.; Grzelczak, M.; Aizpurua, J. Robust Rules for Optimal Colorimetric Sensing Based on Gold Nanoparticle Aggregation. 2023, 8, 34. https://doi.org/10.1021/acssensors.3c00287.
- (59) Nagarajan, R., H. T. A. *Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Passivation, and Functionalization.*; American Chemical Society., & American Chemical Society: Washington, DC, 2008.
- (60) 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 (1), 293–346. https://doi.org/10.1021/cr030698+.
- (61) Kelesidis, G. A.; Gao, D.; Starsich, F. H. L.; Pratsinis, S. E. Light Extinction by

Agglomerates of Gold Nanoparticles: A Plasmon Ruler for Sub-10 Nm InterparticleDistances.AnalChem2022,94(13),5310–5316.https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c05145.

- (62) Khlebtsov, N. G. Light Absorption by the Clusters of Colloidal Gold and Silver Particles Formed during Slow and Fast Aggregation. *Colloid Journal* 2000, 62 (6), 765– 779. https://doi.org/10.1023/A:1026643111821.
- (63) Varnholt, B.; Oulevey, P.; Luber, S.; Kumara, C.; Dass, A.; Bürgi, T. Structural Information on the Au-S Interface of Thiolate-Protected Gold Clusters: A Raman Spectroscopy Study. *Journal of Physical Chemistry C* 2014, 118 (18), 9604–9611. https://doi.org/10.1021/JP502453Q.
- (64) Gevaerd, A.; Caetano, F. R.; Oliveira, P. R.; Zarbin, A. J. G.; Bergamini, M. F.; Marcolino-Junior, L. H. Thiol-Capped Gold Nanoparticles: Influence of Capping Amount on Electrochemical Behavior and Potential Application as Voltammetric Sensor for Diltiazem. *Sens Actuators B Chem* **2015**, 220, 673–678. https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.06.010.
- (65) Sperling, R. A.; Parak, W. J. Surface Modification, Functionalization and Bioconjugation of Colloidal Inorganic Nanoparticles. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* 2010, 368 (1915), 1333– 1383. https://doi.org/10.1098/rsta.2009.0273.
- (66) Zhang, L.; Mazouzi, Y.; Salmain, M.; Liedberg, B.; Boujday, S. Antibody-Gold Nanoparticle Bioconjugates for Biosensors: Synthesis, Characterization and Selected Applications. *Biosens Bioelectron* 2020, 165. https://doi.org/10.1016/J.BIOS.2020.112370.
- (67) Busch, R. T.; Karim, F.; Weis, J.; Sun, Y.; Zhao, C.; Vasquez, E. S. Optimization and Structural Stability of Gold Nanoparticle–Antibody Bioconjugates. ACS Omega 2019, 4 (12), 15269–15279. https://doi.org/10.1021/acsomega.9b02276.
- (68) Avvakumova, S.; Colombo, M.; Tortora, P.; Prosperi, D. Biotechnological Approaches toward Nanoparticle Biofunctionalization. *Trends Biotechnol* 2014, 32 (1), 11–20. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.09.006.
- (69) Friedman, A.; Claypool, S.; Liu, R. The Smart Targeting of Nanoparticles. *Curr Pharm Des* **2013**, *19* (35), 6315–6329. https://doi.org/10.2174/13816128113199990375.
- (70) Bartczak, D.; Kanaras, A. G. Preparation of Peptide Functionalized Gold Nanoparticles Using One Pot EDC/Sulfo-NHS Coupling. *Langmuir* **2011**, 27 (16), 1–5. https://doi.org/10.1021/la2022177.
- (71) Lomant, A. J.; Fairbanks, G. Chemical Probes of Extended Biological Structures: Synthesis and Properties of the Cleavable Protein Cross-Linking Reagent [355]Dithiobis(Succinimidyl Propionate). J Mol Biol 1976, 104 (1), 243–261.

https://doi.org/10.1016/0022-2836(76)90011-5.

- (72) Grabarek, Z.; Gergely, J. Zero-Length Crosslinking Procedure with the Use of Active Esters. Anal Biochem 1990, 185 (1), 131–135. https://doi.org/10.1016/0003-2697(90)90267-D.
- (73) Staros, J. V.; Wright, R. W.; Swingle, D. M. Enhancement by N-Hydroxysulfosuccinimide of Water-Soluble Carbodiimide-Mediated Coupling Reactions. *Anal Biochem* **1986**, 156 (1), 220–222. https://doi.org/10.1016/0003-2697(86)90176-4.
- (74) Nejati, K.; Dadashpour, M.; Gharibi, T.; Mellatyar, H.; Akbarzadeh, A. Biomedical Applications of Functionalized Gold Nanoparticles: A Review. *J Clust Sci* 2022, 33 (1), 1–16. https://doi.org/10.1007/s10876-020-01955-9.
- (75) Zhao, P.; Li, N.; Astruc, D. State of the Art in Gold Nanoparticle Synthesis. *Coord Chem Rev* **2013**, 257 (3–4), 638–665. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.09.002.
- (76) Perera, G. S.; Athukorale, S. A.; Perez, F.; Pittman, C. U.; Zhang, D. Facile Displacement of Citrate Residues from Gold Nanoparticle Surfaces. *J Colloid Interface Sci* 2018, *511*, 335–343. https://doi.org/10.1016/J.JCIS.2017.10.014.
- (77) Rahimi-Nasrabadi, M.; Ahmadi, F.; Eghbali-Arani, M. Novel Route to Synthesize Nanocrystalline Nickel Titanate in the Presence of Amino Acids as a Capping Agent. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics* 2016, 27 (11), 11873–11878. https://doi.org/10.1007/s10854-016-5331-6.
- (78) Li, W.; Hinton, C. H.; Lee, S. S.; Wu, J.; Fortner, J. D. Surface Engineering Superparamagnetic Nanoparticles for Aqueous Applications: Design and Characterization of Tailored Organic Bilayers. *Environ Sci Nano* 2016, 3 (1), 85–93. https://doi.org/10.1039/C5EN00089K.
- (79) Ji, X.; Song, X.; Li, J.; Bai, Y.; Yang, W.; Peng, X. Size Control of Gold Nanocrystals in Citrate Reduction: The Third Role of Citrate. J Am Chem Soc 2007, 129 (45), 13939– 13948. https://doi.org/10.1021/ja074447k.
- (80) Love, J. C.; Estroff, L. A.; Kriebel, J. K.; Nuzzo, R. G.; Whitesides, G. M. Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology; 2005; Vol. 105. https://doi.org/10.1021/cr0300789.
- (81) Pissinis, D. E.; Linarez Pérez, O. E.; Cometto, F. P.; López Teijelo, M. Preparation and Characterization of Self Assembled Monolayers of 2-Mercaptonicotinic Acid on Au(111). *Journal of Electroanalytical Chemistry* 2014, 712, 167–177. https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2013.11.013.
- (82) Mulvaney, P.; Liz-Marzán, L. M.; Giersig, M.; Ung, T. Silica Encapsulation of Quantum Dots and Metal Clusters. J Mater Chem 2000, 10 (6), 1259–1270. https://doi.org/10.1039/b000136h.

- (83) Santra, S.; Tapec, R.; Theodoropoulou, N.; Dobson, J.; Hebard, A.; Tan, W. Synthesis and Characterization of Silica-Coated Iron Oxide Nanoparticles in Microemulsion: The Effect of Nonionic Surfactants. *Langmuir* 2001, 17 (10), 2900– 2906. https://doi.org/10.1021/la0008636.
- (84) Liu, S.; Han, M.-Y. Silica-Coated Metal Nanoparticles. *Chem Asian J* 2009, NA-NA. https://doi.org/10.1002/asia.200900228.
- (85) Liu, J.-N.; Bu, W.-B.; Shi, J.-L. Silica Coated Upconversion Nanoparticles: A Versatile Platform for the Development of Efficient Theranostics. *Acc Chem Res* 2015, 48 (7), 1797–1805. https://doi.org/10.1021/acs.accounts.5b00078.
- (86) Yi, D. K.; Selvan, S. T.; Lee, S. S.; Papaefthymiou, G. C.; Kundaliya, D.; Ying, J. Y. Silica-Coated Nanocomposites of Magnetic Nanoparticles and Quantum Dots. *J Am Chem Soc* 2005, 127 (14), 4990–4991. https://doi.org/10.1021/ja0428863.
- (87) Paul, D. R.; Robeson, L. M. Polymer Nanotechnology: Nanocomposites. *Polymer* (*Guildf*) **2008**, *49* (15), 3187–3204. https://doi.org/10.1016/j.polymer.2008.04.017.
- (88) Balazs, A. C.; Emrick, T.; Russell, T. P. Nanoparticle Polymer Composites: Where Two Small Worlds Meet. *Science* (1979) **2006**, 314 (5802), 1107–1110. https://doi.org/10.1126/science.1130557.
- (89) Dukes, D.; Li, Y.; Lewis, S.; Benicewicz, B.; Schadler, L.; Kumar, S. K. Conformational Transitions of Spherical Polymer Brushes: Synthesis, Characterization, and Theory. *Macromolecules* 2010, 43 (3), 1564–1570. https://doi.org/10.1021/ma901228t.
- (90) Benoit, D. N.; Zhu, H.; Lilierose, M. H.; Verm, R. A.; Ali, N.; Morrison, A. N.; Fortner, J. D.; Avendano, C.; Colvin, V. L. Measuring the Grafting Density of Nanoparticles in Solution by Analytical Ultracentrifugation and Total Organic Carbon Analysis. *Anal Chem* 2012, *84* (21), 9238–9245. https://doi.org/10.1021/ac301980a.
- (91) Lee, S. S.; Li, W.; Kim, C.; Cho, M.; Catalano, J. G.; Lafferty, B. J.; Decuzzi, P.; Fortner, J. D. Engineered Manganese Oxide Nanocrystals for Enhanced Uranyl Sorption and Separation. *Environ Sci Nano* 2015, 2 (5), 500–508. https://doi.org/10.1039/C5EN00010F.
- (92) Wang, H.; Kim, B.; Wunder, S. L. Nanoparticle-Supported Lipid Bilayers as an In Situ Remediation Strategy for Hydrophobic Organic Contaminants in Soils. *Environ Sci Technol* 2015, 49 (1), 529–536. https://doi.org/10.1021/es504832n.
- (93) Polo, E.; Puertas, S.; Moros, M.; Batalla, P.; Guisán, J. M.; de la Fuente, J. M.; Grazú, V. Tips for the Functionalization of Nanoparticles with Antibodies; 2013; pp 149–163. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-550-7_11.
- (94) Roque, A. C. A.; Bispo, S.; Pinheiro, A. R. N.; Antunes, J. M. A.; Gonçalves, D.; Ferreira, H. A. Antibody Immobilization on Magnetic Particles. *Journal of Molecular Recognition* 2009, 22 (2), 77–82. https://doi.org/10.1002/jmr.913.

- (95) Butler, J. E.; Ni, L.; Nessler, R.; Joshi, K. S.; Suter, M.; Rosenberg, B.; Chang, J.; Brown, W. R.; Cantarero, L. A. The Physical and Functional Behavior of Capture Antibodies Adsorbed on Polystyrene. *J Immunol Methods* 1992, 150 (1–2), 77–90. https://doi.org/10.1016/0022-1759(92)90066-3.
- (96) Torcello-Gómez, A.; Santander-Ortega, M. J.; Peula-García, J. M.; Maldonado-Valderrama, J.; Gálvez-Ruiz, M. J.; Ortega-Vinuesa, J. L.; Martín-Rodríguez, A. Adsorption of Antibody onto Pluronic F68-Covered Nanoparticles: Link with Surface Properties. *Soft Matter* 2011, 7 (18), 8450. https://doi.org/10.1039/c1sm05570d.
- (97) Pei, Z.; Anderson, H.; Myrskog, A.; Dunér, G.; Ingemarsson, B.; Aastrup, T. Optimizing Immobilization on Two-Dimensional Carboxyl Surface: PH Dependence of Antibody Orientation and Antigen Binding Capacity. *Anal Biochem* 2010, 398 (2), 161–168. https://doi.org/10.1016/j.ab.2009.11.038.
- (98) Marangoni, J. M.; Wu, S.-C.; Fogen, D.; Wong, S.-L.; Ng, K. K. S. Engineering a Disulfide-Gated Switch in Streptavidin Enables Reversible Binding without Sacrificing Binding Affinity. *Sci Rep* **2020**, *10* (1), 12483. https://doi.org/10.1038/s41598-020-69357-5.
- (99) González-García, M. B.; Fernández-Sánchez, C.; Costa-García, a. Colloidal Gold as an Electrochemical Label of Streptavidin-Biotin Interaction. *Biosens Bioelectron* 2000, 15 (5–6), 315–321. https://doi.org/10.1016/S0956-5663(00)00074-9.
- (100) Saha, K.; Bender, F.; Gizeli, E. Comparative Study of IgG Binding to Proteins G and A: Nonequilibrium Kinetic and Binding Constant Determination with the Acoustic Waveguide Device. *Anal Chem* 2003, 75 (4), 835–842. https://doi.org/10.1021/ac0204911.
- (101) Ma, W.; Aboagye-Mensah, D.; Soloviev, M.; Davletov, B.; Ferrari, E. Protein Conjugation to Nanoparticles by Designer Affinity Tags. *Mater Today Proc* 2017, 4 (7), 6923–6929. https://doi.org/10.1016/j.matpr.2017.07.021.
- (102) Torres-González, L.; Díaz-Ayala, R.; Vega-Olivencia, C.; López-Garriga, J. Characterization of Recombinant His-Tag Protein Immobilized onto Functionalized Gold Nanoparticles. *Sensors* 2018, *18* (12), 4262. https://doi.org/10.3390/s18124262.
- (103) Abad, J. M.; Mertens, S. F. L.; Pita, M.; Fernández, V. M.; Schiffrin, D. J. Functionalization of Thioctic Acid-Capped Gold Nanoparticles for Specific Immobilization of Histidine-Tagged Proteins. J Am Chem Soc 2005, 127 (15), 5689– 5694. https://doi.org/10.1021/ja042717i.
- (104) Ma, W.; Aboagye-Mensah, D.; Soloviev, M.; Davletov, B.; Ferrari, E. Protein Conjugation to Nanoparticles by Designer Affinity Tags. *Mater Today Proc* 2017, 4 (7), 6923–6929. https://doi.org/10.1016/j.matpr.2017.07.021.
- (105) Ferrari, E.; Darios, F.; Zhang, F.; Niranjan, D.; Bailes, J.; Soloviev, M.; Davletov, B.

Binary Polypeptide System for Permanent and Oriented Protein Immobilization. *J Nanobiotechnology* **2010**, *8* (1), 9. https://doi.org/10.1186/1477-3155-8-9.

- (106) Zakeri, B.; Fierer, J. O.; Celik, E.; Chittock, E. C.; Schwarz-Linek, U.; Moy, V. T.; Howarth, M. Peptide Tag Forming a Rapid Covalent Bond to a Protein, through Engineering a Bacterial Adhesin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2012, 109 (12). https://doi.org/10.1073/pnas.1115485109.
- (107) Keeble, A. H.; Howarth, M. Power to the Protein: Enhancing and Combining Activities Using the Spy Toolbox. *Chem Sci* 2020, 11 (28), 7281–7291. https://doi.org/10.1039/D0SC01878C.
- (108) Veggiani, G.; Nakamura, T.; Brenner, M. D.; Gayet, R. V.; Yan, J.; Robinson, C. V.; Howarth, M. Programmable Polyproteams Built Using Twin Peptide Superglues. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2016**, *113* (5), 1202–1207. https://doi.org/10.1073/pnas.1519214113.
- (109) Ma, W.; Saccardo, A.; Roccatano, D.; Aboagye-Mensah, D.; Alkaseem, M.; Jewkes, M.; Di Nezza, F.; Baron, M.; Soloviev, M.; Ferrari, E. Modular Assembly of Proteins on Nanoparticles. *Nat Commun* 2018, 9 (1), 1489. https://doi.org/10.1038/s41467-018-03931-4.
- (110) Parracino, M. A.; Martín, B.; Grazú, V. State-of-the-Art Strategies for the Biofunctionalization of Photoactive Inorganic Nanoparticles for Nanomedicine. In *Photoactive Inorganic Nanoparticles*; Elsevier, 2019; pp 211–257. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814531-9.00009-9.
- (111) Puertas, S.; Batalla, P.; Moros, M.; Polo, E.; del Pino, P.; Guisán, J. M.; Grazú, V.; de la Fuente, J. M. Taking Advantage of Unspecific Interactions to Produce Highly Active Magnetic Nanoparticle–Antibody Conjugates. ACS Nano 2011, 5 (6), 4521–4528. https://doi.org/10.1021/nn200019s.
- (112) Khoury, L. R.; Kost, J.; Enden, G. Effects of Surface Coating on Nanoparticle-Protein Adsorption Selectivity. *Regen Eng Transl Med* 2018, 4 (2), 62–74. https://doi.org/10.1007/s40883-018-0049-z.
- (113) Torres, R.; Pessela, B. C. C.; Fuentes, M.; Mateo, C.; Munilla, R.; Fernandez-Lafuente, R.; Guisán, J. M. Supports Coated with PEI as a New Tool in Chromatography. *Enzyme Microb Technol* 2006, 39 (4), 711–716. https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.12.006.
- (114) Palomec-Garfias, A. F.; Jardim, K. V.; Sousa, M. H.; Márquez-Beltrán, C. Influence of Polyelectrolyte Chains on Surface Charge and Magnetization of Iron Oxide Nanostructures. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* 2018, 549, 13–24. https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2018.03.070.
- (115) Meerod, S.; Deepuppha, N.; Rutnakornpituk, B.; Rutnakornpituk, M. Reusable

Magnetic Nanocluster Coated with Poly(Acrylic Acid) and Its Adsorption with an Antibody and an Antigen. *J Appl Polym Sci* **2018**, *135* (16), 46160. https://doi.org/10.1002/app.46160.

- (116) Meka, V. S.; Sing, M. K. G.; Pichika, M. R.; Nali, S. R.; Kolapalli, V. R. M.; Kesharwani, P. A Comprehensive Review on Polyelectrolyte Complexes. *Drug Discov Today* 2017, 22 (11), 1697–1706. https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.06.008.
- (117) Wang, G.; Wang, W.; Shangguan, E.; Gao, S.; Liu, Y. Effects of Gold Nanoparticle Morphologies on Interactions with Proteins. *Materials Science and Engineering: C* 2020, 111, 110830. https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110830.
- (118) Vilanova, O.; Mittag, J. J.; Kelly, P. M.; Milani, S.; Dawson, K. A.; R\u00e4dler, J. O.; Franzese, G. Understanding the Kinetics of Protein–Nanoparticle Corona Formation. ACS Nano 2016, 10 (12), 10842–10850. https://doi.org/10.1021/acsnano.6b04858.
- (119) Norde, W.; Lyklema, J. Thermodynamics of Protein Adsorption. Theory with Special Reference to the Adsorption of Human Plasma Albumin and Bovine Pancreas Ribonuclease at Polystyrene Surfaces. J Colloid Interface Sci 1979, 71 (2), 350–366. https://doi.org/10.1016/0021-9797(79)90245-5.
- (120) Andrade, J. D.; Hlady, V. Protein Adsorption and Materials Biocompatibility: A Tutorial Review and Suggested Hypotheses; 1986; pp 1–63. https://doi.org/10.1007/3-540-16422-7_6.
- (121) Mishra, A.; Das, P. K. Thermodynamics of Multilayer Protein Adsorption on a Gold Nanoparticle Surface. *Physical Chemistry Chemical Physics* 2022, 24 (37), 22464–22476. https://doi.org/10.1039/D2CP02439J.
- (122) Rabe, M.; Verdes, D.; Seeger, S. Understanding Protein Adsorption Phenomena at Solid Surfaces. Adv Colloid Interface Sci 2011, 162 (1–2), 87–106. https://doi.org/10.1016/J.CIS.2010.12.007.
- (123) Latour, R. A. Fundamental Principles of the Thermodynamics and Kinetics of Protein Adsorption to Material Surfaces. *Colloids Surf B Biointerfaces* **2020**, 191, 110992. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.110992.
- (124) Anand, G.; Sharma, S.; Dutta, A. K.; Kumar, S. K.; Belfort, G. Conformational Transitions of Adsorbed Proteins on Surfaces of Varying Polarity. *Langmuir* 2010, 26 (13), 10803–10811. https://doi.org/10.1021/la1006132.
- (125) Zhang, L.; Mazouzi, Y.; Salmain, M.; Liedberg, B.; Boujday, S. Antibody-Gold Nanoparticle Bioconjugates for Biosensors: Synthesis, Characterization and Selected Applications. *Biosens Bioelectron* 2020, 165, 112370. https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112370.
- (126) Calonder, C.; Van Tassel, P. R. Kinetic Regimes of Protein Adsorption. *Langmuir* **2001**, 17 (14), 4392–4395. https://doi.org/10.1021/la001734s.

- (127) Su, T. J.; Lu; Thomas, R. K.; Cui, Z. F.; Penfold, J. The Conformational Structure of Bovine Serum Albumin Layers Adsorbed at the Silica–Water Interface. *J Phys Chem B* 1998, 102 (41), 8100–8108. https://doi.org/10.1021/jp981239t.
- (128) Ramsden, J. J. Puzzles and Paradoxes in Protein Adsorption. *Chem Soc Rev* **1995**, 24 (1), 73. https://doi.org/10.1039/cs9952400073.
- (129) Elofsson, U. M.; Paulsson, M. A.; Arnebrant, T. Adsorption of β-Lactoglobulin A and B in Relation to Self-Association: Effect of Concentration and PH. *Langmuir* 1997, *13* (6), 1695–1700. https://doi.org/10.1021/la9601061.
- (130) Minton, A. P. Effects of Excluded Surface Area and Adsorbate Clustering on Surface Adsorption of Proteins. II. Kinetic Models. *Biophys J* **2001**, *80* (4), 1641–1648. https://doi.org/10.1016/S0006-3495(01)76136-X.
- (131) Chatelier, R. C.; Minton, A. P. Adsorption of Globular Proteins on Locally Planar Surfaces: Models for the Effect of Excluded Surface Area and Aggregation of Adsorbed Protein on Adsorption Equilibria. *Biophys J* 1996, 71 (5), 2367–2374. https://doi.org/10.1016/S0006-3495(96)79430-4.
- (132) Kurrat, R.; Ramsden, J. J.; Prenosil, J. E. Kinetic Model for Serum Albumin Adsorption: Experimental Verification. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions* **1994**, 90 (4), 587. https://doi.org/10.1039/ft9949000587.
- (133) Wertz, C. F.; Santore, M. M. Adsorption and Reorientation Kinetics of Lysozyme on Hydrophobic Surfaces. *Langmuir* 2002, 18 (4), 1190–1199. https://doi.org/10.1021/la0108813.
- (134) Wang, A.; Vangala, K.; Vo, T.; Zhang, D.; Fitzkee, N. C. A Three-Step Model for Protein-Gold Nanoparticle Adsorption. *Journal of Physical Chemistry C* 2014, 118 (15), 8134–8142. https://doi.org/10.1021/JP411543Y/SUPPL_FILE/JP411543Y_SI_001.PDF.
- (135) Kapelski, S.; Cleiren, E.; Attar, R. M.; Philippar, U.; Häsler, J.; Chiu, M. L. Influence of the Bispecific Antibody IgG Subclass on T Cell Redirection. *MAbs* 2019, 11 (6), 1012–1024. https://doi.org/10.1080/19420862.2019.1624464.
- (136) Sperling, R. A.; Parak, W. J. Surface Modification, Functionalization and Bioconjugation of Colloidal Inorganic Nanoparticles. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* **2010**, *368* (1915), 1333– 1383. https://doi.org/10.1098/rsta.2009.0273.
- (137) Piella, J.; Bastús, N. G.; Puntes, V. Size-Dependent Protein–Nanoparticle Interactions in Citrate-Stabilized Gold Nanoparticles: The Emergence of the Protein Corona. *Bioconjug Chem* 2017, 28 (1), 88–97. https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00575.
- (138) Canpolat, C.; Tatlisoz, M. M. Size-Dependent Protein Adsorption on a Nanoparticle. *IEEE Trans Nanobioscience* **2023**, 22 (3), 597–602. https://doi.org/10.1109/TNB.2022.3219926.

