



Universidad Autónoma de Baja California
Facultad de Ingeniería, Arquitectura y Diseño

Programa de Licenciatura

En Ingeniería en Nanotecnología

**Inmovilización de un anticuerpo en nanopartículas magnéticas de tipo MFe_2O_4 para la
detección de la proteína E7 del virus del papiloma humano (VPH)**

TESIS

**Para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Ingeniera en Nanotecnología**

Presenta:

Mariana Paola Bucio Carmona

Director de Tesis:

Dr. Javier Alonso López Medina

Codirectora de tesis:

Dra. Eunice Vargas Viveros

Ensenada, Baja California, México, --/--/--

Universidad Autónoma de Baja California

Facultad de Ingeniería, Arquitectura y Diseño

Inmovilización de un anticuerpo en nanopartículas magnéticas de tipo MFe_2O_4 para la detección de la proteína E7 del virus del papiloma humano (VPH)

Tesis

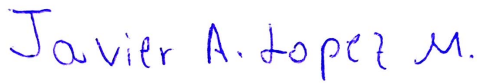
Para cubrir los requisitos necesarios para obtener el título de

Ingeniera en Nanotecnología

Presenta:

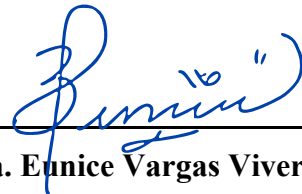
Mariana Paola Bucio Carmona

Aprobada por:



Dr. Javier Alonso López Medina

Director



Dra. Eunice Vargas Viveros

Codirectora



Dr. David Cervantes Vásquez

Sinodal



Dr. Franklin David Muñoz Muñoz

Sinodal



Dr. Sergio Aguila Puentes

Sinodal

Resumen

Por mucho tiempo se ha pensado que el coito es la única forma de transmisión para el virus de papiloma humano, sin embargo, hoy en día sabemos que a pesar de ser la más común no es la única, lo que explica la alta incidencia de la enfermedad en un rango de edades que van desde recién nacidos hasta adultos. Esta incidencia y las complicaciones que la enfermedad acarrea a los pacientes es la principal motivación para estudiar nuevos materiales que ayuden en el desarrollo de métodos de detección fiables, seguros y de bajo costo. La detección temprana de enfermedades no solo es de vital importancia para ofrecer a los pacientes la posibilidad de un tratamiento adecuado y oportuno, sino que es crucial para tomar medidas precautorias para reducir contagios. En este trabajo se presenta el uso de nanopartículas magnéticas como material viable para el anclaje de anticuerpos y la detección de la proteína E7 del Virus del papiloma humano mediante un método electroquímico.

Palabras clave: anticuerpo E7, biosensor, electroquímica, nanopartículas magnéticas, VPH.

Abstract

For a long time, it has been thought that sexual intercourse is the only form of transmission for the human papillomavirus. However, today we know that despite being the most common it is not the only one, which explains the high incidence of the disease in a range of ages from newborn babies to adults. This incidence and the complications that the disease brings to patients is the main motivation to study new materials that help in the development of reliable, safe, and low-cost detection methods. Early detection of diseases is not only of vital importance to offer patients the possibility of adequate and timely treatment, but it is also crucial to take precautionary measures to reduce contagion. This work focus on the use of magnetic nanoparticles as a viable material for the anchoring of antibodies and the detection of the E7 protein of the Human papilloma virus through an electrochemical system.

keywords: biosensor, antibody, HPV, magnetic nanoparticles, electrochemistry

Dedicatoria

A mis padres; por darme todas las herramientas y la motivación para llevar a cabo todos mis proyectos.

A mi hermana; que sin saberlo y sin yo admitírselo me dio la inspiración de terminar mis tareas justo cuando más agotada me sentía.

A mi Cheetito, que desde que llegó a mi vida no ha hecho más que ser símbolo de felicidad, amor y recordatorio de los momentos más bonitos de mi carrera.

A Felipe; mi amigo, mi confidente y soporte emocional durante los momentos más difíciles de toda la universidad. Te agradezco infinitamente el haber encontrado siempre un momento para estar a mi lado y al pendiente mío en las buenas, en las malas, y por seguir siempre apoyándome aún después de todos estos años.

A mis mejores amigas; Kimberly, Alejandra, Melissa, Karla y Alexa. Por haber estado siempre para mí, dentro y fuera del laboratorio. Y por seguir conmigo, dándome aliento para comenzar una nueva etapa de vida.

A Luis, por haber sido mi compañero incondicional en todos los aspectos posibles durante 4 años, por siempre haber creído en mí y enseñarme a hacer lo mismo.

A todos mis asesores y profesores, por llevarme de la mano durante toda mi trayectoria y compartirme todo su saber.

A mis compañeros y amigos de la USP y a la doctora Elsa Materon, por enseñarme tantas cosas y por hacerme sentir en casa aún estando tan lejos.

Agradecimientos

ESTE TRABAJO FUE FINANCIADO POR LOS PROYECTOS DE CIENCIA BASICA CONACYT 2017–2018 A1-S-21323 Y A1-S-21084, FORDECYT - CONACYT 272894, FRONTERAS DE LA CIENCIA CONACYT - 21077, DGAPA-UNAM A TRAVES DE LOS PROYECTOS PAPIIT IN103220, IG200320, IN110018, IN113219, AG200320.

DE IGUAL MANERA, SE EXTIENDE UN ENORME AGRADECIMIENTO AL GRUPO DE INVESTIGACIÓN DEL INSTITUTO DE FÍSICA DE LA UNIVERSIDAD DE SAO PAULO, BRASIL QUE APOYARON ESTE TRABAJO A TRAVÉS DEL PROYECTO TEMÁTICO 2018 22214-6.

Contenido

Resumen.....	i
Abstract	i
Dedicatoria.....	ii
Agradecimientos.....	iii
Capítulo 1. Introducción	1
1.1 Fundamentos teóricos	2
1.1.1 Nanopartículas	2
1.1.2 Nanopartículas magnéticas MFe_2O_4 (M= Mn, Fe, Co, Ni, Zn)	4
1.1.3 Biosensores basados en nanopartículas magnéticas	11
1.1.4 Modificación de nanopartículas	13
1.2 Hipótesis.....	19
1.3 Objetivos.....	19
1.3.1 Objetivo general	19
1.3.2 Objetivos específicos	19
Capítulo 2. Metodología.....	20
2.1 Materiales y reactivos.....	20
2.2 Primer etapa: Síntesis del núcleo magnético	21
2.2.1 Ferritas de níquel ($NiFe_2O_4$)	21
2.3 Segunda etapa: Recubrimiento con SiO_2	22
2.4 Tercer etapa	24
2.4.1 Funcionalización de la nanopartícula.....	24
2.4.2 Anclaje del anticuerpo en la nanopartícula	25
2.5 Evaluación	25
2.5.1 Anclaje del anticuerpo.....	25

2.5.2 Detección de la proteína	26
2.6 Caracterización	26
2.5.1 Microscopía electrónica de transmisión.....	26
2.5.2 – Microscopía electrónica de barrido (SEM) y Espectroscopia de rayos X de energía dispersiva (EDS).....	27
2.5.3 Difracción de rayos X (XRD)	28
2.5.4 Magnetómetro de muestra vibrante (VSM)	29
2.5.5 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR ATR)	30
Capítulo 3. Resultados y discusiones	32
3.1 Estudio morfológico y análisis de distribución estadística de tamaños por microscopía de barrido (SEM) y microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	32
3.1.1 Análisis estructural por microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM)	36
3.2 Análisis de composición de NiFe ₂ O ₄ por medio de la técnica de dispersión de energía de rayos X (EDS).....	38
3.3 Análisis de estructura cristalina por difracción de rayos X	39
3.4 Análisis del comportamiento magnético con magnetómetro de muestra vibrante (VSM).....	40
3.5 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR ATR)	42
3.6 Sistema electroquímico	44
3.6.1 Detección de la proteína S	50
Capítulo 4. Conclusiones	56
Anexo	58
Fabricación de los electrodos de oro.....	58
REFERENCIAS	59

Capítulo 1. Introducción

La nanotecnología es un área de investigación que se enfoca en la investigación, diseño y construcción de materiales y dispositivos en escala atómica. En esta escala, las reglas convencionales de la física y la química no aplican en su totalidad, ya que un nanomaterial puede modificar completamente su comportamiento, por ejemplo, su color, conductividad, reactividad, estabilidad, etc. La nanotecnología promete dar nuevas soluciones a los problemas que obstaculizan el desarrollo de los países, especialmente en relación con la salud (Foladori & Invernizzi, 2006). En palabras de Ralph Merkle “Si podemos reducir el costo y mejorar la calidad de la tecnología médica a través de los avances en nanotecnología, podemos abordar más ampliamente las condiciones médicas que prevalecen y reducir el nivel de sufrimiento humano”(Merkle, 1992).

Las nanopartículas atraen la atención de la comunidad científica ya que su tamaño es comparable al de virus, ADN y proteínas, lo que les da la libertad de moverse por el cuerpo sin quedar atrapadas en espacios reducidos, además también tienen mayor facilidad para entrar a las células, lo que resulta muy atractivo en el campo de fármacos dirigidos (Tharayil et al., 2021).

Actualmente, y sobre todo después de una pandemia que afectó la economía e índices de mortalidad internacionalmente, los aspectos de la ingeniería médica más destacados se dirigen en torno a investigaciones para mejorar y desarrollar técnicas de diagnóstico de enfermedades, tales como las enfermedades virales. Estas ocurren cuando un organismo es invadido por virus patógenos y/o partículas como virosis contagiosas (viriones) que pueden adherirse a la superficie y/o penetrar las células susceptibles. Un gran número de virus pueden causar enfermedades contagiosas (Taylor et al., 2012). Normalmente, el cuadro clínico utilizado para detectar una infección viral es la presencia de dolores musculares y articulares severos, fiebre, erupciones cutáneas e inflamación de los ganglios linfáticos.

Hablando específicamente, el virus del papiloma humano (VPH) es la enfermedad vírica del aparato reproductor más frecuente (10-60% de la población general), por lo que la mayoría de los hombres y mujeres sexualmente activos llegarán a padecerla en algún momento de su vida e incluso podrán

infectarse repetidamente. En las mujeres embarazadas, la infección puede transmitirse al feto durante la gestación o en el momento del parto (Trottier et al., 2016). Además, es una fuente importante de morbilidad y mortalidad entre la población joven y, junto con el VIH, se considera la enfermedad de transmisión sexual (ETS) más costosa en términos de la estimación de los gastos médicos directos (Chesson et al., 2017). La mayor parte de las infecciones causadas por el VPH desaparecen por sí mismas, lo que causa pocas o ninguna secuela (VPH de bajo riesgo). No obstante, algunos subtipos del virus tienden a persistir y causar desde displasia de bajo grado, papilomatosis respiratoria o verrugas en el área anogenital hasta cambios celulares asociados con precánceres y cánceres cervicouterinos de alto grado (VPH de alto riesgo). Según la OMS, se estimó que, en 2018, cerca de 311 mil mujeres fallecieron de cáncer cervicouterino relacionados a los tipos 16 y 18 del VPH (*Human Papillomavirus (HPV) and Cervical Cancer*, 2020). Cabe destacar que, aunque la mayor parte de la población infectada son jóvenes y adultos, hay también una gran prevalencia de papilomatosis respiratoria en niños, de acuerdo con (Loenenbach et al., 2022). La tasa de detección de ADN del VPH en bebés recién nacidos llega a variar entre 4% y un 87%. Estas cifras dejan muy en claro que resulta indispensable contar con formas de detección temprana del virus que sean altamente fiables y que permitan llevar a cabo un tratamiento adecuado y oportuno al paciente.

En este sentido, la nanotecnología brilla una vez más por el potencial que ofrece en el campo de detección de enfermedades gracias a las posibilidades ya exploradas que ofrece en el campo de detección de enfermedades. Muchos sistemas se han propuesto ya con el uso de nanopartículas; uno de ellos es el sistema electroquímico, el cual en este trabajo buscaremos optimizar mediante la síntesis y modificación de nanopartículas magnéticas y su implementación en el electrodo de trabajo del sistema.

1.1 Fundamentos teóricos

1.1.1 Nanopartículas

Una nanopartícula es una unidad ultra pequeña con dimensiones medidas en el orden de nanómetros, es decir, 1×10^{-9} metros. Las nanopartículas se pueden clasificar en varios tipos, según su tamaño, forma

y propiedades del material. Algunos ejemplos de nanopartículas son los dendrímeros, liposomas, puntos cuánticos, nanopartículas poliméricas, entre otros.

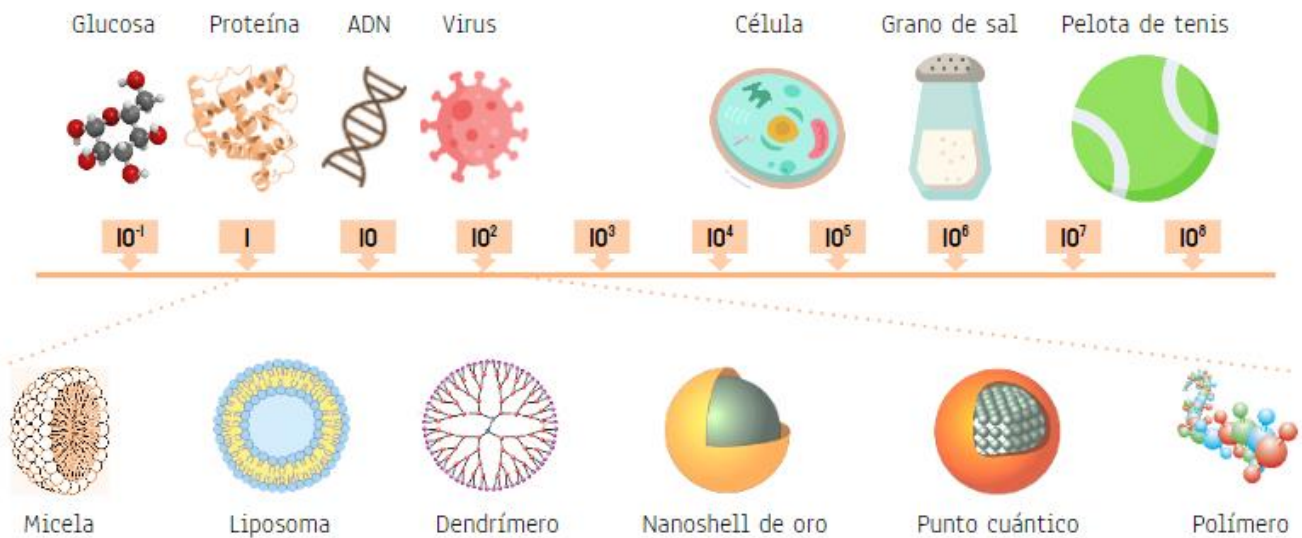


Figura 1. Comparación de tamaños dentro y fuera de la escala nanométrica

Las propiedades de los materiales cambian a medida que su tamaño se acerca a la escala atómica. Esto se debe al aumento de la relación entre el área de la superficie y el volumen, lo que hace que los átomos de la superficie del material dominen el rendimiento del material. Debido a su tamaño muy pequeño, las nanopartículas tienen una relación de superficie-volumen muy grande en comparación con el material a granel, como polvos, placas y láminas. Esta característica permite que las nanopartículas posean propiedades ópticas, físicas y químicas inesperadas, ya que son lo suficientemente pequeñas como para confinar sus electrones y producir efectos cuánticos (Govindaraman et al., 2022; Sajid, 2022).

Los nanomateriales pueden producirse de forma natural, crearse como subproductos de reacciones de combustión o producirse mediante ingeniería para realizar una función especializada. Debido a la capacidad de generar los materiales de una manera particular para desempeñar un papel específico, el uso de nanomateriales abarca una amplia variedad de aplicaciones, incluyendo el transporte de fármacos y las tecnologías de detección de enfermedades (Bunekar & Tsai, 2022).

1.1.2 Nanopartículas magnéticas MFe_2O_4 (M= Mn, Fe, Co, Ni, Zn)

Las nanopartículas magnéticas son nanomateriales que constan de elementos magnéticos tales como el hierro, el manganeso, cobalto, níquel, zinc, etc. La respuesta magnética de los materiales magnéticos bajo la acción de un campo magnético externo está influenciada por la configuración de sus elementos constitutivos, la forma en que se combinan químicamente y el método de síntesis por el que se fabrica. Los nanomateriales magnéticos se pueden clasificar en:

- **Diamagnéticos:** En un material diamagnético, todos los espines de los electrones del material están emparejados y presentan el tipo más débil de comportamiento magnético. Un campo magnético externo induce un par de torsión en los dipolos de espín de estos pares de electrones, lo que hace que los pares de electrones sufran un desplazamiento angular. La dirección del reajuste es tal que el momento magnético creado actúa para oponerse al campo inductor, lo que da lugar a materiales con una susceptibilidad inicial negativa. Los gases inertes, la mayoría de los no metales y los compuestos orgánicos son diamagnéticos comunes, y su respuesta depende débilmente de la temperatura (Issa et al., 2013).
- **Paramagnéticos:** Los materiales paramagnéticos son aquellos en los que los átomos individuales tienen espines que están alineados al azar. En presencia de un campo magnético externo, los momentos de espín tienden a alinearse en dirección del campo, por lo que el grado de alineación de los espines con el campo magnético aplicado depende de la fuerza del campo y de la temperatura, es decir, a mayor campo magnético mayor, el grado de alineación y a mayor temperatura el grado de alineación será menor para el mismo campo aplicado.
- **Ferromagnéticos:** Los momentos magnéticos en cada dominio de un ferromagnético están orientados a lo largo de un eje de magnetización fácil, correspondiente a un estado de baja energía. Los electrones no compensados de los átomos individuales tienden a interactuar, dando lugar a un acoplamiento de espines en una orientación preferida. A diferencia de los paramagnéticos, cuando se elimina el campo aplicado, pueden retener una componente de magnetización en la dirección de dicho campo, por lo que quedan magnetizados. Al retirar el campo, el grado en que el material permanece magnetizado se cuantifica mediante la

magnetización remanente (MR), y el campo necesario para desmagnetizar el material es el campo coercitivo (H_c). El ferromagnetismo se observa sobre todo en el hierro, níquel, cobalto y manganeso (Leon et al., 2019; Savliwala et al., 2019).

- Superparamagnéticos: El superparamagnetismo es causado por efectos térmicos donde las fluctuaciones térmicas son lo suficientemente fuertes como para desmagnetizar espontáneamente un ensamblaje previamente saturado; por lo tanto, estas partículas tienen coercitividad cero y no tienen histéresis. En este estado, un campo magnético externo puede magnetizar las nanopartículas con una susceptibilidad magnética mucho mayor. Cuando se elimina el campo, las nanopartículas magnéticas no presentan magnetización (Issa et al., 2013).
- Antiferromagnéticos: El antiferromagnetismo ocurre cuando los electrones están dispuestos en la misma dirección, pero en la dirección opuesta. De esta forma, si tienen el mismo valor absoluto, se anulan entre sí; y si son diferentes, disminuye. A diferencia del ferromagnetismo, el antiferromagnetismo se encuentra en materiales que tienen dominios alineados en direcciones opuestas. Además, el ferromagnetismo se caracteriza por la resistencia a la magnetización (Hoffmann & Zhang, 2022).
- Ferrimagnéticos: El ferrimagnetismo se puede definir como un tipo de magnetismo donde los momentos magnéticos tienen momentos opuestos similares a los del antiferromagnetismo; sin embargo, los momentos antiparalelos no se anulan entre sí. Al igual que en el ferromagnetismo, la susceptibilidad de los materiales ferrimagnéticos es grande (Slimani et al., 2020).

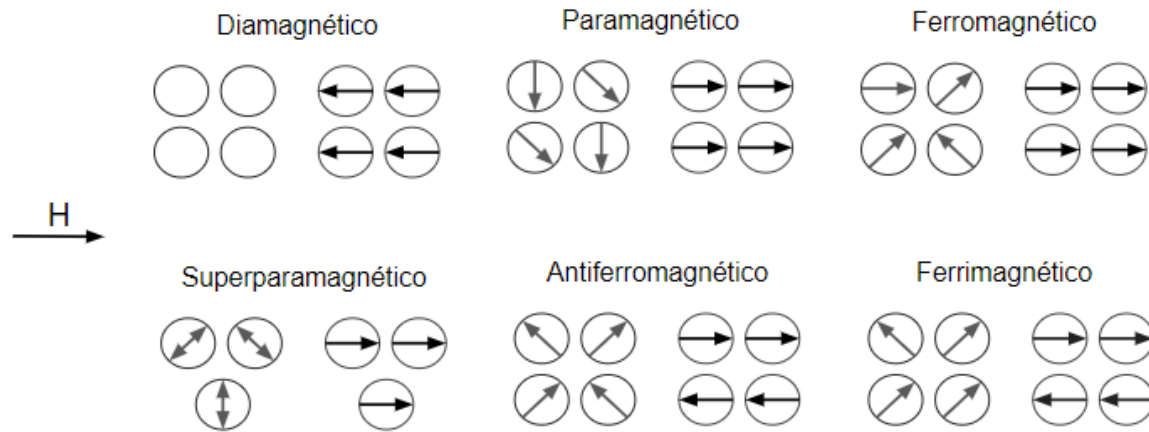


Figura 2. Comportamiento de los momentos dipolares magnéticos en seis tipos de materiales magnéticos con (derecha) y sin (izquierda) campo magnético externo (H).

Uno de los materiales magnéticos en forma de nanopartícula más estudiados es la magnetita (Fe_3O_4), este es un mineral cuyo componente principal es un óxido de hierro que contiene cantidades iguales de hierro (II) y hierro (III), y a menudo se expresa como óxido de hierro (II, III). La magnetita es cúbica con una estructura de espinela inversa con predominio de Fe^{3+} . Aunque la magnetita es un mineral común que rara vez excede el 1% en volumen, ésta tiene la mayor magnetización de saturación de todos los minerales magnéticos naturales conocidos, por lo que incluso las trazas de este mineral (< 0,1%) se pueden detectar fácilmente con mediciones magnéticas en el laboratorio (Moskowitz et al., 2015). Una de las fases existentes de este material es la maghemita ($\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$), esta se forma como producto de la oxidación a baja temperatura de la magnetita. La maghemita posee una estructura de espinela inversa similar a la magnetita y al igual que ella exhibe una estructura cúbica con una pequeña anisotropía magnética debido a la ausencia de momento angular orbital (Bengtson et al., 2013).

