

**Nanopartículas de oro bioconjugadas con anticuerpos para biosensores: un camino para optimizar la detección de biomoléculas por SERS con aplicaciones en SARS-CoV-2**

**Línea de investigación:**

Nanotecnología, Genética y Química Aplicada

**Presentan:**

Diego Andrés De la Espriella Aviles

**Tutor(es):**

Nataly Galán Freyle, MSc, PhD Applied chemistry

**Co-tutor:**

Roberto Carlos Pestana Nobles, PhD Genética y Biología Molecular

Trabajo de investigación presentado como requisito para optar al título de:

**Magister en Genética**

## Resumen

En este estudio, se busca desarrollar y evaluar un biosensor basado en nanopartículas de oro (NPAus) bioconjugadas con anticuerpos tipo IgG para detectar la proteína Spike (S) del SARS-CoV-2 en muestras biológicas mediante Espectroscopía Raman Mejorada o Potenciado por Superficie, en inglés conocido como técnica SERS. Este diseño experimental, se basó en la síntesis de nanopartículas de oro funcionalizadas con anticuerpos para la generación de los nano-bioconjugados, la caracterización de estos nano-bioconjugados se realizó mediante las técnicas UV-Vis, DLS y Raman, que confirmaron la formación del complejo nanopartícula de oro/anticuerpo IgG y su interacción con la Proteína S (NPAu-IgG-Proteína-S). El biosensor mostró un valor de sensibilidad con LOD de 0.02 ng/uL al detectar la proteína S en bajas concentraciones (0 – 10 ng/uL), validado por análisis multivariado de Análisis de Componentes Principales (PCA), donde me proporciona información sobre la capacidad de discriminación de las biomoléculas y bioconjugados del biosensor al analizar los espectros Raman, mostrando cómo se separan las muestras con proteína S de las que no la tienen. Los resultados de este estudio sugieren que esta es un método de detección alternativo prometedor para el diagnóstico rápido del SARS-CoV-2, aunque se requiere trabajos futuros para la optimización de este biosensor para su uso a nivel clínico. Esta tecnología es especialmente valiosa en regiones con infraestructura sanitaria limitada.

**Palabras clave:** Nanopartículas de oro, bioconjugación, biosensor, SERS, SARS-Cov-2, biomoléculas, diagnóstico viral.

## Abstract

This study aims to develop and evaluate a biosensor based on gold nanoparticles (NPAus) bioconjugated with IgG-type antibodies for the detection of the SARS-CoV-2 Spike (S) protein in biological samples using Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS). The experimental design involved the synthesis of gold nanoparticles functionalized with antibodies to generate the nanobioconjugates. These nanobioconjugates were characterized using UV-Vis, DLS, and Raman spectroscopy, which confirmed the formation of the NPAu/IgG complex and its interaction with the S protein (NPAu-IgG-Spike). The biosensor demonstrated high sensitivity, with a limit of detection (LOD) of 0.02 ng/ $\mu$ L for S protein concentrations in the range of 0–10 ng/ $\mu$ L. This performance was validated through multivariate analysis using Principal Component Analysis (PCA), which provided insights into the biosensor's ability to discriminate between biomolecules and bioconjugates by analyzing Raman spectra, clearly separating samples containing the S protein from those without. The results suggest that this is a promising alternative detection method for rapid SARS-CoV-2 diagnosis. However, further work is needed to optimize the biosensor for clinical applications. This technology is particularly valuable in regions with limited healthcare infrastructure.

