



Universidad de Oviedo

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

***ESTUDIO DEL ANCLAJE DE NEUTRAVIDINA A
NANOPARTÍCULAS METÁLICAS***



FRANCISCO JAVIER MORENO ACEA

FACULTAD DE QUÍMICA, DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA E INORGÁNICA

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

JUNIO DE 2018



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

Índice

Certificación del tutor académico	3
Glosario de términos y abreviaturas	4
Resumen	5
Abstract	5
Introducción	7
Parte experimental	14
Material empleado.....	14
Conjugación de NAV con sulfuro de plata.....	15
Conjugación de NAV con óxido de cerio	15
Resultados y discusión	17
Sulfuro de Plata (Ag_2S)	17
Óxido de cerio (CeO_{2-x})	24
Conclusiones	28
Bibliografía	29



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

Certificación del tutor académico

FRANCISCO JAVIER GARCÍA ALONSO, Catedrático de Química Inorgánica del Departamento de Química Orgánica e Inorgánica de la Facultad de Química de la Universidad de Oviedo

CERTIFICA :

Que la presente memoria titulada ESTUDIO DEL ANCLAJE DE NEUTRAVIDINA A NANOPARTÍCULAS METÁLICAS ha sido realizada en el Departamento de Química Orgánica e Inorgánica de la Universidad de Oviedo por don FRANCISCO JAVIER MORENO ACEA, graduado en Biología por la Universidad de Santiago de Compostela, bajo mi dirección y autoriza su presentación para optar al grado de Master en Biotecnología del medioambiente y la salud

Oviedo, Junio de 2018

Prof. Dr. Fco J. García Alonso



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

Glosario de términos y abreviaturas

ABREVIATURA	NOMBRE COMPLETO
3-MPA	Ácido 3-mercaptopropiónico
Ag₂S	Sulfuro de Plata
CeO_{2-x}	Óxido de Cerio
DLS	Dynamic Light Scattering
EDC	Hidrocloreuro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
KDa	KiloDaltons
NAV	Neutravidina
NPM	Nanopartículas de magnetita
PAA	Poliácido Acrílico
QD	Quantum Dot (Punto cuántico)
RPM	Revoluciones por minuto
Sulfo-NHS	N-hidroxisulfosuccinimida



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

Resumen

En el presente trabajo se estudia la unión de la neutravidina (NAV) a las nanopartículas de CeO_{2-x} y Ag_2S . La NAV servirá para anclar dichas nanopartículas, que actuarán como marcas de biosensores, a los correspondientes anticuerpos dotados de un residuo de biotina, por el que la NAV tiene mucha afinidad. La preparación de estos complejos marca-anticuerpo forman parte de un proyecto para el desarrollo de un método de análisis clínico para detectar la celiacía. Este se llevará a cabo mediante la detección electroquímica de todos los anticuerpos asociados a esta dolencia contenidos en la sangre del paciente.

Dado que las nanopartículas están recubiertas con poliácido acrílico (CeO_{2-x}) y con ácido 3-mercaptopropiónico (Ag_2S), para conseguir la formación del complejo nanopartícula-proteína se han utilizado los reactivos EDC y Sulfo-NHS capaces de formar un enlace amida entre los grupos COOH de las nanopartículas y los grupos NH_2 más externos de la neutravidina a temperatura ambiente. Para poder realizar un seguimiento rápido y fiable de la formación de los complejos nanopartícula-neutravidina, así como su estabilidad, se hizo uso de la técnica Dynamic Light Scattering, la más útil en las condiciones de trabajo.

Mientras que todas las nanopartículas de sulfuro de plata se cargan con neutravidina, las de CeO_{2-x} sólo lo hacen parcialmente en las condiciones empleadas. Medidas cuidadosas de los complejos nanopartícula-neutravidina por DLS indican que estos complejos se van degradando lentamente en estado sólido.

Abstract

In the present work, the union of neutravidin (NAV) to the nanoparticles of CeO_{2-x} and Ag_2S is studied. The NAV is used to join these nanoparticles, which act as biosensor tags, to the corresponding antibodies by means of a NAV-Biotin bond. The preparation of these tag-antibody complexes is part of a project for the development of a clinical analysis method to detect celiac disease. This will be done by electrochemical



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

detection of all the antibodies associated with this disorder contained in the patient's blood.

Since the nanoparticles are coated with poly(acrylic acid) (CeO_{2-x}) and with 3-mercaptopropionic acid (Ag_2S), the formation of the nanoparticle-protein complex is carried out using the EDC and Sulfo-NHS reagents, which are able to form at room temperature an amide bond between the COOH groups of the nanoparticles and the external NH_2 groups of NAV. The formation and the stability of the nanoparticle-neutraavidin complexes are followed by the Dynamic Light Scattering technique, the most useful one in the working conditions.

While all the silver sulfide nanoparticles are loaded with neutraavidin, those of CeO_{2-x} are only partially charged under the conditions employed. Careful measurements of nanoparticle-neutraavidin complexes by DLS indicate that these complexes slowly degrade in solid state.

Introducción

El uso de nanopartículas en el campo de la bionanotecnología está cada vez más extendido. Se trata de partículas a escala nanométrica, que presentan un tamaño comprendido entre 1 y 100 nm, fabricadas a partir de distintos materiales y que poseen una serie de nuevas propiedades que las hacen muy interesantes para su uso en distintas áreas. Paralelo al desarrollo de la nanotecnología aplicada a fines industriales, se ha desarrollado también su uso en el sector biomédico. Así, estas nanopartículas han sido usadas en tratamientos antitumorales como la hipertermia; para el transporte de fármacos o anticuerpos, para desinfección antimicrobiana, para terapias regenerativas o desarrollo de biomateriales e ingeniería de tejidos y, finalmente, como plataformas para la terapia y el diagnóstico conjunto (“theranostics”). **(Albanell J. et al., 2013).**

Por otro lado, la necesidad de determinar la concentración de compuestos de interés biológico de una manera fiable y rápida ha propiciado un amplio desarrollo de los biosensores. Un biosensor puede definirse como un dispositivo analítico cuantitativo o semicuantitativo que contiene un elemento sensor de origen biológico o biomimético y que está integrado o está en íntimo contacto con un transductor fisicoquímico, que pueden ser óptico, electroquímico, calorimétrico, piezoeléctrico, magnético o micromecánico. **(Turner et al., 1987).** Existen muchos tipos de biosensores, como inmunosensores, biosensores enzimáticos o biosensores celulares. En particular, un sensor electroquímico será capaz de detectar la presencia de un analito en una muestra a analizar mediante diversos mecanismos y un elemento transductor que convierte la señal química en señal eléctrica, de tal manera que podemos medir las diferencias de potencial o intensidad de corriente por potenciometría o amperometría, respectivamente. **(Thakur MS. et al., 2013).**



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

En este proyecto se pretenden desarrollar biosensores electroquímicos para la detección de celiaquía, que permitan determinar si un paciente padece o no enfermedad celíaca, un trastorno que muestran las personas intolerantes al gluten.

Para llevar a cabo el análisis con este método, es necesario obtener una muestra de sangre de la persona de la que se sospecha puede padecer celiaquía. Si la persona padece intolerancia al gluten, en la sangre de esta persona van a estar presentes una serie de anticuerpos que indican la afección, concretamente inmunoglobulina A e inmunoglobulina G. Esta muestra se mezcla con nanopartículas de magnetita (NPM), en las que previamente se han anclado transglutaminasa (proteína tisular) y gliadina deaminada porque los citados anticuerpos se van a unir de manera específica a estas proteínas mediante la unión antígeno-anticuerpo.

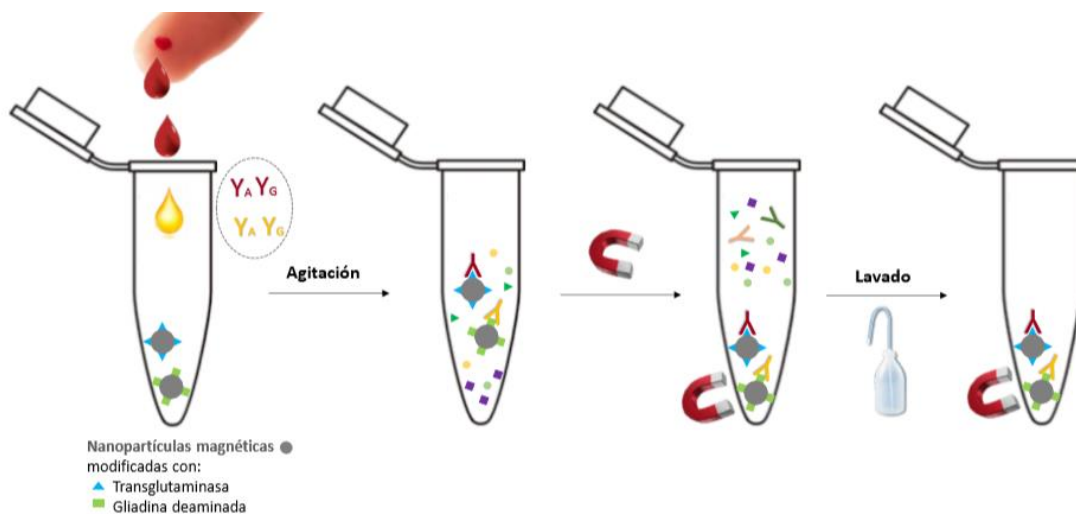


Figura 1: Primera parte del método diagnóstico: se mezcla la sangre del paciente con las nanopartículas de magnetita cargadas con transglutaminasa o gliadina deaminada.