Otros sistemas en forma de nanopartículas que se han estado estudiando son las nanopartículas del tipo MFe_2O_4 donde M es un catión o ion de transición, como por ejemplo cobalto, níquel o zinc. Como miembros destacados de las ferritas, los MFe_2O_4 son objeto de interés por su naturaleza ferromagnética. Los MFe_2O_4 tienen una formación de fase espinela inversa con los cationes Fe^{3+} distribuidos entre los sitios tetraédricos u octaédricos y los iones M^{2+} en el sitio octaédrico. (Chand Verma et al., 2020)

Las principales propiedades magnéticas que se pueden manifestar en este tipo de nanopartículas son:

- Susceptibilidad inicial: A campos magnéticos aplicados suficientemente bajos, la dependencia entre la magnetización y el campo magnético aplicado para los materiales paramagnéticos y superparamagnéticos es lineal, y la pendiente de esta relación se denomina susceptibilidad inicial. Como tal, la susceptibilidad inicial es una medida de lo fácil que es alinear los dipolos magnéticos del material con el campo, para situaciones en las que la energía asociada al campo magnético es pequeña en relación con la energía térmica (Maldonado-Camargo et al., 2017).
- Saturación magnética: En presencia de un campo magnético aplicado, los espines magnéticos de una partícula superparamagnética tienden a alinearse en la dirección del campo, lo que da lugar a una magnetización inducida (Jiles, 2015). A campos magnéticos suficientemente altos, todos los espines magnéticos se alinean en la dirección del campo, lo que da lugar a la máxima magnetización inducida, que suele denominarse magnetización de saturación de la muestra. La magnetización de saturación se utiliza a menudo como métrica para comparar las propiedades magnéticas de diferentes partículas, debido a su relación con la fuerza del momento dipolar global de la nanopartícula.
- Temperatura de bloqueo: El superparamagnetismo depende en gran medida de la temperatura del sistema y del tamaño de la partícula. La temperatura a la que la energía térmica es lo suficientemente baja como para "congelar" la alineación espontánea de la magnetización, se denomina temperatura de bloqueo. Por encima de la temperatura de bloqueo, un material puede actuar como un super imán, mientras que puede actuar como un ferromagnético por debajo de la temperatura de bloqueo. (Savliwala et al., 2019)

1.1.2.1 Representación del comportamiento magnético

El comportamiento magnético se puede describir en términos de sus bucles de histéresis, siendo ésta la representación de la fuerza de magnetización (H) con relación con la densidad de flujo magnético (B) del material. El bucle de histéresis es característica de cada material y varía en que tan ancha o estrecha es. Los bucles de histéresis comienzan en un punto inicial donde H es cero, ahí sus momentos dipolares magnéticos están desorientados y el material presenta paramagnetismo. Cuando se añade una fuerza

magnetizante (H) al material, éste sigue el camino hasta el punto de saturación ($+H_s$). En este punto todos los momentos dipolares magnéticos se alinean en la dirección de la fuerza magnetizante y el flujo magnético deja de aumentar. Cuando H se reduce a cero, queda algún remanente de magnetización; este punto se conoce como punto de retentividad ($+B_r$). Para eliminar esta magnetización remanente, se aplica una fuerza magnetizante coercitiva en sentido inverso. El punto en el que ya no hay flujo magnético ($B=0$) debido a la cancelación de los momentos dipolares que actúan en direcciones opuestas, se conoce como punto de coercitividad ($-H_c$). Al aumentar la fuerza magnetizante en sentido negativo, se produce la misma saturación que había antes, pero en sentido opuesto ($-H_s$). El bucle continúa con un punto de retentividad ($-B_r$) y un punto de coercitividad ($+H_c$) iguales pero opuestos hasta su punto de saturación original ($+H_s$) (*Magnetic Hysteresis*, 2020).

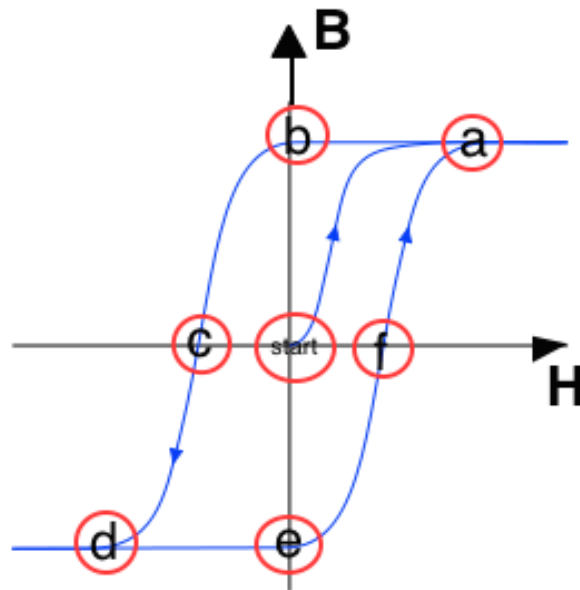


Figura 3. Representación esquemática del bucle de histéresis de un material ferromagnético (*Magnetic Hysteresis*, 2020)

En la Figura 3 se puede observar mejor el ciclo completo del bucle de histéresis, donde los puntos a y d representan a $\pm H_s$, los puntos b y e son los $\pm B_r$, y los puntos c y f son los $\pm H_c$. Los giros del dipolo magnético en estos puntos respectivos pueden apreciarse en la Figura 4, en la que los giros comienzan desorientados, posteriormente se alinean con el campo magnético y finalmente se

desalinean hasta que los momentos se cancelan entre sí para no producir ningún momento magnético neto. Cabe destacar que la curva en ningún momento vuelve al origen (B y $H=0$). Para volver a este punto, el material tendrá que desmagnetizarse, es decir, volver a tener un comportamiento paramagnético (*Magnetic Hysteresis*, 2020).

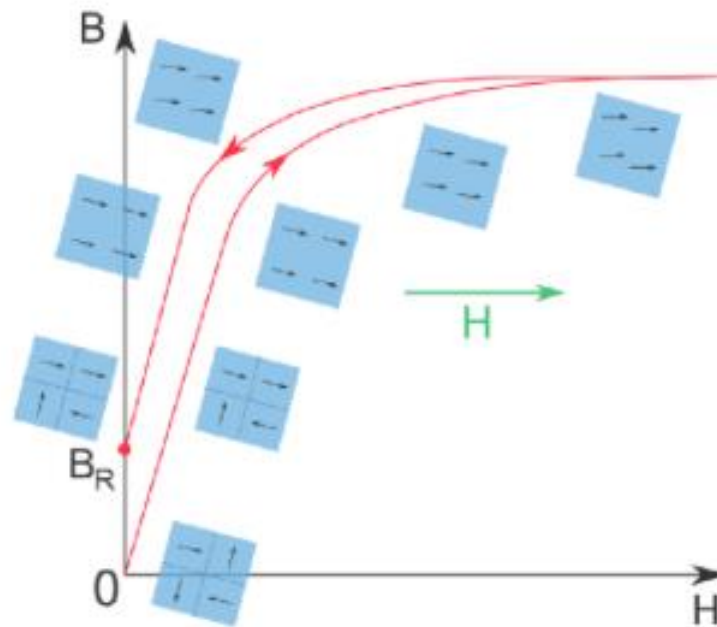


Figura 4. Representación esquemática de los momentos dipolares magnéticos (*Magnetic Hysteresis*, 2020)

1.1.2.2 Métodos de síntesis de nanopartículas magnéticas

Existen diferentes rutas para sintetizar nanopartículas magnéticas, entre ellos podemos destacar la descomposición térmica, método de coprecipitación, sol-gel, microemulsión y el método hidrotermal (SOUFI et al., 2021).

Descomposición térmica: Este método de síntesis se lleva a cabo a través de la descomposición térmica de precursores metálicos al aplicar altos valores de temperatura y de presión. Las ventajas que proporciona este método son una alta monodispersidad y un control efectivo del tamaño de partícula. Por otro lado, las desventajas de utilizar este método son, principalmente, la necesidad de aplicar

valores extremos de temperatura durante la síntesis, el alto costo y el uso de químicos orgánicos peligrosos (Behrens, 2011).

Método de coprecipitación: En una síntesis típica, el pH de una solución ferrosa se incrementa mediante la adición de una base bajo una atmósfera inerte o bajo temperatura. Este enfoque es una ruta eficaz y sencilla para la síntesis de nanopartículas magnéticas, una de las principales ventajas de este método es que las nanopartículas pueden prepararse eficazmente a gran escala. Sin embargo, las condiciones durante el proceso de síntesis deben determinarse cuidadosamente en esta técnica y generalmente se obtienen NP con una amplia distribución de tamaño (SOUFI et al., 2021).

Método sol-gel: Para este método se llevan a cabo procesos de hidroxilación y condensación de los reactivos en soluciones, posteriormente, se sintetiza un gel con una estructura tridimensional de óxido metálico mediante un proceso de condensación. Por otro lado, el estado cristalino se logra utilizando un tratamiento térmico (Itoh & Sugimoto, 2003). La ventaja de este método es que no necesita de temperaturas tan altas, y su inconveniente principal es la posibilidad de que suceda una coagulación de la mezcla durante el proceso.

Método de micro emulsión: Una micro emulsión es un sistema líquido transparente isotrópico compuesto de aceite, agua y anfifilo. Para sintetizar nanopartículas magnéticas por este método se llevan a cabo reacciones que incluyen reducción o coprecipitación en sistemas de microemulsión. Sus principales desventajas son el bajo rendimiento que produce y el consumo de un gran volumen de disolventes orgánicos durante el proceso de síntesis (Itoh & Sugimoto, 2003)

Método hidrotermal: El método hidrotermal se refiere al medio en el que se encierra una solución acuosa en un reactor especialmente sellado como medio de reacción, tiene un funcionamiento sencillo, materias primas baratas y baja contaminación. Mediante el establecimiento de condiciones externas, se crea un entorno de alta temperatura y alta presión para el reactor, y las sustancias insolubles o no, se disuelven en el entorno. La reacción se recristaliza, y luego se separa y se trata térmicamente para obtener nanopartículas. El uso de este método para preparar nanomateriales magnéticos tiene dos ventajas. En primer lugar, las propiedades magnéticas del nanomaterial magnético pueden mejorarse en un entorno de alta temperatura; en segundo lugar, la volatilización

de cada componente puede reducirse en un entorno de alta presión, y la pureza del producto y la protección del medio ambiente pueden mejorarse (Liu et al., 2020).

1.1.3 Biosensores basados en nanopartículas magnéticas

Las estrategias de biodetección basadas en nanopartículas magnéticas han recibido una atención considerable porque ofrecen ventajas únicas sobre otras técnicas. Por ejemplo, las nanopartículas magnéticas son baratas de producir, física y químicamente estables, biocompatibles y ambientalmente seguras (Haun et al., 2010). Se pueden unir selectivamente a moléculas funcionales y permitir el transporte a una ubicación específica bajo un campo magnético externo de un electroimán o imán permanente. Además, las muestras biológicas no presentan prácticamente ningún fondo magnético, por lo que se pueden realizar mediciones muy sensibles en muestras turbias o con poca visibilidad sin necesidad de procesarlas (Lee et al., 2015).

1.1.3.1 Partes de un biosensor

Un biosensor típico se compone por dos elementos básicos: 1) El receptor, que suele ser un elemento biológico como enzimas, anticuerpos, ADN, microorganismos, tejidos o incluso moléculas sintéticas; y 2) el transductor, que es la parte del sensor que transforma el evento de reconocimiento en una señal medible que puede utilizarse para la cuantificación del analito. La señal del transductor (que podría ser cualquier cosa, desde el ángulo de acoplamiento de un rayo láser hasta la corriente producida en un electrodo) se convierte en una señal eléctrica que se amplifica y se envía para su procesamiento a algún software de computadora para convertirlo en un parámetro físico significativo que describa el proceso que se está investigando; finalmente, la cantidad resultante se exhibe a través de una interfaz para el operador humano (H. Liu et al., 2019).

En las aplicaciones de detección, las nanopartículas magnéticas se utilizan mediante la aplicación directa de soportes etiquetados al sensor, integrándose en los materiales del transductor y/o en la dispersión de ellas en la muestra seguida de su atracción por un campo magnético externo en la superficie de detección activa del sensor.

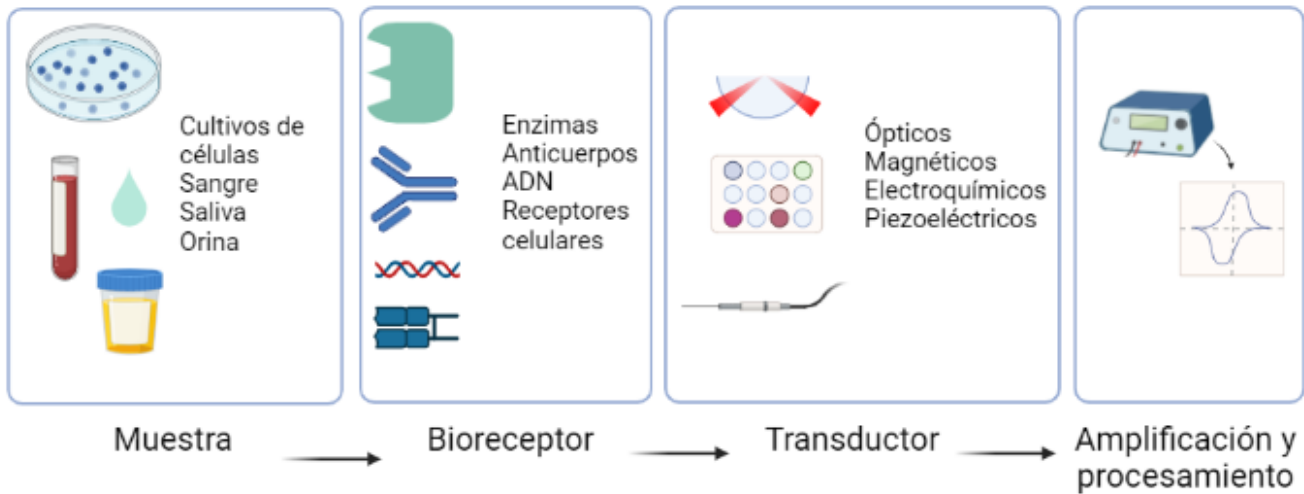


Figura 5. Elementos básicos de un sistema de biodetección

1.1.3.2 Biosensores electroquímicos

Los biosensores, tal y como se ilustra en la Figura 5 se basan en diferentes principios de transducción, llámese electroquímico, óptico, piezoeléctrico o magnético (Shavanova et al., 2016). A continuación, se describe al sensor electroquímico.

Como bien lo dice su nombre, estos perciben las señales electroquímicas como corriente, voltaje e impedancia inducidas por la interacción de analitos y de electrodos que se pueden recubrir con productos químicos, materiales bioquímicos o elementos biológicos para mejorar su actividad superficial. Sus ventajas incluyen rapidez, alta sensibilidad, bajo costo y fácil miniaturización y operación, por lo que son atractivos en aplicaciones clínicas, ambientales, biológicas y farmacéuticas. Los dispositivos electroquímicos se pueden clasificar en amperométricos, potenciométricos, voltamperométricos, quimioresistivos y capacitivos, según sus principios de funcionamiento (Duarte et al., 2014). Éstos y los biosensores de enzimas, tejidos y ADN están diseñados mediante la inmovilización de elementos de reconocimiento biológico de anticuerpos, enzimas, tejidos y ADN,

respectivamente, en la superficie del electrodo de trabajo. La incorporación de nanopartículas magnéticas en este tipo de dispositivos puede potencialmente amplificar las señales a través de su contacto con la superficie del electrodo y mejorar la matriz de trabajo, ejemplo de esto el uso de partículas de tipo core-shell $\text{Fe}_3\text{O}_4 @\text{SiO}_2$ para modificar las superficies de los electrodos (Rocha-Santos, 2014), ya que sus características, como una buena conductividad eléctrica, una gran superficie y más sitios de interacción electroactiva, pueden proporcionar un transporte de masa mejorado y una accesibilidad más fácil a los sitios activos, aumentando así la señal analítica y la sensibilidad.

1.1.4 Modificación de nanopartículas

Independientemente del principio de transducción utilizado, es necesario modificar la superficie de las nanopartículas para el anclaje de una biomolécula específica, la cual actuará en el bio-reconocimiento del analito. Este trabajo se enfoca en la detección de enfermedades, específicamente orientados hacia el Virus del papiloma humano (VPH), por lo que para desarrollar una estrategia apropiada de cómo modificar la nanopartícula magnética se debe definir qué elemento dentro de la muestra se busca identificar. En la siguiente sección se describe brevemente el ciclo viral del Virus de Papiloma Humano y las proteínas presentes en él, una de las cuales es el analito de interés.

1.1.4.1 Virus del papiloma humano (VPH)

Ciclo viral

Todos los VPH poseen un genoma de ADN episomal de aproximadamente 8 kb de tamaño tal y como se ilustra en la Figura 6, donde se toma de ejemplo el genoma VPH 16 (otros genomas del VPH tienen una organización muy similar). Este genoma se puede dividir en tres secciones funcionales, la región temprana (E) que codifica al menos siete proteínas virales que tienen funciones reguladoras en la célula epitelial infectada (E1, E2, E4, E5, E6, E7, E8), la región tardía (L) que codifica las dos proteínas estructurales virales L1 y L2, que forman la cápside viral, y la LCR (long control region) también llamada región reguladora upstream (URR). La LCR contiene las secuencias reguladoras virales que controlan la replicación y la transcripción virales, así como el control postranscripcional a través del elemento regulador tardío (Graham, 2010).

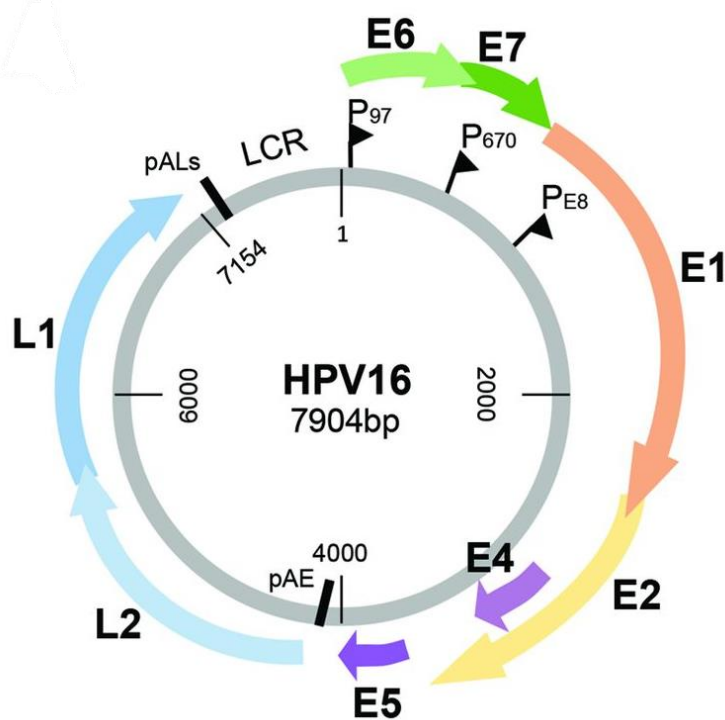


Figura 6. Genoma del VPH16¹

Tras la entrada nuclear en las células en división de la capa basal o del ectocérvix, se inicia la transcripción temprana del virus. E2 se une a E1, que luego se une como un dímero de hexámeros al origen de replicación viral y recluta la maquinaria de replicación del ADN celular. La replicación inicial de un genoma de VPH entrante genera aproximadamente 50-100 copias episomales por núcleo. Esto constituye la primera fase de la replicación del ADN viral y del mantenimiento del genoma. En las células basales infectadas, los genomas virales circulares se replican de forma conjunta con la replicación del ADN celular y se distribuyen de forma equitativa en las células hijas mediante la unión de los genomas del virus a los cromosomas de la célula huésped a través de E2 ligada a la LCR viral y a las proteínas de unión a la cromatina (Roman & Munger, 2013).

Papel de las proteínas E6 y E7 del VPH durante el ciclo de replicación

¹ Los promotores se indican con P y flechas (P97, P670, PE8). Los sitios de poliadenilación temprana (pAE) y tardía (pALs) se indican con líneas rectas cortas por encima del genoma circular. El LCR se indica con una línea azul. Adaptado de (Graham, 2017).

Los VPH poseen un promotor temprano responsable de la expresión de proteínas en las primeras etapas del ciclo de replicación. Entre ellas se encuentran las oncoproteínas virales E6 y E7 (Vande Pol & Klingelutz, 2013) cuya expresión es esencial para el ciclo vital normal del VPH. Se ha encontrado que la expresión de los biomarcadores que responden a E6 y E7 disminuye en las capas epiteliales superiores, por lo que la actividad biológica de estas proteínas puede ser más importante en la fase inicial de la replicación viral en las células epiteliales basales. Al comienzo de la infección, la expresión de E7 activa el punto de control de la fase G1 a S en los queratinocitos que normalmente sufrirían una diferenciación terminal, ampliando así el compartimento de células epiteliales activas en la replicación del ADN (Roman & Munger, 2013). Este es un paso importante para lograr la segunda fase de la replicación del genoma viral en las células de las capas epiteliales medias y superiores que normalmente saldrían del ciclo celular. El E7 activa el ciclo celular de las células infectadas y diferenciadas mediante la unión y liberación, o degradación, de pRb y otras proteínas (p107 y p130) de un complejo de represión transcripcional que contiene el factor de transcripción E2F, este queda libre para activar la transcripción de una serie de genes relacionados con el ciclo celular, como las ciclinas A y E, estimulando así la transición de la fase G1 a la fase S (Moody & Laimins, 2010).

Fase tardía del ciclo de replicación viral

La fase tardía del ciclo de vida viral implica la replicación vegetativa del ADN viral y posteriormente la formación de viriones. Para llevar a cabo esta fase se requiere una mayor expresión de las proteínas virales E1 y E2. La fase tardía del ciclo de vida está marcada por la activación (debido a cambios en la señalización celular) del promotor tardío principal viral (VPH16: P670; VPH18: P811) que está situado en la región del gen E7 (Bodily et al., 2011). Esto da lugar a una mayor expresión, no únicamente de E1 y E2, sino también de E4 y E5 (Graham, 2010). El promotor E8 se mantiene activo en esta etapa y E2 puede seguir reprimiendo la amplificación del genoma viral. Finalmente, la replicación del ADN en la fase tardía produce muchos miles de genomas virales progenitores.

