



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS
ESCUELA DE POSTGRADO

DESARROLLO DE UN MATERIAL NANOESTRUCTURADO ÓPTICO-MAGNÉTICO
UTILIZANDO FERRITINA

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA
MENCIÓN CIENCIA DE LOS MATERIALES

ITALO ARNOLDO MOGLIA FERNANDEZ

PROFESOR GUÍA:

MÓNICA SOLER JAUMA

PROFESOR CO-GUÍA:

VÍCTOR FUENZALIDA ESCOBAR

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:

MARCELO KOGAN BOCIAN

MARCOS FLORES CARRASCO

RODRIGO SEGURA DEL RÍO

SANTIAGO DE CHILE

2018

RESUMEN

Esta tesis consiste en el uso de la proteína ferritina para la síntesis de nanopartículas plasmónicas y magnéticas en su cavidad, estudiándose el efecto de las condiciones de síntesis de estos materiales sobre las propiedades ópticas, magnéticas y estructurales del sistema resultante.

El trabajo está dividido en cinco etapas: i) El estudio de la proteína ferritina como material de partida, ii) la formación de apoferritina, iii) la síntesis de nanoestructuras de oro en la cavidad de la proteína, iv) la formación de óxidos de hierro magnéticos dentro de la proteína y v) la carga mixta de nanoestructuras de oro y óxidos de hierro en la cavidad.

En el estudio inicial de la proteína se establece la coexistencia de agregados y monómeros de ferritina, en que el contenido de hierro en la cavidad está relacionado con la existencia de especies oligoméricas. Por otro lado, el núcleo de óxido de hierro presente en la cavidad corresponde a una mezcla de diversos tipos de óxidos con un comportamiento antiferromagnético.

Con el propósito de obtener apoferritina, se evaluaron distintas condiciones para la remoción de los óxidos de hierro nativos presentes en la proteína, resultando en un protocolo que permite la remoción casi total del hierro, conservando su integridad estructural. A su vez se observa que las propiedades ópticas de la proteína dependen del contenido de hierro.

La síntesis de nanoestructuras de oro en la cavidad de la proteína mediante la adición y reducción controlada del oro permite obtener partículas monodispersas. Sintetizándose inicialmente cúmulos o *clusters* de oro, los que presentan fluorescencia y posteriormente las nanopartículas de oro, las que exhiben el plasmón de resonancia superficial.

La formación de óxidos de hierro magnéticos en la cavidad de la proteína fue obtenida mediante la adición y oxidación controlada de hierro, produciendo una mezcla de óxidos magnéticos cuya proporción depende principalmente del contenido de hierro y del pH del proceso.

La carga mixta y secuencial de *clusters* de oro y de óxidos de hierro genera moléculas de proteína en las cuales coexisten ambas nanoestructuras, conservándose las propiedades magnéticas. La existencia de *clusters* de oro limita el proceso de incorporación del hierro.

ABSTRACT

The main objective of this project is the use of the protein ferritin for the synthesis of plasmonic and magnetic nanoparticles in its cavity. The effect of the synthetic conditions on the resulting optical, magnetic and structural properties are studied, considering the different nanomaterials prepared in the cavity.

This thesis is divided into five parts: i) The study of ferritin as starting material, ii) the formation of apoferritin, iii) the synthesis of gold nanostructures in the cavity, iv) the formation of magnetic iron oxides within of the protein and v) the mixed loading of gold nanostructures and iron oxides in the cavity.

The initial study of the protein used as starting material establishes the coexistence of ferritin aggregates and monomers, where the iron content is related to the existence of aggregated species. The iron oxides core is a mixture of different kinds of oxides with an antiferromagnetic behavior.

In order to obtain apoferritin, different conditions were evaluated for the removal of the native iron oxides present in the protein. A protocol is created that allows to obtain almost iron devoided protein and preserving its structural integrity. The optical properties of the protein depend on the iron content.

The synthesis of gold nanostructures in the cavity of the protein by the route of addition and controlled reduction of the gold produces particles with a monodispersed size distribution. Initially fluorescent gold clusters were synthesized, leading finally to gold nanoparticles with the surface resonance plasmon.

The formation of magnetic iron oxides inside the protein was achieved by the addition and controlled oxidation of iron, obtaining a mixture of iron oxides that depends mainly on the iron content and pH of the process.

The sequential loading of gold clusters and iron oxides generates protein molecules with both nanostructures inside, conserving the magnetic properties. The existence of gold clusters limits the iron incorporation.

Mil días para ser aprendiz,
diez mil días para ser maestro.

Proverbio japonés

Escucho y olvido. Veo y recuerdo. Hago y comprendo.

Confucio

Si tienes ciencia, deja que otros enciendan sus velas en ella

Margaret Fuller

AGRADECIMIENTOS

A Carolina, mi fiel compañera, quien ha tenido una enorme paciencia desde hace 14 años, apoyándome en cada etapa de la vida, en particular en estos duros años de doctorado que como familia hemos abordado. No existen palabras para agradecer todo lo que has hecho y haces por mí.

A mis hijos Lucas y Giuliano, por ser la mayor odisea que un hombre puede enfrentar. Esta escuela enseña que se les puede dar amor, pero no mis pensamientos, pues ellos tienen los propios.

Deseo agradecer a mis tutores, Mónica Soler por dirigir este trabajo, que me permitió concretar exitosamente mi proyecto de investigación. A Víctor Fuenzalida, por ser un referente en investigación científica, acompañándome desde mi tesis de pregrado a hasta ahora.

A Margarita Santiago y Álvaro Olivera, miembros del FerriTeam. Por el apoyo en el trabajo de laboratorio y la discusión de resultados.

A Nuria Aliaga, por recibirme en su laboratorio y todo el apoyo brindado durante mi estadía en Barcelona. A Frank Quero por su colaboración en las mediciones y discusiones de espectroscopía Raman. A Esteban Vargas por el apoyo con TEM y VSM en la Universidad de Santiago. A José Gaete por la cuantificación de las muestras con oro.

A mis padres Arnoldo Y Elizabeth, por apoyarme incondicionalmente en esta aventura. Gracias a ustedes dos por todo. A mis hermanos Enzo y Nicole, cómplices, amigos y confidentes, quienes fueron los primeros en motivarme a emprender el doctorado.

A Conicyt por la Beca de Doctorado Nacional 2015 N° 21150874 y al Centro de Biotecnología y Bioingeniería CeBiB.

A mis compañeros y amigos que me han acompañado en estos años de doctorado: Roberto Villarroel, Carolina Rojas, Andrés Ibáñez, Álvaro Etcheverry, Joseline Iribarra, María Cristina Ravanal, Manuel Romero, Esteban Vargas, Isadora Berlanga, Noelia Benito, Fernando Guzmán y Daniela Arancibia.

Finalmente a mis compañeros del Camino Kyokushin: Osu!

TABLA DE CONTENIDO

Resumen	i
Abstract.....	ii
Agradecimientos	v
Índice de tablas.....	xi
Índice de figuras.....	xiii
Capítulo 1	1
1.1 Introducción	1
1.2 Hipótesis y objetivos	10
Capítulo 2	11
Materiales, métodos y caracterización.....	11
2.1 Reactivos y materiales.....	11
2.2 Métodos.....	12
2.2.1 Remoción de los óxidos de hierro o formación de apoferritina (AFt)	12
2.2.1.1 Procedimiento de reducción y diálisis asistida por quelantes	12
2.2.1.2 Escalamiento de la formación de apoferritina asistida por EDTA ...	13
2.2.2 Síntesis de nanoestructuras de oro en la cavidad (AFt-Au).....	13
2.2.3 Oxidación controlada de hierro en la cavidad de la proteína (AFt-Fe)..	14
2.3 Caracterización.....	16
Espectroscopía UV-Vis.....	16
Cuantificación de proteínas	16
Cuantificación colorimétrica de hierro por método del complejo Fe-BiPy..	18
Cromatografía de exclusión de tamaño (SEC)	18

Espectrometría de fotoelectrones de rayos X (XPS)	19
Espectroscopía Raman	20
Microscopía electrónica de Transmisión (TEM)	20
Caracterización magnética	21
Dispersión dinámica de luz (DLS) y potencial Z	22
Espectroscopía de absorción atómica (AAS)	23
Capítulo 3	25
Ferritina: Material de partida	25
3.1 Introducción	25
3.2 Propiedades ópticas y estructurales	30
3.3 Núcleo de óxidos de hierro	36
3.3.1 Estudio de la composición y estructura	37
3.3.2 Estudio de las propiedades magnéticas	46
3.4 Estudio por microscopía electrónica	48
3.5 Conclusiones	50
Capítulo 4	52
Formación de apoferritina	52
4.1 Introducción	52
4.2 Propiedades ópticas y contenido de hierro	55
4.3 Integridad estructural	60
4.4 Recuperación de proteína	64
4.5 Conclusiones	66
Capítulo 5	68
Formación de nanoestructuras de oro en la cavidad de la proteína	68

5.1	Introducción	68
5.2	Propiedades ópticas	74
5.3	Integridad estructural y tamaño	77
5.4	Contenido de oro	80
5.4.1	Incorporación de oro.....	81
5.4.2	Estudio de la composición elemental	83
5.5	Estudio por microscopía electrónica de transmisión.....	87
5.6	Conclusiones	92
Capítulo 6	94
Formación de óxidos de hierro magnéticos en la cavidad de la proteína	94
6.1	Introducción	94
6.2	Remoción controlada de los óxidos de hierro	100
6.2.1	Contenido de hierro y propiedades ópticas	102
6.2.2	Integridad estructural.....	103
6.2.2	Propiedades magnéticas	104
6.3	Carga y oxidación controlada de hierro	106
6.3.1	Recuperación de proteína y contenido de hierro.....	108
6.3.2	Propiedades magnéticas	113
6.3.2	Estudio de la composición.....	117
6.4	Conclusiones	122
Capítulo 7	123
Carga mixta de oro-óxidos de hierro en la cavidad de la proteína ferritina	123
7.1	Introducción	123
7.2	Propiedades ópticas y contenido de hierro y oro	127

7.3 Estudio por microscopía electrónica de transmisión.....	130
7.4 Propiedades magnéticas	136
7.5 Conclusiones	138
Capítulo 8	140
Aspectos generales y perspectivas.....	140
8.1 Aspectos generales	140
8.2 Perspectivas	144
Glosario	147
Bibliografía.....	150
Apéndice.....	175
Anexo 1	175
Anexo 2	176
Anexo 3	177
Anexo 4	179
Anexo 5	181
Síntesis de nanoestructuras de oro en dentro de la ferritina con óxidos de hierro en la cavidad	181
Anexo 6	186
Publicaciones	188

Índice de tablas

Tabla 3.1. Valores de contenido de hierro, diámetro hidrodinámico y potencial Z de ferritina y oligómeros colectados.....	35
Tabla 3.2. Energías de ligadura, ancho de curva y porcentaje de las señales C1s, N1s y O1s de ferritina.	38
Tabla 3.3. Valores de Energías de ligadura, ancho de curva y porcentaje de la señal Fe2p de ferritina	40
Tabla 3.4. Tabla comparativa de modos vibracionales Raman activos para los minerales de magnetita, maghemita, hematita y ferrihidrita.....	45
Tabla 4.1 Diámetros hidrodinámicos de las muestras de formación de apoferritina y ferritina	63
Tabla 4.2. Valores de recuperación de proteína	64
Tabla 5.1. Valores de diámetro hidrodinámico y potencial Z de los agregados y monómeros de proteína de muestras con nanoestructuras de oro.....	80
Tabla 5.2. Valores de átomos por molécula de ferritina y porcentaje de oro incorporado en cada tipo de nanoestructura.....	82
Tabla 5.3. Valores de contenido de oro, diámetro de partícula estimado por estructura cristalina y diámetro real estimado por TEM	91
Tabla 6.1. Valores de contenido de hierro en muestras de remoción controlada.	102

Tabla 6.2. Valores de recuperación de proteína, contenido de hierro y eficiencia de carga.....	108
Tabla 6.3 Ajuste de curvas de la señal Fe 2p _{3/2} de XPS para muestra con 650 y 1250 Fe/Ft	120
Tabla 7.1. Valores comparativos de contenido de hierro, diámetro de partícula y relación de átomos de hierro por nanómetro cúbico.....	129

Índice de figuras

Figura 1.1. Diagrama de un material multifuncional de teranóstico	5
Figura 1.2. Diagrama de una corona de proteínas.....	7
Figura 3.1 Diagrama de la proteína ferritina	26
Figura 3.2. Esquema de la composición de los óxidos de la ferritina.....	27
Figura 3.3. Diagrama de la versatilidad de la proteína ferritina para el desarrollo de materiales bionanotecnológicos.....	29
Figura 3.4 Espectro UV-Vis de la proteína ferritina.....	31
Figura 3.5. Cromatograma de exclusión de tamaño de ferritina.	33
Figura 3.6. Diagrama de agregados y monómeros de ferritina.....	35
Figura 3.7. Espectro de XPS de ferritina.....	38
Figura 3.8 Espectro de alta resolución de la señal Fe 2p.	40
Figura 3.9. Espectro Raman de ferritina	42
Figura 3.10. Diagrama de las estructuras cristalinas de magnetita, maghemita, hematita y ferrihidrita	43
Figura 3.11. Curva de magnetización de ferritina	47
Figura 3.12. Imágenes TEM de proteína ferritina.....	48
Figura 4.1. Diagrama de las condiciones de formación de apoferritina	54
Figura 4.2 Espectros de absorción de las muestras de apoferritina	56
Figura 4.3. Contenido de hierro de las muestras de apoferritina	58
Figura 4.4. Cromatogramas SEC de muestras de apoferritina.	61

Figura 4.5 Punto isoeléctrico de la ferritina.....	62
Figura 5.1. Esquema del plasmón de resonancia superficial	69
Figura 5.2. Espectro de absorción de nanopartículas con diferente tamaño	70
Figura 5.3 Espectro de absorción de nanobarras	71
Figura 5.4. Diagrama de la síntesis de nanoestructuras de oro en apoferritina	73
Figura 5.5 Espectros de absorbancia de apoferritina y con nanoestructuras de oro en su cavidad.....	74
Figura 5.6 Perfil de fluorescencia de las muestras de apoferritina y con nanoestructuras de oro	76
Figura 5.7. Diagrama de luminiscencia para cúmulos de oro.	76
Figura 5.8. Cromatogramas de exclusión para muestra de apoferritina y con nanoestructuras de oro.....	78
Figura 5.9. Curvas de distribución de tamaños para las muestras con <i>clusters</i> y nanopartículas de oro	79
Figura 5.10. Espectro XPS de alta resolución de la señal Au 4f de la muestra con <i>clusters</i> de oro	84
Figura 5.11 Espectro XPS de alta resolución de la señal Au 4f de la muestra con <i>nanopartículas</i> de oro	85
Figura 5.12 Imágenes TEM de <i>clusters</i> de oro	87
Figura 5.13. Imágenes TEM de nanopartículas de oro, figura (a) barra de 20 nm, figura (b) barra de 50 nm.	88
Figura 5.14. Histogramas de distribución de tamaños de los núcleos de oro para la muestra con <i>clusters</i> (a) y nanopartículas (b)	89

Figura 6.1. Esquema del ordenamiento magnético en los diversos tipos de materiales.	96
Figura 6.2. Diagrama de relación entre el campo coercitivo y el tamaño de partícula.	97
Figura 6.3. Ciclo de histéresis de un material magnético de acuerdo al tipo de comportamiento.	99
Figura 6.4. Diagrama de remoción controlada del hierro	101
Figura 6.5. Espectros de absorbancia de muestras por remoción controlada de hierro.....	103
Figura 6.6. Cromatogramas de exclusión de tamaño de muestras por remoción controlada de hierro.	104
Figura 6.7. Curvas de histéresis de muestras por remoción controlada.	105
Figura 6.8. Esquema de la carga y oxidación controlada de hierro en la cavidad de ferritina.....	107
Figura 6.9. Diagrama de Pourbaix del hierro	112
Figura 6.9 Curvas de magnetización de muestras con oxidación controlada bajo distintas condiciones de síntesis.....	115
Figura 6.11. Espectros de XPS de alta resolución de la señal Fe2p de las muestras obtenidas a 50°C y pH 9.	119
Figura 7.1. Diagrama de tipos de nanoestructuras para el desarrollo de materiales multifuncionales	124
Figura 7.2. Diagrama de las rutas evaluadas para la obtención de un material óptico-magnético en la cavidad de la proteína ferritina.....	126
Figura 7.3. Espectros de absorbancia de muestras de proteína con <i>clusters</i> de oro y carga mixta de <i>clusters</i> -óxidos de hierro.....	128

Figura 7.4. Imagen TEM de muestra de carga mixta.	131
Figura 7.5. Imagen TEM de muestra de carga mixta.	133
Figura 7.6. Diagramas de distribución de tamaños de muestras con <i>clusters</i> de oro y con óxidos de hierro.....	134
Figura 7.7 Imagen TEM con perfil de composición.....	135
Figura 7.8 Curvas de magnetización de muestra de con óxidos de hierro y carga mixta de oro-óxidos de hierro.....	136
Figura A 1.1. Espectros de XPS de ferritina antes y después de erosión con Ar ⁺ . 175	175
Figura A 1.2. Difracción de electrones de área seleccionada de ferritina	175
Figura A 2.1. Curvas de A _{280 nm} para determinación del coeficiente de extinción molar ϵ^{280}	176
Figura A 2.2. Perfil electroforético en gel no denaturante de las muestras de apoferritina y ferritina nativa (HSF).	176
Figura A 3.1. Espectro XPS de la muestra con <i>clusters</i> de oro.	177
Figura A 3.2. Espectros XPS de alta resolución de muestra con <i>clusters</i> de oro para las señales C1s, N1s y O1s.....	177
Figura A 3.3. Espectro XPS de la muestra con nanopartículas de oro.	178
Figura A 3.4. Espectros XPS de alta resolución de muestra con nanopartículas de oro para las señales C1s, N1s y O1s.....	178
Figura A 3.5. Espectros XPS de alta resolución de señales Au4f y C1s de muestra de nanopartículas de oro sintetizadas con exceso de ácido ascórbico.....	179
Figura A 4.1 Curvas de A _{280 nm} de ferritina y apoferritina	176

Figura A 4.2 Perfil electroforético en gel no denaturante de las muestras de apoferritina y ferritina nativa.....	176
Figura A 5.1. Espectros de absorbancia de muestras con distinto contenido de hierro utilizadas para la síntesis de nanoestructuras la proteína	184
Figura A 5.2. Imagen TEM de muestra con carga mixta y análisis de composición por EDS.	186
Figura A 6.1. Viabilidad celular por ensayo de MTS sobre B16F10 y AGS.	187

CAPÍTULO 1

1.1 Introducción

La nanotecnología es considerada como una poderosa herramienta para el desarrollo y empleo de diversos fenómenos de la nanoescala, en que la síntesis de nuevos materiales y la modulación controlada de las propiedades ópticas, electrónicas y magnéticas, entre otras, han favorecido la miniaturización de dispositivos electrónicos[1], optimización de procesos catalíticos[2], desarrollo de nuevos dispositivos para el reconocimiento de biomoléculas[3] y tratamiento de enfermedades[4].

Las potenciales aplicaciones de los nanomateriales dependen de sus propiedades, las que pueden ser moduladas por las condiciones de síntesis, existiendo actualmente diversos métodos para la creación de nanomateriales como partículas, barras o películas delgadas. La nanoestructura más estudiada a la fecha corresponde a las nanopartículas, las que son clasificadas principalmente según su composición en orgánicas e inorgánicas. Las nanopartículas orgánicas son esencialmente de polímeros[5], [6] mientras que en la categoría de inorgánicas se encuentran las nanopartículas metálicas como oro[7], plata[8], cobre[9], níquel[10], cobalto[11], o platino[12] y de óxidos metálicos tales como Fe_2O_3 [13], Co_3O_4 [14], entre otros. Finalmente *quantum dots* cuya composición corresponde principalmente a selenuros y sulfuros como ZnS y CdSe[15] a modos de ejemplo.

Dentro de las nanopartículas inorgánicas, las nanopartículas de oro presentan interesantes propiedades ópticas y superficiales que no se presentan en la mesoescala[16]. Los sistemas coloidales en base a nanopartículas de metales nobles exhiben una intensa coloración debido a su interacción con la radiación electromagnética, absorbiendo luz en un rango que es modificable en función de la forma y tamaño, principalmente. Este fenómeno se debe a la oscilación de los electrones de la banda de conducción producto del estímulo producido por la luz incidente. Esto induce el desplazamiento de los electrones deslocalizados y por tanto generando un dipolo en la superficie de la nanopartícula, fenómeno llamado plasmón de resonancia superficial. Estas nanopartículas también presentan una destacable química superficial, producto del dipolo generado y la estructura cristalina, las cuales interactúan fácilmente con el ambiente circundante. La cualidad de absorber energía en un rango modificable y confinarla en la superficie, así como las interacciones superficiales están siendo evaluadas en sistemas de diagnóstico[17], transporte y liberación de fármacos[18], agentes de terapia fotodinámica para el tratamiento del cáncer[19], entre otras aplicaciones.

Por otro lado, las nanopartículas de óxidos metálicos como Fe_3O_4 o $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ presentan un comportamiento magnético producto de su reducido tamaño. Las nanopartículas de óxidos de hierro magnéticos con un tamaño inferior a 100 nm se comportan como si cada partícula fuera solo un dominio magnético, propiedad llamada superparamagnetismo. Este comportamiento presenta una magnetización cercana a cero en ausencia de un campo magnético externo, además de bajos valores de remanencia y coercitividad, lo que implica que este tipo de nanopartículas no generan aglomeración por remanencia magnética lo que favorece su estabilidad en sistemas biológicos. Las nanopartículas de óxidos de hierro además presentan una baja toxicidad celular por lo que están siendo estudiadas como agentes de contraste para la obtención de imágenes por

resonancia (MRI)[20]–[22], purificación de biomoléculas[23], [24], liberación de fármacos e hipertermia por estímulos magnéticos externos[23]–[26].

El uso de la nanotecnología ha presentado un éxito considerable en el campo biomédico utilizando nanopartículas, debido a que estas pueden ser incorporadas fácilmente a las células, desplazándose con relativa facilidad en su interior[27], permitiendo explotar sus propiedades físico-químicas. Las aplicaciones biomédicas han incorporado una nueva aproximación biológica a la nanotecnología, dando espacio a la simbiosis entre ciencia de los materiales y biotecnología[28], facilitando la comprensión de la interacción de nanomateriales con entidades biológicas. Esto ha potenciado trabajos interdisciplinarios que permiten utilizar nanopartículas para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades, áreas que se describen a continuación como imagenología, transporte y liberación de fármacos e hipertermia.

1. La imagenología es el conjunto de técnicas para crear imágenes del cuerpo humano y animal permitiendo estudiar, diagnosticar y examinar la anatomía. En esta área, las nanopartículas de oro con una banda de absorción de luz definida están siendo utilizadas en las imágenes de microscopía de campo oscuro [29]–[31], presentando un mejor contraste y así reemplazando a los agentes fluorescentes tradicionales. A su vez, las nanopartículas magnéticas están siendo explotadas en las imágenes por resonancia magnética (MRI) [20]–[22], [32], permitiendo incrementar el contraste y por lo tanto realizar diagnósticos más certeros.

2. En el campo del transporte y liberación de fármacos, la utilización de un portador, un sistema nanoestructurado que permite almacenar y liberar un fármaco de manera controlada. Diversos tipos de nanopartículas pueden ser modificadas para contener fármacos y que su interacción sea específica con ciertos tejidos (*cell targeting*)[33]·[34]. Por otro lado, la liberación del fármaco

puede ser producida por el ambiente fisiológico que rodea las nanopartículas y también como respuesta frente a un estímulo externo[31], [35]–[38].

3. La hipertermia es la absorción de energía por parte de las nanopartículas producto de un estímulo externo y su disipación en forma de calor, generando un incremento significativo en la temperatura local del medio que rodea las nanopartículas. Las nanopartículas de oro que presentan absorción de luz en el infrarrojo cercano están siendo estudiadas debido a que en este rango el tejido presenta una baja absorción de luz, también llamada ventana biológica[4]. Esto permite excitar fácilmente las nanopartículas, las que disipan su energía en forma de calor, lo que produce un incremento en la temperatura sobre los 40°C, induciendo la destrucción de células cancerígenas[4], [19], [39]. De similar manera, las nanopartículas magnéticas pueden ser estimuladas por campos magnéticos alternos o microondas produciendo un efecto similar[32], [33], [40].

Un nuevo desafío para la nanotecnología en el área biomédica es la creación de materiales multifuncionales que permitan ser utilizados como agentes de diagnóstico y terapia al mismo tiempo, también llamados de teranóstica[41]. Esto es posible de obtener mediante la unión de dos o más tipos de nanoestructuras diferentes que permitan complementar sus propiedades. En esta línea se investigan dispositivos nanométricos que una vez inoculados en un organismo vivo sean capaces de interactuar con un tejido específico, facilitando la detección o visualización en tiempo real mientras efectúa un tratamiento localizado, logrando un proceso de elevada efectividad, figura 1.1.

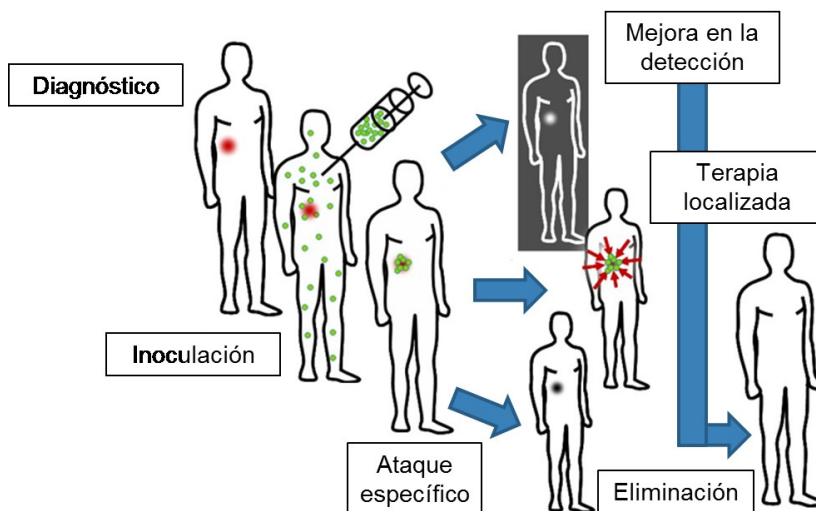


Figura 1.1. Diagrama de aplicación de un material multifuncional de teranóstico

Muchas de estas aplicaciones requieren de materiales estratégicamente desarrollados para dicho propósito, por lo que deben satisfacer una serie de condiciones: 1) compatibilidad con el medio biológico, 2) interacción específica con células o biomoléculas y 3) biodisponibilidad.

Primeramente, la compatibilidad con el medio biológico es un parámetro que evalúa el efecto de las nanopartículas sobre el tejido huésped, como la viabilidad celular. Se han evaluado diversos recubrimientos o agentes capantes de nanopartículas que mejoran la biocompatibilidad, siendo uno de los más reportados en esta línea el polietilenglicol (PEG)[35], [42]–[44].

Un segundo tema de elevado interés en las aplicaciones biomédicas es la interacción específica de las nanopartículas con ciertas células o biomoléculas, concepto llamado *cell targeting* o direccionamiento celular. Esto es posible de obtener por la funcionalización de las nanopartículas con anticuerpos que se

1.1 Introducción

adhieren específicamente a ciertas células, de esta manera se concentran en un tejido incrementando la eficacia del tratamiento[45], [46].

Finalmente, la tercera condición es la biodisponibilidad, parámetro que evalúa la ubicación y disposición final de las nanopartículas en el organismo huésped. La factibilidad en el uso de las nanopartículas en sistemas biológicos vivos se halla limitada debido principalmente a las múltiples interacciones que se presentan entre las nanopartículas y el medio biológico. Dentro de este marco, la evaluación de la biodisponibilidad final de un dispositivo, determina la funcionalidad real que este posee. A la fecha, el control de la biodisponibilidad es un desafío de gran complejidad en el desarrollo de nanomateriales con fines biomédicos.

Uno de los problemas que presentan las nanopartículas al incorporarse en medios fisiológicos vivos, es que sufren transformaciones en su superficie, debido a que este ambiente acuoso posee múltiples biomoléculas como péptidos y proteínas. Dichas biomoléculas interactúan inespecíficamente en la superficie generando una capa orgánica que modifica la identidad biológica de la nanopartícula, dando origen a una corona de proteínas[47]:[48], figura 1.2. La composición de la corona depende del tamaño y características superficiales de las nanopartículas[49]:[50] y esta contiene cientos de proteínas que confieren nuevas características biológicas a las nanopartículas, lo que determina la respuesta fisiológica frente las nanopartículas como estabilidad, transporte, acumulación y toxicidad[51].

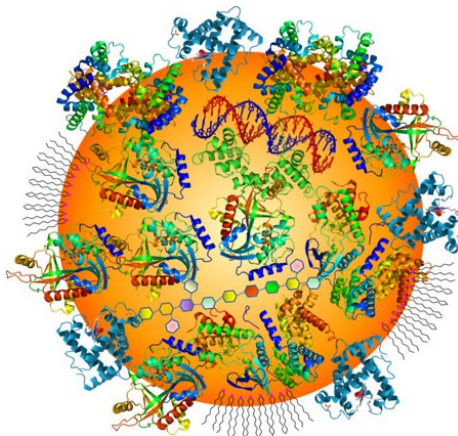


Figura 1.2. Diagrama de una corona de proteínas

La formación de una corona de proteínas en la superficie de la nanopartículas afecta la biodisponibilidad[52], debido que inicia una serie de respuestas inmunes en el organismo[53]. Esto implica que las nanopartículas pierden efectividad al ser reconocidas como agentes patógenos, siendo redirigidas a sitios no deseados[54] e incorporadas a células por fagocitosis o removidas del organismo, perdiéndose control sobre ellas[55],[56].

Debido al creciente interés en entender y abordar el problema de la formación de la corona de proteínas, se evalúan diversas estrategias que permitan tener un mayor control sobre la superficie de las nanopartículas[57]. En esta línea se está investigando la utilización de agentes orgánicos como polietilenglicol (PEG)[58]–[62], el que otorga una mayor vida media a las nanopartículas en el organismo al prevenir su fagocitosis celular[63]. También se ha reportado ampliamente el uso de recubrimientos inorgánicos de sílice, el que permite minimizar las interacciones superficiales, facilitando la incorporación de las nanopartículas en células tumorales y la liberación de fármacos asociados [64]–[66].

1.1 Introducción

En los últimos años se ha potenciado una nueva línea de investigación para recubrir nanopartículas utilizando sistemas biomoleculares, presentando una mayor biocompatibilidad, minimizando las interacciones fisiológicas como la corona de proteínas y facilitando su funcionalización para direccionamiento celular (*cell targeting*). Dentro de esta gama de recubrimientos, se ha destacado el uso de la proteína albúmina, incrementando la biocompatibilidad y efectividad de los sistemas nanoestructurados en medio biológicos [67]–[70]. Por otro lado, es posible manipular proteínas más complejas para la síntesis biomimética de nanopartículas en vistas de aplicaciones biomédicas. Este es el caso de la proteína ferritina, la que ha sido utilizada para la síntesis de diversas nanopartículas, la incorporación de drogas para el tratamiento del cáncer y modificación de su superficie para direccionamiento celular[71]. La versatilidad que presenta esta proteína la presenta como una candidata para el desarrollo de materiales multifuncionales con fines biomédicos.

Dentro de las aplicaciones biomédicas destaca la necesidad de explotar materiales multifuncionales que permitan complementar dos o más propiedades, siendo las de mayor interés las propiedades magnéticas y ópticas. En este campo se destacan la unión de nanopartículas de óxidos de hierro y de metales nobles, exhibiendo propiedades ópticas especiales, superparamagnetismo y una destacable química superficial, siendo descritos como materiales magneto-plasmónicos. Esta clase de materiales multifuncionales están siendo estudiados en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades [72]–[74][75], mejoras en técnicas de detección y separación de biomoléculas[76], [77], entre otros. En los últimos años se ha considerado las nanopartículas bifuncionales de óxido de hierro-oro como uno de los mayores avances en la nanobiotecnología[77].

Considerando los antecedentes expuestos, la creación de materiales multifuncionales para su uso en aplicaciones biomédicas es una línea de

creciente interés. Esto ha motivado la búsqueda de nuevos métodos de síntesis no convencionales de estos materiales, permitiendo obtener una elevada compatibilidad y disponibilidad en medios biológicos.

El presente trabajo busca desarrollar un material magnético y óptico utilizando la proteína ferritina, permitiendo la síntesis controlada de diferentes nanopartículas magnéticas y ópticas en su cavidad. A la fecha, la utilización de este tipo de proteínas para la síntesis de materiales nanométricos sigue siendo una línea de reciente exploración. La creación de un material óptico-magnético utilizando la proteína ferritina permite abordar este desafío mediante un trabajo interdisciplinario entre la ciencia de los materiales y la biotecnología.

1.2 Hipótesis y objetivos

Hipótesis

Es posible obtener un material magneto-plasmónico por medio de la formación de óxidos de hierro y nanoestructuras de oro dentro de la cavidad de ferritina

Objetivo General

Estudiar el efecto de las condiciones de síntesis sobre las propiedades magnéticas y ópticas de un material magneto-plasmónico basado en ferritina con óxidos de hierro y nanoestructuras de oro.

Objetivos específicos

- Estudiar la proteína ferritina como un material de partida.
- Estudiar la eliminación de óxidos de hierro nativos para la formación de apoferritina.
- Estudiar la formación de óxidos de hierro en la cavidad de la ferritina y su efecto sobre las propiedades magnéticas.
- Estudiar la formación de partículas de oro en la cavidad de la ferritina y su efecto sobre las propiedades ópticas.
- Estudiar las propiedades del material constituido por ferritina con óxidos de hierro y nanoestructuras de oro.

CAPÍTULO 2

Materiales, métodos y caracterización

2.1 Reactivos y materiales

Para los ensayos de remoción de los óxidos de hierro nativos presentes en la ferritina o formación de apoferritina se emplearon los siguientes reactivos: ferritina de bazo de caballo (Horse Spleen Ferritin, Sigma Aldrich), ácido tioglicólico (Sigma Aldrich), 2,2·bipiridil (AK Scientific), etilendiaminotetracetato disódico (J.T. Baker Chemicals) y NaCl (Merck). En la síntesis de nanoestructuras de oro en la cavidad de la proteína se utilizó $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Sigma Aldrich), NaBH_4 (Sigma Aldrich), ácido ascórbico (Merck) y buffer Tris (Sigma Aldrich). En la carga controlada de hierro en la cavidad de la proteína se utilizó $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Sigma Aldrich), H_2O_2 37% v/v, AMPSO buffer (Sigma Aldrich), ácido etilendiaminotetracético (Sigma Aldrich) y N_2 gaseoso. La cuantificación de proteína se utilizó ácido bicinchonínico (Sigma Aldrich), $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Sigma Aldrich), tartrato sódico dihidratado (Merck), NaOH (Sigma Aldrich), NaHCO_3 (Sigma Aldrich), CuSO_4 (Sigma Aldrich), Kit Lowry Modificado (Thermo Fisher).

2.2 Métodos

Para todos los ensayos se utilizó agua Milli Q (18 MOhm-cm). Las diálisis fueron realizadas en bolsas de filtración con un corte (Molecular Weight Cut Off) de 3 y 10 kDa (Spectrapore).

2.2 Métodos

2.2.1 Remoción de los óxidos de hierro o formación de apoferritina (AFt)

2.2.1.1 Procedimiento de reducción y diálisis asistida por quelantes

1. -Diálisis asistida por BiPy: Se mezclan 125 μ L de Ft con 35 μ L de TGA 10% NaCl 70mM a pH 4.5 y pH 7 según corresponda, luego se añaden 150 μ L de BiPy 1M en EtOH 50%.
-Diálisis asistida por EDTA: Se mezclan 125 μ L de Ft 35 con μ L de TGA 10% NaCl 70 mM a pH 4.5 y pH 7 según corresponda, luego se añaden 150 μ L de EDTA 0.3M.
-Sin quelante: Se mezclan 125 μ L de ferritina (HSF) con 150 μ L de NaCl 70mM, luego se añaden 35 μ L de TGA 10% NaCl 70 mM a pH 4.5 y pH 7 según corresponda.
2. Las muestras son incubadas a 4°C durante 1 h.
3. Se dializan contra NaCl 70 mM por 24 h a 4°C con cambio de solución cada 12 h y un cambio de bolsa después del primer recambio de agua.

4. Se centrifuga a 10 000 RPM a 4°C durante una hora seleccionando el sobrenadante.
5. La proteína es concentrada en un tubo centrifón con un corte de peso molecular (MWCO) de 3,5 kDa, con centrifugación a 5 000 RPM y 4°C. Posteriormente la muestra se almacena a 4°C

2.2.1.2 Escalamiento de la formación de apoferritina asistida por EDTA

1. Se mezclan 300 µL de ferritina (HSF) con 200 µL de TGA 10% NaCl 70 mM a pH 4.5, se incuba por 30 minutos a 4°C.
2. A la solución anterior se le añaden 450 µL de EDTA 0.3M, incubando por 30 minutos a 4°C.
3. Se dializa contra NaCl 70 mM por 24 h a 4°C con cambio de solución cada 12 h y un cambio de bolsa después del primer recambio de agua.
4. Se centrifuga a 10.000 RPM a 4°C durante una hora seleccionando el sobrenadante.
5. La proteína es concentrada en un tubo centrifón con un corte de peso molecular (MWCO) de 3,5 kDa, con centrifugación a 5 000 RPM a 4°C. Posteriormente la muestra es almacenada a 4°C.

2.2.2 Síntesis de nanoestructuras de oro en la cavidad (AFt-Au)

1. Se prepara una solución de 1 mL de AFt 3mg/mL en buffer Tris 50mM pH 7.
2. Se le añaden 20 µL de HAuCl₄ 100mM incubando durante 3h a oscuras.

2.2 Métodos

3. La solución incubada se dializa contra buffer Tris 50 mM pH 7 durante 2h.
4. Se le añaden 20 μ L de NaBH_4 100 mM, incubando durante una noche. Esto permite la formación de clusters de Au en la cavidad de la proteína (AuFt-Au_{clusters}).
5. Se le añaden 20 μ L de HAuCl_4 100mM incubando durante 3h a oscuras.
6. La solución incubada se dializa contra buffer Tris 50 mM pH 7 durante 2h.
7. Se le añaden 20 μ L de ácido ascórbico 100mM incubando durante una noche. Finalmente se obtiene las nanopartículas en la cavidad de la proteína (Aft-Au_{NP}).
8. Se centrifuga a 10 000 RPM a 4°C durante una hora seleccionando el sobrenadante. La muestra es almacenada a 4°C

2.2.3 Oxidación controlada de hierro en la cavidad de la proteína (Aft-Fe)

1. Una solución de 10 mL de buffer AMPPO 50 mM pH 9 es expuesta a burbujeo de N_2 por 30 minutos a temperatura ambiente.
2. La solución de AMPPO 50 mM pH 9 es calentada a 50 °C, bajo burbujeo de N_2 por 30 minutos.
3. Se le añade 1 mL de proteína 4 mg/mL, manteniendo las condiciones por 10 minutos.
4. Se añade $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 15 mM a 100 μ L/min y H_2O_2 15 mM a 100 μ L/min. La adición de la fuente de hierro se encuentra entre 400 y 1000 μ L.
5. Se deja reaccionar por 10 minutos bajo las mismas condiciones.
6. Se deja enfriar, se colecta la muestra y se añade 1 mL de EDTA 0.3M.

7. Se centrifuga a 6 000 RPM por 15 minutos. Posteriormente se dializa contra AMPSO 50 mM pH 7 a 4°C durante 1 hora.
8. La proteína es concentrada en un centricon con un corte de peso molecular (MWCO) de 3,5 kDa, con centrifugación a 5 000 RPM a 4°C. Posteriormente la muestra es almacenada a 4°C.

2.3 Caracterización

Espectroscopía UV-Vis

Las propiedades ópticas de las distintas muestras son analizadas por espectroscopia de absorción lo que permite detectar la presencia de la proteína y la existencia de carga en su cavidad. Los espectros de absorbancia fueron obtenidos por un espectrofotómetro de arreglo de diodos Avantes AvaSpec-2048, realizando un barrido de 200 a 800 nm, con un tiempo de integración de 12 ms, suavizado de 10 y 12 repeticiones de medición por muestra. Se utilizó una celda de cuarzo con un paso de 1 cm y 600 μ L de volumen de muestra.

Cuantificación de proteínas

-Método de ácido bicinchonínico (BCA)

La concentración de proteína de las muestras es estimada mediante el método del ácido bicinchonínico, método colorimétrico de valoración cuantitativa de proteína. Este método consiste en que bajo condiciones alcalinas los enlaces peptídicos de las proteínas son capaces de reducir de Cu^{+2} a Cu^{+1} , el Cu^{+1} interactúa con el BCA formando un complejo, determinando su concentración por absorbancia molecular, esto permite una valoración indirecta de la cantidad de proteína utilizando una curva de calibrado. Para la determinación de proteína por el método BCA se utilizan dos reactivos, los que se mezclan y ofrecen las condiciones alcalinas para que la proteína realice la reducción del Cu^{+2} .

Reactivo A: BCA 1%, $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 2%, tartrato sódico dihidratado 0.16%, NaOH 0.4% y NaHCO_3 0.95%, pH 11

Reactivo B: CuSO_4 4%

Preparación: 200 μL de reactivo BCA (Reactivo A/Reactivo B, 100/2) se añaden 10 μL de muestra, se incuba a 60°C por 30 min con agitación, posteriormente se mide de absorbancia a 562 nm.

Para curva de calibrado se utilizó ovoalbúmina de 0,5 a 3 mg/mL de concentración en agua MilliQ.

-Método Lowry modificado

Este método es similar al ensayo BCA, consistiendo en dos pasos sucesivos. Primero es la reducción de Cu^{+2} a Cu^{+1} por parte del enlace peptídico, lo que provoca un cambio en el plegamiento de la proteína exponiendo los residuos fenólicos del aminoácido tirosina, los que participan en el segundo paso. Luego le sigue la reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu (ácido fosfomolibdotúngstico) por los grupos fenólicos catalizado por la presencia de Cu^{+1} , produciendo un complejo de color azul intenso el que es cuantificado por absorbancia a 750 nm.

Preparación: 200 μL de Reactivo Lowry Modificado se añaden 40 μL de muestra incubando por 10 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se añaden 20 μL del reactivo de Folin-Ciocalteu incubando por 30 min a temperatura ambiente y oscuridad. Finalmente se mide la absorbancia a 750 nm.

Para curva de calibrado se utilizó albúmina bovina (BSA) de 0,5 a 2 mg/mL de concentración en agua MilliQ.

Cuantificación colorimétrica de hierro por método del complejo Fe-BiPy

La concentración de hierro de las muestras es estimada mediante el método colorimétrico de Fe-BiPy. El método consiste en la denaturación ácida de la proteína, para luego realizar la reducción de Fe^{+3} a Fe^{+2} , el cual interactúa con el quelante BiPy, formando un complejo de color cuantificable por absorbancia. Esto permite la valoración directa del contenido de hierro de las muestras. Para la presente tesis, este valor se relaciona con la cantidad de proteína presente en la respectiva muestra para obtener el parámetro de átomos de hierro por molécula de ferritina.

