

Bitácora@ Artículos

Detección óptica ultrasensible de antígenos de relevancia en Ciencias de los Alimentos utilizando nanopartículas de plata mediante inmunoensayos

Autores: Pablo, A. Mercadal[†]; Ruben, D. Motrich^{††}; Eduardo, A. Coronado^{†*}.

[†] INFIQC, Centro Láser de Ciencias Moleculares, Departamento de Físicoquímica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.

^{††} CIBICI-CONICET, Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.

*Email: coronado@fcq.unc.edu.ar

RESUMEN

La combinación de las propiedades ópticas de las nanopartículas de plata (Ag NPs) con algunos elementos utilizados en el método estándar ELISA, uno de los inmunoensayos más ampliamente difundidos para la detección de antígenos, ha permitido en nuestros laboratorios el desarrollo de un nuevo método óptico, libre de enzimas, de bajo costo, rápido y más sensible que el ELISA, denominado IDILA (del inglés, Intensity Depletion Immuno-Linked Assay). El mismo se puede realizar directamente en dispersión coloidal, sin la necesidad de inmovilizar el anticuerpo específico de captura en una placa o la utilización de anticuerpos secundarios y primarios sobre un sustrato. En este trabajo se demuestra la capacidad del IDILA para cuantificar antígenos de relevancia en Ciencias de los Alimentos a muy bajas concentraciones. En particular, utilizando Ag NPs de 58 nm de diámetro, describiremos cómo la técnica IDILA se puede emplear para la detección ultrasensible de gliadina, proteína a la que son sensibles las personas con enfermedad celíaca. Los resultados de los experimentos realizados se comparan con ELISA sándwich, la técnica estándar homologada por el codex alimentarius, demostrando que el IDILA es casi 1000 veces más sensible que el ELISA, teniendo también límites de detección más bajos.

Utilizando las condiciones apropiadas, el IDILA demuestra que es capaz de detectar concentraciones femtomolares del antígeno, además de ser robusto, confiable, de bajo costo, rápido (alrededor de 2 horas) y de fácil implementación utilizando el equipo estándar y los reactivos biomoleculares utilizados para el ELISA.

PALABRAS CLAVES

Nanopartículas Plasmónicas – Bioconjugación – Sensor – Inmunoensayo – IDILA – ELISA – Gliadina - Enfermedad Celíaca - Tecnología de los Alimentos

ABSTRACT

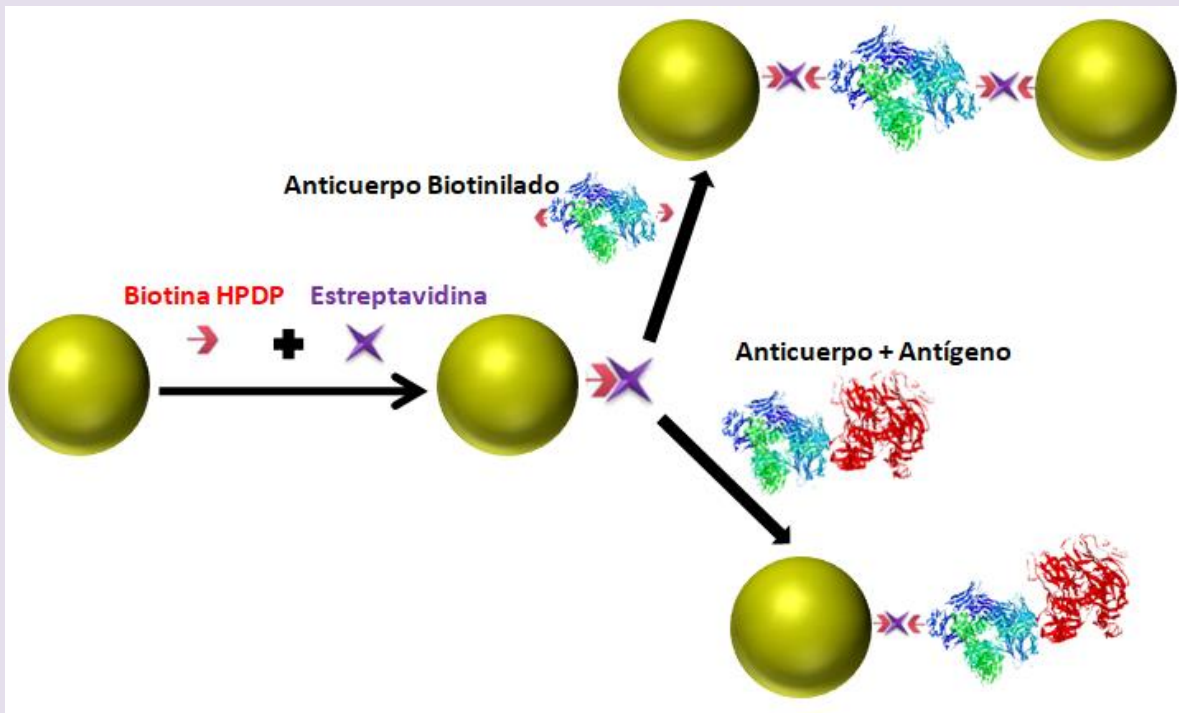
The combination of the optical properties of silver nanoparticles (Ag NPs) with some elements commonly used in ELISA, immunoassay widely used for antigen detection, has given rise to an enzyme-free, low cost, fast and more sensitive optical method developed by our group denoted as Intensity Depletion Immuno-linked Assay (IDILA). IDILA can be performed directly in colloidal dispersion without any immobilization of the capture antibody, antigen, or secondary and primary antibodies on a substrate. The capabilities of the method for quantifying antigens at ultralow concentrations in colloidal dispersions as well as its robust performance are demonstrated for specific antigens of importance in food chemistry. In this work, using conveniently functionalized 58 nm diameter Ag NPs, we describe how the application of the IDILA methodology can be used for the ultrasensitive detection of gliadin, a protein to which people bearing celiac disease are sensitive. Results of the experiments performed were compared with ELISA, the standard technique approved by the codex alimentarius, demonstrating that the IDILA assay is ~1000 times more sensitive than ELISA, and also with a lower detection limit.

Using the appropriate conditions, the IDILA assay has shown to be able to detect femtomolar concentrations of the antigen, besides of being robust, reliable, cheap, fast (around 2 hours) and of easy implementation using the standard equipment and biomolecular reagents used for ELISA.

KEYWORDS

Plasmonic Nanoparticles – Bioconjugation – Sensing – Immunoassay – IDILA – ELISA - Gliadin - Celia Disease - Food Technology.

RESUMEN GRÁFICO



INTRODUCCIÓN

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

La celiaquía o enfermedad celíaca (EC) es una enteropatía inmuno-mediada, desencadenada en individuos genéticamente susceptibles frente a la ingestión de gluten. La prevalencia estimada de la EC indica que la misma afecta al 0,5-1% de la población mundial. También se conoce que individuos con diabetes mellitus, o con trastornos autoinmunes o enfermedades de herencia familiar, son propensos a desarrollar EC, por lo que llevar a cabo un diagnóstico serológico temprano así como un tratamiento dietético de exclusión puede prevenir complicaciones severas asociadas¹. Debido a estas características, surge la necesidad de desarrollar metodologías que permitan detectar el gluten, de forma rápida y específica, en alimentos que van a ser objeto de consumo por esta porción significativa de la población.

La gliadina es la fracción soluble en alcohol del gluten y contiene la mayor parte de los componentes inmunopatogénicos para los celíacos. El consumo de productos manufacturados conlleva asumir riesgos potenciales a las personas con EC, por lo que es de fundamental importancia conocer el contenido de gluten en diversos productos alimenticios para certificar su calidad de "libres de gluten.". El gluten puede ser añadido en forma equívoca por contaminación cruzada o bien como ingrediente o aditivo, como así también por razones inherentes al proceso de fabricación. Actualmente, el contenido de gluten en un alimento se determina por medio de la técnica ELISA R5 (método de Méndez)², presentando un límite de detección de 10 mg/kg, equivalente a 0,5 % de gliadina, utilizando relativamente grandes cantidades de reactivos y requiriendo varias etapas que demandan un tiempo considerable^{3,4}.

Recientemente, los progresos efectuados en la sensibilidad de los transductores ópticos, en combinación con la especificidad, afinidad y versatilidad de las interacciones biomoleculares, ha impulsado el desarrollo de una amplia variedad de biosensores ópticos con aplicaciones en diversos campos, incluyendo el diagnóstico clínico, la ingeniería biomolecular, el diseño de fármacos, etc.⁵. Los nano-biosensores ópticos diseñados utilizando metales nanoestructurados permiten cubrir las necesidades de análisis y de alto rendimiento en el diagnóstico, debido a las propiedades ópticas que surgen de las excitaciones de las denominadas resonancias plasmónicas superficiales localizadas (LSPR, del inglés *Localized Surface Plasmon Resonance*)⁶.

Las LSPR son muy sensibles a pequeños cambios en el entorno dieléctrico alrededor de las nanoestructuras, y depende de la naturaleza del metal, tamaño y la forma de las NPs, así como del índice de refracción del medio dieléctrico que las rodea. La dependencia con el tamaño y la forma permite sintonizar la posición espectral de la LSPR en un gran intervalo de longitudes de onda desde el IR cercano, hasta el UV-Visible⁶.

Por otro lado, la miniaturización es uno de los principales aspectos que se pueden implementar para reducir el volumen de la muestra, una cuestión importante en varias pruebas de diagnóstico clínico, debido al costo de los reactivos. En este sentido, los biosensores basados en la extrema sensibilidad de la LSPR al entorno dieléctrico ofrecen una alternativa interesante para este propósito, con la ventaja adicional que sólo requiere el uso de instrumental rutinario en laboratorios de análisis clínicos. En particular, el diseño de un biosensor para realizar análisis de diagnóstico clínico, o para detectar un antígeno específico en muestras de alimentos, debería tener en cuenta las siguientes características: que sea rápido, que posea un bajo límite de

detección del analito de interés, y que su implementación sea sencilla. Estos aspectos son cruciales para el diagnóstico precoz de enfermedades, para mejorar la atención del paciente o para alertar rápidamente por la presencia de antígenos no deseados en productos para consumo humano^{7,8}.

Una de las principales estrategias utilizadas como herramienta de diagnóstico para la detección y cuantificación de antígenos o anticuerpos específicos en una muestra, es el ensayo de inmunoenlaces (ELISA, del inglés *enzyme-linked immunosorbent assay*). El ELISA se basa en el reconocimiento de un antígeno por parte de un anticuerpo específico para el mismo, y la señal generada por una enzima, fluorocromo, u otro reportero, permitiendo así la detección de cantidades muy pequeñas de antígenos en un fluido. Sin embargo, el ELISA posee ciertas limitaciones debido a que la unión no específica del antígeno a la placa o a la reacción de cambio de color mediada por enzimas, podría conducir a resultados falsos positivos⁹. Por otra parte, esta técnica utiliza cantidades considerables de reactivos en el proceso de inmovilización en la placa, incubaciones y revelado, como así también requiere de varios pasos de lavado insumiendo mucho tiempo¹⁰. Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar plataformas precisas y capaces de efectuar una cuantificación rápida y específica de antígenos en muestras clínicas, de forma rápida, económica y de fácil aplicación. En ese sentido, los ensayos basados en NPs tienen el potencial de ser usados para detectar procesos en sistemas biológicos con niveles de sensibilidad y localización sin precedentes (detección y cuantificación de receptores de membrana celular¹¹⁻¹³, estudios de procesos celulares¹⁴, generación de imágenes celulares^{15,16}, etc.), proporcionando nuevas herramientas para el diagnóstico clínico¹⁴⁻²¹.

