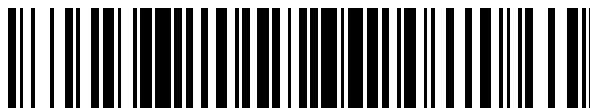


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 527 893**

21 Número de solicitud: 201300722

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/34** (2006.01)

**G01N 27/06** (2006.01)

**G01N 33/497** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A2

22 Fecha de presentación:

**30.07.2013**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**30.01.2015**

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DE SEVILLA (100.0%)**

**Paseo de las Delicias s/n- Pabellón de Brasil  
41013 Sevilla ES**

72 Inventor/es:

**PRADO GOTOR , Rafael y**

**CASTILLO HERNÁNDEZ , Paula Margarita**

54 Título: **Procedimiento para la detección colorimétrica de lisozima por nanopartículas agregadas de oro**

57 Resumen:

Procedimiento para la detección colorimétrica de lisozima por nanopartículas agregadas de oro. La presente invención tiene por objeto un procedimiento que permite detectar lisozima en disolución acuosa, añadiendo nanopartículas de oro protegidas con iones citrato y agregadas previamente mediante el uso de una sal como es el NaCl a una determinada concentración.

Es una herramienta de diagnóstico médico eficaz que permitirá la detección de diversas patologías como leucemia o enfermedades renales.

ES 2 527 893 A2

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la detección colorimétrica de lisozima por nanopartículas agregadas de oro.

### 5 Objeto de la invención

La presente invención tiene por objeto un procedimiento que permite detectar lisozima, añadiendo nanopartículas de oro protegidas con iones citrato y agregadas previamente mediante el uso de una sal como es el NaCl a una determinada concentración.

- 10 Es una herramienta de diagnóstico médico eficaz que permitirá la detección de diversas patologías como leucemia o enfermedades renales.

### Estado de la técnica

La nanotecnología ha abierto nuevas vías de investigación aplicadas a la  
15 medicina, tanto en diagnóstico médico, como en imagen (Sequence-selective detection of double-stranded DNA sequences using pyrrole-imidazole polyamide microarrays. Ishwar Singh, Christian Wendeln, Alasdair William Clark, Jonathan Mark Cooper, Bart Jan Ravoo, and Glenn A. Burley. J. Am. Chem. Soc., Just Accepted (Feb 2013)) o como vehículos farmacéuticos (Folate-Receptor-Targeted  
20 Delivery of Doxorubicin Using Polyethylene Glycol-Functionalized Gold Nanoparticles. Bahareh Asadishad, Manouchehr Vossoughi, and Iran Alemzadeh. Ind. Eng. Chem. Res. 1958, 49, pp1958–1963(2010)). Las np de base orgánica están ampliamente aceptadas y se emplean especialmente como transportadores de fármacos (Polymeric emulsion and crosslink-mediated synthesis of super-stable  
25 nanoparticles as sustained-release anti-tuberculosis drug carriers. Yahya E. Choonara, Viness Pillay, Valence M.K. Ndesendo, Lisa C. du Toit, Pradeep Kumar, Riaz A. Khan, Caragh S. Murphy, Debbie-Leigh Jarvis. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 87. pp 243– 254 (2011)). De entre las inorgánicas, son las compuestas de óxidos de hierro en la forma de magnetita, las que gozan de mayor  
30 aceptación; aprobadas por la FDA, pueden ser usadas como agente de contraste en RMI o destrucción tumoral por hipertermia (One-Pot Synthesis of PEGylated Ultrasmall Iron-Oxide Nanoparticles and Their in Vivo Evaluation as Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents. Jean-Francois Lutz, Sabrina Stiller, Ann Hoth, Lutz Kaufner, Ulrich Pison, and Régis Cartier. Biomacromolecules, 7, pp  
35 3132-3138 (2006)). Además de las de magnetita, las np de metales nobles, especialmente de plata y/o oro son las más empleadas en aplicaciones