La formación de esta unión es rápida porque tanto las NPM como los anticuerpos se mueven libremente bajo agitación mecánica. Tras un breve lapso de tiempo, se realiza una etapa de lavado para separar el analito de los restos de otros compuestos. Aprovechando el carácter superparamagnético de las NPM, estas pueden ser separadas con un imán, con el fin de separar la fase sólida con el analito del resto de la disolución durante el lavado (Véase Figura 1). Hecho esto, se le añade a dicha fase una solución que contenga los complejos Anti-IgA-marca y Anti-IgG-marca, que en caso de



estar presentes van a unirse a las inmunoglobulinas, mediante enlace específico antígeno-anticuerpo. De nuevo se vuelve a lavar reteniendo la magnetita con el imán.

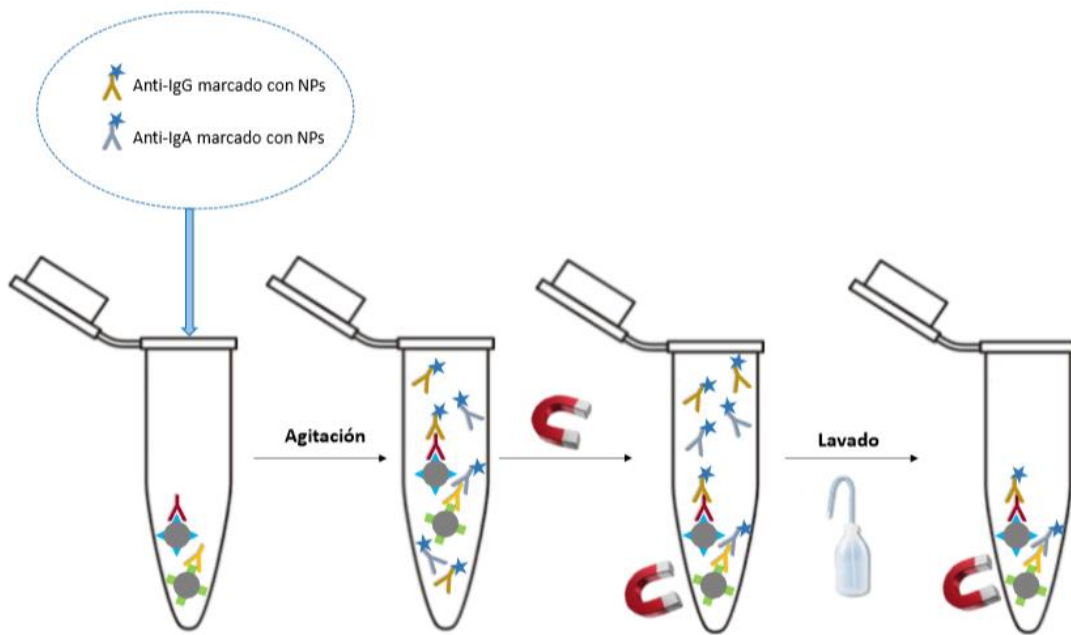


Figura 2: Segunda parte del método: los anticuerpos de la sangre del paciente son unidos con sus respectivos anticuerpos con la marca añadida.

La clave de la detección radica en que tanto Anti-IgA como Anti-IgG llevan unido un marcador. Estos marcadores pueden ser, entre otros, nanopartículas de óxido de cerio o sulfuro de plata (Figura 2). En el caso del sulfuro de plata el catión Ag^+ es directamente detectado en el electrodo. En el caso del óxido de cerio el proceso es un poco más complicado, pues el CeO_{2-x} oxida aniones ferrocianuro a aniones ferricianuro, que son los que son detectados electroquímicamente (Figura 3).



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo



Figura 3: Tercera parte del método: se pone una gota de la muestra del complejo final en un electrodo que detectara la señal gracias a la marca.

La unión entre el marcador y el anticuerpo secundario viene dado por un enlace avidina-biotina, por lo que las nanopartículas deben ser funcionalizadas con una proteína del tipo avidina. Este trabajo se centra en la unión del marcador con la neutravidina. Esta es la avidina deglicosilada, una proteína con un peso molecular aproximado de 60 – 70 KDa, y que se encuentra naturalmente en el oviducto de aves, reptiles y anfibios (**Angerer et al., 1976**). Se trata de un homotetrámero, constituida por cuatro secciones idénticas, y cada una de ellas es capaz de unirse a la biotina con un alto grado de afinidad y especificidad, convirtiéndose de hecho en una de las uniones no covalentes más fuertes conocidas (**Büller et al., 2012**).

Debido a sus interesantes propiedades y a su afinidad por la biotina, la neutravidina se ha usado ampliamente en campos como la investigación, el diagnóstico clínico o el desarrollo de fármacos, y es ampliamente utilizada en múltiples ensayos bioquímicos como el Western Blot, ELISA, Pull-Down y otros (**Diamandis et al., 1991**). El enlace avidina-biotina es muy fuerte y, por ello, es irreversible, sin embargo, la afinidad del enlace puede ser eliminada mediante desnaturalización de las proteínas elevando la temperatura por encima de los 85°C (**Snell et al., 1940**).

La unión de la NAV a la marca se logra mediante un enlace amida formada a partir de los grupos carboxílicos que recubren los marcadores y los extremos amino terminales



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

de la neutravidina. Dado que la reacción directa requiere temperaturas superiores a los 140°C, lo que supondría la desnaturalización de la NAV (**Valeur E., 2009**), resulta necesario recurrir a una reacción de conjugación mediante intermediarios. En nuestro caso se utilizarán el EDC (hidrocloruro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) y el Sulfo-NHS (N-hidroxisulfosuccinimida) aunque, en principio, en ciertas ocasiones podría utilizarse sólo el EDC.

El EDC es una carbodiimida (en su forma hidrocloruro) soluble en agua, con un peso molecular de aproximadamente 191,7 g/mol, que activa los grupos carboxílicos a un pH óptimo de entre 4,5 y 6 para la reacción espontánea con aminas primarias (Figura 4; ruta 1→2→3), o para la creación de ésteres de Sulfo-NHS (Figura 4; ruta 1→2→5) aún más reactivo con los grupos amino de otras biomoléculas (Figura 4; ruta 5→6).

La reacción entre EDC y un extremo carboxílico forma un intermedio de O-acilisourea (Figura 4; ruta 1→2) que reacciona con la amina (Figura 4; ruta 2→3). Sin embargo, si este intermediario no encuentra una amina, hidrolizará y regenerará el grupo carboxílico (Figura 4; ruta 2→4) (**ThermoFisher**).

Por otro lado, el Sulfo-NHS con un peso molecular de 217,13 g/mol, que reacciona con la O-acilisourea para dar ésteres de NHS (Figura 4; ruta 2→5) muy reactivos frente a aminas (Figura 4; ruta 5→6) y por ello es utilizado en métodos de bioconjugación, entrecruzamiento, etiquetado e inmovilización de compuestos (**ThermoFisher**).

Empleando el tandem EDC/Sulfo-NHS se consigue más eficazmente la formación del enlace amida de un extremo carboxílico a una amina primaria. (Figura 4; ruta 1→2→5→6) Esta reacción tarda un mínimo de 30 minutos en completarse, por lo que antes de añadir la proteína, se deben añadir las nanopartículas en un eppendorf junto con ambos compuestos, y poner en agitación a temperatura ambiente (**ThermoFisher**).

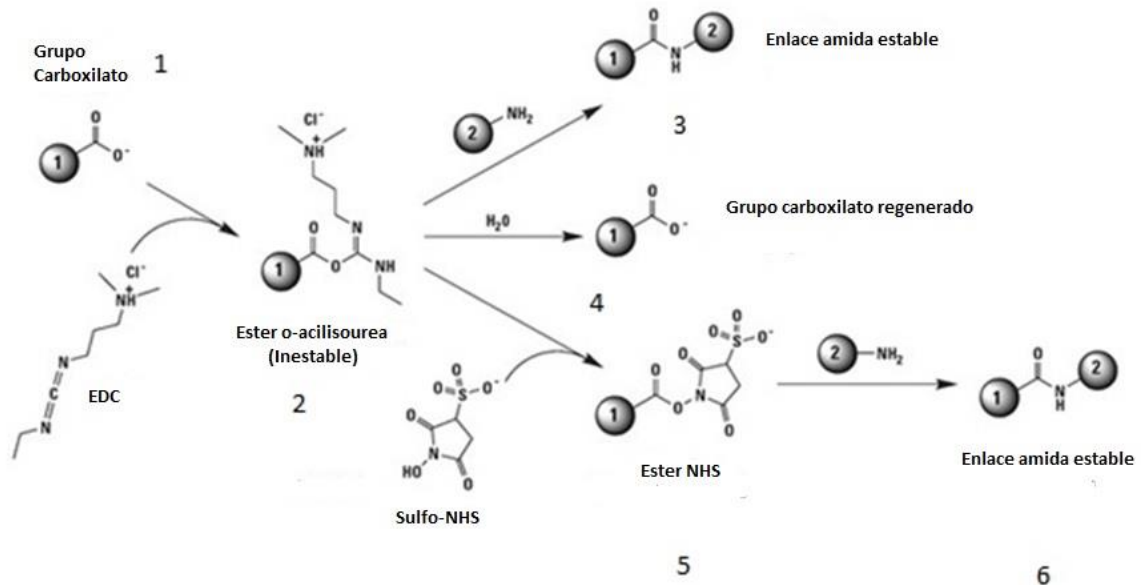


Figura 4: Esquema que muestra las reacciones que se dan en la formación del enlace amida a partir de EDC y Sulfo-NHS; información extraída de “www.fishersci.com”.

Tras estos 30 minutos de incubación se adiciona la proteína a unir en la cantidad adecuada y se deja en agitación a temperatura ambiente durante cuatro horas **(Hermanson G.T., 2008)**. Una vez que se hace esto, el complejo marcador-proteína está formado.

