



República Bolivariana de Venezuela  
Universidad de Los Andes  
Facultad de Farmacia y Bioanálisis  
Escuela de Bioanálisis  
Departamento de Análisis y Control  
Laboratorio de Investigaciones Electroquímicas



DESARROLLO DE UN INMUNOSENSOR ELECTROQUÍMICO BASADO  
EN NANOPARTÍCULAS DE ORO (AUNPS) PARA LA DETECCIÓN DE  
ANTICUERPOS ANTI-*Toxoplasma gondii*

Trabajo de grado para optar al título de Licenciado en bioanálisis

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

Autor: Br. José Manuel Ramírez Galán

C.I. 20.122.339

Tutores: Dr. Sabino Menolasina

Dra. Morella Bouchard

Mérida, 10 de diciembre de 2018

## DEDICATORIA

A todas aquellas personas que de una u otra forma hicieron posible este proyecto.

A mis padres, que me impulsaron a superar todas mis metas y me apoyaron en todo el camino.

A la Universidad de Los Andes por permitirme avanzar, aprender y conocer los diferentes aspectos que forman la vida universitaria.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## AGRADECIMIENTOS

A mis padres que sin importar que siempre me motivaron a realizar mis sueños.

A Carlos Travieso quien me guio a cada paso del desarrollo de la tesis, desde lo teórico hasta lo experimental.

A la Doctora Morella Bouchard que me oriento y guio en la dirección correcta.

Al Instituto de Inmunología Clínica (IDIC ULA) que me dono reactivos para el desarrollo de la tesis.

A Mirsa Cortes y Hermelinda Chacón quienes me motivaron e impulsaron a ser mejor y terminar esta etapa de mi vida.

A todas aquellas personas que de una u otra forma me ayudaron a cada paso de mi carrera.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

# ÍNDICE

DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
INDICE DE FIGURAS.....	vii
RESUMEN.....	ix
INTRODUCCIÓN.....	1
Capítulo I.....	2
Planteamiento del problema.....	2
Justificación e importancia de la investigación.....	3
Alcances y limitaciones de la investigación.....	4
Alcances.....	4
Limitaciones.....	4
Marco teórico.....	4
Marco conceptual.....	4
Toxoplasma gondii.....	4
Ooquiste.....	5
Bradizoíto.....	5
Taquizoíto.....	5
Estructura del Toxoplasma gondii.....	6
Antígeno recombinante.....	6
Transmisión.....	7
Cuadro clínico causado por el Toxoplasma gondii.....	7
Respuesta inmunitaria ante la presencia del Toxoplasma gondii.....	8
Métodos para el diagnóstico de la toxoplasmosis.....	9
Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).....	10
Azul de metileno (AM).....	10
Tiourea (TIO).....	11
Nanopartículas de oro (AuNPs).....	11
Espectroscopía UV-visible.....	13
Microscopía electrónica de transmisión.....	14
Voltamperometría cíclica (VC).....	14

Electrodo de trabajo.....	15
Electrodo de referencia.....	16
Electrodo auxiliar o contraelectrodo.....	16
Biosensor electroquímico.....	16
Antecedentes del problema.....	17
Hipótesis.....	19
Objetivos.....	19
Objetivo general.....	19
Objetivos específicos.....	19
Tipo de investigación.....	20
Diseño de la investigación.....	20
Materiales y métodos.....	20
Materiales.....	20
Instrumentos.....	21
Métodos de limpieza y preparación de electrodos.....	22
Limpieza del material de vidrio.....	22
Preparación de las mezclas de AuNPs y AM.....	22
Limpieza mecánica y electroquímica del electrodo de trabajo.....	22
Preparación del inmunosensor electroquímico.....	23
Caracterización de las AuNPs.....	25
Caracterización electroquímica del electrodo de carbón vítreo.....	26
Determinación del factor de rugosidad (FR) y el área real del electrodo de carbón vítreo utilizado como base para el inmunosensor.....	26
Comportamiento electroquímico del sensor en cada una de las etapas de su modificación hasta el desarrollo del inmunosensor electroquímico.....	27
Respuesta del inmunosensor ante la presencia de anticuerpos.....	32
Conclusiones.....	34
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Estructura del azul de metileno ( $C_{16}H_{18}ClN_3S$ ).....	11
Figura 2 Respuesta del electrodo ante una señal de excitación.....	12
Figura 3 Colores de la suspensión coloidal de AuNPs según su tamaño (Kondinski, 2010).....	15
Figura 4 Espectro de absorción UV-Vis de la suspensión coloidal de AuNPs.....	25
Figura 5 Voltamperograma del electrodo de carbón vítreo en $KNO_3$ 0,1 M (blanco) y $[Fe(CN)_6]^{3-}/[Fe(CN)_6]^{4-}$ $5 \times 10^{-3}$ M a $v = 50$ mV/s. ....	26
Figura 6 Voltamperograma del electrodo de carbón vítreo limpio (CV) en $HClO_4$ 0,1 M a $v = 100$ mV/s. ....	27
Figura 7 Voltamperograma del electrodo CV en Buffer Fosfato pH=7,4 a $v = 100$ mV/s. ....	28
Figura 8 Respuesta de CV en Tiourea 0,25M y $HNO_3$ 2M a $v = 100$ mV/s .....	29
Figura 9 Voltamperogramas del electrodo de CV sin modificar y modificado con TIO con diferentes capas de AuNPs 5 y AM 4, en buffer fosfato pH=7,4 a $v = 100$ mV/s.....	300
Figura 10 Voltamperograma multicapas $[AuNPs(5)/AM(4)TIO/CV]$ , electrodo con multicapas con antígeno $[Ag/AuNPs(5)/AM(4)TIO/CV]$ y sin modificaciones. En Buffer fosfato pH=7,4 a $v = 100$ mV/s. ....	310
Figura 11 Voltamperogramas del electrodo $[AuNPs(5)/AM(4)TIO/CV]$ , electrodo modificado con antígeno $[Ag/AuNPs(5)/AM(4)TIO/CV]$ y con albumina $[Alb/Ag/AuNPs(5)/AM(4)TIO/CV]$ en buffer fosfato pH=7,4 a $v = 100$ mV/s .....	32
Figura 12 Familia de Voltamperogramas del inmunosensor incubado en soluciones con diferentes concentraciones de anticuerpos en buffer fosfato pH=7,4 a $v = 100$ mV/s.....	33
Figura 13 Voltamperograma del inmunosensor en solución con interferentes (muestra sin diluir con títulos altos de anticuerpos anti-Hepatitis C) en buffer fosfato pH=7,4 a $v = 100$ mV/s. ....	343

Conclusiones .....¡Error! Marcador no definido.  
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....¡Error! Marcador no definido.35

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)



REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS

ESCUELA DE BIOANÁLISIS

DEPARTAMENTO DE ANÁLISIS Y CONTROL

LABORATORIO DE INVESTIGACIONES ELECTROQUÍMICAS



**DESARROLLO DE UN INMUNOSENSOR ELECTROQUÍMICO BASADO EN  
NANOPARTICULAS DE ORO(AuNPs) PARA LA DETECCIÓN DE  
ANTICUERPOS ANTI-*Toxoplasma gondii***

**Trabajo de Grado**

**RESUMEN**

El *Toxoplasma gondii* es un parásito intracelular obligado que produce una infección por lo general asintomática, que afecta de manera significativa a los pacientes inmunosuprimidos y a los fetos produciendo en estos últimos problemas en su desarrollo fetal. La detección oportuna del *Toxoplasma gondii* permite que la mujer embarazada pueda ser tratada oportunamente. Con el presente trabajo se creó una posible metodología para detectar anticuerpos anti-*Toxoplasma gondii* utilizando nanopartículas de oro como base y antígeno recombinante puro (SAG1) como elemento de reconocimiento biológico. Se utilizó la técnica de voltamperometría cíclica para estudiar el comportamiento del inmunosensor, obteniéndose que el mismo además de su especificidad es muy sensible ante muestras con anticuerpos anti-*Toxoplasma gondii*, lo cual lo hace una opción viable como método de diagnóstico.

**Palabras claves:** *Toxoplasma gondii*, inmunosensor, voltamperometría, nanopartículas de oro, antígeno recombinante.

## INTRODUCCIÓN

La toxoplasmosis es una enfermedad de distribución mundial, causada por el *Toxoplasma gondii* (*T gondii*). En pacientes inmunocompetentes en la mayoría de casos la infección es asintomática, una pequeña parte de la población infectada desarrolla síntomas similares a los de un resfriado común, mientras que si la infección es adquirida durante el embarazo puede causar grandes daños en el desarrollo del feto, e incluso provocar la muerte del mismo<sup>1</sup>.

La presencia del parásito provoca una respuesta defensiva por parte del huésped que promueve la formación de anticuerpos (glicoproteínas), los cuales se han estudiado a través de una gran variedad de metodologías para detectar y cuantificar los mismos<sup>2</sup>.

Para el diagnóstico de esta enfermedad se utiliza principalmente la metodología de ELISA (ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas) que detecta la aparición de los anticuerpos anti-*T gondii*, lo cual indica en forma indirecta la presencia actual o pasada del parásito. El ELISA convencional utiliza antígenos nativos o crudos preparados a partir de lisados del parásito completo y puede contener material proveniente del procedimiento de producción dando como resultados falsos positivos<sup>3</sup>.

En la actualidad los métodos electroquímicos están siendo utilizados cada vez más por su alta sensibilidad, precisión y exactitud, en el análisis químico de una gran cantidad de sustancias en la búsqueda de analitos de interés clínico<sup>4</sup>.

Para el desarrollo de biosensores, se han utilizado las propiedades del analito, su interacción con otras sustancias y los productos de esta, y a partir de la naturaleza del producto se determina la concentración del analito<sup>5-7</sup>. Se han desarrollado sensores específicos a través de la

modificación de superficies electródicas con compuestos orgánicos e inorgánicos que sirven de anclaje a nanopartículas metálicas que interactúan específicamente con sustancias químicas y biológicas<sup>8-10</sup>.

En el presente trabajo se construyó un inmunosensor como método de diagnóstico alternativo debido a la gran sensibilidad que ofrecen las técnicas electroquímicas. El inmunosensor se elaboró modificando superficies de carbón vítreo con tiourea (TIO) sobre las cuales se intercalaron capas de azul de metileno (AM) y nanopartículas de oro (AuNPs) sintetizadas en el laboratorio, con la finalidad de adsorber un antígeno recombinante de *Toxoplasma gondii* (SAG1) para la detección de anticuerpos anti-*T. gondii*.