biomédicas pues sus interesantes propiedades ópticas que las diferencian del resto de np dan lugar a detecciones rápidas y directas por técnicas espectroscópicas (Surface Plasmon Resonance Scattering and Absorption of anti-EGFR Antibody Conjugated Gold Nanoparticles in Cancer Diagnostics: Applications in Oral Cancer Ivan H. El-Sayed, Xiaohua Huang, and Mostafa A. El-Sayed Nano Lett., 5 (5), pp 829-834 (2005)). Estas propiedades ópticas o su gran capacidad de dispersión de luz, las convierten en sensores ideales, por lo que desde hace más de una década las nanopartículas de oro se emplean en aplicaciones biomédicas como en la detección de ADN (A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials. Mirkin, CA et al. Nature, 382, pp 607-609 (1996)), sensores de glucosa (Polymerized Colloidal Crystal hydrogel films as intelligent chemical sensing materials. H.J. Holtz, S.A. Asher. Nature 389, pp 829-832 (1997)) e incluso en la detección de células cancerosas (Gold Nanoparticle-Based Colorimetric Assay for the Direct Detection of Cancerous Cells. Colin D. Medley, Joshua E. Smith, Zhiwen Tang, Yanrong Wu, Suwussa Bamrungsap, and Weihong Tan. Anal. Chem. 80, pp 1067-1072 (2008)).

Las nanopartículas de metales nobles son especialmente interesantes como sensores colorimétricos. Cuando una biomolécula interacciona con la superficie de una nanopartícula, la distancia entre nanopartícula cambia y con ella la dispersión de la luz emitida, pudiendo ser visible a simple vista. Existen sensores colorimétricos, basados en np de plata (Interaction of DNA bases with silver nanoparticles: Assembly quantified through SPRS and SERS. Basu, S., et al. Journal of Colloid and Interface Science. 321, pp. 288-293 (2008)) y oro (Sensitive and Visual Detection of Sequence-Specific DNA Binding Protein via a Gold Nanoparticle-Based Colorimetric Biosensor. Li-Juan Ou, Pei-Yan Jin, Xia Chu, Jian-Hui Jiang, and Ru-Qin Yu Anal. Chem. 82, pp 6015–6024 (2010)) que cambian de color a simple vista debido a la presencia de ADN ó como detectores de células cancerosas (Gold Nanoparticle-Based Colorimetric Assay for the Direct Detection of Cancerous Cells. Colin D. Medley, Joshua E. Smith, Zhiwen Tang, Yanrong Wu, Suwussa Bamrungsap, and Weihong Tan. Anal. Chem. 80, pp 1067-1072 (2008)) (Aptamer-Nanoparticle Strip Biosensor for Sensitive Detection of Cancer Cells. Guodong Liu, Xun Mao, Joseph A. Phillips, Hui Xu, Weihong Tan, and Lingwen Zeng. Anal. Chem. 81, pp 10013–10018 (2009)).

35

Desde hace más de una década, el reconocimiento de proteínas es una de las aplicaciones más interesantes de las nanopartículas de oro en aplicaciones de diagnóstico médico (Colloidal Gold, Principles, Methods and Applications; Hayat, M. A. Academic Press: New York, (1989).). Otras aplicaciones que se describen en la bibliografía, se refieren al uso de nanopartículas de oro como sensores de diversos carbohidratos en aplicaciones biológicas como en el marcado de proteínas (Metal nanocolloids. Belloni, J. Curr. Opin. Colloid Interface Sci.1, pp184-196 (1996)). Igualmente, se han formado bioconjugados de nanopartículas de oro con lípidos (Spatial organization and patterning of gold nanoparticles on self-assembled biolipid tubular templates. Burkett, S. L.; Mann, S. Chem. Commun., 321-322 (1996)), enzimas (A Method to Construct a Third-Generation Horseradish Peroxidase Biosensor: Self-Assembling Gold Nanoparticles to Three-Dimensional Sol-Gel Network. Jia, J.; Wang, B.; Wu, A.; Cheng, G.; Li, Z.; Dong, S. Anal. Chem. 74, pp 2217-2223 (2002)) o virus (Gold Nanoparticles as Spectroscopic Enhancers for in Vitro Studies on Single Viruses. Dragnea, B.; Chen, C.; Kwak, E.-S.; Stein, B.; Kao, C. C. J. Am. Chem. Soc., 125, pp 6374-6375. (2003)).