Los nanomateriales compuestos por cerio han sido ampliamente investigados como materiales funcionales importantes debido a sus excelentes propiedades tales como una estabilidad térmica y química superior, alta conductividad iónica, buena capacidad de almacenamiento o liberación de oxígeno y una fuerte absorción de rayos UV **(Celardo et al., 2011, He et al. 2015)**.

El segundo tipo de nanopartículas son de sulfuro de plata. Se trata de Quantum Dots o “puntos cuánticos”. Los quantum dots son cristales coloidales semiconductores de entre 1 y 10 nm de diámetro. **(Petryayeva et al., 2013)**. Los QD son particularmente interesantes ya que presentan propiedades morfológicas y ópticas que no se dan en nanopartículas de otros compuestos. De hecho, su aplicabilidad en campos



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

relacionados con la biología destaca por características como altos coeficientes de extinción molar, absorción de espectros de radiación que abarcan desde el ultravioleta hasta el infrarrojo cercano y resistencia excepcional a la degradación química, entre otros. Además de estos, los QD dan una ventaja muy grande en relación a otros marcajes ya que cuentan con dos propiedades en este aspecto que los hacen superiores, como la capacidad incomparable de ajustar la emisión fluorescente en función del tamaño del núcleo (en semiconductores) y los amplios espectros de excitación, que permiten la excitación de poblaciones mixtas de QD a una sola longitud de onda muy alejada de sus respectivas emisiones (**Medintz et al., 2005**).

En base a todo lo expuesto, los objetivos del presente trabajo han sido la preparación de los complejos NAV-nanopartículas de CeO_{2-x} y NAV-QD de Ag_2S y estudiar su estabilidad. Estos objetivos constituyen el paso previo para el anclaje de las marcas a los anticuerpos Anti-IgA y Anti-IgG a través de la unión biotina-neutraavidina.



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

Parte experimental

Material empleado

Como producto de partida se han empleado, de un lado, nanopartículas de CeO_{2-x} recubiertas por poliácido acrílico (PAA; $[\text{CH}_2\text{-CH}(\text{COOH})_n]$) obtenidas por nuestro grupo siguiendo el método ya descrito (**A. Asati, Santra, Kaittanis, Nath, & Perez, 2009**) con ligeras modificaciones. El núcleo de las nanopartículas tienen un tamaño de unos 5 nm de diámetro. Nótese que en ellas coexisten átomos de cerio en dos estados de oxidación diferentes Ce^{3+} y Ce^{4+} y que no son exactamente estequiométricas, a pesar de lo cual mantienen la estructura de la fluorita.

Por otro lado, se han empleado las nanopartículas de Ag_2S administradas por el laboratorio del profesor J.M. Costa de Química Analítica de la Universidad de Oviedo. Tienen un tamaño de entre 5 y 8 nm y están recubiertas por ácido 3-mercaptopropiónico [3-MPA; $(\text{HS-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH})$]. El 3-MPA se une a los átomos de plata de la superficie de las nanopartículas mediante el grupo sulfuro, dejando libre el grupo carboxílico. Cabe destacar que estas nanopartículas son sensibles a la luz, por lo que al trabajar con ellas debe evitarse siempre la incidencia de la misma sobre la muestra, lo que dificulta el trabajo con respecto a las de óxido de cerio.

Para funcionalizar ambos grupos de nanopartículas se han empleado los reactivos EDC (hidrocloruro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida), Sigma Aldrich®, CAS Number: 25952-53-8; y el Sulfo-NHS (N-hidroxisulfosuccinimida), Sigma Aldrich®, CAS Number: 106627-54-7 y NeutrAvidin Thermo Scientific™ Protein (Reference 31000).

Los viales donde se han realizado y almacenado las muestras son tubos Eppendorf (Sarstedt® Micro Tubes 1.5ml Neutral 72.690.001) con recubrimiento antiadherente para proteínas, y la agitación de los mismos fue llevada a cabo usando un agitador Vortex V05 Series IBX®.



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

Para los ensayos de Dynamic Light Scattering fue utilizado un aparato Zetasizer Nano ZS System (Malvern Instruments Ltd., Malvern, U.K.) utilizando las cubetas preparadas para el mismo fin.

Se usaron dos centrifugas para separar los compuestos a diferentes velocidades, una centrifuga digital Minivite 2716, NAHITA® para centrifugaciones a menos de 8000 RPM y una Gyrozen® 1580-R para centrifugados a 10000 RPM. Por último se empleó la balanza analítica de precisión Ohaus® modelo Pioner TM.

Conjugación de NAV con sulfuro de plata

En un eppendorf de 1,5 mL con recubrimiento antiadherente para proteínas se mezclan 70 μL de PBS 0,1 M; 100 μL de una disolución 0,0156 mM de EDC en PBS 0,1 M (aprox. 94×10^{13} moléculas); 170 μL de una disolución 0,0138 mM de Sulfo-NHS en PBS 0,1 M (aprox. 141×10^{13} moléculas) y 170 μL de una suspensión de nanopartículas de Ag_2S recubiertas de 3-MPA (aprox. $3,74 \times 10^{13}$ partículas).

A continuación se recubre el eppendorf con papel de aluminio y se agita mecánicamente durante 30 minutos. Seguidamente se adicionan 4 μL de NAV de una disolución 23 $\mu\text{moles/L}$ (aprox. $4,02 \times 10^{14}$ moléculas) y se vuelve a agitar mecánicamente durante 4 horas.

Tras la agitación se centrifuga la muestra a 10000 RPM durante 30 minutos. Se elimina el sobrenadante con ayuda de una micropipeta, y se resuspende el sólido en 700 μL de agua miliQ. Se purifica la muestra mediante dos centrifugaciones más de 30 minutos a 10000 RPM, añadiendo cada vez 700 μL de agua miliQ y descartando el sobrenadante. Tras todo el procedimiento, la medición por DLS muestra un pico a unos 500 nm en los gráficos de intensidad.

Conjugación de NAV con óxido de cerio

En un eppendorf de 1,5 mL con recubrimiento antiadherente para proteínas se mezclan 423,5 μL de PBS 0,1 M; 45 μL de una disolución 0,104 mM de EDC en PBS 0,1



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

M (aprox. $20,66 \times 10^{14}$ moléculas); 33 μL de una disolución 0,115 mM de Sulfo-NHS en PBS 0,1 M (aprox. 31×10^{14} moléculas) y 8,5 μL de una suspensión de nanopartículas de CeO_{2-x} recubiertas de PAA de $2 \times 10^{16}/\text{mL}$ (aprox. $1,7 \times 10^{14}$ partículas).

A continuación se agita mecánicamente la muestra durante 30 minutos. Seguidamente se adiciona 1 mL de una disolución de NAV en agua mQ (1mg/ml; 0,01515 mM; aprox. 10^{16} moléculas) y volver a agitar mecánicamente durante 4 horas.

Una vez transcurrido el tiempo de reacción, la muestra se centrifuga a 8000 RPM durante 40 minutos, tras lo cual se descarta el sobrenadante con ayuda de una micropipeta y se resuspende el precipitado con 700 μL de agua miliQ. (Se comprueba el resultado por DLS, pudiendo aplicarse otra centrifugación en caso de que la muestra no esté lo suficientemente purificada)



Resultados y discusión

Sulfuro de Plata (Ag_2S)

Para anclar la NAV a los QD de Ag_2S mediante EDC y Sulfo-NHS se ha utilizado la siguiente proporción estequiométrica $\text{Ag}_2\text{S}/\text{EDC}/\text{Sulfo-NHS}/\text{NAV}$: 1/25/37/10.7. Inicialmente se agita a temperatura ambiente la mezcla de los tres primeros para que el EDC y Sulfo-NHS tengan tiempo de actuar. Tras añadir NAV se agita la mezcla anterior, a temperatura ambiente durante la noche y protegido de la luz. Al día siguiente de hacer la reacción se procedió a hacer un DLS de dicha mezcla (Figura 6) y se compararon los gráficos de intensidad junto con los obtenidos de un DLS de Ag_2S de partida (Figura 5). En la Figura 5 aparecen las señales de la muestra por triplicado de QD de plata. A pesar de que aparecen tres poblaciones distintas, la muestra parece, en realidad, bastante homogénea, correspondiendo al pico localizado a 300 nm de tamaño de partícula. La señal de 5000 nm puede reflejar motas de polvo, mientras que la localizada a 4 nm parece mas bien un artefacto puesto que solo aparece en una ocasión y su tamaño es muy pequeño¹.

