

5 **MÉTODO PARA MEDIR E IDENTIFICAR ENTES BIOLÓGICOS A PARTIR DEL
AUMENTO DE LA SENSIBILIDAD DE LA DISPERSIÓN DE LUZ LÁSER**

Campo de la invención

- 10 La invención pertenece al campo de la física-química. Específicamente al de los métodos de medición de entes biológicos por medio de luz.

Estado de la técnica

- 15 En el estado de la técnica se encuentra la patente JP2010243374 que describe un “Aparato de medición del tamaño de partículas de nanopartículas y método de medición del tamaño de partículas de nanopartículas”. En la misma se describe un dispositivo de mano que permite medir nanopartículas.

- 20 También la patente CN104568683 describe un “Dispositivo y método para la medición de nanopartículas”. La invención divulga un dispositivo y método de medición del tamaño de nanopartículas. El dispositivo consta de una fuente de láser, una celda de muestra, lentes, un área dispositivo fotosensible de matriz y una computadora, en donde los rayos láser emitidos por la fuente láser irradian nanopartículas en la celda de muestra después de ser convergidas, las partículas generan señales de dispersión de luz dinámicas y convergentes.
- 25 Realizando el movimiento browniano en la celda de muestra bajo la irradiación de láser incidente, y convergen después de pasar a través de la segunda lente, el dispositivo fotosensible de matriz de área dispuesto en el plano focal de la lente realiza la grabación en un intervalo de tiempo de Δt para obtener dos imágenes de señal de dispersión de luces dinámicas del movimiento de las nanopartículas, y transmite las imágenes a la
- 30 computadora, y la computadora calcula un coeficiente de correlación de las dos imágenes mediante la adopción de un algoritmo de correlación, y determina la tamaño de partícula de las nanopartículas según el coeficiente de correlación.

5 El uso de luz para medir nanopartículas, en especial nanopartículas metálicas, es un método conocido en el estado de la técnica. Sin embargo, la solución propuesta no mide el tamaño de nanopartículas, sino de entes biológicos, que presentan características particulares que dificultan su medición. El método es posible a partir del aumento de la sensibilidad a la luz en los entes por medio de un recubrimiento en nanopartículas metálicas. Esto la diferencia de las solicitudes encontradas de manera sustancial ya que no se trata solamente de medir el tamaño de la nanopartícula y calcular la diferencia, sino de lograr el recubrimiento idóneo de los entes.

Breve descripción de la invención

15 El método propuesto, provee una solución al problema planteado a partir del uso de nanopartículas metálicas que se adhieren a los entes biológicos que serán objeto de análisis, recubriéndolos, disminuyendo su transmisión y aumentando su reflexión. Ello permite, conociendo el tamaño de la nanopartícula, calcular de manera exacta el tamaño del ente biológico al que se adhiere.

20

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Muestra un diagrama de flujo del método

25

Descripción detallada de la invención

Las técnicas de medición del tamaño de entes biológicos mediante dispersión de luz láser presentan problemas de precisión debido a que las moléculas orgánicas que los componen suelen tener una alta transmisión y baja reflexión de la luz.

30 El método propuesto, provee una solución al problema planteado a partir del uso de nanopartículas metálicas que se adhieren a los entes, recubriéndolos, disminuyendo su transmisión y aumentando su reflexión. Ello permite, conociendo el tamaño de la nanopartícula, calcular de manera exacta el tamaño del ente biológico al que se adhiere.

5 El método implica la toma de una muestra del ente biológico diluido que puede ser una proteína, una bacteria o un virus a baja concentración y mezclarlo en una proporción variable con una solución de nanopartículas de oro, plata o platino, que tengan preferiblemente un tamaño de 2 a 10 nm y que deben haber sido previamente medidas.

La proporción de la mezcla se realiza en iteraciones que van en aumento desde 1:1000
10 hasta 1:1 de nanopartículas versus la solución del agente biológico. De tal forma que se pueda identificar la proporción exacta requerida para que la nanopartícula recubra al ente en su totalidad sin enmascarar la señal recibida.

La síntesis de las nanopartículas se lleva a cabo a partir de las siguientes etapas:

1. Preparar 1 ml de una solución de HAuCl al 4% en agua desionizada.
- 15 2. Añadir 375 µL de la solución de HAuCl al 4% más 500 µL de 0.2-M K₂CO₃, a 100 ml de agua desionizada.
3. Disolver borohidruro de sodio (NaBH₄) en 5 ml de agua a una concentración de 0,5 mg/ml a 4°C en el momento de la síntesis.
4. Añadir 5 partes alícuotas de 1 ml de solución de borohidruro de sodio a la
20 suspensión de ácido cloroáurico/carbonato con agitación rápida.
5. Revolver durante 5 min en hielo después de finalizada la adición de borohidruro de sodio.

Las nanopartículas interaccionan con el ente biológico debido a que el agente de capa
25 usado (carbonato) es de adherencia débil. Ello permite una mejor interacción con el ente biológico el cual contiene grupos químicos más afines a la nanopartícula como son: tioles, aminas, hidróxidos, entre otros.

Luego se hace la medición del tamaño del ente usando un instrumento de dispersión
dinámica de la luz láser. Conociendo el tamaño de la nanopartícula y a partir del cálculo en
30 la diferencia de diámetros hidrodinámicos, se puede determinar el tamaño del ente. Una vez determinado el tamaño del ente es posible identificar el ente en una muestra. De tal forma que el método permite el cálculo del tamaño y, a partir del mismo, realizar nuevas identificaciones.

- 5 La determinación del tamaño del ente y la subsecuente clasificación del mismo pueden ser ejecutados por medio de un algoritmo que automatice el proceso. Si bien en la modalidad provista de la invención se realiza de manera manual.

EJEMPLO

- 10 En un ejemplo de aplicación de la invención, el método se usó con una muestra biológica de un virus (SARS COVID-19) obtenida a través de hisopado y conservada en medio de cultivo de viral y cuyo tamaño era previamente conocido, sin embargo, con la operación de resta de diámetros hidrodinámicos, es posible aplicar el método con entes de tamaño desconocido.
- 15 Se realizaron mediciones en muestras positivas y negativas para poder contrastar los resultados. Se procedió a realizar el recubrimiento de la muestra con nanopartículas de oro de 2, 5 y 10 nm. Se determinó que la proporción idónea era de 900 μ L de nanopartícula versus 100 μ L de la muestra (10:1).

- Luego se midieron las muestras recubiertas y se determinaron las distribuciones de tamaño de cada muestra. Conociendo previamente el tamaño del virus SARS COVID-19, se espera un pico que represente el tamaño del virus más 2X el tamaño de la nanopartícula. Así, sabiendo que el virus mide entre 80-10 nm, las muestras debían tener un tamaño que oscile entre 84-104 nm usando las nanopartículas de 2 nm y de 100-200 nm usando las nanopartículas de 10nm.
- 25 Los resultados, mostraron la presencia de señales de intensidad de la luz en las muestras positivas, y ausencia de la misma en las negativas.

