

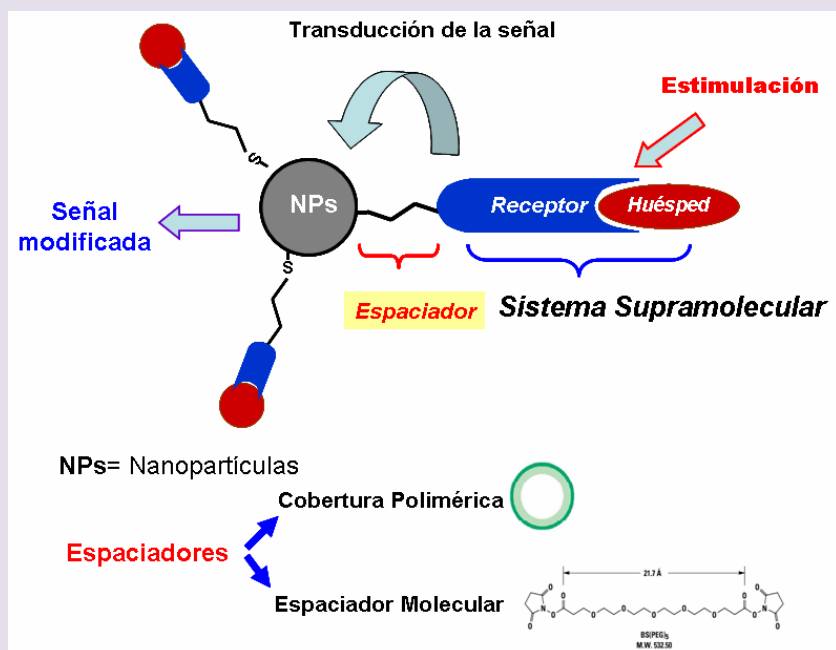
Nanopartículas para biomoléculas

Sistemas Supramoleculares aplicados a la síntesis de nuevas Nanoestructuras

La Química supramolecular, es decir la Química de las interacciones no covalentes, es un área en la cual hay muchos estudios realizados con diversas aplicaciones. Podemos mencionar las ciclodextrinas, las cuales son oligosacáridos cíclicos de glucosa, como principales macrociclos más conocidos y con más desarrollos realizados en aplicaciones analíticas. Además, las modificaciones químicas de dichos macrociclos aumentan aún más la versatilidad y funcionalidad de los mismos. Estos macrociclos emulan interacciones enzimáticas o de anticuerpos, motivo por el cual poseen especificidad y selectividad. Estos sistemas supramoleculares pueden ser parte de nuevos Nanosistemas. De la misma manera otras interacciones de biomoléculas como es el caso del ADN permiten el diseño de nuevas Nanoestructuras con diversas aplicaciones tal como Nanosensores. Es por ello que, de la combinación del conocimiento de la Nanociencia y Química Supramolecular es posible el diseño de nuevas Nanopartículas multifuncionales para ser aplicadas a determinaciones de biomoléculas relacionadas con problemas de salud, diagnóstico por imágenes y Nanomedicina. Este artículo de difusión muestra algunos ejemplos en este sentido.

Por **Guillermo Bracamonte, Guadalupe Miñambres, Natalia Pacioni, Denis Boudreau, Alicia Viviana Veglia**

gbracamonte@fcq.unc.edu.ar



La química Supramolecular puede ser definida como la química de los enlaces no covalentes por Jean-Marie Lehn, premio Nobel de Química en el año 1987.¹ A los sistemas supramoleculares podemos dividirlos en dos grupos, sistemas macrocíclicos y ensambles moleculares.²

Dentro de los macrociclos más conocidos se encuentran las ciclodextrinas (CD), las cuales son oligosacáridos cíclicos de glucosa. Dichos macrociclos poseen la propiedad de formar complejos de inclusión y modificar las propiedades espectroscópicas de los analitos complejados³ Estos receptores pueden detectar diversas moléculas orgánicas, como es el caso de los Indoles, provenientes del metabolismo del triptófano y relacionados con diversas enfermedades en el ser humano, tal como tumores carcinoides y trastornos del sueño.⁴ Estos compuestos poseen propiedades fluorescentes incrementadas cuando se encuentran encapsulados en la forma complejada en presencia de CD. Podemos mencionar al ácido 5 hidroxí-3-indolilacético (5HIA), metabolito de la Serotonina (S) y la 6-hidroxí melatonina (6OHM), metabolito de la Melatonina (M). En estos dos ejemplos mencionados, el analito posee una propiedad luminiscente intrínseca que es modificada por la formación de un sistema supramolecular.