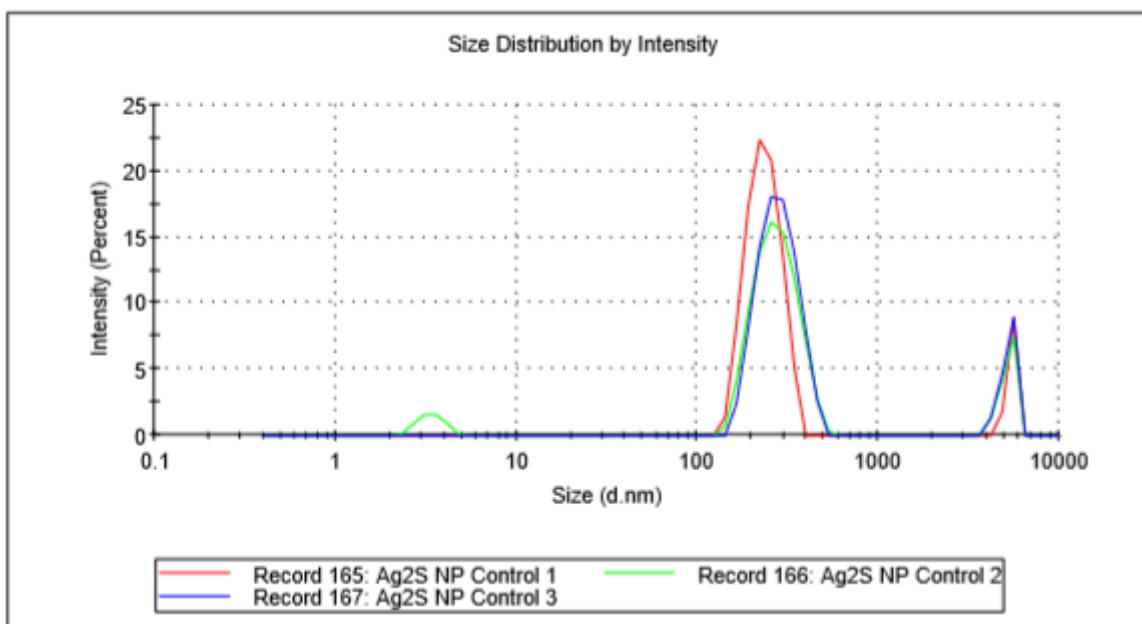


Figura 5: Gráfico de intensidad de DLS de Ag_2S de partida.

¹ Eventualmente la señal a 5000 nm pudiera ser debido a agregados que permanecen en el fondo y no son transferidos al eppendorf donde tiene lugar la reacción pues no aparecen en la Figura 6.



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

Por su parte en la Figura 6 aparece una sola población con diámetro hidrodinámico de 500 nm, claramente mayor que en la disolución de partida, 300 nm, por lo que debería concluirse que la NAV se ha unido a los QD. La efectividad del procedimiento viene acreditada por el hecho de que todas las veces que se llevó a cabo el experimento se obtuvieron idénticos resultados (mismos gráficos de intensidad).

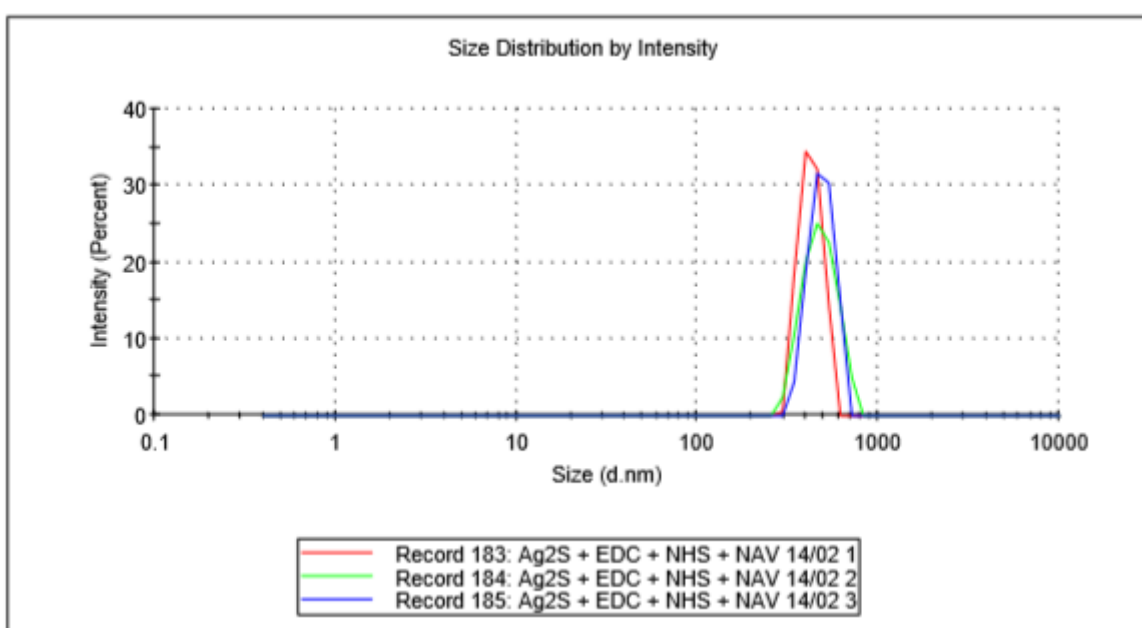


Figura 6: Gráfico de intensidad del DLS de la disolución final de la reacción de Ag₂S con EDC, Sulfo-NHS y NAV.

Para separar la población de QD unidos a la NAV de los otros productos que hay en disolución se procedió a someter las muestras a dos centrifugaciones seguidas. El DLS del líquido sobrenadante de la segunda centrifugación (Figura 7) sugiere que durante la centrifugación ocurre un reagrupamiento o incluso alguna otra reacción inesperada. Afortunadamente el DLS del precipitado (Figura 8) es bastante limpio y coincide con el producto deseado, a 500 nm. El precipitado, una vez secado a vacío, se almacena en el congelador a -20°C. Se estudió su estabilidad al cabo de cinco y diez días mediante medidas de DLS (Figuras 9 y 10).



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

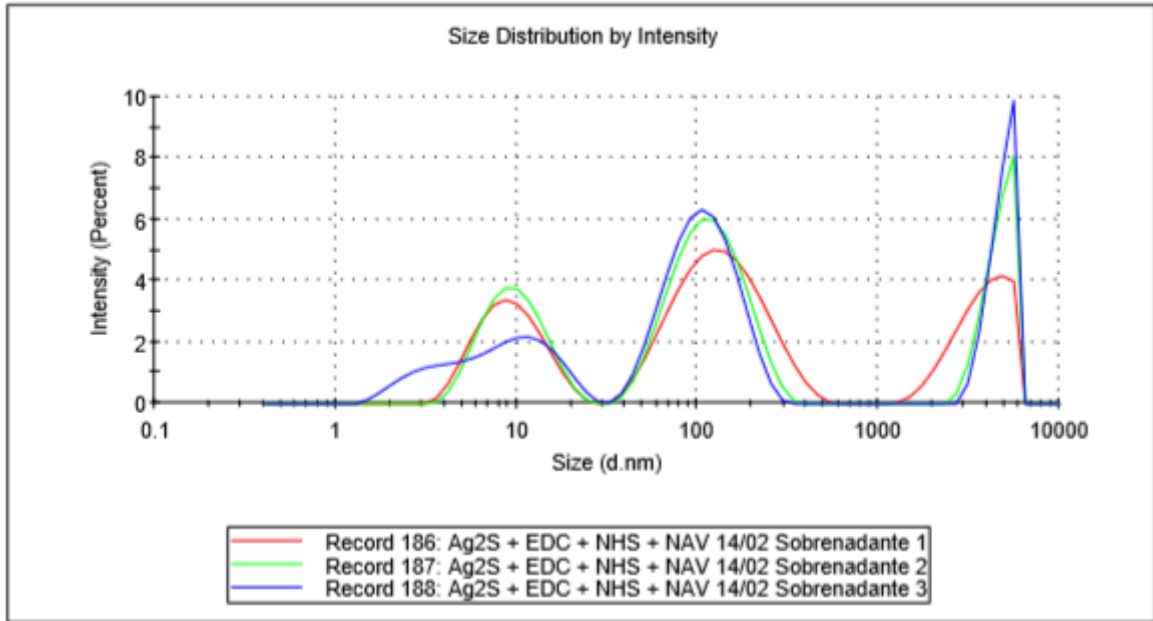


Figura 7: Gráfico de intensidad del DLS del sobrenadante tras centrifugar.

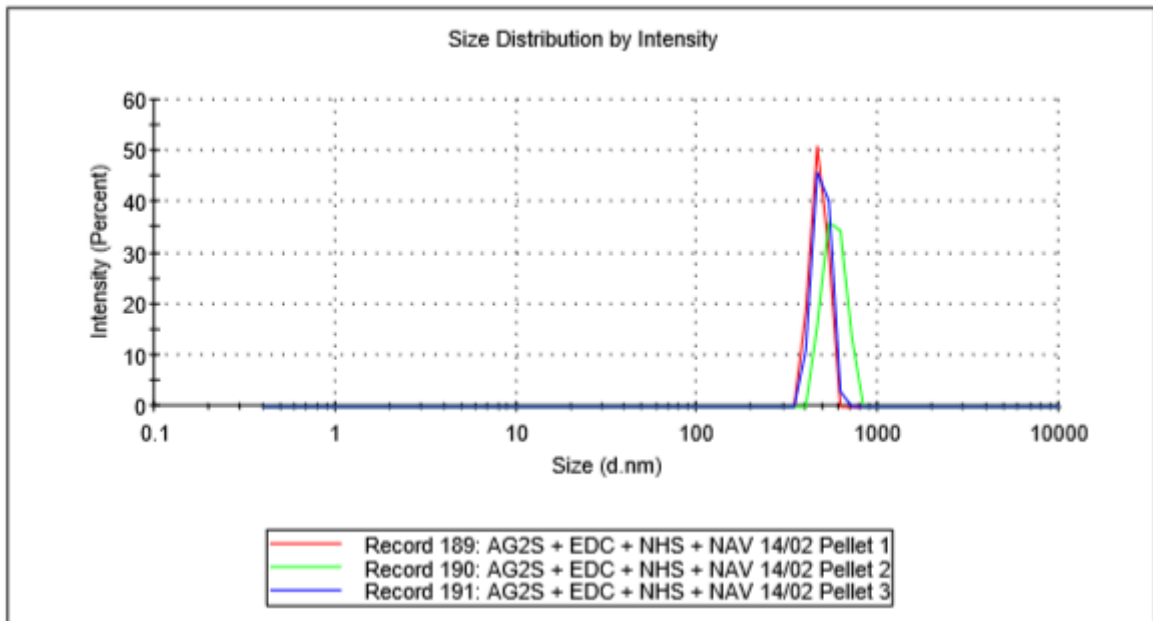


Figura 8: Gráfico de intensidad del DLS del precipitado tras centrifugar.



