

**Universidad de Granada**  
**Departamento de Química Inorgánica**

# **FERRITINAS NATURALES Y SINTÉTICAS.**

## **IMPLICACIONES NANOBIMÉDICAS**



**Tesis Doctoral**

**María Belén Fernández López**  
**Granada, Abril 2009**



**UNIVERSIDAD DE GRANADA**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA INORGÁNICA**



**FERRITINAS NATURALES Y SINTÉTICAS.**

**IMPLICACIONES NANOBIMÉDICAS**

**TESIS DOCTORAL**

**MARÍA BELÉN FERNÁNDEZ LÓPEZ**

**Granada, 30 de abril de 2009**

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: María Belén Fernández López  
D.L.: GR. 2099-2009  
ISBN: 978-84-692-2717-6





# FERRITINAS NATURALES Y SINTÉTICAS.

## IMPLICACIONES NANOBiomédicas

Memoria presentada por **D<sup>a</sup>. María Belén Fernández López** para aspirar al grado de doctor por la Universidad de Granada.

Granada, Abril del 2009

Fdo. María Belén Fernández López

LOS DIRECTORES DE LA MEMORIA

**Dr. José Manuel Domínguez Vera.**

Profesor Titular del Departamento de Química Inorgánica. Facultad de Ciencias. Universidad de Granada

**Dra. Natividad Gálvez Rodríguez.**

Contratada Ramón y Cajal en el Departamento de Química Inorgánica. Facultad de Ciencias. Universidad de Granada



*A mis padres,  
Rafael y María Elena*

*“Queda prohibido no sonreír a los problemas,  
no luchar por lo que quieres,  
abandonarlo todo por miedo,  
no convertir en realidad tus sueños...”*

*Pablo Neruda*



*Gracias a todos los que habéis hecho posible este día, a vuestro apoyo y ánimo continuo.*

*Gracias a todos los componentes de mi grupo de investigación, por haberme guiado y enseñado todo lo que se. En especial, gracias a ti, Josema, por haber creído en mí y por haberme deseado siempre lo mejor, por tu cariño y respeto. Gracias Nati, por haber trabajado conmigo y por haberme guiado en mis inicios dentro del laboratorio, por todas esas interminables horas y por los viajes compartidos. Gracias Puri, por compartir conmigo dos de mis grandes aficiones, la investigación y la música, sin ti no habría tenido la oportunidad de escribir hoy estas líneas, lo que hace que te tenga un especial cariño. Gracias Rafa, a pesar de la distancia siempre has estado cuando te he necesitado.*

*Gracias a todos los profesores del Departamento de Química Inorgánica, por todo lo que hemos vivido juntos en estos cuatro años, en especial al grupo de "Coordinación" encabezado por el Profesor D. Enrique Colacio, por celebrar con nosotros todas nuestras alegrías, y por tratarme como una integrante más de su grupo. Gracias, Pepe, A. Mota, Juanma, Antonio...*

*No puedo dejar de nombrar a dos personas muy especiales en este departamento para mí, Mari Carmen y Antonio de la Torre. Gracias por vuestra disposición y amabilidad constante.*

*Gracias al Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada por facilitarme el uso de sus instalaciones. Gracias, D.<sup>a</sup> M<sup>a</sup> del Mar Abad Ortega, responsable del HREM, D. David Porcel Muñoz, responsable de la Microscopia Láser Confocal, D. Alfredo Molina Quesada, responsable del SQUID, D.<sup>a</sup> Bendición Funes*

*Martín responsable de AAS y D. José Romero Garzón, responsable de Difracción de RX.*

*Gracias a los Profesores D. Rafael Cuesta y D. Ruperto Bermejo, del Departamento de Química Inorgánica y Orgánica de la E.P.S. de Linares, por su ayuda en las medidas de Fluorescencia, y la puesta a punto de sistemas de Cromatografía por Exclusión de Tamaño.*

*Gracias al Profesor D. José Juan Calvino, del Departamento de Ciencia de Materiales e Ingeniería Metalúrgica y Química Inorgánica de la Universidad de Cádiz, por el trabajo desarrollado conjuntamente entre ambos grupos. En especial a la Dra. Susana Trasobares y la Dra. Ana B. Hungría, por las numerosas horas delante del TEM para obtener un buen análisis de EELS y una magnífica imagen.*

*Gracias al Profesor D. Marcelo Ceolín, del Instituto de Físico-Química Teórica y Aplicada, de la Universidad Nacional de la Plata, Argentina, por los tediosos análisis de SAXS y XANES. Colaborar con alguien como él hace que la investigación sea más fácil ya que su aportación a nivel científico y personal ha sido maravillosa.*

*Gracias al Profesor D. Francisco Santoyo y a los doctores Julia Morales y Mariano Ortega, del Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada por vuestra ayuda en la síntesis de los colorantes y NBD solubles.*

*Thanks of all, Richard Watt and Gerald Watt, for your scientific advice and your hospitality.*

