



UNIVERSIDAD
SAN SEBASTIAN

FACULTAD DE INGENIERÍA Y TECNOLOGÍA
SEDE CONCEPCIÓN

**DESARROLLO DE UN MATERIAL FUNCIONAL PARA LA
DETECCIÓN DE PB(II) EN AGUA, POR MEDIO DE UN SISTEMA CON
BASE EN LA INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA**

Tesis para optar al Grado de Magíster en Innovación en Biociencias y Bioingeniería

Profesor tutor: Dr. Víctor Díaz
Profesor co-tutor: Dra. Dariela Nuñez
Estudiante: **Rodrigo Cáceres Congreve**

© (Rodrigo Patricio Cáceres Congreve). Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra en cualquier forma, medio o procedimiento sin permiso por escrito del o los autores.

Concepción, Chile

2020

CALIFICACIÓN

En _____, el _____ de _____ de _____, los abajo firmantes dejan constancia que el (la) estudiante _____, de la carrera de _____ ha aprobado la tesis para optar al título de _____ con una nota de _____.

Profesor Evaluador

Profesor Evaluador

Profesor Evaluador

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a quienes me han acompañado a lo largo de este camino, los cuales me han instado y apoyado en nuevos proyectos mostrándome en todo momento su confianza en mis capacidades;

...mi familia y amigos.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi familia por su infinito e incondicional apoyo brindado en todos mis años de formación académica. Por todo su esfuerzo y trabajo duro que hicieron esto posible.

Agradezco a mis padres y por acompañarme, guiarme y cuidarme a lo largo de toda mi vida y por ser quienes me enseñaron a ser responsable, creativo y con ganas de explorarlo todo. Y a mi hermana por su apoyo, preocupación y cariño infinito.

A mis queridos abuelos por su preocupación, profundo amor, constante ánimo, enseñanzas y lecciones de vida que han hecho de mí una mejor persona.

A mi amada Catalina por escucharme, ayudarme, enseñarme y aguantar mis mañas. Por ser uno de los pilares fundamentales en mi vida y haciendo que todo sea mejor.

A mis compañeras y amigas, Camila y Ligia por su apoyo constante en esta etapa y en toda mi formación universitaria. Por siempre tomarse el tiempo para explicarme, aconsejarme y guiarme. Por los estudios, tareas, trabajos, risas y vivencias que hicieron este proceso mucho más grato.

A mis amigos por su preocupación, ánimo y apoyo desde que nos conocemos. Gracias por todas las vivencias, anécdotas y recuerdos.

A los profesores que aportaron no solo en mi formación académica, sino que a mi formación como persona. Por su apoyo, motivación y preocupación, además de siempre darse un tiempo para aconsejarme.

Al Centro de Investigación de polímeros Avanzados, CIPA, por su apoyo y ayuda en la realización de este trabajo.

A todos quienes de una u otra forma aportaron para que yo pudiera cumplir mis metas. Esta etapa no ha sido fácil, pero con la ayuda de todos ustedes la he podido afrontar exitosamente.

A todos ustedes ¡Muchísimas gracias!

TABLA DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE FIGURAS	vi
RESUMEN	viii
ABSTRACT	ix
CAPÍTULO 1	1
INTRODUCCIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	1
CAPÍTULO 2	7
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	7
2.1 Contaminación por plomo	7
2.2 Biosensores	8
2.3 Nanotecnología	10
2.4 Nanomateriales.....	11
2.5 Nanocelulosa.....	12
2.6 Nanopartículas	15
2.7 Quantum dots	16
2.8 Nanobiosensores.....	18
2.9 Funcionalización de nanoestructuras.....	19
2.10 Aptámero	20
CAPÍTULO 3	23
MATERIALES Y METODOLOGÍA.....	23
3.1 Desarrollo de nanobiosensor para Pb(II)	23
3.2 Síntesis de papeles de nanocelulosa bacteriana.....	30
3.3 Fabricación del papel activo que incorpora el nanobiosensor.....	33
CAPÍTULO 4	35
RESULTADOS.....	35
4.1 Desarrollo de nanobiosensor para Pb(II)	35
4.2 Síntesis de papeles de nanocelulosa bacteriana	49
4.3 Fabricación del papel activo.....	50

CAPÍTULO 5	54
DISCUSIÓN	54
5.1 Evaluación del reconocimiento de Pb(II) por el aptámero	54
5.2 Condiciones de unión del biosensor a la secuencia complementaria quencher	56
5.3 Determinación de plomo con el biosensor	59
5.4 Preparación de nanopapel de celulosa bacteriana	61
5.5 Unión del nanobiosensor a papel de nanocelulosa bacteriana	64
CAPÍTULO 6	67
CONCLUSIÓN	67
CAPÍTULO 7	68
BIBLIOGRAFÍA	68

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquematzación del funcionamiento y partes que conforman un biosensor...	9
Figura 2: Representación esquemática de las propiedades ópticas ajustables por tamaño de los QDs	16
Figura 3: Esquematzación del funcionamiento del nanobiosensor y aptámero	22
Figura 4: Determinación de Pb(II) utilizando nanobiosensor basado en nanopartículas de oro en proporción 1:20.....	36
Figura 5: Determinación de Pb(II) utilizando nanobiosensor basado en nanopartículas de oro en proporción 1:40.....	36
Figura 6: Determinación de Pb(II) utilizando nanobiosensor basado en nanopartículas de oro en proporción 1:20 sin NaCl.....	38
Figura 7: Determinación de Pb(II) utilizando nanobiosensor basado en nanopartículas de oro en proporción 1:40 sin NaCl	38
Figura 8: Determinación de Pb(II) AuNPs sin funcionalizar y agregando Pb(II) y NaCl.....	39
Figura 9: Intensidad de fluorescencia obtenida por el nanobiosensor compuesto por QDs de Cd/Te	41
Figura 10: Analisis por imagen de la Intensidad de fluorescencia del nanobiosensor compuesto por QDs de Cd/Te.....	42
Figura 11: Comparación en sensibilidad de imagenología y fluorimetría.....	43
Figura 12: Análisis mediante imagen en canal rojo del cambio en la intensidad de fluorescencia del nanobiosensor	44
Figura 13: Cambios en la intensidad de fluorescencia del nanobiosensor compuesto por QDs de Cd/Te funcionalizado con 2 nmol de aptámero	45
Figura 14: Cambios en la intensidad de fluorescencia del nanobiosensor compuesto por QDs de Cd/Te funcionalizado con 3 nmol de aptámero	46
Figura 15: Porcentaje de variación en la intensidad de fluorescencia con respecto del nanobiosensor en contacto con 0 ppb de Pb(II)	48
Figura 16: Fibras y papel de nanocelulosa bacteriana producidas mediante hidrólisis ácida	50

Figura 17: Papeles de nanocelulosa bacteriana expuestos a luz UV.....	51
Figura 18: Análisis de imagen para la estabilidad de QDs de Cd/Te impregnadas en papeles de nanocelulosa bacteriana.....	52
Figura 19: Comparación en el porcentaje de intensidad de fluorescencia con respecto al papel de nanocelulosa bacteriana funcionalizado con QDs (NCB+QDs)	53

RESUMEN

Este trabajo presenta el desarrollo de un nanobiosensor óptico (NBS), fácil de usar y con alta especificidad para Pb(II), para ello se trabajó con un material activo compuesto de nanofibras de celulosa bacteriana y un nanobiosensor para detectar ion plomo en agua. Los nanopapeles activos fueron fabricados mediante impregnación *in situ*. El nanobiosensor incorporado fue formulado a partir de quantum dots de cadmio-teluro (QDs), los que fueron funcionalizados con un aptámero específico que se une al Pb(II), el que a su vez, está unido a una secuencia parcialmente complementaria que contiene un apagador de fluorescencia. La presencia y cuantificación de Pb(II) fue seguido mediante cambios en la intensidad de fluorescencia del NBS, donde, en presencia de Pb(II), el apagador es desplazado de las cercanías del QDs, permitiendo la emisión de fluorescencia de manera directamente proporcional. Finalmente, este cambio es seguido mediante imagenología por análisis de fotografías adquiridas por smartphone. Las condiciones que generaron un correcto funcionamiento del NBS fueron utilizando 3nmol de aptámero funcionalizado con 1mg/ml de QDs (peak emission 590nm), una proporción aptámero quencher de 1:3, una concentración final de nanobiosensor de 30 µg/ml (con respecto a la concentración inicial de QDs) y un tratamiento previo al análisis por imagen de 70°C por 10 minutos. Por su parte, se observó que al funcionalizar papeles de nanocelulosa bacteriana con QDs de Cd/Te, las nanopartículas no perdieron su propiedad fotoluminiscente, donde, se obtuvo una mayor retención de los quantum dots en los papeles de nanocelulosa bacteriana, al suspender los nanopapeles en soluciones de etanol al 10%. Estos resultados permiten dar luces de una futura aplicación para la detección de metales pesados en matrices líquidas utilizando sistemas tecnológicos y portables de medición *in situ* de contaminantes.

Palabras clave: nanobiosensor, biopolímeros, contaminación hídrica

ABSTRACT

This work presents the development of an optical nanobiosensor (NBS), easy to use and with high specificity for Pb(II), for this we worked with an active material composed of bacterial cellulose nanofibers and a nanobiosensor to detect lead ion in water. Active nanopapers were manufactured by impregnation *in situ*. The incorporated nanobiosensor was formulated from cadmium-tellurium quantum dots (QDs), which were functionalized with a specific aptamer that binds to Pb(II), which in turn, is linked to a partially complementary sequence that contains a fluorescence quencher. The presence and quantification of Pb(II) was followed by changes in the fluorescence intensity of the NBS, where, in the presence of Pb(II), the quencher is displaced from the vicinity of the QDs, allowing the emission of fluorescence in a directly proportional way. Finally, this change is followed by imaging analysis of photographs acquired by smartphone. The conditions that generated a correct functioning of the NBS were using 3nmol of functionalized aptamer with 1 mg/ml of QDs (peak emission 590nm), a quencher aptamer ratio of 1:3, a final concentration of nanobiosensor of 30 µg/ml (with respect to the initial concentration of QDs) and a pre-imaging treatment of 70 °C for 10 minutes. On the other hand, it was observed that when functionalizing bacterial nanocellulose papers with Cd/Te QDs, the nanoparticles did not lose their photoluminescent property, where a greater retention of quantum dots was obtained in the bacterial nanocellulose papers, by suspending the nano papers in 10% ethanol solutions. These results provide insight into a future application for the detection of heavy metals in liquid matrices using technological and portable systems for *in situ* measurement of contaminants.

Keywords: nanobiosensor, biopolymers, water pollution.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Los metales pesados son contaminantes que generan un gran impacto en el medio ambiente dado que no son degradables y, por lo tanto, persisten bioacumulándose en los organismos. Estos contaminantes se liberan a la superficie del suelo y al agua como resultado de diversas actividades humanas como la quema de combustibles fósiles, la minería y la agricultura entre otras (Saleh *et al.*, 2013). La acumulación de estos elementos en el cuerpo de animales y humanos puede causar daños severos a los tejidos blandos, al tracto intestinal, esqueleto, sistema nervioso central, hígado, riñones y sistemas reproductivos (Vázquez & Carrillo, 2014), pudiendo tener efectos cancerígenos (Sharma *et al.*, 2014).

En relación con los ecosistemas acuáticos, los contaminantes que ingresan a las aguas costeras y estuarios crean serios problemas que causan grandes daños a la vida y las actividades de los organismos acuáticos e incluso generan una mortalidad masiva. La contaminación por metales pesados puede tener efectos devastadores sobre el equilibrio ecológico del entorno y en una gran diversidad de organismos acuáticos (Farombi *et al.*, 2007; Vosyliene & Jankaite, 2006).

Los contaminantes metálicos en los sistemas acuáticos generalmente permanecen en forma soluble o en suspensión y finalmente tienden a depositarse en el fondo o son absorbidos por los organismos. La acumulación progresiva e irreversible de estos metales en varios órganos de las criaturas marinas conduce a enfermedades relacionadas con los metales a largo plazo debido a su toxicidad, poniendo en peligro la biota acuática y otros organismos (Baby *et al.*, 2010).

Los peces, son uno de los principales organismos acuáticos de la cadena alimentaria y pueden acumular grandes cantidades de ciertos metales. El aumento de la concentración a lo largo de la cadena alimentaria provoca un mayor tiempo de retención de sustancias tóxicas que el de otros componentes alimentarios normales. En cantidades muy pequeñas, muchos de estos metales son necesarios para sustentar la vida. Sin embargo, en cantidades mayores se vuelven tóxicos y pueden acumularse en los sistemas biológicos y convertirse en un peligro significativo para la salud (Osha, 2004).

En cuanto a los ecosistemas que encontramos en el suelo, numerosos contaminantes restringen el crecimiento de las plantas. Los factores de estrés abiótico, como la salinidad, la sequía, las temperaturas extremas, la toxicidad química y el estrés oxidativo del medio ambiente son las principales causas de la pérdida de cultivos en todo el mundo que plantean serias amenazas a los productos agrícolas. La toxicidad de los metales contaminantes afecta el rendimiento de los cultivos, la biomasa del suelo y la fertilidad. Los metales y productos químicos en concentraciones más altas dificultan la germinación, el crecimiento y la producción de las plantas asociados principalmente con los elementos fisiológicos, bioquímicos y genéticos del sistema vegetal (Sethy & Ghosh, 2013).

Reflejado en lo anterior es que el nivel de estos elementos es un indicador del grado de contaminación ambiental, por lo que la monitorización de iones metálicos tóxicos cobra relevancia en la protección ambiental, así como en la prevención y tratamiento de enfermedades.

Sin embargo, la detección altamente selectiva y sensible de pequeñas cantidades de metales pesados es todavía un campo de investigación desafiante. Esto se debe principalmente a la presencia de altas concentraciones de componentes interferentes de la matriz en la mayoría de las muestras biológicas y ambientales. Por lo tanto, la captura de iones objetivo a partir de una matriz compleja es un

paso clave en la detección de metales pesados (Farzin, Shamsipur, & Sheibani, 2017).

Uno de los iones de metales pesados más tóxicos es el Pb(II), el cual produce un efecto neurotóxico, afecta el desarrollo cerebral, genera pérdida de memoria, irritabilidad, anemia, retraso mental (especialmente en niños) y cáncer (Mazumdar *et al.*, 2011).

De acuerdo al estándar recomendado por la agencia de protección medioambiental de los estados unidos (EPA) y la organización mundial de la salud (WHO), los límites de concentración de Pb(II) en agua de consumo humano es de 15 y 10 ppb respectivamente (Sengani *et al.*, 2017). En Chile el límite máximo permitido de plomo en agua potable, estipulado en la NCh 409/1, es de 50 ppb (SISS, 2007).

En Chile el método oficial para la determinación de plomo, señalado en el Manual de Métodos de Ensayo para Agua Potable, de la superintendencia de servicios sanitarios (SISS), es por medio de espectrofotometría de absorción atómica con aspiración directa. En este ensayo utilizan una solución blanco término cero que debe ser preparada con agua para análisis grado reactivo exenta de Pb y en un medio 1% v/v HNO₃. Además, las muestras son sometidas a un pretratamiento que consiste en una digestión en plancha calefactora.

Los requerimientos para agua potable estipulan una concentración máxima permitida de plomo de 50 ppb. El método debe proporcionar al menos un límite de detección del método (LDM) de 30 ppb. Para la precisión de la medición, se debe contar con una mínima de 90%, vale decir, diferencias no superiores a 10%, como desviación estándar relativa en la implementación del método, para muestras con concentraciones cercanas al valor normado en NCh 409/1; y como diferencia entre duplicados durante el trabajo rutinario. Por otro lado, con la

exactitud, se exige una mínima de entre 90 – 110 %, como recuperación de estándar de concentración conocida cercana al valor normado en NCh 409/1.

El bajo nivel permisible y tolerable por humanos y animales ha promovido la investigación y el desarrollo de métodos más sensibles para la detección de plomo. Actualmente, los métodos utilizados para su detección son la cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa, los métodos espectroscópicos (absorción/emisión atómica, emisión óptica de plasma acoplado inductivamente), espectrometría de masas de plasma acoplado inductivamente y la electroquímica (Mays & Hussam, 2009; Chen *et al.*, 2018).

Aunque son fiables y sensibles, estos métodos generalmente miden solo el contenido total de plomo y requieren equipos especializados, necesitan pasos o reacciones de pretratamiento de muestras y tienen un tiempo de análisis relativamente largo. No están fácilmente disponibles en países en desarrollo ni son capaces de realizar detecciones de campo *in situ* (Kuang, 2013). Por lo tanto, es muy necesario desarrollar métodos simples, estables y accesibles para detectar trazas de plomo en el medio ambiente.

Los biosensores proporcionan una nueva clase de instrumentos portátiles de bajo costo que permiten llevar a cabo rápidamente mediciones analíticas sofisticadas en el lugar de medición. Los biosensores se están aprovechando de nuevos materiales para simplificar esta tecnología y mejorar el rendimiento general y las características principales, como la sensibilidad, especificidad y reproducibilidad.

De modo general, los sensores basados en nanopartículas no suelen ser específicos por lo que se requiere de un dispositivo que brinde dicha especificidad. En particular, el ADN puede actuar como una sonda de afinidad o elemento de reconocimiento molecular para diversas aplicaciones como biosensores (J. Liu, Cao, & Lu, 2009).

Los aptámeros son moléculas cortas de ADN monocatenario (ADNss) o ARN, que se seleccionaron in vitro mediante la evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial (SELEX). Debido a su alta afinidad y selectividad a los objetivos, los aptámeros se han utilizado ampliamente para diseñar biosensores (J. Liu *et al.*, 2009).

Los ácidos nucleicos funcionales son herramientas poderosas y ampliamente utilizadas para el diseño de sensores debido a sus propiedades de alto reconocimiento y especificidad. Se han seleccionado algunos aptámeros de ADN y ARN para iones metálicos y se han utilizado para detectar iones metálicos, principalmente Pb(II), Hg(II), Cd(II), Ag(I) y As(III) (Chen *et al.*, 2018). Estos iones pueden interactuar específicamente con bases de ADN para formar complejos fuertes y estables.

Con esta investigación se busca desarrollar, por medio de un biosensor que consta de quantum dots de cadmio-teluro funcionalizados con un aptámero específico para reconocer Pb(II), un material funcional para el reconocimiento de ion plomo. Este desarrollo tiene como proyección futura ser la base en el uso como un sistema tecnológico de detección de contaminantes en tiempo real, incorporándolo en recipientes de almacenamiento de agua, o bien en empaques de alimentos.

1.2 HIPOTESIS Y OBJETIVOS

1.2.1 Hipótesis

Al formular un material funcional, con base en una matriz biopolimérica de celulosa bacteriana unida a un nanobiosensor fluorescente, permite detectar Pb(II) en agua en concentraciones menores de 50 ppb.

1.2.2 Objetivo general

Desarrollar un material funcional, con capacidad de detectar concentraciones menores a 50 ppb de Pb(II) en agua, consistente en un nanobiosensor fluorescente unido a una matriz biopolimérica de celulosa bacteriana.

1.2.3 Objetivos específicos

- Sintetizar un nanobiosensor “turn-on” basado en quantum dots, un aptámero específico para detectar Pb(II) y secuencia complementaria unida a apagador de fluorescencia.
- Sintetizar una matriz biopolimérica de nanocelulosa bacteriana a partir de la fermentación de la cepa *K. oboediens*.
- Evaluar el material funcional, con base en una matriz biopolimérica de celulosa bacteriana unida a un nanobiosensor, en la detección de Pb(II) en agua.

CAPÍTULO 2

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Contaminación por plomo

El plomo es el elemento pesado tóxico más importante del medio ambiente. Debido a su naturaleza no biodegradable y uso continuo, su concentración se acumula en el medio ambiente con peligros crecientes. El plomo es un metal altamente venenoso que afecta a casi todos los órganos del cuerpo. De todos los órganos, el sistema nervioso es el objetivo más afectado en la toxicidad del plomo tanto en adultos como en niños (Wani, Ara, & Usmani, 2015).

El desarrollo de extractantes y biosensores fluorescentes para Pb(II) es de importancia para monitorear los niveles exigidos por la norma nacional y mundial. Para tales aplicaciones, es esencial lograr una alta selectividad para el Pb(II) contra otros iones metálicos comunes presentes en los sistemas biológicos, como Cu(II) y Zn(II) (Claudio, Godwin, & Magyar, 2002).

Aunque algunos métodos analíticos poderosos como la espectrometría de masas de plasma acoplado inductivamente y la espectrometría de absorción atómica se utilizan actualmente para monitorear niveles bajos de estos iones metálicos, tienen algunos inconvenientes, como un prolongado tiempo de análisis y un costo elevado. Por lo tanto, existe una gran demanda de un método simple y barato para monitorear estos iones metálicos (Beauchemin, 2002).

Dado que la fluorescencia es el método más eficiente para detectar concentraciones bajas de analitos, existen muchos esfuerzos dedicados al desarrollo de pequeños sensores químicos fluorescentes para Pb(II) (Zhang *et al.*, 2016; Marbella *et al.*, 2009; He *et al.*, 2006). Aunque se han reportado muchos

tipos diferentes de sensores químicos pequeños para Pb(II), la mayoría de ellos adolecen de limitaciones tales como baja solubilidad en agua, baja sensibilidad y baja selectividad (Chen *et al.*, 2011; Neupane *et al.*, 2013).

En general, la respuesta de encendido para detectar iones metálicos es altamente deseada en aplicaciones prácticas porque la respuesta de apagado puede experimentar interferencia por otros factores externos (Jiang *et al.*, 2007). Por lo tanto, la síntesis de nuevos biosensores fluorescentes que detectan selectiva y sensiblemente iones de metales pesados en aguas con una respuesta inmediata es muy desafiante y necesario.

2.2 Biosensores

Los biosensores son un sistema de detección que consta de un componente biológico combinado con un transductor para realizar la medición de una cantidad de analito. Un biosensor típico incluye un bioelemento como una enzima, un anticuerpo o un receptor celular, y un elemento sensor o un transductor. Estos dos elementos se combinan a través de varios métodos, como enlace covalente, atrapamiento de matriz, adsorción física y atrapamiento de membrana (Kougianos & Mohanty, 2006).