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

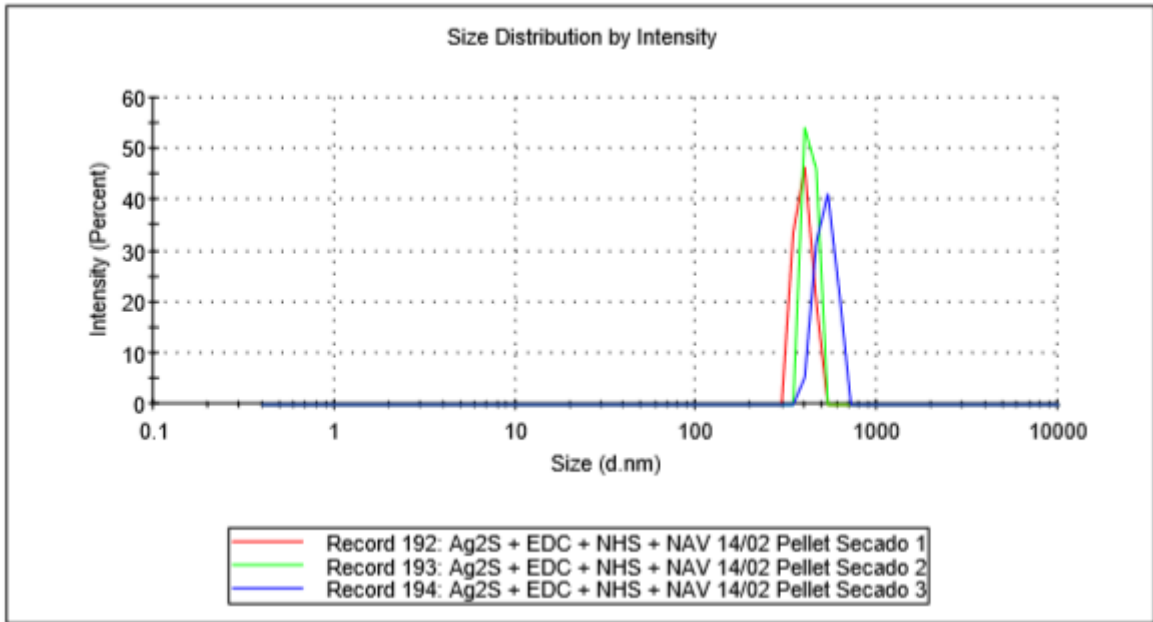


Figura 9: Gráfico de intensidad del DLS del precipitado tras secado a vacío y almacenado cinco días a -20°C.

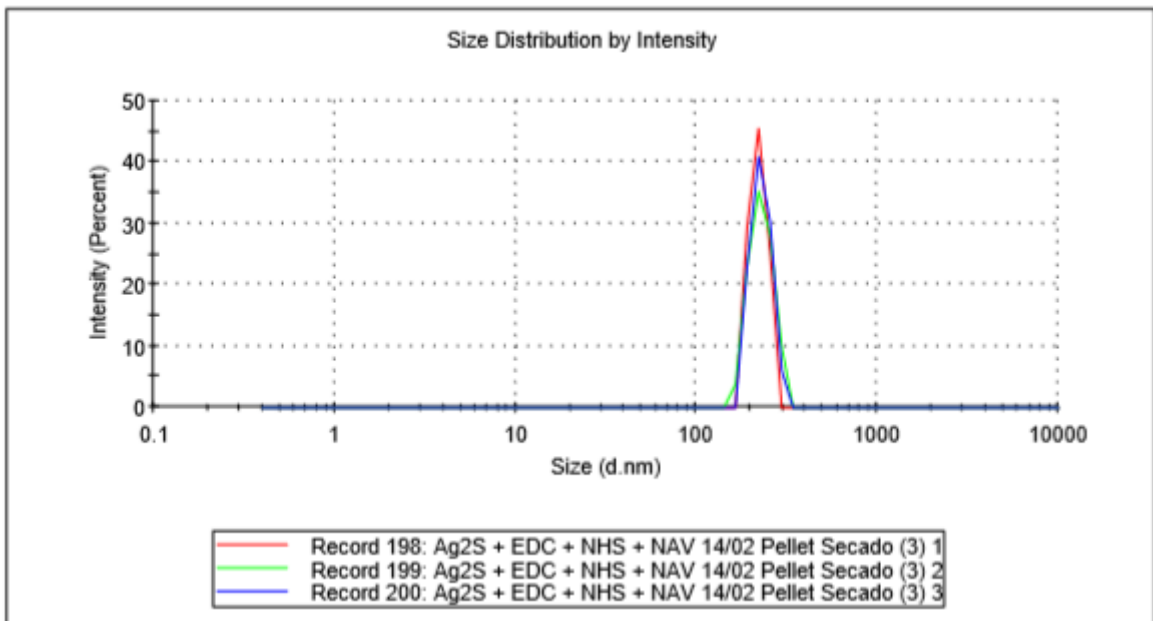


Figura 10: Gráfico de intensidad del DLS del precipitado tras secado a vacío y almacenado diez días a -20°C.

Comparando las medidas (Figuras 11) se comprueba que el tamaño de las nanopartículas va disminuyendo paulatinamente.



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

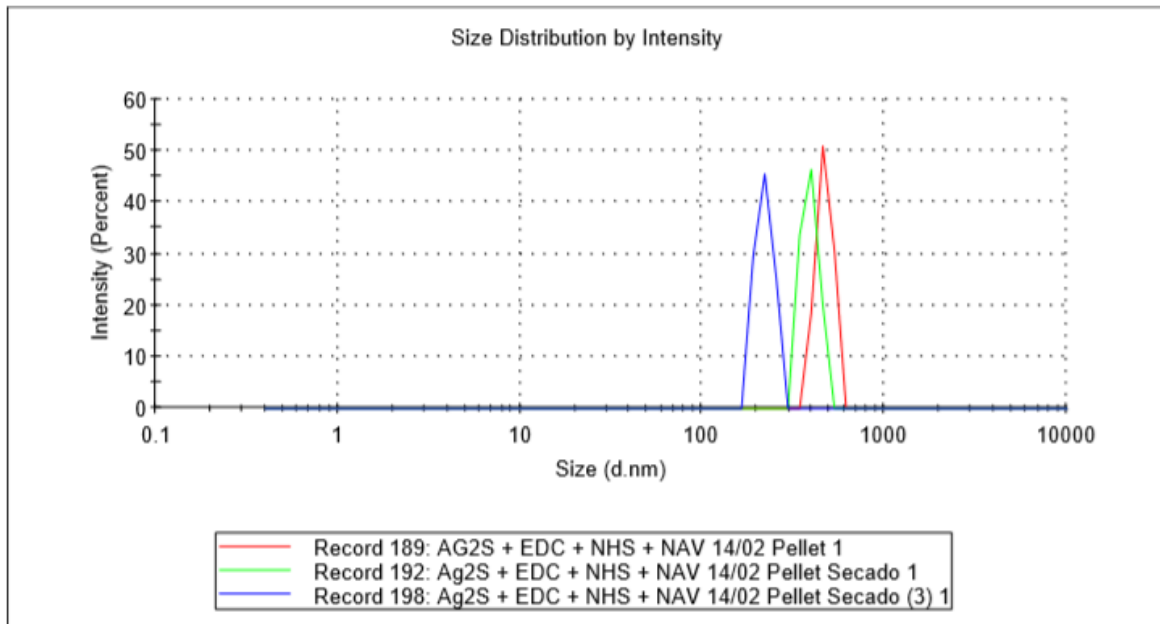


Figura 11: Gráfico de intensidad comparando las medidas del precipitado de Ag_2S secado al vacío y almacenado a -20°C a distintos días (Rojo 1 día, Verde 5 días, Azul 10 días).

Por otro lado se analizaron los correlogramas de las muestras preparadas, debido a que dicho gráfico arroja más luz y da más información que los picos de intensidad.

El gráfico de la muestra de sulfuro de plata tras el secado a vacío y almacenado diez días a -20°C (Figura 12) comienza con una zona plana, que nos da una idea del tamaño de la partícula (cuanto más larga sea esta meseta, mayor es el tamaño), tamaño que es, en cambio, cuantificado en los gráficos de intensidad (Figura 10). Por otro lado, la pendiente de la gráfica es un reflejo de la dispersión de las partículas. Cuanto más abrupta sea la pendiente, menor es la polidispersidad.