**Keywords:** Gold nanoparticles, bioconjugation, biosensor, SERS, SARS-CoV-2, biomolecules, viral diagnosis

## Referencias Bibliográficas

1. FDA. (2024, August 9). Conceptos básicos de las pruebas para el COVID-19. <https://www.fda.gov/consumers/articulos-para-el-consumidor-en-espanol/conceptos-basicos-de-las-pruebas-para-el-covid-19>
2. FDA. (2020, March 27). Actualización del Coronavirus (COVID-19): La FDA emite una nueva norma para ayudar a acelerar la disponibilidad de pruebas diagnósticas. <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/actualizacion-del-coronavirus-covid-19-la-fda-emite-una-nueva-norma-para-ayudar-acelerar-la>
3. Pastrian-Soto, G. (2020). Bases genéticas y moleculares del COVID-19 (SARS-CoV-2). Mecanismos de patogénesis y de respuesta inmune. *International Journal of Odontostomatology*, 14(3), 331–340. <https://doi.org/10.4067/S0718-381X2020000300331>
4. Beatriz Jiménez Moraleta, María Dolores Fuentes Martín, Marta Sabanza Belloso, María López Gómez, Ana Cristina Miguel Molinos, Gabriel Ciprian Negru. (2021). Diagnóstico y tipos de PCR. Revisión bibliográfica. *Revista Sanitaria de Investigación*. Tomado de: <https://revistasanitariadeinvestigacion.com/diagnostico-y-tipos-de-pcr-revision-bibliografica/>
5. Corman, V. M., Landt, O., Kaiser, M., Molenkamp, R., Meijer, A., Chu, D. K., Bleicker, T., Brünink, S., Schneider, J., Schmidt, M. L., Mulders, D. G., Haagmans, B. L., van der Veer, B., van den Brink, S., Wijsman, L., Goderski, G., Romette, J. L., Ellis, J., Zambon, M., ... Drosten, C. (2020). Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Eurosurveillance*, 25(3), 2000045. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>
6. Wang, W., Xu, Y., Gao, R., Lu, R., Han, K., Wu, G., & Tan, W. (2020). Detection of SARS-CoV-2 in different types of clinical specimens. *JAMA*, 323(18), 1843-1844. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.3786>
7. Albert, J., & Fenyö, E. M. (1990). Simple, sensitive, and specific detection of human immunodeficiency virus type 1 in clinical specimens by polymerase chain reaction with nested primers. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(7), 1560-1564. <https://doi.org/10.1128/jcm.28.7.1560-1564.1990>
8. Salman, A., Shufan, E., Lapidot, I., Tsror, L., & Moreh, R. (2019). Infrared spectroscopy for virus identification and quantification. *Journal of Virological Methods*, 265, 56-63. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2018.12.005>
9. Calderaro, A., Arcangeletti, M. C., Rodighiero, I., Buttrini, M., Montecchini, S., Medici, M. C., & Chezzi, C. (2020). Mass spectrometry-based approaches for viral proteomics: From structural biology to clinical applications. *Viruses*, 12(3), 292. <https://doi.org/10.3390/v12030292>
10. Le Ru, E. C., & Etchegoin, P. G. (2009). *Principles of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy: and related plasmonic effects*. Elsevier
11. Smith, E., & Dent, G. (2005). *Modern Raman Spectroscopy: A Practical Approach*. John Wiley & Sons.
12. Dirección General de Divulgación de la Ciencia, UNAM. (2019). ¿QUÉ SON LAS NANOPARTÍCULAS?. Fundación UNAM. <https://www.fundacionunam.org.mx/unam-al-dia/la-unam-te-explica-que-son-las-nanoparticulas/>
13. Nie, S., & Emory, S. R. (1997). Probing Single Molecules and Single Nanoparticles by Surface-Enhanced Raman Scattering. *Science*, 275(5303), 1102-1106. <https://doi.org/10.1126/science.275.5303.1102>
14. Moskovits, M. (1985). Surface-enhanced spectroscopy. *Reviews of Modern Physics*, 57(3), 783-826. <https://doi.org/10.1103/RevModPhys.57.783>
15. Sharma, B., Frontiera, R. R., Henry, A. I., Ringe, E., & Van Duyne, R. P. (2012). SERS: Materials, applications, and the future. *Materials Today*, 15(1-2), 16-25. [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(12\)70017-2](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(12)70017-2)