Un biorreceptor o elemento de reconocimiento biológico es un elemento biológico (enzima, sonda de ADN, anticuerpo, etc.) que es sensible para reconocer el analito (substrato de enzima, ADN complementario, antígeno, metales pesados, etc.). Es fundamental que un receptor sea específicamente sensible al analito diana para evitar la interferencia de otras fuentes de señal o sustancias de la matriz de la muestra. El elemento de reconocimiento biológico aporta esta alta especificidad dada sus características inherentes de unión a un elemento o diana específico (Liu *et al.*, 2019).

Los biosensores funcionan según el principio de transducción de señales. Estos componentes incluyen un elemento de bioreconocimiento, un transductor y un sistema que procese, amplifique y muestre la información (Figura 1).

El elemento de bioreconocimiento, esencialmente un biorreceptor, puede interactuar con un analito específico. El transductor mide esta interacción y emite una señal. La intensidad de la salida de la señal es proporcional a la concentración del analito. Luego, la señal es amplificada y procesada (Mortazavi, Kouzani, & Kaynak, 2011).

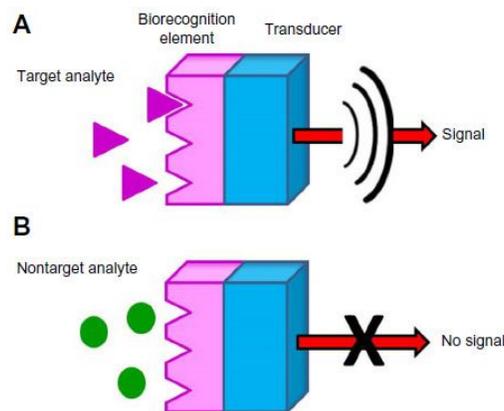


Fig. 1. Esquematización del funcionamiento y partes que conforman un biosensor. A) emisión de señal por parte del transductor luego del reconocimiento del analito por el elemento de reconocimiento. B) Situación en la que el analito no es el target del biorreceptor (Michalek *et al.*, 2015).

Los biosensores proporcionan una nueva clase de instrumentos portátiles de bajo costo que permiten llevar a cabo rápidamente mediciones analíticas sofisticadas en el lugar de medición. Para aplicaciones como sensores químicos, las propiedades de los polímeros convencionales han sido sistemáticamente estudiadas y manipuladas mediante la funcionalización con compuestos metálicos y otros elementos, resultando en una mejora significativa de óptica, propiedades térmicas y mecánicas debido a los efectos sinérgicos a través de interacciones físicas o químicas entre el polímero y el elemento con el que se funcionalizó (Kim *et al.*, 2014).

Hoy en día, los biosensores representan una tecnología emergente que ofrece ventajas como simplicidad, tiempo y rentabilidad, en una amplia variedad de aplicaciones. La tecnología de biodetección pretende revolucionar la forma en que medimos algunos parámetros relacionados con el diagnóstico, monitoreo ambiental, seguridad y otros usos industriales.

Los biosensores están aprovechando nuevos materiales para simplificar esta tecnología y mejorar el rendimiento general y las características principales, como la sensibilidad, especificidad y reproducibilidad.

El desarrollo de sistemas de biosensores ha abierto una nueva y prometedora forma de utilizar sistemas rápidos y sensibles y técnicas sencillas para la detección de contaminantes en el ámbito medioambiental. Los biosensores basados en nanotecnología (nanobiosensores) se caracterizan por su alta especificidad, otorgada por su elemento biológico de reconocimiento y sensibilidad, gracias a su pequeño tamaño y gran área superficial, lo que permite la detección de un amplio espectro de analitos en muestras complejas (Gutiérrez *et al.*, 2020).

2.3 Nanotecnología

El significado del término nanotecnología se refiere a cualquier tecnología que funcione en la nanoescala, comprendida generalmente entre 0,1 a 100 nm y que tiene aplicaciones en el mundo real, es decir, emplear solo átomos y moléculas para formar estructuras funcionales (Nasrollahzadeh *et al.*, 2019).

Muchas aplicaciones de la nanotecnología se basan en la fabricación de materiales diseñados deliberadamente para ser nanoestructurados, para los cuales el término "nanomaterial" se usa con frecuencia. El término "nanomaterial", suele tener muchas definiciones, pero en general se refiere a materiales con dimensiones externas o una estructura interna con escala

nanométrica, pero que muestra propiedades químicas y físicas únicas en comparación con las propiedades de materiales con la misma o similar composición química o molecular, pero de tamaño no nanométrico (Kreyling *et al.*, 2010).

2.4 Nanomateriales

Los métodos para la obtención de nanomateriales son de dos tipos: los llamados “top-down”, en el cual un material de partida adecuado se reduce de tamaño utilizando medios físicos o químicos y los “bottom-up”, en los que se construyen nanomateriales a partir de átomos o moléculas. El tipo de método y las condiciones experimentales determinan la forma y el tamaño de los nanomateriales a obtener (Govindrao *et al.*, 2019).

Los nanomateriales se pueden clasificar según su fuente, sus dimensiones y sus materiales constitutivos. Además, se suele agregar una clasificación de acuerdo a su nivel de toxicidad potencial (Pietrojusti & Magrini, 2014).

Según su origen o fuente, se puede clasificar en natural o antropogénico. Esta última clasificación se puede dividir en incidental o de ingeniería, dependiendo si su formación es intencional o no. Nanopartículas que tienen un origen natural e incidental se refieren generalmente a partículas ultrafinas, como por ejemplo cenizas de erupciones volcánicas, partículas de agua producto de olas de mar rompiendo, tormentas de arena, entre otras (Kumar, 2009).

Los nanomateriales se pueden encontrar igual como subproductos no intencionales de actividades humanas, como por ejemplo, motores de combustión interna, centrales eléctricas, incineradores, humos metálicos, etc. (Dolez, 2015).

Hoy en día los nanomateriales se fabrican utilizando una gran diversidad de compuestos químicos como, por ejemplo, metales semiconductores, óxidos metálicos, carbono, polímeros, entre otros. Estos nuevos nanomateriales antropogénicos incidentales están diseñados para presentar funciones específicas, pudiendo obtener así una gran variedad de formas (esferas, alambres, fibras, agujas, varillas, tubos, anillos, etc.), además de ser característicos por el control en sus dimensiones y su composición (Oberdörster *et al.*, 2005).

Una segunda categorización de los nanomateriales es basada en su dimensionalidad. Según su forma o de acuerdo con el número de dimensiones que tengan a escala de tamaño nanométrica los nanomateriales se subdividen y se nombran como:

- Una dimensión a escala nanométrica: nanocapas, nanopelículas, nanoplacas.
- Dos dimensiones a escala nanométrica: nanofibras, nanotubos, nanohilos.
- Tres dimensiones a escala nanométrica: nanocristales, fullerenos y nanopartículas.

2.5 Nanocelulosa

Dentro de los nanomateriales, los nanocelulósicos tienen muchas características interesantes tales como nano dimensión (mayor área de superficie en relación de volumen), no tóxico, biodegradabilidad, biocompatibilidad, etc. Teniendo en cuenta las propiedades interesantes de la nanocelulosa, se pueden encontrar aplicaciones en el campo biomédico, refuerzo en matriz de polímeros para fabricar nanocompuestos, energía, medio ambiente y más.

Por definición, la nanocelulosa y los nanomateriales en general deben tener dimensiones menores o iguales a 100 nm. Ejemplos típicos de nanocelulosas son

nanofibrillas de celulosa (CNF), nanocristales de celulosa (CNC) y nanocelulosa bacteriana (BNC) (Aitomäki & Oksman, 2014).

La nanocelulosa de origen vegetal se puede extraer mediante el uso de métodos mecánicos, químicos o enzimáticos. La estructura macro o micro de la celulosa consiste en una fase amorfa y también una cristalina. Es relativamente fácil romper la fase amorfa del biopolímero de celulosa por medios mecánicos, químicos o enzimáticos, mientras que, es bastante difícil romper la nanoestructura de la fase cristalina de la celulosa debido a la alta presencia de enlaces de hidrógeno (Kim *et al.*, 2015). Los tratamientos alcalinos despolimerizan la estructura nativa de celulosa, desfibrilando las microfibrillas de celulosa y exponiendo cristales de corta longitud.

La nanocelulosa obtenida mediante el uso de bacterias tiene una estructura química similar a la de la nanocelulosa extraída de la biomasa lignocelulósica por medio de métodos químicos y mecánicos. Además la red de nanofibras ultrafinas formadas por un medio de cultivo apropiado exhibe propiedades únicas como alta pureza, morfología uniforme, buena capacidad de absorción de agua, excelentes propiedades mecánicas y flexibilidad (Taokaew *et al.*, 2013).

La celulosa bacteriana (CB) exhibe una estructura de red fibrosa con una alta resistencia, obtenido a partir de las fibras, y de su baja densidad debido a la naturaleza porosa de la disposición de las mismas. La porosidad consiste en micro espacios nanoporosos que pueden alojar una variedad de partículas a partir de diferentes materiales, tales como polímeros naturales y sintéticos, formando un biomaterial (Czaja *et al.*, 2007).

La CB posee una alta cristalinidad, alta resistencia a la tracción, extrema insolubilidad en la mayoría de los disolventes, moldeabilidad, biodegradabilidad, biocompatibilidad, atoxicidad y alto grado de polimerización (George *et al.*, 2005). El espesor de fibrillas de celulosa es generalmente 0,1-10 nm, es decir, cien

veces más delgada que la de las fibrillas obtenidas de celulosa de plantas, brindando por consecuencia una mayor área superficial por unidad de masa.

Debido a estas características la CB ha sido estudiada para formar variados materiales compuestos con nanopartículas incorporadas en la red porosa. Recientemente la celulosa bacteriana se ha sintetizado e investigado para varias aplicaciones como material para la reparación de tejidos de la piel por la incorporación de colágeno de tipo I, nanopartículas de oro, antioxidantes, antibióticos, quitosano, etc. (Czaja *et al.*, 2007).

La integración de materiales nanoparticulados con nanocelulosa proporciona la funcionalidad de estos, utilizando una matriz o portador ecológico, de bajo costo, fuerte, estable en dimensiones, no fundible, no tóxico y no metálico, que por sí solo tiene aplicaciones versátiles en la industria, la biotecnología y la biomedicina (Bacakova *et al.*, 2020).

Para aplicaciones como sensores, las propiedades de la nanocelulosa bacteriana han sido sistemáticamente estudiadas y modificadas mediante la funcionalización con compuestos metálicos y otros elementos, resultando en una mejora significativa de sus propiedades y funciones (Kim *et al.*, 2014).

Las características sobresalientes de la nanocelulosa la hacen una excelente plataforma para aplicaciones en el área de biosensores. La nanocelulosa es un excelente sustrato de acogida para la inmovilización de materiales de diversos tipos como nanopartículas plasmónicas, quantum dots, nanopartículas metálicas, nanomateriales a base de carbono, nanomateriales conductores, y moléculas fluorescentes (Morales-narváez *et al.*, 2015).

2.6 Nanopartículas

Las nanopartículas se definen primero como naturales o sintéticas y luego son subclasificadas como orgánicas o inorgánicas. Algunos de los grupos más utilizados y estudiados se definen a continuación:

- Nanopartículas a base de carbono.

Este tipo de nanopartículas se componen principalmente de carbono, las que comúnmente toman la forma de esferas huecas, elipsoides o tubos. Los nanomateriales de carbono, esféricos y elipsoidales se denominan fullerenos, mientras que los cilíndricos se denominan nanotubos. Estas nanopartículas son usadas como películas y revestimientos mejorados, materiales más fuertes y ligeros, y aplicaciones en electrónica (Nasrollahzadeh *et al.*, 2019).

- Dendrímeros.

Los dendrímeros son una clase especial de polímeros que presentan estructuras definidas, hiper ramificadas que tienen múltiples grupos funcionales en la superficie, que aumenta su funcionalidad y los hacen versátiles y biocompatibles. Estas características han llevado a que las moléculas dendríticas ofrezcan un abanico de nuevas propiedades y aplicaciones que les confiere un importante y reconocido interés en muchas disciplinas (Sherje *et al.*, 2018).

- Nanopartículas metálicas

Dentro de esta subclasificación se incluyen los quantum dots (QDs), nanopartículas de oro, nanopartículas de plata y óxidos metálicos, como el dióxido de titanio. Estructuralmente, un QDs consiste en un núcleo semiconductor recubierto por una cubierta. Estos están compuestos por cientos o miles de átomos, y su tamaño es de entre 2 y 10 nm de diámetro. Al cambiar su tamaño, cambian sus propiedades ópticas (Reshma & Mohanan, 2019).

2.7 Quantum dots

Las nanopartículas semiconductoras fluorescentes o también llamadas, nanopartículas de puntos cuánticos o quantum dots (QDs), tienen la capacidad de absorber luz y emitir la energía excedente en fluorescencia.

Los espectros de absorción y emisión de los QDs dependen del tamaño y la composición de la nanopartícula debido a un efecto denominado confinamiento cuántico. Este efecto ocurre cuando el electrón que se encuentra en la banda de valencia del átomo es excitado con energía (luz UV). Al haber una distancia considerable entre la capa de valencia del átomo y la banda de conducción del cristal, el electrón es incapaz de alcanzar la banda de conducción del cristal volviendo a la banda de valencia del átomo, lo que a su vez genera la emisión de fluorescencia (Figura 2) (Reshma & Mohanan, 2019).

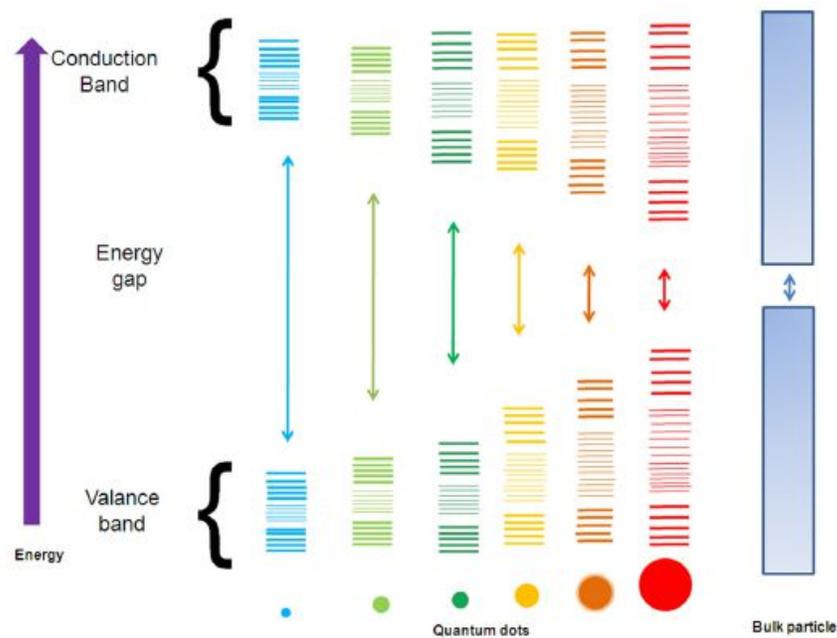


Fig. 2. Representación esquemática de las propiedades ópticas ajustables por tamaño de los QDs que ilustran el aumento de la longitud de onda de emisión con el aumento del tamaño de los QDs (Reshma & Mohanan, 2019).

De esta forma, el diámetro de los QDs, así como su composición, modifica la longitud de onda en la que emiten su fluorescencia al ser excitados. Comparados con fluoróforos orgánicos, los QDs poseen espectros de emisión estrechos, una

mayor estabilidad química y fotoquímica y alto rendimiento cuántico (Kang, 2016).

En los campos de generación de imágenes y detección, la fluorescencia es una herramienta esencial y eficiente, pero sus aplicaciones pueden verse limitadas por la disponibilidad de sondas fluorescentes adecuadas. Existen algunos problemas inherentes, como cambios de susceptibilidad a los productos químicos en diferentes condiciones y espectros de emisión establecidos, en los fluoróforos químicos de uso común. Recientemente, las propiedades ópticas y espectrales únicas de los QD los convierten en una alternativa convincente a los fluoróforos de uso habitual en una variedad de aplicaciones biomédicas, incluido el bioanálisis multivariante (Liu *et al.*, 2019).

Uno de los usos que se les ha dado a los QDs es dentro de nanobiosensores como transductor de señal. El uso de nanopartículas para la amplificación de señales se ha utilizado ampliamente en la construcción de biosensores debido a su gran superficie específica, propiedad catalítica y biocompatibilidad (Bhainsa & Souza, 2006). Estos nanomateriales tienen la ventaja para la amplificación de la señal dada su alta área específica, donde se puede cargar una mayor cantidad de biomoléculas, y de esta forma se mejora la sensibilidad y selectividad de los biosensores (Mohammadi, Yammouri, & Amine, 2019).

Como transductor de señal, los quantum dots son funcionalizados con biorreceptores unidos covalentemente a la superficie metálica. Se utilizan principalmente para la rápida detección de analitos, debido a que posee una alta sensibilidad (Kang, 2016).

Estos nanobiosensores pueden actuar de dos maneras (Huang *et al.*, 2012):

- i) Turn on, los cuales se encuentran en un estado de fluorescencia reprimido y que, al detectar el analito de interés, cambian de estado generando un aumento en la intensidad de fluorescencia.

- ii) Turn off, los cuales se encuentran en estado de fluorescencia activo y que, al detectar el analito de interés, la intensidad de fluorescencia del QDs comienza a disminuir. Este sistema en ocasiones puede incurrir en falsos positivos debido a factores o apagadores que provocan la extinción de la fluorescencia. Es debido a esto que actualmente los sensores turn on son mayormente utilizados.

2.8 Nanobiosensores

El desarrollo de nuevas e innovadoras tecnologías como los nanobiosensores ha dado pie a la elaboración de embalajes bioactivos que ganan cada vez más interés, no solo por ser amigable con el entorno sino también por su potencial para mejorar la calidad y la inocuidad de los alimentos durante su embalaje (Fuentes *et al.*, 2016).

El envasado inteligente de alimentos ha evolucionado para satisfacer las demandas de los clientes y la industria alimentaria, especialmente en técnicas de reconocimiento temprano de contaminantes, patógenos o bacterias de descomposición (Fuentes *et al.*, 2016).

Sumado a esto, los polímeros convencionales y en especial los basados en petróleo, cuestan más que los materiales naturales y su reciclaje es prácticamente nulo después de su uso. Por lo tanto, es beneficioso usar materiales poliméricos naturales como sensores químicos y biológicos (Kim & Yun, 2006).

Algunas de las deficiencias de los biopolímeros, como las propiedades mecánicas y de barrera débiles pueden ser significativamente potenciadas por el uso de nanomateriales como la nanocelulosa (NC). El uso de NC puede extender la vida útil de los alimentos y también puede mejorar la calidad de los alimentos ya que pueden servir como andamio para un biosensor. Los compuestos basados

en nanocelulosa tienen un gran potencial en la preparación de nanocompuestos económicos, livianos y muy fuertes para el envasado de alimentos (Brunswick *et al.*, 2014).

2.9 Funcionalización de nanoestructuras

Como una prometedora matriz en la síntesis de una gran variedad de nanoestructuras con propiedades y funcionalidades sobresalientes, la CB puede desempeñar el papel de agente reductor, agente directivo de la estructura y estabilizador (Yang *et al.*, 2012). Los ingredientes poliméricos o inorgánicos se pueden incorporar e interactuar cooperativamente con nanofibras de CB para lograr algunos productos funcionales.

Las dimensiones de nanoescala de la nanocelulosa presentan una alta área superficial, lo que asegura una gran cantidad de grupos hidroxilo en la superficie que podría ser utilizado para modificaciones químicas de la superficie o la unión con otros materiales o nanocompuestos (Lin & Dufresne, 2012). Las modificaciones químicas deben ser leves para preservar las otras propiedades útiles de la nanocelulosa

La incorporación de nanopartículas en la matriz de nanocelulosa genera un novedoso nanocompuesto que puede usarse como un potencial detector de trazas de contaminantes en solución acuosa. Los detectores basados en compuestos de nanocelulosa y nanopartículas tienen la característica de ser ligeros, flexibles y estables en solución acuosa ácida y alcalina (Wei *et al.*, 2015).

Los sensores basados en papel pueden ser ventajosos para aplicaciones en diagnóstico, monitoreo ambiental y seguridad alimentaria (Parolo & Merkoci, 2013). Además, los nanomateriales permiten el desarrollo de plataformas analíticas miniaturizadas, teniendo plataformas de detección simples, desechables y versátiles basadas en este material (Morales-narváez *et al.*, 2015).

Debido a la nanoestructura de CB, la distribución espacial de las nanopartículas depositadas dentro del nanopapel es completamente diferente en comparación con la disposición de nanopartículas en solución o incrustadas dentro de otros sustratos de papel convencionales como nitrocelulosa. Además, debido a la transparencia óptica de CB, el rendimiento de nanopartículas ópticamente activas incrustadas en CB es ventajoso en comparación con otro sustrato que se utiliza comúnmente en sensores basados en papel como la nitrocelulosa. De este modo, por su estructura, el papel de nanocelulosa opera como una membrana de preconcentración, permitiendo propiedades ópticas de las nanopartículas incrustadas y expuestas debido a su transparencia. (Morales-narváez *et al.*, 2015).

Este rendimiento de preconcentración permite medir el contenido de pequeños volúmenes de nanomateriales ópticamente activos como AuNP y QDs de manera ventajosa. Según lo reportado por Morales-narváez *et al.*, (2015) los espectros fotoluminiscentes de una gota de CB manchada con 4 μ L de QDs y los espectros de 4 μ L de una suspensión coloidal de QDs medidos en una placa de micropocillos negra mostró que usando CB como soporte, los QDs dieron una señal 1,6 veces mayor que la de la pequeña gota de QDs medida en un micropocillo. En consecuencia, el papel puede preconcentrar y homogenizar el contenido del pequeño volumen de la muestra moldeada por goteo.