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

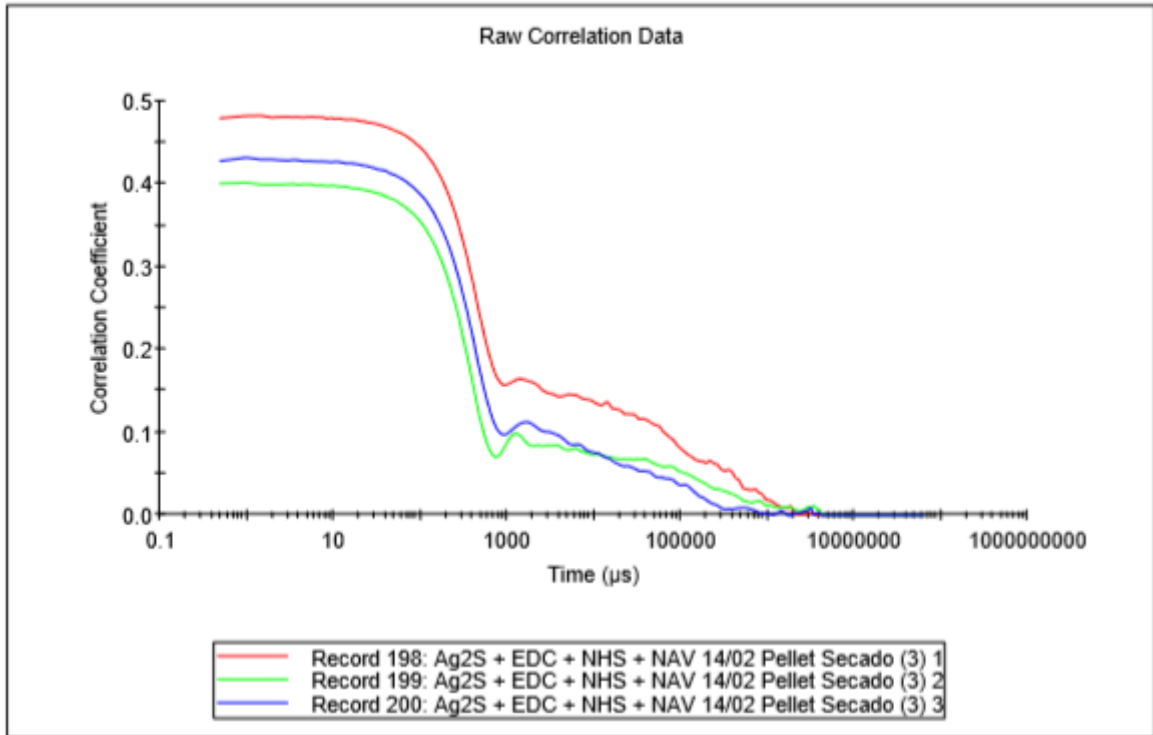


Figura 12: Correlograma del DLS del precipitado tras el secado a vacío y almacenado diez días a -20°C .

En una muestra totalmente homogénea, con una sola población bien definida de partículas en suspensión, cabría esperar un gráfico similar a una cascada; es decir, una meseta bien definida al principio que determina el tamaño de partícula, una pendiente muy pronunciada que indica que la dispersión es baja y hay una única población definida, y por último una segunda meseta pegada o solapada con el eje de abscisas. En nuestro caso (Figura 12), tenemos dos pendientes, la primera corresponde a las nanopartículas unidas a NAV y la segunda, menos pronunciada y más alargada, nos indica que hay otras especies en suspensión que no se aprecian en el gráfico de intensidad (Figura 10). Ahora bien, el hecho de que el gráfico de intensidad no las detecte implica que las impurezas son pocas. Cabe destacar que la segunda pendiente no toca el eje de abscisas (pendiente poco pronunciada) de lo que se deduce que se trata de una población de partículas de tamaño muy elevado, lo que implica necesariamente un proceso de aglutinamiento.

En la Figura 13, se comparan los correlogramas de la misma tras ser almacenada en estado sólido a -20°C uno, cinco y diez días. La meseta inicial toma cada vez una



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

posición más baja en el eje de ordenadas a medida que pasa el tiempo, lo que indica que la población de partículas disminuye (siempre se emplea la misma cantidad de agua para preparar la suspensión), algo que se ve peor empleando los gráficos de intensidad. De otro lado, la segunda pendiente es cada vez menos pronunciada, formándose casi una segunda meseta. Esto apoya fuertemente la idea de que con el tiempo la muestra de nanopartículas-NAV tiende a aglutinarse, formando agregados.

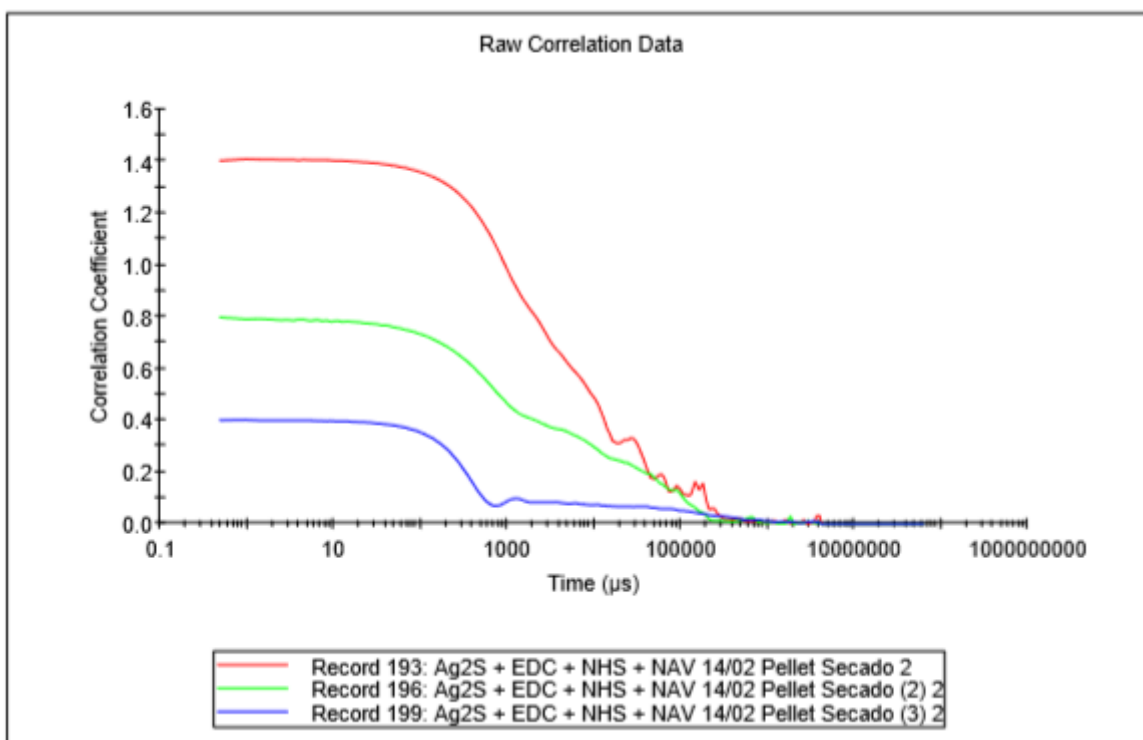


Figura 13: Correlograma del DLS de los precipitados después de ser almacenados a -20°C (Rojo un día después; Verde cinco días después; Azul diez días después).



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

Óxido de cerio (CeO_{2-x})

Para unir la NAV a las NP de CeO_{2-x} se han empleado distintas proporciones de reactivos. Inicialmente se empleó la relación estequiométrica CeO_{2-x} /EDC/Sulfo-NHS/NAV : 1/500/740/58. Al acabar la reacción se hizo una medida DLS de la disolución final, que se recoge en la Figura 15. En ella se observa un conjunto de señales que engloba tanto al pico correspondiente a las NP de partida, (a 20 nm, Figura 14) como los picos de los distintos productos. Entre tales productos hay sin duda aglomerados, sobre todo en la zona de los 5000 nm. Esto sugiere que la reacción de formación de amidas se repite varias veces dando lugar a especies con múltiples uniones a NAV, por lo que se decidió repetir la reacción con valores más bajos de EDC y sulfo-NHS

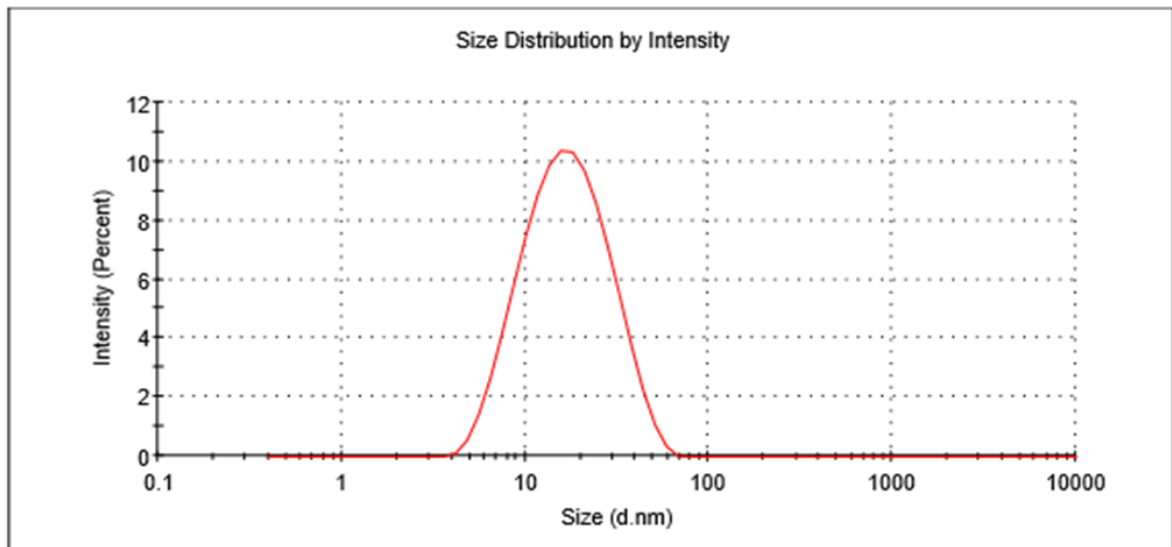


Figura 14: Gráfico de intensidad de una muestra de las NP de CeO_{2-x} de partida