Las NPs metálicas, especialmente de Ag y Au, presentan propiedades ópticas únicas, ya que al ser iluminadas con luz se generan las denominadas resonancias plasmónicas localizadas, que resultan de la oscilación colectiva de los electrones de la banda de conducción del metal. Como se mencionó anteriormente, la frecuencia de resonancia plasmónica puede ser sintonizada en un gran intervalo espectral, desde el UV-Vis al infrarrojo cercano, con sólo cambiar parámetros tales como tamaño, forma, espacio entre partículas y entorno químico^{6,22,23}. Además, las propiedades superficiales de las NPs metálicas son adecuadas para el desarrollo de diversas estrategias de funcionalización con biomoléculas, ya que pueden actuar como agentes de bio-reconocimiento capaces de interactuar específicamente con ciertas moléculas.

Recientemente, en nuestros laboratorios hemos desarrollado una novedosa técnica para la detección y cuantificación rápida de antígenos en muestras reales llamada IDILA (del inglés *Intensity Depletion Immuno-Linked Assay*) como una plataforma genérica, precisa y de cuantificación rápida y específica de antígenos. El ensayo IDILA se

basa en el cambio que experimenta la respuesta óptica de una dispersión coloidal de NPs de Ag al formar dímeros producidos por las interacciones de alta afinidad del complejo estreptavidina-biotina en combinación con la capacidad de reconocimiento biomolecular específica de las inmunoglobulinas. Este biosensor consiste en una aglomeración controlada (formación de dímeros de nanoesferas de Ag) en presencia de una inmunoglobulina G Biotinilada (Biot-IgG) actuando como un lazo de unión entre NPs de Ag funcionalizadas con estreptavidina-biotina. La formación de estas estructuras dimericas se evidencia experimentalmente por una disminución de la intensidad del espectro de extinción, lo cual puede ser cuantificado utilizando un espectrofotómetro UV-Visible.

Para poder racionalizar este comportamiento óptico es necesario tener en cuenta que el espectro de extinción de dímeros y monómeros sigue la misma forma espectral (teniendo en cuenta la polarización promedio de dímeros en solución y la distancia inter-partícula), pero la sección eficaz de extinción de dos monómeros aislados (sin formar dímeros) es mayor que la

sección eficaz del dímero asilado a la longitud de onda donde presentan un máximo tanto el monómero como el dímero. Por otra parte, también se observa que la concentración de partículas (monómeros más dímeros) disminuye a medida que se van formando los dímeros.

En este artículo demostramos la aplicación de esta novedosa metodología analítica ultrasensible en el área de la ciencia de los alimentos. En una primera etapa, se fabricaron Ag NPs de 58 nm de diámetro, luego se funcionalizaron con una relación molar (1:1:1) con estreptavidina (STV) y biotina (Biot). Una hora después, se agregaron diferentes cantidades de IgG-Biot específica para gliadina directamente sobre las mezclas de NPs-Biot-STV, lo que indujo la formación de estructuras diméricas. Esta reacción se evidenció espectralmente por una disminución en la intensidad del espectro de extinción. Una vez elegida la concentración IgG-Biot que más favoreció la formación de dímeros, se agregaron diferentes concentraciones del antígeno específico (gliadina) provocando la inhibición en la formación de dímeros. Esto se tradujo en una respuesta óptica diferente en el espectro UV-Vis, lo que permitió elaborar una curva de calibración. Luego, se analizaron muestras de polenta y maicena a las que se les extrajo la gliadina con una solución acuosa de etanol al 60 %²⁵. Por último, se compararon los resultados obtenidos para IDILA con la técnica ELISA homologada por el Código Alimentario Argentino²⁶.

MATERIALES

Se utilizaron los siguientes reactivos: AgNO₃ (Baker – Sigma Aldrich); Citrato de Sodio (Anedra); Ácido Ascórbico (Cicarelli); Biotina EZ-Link Biotin-HPDP (Pierce); Estreptavidina (Invitrogen); IgG policlonal de conejo biotinilado específico para gliadina (LSBio); IgG policlonal de conejo específico para gliadina de trigo (LSBio), Gliadina extraída de harina de trigo (LSBio); Buffer Salino Fosfato (PBS); Polisorbato 20 (Tween 20) (Sigma Aldrich); NeutrAvidina (Thermo Scientific); Ácido Sulfúrico; Dodecil-Sulfato Sódico (SDS); Gel de Poli(acrilamida); Buffer carbonato-bicarbonato pH 9,6 (Na₂CO₃ 1,59 g, NaHCO₃ 32,93 g, agua destilada c.s.p. 1000 ml); Solución bloqueante [albúmina sérica bovina (BSA) al 4% en PBS]; Solución diluyente (BSA al 1% en PBS); Buffer de corrida para inmunoblot (25mM Tris; 190mM glicina; 0,1% SDS a pH 8,3); TBST (Tris 50 mM, Tween 20 0,1%); sustrato de electroquimioluminiscencia para inmunoblot (Pierce).

MÉTODOS

Síntesis y caracterización de nanopartículas

La síntesis de Ag NPs se realizó mediante una ligera modificación del método de Turkevich, basado en la reducción de la sal metálica (AgNO_3) con citrato de sodio que también cumple el papel de surfactante²⁷. Se fabricaron Ag NPs con un diámetro promedio de 58 nm añadiendo a 150 mL de agua, bajo agitación magnética, 1 mL de citrato de sodio 0,01 M y 1 mL de nitrato de plata 0,01 M y luego calentando la solución hasta el punto de ebullición. Después de 15 minutos, se añadió a esta solución un volumen de 90 μL de ácido ascórbico 0,01 M hasta que se observó un color amarillo. La caracterización óptica y morfológica se realizó mediante espectroscopia de absorción UV-Visible en el intervalo de 300 a 1100 nm, microscopía electrónica de transmisión (TEM) y comparando los espectros experimentales con modelado electrodinámico utilizando teoría de Mie²⁸. Empleando las intensidades máximas de extinción experimentales y la sección transversal de extinción determinada teóricamente con la teoría Mie junto con la Ley de Beer, la concentración obtenida para las Ag NPs de 58 nm de diámetro fue 9.03×10^{-11} M. Los diámetros de las partículas se obtuvieron a partir de las imágenes TEM.

Funcionalización de las nanopartículas

Las Ag NPs se funcionalizaron con STV y Biot. Para la modificación de la superficie de las NPs, la dispersión coloidal se incubó simultáneamente con STV/Biot en una relación molar de 1:1:1, respectivamente, durante 1 hora a temperatura ambiente.

Extracción de gliadina de las muestras problema

Para la extracción de gliadina en las muestras de harina de maíz y almidón de maíz se utilizó una solución de extracción compuesta por etanol al 60% en agua. El protocolo fue el siguiente:

- (1) Se pesaron 0.25 g de una muestra previamente secada y molida del alimento a analizar, y se transfirieron a tubos de propileno de 10 mL.
- (2) Se agregaron 10 mL de una solución de etanol al 60% en agua a la muestra contenida en los tubos de propileno, incubándose por 1 hora a temperatura ambiente con un agitador rotatorio a 45 vueltas por minuto.
- (3) La muestra incubada en cada tubo fue centrifugada por 10 minutos a 2500 x g a temperatura ambiente. Luego, 1 mL del sobrenadante se transfirió a otro tubo y fue centrifugado por 5 minutos a 2500 x g a temperatura ambiente.
- (4) El sobrenadante fue transferido a tubos Eppendorf de 1.5 mL usando pipetas pasteur²⁵.

Inmunoblot

Se utilizó este método para confirmar la presencia de gliadina en las muestras analizadas 29-31. El procedimiento utilizado consistió en separar por peso molecular el complejo proteico de gliadina, extraído previamente de las muestras problema, mediante electroforesis en geles de policrilamida (12% de gel de poli(acrilamida) y un tampón de migración 25 mM BufferTris; Glicina 190 mM; SDS al 0,1%; pH 8.3). El tiempo de electroforesis fue de 2 horas a 100 V. Luego, se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa en un medio húmedo con buffer de transferencia (BufferTris 25 mM, glicina 190 mM y metanol al 20%). El tiempo de transferencia fue de 1 hora a un amperaje constante de 300 mA. Una vez concluida la transferencia, se bloquearon los sitios de unión libres incubando la membrana con una solución de BSA 4% en PBS. Posteriormente, la detección se realizó incubando la membrana con un anticuerpo primario específico para gliadina (IgG policlonal de conejo anti-gliadina) durante 12 hs. a 4 °C. Luego de lavados sucesivos con TBST (buffer Tris Tween 20 0,1%), se agregó el anticuerpo secundario (IgG de rata anti cadena γ y de conejo acoplado a la enzima peroxidasa, Thermo Scientific), efectuándose posteriormente nuevos lavados con TBST. El revelado se realizó mediante la adición del sustrato H₂O₂ y el reactivo quimioluminiscente ECL (Pierce), utilizando un equipo ODYSSEY (LI-COR Bioscience) para la determinación de la señal.

ELISA

Para la determinación de gliadina, se utilizó un ensayo ELISA sándwich (LSBio) en microplacas de 96 pocillos²⁵. Inicialmente, se sensibilizó la placa utilizando un anticuerpo primario (IgG de conejo policlonal anti gliadina) durante 12 hs. a 4°C. Luego, se realizaron 4 lavados con PBS-Tween-20 0,05% y, posteriormente se realizó el bloqueo de los sitios libres de unión con una solución de BSA al 4% en PBS durante 1 h a 37 °C. Luego, se realizaron 4 lavados con PBS-Tween 20 0,05% y seguidamente se añadieron diferentes diluciones de un patrón estándar de gliadina (LSBio) para realizar la curva de calibración. Por otro lado, se añadieron las muestras problema (extractos hidroalcohólicos de muestras de harina de maíz y almidón de maíz) utilizando diluciones seriadas 1/2. Las muestras y patrones estándares se incubaron durante 2 hs. a temperatura ambiente. Posteriormente, se efectuaron 4 lavados con PBS-Tween 20 0,05%, y se agregó el anticuerpo secundario (IgG policlonal de conejo anti-gliadina) biotinilado (LSBio), incubándolo durante 1 h a temperatura ambiente. Seguidamente, se realizaron 4 lavados con PBS-Tween 20 0,05%, y se añadió una solución de STV-peroxidasa, incubándose durante 30 min a 37 °C. Por último, se efectuaron lavados adicionales con PBS-Tween 20 0,05%, y se añadió la solución de sustrato-cromógeno [H₂O₂-Tetrametilbencidina (TMB)] deteniendo la reacción a los 10 minutos con una solución de ácido sulfúrico 5 M. La determinación de las densidades ópticas se realizó a 450 nm en un lector de microplacas de Elisa (BioRad Hercules, USA).