A partir de un volumen de 40 μL de muestra se agregan y mezclan 20 μL de HCl 2N, incubando 15 minutos a temperatura ambiente. Luego se agregan 13 μL de TGA al 0.5 % pH 4,5. Se añaden 56 μL de una solución BiPy 50 mM y finalmente se agregan 20 μL de acetato de sodio (NaAc). Se centrifuga a 14.000 RPM por un minuto, seleccionando el sobrenadante y se mide la absorbancia a λ 550 nm.

Para la curva de calibrado se utilizó una solución fresca de FeCl_3 del 5 al 25% p/p en agua Milli Q.

Cromatografía de exclusión de tamaño (SEC)

La cromatografía es una técnica que permite la separación de diferentes moléculas presentes en la misma muestra. La técnica consiste en el flujo de una fase móvil, que eluye la muestra a separar, a través de una fase estacionaria. La separación de los componentes depende de la afinidad relativa de la muestra con ambas fases. Específicamente, la cromatografía de exclusión de tamaño o de filtración en gel es realizada por los poros de la fase estacionaria que permite separar las moléculas de acuerdo a sus tamaños, las que penetran en los poros de la fase estacionaria. La fase estacionaria está formada por un sólido poroso soportado en el interior de una columna, comúnmente compuesto por un

polímero entrecruzado que genera poros de distintos tamaños por donde fluye la fase móvil. La fase móvil corresponde a una solución que fluye lentamente por la fase estacionaria permitiendo la separación de las moléculas.

Las moléculas con un tamaño mayor al diámetro de los poros de la fase estacionaria fluyen sin ser retenidas por los poros, ya que son demasiado grandes para introducirse, y por lo tanto no se encuentran retrasadas en su descenso por la columna, eluyendo rápidamente. Por otro lado, las moléculas más pequeñas son capaces de penetrar en los poros de la fase estacionaria, atravesando más lentamente a lo largo de la columna cuanto menor es su tamaño. Por lo tanto, las moléculas eluyen por orden decreciente de tamaño.

Las cromatografías de exclusión de tamaño (SEC) fueron realizadas en los equipos Äkta Purifier 900 y Äkta Avant (ambos de *General Electrics Healthcare*) por medio de una columna GFC-1300 de 13.5 mL, utilizando como fase móvil Tris 20mM NaCl 150 mM pH 7 a un flujo de 0,5 mL/min con un volumen de muestra de 200 μ L. La proteína es detectada por absorción a 280 nm, las nanoestructuras de oro por absorción a la longitud de onda del plasmón de resonancia superficial ($\lambda_{SRP}=560\text{nm}$). Las muestras provenientes de la elución también pueden ser colectadas.

Espectrometría de fotoelectrones de rayos X (XPS)

La técnica de espectrometría de fotoelectrones de rayos X (XPS) consiste en irradiar una muestra sólida con rayos X, lo que induce la emisión de los electrones de las capas atómicas más internas del material, permitiendo identificar elementos y sus estados de oxidación. Esta técnica es altamente sensible a la superficie, por lo que la información proviene de las primeras capas atómicas del material debido a la dispersión inelástica de los electrones más internos del

2.3. Caracterización

material. El resultado del análisis es el número de cuentas en función de la energía de ligadura de los electrones detectados. Esta técnica es utilizada principalmente para identificar los estados de oxidación de los elementos Fe y Au en la cavidad de la proteína.

Los espectros de XPS fueron obtenidos mediante un equipo *Physical Electronics* modelo 1257, utilizando radiación Al K α ($h\nu=1486.6$ eV) no monocromatizada, siendo operado con una aceleración de 15 KV y una potencia de 400 W. La erosión de las muestras fue mediante iones de Ar $^+$ con una energía de 4KeV y una corriente de iones de 1 μ A, de duración variable. Los espectros fueron calibrados con la energía de ligadura del enlace C-C de la señal C 1s a 284,5 eV.

Espectroscopía Raman

Los espectros fueron realizados en un equipo Xplora PLUS de *Horiba Scientific* el que se encuentra acoplado a un microscopio óptico Olympus EX41, utilizando un láser de diodo monocromático de 785 nm. La obtención de los espectros fue realizado en un rango de 200 a 3000 cm^{-1} con tres acumulaciones por muestra, un tiempo de exposición de 20 s, resolución espectral de 5 cm^{-1} y una potencia de láser de 10%.

Microscopía electrónica de Transmisión (TEM)

Los tamaños de las distintas nanopartículas en la cavidad de la proteína solo pueden ser determinados mediante microscopía electrónica de transmisión, lo que permite determinar los diámetros respectivos que posteriormente se correlacionan con las propiedades caracterizadas. Para la caracterización microscópica se utilizaron dos equipos, un FEI-Tecnai ST F20 equipado con EDS operado a 200 KV, utilizándose uno existente en la Facultad de Ciencias Físicas

y Matemáticas (FCFM) de la Universidad de Chile y el otro en el Instituto Catalán de Nanociencias y Nanotecnología (ICN2) en la Universidad Autónoma de Barcelona. También se utilizó un microscopio electrónico JEOL 1210 operado a 120 KV, ubicado en el Instituto de Ciencia de los Materiales de Barcelona, España (ICMAB).

Las muestras utilizadas en los estudios de microscopía electrónica se preparan depositando una gota de muestra sobre una grilla de Cu con entramado de carbón (Cu-holloy carbón, 200 mesh), secada al aire y a temperatura ambiente.

Caracterización magnética

El estudio de las propiedades magnéticas de las muestras se realizó mediante dos tipos de magnetómetros, un magnetómetro de muestra vibrante (VSM) de fabricación propia existente en la Universidad de Santiago de Chile (USACH) y un magnetómetro de interferencia cuántica superconductora (SQUID) *Quantum Design* MPMS-3 disponible en el Instituto de Ciencia de los Materiales de Barcelona (ICMAB), Barcelona, España. Este último equipo presenta una gran sensibilidad permitiendo detectar magnetizaciones en muestras con peso cercano al miligramo.

Las curvas de magnetización o de histéresis permiten detectar la magnetización de la muestra al ser sometida a un campo magnético externo basándose en la medida de la tensión inducida en un sistema de bobinas detectoras cuando varía el flujo magnético que las atraviesa, sometiendo la muestra a ciclos de imantación. A partir de estos ciclos es posible determinar tres parámetros magnéticos de interés como lo es la magnetización de saturación (M_s), la magnetización remanente y la coercitividad magnética o campo coercitivo.

La magnetización de saturación (M_s) es la magnetización de que presenta un material cuando todos sus momentos magnéticos se encuentran alineados en la

2.3. Caracterización

dirección del campo magnético aplicado. La magnetización remanente (M_R) es una parte de la magnetización del material que queda cuando el campo aplicado vuelve a valor nulo, esto quiere decir, la magnetización de la muestra a campo magnético cero después de haber aplicado el campo magnético hasta alcanzar el valor de M_S de la muestra. Finalmente, el campo coercitivo (H_C) es la fuerza del campo magnético necesario para eliminar la magnetización remanente del material.

Para esta tesis las curvas de magnetización se realizaron a una temperatura de 5 K y en un rango de -4 a 4 T. Las muestras utilizadas para estas mediciones fueron previamente liofilizadas. Para aquellas muestras se enfrían a -80°C durante 24 h para después liofilizar. Posteriormente las muestras son pesadas debido a que las medidas de magnetización se expresan en función de la masa de la muestra (emu/g).

Dispersión dinámica de luz (DLS) y potencial Z

Tanto la ferritina cargada con nanoestructuras o la ferritina vacía existen en solución como un sistema coloidal, comportándose como una suspensión en el buffer que la contiene. Es por lo tanto que se estudia su estabilidad coloidal y la formación de agregados mediante la técnica de dispersión dinámica de luz, lo que permite estimar el tamaño de partícula y la dispersión de tamaños.

La técnica de dispersión dinámica de luz (DLS) mide las variaciones de la intensidad de luz dispersada por la muestra en función del tiempo para determinar el coeficiente de difusión translacional y subsecuentemente el diámetro hidrodinámico (d_H) de las partículas a partir de la ecuación de Stokes-Einstein. Con dichos valores se determina si existen estructuras de mayor diámetro que ferritina (12 nm), que podrían corresponder a nanopartículas fuera de la proteína o agregados proteicos.

Los diámetros hidrodinámicos de las muestras de proteína fueron obtenidos mediante un equipo de dispersión dinámica de luz Malvern Zetasizer serie Nano. Se utilizaron soluciones con concentraciones de proteína de 0,5 a 1 mg/mL.

Espectroscopía de absorción atómica (AAS)

La técnica de AAS permite la cuantificación de metales presentes en solución basándose en la separación del analito mediante un nebulizador y quemador que permiten vaporizar, desolvatar y finalmente atomizar la muestra. Posteriormente los átomos del analito son excitados mediante el uso de una lámpara del mismo material del analito. El analito durante su paso por la llama absorbe una cierta cantidad de luz la que se relaciona con la concentración.

El contenido de oro de las muestras con *clusters* y nanopartículas fue determinado mediante AAS utilizándose un equipo Perkin Elmer PinAAcle 900 AA disponible en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. Los datos fueron obtenidos utilizando una curva de calibrado de 5 a 50 ppm de HAuCl_4 , las muestras analizadas poseen una concentración promedio de proteína de 0,1 mg/mL, realizando la medición por duplicado.

CAPÍTULO 3

Ferritina: Material de partida

3.1 Introducción

La ferritina es una proteína globular hueca encargada de almacenar hierro en forma de óxidos en células de mamíferos. La proteína consiste en una estructura peptídica llamada apoferritina con un diámetro externo de 12 nm y una cavidad de 7-8 nm diámetro, figura 3.1.

Estructuralmente es un ensamblaje de 24 subunidades peptídicas de cadenas repetitivas H (Heavy) y L (Light), con pesos moleculares de 21 y 19 KDa, respectivamente, generando una proteína con un peso promedio de 450 KDa estando vacía. El plegamiento de las subunidades producen una cavidad y nos canales que permiten la incorporación y biomineralización del hierro. Estos canales se hallan determinados por el ensamblaje de tres o cuatro subunidades peptídicas determinando la simetría que presenta cada tipo de canal. Existen ocho canales hidrofílicos que poseen simetría C3, presentando una mayor cantidad de residuos de aspartato y glutamato, lo que permite el movimiento de moléculas de agua, iones metálicos y otras moléculas afines con un diámetro promedio de 0,5 nm. Por otro lado, existen seis canales de simetría C4 generados

3.1. Introducción

por la intersección de cuatro subunidades, dando origen a canales hidrofóbicos de diámetro irregular[78], [79].

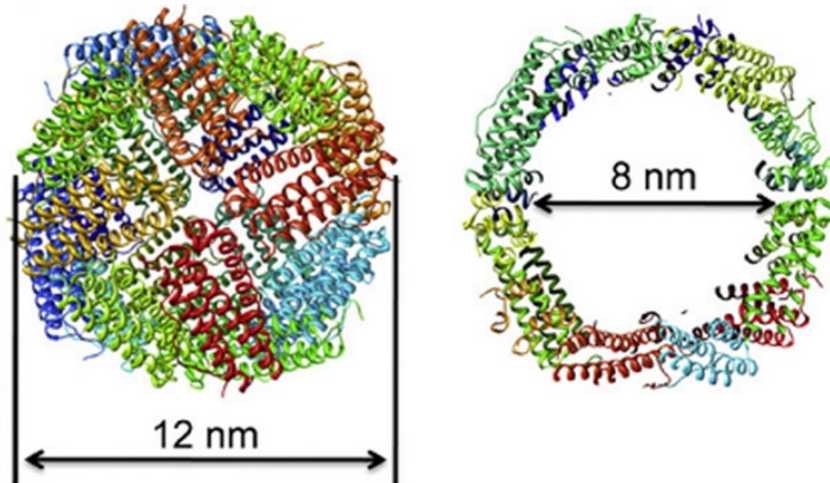


Figura 3.1 Diagrama de la proteína ferritina[80].

La función de la ferritina es almacenar el exceso de hierro presente en el organismo, protegiéndolo de la generación de radicales libres[78]. El exceso de hierro es almacenado en forma de oxihidróxidos de hierro, almacenando hasta 4500 átomos de hierro por molécula de ferritina. La mineralización del hierro es realizada inicialmente por las cadenas H que catalizan la oxidación de Fe^{+2} a Fe^{+3} en presencia de O_2 molecular, realizándose en los sitios catalíticos de ferroxidasa, presentes en las paredes internas de la cavidad. Por otro lado las cadenas L ofrecen sitios de nucleación internos para el almacenamiento del hierro[80]. Los oxihidróxidos producidos corresponden a una mezcla de tres tipos óxidos que dependen del nivel de llenado: a menor nivel, con 200 átomos de hierro por molécula de ferritina (Fe/Ft) hay predominancia de magnetita (Fe_3O_4), seguido por ferrihidrita (FeOOH) y hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$), mientras que a mayor nivel, con 2000 Fe/Ft , la ferrihidrita es el componente mayoritario. Estas

diferencias en el tipo de óxido que posee la ferritina, tienen directa incidencia en las propiedades magnéticas observadas[81], figura 3.2.

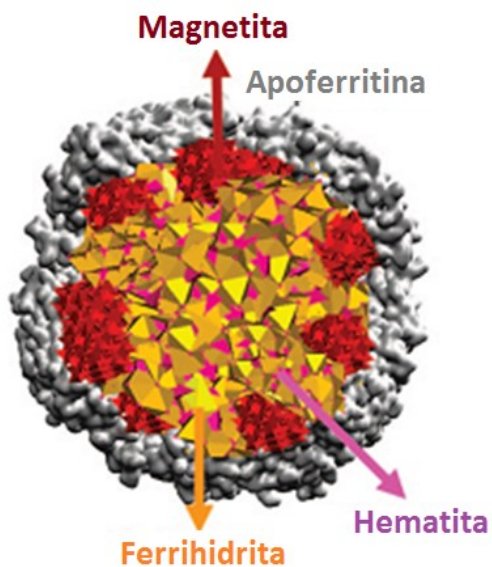


Figura 3.2. Esquema de la composición de los óxidos polimórficos de la ferritina[81].

La cavidad de la ferritina ha sido utilizada para la síntesis de nanopartículas, otorgando un elevado control sobre la dispersión de tamaños, gran estabilidad frente a la agregación y biocompatibilidad, figura 3.3a. En esta línea, se ha logrado la síntesis controlada de nanoestructuras, reportándose la creación de nanopartículas metálicas como oro[82], [83], cobre[9], [84], plata[84] y platino[85], entre otras. También se ha reportado la síntesis de aleaciones metálicas como oro-plata[86] y paladio-oro[87], así como óxidos metálicos de Fe_3O_4 [88]–[90] y Co_3O_4 [91], por mencionar algunos ejemplos.

La ferritina posee una carga eléctrica en la superficie externa producto de los grupos funcionales terminales de sus respectivas cadenas peptídicas,

3.1. Introducción

presentando 21 grupos amino ($-\text{NH}_2$) derivados del aminoácido lisina y 180 terminales carboxilo ($-\text{COOH}$) provenientes de los aminoácidos de ácidos aspártico y glutámico[80]. Estos grupos superficiales le confieren un punto isoeléctrico (pI) cercano a 4,5[79], esta carga eléctrica superficial controla la agregación por interacciones electroestáticas. La repulsión electroestática y estabilidad coloidal pueden ser favorecidas por condiciones de pH del medio distintas a su punto isoeléctrico, lo que previene la formación de agregados. Adicionalmente, los diferentes grupos existentes en su superficie permiten su funcionalización o bioconjugación por vías químicas o por modificaciones genéticas. Esta cualidad ha permitido la funcionalización con moléculas alquílicas confiriéndole la capacidad de ser soluble en solventes apolares[92] e incorporar péptidos específicos para el reconocimiento de células cancerígenas[93], entre otras modificaciones, figura 3.3b

La estructura peptídica de la ferritina es susceptible de modificarse en función del pH . Las 24 subunidades pueden ser parcialmente desagregadas hasta pH 2 y reensambladas a pH ligeramente básico mediante un proceso que es pseudoreversible, produciendo una pérdida parcial de la estructura esférica de la proteína[94]. La capacidad de reensamblar su estructura peptídica ha sido explotada para la incorporación de diversas moléculas en su cavidad. Se ha investigado la incorporación de gadolinio y curcumina, el primero como agente de contraste y el segundo como un antiinflamatorio natural [95]. También se ha investigado la incorporación de drogas anticancerígenas como doxorubicina, utilizando la proteína como un vector para su transporte y liberación controlada[96], [97], figura 3.3c. Adicionalmente la proteína presenta una elevada resistencia térmica, soportando temperaturas de hasta 80°C [95], [98].

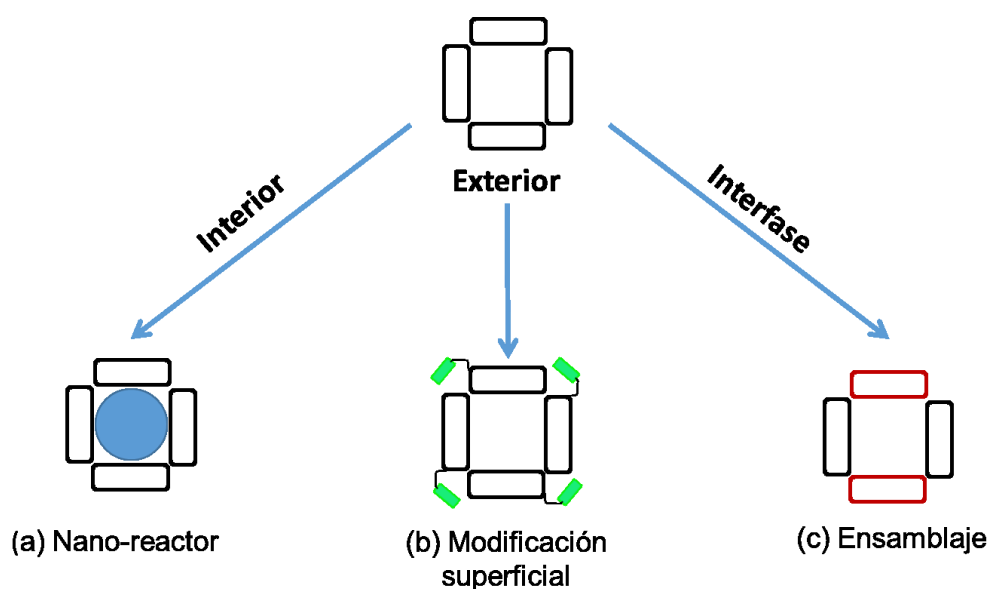


Figura 3.3. Diagrama de la versatilidad que presenta la proteína ferritina para el desarrollo de materiales bionanotecnológicos.

La elevada versatilidad que presenta la proteína ferritina está dada por su estructura orgánica, las subunidades que la conforman y las interacciones generadas determinan su compleja estructura globular. Por consiguiente, es primordial conocer las propiedades de la proteína, en la perspectiva de la ferritina como un material para la síntesis de nuevos nanomateriales. Esto permite asentar las bases para las posteriores modificaciones generadas en la proteína, como lo es la síntesis de nanopartículas plasmónicas o con comportamiento magnético en la cavidad de la ferritina. A continuación se presentan los resultados del estudio de las propiedades ópticas de la proteína, de su integridad estructural, tamaño, composición del núcleo de óxidos de hierro y las propiedades magnéticas entendiendo la ferritina como un material de partida.

3.2 Propiedades ópticas y estructurales

Las proteínas globulares como la ferritina se caracterizan por que sus cadenas peptídicas se pliegan localmente, formando estructuras secundarias y terciarias cuyas interacciones le otorgan su forma tridimensional globular. Este plegamiento genera una cavidad donde muchas proteínas poseen sitios específicos para capturar moléculas o realizar reacciones enzimáticas. Esta estructura tridimensional posee propiedades ópticas intrínsecas, tales como absorción de luz a ciertas longitudes de onda, atribuida a la presencia de aminoácidos aromáticos y su conformación o plegamiento.

Las propiedades ópticas de la ferritina de bazo de caballo (HSF) fueron evaluadas por espectroscopía de absorción UV-Vis, donde la figura 3.4 muestra la existencia de un máximo de absorción a 216 nm y otro de menor intensidad a 280 nm, seguido por un hombro de absorción en el rango visible hasta los 500 nm.

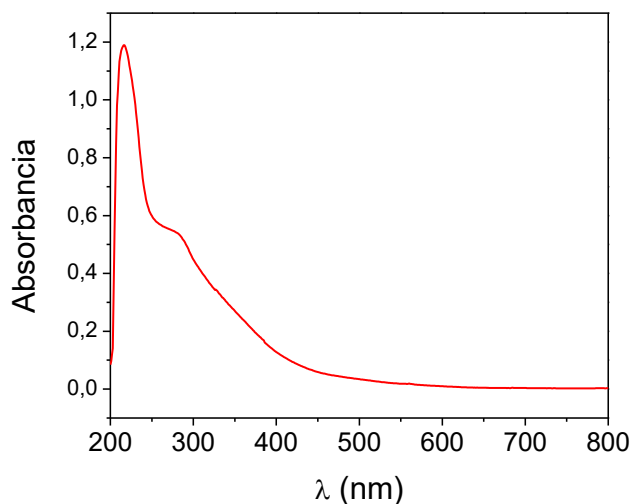


Figura 3.4 Espectro UV-Vis de la proteína ferritina.

La absorción en el rango de 200 a 220 nm sugiere transiciones electrónicas en el propio armazón polipeptídico de la proteína, y como consecuencia es sensible a la conformación de dicho armazón. En este caso la ferritina presenta un máximo de absorción a 216 nm, el que es atribuido a la absorción producida por el enlace peptídico[99], mientras que la absorción a 280 nm es una doble contribución, la absorción de los aminoácidos aromáticos triptófano ($\epsilon^{280} = 5500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y tirosina ($\epsilon^{280} = 1490 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), y los óxidos de hierro presentes en la cavidad. Dichos óxidos producen el hombro en el espectro de absorción en el rango visible hasta los 500 nm, el cual diversos autores han indicado que posee un máximo a 420 nm[100], [101]. Por consiguiente, esta técnica permite la rápida detección de la proteína en solución.

Conocer la integridad estructural, tamaño y carga superficial de la ferritina es fundamental para su utilización como un reactor en la síntesis controlada de nanoestructuras en su cavidad. El plegamiento de las subunidades que

3.2 Propiedades ópticas y estructurales

conforman la proteína es susceptible de ser modificado debido a las múltiples interacciones que presenta la estructura, afectando parcialmente su forma tridimensional y por tanto su utilización como nano-reactor.

Existen variadas técnicas que permiten conocer la integridad estructural de la proteína, su estructura tridimensional y tamaño. Una de las técnicas más utilizadas para caracterizar la integridad estructural de una proteína es la cromatografía de exclusión de tamaño, análisis que permite identificar y separar muestras de acuerdo al tamaño. La integridad estructural de la ferritina es caracterizada por cromatografía de exclusión de tamaño (SEC), la cual detecta la proteína mediante la absorbancia a 280 nm ($A_{280\text{nm}}$).

En la figura 3.5 se muestra el perfil cromatográfico de la ferritina utilizada, la que presenta dos máximos a distinto volumen de elución, lo que indica la existencia de proteína con distintos tamaños que coexisten en la muestra. La primera elución a 4,4 mL corresponde a agregados de proteína como dímeros o trímeros de mayor tamaño, mientras que el segundo máximo a 5,8 mL corresponde al monómero.

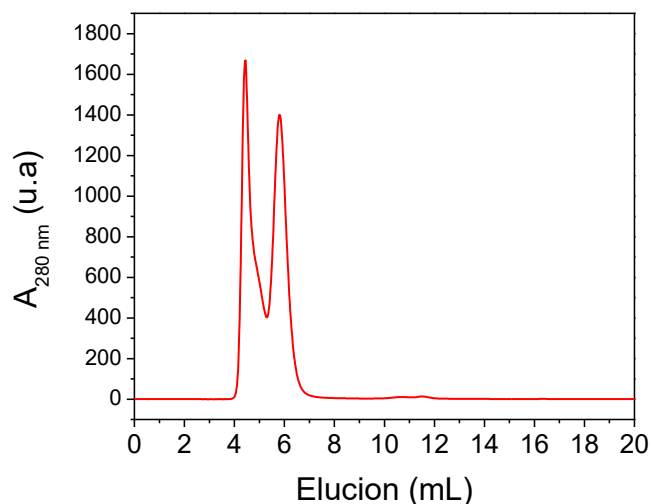


Figura 3.5. Cromatograma de exclusión de tamaño de ferritina (HSF), observándose la existencia de dos oligómeros, agregados a 4,4 mL y monómeros a 5,8 mL.

La existencia de estos agregados es atribuida a interacciones electroestáticas y químicas entre las superficies de las moléculas de proteína, donde algunos grupos funcionales como residuos amino y carboxilatos expuestos disminuyen localmente la repulsión[58][102].

Con el propósito de conocer el tamaño y carga superficial de los agregados de proteína se determinó el diámetro hidrodinámico (d_H) y el potencial Z (ζ) de las muestras colectadas de ambas eluciones cromatográficas mediante dispersión dinámica de luz (*Dinamic Light Scattering*). Los resultados de DLS indican que la ferritina posee un d_H de 12 ± 1 nm, lo que guarda relación con el tamaño reportado de la proteína, y un ζ de -12 mV. Luego de someter la muestra de ferritina a una cromatografía de exclusión molecular, la fracción eluida a 4,4 ml posee un $d_H = 30 \pm 2$ nm, lo que corresponde a agregados de ferritina con un ζ de $-2,6$ mV, mientras que la elución a 5,8 mL posee un diámetro hidrodinámico $d_H = 10 \pm 1$ nm y un ζ de $-12,6$ mV, por lo que corresponde al monómero de ferritina.

3.2 Propiedades ópticas y estructurales

La carga eléctrica superficial de la ferritina, dada por el valor de ζ , depende de la cantidad de grupos amino y carboxilo expuestos de los aminoácidos que la componen, presentando la ferritina de bazo de caballo (HSF) 21 grupos amino y 180 grupos carboxilos expuestos. Esta preponderancia de grupos ácidos (-COOH) sobre los grupos básicos (-NH₃) le otorgan un punto isoeléctrico (pI) cercano a 4,5, esto implica que la carga eléctrica superficial de la proteína depende del pH del medio que la contiene, y por lo tanto su estabilidad coloidal. Valores de ζ más cercanos a cero implican menor repulsión electrostática, lo que favorece la aglomeración y la existencia de agregados.

La caracterización óptica de la ferritina mediante espectroscopía de absorbancia permite detectar la proteína en solución y entrega información indirecta de la presencia de hierro en la cavidad de la proteína. Es primordial determinar cuantitativamente el contenido de hierro mediante espectroscopía de emisión óptica por acoplamiento de plasma inductivo (ICP-OES) de la ferritina y de las muestras colectadas por cromatografía. El contenido de hierro presente en la muestra se relaciona con la cantidad de proteína determinada por el ensayo de ácido bicinchonínico (BCA) de la misma, estableciendo la relación de átomos de hierro por molécula de ferritina Fe/Ft, parámetro que entrega información del nivel de llenado de la cavidad. Las muestras fueron medidas por duplicado

La ferritina utilizada durante la presente tesis posee $820 \pm 5\%$ átomos de hierro por molécula de proteína (Fe/Ft), suponiendo que cada molécula de ferritina posee el mismo contenido de hierro. En un trabajo reportado por Niitsu y colaboradores [103] se establece que el contenido de hierro está relacionado con la existencia de agregados de la ferritina. Consistentemente con lo reportado, la cantidad de hierro presente en las muestras colectadas de cromatografía indica diferencias en el contenido de hierro, presentando los agregados una cantidad

de $2700 \pm 7\%$ Fe/Ft y por otro lado los monómeros contienen $770 \pm 57\%$ Fe/Ft, figura 3.6

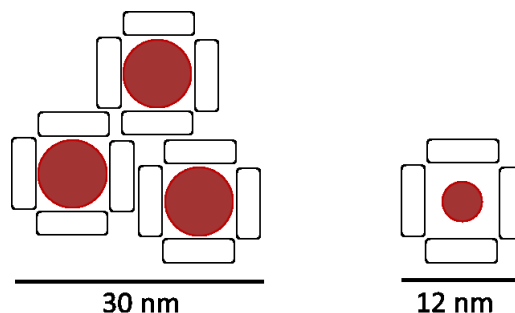


Figura 3.6. Diagrama de agregados y monómeros de ferritina.

A modo de resumen, la ferritina utilizada posee monómeros y agregados (dímeros y/o trímeros), presentando los agregados una mayor cantidad de hierro que el monómero. Los monómeros representan cerca del 80% de la proteína presente en la ferritina según la cuantificación de proteína por BCA, tabla 3.1

Muestra	Parámetro		
	Fe/Ft	d_H (nm)	ζ (mV)
HSF	820	12	-12
Agregados	2700	30	-2,6
Monómeros	770	10	-12,6

Tabla 3.1. Valores de contenido de hierro, diámetro hidrodinámico (d_H) y potencial Z (ζ) de ferritina y oligómeros colectados.

Los agregados presentan un mayor contenido de hierro y un menor ζ con respecto a los monómeros de la proteína. No está claro qué causa la agregación de la proteína, una posible explicación es que el contenido de hierro genera una disminución en el potencial superficial y por consiguiente favorece la agregación.

3.2 Propiedades ópticas y estructurales

Otra posibilidad es que la disminución en el valor de ζ es debido a que la agregación disminuye la cantidad de grupos carboxilos expuestos en la superficie externa, los que generan su carga eléctrica superficial y por tanto su repulsión electroestática.

3.3 Núcleo de óxidos de hierro

Los oxihidróxidos de hierro presentes en la cavidad de la ferritina han sido atribuidos clásicamente a FeOOH. Estudios más complejos del contenido de hierro de la proteína han concluido que corresponde a una mezcla de óxidos que depende del nivel de llenado Fe/Ft según lo reportado por Natividad Gálvez y colaboradores[81], concluyendo que el núcleo de la ferritina presenta a una mezcla de proporción variable de los óxidos hematita (α -Fe₂O₃), magnetita (Fe₃O₄) y ferrihidrita (FeOOH), figura 3.2.

Cada tipo de óxido posee características físicas y químicas propias, tales como absorción de luz a cierta longitud de onda, brecha de energía, estructura cristalina y comportamiento magnético. Con el propósito de estudiar el núcleo de óxidos de la proteína, lo que se relaciona con las propiedades magnéticas, se caracterizó por espectroscopía de fotoelectrones de rayos X (*X-ray Photoelectron Spectroscopy*), magnetometría de muestra vibrante (*Vibrating Sample Magnetometry*), espectroscopía Raman y microscopía electrónica de transmisión (*Transmission Electron Microscopy*).

3.3.1 Estudio de la composición y estructura

El estudio de la composición elemental de la ferritina mediante XPS fue realizada por mediciones de amplio espectro (1200 a 0 eV de energía de ligadura) para detectar elementos que se encuentran presentes en la muestra y el análisis de la composición del núcleo de óxidos de hierro que posee la ferritina fue realizado mediante espectros de alta resolución para los elementos C, N, O y Fe.

Esta técnica permite determinar el estado de oxidación y el ambiente químico que caracteriza cada señal elemental mediante espectros de alta resolución. Esto es con el objetivo de identificar el tipo de óxido de hierro presente en la proteína, el que se relaciona con las propiedades magnéticas. Con el propósito de que los espectros sean representativos de la muestra, es necesario remover la capa orgánica que envuelve el núcleo de óxidos de hierro (apoferritina más carbono ambiental), ya que genera la dispersión inelástica de los fotoelectrones provenientes del núcleo, generando un débil señal de lo que se encuentra en la cavidad, lo que dificulta el análisis. Por este motivo es necesario erosionar para remover dicha capa y dejar expuesto el contenido de la cavidad. Posteriormente a la erosión se repite el barrido de amplio espectro para verificar el incremento en la señal del hierro, lo que indica que la efectividad de la erosión, Anexo 1.

La composición elemental de la ferritina que se muestra en la figura 3.7, indica la existencia de C, N, O, Fe, Na, Cl y Si. Las señales de C, N, O y Fe son propias de la ferritina (estructura orgánica más óxidos de hierro), mientras que las señales de Na y Cl corresponde a la solución salina en la que viene la proteína. La señal de Si corresponde al sustrato en el cual son depositadas las muestras.

3.3. Núcleo de óxidos de hierro

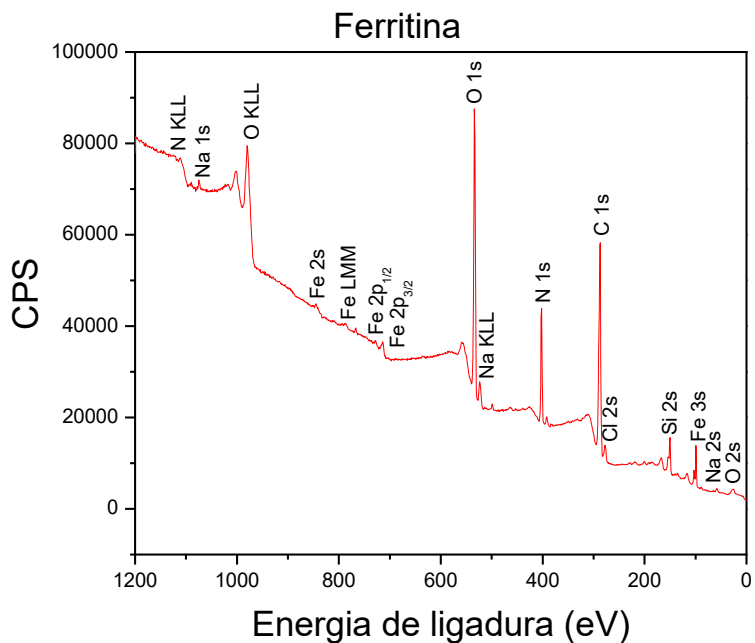


Figura 3.7. Espectro de XPS de ferritina.

Finalmente se realizó un barrido de alta resolución para las señales C 1s, O 1s, N 1s y Fe 2p. Con dichos resultados se realiza un ajuste de curvas para determinar las energías de ligadura que componen cada señal, detallándose los valores del ajuste de las señales de C, O, y N en la tabla 3.2.

Parámetro	Señal								
	C 1s			O 1s			N 1s		
BE (eV)	285	282	287	529	531	528	398	400	396
FWHM	2,3	1,9	2,9	2,4	2,6	1,4	2,8	2,0	2,0
%	67	22	11	87	11	2	65	27	8

Tabla 3.2. Energías de ligadura (BE), ancho de la curva (FWHM) y porcentaje (%) de la señal.

El ajuste de curvas entrega dos parámetros de importancia: la energía de ligadura (BE) y el ancho del máximo a media altura (FWHM), los que permiten identificar el estado de oxidación y el ambiente químico de la señal.

Los espectros de alta resolución fueron ajustados mediante el programa *CasaXPS*. El ajuste de la señal C 1s se hizo mediante tres curvas, la primera con un máximo en 287 eV, atribuido a los enlaces C-N y C-O, lo cual es de esperar en una estructura orgánica como una proteína. La segunda curva presenta un máximo en 285 eV, el que corresponde al enlace C-C y finalmente un máximo a 282 eV. La señal O 1s fue ajustada mediante tres curvas, las dos primeras curvas presentan máximos a 529 y 531 eV, los que son atribuidos a óxidos de hierro como Fe₂O₃[104], la tercera curva presenta un máximo a 528 eV, el que es atribuido al enlace C-O. Para la señal N 1s se ajustaron tres curvas, la primera con un máximo a 400 eV que corresponde a la matriz orgánica, como grupos amino y enlace peptídico[105], la segunda curva con un máximo a 398 eV que puede ser atribuido al anillo de imidazol del aminoácido histidina[106] y la tercera curva a 396 eV que puede ser atribuida a otras interacciones presentes en la proteína.

Finalmente, el ajuste de curvas de la señal Fe 2p en la figura 3.8 indica la existencia de 4 máximos: el máximo Fe1 a 709 eV, seguido por el hombro Fe2 a 713,7 eV, las que componen la señal 2p_{3/2} y los máximos Fe3 a 722,3 eV con su respectivo hombro Fe4 a 729 eV, los que componen la señal 2p_{1/2}. Los detalles del ajuste se encuentran en la tabla 3.3.

3.3. Núcleo de óxidos de hierro

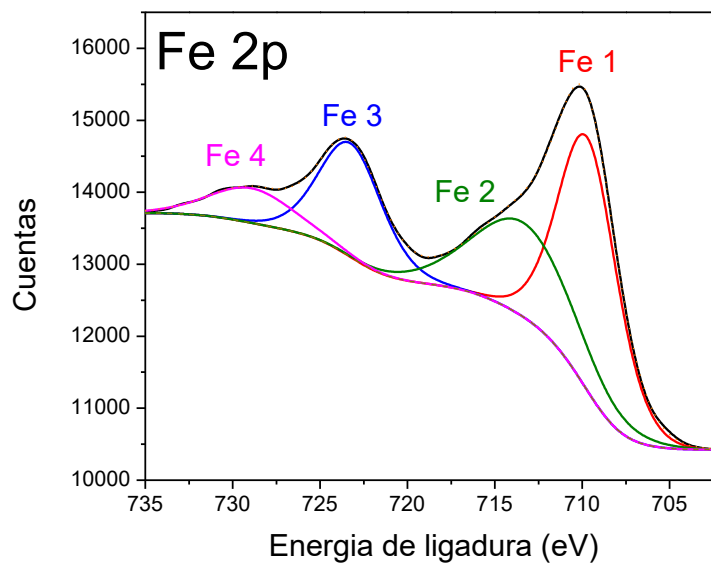


Figura 3.8 Espectro de alta resolución de la señal Fe 2p de ferritina.

<i>Parámetro</i>	<i>Señal</i>			
	Fe 1	Fe 2	Fe 3	Fe 4
BE (eV)	709,0	713,7	722,3	728,0
FWHM	4,3	4,9	3,9	5,0
%	49	17	23	11

Tabla 3.3. Valores de Energías de ligadura (BE), ancho de la curva (FWHM) y porcentaje (%) de la señal.

El ajuste específico de la señal $2p_{3/2}$ no permite identificar claramente el tipo de óxido presente en la muestra, pero sí indica la coexistencia Fe^{+2} y Fe^{+3} , dada por la contribución de Fe2 a la señal $2p_{3/2}$. Según lo reportado por McIntyre y su grupo[107] la señal Fe1 es atribuida a Fe^{+2} (FeO, 709,5 eV) mientras que

Grosvenor y colaboradores[108] señalan que corresponde a Fe^{+3} (Fe_2O_3 , 709,8 eV).

Kumar y sus colaboradores[109] han estudiado la composición de la ferritina mediante XPS de acuerdo al nivel de llenado de la proteína, de 4800 Fe/Ft hasta 1200 Fe/Ft incluyendo apoferritina (libre de hierro). En su trabajo indican que el tipo de óxido cambia de acuerdo al nivel de llenado, a mayor contenido de hierro prevalece la goetita ($\alpha\text{-FeOOH}$), presentando la señal Fe $2p_{3/2}$ una energía de ligadura cercana a 712 eV mientras que la maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) posee una energía de 711 eV y hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) de 709,5 eV. Es materia de discusión la atribución de las energías de ligadura al tipo de compuesto (FeO , Fe_3O_4 , Fe_2O_3 o FeOOH) que se ajuste a los máximos Fe1 y Fe2 de la señal $2p_{3/2}$.

Considerando los resultados del ajuste de las curvas de las señales Fe 2p y O 1s, el contenido de hierro presente en la cavidad puede atribuirse a una mezcla de óxidos, con preponderancia de Fe^{+3} , eventualmente en forma de $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ o FeOOH , pero que no es concluyente. Debido a que la técnica de XPS no permite identificar con certeza el tipo de óxido, se caracterizó la ferritina por espectroscopía Raman.

El espectro Raman de la muestra de ferritina fue obtenido realizando un barrido desde 200 hasta 1000 cm^{-1} de corrimiento Raman utilizando un láser de 785 nm, figura 3.9, presentado 5 máximos a 228, 286, 327, 437 y 505 cm^{-1} , seguido por múltiples hombros difusos. El rango utilizado presenta los máximos de corrimiento Raman de los modos vibracionales característicos de cada tipo de óxido de hierro, lo que permite la identificación del polimorfo.

3.3. Núcleo de óxidos de hierro

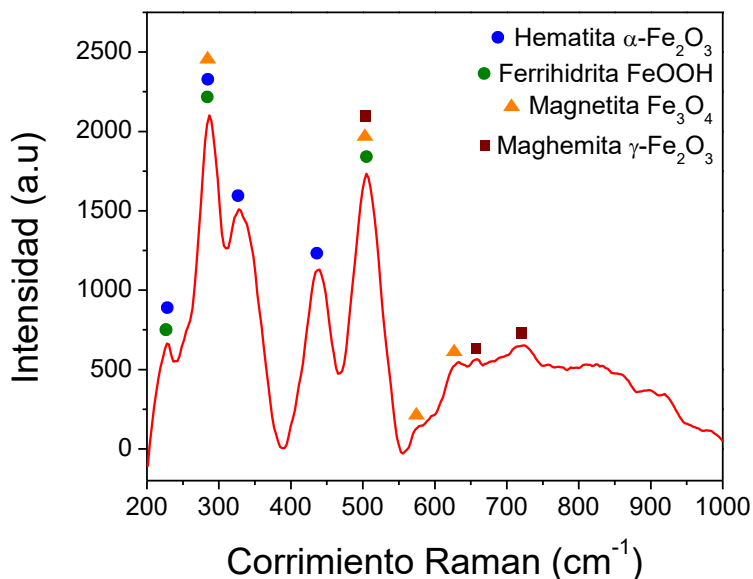


Figura 3.9. Espectro Raman de la proteína ferritina

Los óxidos de hierro magnetita y maghemita pertenecen al grupo de las ferritas tipo espinela cuya estructura cristalina está determinada por el arreglo de los aniones de oxígeno. Los diferentes cationes de hierro (Fe^{+2} y Fe^{+3}) ocupan posiciones intersticiales con respecto al oxígeno, presentando la estructura tipo espinela dos subredes dentro de la celda unitaria, una red octaédrica con 16 posiciones y una tetraédrica con 8 posiciones. Los cationes de hierro de los sitios octaédricos y tetraédricos presentan un fuerte acoplamiento antiferromagnético, resultando en momentos magnéticos no compensados. La suma de todos los momentos magnéticos da origen a que ambos minerales presenten un comportamiento ferrimagnético[110] en la mesoescala. El ordenamiento atómico resultante implica que la magnetita y la maghemita poseen una estructura cristalina de celda cúbica.

Por otro lado, los óxidos hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) y ferrihidrita (FeOOH) presentan una estructura cristalina trigonal, figura 3.10, exhibiendo un comportamiento de

ferromagneto débil y antiferromagnético, respectivamente. De esto se deriva que la magnetita y maghemita poseen los mismos modos vibracionales, lo que permite diferenciarlas espectroscópicamente de la hematita y la ferrihidrita.