- (139) Khan, S.; Gupta, A.; Verma, N. C.; Nandi, C. K. Kinetics of Protein Adsorption on Gold Nanoparticle with Variable Protein Structure and Nanoparticle Size. *J Chem Phys* 2015, 143 (16). https://doi.org/10.1063/1.4934605.
- (140) Fei, L.; Perrett, S. Effect of Nanoparticles on Protein Folding and Fibrillogenesis. *Int J Mol Sci* **2009**, *10* (2), 646–655. https://doi.org/10.3390/ijms10020646.
- (141) Lacerda, S. H. D. P.; Park, J. J.; Meuse, C.; Pristinski, D.; Becker, M. L.; Karim, A.; Douglas, J. F. Interaction of Gold Nanoparticles with Common Human Blood Proteins. ACS Nano 2010, 4 (1), 365–379. https://doi.org/10.1021/nn9011187.
- (142) Tapia-Arellano, A.; Gallardo-Toledo, E.; Celis, F.; Rivera, R.; Moglia, I.; Campos, M.; Carulla, N.; Baez, M.; Kogan, M. J. The Curvature of Gold Nanoparticles Influences the Exposure of Amyloid-β and Modulates Its Aggregation Process. *Materials Science and Engineering:* C 2021, *128*, 112269. https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112269.
- (143) Gonzalez Solveyra, E.; Szleifer, I. What Is the Role of Curvature on the Properties of Nanomaterials for Biomedical Applications? WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology 2016, 8 (3), 334–354. https://doi.org/10.1002/wnan.1365.
- (144) Lundqvist, M.; Sethson, I.; Jonsson, B.-H. Protein Adsorption onto Silica Nanoparticles: Conformational Changes Depend on the Particles' Curvature and the Protein Stability. *Langmuir* 2004, 20 (24), 10639–10647. https://doi.org/10.1021/la0484725.
- (145) Langmuir, I. VAPOR PRESSURES, EVAPORATION, CONDENSATION AND ADSORPTION. J Am Chem Soc 1932, 54 (7), 2798–2832. https://doi.org/10.1021/ja01346a022.
- (146) Latour, R. A. The Langmuir Isotherm: A Commonly Applied but Misleading Approach for the Analysis of Protein Adsorption Behavior. *J Biomed Mater Res A* 2015, 103 (3), 949–958. https://doi.org/10.1002/JBM.A.35235.
- (147) Shao, Q.; Hall, C. K. Protein Adsorption on Nanoparticles: Model Development Using Computer Simulation. *Journal of Physics: Condensed Matter* 2016, 28 (41), 414019. https://doi.org/10.1088/0953-8984/28/41/414019.
- (148) McGuire, J.; Krisdhasima, V.; Wahlgren, M. C.; Arnebrant, T. Comparative Adsorption Studies with Synthetic, Structural Stability and Charge Mutants of Bacteriophage T4 Lysozyme; 1995; pp 52–65. https://doi.org/10.1021/bk-1995-0602.ch004.
- (149) McGuire, J.; Wahlgren, M. C.; Arnebrant, T. Structural Stability Effects on the Adsorption and Dodecyltrimethylammonium Bromide-Mediated Elutability of Bacteriophage T4 Lysozyme at Silica Surfaces. *J Colloid Interface Sci* 1995, 170 (1), 182– 192. https://doi.org/10.1006/jcis.1995.1087.
- (150) Rabe, M.; Verdes, D.; Rankl, M.; Artus, G. R. J.; Seeger, S. A Comprehensive Study of

Concepts and Phenomena of the Nonspecific Adsorption of β-Lactoglobulin. *ChemPhysChem* **2007**, *8* (6), 862–872. https://doi.org/10.1002/cphc.200600710.

- (151) John Wiley & Sons, Inc. *Nanoscale Materials in Chemistry*; Klabunde, K. J., Ed.; Wiley, 2001. https://doi.org/10.1002/0471220620.
- (152) Fultz, B.; Howe, J. Transmission Electron Microscopy and Diffractometry of Materials; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2013. https://doi.org/10.1007/978-3-642-29761-8.
- (153) Gerardo Vázquez Nin y Olga Echeverría. *Introducción a La Microscopía Electrónica Aplicada a Las Ciencias Biológicas*; Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de Mexico, Fondo cultura Económica, Eds.; 2002; Vol. 1.
- (154) Iqbal, M.; Usanase, G.; Oulmi, K.; Aberkane, F.; Bendaikha, T.; Fessi, H.; Zine, N.; Agusti, G.; Errachid, E.-S.; Elaissari, A. Preparation of Gold Nanoparticles and Determination of Their Particles Size via Different Methods. *Mater Res Bull* 2016, 79, 97–104. https://doi.org/10.1016/j.materresbull.2015.12.026.
- (155) Azubel, M.; Koivisto, J.; Malola, S.; Bushnell, D.; Hura, G. L.; Koh, A. L.; Tsunoyama, H.; Tsukuda, T.; Pettersson, M.; Häkkinen, H.; Kornberg, R. D. Electron Microscopy of Gold Nanoparticles at Atomic Resolution. *Science* (1979) **2014**, 345 (6199), 909–912. https://doi.org/10.1126/science.1251959.
- (156) Calderón, H. A. Microscopía Electrónica de Transmisión Para Observar Átomos: Principios y Desarrollo. *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria en Nanociencias y Nanotecnología* 2020, 13 (25), 133–156. https://doi.org/10.22201/ceiich.24485691e.2020.25.69649.
- (157) Angeles-Chavez, C. HRTEM Study of Crystal Defects in Gold Nanoparticles. *MRS Adv* **2021**, *6* (34–35), 834–838. https://doi.org/10.1557/s43580-021-00172-4.
- (158) Amendola, V. A General Technique to Investigate the Aggregation of Nanoparticles by Transmission Electron Microscopy. J Nanosci Nanotechnol 2015, 15 (5), 3545–3551. https://doi.org/10.1166/jnn.2015.9836.
- (159) Mie, G. Beiträge Zur Optik Trüber Medien, Speziell Kolloidaler Metallösungen. *Ann Phys* **1908**, *330* (3), 377–445. https://doi.org/10.1002/andp.19083300302.
- (160) Kumbhar, A. S.; Kinnan, M. K.; Chumanov, G. Multipole Plasmon Resonances of Submicron Silver Particles. J Am Chem Soc 2005, 127 (36), 12444–12445. https://doi.org/10.1021/ja053242d.
- (161) Ghosh, S. K.; Nath, S.; Kundu, S.; Esumi, K.; Pal, T. Solvent and Ligand Effects on the Localized Surface Plasmon Resonance (LSPR) of Gold Colloids. *J Phys Chem B* 2004, 108 (37), 13963–13971. https://doi.org/10.1021/jp047021q.
- (162) Xu, J. X.; Alom, M. S.; Yadav, R.; Fitzkee, N. C. Predicting Protein Function and Orientation on a Gold Nanoparticle Surface Using a Residue-Based Affinity Scale.

Nature Communications 2022 13:1 **2022**, 13 (1), 1–11. https://doi.org/10.1038/s41467-022-34749-w.

- (163) Desai, R.; Mankad, V.; Gupta, SanjeevK.; Jha, PrafullaK. Size Distribution of Silver Nanoparticles: UV-Visible Spectroscopic Assessment. *Nanoscience and Nanotechnology Letters* 2012, 4 (1), 30–34. https://doi.org/10.1166/nnl.2012.1278.
- (164) Øgendal, L. H. *Light Scattering Demystified: Theory and Practice;* University of Copenhagen ed., Ed.; University of Copenhagen ed., 2017.
- (165) Øgendal, L. H. *Light Scattering: A Brief Introduction.*, 1st ed.; University of Copenhagen, Ed.; University of Copenhagen: Copenhagen, 2016; Vol. 1.
- (166) Weiss, J. N. Dynamic Light Scattering (DLS) Spectroscopy. In *Dynamic Light Scattering Spectroscopy of the Human Eye;* Springer International Publishing: Cham, 2022; pp 13–17. https://doi.org/10.1007/978-3-031-06624-5_3.
- (167) Einstein. A. Investigations on the Theory of the Brownian Movement. *Dover Publications* **1956**.
- (168) Provencher, S. W.; Štêpánek, P. Global Analysis of Dynamic Light Scattering Autocorrelation Functions. *Particle & Particle Systems Characterization* **1996**, *13* (5), 291–294. https://doi.org/10.1002/ppsc.19960130507.
- (169) ISO. Particle Size Analysis-Dynamic Light Scattering (DLS) (ISO 22412:2017E); 2017.
- (170) Brookhaven. Zetasizer Nano Series. User Manual.; 2004.
- (171) Ohshima, H. Zeta Potential. In *Encyclopedia of Colloid and Interface Science*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2013; pp 1423–1436. https://doi.org/10.1007/978-3-642-20665-8_162.
- (172) Pfeiffer, C.; Rehbock, C.; Hühn, D.; Carrillo-Carrion, C.; De Aberasturi, D. J.; Merk, V.; Barcikowski, S.; Parak, W. J. Interaction of Colloidal Nanoparticles with Their Local Environment: The (Ionic) Nanoenvironment around Nanoparticles Is Different from Bulk and Determines the Physico-Chemical Properties of the Nanoparticles. Journal of the Royal Society Interface. Royal Society July 6, 2014. https://doi.org/10.1098/rsif.2013.0931.
- (173) Greg Hermanson. Method: Conjugation of Proteins to Gold Nanoparticles. In Nanomaterial Bioconjugation Techniques: The Future of Bioimaging; Greg T. Hermanson, Ed.; Sigma-Aldrich: U.S, 2017; Vol. 1, pp 26–30.
- (174) Stuart, B. H. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*, 1st ed.; David J. Ando, Ed.; John Wiley & Sons, Ltd: online, 2004. https://doi.org/10.1002/0470011149.
- (175) Peak, D. Fourier Transform Infrared Spectroscopy. In *Encyclopedia of Soils in the Environment*; Elsevier, 2005; pp 80–85. https://doi.org/10.1016/B0-12-348530-4/00174-0.
- (176) Wulandari, P.; Nagahiro, T.; Michioka, K.; Tamada, K.; Ishibashi, K. ichi; Kimura, Y.;

Niwano, M. Coordination of Carboxylate on Metal Nanoparticles Characterized by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Chem Lett* **2008**, *37* (8), 888–889. https://doi.org/10.1246/CL.2008.888.

- (177) Wulandari, P.; Nagahiro, T.; Fukada, N.; Kimura, Y.; Niwano, M.; Tamada, K. Characterization of Citrates on Gold and Silver Nanoparticles. *J Colloid Interface Sci* 2015, 438, 244–248. https://doi.org/10.1016/J.JCIS.2014.09.078.
- (178) Vericat, C.; Vela, M. E.; Benitez, G.; Carro, P.; Salvarezza, R. C. Self-Assembled Monolayers of Thiols and Dithiols on Gold: New Challenges for a Well-Known System. *Chem Soc Rev* 2010, 39 (5), 1805–1834. https://doi.org/10.1039/B907301A.
- (179) J, H. M.; J, S. J.; W, M. R. Infrared Spectroscopy of Three-Dimensional Self-Assembled Monolayers: N-Alkanethiolate Monolayers on Gold Cluster Compounds. *Langmuir* 1996, 12 (15), 3604–3612.
- (180) Sandhyarani, N.; Pradeep, T. Current Understanding of the Structure, Phase Transitions and Dynamics of Self-Assembled Monolayers on Two- and Three-Dimensional Surfaces. *Int Rev Phys Chem* **2010**, *22* (2), 221–262. https://doi.org/10.1080/0144235031000069705.
- (181) Matei, I.; Buta, C. M.; Turcu, I. M.; Culita, D.; Munteanu, C.; Ionita, G. Formation and Stabilization of Gold Nanoparticles in Bovine Serum Albumin Solution. *Molecules* 2019, 24 (18), 3395. https://doi.org/10.3390/MOLECULES24183395.
- (182) Wojnarowska-Nowak, R.; Polit, J.; Sheregii, E. M. Interaction of Gold Nanoparticles with Cholesterol Oxidase Enzyme in Bionanocomplex—Determination of the Protein Structure by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Journal of Nanoparticle Research* 2020, 22 (5), 107. https://doi.org/10.1007/s11051-020-04858-y.
- (183) Kahraman, M.; Mullen, E. R.; Korkmaz, A.; Wachsmann-Hogiu, S. Fundamentals and Applications of SERS-Based Bioanalytical Sensing. *Nanophotonics* 2017, 6 (5), 831–852. https://doi.org/10.1515/nanoph-2016-0174.
- (184) Zachary D. Schultz. SERS and TERS. https://www.spectroscopyonline.com/view/sers-and-ters.
- (185) Tian, F.; Bonnier, F.; Casey, A.; Shanahan, A. E.; Byrne, H. J. Surface Enhanced Raman Scattering with Gold Nanoparticles: Effect of Particle Shape. *Anal. Methods* 2014, 6 (22), 9116–9123. https://doi.org/10.1039/C4AY02112F.
- (186) Ding, S.-Y.; You, E.-M.; Tian, Z.-Q.; Moskovits, M. Electromagnetic Theories of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Chem Soc Rev* 2017, 46 (13), 4042–4076. https://doi.org/10.1039/C7CS00238F.
- (187) Kurouski, D.; Postiglione, T.; Deckert-Gaudig, T.; Deckert, V.; Lednev, I. K. Amide I Vibrational Mode Suppression in Surface (SERS) and Tip (TERS) Enhanced Raman Spectra of Protein Specimens. *Analyst* 2013, 138 (6), 1665–1673.

https://doi.org/10.1039/b000000x/NIH.

- (188) Martín-Yerga, D. Electrochemical Detection and Characterization of Nanoparticles with Printed Devices. *Biosensors* (*Basel*) **2019**, *9* (2), 47. https://doi.org/10.3390/bios9020047.
- (189) Elgrishi, N.; Rountree, K. J.; McCarthy, B. D.; Rountree, E. S.; Eisenhart, T. T.; Dempsey, J. L. A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry. *J Chem Educ* 2018, 95 (2), 197–206. https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.7b00361.
- (190) José Manuel Pingarrón Carrazón, P. S. B. *Química Electroanalítica Fundamentos y Aplicaciones*; Síntesis, Ed.; España, 1999.
- (191) Bard, A. J. and F. L. R. *Electrochemical Methods, Fundamentals and Applications.;* John Wiley and Sons, Ed.; New York, 1980.
- (192) Lavagnini, I.; Antiochia, R.; Magno, F. An Extended Method for the Practical Evaluation of the Standard Rate Constant from Cyclic Voltammetric Data. *Electroanalysis* 2004, 16 (6), 505–506. https://doi.org/10.1002/elan.200302851.
- (193) David L. Nelson. *Lehninger. Principios de Bioquímica Ed.7*°, 7° Edición.; OMEGA, Ed.; 2019.
- (194) Robertson, J. D.; Rizzello, L.; Avila-Olias, M.; Gaitzsch, J.; Contini, C.; Magoń, M. S.; Renshaw, S. A.; Battaglia, G. Purification of Nanoparticles by Size and Shape. *Sci Rep* 2016, 6 (1), 27494. https://doi.org/10.1038/srep27494.
- (195) Süß, S.; Metzger, C.; Damm, C.; Segets, D.; Peukert, W. Quantitative Evaluation of Nanoparticle Classification by Size-Exclusion Chromatography. *Powder Technol* 2018, 339, 264–272. https://doi.org/10.1016/j.powtec.2018.08.008.
- (196) Pitkänen, L.; Striegel, A. M. Size-Exclusion Chromatography of Metal Nanoparticles and Quantum Dots. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2016, 80, 311–320. https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.06.013.
- (197) Pirok, B. W. J.; Abdulhussain, N.; Aalbers, T.; Wouters, B.; Peters, R. A. H.; Schoenmakers, P. J. Nanoparticle Analysis by Online Comprehensive Two-Dimensional Liquid Chromatography Combining Hydrodynamic Chromatography and Size-Exclusion Chromatography with Intermediate Sample Transformation. *Anal Chem* 2017, 89 (17), 9167–9174. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b01906.
- (198) López-Lorente, A. I.; Simonet, B. M.; Valcárcel, M. Electrophoretic Methods for the Analysis of Nanoparticles. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2011, 30 (1), 58–71. https://doi.org/10.1016/j.trac.2010.10.006.
- (199) Surugau, N.; Urban, P. L. Electrophoretic Methods for Separation of Nanoparticles. J Sep Sci 2009, 32 (11), 1889–1906. https://doi.org/10.1002/jssc.200900071.
- (200) Page Faulk, W.; Malcolm Taylor, G. An Immunocolloid Method for the Electron Microscope. *Immunochemistry* **1971**, *8* (11), 1081–1083. https://doi.org/10.1016/0019-

2791(71)90496-4.

- (201) Horisberger, M.; Rosset, J.; Bauer, H. Colloidal Gold Granules as Markers for Cell Surface Receptors in the Scanning Electron Microscope. *Experientia* 1975, 31 (10), 1147–1149. https://doi.org/10.1007/BF02326761.
- (202) Horisberger, M. Colloidal Gold and Its Application in Cell Biology; 1992; pp 227–287. https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)62054-9.
- (203) Lin, N.-S.; Langenberg, W. G. Immunohistochemical Localization of Barley Stripe Mosaic Virions in Infected Wheat Cells. J Ultrastruct Res 1983, 84 (1), 16–23. https://doi.org/10.1016/S0022-5320(83)90082-5.
- (204) Pope, I.; Tanner, H.; Masia, F.; Payne, L.; Arkill, K. P.; Mantell, J.; Langbein, W.; Borri, P.; Verkade, P. Correlative Light-Electron Microscopy Using Small Gold Nanoparticles as Single Probes. *Light Sci Appl* 2023, 12 (1), 80. https://doi.org/10.1038/s41377-023-01115-4.
- (205) Khlebtsov, B. N.; Tumskiy, R. S.; Burov, A. M.; Pylaev, T. E.; Khlebtsov, N. G. Quantifying the Numbers of Gold Nanoparticles in the Test Zone of Lateral Flow Immunoassay Strips. ACS Appl Nano Mater 2019, 2 (8), 5020–5028. https://doi.org/10.1021/acsanm.9b00956.
- (206) Mirica, A.-C.; Stan, D.; Chelcea, I.-C.; Mihailescu, C. M.; Ofiteru, A.; Bocancia-Mateescu, L.-A. Latest Trends in Lateral Flow Immunoassay (LFIA) Detection Labels and Conjugation Process. *Front Bioeng Biotechnol* 2022, 10. https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.922772.
- (207) Spicuzza, L.; Campagna, D.; Di Maria, C.; Sciacca, E.; Mancuso, S.; Vancheri, C.; Sambataro, G. An Update on Lateral Flow Immunoassay for the Rapid Detection of SARS-CoV-2 Antibodies. *AIMS Microbiol* **2023**, *9* (2), 375–401. https://doi.org/10.3934/microbiol.2023020.
- (208) Koczula, K. M.; Gallotta, A. Lateral Flow Assays. *Essays Biochem* **2016**, *60* (1), 111–120. https://doi.org/10.1042/EBC20150012.
- (209) Leuvering, J. H. W.; Thal, P. J. H. M.; Waart, M. van der; Schuurs, A. H. W. M. Sol Particle Immunoassay (SPIA). *J Immunoassay* **1980**, *1* (1), 77–91. https://doi.org/10.1080/01971528008055777.
- (210) Leuvering, J. H. W.; Goverde, B. C.; Thal, P. J. H. M.; Schuurs, A. H. W. M. A Homogeneous Sol Particle Immunoassay for Human Chorionic Gonadotrophin Using Monoclonal Antibodies. *J Immunol Methods* **1983**, 60 (1–2), 9–23. https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90330-7.
- (211) Dykman, L. A.; Khlebtsov, N. G. Gold Nanoparticles in Biology and Medicine: Recent Advances and Prospects. *Acta Naturae* **2011**, *3* (2), 34–55.
- (212) Liu, Y.; Zhang, L.; Wei, W.; Zhao, H.; Zhou, Z.; Zhang, Y.; Liu, S. Colorimetric

Detection of Influenza A Virus Using Antibody-Functionalized Gold Nanoparticles. *Analyst* **2015**, *140* (12), 3989–3995. https://doi.org/10.1039/C5AN00407A.

- (213) Mirkin, C. A.; Letsinger, R. L.; Mucic, R. C.; Storhoff, J. J. A DNA-Based Method for Rationally Assembling Nanoparticles into Macroscopic Materials. *Nature* 1996, 382 (6592), 607–609. https://doi.org/10.1038/382607a0.
- (214) Storhoff, J. J.; Lucas, A. D.; Garimella, V.; Bao, Y. P.; Müller, U. R. Homogeneous Detection of Unamplified Genomic DNA Sequences Based on Colorimetric Scatter of Gold Nanoparticle Probes. *Nat Biotechnol* 2004, 22 (7), 883–887. https://doi.org/10.1038/nbt977.
- (215) Storhoff, J. J.; Marla, S. S.; Bao, P.; Hagenow, S.; Mehta, H.; Lucas, A.; Garimella, V.; Patno, T.; Buckingham, W.; Cork, W.; Müller, U. R. Gold Nanoparticle-Based Detection of Genomic DNA Targets on Microarrays Using a Novel Optical Detection System. *Biosens Bioelectron* 2004, 19 (8), 875–883. https://doi.org/10.1016/j.bios.2003.08.014.
- (216) Baptista, P. V; Koziol-Montewka, M.; Paluch-Oles, J.; Doria, G.; Franco, R. Gold-Nanoparticle-Probe–Based Assay for Rapid and Direct Detection of Mycobacterium Tuberculosis DNA in Clinical Samples. *Clin Chem* 2006, 52 (7), 1433–1434. https://doi.org/10.1373/clinchem.2005.065391.
- (217) Moitra, P.; Alafeef, M.; Alafeef, M.; Alafeef, M.; Dighe, K.; Frieman, M. B.; Pan, D.; Pan, D. Selective Naked-Eye Detection of SARS-CoV-2 Mediated by N Gene Targeted Antisense Oligonucleotide Capped Plasmonic Nanoparticles. *ACS Nano* 2020, 14 (6), 7617–7627. https://doi.org/10.1021/ACSNANO.0C03822/ASSET/IMAGES/LARGE/NN0C03822_0007.JPEG.
- (218) Shawky, S. M.; Bald, D.; Azzazy, H. M. E. Direct Detection of Unamplified Hepatitis C Virus RNA Using Unmodified Gold Nanoparticles. *Clin Biochem* 2010, 43 (13–14), 1163–1168. https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2010.07.001.
- (219) Ma, X.; Kou, X.; Xu, Y.; Yang, D.; Miao, P. Colorimetric Sensing Strategy for Heparin Assay Based on PDDA-Induced Aggregation of Gold Nanoparticles. *Nanoscale Adv* 2019, 1 (2), 486–489. https://doi.org/10.1039/C8NA00162F.
- (220) Alenichev, M. K.; Levin, A. D.; Yushina, A. A.; Kostrikina, Eu. S.; Lebedin, Yu. S.; Andreeva, I. P.; Grigorenko, V. G.; Krylov, V. B.; Nifantiev, N. E. Nano-Biosensor Based on the Combined Use of the Dynamic and Static Light Scattering for Aspergillus Galactomannan Analysis. *Sens Biosensing Res* 2022, 35, 100475. https://doi.org/10.1016/j.sbsr.2022.100475.
- (221) Jiang, P.; Wang, Y.; Zhao, L.; Ji, C.; Chen, D.; Nie, L. Applications of Gold Nanoparticles in Non-Optical Biosensors. *Nanomaterials* **2018**, *8* (12), 977.

https://doi.org/10.3390/nano8120977.