Las nanopartículas compuestas por metales nobles como plata y oro son sensores colorimétricos ideales, debido a sus propiedades ópticas como la capacidad de dispersar luz en intensos colores. En los sensores convencionales basados en nanopartículas, se parte de una dispersión estable de nanopartículas sobre la cual se va adicionando la especie de interés provocando el cambio de color en la dispersión debido a la agregación de las nanopartículas. Cuando una biomolécula interacciona con la superficie de una nanopartícula, la distancia entre nanopartículas cambia y con ella la dispersión de la luz emitida, pudiendo ser visible a simple vista. Existen sensores colorimétricos, basados en nanopartículas de plata (Interaction of DNA bases with silver nanoparticles: Assembly quantified through SPRS and SERS. Basu, S., et al. Journal of Colloid and Interface Science 321, pp. 288-293 (2008)) y oro (Sensitive and Visual Detection of Sequence-Specific DNA Binding Protein via a Gold Nanoparticle-Based Colorimetric Biosensor. Li-Juan Ou, Pei-Yan Jin, Xia Chu, Jian-Hui Jiang, and Ru-Qin Yu. Anal. Chem. 82, pp 6015–6024. (2010)) que cambian de color a simple vista debido a la presencia de ADN ó como detectores de células cancerosas (Gold Nanoparticle-Based Colorimetric Assay for the Direct Detection of Cancerous Cells. Colin D. Medley, Joshua E. Smith, Zhiwen Tang, Yanrong Wu, Suwussa Bamrungsap, and Weihong Tan. Anal. Chem. 80, pp 1067-1072 (2008)) (Aptamer-Nanoparticle Strip

Biosensor for Sensitive Detection of Cancer Cells. Guodong Liu, Xun Mao, Joseph A. Phillips, Hui Xu, Weihong Tan, and Lingwen Zeng. *Anal. Chem.*, 81, pp 10013–10018 (2009)). En cualquier caso, en todas ellas se parte de la nanopartícula aislada, funcionalizada o no, pero no agregada.

5

El sensor colorimétrico objeto de la presente invención, es un procedimiento sencillo para la detección de lisozima por nanopartículas aniónicas de oro previamente agregadas. A diferencia de todos los métodos anteriores, se parte de clusters de oro agregados previamente mediante la adición de una sal inerte como el cloruro sódico.

10

Existen antecedentes relativos a trabajos centrados en el empleo de nanopartículas aniónicas de oro para detectar lisozima en disolución. W.L.Tseng y colaboradores (Colorimetric detection of lysozyme based on electrostatic interaction with human serum albumin-modified gold nanoparticles. Yi-Ming Chen; Cheng-Ju Yu; Tiang-Lu Cheng and Wei-Lung Tseng. *Langmuir* 24, pp 3654-60 (2008)) estudiaron la interacción de nanopartículas de oro de con esta proteína. Sin embargo, el método descrito no es directo, pues es necesaria modificación covalente previa de la superficie de los nanoclusters. Además, en los métodos descritos, se controla el seguimiento del cambio de color de la dispersión del rojo al azul (de menor a mayor longitud de onda) y la fuerza iónica del medio influye notablemente como agente interferente. Siguiendo estos cambios de color del rojo al azul que implican agregación descontrolada de las nanopartículas por parte de la lisozima se consiguen bajos límites de detección. De hecho no se usa este método tan sencillo basado en la espectroscopía UV-visible sino que los investigadores usan técnicas más complejas como la Resonance Light-Scattering que requieren equipos más costosos y personal más cualificado (Direct Determination of Urinary Lysozyme Using Surface Plasmon Resonance Light-Scattering of Gold Nanoparticles. Xinyi Wang, Yao Xu, Xiao Xu et al. *Talanta* 82 pp 693-697 (2010)). La otra posibilidad descrita anteriormente es funcionalizar a las nanopartículas mediante un aptámero que sea sensible a la presencia de lisozima. Este no es un método directo y requiere, a diferencia del aquí propuesto, complejas formulaciones que implican los consiguientes costes económicos, tiempo y personal con formación específica.

35

En el nuevo método que hemos desarrollado, partimos justo de la situación opuesta a los anteriormente descritos, y en nuestro caso se toma como referencia el color azul de los nanosistemas que han sido previamente agregados de forma controlada mediante NaCl 0.1 M. Ese color azul de los nanoclusters agregados es tomado como referencia. Al tratar de llevar a cabo esta misma experiencia de agregación en muestras problema que contienen a la proteína hemos constatado que la presencia de ésta evita la agregación total de las nanopartículas. Esta agregación parcial es la que en nuestro método es utilizada como punto de partida para realizar la cuantificación. Con nuestro método se consigue una sensibilidad del mismo orden de magnitud que en los anteriores casos citados de sensores con nanopartículas de oro, y aporta unas ventajas principales que suplen las inconveniencias de los métodos anteriormente descritos. Nuestro método es más directo y puede ser utilizado por el público en general, por no requerir previas funcionalizaciones de las nanopartículas. Es más rápido y barato, pues incluso a simple vista son observables los grados de agregación según la concentración de lisozima en la muestra problema o en su caso, un espectrofotómetro UV-vis, es un equipo habitual, típico y de fácil manejo presente en cualquier laboratorio experimental.