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

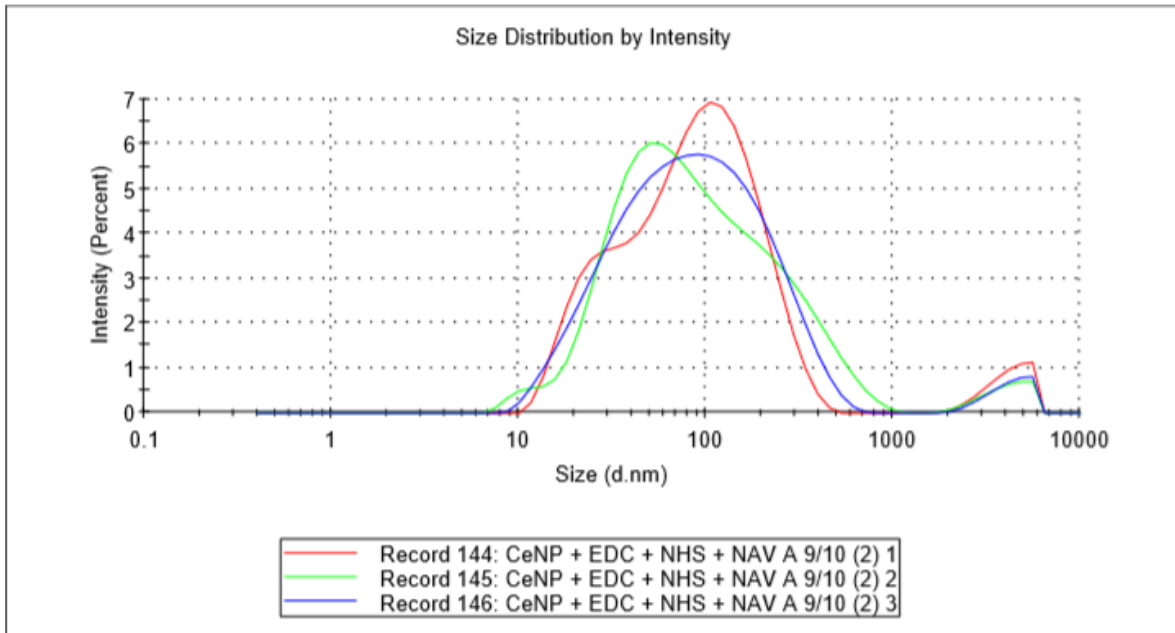


Figura 15 Gráfico de intensidad de la disolución final correspondiente a la reacción en la que la estequiometría $\text{CeO}_{2-x}/\text{EDC}/\text{Sulfo-NHS}/\text{NAV}$ es 1/500/740/58.

La reacción de formación de uniones amida se repitió con la estequiometría $\text{CeO}_{2-x}/\text{EDC}/\text{Sulfo-NHS}/\text{NAV}$: 1/12,5/18,5/58. En la figura 16 se muestra el gráfico de intensidad de la disolución final de la reacción.

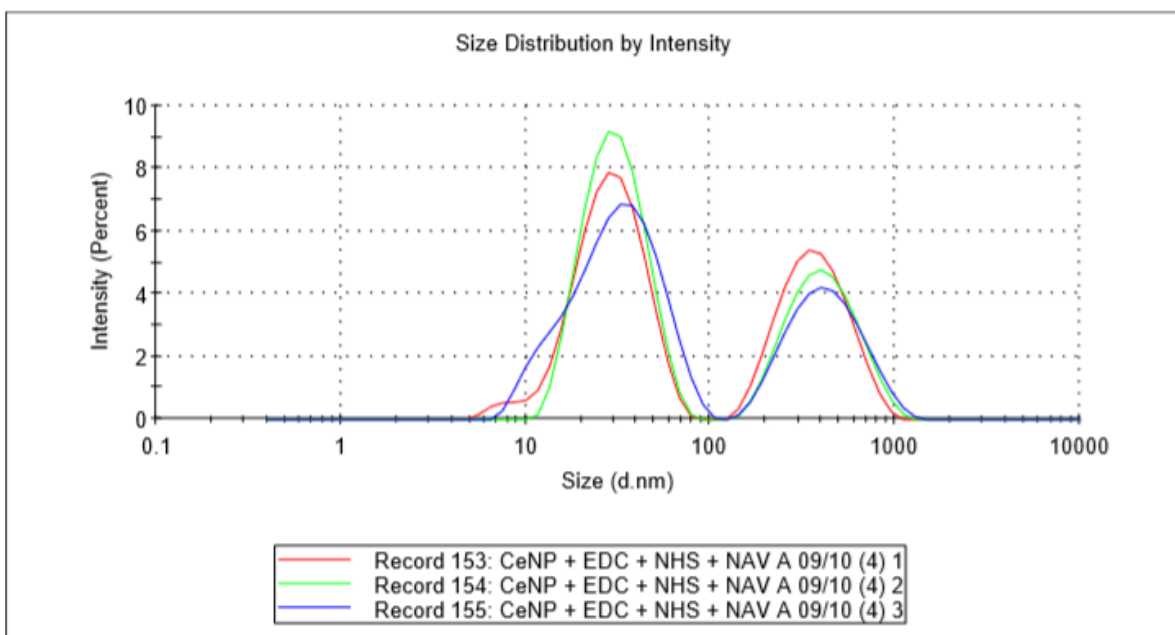


Figura 16: Gráfico de intensidad de la disolución final de la reacción con la estequiometría $\text{CeO}_{2-x}/\text{EDC}/\text{Sulfo-NHS}/\text{NAV}$: 1/12,5/18,5/58



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

En ella se aprecian dos picos limpios, uno en la zona de los 20 nm, correspondiente a las nanopartículas de CeO_{2-x} de partida y otro en la zona de los 200 nm que probablemente corresponda a las nanopartículas unidas a neutravidina. Nótese que el caso de los QD de sulfuro de plata no habían quedado nanopartículas de Ag_2S sin unirse a la NAV. Para aislar los complejos nanopartícula-NAV se centrifugó dicha muestra a 8000 RPM durante 40 minutos. Tras esto se separó sobrenadante y precipitado y se realizaron medidas DLS de ambas muestras. En la figura 17 se muestran superpuestos los resultados de ambas medidas, indicando claramente que se ha conseguido separar el complejo NAV-nanopartículas de CeO_{2-x} (precipitado) de las nanopartículas de óxido de cerio de partida (suspensión sobrenadante). Sin embargo el rendimiento del complejo NAV-nanopartícula de CeO_{2-x} no es muy alto. Tras esto, el precipitado se almacenó en frío a -20°C en el congelador.

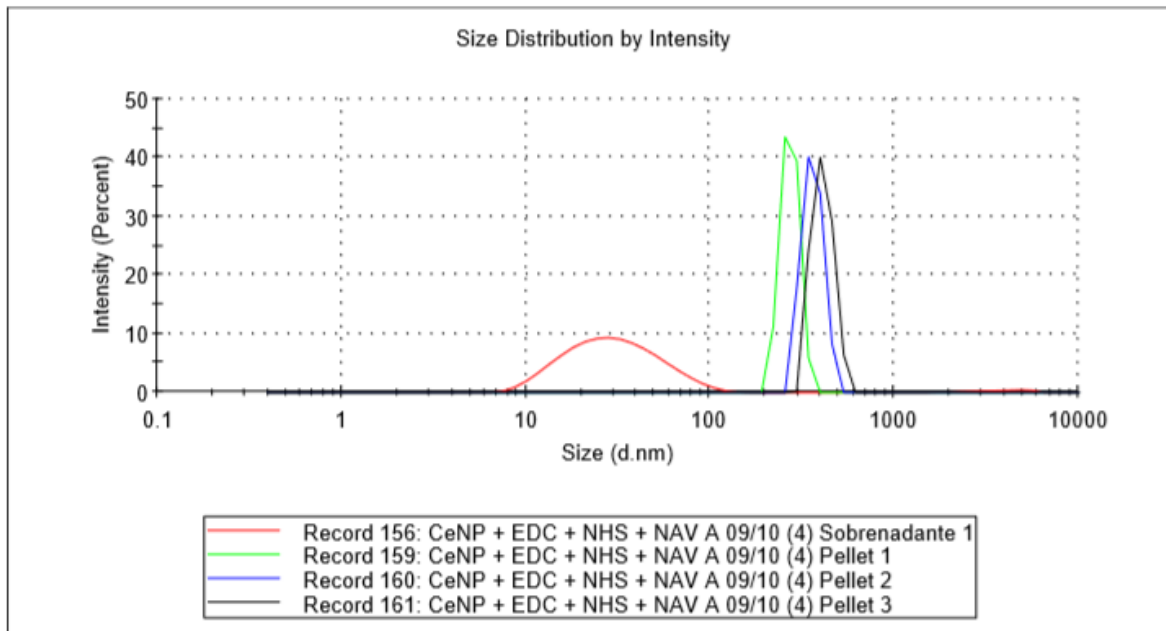


Figura 17 Gráfico de intensidad superpuestos del sobrenadante (rojo) y el precipitado (por triplicado, azul, verde y negro) tras la centrifugación.

Por último, en las figuras 18 y 19 donde se comparan los gráficos de intensidad y los correlogramas (respectivamente) de la muestra recién precipitada (rojo) y transcurridos dos meses a -20°C (por triplicado). En la primera se puede comprobar



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

claramente que las nanopartículas han aumentado notablemente de tamaño mientras que en la segunda se aprecia una disminución notable de su población. Ambas cosas son compatibles sin más que suponer que se producen agregados.