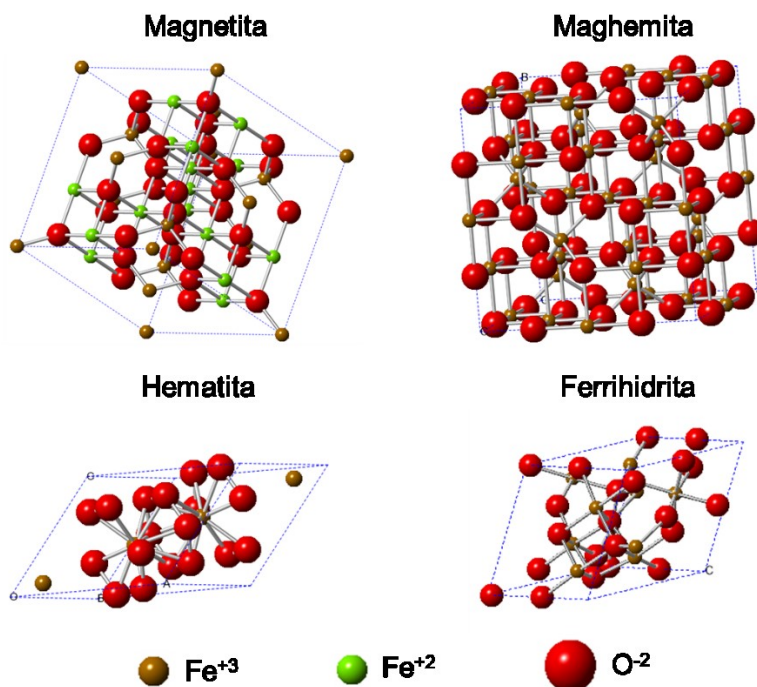


Figura 3.10. Diagrama de las estructuras cristalinas de magnetita, maghemita, hematita y ferrihidrita

Los diversos polimorfos de óxidos de hierro presentan modos vibracionales característicos, lo que permite la atribución del modo vibracional a cierto tipo de óxido de hierro. Por consiguiente, es necesario conocer los modos vibracionales Raman activos para los minerales magnetita (Fe_3O_4), maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) y ferrihidrita (FeOOH), de los que se atribuye su existencia en la proteína ferritina[81].

3.3. Núcleo de óxidos de hierro

$$\text{Magnetita: } \Gamma_{\text{vib}} = A_{1g} + E_{1g} + 3T_{2g} \quad \text{Ec 3.1}$$

$$\text{Maghemita: } \Gamma_{\text{vib}} = A_{1g} + E_{1g} + 3T_{2g} \quad \text{Ec 3.2}$$

$$\text{Hematita: } \Gamma_{\text{vib}} = 2A_{1g} + 3A_{2g} + 5E_g + 4E_u \quad \text{Ec 3.3}$$

Debido a la naturaleza heterogénea del óxido ferrihidrita, no se encuentra plenamente determinado el grupo espacial y por consiguiente, los modos vibracionales característicos. Sin embargo Mazzeti y colaboradores[111] mencionan que existe la misma cantidad de cationes de Fe^{+3} en posiciones de coordinación octaédrica y tetraédrica, de esto resultan los modos vibracionales de la Ec 3.4. Este tipo de ordenamiento presenta un fuerte acoplamiento antiferromagnético entre los cationes lo que da un momento magnético total nulo.

$$\text{Ferrihidrita: } \Gamma_{\text{vib}} = A_{1g} + E_{1g} + F_{2g} + F_{1u} \quad \text{Ec 3.4}$$

Existe amplio consenso en la literatura con respecto a las atribuciones vibracionales de los espectros Raman de los diversos óxidos de hierro, presentándose en la tabla 3.4 los modos vibracionales y el corrimiento Raman de los óxidos de hierro reportados.

Nombre	Compuesto	Modo vibracional y corrimiento (cm ⁻¹)			Ref
		A _{1g}	E _{1g}	T _{2g}	
Magnetita	Fe ₃ O ₄	666	505	241,296,581	[112]
		650	491	283	[113]
		668	306	193, 538	[114]
		672		310, 554	[115]
Maghemita	γ-Fe ₂ O ₃	700	511	365	[115]
		695	493	356	[112]
		640	511	365, 376	[113]
Hematita	α-Fe ₂ O ₃	228,447	200, 294, 327, 391, 466	-	[112]
		229, 500	249, 295, 302, 414, 615	-	[115]
Ferrihidrita	FeOOH	227, 493	245, 292, 297, 493, 608	-	[116]
		220, 480	286, 331, 405, 510, 619	-	[113]

Tabla 3.4. Tabla comparativa de modos vibracionales Raman activos para los minerales de magnetita, maghemita, hematita y ferrihidrita.

Considerando los valores de los máximos en el espectro Raman de la proteína (figura 3.9), y los valores de la tabla 3.4, es posible establecer que el núcleo corresponde a una mezcla mayoritaria de ferrihidrita y hematita, seguido por un aporte menor de magnetita. Estas atribuciones implican que el hierro presente en el núcleo de óxidos corresponde principalmente a Fe⁺³, donde la magnetita minoritaria aporta la presencia de Fe⁺², lo que se encuentra en concordancia con los resultados de XPS de alta resolución para la señal Fe 2p de la tabla 3.2.

3.3.2 Estudio de las propiedades magnéticas

Con el objetivo de conocer el comportamiento magnético de la ferritina se estudió la proteína mediante un magnetómetro de muestra vibrante (VSM), evaluando su magnetización frente a un campo magnético externo. Estas mediciones fueron realizadas a una temperatura de 5K y la proteína fue secada mediante liofilización.

Los resultados de magnetización se hallan descritos por la curva de histéresis en la figura 3.11, la que indica que los óxidos de hierro poseen una baja magnetización de saturación, con un valor cercano a 1,3 emu/g. Este valor es similar al reportado por Kilcoyne y su grupo[117], donde indican que la ferritina posee una magnetización de saturación M_s cercana a 1,9 emu/g a la misma temperatura y estando completamente llena de hierro (4500 Fe/Ft). La diferencia en la magnetización de saturación entre lo obtenido por nosotros experimentalmente y lo reportado es debido a las diferencias en el contenido de hierro de la ferritina utilizada (~800 Fe/Ft).

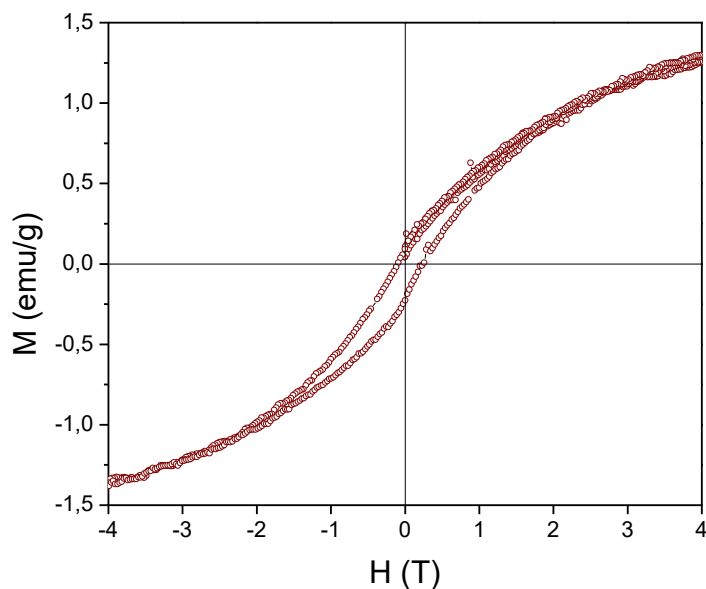


Figura 3.11. Curva de magnetización de ferritina

Los óxidos de hierros en la proteína presentan una coercitividad magnética (H_c) de 0,17 T y una magnetización de remanencia (M_R) de 0,14 emu/g. Los valores de la curva de magnetización indican que la ferritina presenta un comportamiento antiferromagnético, cuyo valor de M_s viene dado por los momentos magnéticos sin compensar provenientes de la superficie del núcleo[81], [118].

El análisis conjunto de los datos de XPS, Raman y VSM pone de manifiesto que el comportamiento antiferromagnético de la ferritina es debido a una mezcla de óxidos, principalmente hematita y ferrihidrita, óxidos que son ferromagnéticos débiles y antiferromagnético, respectivamente [119].

3.4 Estudio por microscopía electrónica

Con el propósito de observar y estimar el tamaño del núcleo de óxidos de hierro de la ferritina, esta fue caracterizada mediante microscopía electrónica de transmisión. Dado que la proteína es esencialmente carbono, por lo que no presenta contraste frente el entramado de carbono de la grilla de TEM, observándose solamente el núcleo de hierro. Para la obtención de imágenes se utilizó una aceleración de 120 kV, lo que permite maximizar el contraste y minimizar el daño producido en la proteína por el haz de electrones.

En las imágenes se observan partículas esféricas, con tamaños entre 4 y 8 nm, figura 3.12. El análisis de distribución de tamaños sobre 100 partículas (N=100) indica que el núcleo de óxidos de hierro posee un diámetro promedio $d=5,8\pm 0,5$ nm.

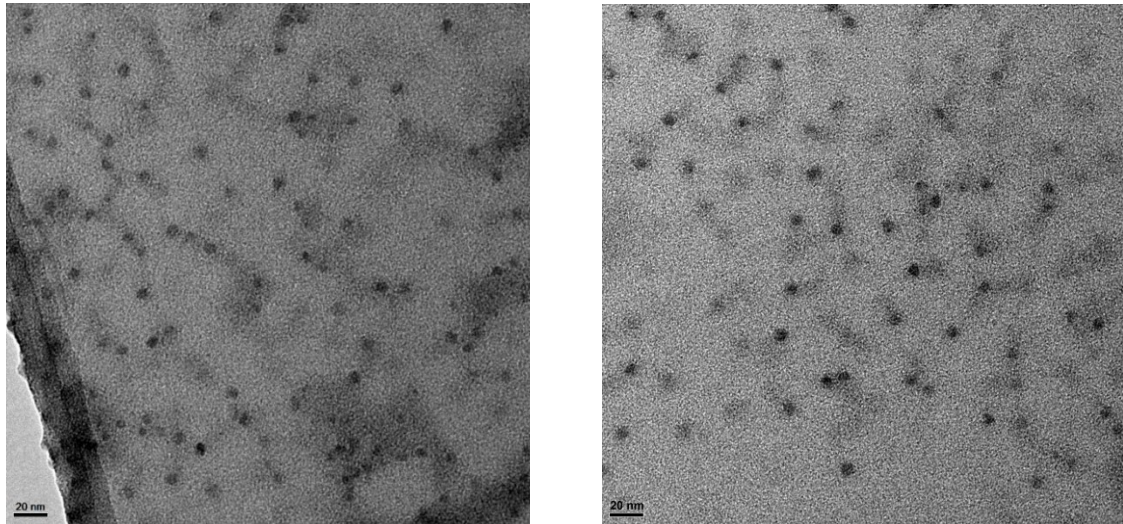


Figura 3.12. Imágenes TEM de proteína ferritina. Barra de escala 20 nm.

La ferritina utilizada posee alrededor de 800 Fe/Ft contenidos en una cavidad de 7-8 nm, espacio que se hallaría completo si tuviera una cantidad de hierro cercana a 4500 Fe/Ft. Esto implica que la cantidad de hierro no es proporcional con respecto a las dimensiones de dicho núcleo[81], [93], [120]. Por otro lado, la difracción de electrones de área seleccionada (SAED) no permite la clara identificación cristalina del material, Anexo 1.

3.5 Conclusiones

1. La ferritina posee un perfil espectrofotométrico característico que da cuenta de la proteína y el contenido de la cavidad, permitiendo estimar indirectamente la presencia de hierro.
2. La ferritina utilizada presenta agregados y monómeros de proteína, los agregados poseen un mayor contenido de hierro y menor carga eléctrica superficial con respecto a los monómeros. La agregación de la proteína guarda relación con la carga de hierro en su interior.
3. El núcleo de óxidos de hierro posee un tamaño promedio de 5,8 nm y corresponde a una mezcla principalmente de hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) y ferrihidrita (FeOOH), presentando un comportamiento antiferromagnético.

CAPÍTULO 4

Formación de apoferritina

4.1 Introducción

La apoferritina o la ferritina vaciada de su contenido de hierro es una proteína de gran interés para diversas aplicaciones biotecnológicas. La apoferritina ofrece una matriz de elevada biocompatibilidad y tamaño controlado para la síntesis de nanopartículas, también permite la incorporación de diversas moléculas funcionales para ser liberadas en organismos. Su superficie puede ser modificada a requerimiento, proyectándose como una plataforma para el desarrollo de materiales de interés nano-biotecnológicos.

La síntesis de nanopartículas o la incorporación de diferentes moléculas en la cavidad de la proteína requieren que esta se encuentre vaciada de su contenido original. Para conseguir la proteína vacía es necesario remover los óxidos de hierro nativos presentes en la ferritina. El vaciado de la proteína posible de obtener por un método reportado por varios autores[81], [120]–[123], donde modifican las condiciones de reacción. Este método consiste generalmente en dos etapas. Primero, la reducción de Fe^{+3} a Fe^{+2} , seguido por la remoción de iones de Fe^{+2} proveniente de la proteína mediante diálisis exhaustiva. En algunos

métodos se han utilizado agentes quelantes, los que favorecen la remoción del Fe^{+2} . Diferentes agentes reductores se han utilizado para la formación de apoferritina: ditionita[100], [124]–[126], FMNH_2 [127], y ácido tioglicólico (TGA)[81], [100], [120], [121], [123], [128], [129]. Este último es el reductor más utilizado en la literatura, pero no existe un claro consenso con respecto al pH que esta reducción debe ser realizada. En algunos casos la utilización de pH ~4 y otros a pH 7, indicándose que pH ácidos favorecen la remoción del hierro[130], pero no existe, a la fecha, ningún estudio sobre el efecto del pH en la remoción del hierro y en la estabilidad estructural de la proteína.

Una vez realizada la reducción del hierro en la cavidad, el siguiente paso es la remoción de Fe^{+2} en solución mediante diálisis, la que puede ser optimizada mediante la adición de agentes quelantes que acomplejan los iones de hierro. En esta línea, el uso de 2,2'-bipiridil (BiPy) como agente quelante para remover el hierro es el más utilizado en la formación de apoferritina [81], [95], [100], [128], [131], [132].

La cantidad de hierro contenida en la proteína, dada por la relación de átomos de hierro por molécula de ferritina (Fe/Ft), es el parámetro más importante en la eficiencia del proceso de formación de apoferritina. Para obtener un proceso eficiente, es necesario no solo remover la mayor cantidad de hierro posible en un tiempo óptimo, es crucial también recuperar la mayor cantidad de proteína conservando su integridad estructural. Estos tres parámetros: Fe/Ft , recuperación de proteína e integridad estructural deben ser considerados al momento de preparar apoferritina.

Disponer de apoferritina es un paso clave para el desarrollo esta tesis, ya que nos permitirá la síntesis de diversas nanoestructuras en la cavidad de la proteína. Con el propósito de determinar las mejores condiciones de formación de apoferritina, se estudiaron dos condiciones de pH y dos agentes quelantes para

4.1. Introducción

definir un protocolo que presente la mayor remoción de hierro, recuperación de proteína e integridad del armazón peptídico.

A continuación se presentan los resultados del protocolo de formación de apoferritina, donde la reducción del hierro es realizada a pH 4,5 y pH 7 utilizándose TGA como reductor y los agentes quelantes 2,2'-bipiridil (BiPy) y EDTA el cual es comúnmente utilizado en los laboratorios y de menor costo. Como ensayo de control, se realizó la reducción y remoción del hierro por diálisis sin agentes quelantes (SQ), todos los ensayos fueron realizados por duplicado. Los ensayos para la formación de apoferritina se encuentran en el diagrama de la figura 4.1.

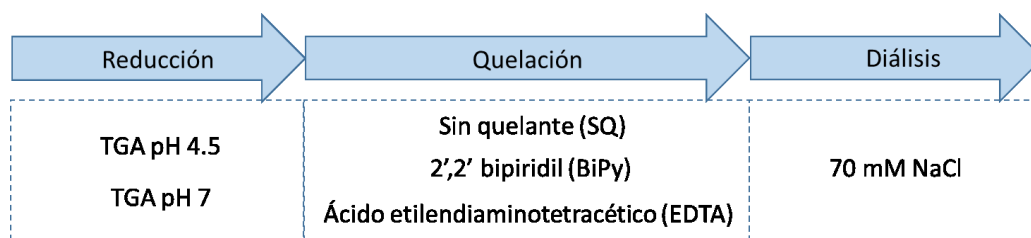


Figura 4.1. Diagrama de las condiciones de formación de apoferritina

De las muestras obtenidas se estudiaron las propiedades ópticas por espectroscopia UV-Vis, el contenido de hierro dado por el parámetro Fe/Ft mediante ICP-OES y BCA, recuperación de proteína y la integridad estructural por SEC y DLS.

4.2 Propiedades ópticas y contenido de hierro

La primera técnica cualitativa para analizar el contenido de hierro de las muestras, fue evaluando las propiedades ópticas por espectroscopía UV-Vis. El espectro de la muestra tratada a pH 4,5 sin quelante (SQ), figura 4.2a, muestra una amplia absorción desde los 300 a 500 nm, que corresponde a la presencia de óxidos de hierro, con una menor intensidad en comparación con el espectro inicial de la ferritina (HSF), lo que revela una disminución en el contenido de hierro. Los máximos de absorción a 218 y 280 nm son atribuidos tanto a la proteína como a los óxidos de hierro en la cavidad. Las muestras de apoferritina tratadas a pH 4,5 en presencia de agentes quelantes, BiPy y EDTA, presentan un espectro donde no se observa la absorción en el rango visible, lo que indica un bajo contenido de hierro. Adicionalmente, todas las muestras tratadas presentan un corrimiento al azul en el máximo atribuido al enlace peptídico (~220 nm) así como la disminución de su intensidad. Las muestras tratadas con BiPy presentan el máximo corrimiento ($\Delta \sim 20$ nm), lo que sugiere posibles cambios en el plegamiento local de las cadenas peptídicas de la proteína. Todas las muestras tratadas a pH 7 presentan un espectro similar a las muestras tratadas a pH 4,5, indicando que no existen grandes diferencias detectables espectroscópicamente con el pH de los dos tratamientos.

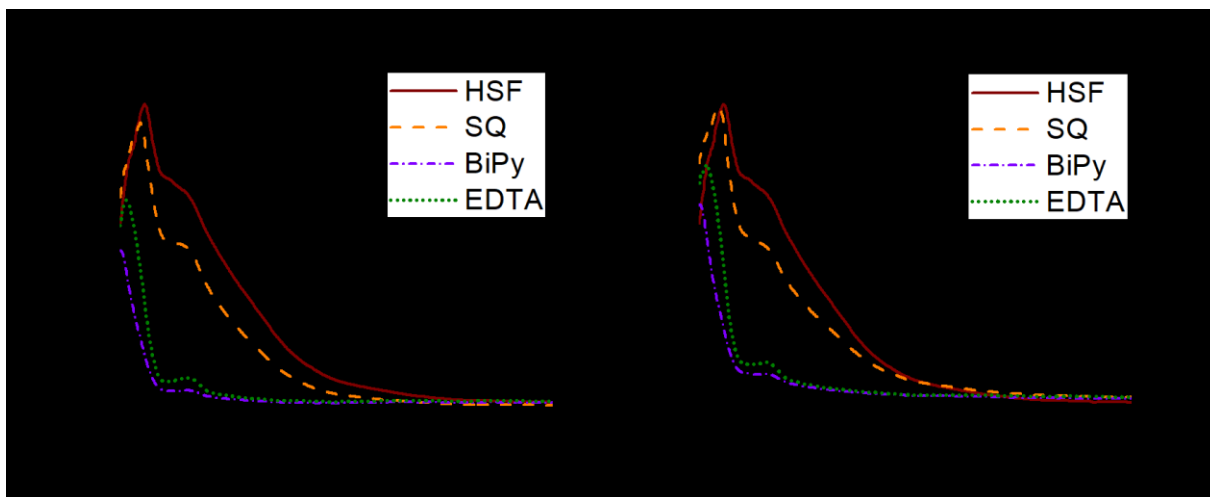


Figura 4.2 Espectros de absorción de las muestras tratadas a pH 4,5 (a) y a pH 7 (b).
HSF: ferritina de bazo de caballo

Las muestras de apoferritina tratadas con agentes quelantes exhiben una disminución en la absorbancia a 280 nm, lo que indica que el hierro interfiere fuertemente en las mediciones a esta longitud de onda. Esta disminución puede ser atribuida a 3 fenómenos. El primero es la absorción en el rango UV por parte de las nanopartículas de óxidos de hierro debido a las transiciones electrónicas interbandas d-d y la brecha de energía (*bandgap*) de cada estructura cristalina (FeOOH, Fe₂O₃ y Fe₃O₄)[133]–[135]. Un segundo fenómeno es el cambio en el plegamiento local de los aminoácidos aromáticos cercanos a los sitios catalíticos y de nucleación de la proteína[136] debido al movimiento de los iones de hierro durante el proceso de remoción, lo que modifica su exposición y por tanto la absorción de luz a 280 nm, efecto que ha sido observado en otras proteínas que contienen hierro como las transferinas[137]. Finalmente existe una contribución menor producto de la dispersión de la luz UV propio de los sistemas nanoestructurados[138].

Estos resultados evidencian que la cuantificación de ferritina por absorbancia a 280 nm (A_{280}), método ampliamente utilizado para la determinación de proteínas, es debatible, si es que no errónea, ya que holo ferritina (con hierro) y apoferritina (sin hierro) poseen espectros diferentes. La cuantificación de proteína por absorbancia no es un método fiable ya que el coeficiente de absorción molar de la proteína depende del contenido de hierro. Interesantemente, May y colaboradores reportaron tempranamente que los coeficientes de extinción de la ferritina son proporcionales al hierro presente en su cavidad, sugiriendo que existe un gran porción de hierro unido covalentemente al oxígeno y que el agua es excluida de manera progresiva[139].

Debido a este fenómeno se determinaron experimentalmente según la ley de Lambert-Beer los coeficientes de absorción molar a 280 nm (ϵ^{280}) de la ferritina (HSF) y de apoferritina (AFt) obtenida por método de reducción a pH 4,5 asistido por EDTA, curvas en Anexo 4. El valor de ϵ^{280} de HSF es de $1\ 552\ 000\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ mientras que el de la apoferritina es de $411\ 000\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, valor muy cercano a lo reportado por otros autores para la apoferritina de $427\ 200\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [9], [78]. Esto implica que la presencia de óxidos de hierro incrementa el coeficiente de absorción de manera no lineal, es por tanto que inicialmente se debe conocer el contenido de hierro en la proteína antes de estimar su concentración por el método de absorción a 280 nm (A_{280}).

El contenido de hierro de las muestras preparadas fue cuantificado mediante espectroscopía de emisión óptica por plasma acoplado inductivo (ICP-EOS), determinándose la relación de átomos de hierro por molécula de ferritina Fe/Ft, representado en la figura 4.3. De la figura se puede observar que: 1) Las muestras producidas en ausencia de agente quelante (SQ) presentan la mayor relación Fe/Ft de todas las muestras. 2) Las muestras tratadas con agentes quelantes exhiben una mejora en la remoción de hierro. 3) Todas las muestras

4.2. Propiedades ópticas y contenido de hierro

tratadas a pH ácido exhiben menor contenido de hierro en comparación con las muestras obtenidas a pH neutro. 4) Las muestras tratadas con agentes quelantes a pH neutro presentan similar contenido de hierro. De estos resultados se observa que las muestras tratadas con EDTA presentan la menor relación Fe/Ft, y que en particular, el tratamiento ácido utilizando este agente quelante es capaz de remover cerca de 99% del hierro presente en la proteína, quedando un remanente ~5 Fe/Ft.

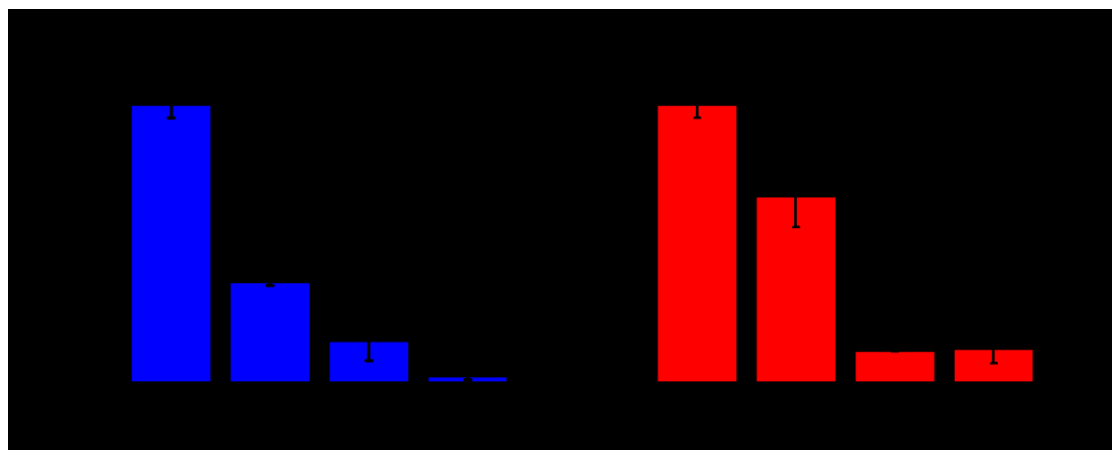


Figura 4.3. Contenido de hierro (Fe/Ft) de las muestras de apoferritina tratadas a pH 4,5 (a) y pH 7 (b).

La cuantificación de hierro por ICP-OES establece que el tratamiento a pH 4,5 remueve un mayor contenido de hierro que a pH 7. La reducción de Fe^{+3} a Fe^{+2} consume H^+ , por lo que pH elevados restringen la cantidad de H^+ disponibles para poder realizar la reducción. Los resultados indican que el uso de agentes quelantes aumenta la cantidad de hierro removido de la holoferritina. Esto puede ser explicado por la gran afinidad que presentan los iones de Fe^{+2} con los agentes quelantes como BiPy o EDTA, los que previenen la reincorporación del hierro hacia la cavidad.

El mejor resultado en la remoción de hierro fue obtenido realizando la reducción a pH 4,5 y utilizando EDTA como agente quelante. El hierro es quelado por el EDTA en relación 1:1, formando el complejo $[\text{Fe}(\text{EDTA})]^{-2}$, el cual es el complejo más estable. Dicho complejo posee una constante de formación de 6×10^6 a pH 4,5 y 8×10^{10} a pH 7 [140], por lo cual el EDTA presenta un mejor efecto quelante a pH neutro. La constante de disociación (pK_a) de las especies de EDTA^{-2} requeridas para la quelación del hierro es de 2,7, lo que implica que más del 99% de las moléculas de EDTA^{-2} están disponibles para quelar a pH 4,5. Es por tanto que la eficiencia de remoción de hierro está limitada por la etapa de reducción, la que depende del pH.

La remoción de hierro realizada a pH 7 presenta similares valores de contenido de hierro para ambos agentes quelantes. A este pH el complejo más estable de BiPy, $[\text{Fe}(\text{BiPy})_3]^{-2}$ posee una constante de formación de 2×10^9 [141], valor cercano a la constante de formación del complejo $[\text{Fe}(\text{EDTA})]^{-2}$ (8×10^{10}). Considerando las constantes de formación a pH neutro y la estequiometría de los complejos de EDTA y BiPy, se puede observar que ambos agentes quelantes remueven esencialmente la misma cantidad de hierro después de la reducción a pH 7 y la posterior diálisis. Estos resultados sugieren que las constantes de formación y la estequiometría no ejercen un rol preponderante como la condición de concentraciones elevadas.

En pH ácido se observa que las muestras de apoferritina producidas en presencia de BiPy presentan un mayor contenido de hierro que la tratada con EDTA. Este comportamiento está dado por las constantes de protonación respectivas, BiPy posee un pK_a de 4,3 mientras que EDTA posee un pK_a de 2,7. Esto implica que a pH 4,5 los dos nitrógenos del grupo bipyridil se encuentran protonados en un ~50% y por consiguiente no pueden quelar el ión Fe^{+2} . De esto se deriva que su habilidad como quelante bidentado se reduce a prácticamente la mitad cuando el

proceso es realizado a pH ácido. Esto concuerda con los resultados y da cuenta de porque la remoción del hierro asistida por BiPy a pH neutro es similar a la presentada por el uso de EDTA. Por tanto el EDTA es el mejor agente quelante para la remoción de hierro bajo condiciones ácidas.

4.3 Integridad estructural

El estudio de la integridad estructural de las muestras de apoferritina fue realizado por cromatografía de exclusión de tamaño (SEC) y dispersión dinámica de luz (DLS), ambas técnicas permiten determinar la existencia de agregados y fragmentos de proteína presentes en cada muestra.

En la figura 4.4 se presentan los cromatogramas de las tres muestras tratadas a pH 4,5 (a) y pH 7 (b). En las imágenes insertas se presentan la magnificación de los perfiles de elución de las muestras tratadas con agentes quelantes (BiPy y EDTA). Se observa que las muestras generadas sin agentes quelantes, independiente del pH, exhiben la mayor proporción de agregados, similar al perfil de elución de la ferritina discutido en el Capítulo 3. Comparando los perfiles de elución de las muestras tratadas con agentes quelantes, se observa que presentan una menor cantidad de agregados, prevaleciendo la especie monomérica en comparación con las muestras tratadas sin agente quelantes (SQ).

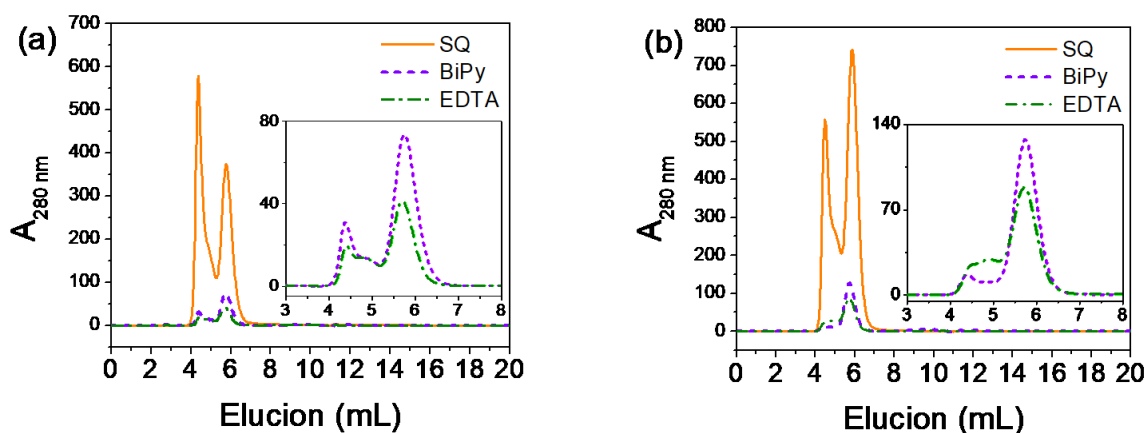


Figura 4.4. Cromatogramas de exclusión de tamaño de muestras tratadas a pH 4,5 (a) y pH 7 (b). El inserto corresponde a las curvas de las muestras producidas con quelantes.

En relación a la influencia de las condiciones de pH en la etapa de reducción, a pH ácido se genera una mayor cantidad de agregados que a pH neutro. La formación de agregados puede atribuirse a la exposición de la proteína a condiciones de pH cercanas a su punto isoeléctrico ($pI \sim 4,5$)[132], figura 4.5. Estas condiciones generan una disminución en el potencial Z (ζ) dando como consecuencia una menor repulsión electrostática entre las moléculas y una vez que los agregados son generados, otro tipo de interacciones estabilizan su configuración. Consistentemente con el reportado por Niitsu y su grupo, la reducción del hierro presente en la ferritina bajo condiciones ácidas y su posterior remoción por agentes quelantes, no eliminan la formación de agregados[103]. Por otro lado, la formación de apoferritina asistida por agentes quelantes a pH 7 exhibe predominantemente la conformación monomérica, ya que existe una desagregación parcial de los agregados de ferritina inducida por la repulsión electrostática a pH más elevado[142].

4.3. Integridad estructural

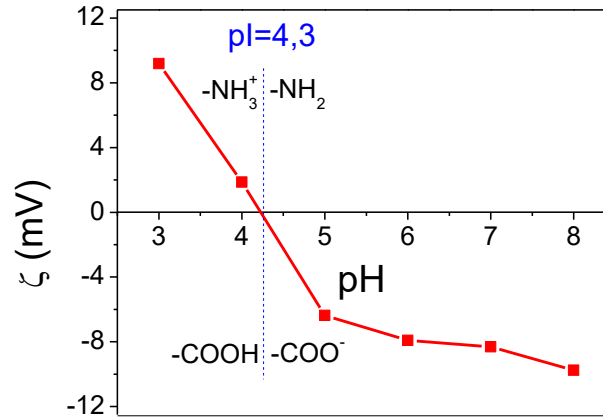


Figura 4.5 Punto isoeléctrico de la ferritina determinado por potencial Z y especiación de los grupos activos superficiales.

Las causas que generan la formación de agregados aún no están del todo claras, pero existe una correlación entre el ζ y la presencia de óxidos de hierro en la cavidad, lo que sugiere interacciones electroestáticas. Es un tema a discutir si la agregación causa la neutralización de la carga superficial (ζ) o la agregación es debida a la compensación de la carga atribuible a la presencia de óxidos de hierro en la cavidad.

En los cromatogramas se observa que las muestras con mayor contenido de hierro presentan mayores intensidades relativas ($A_{280 \text{ nm}}$ u.a), y no depende exclusivamente de la cantidad de proteína detectada. Las propiedades ópticas de la proteína ($A_{280 \text{ nm}}$) dependen fuertemente del contenido de hierro. Esto se observa en las intensidades relativas de las muestras tratadas con agentes quelantes, las que presentan una baja intensidad debido a su bajo contenido de hierro. Por otro lado, no se observan eluciones a mayores volúmenes lo que

indica que los tratamientos utilizados, independiente del pH, no generan fragmentos de proteína estables coloidalmente.

Los resultados de SEC entregan información indirecta sobre la conservación de la estructura cuaternaria de la proteína dado por el tamaño relativo de la proteína detectado en las respectivas eluciones. Por consiguiente, es necesario determinar el tamaño de la proteína dado por el diámetro hidrodinámico (d_H) mediante DLS.

El diámetro hidrodinámico y la consecuente distribución de tamaños obtenidas por DLS para las muestras de apoferritina indica que el proceso de remoción del hierro tiende a retener el tamaño promedio inicial de proteína de 12 nm, sin presentar diferencias estadísticas significativas para cada tratamiento en específico, tabla 4.2.

Muestra	Diámetro hidrodinámico (nm)			
	SQ	BiPy	EDTA	HSF
pH 4,5	14±1	10±1	11±1	12±1
pH 7	10±1	9±1	11±1	

Tabla 4.1 Diámetros hidrodinámicos de las muestras de formación de apoferritina y ferritina (HSF)

Los resultados de SEC y DLS sugieren que las condiciones evaluadas para la formación de apoferritina tienden a preservar la integridad estructural de la proteína y que la existencia de agregados no es significativa, dada la conservación del d_H de la ferritina.

4.4 Recuperación de proteína

Existen tres parámetros claves en la formación de apoferritina: 1) la remoción del hierro, 2) la integridad estructural de la proteína y 3) la recuperación de proteína. Este último parámetro corresponde a la cantidad de muestra que se conserva durante el proceso de formación de apoferritina.

Los resultados de recuperación de proteína de las muestras de apoferritina se presentan en la tabla 4.2. Estos indican que las etapas de reducción y diálisis, dadas por la muestra tratada sin quelantes (SQ), presentan una recuperación del 70-80% independiente del pH del proceso. Por consiguiente, el pH del tratamiento no induce la pérdida de proteína.

Tratamiento	Recuperación de proteína (%)		
	SQ	BiPy	EDTA
pH 4,5	73±18	36±7	72±3
pH 7	76±12	42±8	78±3

Tabla 4.2. Valores de recuperación de proteína

La utilización de BiPy como quelante es perjudicial para la formación de apoferritina, ya que se observa que induce una pérdida entre el 60 y 70% de la proteína. Por otro lado, el uso de EDTA no afecta la recuperación de proteína y los valores son similares a los obtenidos a las muestras sin quelantes.

La recuperación de proteína es un parámetro escasamente reportado para los procedimientos de formación de apoferritina. Wong y su grupo informan una recuperación del 65-80% para la formación de apoferritina mediante TGA a pH

4,25 y diálisis exhaustiva[120], lo que concuerda con los resultados presentados. Por consiguiente, el proceso de reducción y diálisis son responsables de una pérdida del 20-30% de la proteína.

4.5 Conclusiones

1. Tratamientos ácidos favorecen la reducción de Fe^{+3} a Fe^{+2} para su posterior remoción, pero mantienen una mayor proporción de agregados de proteína. Por otro lado tratamientos bajo condiciones neutrales de pH presentan una remoción de hierro limitada pero favorecen la existencia de monómeros. De los resultados se observa que el pH no produce ningún efecto significativo en la pérdida de proteína.
2. El análisis de los resultados para los dos agentes quelantes utilizados permiten demostrar que el agente BiPy, el cual es el más utilizado en la literatura para este propósito, es menos eficiente en la remoción del hierro y produce el doble de pérdida de proteína comparado con el agente EDTA. El EDTA es adicionalmente un agente quelante más económico, biocompatible, no desnaturizante y no caotrópico, dando los mejores resultados en la remoción de hierro con una elevada recuperación de proteína para todos métodos comparados.
3. La existencia de agregados parece depender del contenido de hierro y de las condiciones de pH en la cual se realiza la reducción. Existe una correlación entre el contenido de hierro y el potencial superficial, pero no está claro si el cambio del potencial superficial induce la agregación, o la agregación compensa dicho potencial como consecuencia.
4. Se ha demostrado que el contenido de hierro en la cavidad de la proteína interfiere de manera no lineal con la absorbancia a 280 nm, longitud de onda comúnmente utilizada para la cuantificación de proteína.

5. De los resultados se establece un método para la formación de apoferritina de elevada eficiencia. Dicho método permite remover más del 99% del hierro presente en HSF, utilizándose TGA a pH 4,5 como agente reductor y EDTA como agente quelante en un solo día de tratamiento. Este procedimiento será utilizado en lo sucesivo para la formación de apoferritina.

CAPÍTULO 5

Formación de nanoestructuras de oro en la cavidad de la proteína

5.1 Introducción

Las nanopartículas de oro, con un tamaño desde unos cuantos hasta cientos de nanómetros, presentan interesantes propiedades ópticas y químicas que han promovido su investigación en potenciales aplicaciones biomédicas, la que en la última década se ha desarrollado considerablemente. El reducido tamaño de estas nanopartículas les permite desplazarse fácilmente por estructuras subcelulares. Su química superficial les permite interactuar con diversas moléculas y sus propiedades ópticas están siendo evaluadas para la detección de biomoléculas y sistemas de diagnóstico [17], transporte y liberación de fármacos[18], y como agente terapéutico para el tratamiento del cáncer[19] entre otras aplicaciones.

Las nanopartículas de oro presentan una coloración característica debido a su reducido tamaño, esta interesante propiedad óptica se debe a la interacción de

la nanopartícula con la radiación electromagnética incidente, que produce la oscilación en fase de los electrones en la banda de conducción, fenómeno llamado plasmón de resonancia superficial (SRP) o simplemente plasmón[143]. El campo eléctrico oscilante de la luz induce el desplazamiento de una parte de los electrones deslocalizados, generando un dipolo eléctrico en la superficie de la nanoestructura, representado en la figura 5.1.

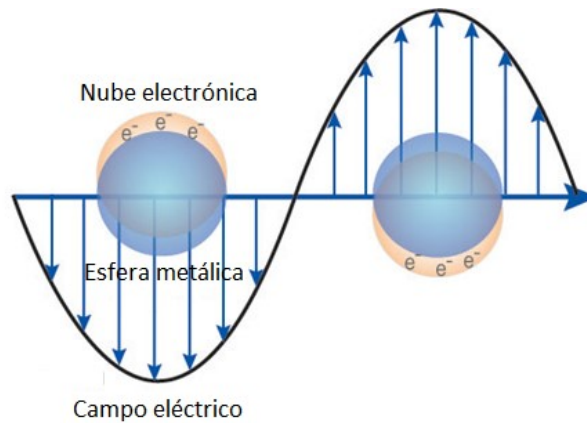


Figura 5.1. Esquema del plasmón de resonancia superficial

Este fenómeno fue estudiado inicialmente por Gustav Mie en 1908, resolviendo las ecuaciones de Maxwell bajo condiciones de frontera para esferas, determinando una expresión que describe el fenómeno del plasmón, Ec. 5.1

$$C_{ext} = \frac{24\pi^2 r \epsilon_m^{3/2}}{\lambda} \left[\frac{\epsilon_p(\lambda)}{(\epsilon_p(\lambda) + 2\epsilon_m)^2 + \epsilon_p(\lambda)^2} \right] \quad \text{Ec 5.1}$$

En la ecuación anterior, la sección transversal de extinción o coeficiente de extinción (C_{ext}) está determinada por la constante dieléctrica del medio (ϵ_m) y de las partículas (ϵ_p), el radio de la nanopartícula (r) y la longitud de onda de la radiación incidente (λ)[144]. La resonancia del plasmón superficial se origina

5.1 Introducción

cuando el tamaño de la partícula es mucho menor que la longitud de onda de haz incidente[145], dado por la siguiente condición, Ec. 5.2

$$2\pi\epsilon_m^{1/2}r \ll \lambda \quad \text{Ec 5.2}$$

Existe directa relación entre el tamaño de las nanopartículas y la absorción de luz a longitudes de onda mayores[18], [76], [146]. En el caso de partículas con un tamaño menor que la longitud de onda de la radiación incidente, el campo eléctrico superficial generado puede ser considerado como uniforme y puede ser descrito utilizando el momento dipolar de la aproximación de Mie[147]. Tamaños de partícula cercanos a la longitud de onda de la luz incidente generan una disminución en la densidad efectiva de los portadores de carga superficiales, lo que se ve reflejado como un desplazamiento al rojo y el ensanchamiento del perfil de absorción[148], figura 5.2.

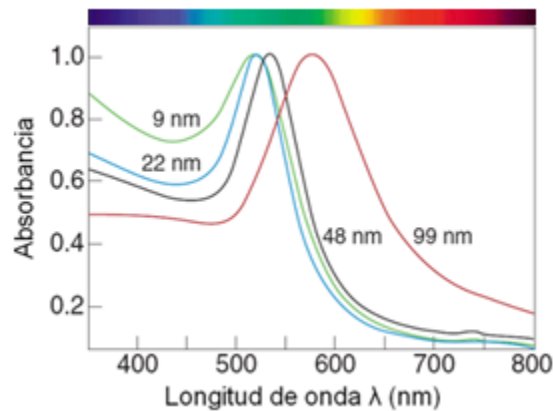


Figura 5.2. Espectro de absorción de nanopartículas de oro con diferente tamaño[148].