Tabla 1. Principales funciones de las proteínas presentes en el VPH²

Proteína	Función asociada	Tipo
E1	ATPasa y ADN helicasa; reconoce y está unido al origen viral de replicación de ADN como un complejo hexamérico.	No estructurales
E2	Esencial para replicación y transcripción viral, segregación genómica y encapsidación	
E4	Regula la expresión de genes tardíos, controla la maduración viral y la salida de los viriones	
E5	Estimula la actividad transformante de E6 y E7, promueve la fusión celular generando aneuploidía e inestabilidad cromosómica, contribuye a la invasión de la respuesta inmunitaria	
E6	Se une e induce la degradación de la proteína supresora de tumores p53, inhibiendo la apoptosis; interactúa con proteínas del sistema inmunitario innato, contribuye a la evasión de la respuesta inmunitaria y a la persistencia del virus; activa la expresión de la telomerasa	
E7	Se une e induce la degradación de la proteína supresora de tumores pRB; incrementa la actividad de cinasas dependientes de ciclinas; afecta la expresión de genes de fase S por interacción directa con factores de transcripción E2F y con histona desacetilasa; contribuye a la evasión de la respuesta inmunitaria	
L1	Proteína principal de la cápside. Reconoce receptores sobre la célula hospedera. Es altamente inmunogénica e induce anticuerpos neutralizantes	
L2	Proteína secundaria de la cápside. Participa en la unión del virión a la célula, en su entrada a la célula y su transporte al núcleo, la liberación del genoma y el ensamble de los viriones	

² Algunos papilomavirus tienen marcos de lectura para las proteínas E3 y E8, aunque aún se desconocen sus funciones. Adaptado de (Santos López et al., 2015).

1.1.4.2 Estrategia de inmovilización

Existen dos tipos de inmovilización de enzimas: métodos físicos y métodos químicos (ver Figura 7). Los métodos físicos se caracterizan por interacciones mono covalentes débiles, fuerzas de Van der Waals, enlaces iónicos o contención mecánica de la enzima dentro del soporte (Mohamad et al., 2015). En el método químico se forman enlaces covalentes e involucra un material matriz que sirve de soporte. Este tipo de unión es uno de los métodos más utilizados y proporciona una fuerte unión entre las enzimas y la matriz de soporte para formar un complejo estable. Los grupos funcionales enzimáticos utilizados en el acoplamiento covalente son el grupo amino, el grupo carboxílico, el grupo fenólico, el grupo tiol, el grupo imidazol, el grupo indol y el grupo hidroxilo.. Por lo general, el procedimiento de unión de la enzima al soporte sólido comprende dos etapas: La primera es la activación de la superficie a través del uso de moléculas enlazadoras y la segunda es el acoplamiento covalente de la enzima al soporte activado. Como resultado de estas etapas, las moléculas enlazadoras actúan como un reactivo entrecruzador entre la superficie y la enzima a través de enlaces covalentes (Vijayalakshmi et al., 2019). Cuando la enzima y la matriz de soporte son fuertes, el enlace covalente protege la fuga de enzima de la matriz superficial y mejora la estabilidad térmica. Esta técnica se puede utilizar para la inmovilización en diferentes tipos de nanopartículas y es la que **se usará en este trabajo**.

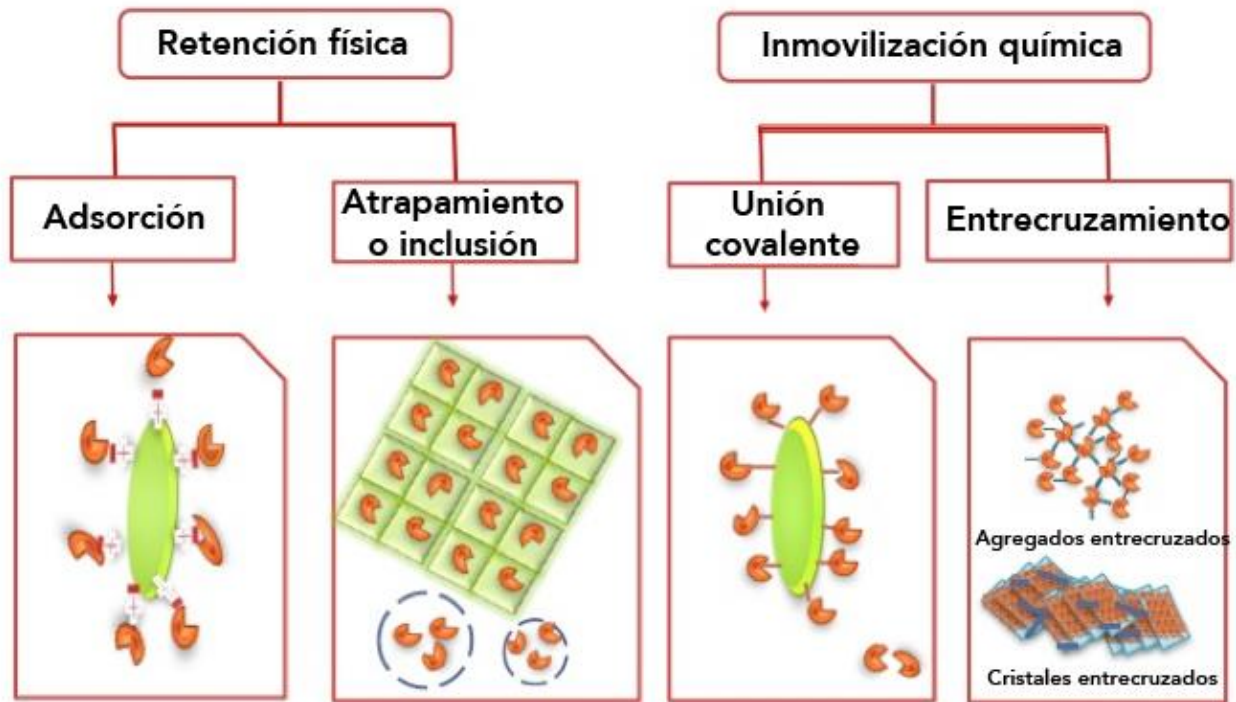


Figura 7. Métodos de inmovilización de enzimas.

Ya se discutió anteriormente que el bioreceptor del sensor puede ser un anticuerpo, por lo que, basados en los antecedentes del VPH, se decidió que la estrategia ideal a seguir sería el anclaje del anticuerpo MAbE7 del HPV 16 (genotipo del Virus del papiloma Humano), el cual es el anticuerpo específico de la proteína E7, es decir, solo se uniría a este, por lo que sería posible desarrollar un sistema que reconozca y cuantifique la presencia de esta proteína característica del VPH. Debido a la poca disponibilidad de dichos elementos en el laboratorio, los experimentos de este trabajo se llevarán a cabo usando en su lugar la proteína Whole Spike SARS CoV 2 y su respectivo anticuerpo monoclonal. (Enzimas Aplicadas En Procesos Industriales, n.d.)

1.2 Hipótesis

La síntesis y funcionalización de nanopartículas magnéticas de tipo MFe_2O_4 (Ni^{+2}) junto con la inmovilización de un anticuerpo monoclonal en su superficie permitirá la detección de proteínas, mostrando que este material es un buen candidato para usarse en biosensores para la futura detección del Virus del Papiloma Humano (VPH) y otras enfermedades virales.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Sintetizar y caracterizar nanopartículas magnéticas de tipo MFe_2O_4 (Ni^{+2}) e inmovilizar un anticuerpo para detectar la presencia de la proteína Whole Spike anti-SARS CoV 2.

1.3.2 Objetivos específicos

1. Realizar la síntesis de nanopartículas magnéticas $NiFe_2O_4$ mediante síntesis hidrotérmal
2. Llevar a cabo el recubrimiento de las nanopartículas magnéticas con material biocompatible (SiO_2) mediante el método de Stöber.
3. Observar la morfología del material fabricado por microscopía electrónica de transmisión (TEM) y microscopía electrónica de barrido (SEM).
4. Evaluar las propiedades estructurales cristalinas del material fabricado por difracción de rayos X (XRD).
5. Determinar la composición química del material fabricado por espectroscopia de energía dispersiva (EDS).
6. Evaluar las propiedades magnéticas por magnetometría de muestra vibrante (VSM).
7. Llevar a cabo el anclaje del anticuerpo sobre la nanopartícula recubierta de SiO_2 .
8. Comprobar la correcta funcionalización de la nanopartícula mediante FTIR
9. Realizar ensayos de voltamperometría cíclica y de onda cuadrada para comprobar el anclaje del anticuerpo sobre la nanopartícula, así como la detección de la proteína por el método electroquímico.

Capítulo 2. Metodología

Para llevar a cabo los objetivos propuestos anteriormente, la metodología se dividió en cuatro etapas:

1. Síntesis de nanopartículas magnéticas del sistema MFe_2O_4 . En concreto, se realizaron experimentos con ferritas de níquel ($NiFe_2O_4$).
2. Recubrimiento de las nanopartículas con material biocompatible (SiO_2) para usarlas como andamio en la siguiente etapa.
3. Funcionalización de la nanopartícula y anclaje del anticuerpo (Ab) que interactuará con el analito de interés.
4. Funcionalización del electrodo y evaluación del anclaje del anticuerpo y detección de la proteína.

2.1 Materiales y reactivos

Tabla 2. Lista de reactivos utilizados en los procesos experimentales

Proceso	Reactivos
1. Síntesis de $NiFe_2O_4$	<ul style="list-style-type: none">• Cloruro de hierro hexahidratado ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 98 % Sigma)• Cloruro de níquel hexahidratado ($NiCl_2 \cdot 6H_2O$, 98 % Sigma)• Urea (NH_2CONH_2, 99.0-100.5% Sigma)• PEG 8000 ($H(OCH_2CH_2)_nOH$, Sigma)• Etanol (C_2H_5OH)• Agua desionizada
2. Recubrimiento con SiO_2	<ul style="list-style-type: none">• TEOS ($Si(OC_2H_5)_4$, 98% Sigma)• Solución de hidróxido de amonio (NH_4OH, 29% Sigma)• Etanol (C_2H_5OH)

<p>3. Funcionalización de la nanopartícula y anclaje del Ab</p>	<ul style="list-style-type: none"> •Anticuerpo monoclonal de proteína Whole Spike anti-SARS CoV 2 Agua Milli-Q • H₂O₂ •NH₄OH •APTES (Sigma) •Clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida (EDC) •N-hidroxisuccinimida (NHS) •Solución salina de fosfato (PBS) •Albúmina de suero bovino (BSA)
<p>4. Funcionalización del electrodo y evaluación del anclaje y detección de la proteína</p>	<p>Se utilizaron los mismos reactivos de la etapa 3, además de:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Proteína Whole Spike SARS CoV 2 • Ferricianuro de potasio (K₃[Fe(CN)₆]) • Ferrocianuro de potasio (K₄[Fe(CN)₆]) • Electrodo de oro (anexo) • 3 polímeros conductores: PEDOT: Poli(3,4-etilendioxitiofeno)-poli(estireno sulfonato) Nafion™: Fluoropolímero a base de tetrafluoroetileno sulfonado PVSA: Poli(ácido vinilsulfónico , sal de sodio)

2.2 Primer etapa: Síntesis del núcleo magnético

2.2.1 Ferritas de níquel (NiFe₂O₄)

La preparación de las nanopartículas magnéticas de NiFe₂O₄ se lleva a cabo mediante síntesis hidrotérmica. En concreto, se prepara una solución de 60 mL de urea y otra de 20 mL de polietilenglicol (PEG), ambas soluciones cristalinas se vierten en un vaso de precipitado de 150 mL y se agitan magnéticamente a temperatura ambiente por media hora hasta formar una solución homogénea. Sin detener la agitación, se añade FeCl₃•6H₂O (16mmol) a la solución anterior hasta que se disuelva por completo, posteriormente se añade NiCl₂•6H₂O (8mmol) y continúa la agitación hasta que este se

disuelta totalmente. La solución amarilla resultante se somete a baño sónico por 15 min y terminado este tiempo se transfiere a un autoclave de 200 mL para mantenerla a 200 °C por 24 h en un horno. La solución marrón resultante indica la formación de nanopartículas magnéticas. Con ayuda de un imán se recuperan los precipitados y se lavan tres veces con agua desionizada en centrífuga a 5500 rpm por 15 min y luego otras tres veces con etanol reactivo. Finalmente, se evapora el etanol por 12 h a temperatura ambiente y los polvos resultantes se someten a tratamiento térmico a 600 °C por 10 h.

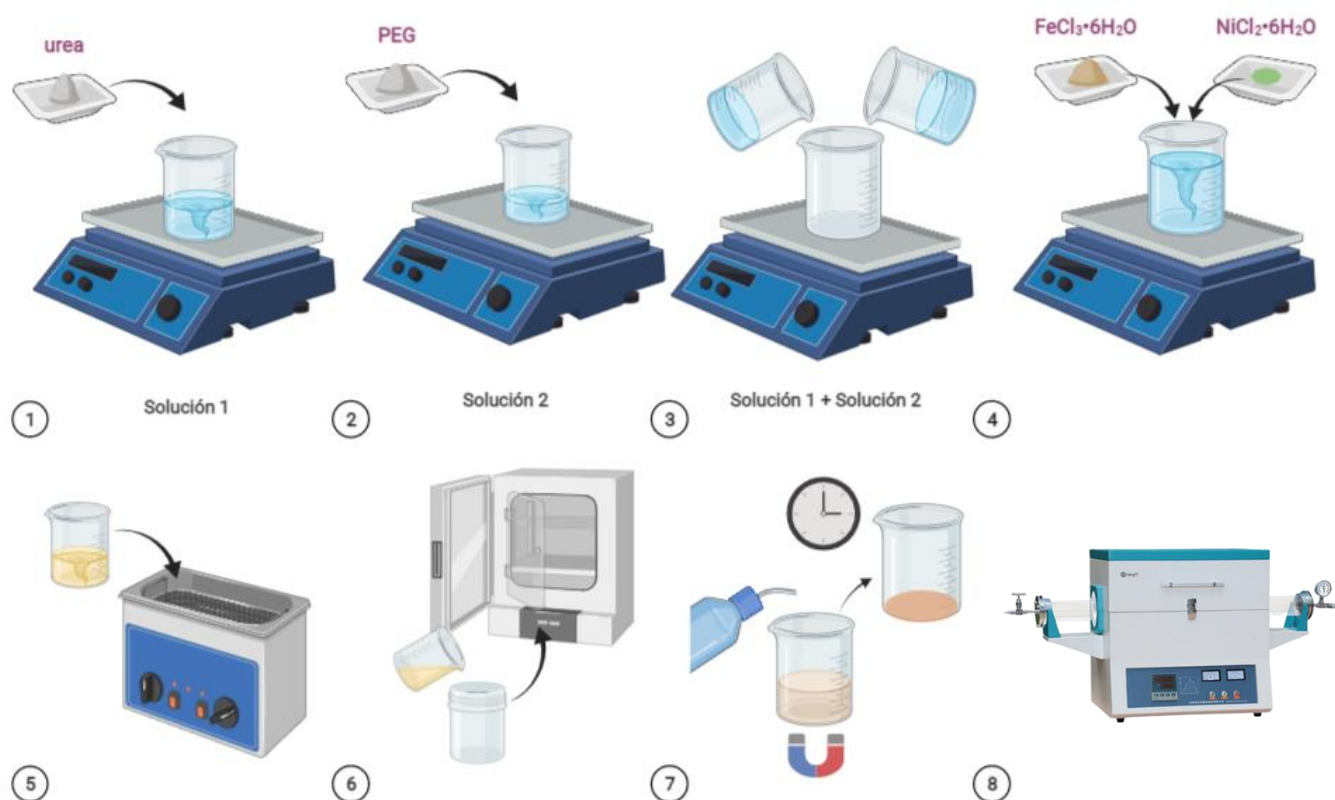


Figura 8. Esquema para la síntesis de NiFe_2O_4

2.3 Segunda etapa: Recubrimiento con SiO_2

Los materiales magnéticos son recubiertos con SiO_2 por medio de una modificación al método de Stöber (Belman, 2019; Stöber et al., 1968):

Se suspenden 0.5 g de material magnético en etanol y se dispersan en baño sónico por 4 h, posteriormente la muestra se seca a 60 °C por 12 h. Pasado este tiempo, se toman 0.2 g del material

previamente secado y se agrega a una mezcla de 40 mL de etanol y 10 mL de agua desionizada. La mezcla se dispersa durante 40 min en baño sónico (solución 1). Por otro lado, se prepara una solución con 30 mL de etanol y 0.6 mL de hidróxido de amonio (NH_4OH), la cual se mantiene en agitación durante 10 min (solución 2). Terminados estos procesos, se agrega la solución 2 a la solución 1, la mezcla se pone en agitación a 800 rpm durante 30 min para después ser dispersada por sonicación por 30 min más. A la mezcla se le añaden 110 μL de tetraetilortosilicato (TEOS) y se mantiene en agitación a 800 rpm durante 4 h. Para detener la reacción, la muestra se lava 3 veces por centrifugación a 5500 rpm durante 15 min. Enseguida, se deja secar la muestra a 60 °C por 12 h y finalmente se realiza un tratamiento térmico a 550 °C durante 6 h.

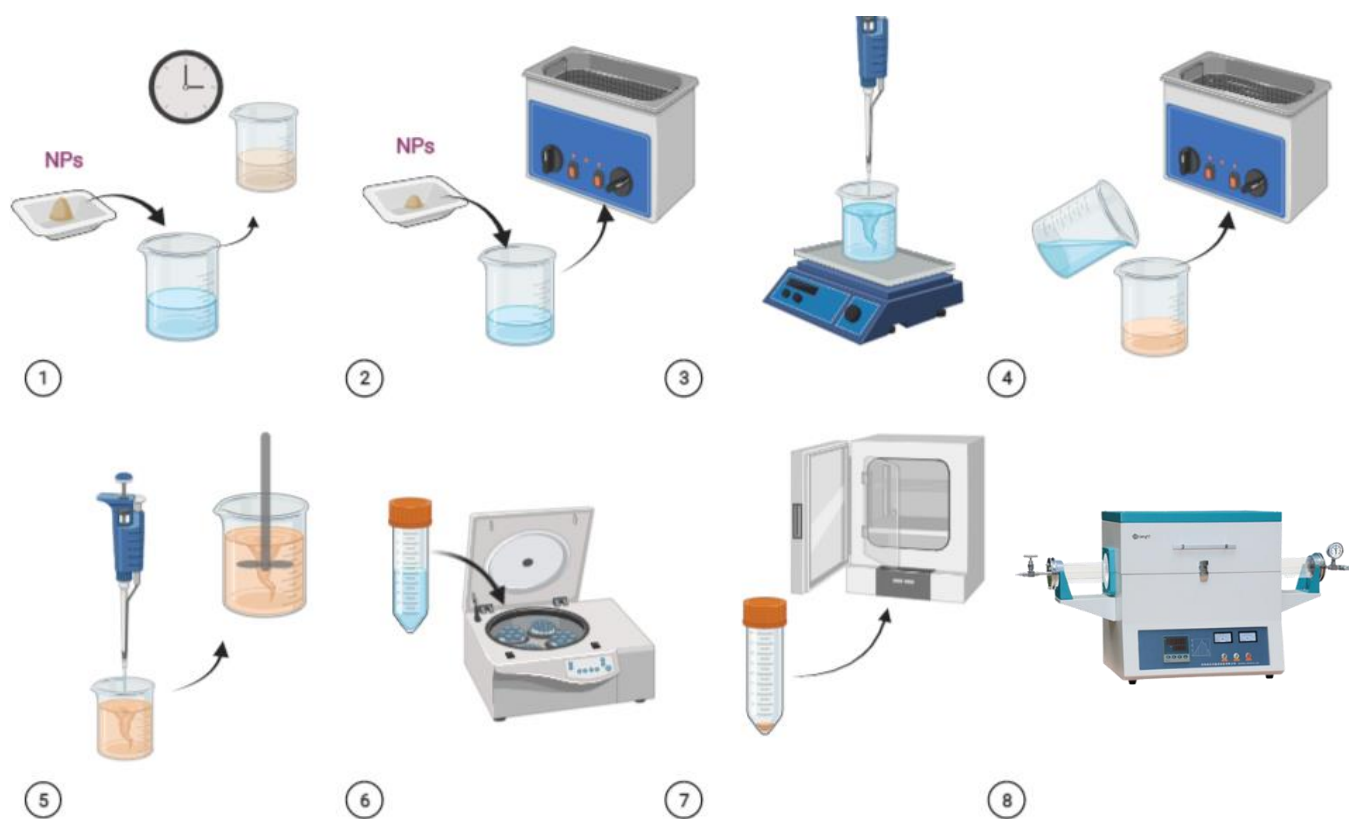


Figura 9. Esquema para el recubrimiento con SiO_2

2.4 Tercer etapa

2.4.1 Funcionalización de la nanopartícula

Como primer paso se realizó una activación oxidativa sobre las nanopartículas sometiéndolas a un lavado con una solución de $\text{H}_2\text{O}:\text{H}_2\text{O}_2:\text{NH}_4\text{OH}$ en una proporción de 10:1:1, luego se llevó a cabo la etapa de silanización utilizando las nanopartículas de $\text{NiFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2$ previamente lavadas y añadiendo APTES a diferentes concentraciones (1 y 5 %v/v) y se dejaron en agitación a temperatura ambiente por 20 min y 24 h. Inmediatamente después de haber pasado el tiempo de reacción las muestras con nanopartículas se lavaron tres veces con buffer MES (pH 5.8 - 6.5), y con $\text{H}_2\text{O}:\text{H}_2\text{O}_2:\text{NH}_4\text{OH}$ para los controles. El objetivo en esta etapa es formar una superficie sobre el material magnético y obtener una interfaz entre éste y el material orgánico utilizando el enlace covalente -Si-O-Si- (Figura 10).