Espectroscopía infrarroja medida por transformada de fourier con reflectancia total atenuada

Esta técnica se usó como una herramienta alternativa para analizar si la extracción de gliadina en las muestras de alimentos analizadas (harina de maíz y almidón de maíz) fue exitosa. Los espectros de extinción se adquirieron en el intervalo de 800 a 1900 cm^{-1} con un espectrómetro Nicolet Nexus FT-IR con un accesorio espectral ATR Golden Gate Mk II con cristal de diamante. El equipo se purgó con aire seco para eliminar la contribución del vapor de agua y las muestras se dejaron evaporar en el vidrio de reflectancia para la posterior adquisición de los espectros^{32,33}.

Mediciones de extinción

La caracterización por espectroscopia UV-Vis se llevó a cabo en el intervalo de 300-1100 nm. Los espectros se obtuvieron usando un espectrofotómetro Shimadzu UV-1700 PharmaSpec con una celda de cuarzo de 1 cm de paso óptico a temperatura ambiente.

Microscopía de transmisión electrónica (TEM)

Las imágenes de TEM se obtuvieron usando un microscopio JEM-JEOL 1120 EXII bajo un voltaje de aceleración de 80 kV. Las muestras se prepararon mediante la

adición de una gota (~ 30 μL) de la solución coloidal de las muestras sobre una rejilla TEM de cobre revestida con carbono-formvar.

Dispersión dinámica de la luz (DLS)

La DLS es una técnica que generalmente se usa para determinar el diámetro de partículas en una solución o dispersión coloidal, basada en las fluctuaciones temporales de la dispersión de partículas en solución y correlacionando estas fluctuaciones con el radio hidrodinámico de las partículas. La caracterización óptica de las diferentes NPs y nanoestructuras se realizó utilizando un espectrofotómetro Delsa Nano 2.2 con una celda de cuarzo con 1 cm de paso óptico a temperatura ambiente.

Métodos computacionales

La respuesta óptica de las Ag NPs se simuló utilizando la teoría de Mie y teoría de Mie generalizada para múltiples partículas (GMM) 28,34. En todos los cálculos realizados, las NPs fueron excitadas por una onda plana con un vector de incidencia (dirección de propagación) normal a la superficie. En todos los cálculos realizados para los dímeros de Ag NPs, se consideró una distancia inter-partícula de 20 nm. La sección eficaz de extinción (σ_{Ext}) se calculó promediando las secciones eficaces de extinción obtenidas al iluminar el dímero con polarizaciones alrededor de los ejes y, x y z. $\sigma_{\text{Ext}} = \frac{1}{3}\sigma_x + \frac{1}{3}\sigma_y + \frac{1}{3}\sigma_z$. En todas las simulaciones, hemos utilizado la función dieléctrica tabulada por Palik para Ag.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La caracterización morfológica de las Ag NPs fabricadas se efectuó mediante la obtención de imágenes TEM. La Figura 1A es una imagen representativa de las NPs fabricadas donde se puede observar que las mismas tienen una geometría aproximadamente esférica y un tamaño uniforme. Previamente a su siembra en la grilla de TEM, la muestra se diluyó con el fin de no observar agregados por efecto de la evaporación del solvente. La distribución y tamaño promedio de las Ag NPs se determinó estadísticamente mediante el análisis de las imágenes TEM. La figura 1B muestra el porcentaje de distribución de tamaños obtenidos. El ajuste de esta curva a una distribución gaussiana arrojó un diámetro promedio de Ag NPs de de 58 ± 7 nm.

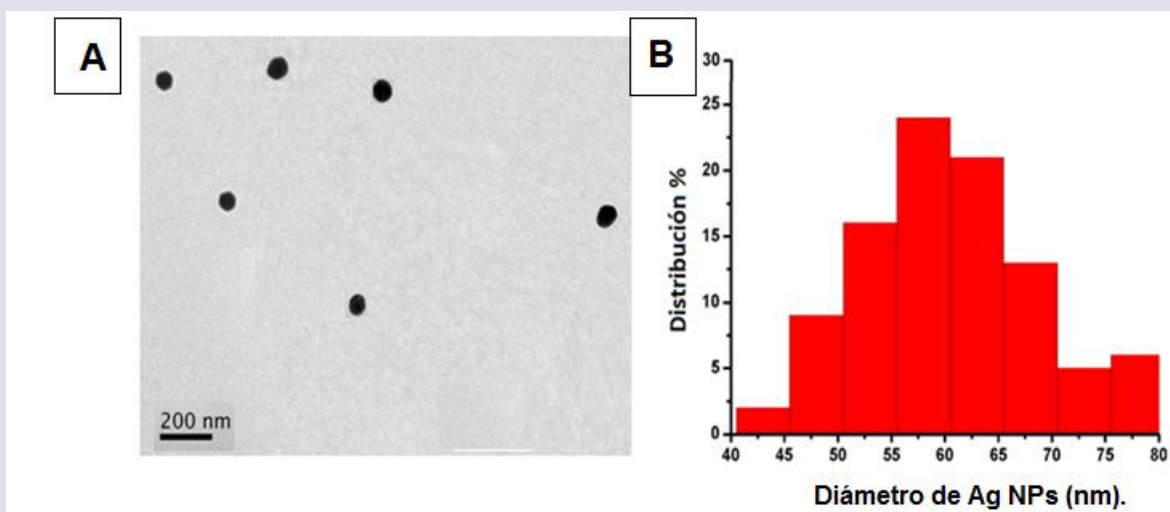


Figura 1: A. Imagen representativa de las Ag NPs fabricadas. B. Histograma de la polidispersión de Ag NPs sintetizadas por el método de Turkevich. El diámetro promedio de las Ag NPs fue de 58 ± 7 nm.

En la Figura 2, puede observarse el espectro de extinción de las Ag NPs sintetizadas (Figura 2 A, línea continua verde), conjuntamente con una imagen de TEM representativa de las mismas (Figura 2 B). El máximo del espectro de extinción se presenta a una longitud de onda 430 nm. Los cálculos de modelado, utilizando la teoría de Mie, se ajustan al espectro experimental utilizando un diámetro promedio de 58 nm (Figura 2 A, línea continua roja), en excelente acuerdo con el tamaño promedio que se determinó a partir de las imágenes de TEM. A partir del máximo de intensidad del espectro de extinción experimental (0.26), y utilizando la σ_{ext} calculada con la teoría de Mie para este diámetro (58nm), la σ_{ext} fue igual a $2,88 \times 10^{-10} \text{ cm}^2$. La concentración de Ag NPs fue determinada a partir de la ley de Beer $I(E) = \sigma_{ext} \cdot b \cdot c$, con un paso óptico de 1 cm de celda, resultando una concentración de NPs = $9,03 \times 10^{-11} \text{ M}$.

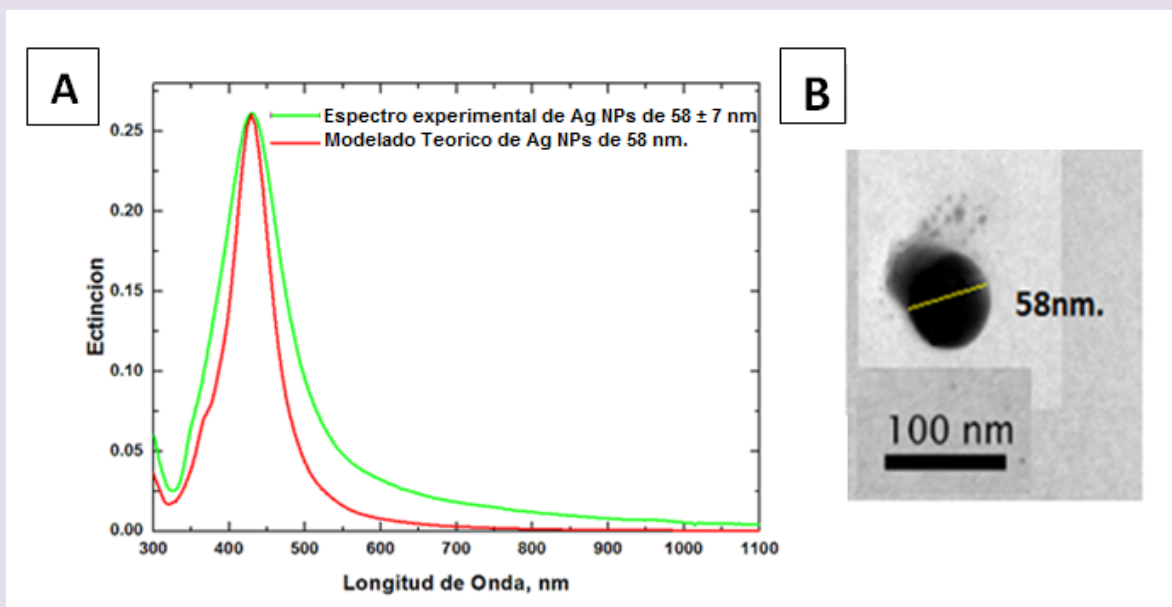


Figura 2: A. Espectro experimental y simulación electrodinámica para Ag NPS con un diámetro promedio de 58 nm. B. Imagen de TEM de una Ag NP de 58nm.

Las Ag NPs se funcionalizaron con STV-Biot utilizando una relación molar 1:1:1 Ag NPs/STV/Biot incubándose la mezcla por 1 hora. La figura 3 muestra los espectros de extinción de las nanopartículas funcionalizadas tomados a distintos intervalos de tiempo hasta un tiempo de 20 minutos. La estabilidad de las dispersiones coloidales se evidencia al no observarse cambios significativos en los espectros de extinción, ya que no cambia ni la intensidad ni desplazamiento de la posición de sus máximos durante este intervalo de tiempo.

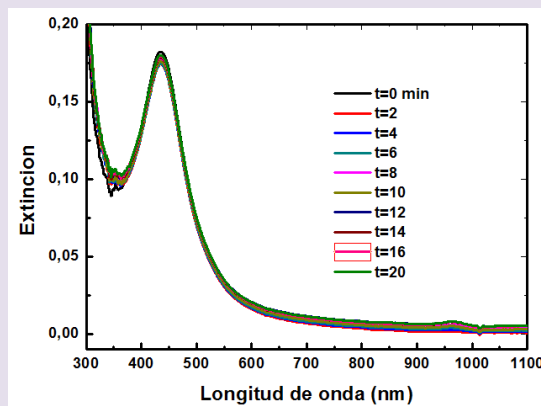


Figura 3: Estabilidad en función del tiempo de 1 mL de solución coloidal de Ag NPs de 58 nm con una concentración de $9,03 \times 10^{-11}$ M funcionalizadas con STV-Biot en relación molar 1:1:1.

Una vez funcionalizadas las Ag NPs, el siguiente paso consistió en formar aglomerados controlados (dímeros) agregando distintas cantidades del anticuerpo IgG-Biot específico para gliadina. Uno de los requisitos para poder formar las estructuras diméricas, es que el anticuerpo se encuentre biotinilado para que pueda interactuar con la STV de cada NP. La formación de dímeros de Ag NPs inducidos por la presencia de IgG-Biot se evidencia espectralmente como una disminución de la intensidad del espectro de extinción.