El tamaño de las nanopartículas incide en la posición del plasmón, mientras que la morfología determina la existencia de múltiples máximos en el espectro de absorción asociado a diversos plasmones. El plasmón que presentan las nanopartículas puede ser descrito con un modelo sencillo de resonancias

dipolares perfectas, presentando perfiles de absorción claros y con un máximo único[149]. Para nanoestructuras con diferente relación de aspecto como barras, la resonancia del plasmón se presenta con dos modos dipolares, uno longitudinal y otro transversal. Comúnmente el plasmón de resonancia transversal presenta un máximo en el rango visible mientras que el plasmón longitudinal lo presenta hacia el infrarrojo [150]:[151], figura 5.3.

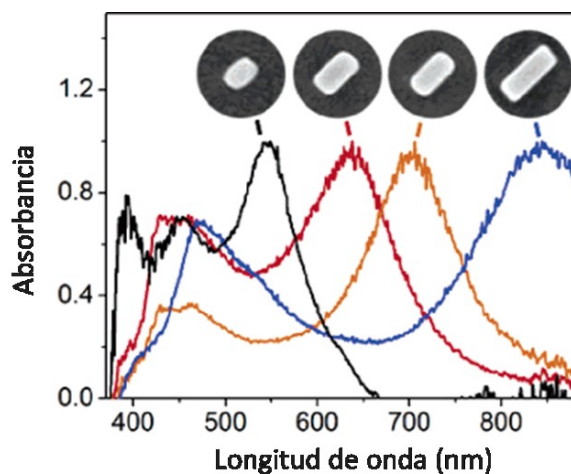


Figura 5.3 Espectro de absorción de nanobarras de diferente relación de aspecto[152].

La posibilidad de modular las propiedades ópticas de las nanopartículas de oro controlando el tamaño y la forma resultan de elevado interés para aplicaciones biotecnológicas[153]. La modulación del plasmón puede ser utilizada para que absorban luz en la ventana biológica, una sección del espectro electromagnético donde los tejidos se comportan de manera transparente, optimizando la absorción de energía por parte de las nanopartículas, la que es disipada en forma de calor localizado.

La síntesis de múltiples nanoestructuras de oro es realizada mediante agentes capantes, los que otorgan control sobre el tamaño y la agregación, utilizándose

5.1 Introducción

comúnmente recubrimientos que no son biocompatibles. Por otro lado, el uso de nanopartículas recubiertas con agentes capantes biocompatibles como citrato o polietilenglicol, genera diversas interacciones no específicas con biomoléculas en sistemas biológicos vivos, produciéndose una corona de proteínas que las rodean, las que terminan por disminuir de manera considerable su eficiencia en sistemas biológicos.

En consideración de estos antecedentes, es de elevado interés la síntesis de nanopartículas de oro utilizando sistemas biomoleculares, como aminoácidos y proteínas que otorguen un elevado control sobre el tamaño, presentando una elevada biocompatibilidad intrínseca en vista de potenciales aplicaciones biomédicas.

El método de síntesis de nanopartículas utilizado en esta tesis está basado en lo reportado por Fan y su grupo[82], figura 5.4. Este método consiste en incorporar AuCl_4^- por los canales de la ferritina mediante incubación de la proteína en presencia de una sal de oro. Con el propósito posterior de reducir y formar nanoestructuras en la cavidad es necesario remover el exceso de AuCl_4^- presente en el exterior de la ferritina, ya que de agregar el agente reductor se podrían formar nanoestructuras indistintamente en el exterior como en el interior de la cavidad. Por este motivo, la muestra es dializada removiendo efectivamente el exceso de AuCl_4^- del exterior. Posteriormente se reduce el Au^{+3} a Au^0 mediante un agente reductor fuerte como NaBH_4 , permitiendo la creación de cúmulos o *clusters de oro*, los que poseen decenas de átomos[154],[155]. Dichos *clusters* sirven como superficie para la posterior reducción y formación de las nanopartículas de Au. En una segunda etapa se vuelve añadir AuCl_4^- , se dializa y finalmente se añade un reductor débil, ácido ascórbico, para el crecimiento de las nanopartículas de Au, las que presentan centenas de átomos. Esta nueva reducción no se realiza con NaBH_4 debido a que este genera nuevos *clusters* y no el crecimiento de las nanopartículas.

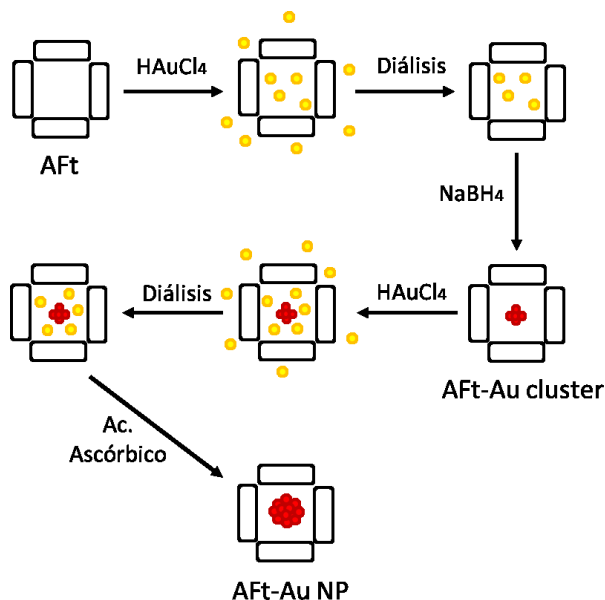


Figura 5.4. Diagrama de la síntesis de nanoestructuras de oro en apoferritina

Las muestras obtenidas de las dos etapas del protocolo fueron estudiadas mediante espectroscopía UV-Vis y fluorescencia, evaluando la formación de las nanopartículas por la existencia del plasmón. La integridad estructural la proteína con las nanoestructuras fue estudiada por cromatografía de exclusión de tamaño (SEC) y dispersión dinámica de luz (DLS). El contenido de oro fue caracterizado por espectroscopía de absorción atómica (AAS), espectroscopía de fotoelectrones de rayos X y microscopía electrónica de transmisión (TEM). A continuación se presentan los resultados de la síntesis de nanoestructuras de oro en la cavidad de la proteína ferritina formadas en las dos etapas.

5.2 Propiedades ópticas

Las propiedades ópticas de las muestras con contenido de oro fueron evaluadas por espectroscopia de absorción UV-Vis y fotoluminiscencia para determinar la existencia de las nanoestructuras. La figura 5.5 muestra el espectro de absorbancia de apoferritina (AFt), presentando los máximos característicos en el UV propios de la proteína vacía. También se presentan es espectro de la proteína posterior a la primera y segunda reducción, respectivamente.

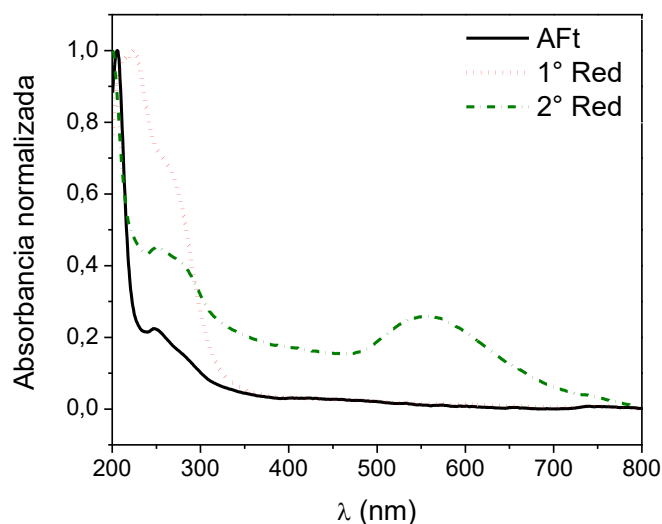


Figura 5.5. Espectros de absorbancia de apoferritina (AFt), muestra posterior a la primera reducción (1° Red) y muestra posterior a la segunda reducción (2° Red).

El espectro de la muestra obtenida posterior a la segunda reducción presenta un máximo a 556 nm, el que corresponde al plasmón de resonancia superficial y por consiguiente demuestra la existencia de nanopartículas. Por otro lado, el espectro de la muestra posterior a la primera reducción no exhibe absorbancia en el visible, por lo que no presenta nanopartículas. Sin embargo, se observa un

incremento en la absorbancia a 280 nm, esto implica que el proceso de carga en la cavidad de la proteína, ya sea con oro como con óxidos de hierro, se correlaciona con la absorbancia a dicha longitud de onda, fenómeno que igualmente es observado en la muestra con nanopartículas producto de la segunda reducción. También se observa un corrimiento al rojo en la absorbancia atribuida al enlace peptídico, con un valor cercano a los 225 nm. Esto puede ser atribuido a interacciones entre las nanoestructuras de oro generadas en la primera reducción con los sitios catalíticos de la proteína[83], lo que afecta el plegamiento local de las cadenas peptídicas.

Las nanopartículas de oro presentan el plasmón ópticamente activo cuando su tamaño se halla en el rango de 3 a 150 nm[148] y la ausencia del plasmón en el espectro de la muestra posterior a la primera reducción indica que las nanoestructuras resultantes pueden poseer un tamaño inferior a los 3 nm. En el caso de partículas de oro con tamaños inferiores a 3 nm, la estructura electrónica del material puede ser descrita mediante orbitales moleculares, presentando nuevas propiedades ópticas como lo es la fotoluminiscencia[153],[156], [157]. Este tipo de nanoestructuras de 2-3 nm poseen decenas de átomos y son comúnmente llamado clusters [154],[155]. Por consiguiente, se evaluó la formación de *clusters* de oro mediante un perfil de fotoluminiscencia utilizando una excitación (λ_{exc}) de 365 nm, figura 5.6.

El perfil de fluorescencia indica que la muestra de proteína sola (Aft) no presenta fluorescencia dada por la nula intensidad detectada. La muestra con *clusters* es la que posee la mayor intensidad, lo que indica la existencia de partículas con un diámetro menor a 3 nm. La muestra de nanopartículas también presenta fluorescencia pero con menor intensidad, lo que sugiere la coexistencia de nanopartículas (>3 nm) y *clusters* (2-3 nm) en la misma muestra.

5.2 Propiedades ópticas

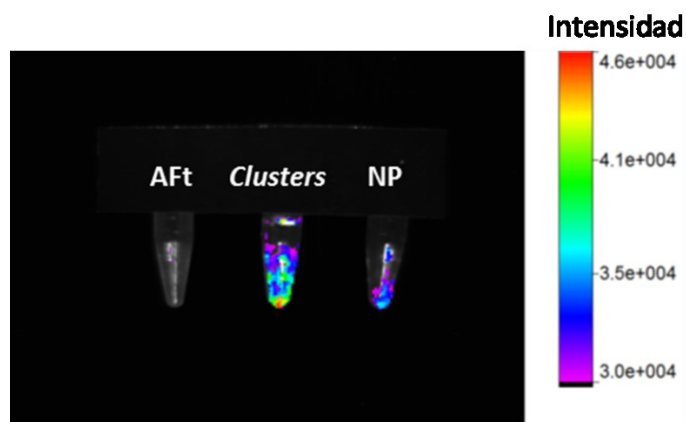


Figura 5.6 Perfil de fluorescencia de las muestras de apoferritina (AFt), proteína con clusters y con nanopartículas.

La excitación de fluorescencia de los *clusters* se debe a transiciones electrónicas interbandas d-sp, mientras que la emisión es producto de la recombinación de los electrones del nivel de Fermi con los huecos de la banda d [157], fenómeno representado en la figura 5.7. En el caso de las muestras con *clusters*, la excitación (λ_{exc}) a 365 nm produce una emisión (λ_{emi}) cercana a 450 nm.

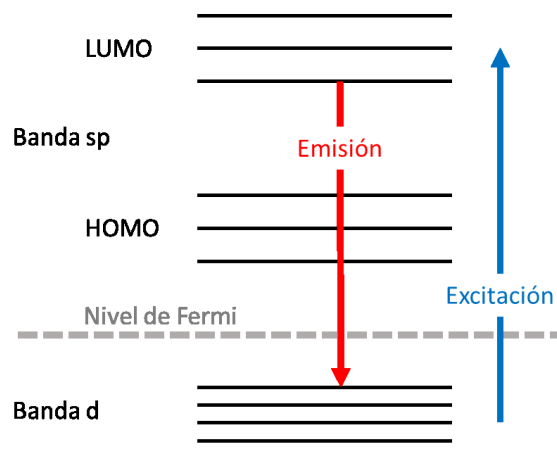


Figura 5.7. Diagrama de luminiscencia para cúmulos de oro. LUMO (*Lowest unoccupied molecular orbital*) y HOMO (*Highest occupied molecular orbital*)

5.3 Integridad estructural y tamaño

La caracterización de la integridad estructural de las muestras con oro por medio de cromatografía de exclusión de tamaño (SEC) se realizó utilizando absorción de luz a dos longitudes de onda, a 280 nm para la detección de proteína y a 556 nm para la detección de las nanoestructuras de oro. Esta técnica permite conocer si las nanoestructuras se hallan unidas a la proteína, resultados que son complementados con el diámetro hidrodinámico determinado mediante DLS.

En la figura 5.8a se muestra el perfil de elución de la apoferritina, eluyendo principalmente el monómero de la proteína ($A_{280 \text{ nm}}$) a 5,8 mL. Por lo otro lado, no se observa señal que presente absorbancia a 556 nm ($A_{556 \text{ nm}}$), confirmando que la muestra carece de nanoestructuras de oro o interferentes.

En el cromatograma de la muestra con *clusters* de oro (figura 5.8b) se observa la coelución de la proteína con las nanoestructuras de oro, indicando que la proteína y los *clusters* de encuentran unidos, principalmente en los agregados, los que eluyen a 4,9 mL.

Finalmente el cromatograma de la muestra con nanopartículas de oro (figura 5.8c) muestra la existencia de agregados y monómeros de la proteína junto con la coelución de las nanopartículas de oro. Esto indica que las nanopartículas de oro se hallan unidas con la proteína. También se observa que las nanopartículas coeluyen principalmente con los agregados de proteína, seguido por el monómero.

5.3 Integridad estructural y tamaño

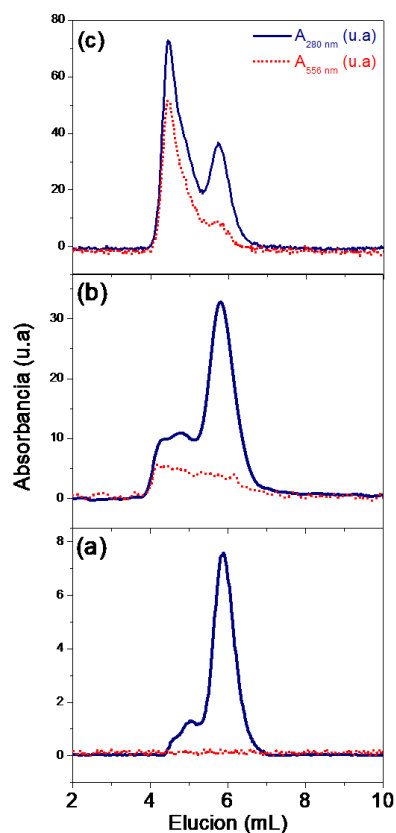


Figura 5.8. Cromatogramas de exclusión para muestra de apoferritina (a), proteína con clusters (b) y proteína con oro (c).

En resumen, el análisis cromatográfico presenta tres elementos de interés: 1) la elución conjunta de las nanoestructuras de oro con la proteína sugiere que se hallan unidas y que no poseen un tamaño considerablemente distinto a los agregados y monómero de la ferritina. 2) La existencia de carga en la cavidad de la ferritina incide en la formación de agregados de proteína, observándose la progresiva formación de agregados de acuerdo al tamaño de la nanoestructura de oro, fenómeno que también se ha observado para la carga con óxidos de hierro. 3) el incremento progresivo en la intensidad en la $A_{280\text{ nm}}$ (u.a) dependiente de la carga en la cavidad de la proteína. Esto evidencia que la existencia de carga

en la proteína incide en la formación de agregados y en las propiedades ópticas de la ferritina.

Los resultados de la integridad estructural por cromatografía indican que la proteína y las nanoestructuras de oro se encuentran unidas, pero no entrega información directa si los *clusters* y las nanopartículas se encuentran en la cavidad o en el exterior de la ferritina, por lo que es necesario conocer el tamaño coloidal de las muestras para determinar si las nanoestructuras se encuentran en la cavidad de la proteína. Esto es posible de establecer por la conservación del diámetro hidrodinámico (d_H) de la proteína analizada por DLS.

El d_H determinado por DLS señala que las muestras con contenido de oro conservan el tamaño coloidal de la proteína (12nm), figura 5.9, sugiriendo que las nanopartículas de oro se encuentran en la cavidad de la ferritina.

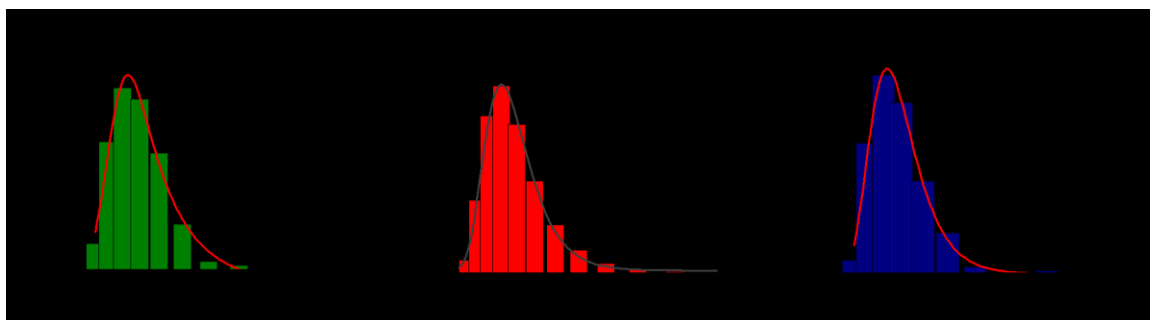


Figura 5.9. Curvas de distribución de tamaños para las muestras de apoferritina (a), *clusters* (b) y nanopartículas (c)

Las eluciones cromatográficas de las muestras con contenido de oro fueron colectadas y analizadas por DLS para conocer la distribuciones de tamaños y relacionarlas con el potencial Z (ζ), tabla 5.1 . Los resultados indican que los agregados poseen un tamaño cercano a los 40 nm para las muestras con nanoestructuras de oro, mientras que el monómero conserva el tamaño de la proteína de 12 nm. Los valores de ζ indican que efectivamente la existencia de

5.3 Integridad estructural y tamaño

carga en la cavidad de la proteína incide en la carga eléctrica superficial y por lo tanto en la agregación de la ferritina. Por consiguiente, la carga en el interior de la ferritina modifica la distribución de cargas eléctricas en la proteína afectando su ζ y dando origen a la formación de agregados. Por otro lado, la cuantificación de proteína establece que para las muestras con *clusters* y con nanopartículas la cantidad de proteína involucrada en los agregados es menor al 10% del total.

Muestra	d_H (nm)		ζ (mV)	
	Agregados	Monómero	Agregados	Monómero
<i>Clusters</i>	39±3	11±1	-7,9	-12,6
NP	37±2	12±1	-3,5	-13

Tabla 5.1. Valores de diámetro hidrodinámico (d_H) y potencial Z (ζ) de los agregados y monómeros de proteína para clusters y nanopartículas de oro en la cavidad de la ferritina.

La caracterización de la integridad estructural de la proteína por SEC y DLS sugiere fuertemente que los *clusters* y nanopartículas de oro se generan en la cavidad de la proteína y que la formación progresiva de las nanoestructuras, de *clusters* a nanopartículas, incide en la formación de agregados de ferritina al modificar su carga eléctrica superficial.

5.4 Contenido de oro

El contenido de oro en las muestras con nanoestructuras de oro fue caracterizado por espectroscopía de absorción atómica (AAS) y espectroscopía de fotoelectrones de rayos X (XPS) para determinar la cantidad de oro presente en las muestras y conocer la composición elemental

5.4.1 Incorporación de oro

La concentración de oro determinada por AAS se relaciona con la cantidad de proteína presente en la muestra para obtener el parámetro de átomos de oro por molécula de ferritina (Au/Ft), lo que determina el grado de carga de cada muestra. La existencia del plasmón con un máximo de absorbancia a 556 nm produce interferencia en la cuantificación de proteína por el método BCA, utilizado ampliamente durante esta tesis, debido a que la proteína es determinada por absorbancia a 562 nm. Debido a este fenómeno el contenido de proteína de las muestras con nanoestructuras de oro fue determinado por el método de Lowry modificado, que mide absorbancia a 750 nm.

De los resultados de AAS y cuantificación de proteína se determinaron las relaciones Au/Ft y el grado de incorporación de oro, tabla 5.2. La concentración de oro determinada por AAS es relacionada con la cantidad de proteína presente en la muestra para obtener el parámetro de átomos de oro por molécula de ferritina (Au/Ft), lo que determina el grado de carga de cada muestra. La existencia del plasmón con un máximo de absorbancia a 556 nm produce interferencia en la cuantificación de proteína por el método BCA, utilizado ampliamente durante esta tesis, debido a que la proteína es determinada por absorbancia a 562 nm. Debido a este fenómeno el contenido de proteína de las muestras con nanoestructuras de oro fue determinado por el método de Lowry modificado, que mide absorbancia a 750 nm.

De los resultados de AAS y cuantificación de proteína se determinaron las relaciones Au/Ft y el grado de incorporación de oro, tabla 5.2.

5.4 Contenido de oro

Muestra	Parámetro	
	Au/Ft	Au inc (%)
<i>Clusters</i>	31±30%	20
NP	130±14%	85

Tabla 5.2. Valores de átomos por molécula de ferritina (Au/Ft) y porcentaje de oro incorporado en cada tipo de nanoestructura

El proceso de incubación de la apoferritina en presencia de la sal de oro permite la incorporación de un 20% del oro añadido, el que posteriormente es reducido por NaBH_4 para formar *clusters*. El bajo valor de incorporación de oro para la muestra con *clusters* puede ser atribuido a las interacciones electroestáticas entre la superficie externa de la proteína que posee un potencial Z (ζ) cercano a los -12 mV bajo las condiciones utilizadas y el carácter aniónico de la sal de oro (AuCl_4^-), lo que restringe la incorporación. Por otro lado, la existencia de *clusters* favorece la incorporación de oro en la cavidad para su posterior reducción y formación de nanopartículas, incorporando cerca del 85% del oro añadido. El aumento en el grado de incorporación de oro se atribuye a que los *clusters* ejercen un efecto en la distribución de cargas eléctricas en la proteína, tabla 5.1, dicha modificación en la carga eléctrica superficial puede disminuir localmente la repulsión entre la sal de oro y la superficie de la proteína, favoreciendo su incorporación. A su vez, los *clusters* ofrecen una superficie para la agregación y coalescencia del oro [82], lo que es termodinámicamente favorable según el modelo de maduración de Ostwald[158].

5.4.2 Estudio de la composición elemental

La composición de las muestras con contenido de oro fue estudiada por espectroscopía de fotoelectrones de rayos X (XPS) realizándose mediciones de amplio espectro para detectar los elementos que se encuentran presentes en las muestras y análisis de alta resolución para las señales C 1s, O 1s y Au 4f.

La caracterización de la composición de la muestra con *clusters* después de ser erosionada con Ar^+ , figura en Anexo 5, exhibe las señales principales de los elementos C, N, O, Na, Cl y Si, también se presentan las señales de Au 4s y 4f con baja intensidad. Las señales C 1s, N 1s y O 1s son propias de la estructura orgánica de la proteína, las señales de Cl 1s y 2p revelan un remanente de la reducción de la sal de oro (HAuCl_4), la señal Na 1s es también un remanente del agente reductor (NaBH_4) mientras que la señal Si 1s proviene del sustrato en el cual se deposita la muestra.

El ajuste de curvas del espectro de alta resolución de la señal Au 4f de la muestra con *clusters*, figura 5.10, presenta las señales Au 1 con una energía de ligadura de 84,1 eV y la señal Au 2 con una energía de 87,7 eV. La energía de ligadura de la señal Au 1 corresponde a la señal de oro metálico (Au^0)[159]. Esto implica que la utilización del NaBH_4 reduce todo el oro presente en la cavidad de la proteína dando origen a los *clusters* de oro. La señal Si^* corresponde a un satélite del sustrato de silicio debido a que la fuente de radiación utilizada para la emisión de los fotoelectrones no es monocromática.

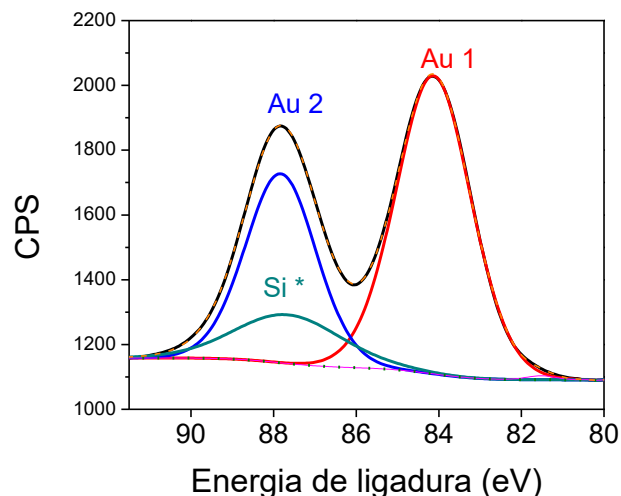


Figura 5.10. Espectro XPS de alta resolución de la señal Au 4f de la muestra con *clusters* de oro

El análisis de la composición elemental de la muestra con nanopartículas posterior a su erosión, figura en Anexo 5, presenta los elementos C, N, O, Cl y Na, los que corresponden a la estructura orgánica de la proteína y remanentes de la sal de oro. Por otro lado se observan las señales Au 4d, 4f y 4s con mayor intensidad que la muestra con *clusters*, lo que muestra indirectamente un mayor contenido de oro.

En la figura 5.11 se muestra el ajuste del espectro de alta resolución de la señal Au 4f de la muestra con nanopartículas de oro. El ajuste específico de la señal 4f_{7/2} presenta el máximo Au 1 con una energía de ligadura de 83,8 eV, atribuible a la existencia de oro metálico (84 eV), y el máximo Au 2 con una energía de 84,8 eV. La señal Au 2 se encuentra cerca de la energía de 85 eV, el que es atribuido a oro oxidado (Au⁺¹)[160].

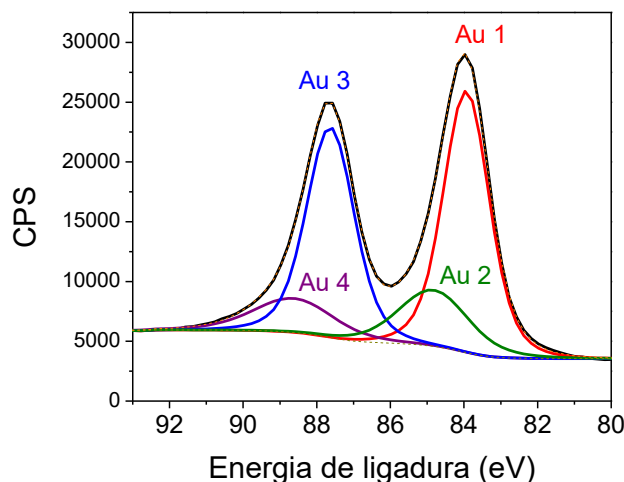


Figura 5.11 Espectro XPS de alta resolución de la señal Au 4f de la muestra con *nanopartículas* de oro

La existencia de oro no metálico en la muestra con nanopartículas puede ser atribuida a dos efectos: el primero es que la segunda reducción de la sal de oro mediante un reductor suave como el ácido ascórbico no sea lo suficiente para reducir todo a oro metálico. Ensayos posteriores de la reducción del oro mediante una mayor cantidad de ácido ascórbico resultaron en la misma existencia de Au^{+1} , por esto se descarta al agente reductor como responsable de la existencia de oro no metálico, Anexo 5.

Un segundo posible efecto responsable de la existencia de Au^{+1} son las interacciones entre la superficie de la nanopartícula y el interior de la proteína. La proteína ferritina posee múltiples sitios catalíticos de ferroxidasa que están compuestos por seis residuos que provienen de los aminoácidos ácido glutámico (Glu), glutamina (Gln), ácido aspártico (Asp) e histidina (His). Los anillos de imidazol de los residuos de histidina presentan afinidad por los iones de Au^{+3} [161]–[163], presentándose como puntos de control para la nucleación heterogénea de las nanoestructuras, donde la rápida reducción ejercida por el

5.4 Contenido de oro

NaBH₄ produce la completa reducción de los iones de oro presente en la cavidad generando los *clusters* de oro metálico. Los *clusters* formados en la cavidad actúan como semillas para la segunda adición y reducción del oro, donde la reducción realizada por un agente reductor suave permite el crecimiento de los *clusters* a nanopartículas. En la segunda adición de oro existe una cierta cantidad de Au⁺³ que puede interactuar con los residuos de histidina de los sitios de ferroxidasa, en que la adición del ácido ascórbico no es suficiente para reducirlos a oro metálico, algo que si logra el NaBH₄, existiendo como remanentes de Au⁺¹. Por otro lado, Sun y su grupo han reportado que la formación de *clusters* de oro en la cavidad de la proteína puede ocurrir preferentemente en los sitios catalíticos y que bajo condiciones alcalinas (pH>11) el anillo de imidazol puede reducir parcialmente de Au⁺³ a Au⁺¹ mientras que la oxidación del enlace peptídico bajo las mismas condiciones puede generar oro metálico[83].

5.5 Estudio por microscopía electrónica de transmisión

Con el objetivo de estimar el tamaño de los *clusters* y nanopartículas de oro en la cavidad de la proteína y relacionarlo con las propiedades ópticas observadas se caracterizaron las muestras mediante microscopía electrónica de transmisión. Para la obtención de imágenes se utilizó una aceleración de 120 kV, lo que permite maximizar el contraste y minimizar el daño producido en la proteína por el haz de electrones.

En la caracterización por TEM de la muestra con *clusters* se observan partículas esféricas con diámetros entre 2 y 6 nm, figura 5.12. El análisis de distribución de tamaños sobre 200 partículas (N=200) indica que los *clusters* poseen un diámetro promedio $d=1,8\pm0,4$ nm.

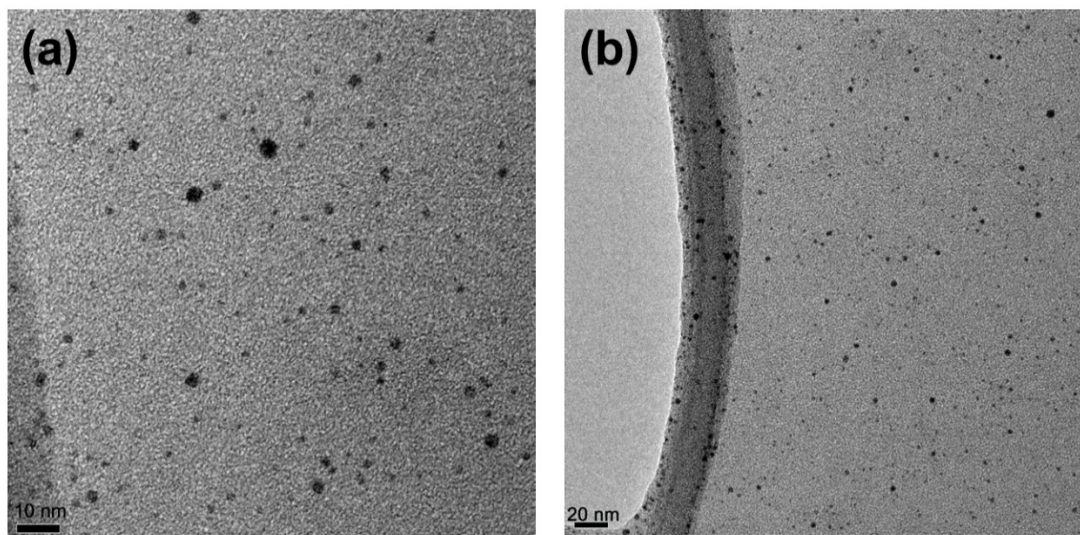


Figura 5.12 Imágenes TEM de *clusters* de oro, figura (a) barra de 10 nm, figura (b) barra de 20 nm.

5.5 Estudio por microscopía electrónica

Por otro lado la caracterización por TEM de la muestra con nanopartículas presenta partículas esféricas con tamaños de 2 a 8 nm. No se observaron partículas con diámetros superiores a 8 nm, que es el tamaño aproximado de la cavidad de la proteína.

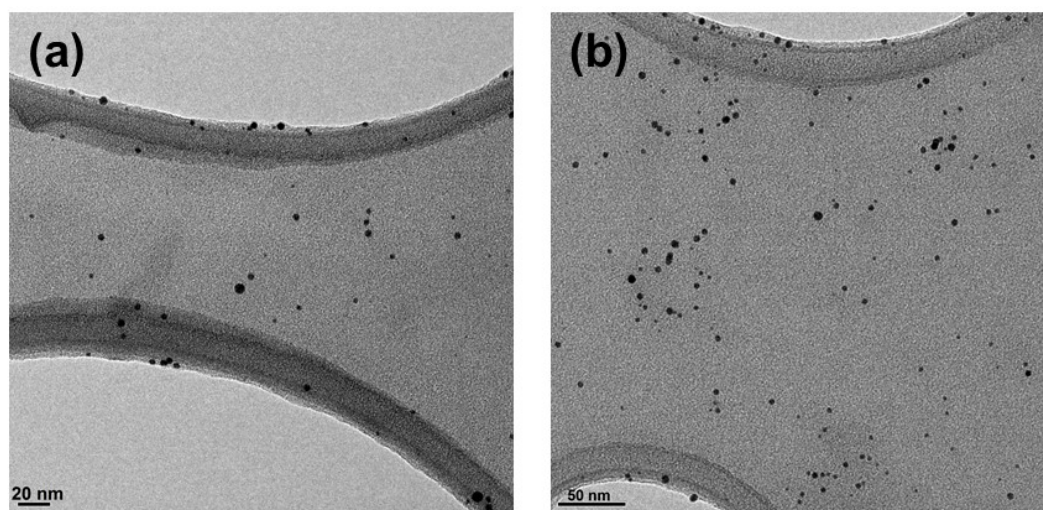


Figura 5.13. Imágenes TEM de nanopartículas de oro, figura (a) barra de 20 nm, figura (b) barra de 50 nm.

La formación de los *clusters* se inicia con la nucleación heterogénea de los átomos de oro, proceso que permite la generación de los primeros núcleos metálicos a partir de una baja concentración de oro presente en la cavidad. El histograma de distribución de tamaños de la muestra con *clusters*, figura 5.14a, muestra que el tamaño mínimo de las partículas es de 2 nm, lo que representa el 80% de las partículas contadas, esto implica que existe una cierta cantidad de oro crítica que inicia la formación de los *clusters*, donde dicho valor se ajusta a lo reportado para etapa de nucleación según el modelo clásico de LaMer[164], [165]. El tamaño de los primeros núcleos debe ser igual o superior al tamaño crítico de 2 nm, partículas con un tamaño inferior al crítico son

termodinámicamente inestables, por lo que se disuelven. La existencia de un 20% de partículas con tamaño superior a los 2 nm en la muestra con *clusters* indica que la proteína es capaz de incorporar sobre una cierta cantidad crítica de oro en su cavidad y que la rápida reducción ejercida por el NaBH_4 consume la totalidad del oro disponible, lo que también restringe partículas de mayores tamaños. Por otro lado, los *clusters* formados no tienden a generar agregación ni maduración intrapartículas debido al pH utilizado durante el proceso (pH 7), lo que restringe la existencia de partículas con tamaños mayores a 2-3nm[158] y por consiguiente, se generan partículas con tamaño monodisperso. De forma similar, diversos autores han reportado que la etapa de nucleación del oro genera nanoestructuras desde 2 nm, que corresponde al diámetro crítico para el posterior crecimiento a nanopartículas[154], [155].

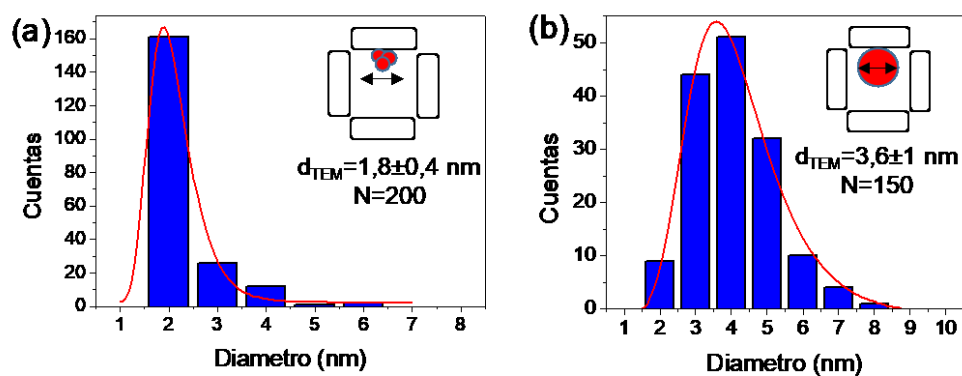


Figura 5.14. Histogramas de distribución de tamaños de los núcleos de oro para la muestra con *clusters* (a) y nanopartículas (b)

La distribución de tamaños de la muestra con nanopartículas indica que estas poseen un diámetro de $3,6 \pm 1$ nm (N=150), figura 5.14b. El proceso de formación de nanopartículas a partir de los *clusters* es realizado mediante una segunda adición y reducción del oro, este proceso permite que el crecimiento a nanopartículas se halle controlado por la difusión de los átomos de oro a la

5.5 Estudio por microscopía electrónica

superficie de los *clusters*, creciendo por agregación. El reducido tamaño promedio de las nanopartículas indica que existe poco oro en la cavidad de la proteína producto de la segunda adición de oro para ser reducido y que finalmente crezcan a nanopartículas. Del histograma de distribución de tamaños se observa que existe cerca de un 6% de partículas contadas que poseen un diámetro de 2 nm, lo que corresponde a *clusters* que no incorporaron oro y por lo tanto conservan su tamaño. La utilización de un agente reductor suave como el ácido ascórbico implica que la reducción realizada es más lenta, lo que otorga mayor control sobre el crecimiento de las nanopartículas, obteniéndose finalmente nanopartículas de tamaño monodisperso.

Los tamaños determinados por TEM de los *clusters* y nanopartículas guardan directa relación con las propiedades ópticas observadas. Los *clusters* poseen un tamaño promedio de 2 nm, que no solo es el tamaño crítico para la nucleación de nanoestructuras de oro, también es el diámetro crítico en que se presenta la fluorescencia[153],[156], sin presentar el SRP. Esto es observado en las figuras 5.5 y 5.6. Por otro lado las nanopartículas poseen un diámetro promedio de 3,6 nm, lo que es suficiente para presentar el plasmón característico y el remanente del 6% de *clusters* presentes en la muestra le otorga la fluorescencia, lo que se observa en el perfil de fluorescencia en la figura 5.6.

Es importante comprender si el proceso de carga con oro en la cavidad de la proteína para ambas nanoestructuras es homogéneo, esto implica si todas las moléculas de ferritina presentan similar contenido de oro. La homogeneidad de la carga es evaluada mediante la comparación del diámetro de partícula estimado por TEM y por el contenido de oro. A partir del contenido de oro por molécula de proteína (Au/Ft), tabla 5.2, es posible calcular el tamaño de partícula, mediante dos supuestos: 1) que el oro posee una estructura cristalina cúbica centrada en las caras (FCC) con una constante de red $a=0,408$ nm[82] y 2) que todas las moléculas de proteína presentan la misma cantidad de oro en su interior. La

estimación del tamaño del núcleo metálico a partir del contenido de oro indica que la muestra con *clusters* tendría un diámetro de 1 nm, mientras que la muestra con nanopartículas de 1,6 nm, tabla 5.3.

Muestra	Parámetro		
	Au/Ft	d _{FCC} (nm)	d _{TEM} (nm)
<i>Clusters</i>	31	1	1,8
NP	128	1,6	3,6

Tabla 5.3. Valores de contenido de oro (Au/Ft), diámetro de partícula estimado por estructura cristalina (d_{FCC}) y diámetro real estimado por TEM (d_{TEM})

Los valores estimados del tamaño del núcleo metálico a partir del contenido de oro se encuentran en discrepancia con las propiedades ópticas observadas y el diámetro estimado por TEM. Las nanopartículas que poseen un tamaño superior al diámetro crítico 2-3 nm[165]–[168], presentan absorción de luz en el rango visible. Esto se debe a la excitación de los electrones de conducción generando el plasmón de resonancia superficial. Considerando esto, y según el diámetro estimado por el contenido de oro (1,6 nm), no debería presentarse el plasmón. Esta diferencia podría explicarse dado que el proceso de incorporación y formación de nanoestructuras (*clusters* y nanopartículas) no es homogéneo, existiendo un remanente de moléculas de proteína que no incorporan oro en su cavidad, quedando vacías.

5.6 Conclusiones

1. El proceso de síntesis progresiva de nanoestructuras de oro en la cavidad de la proteína se inicia con la formación de clusters de 2 nm los que presentan fluorescencia, seguido por la síntesis de nanopartículas de oro de 3,6 nm las que exhiben el plasmón de resonancia característico.
2. La existencia de carga en la cavidad de la proteína modifica la distribución de cargas eléctricas superficiales, lo que se relaciona con la formación de agregados de proteína. A su vez la carga de la cavidad también incide sobre las propiedades ópticas de la proteína, aumentando su absorbancia a 280nm.
3. La síntesis de los *clusters* produce la completa reducción de los iones de oro presentes en la cavidad mientras que el progresivo paso a nanopartículas mediante una segunda reducción más suave produce iones de Au^{+1} atribuible a la interacción del oro con los residuos de histidina de los sitios catalíticos de la proteína.
4. El proceso de formación de nanoestructuras no es homogéneo, existiendo moléculas de proteína sin oro en su cavidad.

CAPÍTULO 6

Formación de óxidos de hierro magnéticos en la cavidad de la proteína

6.1 Introducción

Las nanopartículas magnéticas han sido estudiadas ampliamente y se hallan clasificadas según el tipo de comportamiento que estas presentan. El comportamiento viene dado principalmente por la composición y las dimensiones, reportándose el estudio de nanoestructuras metálicas como Ni[169], y Co[170], de óxidos metálicos, mayoritariamente derivados del hierro como Fe₂O₃[13], [171], [172], Fe₃O₄ [173]–[175] y otros tipos de óxidos como Co₃O₄[176], [177], a modos de ejemplo. Es por lo tanto que las aplicaciones de esta clase de sistemas nanoestructurados dependen fuertemente de las propiedades magnéticas que presentan.

El estudio de las propiedades magnéticas de un material consiste principalmente en la exposición de este a un campo magnético (H) externo, el que genera una inducción magnética (B), donde la respuesta magnética o magnetización del sistema (M) corresponde al momento dipolar magnético (m) por unidad de volumen o masa determinada por la siguiente expresión, ecuación 6.1

$$B = H + 4\pi M \quad \text{Ec 6.1}$$

La susceptibilidad magnética (χ) es el grado de magnetización de un material en respuesta a un campo magnético aplicado, ecuación 6.2. Por lo tanto, el tipo de material magnético es clasificado según el valor de la susceptibilidad.

$$\chi = \frac{M}{H} \quad \text{Ec 6.2}$$

Si el valor de la susceptibilidad es negativo, es considerado como diamagnético. En los materiales diamagnéticos se presenta un acoplamiento total de los electrones de forma que no existe un momento magnético neto. El estímulo producido por un campo externo induce un pequeño momento magnético asociado al orbital, de valor opuesto al campo aplicado expresándose de forma repulsiva. Si el valor es positivo, eso quiere decir que el campo aplicado es capaz de generar un cierto ordenamiento magnético en el material, puede ser clasificado como paramagnético según el valor de dicho cociente. En ambas categorías no se conserva un estado de magnetización permanente cuando la influencia del campo magnético externo se excluye.