## 20 Descripción de las figuras

Figura 1. Nuevo Modelo de detección de lisozima (método 2) en comparación con el existente (método 1).

El método 1 indicado en la figura, está basado en el descrito en bibliografía (Colorimetric Detection of Lysozyme Based on Electrostatic Interaction with Human Serum Albumin-Modified Gold Nanoparticles. Yi-Ming Chen, Chen-Ju Yu, Tian-He Cheng and Wei-Luang Tseng. Langmuir 24, pp 3654-3660 (2008)) en el que, partiendo de nanopartículas sin agregar, se va añadiendo lisozima para estudiar mediante espectroscopía UV-vis los cambios en el plasmón de superficie ( $\Delta\lambda$ ) que se producen desde menores (línea negra) a mayores (línea gris) longitudes de onda. Este método sólo es sensible si se funcionalizan las nanopartículas. De hecho los autores las funcionalizan con la proteína HSA (human serum albumin). Si se emplean nanopartículas sin funcionalizar el comportamiento es el mismo que el descrito en la figura pero con una sensibilidad muy baja.

En el método 2 propuesto por nosotros, el estudio de los cambios del plasmón de superficie de las nanopartículas se produce de forma inversa, de mayores (línea

gris) a menores (línea negra) longitudes de onda Siguiendo el grado de no agregación cuando la lisozima está presente.

Figura 2. Grado de desagregación (medido como  $\Delta\lambda$ ) frente a las concentraciones de lisozima.

5 Se representan los valores obtenidos mediante espectroscopía UV-vis de las variaciones en los desplazamientos del plasmón de superficie de las nanopartículas (nm) frente a concentraciones de lisozima crecientes (M). El punto  $\Delta\lambda = 0$  corresponde al punto tomado como referencia, disolución de oro y sal en ausencia de lisozima.

10 Figura 3. Determinación del límite de detección del biosensor.

Se representa en la recta de calibrado mostrando una relación lineal entre las  $\Delta\lambda$  obtenidas según la figura 2 y las concentraciones de lisozima. De esta figura se obtiene un notable límite de detección inferior a  $10^{-8}$  M.

## 15 Descripción de la invención

El objeto de la invención es la descripción de un método sencillo y directo, que permite incluso a simple vista detectar lisozima, empleando nanopartículas de oro que han sido previamente agregadas mediante la adición de un electrolito inerte como el NaCl. El sensor se basa en las interacciones electrostáticas que  
 20 tienen lugar debido al carácter aniónico de las nanopartículas de oro.

La lisozima se encuentra en el suero y en la orina. Una mayor concentración de ésta proteína, está asociada a diversas patologías como la leucemia, meningitis o enfermedades renales. Adicionalmente, la lisozima  
 25 obtenida de la clara de huevo de gallina, se emplea asiduamente como agente antimicrobiano en la industria alimentaria. La lisozima es una enzima con un alto punto isoelectrico (11.35) que hidroliza las paredes de polisacáridos de las bacterias, por lo que se encuentra ampliamente distribuida en las secreciones y en los tejidos del cuerpo. El aumento de la concentración de lisozima en la orina y en  
 30 el suero de un paciente se asocia a diversas enfermedades como la leucemia (Light chain proteinuria and lysozymuria in a patient with acute monocytic leukaemia. Levinson, S. S.; Elin, R. J; Yam, L. Clin. Chem. 48, pp 1131-1132 (2002)), con enfermedades renales (Urinary lysozyme, ribonuclease, and low-molecular-weight protein in renal disease. Harrison, J. F.; Lunt, G. S.; Scott, P.;  
 35 Blainey, J. D. Lancet 1, pp 371-375. (1968).) y con meningitis (Cerebrospinal fluid

lysozyme in bacterial and viral meningitis. Klockars, M.; Reitamo, S.; Weber, T.; Kerttula, Y. *Acta Med. Scand.*, 203, pp 71-74 (1978)). Este método de detección rápido basado en nanopartículas de oro agregadas previamente mediante el uso de una sal como es el NaCl a una determinada concentración, se plantea como un potencial método de diagnóstico rápido y eficaz diseñado para detectar este tipo de patologías.