## Capítulo I: El problema

### Planteamiento del problema

La toxoplasmosis es una enfermedad parasitaria producida por el *Toxoplasma gondii*, el cual causa una infección benigna en niños y adultos, pero que afecta al feto causándole alteraciones en el funcionamiento psicomotor a largo plazo o incluso la muerte<sup>1,11</sup>. Esta enfermedad en recién nacidos puede producir diferentes alteraciones como la coriorretinitis, hidrocefalia, calcificaciones y retardo psicomotor, e incluso un cuadro visceral (hepatoesplenomegalia)<sup>12,13</sup>.

Se estima que el 60% de la población mundial tiene títulos para anticuerpos anti-*T. gondii* en donde se han reportado casos de toxoplasmosis congénita que afecta de 1 a 2 niños de cada 1000 nacimientos al año. La mayoría de las infecciones por *Toxoplasma gondii* son asintomáticas, en mujeres embarazadas con una primoinfección sin su debido tratamiento, puede terminar en secuelas perjudiciales para el niño<sup>14</sup>.

Existen diferentes métodos para detectar directa e indirectamente la presencia del *T. gondii*, los primeros se basan en la detección del parásito y los segundos determinan la presencia de anticuerpos específicos para el *T. gondii* en el suero del paciente. Los métodos serológicos utilizan antígenos crudos (fragmentos del parásito) que se obtienen al lisar la pared celular del parásito liberando sus organelas y múltiples fragmentos de dicha pared, siendo el ELISA el más empleado.

En la actualidad, las técnicas electroquímicas a través de biosensores electroquímicos se presentan como candidatas viables para mejorar la sensibilidad en la determinación de una variedad de sustancias de interés médico, mediante el desarrollo de inmunosensores, que pueden mejorar la sensibilidad hasta 1000 veces más en comparación a una técnica de ELISA.<sup>15</sup>

### **Justificación e importancia de la investigación**

Las técnicas actuales para la determinación de anticuerpos anti-*T. gondii* emplean como fundamento la unión antígeno, anticuerpo y anti-anticuerpo, en donde los antígenos son proteínas derivadas de la lisis del *Toxoplasma gondii* obtenido por medio de inoculación de ratón o cultivo celular. Este tipo de procedimiento genera una cantidad de posibles interferentes. Además, en la técnica de ELISA se utiliza como revelador una formación de color producto de la degradación enzimática de un sustrato, los cuales a pesar de ser específicos tienden a ser sensibles frente a contaminantes químicos.

Empleando un antígeno recombinante de *Toxoplasma gondii*, en la superficie de carbón vítreo modificada químicamente con nanopartículas de oro se podría desarrollar un inmunosensor que fuera más sensible y específico.

## **Alcances y limitaciones de la investigación**

### **Alcances:**

Con esta investigación se quiere lograr el desarrollo de un inmunosensor que permita la detección de anticuerpos anti-*Toxoplasma gondii* empleando para esto un antígeno recombinante (SAG1).

El inmunosensor desarrollado es de gran especificidad ya que este fue probado en el suero de un paciente con títulos altos de anticuerpos anti-*Hepatitis C*, este también demostró ser una posible alternativa para el diagnóstico clínico, debido al escaso procesamiento de la muestra.

### **Limitaciones:**

El inmunosensor desarrollado no permite diferenciar si aumentan los anticuerpos tipo IgG o los IgM.

El inmunosensor utiliza un antígeno recombinante (SAG1) de *T. gondii* lo cual le proporciona especificidad, pero con una mayor variedad de antígenos recombinantes de *T. gondii* se podría mejorar la sensibilidad.

## **Marco teórico**

### **Marco conceptual**

#### **Definiciones referentes al *Toxoplasma gondii***

#### ***Toxoplasma gondii***

*Toxoplasma gondii* es un parásito protozoario intracelular obligado que pertenece a *phylum apicomplexa*, de clase *Sporozoea*, orden *Eucoccidida* y de familia *Sarcocystidae*. El huésped definitivo es el gato; en el intestino

ocurre la multiplicación sexual de dicho parásito, constituyendo huéspedes potenciales los humanos, mamíferos y aves<sup>13,16</sup>.

*Toxoplasma gondii* se presenta en 3 formas evolutivas: ooquistes, taquizoítos y bradizoítos, el ooquiste es la forma de resistencia ante las barreras naturales y donde se encuentran protegidos los taquizoítos que son la forma virulenta para el ser humano, con un tamaño aproximado de 2x7  $\mu\text{m}$ , estos pertenecen al estadio asexual del parásito por eso su reproducción es rápida. El bradizoíto es la forma no virulenta (en pacientes inmunocompetentes) y su reproducción es sexual y lenta, esta forma parasitaria permite que el microorganismo sea resistente a la respuesta inmunitaria del huésped<sup>2,17,18</sup>. A pesar de que la forma de taquizoíto es la virulenta para el humano, las otras dos formas también son infecciosas permitiendo así transmitir la enfermedad<sup>19</sup>.

### **Ooquiste**

Forma de resistencia en el medio ambiente, esta le permite al parásito resistir las condiciones abruptas del ambiente para poder infectar a otro ser vivo. Se caracteriza por su gruesa pared celular, posee en su interior taquizoítos que son liberados por acción de los jugos gástricos del estómago de los mamíferos y aves.<sup>13,59,16-21</sup>

### **Bradizoíto**

Segunda forma de resistencia, se caracteriza por formar una vacuola a su alrededor lo que la hace invisible ante el sistema inmunitario del huésped. Esta se forma en cualquier tejido y órgano, incluido el cerebro lo cual conlleva a grandes repercusiones a la salud del huésped.<sup>2,20,21</sup>

### **Taquizoíto**

Forma invasiva del parásito, posee diferentes organelas que le permiten una invasión efectiva en casi cualquier tipo de célula del

humano. Esta es la más estudiada debido a que invade el tejido, lo que genera una respuesta inmunitaria por parte del hospedador, lo cual conlleva a que se generen anticuerpos específicos que permiten de manera indirecta detectar una infección por dicho parásito.<sup>2,20,21</sup>

### **Estructura del *Toxoplasma gondii***

Tiene una forma alargada de media luna, posee varias organelas y cuerpos de inclusión: anillos polares, roptrias, micronemas, microporos, mitocondria, microtúbulos subpeliculares, ribosomas, entre otros<sup>2,13,17,20,21</sup>. Utiliza gran variedad de sus estructuras para invadir las células del huésped, todas estas generan una respuesta inmunitaria por parte del mismo.<sup>2,13,17,20,21</sup>

### **Antígeno recombinante**

Un antígeno es un fragmento de naturaleza proteica de un microorganismo, el cual al entrar en contacto con un organismo inmunocompetente es capaz de generar una respuesta inmunológica o defensiva por parte del organismo<sup>22</sup>.

Para producir antígenos recombinantes se debe modificar genéticamente una bacteria, introduciéndole a su genoma una cadena de ADN que codifique la proteína de interés<sup>23-25</sup>. En primer lugar se selecciona la cadena de ADN de interés, esta se amplifica por medio de la PCR, se purifica el producto de dicha amplificación para posteriormente ser ligado a un plásmido (cadena de ADN corta), este se introduce a una bacteria, generalmente *Escherichia coli* (*E. coli*), debido a que su genoma ha sido ampliamente estudiado y que son de crecimiento rápido, luego se induce a la bacteria a la síntesis proteica, para finalmente purificar el producto de esta síntesis y separar la proteína de interés (antígeno o proteína recombinante)<sup>23-25</sup>. Las proteínas recombinantes se han usado ampliamente para el desarrollo de vacunas y en el desarrollo de métodos de diagnóstico lo cual aumenta la especificidad de dichos métodos<sup>26</sup>.

En los últimos 20 años se han utilizado sistemas de expresión basados en *E. coli* para la producción de antígenos recombinantes de *T. gondii* evaluando su potencial para el diagnóstico de infección en seres humanos. Dentro de los mismos se encuentran los de superficie: SAG. La proteína SAG1 está presente en la superficie del *T. gondii*, interviene en la adhesión y a su vez activa el sistema inmune del huésped, pertenece al grupo de superfamilia SRS (secuencias relacionadas con SAG1) <sup>23</sup>. SAG1 tiene un peso molecular de 30 kDa es la más abundante y se expresa sobre la superficie del taquizoito y es uno de los antígenos más inmunogénicos <sup>23</sup>.

### **Transmisión**

La forma más común de infección es por la deglución de ooquistes, que se encuentran en alimentos mal lavados, agua contaminada y por la ingesta de carne que posean quistes tisulares <sup>3,11</sup>.

Los taquizoítos tiene la habilidad de atravesar la barrera transplacentaria, por lo tanto, una madre que adquiriera una infección por *T. gondii*, durante el período de gestación puede transmitir la infección al feto <sup>1,3,12,14,16</sup>.

### **Cuadro clínico causado por el *Toxoplasma gondii***

El cuadro clínico causado por el *Toxoplasma gondii* en un paciente inmunocompetente se presenta en un 90% de los casos como asintomático, el otro 10% presentan síntomas similares a una mononucleosis <sup>27</sup>.

Los pacientes inmunosuprimidos son una población muy sensible ante cualquier infección oportunista, como la toxoplasmosis, entre estos pacientes destacan los pacientes con síndrome de inmunodeficiencia

adquirida. Estos pueden desarrollar una encefalitis causada por la infección <sup>28</sup>.

En el caso de la toxoplasmosis congénita la infección se transmite por vía transplacentaria de la madre que adquiere una primoinfección durante la gestación, afectando el desarrollo del feto dependiendo del periodo en el cual se adquiere la infección. El riesgo de infección y la severidad de las manifestaciones clínicas varía con el tiempo de gestación. Durante el primer trimestre hay menor riesgo de transmisión al feto, pero sus síntomas son muy graves; como abortos, alteraciones multisistémicas en el feto y destrucción del tejido cerebral. Si es en el último trimestre se incrementa el riesgo de transmisión, pero los síntomas son más leves, como coriorretinitis <sup>1,3,12,14,16,29</sup>.

### **Respuesta inmunitaria ante la presencia del *Toxoplasma gondii***

La respuesta por parte del humano empieza desde el momento que ocurre la ingesta del ooquiste, al llegar al tracto intestinal este libera los taquizoitos, los cuales invadirán las células del tracto, activando las células del sistema inmune innato (macrófagos, células NK y dendríticas) como respuesta ante la invasión celular <sup>32,33</sup>.