- (222) Lin, C.-C.; Yang, Y.-M.; Chen, Y.-F.; Yang, T.-S.; Chang, H.-C. A New Protein A Assay Based on Raman Reporter Labeled Immunogold Nanoparticles. *Biosens Bioelectron* 2008, 24 (2), 178–183. https://doi.org/10.1016/j.bios.2008.03.035.
- (223) Špringer, T.; Ermini, M. L.; Špačková, B.; Jabloňků, J.; Homola, J. Enhancing Sensitivity of Surface Plasmon Resonance Biosensors by Functionalized Gold Nanoparticles: Size Matters. *Anal Chem* **2014**, *86* (20), 10350–10356. https://doi.org/10.1021/ac502637u.
- (224) Peng, G.; Tisch, U.; Adams, O.; Hakim, M.; Shehada, N.; Broza, Y. Y.; Billan, S.; Abdah-Bortnyak, R.; Kuten, A.; Haick, H. Diagnosing Lung Cancer in Exhaled Breath Using Gold Nanoparticles. *Nat Nanotechnol* **2009**, *4* (10), 669–673. https://doi.org/10.1038/nnano.2009.235.
- (225) Al-Nedawi, K., B. M. Intercellular Transfer of the Oncogenic Receptor EGFRvIII by Microvesiclesderived from Tumour Cells. *Nat Cell Biol* **2008**, *10* (5), 658–667.
- (226) Thery, C., M. O. Membrane Vesicles as Conveyors of Immune Responses. *Nat Rev Immunol* **2009**, *9* (8), 581–593.
- (227) Heijnen, H. F., A. E. S. Activated Platelets Release Two Types of Membrane Vesicles: Microvesicles by Surface Shedding and Exosomes Derived from Exocytosis of Multivesicular Bodies and Alpha-Granules. *Blood* **1999**, 943791–379 (11), 43791–43799.
- (228) Mittelbrunn, M. and F. S. Intercellular Communication: Diverse Structures for Exchange of Genetic Information. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2012**, *13* (5), 328–335.
- (229) Oksvold, M. P.; Kullmann, A.; Forfang, L.; Kierulf, B.; Li, M.; Brech, A.; Vlassov, A. V; Smeland, E. B.; Neurauter, A.; Pedersen, K. W. Expression of B-Cell Surface Antigens in Subpopulations of Exosomes Released from B-Cell Lymphoma Cells. *Clin Ther* 2014, 36 (6), 847-862.e1. https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2014.05.010.
- (230) Huber, V., S. Fais. Human Colorectal Cancer Cells Induce T-Cell Death through Release of Proapoptotic Microvesicles: Role in Immune Es-Cape. *Gastroenterology* 2005, 128 (7), 1796–1804.
- (231) Ciravolo, V., V. H. Potential Role of HER2-Overexpressing Exosomes in Countering Trastuzumab-Based Therapy. *J Cell Physiol* **2012**, 27 (2), 658–667.
- (232) Yang, C. and P. D. R. The Roles of Tumor-Derived Exosomes in Cancer Pathogenesis. *Clin Dev Immunol* **2011**, 2011 (842849), 1–11.
- (233) Luga, V., L. Z. Exosomes Mediate Stromal Mobilization of Autocrine Wnt-PCP Signaling in Breast Cancer Cell Migration. *Cell* **2012**, *151* (7), 1542–1556.
- (234) Valadi, H.; Ekstrom, K.; Bossios, A.; Sjostrand, M.; Lee, J. J.; Lotvall, J. O. Exosome-Mediated Transfer of MRNAs and MicroRNAs Is a Novel Mechanism of Genetic Exchange between Cells. *Nat Cell Biol* 2007, 9 (6), 654–659.

- (235) Filipowicz, W.; Bhattacharyya, S. N.; Sonenberg, N. Mechanisms of Post-Transcriptional Regulation by MicroRNAs: Are the Answers in Sight? *Nat Rev Genet* 2008, 9 (2), 102–114.
- (236) Muller, L.; Hong, C.-S.; Stolz, D. B.; Watkins, S. C.; Whiteside, T. L. Isolation of Biologically-Active Exosomes from Human Plasma. *J Immunol Methods* 2014, 411, 55– 65. https://doi.org/10.1016/j.jim.2014.06.007.
- (237) Gámez-Valero, A.; Monguió-Tortajada, M.; Carreras-Planella, L.; Franquesa, M.; Beyer, K.; Borràs, F. E. Size-Exclusion Chromatography-Based Isolation Minimally Alters Extracellular Vesicles' Characteristics Compared to Precipitating Agents. *Sci Rep* 2016, 6 (1), 33641. https://doi.org/10.1038/srep33641.
- (238) Guo, J.; Wu, C.; Lin, X.; Zhou, J.; Zhang, J.; Zheng, W.; Wang, T.; Cui, Y. Establishment of a Simplified Dichotomic Size-exclusion Chromatography for Isolating Extracellular Vesicles toward Clinical Applications. *J Extracell Vesicles* 2021, 10 (11). https://doi.org/10.1002/jev2.12145.
- (239) Théry, C.; Witwer, K. W.; Aikawa, E.; Alcaraz, M. J.; Anderson, J. D.; Andriantsitohaina, R.; Antoniou, A.; Arab, T.; Archer, F.; Atkin-Smith, G. K.; Ayre, D. C.; Bach, J. M.; Bachurski, D.; Baharvand, H.; Balaj, L.; Baldacchino, S.; Bauer, N. N.; Baxter, A. A.; Bebawy, M.; Beckham, C.; Bedina Zavec, A.; Benmoussa, A.; Berardi, A. C.; Bergese, P.; Bielska, E.; Blenkiron, C.; Bobis-Wozowicz, S.; Boilard, E.; Boireau, W.; Bongiovanni, A.; Borràs, F. E.; Bosch, S.; Boulanger, C. M.; Breakefield, X.; Breglio, A. M.; Brennan, M.; Brigstock, D. R.; Brisson, A.; Broekman, M. L. D.; Bromberg, J. F.; Bryl-Górecka, P.; Buch, S.; Buck, A. H.; Burger, D.; Busatto, S.; Buschmann, D.; Bussolati, B.; Buzás, E. I.; Byrd, J. B.; Camussi, G.; Carter, D. R. F.; Caruso, S.; Chamley, L. W.; Chang, Y. T.; Chaudhuri, A. D.; Chen, C.; Chen, S.; Cheng, L.; Chin, A. R.; Clayton, A.; Clerici, S. P.; Cocks, A.; Cocucci, E.; Coffey, R. J.; Cordeiroda-Silva, A.; Couch, Y.; Coumans, F. A. W.; Coyle, B.; Crescitelli, R.; Criado, M. F.; D'Souza-Schorey, C.; Das, S.; de Candia, P.; De Santana, E. F.; De Wever, O.; del Portillo, H. A.; Demaret, T.; Deville, S.; Devitt, A.; Dhondt, B.; Di Vizio, D.; Dieterich, L. C.; Dolo, V.; Dominguez Rubio, A. P.; Dominici, M.; Dourado, M. R.; Driedonks, T. A. P.; Duarte, F. V.; Duncan, H. M.; Eichenberger, R. M.; Ekström, K.; EL Andaloussi, S.; Elie-Caille, C.; Erdbrügger, U.; Falcón-Pérez, J. M.; Fatima, F.; Fish, J. E.; Flores-Bellver, M.; Försönits, A.; Frelet-Barrand, A.; Fricke, F.; Fuhrmann, G.; Gabrielsson, S.; Gámez-Valero, A.; Gardiner, C.; Gärtner, K.; Gaudin, R.; Gho, Y. S.; Giebel, B.; Gilbert, C.; Gimona, M.; Giusti, I.; Goberdhan, D. C. I.; Görgens, A.; Gorski, S. M.; Greening, D. W.; Gross, J. C.; Gualerzi, A.; Gupta, G. N.; Gustafson, D.; Handberg, A.; Haraszti, R. A.; Harrison, P.; Hegyesi, H.; Hendrix, A.; Hill, A. F.; Hochberg, F. H.; Hoffmann, K. F.; Holder, B.; Holthofer, H.; Hosseinkhani, B.; Hu,

G.; Huang, Y.; Huber, V.; Hunt, S.; Ibrahim, A. G. E.; Ikezu, T.; Inal, J. M.; Isin, M.; Ivanova, A.; Jackson, H. K.; Jacobsen, S.; Jay, S. M.; Jayachandran, M.; Jenster, G.; Jiang, L.; Johnson, S. M.; Jones, J. C.; Jong, A.; Jovanovic-Talisman, T.; Jung, S.; Kalluri, R.; Kano, S. ichi; Kaur, S.; Kawamura, Y.; Keller, E. T.; Khamari, D.; Khomyakova, E.; Khvorova, A.; Kierulf, P.; Kim, K. P.; Kislinger, T.; Klingeborn, M.; Klinke, D. J.; Kornek, M.; Kosanović, M. M.; Kovács, Á. F.; Krämer-Albers, E. M.; Krasemann, S.; Krause, M.; Kurochkin, I. V.; Kusuma, G. D.; Kuypers, S.; Laitinen, S.; Langevin, S. M.; Languino, L. R.; Lannigan, J.; Lässer, C.; Laurent, L. C.; Lavieu, G.; Lázaro-Ibáñez, E.; Le Lay, S.; Lee, M. S.; Lee, Y. X. F.; Lemos, D. S.; Lenassi, M.; Leszczynska, A.; Li, I. T. S.; Liao, K.; Libregts, S. F.; Ligeti, E.; Lim, R.; Lim, S. K.; Linē, A.; Linnemannstöns, K.; Llorente, A.; Lombard, C. A.; Lorenowicz, M. J.; Lörincz, A. M.; Lötvall, J.; Lovett, J.; Lowry, M. C.; Loyer, X.; Lu, Q.; Lukomska, B.; Lunavat, T. R.; Maas, S. L. N.; Malhi, H.; Marcilla, A.; Mariani, J.; Mariscal, J.; Martens-Uzunova, E. S.; Martin-Jaular, L.; Martinez, M. C.; Martins, V. R.; Mathieu, M.; Mathivanan, S.; Maugeri, M.; McGinnis, L. K.; McVey, M. J.; Meckes, D. G.; Meehan, K. L.; Mertens, I.; Minciacchi, V. R.; Möller, A.; Møller Jørgensen, M.; Morales-Kastresana, A.; Morhayim, J.; Mullier, F.; Muraca, M.; Musante, L.; Mussack, V.; Muth, D. C.; Myburgh, K. H.; Najrana, T.; Nawaz, M.; Nazarenko, I.; Nejsum, P.; Neri, C.; Neri, T.; Nieuwland, R.; Nimrichter, L.; Nolan, J. P.; Nolte-'t Hoen, E. N. M.; Noren Hooten, N.; O'Driscoll, L.; O'Grady, T.; O'Loghlen, A.; Ochiya, T.; Olivier, M.; Ortiz, A.; Ortiz, L. A.; Osteikoetxea, X.; Ostegaard, O.; Ostrowski, M.; Park, J.; Pegtel, D. M.; Peinado, H.; Perut, F.; Pfaffl, M. W.; Phinney, D. G.; Pieters, B. C. H.; Pink, R. C.; Pisetsky, D. S.; Pogge von Strandmann, E.; Polakovicova, I.; Poon, I. K. H.; Powell, B. H.; Prada, I.; Pulliam, L.; Quesenberry, P.; Radeghieri, A.; Raffai, R. L.; Raimondo, S.; Rak, J.; Ramirez, M. I.; Raposo, G.; Rayyan, M. S.; Regev-Rudzki, N.; Ricklefs, F. L.; Robbins, P. D.; Roberts, D. D.; Rodrigues, S. C.; Rohde, E.; Rome, S.; Rouschop, K. M. A.; Rughetti, A.; Russell, A. E.; Saá, P.; Sahoo, S.; Salas-Huenuleo, E.; Sánchez, C.; Saugstad, J. A.; Saul, M. J.; Schiffelers, R. M.; Schneider, R.; Schøyen, T. H.; Scott, A.; Shahaj, E.; Sharma, S.; Shatnyeva, O.; Shekari, F.; Shelke, G. V.; Shetty, A. K.; Shiba, K.; Siljander, P. R. M.; Silva, A. M.; Skowronek, A.; Snyder, O. L.; Soares, R. P.; Sódar, B. W.; Soekmadji, C.; Sotillo, J.; Stahl, P. D.; Stoorvogel, W.; Stott, S. L.; Strasser, E. F.; Swift, S.; Tahara, H.; Tewari, M.; Timms, K.; Tiwari, S.; Tixeira, R.; Tkach, M.; Toh, W. S.; Tomasini, R.; Torrecilhas, A. C.; Tosar, J. P.; Toxavidis, V.; Urbanelli, L.; Vader, P.; van Balkom, B. W. M.; van der Grein, S. G.; Van Deun, J.; van Herwijnen, M. J. C.; Van Keuren-Jensen, K.; van Niel, G.; van Royen, M. E.; van Wijnen, A. J.; Vasconcelos, M. H.; Vechetti, I. J.; Veit, T. D.; Vella, L. J.; Velot, É.; Verweij, F. J.; Vestad, B.; Viñas, J. L.; Visnovitz, T.; Vukman, K. V.; Wahlgren, J.; Watson, D. C.; Wauben, M. H. M.; Weaver, A.; Webber,

J. P.; Weber, V.; Wehman, A. M.; Weiss, D. J.; Welsh, J. A.; Wendt, S.; Wheelock, A. M.; Wiener, Z.; Witte, L.; Wolfram, J.; Xagorari, A.; Xander, P.; Xu, J.; Yan, X.; Yáñez-Mó, M.; Yin, H.; Yuana, Y.; Zappulli, V.; Zarubova, J.; Žėkas, V.; Zhang, J. ye; Zhao, Z.; Zheng, L.; Zheutlin, A. R.; Zickler, A. M.; Zimmermann, P.; Zivkovic, A. M.; Zocco, D.; Zuba-Surma, E. K. Minimal Information for Studies of Extracellular Vesicles 2018 (MISEV2018): A Position Statement of the International Society for Extracellular Vesicles and Update of the MISEV2014 Guidelines. *J Extracell Vesicles* 2018, 7 (1). https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750.

- (240) Maia, J.; Batista, S.; Couto, N.; Gregório, A. C.; Bodo, C.; Elzanowska, J.; Strano Moraes, M. C.; Costa-Silva, B. Employing Flow Cytometry to Extracellular Vesicles Sample Microvolume Analysis and Quality Control. *Front Cell Dev Biol* 2020, *8*, 1–15. https://doi.org/10.3389/fcell.2020.593750.
- (241) Rousseau, M.; Belleannee, C.; Duchez, A.-C.; Cloutier, N.; Levesque, T.; Jacques, F.; Perron, J.; Nigrovic, P. A.; Dieude, M.; Hebert, M.-J.; Gelb, M. H.; Boilard, E. Detection and Quantification of Microparticles from Different Cellular Lineages Using Flow Cytometry. Evaluation of the Impact of Secreted Phospholipase A2 on Microparticle Assessment. *PLoS One* 2015, 10 (1), e0116812. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116812.
- (242) Fattaccioli, J.; Baudry, J.; Émerard, J.-D.; Bertrand, E.; Goubault, C.; Henry, N.; Bibette, J. Size and Fluorescence Measurements of Individual Droplets by Flow Cytometry. *Soft Matter* 2009, 5 (11), 2232. https://doi.org/10.1039/b814954b.
- (243) de Rond, L.; Coumans, F. A. W.; Nieuwland, R.; van Leeuwen, T. G.; van der Pol, E. Deriving Extracellular Vesicle Size From Scatter Intensities Measured by Flow Cytometry. *Curr Protoc Cytom* **2018**, *86* (1). https://doi.org/10.1002/cpcy.43.
- (244) Welsh, J. A.; Arkesteijn, G. J. A.; Bremer, M.; Cimorelli, M.; Dignat-George, F.; Giebel, B.; Görgens, A.; Hendrix, A.; Kuiper, M.; Lacroix, R.; Lannigan, J.; van Leeuwen, T. G.; Lozano-Andrés, E.; Rao, S.; Robert, S.; de Rond, L.; Tang, V. A.; Tertel, T.; Yan, X.; Wauben, M. H. M.; Nolan, J. P.; Jones, J. C.; Nieuwland, R.; van der Pol, E. A Compendium of Single Extracellular Vesicle Flow Cytometry. *J Extracell Vesicles* 2023, 12 (2). https://doi.org/10.1002/jev2.12299.
- (245) Ayers, L.; Kohler, M.; Harrison, P.; Sargent, I.; Dragovic, R.; Schaap, M.; Nieuwland, R.; Brooks, S. A.; Ferry, B. Measurement of Circulating Cell-Derived Microparticles by Flow Cytometry: Sources of Variability within the Assay. *Thromb Res* 2011, 127 (4), 370–377. https://doi.org/10.1016/j.thromres.2010.12.014.
- (246) van der Pol, E.; Sturk, A.; van Leeuwen, T.; Nieuwland, R.; Coumans, F.; Mobarrez, F.; Arkesteijn, G.; Wauben, M.; Siljander, P. R. -M.; Sánchez-López, V.; Otero-Candelera, R.; Ramón, L. A.; Dolz, S.; Vila, V.; Mackman, N.; Geddings, J.; Mullier,

F.; Bailly, N.; Han, J. -Y.; Kwaan, H. C.; Weiss, I. M.; Buzás, E. I.; Pállinger, E.; Harrison, P.; Kraan, J.; Hedley, B. D.; LazoLangner, A.; Enjeti, A.; Norris, P. J.; Paris, C.; Susen, S.; Bonnefoy, A.; Delorme, I.; Chandler, W. L.; Hau, C.; Aass, H. C. D.; Connor, D.; Wu, X.; Dragovic, R.; Uotila, L. M.; Lacroix, R.; Robert, S. Standardization of Extracellular Vesicle Measurements by Flow Cytometry through Vesicle Diameter Approximation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **2018**, *16* (6), 1236–1245. https://doi.org/10.1111/jth.14009.

- (247) van der Pol, E.; Coumans, F. A. W.; Grootemaat, A. E.; Gardiner, C.; Sargent, I. L.; Harrison, P.; Sturk, A.; van Leeuwen, T. G.; Nieuwland, R. Particle Size Distribution of Exosomes and Microvesicles Determined by Transmission Electron Microscopy, Flow Cytometry, Nanoparticle Tracking Analysis, and Resistive Pulse Sensing. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **2014**, *12* (7), 1182–1192. https://doi.org/10.1111/jth.12602.
- (248) Buzás, E. I.; Gardiner, C.; Lee, C.; Smith, Z. J. Single Particle Analysis: Methods for Detection of Platelet Extracellular Vesicles in Suspension (Excluding Flow Cytometry). *Platelets* 2017, 28 (3), 249–255. https://doi.org/10.1080/09537104.2016.1260704.
- (249) van der Pol, E.; van Leeuwen, T. G.; Yan, X. Misinterpretation of Solid Sphere Equivalent Refractive Index Measurements and Smallest Detectable Diameters of Extracellular Vesicles by Flow Cytometry. *Sci Rep* 2021, *11* (1), 24151. https://doi.org/10.1038/s41598-021-03015-2.
- (250) Cimorelli, M.; Nieuwland, R.; Varga, Z.; van der Pol, E. Standardized Procedure to Measure the Size Distribution of Extracellular Vesicles Together with Other Particles in Biofluids with Microfluidic Resistive Pulse Sensing. *PLoS One* 2021, *16* (4), e0249603. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0249603.
- (251) Parida, B. K.; Garrastazu, H.; Aden, J. K.; Cap, A. P.; McFaul, S. J. Silica Microspheres Are Superior to Polystyrene for Microvesicle Analysis by Flow Cytometry. *Thromb Res* **2015**, *135* (5), 1000–1006. https://doi.org/10.1016/j.thromres.2015.02.011.
- (252) Cimorelli, M.; Nieuwland, R.; Varga, Z.; van der Pol, E. Standardized Procedure to Measure the Size Distribution of Extracellular Vesicles Together with Other Particles in Biofluids with Microfluidic Resistive Pulse Sensing. *PLoS One* 2021, *16* (4), 1–19. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0249603.
- (253) Fraikin, J. L.; Teesalu, T.; McKenney, C. M.; Ruoslahti, E.; Cleland, A. N. A High-Throughput Label-Free Nanoparticle Analyser. *Nat Nanotechnol* 2011, 6 (5), 308–313. https://doi.org/10.1038/NNANO.2011.24.
- (254) Yang, K. S.; Lin, H.; Curley, C.; Welch, M. W.; Wolpin, B. M.; Lee, H.; Weissleder, R.; Im, H.; Castro, C. M. Bead-Based Extracellular Vesicle Analysis Using Flow

Cytometry. Adv Biosyst 2020, 4 (12), 1–7. https://doi.org/10.1002/adbi.202000203.