Hasta el momento, la detección cuantitativa de lisozima se ha conseguido mediante técnicas cinéticas turbidimétricas que requieren el uso de costosos equipamientos (Improved turbidimetric assay for lysozyme in urine. Houser, M.T. *Clin. Chem.*, 29, pp 1488-1493 (1983)) (Turbidimetric and HPLC assays for the determination of formulated lysozyme activity. Liao, Y.H.; Brown, M.B.; Martin, G.P.J. *Pharm. Pharmacol.* 53, pp 549-554 (2001)). Sólo recientemente se han empleado nanopartículas de oro para la detección a partir de cambios colorimétricos. Sin embargo, éstas nanopartículas, a diferencia de los empleados por nosotros, han sido previamente funcionalizadas y el método de detección se basa en el cambio colorimétrico de la banda del plasmón de superficie hacia longitudes de onda mayores (Colorimetric Detection of Lysozyme Based on Electrostatic Interaction with Human Serum Albumin-Modified Gold Nanoparticles. Yi-Ming Chen, Chen-Ju Yu, Tian-He Cheng and Wei-Luang Tseng. *Langmuir* 24, pp 3654-3660 (2008)). En el método que proponemos es posible emplear nanopartículas comerciales, sin ningún tipo de sustancia adsorbida a la nanopartícula, sea polímero, proteína, etc.... Tan sólo es necesario partir previamente de las nanopartículas agregadas de forma controlada y tomar el color azul como punto de referencia. Mediante espectroscopía UV-vis se observa como la vuelta hacia valores de longitudes de onda menores, indica la presencia de la lisozima en disolución. Debido a las propiedades ópticas de las nanopartículas de metales nobles que se manifiestan en su capacidad de dispersar la luz y en su característico plasmón de superficie, es posible detectar el ensayo positivo o negativo de presencia de lisozima a simple vista gracias al cambio de color que se produce, y además, la concentración puede ser cuantificada de forma rápida, efectiva y sensible mediante espectroscopía UV-vis.

Se han llevado a cabo experiencias de agregación de nanopartículas de oro protegidas con iones citrato por diferentes concentraciones de NaCl. Concretamente nanopartículas de 10 nm se agregan en unos pocos segundos en



presencia de NaCl 0.1 M. Su color azul sirve como referencia para detectar la posible presencia de lisozima en una disolución o muestra problema. La presencia de proteína protege a las nanopartículas de la agregación por parte del electrolito inerte, produciéndose un desplazamiento de la banda de plasmones superficiales hacia longitudes de onda más corta que la correspondiente al sistema agregado. El orden de adición de los reactivos resulta clave y la metodología de detección sólo es válida si los aditivos se añaden en el siguiente orden: oro-proteína (o disolución problema)-NaCl. El límite de detección es de alrededor de 0,01  $\mu\text{M}$  (véase el apartado VI. DESCRIPCIÓN DEL CONTENIDO DE LAS FIGURAS). Este límite de detección con esta nueva estrategia de análisis se corresponde con 0.1M de NaCl. Su optimización en función no sólo de la concentración de sal, sino también sobre la naturaleza del electrolito se encuentra en estudio. El método presenta las siguientes ventajas: sensibilidad relativamente alta, sencillez (detección visual sin un diseño técnico complejo) y bajo coste instrumental. Otra ventaja es el tiempo de respuesta. Sólo unos pocos segundos se necesitan para obtener los nanoclusters agregados para ser utilizados como un sensor de lisozima en disolución y la protección de los nanoclusters por parte de la lisozima es prácticamente inmediata.

#### 20 **Modo de realización de la invención**

Previamente a los estudios finales se han optimizado tanto las concentraciones de sal y nanopartículas como el tamaño de las nanopartículas y el tiempo de recogida de datos.