2.10 Aptámero

De modo general, los sensores de detección basados en nanopartículas no suelen ser específicos por lo que se requiere de un dispositivo que brinde dicha especificidad. En particular, el ADN puede actuar como una sonda de afinidad o elemento de reconocimiento molecular para diversas aplicaciones como biosensores. Una molécula de ADN que funciona como tal se denomina "aptámero". Los aptámeros son oligonucleótidos sintéticos de cadena sencilla (ADN o ARN) que se pliegan en formas tridimensionales capaces de unirse de

forma no covalente y con alta afinidad a una molécula no nucleotídica. (Farzin *et al.*, 2017)

Los aptámeros se pueden unir a un amplio rango de objetivos, incluidas moléculas pequeñas, iones, proteínas, células, tejidos y organismos. Estas sondas de oligonucleótidos ofrecen varias ventajas sobre los ligandos tradicionales, como alta afinidad de unión, similar a la de los anticuerpos, que puede ser llevado a una alta sensibilidad, excelente selectividad, alta estabilidad y falta de inmunogenicidad y toxicidad (Jiang *et al.*, 2015).

Los aptámeros como biorreceptores en un biosensor, se han considerado como una alternativa a los anticuerpos para compensar la debilidad del anticuerpo (Toh *et al.*, 2014). La principal diferencia es que los anticuerpos generalmente se extraen y se purifican de animales, donde el problema de la variación del mismo anticuerpo de un animal a otro puede afectar la unión al analito (Tombelli, Minunni, & Mascini, 2005).

Se sabe que los aptámeros son menos costosos en su desarrollo, más estables en los amplios rangos de pH y temperaturas y presentan menos limitaciones en sus objetivos que los anticuerpos. Los aptámeros se seleccionan de una biblioteca aleatoria mediante la evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial (SELEX), pudiendo así formar aptámeros según un analito específico (Tuerk & Gold, 1990).

Además, la facilidad de síntesis y modificación los hace ideales para el reconocimiento de iones de metales pesados en muestras biológicas y ambientales. Diversos aptámeros de ADN han sido diseñados para el reconocimiento y la detección de iones de metales pesados. Estos iones pueden interactuar específicamente con bases de ADN para formar complejos fuertes y estables (Farzin *et al.*, 2017).

Específicamente para Pb(II), Chen *et al.*, (2018) reportaron un aptámero que cuenta con la capacidad de unión específica con este ion (Figura 3A). Para el desarrollo de un sensor, se funcionalizó el aptámero con un reactivo de derivatización fluorescente para etiquetar biomoléculas llamado 6-carboxil fluoresceína. Se generó, además una sonda parcialmente complementaria al aptámero, funcionalizada en su extremo 3' con Dabcil (4- [4- (dimetilamino) fenilazo] ácido benzoico, que hace la función de quencher o apagador. De esta manera, en ausencia del analito de interés la intensidad de fluorescencia se ve disminuida por efecto del apagador, y una vez reconocido el analito, la intensidad de fluorescencia aumenta (Turn on) debido al desplazamiento de la sonda complementaria quencher debido a la presencia de Pb(II) (Figura 3B).

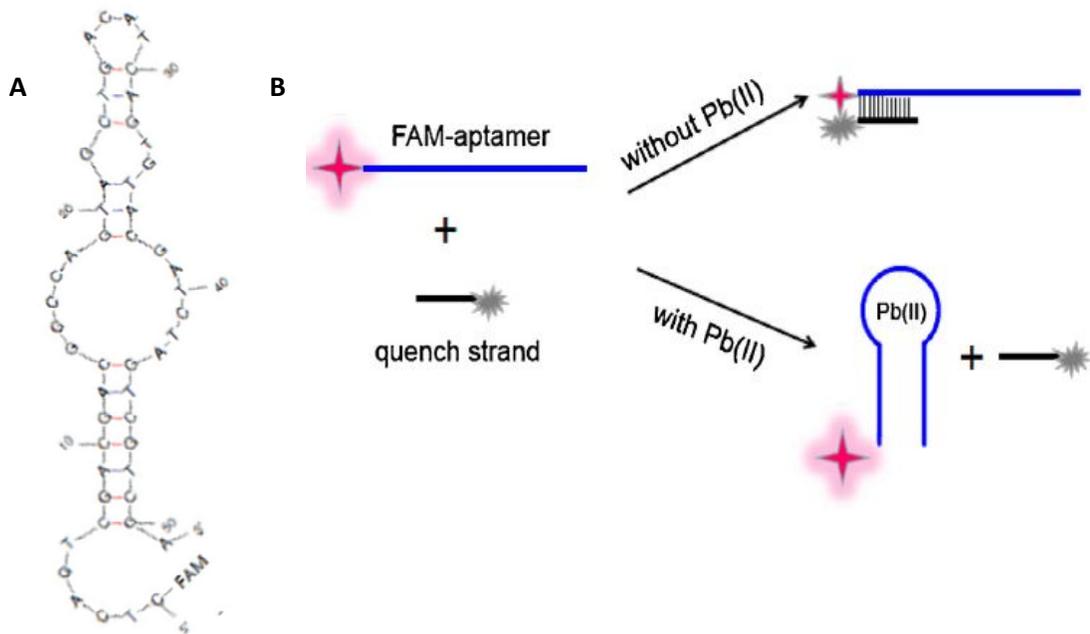


Fig. 3. A) Aptámero específico para Pb(II) reportado por Chen *et al.*, (2018), el cual se encuentra a unido al fluoróforo 6-carboxil fluoresceína. B) Esquematización del funcionamiento del nanobiosensor reportado por Chen *et al.*, (2018), en presencia de Pb(II).

CAPÍTULO 3

MATERIALES Y METODOLOGÍA

El presente capítulo se dividió en tres secciones: (i) Desarrollo del nanobiosensor específico para el reconocimiento de Pb(II). (ii) Síntesis de los papeles de nanocelulosa bacteriana, los cuales son usados como soporte del nanobiosensor y (iii) Fabricación del papel activo de nanocelulosa bacteriana, el cual incorpora el nanobiosensor específico para la detección cuantitativa de Pb(II) en agua.

3.1 DESARROLLO DE NANOBIOSENSOR PARA Pb(II)

3.1.1 EQUIPOS, REACTIVOS Y SOFTWARE

Equipos	Reactivos	Software
<ul style="list-style-type: none">- Balanza Analítica (SHIMADZU, AUX 120)- pH-metro (HANNAH, pH 211)- Refrigerador (Electrolux, ERDG195YSKW)- Centrifuga (HERMLE 7400K)- Termobloque (Select BioProducts)- Espectrofluorímetro (SYNERGY H1, BIOTEK)- Microcentrifuga (Hettich, mikro 200r)- Agitador orbital (Barnstead Max Qmini 4000)- Vortex shaker (Benchmark Benchmixer)- Espectrofotómetro para microplacas UV-Visible (Biotek Instruments, modelo Epoch. Software Gene5)- Transiluminador (VILBER LOURMAT, TFP-M/WL)- Smartphone (Huawei p20 lite)	<ul style="list-style-type: none">- Resina Sephadex G-25- Fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4)- Bifosfato de sodio (NaH_2PO_4)- Buffer (20 mM Tris-HAc, 10 mMNaAc, pH = 7.4)- Ditiotreitól- Solución de Pb (II)- Agua nanopura (18MΩ)- Agua nanopura libre de nucleasas- Oligonucleótido liofilizado específico para Pb (II)- NaCl- Citrato de sodio tribásico dihidratado ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \times 2\text{H}_2\text{O}$)- Cloruro de cadmio (CdCl_2)- Telurito de potasio (K_2TeO_3)- Borato ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10\text{H}_2\text{O}$)	<ul style="list-style-type: none">- Microsoft ® Word 2010- Microsoft ® Excel 2010- Mendeley ®- SigmaPlot ® 11.0- Gene5 ®- GraphPad Prism ® 9.0.0

3.1.2 METODOLOGÍA

3.1.2.1 Síntesis de nanopartículas

Se utilizaron nanopartículas de oro (AuNPs) y nanopartículas fluorescentes o quantum dots (QDs) de cadmio/teluro. Las nanopartículas de oro fueron utilizadas para comprobar la correcta funcionalización y la afinidad del aptámero comercial por el analito al cual fue diseñado.

Los quantum dots de cadmio/teluro fueron utilizados para confeccionar el nanobiosensor, siendo estos (QDs) los que emiten la señal medida.

- **Nanopartículas de oro:**

Las nanopartículas de oro fueron sintetizadas y proporcionadas por el laboratorio de nanotecnología de la Universidad San Sebastián ubicada en Lientur 1457, Concepción, Región del Bío Bío. Estas AuNPs fueron sintetizadas mediante el método de reducción por citrato (Taton 2002; Gutiérrez *et al.*, 2020) con materiales de grado analítico (Sigma - Aldrich), los cuales son: ácido cloroaúrico trihidratado ($\text{HAuCl}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$) y citrato de sodio tribásico dihidratado ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \times 2\text{H}_2\text{O}$).

- **Quantum Dots de Cadmio/Teluro:**

Los QDs de Cd/Te fueron sintetizadas mediante la metodología de Perez-Donoso *et al.*, (2012), con materiales de grado analítico (Sigma-Aldrich), los cuales fueron: Glutación (GSH), cloruro de cadmio (CdCl_2), telurito de potasio (K_2TeO_3), borato ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10\text{H}_2\text{O}$) y citrato ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \times 2\text{H}_2\text{O}$). Utilizando tampón bórax citrato 15mM a pH 9,4, se preparó la solución de síntesis, que contiene CdCl_2 (40 μM) K_2TeO_3 (10 μM) y 15 mM de glutación. La solución de síntesis fue calentada a 90 °C durante 6 horas para obtener QDs de un tamaño aproximado de 5 nm y un peak de absorción en 590 nm de longitud de onda. La reacción de síntesis fue detenida al guardar la solución de síntesis a 4 °C.

3.1.2.2 Funcionalización de los QDs con el aptámero

Para la funcionalización de las nanopartículas se utilizó el aptámero comercial reconstituido específico para plomo (5'-ACGACGACGGCCAGTAGCTGACATCAGTGTACGATCTAGTCGTCGTGACC/3ThioMC3-D/-3') (Chen *et al.*, 2018), comprado en IDT (Integrated DNA Technologies, USA). Se reconstituyó utilizando agua nanopura libre de nucleasas, y se dejó a una concentración de 100µM.

Luego de la reconstitución del aptámero, se realizó la reducción del grupo disulfuro a tiol mediante columna con resina Sephadex G-25.

i. Reducción del grupo disulfuro a tiol (Hill & Mirkin, 2006):

- Se preparó un volumen adecuado de solución de Ditioneitol 0,1 M en buffer de clivaje (Na_2HPO_4 y NaH_2PO_4 a pH 8,0).
- Se agregó en un tubo tipo eppendorf de 1.6 mL el aptámero tiolado, suministrado por IDT, a la forma de disulfuro.
- Se agregó un volumen adecuado de solución de Ditioneitol 0,1 M a la cantidad de aptámero, en una relación de 5 nmol de aptámero por 100 µL de buffer de clivaje.
- Se mezcló y dejó en reposo durante 2 a 3 horas en oscuridad a 22 °C.

ii. Purificación de los aptámeros mediante columna:

- Se eluyó la columna utilizada con resina Sephadex G-25 hasta que el menisco casi tocó la superficie de la resina y se cerró la llave de paso.
- Se descartó el volumen eluido.
- Se agregó la mezcla aptámero-DTT.
- Se eluyó hasta que la muestra ingresó a la columna y se cerró la llave de paso.

- Se agregó 1 mL de agua nanopura y libre de nucleasas.
- Se eluyó hasta que el menisco casi tocó la resina y se cerró la llave de paso.
- Se descartó el volumen eluido.
- Se agregó 26 mL de agua nanopura libre de nucleasas a la columna.
- Se eluyó dejando caer 500 μ L aproximadamente por micro-tubo.

iii. Funcionalización de las nanopartículas con el aptámero tiolado (Hill & Mirkin, 2006):

- Se mezcló el volumen seleccionado de aptámero purificado con DTT y la solución de QDs, según la proporción molar deseada, en un tubo tipo falcon de 15 mL lavado con alcohol y enjuagado con agua nanopura libre de nucleasas.
- Se mantuvo en oscuridad durante 2 días a temperatura ambiente.
- Se guardó en oscuridad a 4°C.

3.1.2.3 Evaluación del reconocimiento de Pb(II) por el aptámero

Para la detección de Pb(II), empleando el nanobiosensor confeccionado con nanopartículas de oro, se realizó el protocolo desarrollado y estandarizado en el laboratorio de nanotecnología de la Universidad San Sebastián (campus Tres Pascualas, Concepción). En este método se observa una propiedad óptica inherente de las nanopartículas de metales nobles, como oro y plata, que resulta de oscilaciones colectivas de las nubes de electrones y permite implementar la detección óptica en el rango visible siguiendo el cambio del espectro de absorción/emisión. Este ensayo entrega de manera rápida y precisa la afinidad y reconocimiento del analito por el aptámero (Gutiérrez *et al.*, 2020).

Se utilizó como control, ensayos en que no se agregó el revelador (NaCl), para confirmar que la agregación de las nanopartículas no es producida por el plomo. De esta manera se tiene claridad en cuanto a la correcta funcionalización de las nanopartículas, así como de la afinidad del aptámero por el analito.

Para detectar plomo utilizando el nanobiosensor se procedió como sigue:

- Se incubó a 60 °C durante 10 minutos 200 µL de la solución del nanobiosensor.
- Se dejó a temperatura ambiente por 5 minutos.
- Se agregó 100 µL de solución de Pb(II).
- Se incubó a 60 °C durante 10 minutos.
- Se dejó a temperatura ambiente por 5 minutos.
- Se agregó 60 µL de solución de NaCl 5 M.
- Se registraron los valores de absorbancia entre los 400 y 800 nm a los 30 minutos luego de haber agregado la solución de NaCl, utilizando como blanco agua nanopura.

Para la determinación del analito se observó el cambio en la relación de absorbancias de 620 y 520 nm.

3.1.2.4 Unión del biosensor a la secuencia complementaria quencher

Para lograr la disminución de la fluorescencia de los QDs se utilizó una secuencia complementaria que posee un quencher en el extremo 5'. Se realizó esta verificación del funcionamiento del quencher, para conocer qué relación molar de aptámero y secuencia complementaria quencher logra apagar las nanopartículas.

Se utilizó el Quencher 5' Iowa Black RQ (QBH) comercial de IDT, con la secuencia complementaria (5'-/5labRQ/GAGTCACGACGA- 3') a la secuencia del oligonucleótido tiolado específica para plomo.

Se reconstituyó la sonda QBH con agua nanopura libre de nucleasas, y se dejó a una concentración stock de 100 μM para trabajos posteriores.

Se realizó la dilución y el cálculo de concentraciones necesarias para la unión de la secuencia complementaria quencher. Se probaron distintas relaciones molares de aptámero y secuencia complementaria quencher (1:0, 1:1, 1:3 y 1:6).

3.1.2.5 Análisis de imagen

Imágenes fueron obtenidas mediante smartphone, utilizando software ImageJ. Los canales de color (Azul, Rojo y Verde) de la imagen fueron separados. Para estos análisis se trabajó con el canal rojo de imagen debido a que los quantum dots utilizados tienen una peak de fluorescencia de 590 nm (rojo anaranjado). Así, en este canal de color se generó menor interferencia y se logró identificar la variación de la intensidad de fluorescencia de manera más notoria.

Para el análisis, se seleccionó un área similar para cada ensayo y el software entregó el promedio de la medición de los píxeles. Utilizando este dato se observó la variación en la intensidad de fluorescencia con respecto a los distintos factores y condiciones probadas.

3.1.2.6 Determinación de plomo con el biosensor

Para analizar el cambio en la intensidad de fluorescencia del nanobiosensor a distintas condiciones de estudio, se utilizó análisis de imagen mediante el software ImageJ.

Se tomaron 155 μl del nanobiosensor compuesto por QDs de Cd/Te funcionalizados con 3 nmol de aptámero y se mezclaron con 155 μl de Pb(II) a 5

concentraciones distintas (10, 50, 100, 500 y 1000 ppb). La mezcla se dejó a 70 °C por 10 minutos. Todas las pruebas se realizaron por triplicado.

Luego de probar la condición de cada ensayo se colocaron los tubos en transiluminador de luz UV con campana de observación. Se tomó fotografía con smartphone Huawei p20 lite. La fotografía fue de 16 megapíxeles, ISO 3200.

3.1.2.7 Análisis estadístico

Se trabajó con el software GraphPad Prism 9.0.0. Los datos se presentan como promedio $\pm \sigma$. La significancia estadística se analizó con el test no-paramétrico de Kruskal-Wallis para múltiples comparaciones entre distintos grupos, con un post test de Dunn. Para el análisis de los datos, un valor de $p < 0,05$ se consideró significativo.

Para la determinación del límite de detección del método (LDM) y el límite de cuantificación (LDC) del sistema mediante análisis de imagen se tomó fotografía de 10 muestras blanco (agua destilada) en microplacas transparentes al UV en transiluminador de luz UV con campana de observación. Se tomó fotografía con smartphone Huawei p20 lite. La fotografía fue de 16 megapíxeles, ISO 3200.

La fotografía se analizó con el software ImageJ. Con el programa se separaron los canales de color (Azul, Verde y Rojo). Se trabajó con el canal rojo y se seleccionó un área similar para cada ensayo y el software entregó el promedio de la medición de los píxeles. Utilizando esta información se obtuvo la desviación estándar y con este dato el LDM y LDC.

3.2 SÍNTESIS DE PAPELES DE NANOCELULOSA BACTERIANA

3.2.1 MATERIAL BACTERIANO

Para la producción de celulosa bacteriana se utilizó la cepa *Komagataeibacter oboediens* aislada desde vinagre de manzana artesanal en el laboratorio de Biotecnología de la Universidad San Sebastián.

3.2.2 EQUIPOS, REACTIVOS Y SOFTWARE

Equipos	Reactivos	Software
<ul style="list-style-type: none">- Cámara de flujo laminar (ESCO)- Autoclave (Quimis, Q-190-26)- Balanza Analítica (SHIMADZU, AUX 120)- pH-metro (HANNAH, pH 211)- Agitador magnético (Glassco)- Microondas (LG Electronics, MH-3046SP)- Estufa (Quimis, Q-316M4)- Refrigerador (Electrolux, ERDG195YSKW)- Centrifuga (HERMLE 7400K)- Vortex (Benchmark Benchmixer)- Ultra-Turrax (IKA T18 basic)	<ul style="list-style-type: none">- Glucosa- Peptona- Extracto de levadura- Agua destilada- Sulfato de amonio- Fosfato de potasio monobásico- Sulfato de magnesio- NaOH- HCl- Persulfato de amonio ((NH₄)₂S₂O₈).	<ul style="list-style-type: none">- Microsoft ® Word 2010- Microsoft ® Excel 2010- Mendeley ®- SigmaPlot ® 11.0

3.2.3 METODOLOGÍA

3.2.3.1 Fermentaciones para producción de nanocelulosa bacteriana

i. Preparación de inóculo para fermentación

Para generar el inóculo para las fermentaciones se utilizó medio Hestrin-Schramm pH 5 el cual consta de 2.5% de fuente de carbono (Glucosa), 0.3% peptona, 0.5% extracto de levadura. Se preparó un cultivo líquido desde una colonia tomada desde placa de cultivo a 10 ml de medio HS y se dejó tres días a 28 °C en estufa. Pasada la incubación la suspensión celular resultante se utilizó como inóculo

ii. Preparación de medio líquido para fermentaciones

El medio líquido utilizado para las fermentaciones fue el descrito por Yamanaka (Watanabe & Yamanaka, 2014) el cual utiliza 2 % de glucosa. Además, el medio consta de 0.5% sulfato de amonio, 0.5% extracto de levadura, 0.3% de fosfato de potasio monobásico y 0.005% de sulfato de magnesio.

iii. Fermentación con la cepa *Komagataeibacter oboediens*

Se realizaron fermentaciones en recipientes de vidrio de 2 litros. A estas fuentes se les agregó 1 L de medio de cultivo Yamanaka con 2% de glucosa. Las fermentaciones se inocularon con 0.5 mL de suspensión celular antes preparada y se dejaron en estufa de cultivo a 28 °C por seis días. Al término del cultivo se retiró la celulosa producida en la superficie, siendo almacenada para su posterior purificación.

3.2.3.2 Preparación de soluciones para purificación de celulosa

Para lisar las células que pudieron estar adheridas a la celulosa, esta se trató con una solución de NaOH 0.1 M y posteriormente se neutralizó con ácido acético al 5%. (Chawla *et al.*, 2009).

3.2.3.3 Purificación de celulosa bacteriana

Para purificar la celulosa bacteriana generada en la fermentación se trató con solución alcalina (NaOH 0.1 M) para lisar las células que pudieron quedar atrapadas en el polímero y además limpiar el medio de cultivo existente (Chawla *et al.*, 2009). Esto se logró calentando a 90 °C la mezcla de celulosa bacteriana y NaOH por 20 minutos en tres oportunidades. Luego de estos se realizaron lavados con agua destilada y ácido acético al 5% para neutralización del pH de la celulosa.

3.2.3.4 Preparación de nanofibras de celulosa bacteriana (Hidrólisis ácida)

Para la obtención de nanofibras de celulosa bacteriana se procedió según lo reportado por Rozenberga *et al.*, (2016). El procedimiento consistió en una desintegración de la película de celulosa bacteriana purificada utilizando Ultraturrax y agregando agua desionizada. Luego se transfirió la suspensión de fibras a un vaso precipitado con HCl (concentrado, 37%) para alcanzar una concentración de ácido de 1 N en la mezcla. Se calentó la suspensión a 80-90 °C, se añadieron 4 g de persulfato de amonio ((NH₄)₂S₂O₈) y se agitó la mezcla vigorosamente durante 2 horas. Posteriormente se realizó un lavado y centrifugado de la celulosa resultante por 15 minutos a 10.000 rcf. Se agregó solución de NaOH 1 N (pH 9) y se calentó la solución a 60 °C durante 1 hora en agitación. El gel resultante se lavó con agua desionizada y se centrifugó repetidamente hasta que se neutralizó el pH.