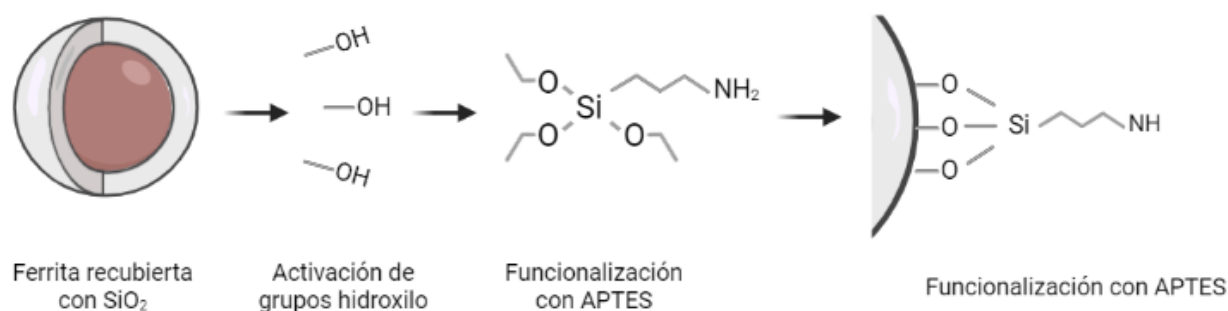


Figura 10. Funcionalización de la superficie con APTES

Para determinar la mejor concentración y tiempo de reacción para la solución de APTES, se realizaron varios conjuntos de experimentos, variando a) la cantidad de $\text{NiFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2$ por cada mililitro (5mg y 10 mg), b) la concentración de APTES (1% y 5%) y c) el tiempo de reacción (20min y 24 h) así, se obtienen un total de 10 muestras, cada una de ellas descrita en la Tabla 3 (las muestras de control están resaltadas en negrita)

Tabla 3. Muestras preparadas

Muestra	NPs magnéticas (mg/mL)	APTES (% V/V)	Tiempo de reacción (h)
1a	5	5	20 min
1b	5	1	20 min
1c	10	5	20 min
1d	10	1	20 min
4a	5	5	24 h
4b	5	1	24 h
4c	10	5	24 h
4d	10	1	24 h
x	5	-	-
y	10	-	-

2.4.2 Anclaje del anticuerpo en la nanopartícula

Se preparan microtubos con 1 mL de solución de NiFe₂O₄@SiO₂-APTES y en cada uno se realiza el siguiente procedimiento: Se agregan volúmenes de 19 µL de EDC 2.5x*10⁻³ mol/L y 35 µL de NHS 1x*10⁻² mol/L en agua ultrapura a la solución y se coloca en agitación durante 20 min. Posteriormente, se retiran 540 µL del líquido, separándolo de las nanopartículas con ayuda de un imán y se colocan 40 µL de Ab_s diluido en 1:19 de Buffer PBS. Se deja incubar durante toda la noche a 28 °C. Nuevamente con ayuda del imán, se recuperan las nanopartículas y se resuspenden en 200 µL de PBS y 300 µL de BSA al 0.5% a un porcentaje final de 0.2%. La solución se resuspende dos veces para eliminar el exceso de anticuerpos y se almacena a 4 °C.

2.5 Evaluación

2.5.1 Anclaje del anticuerpo

Se llevó a cabo la siguiente estrategia sobre electrodos de oro previamente fabricados (ver anexo): Los electrodos de trabajo secos se funcionalizaron con EDC/NHS de la misma forma que en la sección anterior y se dejaron incubar por 20 min. Tras un lavado con buffer PBS, se colocan 8 µL de solución de

Ab_s y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas. Pasado este tiempo se realizaron mediciones de voltamperometría cíclica (CV).

2.5.2 Detección de la proteína

Se prepararon diluciones de proteína S en buffer PBS partiendo desde una concentración de 1uL de proteína por cada mililitro y llegando hasta 0.00005uL/mL. A cada tubo se le adicionaron 20mL de solución de nanopartícula con Ab. Se colocó una cantidad suficiente para cubrir el electrodo de trabajo y se procedió a medir cada disolución mediante voltamperometría de onda cuadrada (SWV) y voltamperometría cíclica (CV).

2.6 Caracterización

Para la respectiva caracterización de las propiedades físicas y químicas, se cuenta con la infraestructura adecuada y necesaria en el Centro de Nanociencias y Nanotecnología, como lo es el laboratorio de síntesis de nanomateriales. También se cuenta con un Microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-2100F (STEM) para la caracterización morfológica y estructural, un sistema integral de microscopía electrónica (SEM) y haz de iones enfocados (FIB), JEOL JIB-4500 (SEM+FIB) con nanomanipulador, espectroscopía de catodoluminiscencia y de dispersión de energía (EDS), dos Difractómetros Philips X'pert MPD y Panalitical X'pert Pro MRD para la caracterización estructural, un espectrómetro AvaSpec-2048 para la caracterización espectroscópica UV – Vis y para la caracterización magnética se cuenta con acceso mediante colaboración a un equipo PPMS Dyna Cool-9 (Physical Property Measurement System) ubicado en la Facultad de Ciencias Físico Matemáticas de la Universidad Autónoma de Cd. Juárez.

2.5.1 Microscopía electrónica de transmisión

El TEM es una caracterización mediante la que se transmite un haz de electrones a una determinada muestra para que interactúe con sus átomos y moléculas. Gracias a la longitud de onda tan pequeña que se maneja, este tipo de microscopía es capaz de recuperar imágenes con mayor resolución que otros microscopios de luz (Zhao & Liu, 2022)

Este microscopio está equipado con un cañón de electrones tipo emisión de campo-Schottky. La preparación de las nanopartículas se llevó a cabo dispersando 20 mg de material el polvos en 5 mL de etanol y colocando en baño ultrasónico por 5 min, se transfirieron 2 mL de esta solución a otro frasco, se aforó a 5 mL con más etanol y se repitió el proceso hasta obtener 5 diluciones. Este proceso se realizó con muestras de NiFe_2O_4 y $\text{NiFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2$.



Figura 11. Esquema de preparación y muestras reales

2.5.2 – Microscopía electrónica de barrido (SEM) y Espectroscopia de rayos X de energía dispersiva (EDS)

El SEM es un instrumento utilizado para lograr analizar la topografía en la superficie de un material. Contrario a los microscopios convencionales, la imagen es producida gracias al uso de electrones en lugar de luz (Zhao & Liu, 2022). Durante una medida, primero se recubre el material con una fina capa de algún metal o una capa de carbón, ya que la muestra de ser conductora, posteriormente un haz de electrones se produce en la parte superior del microscopio mediante un cañón de electrones, este haz sigue una trayectoria vertical a través del microscopio, que se mantiene dentro del vacío. El haz viaja a través de campos electromagnéticos y lentes, que enfocan el haz hacia la muestra. Una vez que el haz golpea la muestra, los electrones y los rayos X son expulsados de la muestra. La preparación de las muestras para análisis SEM es relativamente sencilla; para el análisis de las partículas de NiFe_2O_4 se fijó primeramente un trozo de silicio previamente limpiado con acetona como blanco sobre un soporte

adecuado, seguido de esto se pipeteó 20 μL de material disperso en agua y se dejó durante un día en desecador.

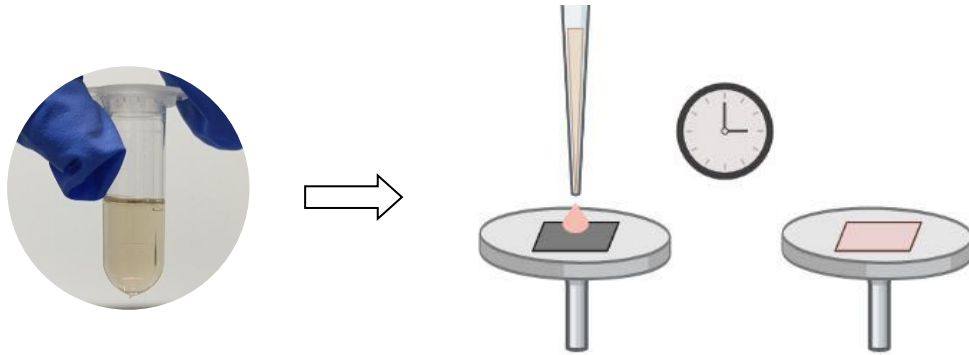


Ilustración 12. Muestra diluida en agua y esquema de preparación sobre un trozo de silicio adherido al soporte

2.5.3 Difracción de rayos X (XRD)

La caracterización mediante difracción de rayos X no solo nos es útil para identificar la fase cristalina de un material, sino que nos proporciona una amplia variedad de información sobre su estructura tal como la distribución de electrones en los átomos, la disposición de los átomos en una estructura cristalina, las distancias interatómicas y sus ángulos de enlace. La difracción de rayos X se basa en la interferencia constructiva de rayos X monocromáticos y una muestra cristalina. Estos rayos X son generados por un tubo de rayos catódicos, filtrados para producir radiación monocromática, colimados para concentrarlos y dirigidos hacia la muestra (Ali et al., 2022). La interacción de los rayos incidentes con la muestra produce interferencia constructiva y un rayo difractado cuando las condiciones cumplen la Ley de Bragg, dada por la siguiente ecuación:

Ecuación 1

$$n\lambda = 2d \sin(\theta)$$

Donde n , siendo un número entero, se refiere al orden de difracción, λ es la longitud de onda de la radiación incidente, θ es el ángulo entre los rayos incidentes y los planos de dispersión y d es la distancia interplanar, por lo que despejando la ecuación anterior podemos obtener:

$$d = \frac{n\lambda}{2\sin(\theta)}$$

Esta ley relaciona la longitud de onda de la radiación electromagnética con el ángulo de difracción y el espaciado de la red en una muestra cristalina. Estos rayos X difractados se detectan, procesan y cuentan. Al escanear la muestra a través de un rango de 2θ ángulos, todas las posibles direcciones de difracción de la red deben alcanzarse debido a la orientación aleatoria del material en polvo. La conversión de los picos de difracción a espacios d nos permite identificar el material utilizando referencias estándar obtenidas de bases de datos. Además, este tipo de caracterización nos permite obtener el tamaño aproximado de cristal, para lo cual se usó la ecuación de Scherrer:

$$\tau = \frac{k\lambda}{\beta\cos(\theta)}$$

Donde τ es el tamaño promedio de cristal, λ sigue siendo la longitud de onda de los rayos X, β es el área total bajo el máximo de difracción dividida por la intensidad del pico, θ es el ángulo y k es la constante de Scherrer (Ali et al., 2022).

Para la caracterización por XRD no se llevó a cabo ninguna preparación especial de los polvos de ferrita, por lo que estos se colocaron directamente sobre el soporte adecuado.

2.5.4 Magnetómetro de muestra vibrante (VSM)

Un magnetómetro de muestra vibrante (VSM) funciona según la Ley de Inducción de Faraday, que nos dice que un campo magnético cambiante producirá un campo eléctrico. Este campo eléctrico puede ser medido y puede darnos información sobre el campo magnético cambiante. Un VSM se utiliza para medir el comportamiento magnético de los materiales magnéticos. La muestra se coloca bajo un campo constante, si la muestra es magnética, este campo magnetizará la muestra alineando los dominios magnéticos, o los espines magnéticos individuales, con el campo. Cuanto más fuerte sea el campo constante, mayor será la magnetización. El momento dipolar magnético de la muestra creará un campo magnético alrededor de la muestra. A medida que la muestra se mueve hacia arriba y hacia

abajo, este campo magnético cambia en función del tiempo y puede ser detectado por un conjunto de bobinas de captación. El campo magnético alterno provocará un campo eléctrico en las bobinas de captación de acuerdo con Ley de inducción de Faraday. Esta corriente será proporcional a la magnetización de la muestra. Cuanto mayor sea la magnetización, mayor será la corriente inducida(Maldonado-Camargo et al., 2017).

2.5.5 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR ATR)

La espectroscopia FTIR es una potente técnica óptica basada en mediciones de vibración de una molécula excitada por radiación IR en un rango de longitud de onda específico, que identifica las características de vibración de los grupos funcionales químicos en una muestra (Ricci et al., 2015; Tsai et al., 2018). La espectroscopia FTIR proporciona información sobre estructuras moleculares, entornos químicos, orientaciones y conformaciones de cadenas de polímeros. La espectroscopia FTIR es uno de los mejores métodos para identificar la estructura molecular, como el grupo funcional y el enlace, cualitativamente de acuerdo con las frecuencias características. Además, los espectros FTIR pueden determinar cuantitativamente el contenido de componentes de la muestra según la intensidad de la banda(Chang & Tanaka, 2002).

Así, con las mediciones de FTIR podemos identificar los grupos funcionales presentes en las muestras preparadas, lo cual nos ayudará a confirmar la presencia de grupos amino en su superficie, producto de una correcta funcionalización con APTES. Para ello, 200 uL de muestra dispersa en agua se colocó en el equipo inmediatamente después de que el tiempo de reacción terminara y se midió en modo ATR con resolución 6 en un rango de 600 a 4000 nm.

2.5.6 Caracterización electroquímica

Voltamperometría cíclica (CV)

La CV es la prueba electroquímica básica de los materiales. En él, la corriente se registra al barrer el potencial de un lado a otro (de positivo a negativo y de negativo a positivo) entre los límites elegidos. La información obtenida de la CV puede utilizarse para conocer el comportamiento electroquímico del

material. El análisis gráfico de un voltamperograma cíclico proporciona los picos rédox, que son picos de reducción y oxidación del material, que predicen el comportamiento capacitivo del electrodo(Choudhary et al., 2017).

Voltamperometría de onda cuadrada. Se trata de un tipo de técnica electroquímica en la que se proporciona una señal de entrada linealmente creciente en forma de onda cuadrada para una aplicación voltamperométrica. Utilizando la voltamperometría de onda cuadrada (SWV) se puede determinar la corriente que pasa a través del electrodo de trabajo y el potencial a través del electrodo de trabajo y del electrodo de referencia se barrerá linealmente en el tiempo.

La amplitud de esta onda cuadrada de barrido lineal es siempre constante. La corriente obtenida se mide muestreando la forma de onda cuadrada de entrada de barrido lineal al final de cada semiciclo. Esta corriente se mide tanto en el semiciclo de avance como en el semiciclo de retroceso y la diferencia entre ambos da la forma de onda de la corriente de salida en función del potencial aplicado. La SWV es una técnica muy sensible. Puede identificar fácilmente la adsorción de cualquier reactivo específico mostrando una mejora significativa en su pico de corriente (Choudhary et al., 2017).

Capítulo 3. Resultados y discusiones

3.1 Estudio morfológico y análisis de distribución estadística de tamaños por microscopía de barrido (SEM) y microscopía electrónica de transmisión (TEM)

De acuerdo a lo observado en las imágenes SEM, se formaron partículas de diversos tamaños (Figura 13 y 14), con morfología irregular y con tendencia a la aglomeración. Para obtener las medidas aproximadas de los tamaños de partícula se utilizó el software Image J y se determinó el tamaño de 125 partículas. Con estos datos se obtuvo un histograma de distribución de tamaño (Figura 14) con el que se puede observar que el rango de tamaño más frecuente de la muestra de NiFe_2O_4 está entre los 50 y 100 nm.

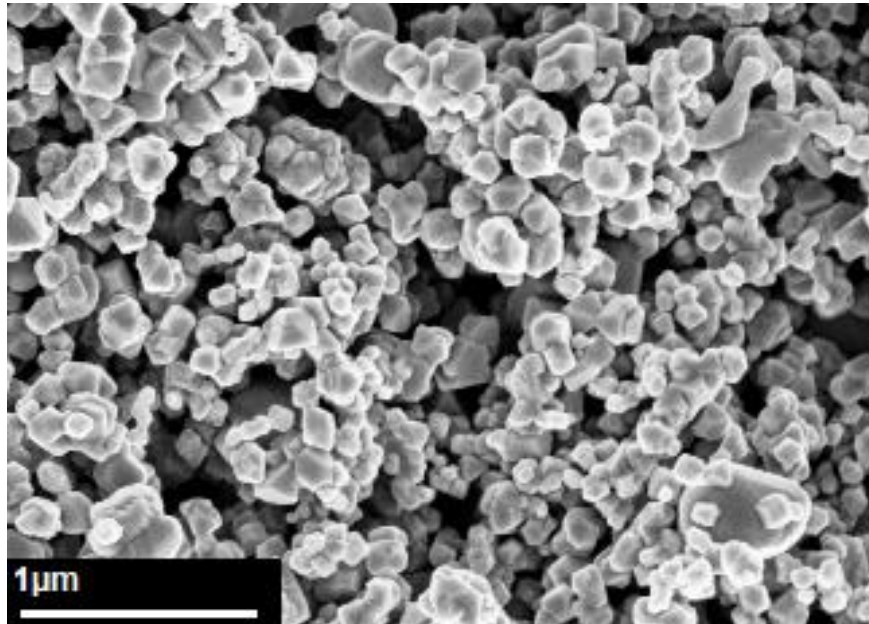


Figura 13. Muestra de NiFe_2O_4 observada mediante microscopía electrónica de barrido (SEM)

Como se ha expuesto anteriormente, las nanopartículas magnéticas resultan de gran atractivo en las aplicaciones biomédicas por su tamaño tan pequeño y el comportamiento que exhibe debido a éste. Sin embargo, ensambles aglomerados de partículas podrían variar e incluso cambiar totalmente sus propiedades. En este sentido, la primer incógnita a resolver es si será posible realizar un recubrimiento uniforme sobre las nanopartículas que sirva como material biocompatible para aplicaciones biomédicas. Las nanopartículas magnéticas tienen una fuerte tendencia a agregarse debido a las

interacciones magnéticas entre partículas y a la gran reactividad de la superficie de estas, por lo que al observar estas imágenes surge como segunda interrogante si estamos en presencia de partículas con tendencia a la aglomeración o a la agregación.

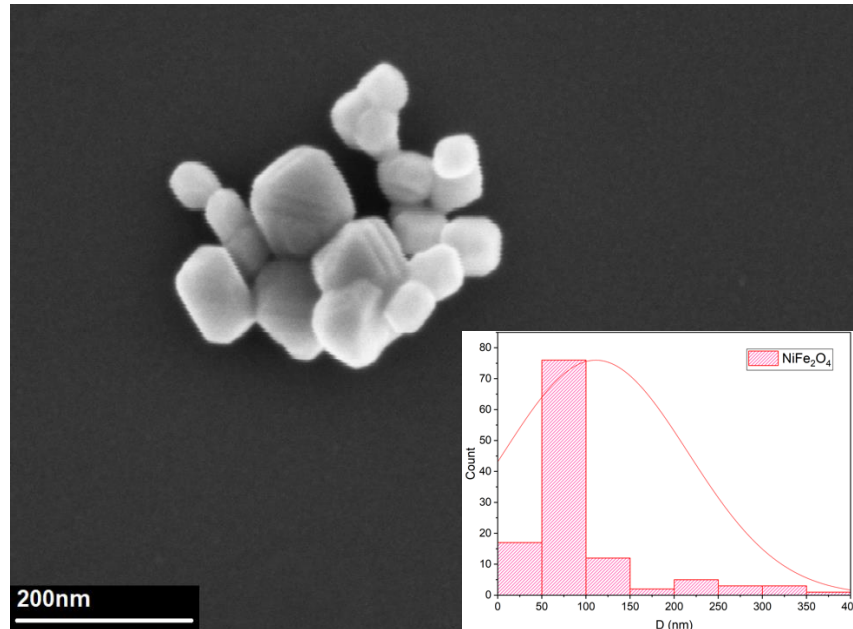


Figura 14. Cúmulo de nanopartículas NiFe_2O_4 e histograma de tamaño basado en el conteo de 125 partículas

Recordando, la aglomeración se refiere a grupos de partículas débilmente unidos que son capaces de romperse a través de fuerzas mecánicas sencillas, mientras que en la agregación se refiere a grupos fuerte y densamente unidos que difícilmente pueden separarse.

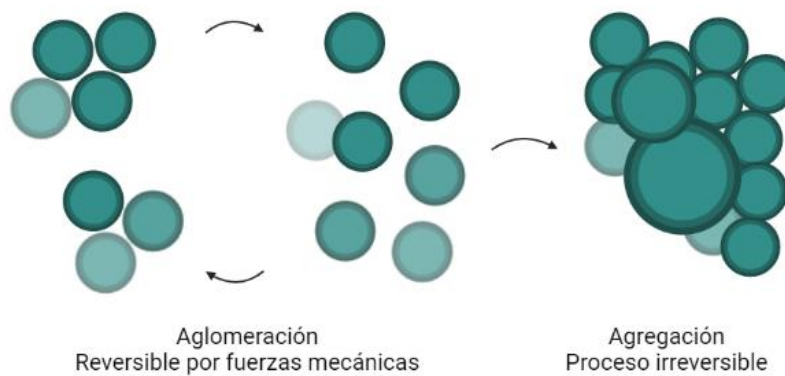


Figura 15. Comparación entre un grupo de nanopartículas aglomeradas y agregadas.

El segundo análisis de la morfología del material se llevó a cabo por microscopía electrónica de transmisión (TEM). La Figura 16 muestra las micrografías obtenidas del NiFe_2O_4 a diferentes ampliaciones, en las imágenes se confirma la formación de algunos cúmulos (a y b) y se aprecian enfoques acercados de una nanopartícula donde se aprecian sus planos cristalinos, a partir de los cuales más adelante se determinó la distancia interplanar.

Dado que durante la preparación de muestras para TEM las muestras se colocaron varias veces en baño sónico y sin embargo continuamos percibiendo la formación de grupos de partículas, podemos inferir que estas están fuertemente unidas y han formado entidades de mayor tamaño, las cuales se hicieron presentes durante el conteo de diámetro de partículas, siendo éstas las correspondientes a las barras de 200 nm en adelante en el histograma de la Figura 14. Ya se ha reportado (Kumar et al., 2020) anteriormente la síntesis de nanopartículas magnéticas mediante síntesis hidrotérmica en la cual las partículas resultantes exhibieron una morfología muy similar a la observada en este trabajo, y donde además, se había usado de igual forma PEG como agente estabilizante para, teóricamente, evitar la agregación de partículas y se concluyó que la morfología resultante se atribuye al haber trabajado con una alta temperatura. Esto concuerda con otros trabajos encontrados en la literatura, donde el aumento en el tamaño de partícula está fuertemente relacionado con la temperatura que se usa no solo durante la etapa de nucleación y crecimiento de las partículas, sino también con la usada en las etapas de secado y recocido (cuando se recuperan polvos y no se mantiene en solución). De acuerdo a (Abdellahi et al., 2021) el tamaño promedio de las nanopartículas magnéticas aumentó significativamente después del recocido, el cual se llevó a cabo a temperaturas arriba de los 600 °C y donde se registró la formación de agregados que dieron lugar a partículas con un tamaño 20 nm mayor al registrado antes del tratamiento térmico.