25 Todos los estudios se han realizado en disolución acuosa. En cualquier caso, es conocido y aceptado que la interferencia que puede afectar seriamente a la determinación de lisozima en la orina procede de la proteína HSA (human serum albumin). Esta proteína, con un punto isoelectrico de 4,9, se elimina de la muestra problema antes de la determinación mediante su precipitación con etanol y posterior filtrado, a un pH próximo al punto isoelectrico de la proteína en cuestión mediante protocolos aceptados y bien definidos descritos en bibliografía (Direct Determination of Urinary Lysozyme Using Surface Plasmon Resonance Light-Scattering of Gold Nanoparticles. Xinyi Wang, Yao Xu, Xiao Xu et al. Talanta 82 pp 693-697 (2010))

35

Los experimentos de titulación se llevaron a cabo a una concentración fija de oro coloidal protegidos con iones citrato (casa Aldrich, diámetro de 10nm), [AuNPs] =  $7.5 \times 10^{-9}$  M, previamente agregadas con NaCl, y en un rango de concentración de lisozima de  $10^{-9}$  M a  $8 \times 10^{-4}$  M. El volumen de oro empleado así como el de NaCl en la cubeta fue siempre el mismo, variando el volumen de proteína correspondiente a una disolución madre así como el volumen de agua para conseguir preparar todas las muestras. El orden y los tiempos de estabilización empleados han sido los siguientes:

1°AuNPs-2°H<sub>2</sub>O-3°Lisozima-(10 min estabilización)-4°NaCl (Más 10 minutos adicionales de estabilización antes de medir).

El modo detallado de la realización del procedimiento de invención es el siguiente:

- a) Adición de 200  $\mu$ l de oro coloidal de  $7.9 \times 10^{-9}$ M de 10 nm de tamaño a 1800  $\mu$ l de agua que contiene NaCl en una concentración tal que la mezcla final (2000  $\mu$ l) corresponde a NaCl 0.1 M.
- b) Seguimiento controlado de la agregación de las nanopartículas y determinación de la  $\lambda$  de máxima absorción del sistema ( $\lambda \sim 606$  nm).
- c) Fijación de este máximo de absorción correspondiente a un color azul de la disolución como punto de referencia del método.
- d) Adición a 1600  $\mu$ l de muestra problema 200  $\mu$ l de oro de concentración  $7.5 \times 10^{-9}$  M.
- e) Diez minutos de espera para la estabilización tras agitación.
- f) Adición de una alícuota de NaCl en agua de concentración tal que la final en la mezcla sea NaCl 0.1 M.
- g) Diez minutos de espera para la estabilización tras agitación.
- h) Determinación de la  $\lambda$  del máximo de absorción de la muestra problema y cálculo de  $\Delta\lambda$  con respecto al valor de  $\lambda$  en el apartado b).

En la tabla 1 se muestran los resultados obtenidos en la titulación, donde  $\Delta\lambda$  representa el desplazamiento tomando como referencia la longitud de onda de las nanopartículas agregadas por NaCl en una muestra patrón donde no existe proteína. Las figuras correspondientes a estas experiencias aparecen en la sección de figuras.

35

Tabla 1.

<b>[Lys] / M</b>	<b><math>\lambda</math> / nm</b>	<b><math>\Delta\lambda</math> / nm</b>
$10^{-9}$	606	$\approx 0,0$
$2,5 \cdot 10^{-9}$	594	8,2
$5 \cdot 10^{-9}$	588	14,2
$10^{-8}$	575	27,2
$2 \cdot 10^{-8}$	562	40,2
$2 \cdot 10^{-6}$	549	53,2
$5 \cdot 10^{-5}$	545	57,2
$10^{-4}$	541	61,2
$3 \cdot 10^{-4}$	543	59,2
$8 \cdot 10^{-4}$	540	62,2

## Reivindicaciones

- 1.- Procedimiento colorimétrico para la detección y/o cuantificación de lisozima en disolución acuosa que comprende:
- 5
- a) añadir un biosensor de color azul constituido por nanopartículas de oro protegidas con iones citrato (AuNPs) agregadas con NaCl, a una muestra problema y
- 10 b) determinar el grado de desagregación de las nanopartículas a simple vista o mediante espectroscopía UV-visible tras el estudio del desplazamiento que se produce hacia menores valores en la longitud de onda (color rojo) en la muestra que contiene lisozima.
- 15 2.- Procedimiento colorimétrico para la detección y/o cuantificación de lisozima de acuerdo a la reivindicación 1, en el que las nanopartículas de Au tienen un diámetro de 10 nm y han sido sintetizadas mediante la reducción en medio acuoso de una sal de oro con citrato sódico.
- 20 3.- Procedimiento colorimétrico para la detección y/o cuantificación de lisozima, de acuerdo a las reivindicaciones anteriores caracterizado porque las nanopartículas de oro están en disolución acuosa.
- 4.- Procedimiento colorimétrico para la detección y/o cuantificación de lisozima de
- 25 acuerdo a las reivindicaciones anteriores caracterizado porque en el procedimiento de preparación del biosensor se toman como punto de referencia las nanopartículas de oro que han sido agregadas de forma controlada.
- 5.- Procedimiento colorimétrico para la detección y/o cuantificación de lisozima de
- 30 acuerdo a la reivindicación 4, caracterizado porque el punto de referencia se establece mediante la adición sobre las nanopartículas de oro, de NaCl a una concentración 0.1 M y 10 minutos de espera para la estabilización.
- 6.- Procedimiento colorimétrico para la detección y/o cuantificación de lisozima de
- 35 acuerdo a las reivindicaciones anteriores caracterizado porque la determinación de la concentración de lisozima de la muestra problema requiere, el valor obtenido en