3.2.3.5 Preparación de nanopapel de celulosa bacteriana

Para preparar el nanopapel de celulosa bacteriana se procedió como sigue, según lo reportado por Rozenberga *et al.*, (2016):

- Se diluyó el gel de celulosa antes preparado con agua desionizada a una concentración del 0,35% y luego se dispersó usando ultrasonido (455 W durante 15 minutos).
- Se agregó la solución resultante en un recipiente de silicona y se secó en estufa a 30 °C durante 48 h.

3.3 FABRICACIÓN DEL PAPEL ACTIVO QUE INCORPORA EL NANOBIOSENSOR

3.3.1 EQUIPOS, REACTIVOS Y SOFTWARE

Equipos	Reactivos	Software
<ul style="list-style-type: none"> - Balanza Analítica (SHIMADZU, AUX 120) - pH-metro (HANNAH, pH 211) - Agitador magnético (Glassco) - Estufa de secado (Quimis) - Refrigerador (Electrolux, ERDG195YSKW) - Agitador orbital (Barnstead Max Qmini 4000) - Vortex (Benchmark Benchmixer) 	<ul style="list-style-type: none"> - Solución de Pb(II) - Agua nanopura libre de nucleasas 	<ul style="list-style-type: none"> - Microsoft ® Word 2010 - Microsoft ® Excel 2010 - Mendeley ® - SigmaPlot ® 11.0 - Image J ®

3.3.2 METODOLOGÍA

3.3.2.1 Funcionalización de papel de nanocelulosa bacteriana con biosensor

Para la funcionalización del papel de nanocelulosa antes formulado se procedió como sigue, según lo reportado por Pourreza *et al.*, (2015):

- Se cortaron piezas de nanopapel de celulosa bacteriana de 2 x 2 cm.
- Se añadió 20 mL de agua nanopura libre de nucleasas en un matraz Erlenmeyer de 50 mL.
- La mezcla es agitó y calentó a 65 °C por 2 horas usando un agitador magnético con control de temperatura.
- 5 mL de biosensor (0,1% w/v), confeccionado anteriormente, se agregó por goteo (30 gotas/minuto aproximadamente) a la mezcla, en las mismas condiciones de temperatura y agitación.
- Cada papel húmedo funcionalizado se colocó en un molde de silicona y fue secado en estufa.

3.3.2.2 Evaluación de la estabilidad QDs de Cd/Te en papeles de nanocelulosa bacteriana

Para conocer la adhesión de los QDs de Cd/Te insertos en la matriz de celulosa bacteriana en presencia de distintas soluciones, se desarrolló esta experiencia. Se tomaron rectángulos de 2 x 1 cm de papeles de nanocelulosa bacteriana funcionalizados con QDs. Estos rectángulos se colocaron en 3 soluciones distintas (agua destilada, solución de alcohol al 5% y solución de alcohol al 10%). Los papeles se dejaron en las soluciones por 2 horas a temperatura ambiente y en agitación a 100 rpm.

Finalizado el tiempo de contacto los papeles fueron secados a temperatura ambiente y luego puestos en transiluminador para observar el cambio en la intensidad de fluorescencia con respecto al control que no fue expuesto a soluciones, temperatura ni agitación.

Se tomó fotografía con smartphone Huawei p20 lite. La fotografía fue de 16 megapíxeles, ISO 3200, y utilizando el software ImageJ se separaron los canales de color (Azul, Rojo y Verde).

Para estos análisis se trabajó con el canal rojo de imagen debido a que los quantum dots utilizados tienen una peak de fluorescencia de 590 nm (rojo anaranjado). Así, en este canal de color se genera menos interferencia y se logra identificar la variación de la intensidad de fluorescencia de manera más notoria.

Para el análisis, se seleccionó un área similar para cada ensayo y el software entregó el promedio de la medición de los píxeles. Utilizando este dato se observó la variación con respecto a los distintos factores y condiciones probadas.

Capítulo 4

RESULTADOS

4.1 Desarrollo de nanobiosensor para Pb(II)

4.1.1 Evaluación del reconocimiento de Pb(II) por el aptámero

Para comprobar el correcto reconocimiento del aptámero por su analito (Pb(II)), se evaluó la agregación de las nanopartículas de oro (AuNPs), funcionalizadas con el aptámero en presencia y ausencia de Pb (II).

Este ensayo permite visualizar mediante cambios en la agregación de AuNPs, la presencia de diversos agentes (en este caso el aptámero y el aptámero unido al Pb(II)) presentes en la superficie de las AuNPs, las cuales ejercen un efecto estérico diferencial dependiendo del volumen y ocupación de dichos agentes, cuando se aumenta la fuerza iónica en la solución (Gutiérrez *et al.*, 2020).

Esto debido a que el aumento de la fuerza iónica en el medio, generado por la concentración de sales presentes (NaCl), provoca la agregación y por consecuencia la precipitación de las nanopartículas, cambiando su comportamiento espectrofotométrico. Así, esta situación se ve afectada por como la nanopartícula se encuentre recubierta y expuesta hacia el medio.

En presencia del Pb(II), el aptámero adopta una conformación tridimensional que deja mayormente expuesta a la nanopartícula, y por lo tanto es vulnerable a agregar por efecto del NaCl. De esta manera se puede comprobar que, si las AuNPs están agregando luego de añadir el revelador, es debido a que el reconocimiento del aptámero por su analito es correcto y además se infiere que existe una correcta funcionalización de las nanopartículas.

Para este ensayo (Figura 4 y 5) se probaron dos proporciones de AuNPs y aptámero. La primera proporción probada fue 1 nmol de AuNPs y 20 nmol de

aptámero y la segunda fue de 1 nmol de AuNPs y 40 nmol de aptámero. Se utilizaron 6 concentraciones de Pb(II) distintas (400, 200, 100, 50, 25 y 0 ppb) y además se utilizó como control agua destilada y un ensayo con 0 ppb de Pb(II) y sin NaCl.

Se trabajó con dichas relaciones molares (1:20 y 1:40), de acuerdo a condiciones experimentales previamente optimizadas en nuestro laboratorio (Datos no publicados).

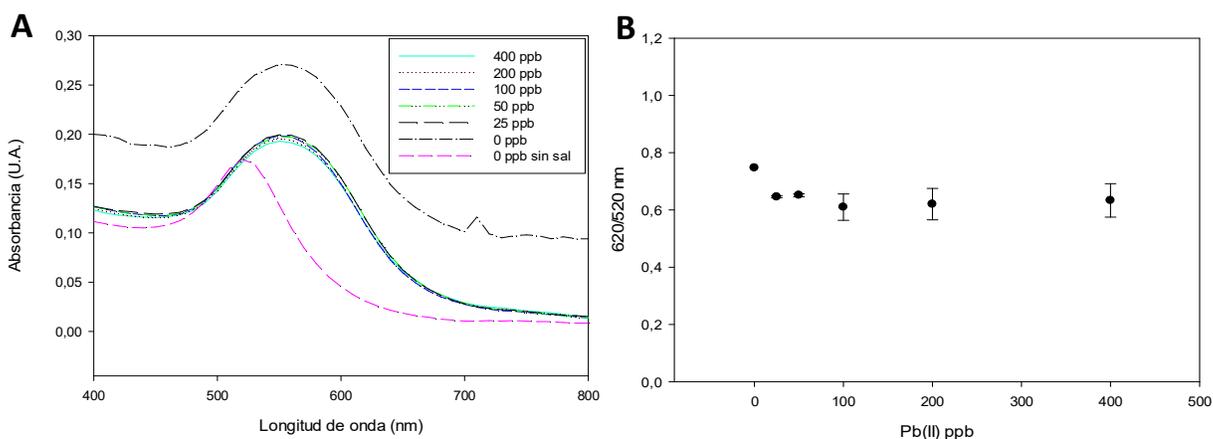


Fig. 4. Determinación de Pb(II) utilizando nanobiosensor basado en nanopartículas de oro. A) Proporción de nanopartícula aptámero 1:20, luego de 30 minutos de aplicado el NaCl. B) Razón entre el valor de absorbancia obtenido a 620 y 520 nm, en función de la concentración de Pb(II) probada. Se muestra el promedio del resultado de 2 experimentos independientes (n=2). Los datos fueron analizados utilizando el test no paramétrico Kruskal-Wallis. Diferencias estadísticamente significativas comparadas con el control (0 ppb) y entre sí son indicadas (* = $p < 0,05$).

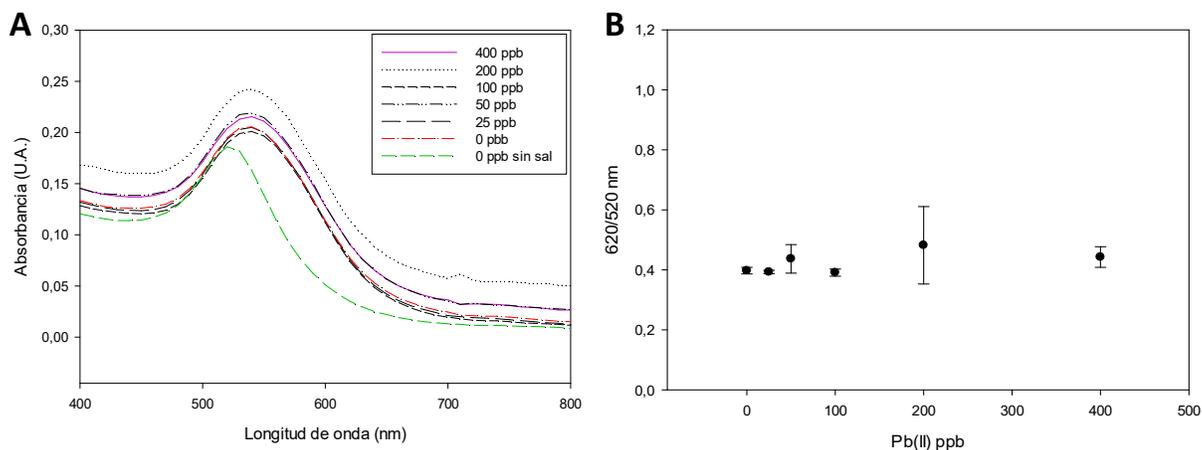


Fig. 5. Determinación de Pb(II) utilizando nanobiosensor basado en nanopartículas de oro. A) Proporción de nanopartícula aptámero 1:40, luego de 30 minutos de aplicado el NaCl. B) Razón entre el valor de absorbancia obtenido a 620 y 520 nm, en función de la concentración de Pb(II) probada. Se muestra el promedio del resultado de 2 experimentos independientes (n=2). Los datos fueron analizados utilizando el test no paramétrico Kruskal-Wallis. Diferencias estadísticamente significativas comparadas con el control (0 ppb) y entre sí son indicadas (* = $p < 0,05$).

En la figura 4, se observó que al realizar el ensayo de determinación de Pb(II) utilizando el nanobiosensor basado en nanopartículas de oro en una proporción 1:20, la razón entre el valor de absorbancia obtenido a 620 y 520 nm disminuyó al aumentar la concentración de plomo en el sistema.

Por otro lado, en la figura 5, se observó que al realizar el ensayo de determinación de Pb(II) utilizando el nanobiosensor basado en nanopartículas de oro en una proporción 1:40, la razón entre el valor de absorbancia obtenido a 620 y 520 nm mostró un leve aumento al aumentar la concentración de plomo en el sistema.

Esto permite visualizar que utilizando una proporción de funcionalización de 1:20 se ve una saturación del sistema en la primera concentración de Pb(II) probada (25 ppb), generando que el aumento de Pb(II) en el sistema no está generando un aumento en la agregación. De esta forma se evidencia un sistema reactivo capaz de reconocer al analito.

Para descartar la posibilidad de que el Pb(II) sea el causante de la agregación de las nanopartículas, se realizó un ensayo en el que no se agregó el revelador (NaCl) y se observó la razón entre la absorbancia obtenida en 620 y 520 nm.

Para este ensayo (Figura 6 y 7) se probaron dos proporciones de AuNPs y aptámero. La primera proporción probada fue 1:20 nmol y la segunda fue de 1:40 nmol. Se utilizaron 6 concentraciones de Pb(II) distintas (400, 200, 100, 50, 25 y 0 ppb) y además se utilizó como control agua destilada y un ensayo con 0 ppb de Pb(II).

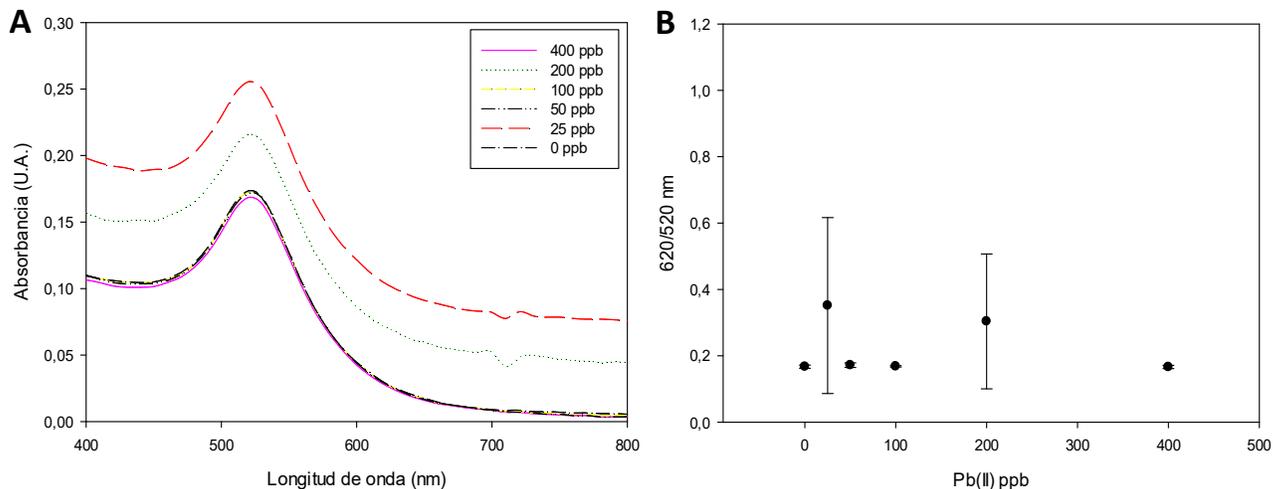


Fig. 6. Determinación de Pb(II) utilizando nanobiosensor basado en nanopartículas de oro. A) Proporción de nanopartícula aptámero 1:20. B) Razón entre el valor de absorbancia obtenido a 620 y 520 nm, en función de la concentración de Pb(II) probada. Se muestra el promedio del resultado de 2 experimentos independientes (n=2). Los datos fueron analizados utilizando el test no paramétrico Kruskal-Wallis. Diferencias estadísticamente significativas comparadas con el control (0 ppb) y entre sí son indicadas (* = $p < 0,05$).

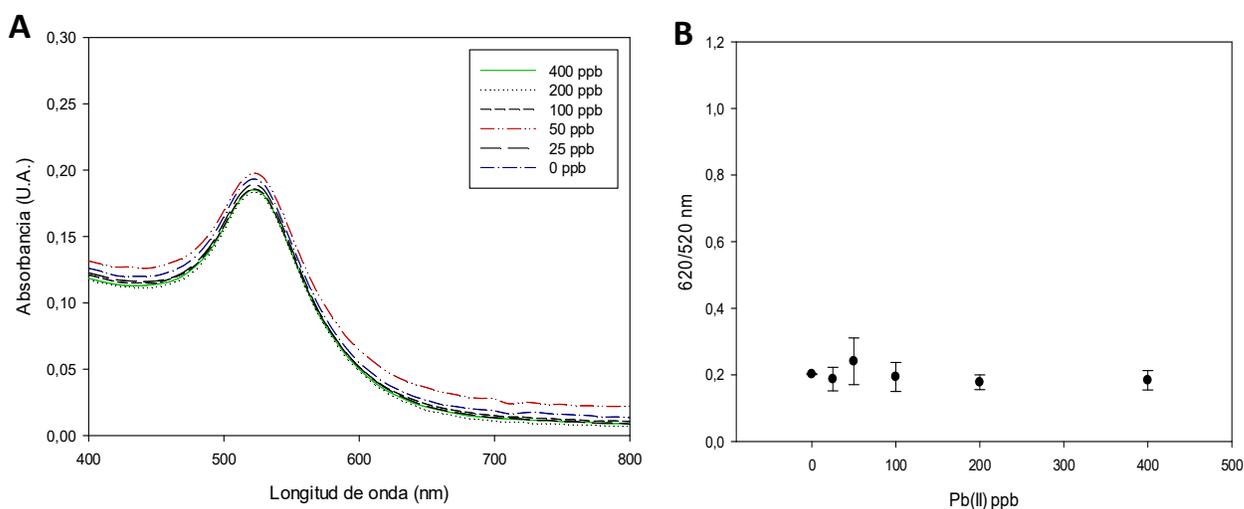


Fig. 7. Determinación de Pb(II) utilizando nanobiosensor basado en nanopartículas de oro. Proporción de nanopartícula aptámero 1:40. B) Razón entre el valor de absorbancia obtenido a 620 y 520 nm, en función de la concentración de Pb(II) probada. Se muestra el promedio del resultado de 2 experimentos independientes (n=2). Los datos fueron analizados utilizando el test no paramétrico Kruskal-Wallis. Diferencias estadísticamente significativas comparadas con el control (0 ppb) y entre sí son indicadas (* = $p < 0,05$).

En la figura 6 y 7, se observó que al realizar el ensayo de determinación de Pb(II) utilizando el nanobiosensor basado en nanopartículas de oro en una proporción 1:20 y 1:40, pero sin revelador (NaCl), la razón entre el valor de absorbancia obtenido a 620 y 520 nm se mantuvo relativamente constante al aumentar la concentración de plomo en el sistema.

Esto indica que la agregación del nanobiosensor, independiente de la proporción molar (1:20 o 1:40), es provocada por el aumento en la fuerza iónica del medio, generado por la concentración de sales presentes (NaCl), y no por el Pb(II).

Se realizó, además, el ensayo de agregación utilizando nanopartículas de oro sin funcionalizar (Figura 8) y se midió su absorbancia entre 400 y 800 nm luego de 30 minutos de haber agregado el revelador (NaCl). Se utilizaron 6 concentraciones de Pb(II) distintas (0, 25, 50, 100, 200 y 400 ppb) y además se utilizó como control agua destilada y un ensayo con 0 ppb de Pb(II) y sin NaCl. Esto para comparar el comportamiento en la agregación de las AuNPs funcionalizadas y sin funcionalizar.

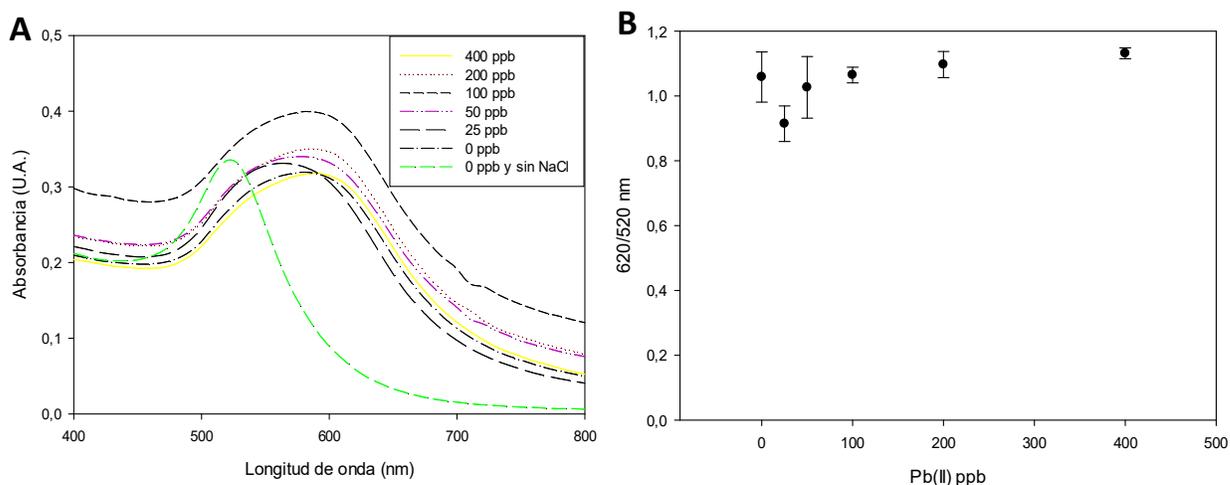


Fig. 8. Determinación de Pb(II) AuNPs sin funcionalizar y agregando Pb(II) y NaCl. A) Variación de absorbancia en función de la longitud de onda para las muestras de AuNPs con distintas concentraciones de Pb(II). B) Razón entre el valor de absorbancia obtenido a 620 y 520 nm, en función de la concentración de Pb(II) probada. Se muestra el promedio del resultado de 2 experimentos independientes (n=2). Los datos fueron analizados utilizando el test no paramétrico Kruskal-Wallis. Diferencias estadísticamente significativas comparadas con el control (0 ppb) y entre sí son indicadas (* = $p < 0,05$).

En la figura 8, se observó que al realizar el ensayo de determinación de Pb(II) utilizando el nanopartículas de oro sin funcionalizar, la razón entre el valor de absorbancia obtenido a 620 y 520 nm aumentó levemente al aumentar la concentración de plomo en el sistema.

Este ensayo control nos permite evidenciar la agregación de las AuNPs al no estar funcionalizadas y por lo tanto recubiertas en su superficie. Al no estar recubiertas las nanopartículas agregan debido al aumento de la fuerza iónica por parte del revelador (NaCl).

Considerando los ensayos expuestos en las figuras 4, 5, 6, 7 y 8, se observó que las nanopartícula de oro fueron funcionalizadas efectivamente en dos proporciones distintas (1:20 y 1:40) y que además el aptámero utilizado reconocía efectiva y selectivamente al Pb(II).

4.1.2 Condiciones de unión del biosensor a la secuencia complementaria quencher

Para evaluar la unión de la secuencia complementaria quencher al nanobiosensor, se utilizaron QDs de Cd/Te funcionalizados con 2 nmol de aptámero. Se trabajó con dicha relación molar (1:2) debido a que, a diferencia de las AuNPs utilizadas anteriormente (15 nm), estos QDs tienen un tamaño menor (5 nm) y por ende una menor superficie de funcionalización. Estas condiciones experimentales se encontraban previamente optimizadas en nuestro laboratorio (Datos no publicados).