Los materiales paramagnéticos son aquellos cuyos momentos magnéticos no se encuentran apareados, distribuyéndose con una orientación aleatoria. Esto implica que su momento magnético es diferente de cero y al ser expuesto a un campo externo presenta una magnetización debido al alineamiento de los momentos en la dirección del campo. En ausencia de un campo magnético, la energía térmica fuerza a los momentos magnéticos a volver a su distribución aleatoria. Por dicho motivo el paramagnetismo no se observa a bajas temperaturas, existiendo una temperatura crítica que indica el cambio en el comportamiento. Por debajo de dicha temperatura el acoplamiento de los momentos magnéticos del material produce uno de los tres tipos restantes de comportamiento magnético, figura 6.1.

6.1. Introducción

En los materiales ferromagnéticos, los momentos magnéticos interactúan fuertemente producto de la existencia de electrones desapareados. Se caracterizan porque poseen una orientación magnética y exhiben cierta magnetización en ausencia de un estímulo externo. La existencia de una magnetización espontánea es estable hasta cierta temperatura, llamada temperatura de Curie donde la energía térmica es mayor que la interacción magnética destruyendo el orden, resultando en un comportamiento paramagnético.

Los materiales antiferromagnéticos poseen momentos magnéticos de igual magnitud, pero ordenados de manera antiparalela, resultando en una magnetización total nula. Esta condición desaparece sobre la temperatura de Neel, donde la energía térmica es suficiente para producir que los momentos magnéticos dispuestos de manera antiparalela fluctúen de manera aleatoria, provocando la desaparición de su orden, exhibiendo un comportamiento paramagnético.

Por último los materiales ferrimagnéticos se pueden interpretar similarmente a un material antiferromagnético en que una de la direcciones del campo es de mayor valor que la otra, resultando en un magnetización no nula, imponiéndose un valor sobre el otro.

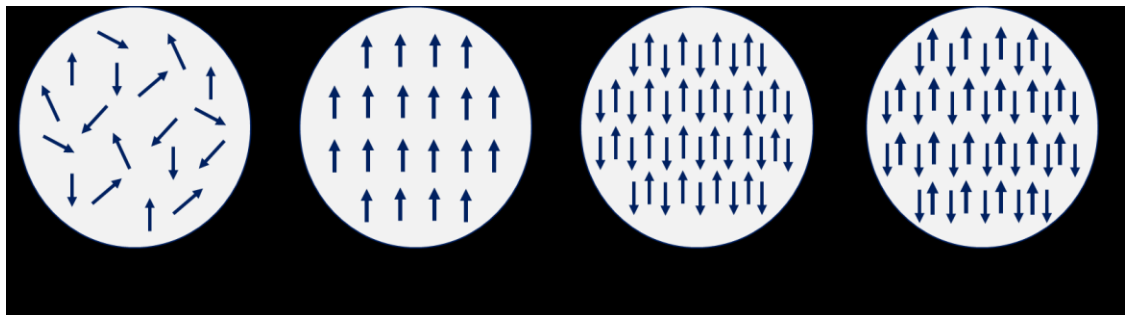


Figura 6.1. Esquema del ordenamiento magnético en los diversos tipos de materiales.

Muchos materiales magnéticos se caracterizan por que su estructura se encuentra dividida en dominios magnéticos, permitiendo minimizar su energía. Un dominio magnético es una región del material en que todos sus momentos se hallan alineados en la misma dirección, presentando una magnetización uniforme. Cada dominio está acotado por unas paredes de dominio, las que delimitan el inicio de otra región con un alineamiento magnético distinto [178].

Si un material magnético posee dimensiones inferiores a 100 nm, este se puede comportar como si cada partícula fuese un sólo dominio, presentando un comportamiento global como un material paramagnético, figura 6.2. Esta condición en que cada partícula es un monodominio es denominada superparamagnetismo, fenómeno que se caracteriza por una magnetización remanente y campo coercitivo con valores cercanos a cero en ausencia de campo externo.

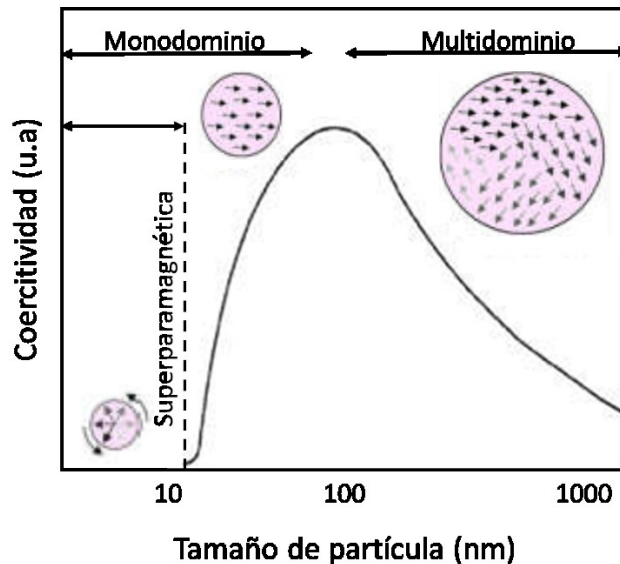


Figura 6.2. Diagrama de relación entre el campo coercitivo y el tamaño de partícula.

6.1. Introducción

El tipo de comportamiento magnético está dado por la respuesta que presenta el material a la acción de un campo externo, definido por la existencia de un ciclo o curvas de histéresis, figura 6.3. En este tipo de curvas se representa la magnetización del material (M) en función del campo aplicado (H) a una determinada temperatura. La aplicación de un campo magnético externo creciente ($H > 0$) induce a los momentos de los dominios magnéticos a alinearse gradualmente en la dirección del campo aplicado. Los dominios se alinean hasta alcanzar un valor máximo, denominado magnetización de saturación (M_s). La curva de histéresis ahora contempla la aplicación del campo en el sentido contrario hasta la desaparición de dicho campo ($H = 0$), donde una cierta parte de la magnetización del material sigue existiendo y es denominada magnetización remanente (M_R). Se sigue con la aplicación del campo ($H < 0$) lo que permite que los momentos magnéticos de los dominios vuelvan a dar un valor neto nulo, donde el valor de dicho campo es conocido como campo coercitivo o coercitividad (H_c). Al continuar aplicando el campo, los dominios inician su orientación con respecto al nuevo campo alcanzando de nuevo una magnetización de saturación, de igual magnitud pero signo opuesto a la primera. Este recorrido reversible representa el ciclo de histéresis magnético

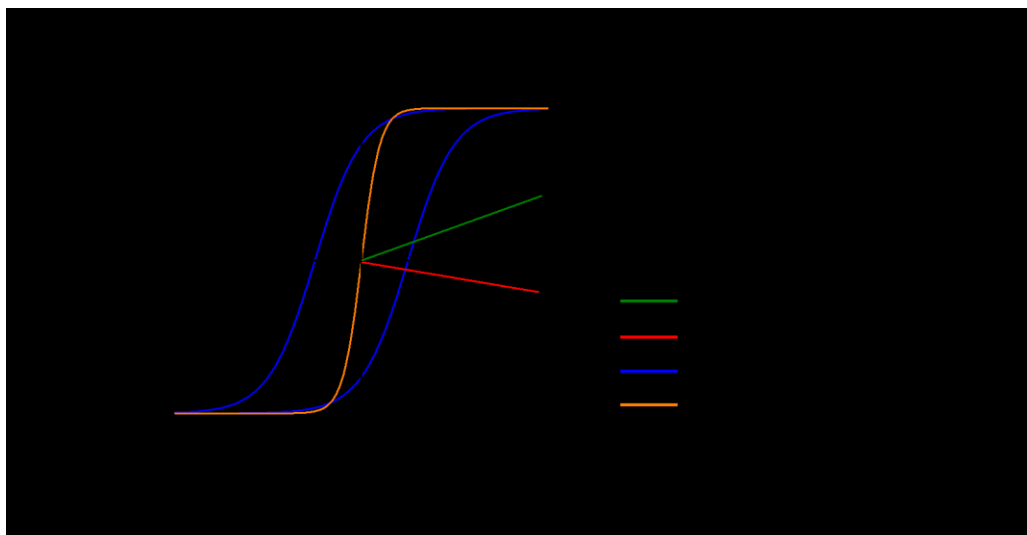


Figura 6.3. Ciclo de histéresis de un material magnético de acuerdo al tipo de comportamiento.

Los sistemas nanoestructurados con comportamiento superparamagnético se caracterizan por presentar una magnetización remanente muy baja, por lo que no se generan interacciones magnéticas entre las partículas que puedan incidir en su aglomeración. El fenómeno del superparamagnetismo ha generado un creciente interés en aplicaciones biotecnológicas, estudiándose su interacción e incorporación en sistemas biológicos [23], [25], [26], [43]. La respuesta magnética del material frente a un estímulo externo también puede ser aprovechada para la formación de imágenes utilizando el material como agente de contraste para las imágenes por resonancia magnética [32],[21], [25], [173], [179], así como para producir un aumento local de la temperatura lo que permite la liberación de fármacos y la hipertermia localizada [37], [40]. Por lo anterior la síntesis de nanopartículas magnéticas, que presenten una elevada biocompatibilidad y que puedan interactuar específicamente con ciertos tejidos, se vuelve de elevado interés, utilizándose sistemas biomoleculares, como aminoácidos y proteínas que otorguen un elevado control sobre la distribución de tamaño de las nanopartículas, biocompatibilidad y una fácil la modificación superficial.

6.1. Introducción

Con el objetivo de obtener nanopartículas magnéticas basadas en los óxidos de hierro en la cavidad de la proteína se evaluaron dos rutas que permitieran obtener óxidos de hierro con una elevada magnetización de saturación (M_s), minimizando el campo coercitivo (H_c) y la magnetización remanente (M_R), en vistas a obtener un material superparamagnético. Una de las rutas está basada en lo reportado por Gálvez y su grupo [81], donde la remoción controlada de los óxidos de hierro permite obtener magnetita (Fe_3O_4) en bajo contenido de hierro (200 Fe/Ft). Otra ruta evaluada es la síntesis de nanopartículas magnéticas en la cavidad, por medio de la carga y oxidación controlada del hierro. Se han reportado diversos trabajos en que añaden Fe^{+2} y un agente oxidante como H_2O_2 estequiométricamente para obtener óxidos de hierro magnéticos en la ferritina, presentándose como magnetoferritina [88], [89], [120], [180].

6.2 Remoción controlada de los óxidos de hierro

Con el propósito de obtener ferritinas con un núcleo superparamagnético se realizó la remoción controlada de los óxidos de hierro basado en lo reportado por Gálvez y su grupo [81]. En dicho trabajo se plantea que la ferritina posee un núcleo de óxidos de hierro polimórficos, donde el tipo de óxido depende del nivel de llenado, a bajo nivel de llenado (200 Fe/Ft), la presencia de magnetita es cercana al 60% del total de los óxidos, seguido por ferrihidrita y hematita. Siguiendo esta línea, se estableció un procedimiento que permite obtener la proteína con un contenido de hierro gradualmente más bajo, en vistas de obtener un núcleo de óxidos con preponderancia de magnetita.

El procedimiento para la remoción controlada es una modificación del método de reducción por TGA al 10% realizada a pH 4,5 y asistida por EDTA, reportado en el Capítulo 4. La remoción controlada requiere que la adición del agente reductor sea realizada en sucesivas alícuotas de baja concentración (1%) añadidas estequiométricamente, posteriormente se realiza la adición del agente quelante, la diálisis y finalmente la centrifugación, figura 6.4. La remoción controlada es realizada para estimaciones teóricas de 400, 200, y <50 Fe/Ft, esta última corresponde a apoferritina para efectos prácticos. El parámetro más importante para este tipo de muestras es el contenido de hierro, que como se ha visto previamente, determina las propiedades ópticas y magnéticas que presenta la ferritina. El contenido de hierro fue determinado mediante el ensayo colorimétrico Fe-BiPy, las propiedades ópticas fueron evaluadas por espectroscopía UV-Vis, la integridad estructural por medio de cromatografía de exclusión de tamaño (SEC) y el comportamiento magnético por magnetometría de muestra vibrante (VSM).

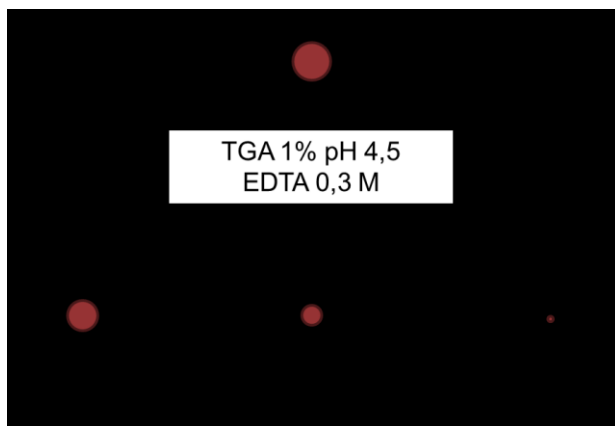


Figura 6.4. Diagrama de remoción controlada del hierro

6.2.1 Contenido de hierro y propiedades ópticas

La cuantificación del contenido de hierro por molécula de proteína indica que el procedimiento de remoción mediante alícuotas de TGA de baja concentración permite obtener ferritinas con un contenido gradualmente más bajo de hierro, obteniéndose ferritinas con una relación Fe/Ft cercanas a las estimadas teóricamente, tabla 6.1.

Parámetro	Muestra			
	HSF	400	200	<50
Fe/Ft	820±2%	420±10%	250±40%	<50
mg muestra	4	1,6	2	1,4

Tabla 6.1. Valores de contenido de hierro en muestras de remoción controlada.

La reducción de Fe⁺³ a Fe⁺² y su posterior remoción se halla gobernada por la acción del agente reductor, este proceso puede ser controlado estequiométricamente para obtener ferritinas con un contenido de hierro determinado. El control para la remoción específica de hierro es realizado mediante adiciones de baja concentración de TGA y agitación, cada alícuota permite ir reduciendo de manera paulatina a Fe⁺² hasta un valor cercano al estimado teóricamente, posteriormente el Fe⁺² es quelado por la adición en exceso del quelante EDTA y removido mediante diálisis.

Las diferencias en el contenido de hierro pueden ser observadas en los espectros de absorbancia de las respectivas muestras, figura 6.5. Los espectros revelan una disminución gradual en la absorbancia en el rango visible y a 280 nm, absorbancias que son dependientes del contenido de hierro presente en la cavidad de la proteína. Producto de la remoción del hierro en la proteína se generan cambios en la geometría de los sitios catalíticos, exponiendo en distinto

grado residuos de los aminoácidos His, Glu, Gln y Asp, lo que se ve representado en los espectros de absorbancia con el corrimiento de la posición y modificación de la absorbancia correspondiente al enlace peptídico y la absorbancia de los aminoácidos aromáticos a 216 y 280 nm respectivamente[181], [182]. Por consiguiente, los cambios en la $A_{280\text{nm}}$ se pueden atribuir principalmente a la contribución producida por los cambios en el plegamiento de los sitios de ferroxidasa.

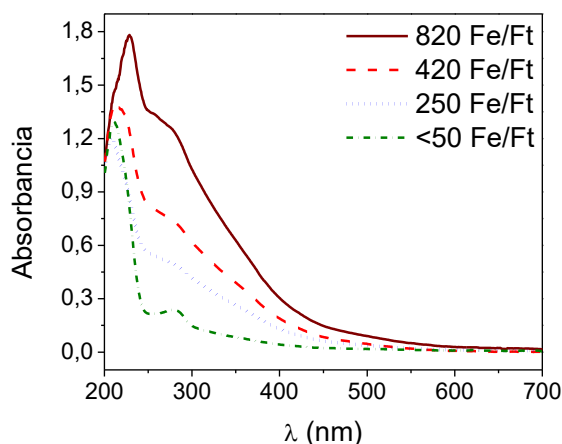


Figura 6.5. Espectros de absorción de muestras por remoción controlada de hierro.

6.2.2 Integridad estructural

En la figura 6.6 se presenta la caracterización de la integridad estructural por SEC, los cromatogramas indican que las muestras con un contenido de hierro superior a 50 Fe/Ft presentan la coexistencia de agregados y monómeros de la proteína, también se observa un progresivo aumento en la intensidad detectada ($A_{280\text{ nm}}$) en la elución correspondiente a los agregados de la proteína en función del contenido de hierro. Estos resultados corroboran que la formación de

6.2 Remoción controlada de los óxidos de hierro

agregados guarda relación con el contenido de hierro, iniciando cambios en la distribución de cargas eléctricas, lo que modifica su potencial superficial y por tanto en las interacciones electrostáticas entre la proteína. El cambio en la carga eléctrica neta de la proteína producto del contenido de hierro ha sido reportado por Welch y su grupo como una diferencia en las movilidades electroforéticas de las especies oligoméricas de la ferritina[183].

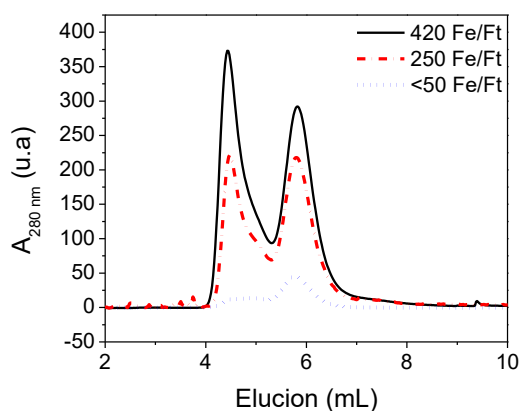


Figura 6.6. Cromatogramas de exclusión de tamaño de muestras por remoción controlada de hierro.

6.2.2 Propiedades magnéticas

Con el propósito de obtener ferritinas que presenten un comportamiento superparamagnético se evaluaron las propiedades magnéticas de las muestras mediante un magnetómetro de muestra vibrante (VSM), analizando su magnetización frente a un campo magnético externo a una temperatura de 5K.

Al analizar las curvas de histéresis presentadas en la figura 6.7 se observa que el valor de la magnetización de saturación (M_s) varía en proporción al contenido de hierro. Por otro lado, las muestras con un contenido de hierro superior a 50 Fe/Ft no presentan diferencias considerables en los valores de remanencia (M_R)

y campo coercitivo (H_c). Estos resultados implican que la disminución en la M_s se puede atribuir exclusivamente al contenido de hierro y no a un cambio en el tipo de óxido de hierro presente. Como se discutió previamente en el Capítulo 3, la ferritina de bazo de caballo utilizada presenta una mezcla de óxidos de hierro, principalmente hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) y ferrihidrita (FeOOH) con un comportamiento antiferromagnético y la magnetización observada viene dada por los momentos magnéticos sin compensar de la superficie del núcleo de óxidos de hierro.

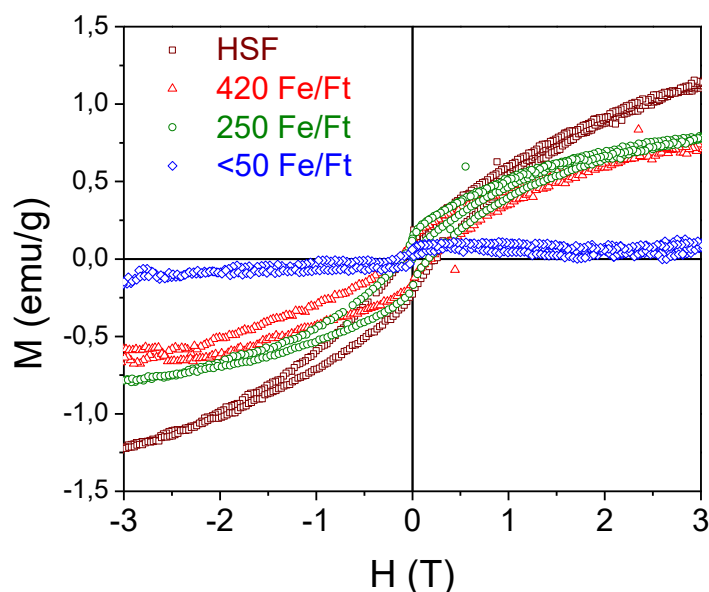


Figura 6.7. Curvas de histéresis de muestras por remoción controlada. HSF: Ferritina de bazo de caballo con 820 Fe/Ft.

Los resultados de magnetización establecen que la ruta de remoción controlada no permite obtener óxidos de hierro superparamagnéticos. Por el contrario, se conserva el comportamiento antiferromagnético y con menores valores de magnetización de saturación. Por consiguiente, esta ruta es descartada para la obtención de ferritinas superparamagnéticas, evaluándose a continuación el procedimiento de carga y oxidación controlada de hierro.

6.3 Carga y oxidación controlada de hierro

Los diversos óxidos en la proteína son generados por los sitios catalíticos que oxidan de Fe^{+2} a Fe^{+3} utilizando el O_2 disponible en el medio acuoso, para posteriormente almacenar el Fe^{+3} en forma de oxihidróxidos. El proceso de oxidación del hierro puede ser controlado para favorecer la formación de óxidos ferromagnéticos como magnetita (Fe_3O_4) o maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Esto es posible de realizar mediante la adición y oxidación controlada de Fe^{+2} en condiciones de pH y temperatura distintas a las normales de funcionamiento de la proteína.

Con el propósito de obtener óxidos de hierro superparamagnéticos en la cavidad de la ferritina, se evaluaron diversas condiciones de temperatura y pH y su efecto en las propiedades magnéticas resultantes, buscando obtener una elevada magnetización de saturación, baja magnetización remanente y elevada recuperación de proteína.

La síntesis de óxidos de hierro magnéticos en la cavidad de la ferritina se encuentra reportado por diversos autores[88]–[90], [120], los que modifican condiciones como buffer, agente oxidante, pH y temperatura. En estos casos, el proceso de oxidación controlada requiere la remoción del O_2 presente en el medio acuoso por medio del burbujeo de N_2 o Ar, para que posteriormente la oxidación del hierro sea realizada por la adición de un agente oxidante. En dichos trabajos se estudia principalmente el comportamiento magnético de la proteína cargada con hierro y el tamaño del núcleo. Por otro lado, la recuperación de proteína es un factor no considerado en esos estudios.

A partir de estos antecedentes, se realizó la síntesis de óxidos de hierro en la cavidad de la proteína en base a lo reportado por Lassila [184]. El proceso de carga y oxidación involucra calentar la solución buffer a pH 8 con apoferritina a 60°C bajo burbujeo de N_2 para luego añadir alícuotas controladas de Fe^{+2} y H_2O_2 ,

como fuente de hierro y agente oxidante respectivamente. Posteriormente se deja reaccionar por 10 minutos, manteniendo las condiciones de temperatura y burbujeo de N_2 . Luego se añade EDTA para quelar el hierro que eventualmente no haya sido incorporado a la proteína, se centrifuga y dializa para remover otros iones y complejos presentes en la solución, obteniéndose finalmente la proteína con óxidos de hierro, figura 6.8.

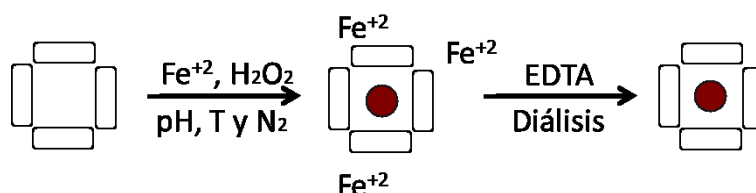


Figura 6.8. Esquema de la carga y oxidación controlada de hierro en la cavidad de ferritina.

Se prepararon las muestras por duplicado partiendo siempre desde apoferritina. La adición de hierro se realizó con dos estimaciones teóricas de 1600 y 800 Fe/Ft, esta última cantidad es similar a la ferritina de partida (HSF) de 820 Fe/Ft. En el siguiente estudio se determina la cantidad de hierro incorporado mediante la cuantificación de hierro por el método colorimétrico de Fe-BiPy y la proteína es cuantificada por el método BCA. Las muestras fueron secadas por liofilización para posteriormente caracterizar sus propiedades magnéticas por medio de un magnetómetro SQUID. Con el propósito de estudiar la eficiencia del proceso de síntesis de óxidos de hierro se evaluaron tres parámetros: 1) la recuperación de proteína, 2) la eficiencia de carga de hierro y 3) el comportamiento magnético.

El procedimiento experimental de carga con hierro fue realizado por tres rutas distintas. Inicialmente carga y oxidación controlada se realizó a $60^{\circ}C$ y pH 8. Debido a la baja recuperación de proteína se modificó la temperatura del proceso. Una segunda ruta de carga y oxidación fue realizada a $50^{\circ}C$ y pH 8, obteniéndose

6.3 Carga y oxidación controlada de hierro

una mejor recuperación de proteína pero menores valores de magnetización de saturación, y finalmente la tercera ruta evaluó la síntesis a 50°C y pH 9, obteniéndose óptimos resultados.

6.3.1 Recuperación de proteína y contenido de hierro

Un aspecto muy importante a considerar es la recuperación de proteína es este proceso, lo que incide principalmente en la cantidad de muestra resultante para las respectivas caracterizaciones. Los resultados de recuperación de proteína y carga de hierro presentados en la tabla 6.2 muestran que la síntesis de los óxidos de hierro utilizando una temperatura de 60°C ejerce un fuerte efecto sobre la estabilidad estructural de la ferritina, induciendo una pérdida considerable de proteína. Por otro lado, la incorporación del hierro en la ferritina depende de las condiciones de temperatura y pH. Estos resultados demuestran que la estructura cuaternaria de la proteína se ve afectada en distinto grado por las condiciones de síntesis.

Parámetro		Resultado		
T (°C)	pH	Rec Prt (%)	Fe/Ft	Efic carg (%)
60	8	25	1100±14%	70
60	8	30	550±18%	63
50	8	65	1350±7%	84
50	8	72	700±21%	88
50	9	60	1250±8%	75
50	9	68	650±8%	70

Tabla 6.2. Valores de recuperación de proteína, contenido de hierro (Fe/Ft) y eficiencia de carga.

Las muestras sintetizadas bajo las condiciones de 60°C y pH 8 presentan una baja recuperación de proteína, con valores cercanos al 30%. La elevada pérdida de proteína es atribuida al efecto de la temperatura del proceso, la que genera regiones de inestabilidad local en las interacciones de las subunidades peptídicas y por tanto en el plegamiento que da la forma tridimensional a la proteína[185], considerando que la ferritina es capaz de conservar su estructura tridimensional hasta 70-80°C [71], [79]. Sin embargo, Liu y su grupo han reportado que temperaturas cercanas a los 60°C afectan la estructura cuaternaria de la ferritina, generando una pérdida parcial de la proteína[186]. La baja recuperación de proteína incide en la obtención de una muestra con un peso cercano a 1 mg seco, lo que dificulta considerablemente las mediciones magnéticas.

Con el propósito de mejorar la tasa de recuperación de proteína se modificaron las condiciones de síntesis, realizando el segundo procedimiento a 50°C y pH 8. Estos ensayos presentan una recuperación de proteína cercana al 70%, tasa de recuperación que se halla dentro de los valores promedio de recuperación de proteína durante el desarrollo de esta tesis. Por consiguiente, la modificación de temperatura permite mejorar la recuperación de proteína, obteniéndose finalmente una mayor cantidad de muestra, con una cantidad aproximada de 3 mg de muestra seca, lo que facilita las consiguientes mediciones de magnetización.

Por otro lado, el pH al cual la ferritina es expuesta durante el proceso de carga y oxidación controlada incide en menor grado en la recuperación de proteína, efecto que se ve representado en la recuperación de proteína promedio de las muestras tratadas a 50°C y pH 9 con respecto a las muestras obtenidas a la misma temperatura y pH 8, con una tasa promedio de valores que son aceptables para la manipulación de la ferritina.

6.3 Carga y oxidación controlada de hierro

Temperaturas y pH lejanos a las condiciones normales de funcionamiento de la ferritina afectan las interacciones y el plegamiento de las cadenas peptídicas que la conforman así como con los iones de hierro que son incorporados. La incorporación del hierro a la proteína consiste en tres etapas consecutivas: 1) la incorporación del Fe^{+2} por los canales y su transporte en la cavidad, 2) la oxidación a Fe^{+3} en los sitios de ferroxidasa y finalmente 3) su fijación en sitios de nucleación.

La primera etapa es el paso de los iones de Fe^{+2} a través de los canales hacia la cavidad, donde cada átomo de Fe^{+2} se une a tres residuos carboxilatos de los aminoácidos ácido glutámico y aspártico, los que en general presentan una elevada conservación estructural por lo que no se hallan afectados por condiciones de pH y temperatura dentro del rango de estabilidad de la proteína[187]. La siguiente etapa es la oxidación, la cual está controlada por la geometría del sitio de ferroxidasa. Comúnmente, la proteína se une a dos iones de Fe^{+2} para oxidarlos utilizando O_2 disponible en el medio acuoso, dando origen al complejo de ferroxidasa (proteína- $[\text{Fe}_2\text{O}(\text{OH})_2]^{+2}$ [188], ecuación 6.3.



El complejo ferroxidasa interactúa por cargas eléctricas de los ligandos de glutamato del centro catalítico, los que sí son sensibles al pH local del medio[100],[189], incidiendo en otros tipos de interacciones como puentes de hidrógeno o fuerzas de van der Waals. Estas interacciones afectan el plegamiento y por tanto la geometría del centro catalítico [182], [188]. Es por lo tanto que la etapa de oxidación es el paso más susceptible de verse afectado por las condiciones de pH y temperatura durante el proceso de incorporación de

hierro en la proteína, lo que finalmente se ve reflejado en los valores de la eficiencia de carga.

La etapa de nucleación y formación de óxidos de hierro en la cavidad de la proteína es sensible a la presencia de diversos iones así como del Fe^{+3} que es guiado a los sitios de nucleación que posee la proteína. La existencia de diversos sistemas moleculares intermediarios en el proceso de nucleación así como la hidrólisis de los complejos de Fe^{+3} , dan paso a la estabilización del núcleo de óxidos de hierro, el que depende principalmente de la cantidad de hierro incorporado[181], seguido por el tipo de buffer utilizado[190].

Finalmente, estos tres pasos inciden en distinto grado en el proceso de incorporación de hierro. El bajo valor comparativo en la eficiencia de carga para las muestras sintetizadas a 60°C , tabla 6.2, puede ser atribuido a cambios en el plegamiento local de los aminoácidos de los sitios catalíticos de la ferritina producto del efecto térmico. La capacidad catalítica de las enzimas depende de la geometría del sitio activo que aloja al sustrato, por lo tanto, cambios en dicha geometría afectan el proceso de oxidación de Fe^{+2} a Fe^{+3} y su posterior almacenamiento en forma de óxido, efecto que también se ve representado en la recuperación de proteína.

En comparación con la eficiencia de carga de las muestras sintetizadas a 60°C , las muestras sintetizadas a 50°C presentan un mayor contenido de hierro. Esto es debido a que la proteína incorpora y cataliza la oxidación del hierro a temperatura corporal (37°C), por lo tanto, la exposición de la proteína a condiciones cercanas a las fisiológicas de trabajo favorecen sus funciones, pero no son condiciones óptimas para la síntesis de óxidos de hierro magnéticos[191], [192].

6.3 Carga y oxidación controlada de hierro

La síntesis de óxidos de hierro depende fuertemente del pH del proceso, esto se ve representado por el diagrama de Pourbaix, el que relaciona el tipo de óxido de hierro en función del pH y del potencial redox, figura 6.9. De este diagrama se desprende que la formación de magnetita se ve favorecida en condiciones de pH superior a 9 y que existe una amplia gama de óxidos de hierro de composición general Fe_2O_3 que se pueden formar desde pH 4.

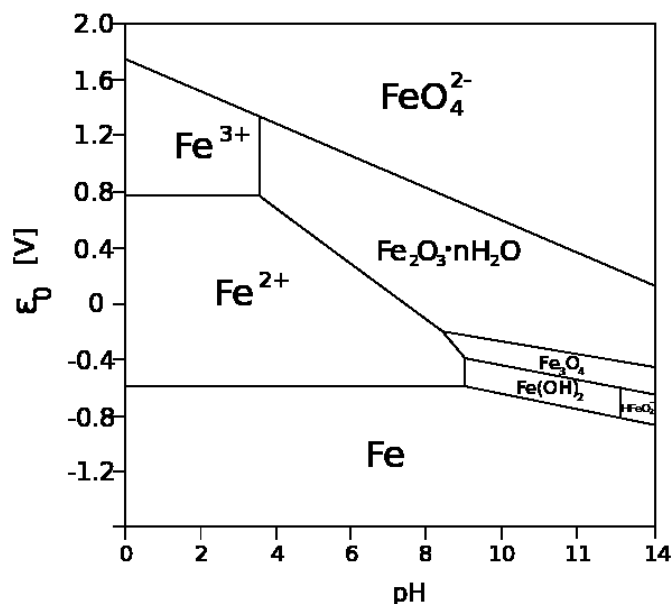
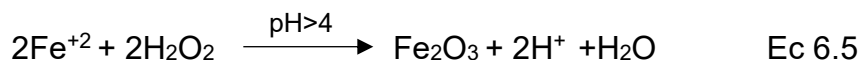
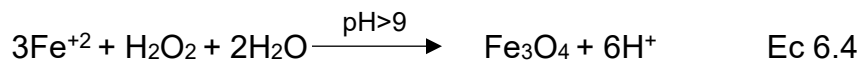


Figura 6.9. Diagrama de Pourbaix del hierro

El pH al cual es realizada la oxidación controlada mediante H_2O_2 incide directamente sobre el tipo de óxido que es generado así como también la cantidad de protones (H^+) que se generan producto de la reacción, esto último incide en el plegamiento local de la proteína. En este caso la reacción global de oxidación del Fe^{+2} realizado por el H_2O_2 viene dado por las ecuaciones 6.4 y 6.5.



6.3.2 Propiedades magnéticas

Como se discutió anteriormente, el proceso de oxidación por parte de la proteína es el paso más sensible a las condiciones de síntesis, ya que afectan el plegamiento y geometría de los sitios catalíticos. Esto implica que la oxidación del hierro puede ocurrir parcialmente, quedando iones de Fe^{+2} sin ser oxidados, que posteriormente forman parte de la estructura cristalina que se forma en los sitios de nucleación, y por tanto la formación de óxidos de hierro polimórficos. Este proceso de oxidación se halla limitado por la cantidad de O_2 disponible en el medio, el que se encuentra controlado por la descomposición del H_2O_2 que es añadido estequiométricamente para oxidar parcialmente los iones de Fe^{+2} añadidos a la solución con la proteína.

Los resultados de magnetización de las muestras preparadas utilizando las tres condiciones se encuentran representados en la figura 6.10. En la figura se observa que las muestras con menor contenido de hierro, dentro de sus respectivos parámetros de ensayo, presentan menores valores de M_s , lo que viene dado por el momento magnético total que aporta el hierro. Este tipo de muestras también presenta mayores valores de M_R y H_c . En particular, las muestras obtenidas bajo las condiciones de 50°C y pH 8 presentan valores de M_s comparativamente menores a las obtenidas a 60°C , considerando que presentan un mayor contenido de hierro. Debido a los bajos valores de M_s y

6.3 Carga y oxidación controlada de hierro

elevada M_R que presentan las muestras obtenidas a 50 ° C y pH 8, se plantearon nuevas condiciones de síntesis, conservando la temperatura de 50°C y pH 9, evaluando su efecto sobre las propiedades magnéticas. Producto de la modificación de pH se obtuvieron muestras con valores de M_S cercanos a los obtenidos a 60°C y pH 8, optimizando la recuperación de proteína, la M_S y M_R .

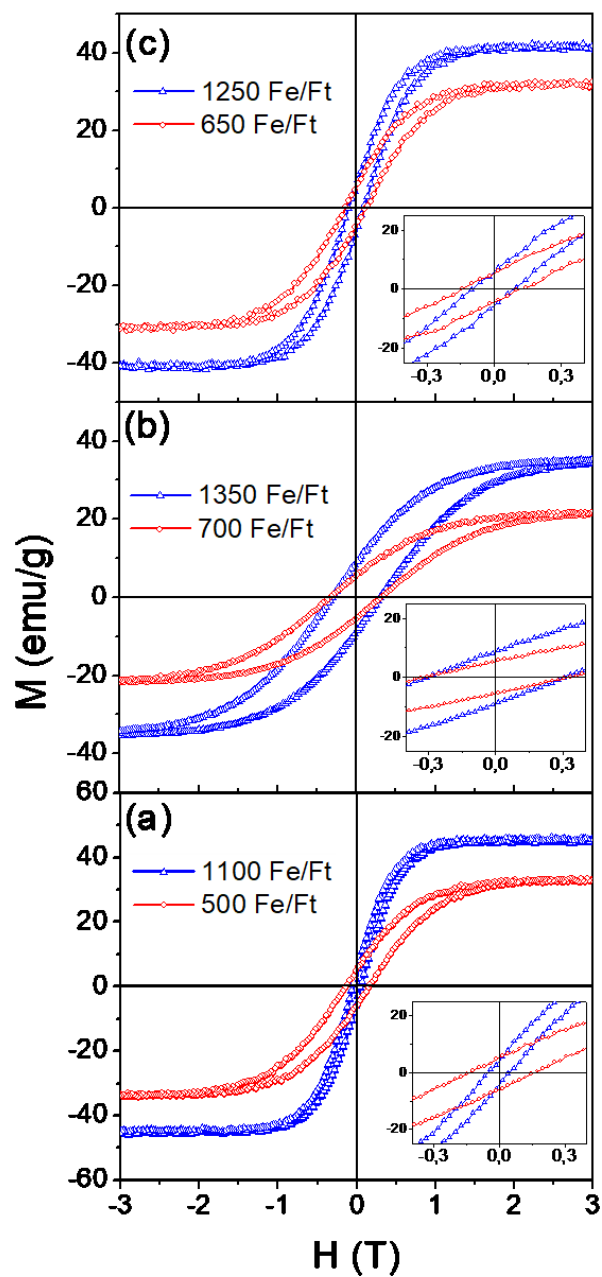


Figura 6.10 Curvas de magnetización de muestras con oxidación controlada bajo distintas condiciones de síntesis: (a) 60°C y pH 8, (b) 50°C y pH 8 y (c) 50°C y pH 9.

6.3 Carga y oxidación controlada de hierro

Diversas nanopartículas de óxidos de hierro con dimensiones entre 5 y 10 nm (valores cercanos al tamaño de la cavidad de la proteína), se han reportado que presentan diferentes valores de magnetización de saturación (M_s), existiendo magnitudes no nulas de remanencia (M_R) y coercitividad (H_c) que permiten establecer un comportamiento superparamagnético para los óxidos magnetita y maghemita, tabla 6.3.

d (nm)	M_s (emu/g)	M_R (emu/g)	H_c (T)	Tipo de óxido	Ref
5	75	19	-	Fe_3O_4	[193]
5	59	13	-	$\gamma-Fe_2O_3$	[193]
5,4	45	-	0,22	Fe_3O_4	[194]
10	63	0,5	0,02	Fe_3O_4/Fe_2O_3	[193]
10	45	-	-	Fe_3O_4	[195]
11	46	13	0,4	$\gamma-Fe_2O_3$	[196]

Tabla 6.3. Valores comparativos de magnetización de saturación (M_s), remanencia (M_s) y campo coercitivo (H_c) para nanopartículas de óxidos de hierro con distintos diámetros.

El fenómeno de superparamagnetismo no está dado exclusivamente para nanopartículas de Fe_3O_4 , también se ha reportado para el caso de nanopartículas de $\gamma-Fe_3O_2$. Por lo tanto, el superparamagnetismo está dado principalmente por un efecto de tamaño, presentándose generalmente en nanopartículas con dimensiones inferiores a los 20 nm.

Considerando los valores de saturación, remanencia y coercitividad de las muestras obtenidas bajo las condiciones de 50°C y pH 9 (figura 6.10c), y los valores de la tabla 6.3, es posible establecer que el comportamiento magnético que presentan estas muestras se ajusta al superparamagnetismo reportado.

La existencia de magnetización remanente y coercitividad en las muestras puede ser atribuida a la existencia de óxidos de Fe^{+3} como maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) o hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) que presentan un comportamiento ferrimagnético y ferromagnético débil respectivamente. Es por tanto, que la mayor remanencia y coercitividad que presentan las muestras con menor contenido de hierro puede ser atribuida a la existencia mayoritaria de óxidos de Fe^{+3} por sobre Fe^{+2} , debido a dos posibles efectos: 1) la oxidación catalítica es más susceptible de realizarse a bajas cantidades de hierro[181], [197], [198] y 2) la oxidación superficial espontánea que presentan las nanopartículas con óxidos de Fe^{+2} [199].

De los resultados se observa que a mayor incorporación de hierro existe una mayor magnetización de saturación y menor remanencia, por lo que no todo el Fe^{+2} incorporado es oxidado a Fe^{+3} . Este fenómeno ha sido reportado como una mezcla de distinta proporción de magnetita/maghemita ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) que depende del contenido de hierro[120]. Dados estos antecedentes, se conjetura la formación de una mezcla de óxidos de hierro en la cavidad de la ferritina, donde las condiciones evaluadas inciden en la relación $\text{Fe}_3\text{O}_4/\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, y por tanto en el comportamiento magnético que presentan las muestra.

6.3.2 Estudio de la composición

A partir de los resultados de magnetización se conjetura que la carga y oxidación controlada del hierro generan una mezcla de óxidos, donde las condiciones de síntesis inciden en la proporción de los óxidos magnetita (Fe_3O_4) y maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$).

6.3 Carga y oxidación controlada de hierro

Fe₂O₃) o hematita (α -Fe₂O₃). Estos resultados sugieren que a menor contenido de hierro la oxidación de Fe⁺² a Fe⁺³ es más susceptible de realizarse generando una capa de óxidos de Fe⁺³, lo que explica los mayores valores de remanencia (M_R) y coercitividad (H_C) en este tipo de muestras. Por este motivo es necesario conocer los estados de oxidación del hierro en las muestras con menor y mayor contenido de hierro bajo las mismas condiciones de síntesis, lo que se relaciona con las propiedades magnéticas observadas.

Con el objeto de conocer la proporción de Fe⁺² y Fe⁺³ del núcleo de óxidos de hierro en las muestras de carga y oxidación controlada se caracterizaron las muestras obtenidas a 50°C y pH 9 mediante XPS de alta resolución erosionando previamente la muestra para remover la capa orgánica de la proteína. Esto permite conocer los distintos estados de oxidación que presenta el hierro en la muestra y cuál es la proporción entre estos, estos resultados se relacionan con la existencia de Fe₃O₄ y Fe₂O₃ mediante el ajuste de curvas.