el punto de referencia según la reivindicación 5 y el valor obtenido para la muestra problema, logrado con un orden tiempos y concentración fijados.

5 7.- Procedimiento colorimétrico para la detección y/o cuantificación de lisozima de acuerdo a la reivindicación 6, caracterizado porque el orden de adición fijado para obtener el valor de la muestra problema de lisozima es: primero las nanopartículas de oro ( $7.9 \times 10^{-9} \text{M}$ ), posteriormente la sal NaCl (0,1 M) y un tiempo de espera de 10 minutos para su estabilización.

10 8.- Procedimiento colorimétrico para la detección y/o cuantificación de lisozima de acuerdo a las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la determinación de la concentración de lisozima ( $10^{-9}$ - $8.10^{-4} \text{M}$ ) se realiza a simple vista o calculada por diferencia, mediante espectroscopia UV-vis, tras el estudio del desplazamiento que se produce hacia menores valores en la longitud de onda en la muestra que  
15 contiene lisozima.

9.- Uso del procedimiento colorimétrico para la detección y/o cuantificación de lisozima de acuerdo a las reivindicaciones 1-8, para detectar/cuantificar la presencia de lisozima en una muestra.  
20

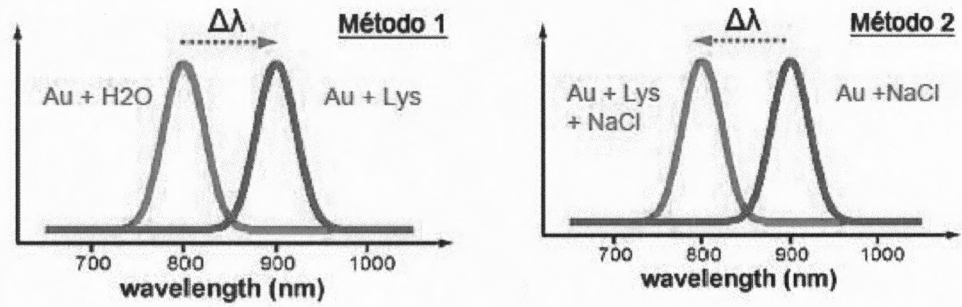


Figura 1

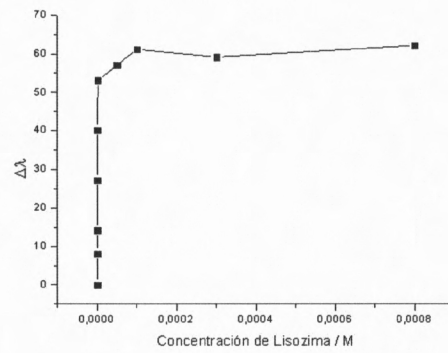


Figura 2

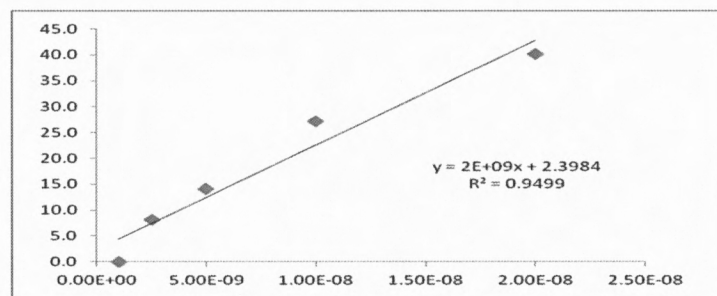


Figura 3