En el presente artículo se presentarán dos determinaciones analíticas desarrolladas en el Departamento de Química Orgánica, de la Facultad de Ciencias Químicas, UNC, para dichos metabolitos de importancia biológica en muestras de orina.^{5, 6}

Por otra parte, se mostrará un ejemplo de una publicación de un trabajo llevado a cabo durante una estadía posdoctoral, de uno de los co-autores, en la Universidad Laval, Québec, Canadá; en donde se desarrolló un Nanosensor para la determinación de ADN en muestras de sangre.^{7, 8} El nanosensor es basado en la fluorescencia incrementada por la presencia de una superficie metálica (MEF)⁹ y por la reacción de transferencia de Energía de Förster (FRET).

De esta publicación se discutirá el concepto de transducción e incremento de la señal de emisión fluorescente mediante la utilización de un polímero fluorescente y de Nanopartículas metálicas fluorescentes respectivamente para la determinación de un analito no fluorescente.

Cómo se realizó la investigación

Fueron utilizadas CD de la compañía Cerestar, Francia. Los reguladores del pH y sales utilizados fueron de la Compañía Ciccarelli, Argentina. Las muestras de ADN fueron provistas por Hema-Québec (Québec) Canadá. Y el resto de los reactivos utilizados fueron de la compañía Sigma-Aldrich, Estados Unidos de Norteamérica.

En las determinaciones analíticas de los indoles las mediciones de emisión de fluorescencia fueron realizadas en un espectrofluorímetro Jasco FP-777 del Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba. Para la detección y cuantificación del ADN se utilizó un sistema de citometría en flujo con detección fluorescente desarrollado en el Centre d'Optique et Photonique Laser, Québec, Canadá.

Resultados

Para comenzar el trabajo referido a la determinación de indoles de interés biológico se realizó el estudio de interacción entre los receptores macrocíclicos, β CD (7 unidades de glucosa) e HP β CD (CD modificada con grupos hidroxipropilos de manera de incrementar la solubilidad) con S y 5HIA y solo con HP β CD para 6OHM mediante la utilización de espectrofluorimetría a pH= 2,00; 6,99 y 13,00 de manera de estudiar las diferentes especies ácido-base de los analitos según corresponda. En presencia de los receptores, los

sustratos mostraron un incremento de emisión fluorescente en el rango de 30-60 %. Las constantes de asociación (K_A) determinadas estuvieron en el rango de 60-200 M⁻¹.

Dichos complejos permitieron la determinación directa de 6OHM y la determinación simultánea de S y 5HIA utilizando un tratamiento matemático de la señal obtenida para la resolución analítica de la mezcla. Dicho último método mencionado es llamado método espectrofluorimétrico del punto cero de la primera derivada.

Dichas metodologías analíticas se validaron en una muestra biológica de orina. Para ello se realizaron las correspondientes curvas de calibración en ausencia y presencia de matriz de orina. Dicha muestra real fue tratada mediante una serie de etapas y extracciones. Según el analito se observó un pequeño efecto negativo en presencia de matriz en presencia de las CD estudiadas. Este inconveniente fue resuelto mediante la utilización de las correspondientes sensibilidades analíticas en presencia de matriz.

Con esta metodología analítica se alcanzaron límites de detección del orden de los 50 pM en las mejores condiciones.

Por otra parte para la determinación del ADN proveniente de muestras de sangre, se sintetizó un nanosensor basado en nanopartículas de plata recubiertas de un polímero de sílica que tiene incorporado moléculas de eosina. Además la superficie exterior de las nanopartículas fue modificada con hebras de ADN mediante reacciones de química orgánica. Estas hebras de ADN unidas covalentemente a la superficie de las nanopartículas interaccionan con un polímero fluorescente que es adicionado, y que en presencia de la simple hebra de ADN sufre una atenuación de su emisión. Mientras que en presencia de la hebra de ADN complementaria la emisión fluorescente es incrementada. Este efecto es debido a un cambio de la conformación de las unidades monoméricas fluorescentes del polímero. Experimentalmente se adicionó al nanosensor una muestra de ADN, se la dejó interactuar 10 minutos, y posteriormente mediante un arreglo de citometría en flujo con detección fluorescente, se excitó al valor de máxima longitud de onda de absorción del polímero. La emisión incrementada debido a la presencia del corazón metálico de la nanopartícula (**MEF**) fue reabsorbida mediante **FRET** por las moléculas de eosina incorporadas dentro de la cobertura polimérica. La emisión de este fluoróforo fue medida solamente en presencia de la doble hebra completamente complementaria. Cuando se realizó el mismo experimento, pero en ausencia del fluoróforo incorporado en la cobertura polimérica, la emisión no fue medida. El diseño de este nanosensor permitió la determinación del gen SRY, gen que determina el sexo en el ser humano. Para ello se tomaron diez muestras de sangre incógnita, se la procesó a cada

una de ellas de manera de extraer el ADN y se realizó la determinación del gen SRY dando como resultado 5 muestras del sexo masculino y 5 muestras del sexo femenino.