En la figura 6.11a se presenta el ajuste del espectro de alta resolución de la señal Fe2p de la muestra con 650 Fe/Ft. El ajuste específico para la señal Fe2p_{3/2} indica que el máximo Fe 1 posee una energía de ligadura cercana a 709 eV, la que es atribuida a la presencia de Fe⁺² (FeO)[108],[159]. El máximo Fe 3 posee una energía de 711,5 eV, lo que revela la existencia de Fe⁺³ (γ -Fe₂O₃)[109]. Por otro lado se presenta el máximo Fe 2 con una energía de ligadura de 710 eV. El desplazamiento gradual de un máximo con una energía de ligadura de 709 eV a 711 eV indica una transición en el estado de oxidación de Fe⁺² a Fe⁺³, por lo tanto, la señal Fe 2 puede ser atribuida a hierro con una valencia mixta. Estos resultados sugieren que existe un proceso de oxidación superficial que genera una capa de Fe₂O₃ a expensas del FeO (Fe₃O₄).

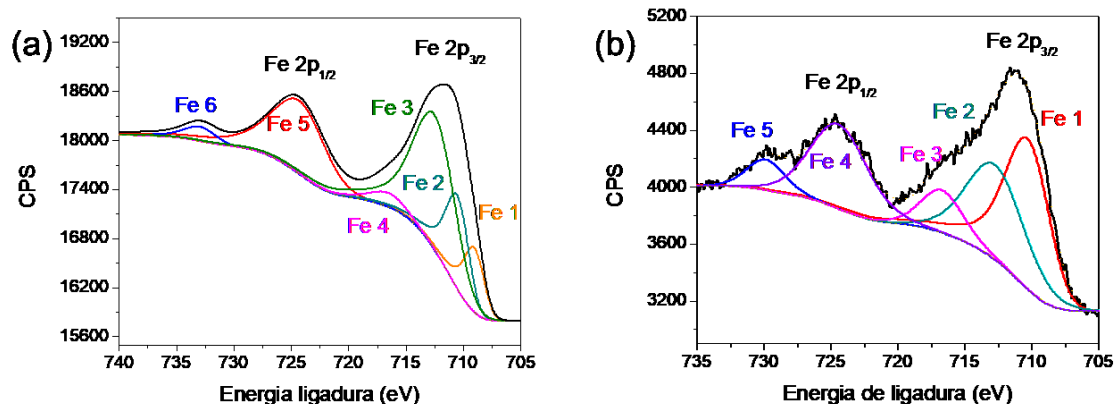


Figura 6.11. Espectros de XPS de alta resolución de la señal Fe2p de las muestras con 650 Fe/Ft (a) y 1250 Fe/Ft (b).

El ajuste de curvas de la señal Fe2p de la muestra con 1250 Fe/Ft, figura 6.11b, indica que la señal Fe2p_{3/2} posee un máximo Fe 1 a 709,4 eV, atribuido a la existencia de Fe⁺² y la señal Fe 2 con una energía de 712 eV que corresponde a la existencia de Fe⁺³ en forma de Fe₂O₃ o FeOOH[159]. El ajuste de curvas indica que existen estados de oxidación del hierro definidos, coexistiendo en forma de FeO y Fe₂O₃, sin evidenciar estados de oxidación intermedios, como lo es el caso de la muestra con menor contenido de hierro.

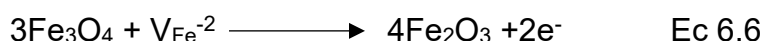
El análisis del ajuste de curvas involucrando el porcentaje de los máximos que componen la señal Fe2p_{3/2} para las muestras con 650 y 1250 Fe/Ft, tabla 6.3, establece que a menor contenido de hierro existe una preponderancia de óxidos de hierro en forma de Fe⁺³ mientras que a mayor contenido de hierro prevalece la especie de Fe⁺². Sin embargo, se debe recordar que la técnica de XPS es altamente sensible a la superficie del material a caracterizar, debido a que los fotoelectrones detectados provienen principalmente de los primeros nanómetros de la muestra, por lo tanto los espectros representan principalmente la superficie del núcleo de óxidos.

6.3 Carga y oxidación controlada de hierro

Parámetro	650 Fe/Ft			1250 Fe/Ft	
	Fe1	Fe2	Fe3	Fe1	Fe2
BE (eV)	708,7	710	711,5	709,5	712
FWHM	2	2,2	4	3,7	5,1
Atribución	Fe (II)	Fe (II,III)	Fe (III)	Fe (II)	Fe (III)
%	15	24	61	58	42

Tabla 6.4 Ajuste de curvas de la señal Fe 2p_{3/2} de XPS para muestra con 650 y 1250 Fe/Ft.

Las nanopartículas de magnetita (Fe₃O₄) pueden sufrir un proceso de oxidación pasiva en medio acuoso, donde los iones de Fe⁺² de los sitios octaédricos de la estructura de espinela inversa migran a hacia la superficie generando una vacancia (V_{Fe⁻²}). Por otro lado, el O₂ del medio difunde hacia el interior, esta contradifusión del hierro y el oxígeno en el sólido produce un cambio en el estado de oxidación del hierro y por tanto de la estructura local, ecuación 6.6, consumiéndose las vacancias (V_{Fe⁻²}) para producir Fe₂O₃ superficial [200].



Este fenómeno da origen a una capa de maghemita, cuya fracción relativa crece a expensas de la magnetita a medida que el tamaño disminuye[201], [202],[203]. El cambio químico y estructural resultante de la oxidación de Fe⁺² a Fe⁺³ en estado sólido implica que las propiedades magnéticas cambian, presentando una disminución en la Ms con similar contenido de hierro y tamaño[204].

El proceso de oxidación es más favorable cuando la proteína posee un menor contenido de hierro y considerando que los procesos de carga de la cavidad de la ferritina genera una distribución de moléculas de proteína con distinto nivel de llenado, es posible establecer que las moléculas de ferritina con menor contenido de hierro pueden presentar una preponderancia de Fe⁺³ en forma de Fe₂O₃

mientras que a mayor contenido de hierro, donde la oxidación sucede parcialmente, se genera una fracción mayoritaria de Fe^{+2} en forma de Fe_3O_4 . Estos resultados se encuentran en discrepancia con lo reportado por Gálvez y su grupo[81], los que concluyen que a bajo contenido de hierro (200 a 500 Fe/Ft) el Fe_3O_4 representa sobre el 50% de los óxidos de hierro presentes y a medida que el contenido de hierro aumenta, disminuye hasta un 30%. Es un tema de discusión que requiere de análisis más complejos como espectroscopía de pérdida de energía de electrones (EELS) y/o espectroscopia Mössbauer.

El análisis conjunto del contenido de hierro, magnetometría y XPS establece que la oxidación parcial de Fe^{+2} a Fe^{+3} es más susceptible de realizarse a bajo contenido de hierro. Este fenómeno puede ser atribuido a la acción catalítica de la proteína y la oxidación pasiva en medio acuoso, donde el cambio químico y por lo tanto estructural puede generar un sistema núcleo/capa (*core/shell*) con un núcleo de Fe_3O_4 rodeado por Fe_2O_3 . En esta línea, el núcleo de Fe_3O_4 puede presentar un comportamiento superparamagnético debido al reducido tamaño mientras que el $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ posee un comportamiento ferromagnético.

6.4 Conclusiones

1. La capacidad de incorporación del hierro en la proteína depende fuertemente de la temperatura a la cual es expuesta. Temperaturas elevadas inducen el desensamblaje parcial de las subunidades que conforman la proteína, lo que afecta su estabilidad y la conformación de los sitios catalíticos, esto finalmente incide en la recuperación de proteína y el almacenamiento del hierro.
2. El proceso de carga y oxidación controlada genera una mezcla de óxidos de hierro donde las condiciones de síntesis inciden en la relación de $\text{Fe}^{+2}/\text{Fe}^{+3}$. El pH del proceso y la cantidad de hierro incorporado son los principales factores que determinan la proporción de los óxidos generados y por tanto el comportamiento magnético que presentan. La pasivación de la superficie del núcleo de óxidos debido a la formación de la capa de Fe_2O_3 produce un comportamiento ferromagnético.
3. Las condiciones de síntesis de 50°C y pH 9 representan las condiciones óptimas para la carga y oxidación controlada del hierro, presentando una elevada recuperación de proteína y un comportamiento cercano al superparamagnetismo y serán utilizados en los sucesivos para la síntesis de óxidos de hierro magnéticos en la cavidad de la ferritina, en vistas a desarrollar posteriormente un material óptico-magnético mediante la carga mixta de oro-óxidos de hierro

CAPÍTULO 7

Carga mixta de oro-óxidos de hierro en la cavidad de la proteína ferritina

7.1 Introducción

Los nanomateriales multifuncionales han atraído significativamente la atención para potenciales aplicaciones biomédicas, como imagenología, liberación de fármacos, terapia contra el cáncer, entre otras aplicaciones. Este tipo de nanomateriales son desarrollados principalmente mediante la sinergia de dos o más nanoestructuras con diferentes funcionalidades, como puede ser fluorescencia, el plasmón de resonancia superficial y propiedades magnéticas. Dentro de esta línea los nanomateriales más investigados son las nanopartículas de oro, las que presentan actividad óptica y gran estabilidad química y los óxidos de hierro, que aportan propiedades magnéticas y se destacan por presentar la menor citotoxicidad de las nanopartículas magnéticas[205]. Existen dos rutas para la fabricación de nanomateriales multifuncionales, una de ellas es el crecimiento de uno de los componentes a partir de otro ya existente, formando un núcleo de un material rodeado por otro, morfología llamada *Core/Shell* (figura

7.1 Introducción

7.1a). Otra ruta utilizada es la unión de dos o más nanopartículas formando una sola partícula (heteroestructura), comúnmente recubierta por algún agente capante (figura 7.1b). Considerando el progreso que se ha desarrollado en la síntesis y control de este tipo de heteroestructuras, los métodos utilizados a la fecha siguen presentando inconvenientes que afectan en distinto grado su efectividad en sistemas biológicos. El crecimiento directo de dos tipos de materiales diferentes en forma de composito nanométrico requiere compatibilidad entre ellos para formar una interface estable, lo que restringe los materiales y tamaños que pueden ser incorporados[206]. Por otro lado, la unión y encapsulación de nanopartículas tiende a generar partículas grandes (100 nm a 1 μm), lo que limita sus aplicaciones en sistemas vivos[146], [206], [207].

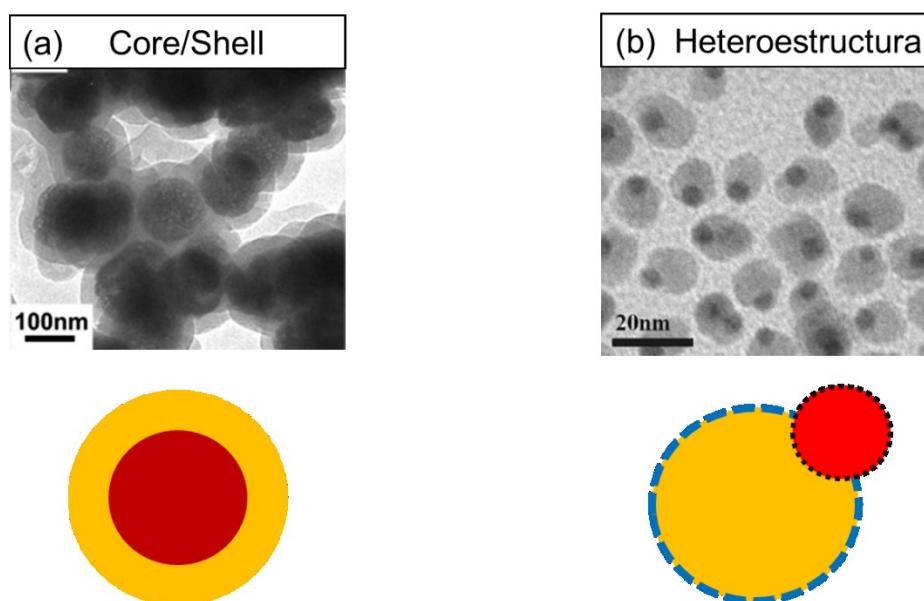


Figura 7.1. Diagrama de tipos de nanoestructuras para el desarrollo de materiales multifuncionales, sistema Core/Shell[207] (a) y heteroestructura[208] (b).

En esta línea, se han reportado diversos sistemas moleculares que actúan como mediadores entre ambos materiales, como por ejemplo ácido oleico y oleilamina [208], [209], [209], polifosfazeno[210], hidroxilamina[171], polipirrol[207], ácido

mercaptoundecanoico[211] y sílica modificada[212], entre otros. Con el propósito de obtener un material con aplicaciones biomédicas también se ha evaluado el uso del aminoácido cisteína en la síntesis de materiales bifuncionales magneto-plasmónicos[146], lo que implica utilizar sistemas biomoleculares de mayor complejidad que logren unir covalentemente ambas heteroestructuras. En consideración de estos antecedentes, el uso de proteínas para la síntesis de nanomateriales magneto-plasmónicos es una ruta no explorada. En esta tesis la proteína ferritina se presenta como una candidata de elevada versatilidad para el desarrollo de nanomateriales multifuncionales mediante la síntesis de nanoestructuras de oro y de óxidos de hierro en su cavidad.

Buscando obtener un comportamiento óptico-magnético mediante la carga mixta de oro-óxidos de hierro en la cavidad de la proteína ferritina, se plantearon dos rutas. La primera ruta consiste en sintetizar las nanoestructuras de oro en dentro de la ferritina, poseyendo la proteína con óxidos de hierro en la cavidad, mientras que la segunda ruta evalúa la síntesis óxidos de hierro magnéticos en la proteína con nanoestructuras de oro en su cavidad, figura 7.2

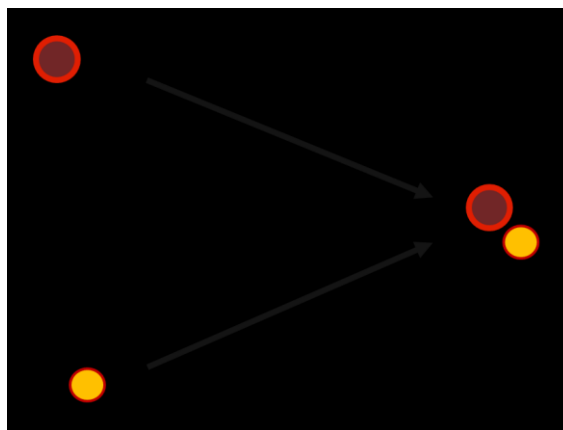


Figura 7.2. Diagrama de las rutas evaluadas para la obtención de un material óptico-magnético en la cavidad de la proteína ferritina.

Los resultados de la primera ruta evaluada indican que las reducciones sucesivas requeridas para la formación del oro metálico producen una pérdida parcial del contenido de hierro y por tanto es perjudicial para las propiedades magnéticas deseadas. La existencia de hierro en la cavidad restringe considerablemente la formación de las nanoestructuras de oro, requiriéndose un contenido de hierro cercano a 100 Fe/Ft para la síntesis de las nanopartículas. Los resultados de la evaluación de esta ruta se hallan detallados en el Anexo 5.

La segunda ruta evaluada consiste en realizar la adición y oxidación controlada del hierro a muestras de proteína con *clusters* de oro en su interior. Primeramente se sintetizaron nanoestructuras de oro en la cavidad vacía de la proteína (apoferritina). Posteriormente se sintetizan óxidos de hierro en el interior de la proteína con una estimación teórica de 1600 Fe/Ft, realizando la carga y oxidación a pH 9 y a una temperatura de 50°C, de acuerdo a las condiciones óptimas discutidas en el Capítulo 6. Estos ensayos se evaluaron mediante las propiedades ópticas por espectroscopía UV-Vis, el contenido de hierro fue determinado por el ensayo Fe-BiPy y BCA mientras que el contenido de oro por AAS. Las propiedades magnéticas fueron caracterizadas por VSM mientras que

la estructura fue analizada por TEM equipado con EDS. A continuación se presentan los resultados de la evaluación de la segunda ruta.

7.2 Propiedades ópticas y contenido de hierro y oro

En la figura 7.3 se presenta el espectro de absorbancia de apoferritina, exhibiendo las absorciones características en el UV lejano propio del enlace peptídico y los aminoácidos aromáticos, sin presentar absorción en el visible. El espectro de la muestra con *clusters* de oro presenta un incremento en A_{280} así como en todo el rango visible. Similar fenómeno se obtiene al cargar posteriormente con óxidos de hierro, presentando un incremento aún mayor en A_{280} . La absorción atribuida al enlace peptídico presenta cambios en la posición e intensidad, lo que indica posibles cambios en la geometría interna de la proteína debido a la existencia de carga en su cavidad, elemento discutido previamente en el Capítulo 6.

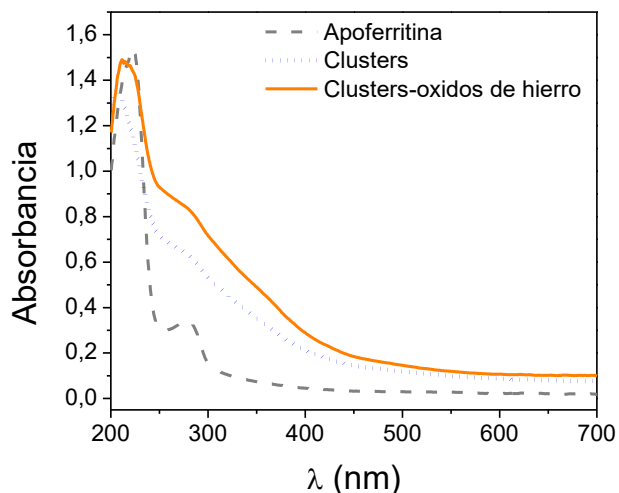


Figura 7.3. Espectros de absorción de muestras de apoferritina, proteína con *clusters* de oro y finalmente con carga mixta de *clusters*-óxidos de hierro.

La caracterización óptica de las muestras de proteína revela indirectamente la existencia de carga en la cavidad. Es por lo tanto que se determinó la cantidad de hierro mediante los ensayos Fe-BiPy y Lowry modificado para la muestra de carga mixta oro-óxidos de hierro, presentando un contenido de $600 \pm 20\%$ Fe/Ft, lo que representa una eficiencia de carga menor al 40%. Por otro lado la cuantificación del oro indica una cantidad cercana a 40 Au/Ft, lo que corresponde a la cantidad normal de átomos que conforman un *cluster* de oro.

El ensayo de carga exclusiva con hierro bajo las mismas condiciones de 50°C, pH 9 y una adición teórica de 800 Fe/Ft presenta una eficiencia de carga cercana al 70%. Las diferencias en la eficiencia de carga pueden ser atribuidas a dos posibles efectos. El primer efecto considera que la síntesis de los *clusters* de oro ocurre preferente en los sitios catalíticos de la proteína[83], [213], inhibiendo parcialmente el proceso de oxidación catalítica del hierro y por tanto en su incorporación y almacenamiento en forma de óxido.

Otro posible efecto que incide en el grado de incorporación del hierro es el espacio disponible para su almacenamiento, el que se encuentra restringido por la existencia de los *clusters* de oro. El análisis de distribución de tamaños a partir de las imágenes de TEM de la muestra con *clusters* (Figura 5.14) indica que estos poseen un diámetro promedio de 2 nm. Por otro lado la proteína posee una cavidad de 7-8 nm y por lo tanto la existencia de *clusters* deja un espacio disponible para la incorporación del hierro cercano a los 5 nm. Dado que la formación de las nanoestructuras de oro no es un proceso homogéneo, existe una cantidad indeterminada de proteína que no posee nanoestructuras de oro en su cavidad, quedando completamente libres para la incorporación del hierro.

El tamaño del núcleo de óxidos de hierro presenta una relación no lineal con respecto a la cantidad de hierro presente. Esto puede ser cuantificado a través de la cantidad aproximada de átomos de hierro por unidad de volumen (Fe/nm^3). Para una relación lineal entre el contenido de hierro y el tamaño de partícula, el parámetro Fe/nm^3 debe presentar valores cercanos, mientras que para relaciones no lineales, los valores de dicho parámetro difieren considerablemente. En la tabla 7.1 se presenta una comparación entre los valores de cantidad de hierro y el tamaño de partícula reportado por diversos autores y los obtenidos en el desarrollo de la presente tesis.

Fe/Ft	d (nm)	Fe/nm ³	Ref.
820*	5,5±1	35	-
1000	5,9±1,3	37	[93]
1000	7,5±1,3	23	[120]
1200	5,9±0,9	44	[81]
3000	5,5±0,9	126	[93]
3000	8,4±1	54	[93]

Tabla 7.1. Valores comparativos de contenido de hierro (Fe/Ft), diámetro de partícula y relación de átomos de hierro por nanómetro cúbico (Fe/nm^3). * HSF.

7.2 Propiedades ópticas, contenido de hierro y oro

En la tabla 7.1 se presenta el caso de la proteína cargada con 820 y 1000 Fe/Ft, cuyos núcleos de óxidos de hierro poseen un similar tamaño, y por lo tanto la misma relación Fe/nm^3 aproximada. Considerando estos antecedentes, la incorporación de hierro con una capacidad de 600 Fe/Ft se encuentra dentro del límite del espacio disponible en la proteína con *clusters*.

Los valores de Fe/Ft y Fe/nm^3 son promedios, esto implica suponer que todas las moléculas de proteína poseen la misma cantidad de hierro y por lo tanto similar tamaño del núcleo. De la discusión de los Capítulos 3 (Ferritina material de partida) y Capítulo 5 (Formación de nanoestructuras de oro) se concluye que una misma muestra de proteína posee moléculas de ferritina con distinto nivel de llenado, los agregados de proteína poseen mayor cantidad de hierro comparado con el monómero, mientras que la síntesis de las nanoestructuras de oro tampoco es un proceso homogéneo. Es por lo tanto que todo proceso de carga en la proteína, ya sea hierro u oro, genera moléculas de ferritina con distinto nivel de llenado en su cavidad. Este fenómeno es posible de estudiar mediante microscopía electrónica de transmisión

7.3 Estudio por microscopía electrónica de transmisión

La caracterización por microscopía electrónica de las muestras con carga mixta de oro-óxidos de hierro fue realizada en el microscopio electrónico de transmisión (TEM) del Instituto Catalán de Nanociencias y Nanotecnología, ICN2, en Barcelona, España. La formación de las imágenes de campos oscuro fue realizada mediante la detección de los electrones dispersados a gran ángulo (*High Angle Anular Dark Field*), donde la imagen generada permite distinguir

fácilmente las diferencias en las densidades electrónicas y por tanto el tipo de material. Los materiales que poseen una mayor densidad electrónica presentan una mayor intensidad con respecto a otro de menor densidad, como es el caso del oro y el hierro.

Las imágenes de TEM en modo HAADF revelan una baja cantidad de *clusters* de oro, los que se hallan comúnmente rodeados por óxidos de hierro, figura 7.4. La figura presenta en el inserto una imagen que contiene un *cluster* de oro con óxidos de hierro, el perfil de intensidades de la imagen seleccionada (b) y su representación tridimensional (c). Estas imágenes sugieren que ambas estructuras se hallan confinadas en un espacio cercano a los 8 nm y que corresponde al tamaño de la cavidad de la proteína.

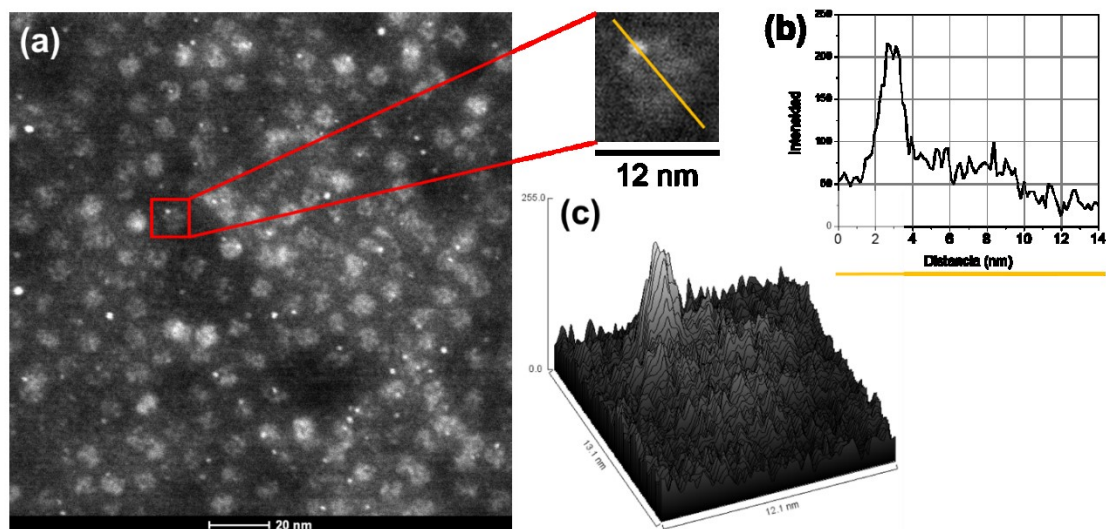


Figura 7.4. Imagen TEM de muestra de carga mixta, imagen inserta de área seleccionada de ferritina con oro y óxidos de hierro con su perfil de intensidades (b) y representación 3D (c).

La formación de los *clusters* y nanopartículas de oro no es un proceso homogéneo, como se discutió previamente en el Capítulo 5. La incorporación de

7.3 Estudio por microscopía electrónica

los iones de oro a la cavidad de la proteína se halla restringida debido a la repulsión electrostática generada entre la superficie de la proteína y los iones de AuCl_4^- . También incide el proceso de nucleación del oro, el que requiere una cantidad crítica de oro para generar núcleos termodinámicamente estables. Esto implica que existe un remanente de moléculas de proteína sin oro en su cavidad. Por otro lado, el proceso de incorporación del hierro en la proteína es un proceso mucho más favorable, ya que es la función de la proteína. El Fe^{+2} es incorporado rápidamente a través de los canales siendo transportado a los sitios catalíticos, donde es oxidado y posteriormente llevado a los sitios de nucleación y almacenado en forma de óxido. Por lo tanto, la proteína incorpora fácilmente el hierro en su cavidad, existiendo una restricción catalítica y espacial solo en las moléculas de ferritina que poseen oro en su cavidad.

Las imágenes de microscopía exhiben múltiples moléculas de proteína cargadas exclusivamente con hierro, presentando muchas de estas un centro hueco debido a que la oxidación y almacenamiento del hierro ocurren en las paredes internas de la proteína, que es donde se presentan los sitios catalíticos y de nucleación, (figura 7.5). Al analizar el perfil de intensidades de la imagen seleccionada inserta (figura 7.5b) se observa que entre las señales de mayor intensidad correspondiente al hierro existe una distancia cercana a 8 nm, valor que se ajusta al tamaño de la cavidad de la proteína. Estos resultados indican que el almacenamiento de los óxidos de hierro es convectivo, se inicia en las paredes internas de la proteína y crece progresivamente hacia interior excluyendo el agua. También es posible observar que existen moléculas de proteína con distinto nivel de carga de hierro en su cavidad, las que son morfológicamente distintas. Las imágenes sugieren que el proceso de carga de hierro genera una distribución de moléculas de ferritina con distinto nivel de llenado.

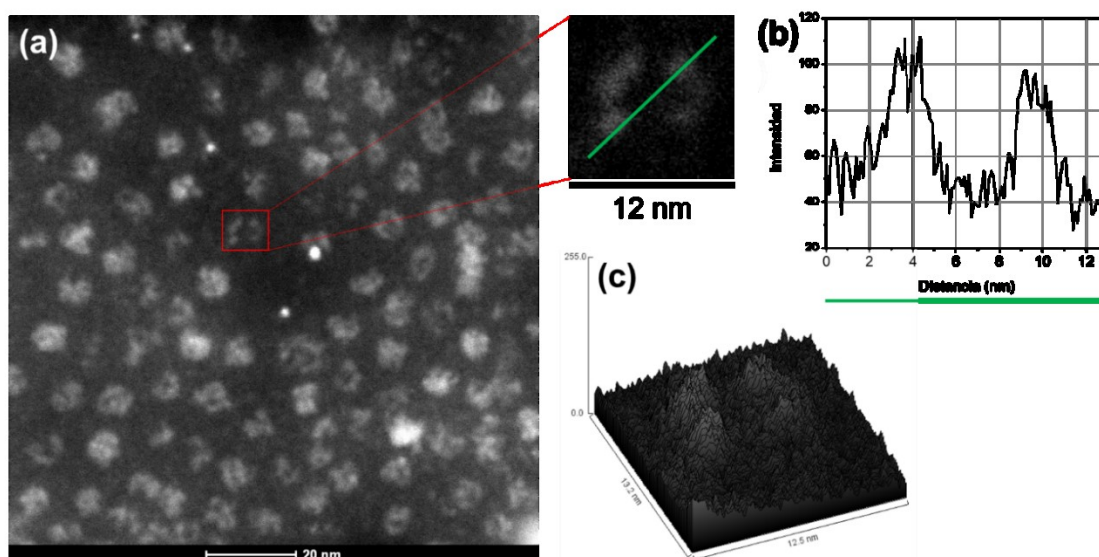


Figura 7.5. Imagen TEM de muestra de carga mixta, imagen inserta de área seleccionada de ferritina con óxidos de hierro con su perfil de intensidades (b) y representación 3D (c).

A partir de imágenes de TEM se estimaron las distribuciones de tamaño para los *clusters* de oro y los óxidos de hierro, figura 7.6. Estos resultados muestran que efectivamente los *clusters* poseen el tamaño promedio de 2 nm, lo que se relaciona con las propiedades ópticas, mientras que los óxidos poseen un tamaño de 6,5 nm. Debido a que el almacenamiento de los óxidos de hierro se genera a partir de las paredes internas de la proteína, su tamaño promedio es cercano al tamaño de la cavidad que es de 7-8 nm.

7.3 Estudio por microscopía electrónica

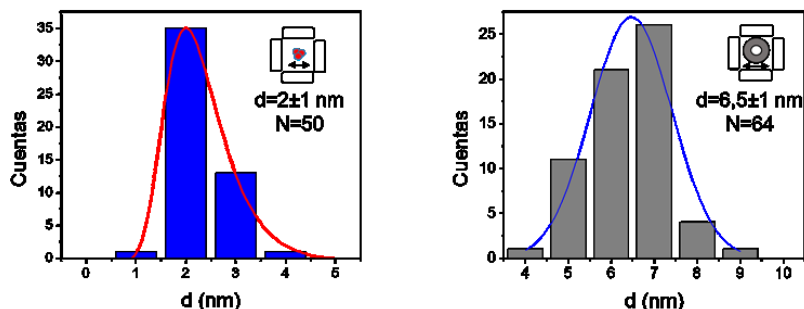


Figura 7.6. Diagramas de distribución de tamaños de *clusters* y óxidos de hierro para muestra de carga mixta.

Las diferencias de intensidades en las imágenes de microscopía son un indicador directo de la densidad electrónica del material, que se diferencian por contraste y por lo tanto es necesario realizar un análisis de la composición elemental de las muestras mediante espectroscopia de energía dispersiva de rayos X (EDS). Con el propósito de conocer la distribución espacial de los elementos se realizó un análisis de composición mediante EDS a un trazo seleccionado sobre una molécula de proteína que presente la carga mixta evaluando los rayos X característicos de la señal de Au y Fe a lo largo del trazo. La imagen 7.7 presenta el trazo realizado sobre una molécula de proteína con carga mixta de oro-óxidos de hierro. Los resultados indican que las zonas con mayor intensidad en el perfil de intensidades corresponden a la dispersión de los electrones producida por el oro, seguido por el hombro correspondiente al hierro, lo que concuerda con el perfil de EDS.

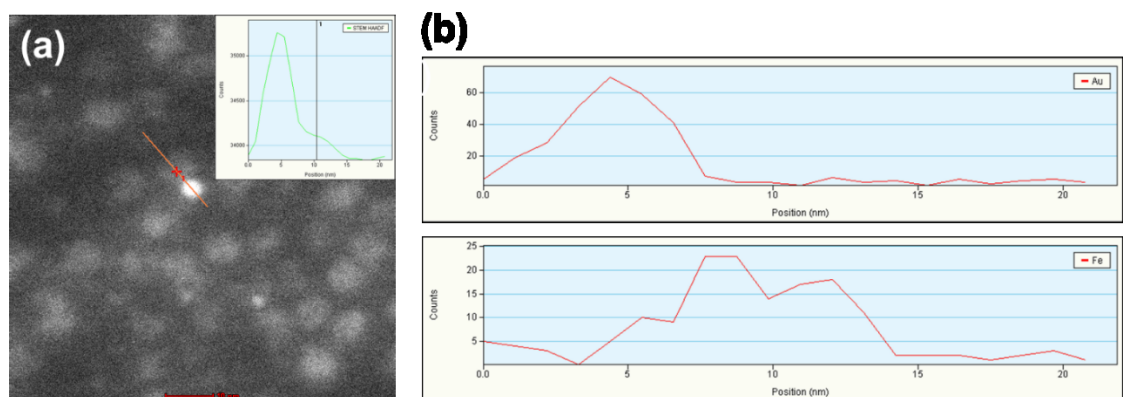


Figura 7.7 Imagen TEM con escala de 10 nm e inserto del perfil de intensidades (a). Perfiles de composición de las señales de Au y Fe para el trazo de la imagen TEM (b).

El análisis conjunto del perfil de intensidades y de las señales de EDS establece que la distancia donde ocurre la mayor dispersión de electrones producto de la densidad electrónica local de la muestra guarda relación con la composición elemental. El pico de mayor intensidad en el perfil de intensidades corresponde a la dispersión producida por el oro, seguido por el hierro. Estos resultados sugieren fuertemente que las nanoestructuras de oro se hallan confinadas junto con los óxidos de hierro en la cavidad de la proteína ferritina. Otros análisis de EDS y perfil de intensidades se hallan en el Anexo 5.

..

7.4 Propiedades magnéticas

Con el propósito de conocer las propiedades magnéticas de la muestra con carga mixta de oro-óxidos de hierro se caracterizó por VSM la muestra secada previamente por liofilización. El comportamiento magnético de la muestra de carga mixta se estudió de forma comparativa con la muestra de carga y oxidación controlada de hierro producida a 50°C y pH 9 con una carga de 650 Fe/Ft, valor de carga de hierro que es similar al presentado por la muestra de carga mixta de 600 Fe/Ft.

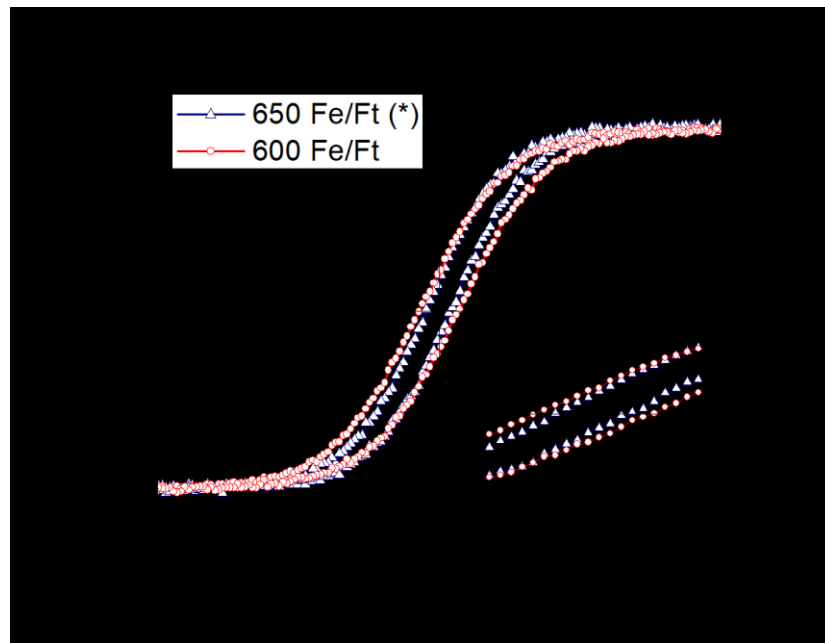


Figura 7.8 Curvas de magnetización de muestra de carga y oxidación controlada (*) y carga mixta de oro-óxidos de hierro. La imagen inserta muestra la magnetización remanente y el campo coercitivo.

Los resultados del análisis comparativo indican que la muestra de carga mixta posee una magnetización de saturación inferior a la muestra con carga exclusiva de hierro, presentando una diferencia cercana al 9%. Esta diferencia es atribuida

principalmente al aporte másico producido por los *clusters* de oro, los que presentan un comportamiento diamagnético[146], [214]. La contribución diamagnética se ve representada también en el aumento de la remanencia y la coercitividad en el análisis comparativo. De las imágenes de TEM se observa que la cantidad de moléculas de proteína con *clusters* de oro es mucho menor que las moléculas con carga de hierro. Debido a la predominancia del hierro, las propiedades magnéticas no se ven alteradas significativamente a causa de la presencia de las nanoestructuras de oro.

7.5 Conclusiones

1. Es posible obtener un material óptico-magnético mediante la carga mixta de nanoestructuras de oro y óxidos de hierro en la cavidad de ferritina, coexistiendo ambas estructuras dentro de una misma molécula de proteína. Esto implica que se ha obtenido un nanomaterial no reportado a la fecha.
2. Los *clusters* de oro afectan la generación de los óxidos de hierro, esto podría deberse a que los sitios de nucleación del oro coincidan con los sitios de actividad ferroxidasa y/o al menor espacio disponible para el almacenamiento de los óxidos, lo que finalmente incide en una baja eficiencia de carga de hierro en el proceso.
3. El proceso de almacenamiento del hierro ocurre en las paredes internas de la proteína, iniciando su crecimiento hacia el interior de manera convectiva. Es en este proceso de crecimiento que se genera una mezcla de óxidos de hierro.
4. Todo proceso de llenado de la proteína, ya sea con oro u óxidos de hierro, genera moléculas de ferritina con distinto nivel de carga en su interior.

CAPÍTULO 8

Aspectos generales y perspectivas

8.1 Aspectos generales

El presente trabajo de tesis plantea el uso la proteína ferritina para la síntesis de nuevos materiales nanométricos multifuncionales, utilizando su cavidad para realizar reacciones confinadas, lo que otorga un elevado control sobre el tamaño y la agregación de las partículas generadas.

La elevada versatilidad que presenta la proteína depende principalmente de las cadenas peptídicas que la conforman y las interacciones entre ellas. En este sentido la ferritina presenta dos aspectos de los cuales se derivan la mayoría de las discusiones de la presente tesis. Un aspecto es el armazón peptídico con unos canales específicos que permiten el paso de diversos iones hacia el interior, utilizándose como un espacio confinado para la síntesis de diversas nanoestructuras en su cavidad. Otro aspecto de interés es el plegamiento e interacciones de los sitios catalíticos y de nucleación, lo que se relaciona con las propiedades ópticas y presumiblemente con la agregación.

A continuación se plantea una discusión general enfocada principalmente en las cualidades y desempeño que presenta la ferritina como una plataforma para la síntesis de nuevos materiales en la nanoescala

Considerando los resultados obtenidos de la remoción de los óxidos de hierro, síntesis de nanoestructuras de oro, síntesis de óxidos de hierro y carga mixta de oro-óxidos de hierro se observa que todo proceso de modificación del contenido de la cavidad de la ferritina induce un cambio en el plegamiento interno de la proteína, esto puede ser debido a las diversas interacciones como puentes de hidrógeno, fuerzas electroestáticas e hidrofóbicas, entre otras, se ven afectadas como consecuencia de la movilización de diversos iones en su interior.

La modificación de la posición e intensidad de la absorbancia atribuida al enlace peptídico (~220 nm) sumado al cambio en la intensidad de la absorbancia los aminoácidos aromáticos (280 nm) sugieren cambios en el plegamiento interno de la proteína producto del proceso de carga. La carga con hierro en la proteína se inicia en los sitios catalíticos y presumiblemente la nucleación del oro también coincide con dichos sitios, modificando la geometría de estos centros. El cambio en la disposición espacial de los sitios activos expone en distinto grado residuos del aminoácido aromático triptófano que se hallan próximos a los sitios catalíticos, lo que afecta principalmente la A_{280} .

Los procesos de llenado de la cavidad, ya sean óxidos de hierro como oro, generan estructuras con tamaños nanométricos, las que comúnmente presentan absorbancia en el UV debido a transiciones electrónicas. Fenómeno que también contribuye con las variaciones en la A_{280} y que es proporcional al nivel de llenado.

El plegamiento de los sitios de ferroxidasa también pueden verse afectados por las condiciones a las cuales es expuesta la proteína, afectando las interacciones locales y por lo tanto su geometría y actividad catalítica. Esto se ve representado en la relación entre los estados de oxidación del hierro (Fe^{+2}/Fe^{+3}) producto de

8.1 Aspectos generales

las condiciones de síntesis, lo que determina las propiedades magnéticas resultantes.

Por otro lado, la síntesis de las nanopartículas de oro se inicia con la nucleación heterogénea, preferentemente en los sitios catalíticos de la proteína. En ambos casos es el plegamiento de los sitios activos, el catalítico y de nucleación, que desempeñan un rol fundamental en la generación de estas nanoestructuras, incidiendo en las propiedades ópticas resultantes y la formación de agregados de ferritina.

Los cambios en el plegamiento también generan una nueva distribución de cargas eléctricas que modifican la carga eléctrica superficial. De los resultados se observa que el llenado de la proteína, el potencial Z y la formación de agregados se encuentran relacionados. El proceso de llenado disminuye la repulsión electrostática entre las moléculas de ferritina, lo que se relaciona la formación de agregados. Interesantemente, los agregados que se forman poseen un tamaño definido, involucrando un diámetro hidrodinámico no superior a 40 nm lo que equivale de 3 a 4 moléculas de ferritina. Sin importar el nivel de llenado, los agregados de proteína no crecen, conservando su tamaño promedio y estabilidad coloidal.

El llenado de la proteína genera una distribución de moléculas de ferritina con distinto nivel de carga en su interior. Este fenómeno es aún más notorio para el caso de la síntesis de nanoestructuras de oro, donde debido al complejo proceso de síntesis por etapas queda una cierta cantidad de proteína que no presenta oro en su cavidad, quedando vacías.

Finalmente, a partir de las discusiones previas es posible concluir que todo proceso de carga en la cavidad produce un cambio en el plegamiento local de las cadenas internas de la proteína, lo que da origen a una serie de modificaciones

en las propiedades ópticas, distribución de cargas eléctricas y finalmente en la formación de agregados.

El armazón peptídico de la proteína ofrece un espacio para la síntesis confinada de nanoestructuras, donde los sitios activos internos juegan un rol clave en el proceso de oxidación del hierro y además se presentan como sitios preferenciales para la nucleación del oro.

Los procesos de llenado de la proteína no son homogéneos, generan una distribución de moléculas de ferritina con distinto nivel de llenado. A su vez, todo proceso de carga se relaciona con la formación de agregados, presentando los agregados una menor repulsión electrostática y mayor contenido en comparación con los monómeros.

8.2 Perspectivas

Del trabajo realizado se desprenden diversos temas que pueden ser profundizados en vistas a optimizar y obtener una mejor comprensión de los procesos involucrados.

El primero es comprender como el proceso de llenado modifica la disposición espacial de las cadenas peptídicas internas de la proteína, lo que produce una serie de cambios en las propiedades ópticas y estructurales. Se plantea la opción de evaluar muestras de proteína con distinto nivel de llenado mediante dicroísmo circular, lo que permite relacionar dichos cambios con las propiedades ópticas, la integridad estructural, el potencial Z y la movilidad electroforética.