Los macrófagos y las células dendríticas liberan IL-12 que activa a las células NK que poseen actividad citotóxica y producen IFN $\gamma$ , esta IL-12 además provoca una respuesta inmune por parte de los linfocitos T del tipo TH1 que a su vez activa los macrófagos. Los macrófagos pueden actuar como células presentadoras de antígenos produciendo citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-10 e IL-12. El TNF- $\alpha$  junto a la IL-12 optimizan la capacidad microbicida, como el estallido respiratorio donde se generan intermediarios reactivos del oxígeno (RIO) y la síntesis del óxido nítrico (NO) para generar una acción tóxica sobre el parásito <sup>30,31</sup>.

El control de la infección se da por una acción sinérgica entre LTCD4 + tipo TH1 y LTCD8 + lo que constituye una respuesta inmune adaptativa celular. Los LTCD4 + Th1 se encargan de producir IL-2 e IFN- $\gamma$ , necesarios para el desarrollo de la resistencia durante la fase temprana de la infección, dicha resistencia está relacionada con el IFN- $\gamma$  y la IL-12 que son producidas después de la activación de las células NK y los macrófagos. Los LTCD8 + son activados por la IL-2 secretada por los LTCD4 + y se encargan de ejercer una actividad citotóxica contra los taquizoitos y/o células infectadas.

El papel de la respuesta adaptativa humoral en toxoplasmosis es limitado. Los anticuerpos o inmunoglobulinas, son proteínas sintetizadas por los linfocitos B, actúan únicamente sobre los taquizoitos extracelulares liberados luego de la lisis de las células infectadas. Limitan la multiplicación del *T. gondii* extracelular por medio del sistema del complemento, la opsonización o por un aumento en la fagocitosis por los macrófagos. Existen 5 tipos de anticuerpos: la Inmunoglobulina A (IgA), la inmunoglobulina E (IgE), la inmunoglobulina D (IgD), la inmunoglobulina G (IgG) y la inmunoglobulina M (IgM). La IgM es la primera en aparecer para luego disminuir y desaparecer en pocos meses o persistir durante un año o más. Se ha utilizado para diagnosticar infección aguda. La IgG aparece a las 1-2 semanas de la infección y suelen persistir de por vida por lo cual se relacionan a infección crónica<sup>32,33</sup>.

### **Métodos para el diagnóstico de la toxoplasmosis**

Existen diferentes métodos para detectar de manera directa e indirecta al *Toxoplasma gondii*. Los métodos directos se utilizan para el diagnóstico de infección aguda ya que determinan la presencia del parásito, estos son la inoculación del ratón, cultivos celulares y reacción en cadena de la polimerasa. Son poco empleados por ser lentos, laboriosos y costosos. Los más utilizados son los indirectos que detectan la presencia en suero de los anticuerpos que forma el huésped como respuesta inmunitaria al

contacto con el *Toxoplasma gondii*, entre estos métodos tenemos: la inmunofluorescencia indirecta, la hemoaglutinación indirecta y el ELISA<sup>34,35</sup>.

### **Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA)**

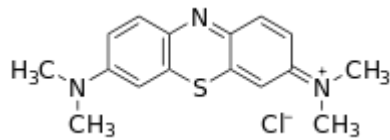
El ELISA se basa en determinar la formación de complejos antígeno-anticuerpos mediante el uso de anticuerpos o antígenos marcados con una enzima. Son ensayos en fase sólida en los cuales se adsorbe un antígeno o un anticuerpo sobre un soporte sólido, tienen pasos de separación (lavados) para eliminar el conjugado enzimático libre antes de proceder a determinar la cantidad de conjugado unido, para lo cual se añade sustrato enzimático y se mide la reacción catalítica entre la enzima y el sustrato, produciéndose un cambio de color que se detecta con facilidad<sup>34</sup>.

En el diagnóstico de toxoplasmosis se utiliza más comúnmente el ELISA indirecto, en donde se detectan los anticuerpos específicos y se basa en la unión entre el antígeno (crudo) que sensibiliza la placa y el anticuerpo presente en la muestra del paciente, al final se agrega un anticuerpo anti-anticuerpo que está conjugado a una enzima que al reaccionar con el sustrato dará un cambio de color que puede ser medido con un colorímetro para cuantificar el resultado<sup>25,35</sup>.

### **Definiciones referentes a electroquímica**

#### **Azul de metileno (AM)**

El azul de metileno es un compuesto colorante, de carga positiva, que se ha usado ampliamente en la elaboración de biosensores debido a su gran actividad redox en soluciones acuosas, y de su gran afinidad con nanopartículas de metales nobles, como el oro y la plata<sup>36</sup>.



**Figura 1 Estructura del azul de metileno (C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>ClN<sub>3</sub>S)**

### **Tiourea (TIO)**

Es un compuesto que posee tres grupos funcionales, un grupo amino, uno imino y uno tiol, debido a esta variedad de grupos funcionales, la tiourea se ha utilizado para la modificación de superficies metálicas como oro y carbón vítreo <sup>37,38,39</sup>.

La tiourea puede ser adsorbida en la superficie de carbón vítreo gracias a que uno de sus grupos funcionales forma un enlace covalente con los grupos reactivos presentes, al hacer esto la tiourea expone otros grupos funcionales que tienen afinidad con nanopartículas de oro (AuNPs), de tal forma que permite modificar la superficie del electrodo con AuNPs para su posterior modificación con compuestos orgánicos <sup>40</sup>.

### **Nanopartículas de oro (AuNPs)**

Las AuNPs son partículas de un tamaño menor de los 100nm que tienen una gran aplicabilidad en la actualidad en medicina, en cosméticos y en técnicas electroquímicas, debido a sus diversas propiedades, como su finidad por compuestos orgánicos como lo son los antígenos y los anticuerpos <sup>41,42,43</sup>.

Estas se pueden obtener de dos formas: de manera química (reducción de sales de oro) y de manera electroquímica (por electrodeposición).

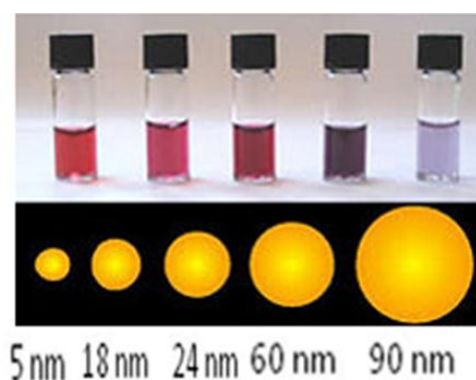
En la síntesis química se utiliza un compuesto reductor como el citrato de sodio, que reduce los iones de oro Au<sup>+3</sup> hasta convertirlos en Au<sup>0</sup>

(nanoesferas de oro). Durante el proceso el citrato de sodio se oxida formando dicarboxil acetona <sup>41</sup>.

Las propiedades ópticas de las nanopartículas metálicas están determinadas por la interacción de la luz incidente con la conducción de electrones libres <sup>43</sup>, es decir; el mecanismo para la absorción de luz en la nanopartícula metálicas se asocia con un fenómeno de excitación coherente y colectivo de los electrones libres en la banda de conducción, produciéndose una oscilación en fase que se conoce como resonancia del plasmón superficial (RPS). La interacción de las nanopartículas con la radiación electromagnética dependerá del tamaño, forma y composición de la misma, y del efecto plasmón de la superficie de la nanopartícula <sup>42</sup>.

Las nanopartículas (NPs) metálicas que tiene un diámetro entre 3 y 100 nM pueden ser caracterizadas por microscopia UV-vis debido a que absorben luz como consecuencia de las interacciones lineales que experimentan estas NPs con el campo electromagnético lo cual conduce a una oscilación colectiva de los electrones en la banda de conducción <sup>42</sup>.

Las suspensiones coloidales de oro exhiben un color característico dependiendo del tamaño de las mismas <sup>42,43</sup>.



**Figura 2. Colores de la suspensión coloidal de AuNPs según su tamaño <sup>42</sup>**

Las AuNPs se caracterizan por poseer una alta relación de superficie-volumen, alta energía superficial, capacidad para disminuir la distancia entre las proteínas y las partículas de metal, y el funcionamiento como conductor electrónico entre grupos funcionales y la superficie del electrodo, son razones que justifican la modificación de los electrodos con AuNPs para facilitar la transferencia de los electrones entre los analitos redox y superficies de los electrodos <sup>43</sup>.

Las nanopartículas de oro (AuNPs), exhiben excelentes propiedades físicas, químicas y biológicas, intrínsecas a su tamaño nanométrico, como su afinidad por el azufre y los tioles, su capacidad para unirse fuertemente a moléculas de origen biológico, sin afectar las propiedades de las mismas. Además, las AuNPs pueden ser producidas en distintos tamaños, formas y pueden ser fácilmente funcionalizadas con un amplio abanico de ligandos (anticuerpos, polímeros, sondas de diagnóstico, fármacos, material genético, etc.) <sup>44</sup>.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

### **Espectroscopía UV-visible**

La espectroscopía UV-Vis está basada en el proceso de absorción de la radiación ultravioleta-visible (radiación con longitud de onda comprendida entre los 160 y 780 nm) por una molécula. La absorción de esta radiación causa la promoción de un electrón a un estado excitado. Los electrones que se excitan al absorber radiación de esta frecuencia son los electrones de enlace de las moléculas, por lo que los picos de absorción se pueden correlacionar con los distintos tipos de enlace presentes en el compuesto. Debido a ello, la espectroscopia UV-Vis se utiliza para la identificación de los grupos funcionales presentes en una molécula. Las bandas que aparecen en un espectro UV-Vis son anchas debido a la superposición de transiciones vibracionales y electrónicas <sup>45</sup>.

El espectro visible va desde 380 nm hasta 750 nm y el rango ultravioleta va desde 160 nm hasta 380nm, la espectroscopía permite la determinación cualitativa y la cuantificación de diferentes moléculas, se usa para la determinación del tamaño de las AuNPs ya que dependiendo de la longitud de onda a la que reaccionen las nanopartículas dependerá el tamaño de las mismas <sup>45</sup>.

Las nanopartículas absorben radiación electromagnética a más o menos 520nm, esta se debe a que las nanopartículas de oro al recibir radiación en su superficie, se produce el efecto plasmon, que se relación con el tamaño de la nanopartícula.

### **Microscopia electrónica de transmisión**

Consiste en colisionar un haz de electrones suficientemente acelerados con la muestra delgada, estos se dispersan dependiendo del grosor y del tipo de átomos forman la muestra, de manera que hay una gradación entre los electrones que atraviesan directamente y los que son totalmente desviados <sup>46</sup>.