Para llevar a cabo la formación de dímeros, se realizaron dos tipos de experimentos. En el primer tipo de ensayos las mediciones se efectuaron utilizando las mismas microplacas que se utilizan para realizar el ensayo ELISA, mezclando en diferentes pocillos distintas concentraciones de anticuerpo IgG-Biot antigliadina llevando a un volumen de 100 μL /pocillo mediante el agregado de PBS-BSA4% y luego agregando la dispersión de Ag NPs previamente funcionalizadas hasta llegar a un volumen final de 200 μL /pocillo. La lectura de la intensidad de extinción fue tomada al cabo de 27 minutos en un lector de microplacas utilizando una longitud de onda $\lambda=450\text{nm}$. Los resultados obtenidos, que se muestran en la figura 4, evidencian que a medida que aumenta la concentración de IgG-Biot la intensidad de extinción disminuye hasta llegar a un mínimo que corresponde a una cantidad de 1 ng/mL de anticuerpo. Este tramo de la curva corresponde, al proceso de formación de dímeros. A partir de esta concentración, a medida que aumenta la cantidad de IgG-Biot también aumenta la intensidad de extinción registrada hasta llegar a una concentración de anticuerpo máxima de 5 ng/mL donde luego a partir de este valor la intensidad de extinción no cambian significativamente. En estas condiciones, la concentración de IgG-Biot es tan alta que la mayor parte de los sitios de unión disponibles de las moléculas de STV que se encuentran en la superficie de las Ag NPs están unidos a moléculas de IgG-Biot individuales, por lo que se inhibirá la formación de dímeros.

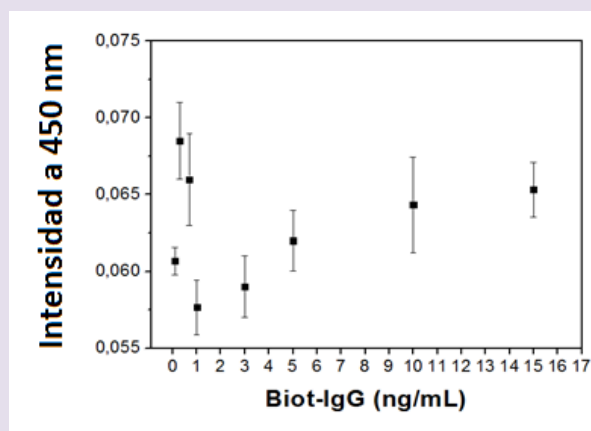


Figura 4: Variación de la intensidad de extinción de Ag NPs a una longitud de onda de 450 nm en un lector de microplacas en función de las diferentes concentraciones de IgG-Biot agregadas, al cabo de 27 minutos de transcurrida la reacción.

El segundo tipo de experimentos realizados consistió en analizar la evolución global del espectro de extinción en función del tiempo frente al agregado de distintas concentraciones de anticuerpo, utilizando un espectrofotómetro UV-Vis convencional. La cinética de dimerización se evaluó durante un tiempo de 27 minutos, utilizando para cada experimento diferentes concentraciones de anticuerpo biotinilado suplementado con PBS-BSA4% hasta llegar a un volumen de 0,5 mL y la misma cantidad de Ag NPs previamente funcionalizadas, hasta alcanzar volumen final de 1 mL. Los resultados de estos experimentos se muestran, a modo

ilustrativo, en la figura 5 A-B para dos concentraciones diferentes de anticuerpo. En ambos casos, la disminución de la intensidad de extinción evidencia la formación de dímeros, y el grado de disminución de esta intensidad de extinción depende de la concentración de anticuerpo. Cuando se emplean 1 ng/mL (Figura 5 A) y 3 ng/mL (Figura 5 B) de IgG-Biot, al cabo de 27 minutos la disminución en la intensidad del espectro de extinción es de 0,07 y 0,03 u.a., respectivamente. Esto indica que la formación de dímeros se ve más favorecida utilizando la menor concentración de anticuerpo. Este resultado está de acuerdo con lo observado en los ensayos efectuados en microplacas y su interpretación es idéntica.

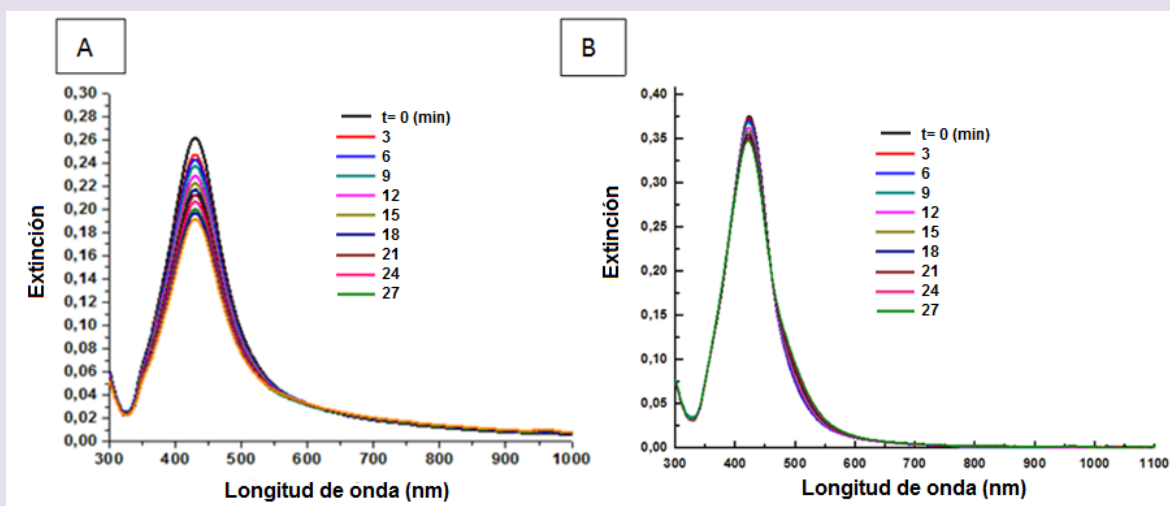


Figura 5: **A.** Evolución espectral de 0,5 mL de Ag NPs previamente funcionalizadas en presencia de 1 ng/mL de IgG-Biot anti gliadina. **B.** Evolución espectral de 0,5 mL de Ag NPs previamente funcionalizadas en presencia de 3 ng/mL de IgG-Biot anti gliadina.

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

Caracterización morfológica y óptica de las estructuras diméricas

La caracterización morfológica de las estructuras formadas luego del agregado de 1 ng/mL de IgG-Biot al cabo de 27 minutos de iniciada la reacción, se efectuó mediante TEM. Para ello, se sembró en una grilla de TEM una alícuota de la dispersión coloidal lo suficientemente diluida para evitar procesos de agregación *in situ* de las nanoestructuras formadas en la dispersión coloidal, que se podrían generar sobre la grilla por efectos de la evaporación y difusión de los agregados. En la Figura 6, se muestra una imagen TEM representativa de las nanoestructuras formadas. Se puede observar que la estructura predominante es la de dímeros de Ag NPs, con una proporción menor de nanoesferas aisladas.

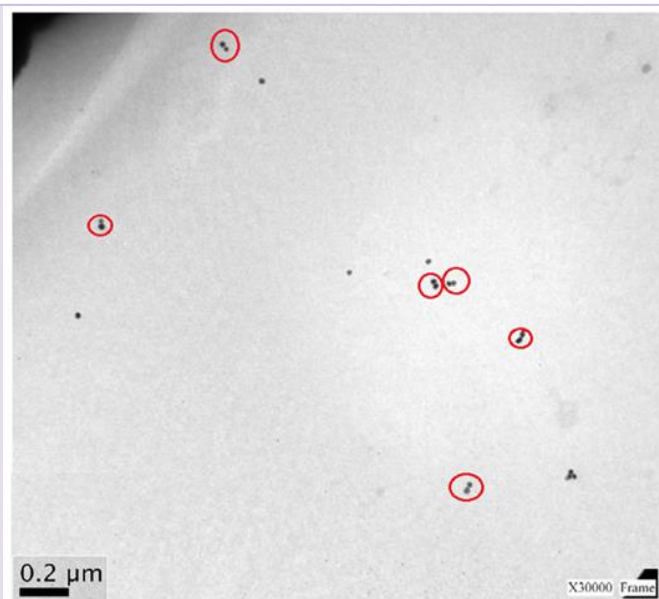


Figura 6: Imagen de TEM representativa de las nanoestructuras formadas luego de 27 minutos del agregado de 1 ng/mL IgG-Biot anti gliadina a la dispersión coloidal de Ag NPs. Nótese el predominio de estructuras diméricas frente a otros tipos de nanoestructuras (NPs aisladas, trímeros o aglomerados de mayor número de Ag NPs).

Otra información de interés que se puede obtener a partir de las imágenes de TEM, es la distancia interpartícula promedio de los dímeros formados. Como se observa en la imagen de TEM, esta distancia es del orden de 20 nm (Figura 7 A). Este resultado concuerda con la distancia que se puede estimar a partir de la geometría molecular del puente molecular que une los dímeros. En la figura 7 B, se esquematizan las distancias calculadas para el sándwich formado por las moléculas Biot-STV- Biot-IgG-STV-Biot que resulta en un valor de distancia interpartícula de ~ 20 nm en concordancia con lo determinado a partir de las imágenes de TEM de los dímeros.

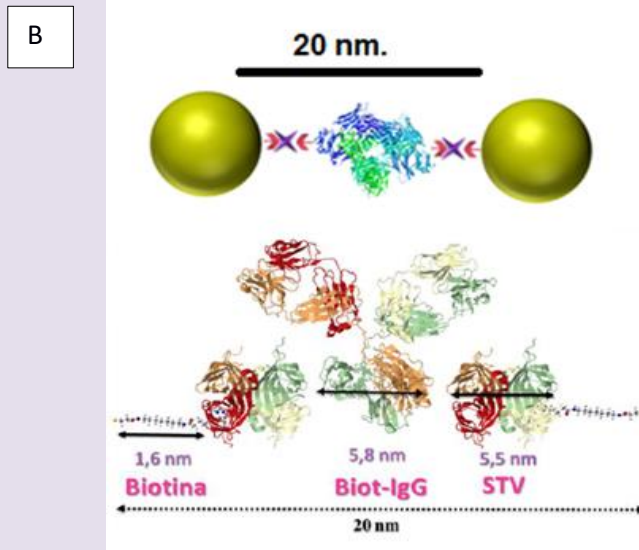
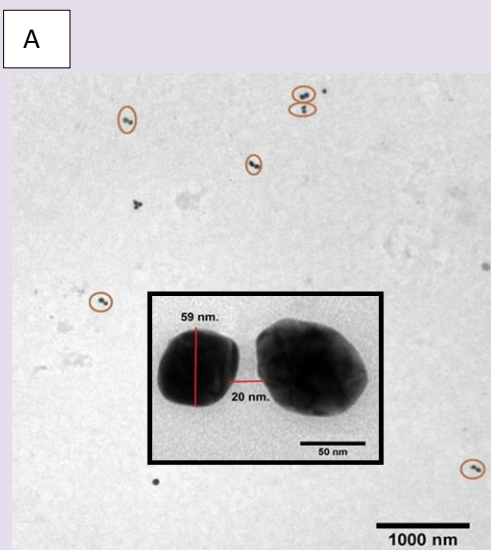


Figura 7: A. Imagen de TEM de los dímeros de Ag NPs formados luego de 30 minutos del agregado de 1 ng/mL IgG-Biot anti gliadina. **B.** Esquema de la distancia interpartícula estimada para el puente molecular que une las Ag NPs formado por el “sándwich” Biot–STV–Biot–IgG–STV–Biot.