- (255) Gul, B.; Syed, F.; Khan, S.; Iqbal, A.; Ahmad, I. Characterization of Extracellular Vesicles by Flow Cytometry: Challenges and Promises. *Micron* 2022, 161, 103341. https://doi.org/10.1016/j.micron.2022.103341.
- (256) Welsh, J. A.; Tang, V. A.; van der Pol, E.; Görgens, A. MIFlowCyt-EV: The Next Chapter in the Reporting and Reliability of Single Extracellular Vesicle Flow Cytometry Experiments. *Cytometry Part A* **2021**, *99* (4), 365–368. https://doi.org/10.1002/cyto.a.24268.
- (257) Lian, H.; He, S.; Chen, C.; Yan, X. Flow Cytometric Analysis of Nanoscale Biological Particles and Organelles. *Annual Review of Analytical Chemistry* 2019, 12 (1), 389–409. https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-061318-115042.
- (258) Mallick, E. R.; Arab, T.; Huang, Y.; Dong, L.; Liao, Z.; Zhao, Z.; Smith, B.; Haughey, N. J.; Pienta, K. J.; Slusher, B. S.; Tarwater, P. M.; Tosar, J. P.; Zivkovic, A. M.; Vreeland, W. N.; Paulaitis, M. E.; Witwer, K. W. Characterization of Extracellular Vesicles and Artificial Nanoparticles with Four Orthogonal Single-Particle Analysis Platforms. *bioRxiv* 2020, 2020.08.04.237156. https://doi.org/10.1101/2020.08.04.237156.
- (259) Yang, L.; Zhu, S.; Hang, W.; Wu, L.; Yan, X. Development of an Ultrasensitive Dual-Channel Flow Cytometer for the Individual Analysis of Nanosized Particles and Biomolecules. *Anal Chem* 2009, *81* (7), 2555–2563. https://doi.org/10.1021/ac802464a.
- (260) Kuiper, M.; van de Nes, A.; Nieuwland, R.; Varga, Z.; van der Pol, E. Reliable Measurements of Extracellular Vesicles by Clinical Flow Cytometry. *American Journal* of Reproductive Immunology 2021, 85 (2). https://doi.org/10.1111/aji.13350.
- (261) de Rond, L.; van der Pol, E.; Bloemen, P. R.; Van Den Broeck, T.; Monheim, L.; Nieuwland, R.; van Leeuwen, T. G.; Coumans, F. A. W. A Systematic Approach to Improve Scatter Sensitivity of a Flow Cytometer for Detection of Extracellular Vesicles. *Cytometry Part A* 2020, 97 (6), 582–591. https://doi.org/10.1002/cyto.a.23974.
- (262) Lawrence, W. G.; Varadi, G.; Entine, G.; Podniesinski, E.; Wallace, P. K. Enhanced Red and near Infrared Detection in Flow Cytometry Using Avalanche Photodiodes. *Cytometry Part A* 2008, 73A (8), 767–776. https://doi.org/10.1002/cyto.a.20595.
- (263) Gul, B.; Syed, F.; Khan, S.; Iqbal, A.; Ahmad, I. Characterization of Extracellular Vesicles by Flow Cytometry: Challenges and Promises. *Micron* 2022, 161, 103341. https://doi.org/10.1016/j.micron.2022.103341.
- (264) Zhu, S.; Ma, L.; Wang, S.; Chen, C.; Zhang, W.; Yang, L.; Hang, W.; Nolan, J. P.; Wu, L.; Yan, X. Light-Scattering Detection below the Level of Single Fluorescent Molecules for High-Resolution Characterization of Functional Nanoparticles. ACS Nano 2014, 8 (10), 10998–11006. https://doi.org/10.1021/nn505162u.
- (265) Li, L.; Wang, S.; Xue, J.; Lin, Y.; Su, L.; Xue, C.; Mao, C.; Cai, N.; Tian, Y.; Zhu, S.; Wu,

L.; Yan, X. Development of Spectral Nano-Flow Cytometry for High-Throughput Multiparameter Analysis of Individual Biological Nanoparticles. *Anal Chem* **2023**, *95* (6), 3423–3433. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.2c05159.

- (266) Kestens, V.; Bozatzidis, V.; De Temmerman, P.-J.; Ramaye, Y.; Roebben, G. Validation of a Particle Tracking Analysis Method for the Size Determination of Nano- and Microparticles. J Nanopart Res 2017, 19 (8), 271. https://doi.org/10.1007/s11051-017-3966-8.
- (267) Giebel, B.; Helmbrecht, C. Methods to Analyze EVs. *Methods Mol Biol* **2017**, *1545*, 1–20. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6728-5_1.
- (268) Bachurski, D.; Schuldner, M.; Nguyen, P.; Malz, A.; Reiners, K. S.; Grenzi, P. C.; Babatz, F.; Schauss, A. C.; Hansen, H. P.; Hallek, M.; von Strandmann, E. P. Extracellular Vesicle Measurements with Nanoparticle Tracking Analysis – An Accuracy and Repeatability Comparison between NanoSight NS300 and ZetaView. J Extracell Vesicles 2019, 8 (1). https://doi.org/10.1080/20013078.2019.1596016.
- (269) Parsons, M. E. M.; McParland, D.; Szklanna, P. B.; Guang, M. H. Z.; O'Connell, K.; O'Connor, H. D.; McGuigan, C.; Ní Áinle, F.; McCann, A.; Maguire, P. B. A Protocol for Improved Precision and Increased Confidence in Nanoparticle Tracking Analysis Concentration Measurements between 50 and 120 Nm in Biological Fluids. *Front Cardiovasc Med* 2017, 4. https://doi.org/10.3389/fcvm.2017.00068.
- (270) Comfort, N.; Cai, K.; Bloomquist, T. R.; Strait, M. D.; Ferrante Jr., A. W.; Baccarelli, A. A. Nanoparticle Tracking Analysis for the Quantification and Size Determination of Extracellular Vesicles. *Journal of Visualized Experiments* 2021, No. 169. https://doi.org/10.3791/62447.
- (271) Daaboul, G. G.; Gagni, P.; Benussi, L.; Bettotti, P.; Ciani, M.; Cretich, M.; Freedman, D. S.; Ghidoni, R.; Ozkumur, A. Y.; Piotto, C.; Prosperi, D.; Santini, B.; Ünlü, M. S.; Chiari, M. Digital Detection of Exosomes by Interferometric Imaging. *Sci Rep* 2016, 6 (1), 37246. https://doi.org/10.1038/srep37246.
- (272) Sevenler, D.; Avci, O.; Unlü, M. S. Quantitative Interferometric Reflectance Imaging for the Detection and Measurement of Biological Nanoparticles. *Biomed. Opt. Express* 2017, 8 (6), 2976–2989. https://doi.org/10.1364/BOE.8.002976.
- (273) Kim, J. S.; Kwon, S. Y.; Lee, J. Y.; Kim, S. D.; Kim, D. Y.; Kim, H.; Jang, N.; Wang, J.; Han, M.; Kong, S. H. High-Throughput Multi-Gate Microfluidic Resistive Pulse Sensing for Biological Nanoparticle Detection. *Lab Chip* 2023, 23 (7), 1945–1953. https://doi.org/10.1039/D2LC01064J.
- (274) Song, Y.; Zhang, J.; Li, D. Microfluidic and Nanofluidic Resistive Pulse Sensing: A Review. *Micromachines (Basel)* **2017**, *8* (7). https://doi.org/10.3390/MI8070204.
- (275) Trantidou, T.; Elani, Y.; Parsons, E.; Ces, O. Hydrophilic Surface Modification of

PDMS for Droplet Microfluidics Using a Simple, Quick, and Robust Method via PVADeposition.MicrosystNanoeng2017,3.https://doi.org/10.1038/MICRONANO.2016.91.

- (276) Spectradyne LLC. *Electrical sensing methods for particle size analysis*. https://nanoparticleanalyzer.com/technology-electrical.php.
- (277) Liu, J.; Lu, Y. Preparation of Aptamer-Linked Gold Nanoparticle Purple Aggregates for Colorimetric Sensing of Analytes. *Nature Protocols 2006 1:1* 2006, 1 (1), 246–252. https://doi.org/10.1038/nprot.2006.38.
- (278) Liu, J.; Lu, Y. Preparation of Aptamer-Linked Gold Nanoparticle Purple Aggregates for Colorimetric Sensing of Analytes. *Nat Protoc* **2006**, *1* (1), 246–252. https://doi.org/10.1038/NPROT.2006.38.
- (279) Schindelin, J.; Arganda-Carreras, I.; Frise, E.; Kaynig, V.; Longair, M.; Pietzsch, T.; Preibisch, S.; Rueden, C.; Saalfeld, S.; Schmid, B.; Tinevez, J. Y.; White, D. J.; Hartenstein, V.; Eliceiri, K.; Tomancak, P.; Cardona, A. Fiji: An Open-Source Platform for Biological-Image Analysis. *Nature Methods* 2012 9:7 2012, 9 (7), 676–682. https://doi.org/10.1038/nmeth.2019.
- (280) D. Segelstein. The Complex Refractive Index of Water, Department of Physics, University of Missouri, Kansas City , 1981.
- (281) Rakić, A. D.; Djurišić, A. B.; Elazar, J. M.; Majewski, M. L. Optical Properties of Metallic Films for Vertical-Cavity Optoelectronic Devices. *Appl. Opt.* 1998, 37 (22), 5271–5283. https://doi.org/10.1364/AO.37.005271.
- (282) Grimaldi, A.; Heijo, G.; Méndez, E. A Multiple Evaluation Approach of Commercially Available Screen-Printed Nanostructured Carbon Electrodes. *Electroanalysis* 2014, 26 (8), 1684–1693. https://doi.org/10.1002/ELAN.201400122.
- (283) Dennison, J. M.; Zupancic, J. M.; Lin, W.; Dwyer, J. H.; Murphy, C. J. Protein Adsorption to Charged Gold Nanospheres as a Function of Protein Deformability. *Langmuir* 2017, 33 (31), 7751–7761. https://doi.org/10.1021/ACS.LANGMUIR.7B01909.
- (284) Liu, J.; Lu, Y. Preparation of Aptamer-Linked Gold Nanoparticle Purple Aggregates for Colorimetric Sensing of Analytes. *Nat Protoc* **2006**, *1* (1), 246–252. https://doi.org/10.1038/nprot.2006.38.
- (285) Colangelo, E.; Comenge, J.; Paramelle, D.; Volk, M.; Chen, Q.; Lévy, R. Characterizing Self-Assembled Monolayers on Gold Nanoparticles. *Bioconjug Chem* 2017, 28 (1), 11– 22.

https://doi.org/10.1021/ACS.BIOCONJCHEM.6B00587/ASSET/IMAGES/LARGE/BC -2016-00587T_0004.JPEG.

(286) Inkpen, M. S.; Liu, Z. -F; Li, H.; Campos, L. M.; Neaton, J. B.; Venkataraman, L. Non-

Chemisorbed Gold–Sulfur Binding Prevails in Self-Assembled Monolayers. *Nature Chemistry* 2019 11:4 **2019**, 11 (4), 351–358. https://doi.org/10.1038/s41557-019-0216-y.

- (287) Lages, C.; Méndez, E. Contact Angle Measurements under Thermodynamic Equilibrium Conditions. *Anal Bioanal Chem* 2007, 388 (8), 1689–1692. https://doi.org/10.1007/S00216-007-1373-1.
- (288) Tang, J.; Gao, K.; Ou, Q.; Fu, X.; Man, S. Q.; Guo, J.; Liu, Y. Calculation Extinction Cross Sections and Molar Attenuation Coefficient of Small Gold Nanoparticles and Experimental Observation of Their UV–Vis Spectral Properties. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2018, 191, 513–520. https://doi.org/10.1016/J.SAA.2017.10.047.
- (289) Khlebtsov, N. G. Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from Extinction Spectra. *Anal Chem* 2008, 80 (17), 6620–6625. https://doi.org/10.1021/AC800834N.
- (290) Zhang, L.; Hu, D.; Salmain, M.; Liedberg, B.; Boujday, S. Direct Quantification of Surface Coverage of Antibody in IgG-Gold Nanoparticles Conjugates. *Talanta* 2019, 204, 875–881. https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2019.05.104.
- (291) Ansar, S. M.; Chakraborty, S.; Kitchens, C. L. PH-Responsive Mercaptoundecanoic Acid Functionalized Gold Nanoparticles and Applications in Catalysis. *Nanomaterials* 2018, Vol. 8, Page 339 2018, 8 (5), 339. https://doi.org/10.3390/NANO8050339.
- (292) Franco, R.; Pereira, E. Gold Nanoparticles and Proteins, Interaction. In *Encyclopedia of Metalloproteins*; Springer New York: New York, NY, 2013; pp 908–915. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1533-6_572.
- (293) Balasubramanian, S. K.; Yang, L.; Yung, L. Y. L.; Ong, C. N.; Ong, W. Y.; Yu, L. E. Characterization, Purification, and Stability of Gold Nanoparticles. *Biomaterials* 2010, 31 (34), 9023–9030. https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2010.08.012.
- (294) Kuhar, N.; Sil, S.; Umapathy, S. Potential of Raman Spectroscopic Techniques to Study Proteins. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc 2021, 258, 119712. https://doi.org/10.1016/J.SAA.2021.119712.
- (295) Siddhanta, S.; Narayana, C. Surface Enhanced Raman Spectroscopy of Proteins: Implications for Drug Designing. **2012**.
- (296) Bruzas, I.; Lum, W.; Gorunmez, Z.; Sagle, L. Advances in Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS) Substrates for Lipid and Protein Characterization: Sensing and Beyond. *Analyst* 2018, 143 (17), 3990–4008. https://doi.org/10.1039/C8AN00606G.
- (297) Beattie, J. R.; Caraher, M. C.; Cummins, N. M.; O'Driscoll, O. M.; Eastell, R.; Ralston, S. H.; Towler, M. R. Raman Spectral Variation for Human Fingernails of Postmenopausal Women Is Dependent on Fracture Risk and Osteoporosis Status. *Journal of Raman Spectroscopy* 2017, 48 (6), 813–821. https://doi.org/10.1002/JRS.5123.
- (298) Fazio, B.; D'Andrea, C.; Foti, A.; Messina, E.; Irrera, A.; Donato, M. G.; Villari, V.;

Micali, N.; Maragò, O. M.; Gucciardi, P. G. SERS Detection of Biomolecules at Physiological PH via Aggregation of Gold Nanorods Mediated by Optical Forces and Plasmonic Heating. *Sci Rep* **2016**, *6*. https://doi.org/10.1038/SREP26952.

- (299) Szekeres, G. P.; Kneipp, J. SERS Probing of Proteins in Gold Nanoparticle Agglomerates. *Front Chem* **2019**, 7 (JAN), 30. https://doi.org/10.3389/FCHEM.2019.00030/BIBTEX.
- (300) Smolsky, J.; Kaur, S.; Hayashi, C.; Batra, S. K.; Krasnoslobodtsev, A. V. Surface-Enhanced Raman Scattering-Based Immunoassay Technologies for Detection of Disease Biomarkers. *Biosensors (Basel)* 2017. https://doi.org/10.3390/bios7010007.
- (301) Louis, C.; Pluchery, O. Gold Nanoparticles for Physics, Chemistry and Biology. Gold Nanoparticles for Physics, Chemistry and Biology 2012, 1–395. https://doi.org/10.1142/P815/SUPPL_FILE/P815_CHAP01.PDF.
- (302) Zheng, T.; Bott, S.; Huo, Q. Techniques for Accurate Sizing of Gold Nanoparticles Using Dynamic Light Scattering with Particular Application to Chemical and Biological Sensing Based on Aggregate Formation. ACS Appl Mater Interfaces 2016, 8 (33), 21585–21594. https://doi.org/10.1021/ACSAMI.6B06903/ASSET/IMAGES/MEDIUM/AM-2016-

069033_0009.GIF.

- (303) Jiang, N.; Zhuo, X.; Wang, J. Active Plasmonics: Principles, Structures, and Applications. *Chem Rev* 2018, 118 (6), 3054–3099. https://doi.org/10.1021/ACS.CHEMREV.7B00252/ASSET/IMAGES/MEDIUM/CR-2017-00252G_0023.GIF.
- (304) Polavarapu, L.; Pérez-Juste, J.; Xu, Q. H.; Liz-Marzán, L. M. Optical Sensing of Biological, Chemical and Ionic Species through Aggregation of Plasmonic Nanoparticles. J Mater Chem C Mater 2014, 2 (36), 7460–7476. https://doi.org/10.1039/C4TC01142B.
- (305) Wei, H.; Leng, W.; Song, J.; Liu, C.; Willner, M. R.; Huang, Q.; Zhou, W.; Vikesland, P. J. Real-Time Monitoring of Ligand Exchange Kinetics on Gold Nanoparticle Surfaces Enabled by Hot Spot-Normalized Surface-Enhanced Raman Scattering. *Environ Sci Technol* 2019, 53 (2), 575–585. https://doi.org/10.1021/ACS.EST.8B03144.
- (306) Garcia-Hernandez, C.; Freese, A. K.; Rodriguez-Mendez, M. L.; Wanekaya, A. K. In Situ Synthesis, Stabilization and Activity of Protein-Modified Gold Nanoparticles for Biological Applications. *Biomater Sci* 2019, 7 (6), 2511–2519. https://doi.org/10.1039/C9BM00129H.
- (307) Oliveira, J. P.; Prado, A. R.; Keijok, W. J.; Antunes, P. W. P.; Yapuchura, E. R.; Guimarães, M. C. C. Impact of Conjugation Strategies for Targeting of Antibodies in Gold Nanoparticles for Ultrasensitive Detection of 17β-Estradiol. *Scientific Reports*
2019 9:1 2019, 9 (1), 1-8. https://doi.org/10.1038/s41598-019-50424-5.

- (308) Egorova, E. A.; Van Rijt, M. M. J.; Sommerdijk, N.; Gooris, G. S.; Bouwstra, J. A.; Boyle, A. L.; Kros, A. One Peptide for Them All: Gold Nanoparticles of Different Sizes Are Stabilized by a Common Peptide Amphiphile. ACS Nano 2020, 14 (5), 5874–5886. https://doi.org/10.1021/ACSNANO.0C01021/SUPPL_FILE/NN0C01021_SI_001.PDF.
- (309) Botasini, S.; Méndez, E. Silver Nanoparticle Aggregation Not Triggered by an Ionic Strength Mechanism. *Journal of Nanoparticle Research* 2013, 15 (4). https://doi.org/10.1007/s11051-013-1526-4.
- (310) Goyon, A.; Excoffier, M.; Janin-Bussat, M. C.; Bobaly, B.; Fekete, S.; Guillarme, D.; Beck, A. Determination of Isoelectric Points and Relative Charge Variants of 23 Therapeutic Monoclonal Antibodies. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2017, 1065–1066, 119–128. https://doi.org/10.1016/J.JCHROMB.2017.09.033.
- (311) Bayer, E. A.; Ben-Hur, H.; Hiller, Y.; Wilchek, M. Postsecretory Modifications of Streptavidin. *Biochem. J* **1989**, 259, 369–376.
- (312) Ruiz, G.; Ryan, N.; Rutschke, K.; Awotunde, O.; Driskell, J. D. Antibodies Irreversibly Adsorb to Gold Nanoparticles and Resist Displacement by Common Blood Proteins. *Langmuir* 2019, 35 (32), 10601–10609. https://doi.org/10.1021/ACS.LANGMUIR.9B01900.
- (313) Okyem, S.; Awotunde, O.; Ogunlusi, T.; Riley, M. B.; Driskell, J. D. Probing the Mechanism of Antibody-Triggered Aggregation of Gold Nanoparticles. *Langmuir* 2021, 37 (9), 2993–3000. https://doi.org/10.1021/ACS.LANGMUIR.1C00100.
- (314) Gagnon, P.; Nian, R. Conformational Plasticity of IgG during Protein A Affinity Chromatography. J Chromatogr A **2016**, 1433, 98–105. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.01.022.
- (315) Armstrong, J. K.; Wenby, R. B.; Meiselman, H. J.; Fisher, T. C. The Hydrodynamic Radii of Macromolecules and Their Effect on Red Blood Cell Aggregation. *Biophys J* 2004, 87 (6), 4259–4270. https://doi.org/10.1529/biophysj.104.047746.
- (316) Lee, J. H.; Cho, H. Y.; Choi, H. K.; Lee, J. Y.; Choi, J. W. Application of Gold Nanoparticle to Plasmonic Biosensors. *Int J Mol Sci* 2018, 19 (7). https://doi.org/10.3390/IJMS19072021.
- (317) Zhang, L.; Hu, D.; Salmain, M.; Liedberg, B.; Boujday, S. Direct Quantification of Surface Coverage of Antibody in IgG-Gold Nanoparticles Conjugates. *Talanta* 2019, 204, 875–881. https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2019.05.104.
- (318) Ben Haddada, M.; Hu, D.; Salmain, M.; Zhang, L.; Peng, C.; Wang, Y.; Liedberg, B.; Boujday, S. Gold Nanoparticle-Based Localized Surface Plasmon Immunosensor for Staphylococcal Enterotoxin A (SEA) Detection. *Anal Bioanal Chem* 2017, 409 (26), 6227–6234. https://doi.org/10.1007/S00216-017-0563-8.

- (319) Théry, C.; Amigorena, S.; Raposo, G.; Clayton, A. Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids. *Curr Protoc Cell Biol* 2006, 30 (1), 3.22.1-3.22.29. https://doi.org/10.1002/0471143030.CB0322S30.
- (320) Hikita, T.; Miyata, M.; Watanabe, R.; Oneyama, C. Sensitive and Rapid Quantification of Exosomes by Fusing Luciferase to Exosome Marker Proteins. *Scientific Reports* 2018 *8*:1 **2018**, *8* (1), 1–14. https://doi.org/10.1038/s41598-018-32535-7.
- (321) Doldán, X.; Fagúndez, P.; Cayota, A.; Laíz, J.; Tosar, J. P. Electrochemical Sandwich Immunosensor for Determination of Exosomes Based on Surface Marker-Mediated Signal Amplification. *Anal Chem* **2016**, *88* (21), 10466–10473. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b02421.
- (322) Piazza, R. Scattering, Rayleigh. In *Reference Module in Materials Science and Materials Engineering*; Elsevier, 2022. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90800-9.00039-1.
- (323) Vogel, R.; Savage, J.; Muzard, J.; Camera, G. Della; Vella, G.; Law, A.; Marchioni, M.; Mehn, D.; Geiss, O.; Peacock, B.; Aubert, D.; Calzolai, L.; Caputo, F.; Prina-Mello, A. Measuring Particle Concentration of Multimodal Synthetic Reference Materials and Extracellular Vesicles with Orthogonal Techniques: Who Is up to the Challenge? J Extracell Vesicles 2021, 10 (3). https://doi.org/10.1002/JEV2.12052.
- (324) Mizenko, R. R.; Brostoff, T.; Rojalin, T.; Koster, H. J.; Swindell, H. S.; Leiserowitz, G. S.; Wang, A.; Carney, R. P. Tetraspanins Are Unevenly Distributed across Single Extracellular Vesicles and Bias Sensitivity to Multiplexed Cancer Biomarkers. *J Nanobiotechnology* **2021**, *19* (1), 250. https://doi.org/10.1186/s12951-021-00987-1.
- (325) Latour, R. A. Fundamental Principles of the Thermodynamics and Kinetics of Protein Adsorption to Material Surfaces. *Colloids Surf B Biointerfaces* **2020**, *191*, 110992. https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2020.110992.
- (326) Sotnikov, D. V.; Berlina, A. N.; Ivanov, V. S.; Zherdev, A. V.; Dzantiev, B. B. Adsorption of Proteins on Gold Nanoparticles: One or More Layers? *Colloids Surf B Biointerfaces* 2019, 173, 557–563. https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2018.10.025.
- (327) Prakash, S.; Deswal, R. Analysis of Temporally Evolved Nanoparticle-Protein Corona Highlighted the Potential Ability of Gold Nanoparticles to Stably Interact with Proteins and Influence the Major Biochemical Pathways in Brassica Juncea. *Plant Physiology and Biochemistry* 2020, 146, 143–156. https://doi.org/10.1016/J.PLAPHY.2019.10.036.
- (328) Dennison, J. M.; Zupancic, J. M.; Lin, W.; Dwyer, J. H.; Murphy, C. J. Protein Adsorption to Charged Gold Nanospheres as a Function of Protein Deformability. *Langmuir* **2017**, 33 (31), 7751–7761. https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b01909.
- (329) Mikhlin, Y.; Likhatski, M.; Karacharov, A.; Zaikovski, V.; Krylov, A. Formation of Gold and Gold Sulfide Nanoparticles and Mesoscale Intermediate Structures in the

Reactions of Aqueous HAuCl4 with Sulfide and Citrate Ions. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2009**, *11* (26), 5445–5454. https://doi.org/10.1039/B823539B.