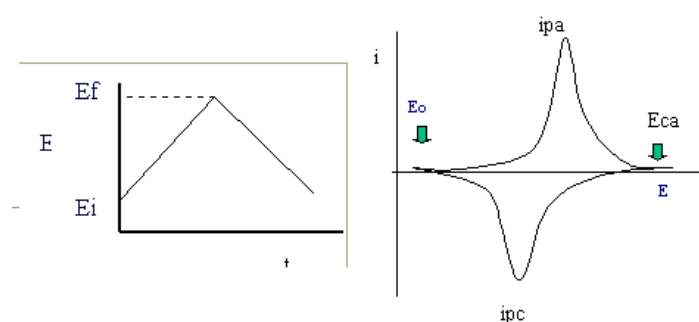
Dependiendo de cómo se dispersen los electrones se obtendrá al final una imagen a partir de los electrones que atraviesan la muestra, la cual se observará con distintas tonalidades de gris que corresponderá al grado de dispersión de los electrones incidentes.

Debido a que los electrones tienen una longitud de onda menor que la luz visible, estos permiten mostrar estructuras más pequeñas como lo son las nanofibras y las nanopartículas.

### **Técnicas electroquímicas**

#### **Voltamperometría cíclica (VC)**

La voltametría cíclica es una técnica electroquímica, a través de la cual se aplica una señal de excitación, que consiste en un barrido cíclico en función del tiempo a una velocidad constante, desde un potencial inicial hasta un potencial final regresando el barrido hasta su estado inicial, obteniéndose como respuesta una señal de corriente en función del potencial aplicado. A la representación gráfica de esta respuesta se le denomina voltamperograma, en el cual se pueden observar picos de oxidación y de reducción, dependiendo del comportamiento electroquímico de la especie electroactiva que se esté estudiando <sup>47</sup>.



**Figura 3 Respuesta del electrodo ante una señal de excitación**

La forma de las curvas del voltamperograma dependerá del proceso que se lleva a cabo en el electrodo de trabajo, en donde la primera parte es el resultado de la oxidación de las especies presentes, observándose un pico anódico (ipa), y la segunda parte corresponderá a la reducción de las mismas, en el pico catódico (ipc).

La voltamperometría permite analizar el estado en el cual se encuentra la superficie del electrodo de trabajo, permitiendo evidenciar los cambios que ocurren al ir modificando la superficie del electrodo, observándose una variación en el voltamperograma que, dependiendo de la naturaleza de los compuestos utilizados y de la ventana de potencial, puede disminuir o aumentar la corriente.

### **Componentes electroquímicos**

#### **Electrodo de trabajo**

Es en el que ocurre la reacción del analito a investigar, este debe tener la capacidad de permitir el paso de corriente a través de él y servir como fuente o depósito de electrones provenientes de la solución electrolítica en la que se trabaje, sin generar cambio alguno más que del proveniente de las modificaciones hechas en su superficie <sup>48</sup>.

### **Electrodo de referencia**

Es un electrodo el cual tiene un potencial conocido y constante, este no debe ser polarizable. Generalmente se utilizan el electrodo de calomel o el electrodo de plata-cloruro de plata (Ag/AgCl) el cual utiliza una solución de KCl (cloruro de potasio) como solución de contacto iónico <sup>49</sup>.

### **Electrodo auxiliar o contraelectrodo**

El electrodo auxiliar o contraelectrodo se utiliza para que la corriente que se origina en la celda electroquímica, pase a través de este y el electrodo de trabajo, y no por el electrodo de referencia, para así evitar su polarización <sup>50</sup>.

### **Biosensor electroquímico**

Un biosensor es un dispositivo compuesto por un elemento de reconocimiento biológico y un sistema transductor, que codifica la señal de la interacción entre el analito y el elemento de reconocimiento biológico a una señal eléctrica cuantificable. <sup>4,5</sup>

El analito (virus, bacteria, átomo, molécula, entre otros) al entrar en contacto con el agente de reconocimiento biológico, produce un cambio fisicoquímico que será detectado y cuantificado por el sistema transductor, este dependerá de la naturaleza del analito, generando en el medio el cambio que será analizado y cuantificado <sup>48</sup>.

De esta forma se puede clasificar los biosensores en dos categorías: según su elemento de reconocimiento biológico y según su sistema transductor <sup>51</sup>.

Según su elemento de reconocimiento biológico, si es una enzima se clasificará como un sensor enzimático, si es un anticuerpo como inmunosensor y si se utiliza fragmentos de ADN como un genosensor.

Por ejemplo, en un biosensor de glucosa, que es un biosensor enzimático, la enzima (glucosa oxidasa) que es el elemento de reconocimiento biológico, reaccionará exclusivamente con la glucosa, y en presencia de oxígeno se forma peróxido de hidrógeno y gluconolactato, tanto el oxígeno como el peróxido de hidrógeno son detectados y medidos por el sistema transductor, de modo que mientras se va consumiendo el oxígeno se va formando el peróxido lo cual genera una variación eléctrica que puede ser medida y cuantificada <sup>52</sup>.

En un inmunosensor, el componente biológico es un antígeno o anticuerpo que participará en una reacción de afinidad con el antígeno o anticuerpo determinado (analito), estos formarán un complejo antígeno-anticuerpo, el cual producirá un cambio en la matriz del biosensor creando una variación en la señal electrónica <sup>53,54</sup>.

El sistema transductor es el que transformará la respuesta que se obtiene de la unión entre el analito y el biosensor a un tipo de señal cuantificable, permitiendo así medir de manera precisa la concentración del analito en la muestra analizada <sup>55</sup>.

### **Antecedentes del problema**

A continuación, se menciona un estudio que compara dos métodos indirectos de diagnóstico de toxoplasmosis con resultados muy similares. En el trabajo desarrollado por Cortes y colaboradores en 2009 se describe

la concordancia entre el método ELISA y la inmunofluorescencia indirecta (IFI), para la determinación de anticuerpos tipo IgG anti *T. gondii*, obteniendo un resultado positivo de 54 % para la IFI y de 56,3 % para el ELISA. Demostrando que tienen una especificidad y sensibilidad similar. El índice kappa (correlación entre 2 métodos comparando los resultados positivos de ambos) dio 0,916 (casi absoluto) <sup>56</sup>.

En la actualidad se han construido muchos tipos de biosensores para detectar anticuerpos, bacterias, virus, y más analitos de interés clínico para el humano, de estos trabajos se destacan tres en los cuales utilizaron técnicas electroquímicas para detectar de manera indirecta la presencia del *Toxoplasma gondii*.

Wang y colaboradores en el 2004 desarrollaron un inmunosensor piezoeléctrico para la detección de anticuerpos anti-*T. gondii* utilizando nanopartículas de oro y cristal de cuarzo. Se reveló la formación del complejo antígeno-anticuerpo al cambiar la frecuencia de resonancia del cuarzo. Se comparó con el método de ELISA obteniendo una correlación de 0,957. Se demostró que las nanopartículas de oro sirven como base para desarrollar un inmunosensor en el que se involucran antígenos de *T. gondii* <sup>57</sup>.

Gokce y colaboradores en el 2016 desarrollaron una metodología utilizando técnicas electroquímicas para la detección voltametría de la hibridación de secuencias selectivas de ADN del *Toxoplasma gondii*, por medio de la oxidación de la guanina como revelador de la presencia de la hibridación <sup>58</sup>.

Así mismo Alves y colaboradores en el 2017 también utilizan voltametría de pulso diferencial para generar un genosensor amperométrico que detecta la hibridación de sondas específicas de ADN de *Toxoplasma gondii*, demostrando una buena respuesta a la oxidación de residuos de guanina como marcador de la presencia y concentración del parásito <sup>59</sup>.

## Hipótesis

Si se logra inmovilizar un antígeno recombinante de *Toxoplasma gondii*, en una superficie de carbón vítreo modificada químicamente con nanopartículas de oro, entonces, se podría desarrollar un inmunosensor electroquímico para la detección de anticuerpos anti-*T. gondii*.

## Objetivos

### Objetivo general

- Desarrollar un inmunosensor electroquímico para la detección de anticuerpos anti-*Toxoplasma gondii*.

### Objetivos específicos

- Caracterizar electroquímicamente la superficie de carbón vítreo a ser utilizada como electrodo de trabajo.
- Modificar la superficie del electrodo de trabajo con compuestos orgánicos que permitan la adhesión de las nanopartículas de oro que servirán como plataforma en el desarrollo del inmunosensor.
- Evaluar la respuesta electroquímica del electrodo de carbón vítreo modificado con compuestos orgánicos y nanopartículas de oro.
- Fijar antígenos recombinantes (SAG1) de *Toxoplasma gondii* al electrodo modificado con compuestos orgánicos y nanopartículas de oro y evaluar la respuesta electroquímica del mismo.
- Evaluar la respuesta del inmunosensor desarrollado en presencia de anticuerpos anti- *T. gondii*.
- Evaluar la especificidad del inmunosensor, utilizando para esto anticuerpos contra otro microorganismo.

## **Marco metodológico**

### **Tipo de investigación**

El tipo de investigación es definido por el objetivo de la investigación, más que por el método utilizado, la fuente de información y otros aspectos de la misma. Cada tipo de investigación tiene sus características propias y únicas, que señalan el grado de profundidad y el tipo de resultado que se obtendrá. Por lo tanto, al analizar el objetivo de la investigación actual, se puede concluir que el tipo de investigación es de tipo proyectiva, ya que con esta se busca desarrollar y probar una técnica para determinar anticuerpos anti-*Toxoplasma gondii*.<sup>60</sup>

### **Diseño de la investigación**

El diseño de la investigación tiene que ver con los procedimientos específicos que se utilizaron para recoger los datos, de esta forma el diseño para esta investigación será de tipo experimental, ya que se está evaluando la respuesta del electrodo modificado ante muestras con y sin anticuerpos anti-*Toxoplasma gondii*.<sup>60</sup>

## **Materiales y métodos**

### **Materiales**

#### **Reactivos**

Los ácidos HClO<sub>4</sub> al 70 %, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 95 – 97 % y el ácido tetracloroaúrico tri-hidratado (HAuCl<sub>4</sub>.3H<sub>2</sub>O), así como las sales de K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>.3H<sub>2</sub>O, K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, KNO<sub>3</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, fueron

suministrados por la Merck. El Azul de Metileno ( $C_{16}H_{18}ClN_3S$ ) y el Citrato de sodio fueron suministrado por Riedel-de Haën®. Todos los reactivos fueron utilizados sin ningún tratamiento adicional de purificación. Las AuNPs fueron preparadas por reducción del  $HAuCl_4 \cdot 3H_2O$  (concentraciones variables) en presencia de citrato de sodio.