La microscopía TEM evidencia claramente la formación de nanoestructuras diméricas de Ag NPs. Otra forma complementaria que permite verificar ópticamente la formación de dímeros pero en suspensión coloidal, es la utilización de la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS). Cabe destacar que esta técnica no permite determinar las dimensiones geométricas de las Ag NPs ya que lo que mide es el radio hidrodinámico, que está determinado por la dinámica del movimiento browniano de las Ag NPs en la dispersión. Sin embargo, permite estimar los cambios en las dimensiones promedio de las nanoestructuras formadas antes y después del agregado del antígeno. La distribución de intensidades DLS de la dispersión coloidal de Ag NPs (espectro en línea negra, Figura 8) evidencia un máximo para un diámetro promedio de 62 nm que concuerda razonablemente con el tamaño de las NPs calculado utilizando la teoría de Mie.

La distribución de intensidades DLS después del agregado de 1 ng/mL de IgG-Biot a la suspensión de Ag NPs al cabo de los 27 minutos (espectro en línea azul, Figura 8), muestra claramente un desplazamiento del máximo de la distribución hacia mayores diámetros (120 nm), lo que implica la formación de estructuras diméricas. Estos experimentos, conjuntamente con las imágenes de TEM, permiten corroborar de manera concluyente que la adición controlada de IgG-Biot induce la formación de dímeros.

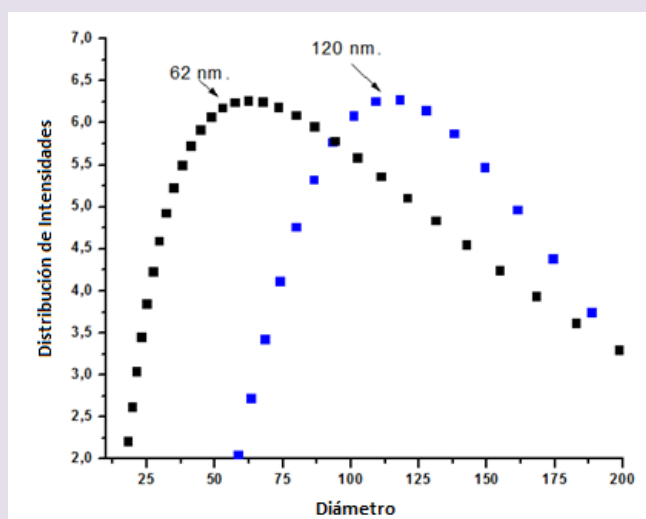


Figura 8: Espectro de la distribución de intensidad en función del diámetro de las Ag NPs. La distribución con símbolos en negro representa las Ag NPs antes del agregado del anticuerpo mientras que la distribución con símbolos azules corresponde a la obtenida a los 27 minutos del agregado de 1 ng/mL de IgG-Biot a las Ag NPs.

Comparación entre los experimentos y las simulaciones teóricas

Otra forma complementaria de corroborar e interpretar en forma rigurosa los resultados experimentales observados, es mediante la simulación teórica de los espectros de extinción obtenidos, teniendo como información los datos de las geometrías de las distintas nanoestructuras observadas, el material que las constituye y el medio en el que están inmersas.

El modelado electrodinámico se efectuó utilizando la teoría de Mie (para las Ag NPs aisladas) y la Teoría de Mie Generalizada para Múltiples Partículas (para los dímeros de Ag NPs).

En todos los cálculos se consideró que las NPs están dispersas en una mezcla de agua y PBS-BSA4% (índice de refracción promedio=1.37) y con un diámetro promedio de las NPs de 58 nm.

El primer interrogante que surge es comprender por qué la formación de dímeros produce una disminución en la intensidad del máximo del espectro de extinción. La simulación teórica utilizando la teoría de Mie para un monómero de Ag NPs se muestra en la curva negra de la Figura 9.A, dando como resultado un valor de $\sigma_{ext} = 2,88 \times 10^{-10} \text{ cm}^2$. Por otra parte, la suma de los espectros de dos monómeros de Ag NPs aislados (separados a distancias muy grandes) resulta, como es de esperar, en un valor igual al doble $\sigma_{ext} = 5,76 \times 10^{-10} \text{ cm}^2$ (línea azul de la figura 9 A). Ahora consideremos el caso en que los dos monómeros de Ag ya no se encuentran aislados sino que hay una distancia entre sus centros geométricos de 78 nm (que resulta de la siguiente suma: radio monómero 1 + distancia interpartícula + radio monómero 2 = 29 nm + 20 nm + 29 nm = 78 nm). En este caso, como la interacción entre las Ag NPs para esta distancia es relativamente débil, no se observa un desdoblamiento de la banda espectral (como se puede ver en el espectro en línea roja de la Figura 9 A). Sin embargo, la sección eficaz promedio del dímero, calculada utilizando la Teoría de Mie Generalizada para Múltiples Partículas, es de $\sigma_{Ext} 4,35 \times 10^{-10} \text{ cm}^2$. Esta sección eficaz se debe calcular tomando el promedio de las secciones eficaces para las distintas orientaciones del campo electromagnético respecto al eje que une las Ag NPs, ya que los dímeros están continuamente rotando en la dispersión coloidal. Una muy buena aproximación para calcular este promedio es ponderando las secciones eficaces para cada orientación del campo eléctrico, i.e: $\sigma_{Ext} = \frac{1}{3}\sigma_x + \frac{1}{3}\sigma_y + \frac{1}{3}\sigma_z$; donde los subíndices indican la orientación del campo eléctrico. Considerando este valor menor de la σ_{Ext} del dímero, comparada con la de los dos monómeros de Ag aislados, y teniendo en cuenta que la distancia interpartícula es lo suficientemente grande para que no se observe un desdoblamiento de la banda espectral de extinción, explica el hecho de que al estar generándose estructuras diméricas se observa una disminución en la intensidad del espectro de extinción. Otro factor adicional, es que el número total de Ag NPs disminuye debido a la formación de dímeros respecto a la concentración inicial de Ag NPs.

La comparación directa entre los experimentos (línea rosa) y los cálculos de modelado (línea verde) para el espectro de extinción de Ag NPs aisladas (sin la adición de IgG-Biot) están en excelente acuerdo, como se puede observar en la Figura 9 B, utilizando una concentración de NPs de $9,03 \times 10^{-11} \text{ M}$.

Para poder efectuar una comparación entre el espectro experimental y el modelado teórico a los 27 min del agregado de 1 ng/mL de IgG-Biot, se requiere conocer la fracción de dímeros formada a este tiempo. Para ello consideramos que dos monómeros (M) dan un dímero (D):



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

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

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

$$E_t = [NPs]_i \left(\frac{1-f_d}{1+f_d} \right) \sigma_m + [NPs]_i \left(\frac{f_d}{1+f_d} \right) \sigma_d \quad (2)$$

donde E_t es la extinción a un tiempo t , σ_m es la sección eficaz de extinción de los monómeros, y σ_d la sección eficaz de extinción de los dímeros.

Partiendo de la expresión anterior, para efectuar el cálculo, la única variable desconocida es la fracción de dímeros. Variando sistemáticamente esta fracción, hasta hacerla coincidir con la máxima intensidad de extinción experimental, se encontró que $f_d = 0,9$. Usando este valor de f_d , se puede apreciar una excelente correlación entre los cálculos de modelado (línea roja, Figura 9 B) y el espectro experimental (línea negra, Figura 9 B), obtenido a los 27 minutos luego de la adición de 1 ng/mL de IgG-Biot.

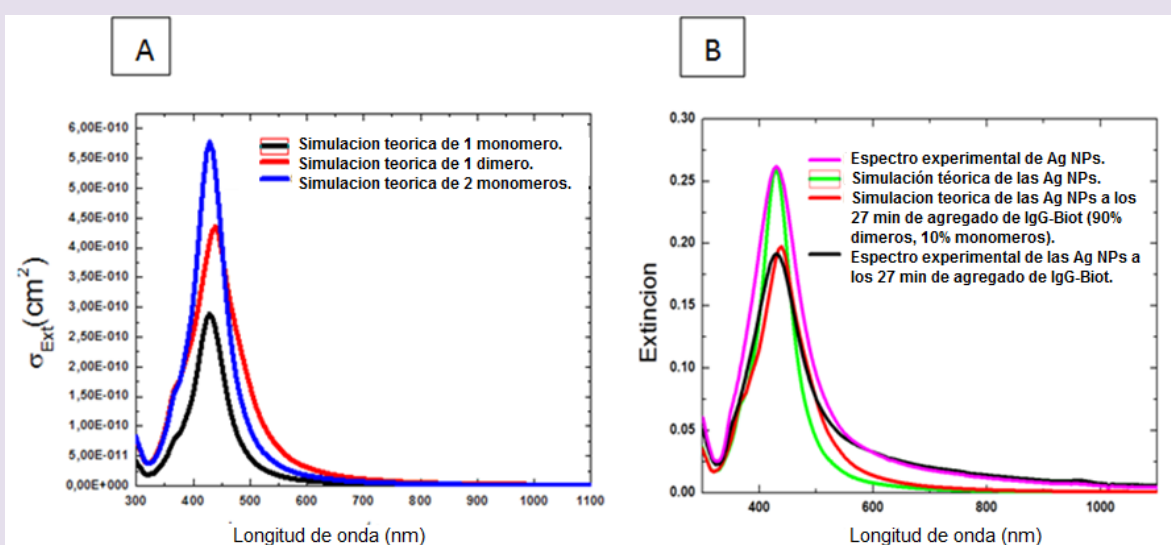


Figura 9: **A.** Modelado teórico utilizando la teoría de Mie y teoría de Mie generalizada para múltiples partículas de la sección eficaz de 1 monómero (línea negra), 2 monómeros (línea azul) y 1 dímero con polarización promediada (línea roja) que explica el fenómeno de la disminución de la intensidad de extinción cuando se forman estructuras diméricas. **B.** Simulación teórica en función de la extinción de Ag NPs y dímeros comparada con los espectros experimentales obtenidos teniendo en cuenta un 90% de nanoestructuras diméricas y un 10% de monómeros.

Inhibición de la formación de dímeros en presencia del antígeno para gliadina

En esta sección se detallará la verificación experimental sobre si la formación de dímeros se encuentra inhibida ante la presencia de un antígeno. Para ello, se realizaron experimentos tanto en presencia del anticuerpo específico para gliadina como del antígeno. La inhibición de la formación de nanoestructuras diméricas quedará evidenciada espectralmente por una menor disminución de la intensidad de extinción.

Para llevar a cabo estos experimentos, se seleccionó la concentración de 1 ng/mL de IgG-Biot y se utilizó un espectrofotómetro UV-Vis convencional, en el intervalo de 300-1100 nm con una cubeta de cuarzo con 0,5 mL de Ag NPs previamente funcionalizadas y se agregaron diferentes concentraciones de antígeno. Posteriormente, se agregó 1 ng/mL de IgG-Biot y se

completó a un volumen de 1 mL con PBS-BSA4%. La señal se midió por un tiempo de 27 minutos.