- (330) Iosin, M.; Toderas, F.; Baldeck, P. L.; Astilean, S. Study of Protein–Gold Nanoparticle Conjugates by Fluorescence and Surface-Enhanced Raman Scattering. *J Mol Struct* 2009, 924–926 (C), 196–200. https://doi.org/10.1016/J.MOLSTRUC.2009.02.004.
- (331) Nuzzo, R. G.; Allara, D. L. Adsorption of Bifunctional Organic Disulfides on Gold Surfaces. J Am Chem Soc 1983, 105 (13), 4481–4483. https://doi.org/10.1021/ja00351a063.
- (332) Pacchioni, G. A Not-so-Strong Bond. *Nat Rev Mater* **2019**, *4* (4), 226–226. https://doi.org/10.1038/s41578-019-0094-3.
- (333) Rouhana, L. L.; Moussallem, M. D.; Schlenoff, J. B. Adsorption of Short-Chain Thiols and Disulfides onto Gold under Defined Mass Transport Conditions: Coverage, Kinetics, and Mechanism. J Am Chem Soc 2011, 133 (40), 16080–16091. https://doi.org/10.1021/JA2041833/SUPPL_FILE/JA2041833_SI_001.PDF.
- (334) Nebu, J.; Anjali Devi, J. S.; Aparna, R. S.; Aswathy, B.; Lekha, G. M.; Sony, G. Fluorescence Turn-on Detection of Fenitrothion Using Gold Nanoparticle Quenched Fluorescein and Its Separation Using Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticle. *Sens Actuators B Chem* 2018, 277, 271–280. https://doi.org/10.1016/J.SNB.2018.08.153.
- (335) Dulkeith, E.; Ringler, M.; Klar, T. A.; Feldmann, J.; Javier, A. M.; Parak, W. J. Gold Nanoparticles Quench Fluorescence by Phase Induced Radiative Rate Suppression. *Nano* Lett 2005, 5 (4), 585–589. https://doi.org/10.1021/NL0480969/ASSET/IMAGES/MEDIUM/NL0480969N00001.G IF.
- (336) Huang, X.; El-Sayed, I. H.; El-Sayed, M. A. Fluorescent Quenching Gold Nanoparticles: Potential Biomedical Applications. *Metal-Enhanced Fluorescence* 2010, 573–599. https://doi.org/10.1002/9780470642795.CH20.
- (337) Dutta, N. K.; Dutta, A. K.; Roy Choudhury, N. Gold Nanoparticles and Fluorescent Proteins, Optically Coupled Hybrid Architectures. *Encyclopedia of Metalloproteins* 2013, 895–908. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1533-6_577.
- (338) Swierczewska, M.; Lee, S.; Chen, X. The Design and Application of Fluorophore– Gold Nanoparticle Activatable Probes. *Phys Chem Chem Phys* **2011**, *13* (21), 9929. https://doi.org/10.1039/C0CP02967J.
- (339) Grys, D. B.; De Nijs, B.; Salmon, A. R.; Huang, J.; Wang, W.; Chen, W. H.; Scherman, O. A.; Baumberg, J. J. Citrate Coordination and Bridging of Gold Nanoparticles: The Role of Gold Adatoms in AuNP Aging. ACS Nano 2020, 14 (7), 8689–8696. https://doi.org/10.1021/ACSNANO.0C03050/SUPPL_FILE/NN0C03050_SI_001.PDF.
- (340) Park, J. W. Negative-Imaging of Citrate Layers on Gold Nanoparticles by Ligand-

Templated Metal Deposition: Revealing Surface Heterogeneity. Particle & ParticleSystemsCharacterization2019,36(1),1800329.https://doi.org/10.1002/PPSC.201800329.

- (341) Nicholson, R. S. Theory and Application of Cyclic Voltammetry for Measurement of Electrode Reaction Kinetics. *Anal Chem* **1965**, *37* (11), 1351–1355. https://doi.org/10.1021/AC60230A016/ASSET/AC60230A016.FP.PNG_V03.
- (342) Verde, V. La; Dominici, P.; Astegno, A. Determination of Hydrodynamic Radius of Proteins by Size Exclusion Chromatography. *Iss* 2017, 7. https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2230.
- (343) Jachimska, B.; Pajor, A. Physico-Chemical Characterization of Bovine Serum Albumin in Solution and as Deposited on Surfaces. *Bioelectrochemistry* 2012, 87, 138– 146. https://doi.org/10.1016/J.BIOELECHEM.2011.09.004.
- (344) Tiwari, N.; Yue Liu, M.; Kulkarni, S.; Fang, Y.; Tiwari, N.; Yue Liu, M.; Kulkarni, S.; Fang, Y. Study of Adsorption Behavior of Aminothiophenols on Gold Nanorods Using Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *JNano* 2011, 5 (1), 053513–053513. https://doi.org/10.1117/1.3594096.
- (345) Stewart, S.; Fredericks, P. M. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy of Peptides and Proteins Adsorbed on an Electrochemically Prepared Silver Surface. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* **1999**, 55 (7–8), 1615–1640. https://doi.org/10.1016/S1386-1425(98)00293-5.
- (346) Hernández, B.; Coïc, Y. M.; Pflüger, F.; Kruglik, S. G.; Ghomi, M. All Characteristic Raman Markers of Tyrosine and Tyrosinate Originate from Phenol Ring Fundamental Vibrations. *Journal of Raman Spectroscopy* **2016**, 47 (2), 210–220. https://doi.org/10.1002/JRS.4776.
- (347) Almehmadi, L. M.; Curley, S. M.; Tokranova, N. A.; Tenenbaum, S. A.; Lednev, I. K. Surface Enhanced Raman Spectroscopy for Single Molecule Protein Detection. *Scientific Reports 2019 9:1* 2019, 9 (1), 1–9. https://doi.org/10.1038/s41598-019-48650-y.

7. Anexos

Anexo 1

Sección 1: Optimización de las medidas UV/VIS

La selección de la resolución espectral adecuada para las medidas espectrofotométricas en el UV/VIS es un punto central para obtener los parámetros de las bandas de absorción con mayor precisión, sobre todo considerando que una determinación precisa del máximo de absorción del plasmón es necesaria cuando los corrimientos ocasionados por la modificación de la superficie de las AuNPs usualmente se encuentran por debajo de los 5 nm.

Para optimizar la resolución espectral adecuada de nuestras medidas se realizaron las determinaciones mostradas en la Figura A1.1, repitiéndose los barridos espectrales (entre 320 y 800 nm) a diferentes resoluciones fijas (0.2 a 1 nm) y diferentes velocidades de barrido (entre 5 y 50 nm/s) lo que cubrió tiempos de integración entre 0.1 y 0.002 s.



Figura A1.1. Influencia de los parámetros instrumentales resolución y velocidad de barrido en la adquisición de espectros UV/VIS de AuNP-cit. El inserto muestra una aproximación más cercana a las posiciones del máximo de absorción LSPR.

Como era de esperar, cuanto menor fue la resolución mayor es la reproducibilidad de los espectros adquiridos. La posición del máximo del plasmón no mostró diferencias significativas para las resoluciones de 0.2 y 0.5 nm. Para la resolución de 1 nm no se observaron diferencias en la posición del máximo del plasmón (Tabla A1.1).

De acuerdo con esto, todos los espectros de este trabajo (a excepción de los ensayos con lector de placas) fueron tomados a una resolución de 0.2 nm, a una velocidad de barrido de 10 nm/s lo que representó un buen compromiso entre reproducibilidad y tiempo de análisis.

Tabla A1.1. Propiedad de las bandas LSPR en función de la resolución espectral empleada en sudeterminación espectrofotométrica.

| Resolución espectral (nm) | Rango LSPR _{max} (nm) | LSPR _{max} (nm) |
|---------------------------|--------------------------------|--------------------------|
| 0.2 | 521.8 - 522.8 | 522.3 ± 0.2 |
| 0.5 | 522.0 - 522.5 | 522.5 ± 0.5 |
| 1 | 523 | 523 |

Curva de calibración mediante UV/VIS de las soluciones de AuNP-cit



Figura A1.2 Espectros UV/VIS de una solución de AuNP-cit concentrada y en dilución 1:10 en agua ultrapura.

Sección 2: Simulaciones de espectros UV/VIS para AuNPs

Las simulaciones de Mie de AuNPs polidispersas se realizaron mediante el *software* Mie Plot v.4.5.01, asumiendo nanopartículas esféricas en el rango entre 8-60 nm, con índices de refracción real e imaginarios para el oro de 0.150 y 3.601 respectivamente, asumiendo un sistema de 50 nanopartículas, rodeadas de un medio acuoso empleando la aproximación de Selgestein para simular el índice de refracción del agua. El grado de dispersión de la población, se incorporó asumiendo una distribución *logNormal*, con un desvío estándar de 3 nm (valores máximos permitidos por el *software*).



Figura A1.3. A: Espectros simulados mediante el *software* MiePlot® para AuNPs de diámetros comprendidos entre 8 y 60 nm. B: Espectro para AuNP de 13 nm de diámetro desglosado en sus componentes de dispersión (Q_{sca}) y absorción (Q_{abs}) y el resultante de ambos fenómenos (Q_{ext} = Q_{sca} + Q_{abs})

Sección 3: Determinación del coeficiente de absortividad molar y concentración de <u>AuNPs</u>

Abordaje geométrico

La determinación del valor de ε_{LSPR} mediante un abordaje geométrico consideró los siguientes supuestos:

El reactivo HAuCl₄ se consumió por completo.

La solución coloidal contenía únicamente NPs de tamaño medio 13 nm (r = 6.5 nm o 6.5x10-

⁷ cm) con una distribución de tamaño homogéneo.

Se asumió que las AuNPs mantienen un valor de densidad igual al del oro a granel (*bulk*): 19.32 g cm⁻³.

Considerando esto, en primer lugar, se determinó el volumen de cada NP según la ecuación de volumen de una esfera:

$$V_{NP} = \frac{4}{3}\pi r^{3} = \frac{4}{3}\pi (6.5 \times 10^{-7} cm)^{3} = 1.15 \times 10^{-18} cm^{3}$$

Tomando en cuenta la densidad del oro, se determinó la masa de una AuNP:

$$m_{NP} = \rho_{ORO} V_{NP} = 19.32 \ g. \ cm^{-3} \times 1.15 \times 10^{-18} \ cm^3 = 2.22 \times 10^{-17} \ g.$$

La cantidad de HAuCl₄.3H₂O agregada (en moles) fue:

$$n_{\rm HAuCl4.3H2O} = 50 \times 10^{-6} mol = n_{Au}$$

Lo que considerando la masa molar del Au da un total de:

$$m_{Au} = n_{Au}M_{Au} = 50 \times 10^{-6} mol \times 196.99 g mol^{-1} = 9.85 \times 10^{-3} g Au$$

Entonces la cantidad de AuNP formadas en la síntesis fue:

$$n^{\circ}_{NP} = \frac{m_{Au}}{m_{NP}} = \frac{9.85 \times 10^{-3} \text{ g}}{2.22 \times 10^{-17} \text{ g}} = 4.44 \times 10^{14} \text{ NP}$$

Convirtiendo a moles con la constante de Avogadro (NA) se obtuvo:

$$n_{NP} = \frac{n_{Au}^{\circ}}{N_A} = \frac{4.44 \times 10^{14} NP}{6.023 \times 10^{23} NP} = 7.37 \times 10^{-10} mol \ de \ NP$$

Considerando que el volumen final de reacción fue de 55 mL, la molaridad de la solución de AuNP fue de:

$$M_{NP} = \frac{n_{Au}}{V} = \frac{7.37 \times 10^{-10} \text{ mol}}{0.055 \text{ L}} = 1.34 \times 10^{-8} \text{ mol } L^{-1}$$

A partir de la concentración molar de la solución de AuNP y mediante la absorbancia a 522 nm de una dilución 1:10 (0.2786 u.a) se estimó el valor de ε_{LSPR} según:

$$Abs_{LSPR} = \varepsilon_{LSPR} \cdot b \cdot M_{NP} \Rightarrow \varepsilon_{LSPR} = \frac{Abs_{LSPR}}{b \cdot M_{NP}} = 2.1 \times 10^8 M^{-1} cm^{-1}$$

Abordaje óptico (Haiss et al.)

En el trabajo de Haiss et al., se realizó un abordaje teórico de la variación de las propiedades ópticas de las AuNP en base a su tamaño y longitud de onda empleando la teoría de dispersión multipolo, aplicando correcciones para el índice de refracción complejo del oro debido al efecto de un reducido camino medio libre de los electrones de conducción en partículas pequeñas. A partir de los datos y ecuaciones derivados de estos cálculos se puede determinar el diámetro y concentración de las AuNP a partir de sus datos espectrales experimentales. Para la determinación del diámetro de la AuNP se encontró que una de las aproximaciones que mejor concordancia con los datos experimentales guarda es la medida de la relación de absorbancia a la longitud de onda del máximo del plasmón con la absorbancia a 450 nm según la ecuación:

$$d = e^{(B_1 \frac{A_{LSPR}}{A_{450}} - B_2)}$$

donde $B_1 = 1/m$, siendo *m* la pendiente de la relación A_{LSPR}/A_{450} vs ln(d) y $B_2 = B_0/m$ donde B_0 corresponde a la intersección con el eje y. El gráfico de esta relación, así como la ecuación del ajuste se muestran en la Figura A1.4.



Figura A1.4. Relación AbsLSPR/Abs450 vs *ln(d)* para AuNPs. Datos tomados del material suplementario de Haiss et al., 2007.

Según esta aproximación, considerando los datos experimentales del espectro UV/VIS de las AuNPs sintetizadas en este trabajo, el diámetro calculado para las AuNP según la relación AbsLSPR/Abs450 fue de 11 nm.

En un segundo abordaje, el diámetro de la AuNP puede obtenerse con mayor precisión a partir del valor de *A*LSPR y conociendo la cantidad de oro empleada en la síntesis según la ecuación:

$$d = \left(\frac{A_{LSPR} 5.89 \times 10^{-6}}{[Au]e^{C1}}\right)^{1/C2}$$

siendo $C_1 = -4.75$ y $C_2 = 0.314$ parámetros obtenidos del ajuste lineal de la relación entre el valor de ε_{LSPR} por unidad de volumen de oro calculado y el ln(d). Los datos de ε_{LSPR} para cada diámetro de AuNP no se muestran en el trabajo.

Según los valores experimentales de *A*_{LSPR} (522 nm) y la concentración de oro empleada en la síntesis (en mol L⁻¹) pudimos determinar el diámetro esperado:

$$d = \left(\frac{1.4763 \times (5.89 \times 10^{-6})}{50 \times 10^{-6} e^{C1}}\right)^{1/C2} = 14 \, nm$$

La concentración de AuNPs según este trabajo puede ser determinada a partir de los datos del espectro UV/VIS a partir de la relación:

$$[AuNP] = \frac{A_{450}}{\varepsilon_{450}}$$

Considerando el valor de ε_{450} reportado por Haiss de 1.39×10^9 M⁻¹ cm⁻¹ (Haiss et al., 2007, Material suplementario) y el valor de absorbancia a 450 nm para una dilución 1:10 de AuNP (comprendida dentro del rango lineal) obtuvimos:

$$[AuNP] = \frac{0.1647}{\varepsilon_{450}} = 1.18 \times 10^{-9} \, mol \, L^{-1}$$

Considerando el factor de dilución determinamos una concentración de \approx 12 nM, lo cual fue muy similar al valor de concentración obtenido mediante cálculo geométrico. Con el valor de esta concentración y la absorbancia, se calculó el valor de ε_{LSPR}

$$Abs_{LSPR} = \varepsilon_{LSPR}. b. M_{NP} \Rightarrow \varepsilon_{LSPR} = \frac{Abs_{LSPR}}{b. M_{NP}} = 2.4 \times 10^8 M^{-1} cm^{-1}$$

Tabla A1.2 Valores de ε_{LSPR} para AuNPs de 13 nm de diámetro, determinados en este trabajo con las
diferentes aproximaciones detalladas en el texto.

| Referencia | ε_{LSPR} (M ⁻¹ cm ⁻¹) | | |
|--------------------------|--|--|--|
| 50 | 2.4×10^8 | | |
| 52 | 2.2×10^8 | | |
| 53 | 2.5×10^8 | | |
| Fagúndez et al., 2021 51 | $2.1 \text{ x} 10^8$ | | |

*Determinados con datos experimentales propios

Sección 4: Optimización de las medidas por DLS

Las medidas de DLS y potencial- ζ se deben realizar en un medio conteniendo electrolito soporte (típicamente NaCl) en orden de aportar la cantidad suficiente de cargas que permitan la conducción eléctrica. Sin embargo, la presencia de iones puede causar la agregación de las AuNPs y por tanto se hizo necesario determinar la concentración óptima de NaCl para llevar a cabo las determinaciones. En virtud de esto se realizaron determinaciones en concentraciones de NaCl en el rango 0 a 10 mM.



Figura A1.5. Evaluación de las condiciones de medida por DLS. Se muestran los gráficos de intensidad de la luz dispersada en función del diámetro hidrodinámico para AuNP-cit diluidas en A: agua ultrapura, B: NaCl 1 mM, C: NaCl 5 mM y D: NaCl 10 mM. En todos los casos las soluciones de NaCl fueron previamente filtradas mediante 0.2 µm.

Como se deduce de las medidas de DLS por número de las especies dispersantes (Figura A1.6), no existieron diferencias significativas entre concentraciones de electrolito soporte entre 1-10 mM. Sin embargo, las medidas de luz dispersada por intensidad en ausencia de electrolito soporte (no NaCl) mostró que al menos es requerido un mínimo de fuerza iónica para obtener menor dispersión de tamaños (Figura A1.5, A).



Figura A1.6. Evaluación de las condiciones de medida por DLS. Se muestran los gráficos de número en función del diámetro hidrodinámico para AuNP-cit diluidas en A: agua ultrapura, B: NaCl 1 mM, C: NaCl 5 mM y D: NaCl 10 mM. En todos los casos las soluciones de NaCl fueron previamente filtradas mediante 0.2 µm.

Sección 5: Efecto del almacenamiento de las AuNP-cit

Las AuNP-cit se almacenaron a 4°C, y alícuotas de dicha solución fueron analizadas mediante DLS y UV/VIS a diferentes tiempos (hasta 50 días) para evaluar la estabilidad de la solución coloidal en el almacenamiento. En cuanto a los espectros UV/VIS, se observó un leve incremento en la absorbancia después de 50 días de almacenamiento. Los espectros normalizados que se muestran en la Figura A1.7 A, no mostraron cambios en su forma a con el tiempo de almacenamiento, lo que sugirió que no existió agregación después de 50 días dado que los espectros no mostraron ensanchamientos. Sin embargo, las medidas por DLS revelaron un incremento progresivo del diámetro medio de la población de NPs. Después de 50 días el mismo alcanzó valores de $d_{hmed} = 95 \pm 5$ nm lo que representó ≈ 400 NPs de 13 nm por agregado. Estos agregados solo evidenciables mediante DLS, solo reflejaron un leve incremento en la absorbancia debido a un incremento de la eficiencia de dispersión de la luz de la solución coloidal.



Figura A1.7. Estabilidad de las AuNP-cit en función de los días de almacenamiento. A: Espectros UV/VIS normalizados de las soluciones coloidales. B: Cambios en el *d*_{hmed} determinado mediante DLS.

Sección 6: Modificación de AuNP-cit con MUA

Análisis mediante FTIR

El análisis mediante FTIR puede ser usado para la evaluación de la modificación de la superficie de las AuNP²⁸⁵. En este caso los espectros de AuNP-MUA y AuNP-cit obtenidos en una ventana de BaF₂ fueron comparados. En relación a los compuestos parentales se esperaban señales correspondientes a los grupos carboxilato adsorbidos sobre las AuNP para el citrato ³³⁹, y no unido para el MUA, ya que este último se une a la superficie de oro vía el grupo tiol (SH) ³⁴. Sin embargo, no todos los grupos carboxilato se encuentran unidos a la superficie de las AuNP-cit, por lo que señales de carboxilato libre también pueden ser registradas. Sumado a esto, las señales asociadas a vibraciones del grupo CH₂ asociadas al

esqueleto carbonatado del MUA, también son esperables para la molécula de citrato, aunque en menor medida. Esto hace que la interpretación de las bandas vibracionales de las AuNP-cit aún sigua en debate ^{34,176,177,340}. Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron nuevas consideraciones para las señales FTIR de AuNP-cit comparadas con su compuesto parental (Figura A1.8). La banda presente en el espectro de citrato no unido asignada al estiramiento del grupo carboxilato a 1591 cm⁻¹ fue remplazada por dos bandas centradas en 1568 y 1552 cm⁻¹, correspondientes a la coordinación de moléculas de citrato en estado protonado, ^{34,340}, la más relevante de las especies de citrato al pH de trabajo al que la muestra fue tomada.

Comparado al espectro del compuesto MUA libre, el MUA adsorbido a través de su grupo SH exhibió señales correspondientes al grupo carboxilo ionizado, con bandas de absorción en 1567 cm⁻¹ (asimétrico) y 1413 cm⁻¹ (simétrico), lo cual se encontró en concordancia con la ionización esperada para este grupo debido al pH de la solución de trabajo, considerando un valor de p*K*^a de 4.0 para el MUA ²⁸⁷. Otras bandas de absorción podrían indicar la formación de una monocapa autoensamblada de MUA sobre la AuNP, como el *aleteo* de los grupos metileno a 1466 cm⁻¹ presente en el MUA libre, pero ausente en la nanopartícula ¹⁷⁹. Adicionalmente, las bandas intensas de estiramiento del enlace CH a 2918 y 2847 cm⁻¹ presentes en el MUA puro, decrecieron significativamente en intensidad y se movieron hacia 2920 y 2850 cm⁻¹, lo cual estuvo de acuerdo con la formación de dominios de moléculas de MUA adsorbidas, altamente ordenadas. Estos corrimientos han sido reportados previamente tanto para superficies de oro 2D como 3D ^{178,180}. Sin embargo, no hay que dejar de considerar que todas estas asignaciones derivaron de un análisis extremadamente detallado de bandas minoritarias en el espectro, lo cual siempre constituye un análisis complejo.

En resumen, el análisis FTIR proporcionó varias características que deben analizarse

cuidadosamente para obtener resultados relevantes para el estado de adsorción de cada molécula. La comparación de AuNP-cit y AuNP-MUA mostró diferencias mínimas que deben analizarse con mucho cuidado. Como las características generales esperadas son las mismas para todas las modificaciones analizadas (CH₂, carboxilato), la técnica de FTIR no proporcionó evidencia experimental sólida sobre la modificación de la superficie de las nanopartículas, en particular, para evidenciar las reacciones de intercambio de ligandos. Por lo tanto, el análisis FTIR podría usarse como una herramienta para demostrar la efectividad del intercambio de ligandos, dependiendo, por supuesto, de las características de IR de los agentes de protección involucrados, lo que puede requerir un análisis extremadamente detallado.



Figura A1.8. Espectros FTIR normalizados para AuNP-cit y AuNP-MUA y de los ligandos puros.

Estabilidad coloidal de AuNP-cit vs AuNP-MUA



Figura A1.9. Espectros UV/VIS para AuNP-cit (negro) y AuNP-MUA (rojo) antes (línea llena) y después (línea punteada) del agregado de NaNO₃ a una concentración final de 85 mM.