Los sueros donde se encuentran los anticuerpos anti- *T. gondii* y el antígeno recombinante puro (SAG1) fueron suministrados por el Instituto de Inmunología Clínica (IDIC ULA).

El antígeno recombinante puro (SAG1) fue clonado, expresado en *Escherichia coli* y purificado previamente en el Instituto de Inmunología Clínica de la Universidad de los Andes (IDIC ULA) según protocolo previamente estandarizado.<sup>28</sup>

### **Celda electroquímica y electrodos**

Los experimentos se realizaron en una celda electroquímica de vidrio de un compartimiento y con un sistema de tres electrodos: un electrodo de Ag/AgCl (sat) utilizado como electrodo de referencia, un alambre de platino como contraelectrodo y como electrodo de trabajo, carbón vítreo (Basi MF-2012 de 3mm de diámetro) modificado, con un área geométrica de  $0,071 \text{ cm}^2$  y un área efectiva de  $0,10 \text{ cm}^2$ .

### **Instrumentos**

Se utilizó un potenciostato/galvanostato Autolab® PGSTAT12 para los estudios realizados por Voltametría Cíclica.

Se utilizó un espectrofotómetro UV-vis JENWAY en el intervalo de longitudes de onda de 400 a 650 nm, empleando una celda plástica de 1cm de espesor, para la caracterización en cuanto a tamaño, forma y estabilidad de las AuNPs sintetizadas.

## Métodos de limpieza y preparación de electrodos

### Limpieza del material de vidrio

Todo el material de vidrio utilizado y la celda electroquímica fueron lavados inicialmente con detergente, posteriormente con una mezcla de  $\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}_2$  (1:1) durante 10 minutos y finalmente con abundante agua desionizada. Este proceso se realizó siempre que se sospechaba de una posible contaminación de material.

### Preparación de las mezclas de AuNPs y AM

- **Solución de AM:** La mezcla homogénea (solución) de AM  $10^{-4}$  M fue preparada disolviendo 9 mg de AM en agua desionizada y enrasando hasta el volumen de 25ml. Esta solución fue almacenada a una temperatura de  $4^\circ\text{C}$ .
- **Mezcla de AuNPs:** La mezcla heterogénea de AuNPs fue preparada, realizando la síntesis de las mismas por el método de Turkevich modificado por Frens<sup>47</sup>, a través del cual, a una solución de ácido tetracloroaurico ( $\text{HAuCl}_4$ ) 0.01% en caliente y con agitación se le adiciona lentamente una determinada cantidad de una solución de citrato de sodio, hasta que aparezca un cambio de color en la solución, dejando luego enfriar la mezcla resultante. La mezcla fue almacenada en viales ámbar a una temperatura de  $4^\circ\text{C}$ . El tamaño y forma de las AuNPs fueron determinados empleando espectrofotometría UV-Vis y microscopía electrónica de transmisión.

### Limpieza mecánica y electroquímica del electrodo de trabajo

Un electrodo de disco de carbón vítreo ( $d = 3\text{mm}$ ), fue utilizado como electrodo de trabajo. Para su limpieza se siguió un tratamiento químico a través del cual, el electrodo fue inmerso en una mezcla de  $\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}_2(3:1)$  durante 10 segundos y posteriormente lavado en abundante agua desionizada. Luego se pulió con alúmina  $0,3\ \mu\text{m}$  y  $0,05\ \mu\text{m}$ . usando agua desionizada como lubricante. Finalizada la limpieza mecánica, se sometió a limpieza electroquímica en medio ácido ( $\text{HClO}_4$   $0,1\text{M}$ ), utilizando la técnica electroquímica de Voltametría cíclica, desde  $0,2$  a  $1,4\ \text{V}$  vs  $\text{Ag}/\text{AgCl}$  (sat) durante 10 ciclos a una velocidad de barrido de  $100\ \text{mV/s}$ . En esta etapa el electrodo limpio (EQ/CV) fue utilizado para su modificación con tiourea (TIO) azul de metileno (AM) y nanopartículas de oro (AuNPs).

### **Preparación del inmunosensor electroquímico**

Para construir el inmunosensor electroquímico se modificó el electrodo de carbón vítreo previamente limpio con Tiourea (TIO), azul de metileno (AM/AuNPs/TIO/CV), y AuNPs (AuNPs/TIO/CV)<sup>44</sup>, siguiendo los siguientes procedimientos:

- **Modificación con Tiourea (TIO):**

El electrodo EQ/CV fue modificado, colocándolo en una solución de TIO  $0,25\text{M}$  en  $\text{HNO}_3$   $2\text{M}$  ( $0,95\ \text{gr}$  de tiourea +  $6,93\text{ml}$  de  $\text{HNO}_3$  + agua desionizada hasta  $250\ \text{mL}$ ) y aplicando VC en una ventana de potencial de  $-1,1$  a  $1,0\ \text{V}$ , a una velocidad de barrido de  $100\text{mV/s}$ . Durante este proceso se electrodeposita TIO sobre el EQ/CV, dando origen a un electrodo modificado (TIO/EQ/CV).

- **Modificación con azul de metileno (AM) y nanopartículas de oro (AuNPs):**

El electrodo TIO/EQ/CV fue modificado por adsorción de capas de AuNPs y AM de forma alternada. Se comienza colocando una cantidad determinada de la mezcla coloidal de AuNPs sobre la superficie del

electrodo y evaporando luego el solvente aplicando vapor caliente. Posteriormente se coloca una cantidad determinada de la solución de AM y se procede con el mismo procedimiento de evaporación del solvente. Este procedimiento se repite entre cada capa de AuNPs y AM hasta que el número de capas de AuNPs sea igual a cinco. Esta modificación es estable debido a las fuerzas de atracción electrostáticas entre las capas de AuNPs y AM que se originan entre ellas. La cantidad de cada una de las mezclas que se colocaron sobre el electrodo modificado fue de 5 $\mu$ L por capa, llegándose a preparar 5 capas de AuNPs y 4 de AM. Entre capa y capa se ciclo el electrodo a una ventana de potencial de -0,6 a 0,2 a una velocidad de 100 mV/s empleando la técnica VC en una solución de buffer fosfato pH=7,4 (PBS). Con este procedimiento se construyó el electrodo modificado [AuNPs]5-AM4/TIO/EQ/CV.

- **Adsorción del antígeno recombinante sobre el electrodo [AuNPs]5-AM4/TIO/EQ/CV:**

El electrodo [AuNPs]5-AM4/TIO/EQ/CV, fue sumergido en una solución del antígeno recombinante SAG1 1:10(diluido con Buffer fosfato pH=7,4), durante 24 hrs. a 4°C, con la finalidad de que dicho antígeno se adsorba sobre la superficie del electrodo modificado. Una vez realizada la modificación, el electrodo Ag/[AuNPs]5-AM4/TIO/EQ/CV fue ciclado por VC en una ventana de potencial de -0,6 a 0,2 a una velocidad de barrido 100 mV/s en una solución de PBS.

- **Bloqueo de los sitios libres del electrodo:**

El electrodo modificado Ag/[AuNPs]5-AM4/TIO/EQ/CV fue incubado en una solución de albúmina al 1% a 37°C, con la finalidad de bloquear los sitios activos del electrodo modificado donde no se adsorbió el antígeno, después fue ciclado en una ventana de potencial de -0,6 a 0,2 a una velocidad de barrido de 100 mV/s en PBS.

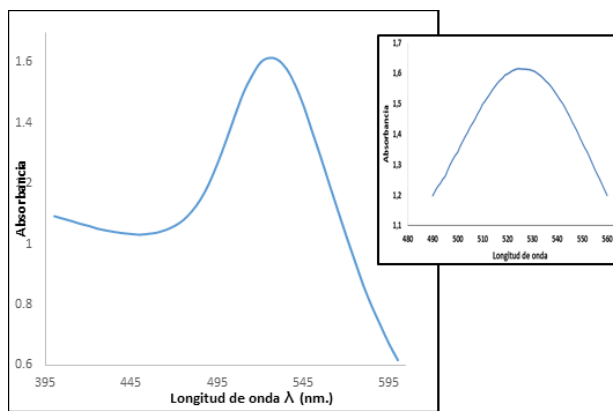
Al finalizar todo este procedimiento, se logra obtener el inmunosensor electroquímico deseado.

El electrodo se cicló en solución de trabajo (buffer fosfato PBS) después de cada modificación, esto se realizó ciclando el electrodo hasta que se obtuvo una respuesta constante, la que se registró y se presentó en los resultados finales.

## Resultados y discusión

### Caracterización de las AuNPs

La mezcla de AuNPs sintetizada presentó un color rojo rubí. Este color de la mezcla se asoció con las propiedades ópticas que presentan las AuNPs, debido a la interacción de la luz incidente con las nanopartículas. El mecanismo de absorción de luz en la nanopartícula metálicas se relaciona con un fenómeno de excitación coherente y colectivo de los electrones libres en la banda de conducción, produciéndose una oscilación en fase que se conoce como resonancia del plasmón superficial (RPS). La figura 4, muestra el espectro obtenido de la mezcla de AuNPs sintetizada. Se observa una sola banda de absorción del plasmón centrada a 525 nm, la cual es característica de nanopartículas que presentan un diámetro promedio de 20 nm.<sup>60</sup>

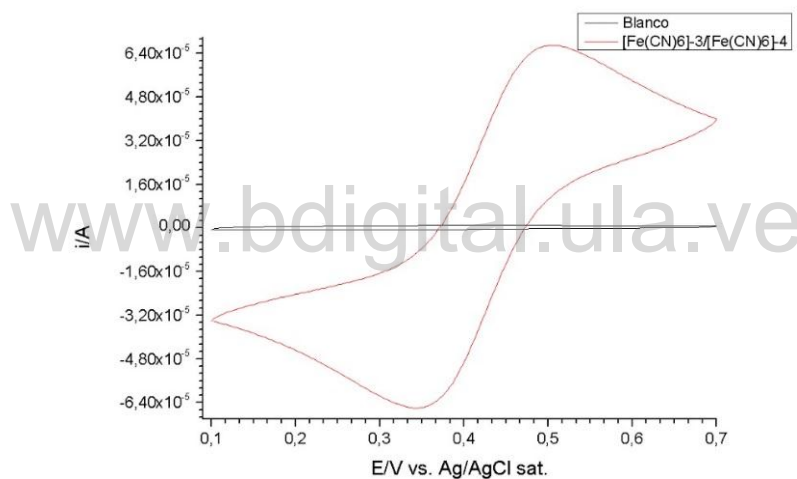


**Figura 4: Espectro de absorción UV-Vis de la suspensión coloidal de AuNPs**

## Caracterización electroquímica del electrodo de carbón vítreo

**Determinación del factor de rugosidad (FR) y el área real del electrodo de carbón vítreo utilizado como base para el inmunosensor:**

La figura 5 muestra el comportamiento electroquímico del electrodo de carbón vítreo (EQ/CV) en una solución de  $\text{KNO}_3$  0,1M +  $5 \times 10^{-3}$  de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  (voltamograma registrado en el segundo barrido cíclico).