Como se analizó anteriormente, en ausencia de antígeno, se observa una disminución en la intensidad del espectro de extinción indicando la formación de dímeros, la cual es máxima a un tiempo de 27 min (Figura 10 A). Cuando el mismo experimento es llevado a cabo con el agregado de 5 pg/mL de antígeno (Figura 10 B), los resultados obtenidos indican que, aunque hay una disminución en la intensidad del espectro de extinción, la disminución de la misma a un tiempo de 27 minutos es significativamente menor comparada con el mismo ensayo realizado en ausencia de antígeno (Figura 10 A). Este hecho indica que la formación de dímeros si bien no se encuentra totalmente inhibida, se encuentra disminuida. Si el mismo experimento se efectúa con la adición de 15 pg/mL de antígeno (Figura 10 C), no se evidencian cambios significativos en la intensidad del espectro de extinción. En estas condiciones de concentración de antígeno, la formación de dímeros se encuentra totalmente inhibida.

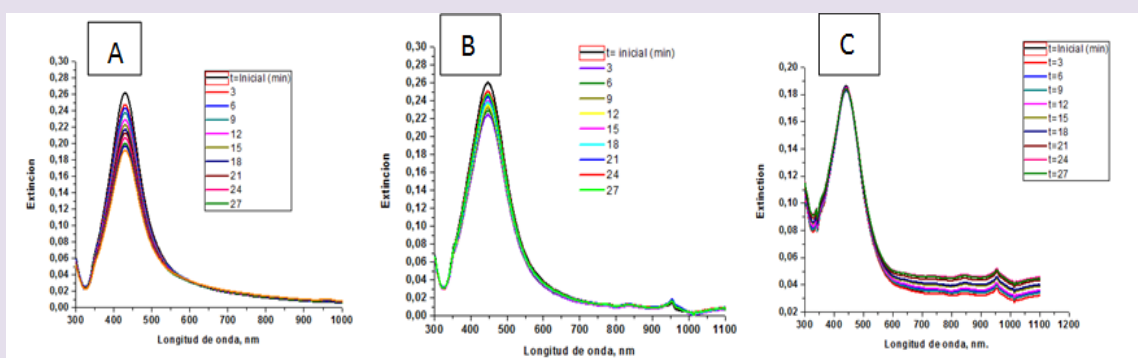


Figura 10: **A.** Evolución espectral para un tiempo de 27 minutos de Ag NPs de 58 nm previamente funcionalizadas con STV-Biot con el agregado de 1ng/mL de IgG-Biot y sin añadir antígeno. **B.** Evolución espectral para un tiempo de 27 minutos de Ag NPs de 58 nm previamente funcionalizadas con STV-Biot con el agregado de 5 pg/mL de antígeno y 1ng/mL de IgG-Biot. **C.** Evolución espectral para un tiempo de 27 minutos de Ag NPs de 58 nm previamente funcionalizadas con STV-Biot con el agregado de 15 pg/mL de antígeno y 1ng/mL de IgG-Biot.

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

La razón por la cual la presencia del antígeno inhibe la formación de estructuras diméricas constituye actualmente un objeto de estudio. No obstante, hipotéticamente se pueden considerar dos mecanismos que podrían explicar este hecho. El primer mecanismo consiste en suponer que la presencia del antígeno produce un cambio conformacional en la estructura del anticuerpo dejando a la biotina en una posición inaccesible para interactuar con la STV de la Ag NP. El segundo mecanismo plausible es suponer que la interacción antígeno-anticuerpo en una Ag NP produce un impedimento estérico que imposibilita la interacción con otra Ag NP.

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

Análisis de muestras problema

Uno de los principales objetivos en el área de desarrollo de biosensores es lograr la detección específica y ultrasensible de distintos tipos de analitos de interés que las técnicas convencionales no pueden lograr. La elección de las muestras problema se debió principalmente a dos razones. La primera fue determinar si la técnica IDILA es capaz de detectar y cuantificar gliadina en harina y almidón de maíz, donde la presencia del antígeno se debe a la contaminación de la muestra ya que se lo considera un alimento libre de gluten. La segunda razón es poner a prueba la capacidad de esta técnica para determinar concentraciones muy bajas y comparar los límites de detección de la técnica IDILA con el ensayo ELISA.

Para determinar la estabilidad de las Ag NPs en presencia de una solución hidroalcohólica al 60% y PBS-BSA4%, se realizaron ensayos mezclando 0,5 mL de Ag NPs previamente funcionalizadas con 0,1 mL de una solución de alcohol-agua al 60 % que fue suplementado con 0,4 mL de PBS-BSA4%, para llegar a un volumen final de 1,0 mL. El experimento se llevó a cabo durante 30 minutos. Como puede observarse en la Figura 11, no se apreciaron cambios en la intensidad del espectro de extinción ni tampoco desplazamientos del máximo de extinción, lo que indica que las partículas son estables frente a la presencia de etanol y buffer PBS-BSA4%. Los resultados de estos ensayos son de relevancia crucial, ya que los experimentos que se realizan en microplacas para el análisis de muestras problema utilizan ambos compuestos en cantidades proporcionalmente similares a las utilizadas en estos ensayos.

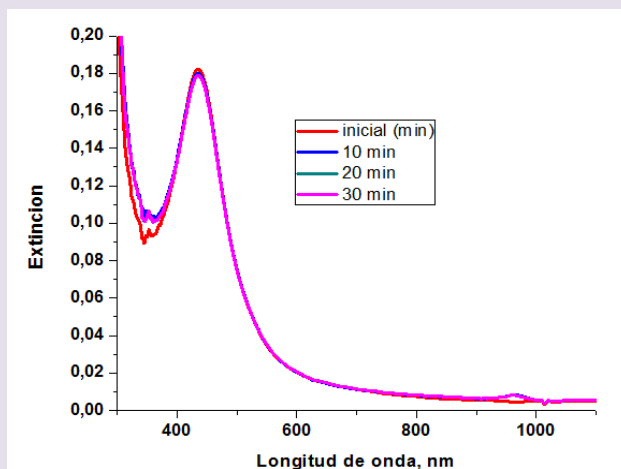


Figura 11: Espectro UV-Vis que muestra la estabilidad de Ag NPs en presencia de una solución de etanol-agua al 60%. Se utilizó un volumen de 0,5 mL de partículas 0,4 mL de PBS-BSA4% y 0,1 ml de etanol en una cubeta de plástico.

Para corroborar la extracción exitosa de gliadina de las muestras problema, se realizó un ensayo de Inmunoblot y una medición por espectroscopía Infrarroja medida por transformada de Fourier con reflectancia total atenuada (Figura 12). En la figura 12 A, se detalla la imagen obtenida a partir del Inmunoblot realizado. En la columna izquierda se encuentra el marcador de peso molecular y en las columnas siguientes distintos tipos de muestras, en particular los resultados de la extracción en muestras que son de nuestro interés como harina de maíz y almidón. En la muestra de harina de trigo, y tal como se esperaba, se puede apreciar que se detectó una fracción significativa de proteínas de un peso molecular de aproximadamente 35 KDa, que concuerda con el peso de una fracción del complejo de gliadina. Un resultado similar, pero con menores niveles de inmunomarcación, se observó para la muestra de avena arrollada.

Para las muestras de almidón y harina de maíz, esta técnica no logró detectar la presencia del complejo de gliadina debido a la baja concentración de la misma en estas muestras.

En la figura 12 B, se detalla el espectro IR-ATR obtenido una vez evaporada las muestras. En esta figura se observan las bandas amida características de las proteínas, así como la banda del almidón para las muestras de avena arrollada y harina de trigo, pero no se puede apreciar ninguna banda característica de las proteínas para las muestras de almidón de maíz y harina de maíz debido a la baja concentración de gliadina en las mismas.

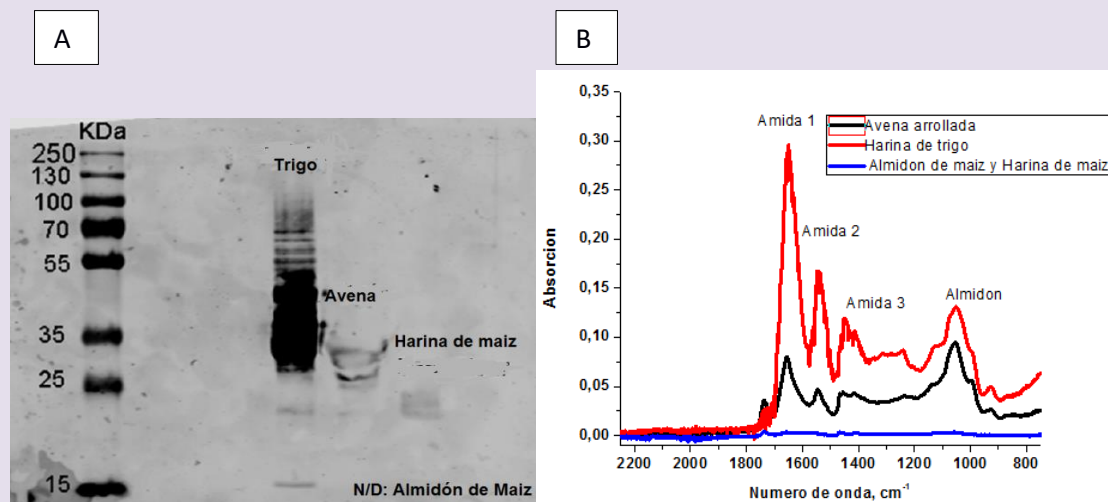


Figura 12: **A.** Inmunoblot para la determinación de gliadina. La primera columna corresponde al marcador de peso molecular, la segunda columna corresponde al extracto de harina de trigo, la tercera columna corresponde al extracto de avena arrollada, y la cuarta columna corresponde al extracto de harina de maíz, y la quinta columna corresponde al extracto de almidón de maíz (el cual fue no detectable por esta técnica). **B.** Espectro FT-IR ATR para extractos de harina de trigo, maíz, avena y almidón de maíz, donde se encuentran diferenciadas las bandas amida 1° (1650 cm^{-1}), 2° (1550 cm^{-1}), y 3° (1450 cm^{-1}), correspondiente a estructuras proteicas, y la banda del almidón (1050 cm^{-1}).

Los resultados obtenidos demuestran que el método de extracción del complejo de gliadina es eficaz en muestras de avena y trigo, mientras que para la harina de maíz y el almidón de maíz ninguna de estas técnicas es lo suficientemente sensible para determinar la presencia de gliadina ya que se espera que sean cantidades sumamente pequeñas. Por lo tanto, para cuantificar el contenido de gliadina en estas muestras se debería emplear un método con un límite de detección (LOD) muy bajo. Las técnicas IDILA o ELISA, que tienen menor LOD, serían, en principio, adecuadas para este propósito.

Ensayo de ELISA tipo sándwich

Los resultados obtenidos utilizando esta técnica se muestran en la Figura 13 y la Tabla 1. A partir de la curva de calibración, se determinó que el LOD es de $1,82\text{ ng/mL}$ de gliadina. Para calcular este valor, se utilizó la medida de intensidad de blanco más 3 desviaciones estándar. La curva de calibración se ajusta a una función lineal con un valor de desviación cuadrática media de 0,97.