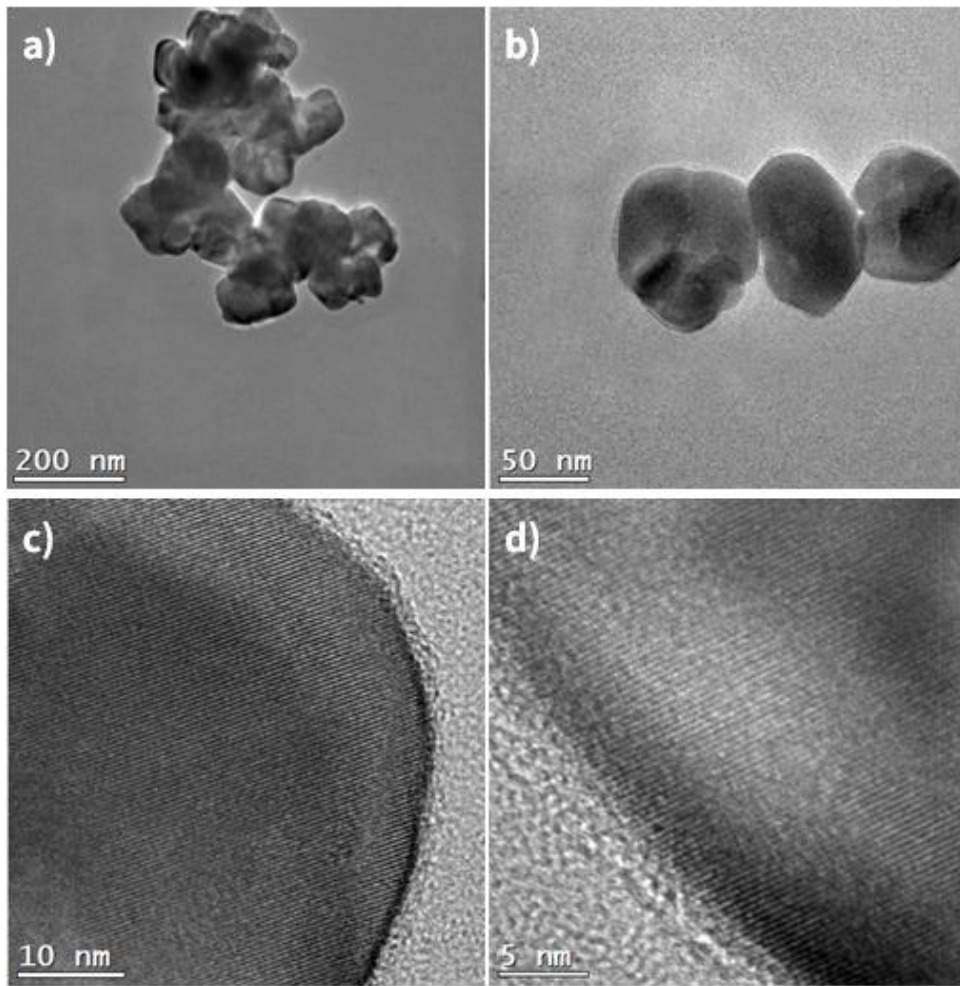


Figura 16. Micrografías TEM de ferrita de níquel

Por otro lado, con respecto al recubrimiento con Si podemos comprobar que hubo un recubrimiento completo en las partículas, independientemente de su morfología. En la Figura 17 se observa la comparación entre una nanopartícula recubierta con SiO_2 y una sin recubrir. Existe una diferencia de color entre el núcleo y el recubrimiento, que es de un color más claro, lo cual se asocia a que el núcleo de ferrita tiene más capacidad de dispersión que el silicio. Dicho recubrimiento tuvo un grosor de 2.92 nm que se aproximó utilizando el software ImageJ. De acuerdo a la literatura, a mayor tiempo de reacción entre las partículas y TEOS el grosor del recubrimiento deberá aumentar, este comportamiento ya ha sido reportado en otros trabajos (Kobayashi et al., 2005; Nadeem et al., 2014) por lo que se predice un resultado similar para este caso.

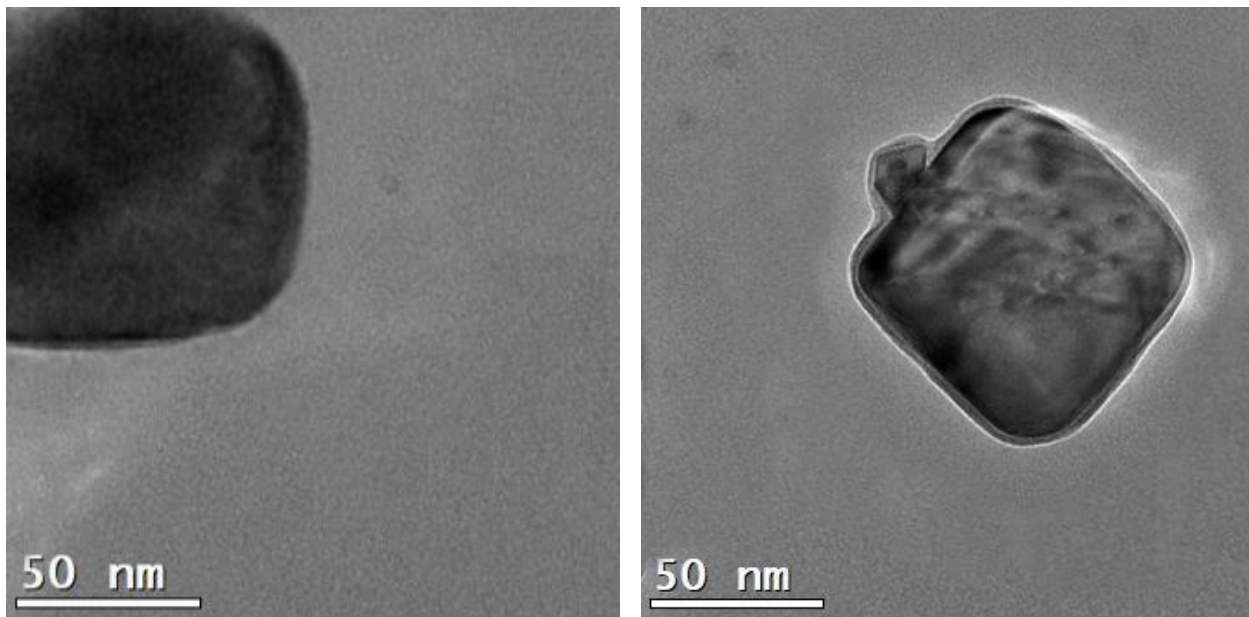


Figura 17. Comparación entre NiFe_2O_4 y $\text{NiFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2$

3.1.1 Análisis estructural por microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM)

Con el objetivo de conocer las características de la estructura cristalina de las nanopartículas sintetizadas, a partir de la Figura 18-a se obtuvieron los puntos de difracción del área marcada en el recuadro rosa usando el software Gatan Microscopy Suite mediante la Transformada rápida de Fourier (Figura 18-b) y el inverso de la transformada (Figura 18-c) para posteriormente realizar un análisis de

distancias (Figura 18-d). La región usada para analizar la distribución de distancias medía 4.08 nm y se encontraba separada por 10 zonas brillantes, por lo que la distancia se calcula utilizando la ecuación 4.

Ecuación 4

$$d = \frac{4.08nm}{10} = 0.408 nm = 4.08 \text{ \AA}$$

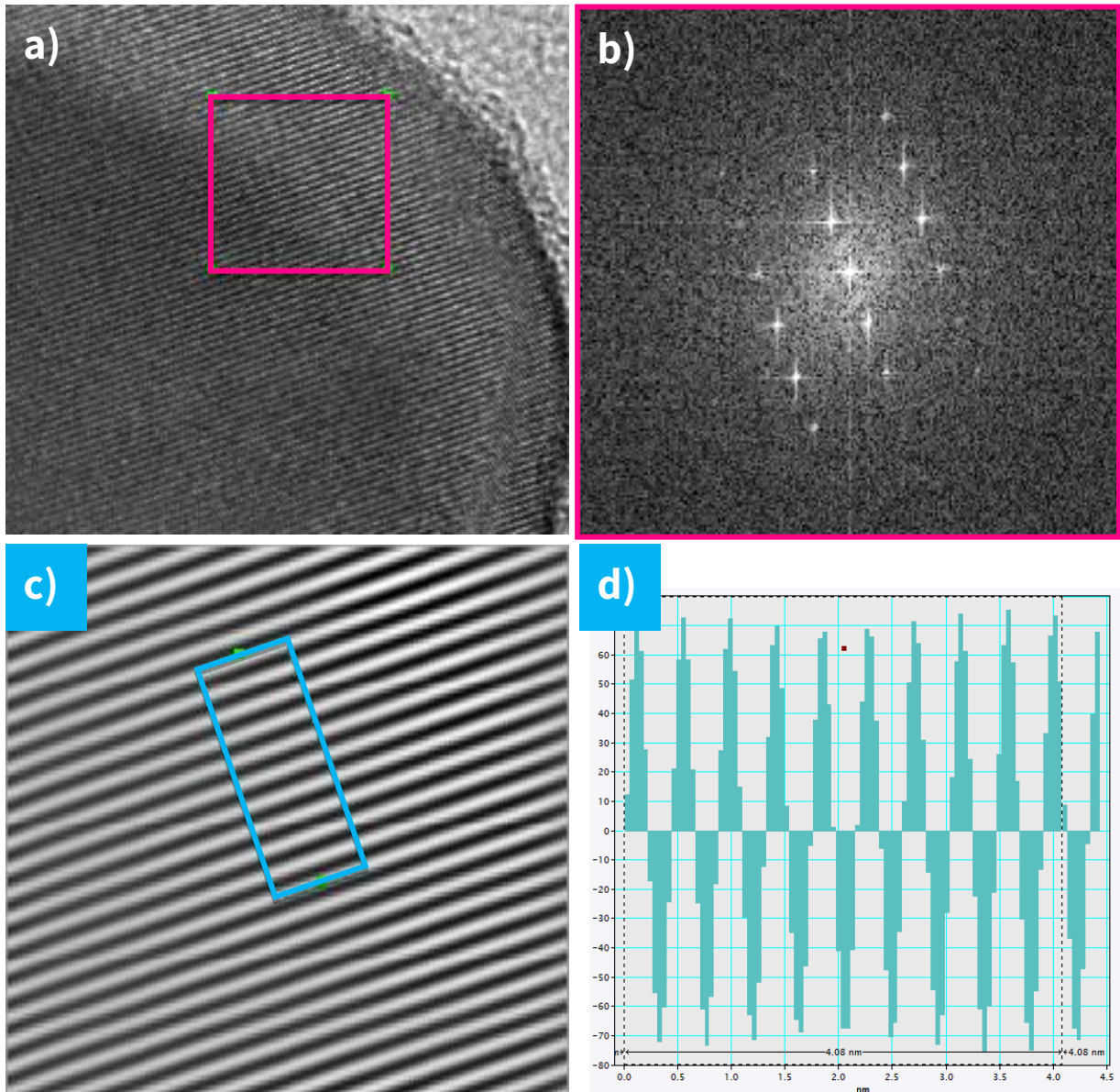


Figura 18. Micrografía HR-TEM de NiFe_2O_4 (a), Imagen FFT del área delimitada en rosa (b), Imagen IFFT (c) y determinación de distancia en nm (d)

En la Figura 18-a se ilustra una micrografía de la red cristalina de la muestra, mientras que en la 18-b se observan sus correspondientes puntos de difracción generados por la Transformada rápida inversa de Fourier (IFFT). Los planos continuos observados en las imágenes IFFT, sugieren una alta cristalinidad en las NPS de NiFe_2O_4 .

3.2 Análisis de composición de NiFe_2O_4 por medio de la técnica de dispersión de energía de rayos X (EDS)

De los resultados obtenidos por EDS se puede observar que tanto en la muestra prístina como en la calcinada a 600°C (Figura 19) se encuentran presentes los elementos característicos de la ferrita de níquel (O, Ni, Fe). En la muestra prístina (línea roja) se observa también la presencia de carbono, la cual atribuimos a la falta de tratamiento térmico, ya que en la muestra calcinada (línea negra) vemos este pico mucho más pequeño, lo que nos indica que se redujo en gran medida esta presencia. En esta última muestra se encontraron picos que señalan también la presencia inesperada de Cloro. Sin tomar en cuenta el tratamiento térmico, la única diferencia en el proceso de síntesis de una muestra y otra fue que en la muestra prístina se llevaron a cabo lavados con agua y etanol, mientras que en la muestra

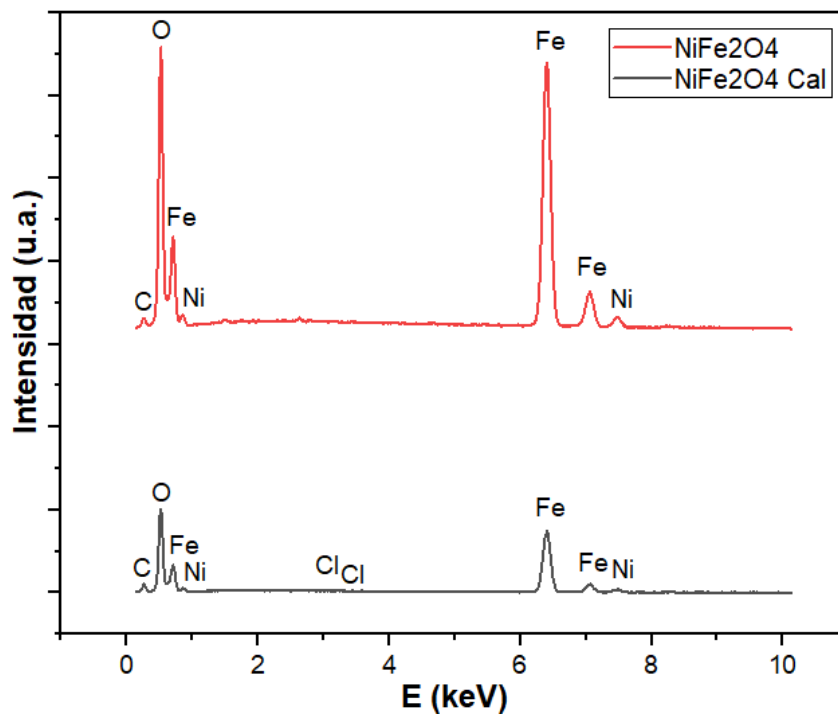


Figura 19. Espectro EDS de las muestras prístina y calcinada a 600°C de NiFe_2O_4

calcinada los lavados se realizaron únicamente con etanol reactivo, y dado que ambos procesos se llevaron a cabo bajo las mismas condiciones, inferimos que estos lavados influyen en gran medida para asegurar que las muestras no resulten contaminadas con elementos inesperados. Por otra parte, en la Figura 20 se observa la muestra final de ferrita de níquel antes y después de someterla al recubrimiento con SiO_2 . Se observa un espectro muy similar, siendo la única diferencia notable el pico de Si, el cual confirma el recubrimiento exitoso del núcleo de ferrita.

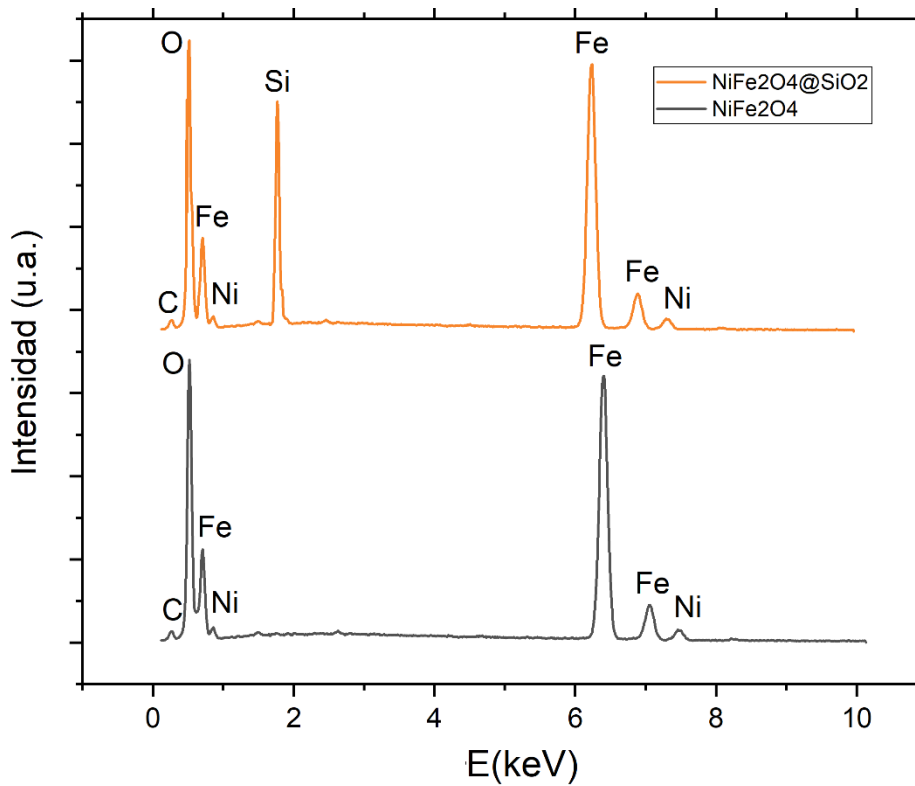


Figura 20. Espectro EDS de las muestras antes y después del recubrimiento

3.3 Análisis de estructura cristalina por difracción de rayos X

A partir del análisis de los patrones de difracción de rayos X, determinamos la estructura cristalina, los parámetros de red y el tamaño del cristal para todas las muestras. La Figura 21 muestra los patrones de difracción para las ferritas de níquel y se puede apreciar la reflexión del pico más intenso para esta muestra, que corresponde a la orientación del plano cristalográfico (311). Esto indica la formación de la fase espinela, característica de este tipo de ferrita. Se pueden observar los planos de difracción

indexados, (220), (311), (222), (400), (422), (511) y (440) (ficha JCPDS nº 98-002-8108) a, 30.104°, 35.5528°, 37.126°, 43.135°, 57.093° y 63.944° respectivamente, los cuales corresponden a la celda unitaria cúbica característica para la estructura de espinela inversa, mientras que los picos no indexados pueden ser producto de alguna impureza.

Los datos obtenidos del espectro de rayos X de la muestra de NiFe₂O₄ se trataron con el software Xpert HighScore y posteriormente se utilizó la ecuación de Debye - Scherrer en dicho programa para obtener el tamaño medio de los cristalitas a partir del pico de mayor intensidad (311), obteniendo un valor promedio de 720 ± 6 Å. Utilizando la conversión de Å a nanómetros, obtenemos un tamaño de cristal de 72 ± 6 nm que corresponde al tamaño medio obtenido por las caracterizaciones SEM y TEM.

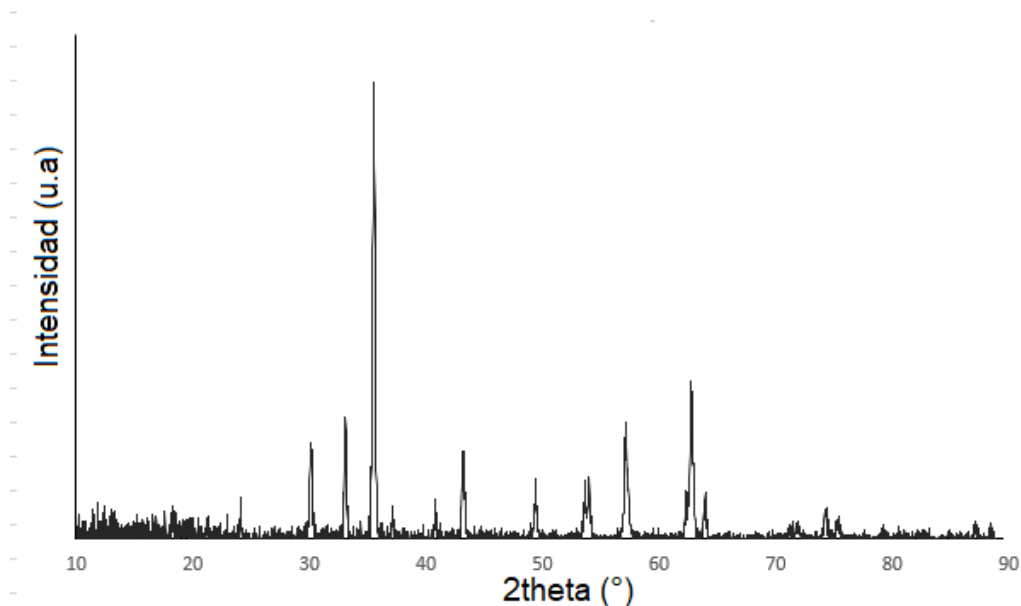


Figura 21. Patrón de difracción de ferrita de níquel

3.4 Análisis del comportamiento magnético con magnetómetro de muestra vibrante (VSM)

Para analizar las propiedades magnéticas de las muestras de NiFe₂O₄ y NiFe₂O₄@SiO₂, se obtuvieron los bucles de histéresis mediante VSM a temperatura ambiente, el cual se aprecia en la Figura 22. Se muestran los bucles de magnetización de histéresis a temperatura ambiente mediante mediciones de

VSM para las muestras de polvo de NiFe_2O_4 y se puede observar que las muestras exhiben el comportamiento típico de un material magnético blando: bajo campo coercitivo (material superparamagnético) y un aumento monótono de la magnetización hasta la saturación.