Conclusiones

En el estudio de la determinación de indoles, los valores de K_A determinados están relacionados con interacciones débiles provenientes del efecto hidrofóbico e interacciones de Van der Waals debido a la formación de un complejo. Pero aún así las sensibilidades analíticas fueron incrementadas en presencia de los receptores estudiados, mejorando los parámetros analíticos para su posterior determinación en muestras reales.

La metodología desarrollada para la determinación de S, 5HIA y 6OHM puede ser propuesta como simple método de determinación analítica de bajo costo que involucra tan solo una extracción de la muestra. Además también se la propone como método acoplado a la utilización de cromatografía de alta resolución mediante un reactor pos-columna. Además estos macrociclos podrían reemplazar a solventes orgánicos, en la cromatografía mencionada, para la determinación de indoles y otras moléculas de interés medioambiental, tales como pesticidas.¹⁰

En la determinación del ADN geonómico los valores de sensibilidades analíticas fueron mayores en presencia de la nanopartícula fluorescente comparados a los correspondientes a las nanopartículas no fluorescentes, demostrándose allí los efectos **FRET** y **MEF** involucradas en el proceso de transducción de la señal con su consecuente posterior emisión incrementada de la fluorescencia del fluoróforo incorporado en la cobertura polimérica.

Además cabe destacar que el desarrollo del nanosensor basado en nanopartículas metálicas fluorescentes y en base a la interacción del polímero transductor fluorescente con la doble hebra de ADN debido a su alta sensibilidad podría reemplazar a las determinaciones más costosas que demandan mayor tiempo de tratamiento de la muestra tal como lo es PCR.

En cuanto a las estrategias utilizadas en ambas determinaciones, para la determinación analítica de los indoles la estrategia fue la formación de un complejo de inclusión de manera de incrementar la emisión de fluorescencia debido a la estabilización del estado excitado del analito complejado. Mientras que para el caso de una biomolécula no fluorescente como es el ADN, la estrategia para la determinación analítica fue la utilización de un transductor de la señal. Este es un polímero catiónico fluorescente que interacciona con dicha biomolécula que provoca un incremento de la emisión

fluorescente del mismo en presencia de la doble hebra complementaria que es incrementada mediante **MEF**. Además mediante **FRET** la emisión es reabsorbida por otro fluoróforo (eosina). Ambas estrategias son válidas y pueden ser aplicadas al diseño de nuevas nanoestructuras con diversas aplicaciones.

Para concluir, podemos mencionar que de la unión del conocimiento de la química supramolecular y de la nanociencia podemos diseñar y plantear nuevos nanosensores de manera de realizar un seguimiento, diagnóstico por imágenes y determinación de biomoléculas con interés biológico.

La investigación

El equipo está conformado por docentes-investigadores del INFIQC, Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba; y del Département de chimie and Centre d'optique, photonique et laser (COPL), Université Laval, Québec (QC), Canadá. Se agradece a CONICET y FONCyT por los fondos y becas otorgadas. Y otro agradecimiento al Profesor Denis Boudreau por la oportunidad Pos-doctoral otorgada en el período 2009-2011 al coautor A. Guillermo Bracamonte en la Universidad Laval.

Referencias

- ¹ Eric V. Anslyn; J. Org. Chem., 72, 687-699 (2007).
- ² H. Ringsdorf; Supramolecular Science, 1, 1, 5-6 (1994).
- ³ M. L. Bender y M. Komyama; Cyclodextrin Chemistry, Reactivity and Structure. Concepts in Organic Chemistry 6 . Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1978).
- ⁴ Carl A. Burtis, Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry, 6th Edition (2001).
- ⁵ A. Guillermo Bracamonte, Alicia V. Veglia*, Talanta, 83, 1006- 1013 (2011).
- ⁶ A. Guillermo Bracamonte, Guadalupe Miñambres, Alicia V. Veglia, ARKIVOC (vii) 439-449 (2011).
- ⁷ Danny Brouard; Mathieu Lessard Viger; A. Guillermo Bracamonte; Denis Boudreau, ACS Nano, 5 1888-1896 (2011).
- ⁸ Danny Brouard, Olivier Ratelle, A. Guillermo Bracamonte, Maryse St-Louis, Denis Boudreau, Analytical Methods, 5 6896 – 6899 (2013).
- ⁹ J. R. Lackowicz, K. Ray, M. Chowdhury, H. Szmanski, Y. Fu, J. Zhang, K. Nowaczyk; Analyst, 133, 1308-1346 (2008).
- ¹⁰ N. L. Pacioni, A. G. Bracamonte, A. V. Veglia*, J. Photochem. Photobiol. A: Chem. 198 (2008) 179-185.