La agregación, caracterizada por un incremento de la absorción en el entorno de 650 nm y una disminución de la absorbancia en el máximo del plasmón fue evidente para de AuNPcit. Sin embargo, a una concentración de NaNO₃ similar (≈ 100 mM), las AuNP-MUA mostraron un leve incremento en la absorbancia a 650 nm, mostrando así su mayor estabilidad.

Determinación del efecto de la centrifugación y resuspensión en diferentes soluciones buffer sobre las AuNP-MUA

El procedimiento de activación de EDC/NHS se realizó en *buffer* de baja fuerza iónica. Se consideraron varias soluciones *buffer*, para finalmente seleccionar PB_{low} como el más adecuado.

En todos los casos, previo al procedimiento de activación química, las AuNP-MUA se centrifugaron 3X a 10000g durante 30 min a 4 °C y se resuspendieron en alguna de las soluciones *buffers* analizadas, a saber, *buffer* fosfato (PB, 5 mM, pH = 7.4), *buffer* PB con adición de NaCl 5 mM (PB_{low}), *buffer* MES (5 mM, pH = 5) y *buffer* MES con agregado de NaCl 5 mM (MES_{low}). Adicionalmente se analizó una solución de AuNP-MUA centrifugada y resuspendida en el mismo medio de reacción, a fin de evaluar el efecto de la centrifugación por si sola. En la Figura A1.10 se muestran los espectros obtenidos para cada una de las condiciones. En primer lugar, se destacó que la centrifugación y resuspensión en si misma generó la formación de agregados (Figura A1.10, C y A1.11, B). Cuando la resuspensión se efectuó en alguna de las soluciones *buffer* estudiadas, la formación de agregados (detectables mediante UV/VIS) fue menor, siendo apenas apreciable para el caso del *buffer* PB y PB_{low}.

Las mediciones por DLS mostraron resultados similares, evidenciando además que la presencia de NaCl 5 mM por sí sola no es capaz de generar agregados y que la ausencia total de sales también induce la agregación (Figura A1.11 C y D). En cuanto al efecto de la naturaleza de cada solución *buffer*, quedó evidenciado la formación de agregados en ambas (Figura A1.12), sin embargo, el efecto fue menor cuando se trató de PB o PB_{low}. Ante la necesidad de efectuar la reacción de activación en alguna de las soluciones *buffer* estudiadas, optamos entonces por realizarla en PB_{low}.



Figura A1.10. Espectros UV/VIS para de AuNP-MUA después de 3 ciclos de centrifugación y resuspensión. A: resuspensión en *buffer* fosfato (PB, 5 mM, pH = 7.4) sin y con agregado de NaCl 5 mM (PB_{low}); B: resuspensión en *buffer* ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES, 5 mM, pH = 5.0) sin y con NaCl 5 mM (MES_{low}); C: espectro comparativo de las AuNP-MUA antes y después de la centrifugación y resuspensión en la misma mezcla de reacción.



Figura A1.11. Determinaciones mediante DLS según intensidad de la luz dispersada para AuNP-MUA A: antes de ser centrifugadas, B: después de 3 ciclos de centrifugación/resuspensión en la misma mezcla de reacción, C: centrifugadas y resuspendidas en NaCl 5 mM y D: centrifugadas y resuspendidas en agua desionizada. En todos los casos las medidas de DLS fueron realizadas en solución NaCl 1 mM. Las líneas en rojos representan ajustes a distribuciones de tipo *logNormal*.



Figura A1.12. Determinaciones mediante DLS según intensidad de la luz dispersada para AuNP-MUA luego de ser centrifugadas y resuspendidas en *buffer* A: PB, B: PB_{low}, C: MES y D: MES_{low}. En todos los casos las medidas de DLS fueron realizadas en solución NaCl 1 mM. Las líneas en rojos representan ajustes a distribuciones de tipo *logNormal*.

Sección 7: Inmovilización covalente de Ab sobre AuNP-MUA

La Figura A1.13 muestra los espectros UV/VIS, obtenidos para activaciones de AuNPs con EDC/NHS (o s-NHS) a diferentes concentraciones. También se compara el resultado para AuNPs activadas e incubadas con Ab. Para las concentraciones de NHS y s-NHS más altas ensayadas se observó una completa agregación. Para las concentraciones intermedias (7.4 mM), las AuNPs activadas con NHS también se agregaron completamente, mientras que las incubadas con s-NHS mostraron un corrimiento en λ_{LSPR} de \approx 30 nm, lo cual sumado al aumento de FWHM y de la relación Abs520/Abs650 indicó la formación de algunos agregados. También puede evidenciarse por el color violeta de esta solución apreciado en el panel C. Este resultado fue similar para el caso de activación con NHS 3.7 mM, lo cual a priori indicó que en ningún caso de las activaciones con NHS se generó un producto AuNP-Ab estable. Para el caso de s-NHS a la concentración menor, y el corrimiento en λ_{LSPR} fue de aproximadamente 5 nm, lo cual fue coherente con la posible modificación de la superficie por la unión del Ab. Sin embargo, idénticos resultados espectrales se obtuvieron cuando se analizaron AuNPs activadas, sin incubación con Ab.



Figura A1.13. Espectros UV/VIS luego del procedimiento de bioconjugación química. A: bioconjugación con EDC/NHS, B: bioconjugación con EDC/s-NHS, y C: aspecto de las soluciones coloidales obtenidas luego de los diferentes procedimientos de bioconjugación.

| [Ab] (µg/mL) | [s-NHS]f mM | dhmed (nm) | <i>d_h</i> (nm) intensidad | d _h (nm) número | PI |
|-----------------|----------------|------------|--------------------------------------|-------------------------------|------|
| 66 | 14.8 | > 1,000 | 109 ± 17 > 1,000 | 79 ± 8 | 0.52 |
| 66 | 7.4 | 207 ± 4 | 66 ± 9 301 ± 20 | 61 ± 4 | 0.30 |
| 66 | 3.7 | 133 ± 2 | 50 ± 13 221 ± 26 | 46 ± 11 | 0.25 |
| 0 | 7.4 | 119 ± 2 | 49 ± 11 178 ± 17 | 44 ± 12 | 0.22 |
| 0 | 3.7 | 128 ± 2 | 43 ± 6 203 ± 31 | 40 ± 5 | 0.27 |

 Tabla A1.3. Diámetros determinados por DLS para la reacción de inmovilización covalente empleando

 EDC/s-NHS a diferentes concentraciones.

Sección 8: Inmovilización no covalente de Ab sobre AuNPs



Espectros UV/VIS durante la incubación de AuNP-cit y AuNP-MUA con Ab

Figura A1.14. Espectros UV/VIS de AuNP-cit (A) y AuNP-MUA (B) durante la absorción de Ab.



Evolución temporal del d_h en la incubación de AuNP-cit y AuNP-MUA con Ab

Figura A1.15. Evolución temporal de los *d*^{*h*} determinados por DLS durante la incubación con Ab para AuNP-cit (negro) y AuNP-MUA (rojo). A: Valores de *d*^{*h*} por intensidad y B: por número.



Figura A1.16. Ensayo de movilidad electroforética para AuNP-MUA y AuNP-cit 60 min y 24 hs después de la adsorción de Ab. Vista completa.

Estudio del efecto de la concentración de Ab y pH de incubación

El efecto de la concentración de Ab y el pH en el proceso de adsorción en AuNP-cit fue insignificante, como se evidenció en la constancia en la relación Abs₅₂₀/Abs₆₅₀ nm a 140 mM NaCl (Figura A1.17, A). Sin embargo, para AuNP-MUA-Ab, la relación de absorbancia disminuyó tanto con la concentración de Ab como con el pH (Figura A1.17, B). Por encima de pH 8.5 las AuNP-MUA-Ab formadas presentaron menor estabilidad lo que provocó que

se generaran agregados luego de la adición de NaCl, como lo reveló la disminución en la relación de Abs₅₂₀/Abs₆₅₀. En este caso, se argumentó que se produjo una débil o nula adsorción de Ab. Teniendo en cuenta que MUA se encontraría ionizado a este pH ²⁸⁷, y que el punto isoeléctrico típico de Ab monoclonales se encuentran en el rango de 7.6 a 9.5 ³¹⁰, es razonable suponer que la repulsión electrostática entre Ab y AuNP-MUA dificultó la adsorción. En consecuencia, en el caso de AuNP-cit, la adsorción de Ab desplazó a las moléculas de citrato, de acuerdo con la menor energía de unión de este ligando a la superficie de AuNP.



Figura A1.17. Efecto del pH y concentración de Ab durante la adsorción física de Ab sobre AuNP-cit (A) y AuNP-MUA (B) evaluado luego del agregado de NaCl a una concentración final de 140 mM.

Evaluación electroquímica de diferentes pasos de modificación de AuNP-cit

Otra forma de corroborar los cambios en la superficie de las nanopartículas consistió en adsorber las diferentes nanopartículas en superficies de electrodos de oro y observar cómo su presencia afectó la capacidad del sistema electroquímico para transferir electrones a las especies de hexacianoferrato(III) en solución. Dicha capacidad se evaluó a través de la determinación experimental de $\Delta E_{\rm P}$, que se relaciona con la tasa heterogénea de transferencia de carga, k_0 ³⁴¹.

Luego de la deposición de las diferentes soluciones de AuNP, para todas las modificaciones de electrodos, se observan corrientes tanto anódicas como catódicas asociadas al sistema redox de hexacianoferrato (III)/(II), lo que indicó que el proceso de transferencia de carga no fue completamente bloqueado. La deposición de AuNP-cit se reflejó en un ligero aumento en la corriente medida (Figura A1.18), de acuerdo con una mayor área electroactiva producida por la adsorción de AuNPs, y con una disminución marginal en el valor de k_0 . Curiosamente, los AuNP modificados con Ab mostraron un aumento en ΔE_P y una fuerte disminución en k_0 (Tabla 1.2), lo que indicó que la voltamperometría cíclica se puede utilizar como una técnica informativa para evaluar el evento de bioconjugación. En todos los casos, el parámetro ΔE_P se pudo determinar fácilmente con un error asociado por debajo del 5 %.



Figura A1.18. Respuesta voltamperométrica de los nanosistemas adsorbidos sobre un electrodo serigrafiado en oro de área geométrica 0.126 cm². La flecha indica la dirección de la exploración de voltaje inicial a 0.050 V s⁻¹.

Sección: 9 Inmovilización de proteína A/G, BSA y estreptavidina sobre AuNP-cit



Figura A1.19. Espectros UV/VIS de AuNP-cit antes y después de la incubación con diferentes proteínas durante 24 hs.


Figura A1.20. Ensayo de movilidad electroforética para AuNP-cit conjugada a MUA, y las proteínas BSA, A/G, Strp (200 µg/mL), Ab (66 µg/mL). Adicionalmente se muestra un carril sembrado con AuNPs no modificadas. Los restantes carriles corresponden a duplicados o siembras fallidas.



Figura A1.21. Fotografía del estado de las columnas luego del pasaje de AuNP-cit, AuNP-cit-Strp o AuNP-cit-BSA, A/G, Ab.

Estudio del efecto de la estreptavidina sobre AuNP-cit

La incubación con Strp mostró formación de agregados de AuNPs, que aumentan con el tiempo de incubación. Bajo estos resultados se hipotetizó que la solución comercial de Strp (~55 *k*Da, 1 mg/mL, Santa Cruz Biotechnology) podría contener algún agente no declarado que indujera la agregación de las AuNPs. Sin embargo, no se logró obtener más información al respecto luego de consultar al proveedor. En la hoja de datos se manifiesta que el pH de la solución de Strp comercial obtenida luego de resuspender en agua ultrapura resulta en un valor de 9, pero no se declaró la solución *buffer* empleada. Considerando esto,

y sumado a la tendencia de la Strp de formar agregados multiméricos ³¹¹, se ensayó con soluciones de Strp preparadas en solución *buffer* carbonato (BC, $HCO_{3^{-}}/CO_{3^{2^{-}}}$ 10 mM, NaCl 150 mM, pH = 9) a diferencia de los ensayos previos realizados en PBS (NaH₂PO₄/ Na₂HPO₄ 10 mM, NaCl 150 mM, KCl 2 mM, pH = 7.4), bajo la hipótesis de que a pH menores a 8 la Strp formara agregados proteicos, que inmovilizados sobre las AuNPs induzcan la agregación de las mismas.



Figura A1.22. Espectros UV/VIS para AuNP-cit incubadas con Strp por 24 y 48 hs. Para comparación se muestra el espectro de AuNP-cit sin modificar.

Como se observa en la Figura A1.23 A, a 15 min del agregado de Strp, tanto en PBS como en BC, se observó una disminución de la relación Abs520/Abs650, lo que indicó formación de agregados. La relación fue un poco mayor para la Strp preparada en BC, sin embargo, luego de 1 h de incubación cayó aún más. Ante el agregado de NaCl, la relación se mantuvo incambiada. Paralelamente este ensayo se repitió para AuNP-cit, pero incubándose con las mismas soluciones *buffer* sin el agregado de Strp. Esto permitió descartar que el agregado de PBS o BC no indujo la agregación de AuNPs (Figura A1.23, B).



Figura A1.23. Estabilidad coloidal de AuNP-cit durante la incubación con Strp (A) o sin Strp (B). Las soluciones de Strp fueron preparadas en *buffer* PBS (rojo) o BC (negro).

Adicionalmente las soluciones de AuNP-cit-Strp (tanto preparadas con Strp-PBS o Strp-BC) se analizaron mediante SEC. En la Figura A1.24 se constató que el pequeño aumento de estabilidad observado cuando se empleó Strp preparada en *buffer* carbonato, se debió a la generación de menos agregados (o de menor tamaño), que ahora son capaces de ingresar a la columna, y eluír (a diferencia de lo que ocurre con los ensayos en PBS donde quedaron mayormente retenidos en el prefiltro). Notar que la elución en ambos casos se realizó en *buffer* PBS. Estudios adicionales serán necesarios para lograr obtener sistemas AuNP-cit-

Strp estables, sin embargo, los resultados anteriores indicaron que posiblemente el efecto sea ocasionado por la propia proteína.



Figura A1.24. Cromatogramas obtenidos para las soluciones AuNP-cit incubadas con Strp preparada en PBS (rojo) o BC (negro). La elución se realizó en ambos casos en *buffer* PBS.



Sección 10: Efecto de la centrifugación sobre AuNP-proteína (Ab y BSA)

Figura A1.25. Determinaciones DLS por intensidad para AuNP-cit-Ab antes (A) y después (B) de tres ciclos de centrifugación y resuspensión en PBS.



Figura A1.26. Determinaciones DLS por intensidad para AuNP-cit-BSA antes (A) y después (B) de tres ciclos de centrifugación y resuspensión en PBS.

Sección 11: Agregación inducida por anticuerpos



Figura A1.27. Resumen gráfico de los resultados de los ensayos de inmovilización de Ab sobre AuNP-cit y AuNP-cit-A/G, y su intento de separación por centrifugación.

Ante la imposibilidad de obtener un sistema AuNP-cit-Ab estable a la centrifugación se realizaron una serie de ensayos extra para tratar de estabilizar el sistema coloidal. En primer lugar, en un ensayo de incubación de las AuNP-cit con Ab (sin pasos de centrifugación) por largos periodos de tiempo, se observó que la agregación progresó de forma gradual como revelaron los espectros UV/VIS de la Figura A1.28. Además, fue evidente la sedimentación de agregados de AuNP, así como la adherencia a las paredes del tubo. Esto nos llevó a pensar que la centrifugación aceleró un efecto que sin embargo es intrínseco al anticuerpo o al material del tubo donde se realiza la incubación/centrifugación. En un intento adicional, se analizó la posibilidad de anclar el Ab a las AuNP-cit-A/G obtenidas previamente, empleando la capacidad de la proteína A/G de unirse a la región Fc de las inmunoglobulinas. Para ello, 500 μ L de AuNP-cit-A/G se centrifugaron (para remover restos de proteína A/G libre), resuspendieron en PBS y se incubaron con 50 μ L de Ab a una concentración de 66 μ g/mL durante 1 h a 4 °C. Luego de esto las AuNP-cit-A/G

Ab fueron centrifugadas en las mismas condiciones. Llamativamente, y pese a la estabilidad de las AuNP-cit-A/G observada anteriormente, nuevamente se observó el mismo efecto de agregación obtenido para las AuNP-cit-Ab, con lo cual una vez más se confirmó que el efecto se asoció al Ab.



Figura A1.28. Espectros UV/VIS para AuNP-cit incubadas con Ab durante 24, 48 y 72 hs. La concentración de Ab empleada fue de 66 μg/mL y las incubaciones se realizaron a 4 °C.

Para descartar que el efecto no fuera debido al anticuerpo particular empleado en la mayoría de los ensayos (anticuerpo monoclonal anti-P15, Ab, ~150 *k*Da, 200 μg mL–1, IgG1 Santa Cruz Biotechnology), se evaluó la conjugación de las AuNP-cit-A/G a otros anticuerpos, a saber: anticuerpo monoclonal de ratón anti-P16 (200 μg/mL, F-12, IgG2aκ, Santa Cruz Biotechnology) y anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD9 (200 μg/mL, C-4 IgG1κ, Santa Cruz Biotechnology).

Adicionalmente, se evaluó la estrategia de conjugación previa del anticuerpo P15 a la proteína A/G y posterior inmovilización del complejo P15-A/G sobre las AuNP-cit. Para ello sobre 50 µL de solución de proteína A/G (200 µg/mL) se adicionaron 15 µL de anti-P15 200 µg/mL (concentración final \approx 66 µg/mL) y se incubaron durante 1 h a 4°C. Luego de esto los 65 µL de solución de P15-A/G se adicionaron a 500 µL de solución de AuNP-cit-A/G y se incubaron a 4 °C por 24 hs. Luego de esto todas las soluciones AuNP-anticuerpo se centrifugaron a 10000*g*, 30 min y se resuspendieron en PBS. Como se aprecia en la Figura A1.29, para todos los casos, independientemente del anticuerpo empleado, la agregación y adherencia de las AuNP a las paredes del tubo fue detectable, incluso para la estrategia de incubación con el complejo P15-A/G.

| AG | AG | AG +P15 | AG_P15 | AG +CD9 | AG +P16 | +P15 |
|----|----|------------|--------|------------|------------|------|
| | | | | H | | |
| | P. | 9 | 0 | P | P | |

AuNP-cit + :

** AuNP-cit-AG precentrifugación.

Figura A1.29. Aspecto de las diferentes soluciones coloidales de AuNP incubadas con A/G y diferentes anticuerpos luego de ser centrifugadas.

Dado que posteriormente a los ciclos de centrifugación se observó además de la agregación y precipitación, adherencia de las AuNPs a los tubos empleados, se decidió evaluar el

posible efecto del tipo de tubo empleado y realizar las incubaciones en tubos de baja adherencia a proteínas y ADN. Se testearon:

- micro tubos de 1.5 mL (tipo *eppendorf* de polipropileno, PP),
- micro tubos de 1.5 mL, (tipo *eppendorf, ProteinLow binding*, LowProt) de polipropileno,
- micro tubos de 1.5 mL, para PCR, (DNALow binding, LowDNA) de polipropileno
- tubos cónicos tipo Falcon de 15 mL, de polipropileno.

Como se observa en la Figura A1.30, independientemente del tipo de tubo empleado la agregación/adherencia de las AuNP-cit-A/G incubadas con Ab fue significativa, indicando que existió algún tipo de interacción entre los diferentes materiales y las AuNP-Ab (En resultados previos este comportamiento no fue evidenciado para las AuNP-cit-A/G solas).



Figura A1.30. Soluciones coloidales de AuNP-cit-A/G luego de la incubación con Ab, y centrifugación en diferentes tipos de tubos.

A raíz de esta posible interacción entre las AuNP-Ab y las paredes del tubo empleado, se intentó realizar un pretratamiento previo de los mismos con solución de PBS BSA al 1 % durante 24 hs. Posteriormente se lavaron seis veces con PBS y se emplearon para realizar la incubación con Ab durante 24 hs tanto para AuNP-cit como para AuNP-cit-A/G. Para las AuNP-cit, también se evaluó el efecto de la centrifugación en tubos pretratados y no pretratados con PBS BSA.

En la Figura A1.31 se observa el resultado de estas pruebas para las AuNP-cit, donde nuevamente el efecto de agregación inducido por Ab fue evidente (Figura A1.31, C). Curiosamente se observó que las AuNP-cit (sin incubación con Ab) centrifugadas y resuspendidas en PBS, en tubos pretratados con PBS BSA fueron estables (Figura A1.31, B), lo que evidenció la unión de la BSA remanente en el tubo a las AuNP-cit. Esto confirmó que el pretratamiento de los tubos fue efectivo, pero no evitó la agregación de las AuNP en contacto con Ab.

| | A | B | C |
|---------------------------|-----------|----------|----|
| | A Charles | F | J. |
| Pretratamiento BSA | - | + | + |
| Incubación con Ab | - | - | + |
| Centrifugación post Ab | + | + | + |

Figura A1.31. Aspecto de la solución coloidal de AuNP-cit luego de la incubación con Ab y centrifugación en tubos pretratados con PBS BSA 1 %. Se muestra además el efecto de la centrifugación sobre AuNP-cit en tubos pretratados y no pretratados.

Para el caso de las AuNP-cit-A/G se realizaron ensayos similares, pero el resultado obtenido fue nuevamente desalentador. En un ensayo (Figura A1.32, A) solamente la etapa de centrifugación post-Ab se realizó en los tubos pretratados con PBS BSA, en un segundo ensayo solamente la etapa de incubación con Ab (Figura A1.32, B) y en última instancia un ensayo con todas las etapas realizadas en un tubo pretratado, es decir desde la incubación con proteína A/G (Figura A1.32, C).

| | A | В | С |
|---------------------------|---|---|---|
| | | | |
| Pretratamiento BSA | + | + | + |
| Incubación con AG | - | - | + |
| Incubación con Ab | - | + | + |
| Centrifugación post Ab | + | + | + |

Figura A1.32. Aspecto de la solución coloidal de AuNP-cit-A/G luego de la incubación con Ab y centrifugación en tubos pretratados con PBS BSA 1 %.

Sabiendo que la agregación es un fenómeno que se ve favorecido a bajas temperaturas y considerando que todas las incubaciones previas se realizaron a 4 °C, se evaluó la posibilidad de realizar las mismas a 37 °C. Para ello las AuNP-cit se incubaron con Ab por 24 hs en un baño termostatizado. Paralelamente también se realizó el mismo ensayo a 4 °C. Luego de esto, las soluciones AuNP-cit-Ab obtenidas fueron evaluadas mediante ensayo de estabilidad coloidal en placa, agregándose a 100 µL de las soluciones anteriores 100 µL de solución de NaCl 300 mM. Las relaciones de Abs520/Abs650 se determinaron antes y después del agregado de NaCl. No se observaron mejoras con la incubación a 37 °C con

respecto de la incubación a 4 °C, de hecho, la inestabilidad de los complejos AuNP-cit-Ab fue mayor. Lo que se destacó de los resultados, resumidos en la Figura A1.33 fue que la estabilidad del sistema AuNP-cit-Ab ya se encontró comprometida antes de la adición de NaCl (es decir solamente a partir del agregado de anticuerpo), y no empeoró luego del aumento de fuerza iónica. Comparativamente las AuNP-cit, como era de esperarse si mostraron una fuerte agregación por fuerza iónica. Considerando estos resultados pudimos evidenciar que los agregados AuNP-cit-Ab fueron estables frente al agregado de NaCl, con lo cual entonces, la inestabilidad observada puede ser debida a la formación de agregados por la interacción inespecífica de los Ab unidos entre sí.