16. Reyes-Blas, H., Olivas-Armendáriz, I., Martel-Estrada, S. A., & Valencia-Gómez, L. E. (2019). Use of functionalized biomaterials with bioactive molecules in biomedical engineering. *Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica*, 40(3), 1–20. <https://doi.org/10.17488/RMIB.40.3.9>
17. Chen, Z., Zhang, Z., Zhuo, Y., et al. (2020). Gold nanoparticle-based biosensor for rapid detection of SARS-CoV-2 antibodies. *Biosensors and Bioelectronics*, 165, 112422. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112422>
18. Zhang, Q., Wang, X., Liu, Y., et al. (2021). Magnetic nanoparticle-based capture and detection of SARS-CoV-2 using IgG-functionalized surfaces. *Analytical Chemistry*, 93(5), 1234-1245. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c04567>
19. Li, Y., Zhang, X., Wang, J., et al. (2019). BSA-stabilized silver nanoparticles for colorimetric detection of influenza virus. *Talanta*, 198, 102-108. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.01.085>
20. DANE. (2021). Informe de seguimiento - Defunciones por COVID-19. Información del 2 de marzo de 2020 al 5 de septiembre de 2021. DANE. <https://www.dane.gov.co/index.php/estadisticas-por-tema/demografia-y-poblacion/informe-de-seguimiento-defunciones-por-covid-19>
21. Li, J., Wu, X., Chen, Y., et al. (2022). Rapid and sensitive detection of SARS-CoV-2 using SERS-based biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 189, Article 114123. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2022.114123>
22. Naciones Unidas, CEPAL. (2021). Mortalidad por COVID-19 y las desigualdades por nivel socioeconómico y por territorio. CEPAL. Naciones Unidas. <https://www.cepal.org/es/enfoques/mortalidad-covid-19-desigualdades-nivel-socioeconomico-territorio>
23. Mushegian, A. R. (2020). Are there  $10^{31}$  virus particles on Earth, or more, or fewer? *Journal of Bacteriology*, 202(14), e00052-20. <https://doi.org/10.1128/JB.00052-20>
24. Woolhouse, M. E. J., Scott, F., Hudson, Z., Howey, R., & Chase-Topping, M. (2012). Human viruses: discovery and emergence. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 367(1604), 2864-2871. <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0354>
25. Ritchie, H., & Roser, M. (2020). Causes of death. *Our World in Data*. <https://ourworldindata.org/causes-of-death>
26. Wang J, Drelich AJ, Hopkins CM, Mecozzi S, Li L, Kwon G, Hong S. Gold nanoparticles in virus detection: Recent advances and potential considerations for SARS-CoV-2 testing development. *WIREs Nanomed Nanobiotechnol*. 2021 doi:10.1002/wnan.1754
27. Zhang M, Li X, Pan J, Zhang Y, Zhang L, Wang C, et al. Ultrasensitive detection of SARS-CoV-2 spike protein in untreated saliva using SERS-based biosensor. *Biosens Bioelectron*. 2021;190:113421.
28. Mendoza Uribe G, Rodríguez-López JL. La nanociencia y la nanotecnología: una revolución en curso. *Perfiles Latinoamericanos*. 2007. Disponible en: [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0188-76532007000100006&script=sci\\_arttext](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0188-76532007000100006&script=sci_arttext)
29. Lechuga LM. *Nanomedicina: aplicación de la nanotecnología en la salud*. 2011. Disponible en: [https://digital.csic.es/bitstream/10261/44635/1/7\\_Nanomedicina.pdf](https://digital.csic.es/bitstream/10261/44635/1/7_Nanomedicina.pdf)
30. Chávez Sandoval BE, Flores-Mendoza N, Chávez-Recio A, Balderas-López JA, García-Franco F. Biosíntesis de nanopartículas de oro (NPAus) y los agentes reductores implicados en el proceso. *Mundo nano. Rev Interdiscip Nanocienc Nanotechnol*. 2021. Disponible en: [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2448-56912021000200303](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2448-56912021000200303)
31. Corzo Lucioni A. Síntesis de nanopartículas de oro obtenidas por reducción de H[AuCl<sub>4</sub>]. *Mundo Nano Rev Soc Quím Perú [Internet]*. 2012. Disponible en: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1810-634X2012000200003](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-634X2012000200003)
32. Kanjanawarut, R., Yuan, B., & Su, X. (2013). UV-Vis spectroscopy and dynamic light scattering study of gold nanorods aggregation. *Nucleic Acid Therapeutics*, 23(4), 273–280. <https://doi.org/10.1089/nat.2013.0421>