**Figura 5 Voltamperograma del electrodo de carbón vítreo en  $\text{KNO}_3$  0,1 M (blanco) y  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$   $5 \times 10^{-3}$  M a  $v = 50 \text{ mV/s}$ .**

A partir del voltamperograma obtenido en la figura 5 se calculó el factor de rugosidad (FR) y el área real (AR) utilizando las siguientes ecuaciones:

$$A_{real} = FR \times A_{Geometrica} \quad (1)$$

$$FR = \frac{I_{Pa(exp)}}{I_{Pa(teorico)}} \quad (2)$$

Donde  $I_{pa(exp)}$  es la corriente del pico de oxidación correspondiente al ión  $[Fe(CN)_6]^{-4}$  que se obtuvo de la figura 5 e  $I_{pa(teorico)}$  es la corriente que se calcula a partir de la ecuación de Randles-Sevcik.

Asumiendo temperatura de 25°C la ecuación de Randles-Sevcik quedaría así:

$$I_{pa(teorico)} = (2,69 \times 10^{-5}) n^{3/2} D^{1/2} V^{1/2} AC \quad (3)$$

En donde  $n$  son los electrones transferidos,  $D$  es el coeficiente de difusión del  $[Fe(CN)_6]^{-4}$  que es  $7,6 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ ,  $v$  es la velocidad de barrido que es  $50 \text{ mV/s}$ ,  $A$  es el área geométrica del electrodo de carbón vítreo que se obtiene a partir de:  $A_g = \pi r^2$  dando  $0,0707 \text{ cm}^2$ , y  $C$  la concentración de  $[Fe(CN)_6]^{-4}$  que es  $5 \times 10^{-3} \text{ M}$ .

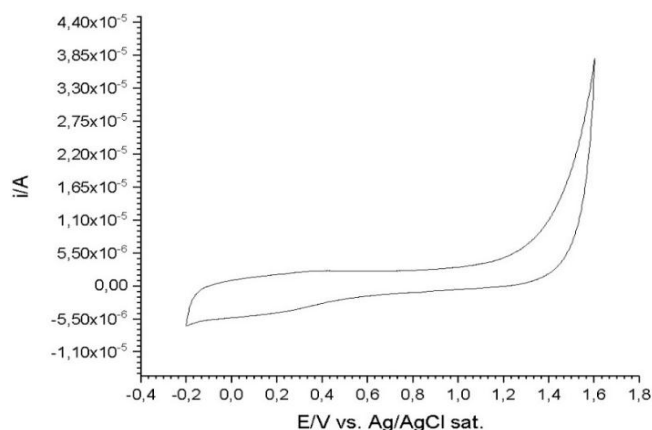
A partir de los datos anteriores y después de realizar varias veces el experimento anterior, se pudo constatar que el área real del electrodo de carbón vítreo utilizado presentó un área real de  $0,08 \text{ cm}^2 \pm 0,05$ .

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

**Comportamiento electroquímico del sensor en cada una de las etapas de su modificación hasta el desarrollo del inmunosensor electroquímico:**

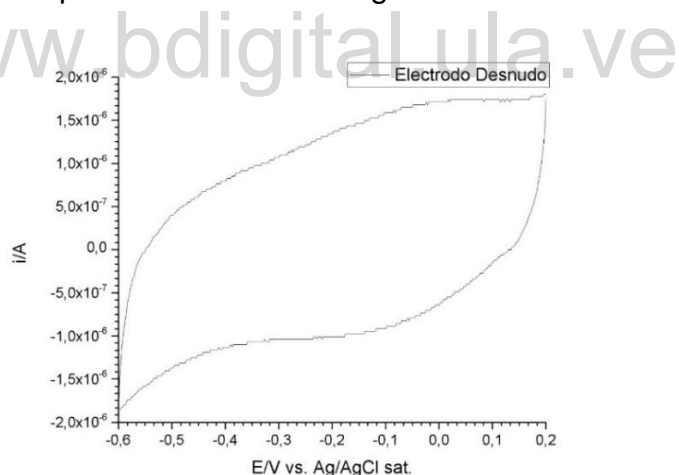
- **Comportamiento electroquímico del electrodo de carbón vítreo después de la limpieza mecánica y electroquímica (electrodo CV):**

El comportamiento electroquímico del CV se muestra en la figura 6. Se observa una respuesta característica de un electrodo con una superficie completamente limpia, esto se realizó previo a cada experimento observándose una buena reproducibilidad.



**Figura 6 Voltamperograma del electrodo de carbón vítreo limpio (CV) en HClO<sub>4</sub> 0,1 M a  $v = 100\text{mV/s}$ .**

Después de la limpieza mecánica y electroquímica se procedió a ciclar el electrodo CV en la solución PBS en donde se evaluó la respuesta del mismo después de cada modificación, obteniéndose como resultado el voltamperograma que se observa en la figura 7.



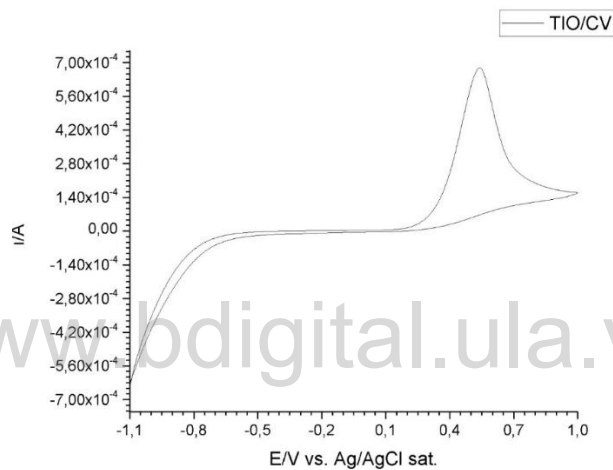
**Figura 7 Voltamperograma del electrodo CV en Buffer Fosfato pH=7,4 a  $v = 100\text{mV/s}$ .**

### **Electrodeposición de tiourea (TIO)**

La electrodeposición de TIO en CV se lleva a cabo debido a la interacción de los grupos aminos del TIO con la superficie del CV, formando un enlace covalente con los grupos reactivos como hidroxilos y otros óxidos presentes en la superficie del CV.

Al ciclar el electrodo CV, en la solución de tiourea, uno de los grupos amino de la tiourea se inmoviliza en la superficie del electrodo, esto ocurre durante el proceso de oxidación, obteniéndose lo que se observa en la figura 8.

A medida que el electrodo CV se cicla en la solución de Tiourea se va modificando la superficie, la tiourea en soluciones ácidas forma un radical lo cual se evidencia en el pico que se observa entre 0,4 y 0,7 V.



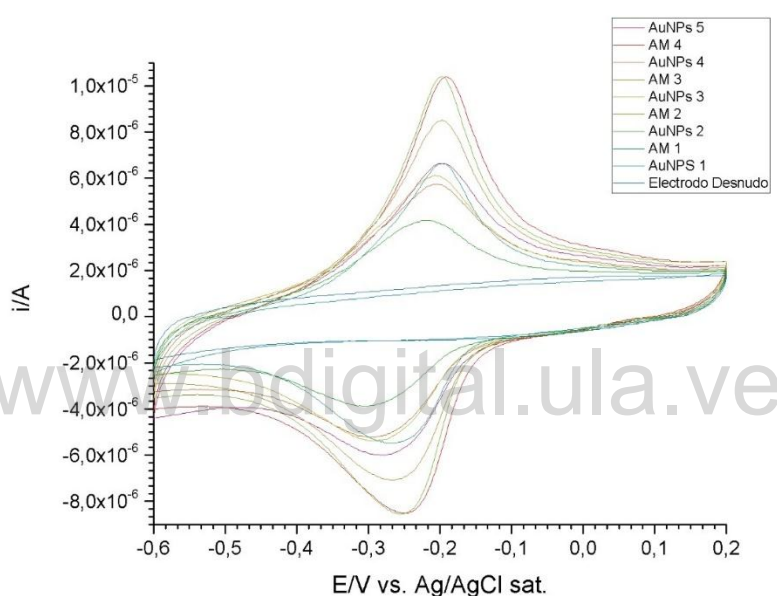
**Figura 8 Respuesta de CV en Tiourea 0,25M y HNO<sub>3</sub> 2M a v = 100mV/s**

### **Comportamiento electroquímico durante el ensamblaje capa por capa de AuNPs y AM**

El AM es un colorante catiónico que experimenta un proceso redox reversible en soluciones acuosas ácidas, en un intervalo de potencial de -0,4 a -0,1 V Esta respuesta electroquímica puede utilizarse como revelador del compuesto que está siendo adsorbido durante el proceso de modificación del electrodo de trabajo.

En la figura 9, se observa la respuesta electroquímica del electrodo modificado con AM y AuNPs. Cada voltamperograma registrado corresponde a la respuesta electroquímica observada en el quinto barrido

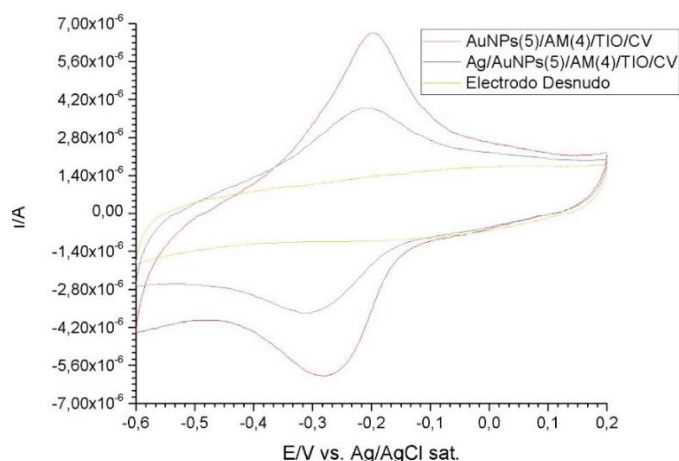
cíclico, a partir del cual la respuesta permanece constante. Al incrementarse las capas de AM se observa un incremento en la corriente del pico de oxidación, lo cual es atribuido a la presencia cada vez mayor de AM que se está siendo adsorbido en la superficie del electrodo. Mientras que a medida que se va adsorbiendo AuNPs, la señal del pico de oxidación disminuye ligeramente debido a que en ese intervalo de potencial las AuNPs no experimentan un proceso de oxidación. Sin embargo, dicho comportamiento es indicativo de que las AuNPs están siendo adsorbidas entre capa y capa de AM.