Se probaron 4 proporciones de aptámero quencher (1:0, 1:1, 1:3 y 1:6). Estas proporciones probadas fueron seleccionadas en base al trabajo realizado por Chen *et al.*, (2018). Una vez añadidos las soluciones al tubo de reacción se incubaron a 70 °C (T_m del aptámero) por 10 minutos. Posteriormente se analizó la intensidad de fluorescencia mediante espectrofluorímetro (SYNERGY H1, BIOTEK), utilizando una ganancia de 80, una excitación de 360 nm y una lectura de emisión entre 400 y 700 nm (Figura 9).

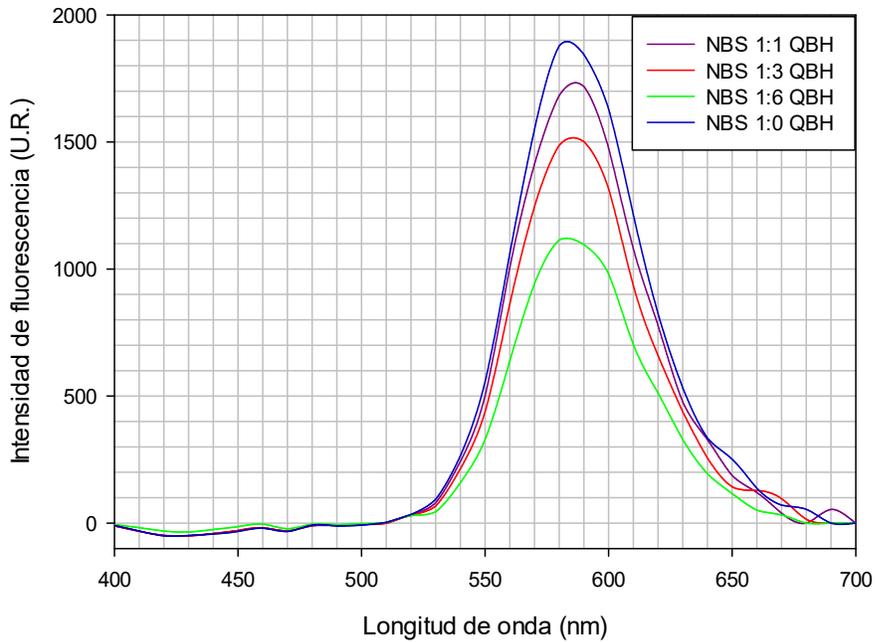


Fig. 9. Intensidad de fluorescencia obtenida por el nanobiosensor compuesto por QDs de Cd/Te funcionalizados con 2 nmol de aptámero con 4 proporciones aptámero quencher (1:0, 1:1, 1:3 y 1:6), medidos en espectrofluorímetro (SYNERGY H1, BIOTEK), utilizando una ganancia de 80, una excitación de 360 nm. Se muestra el resultado de 1 experimento (n=1).

Estos resultados indican que el quencher utilizado logró disminuir la intensidad de fluorescencia generada por el nanobiosensor, y la proporción aptámero quencher que produjo la mayor disminución fue de 1:6 con un 40,56% con respecto al nanobiosensor en proporción 1:0 (100%).

Esto confirma que la sonda parcialmente complementaria quencher logra unirse al aptámero, quedando el apagador a una proximidad tal del QDs que logra disminuir su intensidad de fluorescencia.

Se realizó además, el análisis de la unión de la secuencia complementaria quencher al nanobiosensor mediante imagen (Figura 10) utilizando el software ImageJ y con fotografía de 16 megapíxeles, ISO 3200 tomada con smartphone Huawei p20 lite. Se trabajó en el canal rojo de imagen para el análisis.

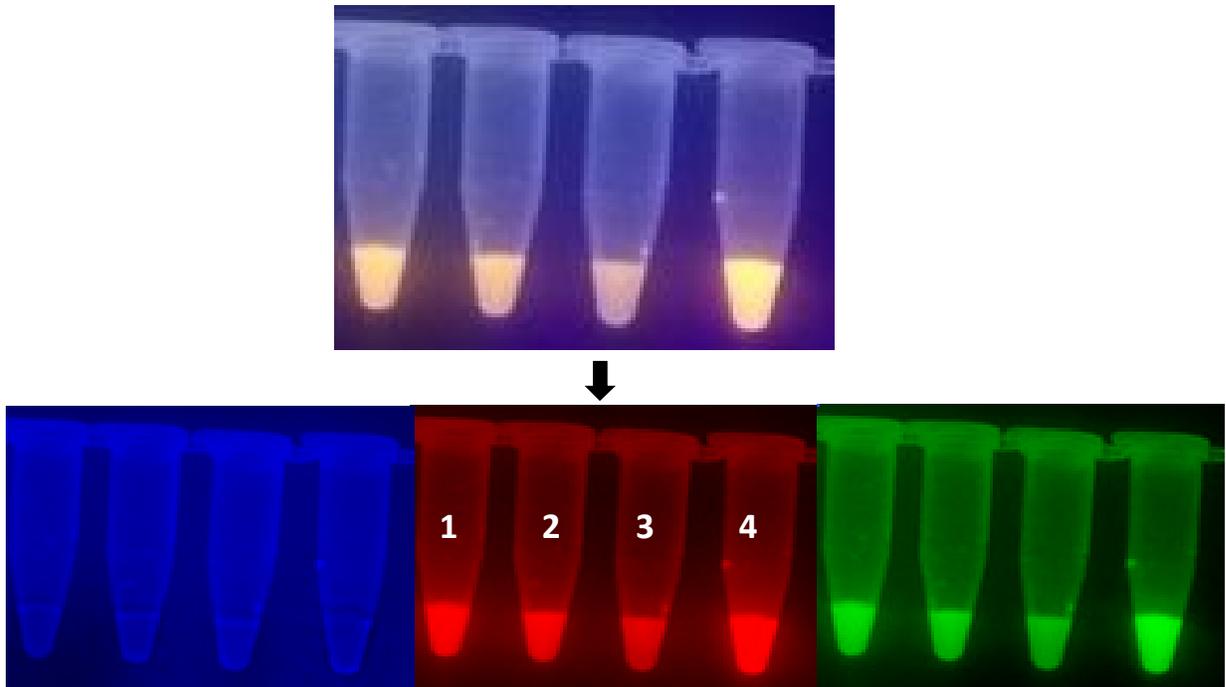


Fig. 10. Intensidad de fluorescencia del nanobiosensor compuesto por QDs de Cd/Te funcionalizados con 2 nmol de aptámero con 4 proporciones aptámero quencher (1:0, 1:1, 1:3 y 1:6). 1) NBS 1:1. 2) NBS 1:3. 3) NBS 1:6. 4) NBS 1:0. Se muestra el resultado de una medición realizada

En la figura 10 se observó la disminución en la intensidad de fluorescencia del nanobiosensor debido a la sonda parcialmente complementaria quencher mediante imagenología. Este resultado indicó, por lo tanto que estos cambios son posibles de cuantificar mediante análisis de imagen.

Se compararon los resultados obtenidos de la unión de la secuencia complementaria quencher al nanobiosensor mediante imagen y mediante espectrofluorímetro (Figura 11). Se analizó el porcentaje de variación en la intensidad de fluorescencia del nanobiosensor en presencia de la sonda parcialmente complementaria quencher con respecto al nanobiosensor en ausencia de ésta (100%). Se realizó el análisis de la intensidad de fluorescencia del nanobiosensor compuesto por QDs de Cd/Te funcionalizados con 2 nmol de aptámero con 3 proporciones aptámero quencher (1:1, 1:3 y 1:6).

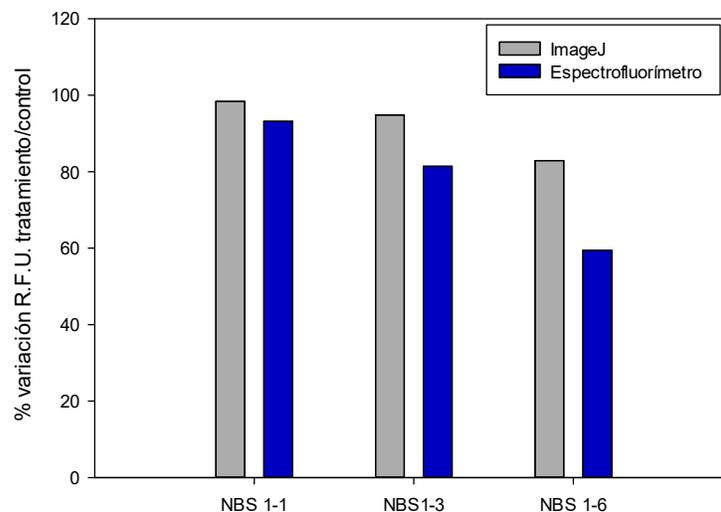


Fig. 11. Comparación en sensibilidad de imagenología y fluorimetría. Nanobiosensores basados en QDs, en proporciones 1:1, 1:3 Y 1:6 (NBS : sonda apagador) que fueron incubados por 10 minutos a 70°C y posteriormente se determinó la fluorescencia de las distintas soluciones por imagenología (Canal rojo, software ImageJ) y espectrofluorimetría (590 nm, SYNERGY H1, BIOTEK). Barra gris y azules corresponde a la variación de valores observadas por imagenología y espectrofluorimetría, respectivamente. Se muestra el resultado de una medición realizada a una misma solución por las dos metodologías descritas.

Esta comparación permitió visualizar que el cambio en porcentaje de la intensidad de fluorescencia es posible seguir mediante análisis de imagen aun cuando el análisis mediante espectrofluorímetro muestra un mayor cambio pero con la misma tendencia.

Se evaluó por análisis de imagen el apagamiento del nanobiosensor en distintas condiciones. Se utilizaron QDs de Cd/Te a una concentración de 1mg/ml funcionalizados con 2 nmol y 3 nmol de aptámero, figura 13 y 14 respectivamente. Se evaluaron 3 proporciones de aptámero quencher (1:0, 1:3 y 1:6). Se utilizó para la confección del nanobiosensor Buffer Tris-Acetato pH 7,4. Una vez añadidos los componentes del nanobiosensor (QDs funcionalizadas, secuencia complementaria quencher y buffer) al tubo de reacción se probaron tres condiciones, 10 minutos a 70 °C (Tm del aptámero), temperatura ambiente por 20 minutos antes de ser analizado por imagen y por último 6 horas a temperatura ambiente y luego 10 minutos a 70 °C. Finalmente se agregó el mismo volumen de nanobiosensor que agua destilada libre de nucleasas (simulando analito).

Posteriormente se analizó la intensidad de fluorescencia mediante fotografía, utilizando el programa de análisis de imagen ImageJ. Se trabajó en el canal rojo de imagen para el análisis (Figura 12, ejemplo del análisis). Las concentraciones finales probadas del nanobiosensor luego de agregar el agua destilada libre de nucleasas fueron 15 y 20 $\mu\text{g/ml}$ en ambas condiciones de funcionalización 2 nmol (Figura 13) y 3 nmol de aptámero (Figura 14). Todas las pruebas se realizaron por triplicado. Se realizó un t-test no paramétrico de comparación múltiple para definir si el cambio fue significativo o no con respecto al nanobiosensor con proporción aptámero quencher 1:0.

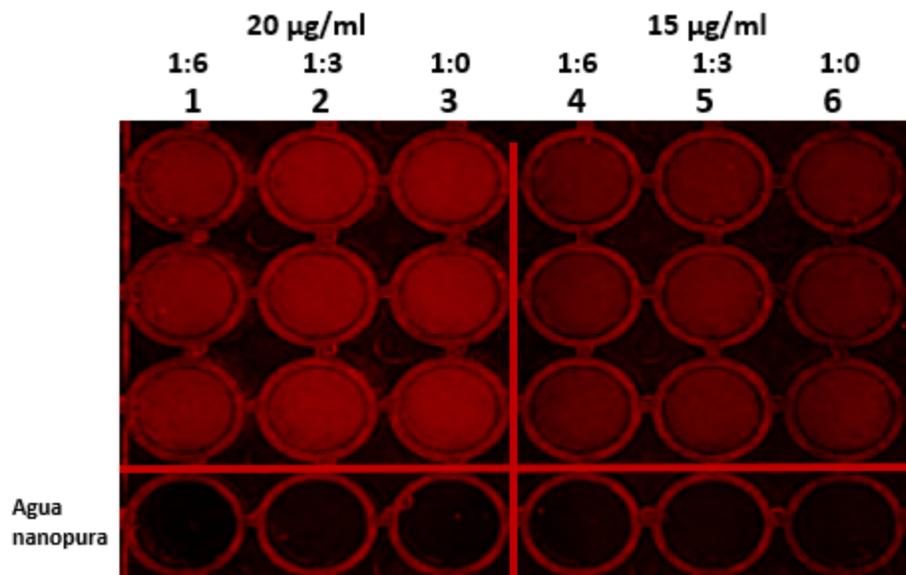


Fig. 12. Intensidad de fluorescencia del nanobiosensor compuesto por QDs de Cd/Te funcionalizado con aptámero, 3 proporciones aptámero quencher (1:0, 1:3 y 1:6) y 10 minutos a 70 °C. Se probaron 2 concentraciones finales de nanobiosensor (20 $\mu\text{g/ml}$ y 15 $\mu\text{g/ml}$). Se trabajó en triplicado y se analizó agua nanopura para obtener el límite de cuantificación y detección del método.

Estos resultados indican que existe un cambio medible mediante análisis de imagen en el canal rojo, en cuanto a la intensidad de fluorescencia del nanobiosensor a dos concentraciones diferentes (15 y 20 $\mu\text{g/ml}$) y con 3 proporciones aptámero quencher distintas. Utilizando este tipo de análisis se elaboraron los resultados expuestos en las figuras 13 y 14.

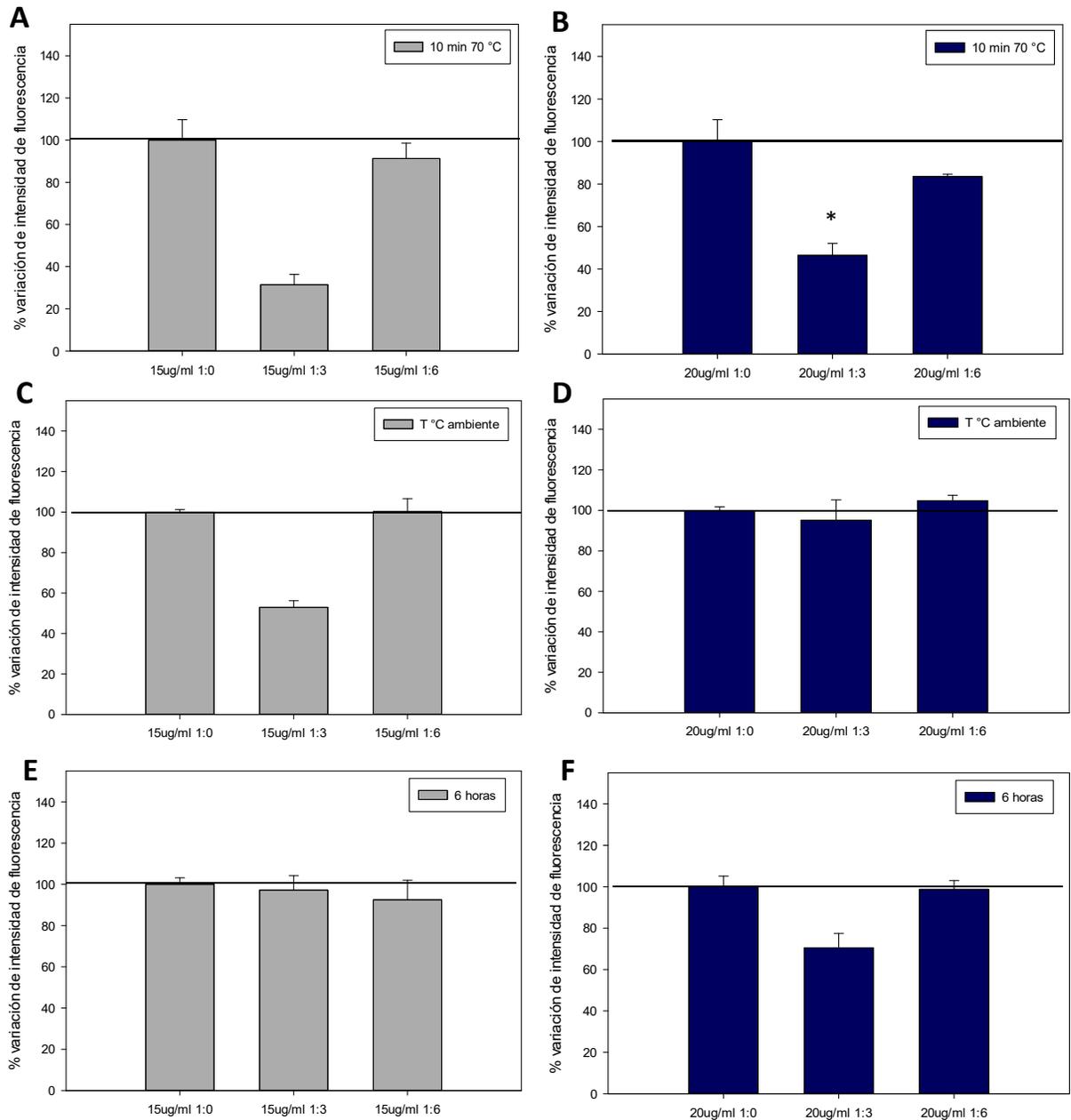


Fig. 13. Intensidad de fluorescencia del nanobiosensor compuesto por QDs de Cd/Te funcionalizado con 2 nmol de aptámero y 3 proporciones aptámero quencher (1:0, 1:3 y 1:6). Se estudiaron dos concentraciones finales de nanobiosensor, 15 µg/ml (A, C y E) y 20 µg/ml (B, D y F) y tres condiciones de ensayo, 10 minutos a 70 °C (A y B), 20 minutos a T. ambiente (C y D) y 6 horas a T. ambiente (E y F). Se muestra el promedio del resultado de 2 experimentos independientes (n=2). Los datos fueron analizados utilizando el test no paramétrico Kruskal-Wallis. Diferencias estadísticamente significativas comparadas con el control (0 ppb) y entre sí son indicadas (* = p < 0,05).

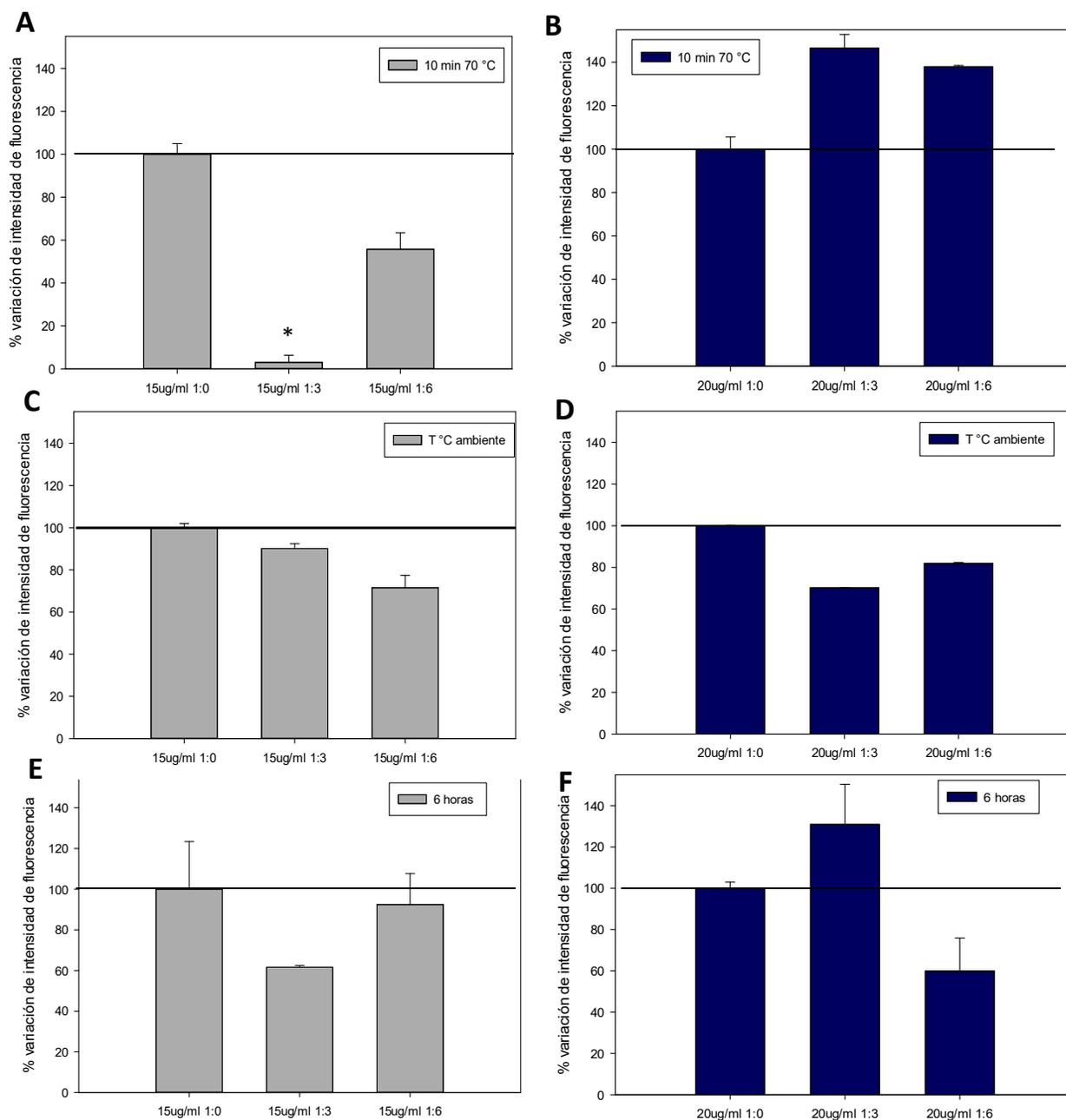


Fig. 14. Intensidad de fluorescencia del nanobiosensor compuesto por QDs de Cd/Te funcionalizado con 3 nmol de aptámero y 3 proporciones aptámero quencher (1:0, 1:3 y 1:6). Se estudiaron dos concentraciones finales de nanobiosensor, 15 µg/ml (A, C y E) y 20 µg/ml (B, D y F) y tres condiciones de ensayo, 10 minutos a 70 °C (A y B), 20 minutos a T. ambiente (C y D) y 6 horas a T. ambiente (E y F). Se muestra el promedio del resultado de 2 experimentos independientes (n=2). Los datos fueron analizados utilizando el test no paramétrico Kruskal-Wallis. Diferencias estadísticamente significativas comparadas con el control (0 ppb) y entre sí son indicadas (* = p < 0,05).