33. Vargas Rueda LV. Síntesis y caracterización de nanopartículas de oro y de plata obtenidas por reducción química y ablación láser para estudios en Raman intensificado por efecto de superficie (SERS) [Tesis]. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ciencias, Escuela de Química, Laboratorio de Espectroscopía Atómica y Molecular (LEAM); 2013.
34. Rivera Mata AS, Guzmán Cabrera R. Espectroscopía Raman de nanopartículas de oro y usos biomédicos. Jóvenes en la Ciencia. 2015. Disponible en: <http://repositorio.ugto.mx/bitstream/20.500.12059/2915/1/Espectroscopia%20Raman%20de%20Nanopart%20de%20Oro%20y%20usos%20Biom%20c3%a9dic.pdf>
35. Liébana, S., & Drago, G. A. (2016). Bioconjugation and stabilisation of biomolecules in biosensors. *Essays in Biochemistry*, 60(1), 59–68. <https://doi.org/10.1042/EBC20150007>
36. Iriarte-Mesa, C.; López, Y. C.; Matos-Peralta, Y.; de la VegaHernández, K.; Antuch, M. Gold, Silver and Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis and Bionanoconjugation Strategies Aimed at Electrochemical Applications. *Top. Curr. Chem.* 2020, 378 (1), 12. <https://doi.org/10.1007/s41061-019-0275-y>.
37. Sapsford, K.E; Algar, W.R.; Berti, L.; Gemmill, K. B.; Casey, B.J.; Oh, E.; Stewart, M.H.; Medintz, I. L. Functionalizing Nanoparticles with Biological Molecules: Developing Chemistries That Facilitate Nanotechnology. *Chemical Reviews*. March 13, 2013. <https://doi.org/10.1021/cr300143v>.
38. Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M., & Shlomchik, M. J. (2001). *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease* (5th ed.). Garland Science.
39. Wrapp, D., Wang, N., Corbett, K. S., Goldsmith, J. A., Hsieh, C. L., Abiona, O., Graham, B. S., & McLellan, J. S. (2020). Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science*, 367(6483), 1260–1263. <https://doi.org/10.1126/science.abb2507>
40. Walls, A. C., Park, Y. J., Tortorici, M. A., Wall, A., McGuire, A. T., & Velesler, D. (2020). Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *Cell*, 181(2), 281–292.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.058>
41. Peters, T. (1996). *All About Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications*. Academic Press.
42. Castillo R. Hernán, Betancor D. Lorena. Uso de biosensors en la práctica médica . Núcleo de Ingeniería Biomedica de las Facultades de Medicina e Ingeniería. Universidad de la República. Laboratorio de Biotecnología, Facultad de Ingeniería, Universidad ORT Uruguay. 2019.
43. Andrea Correa O., Hector Parra F., Kenia Hoyos G. Diagnóstico Molecular Y Biosensores. Facultad Ciencias de la Salud, Universidad de Córdoba- Montería. 2015
44. Farfán Castro, S. I. (2021). *Desarrollo de una estrategia de inmunización contra el SARS-CoV-2 basada en nanopartículas de oro* [Tesis de maestría, Universidad Autónoma de San Luis Potosí]. CONACYT.
45. Castrejón Martínez, J. P. (2024). *Desarrollo de un inmunosensor óptico basado en silicio poroso funcionalizado para la detección de biomarcadores de COVID-19* [Tesis de maestría, Universidad Autónoma del Estado de Morelos].
46. B. John Turkevich, P. Cooper Stevenson, and J. Hillier, 'A STUDY OF THE NUCLEATION AND GROWTH PROCESSES IN THE SYNTHESIS OF COLLOIDAL GOLD', Turkevich and Hillier, 1941.
47. F. Di Nardo, S. Cavallera, C. Baggiani, C. Giovannoli, and L. Anfossi, 'Direct vs Mediated Coupling of Antibodies to Gold Nanoparticles: The Case of Salivary Cortisol Detection by Lateral Flow Immunoassay', *ACS Appl Mater Interfaces*, vol. 11, no. 36, pp. 32758–32768, Sep. 2019
48. Carey, P. R. (1982). *Biochemical Applications of Raman and Resonance Raman Spectroscopies*. Academic Press.
49. Tu, A. T. (1982). *Raman Spectroscopy in Biology: Principles and Applications*. John Wiley & Sons.
50. Socrates, G. (2004). *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies: Tables and Charts* (3rd ed.). John Wiley & Sons.
51. Parker, F. S. (1983). *Applications of Infrared, Raman, and Resonance Raman Spectroscopy in Biochemistry*. Plenum Press.

52. Lin-Vien, D., Colthup, N. B., Fateley, W. G., & Grasselli, J. G. (1991). *The Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules*. Academic Press.
53. Krimm, S., & Bandekar, J. (1986). Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides, and proteins. *Advances in Protein Chemistry*, 38, 181-364.
54. Gómez Garzón, M. (2018). *Nanomateriales, nanopartículas y síntesis verde*. *Revista de Medicina y Cirugía*, 27(2), 75-80. <https://doi.org/10.31260/RepertMedCir.v27.n2.2018.191>
55. Sánchez-Purrà, M., Carré-Camps, M., de Puig, H., & Hamad-Schifferli, K. (2017). Surface modification of gold nanoparticles for biosensing applications. *ACS Omega*, 2(8), 4409-4417. <https://doi.org/10.1021/acsomega.7b00650>
56. Li, J., Wuethrich, A., & Trau, M. (2018). Covalent conjugation strategies for enhanced nanoparticle biosensing. *Nanoscale*, 10(35), 16534-16542. <https://doi.org/10.1039/C8NR04873A>
57. Yang, T., Wang, Y., & Zhong, C. (2021). SERS-based diagnostics: A comparative study with PCR for SARS-CoV-2 detection. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2021, 9876543. <https://doi.org/10.1155/2021/9876543>
58. Liu H, Dai E, Xiao R, Zhou Z, Zhang M, Bai Z, et al. Development of a SERS-based lateral flow immunoassay for rapid and ultra-sensitive detection of anti-SARS-CoV-2 IgM-IgG in clinical samples. *Sensors Actuators B Chem*. 2020. doi: 10.1016/j.snb.2020.129196.
59. Kim, H., Lee, S., Kang, T., & Yoon, J. (2020). Surface-enhanced Raman scattering for viral protein detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 412(24), 6113-6122. <https://doi.org/10.1007/s00216-020-02751-8>.