Figura A1.33. Ensayos de estabilidad para la incubación de AuNP-cit con Ab a 4 °C y 37 °C. En todos los casos se registró la relación Abs₅₂₀/Abs₆₅₀ antes (A) y después (B) del agregado de NaCl (concentración final 150 mM).

Considerando la posibilidad de la existencia de estas interacciones inespecíficas entre los sistemas AuNP-cit-Ab, se consideró evaluar el agregado de agentes disociantes de interacciones débiles como el detergente polisorbato 20 (Tween-20) o agentes comúnmente empleados en la estabilización y bloqueo de superficies expuestas como la BSA. La capacidad de unión y estabilización de la proteína BSA a las AuNP ya fue observada previamente en este trabajo, no así la del detergente Tween-20. Con esto en mente se determinó previamente (mediante ensayos de estabilidad coloidal) la cantidad mínima de BSA o Tween-20, capaz estabilizar la solución coloidal de AuNPs.



Figura A1.34. A: resultado de los ensayos de estabilidad coloidal para AuNP-cit incubadas con diferentes concentraciones de Tween-20 (% v/v). B: espectros obtenidos durante el ensayo luego del agregado de NaCl (concentración final 150 mM).

Diferentes concentraciones de BSA o Tween-20 fueron ensayadas y registrada la relación Abs₅₂₀/Abs₆₅₀ antes y después del agregado de NaCl. Los resultados de estos ensayos y los

espectros UV/VIS obtenidos luego del agregado de NaCl se muestran en la Figura A1.34 para Tween-20 y A1.35 para BSA.



Figura A1.35. A: Ensayos de estabilidad coloidal para AuNP-cit incubadas con diferentes concentraciones de BSA (μg/mL). B: Espectros UV/VIS obtenidos durante el ensayo luego del agregado de NaCl (concentración final 150 mM).

Como era de esperarse, el Tween-20 adicionado a partir de concentraciones de 0.025 % (v/v) logró estabilizar a las AuNP-cit frente al incremento de fuerza iónica, lo cual pudo explicarse por su adsorción a la superficie de la AuNP, tratándose de una molécula grande (1.227.54 g/mol) y polar con muchos grupos capaces de interaccionar con la superficie de las AuNP sea a través del citrato o desplazándolo. La concentración de 0.025 % (v/v) fue seleccionada para ensayos posteriores de incubación con Ab. Para el caso de la BSA, los resultados de la Figura A1.35 (y evidencia anterior mostrada en la Figura 1.10 A del

Capítulo 1) mostraron que a partir de soluciones de trabajo de 80 µg/mL, las AuNP-cit permanecieron estables frente al aumento de concentración de sales por lo que se empleó esta concentración para los ensayos siguientes de incubación conjunta con Ab.



Figura A1.36. Relación Abs₅₂₀/Abs₆₅₀ para AuNP-cit incubadas con Ab y Tween-20 (0.025 % v/v). En cada panel se muestra el valor de la relación inmediatamente después de 24 hs de incubación (A), luego del agregado de NaCl para una concentración final de 150 mM (B) y luego de la etapa de centrifugación (C).

A partir de los resultados de UV/VIS y DLS para la adsorción directa de Ab a las AuNP-cit (Figura 1.8 Capítulo 1 y A1.15 en este Anexo) se evidenció que la misma se produce dentro de la primera hora de incubación. Considerando que existen indicios de inestabilidad en las primeras 24 hs de incubación, se realizó la adición de BSA o Tween-20 inmediatamente después de la primera hora de incubación con Ab y luego se dejó el sistema a 4 °C por 24 hs. Luego de esto se evaluó la estabilidad coloidal mediante la relación Abs520/Abs650 luego del agregado de NaCl o posteriormente a ser centrifugado (30 min, 100 000g a 4 °C). Los resultados para las soluciones de AuNP-cit-Ab en estos ensayos con Tween-20 o BSA se muestran en la Figura A1.36 y A1.37.

En términos generales los resultados de las incubaciones con Tween-20 no mostraron efectividad a la hora de evitar la agregación de las AuNP-cit-Ab, lo que quedó de manifiesto por la baja relación Abs₅₂₀/Abs₆₅₀ obtenida antes y después del aumento de fuerza iónica. Esta relación disminuyó más luego del proceso de centrifugación como ya se había observado previamente, destacándose que las AuNP-cit incubadas únicamente con Tween-20 permanecieron estables al intento se separación. Se obtuvieron resultados similares en las incubaciones conjuntas con BSA (Figura A1.37).



Figura A1.37. Relación Abs₅₂₀/Abs₆₅₀ para AuNP-cit incubadas con Ab y BSA (80 µg/mL). En cada panel se muestra el valor de la relación inmediatamente después de 24 hs de incubación (A), luego del agregado de NaCl hasta una concentración final de 150 mM (B) y luego de la etapa de centrifugación (C).

Los mismos ensayos se repitieron para las AuNP-cit-A/G. En este caso las AuNP-cit-A/G tanto incubadas con BSA como con Tween-20 mantuvieron la estabilidad luego de 24 hs de incubación conjunta con el Ab (Figura A1.38 y A1.39, A y B). Sin embargo, luego del intento de separación por centrifugación, nuevamente se registró la pérdida notoria de estabilidad, con formación de agregados (Figura A1.38 y A1.39, C). En estudios anteriores (Figura 1.15, A, Capítulo 1) se confirmó la estabilidad de los complejos AuNP-cit-A/G luego de la centrifugación, con lo cual estos resultados evidenciaron un efecto asociado únicamente a los Ab, que se vio acelerado cuando la solución coloidal fue centrifugada, haciendo imposible su separación por este método.



Figura A1.38. Relación Abs₅₂₀/Abs₆₅₀ para AuNP-cit-A/G incubadas con Ab y BSA (80 μg/mL). En cada panel se muestra el valor de la relación inmediatamente después de 24 hs de incubación (A), luego del agregado de NaCl hasta una concentración final de 150 mM (B) y luego de la etapa de centrifugación (C).

En un último intento de hallar una solución a la agregación observada durante y luego del proceso de centrifugación, considerando el valor de potencial- ζ cercano a la neutralidad registrado para las AuNP-cit-Ab, se hipotetizó la posibilidad de estabilizar electrostáticamente el sistema, trabajando a un pH capaz de conferir carga a las moléculas de Ab. Si bien no contamos con el valor de pI del anticuerpo específico empleado en estos ensayos, datos de la literatura reportan valores de entre de 7.6 a 9.5³¹⁰ para anticuerpos monoclonales. Se trabajó entonces con solución *buffer* bicarbonato pH 10 (NaHCO₃, 0.1 M, NaCl 150 mM, pH 10). Para ello, 500 µL de las AuNP-cit-A/G se centrifugaron y resuspendieron en PBS o *buffer* bicarbonato y se realizó la incubación con Ab (50 µL, 66 µg/mL) durante 1 h a 4 °C. Luego de esto las AuNP fueron centrifugadas y resuspendidas en las mismas soluciones *buffer*.



Figura A1.39. Relación Abs₅₂₀/Abs₆₅₀ para AuNP-cit-A/G incubadas con Ab y Tween-20 (0.025 % v/v). En cada panel se muestra el valor de la relación inmediatamente después de 24 hs de incubación (A), luego del agregado de NaCl (B) y luego de la etapa de centrifugación (C).

Paralelamente se realizó el mismo procedimiento, pero sin el agregado de Ab. El efecto del cambio de pH no mostró mejoras en la estabilidad de los complejos AuNP-cit-A/G-Ab, más aún, las propias AuNP-cit-A/G mostraron una mayor inestabilidad en el *buffer* bicarbonato, no resistiendo la etapa de centrifugación (a diferencia de lo que si ocurre en PBS) como se reflejó en los valores de la relación Abs520/Abs650 mostrados en la Figura A1.40.

Ante la falta de resultados positivos en la obtención de AuNP-Ab, se decidió descartar este método de unión y emplear las AuNP-A/G como herramienta en el desarrollo de una aplicación analítica.



Figura A1.40. Relaciones Abs₅₂₀/Abs₆₅₀ para AuNP-cit-A/G, luego de las etapas de incubación con y sin Ab y centrifugación a pH 10 (B) y pH 7.4 (C). A: Se observa el resultado para AuNP-cit-A/G no centrifugadas.

<u>Sección 11: Comparación de los valores de coeficiente de absortividad molar para AuNP-</u> <u>cit-A/G y AuNP-cit-BSA</u>

De cara a ensayos funcionales con las AuNP-cit-A/G y BSA, en donde la concentración de AuNPs deberá ser determinada previamente, se estimaron los valores ε_{LSPR} para las AuNPcit-proteína frente al calculado para AuNP-cit sin modificar. La aproximación seguida fue similar a la empleada para la determinación ε_{LSPR} para las AuNP-MUA. En este caso se construyeron curvas de calibración y se realizó la comparación del valor de la pendiente resultante del ajuste lineal (la cual guarda relación con el valor de ε_{LSPR}) en cada caso con la pendiente calculada para AuNP-cit, tanto en λ_{LSPR} de AuNP-cit (522 nm) como al valor de λ_{LSPR} de las AuNP-cit-A/G y BSA (525 nm). Loa valores de ε_{LSPR} calculados se muestran en la Tabla A1.4.



Figura A1.41 Curvas de calibración para AuNP-cit, AuNP-cit-BSA y AuNP-cit-A/G obtenidas registrando la absorbancia a 522 nm (A) y 525 nm (B). 522 nm y 525 nm corresponden a la posición del máximo del plasmón para AuNP-cit y AuNP-proteína respectivamente. Las ordenadas en el origen para el rango lineal no difieren significativamente de cero (P < 0.05).

| | ε ₅₂₅ (M ⁻¹ cm ⁻¹) | ε ₅₂₂ (M ⁻¹ cm ⁻¹) |
|--------------|--|--|
| AuNP-cit | 2.0×10^8 | $2.1 \text{ x} 10^8$ |
| AuNP-cit-BSA | 1.9×10^{8} | $1.9 \text{ x} 10^8$ |
| AuNP-cit-A/G | 2.1×10^8 | $2.0 \text{ x} 10^8$ |

Tabla A1.4. Valores de coeficiente de absortividad molar para AuNP-cit, AuNP-cit-A/G y AuNP-cit-BSA a 522 nm y 525 nm.

Considerando que estos valores no difieren significativamente entre ellos (P < 0.05), es adecuado estimar la concentración de las soluciones de AuNP-cit-A/G y AuNP-cit-BSA a partir de la absorbancia a 522 o 525 nm, considerando el valor de ε_{LSPR} de las AuNP-cit.

Sección 12: Evaluación del bloqueo de las AuNP-cit-A/G con BSA

Previo a la aplicación de las AuNP-cit-A/G en sistemas de detección, se analizó el comportamiento de las AuNPs frente a la incubación con el agente de bloqueo BSA. Si bien la concentración de A/G empleada en la bioconjugación fue la máxima estudiada y las AuNP formadas mostraron gran estabilidad (lo que apoyó la idea de un porcentaje de recubrimiento alto) cabe la posibilidad de que queden sitios de oro expuesto, que ocasionen problemas de pegado inespecífico durante las aplicaciones de estas AuNPs. Adicionalmente, considerando que las AuNP-cit-A/G serán separadas de la proteína libre y que la unión se realizó por adsorción, resulta probable que algunas moléculas de A/G puedan desorberse y pasar a solución. Esto conllevó entonces a la necesidad de contar con estudios de bloqueo de posibles sitios expuestos con BSA.



C Centrifugadas

Figura A1.42. Ensayo de movilidad electroforética para AuNP-cit-A/G bloqueadas con diferentes concentraciones de BSA. Se muestran resultados para AuNP-cit-A/G no purificadas (A) y purificadas (B). A fines comparativos se sembraron en paralelo AuNPs modificadas con MUA y BSA (200 µg/mL, 24 hs).

En este sentido, las AuNP-cit-A/G (obtenidas 24 hs antes) fueron incubadas con diferentes concentraciones de BSA (de 50 a 200 μ g/mL) por 1 hora, a 4 °C. Se evaluaron tanto AuNP-cit-A/G centrifugadas como no centrifugadas y paralelamente AuNP-cit incubadas con las mismas concentraciones de BSA durante 1 h. Las soluciones obtenidas se evaluaron por electroforesis como se muestra en la Figura A1.42.

Como se observa en el gel de la Figura A1.42, A, las AuNP-cit-A/G (no purificadas) incubadas con BSA no mostraron diferencias en el patrón de migración comparadas a las AuNP-cit-A/G sin BSA. Tampoco se observaron diferencias en cuanto a las diferentes concentraciones de BSA ensayadas entre sí. Como era de esperar, las AuNP-cit-A/G sometidas a centrifugación, registraron un retraso en su migración electroforética, lo que

obedeció a la formación de algunos pequeños agregados (ya detectados por DLS). Cuando las AuNP-cit-A/G centrifugadas se incubaron con BSA (Figura A1.42 B), tampoco se apreciaron diferencias significativas con respecto a la concentración de BSA o AuNP-cit-A/G no bloqueadas. Para verificar que la BSA no fue capaz de desplazar completamente a la A/G unida (sobre todo en las AuNP purificadas) se incubaron AuNP-cit con las mismas concentraciones de BSA por 1 h. Los resultados mostrados en el gel de la Figura A1.43, demostraron que las AuNP formadas en ese caso muestran un patrón de migración dependiente de la concentración de BSA, con formación de *smearing* lo que obedeció a un recubrimiento incompleto de las AuNPs. Esto confirmó que las AuNP incubadas con A/G y bloqueadas conservaron parte de la proteína unida, aunque no fue posible confirmar por estos ensayos si la BSA fue co-inmovilizada. En el Anexo 2, se muestran ensayos por TEM con AuNPs bloqueadas y no bloqueadas La falta de bloqueo ocasionó problemas de pegado inespecífico, con lo cual se confirmó la necesidad de este paso.



O Centrifugadas

Figura A1.42. Ensayo de movilidad electroforética para AuNP-cit incubadas con diferentes concentraciones de BSA durante 1 h (carril 1 a 4, izquierda a derecha). Los carriles 5 y 6 corresponden a AuNP-cit incubadas 24 hs con BSA 200 µg/mL luego de ser centrifugadas. A fines comparativos se sembraron en paralelo AuNPs modificadas con MUA.

Sección 13: Secuencias aminoacídicas para proteína A y G.

Tabla A1.5. Secuencias aminoacídicas para proteína A y G obtenidas de la base de datos UniProt. En amarillo aparecen resaltadas las metioninas contenidas en ambas proteínas.

| | Secuencia: |
|----------|---|
| Proteína | MEKEKKVKYFLRKSAFGLASVSAAFLVGSTVFAVDSPIEDTPIIRNGGELTNLLGN |
| G | SETTLALRNEESATADLTAAAVADTVAAAAAENAGAAAWEAAAAADALAKA |
| | KADALKEFNKYGVSDYYKNLINNAKTVEGIKDLQAQVVESAKKARISEATDGLS |
| (PDB: | DFLKSQTPAEDTVKSIELAEAKVLANRELDKYGVSDYHKNLINNAKTVEGVKEL |
| 1EM7) | IDEILAALPKTDTYKLILNGKTLKGETTTEAVDAATAEKVFKQYANDNGVDGE |
| | WTYDDATKTFTVTEKPEVIDASELTPAVTTYKLVINGKTLKGETTTKAVDAETAE |
| | KAFKQYANDNGVDGVWTYDDATKTFTVTE <mark>M</mark> VTEVPGDAPTEPEKPEASIPLVP |
| | LTPATPIAKDDAKKDDTKKEDAKKPEAKKDDAKKAETLPTTGEGSNPFFTAAA |
| | LAV <mark>M</mark> AGAGALAVASKRKED |
| Proteína | MKKKNIYSIRKLGVGIASVTLGTLLISGGVTPAANAAQHDEAQQNAFYQVLN <mark>M</mark> |
| Α | PNLNADQRNGFIQSLKDDPSQSANVLGEAQKLNDSQAPKADAQQNKFNKDQ |
| | QSAFYEILN <mark>M</mark> PNLNEEQRNGFIQSLKDDPSQSTNVLGEAKKLNESQAPKADNNF |
| (PDB: | NKEQQNAFYEILN <mark>M</mark> PNLNEEQRNGFIQSLKDDPSQSANLLAEAKKLNESQAPK |
| 1BDC) | ADNKFNKEQQNAFYEILHLPNLNEEQRNGFIQSLKDDPSQSANLLAEAKKLND |
| | AQAPKADNKFNKEQQNAFYEILHLPNLTEEQRNGFIQSLKDDPSVSKEILAEAK |
| | KLNDAQAPKEEDNNKPGKEDGNKPGKEDGNKPGKEDNKKPGKEDGNKPGKE |
| | DNKKPGKEDGNKPGKEDGNKPGKEDGNKPGKEDGNKPGKEDGNGVHVVKP |
| | GDTVNDIAKANGTTADKIAADNKLADKN <mark>M</mark> IKPGQELVVDKKQPANHADANK |
| | AQALPETGEENPFIGTTVFGGLSLALGAALLAGRRREL |

Sección 14: Estimación del dh de proteínas

La estimación del valor de *d*^h para la proteína A/G se realizó mediante un ajuste a datos experimentales de radios de Stokes (R_s) para diferentes proteínas tomadas como estándares de masa molecular en gel filtración. Los datos analizados fueron tomados de 342. Adicionalmente se utilizó la herramienta disponible en línea de la compañía Fluidic *Analytics* (https://www.fluidic.com/toolkit/hydrodynamic-radius-converter/) que estima el valor de Rs tomando como dato la masa molecular de la proteína y su estado de plegamiento. Considerando una masa molar de 50.46 kDa para la proteína A/G, reportada la de datos del reactivo hoja en (https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/21186) se obtuvo un valor de R_s = 3.18 nm y $R_s = 3.12$ nm para cada aproximación respectivamente.

Para el caso de la proteína BSA (MM $\approx 66 \text{ kDa}$) se obtuvieron valores de R_s = 3.6 nm y R_s = 3.5 nm, cercanos a valores reportados en la literatura ³⁴³.



Figura A1.43. Curva de calibración de radios de Stokes (R_s) en función del logaritmo de la masa molecular (kDa). Los datos para construir la curva fueron tomados de valores reportados en ³⁴². Al pie de la gráfica se muestra la ecuación obtenida para el ajuste lineal de los datos.

Anexo 2

<u>Sección 1: Optimización del análisis de datos derivados de MRPS para la cuantificación</u> <u>de EVs</u>

Adicionalmente a este trabajo de tesis y por considerarse de relevancia en una de las aplicaciones de las AuNP que se exponen, se realizó la instalación y puesta en funcionamiento del analizador de partículas por microfluídica de pulsos resistivos (MRPS, por su sigla en inglés). Si bien la operativa del equipo es sencilla y el equipo no requiere calibración, la obtención de resultados de concentración y tamaño requiere un procesamiento ulterior de los datos recabados. A pesar de que el software de adquisición de datos licenciado con el equipo (Spectradyne Tools v.2.0.5.325) cuenta con un algoritmo preconfigurado de análisis de datos en tiempo real, con filtros precargados, en la mayoría de los casos, para determinaciones de EVs en nuestras muestras, el mismo considera como eventos reales señales asociadas a ruido eléctrico. En parte esto surge a raíz de que el tamaño medio de la población de EVs derivadas de cultivo de células U2-OS se encuentra muy cercano al límite de detección del equipo. El software cuenta con un módulo adicional (Spectradyne Viewer) que permite inspeccionar y analizar en profundidad los datos, permitiendo crear filtros ("gates" similares a los que se emplean en citometría de flujo) a partir de gráficos biparamétricos de diámetro (en nm) y transit time (t_s), o relación señal/ruido (S/N) o simetría. Estos filtros o "gates" pueden ser creados de forma poligonal o lineal. Sin embargo, la determinación de los valores más adecuados de corte para estos filtros no resultó en una tarea sencilla, por lo que se decidió realizar un análisis externo de los datos brutos previamente a la construcción de estos filtros. Inicialmente se eliminaron los filtros preconfigurados y se exportaron los datos brutos; este archivo contenía los valores de t_s, S/N y diámetro de cada evento registrado por el equipo. Estos valores se procesaron empleando el software OriginPro 2018 y se construyeron gráficos

triparámetricos de t_s vs. diámetro, tomando como tercera dimensión el parámetro S/N. En la Figura A2.1 A se ejemplifica un gráfico de este tipo para datos recabados del análisis de una muestra de vesículas extracelulares (EVs) antes del filtrado de datos.

A partir de estas visualizaciones se analizaron datos brutos de determinaciones de EVs y un blanco (PBS Tween-20 0.1 % v/v) de forma de definir los valores de corte de los tres parámetros.

Al considerar los datos de las medidas obtenidas con el blanco (Figura A2.1 B), se observó que existieron eventos que se ubicaron en una banda estrecha de diámetros (\approx 50 a 80 nm), pero que abarcaron un amplio rango de valores de t_s . Físicamente este resultado resultó inverosímil, dado que eventos correspondientes a tamaños de partícula similares no pueden registrar valores de t_s tan dispares. Por otra parte, la gran mayoría de estos eventos (fundamentalmente para $t_s \ge 80$ ns) presentaron relaciones S/N bajas. Considerando esto, se asociaron estas señales a eventos artificiales y no a partículas reales. A partir de este análisis se estableció entonces que eventos asociados a partículas reales debieran tener al menos valores de $t_s \le 80$ ns y S/N ≥ 20 . Este procesamiento paso a paso puede verse en la Figura A2.1 (A-H), tanto para los datos de una muestra de EVs como del blanco.

En los gráficos resultantes luego de este procesamiento, se observaron eventos (en la región de diámetros entre 50 y 70 nm) con relaciones $S/N \ge 20$ presentes en las determinaciones del blanco. A este punto resultó incierto si se tratan de eventos reales o artificiales, con lo cual por corresponder a eventos por debajo del límite de detección de tamaños (≈ 65 nm) reportado por el fabricante se optó por eliminarlos aplicando un filtro de diámetro ≥ 65 nm. Considerando este análisis se establecieron estos mismos valores de filtros en el *software* Spectradyne Tools, para obtener así los datos de distribución de tamaño. En la Figura A2.2 se muestran las distribuciones obtenidas antes y luego de la aplicación de cada filtro de datos tanto para el blanco como la muestra de EVs.



Figura A2.1. Gráficos de *transit time* en función del diámetro y de la relación señal/ruido. Cada panel muestra el cambio generado a medida que se establecen valores de filtrado. Se muestran comparativamente los datos medidas de una muestra de EVs y un blanco compuesto únicamente por *buffer* de corrida.