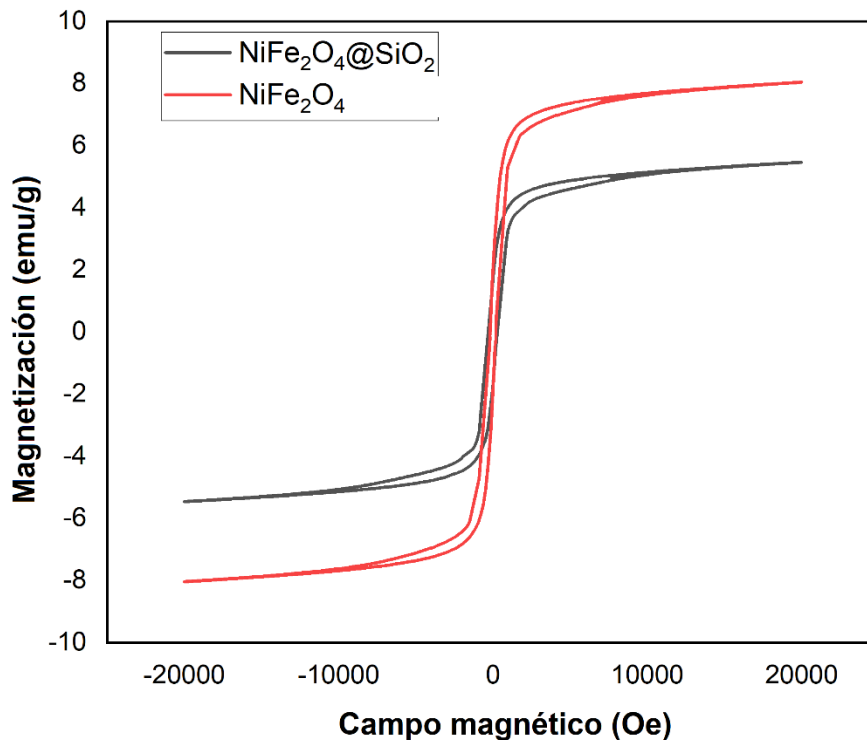


Figura 22. Curvas VSM de las nanopartículas de NiFe_2O_4 y $\text{NiFe}_2\text{O}_4@SiO_2$

El bucle de las muestras exhibió un comportamiento magnético suave y los valores de magnetización remanente (M_r), campo coercitivo (H_c) y magnetización de saturación (M_s) pudieron estimarse en 50.85 emu/g, 0.283 kOe y 163.79 emu/g respectivamente. Los bucles de magnetización para estas muestras tienen valores de coercitividad y saturación que dependen de los tamaños de las partículas; se sabe que las partículas magnéticas pueden ser consideradas como un monodominio magnético (SD) cuando los tamaños son inferiores a 100 nm. En cambio, para tamaños inferiores a 30 nm, las partículas tienden a mostrar un comportamiento superparamagnético, suponiendo que las partículas son monocristalinas. Así, el bajo campo coercitivo en los bucles de magnetización indica que estas nanopartículas magnéticas pueden considerarse como una partícula SD con tendencia a un comportamiento superparamagnético a temperatura ambiente. Además, se puede observar que la magnetización de saturación, disminuye cuando las partículas magnéticas fueron recubiertas con un revestimiento de SiO_2 por el método de Stöber, esta reducción en la magnetización de saturación

puede asociarse con la presencia de un material no magnético o componente diamagnético en la muestra, es decir, el recubrimiento de SiO₂, que produce un escudo magnético; sin embargo, la propiedad magnética permanece en la muestra a pesar del recubrimiento de SiO₂.

3.5 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR ATR)

La Figura 23 muestra los espectros FTIR-ATR de la muestra de NiFe₂O₄@SiO₂-APTES en la que esperábamos ver en primer lugar los picos característicos de los grupos SiO-H y Si-O-Si. Efectivamente, éstos se identificaron en los picos a 1010, 1045 y 1093 cm⁻¹. De acuerdo con Fen et al. (2008) y Guang-She et al (2001), las bandas de absorción a 783 y 883 cm⁻¹ podrían ser producto del estiramiento de las vibraciones Si-O-H y OH sobre la superficie de la nanopartícula.

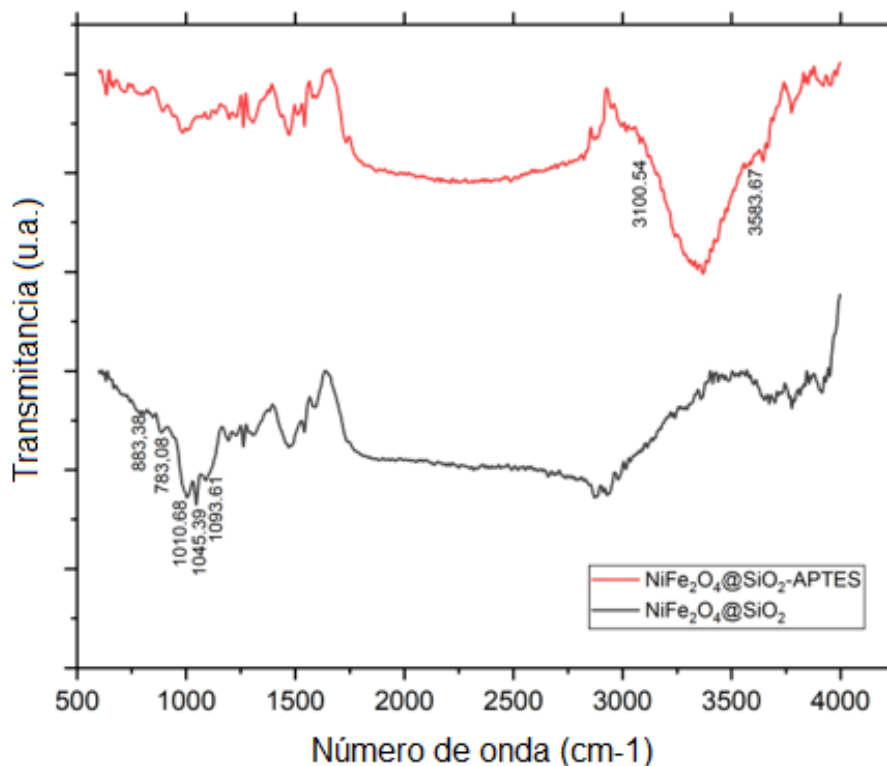


Figura 23. Espectro FTIR de la ferrita de níquel antes y después de la funcionalización

En orden de que este material sea viable para la aplicación pensada, se debe poder confirmar la presencia de grupos amino sobre la superficie de la nanopartícula. A partir de los experimentos realizados en la etapa de funcionalización, podemos determinar que las mejores condiciones para

llevar a cabo la activación de grupos amino es utilizando APTES al 5% del volumen final para 10mg de nanopartículas por mL y dejando en agitación constante por 24 horas. Esto se puede comprobar comparando los espectros FTIR-ATR donde los grupos amino se identifican por la presencia de picos anchos entre los 3310 y 3500 cm^{-1} .

En las figuras 24 y 25 se muestran los diferentes espectros de FTIR cuando se varían los parámetros de concentración de miligramos de nanopartícula, concentración de APTES y tiempo de reacción.

Debido a la ausencia de picos anchos en la zona de los 3000 a 3500 cm^{-1} de los experimentos con tiempo de reacción de 20 min, inferimos que este no es tiempo suficiente para llevar a cabo la funcionalización con APTES.

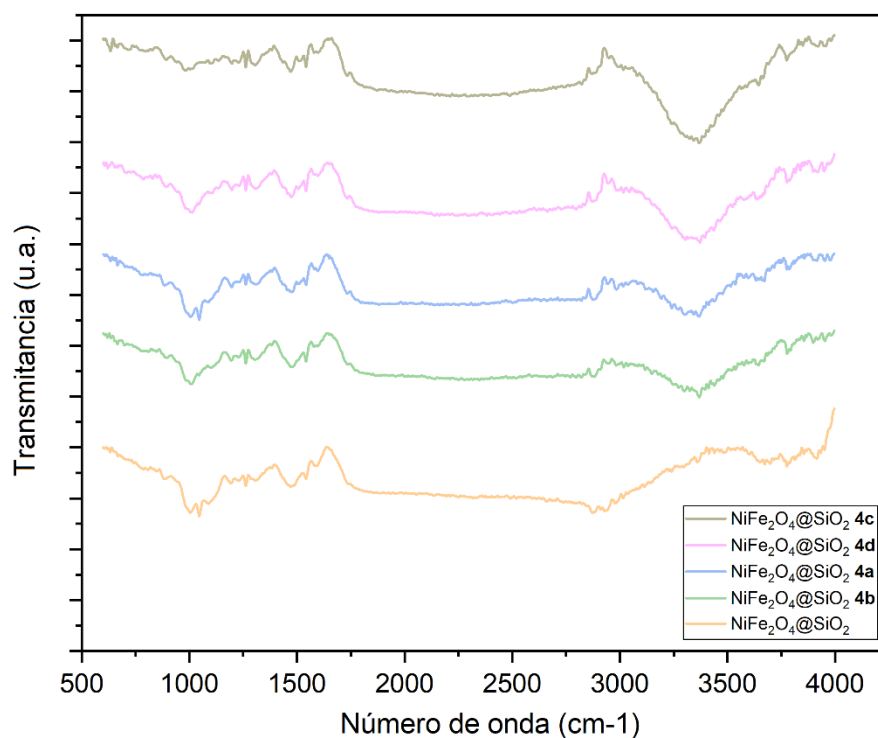


Figura 24. Tiempo de reacción a 20 min para funcionalización con APTES

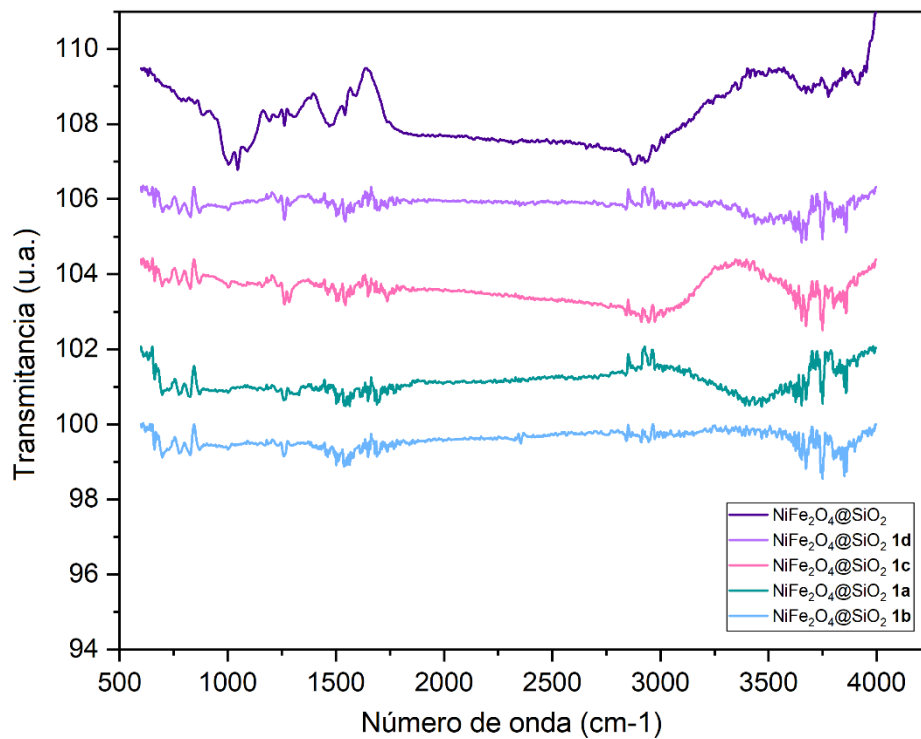


Figura 25. Tiempo de reacción a 24 horas para funcionalización con APTES

3.6 Sistema electroquímico

El biosensor se diseñó como se muestra en la Figura 26 en un electrodo de oro el cual consiste en un electrodo de trabajo, uno de referencia y un contraelectrodo. El anticuerpo anti-S anclado a la nanopartícula magnética se inmoviliza en el electrodo de trabajo con ayuda de un imán en la parte de abajo del mismo. Posteriormente se coloca una cantidad apropiada para cubrir el electrodo de trabajo de una dilución con proteína S. En la teoría, la unión de la proteína a los inmunosensores provoca un

aumento de las cargas positivas en la superficie que, a su vez, atrae el anión rédox y mejora la transferencia de electrones, por lo que en nuestro caso, la unión de la proteína S a su anticuerpo específico provocaría, teóricamente, un cambio en la señal electroquímica, y por tanto, un aumento de corriente que representa la base de la detección, mientras que un el electrodo de control (nanopartículas con anticuerpo) permanecerá sin cambios.

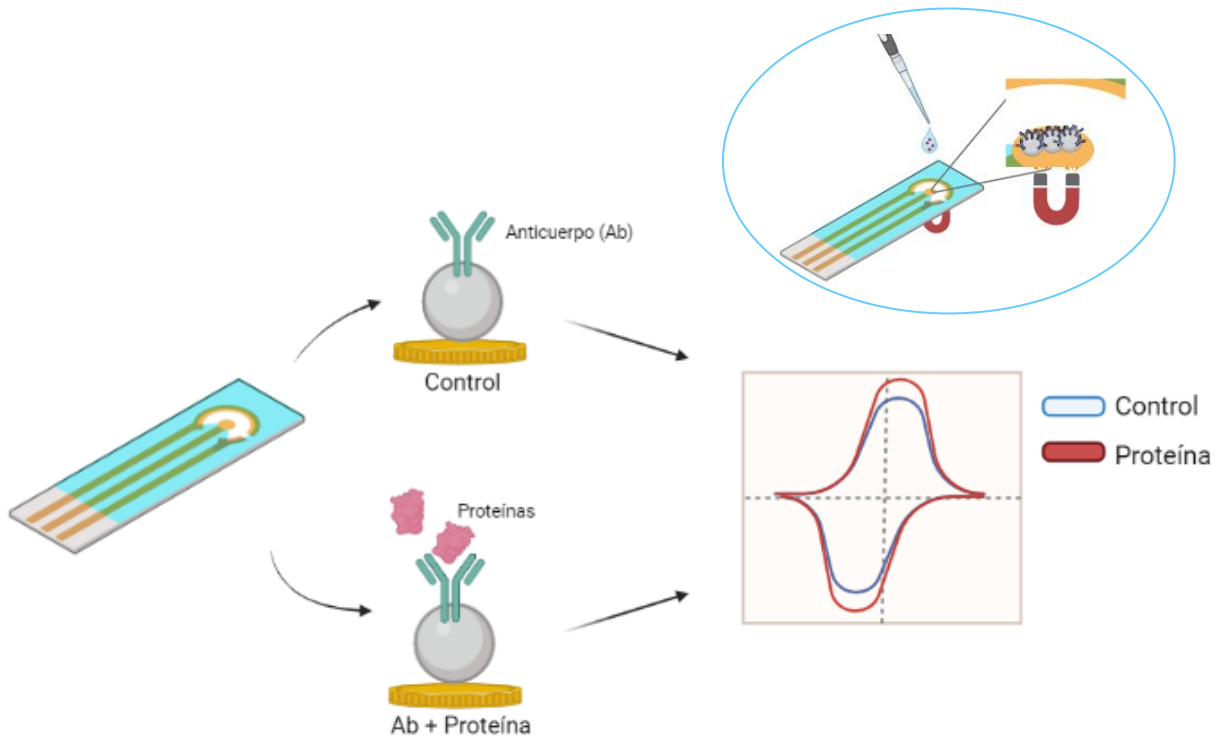


Figura 26. Esquema del sistema sensor con nanopartículas magnéticas

Antes de comenzar las medidas electroquímicas, se debe tomar en cuenta que el primer paso para llevar a cabo la detección electroquímica es asegurarse de que todos los electrodos en los que se hagan las pruebas ofrezcan resultados reproducibles, por lo que en la Figura 27 se muestran medidas de voltamperometría cíclica de todos los electrodos desnudos usados. Se aplicó voltaje al electrodo de referencia con un potenciostato, se produjo una reacción rédox en el electrodo de trabajo, y la corriente que fluía en ese momento se leyó en el contraelectrodo. Como solución rédox se utilizó una solución 5-mM de ferri/ferrocianuro (proporción 1:1 M) en buffer PBS de pH 7.4. Los parámetros de medidas electroquímicas de los electrodos fabricados se llevaron a cabo utilizando el barrido CV entre 0,8 y -0.3 V a una velocidad de barrido de 100 mV/s.

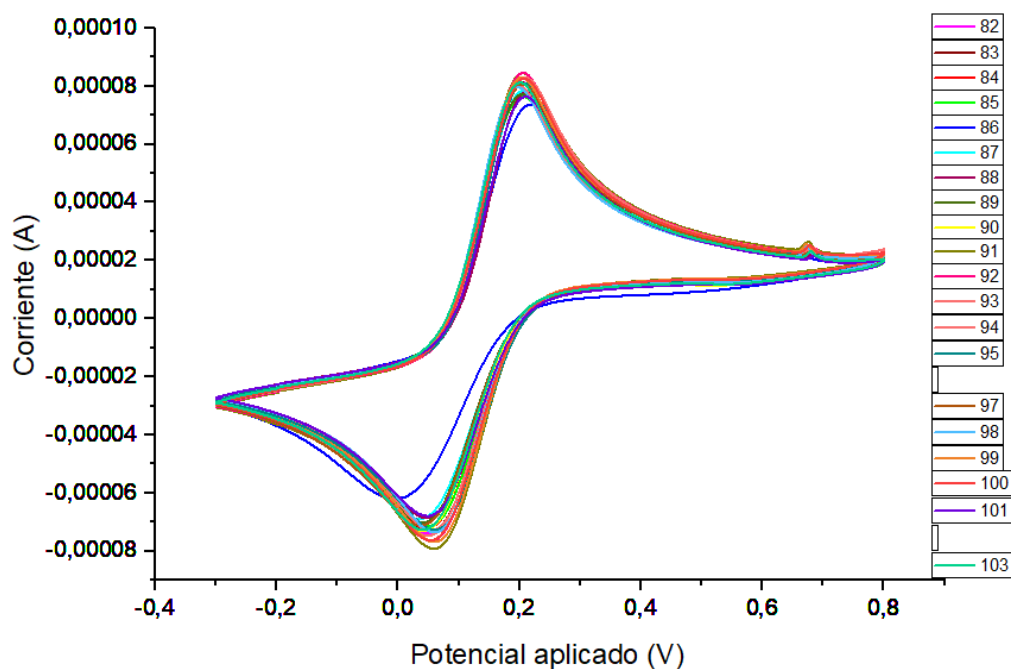


Figura 27. CV de electrodos de oro desnudos

El electrodo de oro desnudo presentó el CV característico del oro, con picos anódicos y catódicos bien definidos del par rédox con una separación de pico a pico (ΔE) de 0.15 V. En este gráfico claramente vemos que todas las señales de los electrodos son similares entre sí, teniendo diferencias de corriente despreciables de apenas 1 μ A, lo que nos indica que la reproducibilidad de los experimentos en poco se podrá ver afectada por los electrodos de oro.

Posteriormente, se realizaron las mismas medidas de CV pero ahora con diferentes concentraciones de nanopartículas magnéticas. Como aparece en la Figura 28 se observaron los mismos picos bien definidos esperados del electrodo de oro, sin embargo, se presentó una disminución significativa de la corriente de hasta casi 20 μA . Este comportamiento probablemente se puede atribuir al apantallamiento de la superficie del electrodo con los grupos carboxílicos cargados negativamente provenientes de la etapa de funcionalización, lo que provoca la repulsión de los aniones rédox de la superficie (Eissa et al., 2021). Los valores de disminución de corriente variaron de acuerdo con la concentración por mililitro de nanopartículas se especifican en la .

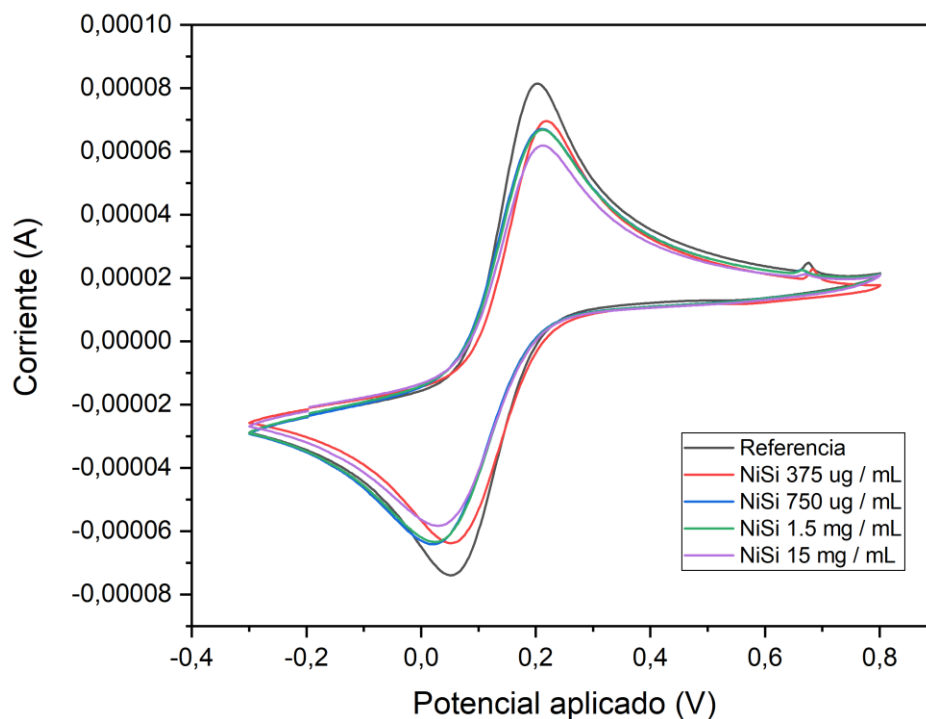


Figura 28. Curvas de CV del electrodo con $\text{NiFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2$ a diferentes concentraciones

La disminución en la señal de corriente con las nanopartículas no es un factor preocupante para el diseño del biosensor, ya que su función es mejorar el rendimiento del biosensor aumentando la especificidad del mismo al anclar en ellas el anticuerpo y fijarlas al electrodo de forma rápida con un imán sin periodos de incubación, además, en este punto se decidió modificar el electrodo de trabajo

con polímeros conductores, por lo que de cierta forma esta disminución se verá compensada. Los polímeros conductores ofrecen la posibilidad de optimizar aún más el sistema de diversas maneras; mejoran la conductividad eléctrica y la actividad electroquímica, además, los polímeros conductores son biocompatibles y también muy estables. Así, se evaluó la efectividad de tres polímeros bajo los mismos parámetros de CV que en las pruebas con nanopartícula magnética. Los polímeros evaluados fueron PEDOT, Nafion™ y PVSA.

Tabla 4. Respuesta electroquímica de la ferrita de níquel a diferentes concentraciones sobre electrodos de oro

Muestra	Electrodo desnudo	NiFe ₂ O ₄ @SiO ₂ 375 ug/mL	NiFe ₂ O ₄ @SiO ₂ 750 ug/mL	NiFe ₂ O ₄ @SiO ₂ 1.5 mg/mL	NiFe ₂ O ₄ @SiO ₂ 15 mg/mL
Máximo de corriente catódica (μA)	81.41	69.58	66.8	66.74	61.82
Máximo de corriente anódica (μA)	-73.94	-63.78	-64.14	-63.41	-58.29

Tal y como se esperaba, estos exhibieron una señal de corriente mayor que las pruebas con nanopartículas, aumentando la corriente hasta 15 μA por encima del electrodo desnudo (Figura 29), los valores específicos se describen en la Tabla 5. Después de los análisis se seleccionaron las mejores variables y decidió trabajar con el electrodo modificado con polímero conductor PEDOT al 20% v/v y nanopartículas en concentración de 375 μg/mL.