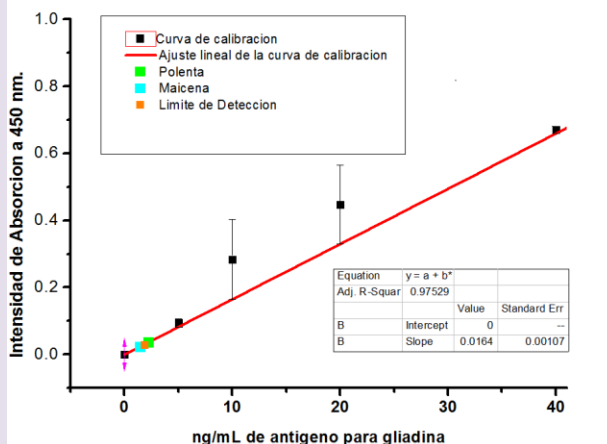


Figura 13: Curva de calibración del ensayo ELISA realizado para extractos de muestras de almidón de maíz y harina de maíz. Con un LOD de 1,82 ng/mL, se observa que los valores detectados para el extracto de almidón de maíz están por debajo del LOD y la cantidad hallada en el extracto de harina de maíz es de $2,2 \pm 0,1$ ng/mL.

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

Tabla 1: Resultados obtenidos por ensayo ELISA tipo Sándwich específico para gliadina en muestras de almidón de maíz y harina de maíz.

	ALMIDÓN DE MAÍZ	HARINA DE MAIZ
RESULTADOS	N/D	$2,2 \pm 0,1$ ng/mL. Utilizando el factor de dilución correspondiente, el mismo resulta en una concentración final de $4,5 \pm 0,7$ mg/Kg de muestra.

Ensayo IDILA

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

Como se mencionó anteriormente, para este ensayo la concentración óptima de IgG-Biot que favorece la mayor formación de dímeros es de 1 ng/mL, utilizando Ag NPs de un diámetro promedio de 58 nm con una concentración de $9,03 \times 10^{-11}$ M.

Para la construcción de la curva de calibración, se añadió una cantidad específica de IgG-Biot (1 ng/mL) por pocillo, y diferentes cantidades de antígeno (gliadina) en diluciones seriadas (con un factor de dilución de $\frac{1}{2}$). Luego se añadieron las Ag NPs previamente funcionalizadas utilizando un volumen de 100 μ L/pocillo. Posteriormente, se completó hasta un volumen final de 200 μ L/pocillo con buffer PBS-BSA4%. Finalmente, la intensidad de extinción se midió al cabo de 20 minutos de realizada la mezcla, en un lector de microplacas usando un filtro de 450 nm.

Para el análisis de las muestras problema, se añadieron una cantidad específica de IgG-Biot (1 ng/mL) por pocillo y diferentes cantidades de muestra problema, partiendo de una dilución de 1:100 de la extracción realizada en las muestras de alimentos, a la que posteriormente se le realizaron diluciones seriadas (con un factor de dilución de $\frac{1}{2}$) en cada pocillo de la microplaca. Luego, se agregó directamente la suspensión de Ag NPs previamente funcionalizadas en una cantidad de 100 μ L/pocillo, para luego completar a un volumen final de 200 μ L/pocillo con buffer PBSX-BSA4%. Posteriormente, la intensidad de extinción fue medida al cabo de unos 20 minutos de realizada la mezcla, en un lector de microplacas usando un filtro de 450 nm (Figura 14).

El blanco de reacción se realizó utilizando un volumen de 100 μ L/pocillo de una solución de 1 ng/ml de IgG-Biot hasta completar a un volumen final de 200 μ L/pocillo con buffer PBS-BSA4%.

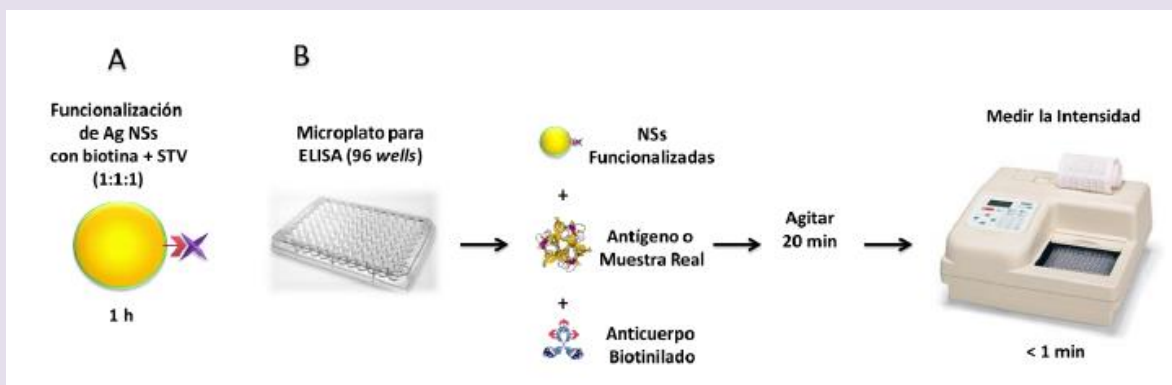


Figura 14: **A.** Representación esquemática de la estrategia de funcionalización de las Ag NPs con el sistema STV-Biot. **B.** Representación esquemática del procedimiento de la técnica IDILA. Adición de las Ag NPs funcionalizadas en una microplaca de 96 pocillos, conjuntamente con el anticuerpo biotinilado (IgG-Biot), el antígeno para realizar la curva de calibración y la muestra problema. Para la obtención de la curva de calibración, se modifica la concentración de antígeno agregado mientras la cantidad de NPs y IgG-Biot se mantienen constantes. En todos los casos el volumen final de la solución se ajusta con solución buffer hasta llegar a los 200 μ L/pocillo.

La curva de calibración en todo el intervalo de concentraciones se ajustó a una función exponencial ($I = -A_0e^{-bc} + I_0$) donde I = intensidad y c = concentración, con un valor R^2 de 0,94. Sin embargo, para la cuantificación de las muestras problema se utilizó el intervalo lineal de la curva exponencial que corresponde a un intervalo de concentraciones entre 0,00 y 8,00 pg/mL de antígeno (gliadina). El ajuste lineal realizado arrojó un valor $R^2 = 0,88$. Los resultados a la hora de llevar a cabo el ensayo IDILA muestran que el LOD calculado como el blanco más 3 desviaciones estándar es igual a 0,55 pg/mL de gliadina. La curva de calibración obtenida es de tipo exponencial (Figura 15 A). Este hecho es debido a que, inicialmente, y a medida que aumenta la concentración de antígeno, la intensidad medida a 450 nm aumenta, ya que se está inhibiendo la formación de estructuras diméricas. Luego, aumenta más lentamente hasta llegar a una concentración de antígeno tan alta que a partir de la misma, y para mayores concentraciones de antígeno, la formación de dímeros se encuentra totalmente inhibida, por lo que no se observará ningún cambio en la intensidad.

Para la correcta cuantificación de las muestras problema, se tomó la porción inicial de la curva de calibración de 0,00 a 8,00 pg/mL y se realizó un ajuste lineal (Figura 15 B).

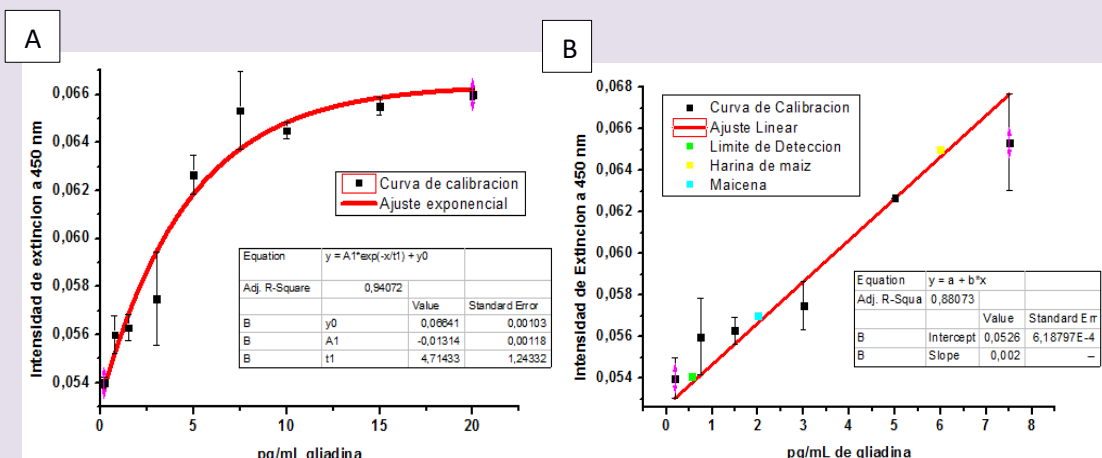


Figura 15: A. Curva de calibración experimental de IDILA para gliadina en presencia de 1 ng/mL de anticuerpo específico para gliadina. B. Ajuste lineal de la porción de la curva experimental comprendida entre 0,00-8,00 pg/mL de antígeno y resultados experimentales en muestras reales de harina y almidón de maíz.

Los valores cuantificados una vez realizado el ajuste lineal de la curva de calibración, y como se puede ver en la Tabla 2, muestran que los resultados obtenidos para la cuantificación de gliadina en muestras de harina de maíz están en gran concordancia con el valor calculado con el ensayo de ELISA sándwich. Un aspecto importante a considerar es que el ensayo IDILA fue capaz de cuantificar una pequeña cantidad de gliadina en la muestra de almidón de maíz, que se encuentra por encima del LOD del ensayo realizado, y que el ensayo ELISA no fue capaz de detectar. Las desviaciones estándar fueron tomadas como el promedio de 3 repeticiones para cada muestra.

Tabla 2: Resultados obtenidos para el ensayo IDILA específico para gliadina en muestras de almidón y harina de maíz.

	ALMIDÓN DE MAÍZ	HARINA DE MAIZ
RESULTADOS	2,0 ± 0,5 pg/mL. Utilizando el factor de dilución correspondiente, el mismo resulta en una concentración final de 0,1 ± 0,1 mg/Kg de muestra.	6,0 ± 1,0 pg/mL. Utilizando el factor de dilución correspondiente, el mismo resulta en una concentración final de 3 ± 1 mg/Kg de muestra.

Comparación entre IDILA vs. ELISA

La comparación entre ambos ensayos se puede analizar en base a dos aspectos. El primer aspecto corresponde a la información relacionada a la cuantificación de antígeno en muestras reales. Por un lado, hay que destacar que la técnica IDILA es una técnica que permite la detección de muy bajas concentraciones de antígeno, utilizando factores de dilución de un orden 1000 veces mayor a los que se utilizan en el ensayo ELISA. Como se puede observar en la Tabla 3, los resultados indican que para la cuantificación de gliadina en extractos de harina de maíz hay una gran concordancia entre los valores obtenidos entre ambas metodologías. Por otro lado, el empleo del ensayo IDILA para la cuantificación de gliadina en extractos de almidón de maíz permite la detección de una pequeña cantidad de gliadina, mientras que la técnica de ELISA no fue capaz de detectar la presencia de gliadina en esta muestra.

Tabla 3: Comparación de los resultados obtenidos para la cuantificación de gliadina en muestras de alimentos mediante IDILA (usando 1 ng/mL de anticuerpo específico para gliadina) y ELISA sándwich.

RESULTADOS	ALMIDÓN DE MAÍZ	HARINA DE MAIZ
ELISA sándwich	N/D	4,5 ± 0,7 mg/Kg.
IDILA	0.1 ± 0.08 mg/Kg.	3 ± 1 mg/Kg.