**Figura 9 Voltamperogramas del electrodo de CV sin modificar y modificado con TIO con diferentes capas de AuNPs 5 y AM 4, en buffer fosfato pH=7,4 a  $v = 100\text{mV/s}$ .**

### **Comparación del comportamiento electroquímico de los electrodos [AuNPs]<sub>5</sub>-AM<sub>4</sub>/TIO/CV y Ag/[AuNPs]<sub>5</sub>-AM<sub>4</sub>/TIO/CV**

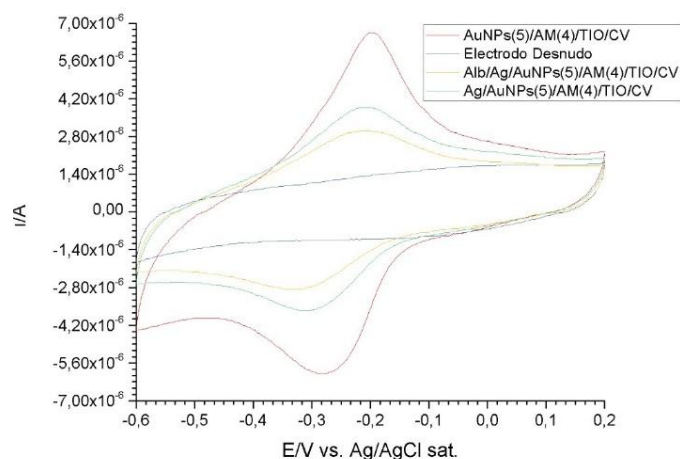
En la figura 10 se muestran las respuestas electroquímicas de los electrodos [AuNPs]<sub>5</sub>-AM<sub>4</sub>/TIO/CV y Ag/[AuNPs]<sub>5</sub>-AM<sub>4</sub>/TIO/CV.



**Figura 10 Voltamperograma multicapas [AuNPs(5)/AM(4)TIO/CV], electrodo con multicapas con antígeno[Ag/AuNPs(5)/AM(4)TIO/CV] y sin modificaciones. En Buffer fosfato pH=7,4 a  $v = 100\text{mV/s}$ .**

En la figura 10 se puede observar como el pico de oxidación del AM disminuyó, esto se debe a la unión entre el antígeno recombinante y las AuNPs debido a que estos bloquean pasivamente la señal, ya que las sustancias de origen proteico como los antígenos y anticuerpos no son electroactivas.

El electrodo Ag/[AuNPs]<sub>5</sub>-AM<sub>4</sub>/TIO/CV fue incubado en una solución de albúmina al 1% por 2 horas a 37°C, y posteriormente se barrió el electrodo en buffer fosfato a una ventana de potencial de -0,6 a 0,2 a una velocidad de barrido de 100 mV/s.



**Figura 11 Voltamperogramas del electrodo [AuNPs(5)/AM(4)TIO/CV], electrodo modificado con antígeno [Ag/AuNPs(5)/AM(4)TIO/CV] y con albumina [Alb/Ag/AuNPs(5)/AM(4)TIO/CV] en buffer fosfato pH=7,4 a v = 100mV/s**

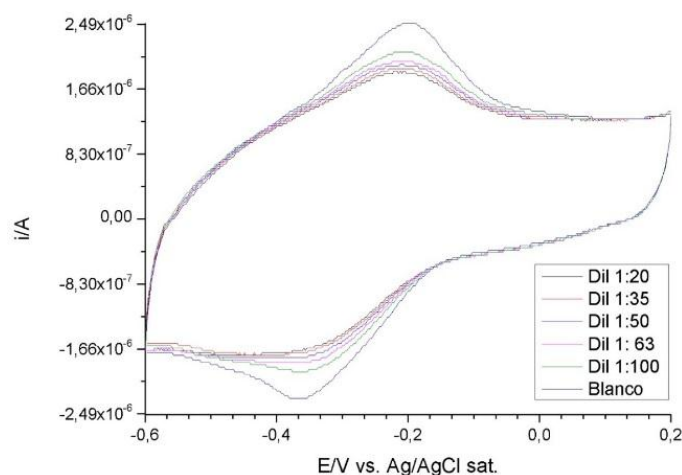
En la figura 11 se muestra la respuesta electroquímica del sensor modificado con albúmina, nuevamente se observa que la señal disminuye y esto es atribuido a la pasivación del mismo, debido al bloqueo de los sitios activos del electrodo que habían quedado sin modificación, y de las AuNPs, sobre las cuales no se adsorbió el antígeno recombinante. Es decir, la albúmina se adsorbe sobre todos estos sitios en la superficie del electrodo donde no se habían adsorbido las AuNPs sobre el AM y donde no se había adsorbido el antígeno recombinante sobre las AuNPs.

### Respuesta del inmunosensor ante la presencia de anticuerpos

Se evaluó la respuesta del inmunosensor ante la presencia de anticuerpos anti-*T. gondii*, para ello, se utilizó un suero paciente (1662) positivo para anticuerpos tipo IgG anti-*T. gondii* con una concentración de 1091IU/ml (ELISA indirecto), el cual fue diluido en diferentes concentraciones para hacer soluciones patrón.

El inmunosensor desarrollado se incubó en cada dilución (de menor a mayor concentración) por 30 min a temperatura ambiente y se evaluó su

respuesta electroquímica después de cada incubación, en buffer fosfato pH 7,4 desde -0,6 a 0,2 a una velocidad de barrido de 100 mV/s y se registró su respuesta, obteniéndose lo observado en la figura 12.

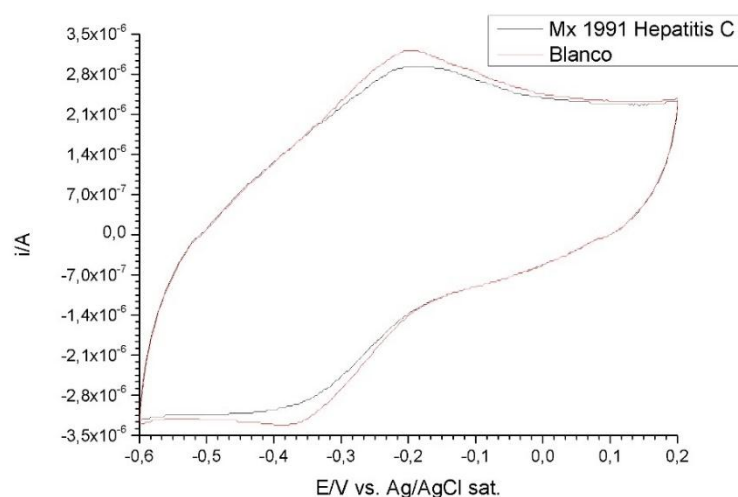


**Figura 2 Familia de Voltamperogramas del inmunosensor incubado en soluciones con diferentes concentraciones de anticuerpos en buffer fosfato pH=7,4 a v = 100mV/s.**

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

En la figura 12 se observa que después de incubar al inmunosensor en las soluciones de diferentes concentraciones de anticuerpos la corriente disminuye al incrementarse la concentración de anticuerpos, debido a que la unión del anticuerpo (presente en las soluciones) con el antígeno (en la superficie del electrodo modificado) bloquea pasivamente la señal del electrodo.

La respuesta del inmunosensor ante interferentes fue evaluada, al colocar el inmunosensor en suero paciente (sin modificación alguna) con títulos altos para *hepatitis C*, no hubo variaciones en la corriente. Este comportamiento mostró que el inmunosensor desarrollado es específico y sensible a la presencia únicamente de anticuerpos anti-*Toxoplasma gondii*.



**Figura 3 Voltamperograma del inmunosensor en solución con interferentes (muestra sin diluir con títulos altos de anticuerpos anti-Hepatitis C) en buffer fosfato pH=7,4 a  $v = 100\text{mV/s}$ .**

www.bdigital.ula.ve

## Conclusiones

Las modificaciones hechas al electrodo de carbón vítreo demostraron ser de gran utilidad para el armado de un inmunosensor.

El uso de antígeno recombinante hace que la especificidad de cualquier técnica inmunológica aumente, como lo es el caso de los inmunosensores.

El inmunosensor demostró ser altamente específico ya que al realizar la prueba de interferentes no hubo respuesta ante la presencia de anticuerpos anti-*Hepatitis C*.

El uso de técnicas electroquímicas para la detección de anticuerpos anti-*Toxoplasma gondii* ha demostrado ser una metodología más sencilla, de un menor tiempo relativo, de mayor especificidad y sensibilidad que otras metodologías actuales.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kuchar A, Hayde M, Steinkogier F. Congenital toxoplasmosis retinochoroiditis after primary infection de of the mother in pregnancy. Der Ophthamologe. 1996; 93:190-193.