Tabla 5. Respuesta electroquímica de polímeros a diferentes concentraciones

Muestra	Electrodo desnudo	PEDOT			NAFION™			PVSA		
		20%	5%	1%	20%	5%	1%	5%	2.5%	1%
Máximo de corriente catódica (μA)	81.17	96.40	77.91	81.90	85.17	73.73	63.84	70.92	67.59	79.07
Máximo de corriente anódica (μA)	-73.88	-10.03	-73.73	-79.25	-83.74	-69.06	-61.40	-68.05	-62.86	-70.89

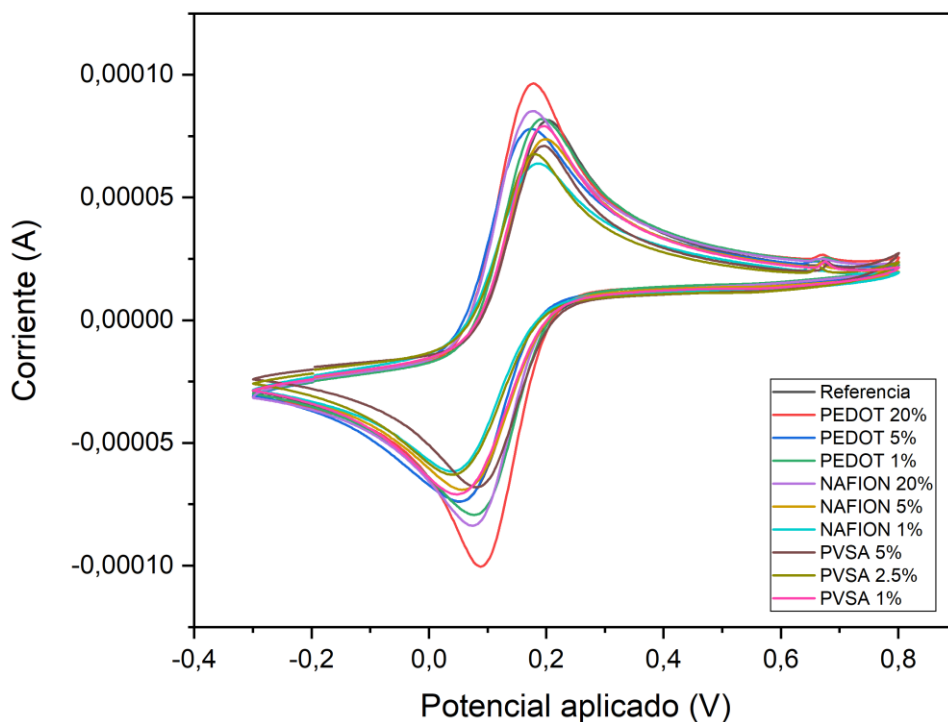


Figura 29. Curvas de CV del electrodo con varios polímeros a diferentes concentraciones

Finalmente, solo resta comprobar el anclaje del anticuerpo en la nanopartícula. Esto se llevó a cabo colocando 5 μL de solución de nanopartículas a la concentración adecuada con anticuerpos sobre un electrodo previamente modificado con polímero conductor.

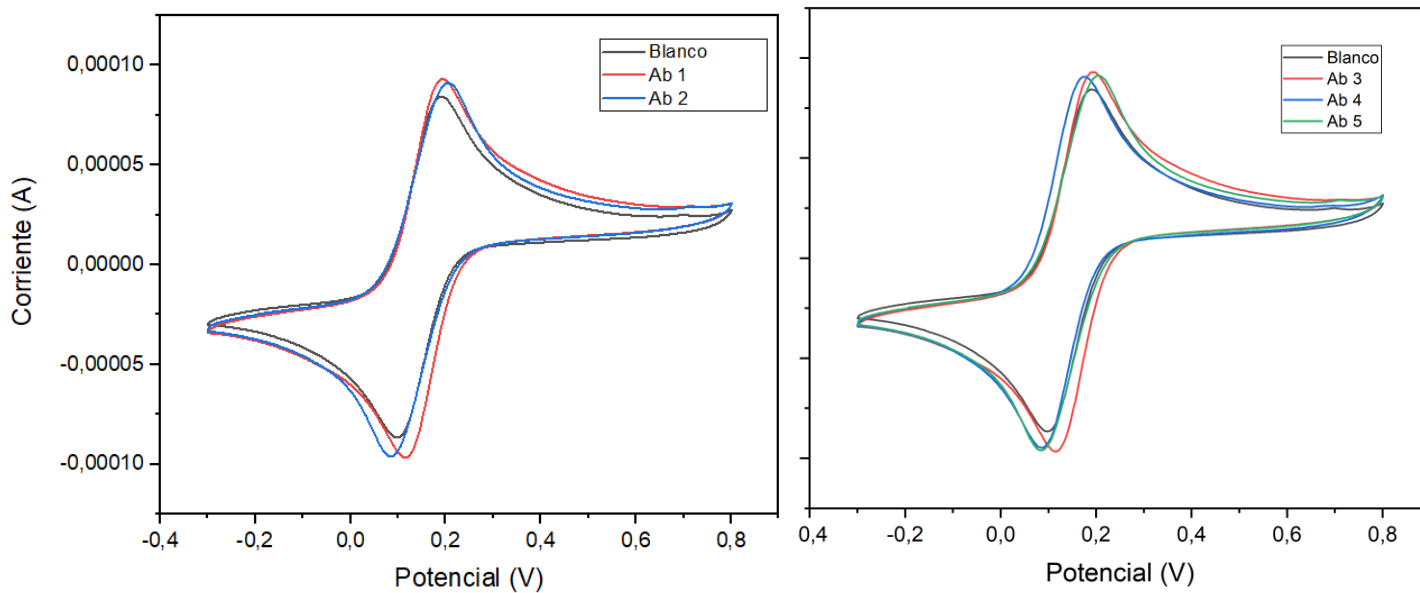


Figura 30. Curvas de CV del electrodo y nanopartículas sin anticuerpo (Blanco) y con anticuerpos (Ab 1 - Ab 5)

En la Figura 30 se presentan las curvas de CV de un electrodo modificado con polímero PEDOT después de colocarle solamente nanopartículas magnéticas (Blanco) y curvas del mismo electrodo después de colocarle nanopartículas con anticuerpo (Ab 1 y Ab 2). En este electrodo específico se realizó la prueba dos veces, lavando el electrodo con buffer PBS entre cada prueba. En ambas se observó un aumento de la corriente tras la fijación del anticuerpo en el electrodo de trabajo, lo que comprueba el éxito del anclaje y lectura del anticuerpo. La ligera disminución de corriente observada entre Ab 1 y Ab 2 se puede atribuir a la pérdida de polímero conductor entre los lavados. Este este experimento se llevó a cabo varias veces en diferentes electrodos (Ab 3 – Ab 5), en los que todos los resultados fueron similares, lo que permitió seguir adelante con la siguiente etapa; detección real de la proteína.

3.6.1 Detección de la proteína S

Como se mencionó en la sección de metodología, para los ensayos con proteína S se exploraron diferentes disoluciones de proteína. Inicialmente, se realizó el análisis usando solo dos diluciones de proteína, siendo la más concentrada la muestra B en la figura 31, cada una se colocó en el electrodo de trabajo y se sometió a un análisis por voltimetría de onda cuadrada (SWV), una técnica más sensible ya que elimina la corriente capacitiva, usando como solución rédox buffer PBS, pH 7.4.

Como muestra control o “blanco” se utilizó una solución de nanopartículas con anticuerpos anclados en ellas dispersas en solución buffer PBS. Cuando la proteína S no está presente en la muestra se detecta una pequeña señal electroquímica mientras que cuando se encuentra presente se observa una señal más fuerte, esto es indicativo de que los anticuerpos anclados a la superficie de las nanopartículas lograron unirse a la proteína S y su interacción consigue ser detectada por el sistema propuesto. Si bien, se pudo observar un aumento considerable de la corriente cuando se compara la señal control contra las señales de diluciones de proteína, para lograr un rendimiento óptimo del sensor fue necesario optimizar algunos parámetros que mejoraran la señal, tales como la frecuencia, el rango de barrido y el tiempo de paso utilizado. Además, se añadió una dilución más de la proteína S con la intención de probar si el sensor exhibe un comportamiento dependiente de la concentración del analito.

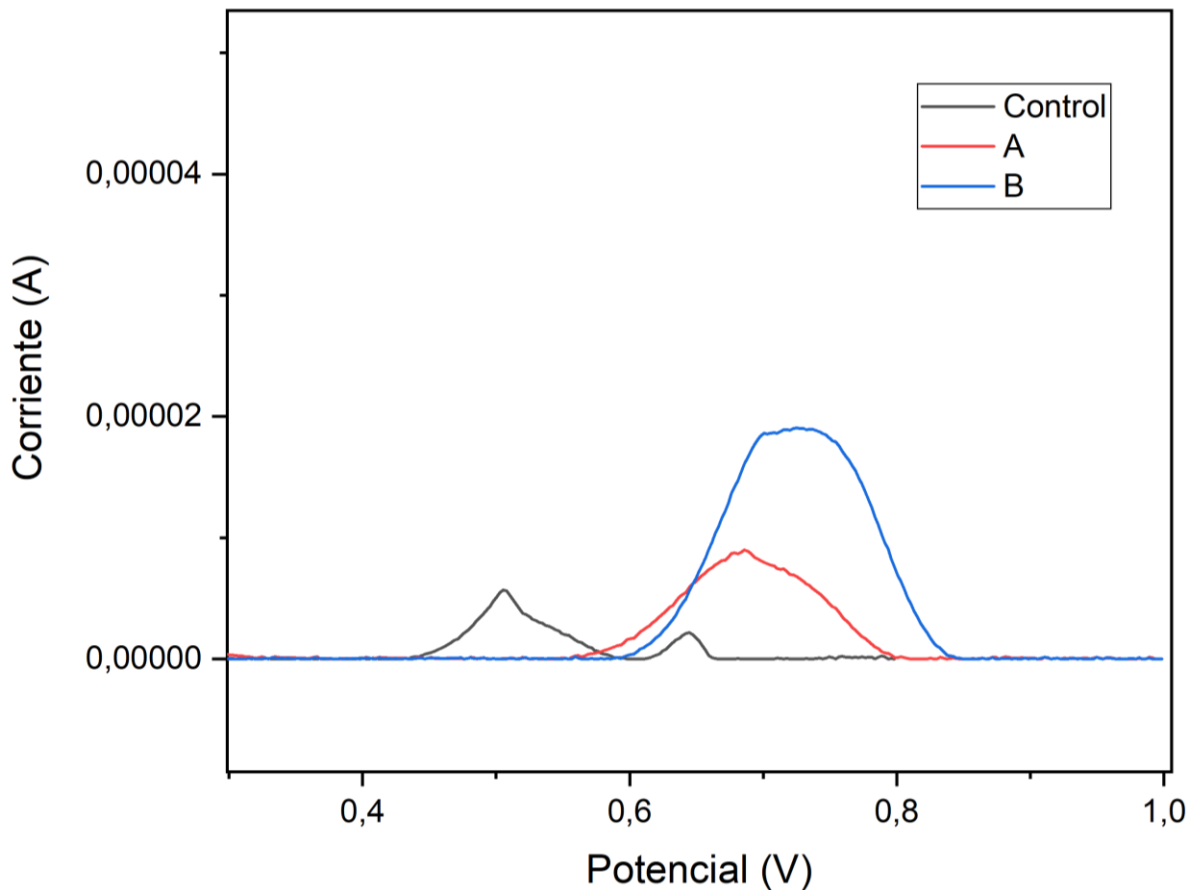


Figura 31. Primer análisis de muestras con proteína S y muestra control por SWV

Para las curvas de SWV de la Figura 32, las concentraciones de proteína por mililitro de buffer PBS trabajadas fueron de 0.005 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 0.05 $\mu\text{L}/\text{mL}$ y 0.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (A, B y C, respectivamente) y el control se refirió a nanopartículas con anticuerpos anclados, en solución buffer. El primer aspecto resaltable es la reducción de ruido en las señales y la mejora de los picos debido a la optimización de parámetros que se realizó. Respecto a la detección, nuevamente se observa que a medida que aumenta la concentración de proteína S dentro de la muestra, la corriente de pico SWV se incrementa gradualmente, lo que indica que la respuesta de la señal de análisis es altamente dependiente de la concentración de la proteína S tal y como se supuso en el primer análisis.

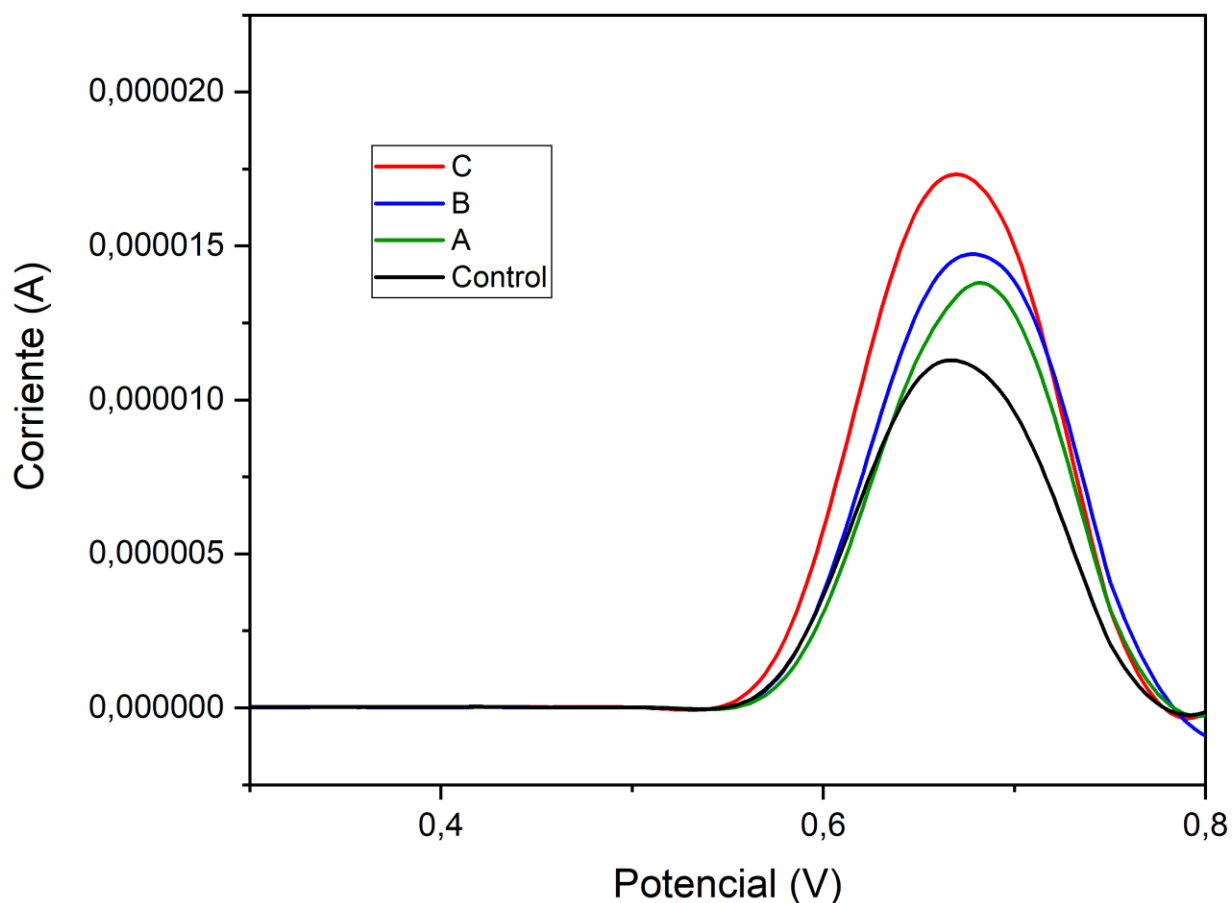


Figura 32. Segundo análisis de SWV con proteína S a 0.005 (A), 0.05 (B) y 0.5(C) $\mu\text{L/mL}$

Los parámetros optimizados de medición por SWV fueron; barrido de -0.7 a 0.5 V, con una frecuencia 25 Hz, tiempo de intervalo 0.04 s, potencial de paso 0.0025 mV, velocidad de barrido 125 mV/s y amplitud de 25 mV. Se realizaron correcciones de la línea de base para todas las curvas de SWV utilizando el software Nova 2.1. La detección electroquímica una vez más se determinó basándose en el cambio de la corriente del pico de reducción de las señales SWV.

Con estos parámetros optimizados, se presenta un tercer análisis ahora con seis diluciones de proteína S (Figura 33). Esto no solo para comprobar la reproducibilidad del sistema sino también para determinar la sensibilidad del sistema cuando se utiliza en la detección de proteína en bajas concentraciones.

Se estudiaron las siguientes concentraciones de microlitros de proteína por mililitro de solución buffer; 0.05, 0.005, 0.0005, 0.00005, 0.000005 y 0.0000005 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Como muestra control se utilizó simplemente una solución de nanopartículas con anticuerpo Anti-S en buffer PBS tal y como se realizó en los análisis anteriores.

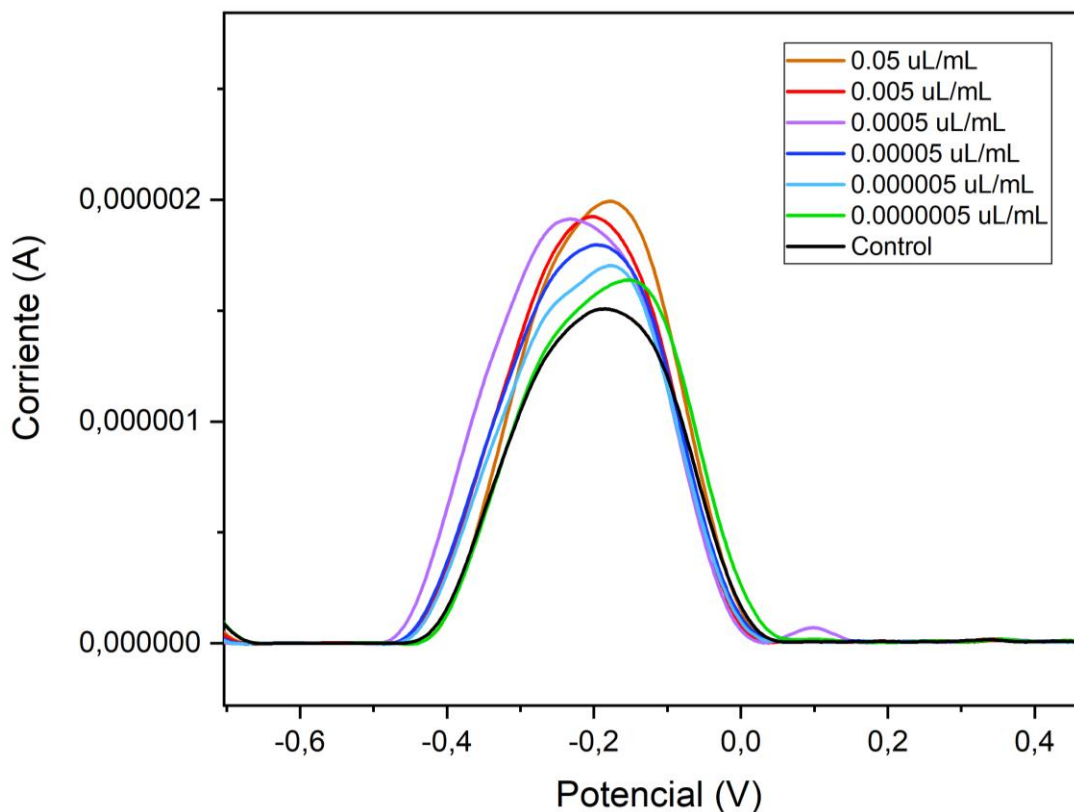


Figura 33. Análisis de SWV con proteína S a 0.05, 0.005, 0.0005, 0.00005, 0.000005 y 0.0000005 $\mu\text{L}/\text{mL}$ con parámetros optimizados

Nuevamente, se observó un aumento gradual de la corriente del pico de reducción tras la lectura del electrodo con una mayor concentración de la proteína, este comportamiento, que se mantiene coherente en cada análisis y que es la base de nuestro sensor, probablemente se deba a la carga superficial ofrecida por la proteína S como ya se había discutido antes.

La Figura 34 muestra el gráfico de calibración del biosensor electroquímico de la proteína S donde se muestra la respuesta electroquímica frente a la concentración de proteína S. La ecuación de la línea de tendencia y el coeficiente de correlación (R) se presentan a continuación:

Ecuación 5

$$y = 13.314x - 21.82$$

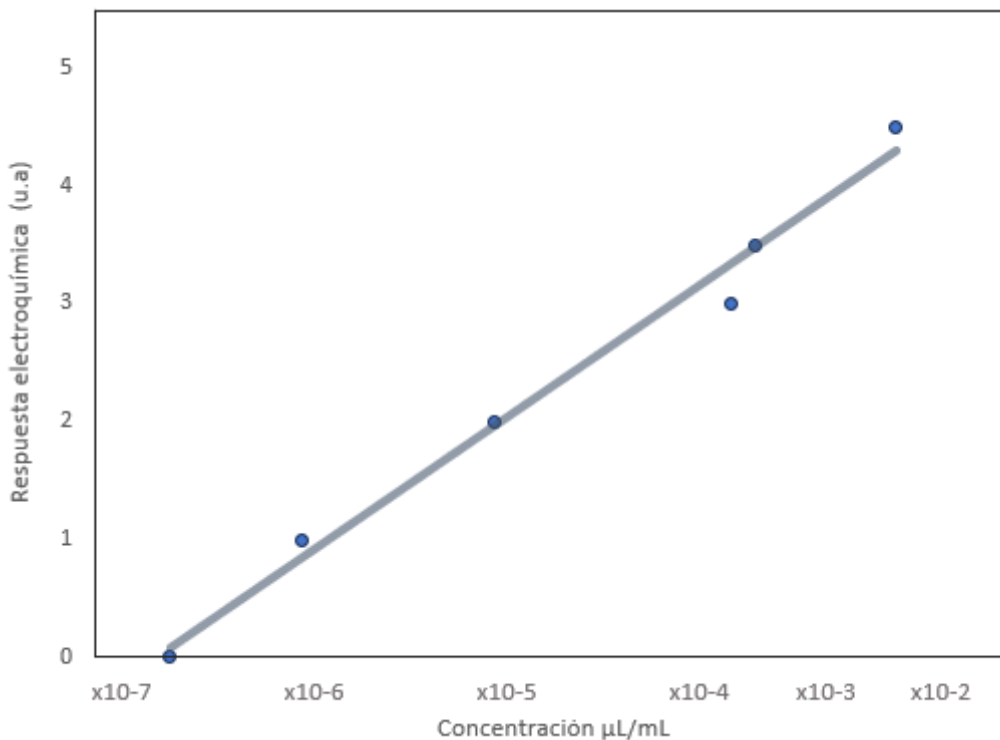


Figura 34. Curva de calibración de la concentración de proteína S

$$R^2 = 0.9665$$

A partir de dicha curva de calibración se determinó también el límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ) del sensor usando la siguiente ecuación:

Ecuación 6

$$C_L = k \frac{S_B}{p}$$

Donde S_B se refiere a la desviación estándar del blanco; p es la pendiente de la recta y k es un factor que se toma como 3 para el límite de detección y 10 para el límite de cuantificación. De forma que, sustituyendo, se obtienen los siguientes valores:

Ecuación 7

$$LOD = 3 \frac{0.00012}{13.314} = 0.000027 \mu L/mL$$

Ecuación 8

$$LOQ = 10 \frac{0.00012}{13.314} = 0.0000901 \mu L/mL$$

Los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) se definen como la concentración más baja del analito que se puede detectar y cuantificar de forma fiable, respectivamente, estos junto con el gráfico de calibración que muestra una buena relación lineal entre la corriente eléctrica y la concentración de la proteína S en la muestra, es un indicativo de que el sistema posee un buen nivel de sensibilidad para el uso práctico.