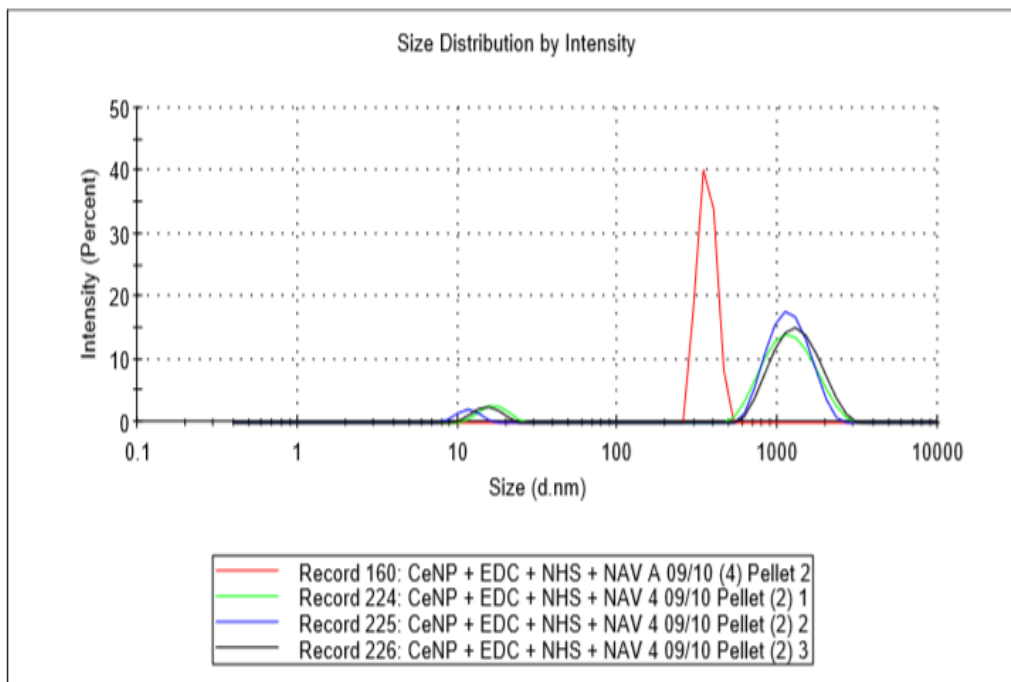


Figura 18: Comparación entre el gráfico de intensidad del precipitado de una muestra de CeO_{2-x} en con un gráfico de intensidad (triplicado) del mismo precipitado tras dos meses almacenado a -20°C



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

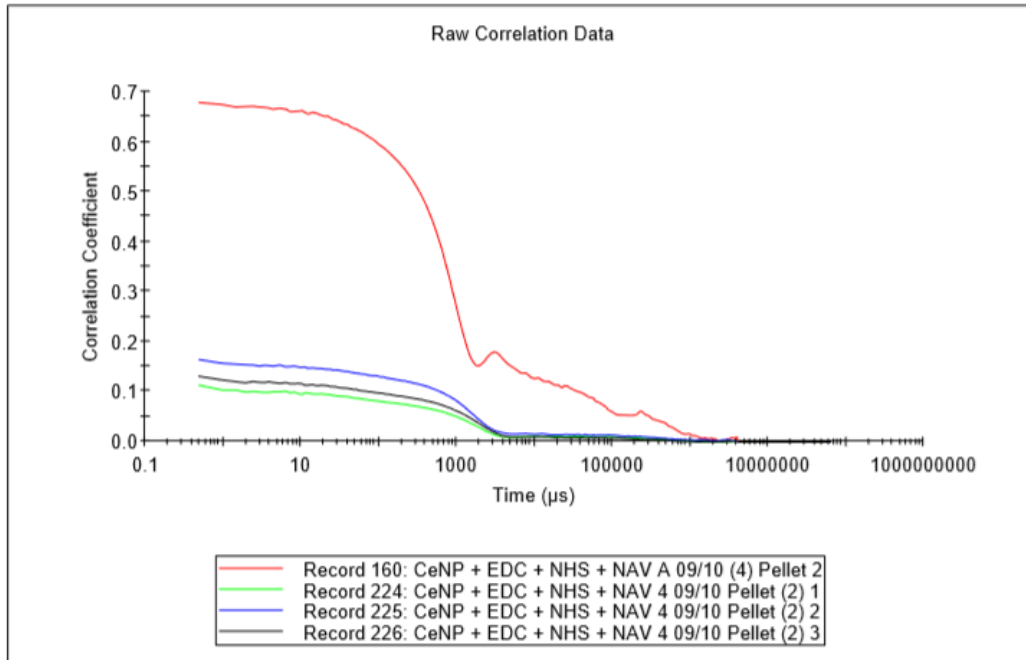


Figura 19: Comparación entre el correlograma del precipitado de una muestra de CeO_{2-x} con un correlograma (triplicado) del mismo precipitado tras dos meses almacenado a -20°C .

Conclusiones

En base a los resultados obtenidos se concluye que el método EDC/Sulfo-NHS es eficaz para unir NAV con terminaciones NH_2 con las nanopartículas de Ag_2S y CeO_{2-x} con grupos carboxilato en su superficie.

Cabe destacar que el procedimiento es mucho más eficaz en el caso de los QD de Ag_2S (todas la nanopartículas son cargadas con NAV) que en el caso de las nanopartículas de CeO_{2-x} (sólo algunas nanopartículas son cargadas con NAV).

Por último, los dos complejos nanopartícula-NAV van degradándose con el tiempo pese a estar conservadas a -20°C .



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

Bibliografía

- Albanell Mestres, J. et al. (2013). "Nanotecnología en medicina". *TransWorld Editors SL; Celsgene; España*.
- Angerer L, Davidson N, Murphy W, Lynch D, Attardi G (September 1976). "An electron microscope study of the relative positions of the 4S and ribosomal RNA genes in HeLa cells mitochondrial DNA". *Cell*. 9 (1): 81–90.
- Asati, A., Santra, S., Kaittanis C., Nath S., Perez, J.M. (2009). "Oxidase-Like Activity of Polymer-Coated Cerium Oxide Nanoparticles". *Angew. Chem. Int. Ed.* 2009, 48, 2308 –2312
- Büller HR, Gallus AS, Pillion G, Prins MH, Raskob GE (January 2012). "Enoxaparin followed by once-weekly idrabiotaparinux versus enoxaparin plus warfarin for patients with acute symptomatic pulmonary embolism: a randomised, double-blind, double-dummy, non-inferiority trial". *Lancet*. 379 (9811): 123–9
- Celardo, I., Pedersen, J. Z., Traversa, E., & Ghibelli, L. (2011). "Pharmacological potential of cerium oxide nanoparticles". *Nanoscale*, 3(4), 1411.
- Diamandis, E. P., & Christopoulos, T. K. (1991). "The biotin-(strept)avidin system: Principles and applications in biotechnology". *Clinical Chemistry*, 37(5), 625–636.
- Flores, Constanza Y. (2014). "Nanopartículas de plata con potenciales aplicaciones en materiales implantables: síntesis, caracterización fisicoquímica y actividad bactericida". p. 233.
- Hasan, S., & Hasan, S. (2015). "A Review on Nanoparticles: Their Synthesis and Types". *Research Journal of Recent Sciences*, (February), 7–10.
- He, L., Su, Y., Lanhong, J., & Shi, S. (2015). "Recent advances of cerium oxide nanoparticles in synthesis, luminescence and biomedical studies: a review". *Journal of Rare Earths*, 33(8), 791–799.



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

- Hermanson, G. T. (2008). "Bioconjugate Techniques (2nd Edition)". (Elsevier, Ed.). *Thermo Fisher Scientific*, Rockford, Illinois, USA.
- Khan, I., Saeed, K., & Khan, I. (2017). "Nanoparticles: Properties, applications and toxicities". *Arabian Journal of Chemistry*.
- Malvern instruments. (n.d.). Intro to DLS, 1–8.
- Medintz, I. L., Uyeda, H. T., Goldman, E. R., & Mattoussi, H. (2005). "Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing". *Nature Materials*, 4(6), 435–446.
- Ozin, Geoffrey A., Arsenault, André C. (2005). "Nanochemistry: a chemical approach to nanomaterials". *The Royal Society of Chemistry*, Cambridge, UK.
- Petryayeva, E., Algar, W. R., & Medintz, I. L. (2013). "Quantum dots in bioanalysis: A review of applications across various platforms for fluorescence spectroscopy and imaging". *Applied Spectroscopy*, 67(3), 215–252.
- Rao, C.N.R., Müller, A., Cheetham, A.K., (2005). "The chemistry of nanomaterials: Synthesis, Properties and Applications (Volume 1)". *WILEY-VCH Verlag GmbH & Co.*, Germany
- Rao, C.N.R., Müller, A., Cheetham, A.K., (2005). "The chemistry of nanomaterials: Synthesis, Properties and Applications (Volume 2)". *WILEY-VCH Verlag GmbH & Co.*, Germany
- Snell EE, Eakin RE, Williams RJ (1940). "A Quantitative Test for Biotin and Observations Regarding its Occurrence and Properties". *Journal of the American Chemical Society*. 62: 175–8.
- Thakur, M. S., & Ragavan, K. V. (2013). "Biosensors in food processing". *Journal of Food Science and Technology*, 50(4), 625–641.



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

- Turner APF, Karube I, Wilson GS (1987) "Biosensors, fundamentals and applications". *Oxford University Press*, Oxford
- Turner, S., Lazar, S., Freitag, B., Egoavil, R., Verbeeck, J., Put, S., Van Tendeloo, G. (2011). "High resolution mapping of surface reduction in ceria nanoparticles". *Nanoscale*, 3(8), 3385.
- Valeur, E., & Bradley, M. (2009). "Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents". *Chem. Soc. Rev.*, 38(2), 606–631.
- Vitaliy V. Khutoryanskiy, Georgios Staikos (2009) "Hydrogen-bonded Interpolymer Complexes: Formation, Structure and Applications" *Ed. World Scientific*, Singapore