El proceso de síntesis de *clusters* de oro genera dos clases de moléculas de proteína, unas con oro y otras que conservan su cualidad de apoferritina. Este proceso puede ser optimizado mediante la separación por gradiente de sucrosa, lo que permitiría reutilizar las moléculas de ferritina sin oro en su cavidad. A su vez es de elevado interés comprender como se inicia la nucleación del oro en la cavidad y el rol que juegan los sitios activos durante este proceso. Esto podría ser realizado mediante el estudio comparativo de la síntesis en moléculas de proteína posean exclusivamente cadenas H y L por separado.

La obtención de nanoestructuras de oro en la cavidad de la proteína permite explorar una nueva línea de investigación biomédica. En colaboración con la investigadora postdoctoral Margarita Santiago del Centro de Bioingeniería y Biotecnología (CeBiB), el profesor Dr. Marcelo Kogan y el Dr. Simón Guerrero, ambos pertenecientes a la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, se evaluó la toxicidad de ferritinas recombinantes con nanopartículas de oro en su cavidad sobre diversas líneas celulares. Estos ensayos preliminares indican que las nanopartículas de oro en la cavidad de la

proteína tienden a disminuir la viabilidad celular en dos líneas celulares de melanoma y de cáncer gástrico, debido a la internalización de las nanoestructuras.

Siguiendo en una línea similar se busca en el mediano plazo obtener ferritinas recombinantes con péptidos específicos en su superficie externa que habilitan a la proteína para traspasar la barrera hematoencefálica. De lograr traspasar la barrera y ser cargada con nanoestructuras de oro se obtendría un agente de contraste para la obtención de imágenes por microscopía de fluorescencia y electrónica de transmisión para cortes cerebrales, lo que es de elevado interés en el área de diagnóstico médico. A la fecha se está trabajando en la purificación de los especímenes de proteína recombinante para posteriormente sintetizar nanoestructuras de oro.

Se logró optimizar la síntesis de óxidos de hierro magnéticos en la cavidad de la proteína, de estos resultados se deriva que la identificación y proporción de los tipos de óxidos no es concluyente. Es necesario utilizar técnicas más sofisticadas que permitan una mejor comprensión del proceso de oxidación por parte de la proteína y como es que afecta las propiedades magnéticas.

La proteína ferritina ha llamado la atención en el último tiempo en nuevas líneas de investigación como lo es la electrónica molecular, ciencia que estudia el uso sistemas moleculares orgánicos para la creación de dispositivos electrónicos. En colaboración con el Dr. Herre Van der Zant de la Universidad Tecnológica de Delft (TUDelft) en Holanda y la ingeniera eléctrica Jacqueline Labra, estudiante de magister en Ingeniería Eléctrica de la Universidad de Chile se están explorando las propiedades electrónicas de la ferritina con distintos nivel de carga de hierro y con nanoestructuras de oro en su cavidad. En esta colaboración se está evaluando la creación de diversos dispositivos y condiciones para la medición de las propiedades electrónicas y los modelos que permitan ajustar y

comprender los datos resultantes. Estos resultados se encuentran aún en desarrollo y protegidos por acuerdos de confidencialidad.

La posibilidad de obtener un material magneto-óptico mediante óxidos de hierro y oro metálico en la cavidad de una misma molécula de proteína plantea un nuevo camino para el desarrollo de materiales con fines biomédicos. Estos últimos resultados están siendo evaluados para la generación de una segunda publicación derivada de la presente tesis.

GLOSARIO

AAS	Espectroscopía de absorción atómica, <i>Atomic Absorption Spectroscopy</i>
AFt	Apoferritina, envoltura proteína de ferritina
Au/Ft	Relación de átomos de oro por molécula de ferritina
BCA	Ácido bincinónico, <i>Bicinchoninic Acid</i>
BE	Energía de ligadura, <i>Binding Energy</i>
BiPy	2,2 bipyridil
DLS	Dispersión dinámica de luz, <i>Dinamic Light scattering</i>
EDTA	Ácido Etilendiaminotetracético
EDS	Espectroscopía de energía dispersiva, <i>Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy</i>
FCC	Estructura cristalina cúbica centrada en las caras, <i>Face Cubic Centered</i>
Fe/Ft	Relación de átomos de hierro por molécula de ferritina
FPLC	Cromatografía líquida rápida de proteína, <i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
FWHM	Ancho del pico a media altura, <i>Full Width Half Maximum</i>
HAADF	<i>High Angle Anular Dark Field</i>
Hc	Campo coercitivo
HSF	Ferritina de bazo de caballo, <i>Horse Spleen Ferritin</i>

HOMO	Orbital molecular más alto ocupado, <i>Highest Occupied Molecular Orbital</i>
ICP-OES	Espectroscopía de emisión óptica por plasma acoplado inductivo, <i>Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy</i>
LUMO	Orbital molecular más bajo desocupado, <i>Lowest Unoccupied Molecular Orbital</i>
M_R	Magnetización de remanencia
M_s	Magnetización de saturación
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida, <i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i>
pI	Punto isoeléctrico
PL	Fotoluminiscencia
Pot-Z	Potencial Z
SAED	Difracción de electrones de área seleccionada, <i>Selected Area Electron Diffraction</i>
SEC	Cromatografía de exclusión de tamaño, <i>Size Exclusion Chromatography</i>
SQ	Sin quelante
SRP	Plasmón de resonancia superficial, <i>Surface Resonance Plasmon</i>
SQUID	Magnetometría de dispositivo superconductor de interferencia cuántica, <i>Superconducting Quantum Interference Device</i>
TEM	Microscopía electrónica de transmisión, <i>Transmission Electron Microscopy</i>

- TGA** Ácido tioglicólico, *Thioglicolic acid*
- UV-Vis** Espectroscopía de absorción Ultravioleta-visible
- VSM** Magnetómetro de muestra vibrante, *Vibrating Sample Magnetometer*
- XPS** Espectroscopía de fotoelectrones de rayos X, *X-Ray Photoelectron Spectroscopy*

BIBLIOGRAFÍA

- [1] W. Lu and C. M. Lieber, "Nanoelectronics from the bottom up," *Nat. Mater.*, vol. 6, no. 11, pp. 841–850, 2007.
- [2] A. Moisala, A. G. Nasibulin, and E. I. Kauppinen, "The role of metal nanoparticles in the catalytic production of single-walled carbon nanotubes - a review," *J. Phys. - Condens. Matter*, vol. 15, p. S3011, 2003.
- [3] K. Aguilar-Arteaga, J. A. Rodriguez, and E. Barrado, "Magnetic solids in analytical chemistry: A review," *Anal. Chim. Acta*, vol. 674, no. 2, pp. 157–165, 2010.
- [4] H. X, J. PK, E.-S. IH, and E.-S. MA, "Gold nanoparticles: interesting optical properties and recent applications in cancer diagnostics and therapy," *Nanomedicine*, vol. 2, pp. 681–693, 2007.
- [5] B. D. A. Tomalia, A. M. Naylor, and W. A. Goddard, "Starburst Dendrimers : Molecular-Level Control of Size , Shape , Surface Chemistry , Topology , and Flexibility from Atoms to Macroscopic Matter **," vol. 29, pp. 138–175, 1990.
- [6] K. S. Soppimath, T. M. Aminabhavi, and A. R. Kulkarni, "Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices," vol. 70, pp. 1–20, 2001.
- [7] M. Brust, J. Fink, D. Bethell, D. J. Schiffrin, and C. Kiely, "Synthesis and Reactions of Functionalized Gold Nanoparticles," *J. Chem. Soc. Commun.*, no. 16, pp. 1655–1656, 1995.
- [8] J. C. Scaiano *et al.*, "Photochemical routes to silver and gold nanoparticles," *Pure Appl. Chem.*, vol. 81, no. 4, pp. 635–647, 2009.
- [9] M. Ceolín, N. Gálvez, P. Sánchez, B. Fernández, and J. M. Domínguez-

- Vera, "Structural aspects of the growth mechanism of copper nanoparticles inside apoferritin," *Eur. J. Inorg. Chem.*, no. 5, pp. 795–801, 2008.
- [10] M. Okuda, K. Iwahori, I. Yamashita, and H. Yoshimura, "Fabrication of nickel and chromium nanoparticles using the protein cage of apoferritin," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 84, no. 2, pp. 187–194, 2003.
- [11] I. Robinson, L. D. Tung, S. Maenosono, C. Wälti, and N. T. K. Thanh, "Synthesis of core-shell gold coated magnetic nanoparticles and their interaction with thiolated DNA.," *Nanoscale*, vol. 2, pp. 2624–2630, 2010.
- [12] C. Wang, H. Daimon, T. Onodera, T. Koda, and S. Sun, "A general approach to the size- and shape-controlled synthesis of platinum nanoparticles and their catalytic reduction of oxygen," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 47, no. 19, pp. 3588–3591, 2008.
- [13] S. S. and H. Zeng, "Size-Controlled Synthesis of Magnetite Nanoparticles," *J. Am. Chem. Soc.*, no. 31, pp. 8204–8205, 2002.
- [14] Y. Dong, K. He, L. Yin, and A. Zhang, "A facile route to controlled synthesis of Co₃O₄ nanoparticles and their environmental catalytic properties," *Nanotechnology*, vol. 18, no. 43, p. 435602, 2007.
- [15] B. O. Dabbousi *et al.*, "(CdSe)ZnS Core–Shell Quantum Dots: Synthesis and Characterization of a Size Series of Highly Luminescent Nanocrystallites," *J. Phys. Chem. B*, vol. 101, no. 46, pp. 9463–9475, 1997.
- [16] M. C. Daniel and D. Astruc, "Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications Toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology," *Chem. Rev.*, vol. 104, no. 1, pp. 293–346, 2004.
- [17] D. Liu, Z. Wang, and X. Jiang, "Gold nanoparticles for the colorimetric and fluorescent detection of ions and small organic molecules.," *Nanoscale*, vol.

3, no. 4, pp. 1421–1433, 2011.

- [18] A. R. Guerrero, N. Hassan, C. A. Escobar, F. Albericio, M. J. Kogan, and E. Araya, “Gold nanoparticles for photothermally controlled drug release.,” *Nanomedicine (Lond)*, vol. 9, no. 13, pp. 2023–39, 2014.
- [19] M. M. Joseph and T. T. Sreelekha, “Gold nanoparticles - synthesis and applications in cancer management,” *Recent Patents Mater. Sci.*, vol. 7, no. 1, pp. 8–25, 2014.
- [20] G. a O. Jinhao, G. U. Hongwei, and X. U. Bing, “Multifunctional magnetic nanoparticles: design, synthesis, and biomedical applications,” *Acc. Chem. Res.*, vol. 42, no. 8, pp. 1097–1107, 2009.
- [21] Y.-M. Huh *et al.*, “In vivo magnetic resonance detection of cancer by using multifunctional magnetic nanocrystals.,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 127, no. 35, pp. 12387–12391, 2005.
- [22] H. Bin Na, I. C. Song, and T. Hyeon, “Inorganic nanoparticles for MRI contrast agents,” *Adv. Mater.*, vol. 21, pp. 2133–2148, 2009.
- [23] C. Okoli, M. Boutonnet, L. Mariey, S. Järås, and G. Rajarao, “Application of magnetic iron oxide nanoparticles prepared from microemulsions for protein purification,” *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, vol. 86, no. 11, pp. 1386–1393, 2011.
- [24] K. Kang *et al.*, “Preparation and Characterization of Chemically Functionalized Silica-Coated Magnetic Nanoparticles as a DNA Separator,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 113, pp. 536–543, 2009.
- [25] T. Neuberger, B. Schöpf, H. Hofmann, M. Hofmann, and B. Von Rechenberg, “Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications: Possibilities and limitations of a new drug delivery system,” *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. 293, no. 1, pp. 483–496, 2005.

- [26] C. S. S. R. Kumar and F. Mohammad, "Magnetic nanomaterials for hyperthermia-based therapy and controlled drug delivery," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 63, no. 9, pp. 789–808, 2011.
- [27] A. Verma and F. Stellacci, "Effect of surface properties on nanoparticle-cell interactions," *Small*, vol. 6, no. 1, pp. 12–21, 2010.
- [28] B. Meets, "Biotechnology Meets Materials Science," *Mater. Sci.*, vol. 40, no. 22, pp. 4128–4158, 2001.
- [29] M. Hu *et al.*, "Dark-field microscopy studies of single metal nanoparticles: Understanding the factors that influence the linewidth of the localized surface plasmon resonance," *J. Mater. Chem.*, vol. 18, no. 17, pp. 1949–1960, 2008.
- [30] J. Kim, Y. Piao, and T. Hyeon, "Multifunctional nanostructured materials for multimodal imaging, and simultaneous imaging and therapy," *Chemical Society Reviews*, vol. 38, no. 2, pp. 372–390, 2009.
- [31] B. Panchapakesan, B. Book-Newell, P. Sethu, M. Rao, and J. Irudayaraj, "Gold nanoprobe for theranostics," *Nanomedicine*, vol. 6, no. 10, pp. 1787–1811, 2011.
- [32] A. K. Gupta and M. Gupta, "Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications," *Biomaterials*, vol. 26, no. 18, pp. 3995–4021, 2005.
- [33] K. Hola, Z. Markova, G. Zoppellaro, J. Tucek, and R. Zboril, "Tailored functionalization of iron oxide nanoparticles for MRI, drug delivery, magnetic separation and immobilization of biosubstances," *Biotechnol. Adv.*, vol. 33, no. 6, pp. 1162–1176, 2015.
- [34] X. Shi *et al.*, "Dendrimer-entrapped gold nanoparticles as a platform for cancer-cell targeting and imaging," *Small*, vol. 3, no. 7, pp. 1245–1252,

2007.

- [35] A. K. Gupta and S. Wells, "Surface-Modified Superparamagnetic Nanoparticles for Drug Delivery: Preparation, Characterization, and Cytotoxicity Studies," *IEEE Trans. Nanobioscience*, vol. 3, no. 1, pp. 66–73, 2004.
- [36] O. Veisoh, J. W. Gunn, and M. Zhang, "Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 62, no. 3, pp. 284–304, 2010.
- [37] J. R. McCarthy and R. Weissleder, "Multifunctional magnetic nanoparticles for targeted imaging and therapy," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 60, no. 11, pp. 1241–1251, 2008.
- [38] E. Boisselier and D. Astruc, "Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 38, no. 6, pp. 1759–1782, 2009.
- [39] X. H. Huang, I. H. El-Sayed, W. Qian, and M. a El-Sayed, "Cancer cell imaging and photothermal therapy in the near-infrared region by using gold nanorods," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 128, no. 6, pp. 2115–2120, 2006.
- [40] I. Castellanos-Rubio *et al.*, "Fe₃O₄ nanoparticles prepared by the seeded-growth route for hyperthermia: electron magnetic resonance as a key tool to evaluate size distribution in magnetic nanoparticles.," *Nanoscale*, vol. 12, pp. 7542–7552, 2014.
- [41] T. Lammers, S. Aime, W. E. Hennink, G. Storm, and F. Kiessling, "Theranostic nanomedicine," *Acc. Chem. Res.*, vol. 44, no. 10, pp. 1029–1038, 2011.
- [42] R. Gref *et al.*, "The controlled intravenous delivery of drugs using PEG-coated sterically stabilized nanospheres," no. 95, 1995.

- [43] Y. Zhang, N. Kohler, and M. Zhang, "Surface modification of superparamagnetic magnetite nanoparticles and their intracellular uptake," *Biomaterials*, vol. 23, no. 7, pp. 1553–1561, 2002.
- [44] G. Marcelo, E. Kaplan, M. P. Tarazona, and F. Mendicuti, "Interaction of gold nanoparticles with Doxorubicin mediated by supramolecular chemistry," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 128, pp. 237–244, 2015.
- [45] P. Kocbek, N. Obermajer, M. Cegnar, J. Kos, and J. Kristl, "Targeting cancer cells using PLGA nanoparticles surface modified with monoclonal antibody," *J. Control. Release*, vol. 120, no. 1–2, pp. 18–26, 2007.
- [46] C. M. Pitsillides, E. K. Joe, X. Wei, R. R. Anderson, and C. P. Lin, "Selective cell targeting with light-absorbing microparticles and nanoparticles," *Biophys. J.*, vol. 84, no. 6, pp. 4023–4032, 2003.
- [47] A. P. Ramos, M. A. E. Cruz, C. B. Tovani, and P. Ciancaglini, "Biomedical applications of nanotechnology," *Biophys. Rev.*, vol. 9, no. 2, pp. 79–89, 2017.
- [48] D. Westmeier, C. Chen, R. H. Stauber, and D. Docter, "The bio-corona and its impact on nanomaterial toxicity," *European Journal of Nanomedicine*, vol. 7, no. 3, pp. 153–168, 2015.
- [49] P. Del Pino, B. Pelaz, Q. Zhang, P. Maffre, G. U. Nienhaus, and W. J. Parak, "Protein corona formation around nanoparticles - From the past to the future," *Materials Horizons*, vol. 1, no. 3, pp. 301–313, 2014.
- [50] M. Mahmoudi, I. Lynch, M. R. Ejtehadi, M. P. Monopoli, F. B. Bombelli, and S. Laurent, "Protein-nanoparticle interactions: Opportunities and challenges," *Chemical Reviews*, vol. 111, no. 9, pp. 5610–5637, 2011.
- [51] C. D. Walkey and W. C. W. Chan, "Understanding and controlling the interaction of nanomaterials with proteins in a physiological environment,"

Chemical Society Reviews, vol. 41, no. 7. pp. 2780–2799, 2012.

- [52] S. R. Saptarshi, A. Duschl, and A. L. Lopata, “Interaction of nanoparticles with proteins: Relation to bio-reactivity of the nanoparticle,” *J. Nanobiotechnology*, vol. 11, no. 1, pp. 1–12, 2013.
- [53] E. Choi, T. J. Webster, and S. Kim, “Effect of the protein corona on nanoparticles for modulating cytotoxicity and immunotoxicity,” pp. 97–113, 2015.
- [54] V. Mirshafiee, M. Mahmoudi, K. Lou, J. Cheng, and M. L. Kraft, “Protein corona significantly reduces active targeting yield,” *Chem. Commun.*, vol. 49, no. 25, pp. 2557–2559, 2013.
- [55] K. A. Dawson, A. Lesniak, F. Fenaroli, M. P. Monopoli, A. Christoffer, and A. Salvati, “ARTICLE Effects of the Presence or Absence of a Protein Corona on Silica Nanoparticle Uptake and Impact on Cells,” no. 7, pp. 5845–5857, 2012.
- [56] R. Gref *et al.*, “‘Stealth’ corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): Influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 18, no. 3–4, pp. 301–313, 2000.
- [57] D. Westmeier, C. Chen, R. H. Stauber, and D. Docter, “The bio-corona and its impact on nanomaterial toxicity,” vol. 7, no. 11, pp. 153–168, 2015.
- [58] R. Tsukamoto *et al.*, “Effect of PEGylation on controllably spaced adsorption of ferritin molecules,” *Langmuir*, vol. 29, no. 41, pp. 12737–12743, 2013.
- [59] J. L. Perry *et al.*, “PEGylated PRINT nanoparticles: The impact of PEG density on protein binding, macrophage association, biodistribution, and

pharmacokinetics,” *Nano Lett.*, vol. 12, no. 10, pp. 5304–5310, 2012.

- [60] D. K. Ban and S. Paul, “Protein corona over silver nanoparticles triggers conformational change of proteins and drop in bactericidal potential of nanoparticles: Polyethylene glycol capping as preventive strategy,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 146, pp. 577–584, 2016.
- [61] B. Pelaz *et al.*, “Surface Functionalization of Nanoparticles with Polyethylene Glycol : Effects on Protein Adsorption and Cellular Uptake,” no. 7, pp. 6996–7008, 2015.
- [62] R. Gref, M. Lu, P. Sud, and E. Pharmaceutiques, “‘Stealth’ corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption,” vol. 18, pp. 301–313, 2000.
- [63] S. K. Larson, Timothy A. Joshi, Pratixa, “Preventing Protein Adsorption and Macrophage Uptake of Gold Nanoparticles via a Hydrophobic Shield,” no. 10. pp. 9182–9190, 2012.
- [64] Z. Li, J. C. Barnes, A. Bosoy, J. F. Stoddart, and J. I. Zink, “Mesoporous silica nanoparticles in biomedical applications,” *Chemical Society Reviews*, vol. 41, no. 7. pp. 2590–2605, 2012.
- [65] F. Lu, S. Wu, Y. Hung, and C. Mou, “Size Effect on Cell Uptake in Well-Suspended , Uniform Mesoporous Silica Nanoparticles **,” pp. 1408–1413, 2009.
- [66] F. Tang, L. Li, and D. Chen, “Mesoporous silica nanoparticles: Synthesis, biocompatibility and drug delivery,” *Adv. Mater.*, vol. 24, no. 12, pp. 1504–1534, 2012.
- [67] B. Bhushan, V. Khanadeev, B. Khlebtsov, N. Khlebtsov, and P. Gopinath,

- “Impact of albumin based approaches in nanomedicine : Imaging , targeting and drug delivery,” *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 246, no. July, pp. 13–39, 2017.
- [68] D. M. Chevrier, A. Chatt, and P. Zhang, “Properties and applications of protein- stabilized fluorescent gold nanoclusters : short review,” *J. Nanophotonics*, vol. 6, p. 064504, 2012.
- [69] J. Xie, Y. Zheng, and J. Y. Ying, “Protein-directed synthesis of highly fluorescent gold nanoclusters.,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 131, no. 3, pp. 888–9, 2009.
- [70] J. López-viota *et al.*, “Electrophoretic characterization of gold nanoparticles functionalized with human serum albumin (HSA) and creatine,” *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 332, pp. 215–223, 2009.
- [71] M. Truffi, L. Fiandra, L. Sorrentino, M. Monieri, F. Corsi, and S. Mazzucchelli, “Ferritin nanocages : A biological platform for drug delivery , imaging and theranostics in cancer,” *Pharmacol. Res.*, vol. 107, pp. 57–65, 2016.
- [72] T. A. Larson, J. Bankson, J. Aaron, and K. Sokolov, “Hybrid plasmonic magnetic nanoparticles as molecular specific agents for MRI/optical imaging and photothermal therapy of cancer cells,” *Nanotechnology*, vol. 18, no. 32, 2007.
- [73] Z. Skeete *et al.*, “Design of Functional Nanoparticles and Assemblies for Theranostic Applications.,” *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2014.
- [74] Y. Hu, L. Meng, L. Niu, and Q. Lu, “Facile Synthesis of Superparamagnetic Fe₃O₄ @polyphosphazene@Au Shells for Magnetic Resonance Imaging and Photothermal Therapy,” *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 5, no. 11, pp. 4586–4591, 2013.

- [75] V. Amendola *et al.*, "Magneto-plasmonic Au-Fe alloy nanoparticles designed for multimodal SERS-MRI-CT imaging," *Small*, vol. 10, no. 12, pp. 2476–2486, 2014.
- [76] A. Mezni, I. Balti, A. Mlayah, N. Jouini, and L. S. Smiri, "Hybrid Au – Fe₃O₄ Nanoparticles : Plasmonic , Surface Enhanced Raman Scattering , and Phase Transition Properties," *J. Phys. Chem. C*, vol. 117, p. 16166–16174, 2013.
- [77] J. Bao *et al.*, "Bifunctional Au-Fe₃O₄ Nanoparticles for Protein Separation," *ACS Nano*, vol. 1, no. 4, pp. 293–298, Nov. 2007.
- [78] M. B. Fernández López, *Ferritinas Naturales y Sintéticas. Implicaciones Nanobiomédicas*. 2009.
- [79] G. Jutz, P. Van Rijn, B. Santos Miranda, and A. Böker, "Ferritin: A versatile building block for bionanotechnology," *Chem. Rev.*, vol. 115, no. 4, pp. 1653–1701, 2015.
- [80] M. Uchida, S. Kang, C. Reichhardt, K. Harlen, and T. Douglas, "The ferritin superfamily: Supramolecular templates for materials synthesis," *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, vol. 1800, no. 8, pp. 834–845, 2010.
- [81] N. Galvez *et al.*, "Comparative Structural and Chemical Studies of Ferritin," *J. Ann. Chem. Soc.*, vol. 130, no. 5, pp. 8062–8068, 2008.
- [82] R. Fan, S. W. Chew, V. V. Cheong, and B. P. Orner, "Fabrication of gold nanoparticles inside unmodified horse spleen apoferritin," *Small*, vol. 6, no. 14, pp. 1483–1487, 2010.
- [83] C. Sun *et al.*, "Controlling assembly of paired gold clusters within apoferritin nanoreactor for in vivo kidney targeting and biomedical imaging," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 133, no. 22, pp. 8617–8624, 2011.
- [84] N. Gálvez, B. Fernandez, E. Valero, P. Sánchez, R. Cuesta, and J. M.

- Domínguez-Vera, "Apoferritin as a nanoreactor for preparing metallic nanoparticles," *Comptes Rendus Chim.*, vol. 11, no. 10, pp. 1207–1212, 2008.
- [85] Q. Y. Deng, B. Yang, J. F. Wang, C. G. Whiteley, and X. N. Wang, "Biological synthesis of platinum nanoparticles with apoferritin," *Biotechnol. Lett.*, vol. 31, no. 10, pp. 1505–1509, 2009.
- [86] Y. Shin, A. Dohnalkova, and Y. Lin, "Preparation of homogeneous gold/silver alloy nanoparticles using the apoferritin cavity as a nanoreactor," *J. Phys. Chem. C*, vol. 114, no. 13, pp. 5985–5989, 2010.
- [87] M. Suzuki *et al.*, "Preparation and catalytic reaction of Au/Pd bimetallic nanoparticles in Apo-ferritin," *Chem. Commun.*, no. 32, pp. 4871–4873, 2009.
- [88] F. C. Meldrum, B. R. Heywood, and S. Mann, "Magnetoferritin: In vitro synthesis of a novel magnetic protein," *Science (80-.)*, vol. 257, no. 5069, pp. 522–523, 1992.
- [89] Z. Mitroová, L. Melníková, J. Kováč, M. Timko, and P. Kopčanský, "Synthesis and characterization of magnetoferritin," *Acta Phys. Pol. A*, vol. 121, no. 5–6, pp. 1318–1320, 2012.
- [90] K. Fan *et al.*, "Magnetoferritin nanoparticles for targeting and visualizing tumour tissues," *Nat. Nanotechnol.*, vol. 7, no. 7, pp. 459–464, 2012.
- [91] R. Tsukamoto, K. Iwahori, M. Muraoka, and I. Yamashita, "Synthesis of Co₃O₄ nanoparticles using the cage-shaped protein, apoferritin," *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, vol. 78, no. 11, pp. 2075–2081, 2005.
- [92] K. K. W. Wong, N. T. Whilton, T. Douglas, S. Mann, and H. Colfen, "Hydrophobic proteins: synthesis and characterisation of organic-soluble alkylated ferritins," *Chem. Commun.*, no. 16, pp. 1621–1622, 1998.

- [93] M. Uchida *et al.*, "Targeting of cancer cells with ferromagnetic ferritin cage nanoparticles," *J Am Chem Soc*, vol. 128, no. 51, pp. 16626–33, 2006.
- [94] M. Kim *et al.*, "PH-dependent structures of ferritin and apoferritin in solution: Disassembly and reassembly," *Biomacromolecules*, vol. 12, no. 5, pp. 1629–1640, 2011.
- [95] J. C. Cutrin, S. G. Crich, D. Burghilea, W. Dastr??, and S. Aime, "Curcumin/Gd loaded apoferritin: A novel 'theranostic' agent to prevent hepatocellular damage in toxic induced acute hepatitis," *Mol. Pharm.*, vol. 10, no. 5, pp. 2079–2085, 2013.
- [96] M. A. Kilic, E. Ozlu, and S. Calis, "A novel protein-based anticancer drug encapsulating nanosphere: Apoferritin-doxorubicin complex," *J. Biomed. Nanotechnol.*, vol. 8, no. 3, pp. 508–514, 2012.
- [97] Z. Zhen *et al.*, "RGD-Modified Apoferritin Nanoparticles for Efficient Drug Delivery to Tumors," *ACS Nano*, no. 6, pp. 4830–4837, 2013.
- [98] B. Maity, K. Fujita, and T. Ueno, "Use of the confined spaces of apo-ferritin and virus capsids as nanoreactors for catalytic reactions," *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 25, pp. 88–97, 2015.
- [99] G. S. Bailey, *The Protein Protocols Handbook*. 2009.
- [100] I. G. Macara, T. G. Hoy, and P. M. Harrison, "The formation of ferritin from apoferritin. Catalytic action of apoferritin.," *Biochem. J.*, vol. 135, no. 2, pp. 343–348, 1973.
- [101] J. C. Salgado *et al.*, "Mathematical modeling of the dynamic storage of iron in ferritin.," *BMC Syst. Biol.*, vol. 4, no. 1, p. 147, 2010.
- [102] D. N. Petsev, B. R. Thomas, S.-T. Yau, and P. G. Vekilov, "Interactions and Aggregation of Apoferritin Molecules in Solution: Effects of Added Electrolytes," *Biophys. J.*, vol. 78, no. 4, pp. 2060–2069, 2000.

- [103] Y. Niitsu and I. Listowsky, "Mechanisms for the Formation of Ferritin Oligomers," *Biochemistry*, vol. 12, no. 23, pp. 4690–4695, 1973.
- [104] J. Dupin, D. Gonbeau, P. Vinatier, and A. Levasseur, "Systematic XPS Studies of Metal Oxides , Hydroxides and Peroxides Systematic XPS studies of metal oxides , hydroxides and peroxides," *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 2, pp. 1319–1324, 2000.
- [105] J. Shu, W. Wang, and H. Cui, "Direct electrochemiluminescence of gold nanoparticles bifunctionalized by luminol analogue-metal complexes in neutral and alkaline media," *Chem. Commun.*, vol. 51, no. 57, pp. 11366–11369, 2015.
- [106] J. Shu, W. Wang, and H. Cui, "Direct electrochemiluminescence of gold nanopartifile:///C:/Users/Italo/Downloads/la904684e.riscles bifunctionalized by luminol analogue-metal complexes in neutral and alkaline media," *Chem. Commun.*, vol. 51, no. 57, pp. 11366–11369, 2015.
- [107] N. S. McIntyre and D. G. Zetaruk, "X-ray Photoelectron Spectroscopic Studies of Iron Oxides," *Anal. Chem.*, vol. 49, no. 11, pp. 1521–1529, 1977.
- [108] A. P. Grosvenor, B. A. Kobe, M. C. Biesinger, and N. S. McIntyre, "Investigation of multiplet splitting of Fe 2p XPS spectra and bonding in iron compounds," *Surf. Interface Anal.*, vol. 36, no. 12, pp. 1564–1574, 2004.
- [109] K. S. Kumar, R. R. Pasula, S. Lim, and C. A. Nijhuis, "Long-Range Tunneling Processes across Ferritin-Based Junctions.," *Adv. Mater. Lett.*, vol. 28, no. 9, pp. 1824–1830, Mar. 2016.
- [110] H. Shokrollahi, "Author ' s Accepted Manuscript," *J. Magn. Magn. Mater.*, 2016.
- [111] L. Mazzetti and P. J. Thistlethwaite, "Raman spectra and thermal transformations of ferrihydrite and schwertmannite," *J. Raman Spectrosc.*,

vol. 33, no. 2, pp. 104–111, 2002.

- [112] I. Chamritski and G. Burns, “Infrared- And raman-active phonons of magnetite, maghemite, and hematite: A computer simulation and spectroscopic study,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 109, no. 11, pp. 4965–4968, 2005.
- [113] M. Szybowicz, M. Koralewski, J. Karoń, and L. Melnikova, “Micro-Raman spectroscopy of natural and synthetic ferritins and their mimetics,” *Acta Phys. Pol. A*, vol. 127, no. 2, pp. 534–536, 2015.
- [114] O. N. Shebanova and P. Lazor, “Raman spectroscopic study of magnetite (FeFe₂O₄): A new assignment for the vibrational spectrum,” *J. Solid State Chem.*, vol. 174, no. 2, pp. 424–430, 2003.
- [115] A. M. Jubb and H. C. Allen, “Vibrational spectroscopic characterization of hematite, maghemite, and magnetite thin films produced by vapor deposition,” *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 2, no. 10, pp. 2804–2812, 2010.
- [116] G. N. Kustova, E. B. Burgina, V. A. Sadykov, and S. G. Poryvaev, “Vibrational Spectroscopic Investigation of the Goethite Thermal Decomposition Products,” *Phys Chem Miner.*, vol. 18, pp. 379–382, 1992.
- [117] S. H. Kilcoyne and R. Cywinski, “Ferritin: a model superparamagnet,” *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. 140–144, no. PART 2, pp. 1466–1467, 1995.
- [118] A. Soriano-portillo, M. Clemente-le, J. G. Carlos, G. Natividad, E. Colacio, and M. Dom, “Magnetic Langmuir – Blodgett films of ferritin with different iron loadings,” *Synth. Met.*, vol. 148, no. 11, pp. 7–10, 2005.
- [119] W. Wu, Q. He, and C. Jiang, “Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis and surface functionalization strategies,” *Nanoscale Res. Lett.*, vol. 3, no. 11, pp. 397–415, 2008.

- [120] T. . G. S. . A. D. D. . M. S. . Wong K.K.W. a Douglas, "Biomimetic Synthesis and Characterization of Magnetic Proteins (Magnetoferritin)," *Chem. Mater.*, vol. 10, no. 1, pp. 279–285, 1998.
- [121] M. S. Joo, G. Tourillon, D. E. Sayers, and E. C. Theil, "Rapid reduction of iron in horse spleen ferritin by thioglycolic acid measured by dispersive X-ray absorption spectroscopy," *Biol. Met.*, vol. 3, no. 3–4, pp. 171–175, 1990.
- [122] N. Gálvez, B. Ruiz, R. Cuesta, E. Colacio, and J. M. Domínguez-Vera, "Release of iron from ferritin by aceto- and benzohydroxamic acids," *Inorg. Chem.*, vol. 44, no. 8, pp. 2706–2709, 2005.
- [123] A. Trefry and P. M. Harrison, "Incorporation and release of inorganic phosphate in horse spleen ferritin.," *Biochem. J.*, vol. 171, no. 2, pp. 313–20, 1978.
- [124] F. FUNK, J. -P LENDERS, R. R. CRICHTON, and W. SCHNEIDER, "Reductive mobilisation of ferritin iron," *Eur. J. Biochem.*, vol. 152, no. 1, pp. 167–172, 1985.
- [125] S. Granick and L. Michaelis, "Ferritin and apoferritin," *Science (80-)*, vol. 95, no. 2469, pp. 439–440, 1942.
- [126] G. Zhao, F. Bou-Abdallah, P. Arosio, S. Levi, C. Janus-Chandler, and N. D. Chasteen, "Multiple pathways for mineral core formation in mammalian apoferritin. The role of hydrogen peroxide," *Biochemistry*, vol. 42, no. 10, pp. 3142–3150, 2003.
- [127] Granick, "Ferritin ii. apoferritin."
- [128] M. Gerl and R. Jaenicke, "Mechanism of the self-assembly of apoferritin from horse spleen - Cross-linking and spectroscopic analysis," *Eur. Biophys. J.*, vol. 15, no. 2, pp. 103–109, 1987.
- [129] S. Cavallo, G. Mei, S. Stefanini, N. Rosato, A. Finazzi-Agró, and E.

- Chiancone, "Formation and movement of Fe(III) in horse spleen, H- and L-recombinant ferritins. A fluorescence study," *Protein Sci.*, vol. 7, no. 2, pp. 427–432, 2008.
- [130] F. Funk, J. Lenders, R. R. Crichton, and W. Schneider, "Reductive mobilisation of ferritin iron," vol. 172, pp. 167–172, 1985.
- [131] S. S. C. Lee and G. W. Richter, "The Monomers and Oligomers of Ferritin and Apoferritin : Association and Dissociation," *Biochemistry*, vol. 15, no. 1, pp. 65–70, 1976.
- [132] P. M. Harrison, "The structure and function of ferritin," *Biochem. Educ.*, vol. 14, no. 4, pp. 154–162, 1986.
- [133] M. Chirita and I. Grozescu, "Fe₂O₃ – Nanoparticles , Physical Properties and Their Photochemical And Photoelectrochemical Applications," *Chem Bull Politeh. Univ Timisoara*, vol. 54, no. 68, pp. 1–8, 2009.
- [134] P. Mallick and B. N. Dash, "X-ray Diffraction and UV-Visible Characterizations of α -Fe₂O₃ Nanoparticles Annealed at Different Temperature," *Nanosci. Nanotechnol.*, vol. 3, no. 5, pp. 130–134, 2013.
- [135] K. Tharani and L. C. Nehru, "Synthesis and Characterization of Iron Oxide Nanoparticle by Precipitation Method," *Int. J. Adv. Res. Phys. Sci.*, vol. 2, no. 8, pp. 47–50, 2015.
- [136] E. C. Theil, "Ferritin protein nanocages use ion channels, catalytic sites, and nucleation channels to manage iron/oxygen chemistry," *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 15, no. 2, pp. 304–311, 2011.
- [137] N. G. James, S. L. Byrne, A. N. Steere, V. C. Smith, R. T. A. MacGillivray, and A. B. Mason, "Inequivalent contribution of the five tryptophan residues in the C-Lobe of human serum transferrin to the fluorescence increase when iron is released," *Biochemistry*, vol. 48, no. 13, pp. 2858–2867, 2009.

- [138] E. May, W. W. Fish, and S. Carolina, "The UV and Visible Spectral Properties of Ferritin The soluble form of storage iron in animals is the protein-hydrated ferric oxide complex, termed ferritin. The protein moiety of 24 subunits (1) arranged in a regular array to form a nearly spherical," vol. 190, no. 2, pp. 720–725, 1978.
- [139] E. May, W. W. Fish, and S. Carolina, "The UV and Visible Spectral Properties of Ferritin," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 190, no. 2, pp. 720–725, 1978.
- [140] D. C. Harris, *Quantitative Chemical Analysis*. 1982.
- [141] A. Atkins, Overton, Rourke, Weller, *Inorganic Chemistry*, Fifth. Oxford, 2009.
- [142] R. R. Crichton and C. F. Bryce, "Subunit interactions in horse spleen apoferritin. Dissociation by extremes of pH.," *Biochem. J.*, vol. 133, no. 2, pp. 289–299, 1973.
- [143] and G. C. S. K. Lance Kelly, Eduardo Coronado, Lin Lin Zhao, "The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment," *J. Phys. Chem. B*, vol. 107, no. 2, pp. 668–677, 2003.
- [144] M. Rycenga, C. M. Cobley, J. Zeng, W. Li, and C. H. Moran, "NIH Public Access," *Chem Rev*, vol. 111, no. 6, pp. 3669–3712, 2012.
- [145] L. Genzel and T. P. Martin, "Infrared Absorption in Small Ionic Crystals," *Phys. status solidi*, vol. 51, no. 1, pp. 91–99, 1972.
- [146] Y. Wang, Y. Shen, A. Xie, S. Li, X. Wang, and Y. Cai, "A simple method to construct bifunctional Fe₃O₄/Au hybrid nanostructures and tune their optical properties in the near-infrared region," *J. Phys. Chem. C*, vol. 114, no. 10, pp. 4297–4301, 2010.

- [147] T. P. Martin, "Infrared Absorption in Small Ionic Crystals," vol. 91, pp. 91–99, 1972.
- [148] P. K. Jain, K. S. Lee, I. H. El-Sayed, and M. A. El-Sayed, "Calculated absorption and scattering properties of gold nanoparticles of different size, shape, and composition: Applications in biological imaging and biomedicine," *J. Phys. Chem. B*, vol. 110, pp. 7238–7248, 2006.
- [149] S. Link and M. a. El-Sayed, "Size and Temperature Dependence of the Plasmon Absorption of Colloidal Gold Nanoparticles," *J. Phys. Chem. B*, vol. 103, p. 4212, 1999.
- [150] C. M. Cobley, J. Chen, E. C. Cho, L. V Wang, and Y. Xia, "Gold nanostructures: A class of multifunctional materials for biomedical applications," *Chemical Society Reviews*, vol. 40, no. 1. pp. 44–56, 2011.
- [151] B. J. Wiley *et al.*, "Synthesis and optical properties of silver nanobars and nanorice," *Nano Lett.*, vol. 7, no. 4, pp. 1032–1036, 2007.
- [152] B. J. Wiley *et al.*, "Synthesis and Optical Properties of Silver Nanobars and Nanorice," 2007.
- [153] C. M. Cobley, J. Chen, E. C. Cho, L. V Wang, and Y. Xia, "Chem Soc Rev Gold nanostructures : a class of multifunctional materials for biomedical applications," pp. 44–56, 2011.
- [154] J. Polte, "Fundamental growth principles of colloidal metal nanoparticles: a new perspective," *CrystEngComm*, vol. 17, no. 36, pp. 6809–6830, 2015.
- [155] J. Polte, T. T. Ahner, F. Delissen, and S. Sokolov, "Mechanism of Gold Nanoparticle Formation in the Classical Citrate Synthesis Method Derived from Coupled In Situ XANES and SAXS Evaluation," *J. Am. Chem. Soc.*, no. 9, pp. 1296–1301, 2010.
- [156] J. Zheng, C. Zhou, M. Yu, and J. Liu, "Nanoscale Different sized

luminescent gold nanoparticles,” 2012.

- [157] J. P. Wilcoxon, J. E. Martin, F. Parsapour, B. Wiedenman, and D. F. Kelley, “Photoluminescence from nanosize gold clusters,” *J. Chem. Phys.*, vol. 108, no. 1998, p. 9137, 1998.
- [158] N. T. K. Thanh, N. Maclean, and S. Mahiddine, “Mechanisms of nucleation and growth of nanoparticles in solution,” *Chemical Reviews*, vol. 114, no. 15, pp. 7610–7630, 2014.
- [159] J. F. Moulder, W. F. Stickle, P. E. Sobol, and K. D. Bomben, *Handbook of X-ray photoelectron spectroscopy: a reference book of standard spectra for identification and interpretation of XPS data*. 1992.
- [160] M. Brust, M. Walker, D. Bethell, D. J. Schiffrin, and R. Whyman, “Synthesis of Thiol-derivatised Gold Nanoparticles in,” *Chem. Commun.*, pp. 801–802, 1994.
- [161] T. Maruyama, Y. Fujimoto, and T. Maekawa, “Synthesis of gold nanoparticles using various amino acids,” *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 447, pp. 254–257, 2015.
- [162] J. K. Lim, Y. Kim, S. Y. Lee, and S. W. Joo, “Spectroscopic analysis of L-histidine adsorbed on gold and silver nanoparticle surfaces investigated by surface-enhanced Raman scattering,” *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 69, no. 1, pp. 286–289, 2008.
- [163] Z. Liu *et al.*, “Hydrothermal synthesis of histidine-functionalized single-crystalline gold nanoparticles and their pH-dependent UV absorption characteristic,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 76, no. 1, pp. 311–316, 2010.
- [164] V. K. Lamer and R. H. Dinegar, “Theory, Production and Mechanism of Formation of Monodispersed Hydrosols,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 72, no.

11, pp. 4847–4854, 1950.