Este resultado indica que las condiciones que generaron un cambio significativo, medido por imagenología en el canal rojo de imagen utilizando el software ImageJ, fueron incubando las muestras por 10 minutos a 70 °C, QDs de Cd/Te

funcionalizados con 2 nmol de aptámero y una concentración final del nanobiosensor de 20 µg/ml y QDs de Cd/Te funcionalizados con 3 nmol de aptámero y una concentración final del nanobiosensor de 15 µg/ml. Estos ensayos permitieron definir las condiciones, concentraciones y proporciones aptámero quencher que se utilizarían para los ensayos siguientes en el reconocimiento de Pb(II) por el nanobiosensor.

4.1.3 Determinación de plomo con el biosensor

Para conocer si el Pb(II) en solución logra aumentar la intensidad de fluorescencia del nanobiosensor al cual se le ha añadido la sonda parcialmente complementaria quencher, se realizó este experimento.

Este experimento se realizó para el nanobiosensor en proporción aptámero quencher 1:3 y concentración final de nanobiosensor 15 µg/ml y 30 µg/ml (Figura 15). Se trabajó con una concentración final del nanobiosensor de 30 µg/ml, y no 20 µg/ml, para aumentar la señal y así aumentar la sensibilidad del método. Se realizó como control el mismo ensayo, pero teniendo el nanobiosensor (NBS) en ausencia del quencher (QBH) y también un ensayo teniendo sólo QDs de Cd/Te sin funcionalizar y sin quencher.

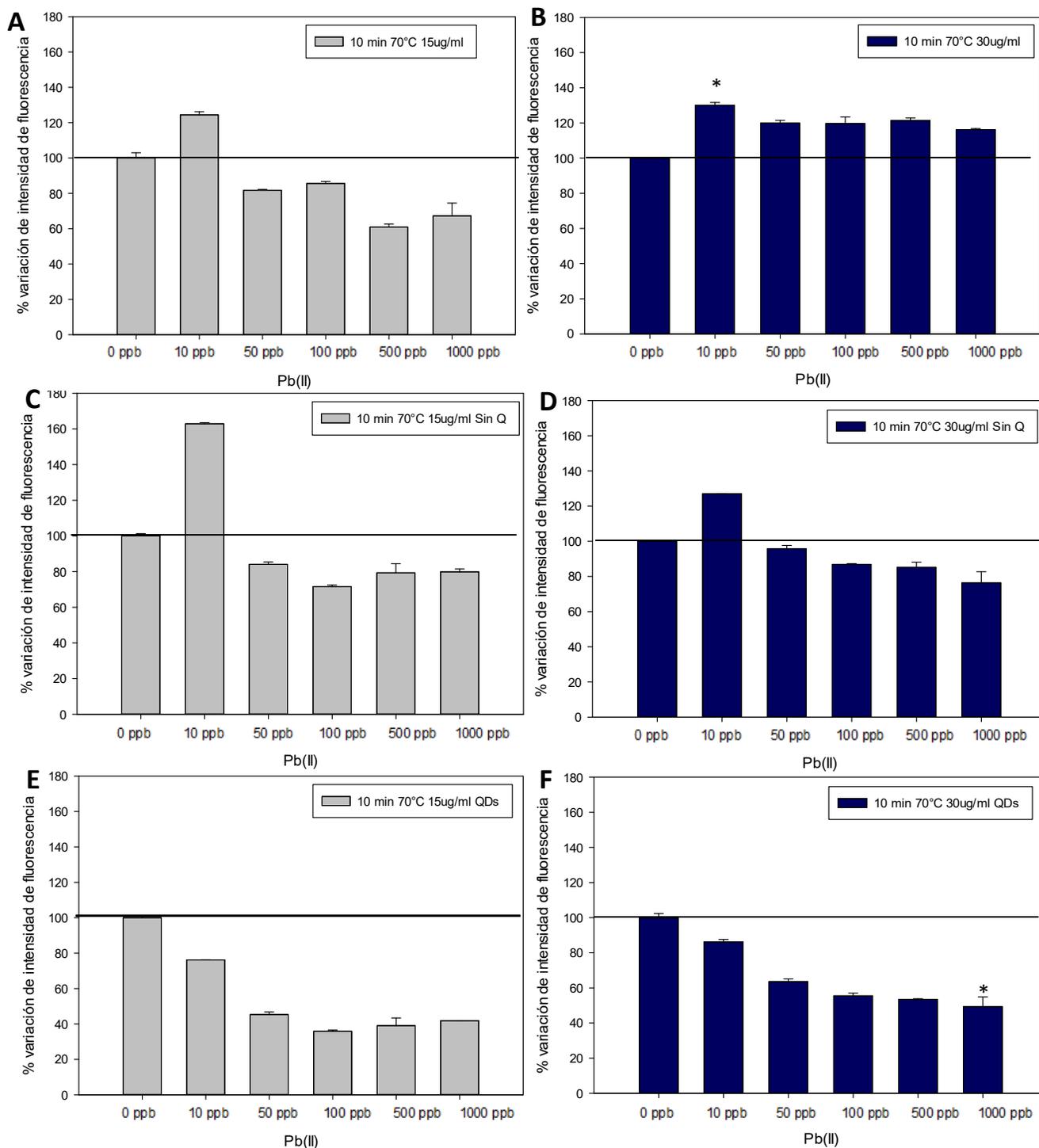


Fig. 15. Intensidad de fluorescencia con respecto del nanobiosensor compuesto por QDs de Cd/Te funcionalizados con 3 nmol de aptámero con proporciones aptámero quencher 1:3 en contacto con 0 ppb de Pb(II). Se probaron 5 concentraciones distintas de plomo (10, 50, 100, 500 y 1000 ppb). Se estudiaron dos concentraciones finales de nanobiosensor, 15 $\mu\text{g/ml}$ (A, C y E) y 30 $\mu\text{g/ml}$ (B, D y F) y tres sistemas como sensor. Nanobiosensor (A y B), QDs funcionalizados pero sin quencher (C y D) y QDs sin funcionalizar y sin quencher (E y F). Se muestra el promedio del resultado de 3 experimentos independientes ($n=3$). Los datos fueron analizados utilizando el test no paramétrico Kruskal-Wallis. Diferencias estadísticamente significativas comparadas con el control (0 ppb) (* = $p < 0,05$).

Se observó que para los experimentos con el nanobiosensor en proporción aptámero quencher 1:3 y concentración final de nanobiosensor 30 µg/ml (Figura 15 B) se generó un aumento en la intensidad de fluorescencia con respecto al control en presencia de las cinco diferentes concentraciones de Pb(II) probadas.

Utilizando QDs sin funcionalizar se generó una disminución de la intensidad de fluorescencia de forma casi proporcional con respecto al aumento de la concentración de Pb(II). Este resultado indica que el analito es capaz de disminuir la intensidad de fluorescencia de los QDs proporcionalmente a la concentración de este metal en la muestra.

4.2 Síntesis de papeles de nanocelulosa bacteriana

4.2.1 Preparación de nanopapel de celulosa bacteriana

Luego de la producción y purificación de la celulosa bacteriana, se realizó una hidrólisis ácida. Esto produjo una despolimerización de la estructura nativa de celulosa, desfibrilando las microfibrillas de celulosa y exponiendo cristales de corta longitud. Para la preparación de los nanopapeles de celulosa bacteriana, la mezcla resultante de nanocelulosa bacteriana y agua destilada fue agitada vigorosamente y secada en estufa en un molde de silicona (Figura 16 C y D).

Se exponen además, micrografías SEM y TEM (Figura 16 A y B) de celulosa bacteriana tomadas para una investigación anterior realizado por el autor y colaboradores de esta trabajo (Núñez *et al.*, 2020).

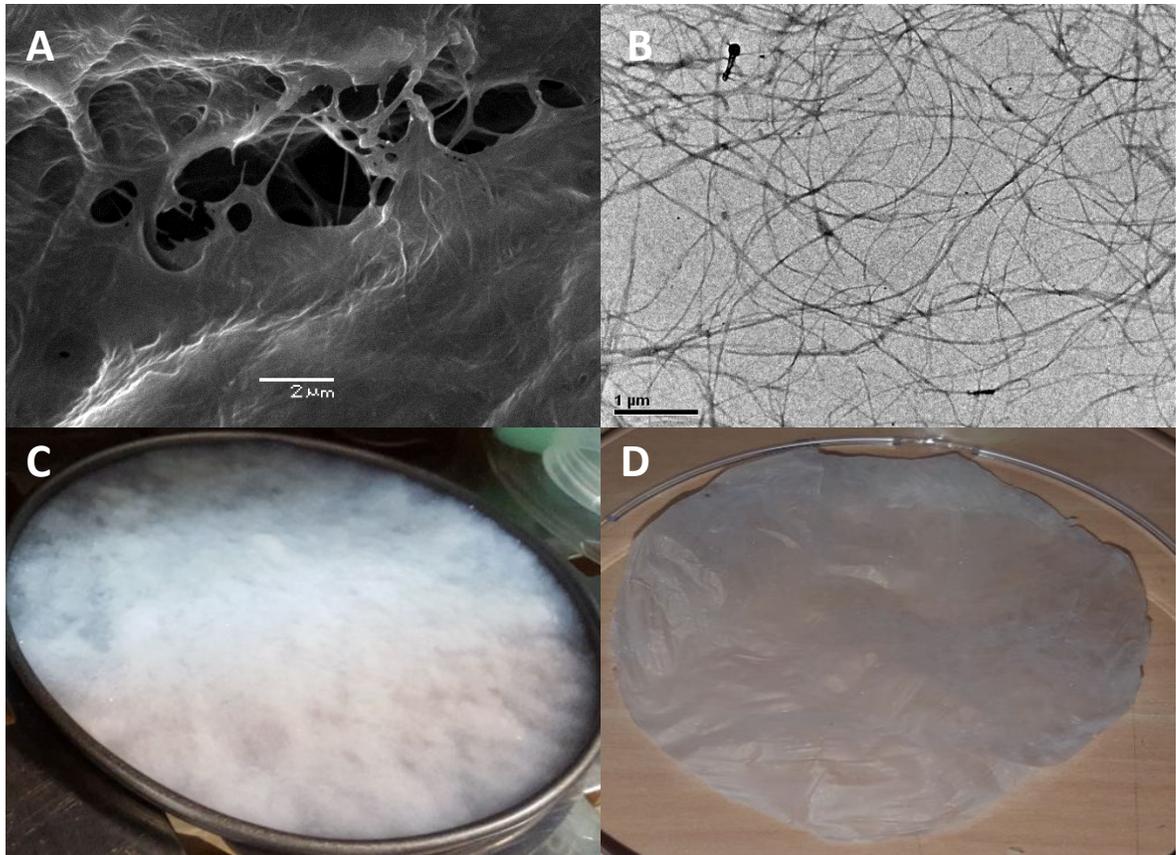


Fig. 16. Celulosa bacteriana obtenida desde la fermentación de *K. oboediens*. A y B) Micrografías SEM y TEM respectivamente de fibras de celulosa bacteriana (Núñez et al., 2020). C) Nanocelulosa bacteriana húmeda producida mediante hidrólisis ácida. D) Papel de nanocelulosa bacteriana.

Con estos resultados se observó que mediante la hidrólisis ácida se obtiene un blanqueamiento y translucidez luego del secado de la celulosa bacteriana producida por la fermentación de la cepa *K.oboediens*.

4.3 Fabricación del papel activo

4.3.1 Unión del QDs de Cd/Te al papel de nanocelulosa bacteriana

Las nanofibras de celulosa bacteriana húmeda fueron mezcladas con QDs de Cd/Te. La mezcla resultante fue agitada vigorosamente y secada en estufa en un molde de silicona. El resultado de este proceso se muestra en la figura 17.

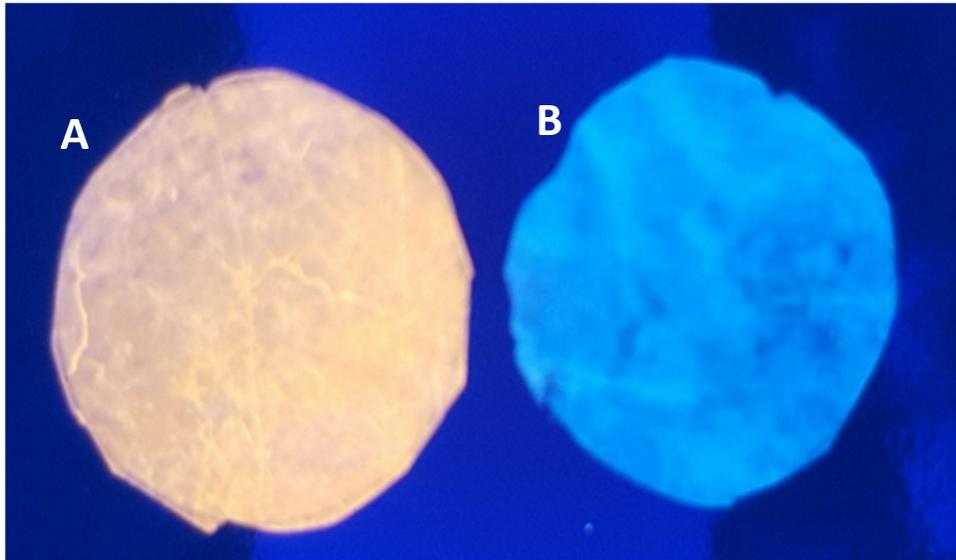


Fig. 17. Exposición de papeles de nanocelulosa bacteriana a luz UV. A) Papel de nanocelulosa bacteriana en mezcla con QDs de Cd/Te. B) Papel de nanocelulosa bacteriana.

Este resultado demostró que los QDs de Cd/Te mantienen su característica de emitir fluorescencia al ser expuestas a luz UV, aun cuando estén unidos a la matriz de nanocelulosa bacteriana. Por lo tanto, esta es una situación promisoriosa para el funcionamiento del nanobiosensor en el papel de nanocelulosa bacteriana.

Con la finalidad de conocer la estabilidad de los quantum dots de cadmio/teluro en los papeles de nanocelulosa bacteriana, y observar si estas nanopartículas quedaban unidas fuertemente al papel o se desprendían en presencia de distintas matrices es que se realizó el siguiente experimento.

Luego del contacto por dos horas, en agitación a 100 rpm y a temperatura ambiente con tres soluciones distintas (Agua destilada, solución de etanol al 5% y solución de etanol al 10%) (Figura 18 A), se cuantificó mediante la diferencia en la intensidad de fluorescencia con respecto al control (Papel no expuesto a soluciones). El análisis se realizó mediante imagen en el canal rojo utilizando el software ImageJ (Figura 18 B).

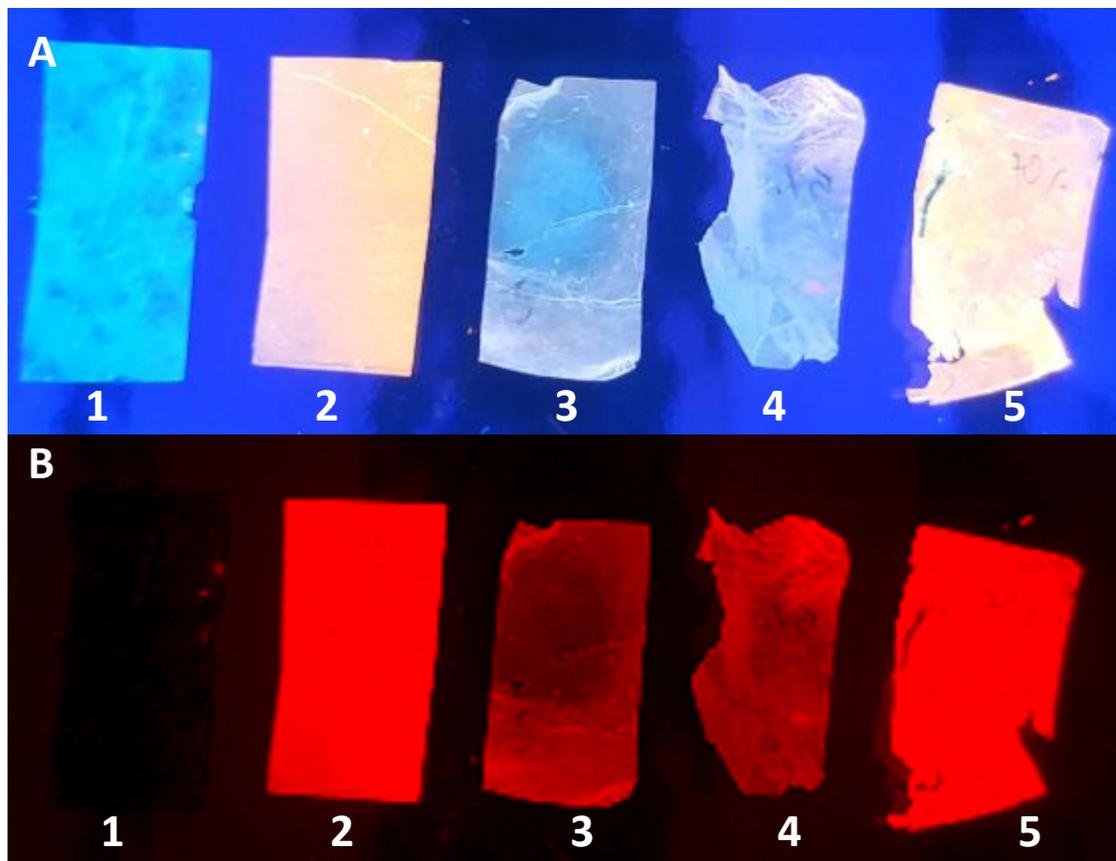


Fig.18: Estabilidad de QDs de Cd/Te impregnadas en papeles de nanocelulosa bacteriana en presencia de distintas matrices, analizada mediante análisis de imagen con el software ImageJ en canal rojo. Se muestra el resultado de una medición realizada a cada papel y condición probada 1) Papel de nanocelulosa bacteriana sin QDs sometido a contacto con agua destilada como control. 2) Nanopapel con QDs no sometida al experimento como control. 3) Nanopapel con QDs sometido a contacto con agua destilada. 4) Nanopapel con QDs sometido a contacto con etanol al 5%. 5) Nanopapel con QDs sometido a contacto con etanol al 10%.

Estos resultados indican que una solución de etanol al 10% genera una menor disminución en la intensidad de fluorescencia que las generadas por solución de etanol al 5% y agua destilada. De esta manera se infiere que la estabilidad de adhesión de los QDs al papel de nanocelulosa es mayor cuando la solución de ensayo presenta etanol al menos al 10%. Por lo tanto, para contactos con soluciones de metales pesados se debería trabajar con matrices que contengan etanol al 10% permitiendo que el nanobiosensor no se desprenda de la matriz de nanocelulosa bacteriana.

Se realizó la comparación porcentual de la intensidad de fluorescencia con respecto al papel de nanocelulosa funcionalizado con QDs de Cd/Te (Figura 19), el cual no fue sometido a contacto con ninguna solución y se tomó como control.

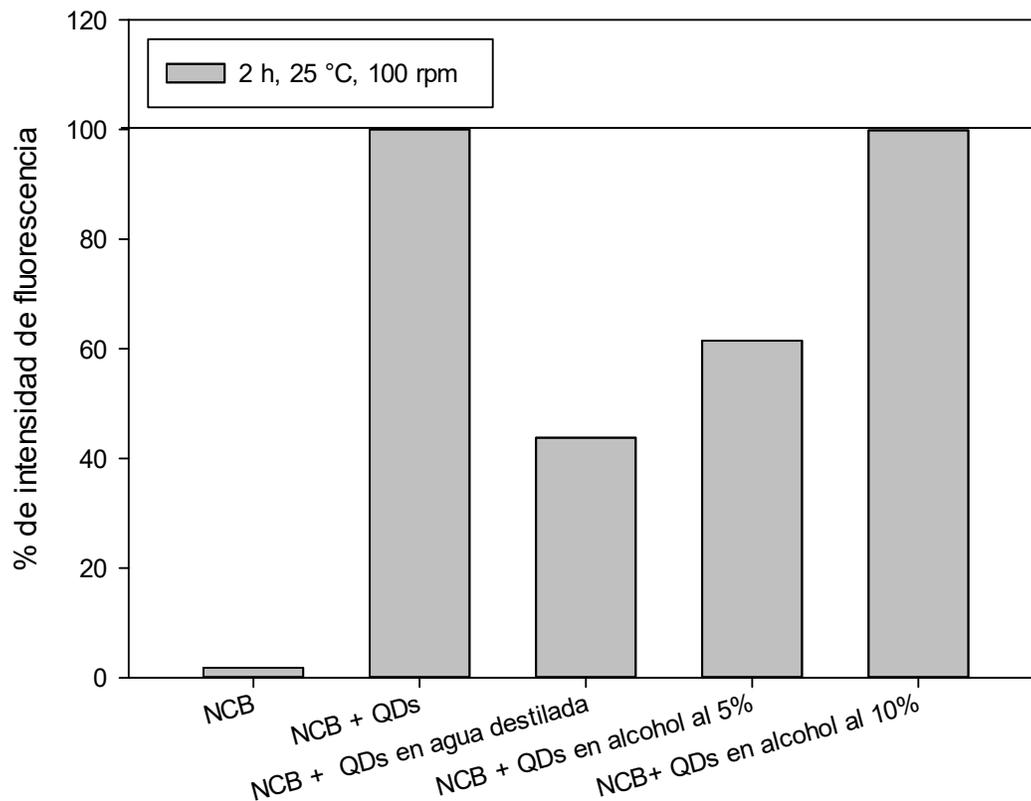


Fig.19: Intensidad de fluorescencia con respecto al papel de nanocelulosa bacteriana funcionalizado con QDs (NCB+QDs). NCB) Papel de nanocelulosa bacteriana. NCB+QDs en agua destilada) Papel de nanocelulosa bacteriana con QDs sometida a contacto con agua destilada. NCB+QDs en alcohol al 5%) Papel de nanocelulosa bacteriana con QDs sometida a contacto con solución de alcohol al 5%. NCB+QDs en alcohol al 10%) Papel de nanocelulosa bacteriana con QDs sometida a contacto con solución de alcohol al 10%.