2. Dubey J, Lindsay D, Speer C. Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts. *Clin. Microbiol. Rev.* 1998. 11(2): 267-299.
- 3 Hill D, Dubey J. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clin Microbiol Infect.* 2002;8:634-40.
- 4 Ortega, F. biosensores y biochips: herramientas para el diagnóstico y la terapéutica. [Tesis de doctorado]. España. real academia nacional de farmacia. 2006.
- 5 Lopez, M. transductores y sensores. [Tesis de doctorado]. Argentina. Universidad nacional de Córdoba. 2009.
- 6 D'Souza, S. Microbial biosensors. *Biosens Bioelectron*,2001; 16(6): 337–353.
- 7 Salinas M. y Medina C. Técnicas inmunológicas para el estudio de antígenos parasitarios. En Becerril M. (Ed.) *Parasitología Medica*. 2014. México. mcgraw-hill/interamericana editores, s.a. de c.v.
8. S. Menolasina, D. Rodriguez. Detección electroquímica de virus en muestras de *Allium Sativum L.* cultivadas en el páramo andino de Venezuela. *Perfiles*,2016; 1(15), 17-22.
9. S. Menolasina, M.I. De Oliveira, C. Travieso. Superficies de carbón vítreo modificadas con compuestos orgánicos y nanopartículas de oro como sensores de dopamina, *Avances en Química*,2013; 8(3), 139-1444.
10. S. Menolasina, F.J. García-Iñigo, B. Martín-Fernández, and B. López-Ruiz. Indirect Dopamine Detection on a Glassy Carbon Electrode Based on Laponite/Tirosinase. *Sensor Letter*,2011; 9(5), 1670-1675.
- 11 Miller N, Frenkel J, Dubey J. Oral infections with *Toxoplasma* cysts and oocysts in felines, other mammals, and in birds. *J. Parasitol.* 1972; 58: 928–937

- 12 Rosso F, Agudelo A, Isaza A, Montoya J. Toxoplasmosis congénita: aspectos clínicos y epidemiológicos de la infección durante el embarazo. *Colomb Med (Cali)*. 2007; 38(3). 316-337.
- 13 Dumetre A, Dubey J, Ferguson D, Bongran P, Azas N, Puech P. Mechanics of the *Toxoplasma gondii* oocyst Wall. *PNAS*. 2013; 110(28): 11535-11540.
- 14 Díaz L, Zambrano B, Chacón G, Rocha A, Díaz S. Toxoplasmosis y embarazo. *Rev Obstet Ginecol Venez*. 2010. 70(3):190-205.
- 15 Ji H, Mcniven S, LeeK, Saito T, IkebukuroK, Karube I. increasing the sensitivity of piezoelectric odour sensors based on molecularly imprinted polymers. *biosens. bioelectron*. 2000; 15: 403–409.
- 16 Pelloux H, Brenier-Pinchart MP, Fricker-Hidalgo H. Protozoan infections in humans: Congenital toxoplasmosis. *Europ J Protistol*. 2003;39:444-448.
- 17 Shapiro K, Largier J, Mazet J, Bernt W, Ell J, Melli A, Conrad P. Surface Properties of *Toxoplasma gondii* Oocysts and Surrogate Microspheres. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009;75(4): 1185-1191.
- 18 Dumetre A, Dubey J, Ferguson D, Bongran P, Azas N, Puech P. Mechanics of the *Toxoplasma gondii* oocyst Wall. *PNAS*. 2013;110(28): 11535-11540.
- 19 Quiroz H. Enfermedades causadas por Coccidias. En: Quiroz H, editor. *Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos*. México DF: Editorial Limusa, S.A.; 2002. p.119-176.
- 20 Lyons R, McLeod R, Roberts C. *Toxoplasma gondii* tachyzoite-bradyzoite interconversion. *Trends Parasitol*. 2002; 18:198-201.
- 21 Dubey J, Lindsay D, Speer C. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin Microbiol Rev*. 1998; 11:267-299.

- 22 Vega G. Antígenos e inmunógenos. Rev Fac Med UNAM.2009; 25(1): 41-42.
- 23 Orozco K. evaluación de los antígenos recombinantes sag1, gra7 y rop1 en el diagnóstico de la toxoplasmosis congénita en el departamento de sucre. [Tesis de doctorado]. Colombia. Universidad de Sucre. 2016.
- 24 Silva N. Evaluación de la respuesta pro-inflamatoria in vitro frente a proteínas recombinantes de *Toxoplasma gondii* [Trabajo Especial de Grado]. Mérida: Universidad de los Andes; 2016.
- 25 Eldeval F, Martínez R. Diagnóstico de toxoplasmosis a través de un elisa con antígenos recombinantes en adultos. [Tesis de grado]. Mérida: Universidad de los Andes; 2018.
- 26 Lopez M, Fernandez G, Lopez H, de Francizco A. Antigenicidad de las proteínas recombinantes. Gac Med Bilbao.2003; 100: 17-21.
- 27 Samudio M, Acosta E, Castillo V, Guillén Y, Licitra G, Aria L et al . Aspectos clínico-epidemiológicos de la toxoplasmosis en pacientes que consultan por problemas de visión. Rev. chil. infectol. 2015; 32 (6): 658-663.
- 28 Martin I, Garcia S. Toxoplasmosis: infección oportunista en pacientes con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida. Rev Biomed 2003; 14:101-111.
- 29 Lebech M, Joynson D, Seitz H, Thulliez P, Gibert R, Dutton G, Ovlisen B, Petersen E. Classification system and case definitions of *Toxoplasma gondii* infection in immunocompetent pregnant women and their congenitally infected offspring. Eur J Clin Microbiol Infec dis. 1996; 15:799-805.
- 30 Halonen S, Weiss L. Txoplamosis. Handbook of Clinical Neurology. 2013. 125-145.

- 31 Martin V. Regulación de la respuesta inmune contra el toxoplasma gondii en la mucosa intestinal y análisis del valor inmunoproláctico de antígenos del parásito en el modelo murino. [Tesis de grado]. Buenos Aires: Universidad de Buenos Aires; 2003.
- 32 Goodman J. Wang A. Immunoglobulins: structure, diversity, and genetics, IN: Fudenberg H, Stites, D, Caldwell J, Wells J. (Edit.). Basic and clinical immunology. Lange Medical Publication. Los Altos 1980; 28.
- 33 Yujra M, Ramirez R, Ramirez T. Inmunoglobulinas. Rev. Act. Clin. Med. 2011; 13: 663-666.
- 34 Rodriguez A, Figueroa D, Dalence R. Comparacion de dos métodos serológicos para el diagnóstico de toxoplasmosis. Gac Med Bol. 2007; 30(2): 11-14.
- 35 Regalado B, Rodríguez M, Fraga J, Rojas L, Nuñez F, Jerez L. Aplicación de herramientas serológicas y moleculares para el diagnóstico de coriorretinitis por *Toxoplasma gondii*. Rev Cubana Med Trop. 2013; 65(1): 13-25.
- 36 Buzarovska A., Arsova I. y Arsuv L. Electrochemical synthesis of poly (2-methyl aniline): electrochemical and spectroscopic characterization. J. Serb. Chem. Soc. 20014; 66(1): 27–37.
- 37 Gao Q, Liu B, Li L, Wang J. Oxidation and Decomposition Kinetics of Thiourea Oxides. J. Phys. Chem. A. 2007; 111: 872-877.
- 38 Lacconi G, Macagno V. Electrochemical study of thiourea in relation to the silver electrodeposition process. Electrochimica Acta. 1994. 39(17): 260-2610.
- 39 Liu G, Ren H, Zhan J. Synthesis, characterization and properties of 3,30-diethyl-1,10-oxydiethylenedicarbonyl bis(thiourea). Res Chem Intermed. 2014; 40(5). 2025-2034.

- 40 Travieso C. Desarrollo de inmunosensores y sensores electroquímicos Basados en nanoparticulas de oro (aunps). [Tesis de doctorado]. Merida, Universidad de los andes. 2016.
- 41 Amendola V., Meneghetti M., Stener M., Guo Y., Chen S., Crespo P., García M., Hernando A., Pengo P. y Pasquato L. Physico-Chemical Characteristics of Gold Nanoparticles. En: Angela L. Gold Nanoparticles in Analytical Chemistry ed. 66. España: Elsevier;2014 p 82-147.
- 42 Abdelhalim M., Mady M. y Ghannam M. Physical Properties of Different Gold Nanoparticles: Ultraviolet-Visible and Fluorescence Measurements. *Nanomedicine*.2012; 3(3): 1-5.
- 43 Guo S, Wang E. Synthesis and electrochemical applications of gold nanoparticles. *Analytica Chimica Acta*. 2007;598: 181-334.
- 44 Mateo D, Morales P, Ávalos A, Haza A. Nanopartículas de oro: aplicaciones y citotoxicidad in vitro. *Acta Toxicol. Argent*. 2013; 21: 102 - 109. [www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)
- 45 Skoog D, Leary J, Holler J. PRINCIPIOS DE ANÁLISIS INSTRUMENTAL, 5° ed.; Ed. McGraw-Hill (1998). 353-367.
- 46 Naik A. Fundamentos de la microscopia electrónica y su aplicación en la investigación textil. *Boletín INTEXTER*. 1975; 64: 39-50.
- 47 Gonzales J. Capítulo 3 .Metodos experimentales en electroquímica. España. 2012
- 48 Sharma V, Jelen F, Trnkova L. Functionalized Solid Electrodes for Electrochemical Biosensing of Purine Nucleobases and Their Analogues: A Review. *Sensors*.2015; 15: 1564-1600.
- 49 Bott A. Practical Problems in Voltammetry 3: Reference Electrodes for Voltammetry. *Current separations*. 1995; 14:2: 64-68.

- 50 Kounaves, S. Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry. Tufts University, Department of chemistry. 1997. 711-725.
- 51 Jimenez C, Leon D. Biosensores: aplicaciones y perspectivas en el control y calidad de procesos y productos alimenticios. *vitae, vitae-columbia Journal*. 2009; 16(1): 144-154.
- 52 Montañez J, Ramos E, Alegret, S, Delgado R. Biosensor de Glucosa basado en un Biocompósito disperso de Grafito-Epoxi-Platino-Glucosa Oxidasa. *Inf. Technol.*2010; 22: 29-40.
- 53 Sharma S, Sehgal N, Kumar A. Biomolecules for development of biosensors and their applications. *Curr. Appl. Phys.*2003; 3: 307-316.
- 54 Carralero V. Preparación de biosensores enzimáticos e Inmunosensores basados en electrodos Modificados con nanopartículas de oro. [Tesis de doctorado] Madrid: Universidad complutense de Madrid; 2008.
- 55 Lechuga M, Calle A. Los dispositivos analíticos del futuro. *Rev. Plást. Mod.*1995; 471: 232-242.
- 56 Cortés L, Mancera L. Concordancia entre ELISA e IFI para la determinación de anticuerpos tipo IgG contra *Toxoplasma gondii*. *Infect.* 2009; 13(2): 76-82.
- 57 Wang H, Lei C, Li J, Wu Z, Shen G. A piezoelectric immunoagglutination assay for *Toxoplasma gondii* antibodies using gold nanoparticles. *PR, China*. 2004;19(7): 701-709.
- 58 Gokce G, Erdem A, Ceylan C. y Akgoz M. Voltammetric detection of sequence-selective DNA hybridization related to *Toxoplasma gondii* in PCR amplicons. *Talanta*. 2016;149: 244-249.
- 59 Alves L, Rodovalho V, Castro A, Freitas M, Mota C, Mineo T, Mineo J, Madurro J, Brito A. Development of direct assays for *Toxoplasma gondii*

and its use in genomic DNA sample. J Pharm Biomed Anal.2017; 145: 838-844.

60. Viudez A. Síntesis, caracterización y ensamblaje de nanopartículas de oro protegidas por monocapas moleculares. [Tesis doctoral]. Córdoba, Argentina: Universidad Nacional de Córdoba.;2011.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)