- [165] N. T. K. Thanh, N. Maclean, and S. Mahiddine, “Mechanisms of Nucleation and Growth of Nanoparticles in Solution,” vol. 3, no. 1, 2014.
- [166] P. Mulvaney, “Surface Plasmon Spectroscopy of Nanosized Metal Particles,” *Langmuir*, vol. 12, no. 3, pp. 788–800, 1996.
- [167] J. Polte, “Fundamental growth principles of colloidal metal nanoparticles – a new perspective,” *CrystEngComm*, vol. 17, pp. 6809–6830, 2015.
- [168] T. T. Ahner, F. Delissen, and S. Sokolov, “Mechanism of Gold Nanoparticle Formation in the Classical Citrate Synthesis Method Derived from Coupled In Situ XANES and SAXS Evaluation,” no. 9, pp. 1296–1301, 2010.
- [169] S. H. Wu and D. H. Chen, “Synthesis and characterization of nickel nanoparticles by hydrazine reduction in ethylene glycol,” *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 259, no. 2, pp. 282–286, 2003.
- [170] S. M. Ansari *et al.*, “Cobalt nanoparticles for biomedical applications : Facile synthesis , physiochemical characterization , cytotoxicity behavior and biocompatibility,” *Appl. Surf. Sci.*, vol. 414, pp. 171–187, 2017.
- [171] J. L. Lyon, D. a. Fleming, M. B. Stone, P. Schiffer, and M. E. Williams, “Synthesis of Fe oxide Core/Au shell nanoparticles by iterative hydroxylamine seeding,” *Nano Lett.*, vol. 4, no. li, pp. 719–723, 2004.
- [172] B. Chanteau, J. Fresnais, and J. F. Berret, “Electrosteric enhanced stability of functional sub-10 nm cerium and iron oxide particles in cell culture medium,” *Langmuir*, vol. 25, no. 16, pp. 9064–9070, 2009.
- [173] Y. Zhang *et al.*, “Synthesis of PVP-coated ultra-small Fe₃O₄ nanoparticles as a MRI contrast agent,” *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 21, no. 4, pp. 1205–1210, 2010.

- [174] S. A. Jadhav and R. Bongiovanni, "Synthesis and organic functionalization approaches for magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles," *Adv. Mater. Lett.*, vol. 3, no. 5, pp. 356–361, 2012.
- [175] S. F. Chin, K. S. Iyer, and C. L. Raston, "Facile and green approach to fabricate gold and silver coated superparamagnetic nanoparticles," *Cryst. Growth Des.*, vol. 9, no. 6, pp. 2685–2689, 2009.
- [176] D. Aron, A. Zorko, R. Dominko, A. Roy, V. Srinivas, and S. Ram, "prepared by chemical reduction A comparative study of the magnetic properties of bulk and nanocrystalline," *J. Phys. - Condens. Matter*, vol. 8, no. 015218, pp. 1–8, 2008.
- [177] Y. Ichiyanagi and S. Yamada, "The size-dependent magnetic properties of Co₃O₄ nanoparticles," *Polyhedron*, vol. 24, no. 16–17, pp. 2813–2816, 2005.
- [178] J. M. Coey, *Magnetism and Magnetic Materials*. Cambridge University Press, 2009.
- [179] D. Bin Shieh *et al.*, "Aqueous dispersions of magnetite nanoparticles with NH₃⁺ surfaces for magnetic manipulations of biomolecules and MRI contrast agents," *Biomaterials*, vol. 26, no. 34, pp. 7183–7191, 2005.
- [180] C. Lang, D. Schüler, and D. Faivre, "Synthesis of magnetite nanoparticles for bio- and nanotechnology: Genetic engineering and biomimetics of bacterial magnetosomes," *Macromol. Biosci.*, vol. 7, no. 2, pp. 144–151, 2007.
- [181] N. D. Chasteen and P. M. Harrison, "Mineralization in ferritin: an efficient means of iron storage," *J. Struct. Biol.*, vol. 126, no. 3, pp. 182–194, 1999.
- [182] G. R. Bakkers and R. F. Boyerg, "Iron Incorporation into Apoferritin," *J. Biol. Chem.*, vol. 261, no. 28, pp. 13182–13185, 1986.

- [183] K. D. Welch, M. E. Van Eden, and S. D. Aust, "Modification of ferritin during iron loading," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 31, no. 8, pp. 999–1006, 2001.
- [184] J. K. Lassila, *Protein Cages*, vol. 1252. 2015.
- [185] E. C. Theil, "Ferritin: The protein nanocage and iron biomineral in health and in disease," *Inorg. Chem.*, vol. 52, no. 21, pp. 12223–12233, 2013.
- [186] X. Liu, W. Jin, and E. C. Theil, "Opening protein pores with chaotropes enhances Fe reduction and chelation of Fe from the ferritin biomineral.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 100, no. 7, pp. 3653–3658, 2003.
- [187] N. D. Chasteen and P. M. Harrison, "Mineralization in ferritin: An efficient means of iron storage," *J. Struct. Biol.*, vol. 126, no. 3, pp. 182–194, 1999.
- [188] N. D. Chasteen and P. M. Harrison, "Mineralization in Ferritin : An Efficient Means of Iron Storage," vol. 194, pp. 182–194, 1999.
- [189] S. Stefanini *et al.*, "Thermal stability of horse spleen apoferritin and human recombinant H apoferritin," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 325, no. 1, pp. 58–64, 1996.
- [190] C. L. Snow *et al.*, "Ferritin iron mineralization proceeds by different mechanisms in MOPS and imidazole buffers," *J. Inorg. Biochem.*, vol. 105, no. 7, pp. 972–977, 2011.
- [191] S. Laurent *et al.*, "Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations and biological applications," *Chem. Rev.*, vol. 108, no. 6, pp. 2064–2110, 2008.
- [192] M. Mahmoudi, S. Sant, B. Wang, S. Laurent, and T. Sen, "Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): Development, surface modification and applications in chemotherapy," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 63, no. 1–2, pp. 24–46, 2011.

- [193] E. M. Múzquiz-Ramos, V. Guerrero-Chávez, B. I. Macías-Martínez, C. M. López-Badillo, and L. A. García-Cerda, "Synthesis and characterization of maghemite nanoparticles for hyperthermia applications," *Ceram. Int.*, vol. 41, no. 1, pp. 397–402, 2014.
- [194] Y. Tan, Z. Zhuang, Q. Peng, and Y. Li, "Room-temperature soft magnetic iron oxide nanocrystals: Synthesis, characterization, and size-dependent magnetic properties," *Chem. Mater.*, vol. 20, no. 15, pp. 5029–5034, 2008.
- [195] V. Kalidasan, X. Li, T. Seng, H. Yong, and Y. Jun, "Bovine Serum Albumin-Conjugated Ferrimagnetic Iron Oxide Nanoparticles to Enhance the Biocompatibility and Magnetic Hyperthermia Performance," *Nano-Micro Lett.*, vol. 8, no. 1, pp. 80–93, 2016.
- [196] K. Woo *et al.*, "Easy Synthesis and Magnetic Properties of Iron Oxide Nanoparticles," *Chem. Mater.*, vol. 16, no. 14, pp. 2814–2818, 2004.
- [197] G. C. Ford *et al.*, "Ferritin: Design and Formation of an Iron-Storage Molecule," pp. 551–565, 1984.
- [198] A. S. Pereira, W. Small, C. Krebs, P. Tavares, D. E. Edmondson, and E. C. Theil, "Accelerated Publications Direct Spectroscopic and Kinetic Evidence for the Involvement of a Peroxodiferric Intermediate during the Ferroxidase Reaction in Fast Ferritin Mineralization †," vol. 37, no. 28, 1998.
- [199] P. Kucheryavy *et al.*, "Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles with Variable Size and an Iron Oxidation State as Prospective Imaging Agents," 2012.
- [200] S. Nie *et al.*, "Insight into Magnetite's Redox Catalysis from Observing Surface Morphology during Oxidation," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 135, no. 27, pp. 10091–10098, Jul. 2013.
- [201] L. Signorini *et al.*, "Size-dependent oxidation in iron O iron oxide core-shell

nanoparticles,” pp. 1–8, 2003.

- [202] S. P. Schwaminger, D. Bauer, F. E. Wagner, and S. Berensmeier, “Oxidation of magnetite nanoparticles: impact on surface and crystal properties †,” *CrystEngComm*, 2016.
- [203] G. S. Parkinson, “Iron oxide surfaces,” *Surface Science Reports*, vol. 71, no. 1, pp. 272–365, 2016.
- [204] P. Kucheryavy *et al.*, “Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles with Variable Size and an Iron Oxidation State as Prospective Imaging Agents,” *Langmuir*, vol. 29, no. 2, pp. 710–716, 2013.
- [205] R. M. Patil *et al.*, “Comprehensive cytotoxicity studies of superparamagnetic iron oxide nanoparticles,” *Biochem. Biophys. Reports*, vol. 13, no. December 2017, pp. 63–72, 2018.
- [206] M. Wang *et al.*, “Cross-linked heterogeneous nanoparticles as bifunctional probe,” *Chem. Mater.*, vol. 24, pp. 2423–2425, 2012.
- [207] H. Zhang, X. Zhong, J. Xu, and H. Chen, “Fe₃O₄/Polypyrrole/Au Nanocomposites with Core/ Shell/Shell Structure: Synthesis, Characterization, and Their Electrochemical Properties,” *Langmuir*, vol. 24, no. 26, pp. 13748–13752, 2008.
- [208] F. H. Lin, H. H. Peng, Y. H. Yang, and R. A. Doong, “Size and morphological effect of Au-Fe₃O₄ heterostructures on magnetic resonance imaging,” *J. Nanoparticle Res.*, vol. 15, 2013.
- [209] H. Yu, M. Chen, P. M. Rice, S. X. Wang, R. L. White, and S. Sun, “Dumbbell-like bifunctional Au-Fe₃O₄ nanoparticles,” *Nano Lett.*, vol. 5, pp. 379–382, 2005.
- [210] Y. Hu, L. Meng, L. Niu, and Q. Lu, “Facile Synthesis of Superparamagnetic Fe₃O₄ @ polyphosphazene @ Au Shells for Magnetic Resonance

- Imaging and Photothermal Therapy,” *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 5, no. 11, pp. 4586–4591, 2013.
- [211] H.-Y. Park *et al.*, “Fabrication of magnetic core@shell Fe oxide@Au nanoparticles for interfacial bioactivity and bio-separation.,” *Langmuir*, vol. 23, no. 17, pp. 9050–9056, 2007.
- [212] J. Kim *et al.*, “Designed fabrication of multifunctional magnetic gold nanoshells and their application to magnetic resonance imaging and photothermal therapy,” *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 45, no. 46, pp. 7754–7758, 2006.
- [213] C. Sun *et al.*, “Fine-tuned H-ferritin nanocage with multiple gold clusters as near-infrared kidney specific targeting nanoprobe,” *Bioconjug. Chem.*, vol. 26, no. 2, pp. 193–196, 2015.
- [214] U. Tamer, Y. Gündoğdu, I. H. Boyaci, and K. Pekmez, “Synthesis of magnetic core-shell Fe₃O₄-Au nanoparticle for biomolecule immobilization and detection,” *J. Nanoparticle Res.*, vol. 12, no. 4, pp. 1187–1196, 2010.
- [215] N. R. Jana, L. Gearheart, and C. J. Murphy, “Seeding growth for size control of 5-40 nm diameter gold nanoparticles,” *Langmuir*, vol. 17, no. 22, pp. 6782–6786, 2001.
- [216] X. Liu, M. Atwater, J. Wang, and Q. Huo, “Extinction coefficient of gold nanoparticles with different sizes and different capping ligands,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 58, no. 1, pp. 3–7, 2007.

APÉNDICE

Anexo 1

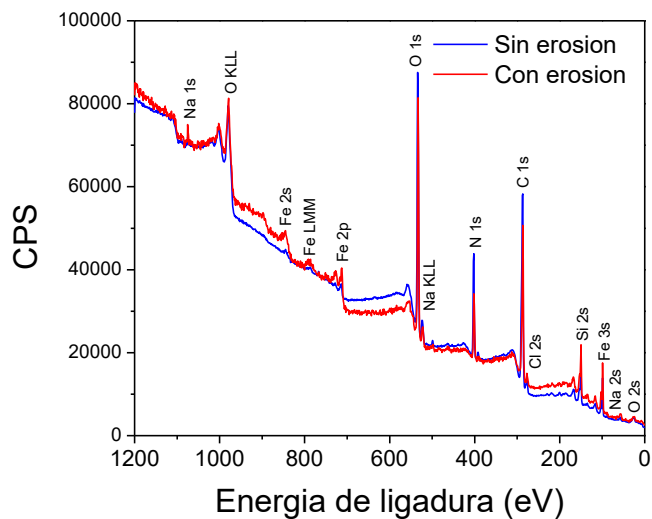


Figura A 1.1. Espectros de XPS de ferritina antes y después de erosionar con Ar^+ .

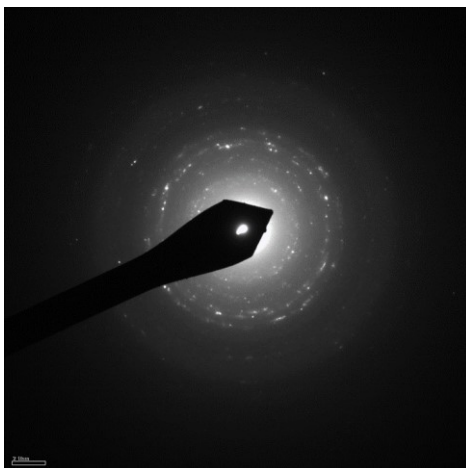


Figura A 1.2. Difracción de electrones de área seleccionada de ferritina (HSF). Los anillos difusos no permiten la identificación de las distancias interplanares cristalinas.

Anexo 2

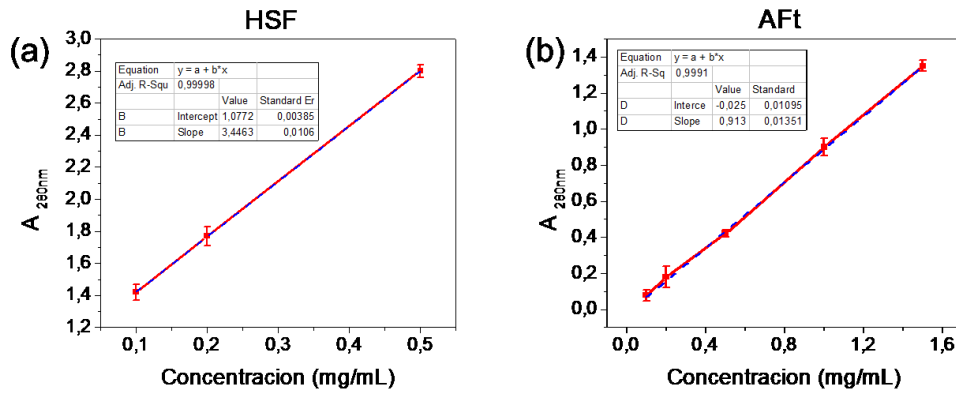


Figura A 2.1. Curvas de $A_{280\text{ nm}}$ para determinación del coeficiente de extinción molar ϵ^{280} para ferritina (a) y apoferritina (b).

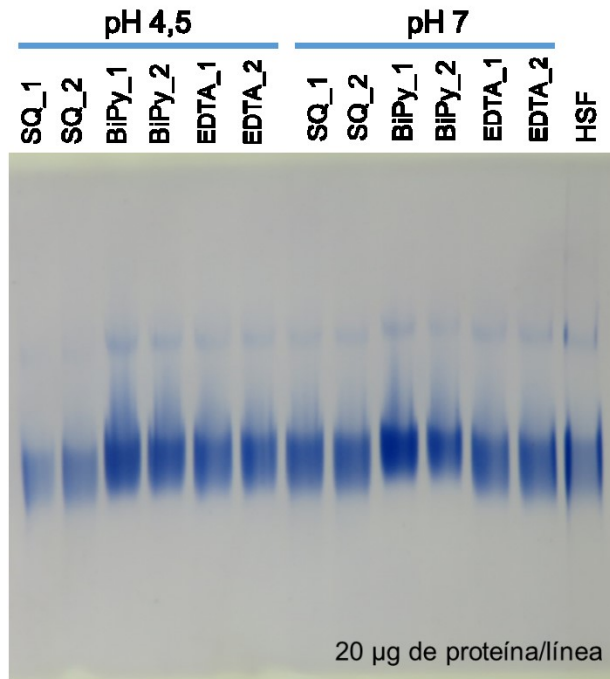


Figura A 2.2. Perfil electroforético en gel no denaturante de las muestras de apoferritina y ferritina nativa (HSF).

Anexo 3

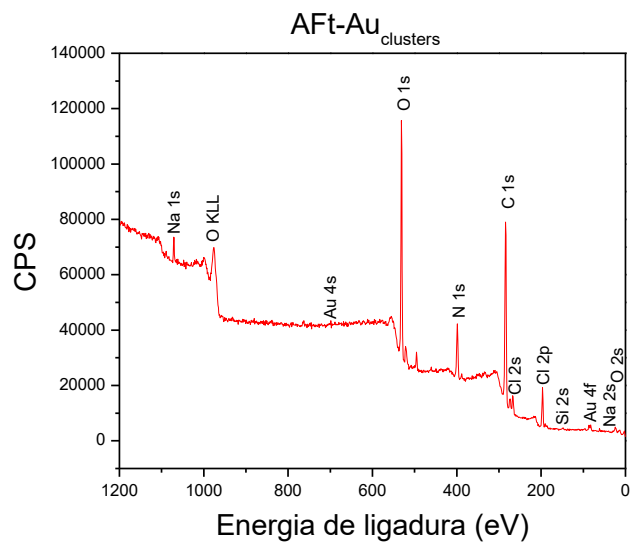


Figura A 3.1. Espectro XPS de la muestra con *clusters* de oro.

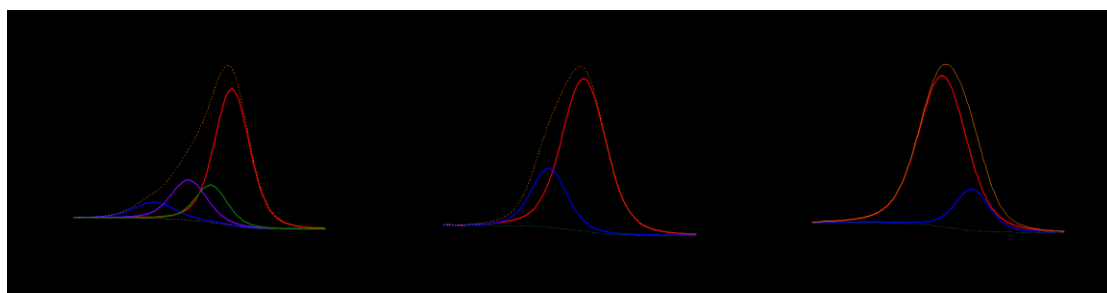


Figura A 3.2. Espectros XPS de alta resolución de muestra con *clusters* de oro para las señales C 1s, N 1s y O 1s.

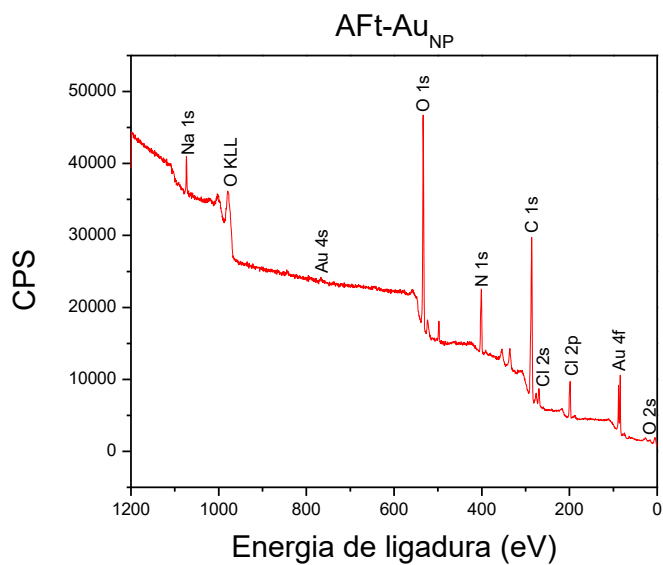


Figura A 3.3. Espectro XPS de la muestra con nanopartículas de oro.

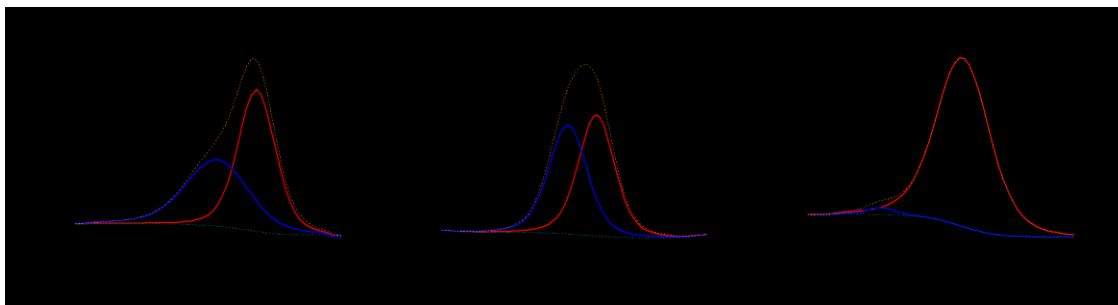


Figura A 3.4. Espectros XPS de alta resolución de muestra con nanopartículas de oro para las señales C1s, N1s y O1s.

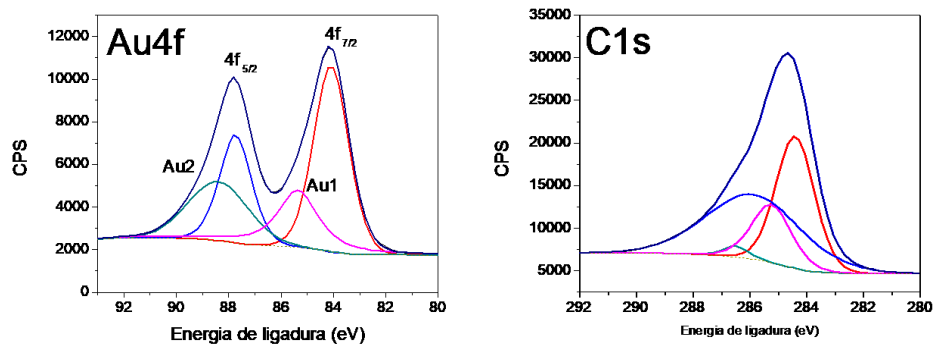


Figura A 3.5. Espectros XPS de alta resolución de señales Au4f y C1s de muestra de nanopartículas de oro sintetizadas con exceso de ácido ascórbico.

Anexo 4

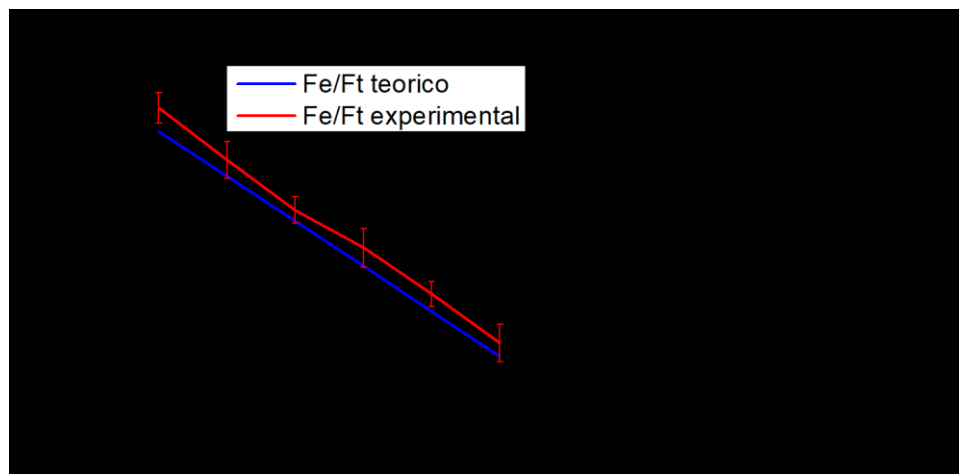


Figura A 4.1. Curva de calibrado para la remoción controlada del hierro de la ferritina.

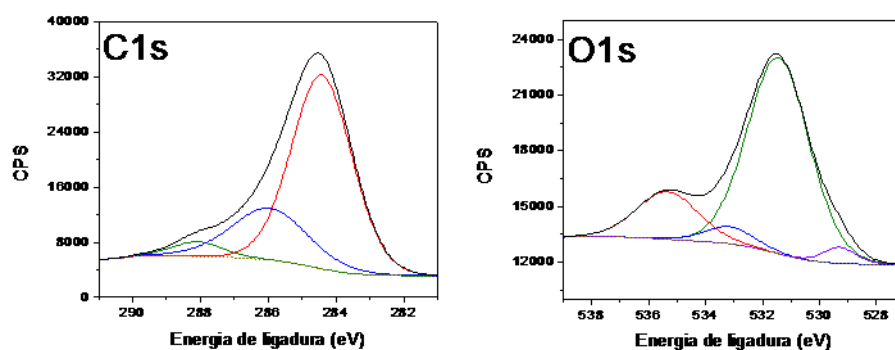


Figura A 4.2. Ajuste de curvas de XPS para las señales C1s y O1s de muestra con 650 Fe/Ft obtenida a 50°C y pH 9.

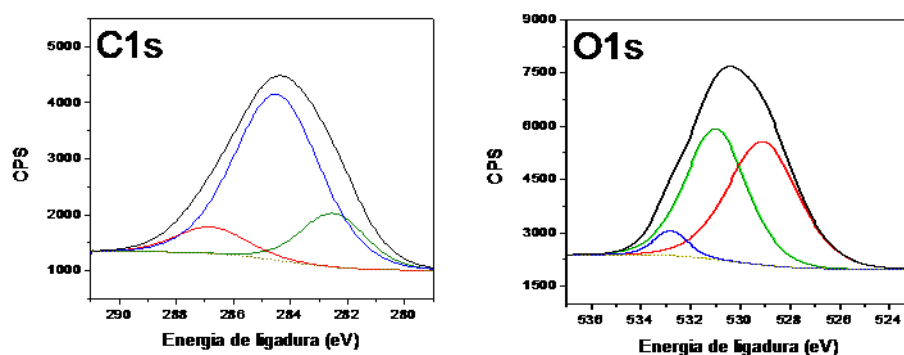


Figura A 4.3. Ajuste de curvas de XPS para las señales C1s y O1s de muestra con 1250 Fe/Ft obtenida a 50°C y pH 9.

Anexo 5

Síntesis de nanoestructuras de oro en dentro de la ferritina con óxidos de hierro en la cavidad

Con el propósito de obtener un material magneto-plasmónico mediante la síntesis de nanoestructuras de oro en la cavidad de ferritina cargada con óxidos de hierro, se prepararon muestras de proteína con contenido de hierro decreciente mediante descarga controlada, en vistas a su posterior carga con nanoestructuras de oro.

Se prepararon muestras con distinto contenido de hierro partiendo siempre desde ferritina (HSF), la remoción controlada fue realizada con estimaciones teóricas de 600, 400, 200 y 100 Fe/Ft. También se utilizó HSF (800 Fe/Ft) como ensayo de control. La preparación de la muestras es realizada por la adición estequiométrica de alícuotas de TGA al 1% ajustado a pH 4,5 y la diálisis es asistida por EDTA. Posterior a las descargas de hierro se realizó el procedimiento de síntesis de *clusters* y nanopartículas de oro para cada muestra con distinto contenido de hierro.

Considerando el procedimiento descrito se evaluó el parámetro Fe/Ft de cada muestra obtenida por descarga controlada y posterior a las reducciones sucesivas, con NaBH₄ y ácido ascórbico para la síntesis de los *clusters* y nanopartículas, respectivamente. La formación de las nanopartículas es evaluada por la existencia del SRP en el espectro de absorbancia UV-Vis.

Los resultados del contenido de hierro determinados por el ensayo Fe-BiPy y BCA para las muestras de remoción controlada indican que se obtuvieron ferritinas con un contenido de hierro gradualmente más bajo, con valores

cercanos a los estimados teóricamente, tabla A 5.1. Por otro lado se observa que las reducciones sucesivas para la síntesis de los *clusters* y nanopartículas de oro remueven masivamente el hierro presente en la proteína.

Fe/Ft teórico	Fe/Ft real	Fe/Ft 1° red	Fe/Ft 2° red
HSF	820±5%	200±50%	<50
600	550±18%	250±40%	100±30%
400	450±10%	100±50%	<50
200	170±30%	<50	<50
100	50±200%	<50	<50

Tabla A 5.1. Contenido de hierro (Fe/Ft) de las muestras por descarga controlada de hierro. Se expresa la cantidad teórica estimada, la real y los valores posteriores a la primera y segunda reducción.

El estudio del contenido de hierro indica que los dos agentes reductores utilizados para la síntesis de las nanoestructuras de oro son capaces de reducir el Fe^{+3} a Fe^{+2} , produciendo su remoción de la cavidad de la proteína y que la diálisis posterior a las reducciones son capaces de extraerlo efectivamente del medio. Este efecto que es observado en todas las muestras, llegando a valores cercanos a la apoferritina (<50 Fe/Ft). Es por tanto que esta ruta es perjudicial para las propiedades magnéticas deseadas ya que elimina el componente magnético dado por los óxidos de hierro.

La caracterización óptica de las muestras preparadas en la figura A 5.1 se presentan los espectros de absorbancia de las muestras con distinto contenido de hierro, previo a la incubación con oro y posterior a las dos reducciones. En los espectros de las muestras con contenidos de hierro iniciales de 800 a 200 Fe/Ft no se observa la existencia del SRP, mientras que en la muestra con 100 Fe/Ft

iniciales, se presenta una banda de absorción con un máximo a los 572 nm la que es atribuida a la formación de las nanopartículas de oro.

La formación de las nanopartículas en la cavidad de la proteína requiere de la existencia previa de los *clusters* para su formación, por lo que debe incorporarse suficiente de oro para su posterior reducción y nucleación, así como un espacio mínimo de 2 nm para dar origen a los *clusters*. Este es el caso de las muestras con contenido de hierro de 800 a 200 Fe/Ft teórico, los que no presentan el SRP característico de las nanopartículas, debido a que el contenido de hierro no permite la incorporación y nucleación del oro que da origen a los *clusters* para posterior formación de las nanopartículas en una segunda adición de oro y reducción.

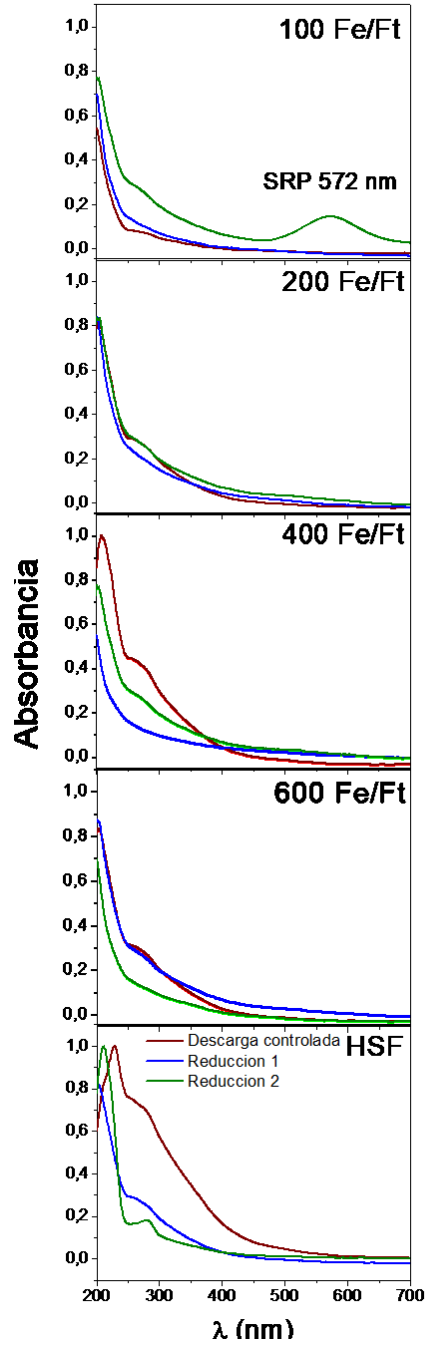


Figura A 5.1. Espectros de absorbancia de muestras con distinto contenido de hierro utilizadas para la síntesis de nanoestructuras en la cavidad de la proteína. HSF: Horse spleen ferritin.

La posición y forma del plasmón en las nanopartículas depende principalmente del tamaño y la forma que estas poseen, también incide en menor grado el entorno que las rodea, como agentes capantes y solventes. Comúnmente, las nanopartículas de oro en un rango de tamaño de 5 a 35 nm presentan un SRP de 520 a 530 nm [215],[216]. Por otro lado, las nanopartículas formadas en la muestra con un contenido teórico de 100 Fe/Ft presentan plasmón a 572 nm, lo que representa un desplazamiento batocrómico con respecto a nanopartículas de tamaño similar. Dicho corrimiento puede ser atribuido a interacciones entre la superficie de las nanopartículas de oro y remanentes de hierro presentes en la proteína, lo que se representa como la constante dieléctrica del medio.

Considerando los resultados en la evaluación de la ruta de remoción controlada para la posterior síntesis de las nanoestructuras, se concluye que las reacciones requeridas para la formación de *clusters* y posteriormente de nanopartículas son perjudiciales para los óxidos de hierro, debido a que el proceso promueve su remoción, eliminando el componente magnético. La formación de las nanopartículas de oro depende fuertemente del bajo contenido de hierro presente en la proteína. Es debido a la pérdida de hierro que la presente ruta es descartada.

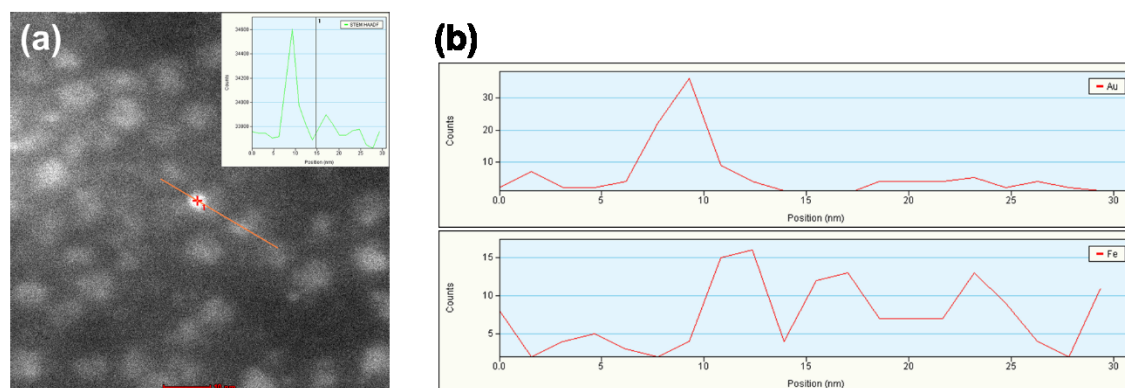


Figura A 5.2. Imagen TEM con escala de 10 nm e inserto del perfil de intensidades (a). Perfiles de composición de las señales de Au y Fe para el trazo de la imagen TEM (b).

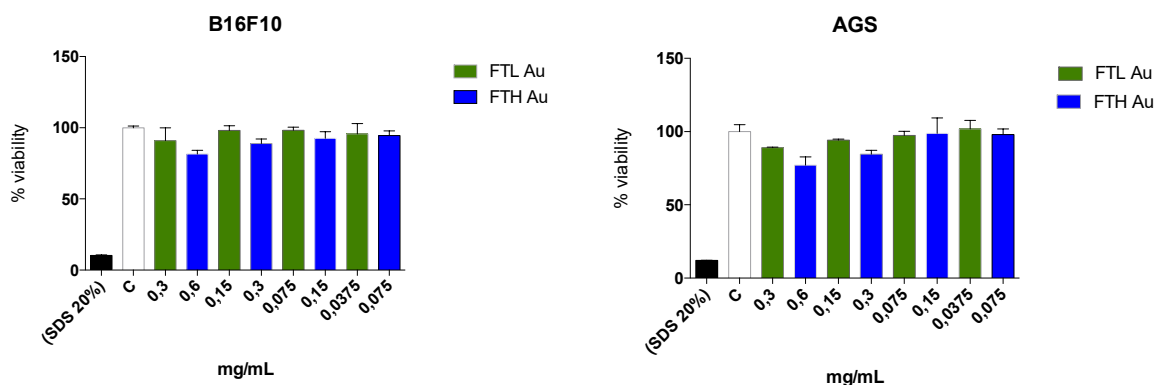
Anexo 6

A partir de ferritinas recombinantes compuestas exclusivamente por cadenas H (FTH) y cadenas L (FTL) facilitadas por la Dra. Margarita Santiago del CeBiB se sintetizaron nanopartículas de oro en su cavidad, replicando la metodología utilizada en el Capítulo 5. Los resultados de cuantificación de oro mediante absorción atómica (AAS) indican que la muestra FTL-Au presenta una mayor cantidad de oro con 230 Au/Ft en comparación con la muestra FTH-Au que posee 170 Fe/Ft, sin embargo, se necesitan realizar nuevas mediciones para confirmar dicha tendencia y obtener validez estadística.

Las muestras de proteína recombinante con nanopartículas de oro se evaluó la toxicidad en función de la concentración de proteína por cada muestra. Se emplearon en primera instancia células B16F10 de melanoma murino, y AGS, una línea celular de cáncer gástrico para los ensayos. Este trabajo fue realizado por el Dr. Simón Guerrero de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

Anexo 6. Información complementaria

Los resultados presentados en la figura A6.1 dan cuenta que a mayor concentración de FTH-Au se aprecia una leve tendencia a disminuir la viabilidad, lo que se halla relacionado con una mayor concentración de oro en la muestra y a una internalización de las mismas a las células.



.Figura A6.1. Viabilidad celular por ensayo de MTS sobre B16F10 y AGS.

Posteriormente se evaluó la internalización en una serie de líneas celulares de origen cancerígeno, empleándose concentraciones máximas de proteína disponibles. Fueron evaluadas las líneas celulares B16F10 de melanoma murino-ratón, AGS una línea celular de adenocarcinoma gástrico humano, HT29, adenocarcinoma de colon humano, MDA MB 231, cáncer glandular mamario y una línea celular de riñón humano proveniente de embrión no cancerígena. El estudio preliminar por MTS de las distintas líneas celulares muestra que las muestras con nanopartículas de oro utilizando ferritinas humanas exclusivamente de cadena H (FTH) presentan una tendencia a una menor viabilidad celular, debido a la fácil internación de la proteína cargada con oro. Las líneas HT29 y MDA se vieron más afectadas a mayores concentraciones que lo observado en B16F10, HEK o AGS.

PUBLICACIONES

El capítulo 4 de la presente tesis derivó en una publicación titulada “*An optimized low-cost protocol for standardized production of iron-free apoferritin nanocages with high protein recovery and suitable conformation for nanotechnological applications*”, la que se encuentra publicada en la revista *Journal of Inorganic Biochemistry*, 183 (2018), 184-190.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2017.11.019>



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Inorganic Biochemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jinorgbio

An optimized low-cost protocol for standardized production of iron-free apoferritin nanocages with high protein recovery and suitable conformation for nanotechnological applications

Italo Moglia^a, Margarita Santiago^b, Álvaro Olivera-Nappa^{a,b,*}, Mónica Soler^{a,*}^a Department of Chemical Engineering, Biotechnology and Materials, FCFM, University of Chile, Beauchef 851, Santiago, Chile^b Center for Biotechnology and Bioengineering – CBB, FCFM, University of Chile, Beauchef 851, Santiago, Chile

ARTICLE INFO

Keywords:

Apo-ferritin production
 Iron-devoided ferritin
 Iron chelators
 pH effect
 Monomeric ferritin
 Oligomeric ferritin

ABSTRACT

Ferritin is a globular protein that consists of 24 subunits forming a hollow nanocage structure that naturally stores iron oxyhydroxides. Elimination of iron atoms to obtain the empty protein called apoferritin is the first step to use this organic shell as a nanoreactor for different nanotechnological applications. Different protocols have been reported for apoferritin formation, but some are time consuming, others are difficult to reproduce and protein recovery yields are seldom reported. Here we tested several protocols and performed a complete material characterization of the apoferritin products using size exclusion chromatography, UV–vis spectroscopy, inductively coupled plasma optical emission spectrometry and dynamic light scattering. Our best method removes more than 99% of the iron from loaded holoferritin, recovering 70–80% of the original protein as monomeric apoferritin nanocages. Our work shows that pH conditions of the reduction step and the presence and nature of chelating agents affect the efficiency of iron removal. Furthermore, process conditions also seem to have an influence on the monomer:aggregate proportion present in the product. We also demonstrate that iron contents markedly increase ferritin absorbance at 280 nm. The influence of iron contents on absorbance at 280 nm precludes using this simple spectrophotometric measure for protein determination in ferritin-iron complexes. Apoferritin produced following our protocol only requires readily-available, cheap and biocompatible reagents, which makes this process standardizable, scalable and applicable to be used for *in vivo* applications of ferritin derivatives as well as nanotechnological and biotechnological uses.

1. Introduction

Ferritin is a natural iron-storage and iron-buffer protein, which can store up to 4500 iron atoms in the form of ferric oxyhydroxide mineral and releases iron in a controlled fashion. In humans, ferritin acts as a buffer against iron deficiency or iron overload [1]. Structurally, it presents a quaternary structure assembled by the interaction of twenty-four subunits that create a hollow sphere-like conformation with an outer diameter of 12 nm and a cavity of 8 nm [2], and two types of small channels formed between subunits – 3-fold symmetry and 4-fold symmetry channels – spanning from the outside into the internal cavity. In mammals, ferritin is formed by two kinds of subunits, light (L) and heavy (H) chains, which vary in proportion depending on the tissue source and function, adding up to a total protein molar mass of ~450 kDa. The H and L chains have different masses of 21 and 19 kDa, respectively. Each subunit has been assigned a specific role: H chains display ferroxidase activity able to catalyze the oxidation of Fe(II) to Fe

(III) with molecular oxygen at body temperature, while L chains have nucleation sites for iron oxyhydroxides nucleation [3]. Fe(III) remains inside the protein cavity as insoluble precipitates and can be released from ferritin once it is reduced back to Fe(II) by external reducing agents.

Apo-ferritin is the iron-devoided spherical protein shell of ferritin that forms a biocompatible nanocage, which can be used to carry different encapsulated nanoparticles or functional molecules and is stable enough to be chemically or genetically modified to generate derivatives for nanotechnological and biotechnological applications. The synthesis of metallic nanoparticles inside apoferritin nanocages has been reported for gold [4], copper [5], silver [6] and platinum [7] among others, as well as alloys such gold-silver [8] and palladium-gold [9]. Some metal oxides have also been synthesized inside the ferritin cavity, such as Fe₃O₄ [10] and Co₂O₄ [11]. In addition, apoferritin has also been used to encapsulate molecules for drug delivery and biostabilization. Entrance of small molecules and ions into ferritin nanocages is

* Corresponding authors.

E-mail addresses: anlivera@ing.uchile.cl (Á. Olivera-Nappa), msoler@ing.uchile.cl (M. Soler).<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2017.11.019>

Received 12 July 2017; Received in revised form 24 October 2017; Accepted 17 November 2017

Available online 21 November 2017

0162-0134/© 2017 Published by Elsevier Inc.