El segundo aspecto está relacionado a la comparación de los parámetros analíticos de los valores obtenidos para las curvas de calibración entre ambas metodologías. Nótese que a la hora de realizar el análisis de los parámetros analíticos de la técnica IDILA, sólo se tuvo en cuenta la porción lineal de la curva de calibración exponencial. Para analizar este aspecto, como se puede apreciar en la Tabla 4, cuando se compara la sensibilidad de ambas técnicas, la técnica IDILA demostró tener una sensibilidad 10.000 veces mayor que la del ensayo de ELISA sándwich. En lo que respecta a LOD, la técnica IDILA demostró tener un LOD 10.000 veces menor que el del

ELISA sándwich, mientras que el límite de cuantificación (calculado como la suma del blanco más diez desviaciones estándar) resultó ser 1.000 veces menor para IDILA con respecto a ELISA.

Tabla 4: Parámetros analíticos de IDILA vs. ELISA.

	IDILA 58 nm (pg/mL)	ELISA (ng/mL)
Sensibilidad	$(1,5 \pm 0,1) \times 10^{-3}$	$(1,6 \pm 0,1) \times 10^{-2}$
Límite de Detección	0,52	1,82
Límite de Cuantificación	2,1	4,87

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS DE LA TÉCNICA IDILA

En este trabajo, hemos diseñado un inmunobiosensor ultrasensible que no utiliza enzimas y basado en la respuesta óptica diferencial de una dispersión coloidal de nanoesferas de Ag y su fuerte interacción con el sistema STV-Biot, en conjunción con la capacidad altamente específica de bioconocimiento de las inmunoglobulinas. La disminución de la intensidad de extinción que se genera cuando a una dispersión de Ag NPs funcionalizadas con STV-Biot se le añade una concentración previamente seleccionada de IgG-Biot es provocada por la formación de estructuras diméricas. La adición de pequeñas cantidades de antígeno específico, a un tiempo donde la formación de dímeros es favorecida (en ausencia del antígeno), inhibe la formación de dímeros, provocando así una menor disminución de la intensidad de extinción a medida que aumenta la concentración de antígeno. A concentraciones suficientemente altas de antígeno, la formación de estructuras diméricas se inhibe totalmente y no hay cambios espectrales de intensidad. La dependencia de la intensidad de extinción con la concentración de antígeno permite la construcción de una curva de calibración y cuantificación en muestras problema.

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

Los resultados obtenidos muestran que el IDILA es un ensayo 10.000 veces más sensible que la técnica de ELISA sándwich; que se puede efectuar en sólo dos horas, ya que no requiere de periodos de bloqueo e incubación; y que es de implementación directa, dado que utiliza instrumentación de uso común en laboratorios como microplacas de 96 pocillos y un lector espectrofotómetro de microplacas. El menor costo de la técnica, comparado con el del ensayo ELISA sándwich, se debe al hecho de que al detectar menores concentraciones de antígeno, utiliza cantidades mucho menores de patrón estándar para realizar las curvas de calibración y un solo anticuerpo específico.

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

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo financiero del CONICET (PIP 112-201101-00430 y PIP 112-2015 01-00652), FONCYT (PICT 2012-2286, PICT 2012-3094, PICT 2014-2195), SECYT-UNC y PME 1544 – 2006. P.A.M. agradece a CONICET por recibir una beca para realizar su doctorado.

REFERENCIAS

1. Fasano A., Berti I., Gerarduzzi T., Not T., Colletti R.B., Drago S., y col.. Prevalence of Celiac Disease in At-Risk and Not-At-Risk Groups in the United States A Large Multicenter Study. *Arch.Intern.Med.* (2003) 163: 286-292.
2. Gorinstein S., Pawelzik E., Delgado-Licon E., Haruenkit R., Weisz M., Trakhtenberg S. Characterization of pseudocereal and cereal proteins by protein and amino acid analyses. *J.Sci .Food.Agr.* (2002) 82: 886-91.
3. Hochegger R., Mayer W., Prochaska M. Comparison of R5 and G12 Antibody-Based ELISA used for the determination of the gluten content in official food samples. *Foods.* (2015) 4: 654-664.
4. Sorell L., López J.A., Valdés I., Alfonso P., Camafeita E., Acevedo B., y col.. An innovative sandwich ELISA system based on an antibody cocktail for gluten analysis. *FEBS Lett.* (1998) 439: 46-50.
5. Sepúlveda B., Angelome P.C., Lechuga L.M., Liz-Marzan LM,. LSPR based nanosensors. *Nano Today.* 2009 4: 244-251.
6. Kelly K.L., Coronado E.A., Zhao L.L., Schatz G.C., The optical properties of metal nanoparticles: the influence of size, shape, and dielectric Environment. *J.Phys.Chem.B.* (2003) 107: 668–677.
7. Castro C., Gourley M., Diagnostic testing and Interpretation of tests for autoimmunity. *J.Allergy.Clin.Immuno.* (2010) 125: 238-247.
8. Lequin R.M., Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Clinical Chemistry.* (2005) 51: 2415-24.
9. Gan S.D., Patel K.R. Enzime Immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. *J.Invest.Dermatol.* (2013) 133: 1-3.
10. Baker, G.; Lajtha, A.; Dunn, S.; Holt, A.: *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology Practical Neurochemistry Methods* Ch. 8. New York (USA): Springer Science; 2007.
11. Fraire J.C., Masseroni M.L., Jausoro I., Perassi E.M., Diaz Añel A.M., Coronado E.A., Identification, localization, and quantification of neuronal cell membrane receptors with plasmonic probes: role of protein kinase D1 in their distribution. *ACS Nano.* (2014) 8: 8942–8958.
12. Wang J., Boriskina S.V., Wang H., Reinhard B.M., Illuminating Epidermal Growth Factor Receptor Densities on Filopodia through Plasmon Coupling. *ACS Nano.* (2011) 5: 6619-6628.
13. Wang J., Yu X., Boriskina S.V., Reinhard B.M., Illuminating the Lateral Organization of Cell-Surface CD24 and CD44 through Plasmon Coupling between Au Nanoparticle Immunolabels. *NanoLett.* (2012) 6: 3231–3237.
14. Rong G.X., Wang H.Y., Skewis L.R., Reinhard B.M., Resolving Sub-Diffraction Limit Encounters in Nanoparticle Tracking Using Live Cell Plasmon Coupling Microscopy. *Nano Lett.* (2008) 8: 3386–3393.
15. Crow M.J., Grant G., Provenzale J.M., Wax A. Molecular Imaging and Quantitative Measurement of Epidermal Growth Factor Receptor Expression in Live Cancer Cells Using Immunolabeled Gold Nanoparticles. *Am.J.Roentgenol.* (2009) 192: 1021–1028.
16. Aaron J., Travis K., Harrison N., Sokolov K. Dynamic Imaging of Molecular Assemblies in Live

- Cells Based on Nanoparticle Plasmon Resonance Coupling. *Nano.Lett.* (2009) 9: 3612–3618.
17. De la Rica R., Stevens M.M., Plasmonic ELISA for the ultrasensitive detection of disease biomarkers with the naked eye. *Nature Nanotechnology.* (2012) 7: 821-824.
 18. Rodríguez-Lorenzo L., De la Rica R., Álvarez-Puebla R.A., Liz-Marzán L.M., Stevens M.M. Plasmonic nanosensors with inverse sensitivity by means of enzyme-guided crystal growth. *Nature Materials.* (2012) 11: 604-607.
 19. Mayilo S., Kloster M.A., Wunderlich M., Lutich A., Klar T.A., Nichtl A., Kürzinger K., Stefani F.D., Feldmann J. Long-Range Fluorescence Quenching by Gold Nanoparticles in a Sandwich Immunoassay for Cardiac Troponin T. *Nano.Lett.* (2009) 9: 4558-4563.
 20. Tang S., Hewlett I., Nanoparticle-based immunoassays for sensitive and early detection of HIV-1 capsid (p24) antigen. *J.Infect.Dis.* (2010) 201: S59–S64.
 21. Wang C., Luconi M., Masi A., Fernandez L. Silver Nanoparticles as Optical Sensors, Silver Nanoparticles. Rijeka (Croacia): David Pozo Perez. 2010.
 22. Su K.H., Wei Q.H., Zhang X. Interparticle coupling effects on plasmon resonances of nanogold particles. *Nano.Lett.* (2003) 3: 1087–1090.
 23. Gunnarsson L., Bjerneld, E.J., Xu H., Petronis S., Kasemo B., Käll M. Interparticle coupling effects in nanofabricated substrates for surface-enhanced raman scattering. *Appl.Phys.Lett.* (2001) 78: 802–804.
 24. Fraire J.C., Motrich R., Coronado E.A., Design of a Novel Plasmonic Nanoconjugated Analytical Tool for Ultrasensitive Antigens Quantification. *Nanoscale.* (2016) 8: 17169-17180.
 25. Garcia E., Llorente M., Hernando A., Kieffer R., Wieser H., Mendez E. Development of a general procedure for complete extraction of gliadins for heat processed and unheated foods. *Eur.J.Gastroenterol.Hepatol.* (2005) 17: 529-539.
 26. Código Alimentario Argentino. Año 2004. Capítulo XVII. Art. 1383.
 27. Kimling J., Maier M., Okenve B., Kotaidis V., Ballot H., Plech A., Turkevich Method for Gold Nanoparticle Synthesis Revisited. *J.Phys.Chem.B.* (2006) 110: 15700–15707.
 28. Myroshnychenko V., Rodríguez-Fernández J., Pastoriza-Santos I., Funston A.M., Novo C., Mulvaney P., Liz-Marzán L.M., García De Abajo F.J. Modelling the Optical Response of Gold Nanoparticles. *Chem.Soc.Rev.* (2008) 37: 1792–1805.
 29. Sandiford C.P., Tatham A.S., Fido R., Welch J.A., Jones M.G., Tee R.D., Shewry P.R., Newman A.J., Identification of the major water/salt insoluble wheat proteins involved in cereal hypersensitivity. *Clinical and Experimental Allergy.* (1997) 27: 1120-1129.
 30. Freedman A.R., Galfre G., Gal E., Ellis H.J., Ciclitira P.J., Western Immunoblotting of Cereal Proteins with Monoclonal Antibodies to Wheat Gliadin to Investigate Coeliac Disease. *Int.Arch .Allergy.Immunol.* (1988) 85: 346-350.
 31. Matsuo H., Kohno K., Morita E., Molecular cloning, recombinant expression and IgE-binding epitope of ω -5 gliadin, a major allergen in wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *FEBS Journal.* (2005) 272: 4431–4438.
 32. Michel P., Sacha B., FranCoise D., Yves P. Comparison between functional and solution states as determined by infrared spectroscopy. *FEBS Letters.* (1992) 299: 247-250.
 33. Popineau Y., Bonenfant S., Cornec M., Pezolet M., A Study by Infrared Spectroscopy of the Conformations of Gluten Proteins Differing in their Gliadin and Glutenin Compositions, *Journal of Cereal Science.* (1994) 20: 15-22.
 34. Coronado E.A., Encina E.R., Stefani F.D., Optical Properties of Metallic Nanoparticles: Manipulating Light, Heat and Forces at the Nanoscale. *Nanoscale.* (2011) 3: 4042-4059.