El porcentaje de variación de la intensidad de fluorescencia obtenido al utilizar etanol al 10 % fue de 0,21 %, mientras que al usar etanol al 5 % fue de 39,28 % y agua destilada un 56,42 %. La muestra de NCB presentó un 1,61 % de intensidad de fluorescencia (control negativo), en tanto que NCB+ QDS se tomó como el 100 % de intensidad de fluorescencia (control positivo) para la comparación.

Capítulo 5

DISCUSIÓN

5.1 Evaluación del reconocimiento de Pb(II) por el aptámero

Los nanobiosensores ópticos que presentan la propiedad de plasmón de resonancia superficial (SPR) son sistemas de sensores ampliamente utilizados. El SPR es una propiedad óptica inherente de las nanopartículas de metales nobles, como oro y plata, que resulta de oscilaciones colectivas de las nubes de electrones y permite implementar la detección óptica en el rango visible siguiendo el cambio del espectro de absorción/emisión. Esta propiedad depende de las dimensiones y la geometría de las nanopartículas. Por tanto, se vuelve posible diseñar NBS ópticas cuya interacción con un analito causa que las nanopartículas agreguen y, en consecuencia, absorban o dispersen la luz en diferentes regiones espectrales que pueden ser detectado y cuantificado instrumentalmente (Gutiérrez *et al.*, 2020).

Mediante este ensayo (Figura 4, 5, 6, 7 y 8) se determinó que el aptámero reconoce efectivamente a su analito, dado que existió una correlación entre la concentración de Pb(II) probada y la razón de absorbancia (620/520) resultante. Así, al variar la concentración de Pb(II) en la muestra produjo un desplazamiento de la banda de absorción de ~520 a ~620 nm y por ende una modificación en el sistema, evidenciando un reconocimiento por el analito.

Para la proporción probada nanopartícula aptámero 1:20, una menor concentración del analito en ppb provocó un cambio menor en las absorbancias probadas (Figura 5 A), que en el caso que se tenga una mayor concentración del analito (1:40). Esto pudo deberse a que al existir una mayor cantidad de aptámero funcionalizando las nanopartículas, al haber mayor cantidad de analito, la conformación tridimensional que adopta el aptámero recubrió aún más las AuNPs

evitando la entrada del revelador (NaCl) y por ende la agregación. A mayor agregación de las AuNPs, la relación 520/620 disminuye debido al desplazamiento de la banda de absorción de ~520 a ~620 nm.

De esta manera en el caso de la proporción probada nanopartícula aptámero 1:40, una menor concentración del analito en ppb provocó un cambio mayor en las absorbancias probadas (Figura 5 B), que en el caso que se tenga una mayor concentración del analito. Esto puede deberse a que a una mayor concentración de Pb(II), los aptámeros que funcionalizan las AuNPs, se encuentran en una conformación tal que dejan espacios en la superficie de las nanopartículas, permitiendo que entre el NaCl agregando las AuNPs.

Mediante el experimento control (Figura 7 A y B) se observó que en ausencia del revelador (NaCl) no ocurrió una agregación considerable. Esto se observó en el cálculo de la razón de las absorbancias de 620 y 520 nm. De esta manera se infiere que el Pb(II), no genera la agregación de las AuNPs.

En el ensayo de agregación utilizando nanopartículas de oro sin funcionalizar (Figura 8), en el que se midió la absorbancia entre 400 y 800 nm luego de 30 minutos de haber agregado revelador (NaCl), se observó que el comportamiento espectrofotométrico de las AuNPs se mantuvo prácticamente constante, independientemente de la concentración de Pb(II) probado (0, 25, 50, 100, 200 y 400 ppb). Esto debido a que como las nanopartículas no están funcionalizadas, no se encuentran recubiertas, al aumentar la fuerza iónica debido a la incorporación de sales (NaCl) existe un comportamiento de agregación similar independientemente de la concentración de Pb(II) en el medio.

5.2 Condiciones de unión del biosensor a la secuencia complementaria quencher

Para evaluar la unión de la secuencia complementaria quencher al nanobiosensor, se analizó la intensidad de fluorescencia mediante espectrofluorímetro (Figura 9), y mediante análisis de imagen (Figura 10). Además, se realizó la comparación entre la medición de estas dos maneras para conocer en qué forma se relacionan y así poder utilizar el análisis de imagen como metodología. Esto último debido a que este análisis resulta más rápido y además es posible llevarlo a cabo en terreno, tomando fotografías con un smartphone y analizarlas con un software o aplicación móvil.

Los teléfonos inteligentes ofrecen una plataforma atractiva para el análisis químico, como el diagnóstico y el monitoreo ambiental, esto debido a que son enfoques analíticos de bajo costo y fáciles de realizar para la detección de varios contaminantes. Las aplicaciones de teléfonos inteligentes más utilizadas se basan en colorimetría y análisis de imágenes.

Los smartphones, se han vuelto cada vez más populares en el desarrollo de biosensores rápidos, portátiles y de bajo costo. Con un procesador de alta velocidad, una cámara de alta resolución y una comunicación inalámbrica ubicua, los teléfonos inteligentes con aplicaciones personalizadas se han utilizado con frecuencia para la recopilación de imágenes o el análisis de datos. Además, los teléfonos inteligentes a menudo están equipados con un sistema de posicionamiento global y pueden indicar la ubicación precisa para la recolección de muestras en el mapa electrónico precargado. Por lo tanto, la combinación de teléfono inteligente, y aplicaciones de análisis de imagen o de otras variables prometen como una solución que podría proporcionar plataformas simples y de bajo costo para la detección rápida contaminantes (Zheng, Cai, & Wang, 2018).

Safarik *et al.*, (2019), demostraron que el análisis de imágenes empleando fotografías tomadas con smartphone se pueden utilizar con éxito para la determinación de la concentración de tintes presentes en agua. Después de la preconcentración del tinte, los autores tomaron fotografías de cuadrados textiles con el tinte adsorbido usando un teléfono móvil. Usando el software ImajeJ y aplicaciones de celular como ColorMeasure y ColorLab lograron la determinación de la concentración de tintes adsorbidos en cuadrados de tela que fueron contactados con las aguas analizadas. Con este ensayo económico y sin elución, fue posible analizar la concentración de colorantes en un rango de 0 a 120 ppb en varias soluciones.

Si bien el análisis de los resultados mediante espectrofluorímetro entrega una mayor exactitud y capacidad de discriminación entre los valores obtenidos, es un proceso que requiere de un equipo sofisticado y costoso y que no puede ser utilizado en terreno. Además, estos sistemas presentan un tiempo de análisis mayor al empleado mediante análisis de imagen.

Se compararon los resultados obtenidos de la unión de la secuencia complementaria quencher al nanobiosensor mediante imagen y mediante espectrofluorímetro (Figura 11). Analizando el porcentaje variación de intensidad de fluorescencia con respecto al nanobiosensor en ausencia de la sonda parcialmente complementaria quencher (100%), se observó que para ambas modalidades de lectura (imagen o espectrofluorímetro) se consiguió una mayor disminución porcentual de la intensidad de fluorescencia cuando la relación aptámero-quencher es de 1:6.

Esto es consistente con lo reportado por Chen *et al.*, (2018), quienes trabajaron con el mismo aptámero y sonda parcialmente complementaria quencher. En su trabajo, el candidato de aptámero elegido se marcó con 6-carboxil fluoresceína (FAM) en su terminal 5', mientras que la sonda parcialmente complementaria se marcó con Dabcyl (4- [4- (dimetilamino) fenilazo] ácido benzoico) en su terminal

3'. Los espectros de fluorescencia los obtuvieron a temperatura ambiente mediante espectrofluorímetro modelo Hitachi F-4600 (Hitachi, Japón) con una excitación de 485 nm y un rango de emisión de 500 a 650 nm. Los autores realizaron pruebas con proporciones diferentes, desde 1:0 a 1:12, y lograron determinar que cuando la proporción fue 1:6, los sistemas de detección lograron una disminución máxima de la intensidad de fluorescencia.

En quencher utilizado fue modificado con el respecto al utilizado por Chen *et al.*, (2018). Esto debido a que para conseguir un óptimo apagamiento por parte del quencher, la distancia entre este elemento y aquel que emite la señal, ya sea un fluoróforo o una nanopartícula, debe existir una distancia de entre 2 a 10 nm como máximo (Crisalli & Kool, 2011). Debido a que los QDs utilizados para formular el nanobiosensor son más pequeños que el fluoróforo 6-carboxil fluoresceína utilizado por los autores, se acortó la sonda parcialmente complementaria quencher en un oligonucleótido y además se modificó el aptámero reportado por Chen *et al.*, (2018) para que al momento en que este y la sonda parcialmente complementaria quencher estuviesen unidos la distancia entre la nanopartícula y el quencher no superara los 3 nm.

Mediante análisis de imagen se evaluó el apagamiento del nanobiosensor en distintas condiciones. Se evaluaron 3 proporciones de aptámero quencher (1:0, 1:3 y 1:6). Una vez añadidos los componentes del nanobiosensor (QDs funcionalizadas, secuencia complementaria quencher y buffer) al tubo de reacción se probaron tres condiciones, 10 minutos a 70 °C (T_m del aptámero), temperatura ambiente por 20 minutos antes de ser analizado por imagen y por último 6 horas a temperatura ambiente y luego 10 minutos a 70 °C. Posteriormente se analizó la intensidad de fluorescencia mediante fotografía, utilizando el programa de análisis de imagen ImageJ. Se trabajó en el canal rojo de imagen para el análisis (Figura 12).

Se calculó el límite de detección (LDM) y límite de cuantificación (LDC) para la metodología de cuantificación mediante análisis de imagen. Esto se obtuvo con

fotografías tomadas a pocillos con agua destilada (Blanco) en los ensayos realizados y posteriormente un análisis de imagen mediante el software ImageJ en el canal rojo de imagen. De esta forma se logró identificar los límites que el sistema mediante análisis de imagen es capaz de detectar descartando el ruido de la metodología. El LDM del sistema, con una incertidumbre del 5% fue de 11,3 (Unidades relativas a escala de grises) y un LDC de 34 (Unidades relativas a escala de grises).

Se observó que la sonda parcialmente complementaria quencher logra disminuir la intensidad de fluorescencia de los QDs funcionalizados. La condición que genera una mayor disminución en la intensidad de fluorescencia fue con la proporción aptámero quencher de 1:3, una concentración final de nanobiosensor de 15 $\mu\text{g/ml}$ y 20 $\mu\text{g/ml}$ y una condición de ensayo en la que se sometió a 70°C por 10 minutos con ambas cantidades (2 o 3 nmol) de aptámero funcionalizando la nanopartícula (68,6 y 53,6% respectivamente) (Figura 13 y 14 A). En los resultados reportados por Chen *et al.*, (2018), la proporción aptámero quencher que generó una mayor disminución en la intensidad de fluorescencia fue 1:6 e indujo una disminución del 75,7% de la intensidad de fluorescencia.

5.3 Determinación de plomo con el biosensor

Para conocer si el Pb(II) en solución lograba aumentar la intensidad de fluorescencia del nanobiosensor y por consecuencia poder correlacionar la concentración de plomo con el aumento de la intensidad e fluorescencia, se realizó este experimento (Figura 15).

Se observó que para ambas concentraciones finales de QDs sin funcionalizar probados (15 y 30 $\mu\text{g/ml}$), mayores concentraciones de Pb(II) disminuyen porcentualmente la intensidad de fluorescencia con respecto al ensayo con 0 ppb de Pb(II) (Figura 15 E y F). Varios autores (P. Sharma & Mehata, (2020); Xu *et al.*, (2019); Bano *et al.*, (2019)) reportaron este fenómeno utilizando diferentes tipos de QDs (Cd/Te, MoS_2 y N-CDots). En estos casos se realizó un análisis del

apagamiento de los quantum dots en presencia del analito y se relacionó con la concentración de éste. Si bien este tipo de sensores presenta un cambio medible, no es específico debido a que no se tiene un elemento de reconocimiento específico como un aptámero y además podría existir un falso positivo al disminuir la intensidad de fluorescencia de los QDs debido a que se están desarmando por otro factor y no por la presencia del analito.

Por otro lado, cuando se trabajó con una concentración final de nanobiosensor de 30 µg/ml, utilizando QDs funcionalizados con aptámero, pero sin apagador (Figura 15 D), se presentó el mismo fenómeno que con los quantum dots sin funcionalizar. Una correlación entre la disminución en el porcentaje de fluorescencia y la concentración del Pb(II). De esta manera se podría tener el funcionamiento de un sensor de modalidad "Turn-off" pero con la selectividad que proporciona el aptámero.

Finalmente se observó que al trabajar con una concentración final de nanobiosensor de 30 µg/ml, utilizando QDs funcionalizados con aptámero y con apagador, se presentó un aumento en la intensidad de fluorescencia en presencia de Pb(II) con respecto al nanobiosensor con 0 ppb de ion plomo (Figura 15 B). Similar a nanobiosensores de modalidad "Turn-on" (Chen *et al.*, 2018) que correlacionan el aumento en la intensidad de fluorescencia en presencia de distintas concentraciones del analito.

Para una caracterización más completa del funcionamiento del nanobiosensor se requiere el cálculo del rango lineal de detección y de esta manera tener el límite de detección y poder identificar el ruido del sistema. Por su parte Chen *et al.*, (2018) obtuvieron un rango lineal de detección de 20,83 a 208,3 ppb ($R^2 = 0,989$), un límite de detección de 12,65 ppb para Pb(II). Como el nivel máximo de contaminación de Pb (II) en el agua potable ha sido definido en 15 ppb por la EPA, el nanobiosensor podría ser aplicable para la detección en agua potable. Los autores realizaron el análisis de intensidad de fluorescencia en espectrofluorímetro a 518 nm y con una relación aptámero-quencher de 1:6.

Es necesario, además realizar pruebas de selectividad del nanobiosensor. Para determinar la especificidad de los dos aptámeros, se debe medir la intensidad de fluorescencia del nanobiosensor al ser incubado con diferentes iones metálicos. Chen *et al.*, (2018), mostraron que el aptámero utilizado para el nanobiosensor después de la incubación con Pb(II) y otros iones metálicos interferentes, como Mn(II), Al(III), Cu(II), Co(II), Zn(II), Ca(II), Ba(II), Cd(II), Hg(II), Ni(II) exhibe una excelente selectividad a Pb(II) frente a otros iones metálicos.

Finalmente, y para explorar más a fondo las potenciales aplicaciones del nanobiosensor sería necesario realizar estas pruebas con muestras reales, y cotejar los resultados con metodología robustas como la espectrometría de emisión óptica de plasma acoplado conductivamente. Con estos resultados se podría validar el método para la detección selectiva y simple de Pb(II) en solución.

5.4 Preparación de nanopapel de celulosa bacteriana

Luego del proceso de obtención del papel de nanocelulosa y el posterior secado en estufa, se obtuvo un papel de color blanco translucido, uniforme y de aspecto y textura suave. Este aspecto del papel de nanocelulosa bacteriana obtenida mediante hidrólisis ácida es similar a la reportado por Rozenberga *et al.*, (2016).

Para una caracterización detallada del papel se debió realizar un ensayo de XRD. De esta manera se puede conocer la cristalinidad y el tamaño del cristal. De acuerdo con lo reportado por los autores antes mencionados las películas de celulosa liofilizadas y en polvo fueron medidas a temperatura ambiente en un difractómetro Bruker D8 Advance utilizando radiación de cobre ($\text{CuK}\alpha$) a una longitud de onda de 1.54180\AA . Este dispositivo estaba equipado con un detector sensible a la posición LynxEye para recopilar los datos. El voltaje y la corriente del tubo fueron ajustados a 40 kV y 40 mA respectivamente. La ranura de divergencia se fijó en 0,6 mm y la rendija de antidisipación se fijó en 8,0 mm. Los patrones de difracción se registraron utilizando una velocidad de escaneo de

0.2s/0.02 ° de 5 ° a 50 °. Cristalinidad (Cr) y tamaño de cristal (CrS) se calcularon basándose en las mediciones de difracción de rayos X obtenidas. Para las muestras analizadas los autores obtuvieron valores de cristalinidad de entre 83,87 a 97% y un tamaño de cristal de entre 5,5 a 6,5 nm aproximadamente.

Para conocer la pureza de la celulosa bacteriana obtenida se debió realizar un FT-IR. De esta manera los resultados del espectro se pueden comparar con los datos del espectro de celulosa microcristalina pura. Para este estudio se requiere la liofilización y molienda en pulverizador o molino de bolas del papel de nanocelulosa bacteriana. A partir de esto, los valores del espectro se pueden registrar utilizando un espectrómetro Spectrum One (Perkin-Elmer) con una resolución de 4cm⁻¹.

Rozenberga *et al.*, (2016), reportan que los espectros en el rango de 4500–600 cm⁻¹ revelan la existencia de regiones vibracionales características de C-H fuera del plano de flexión en la región de 900-870 cm⁻¹. La banda en 892 cm⁻¹ se asigna al estiramiento C-O-C en el enlace β(1-4), mientras que las bandas características 1046 cm⁻¹ y 1071-1067 cm⁻¹, se corresponden con la flexión de enlace de carbohidratos C-O-H. El peak de absorción alrededor de 1111 cm⁻¹ es otra banda característica de celulosa y se ajusta a los enlaces C-C de las unidades monoméricas del polisacárido (Fan, Dai, & Huang, 2012). Una débil y amplia banda centrada en 892 cm⁻¹, y una banda fuerte en 1424 cm⁻¹ identifica las muestras como celulosa I (Goh *et al.*, 2012). La banda característica a 2900 cm⁻¹ se atribuye a la vibración de estiramiento C-H y confirma la porción amorfa característica de la celulosa. La banda ancha en el 3600–3100 cm⁻¹ está relacionada con la vibración de valencia de grupos OH unidos por hidrógeno. El enlace de hidrógeno intramolecular de O(2)H···O(6) y O(3)H···O(5) corresponde a las bandas de absorción a 3410 cm⁻¹ y 3380 cm⁻¹ respectivamente. De manera similar, el enlace de hidrógeno intermolecular de O(6)H···O(3) ocurre a 3340 cm⁻¹ (Singh *et al.*, 2013). La aparición de banda en 1732 cm⁻¹ es atribuida al grupo

carboxilato en su forma ácida, y es una consecuencia clara de la reacción de oxidación (Coseri *et al.*, 2013).

En cuanto a la caracterización de las nanofibras es posible realizar un análisis mediante imágenes en microscopio de fuerza atómica (AFM) para confirmar que la reacción de oxidación produjo nanofibras de celulosa. Rozenberga *et al.*, (2016) reportaron que al oxidar los gránulos de CB con persulfato de amonio en medio ácido, el rendimiento de la reacción es del 75,25% de CB en peso seco. Obtuvieron un ancho promedio de las nanofibras de 80 ± 15 nm y una longitud que varió entre 600-1200 nm. Durante el proceso de oxidación, las regiones amorfas se disuelven, por lo tanto, la cristalinidad aumenta, mientras que el grado de polimerización disminuye significativamente. La disminución del tamaño de los cristalitas se puede explicar por el proceso de despolimerización que ocurre durante la oxidación, dado que el proceso de oxidación tiene lugar principalmente en las regiones desordenadas y en la superficie de regiones cristalinas, la despolimerización se producirá por la β -eliminación del grupo aldehído C6 (Biliuta *et al.*, 2013).

Con titulación conductimétrica, Rozenberga *et al.*, (2016) determinaron que el contenido de carboxilo en la fibra oxidada fue de 7,73%. Para determinar el potencial electrocinético de nanofibras midieron el potencial Zeta. Se analizó una solución de nanofibras al 0,07% en peso usando el equipo Zetasizer Nano ZS90. El potencial zeta de nanofibras oxidadas fue de -53,8 mV, lo que indica que las nanofibras son altamente estables en dispersión coloidal.

Para investigar las propiedades mecánicas del nanopapel de CB, se deben probar las muestras en un estado cercano a su estado original, inalterado y autoensamblado en lo posible. El papel secado bajo presión en caliente puede alterar la red de fibrillas en comparación con los papeles secados libremente. La celulosa bacteriana, secada al aire produce una película dura y arrugada que no se puede utilizar para pruebas de tracción. La suspensión debe ser vertida en un

recipiente de vidrio orgánico y luego secada al aire para permitir que las nanofibras se autoensamblen y produzcan una película plana y uniforme (Rozenberga *et al.*, 2016).

Los autores antes mencionados reportaron que en las pruebas mecánicas del papel de CB se obtuvo un módulo de Young de 0.3 Gpa, que se atribuye a limitaciones en la ductilidad como resultado de la alta cristalinidad y grado de polimerización. La deformación por tracción está directamente relacionada con la cristalinidad y el contenido de fase amorfa en muestras de celulosa. La resistencia a la tracción y módulo de Young del nanopapel preparado a partir de nanofibras de CB resultó ser significativamente más alta que las respectivas películas CB. El nanopapel (nanofibras oxidadas) exhibió un módulo de Young 24 veces mayor (7,39 GPa) en comparación con su respectiva película CB (0,3 GPa).

El módulo elástico de una red de fibras depende de una serie de factores, como la orientación de la fibra, la rigidez de la fibra y la interconectividad de la red. Al secarse, el papel se encoge y esto influye significativamente en sus propiedades mecánicas. El papel secado en caliente tiene un mayor módulo de elasticidad en comparación con los papeles de secado libre. Esto generalmente se explica por el concepto de activación de red, donde las secciones de fibra entre los puntos de contacto (segmentos de fibra libres) se estiran y enderezan en un secado restringido, haciéndolos disponibles para transportar cargas (Galland, 2012).