Capítulo 4. Conclusiones

Este trabajo se centró en la aplicación de nanopartículas magnéticas recubiertas con material biocompatible y el anclaje de anticuerpos monoclonales en ellas para el estudio de una posible vía de detección de proteínas que en un futuro pueda ser la proteína E7 del Virus del Papiloma Humano.

Se llevó a cabo la síntesis exitosa de nanopartículas de ferrita de níquel NiFe_2O_4 mediante el método hidrotermal para posteriormente realizar un recubrimiento con SiO_2 a través del método modificado de Stöber. Dichas nanopartículas fueron caracterizadas mediante SEM, TEM, XRD y VSM y se encontró que tuvieron un tamaño promedio de 72 nm con morfología irregular y tendencia a la aglomeración, el cual, si bien no impidió el recubrimiento de las nanopartículas (que se estimó en 2.92 nm), definitivamente es un factor de gran importancia que dificulta la obtención de nanopartículas de menor tamaño. El patrón de difracción de rayos X confirmó la estructura de tipo espinela inversa (FCC) de las nanopartículas y mediante un análisis con magnetómetro de muestra vibrante se confirmó su comportamiento superparamagnético.

Las nanopartículas resultantes del recubrimiento ($\text{NiFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2$) fueron funcionalizadas correctamente mediante una técnica de silanización con APTES y una etapa de reticulación con EDC/NHS, lo que permitió la conjugación con anticuerpos Anti-S del SARS CoV 2 y además nos indica que es una estrategia altamente viable y sencilla de preparar nanopartículas ancladas a anticuerpos sin perder su propiedad magnética y al mismo tiempo protegiendo a los anticuerpos del núcleo metálico.

El sistema electroquímico propuesto para llevar a cabo los estudios de detección de proteínas consistió en el uso de electrodos descartables modificados con polímeros conductores, los cuales hacen que mejore notablemente la señal de corriente eléctrica de ellos. De los tres polímeros probados en este trabajo, se encontró que el polímero PEDOT fue el que mejor elevaba la señal de los electrodos, sin alterar ni desestabilizar el comportamiento de las nanopartículas magnéticas durante las mediciones. Estos electrodos, además de ser sencillos de producir, relativamente económicos y

altamente reproducibles, nos permiten trabajar con cantidades muy pequeñas de muestras (hasta de 1 uL) de una forma simple.

La propiedad magnética de las nanopartículas optimiza los sensores electroquímicos ya que una vez que se tienen anclados los anticuerpos en ellas se puede proceder directamente a la medición por voltametría de onda cuadrada (SWV), sin necesidad de realizar periodos de incubación para fijarlas al electrodo de trabajo, en su lugar sencillamente se coloca un imán bajo este para mantenerlas en él. Además, las muestras de pacientes normalmente tienen que pasar por un proceso de purificación para eliminar la presencia de otros elementos biológicos que puedan apantallar la señal de reconocimiento del analito; las nanopartículas magnéticas hacen que este proceso sea mucho más rápido y fácil ya que de igual forma, se pueden separar usando un imán evitando el uso de centrifugas y otros equipos de laboratorios que elevan el costo y tiempo del análisis.

A partir de las curvas de SWV de las diferentes diluciones de proteína Whole Spike SARS CoV 2 podemos comprobar la viabilidad del sistema para la detección de proteínas basado en el aumento de corriente eléctrica en los electrodos de oro, mediante el cual se logró detectar hasta seis diluciones de proteína desde 0.0000005 $\mu\text{L}/\text{mL}$ hasta 0.05 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Si bien es necesario llevar a cabo más análisis que permitan optimizar el sistema y elevar la sensibilidad del sistema sensor, los resultados obtenidos en cada análisis exhiben comportamientos reproducibles, linealmente dependientes de la concentración de proteína S que nos indica que vamos por buen camino en el desarrollo de un biosensor funcional para la detección del Virus del Papiloma Humano.

Se espera que en trabajos futuros se pueda utilizar este sistema para sensor otros virus utilizando anticuerpos monoclonales.

Anexo

Fabricación de los electrodos de oro

La fabricación de los electrodos de oro se divide en tres etapas básicas; Primero se diseña el modelo con algún software de diseño como AutoCAD y se imprime con una máquina de corte sobre láminas de vinilo. Estas plantillas se colocan sobre una superficie base previamente limpiada con etanol y agua desionizada. Posteriormente se deposita una capa un metal conductor de un espesor de entre 100 y 200 nm mediante evaporación térmica. Finalmente, y luego de remover las plantillas, los electrodos obtenidos se separan y reservan para usarse en las medidas electroquímicas con potenciostato.



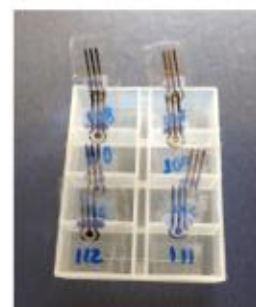
1

Preparación de plantillas
para los electrodos



2

Deposición de metal
conductor



3

Finalización y embalaje
de electrodos

REFERENCIAS

- Abdellahi, M., Tajally, M., & Mirzaee, O. (2021). The effect of the particle size on the heating and drug release potential of the magnetic nanoparticles in a novel point of view. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 530, 167938. <https://doi.org/10.1016/J.JMMM.2021.167938>
- Ali, A., Chiang, Y. W., & Santos, R. M. (2022). X-ray Diffraction Techniques for Mineral Characterization: A Review for Engineers of the Fundamentals, Applications, and Research Directions. *Minerals 2022, Vol. 12, Page 205, 12(2)*, 205. <https://doi.org/10.3390/MIN12020205>
- Behrens, S. (2011). Preparation of functional magnetic nanocomposites and hybrid materials: recent progress and future directions. *Nanoscale*, 3(3), 877–892. <https://doi.org/10.1039/C0NR00634C>
- Belman Rodriguez Carlos. (2019). *Síntesis y caracterización de nanopartículas de Au y materiales luminiscentes para aplicaciones biomédicas*. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada.
- Bengtson, A., Morgan, D., & Becker, U. (2013). Spin state of iron in Fe₃O₄ magnetite and h-Fe₃O₄. *Physical Review B - Condensed Matter and Materials Physics*, 87(15). <https://doi.org/10.1103/PHYSREVB.87.155141>
- Bodily, J. M., Mehta, K. P. M., Cruz, L., Meyers, C., & Laimins, L. A. (2011). The E7 Open Reading Frame Acts in cis and in trans To Mediate Differentiation-Dependent Activities in the Human Papillomavirus Type 16 Life Cycle. *Journal of Virology*, 85(17), 8852–8862. <https://doi.org/10.1128/jvi.00664-11>
- Bunekar, N., & Tsai, T. Y. (2022). Bio-based nanomaterials for properties and applications. *Bio-Based Nanomaterials: Synthesis Protocols, Mechanisms and Applications*, 67–72. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85148-0.00001-4>
- Chand Verma, K., Sharma, A., Goyal, N., & Kumar Kotnala, R. (2020). Ferromagnetism in Multiferroic BaTiO₃, Spinel MFe₂O₄ (M = Mn, Co, Ni, Zn) Ferrite and DMS ZnO Nanostructures. *Electromagnetic Materials and Devices*. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.82437>
- Chang, M. C., & Tanaka, J. (2002). FT-IR study for hydroxyapatite/collagen nanocomposite cross-linked by glutaraldehyde. *Biomaterials*, 23(24), 4811–4818. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(02\)00232-6](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00232-6)
- Chesson, H. W., Mayaud, P., & Aral, S. O. (2017). Sexually Transmitted Infections: Impact and Cost-Effectiveness

of Prevention. In *Disease Control Priorities, Third Edition (Volume 6): Major Infectious Diseases* (pp. 203–232). The World Bank. https://doi.org/10.1596/978-1-4648-0524-0_ch10

Choudhary, Y. S., Jothi, L., & Nageswaran, G. (2017). Electrochemical Characterization. *Spectroscopic Methods for Nanomaterials Characterization*, 2, 19–54. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-46140-5.00002-9>

Duarte, K., Justino, C. I. L., Freitas, A. C., Duarte, A. C., & Rocha-Santos, T. A. P. (2014). Direct-reading methods for analysis of volatile organic compounds and nanoparticles in workplace air. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 53, 21–32. <https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2013.08.008>

Eissa, S., Alhadrami, H. A., Al-Mozaini, M., Hassan, A. M., & Zourob, M. (2021). Voltammetric-based immunosensor for the detection of SARS-CoV-2 nucleocapsid antigen. *Mikrochimica Acta*, 188(6). <https://doi.org/10.1007/S00604-021-04867-1>

Enzimas aplicadas en procesos industriales. (n.d.). Retrieved June 17, 2021, from <http://www.revista.unam.mx/vol.15/num12/art96/>

Feng, B., Hong, R. Y., Wang, L. S., Guo, L., Li, H. Z., Ding, J., Zheng, Y., & Wei, D. G. (2008). Synthesis of Fe₃O₄/APTES/PEG diacid functionalized magnetic nanoparticles for MR imaging. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 328(1–3), 52–59. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFA.2008.06.024>

Foladori, G., & Invernizzi, N. (2006). *La nanotecnología: una solución en busca de problemas*. www.nanoandthepoor.org

Govindaraman, L. T., Arjunan, A., Baroutaji, A., Robinson, J., Ramadan, M., & Olabi, A. G. (2022). Nanomaterials Theory and Applications. *Encyclopedia of Smart Materials*, 302–314. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815732-9.00116-9>

Graham, S. V. (2010). Human papillomavirus: Gene expression, regulation and prospects for novel diagnostic methods and antiviral therapies. *Future Microbiology*, 5(10), 1493–1506. <https://doi.org/10.2217/fmb.10.107>

Graham, S. V. (2017). The human papillomavirus replication cycle, and its links to cancer progression: A comprehensive review. In *Clinical Science* (Vol. 131, Issue 17, pp. 2201–2221). Portland Press Ltd. <https://doi.org/10.1042/CS20160786>

- Guang-She, L., Li-Ping, L., Smith, R. L., & Inomata, H. (2001). Characterization of the dispersion process for NiFe₂O₄ nanocrystals in a silica matrix with infrared spectroscopy and electron paramagnetic resonance. *Journal of Molecular Structure*, *560*(1–3), 87–93. [https://doi.org/10.1016/S0022-2860\(00\)00772-9](https://doi.org/10.1016/S0022-2860(00)00772-9)
- Haun, J. B., Yoon, T. J., Lee, H., & Weissleder, R. (2010). Magnetic nanoparticle biosensors. *Wiley Interdisciplinary Reviews. Nanomedicine and Nanobiotechnology*, *2*(3), 291–304. <https://doi.org/10.1002/WNAN.84>
- Hoffmann, A., & Zhang, W. (2022). Antiferromagnets for spintronics. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, *553*, 169216. <https://doi.org/10.1016/J.JMMM.2022.169216>
- Human papillomavirus (HPV) and cervical cancer*. (2020, November 11). [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/human-papillomavirus-\(hpv\)-and-cervical-cancer](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/human-papillomavirus-(hpv)-and-cervical-cancer)
- Issa, B., Obaidat, I. M., Albiss, B. A., & Haik, Y. (2013). Magnetic Nanoparticles: Surface Effects and Properties Related to Biomedicine Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, *14*(11), 21266. <https://doi.org/10.3390/IJMS141121266>
- Itoh, H., & Sugimoto, T. (2003). Systematic control of size, shape, structure, and magnetic properties of uniform magnetite and maghemite particles. *Journal of Colloid and Interface Science*, *265*(2), 283–295. [https://doi.org/10.1016/S0021-9797\(03\)00511-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9797(03)00511-3)
- Jiles, D. (2015). *Introduction to Magnetism and Magnetic Materials* (3rd ed., Vol. 1). CRC Press. <https://www.routledge.com/Introduction-to-Magnetism-and-Magnetic-Materials/Jiles/p/book/9781482238877>
- Kobayashi, Y., Katakami, H., Mine, E., Nagao, D., Konno, M., & Liz-Marzán, L. M. (2005). Silica coating of silver nanoparticles using a modified Stöber method. *Journal of Colloid and Interface Science*, *283*(2), 392–396. <https://doi.org/10.1016/J.JCIS.2004.08.184>
- Kumar, P., Kumar, P., Khanduri, H., Pathak, S., Pathak, S., Singh, A., Singh, A., Singh, A., Basheed, G. A., Basheed, G. A., Pant, R. P., & Pant, R. P. (2020). Temperature selectivity for single phase hydrothermal synthesis of PEG-400 coated magnetite nanoparticles. *Dalton Transactions*, *49*(25), 8672–8683. <https://doi.org/10.1039/D0DT01318H>
- Lee, H., Shin, T. H., Cheon, J., & Weissleder, R. (2015). Recent Developments in Magnetic Diagnostic Systems. *Chemical Reviews*, *115*(19), 10690. <https://doi.org/10.1021/CR500698D>

- Leon, L., Chung, E. J., & Rinaldi, C. (2019). A brief history of nanotechnology and introduction to nanoparticles for biomedical applications. In *Nanoparticles for Biomedical Applications: Fundamental Concepts, Biological Interactions and Clinical Applications* (pp. 1–4). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816662-8.00001-1>
- Liu, H., Ge, J., Ma, E., & Yang, L. (2019). Advanced biomaterials for biosensor and theranostics. *Biomaterials in Translational Medicine: A Biomaterials Approach*, 213–255. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813477-1.00010-4>
- Liu, S., Yu, B., Wang, S., Shen, Y., & Cong, H. (2020). Preparation, surface functionalization and application of Fe₃O₄ magnetic nanoparticles. In *Advances in Colloid and Interface Science* (Vol. 281, p. 102165). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102165>
- Loenenbach, A., Pawlita, M., Waterboer, T., Harder, T., Poethko-Müller, C., Thamm, M., Lachmann, R., Deleré, Y., Wichmann, O., & Wiese-Posselt, M. (2022). Seroprevalence of mucosal and cutaneous human papillomavirus (HPV) types among children and adolescents in the general population in Germany. *BMC Infectious Diseases*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/S12879-022-07028-8>
- Magnetic Hysteresis*. (2020, October 21). [https://eng.libretexts.org/Bookshelves/Materials_Science/Supplemental_Modules_\(Materials_Science\)/Magnetic_Properties/Magnetic_Hysteresis](https://eng.libretexts.org/Bookshelves/Materials_Science/Supplemental_Modules_(Materials_Science)/Magnetic_Properties/Magnetic_Hysteresis)
- Maldonado-Camargo, L., Unni, M., & Rinaldi, C. (2017). Magnetic Characterization of Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1570, 47. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6840-4_4
- Merkle, R. C. (1992). The technical feasibility of cryonics. *Medical Hypotheses*, 39(1), 6–16. [https://doi.org/10.1016/0306-9877\(92\)90133-W](https://doi.org/10.1016/0306-9877(92)90133-W)
- Mohamad, N. R., Marzuki, N. H. C., Buang, N. A., Huyop, F., & Wahab, R. A. (2015). An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. In *Biotechnology and Biotechnological Equipment* (Vol. 29, Issue 2, pp. 205–220). Diagnosis Press Limited. <https://doi.org/10.1080/13102818.2015.1008192>
- Moody, C. A., & Laimins, L. A. (2010). Human papillomavirus oncoproteins: Pathways to transformation. In *Nature*

Reviews Cancer (Vol. 10, Issue 8, pp. 550–560). *Nat Rev Cancer*. <https://doi.org/10.1038/nrc2886>

Moskowitz, B. M., Jackson, M., & Chandler, V. (2015). Geophysical Properties of the Near-Surface Earth: Magnetic Properties. In *Treatise on Geophysics: Second Edition* (Vol. 11, pp. 139–174). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53802-4.00191-3>

Nadeem, K., Krenn, H., Sarwar, W., & Mumtaz, M. (2014). Comparison of surface effects in SiO₂ coated and uncoated nickel ferrite nanoparticles. *Applied Surface Science*, *288*, 677–681. <https://doi.org/10.1016/J.APSUSC.2013.10.097>

Ricci, A., Olejar, K. J., Parpinello, G. P., Kilmartin, P. A., & Versari, A. (2015). Application of Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy in the Characterization of Tannins. <Http://Dx.Doi.Org/10.1080/05704928.2014.1000461>, *50*(5), 407–442. <https://doi.org/10.1080/05704928.2014.1000461>

Rocha-Santos, T. A. P. (2014). Sensors and biosensors based on magnetic nanoparticles. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *62*, 28–36. <https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2014.06.016>

Roman, A., & Munger, K. (2013). The papillomavirus E7 proteins. *Virology*, *445*(1–2), 138–168. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.04.013>

Sajid, M. (2022). Nanomaterials: types, properties, recent advances, and toxicity concerns. *Current Opinion in Environmental Science & Health*, *25*, 100319. <https://doi.org/10.1016/J.COESH.2021.100319>

Santos López, G., Márquez Domínguez, L., Reyes Leyva, J., & Vallejo Ruiz, V. (2015). *Temas de actualidad Aspectos generales de la estructura, la clasificación y la replicación del virus del papiloma humano*. <http://viralzone.expasy.org/>.

Savliwala, S., Chiu-Lam, A., Unni, M., Rivera-Rodriguez, A., Fuller, E., Sen, K., Threadcraft, M., & Rinaldi, C. (2019). Magnetic nanoparticles. In *Nanoparticles for Biomedical Applications: Fundamental Concepts, Biological Interactions and Clinical Applications* (pp. 195–221). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816662-8.00013-8>

Shavanova, K., Bakakina, Y., Burkova, I., Shtepliuk, I., Viter, R., Ubelis, A., Beni, V., Starodub, N., Yakimova, R., & Khranovskyy, V. (2016). Application of 2D non-graphene materials and 2D oxide nanostructures for biosensing technology. *Sensors (Switzerland)*, *16*(2). <https://doi.org/10.3390/s16020223>

- Slimani, Y., Hannachi, E., Tombuloglu, H., Güner, S., Almessiere, M. A., Baykal, A., Aljafary, M. A., Al-Suhaimi, E. A., Nawaz, M., & Ercan, I. (2020). Magnetic nanoparticles based nanocontainers for biomedical application. *Smart Nanocontainers: Micro and Nano Technologies*, 229–250. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816770-0.00014-9>
- SOUFI, A., HAJJAOU, H., ELMOUBARKI, R., ABDENNOURI, M., QOURZAL, S., & BARKA, N. (2021). Spinel ferrites nanoparticles: Synthesis methods and application in heterogeneous Fenton oxidation of organic pollutants – A review. *Applied Surface Science Advances*, 6, 100145. <https://doi.org/10.1016/J.APSADV.2021.100145>
- Stöber, W., Fink, A., & Bohn, E. (1968). Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. *Journal of Colloid and Interface Science*, 26(1), 62–69. [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(68\)90272-5](https://doi.org/10.1016/0021-9797(68)90272-5)
- Taylor, M. P., Kobilier, O., & Enquist, L. W. (2012). Alphaherpesvirus axon-to-cell spread involves limited virion transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(42), 17046–17051. <https://doi.org/10.1073/pnas.1212926109>
- Tharayil, A., Rajakumari, R., Kumar, A., Choudhary, M. D., Palit, P., & Thomas, S. (2021). New insights into application of nanoparticles in the diagnosis and screening of novel coronavirus (SARS-CoV-2). *Emergent Materials*, 4(1), 101–117. <https://doi.org/10.1007/S42247-021-00182-W/FIGURES/8>
- Trottier, H., Mayrand, M. H., Coutlée, F., Monnier, P., Laporte, L., Niyibizi, J., Carceller, A. M., Fraser, W. D., Brassard, P., Lacroix, J., Francoeur, D., Bédard, M. J., Girard, I., & Audibert, F. (2016). Human papillomavirus (HPV) perinatal transmission and risk of HPV persistence among children: Design, methods and preliminary results of the HERITAGE study. *Papillomavirus Research*, 2, 145–152. <https://doi.org/10.1016/J.PVR.2016.07.001>
- Tsai, T. Y., Bunekar, N., & Liang, S. W. (2018). Effect of Multiorganomodified LiAl- or MgAl-Layered Double Hydroxide on the PMMA Nanocomposites. *Advances in Polymer Technology*, 37(1), 31–37. <https://doi.org/10.1002/ADV.21639>
- Vande Pol, S. B., & Klingelutz, A. J. (2013). Papillomavirus E6 oncoproteins. *Virology*, 445(1–2), 115–137. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.04.026>
- Vijayalakshmi, S., Anand, M., & Ranjitha, J. (2019). Microalgae-based biofuel production using low-cost nanobiocatalysts. In *Microalgae Cultivation for Biofuels Production* (pp. 251–263). Elsevier.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817536-1.00016-3>

Zhao, J., & Liu, X. (2022). Electron microscopic methods (TEM, SEM and energy dispersal spectroscopy). *Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822974-3.00013-6>