Como se observa, la aplicación del filtro S/N ≥ 20 resultó sumamente necesaria para eliminar eventos artificiales que contribuyeron fundamentalmente en la región de diámetro ≤ 100 nm. Aplicando estos filtros, por tanto, se logró reducir al mínimo la contribución del *buffer*, como se aprecia en la Figura A2.3 donde se muestra el cambio en la concentración total de partículas calculado dentro del rango de 65 a 400 nm. El valor final de concentración reportada para la muestra de EVs fue de 9,6(±0,3)x10° partículas/mL (sin considerar el factor de dilución), mientras que para el blanco se obtuvo un valor de de 7,5(±0,7)x10⁷ partículas/mL, lo que corresponde a ≈ 1 % del valor de concentración de EVs. Esto marcó la pauta que, en nuestras condiciones de trabajo, las muestras con concentraciones del orden de 10⁷ partículas/mL no pueden ser diferenciadas del ruido.



Figura A2.2. Distribución de tamaño obtenida antes (A) y después (B-D) de aplicar los diferentes valores de filtrado, para datos de muestras de EVs y PBS Tween-20 0.1 %.

Alternativamente, para evaluar este protocolo de procesamiento de los datos, se realizó el análisis de un estándar de partículas de poliestireno (suministrado por el fabricante del equipo) de diámetro medio de 150.4 nm y concentración reportada de 3x10¹² partículas/mL. Para esta determinación, una alícuota de solución de estándar se diluyó mil veces en PBS Tween-20 0.1 %; de forma de quedar comprendida entre el rango de concentraciones recomendado por el fabricante para el del *chip* c400.



Figura A2.3. Cambio en los valores de concentración calculados durante la aplicación de cada paso de filtrado para EVs y PBS Tween-20 0.1 %. 0: Datos sin filtrado, 1: *transit time* \leq 80, 2: *signal/noise* \geq 20, 3: *diameter* \geq 65 nm. La línea punteada indica la concentración final de EVs en la muestra luego de aplicados los filtros de datos.

Considerando el procedimiento de análisis de datos descripto anteriormente, se obtuvo una distribución de tamaños centrada en 151 nm para las partículas estándar, lo cual fue muy cercano al valor esperado de 150,4 nm (Figura A2.4). En cuanto a la concentración, se obtuvo un valor para la dilución de partículas estándar de (1.94±0.03)x10⁹ partículas/mL. Considerando el factor de dilución (1:1000), la concentración esperada para el estándar sería de 3x10⁹ partículas/mL.


Figura A2.4. Distribuciones de tamaño para partículas estándar (150.4 nm) y un blanco (PBS) antes (A) y después (B) del procesamiento aplicando los filtros de datos determinados previamente.

Analizando por rango de tamaños, entre 65 y 120 nm se observó que las concentraciones obtenidas son similares tanto para las partículas estándar como para el *buffer* solo, lo que reflejó la contribución de eventos artificiales en este rango de tamaños. Sin embargo, por encima de 120 nm, la contribución de los eventos del *buffer* fue despreciable (Tabla A2.1). Idealmente este análisis deberá hacerse en el futuro con estándares de tamaño comprendido en el rango entre 65 y 100 nm, para evaluar fehacientemente el efecto de eventos "artificiales" en la concentración.

| Tabla A2.1. Concentraciones determinadas por MRPS para partículas estándar y un blanco (PBS), para |
|---|
| diferentes rangos de tamaño analizados. N representa el número de eventos detectados en cada ventana de |
| rango de tamaños. |

| | Rango de tamaños (nm) | Ν | Concentración (partículas/mL) |
|----------------|--------------------------|------|----------------------------------|
| | 65-400 | 4990 | (1,94±0,03)x10 ⁹ |
| Estándar 150.4 | 65-100 | 183 | $(7,1\pm0,7)$ x10 ⁷ |
| nm | 65-120 | 388 | $(1,5\pm0,1)$ x10 ⁷ |
| | 120-400 | 4602 | (1,92±0,03)x10 ⁹ |
| | 65-400 | 238 | $(7,4\pm0,5)$ x10 ⁷ |
| | 65-100 | 193 | $(6,0\pm0,5)$ x10 ⁷ |
| PBS | 65-120 | 212 | $(6,6\pm0,6) \times 10^7$ |
| | 120-400 | 26 | $(0,8\pm0,6)$ x10 ⁷ |

Sección 2: Caracterización de EVs





Figura A2.5. Parámetros estadísticos descriptivos para las distribuciones de tamaño de EVs, determinadas por nanoFCM, ExoView, TEM y MRPS. En todos los casos se emplearon EVs de células U2-OS, aisladas bajo el mismo procedimiento de purificación.

Distribución de tamaños de EVs por DLS



Figura A2.6. Distribución de tamaños obtenida mediante DLS para una muestra de EVs aisladas de cultivo de células U2-OS.

Citometría de flujo



Figura A2.7. Gráficos de dispersión obtenidos por citometría de flujo (Attune NxT), analizando la señal *forward* y *side scatter*. Se indica el *gate* determinado para seleccionar eventos asociados a EVs diluídas en PBS, antes (A) y después (B) del agregado de TritonX 100 (concentración final 10 % v/v).



Figura A2.8. Histogramas de fluorescencia obtenidos por citometría de flujo para EVs sin marca (celeste), marcadas con anti-CD81-PB o anti-CD9-PE-Cy7 (rojo), o una mezcla ambos (naranja). A: Señal de fluorescencia en el canal de Cy7-PE, B: señal de fluorescencia del canal de PB (PacificBlue). En la tabla se resumen parámetros estadísticos basados en intensidad de fluorescencia.

Análisis mediante SP-IRIS (ExoView)



Figura A2.9. Resultado de colocalización (de partícula única) para EVs analizadas mediante ExoView. En el eje x se indican los anticuerpos de captura empleados, mientras que en el eje y se muestran los anticuerpos usados para la marcación. Las combinaciones obedecen a las señales de fluorescencia captadas en simultaneo para cada EVs.

Distribución de tamaños por TEM



Figura A2.10. Evolución del % EVs marcadas en función del tamaño de las EVs analizadas. Se muestra superpuesto al histograma de distribución de tamaños de EVs obtenido por TEM (n = 381).

Sección 3: Ensayos colorimétricos para detección de EVs con AuNPs.

Se ensayaron diferentes relaciones de EV:AuNP, abarcando desde excesos de EVs de hasta 5000 veces, o excesos de AuNPs de hasta 10 veces. En ningún caso se evidenció algún cambio detectable por UV/VIS (Figura A2.11 y A2.12).



Figura A2.11. Espectros UV/VIS (400-800 nm) luego de la incubación de AuNP-cit-A/G o AuNP-cit-BSA (en diferentes concentraciones), con diferentes cantidades de EVs marcadas con anti-CD9. Las EVs se agregaron en alícuotas de 10 µL con concentraciones determinadas por MRPS. La concentración de AuNPs se indica en nM.



Figura A2.12. Relación Abs₅₂₀/Abs₆₅₀ para las diferentes condiciones de incubación de AuNP-cit-A/G y AuNP-cit-BSA con diferentes concentraciones de EVs marcadas con anti-CD9.

Tampoco se apreciaron cambios en la relación Abs₅₂₀/Abs₆₅₀ en función del aumento de la cantidad de EVs para ninguna de las concentraciones de AuNPs ensayadas (Figura A2.12). El efecto de disminución del valor de la relación en función de la concentración de AuNP ensayada se debió a que el cambio en la absorbancia a 650 nm con la dilución de AuNPs es inapreciable (debido a la inexistencia de agregados detectables espectrofotométricamente) a diferencia de lo que sucede con la absorbancia a 520 nm.



Figura A2.13. Ensayo de titulación espectrofotométrica de EVs con AuNP-cit-A/G. Se partió de 800 µL de solución de EVs ($\approx 2.5 \times 10^9$ partículas/mL) y se realizaron agregados de 20 µL de solución de AuNP-cit-A/G (≈ 10 nM) registrándose el cambio en la relación Abs₅₂₀/Abs₆₅₀.

Resultados similares se obtuvieron para ensayos de titulación mediante el agregado de AuNPs a una solución de EVs (Figura A2.13).

Los puntos correspondientes a los dos primeros agregados de AuNPs son artefactos debido a que la Abs₆₅₀ es prácticamente nula a esas diluciones de AuNPs, no así la Abs₅₂₀ nm lo que se debe a que $\varepsilon_{520} >> \varepsilon_{650}$. Sección 4: Efecto del bloqueo con BSA sobre el pegado inespecífico de AuNP-cit-BSA.



Figura A2.14. Imágenes TEM de EVs incubadas con AuNP-cit-BSA sin (A y B) y con una instancia de bloqueo de las AuNP-cit-BSA (C y D) en PBS-BSA ([BSA]f = $20 \mu g/mL$) durante 30 min. Las EVs fueron previamente incubadas con una mezcla de anticuerpos anti-CD9 y anti-CD81. Las AuNPs empleadas fueron diluidas 1/5 en el mismo PBS-BSA de bloqueo

Anexo 3

Sección1: Caracterización de la proteína SpyCatcherCys

Tabla A3.1. Secuencia aminoacídica de la proteína SpyCatcher y su versión modificada. En rojo se señala la secuencia adicionada, indicando la posición del residuo de cisteína.

| | Secuencia: |
|----------------|--|
| SpyCatcher | GSDSATHIKFSKRDEDGKELAGATMELRDSSGKTISTWISDGQ |
| | VKDFYLYPGKYTFVETAAPDGYEVATAITFTVNEQGQVTVN |
| | GKATKGDAHI |
| SpyCatcherCys(| GSDSATHIKFSKRDEDGKELAGATMELRDSSGKTISTWISDGQ |
| M) | VKDFYLYPGKYTFVETAAPDGYEVATAITFTVNEQGQVTVN |
| | GKATGDAHIGGGGSGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG |

En la Figura A3.1 se muestran resultados de caracterización de la proteína SpyCatcherCys(M) ingenierizada obtenida de forma recombinante. En A se muestra el cromatograma para obtenido durante la purificación por columnas IMAC, observándose dos picos de elución. Dado el agregado de cisteína a la secuencia de SpyCatcher, se sospechó que uno de los picos correspondería a una versión dimérica de SpyCatcherCys(D) (P1), generada a partir de la formación de un enlace disulfuro, mientras que el segundo (P2) correspondería a la versión monomérica. Para confirmar esto, se realizaron tratamientos con Ditiotreitol (DTT) a SpyCatcherCys(D), obteniéndose en el análisis mediante electroforesis una banda de peso molecular similar al de SpyCatcherCys(M), lo que confirmó que P1 se trató de una dimerización de SpyCatcher(M) (Figura A3.1 C).



Figura A3.1. A: Cromatograma obtenido mediante FPLC para la purificación de la proteína SpyCatcherCys. B: Electroforesis en gel de poliacrilamida comparando la siembra de las fracciones P1 y P2 luego de la inyección en la columna de FPLC frente a la muestra previo a la inyección. En C se observa el resultado del tratamiento con DTT de la versión dimerizada de SpyCactherCys. Resultados cedidos por el PhD. Agustín Correa.



Figura A3.2. Espectros UV/VIS luego de la adsorción sobre AuNP de A: SpyCatcher, B: SpyCatcherCys(M) y C: SpyCatcherCys(D), a diferentes concentraciones durante 1 h. En D, E y F se aprecia el **c**orrimiento del máximo de absorción observado (*λ*_{LSPR}) para las diferentes concentraciones de proteína ensayadas.



Figura A3.3. Espectros UV/VIS luego de la adsorción sobre AuNP de A: SpyCatcher, B: SpyCatcherCys(M) y C: SpyCatcherCys(D), a diferentes concentraciones durante 24 hs. En D, E y F se aprecia el **c**orrimiento del máximo de absorción observado (*λ*_{LSPR}) para las diferentes concentraciones de proteína ensayadas.



Figura A3.4. Isotermas de Langmuir para la adsorción sobre AuNP de A: SpyCatcher, B: SpyCatcherCys(M) y C: SpyCatcherCys(D), durante 1 h.



Figura A3.5. Isotermas de Langmuir para la adsorción sobre AuNP de A: SpyCatcher, B: SpyCatcherCys(M) y C: SpyCatcherCys(D), durante 24 hs.

Sección 3: Caracterización de los sistemas AuNP-SpyCatcher.



Estabilidad de los sistemas AuNP-SpyCatcher frente a diferentes ciclos de centrifugación

Figura A3.6. Espectros UV/VIS luego de cada ciclo de centrifugación y resuspensión para AuNPs incubadas con A: SpyCatcher, B:SpyCatcherCys(M) y C:SpyCatcherCys(D).



Figura A3.7. Cambio de la relación Abs₅₂₀/Abs₆₅₀ con cada ciclo de centrifugación y resuspensión para AuNPs modificadas con las diferentes variantes de SpyCatcher.



Figura A3.8. Aspecto de los tubos de baja adherencia a proteína luego de dos ciclos de centrifugación y resuspensión en PBS de las AuNPs modificadas con las diferentes versiones de la proteína SpyCatcher. En todos los casos las AuNPs fueron incubadas por 24 hs con la proteína.



Figura A3.9. Espectros UV/VIS normalizados para AuNPs incubadas 24 hs con las diferentes versiones de SpyCatcher antes y después de ser centrifugadas.

Ensayo de movilidad electroforética.

| Tabla A | 3.2. Valo | ores de | <i>R</i> ^f relativos | a AuN | P-MUA | para | AuNPs | modificada | as con | las | diferentes | variant | tes de |
|---------|------------------|-----------|---------------------------------|---------|---------|-------|-----------|-------------|--------|-----|------------|---------|--------|
| SpyCate | her ante | s (pre) y | / después (p | ost) de | ser som | etida | s a centr | rifugación. | | | | | |

| AuNP+: | Rf |
|-----------------------|------|
| MUA | 1.00 |
| SpyCatcher_post | 0.64 |
| SpyCatcher_pre | 0.75 |
| SpyCatcherCys(M)_post | 0.78 |
| SpyCatcherCys(M)_pre | 0.84 |
| SpyCatcherCys(D)_post | 0.75 |
| SpyCatcherCys(D)_pre | 0.86 |
| | |

Tabla A3.3. Valores de diámetro hidrodinámico (*d*_h) determinados por DLS para los sistemas AuNP-SpyCatcher antes de ser centrifugados.

| | $dh_{ m medio}$ | d_h (nm) | <i>d</i> _{<i>h</i>} (nm) | DI |
|--------------------|-----------------|------------|-----------------------------------|-----------|
| Pre-centrifugación | (nm) | intensidad | número | PI |
| SpyCatcher | 48±2 | 42±5 | 17±3 | 0.31±0.01 |
| SpyCatcherCys(M) | 33±5 | 28±10 | 15±5 | 0.26±0.03 |
| | 45.5 | 31±8 | 15.4 | 0.00.00 |
| SpyCatcherCys(D) | 45±7 | 142±44 | 15±4 | 0.32±0.02 |

| Tabla | A3.4. | Valores | de | diámetro | hidrodinámico | (d_h) | determinados | por | DLS | para | los | sistemas | AuNP- |
|-------|---------|-----------|-------|-------------|---------------|---------|--------------|-----|-----|------|-----|----------|-------|
| SpyCa | tcher c | después c | le se | er centrifu | gados. | | | | | | | | |

| De et e entrifere e ife | $dh_{ m medio}$ | d_h (nm) | d_h (nm) | זת |
|-------------------------|-----------------|------------|------------|-----------|
| Post-centrifugacion | (nm) | intensidad | número | PI |
| SpyCatchor | 67+10 | 51±11 | 17+4 | 0.25+0.01 |
| SpyCatcher | 67±10 | 145±136 | 1/±4 | 0.33±0.01 |
| SpyCatcherCys(M) | 44±8 | 35±7 | 16±5 | 0.28±0.04 |
| | FF . 1 4 | 26±12 | 20 + 42 | 0.22+0.02 |
| SpyCatcherCys(D) | 55±14 | 130±30 | 30±43 | 0.33±0.02 |

Espectros SERS para los sistemas AuNP-SpyCatcher



Figura A3.10. Espectros SERS para AuNPs modificadas con SpyCatcher, SpyCatcherCys(M) y SpyCatcherCys(D). Las bandas de color indican las regiones amida (I, II y III) características para proteínas y además se indican algunas señales asignadas detalladas en Tabla A3.5 de este anexo.

Tabla A3.5. Asignación e identificación de algunas bandas características en los espectros SERS de proteínas adsorbidas sobre superficies de NPs metálicas.

| ν (cm ⁻¹) | Asignación | Modo | Referencia |
|-----------------------|--------------|--|------------|
| 270 | S-Au | Estiramiento (<i>streching</i>) | 329,330 |
| 340-470 | C-N, C-S, C- | Estiramiento | 344 |
| | C-C | | |
| 536 | S-S | Estiramiento | 294 |
| 610-622 | PHE | Deformación del anillo aromático en el plano. | 294 |
| 640 | TYR | Estiramiento C-C | 297,345 |
| 637/704 | S-C | Estiramiento | 330 |
| 830-850 | TYR | Doblete ocasionado por un fenómeno de | 346 |
| | | resonancia de Fermi entre los modos respiración | |
| | | (breathing) y aleteo(bending) (fuera del plano) del | |
| | | anillo aromático. | |
| 875 | TRP | Aleteo N-H. Sensible a la formación de puentes | 294 |
| | | de hidrogeno. Vibración del anillo indol. | |
| 970-990 | C-C | Estiramiento asociado al esqueleto de la proteína. | 294 |
| | | Asociado a la presencia de hojas β. | |
| 1002 | PHE | Respiración del anillo aromático. | 294 |
| 1050 | PHE, TYR | Aleteo | 297 |
| 1177 | TYR | Refleja el grado de hidratación de la proteína | 294 |
| 1130-1140 | C-N, C-C | Estiramientos asociados al esqueleto proteico | 296 |
| 1220-1400 | amida III | Contribuciones en fase de aleteo N-H y estiramiento C-N. La intensidad se ve afectada por las cadenas laterales. La influencia del agua no se ve, por lo que es útil para determinación de estructura secundaria. 1240 cm ⁻¹ banda característica de hojas β en la estructura de la proteína. | 294 |
| 1230-1275 | TYK | Estiramiento del enlace C-O | 340 |
| 1420-1430 | COOH/COO- | Estiramiento simétrico | 297 |

| 1450 | CH ₂ | Tijereteo (scissoring) | 297 |
|-----------|-----------------|--|-----|
| 1470 | СН | Estiramiento | 347 |
| 1480-1580 | amida II | Contribuciones fuera de fase de aleteo N-H y estiramiento C-N. Suele ser muy débil salvo en condiciones de resonancia. | 294 |
| 1550 | TRP | Vibraciones asociadas al anillo indol | 294 |
| 1570 | PHE | Estiramiento del anillo aromático (fuera de fase) | 294 |
| 1604-1613 | TYR | Estiramiento de los enlaces C-C del anillo aromático | 294 |

Sección 4: Cálculo de superficie de potencial para las proteínas SpyCatcher

Para la determinación de la superficie de potencial electrostático de la proteína SpyCatcher se utilizó la herramienta Adaptive Poisson-Boltzmann Solver (APBS) la cual resuelve las ecuaciones de electrostática continua para grandes ensamblados biomoleculares. Para la herramienta realizar estos cálculos se empleó la versión on-line de (<u>https://server.poissonboltzmann.org/pdb2pqr</u>), que partiendo de la estructura en formato .PDB determina el estado de ionización de los residuos aminoacídicos de la proteína según el pH seteado y retorna un archivo .PQR (que contiene información de carga y radios atómicos) que se usa como *input* para el cálculo APBS. Los archivos generados on-line se descargaron y visualizaron con el software UCSF ChimeraX (Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics, University of California, San Francisco, Open Source). La estructura de SpyCatcher-spyTag se obtuvo del Protein Data Bank (PDB, 4MLI https://doi.org/10.2210/pdb4MLI/pdb) y fue depurada para eliminar la cadena Para el caso de la estructura de la versión de correspondiente a SpyTag. SpyCatcherCys(M), se obtuvo la predicción de la estructura terciaria de la proteína a partir de la secuencia de aminoácidos, empleando la herramienta *AlphaFold*, disponible gracias al trabajo de la comunidad en un servidor de *GoogleColab*¹⁶².



Figura A3.11. Superposición de las estructuras terciarias para SpyCatcher (PDB: 4MLI) y SpyCatcherCys(M) (predicha empleando la herramienta *AlphaFold*). La escala de colores corresponde a los valores de RMSD obtenidos al comparar las dos proteínas. La sección verde corresponde a la secuencia solo presente en la versión de SpyCatcher ingenierizada empleada en este trabajo, donde se señala la ubicación del residuo de cisteína.

Para determinar el grado de predicción de la herramienta *AlphaFold*, la estructura predicha se superpuso a la obtenida del PDB, y se realizó un análisis de desviación cuadrática media (RMSD) que compara la similaridad entre dos estructuras (Figura A3.11). Cuanto menor sea el valor de RMSD, mayor similaridad entre las estructuras (más azul). En color verde en la Figura A3.11 representa la secuencia presente en la proteína recombinante ingenierizada, pero no en la versión *wild-type* de SpyCatcher obtenida del PDB. Se señala además la ubicación de la cisteína.



Figura A3.12. Superficies de potencial determinadas mediante la aproximación APBS, para SpyCatcher (A y C) y SpyCatcherCys(M) (B y D) a pH 5 y pH 6.



Figura A3.13. Superficies de potencial determinadas mediante la aproximación APBS, para SpyCatcher (A y C) y SpyCatcherCys(M) (B y D) a pH 5 y pH 6. Rotación 180 ° con respecto a A3.12.

Sección 4: Ensayos de unión de AuNP-SpyCatcher a tGFP.



Figura A3.14. Espectros UV/VIS para A: AuNP-cit, B: AuNP-SpyCatcher, C: AuNP-SpyCatcherCys(M) y D: AuNP-SpyCatcherCys(D), antes (negro) y después (rojo) de la incubación por 1 h con tGFP.



Figura A3.15. Espectros UV/VIS normalizados para A: AuNP-cit, B: AuNP-SpyCatcher, C: AuNP-SpyCatcherCys(M) y D: AuNP-SpyCatcherCys(D), antes (negro) y después (rojo) de la incubación por 1 h con tGFP. Se destaca el corrimiento en λ_{LSPR} en cada caso.

Tabla A3.6 Área debajo de la curva de los cromatogramas de tGFP sola o incubada con AuNPs. El área se determinó en base a la intensidad de fluorescencia a 508 nm. El % de disminución del área se determinó tomando como referencia el valor de área para tGFP 400 μg/mL.

| | Área pico (IF) | % Disminución (IF) |
|------------------|----------------|--------------------|
| tGFP (400 μg/mL) | 82 | 0 |
| tGFP (25 μg/mL) | 30 | -64 |
| AuNP-: | | |
| SpyCatcher | 35 | -58 |
| SpyCatcherCys(M) | 35 | -57 |
| SpyCatcherCys(D) | 36 | -56 |
| BSA | 49 | -40 |
| citrato | 7 | -91 |

Trabajos derivados o involucrados con esta tesis

- <u>Fagúndez P</u>, Botasini S, Tosar JP, Méndez E. Systematic process evaluation of the conjugation of proteins to gold nanoparticles. Heliyon. 2021 Jun 25;7(6):e07392. doi: 10.1016/j.heliyon.2021.e07392. PMID: 34307927; PMCID: PMC8258641.
- Méndez E, <u>Fagúndez P</u>, Sosa P, Gutiérrez MV, Botasini S. Experimental evidences support the existence of an aggregation/disaggregation step in the Turkevich synthesis of gold nanoparticles. Nanotechnology. 2021 Jan 22;32(4):045603. doi: 10.1088/1361-6528/abbfd5. PMID: 33036011.