5.5 Unión del nanobiosensor a papel de nanocelulosa bacteriana

En los ensayos en que se funcionalizaron papeles de nanocelulosa bacteriana con quantum dots de Cadmio/teluro se observó que los QDs insertos en la matriz de celulosa bacteriana mantuvieron su emisión de fluorescencia característica al ser expuesto a luz UV (Figura 17).

En cuanto a los ensayos realizados con distintos líquidos para conocer el comportamiento en la adsorción de los QDs al nanopapel de CB (Figura 18), se observó que en solución de alcohol al 10% la intensidad de fluorescencia solo disminuyó con respecto al control (nanopapel funcionalizado con QDs no expuesto a ninguna solución) un 0,21%. En tanto con soluciones de alcohol al 5% y agua destilada, la disminución de la intensidad de fluorescencia medida mediante análisis de imagen con respecto al control fue de 39,28 y 56,42% respectivamente (Figura 19). En experimentos futuros se deben realizar los ensayos de contacto de soluciones de Pb(II) con nanobiosensor adherido al nanopapel en una matriz que no genere cambios en la intensidad de fluorescencia y que el cambio sea únicamente producido por el analito buscado (Pb(II)).

Para una caracterización acabada de estos papeles funcionalizados se debió realizar un análisis de los espectros de absorción UV-vis mediante un espectrofotómetro UV-visible colocando los papeles en celdas de vidrio de 1 cm y analizando en un rango de longitud de onda de 350-700 nm (Pourreza *et al.*, 2015).

Se debió realizar, mediante un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FE-SEM) micrografías del nanopapel desnudo y funcionalizado. De esta manera se puede revelar la presencia de los QDs adsorbidos mediante la comparación de ambas micrografías (Feng *et al.*, 2014).

Con un análisis espectroscópico de rayos X de dispersión de energía (EDX) conectado con FE-SEM sería posible revelar la estabilidad de los QDs o bien si estos se han desarmado en el proceso de funcionalización.

Un análisis termogravimétrico (TGA) sería confirmatorio comparando las curvas de TGA para el nanopapel desnudo y el funcionalizado, en el rango de

temperatura de 25 a 700 °C donde la pérdida de peso total ocurre por debajo de 700 °C para el nanopapel desnudo (Pourreza *et al.*, 2015).

La vida útil y la estabilidad de los dispositivos son factores muy importantes para sus aplicaciones prácticas. Si bien los QDs en solución son muy estables, podrían desarmarse al ser funcionalizados en los nanopapeles o al transcurrir el tiempo. Al inmovilizar los quantum dots en los nanopapeles se puede observar la estabilidad de los nanopapeles funcionalizados almacenándolos en una botella marrón sellada a 4 °C durante cuatro meses y registrando el correspondiente UV-vis. Pourreza *et al.*, (2015) encontraron, trabajando con nanopapeles funcionalizados con AgNPs, una estabilidad significativa demostrada en el bajo cambio en los espectros UV-vis durante tres meses. Esto muestra la larga vida útil de los papeles funcionalizados para aplicaciones prácticas.

Capítulo 6

CONCLUSIÓN

Mediante la fermentación de la cepa bacteriana *K. oboediens* se logró obtener celulosa bacteriana la cual, mediante hidrólisis ácida, se utilizó para formular la matriz biopolimérica la que fue funcionalizada con QDs de Cd/Te.

Se funcionalizaron quantum dots de Cd/Te con aptámero para generar un aptasensor. Se estableció que la proporción aptámero quencher que disminuye en mayor medida la intensidad de fluorescencia fue 1:3, trabajando con una concentración final de nanobiosensor de 15 µg/ml y una condición de ensayo de 70 °C por 10 minutos. Fue posible definir las condiciones de formulación y trabajo del nanobiosensor que permitirán, con ensayos posteriores, correlacionar distintas concentraciones de Pb(II) con intensidades de fluorescencia medidas mediante análisis de imagen. Existe novedad en esto debido a que esta técnica permite realizar análisis mediante imagenología y uso de teléfonos inteligentes, haciendo de esta tecnología simple, de bajo costo y de terreno.

No fue posible evaluar el material funcional en la detección de Pb(II) en agua, pero se realizaron aproximaciones y experiencias que demuestran que las propiedades fluorescentes de los QDs se mantienen, ya que éstos permanecen insertos en la matriz de celulosa bacteriana al ser sumergidos en agua, dando luces de su funcionamiento promisorio para la detección de Pb (II) en muestras acuosas.

Capítulo 7

BIBLIOGRAFÍA

- Aitomäki, Y., & Oksman, K. (2014). Reinforcing efficiency of nanocellulose in polymers, 8–13. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2014.08.010>
- Baby, J., Raj, J. S., Biby, E. T., Sankarganesh, P., Jeevitha, M. V, Ajisha, S. U., & Rajan, S. S. (2010). Toxic effect of heavy metals on aquatic environment, 4(August), 939–952.
- Bacakova, L., Pajorova, J., Tomkova, M., Matejka, R., Broz, A., Stepanovska, J., ... Kallio, P. (2020). Applications of Nanocellulose / Nanocarbon Composites : Focus on Biotechnology and Medicine. *Nanomaterials*, 1–32.
- Bano, D., Kumar, V., Chandra, S., Kumar, V., Mohan, S., Kumar, D., ... Hadi, S. (2019). Synthesis of highly fluorescent nitrogen-rich carbon quantum dots and their application for the turn-off detection of cobalt (II). *Optical Materials*, 92(April), 311–318. <https://doi.org/10.1016/j.optmat.2019.04.045>
- Beauchemin, D. (2002). Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, 74(12), 2873–2894.
- Bhainsa, K. C., & Souza, S. F. D. (2006). Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Aspergillus fumigatus*, 47, 160–164. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2005.11.026>
- Biliuta, G., Frascas, L., Drobeta, M., Persin, Z., Kreze, T., Stana-kleinschek, K., ... Coseri, S. (2013). Comparison study of TEMPO and phthalimide- N -oxyl (PINO) radicals on oxidation efficiency toward cellulose. *Carbohydrate Polymers*, 91(2), 502–507. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.08.047>
- Brunswick, N., Huq, T., Bioworks, C., & Scientifique, R. (2014). Nanocellulose-Based Composites and Bioactive Agents for Food Packaging, (January). <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.578765>
- Chawla, P. R., Bajaj, I. B., Survase, S. a., & Singhal, R. S. (2009). Microbial cellulose: Fermentative production and applications (Review). *Food Technology and Biotechnology*, 47(2), 107–124.
- Chen, C., Wang, R., Guo, L., Fu, N., & Dong, H. (2011). A Squaraine-Based Colorimetric and “ Turn on ” Fluorescent Sensor for Selective Detection of Hg 2 þ in an Aqueous Medium, (3), 13320–13321.
- Chen, Y., Li, H., Gao, T., Zhang, T., Xu, L., Wang, B., ... Pei, R. (2018). Selection of DNA aptamers for the development of light-up biosensor to detect Pb (II). *Sensors & Actuators: B. Chemical*, 254, 214–221. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.07.068>

- Claudio, E. S., Godwin, H. A., & Magyar, J. S. (2002). *Fundamental Coordination Chemistry , Environmental Chemistry , and Biochemistry of Lead (II)* (Vol. 51).
- Coseri, S., Biliuta, G., Simionescu, B. C., Stana-kleinschek, K., Ribitsch, V., & Harabagiu, V. (2013). Oxidized cellulose — Survey of the most recent achievements. *Carbohydrate Polymers*, 93(1), 207–215. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.03.086>
- Crisalli, P., & Kool, E. T. (2011). Multi-Path Quenchers : Efficient Quenching of Common Fluorophores.
- Czaja, W. K., Young, D. J., Kawecki, M., & Brown, R. M. (2007). The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications. *Biomacromolecules*, 8(1), 1–12. <https://doi.org/10.1021/bm060620d>
- Dolez, P. I. (2015). *Nanomaterials Definitions, Classifications, and Applications*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-62747-6.00001-4>
- Fan, M., Dai, D., & Huang, B. (2012). Fourier Transform Infrared Spectroscopy for Natural Fibres.
- Farombi, E. O., Adelowo, O. A., & Ajimoko, Y. R. (2007). Biomarkers of Oxidative Stress and Heavy Metal Levels as Indicators of Environmental Pollution in African Cat Fish (*Clarias gariepinus*) from Nigeria Ogun River, 4(2), 158–165.
- Farzin, L., Shamsipur, M., & Sheibani, S. (2017). Aptamer-based analytical strategies using the nanomaterials for environmental and human monitoring of toxic heavy metals. *Talanta*. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.06.066>
- Feng, J., Shi, Q., Li, W., Shu, X., Chen, A., & Xie, X. (2014). Antimicrobial activity of silver nanoparticles in situ growth on TEMPO- mediated oxidized bacterial cellulose, 21(6), 4557–4567. <https://doi.org/10.1007/s10570-014-0449-2>
- Fuertes, G., Vargas, E., Fuertes, G., Soto, I., Carrasco, R., Vargas, M., ... Lagos, C. (2016). Intelligent Packaging Systems : Sensors and Nanosensors to Monitor Food Quality and Safety, (January). <https://doi.org/10.1155/2016/4046061>
- Galland, A. K. T. D. S. (2012). Elastic properties of cellulose nanopaper, 793–807. <https://doi.org/10.1007/s10570-012-9685-5>
- George, J., Ramana, K. V., Sabapathy, S. N., & Bawa, A. S. (2005). Physico-mechanical properties of chemically treated bacterial (*Acetobacter xylinum*) cellulose membrane. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(8–9), 1323–1327. <https://doi.org/10.1007/s11274-005-3574-0>
- Goh, W., Rosma, A., Kaur, B., Fazilah, A., Karim, A., & Bhat, R. (2012). Microstructure and physical properties of microbial cellulose produced during fermentation of black tea broth (Kombucha).II., 19(1), 153–158.

- Govindrao, P., Ghule, N. W., Haque, A., & Kalaskar, M. G. (2019). Metal nanoparticles synthesis : An overview on methods of preparation , advantages and disadvantages , and applications. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 53(June), 101174. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101174>
- Gutiérrez, P., Godoy, S. E., Torres, S., Oyarzún, P., Sanhueza, I., Díaz-garcía, V., ... Coelho, P. (2020). Improved Antibiotic Detection in Raw Milk Using Machine Learning Tools over the Absorption Spectra of a Problem-Specific Nanobiosensor. <https://doi.org/10.3390/s20164552>
- He, Q., Miller, E. W., Wong, A. P., & Chang, C. J. (2006). A Selective Fluorescent Sensor for Detecting Lead in Living Cells, 9316–9317.
- Hill, H. D., & Mirkin, C. A. (2006). The bio-barcode assay for the detection of protein and nucleic acid targets using DTT-induced ligand exchange, 1(1), 324–337. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.51>
- Huang, D., Niu, C., Wang, X., Lv, X., & Zeng, G. (2012). “ Turn-On ” Fluorescent Sensor for Hg 2+ Based on Single-Stranded DNA Functionalized Mn: CdS/ZnS Quantum Dots and Gold Nanoparticles by Time-Gated Mode.
- Jiang, F., Liu, B., Lu, J., Li, F., Li, D., & Liang, C. (2015). Progress and Challenges in Developing Aptamer-Functionalized Targeted Drug Delivery Systems, 2456(August), 23784–23822. <https://doi.org/10.3390/ijms161023784>
- Jiang, X., Vieweger, M. C., Bollinger, J. C., Dragnea, B., & Lee, D. (2007). Reactivity-Based Fluoride Detection : Evolving Design Principles for Spring-Loaded Turn-On Fluorescent Probes, (4), 11732–11733.
- Kang, Z. (2016). Synthesis , Characterization and Application of Luminescent Quantum Dots and Microcrystalline Phosphors, (October).
- Kim, J., Mun, S., Ko, H., Yun, G., & Kim, J. (2014). Disposable chemical sensors and biosensors made on cellulose paper. *Nanotechnology*, 092001, 25. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/25/9/092001>
- Kim, J., Shim, B. S., Kim, H. S., Lee, Y., Min, S., Jang, D., ... Kim, J. (2015). Review of Nanocellulose for Sustainable Future Materials, 2(2), 197–213. <https://doi.org/10.1007/s40684-015-0024-9>
- Kim, J., & Yun, S. (2006). Discovery of Cellulose as a Smart Material, 4202–4206.
- Kougiannos, E., & Mohanty, S. (2006). Biosensors : A tutorial review, (April), 35–40.
- Kreyling, W. G., Semmler-behnke, M., & Chaudhry, Q. (2010). A complementary definition of nanomaterial. *Nano Today*, 5(3), 165–168. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2010.03.004>
- Kuang, H. (2013). Rapid and Highly Sensitive Detection of Lead Ions in Drinking Water Based on a Strip Immunosensor, 4214–4224. <https://doi.org/10.3390/s130404214>

- Kumar, C. (2009). Nanostructured Oxides. *Nanomaterials for the Life Sciences*, 508.
- Lin, N., & Dufresne, A. (2012). Nanoscale Preparation , properties and applications of polysaccharide nanocrystals in advanced functional nanomaterials : a review. <https://doi.org/10.1039/c2nr30260h>
- Liu, H., Ge, J., Ma, E., & Yang, L. (2019). *Advanced biomaterials for biosensor and theranostics. Biomaterials in Translational Medicine*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813477-1.00010-4>
- Liu, J., Cao, Z., & Lu, Y. (2009). *Functional Nucleic Acid Sensors*.
- Marbella, L., Serli-mitasev, B., & Basu, P. (2009). Development of a Fluorescent Pb 2 + Sensor, 3996–3998. <https://doi.org/10.1002/anie.200806297>
- Mays, D. E., & Hussam, A. (2009). Voltammetric methods for determination and speciation of inorganic arsenic in the environment — A review, 646, 6–16. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.05.006>
- Mazumdar, M., Bellinger, D. C., Gregas, M., Abanilla, K., Bacic, J., & Needleman, H. L. (2011). Low-level environmental lead exposure in childhood and adult intellectual function : a follow-up study. *Environmental Health*, 10(1), 24. <https://doi.org/10.1186/1476-069X-10-24>
- Michalek, P., Rodrigo, M. M., Heger, Z., Vaculovicova, M., Hynek, D., Adam, V., & Kizek, R. (2015). Nanoscale virus biosensors : state of the art, 47–66.
- Mohammadi, H., Yammouri, G., & Amine, A. (2019). Current advances in electrochemical genosensors for detecting microRNA cancer markers. *Current Opinion in Electrochemistry*, 16, 96–105. <https://doi.org/10.1016/j.coelec.2019.04.030>
- Morales-narváez, E., Golmohammadi, H., Naghdi, T., Kostiv, U., Horak, D., Pourreza, N., & Merkoçi, A. (2015). Nanopaper as an Optical Sensing Platform.
- Mortazavi, D., Kouzani, A. Z., & Kaynak, A. (2011). Nano-plasmonic Biosensors : A Review, 31–36.
- Nasrollahzadeh, M., Sajadi, S. M., & Sajjadi, M. (2019). *An Introduction to Nanotechnology. An Introduction to Green Nanotechnology* (1st ed., Vol. 28). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813586-0.00001-8>
- Neupane, L. N., Park, J., Park, J. H., & Lee, K. (2013). Turn-on Fluorescent Chemosensor Based on an Amino Acid for Pb (II) and Hg (II) Ions in Aqueous Solutions and Role of Tryptophan for Sensing, (II).
- Núñez, D., Cáceres, R., Ide, W., Varaprasad, K., & Oyarzún, P. (2020). An ecofriendly nanocomposite of bacterial cellulose and hydroxyapatite efficiently removes lead from water. *International Journal of Biological Macromolecules*, 165, 2711–2720. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.055>

- Oberdörster, G., Oberdörster, E., & Oberdörster, J. (2005). Nanotoxicology : An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles, *113*(7), 823–839. <https://doi.org/10.1289/ehp.7339>
- Osha. (2004). Safety and Health Topics: Toxic Metals.
- Parolo, C., & Merkoci, A. (2013). Paper-based nanobiosensors for diagnostics, 450–457. <https://doi.org/10.1039/c2cs35255a>
- Perez-Donoso, J., Monra, J. P., Bravo, D., Aguirre, A., Quest, A. F., Igor, O., ... Va, C. C. (2012). Biomimetic , Mild Chemical Synthesis of CdTe-GSH Quantum Dots with Improved Biocompatibility, *7*(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030741>
- Pietrojusti, A., & Magrini, A. (2014). Engineered nanoparticles at the workplace : current knowledge about workers ' risk, 319–330. <https://doi.org/10.1093/occmed/kqu051>
- Pourreza, N., Golmohammadi, H., Naghdi, T., & Youse, H. (2015). Biosensors and Bioelectronics Green in-situ synthesized silver nanoparticles embedded in bacterial cellulose nanopaper as a bionanocomposite plasmonic sensor, *74*, 353–359. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.06.041>
- Reshma, V. G., & Mohanan, P. V. (2019). Quantum dots : Applications and safety consequences, *205*(September 2018), 287–298. <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2018.09.015>
- Rozenberga, L., Skute, M., Belkova, L., Sable, I., Vikele, L., Semjonovs, P., ... Paegle, L. (2016). Characterisation of films and nanopaper obtained from cellulose synthesised by acetic acid bacteria. *Carbohydrate Polymers*, *144*, 33–40. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.02.025>
- Safarik, I., Baldikova, E., Prochazkova, J., & Pospiskova, K. (2019). Smartphone-based image analysis for evaluation of magnetic textile solid phase extraction of colored compounds. *Heliyon*, *5*(July), e02995. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02995>
- Saleh, T. A., Gupta, V. K., & Al-saadi, A. A. (2013). Adsorption of lead ions from aqueous solution using porous carbon derived from rubber tires : Experimental and computational study. *Journal of Colloid And Interface Science*, *396*, 264–269. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2013.01.037>
- Sengani, M., Mihai, A., & Rajeswari, V. D. (2017). Recent trends and methodologies in gold nanoparticle synthesis – A prospective review on drug delivery aspect. *OpenNano*, *2*(January), 37–46. <https://doi.org/10.1016/j.onano.2017.07.001>
- Sethy, S. K., & Ghosh, S. (2013). Effect of heavy metals on germination of seeds, *4*(2), 272–275. <https://doi.org/10.4103/0976-9668.116964>
- Sharma, B., Singh, S., & Siddiqi, N. J. (2014). Biomedical implications of heavy metals induced imbalances in redox systems. *BioMed Research International*, *2014*. <https://doi.org/10.1155/2014/640754>

- Sharma, P., & Mehata, M. S. (2020). Rapid sensing of lead metal ions in an aqueous medium by MoS₂ quantum dots fluorescence turn-off. *Materials Research Bulletin*, 110978. <https://doi.org/10.1016/j.materresbull.2020.110978>
- Sherje, A. P., Jadhav, M., Dravyakar, B. R., & Kadam, D. (2018). Dendrimers : A versatile nanocarrier for drug delivery and targeting. *International Journal of Pharmaceutics*, 548(1), 707–720. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.07.030>
- Singh, M., Goswami, N., Sahai, A., Jain, V., Mathur, G., & Mathur, A. (2013). Effect of media components on cell growth and bacterial cellulose production from *Acetobacter aceti* MTCC 2623. *Carbohydrate Polymers*, 94(1), 12–16. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.01.018>
- Super Intendencia de Servicios Sanitarios. (2007). MANUAL DE MÉTODOS PARA AGUA POTABLE.
- Taokaew, S., Seetabhawang, S., Siripong, P., & Phisalaphong, M. (2013). Biosynthesis and Characterization of Nanocellulose-Gelatin Films, 782–794. <https://doi.org/10.3390/ma6030782>
- Taton, A. (2002). Preparation of Gold Nanoparticle – DNA Conjugates, 1–12.
- Toh, S., Citartan, M., Gopinath, S., & Tang, T.-H. (2014). Aptamers as a Replacement for Antibodies in Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Biosensors and Bioelectronic*. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.09.026>
- Tombelli, S., Minunni, M., & Mascini, M. (2005). Analytical applications of aptamers, 20, 2424–2434. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2004.11.006>
- Tuerk, C., & Gold, L. (1990). Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment : RNA Ligands to Bacteriophage EI-T, (9).
- Vázquez-gonzález, M., & Carrillo-carrion, C. (2014). Analytical strategies based on quantum dots for heavy metal ions detection. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.19.10.101503>
- Vosyliene, M., & Jankaite, A. (2006). Effect of heavy metal model mixture on rainbow trout biological parameters, (4), 12–17.
- Wani, A. L., Ara, A., & Usmani, J. A. (2015). Lead toxicity : a review, 8(2), 55–64. <https://doi.org/10.1515/intox-2015-0009>
- Watanabe, K., & Yamanaka, S. (2014). Effects of Oxygen Tension in the Gaseous Phase on Production and Physical Properties of Bacterial Cellulose Formed under Static Culture Conditions, 8451. <https://doi.org/10.1271/bbb.59.65>
- Wei, H., Rodriguez, K., Remmeckar, S., Leng, W., & Vikesland, P. (2015). Preparation and Evaluation of Nanocellulose Gold Nanoparticle Nanocomposites for SERS Applications. <https://doi.org/10.1039/C5AN00606F>

- Xu, L., Lu, D., Shi, Q., Chen, H., Xie, S., Li, G., ... She, Y. (2019). ZnCdSe-CdTe quantum dots : A “ turn-off ” fluorescent probe for the detection of multiple adulterants in an herbal honey, 221.
<https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.117212>
- Yang, G., Xie, J., Deng, Y., Bian, Y., & Hong, F. (2012). Hydrothermal synthesis of bacterial cellulose / AgNPs composite : A “ green ” route for antibacterial application. *Carbohydrate Polymers*, 87(4), 2482–2487.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.11.017>
- Zhang, J., Cheng, F., Li, J., Zhu, J., & Lu, Y. (2016). Fluorescent nanoprobe for sensing and imaging of metal ions: Recent advances and future perspectives. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2016.05.010>
- Zheng, L., Cai, G., & Wang, S. (2018). A microfluidic colorimetric biosensor for rapid detection of Escherichia coli O157 : H7 using gold nanoparticle aggregation and smart phone imaging. *Biosensors and Bioelectronics*.
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.10.006>