*Un ringraziamento speciale ai professori Andreu Sbarbati, Pasquina Marzola, Laura Calderan, e Federico Boschi, per la vostra gentilezza e per avermi insegnato le basi di OI e MRI. Grazie mille anche a Alessandro, Elena, Elisa, Silvia, Paolo, Marco, Stefano, Nicolás e Giamaica, per la vostra compagnia nei miei tre mesi in Italia.*

*Gracias a mis padres, Rafael y María Elena, sin los cuales nunca habría conseguido estar aquí, gracias por enseñarme a luchar por mis sueños, gracias por creer siempre en mí, gracias, porque a vosotros os lo debo todo. Gracias, a mis hermanos, Rafilla, Dani y Elo, por aguantar mis malos humos y ayudarme en mi día a día. Gracias, porque sois lo más importante en mi vida.*

*A mi alma gemela, por apoyarme cuando no tenía apoyo...por escucharme cuando mis palabras se perdían sin sentido, por aconsejarme cuando no veía salida y por ayudarme cada vez que sin decírtelo te he necesitado. Gracias Rafilla.*

*Gracias a mis amigas de toda la vida, Victoria y Pili, las cuales han crecido conmigo, por hacer un gran esfuerzo para entender que es eso de la "nanotecnología". Gracias, Rosita, Elena, Inmita, Raquel, Rosa, Rodríguez, Tomi, por hacer tan valiosos los momentos que hemos pasado juntos.*

*Gracias a dos chicos muy especiales en mi vida, a mi Dieguillo y a mi Antoñillo, por estar conmigo en los buenos momentos y sobretodo por estar ahí cuando más los he necesitado, ¡en los momentos no tan buenos!. Gracias Dieguillo, por ser mi amigo desde los estudios, por hacerme creer que de verdad existen los amigos verdaderos. Gracias por ser tú. Gracias Antoñillo, por convertirte en uno de mis mejores amigos, gracias por tu apoyo en el día a día, gracias por todo.*



*Gracias a todos los que habéis pasado por la “salita”, en especial a mis niñas, Elsa, Chiqui y Ana, por todas las “milnos” compartidas juntas. Gracias Elsa, por ser la mejor compañera que podría haber tenido nunca, por ser no sólo una gran colega de trabajo, sino una de mis mejores amigas. Gracias Chiqui por todas nuestras confidencias, por los buenos momentos que llegamos a compartir. Gracias Ana, por darte a conocer y superar en muchos momentos tu timidez para valorar nuestra amistad. Gracias a vosotras tres por hacer de cada día de trabajo, un día especial.*

*Gracias a mi coro, por permitirme aprender tantísimo de la música y desahogarme en las tardes de los viernes. En especial a Paquillo y César, por sus visitas al departamento cuando me he ausentado de los ensayos semanales, y a mis “sopraninis”, Nuria, Inma y Amparo, por esos magníficos ensayos en los cuales siempre nos ganábamos la regañina del Director.*

*Gracias a la Consejería de Innovación y Ciencia de la Junta de Andalucía por la concesión de mi beca predoctoral, adjunta al proyecto de excelencia FQM-425, que me ha permitido llevar a cabo este trabajo. Gracias al Ministerio de Educación y Ciencia por la concesión del proyecto CTQ2006-02840 que ha financiado la investigación que he desarrollado estos años.*

# PREFACIO



Todos los organismos vivos requieren hierro para su desarrollo y por este motivo se almacena cuando se encuentra en exceso para un posible uso posterior. Al mismo tiempo, el rango de concentración de hierro óptimo para el cuerpo humano es muy estrecho, de tal forma que ligeros aumentos tienen consecuencias fatales sobre el propio organismo, debido fundamentalmente a la conocida reacción de Fenton, por la que el Fe(II) es oxidado a Fe(III) generando simultáneamente radicales OH·, probablemente la especie química más oxidante y dañina para la célula. Esta reacción “indeseada” está íntimamente relacionada con el origen y desarrollo de un gran número de enfermedades, especialmente de carácter neurológico.

En toda esta compleja maquinaria metabólica de regulación de hierro, hay una molécula que juega un papel primordial: la *ferritina*, que es la proteína que se encarga de almacenar hierro en todos los organismos vivos. Así almacenado el hierro no da lugar a reacciones perjudiciales, por lo que la ferritina juega un papel de “buffer” de hierro.

La estructura de la ferritina es en sí una bionanopartícula, constituida por un núcleo metálico de óxido de Fe(III) de ~ 6 nm de diámetro y por una corteza orgánica, la apoferritina, de un espesor de aproximadamente 2 nm. La corteza proteica hace que el material metálico no pueda aglomerarse y sea soluble en H<sub>2</sub>O, alcanzando valores de concentración de Fe(III) de hasta 0.2 M. Un dato impensable dado el carácter polarizante del catión metálico. Esta estructura ha inspirado una vía de preparación de nuevas nanopartículas metálicas en las que el núcleo metálico y la corteza proteica pueden ser químicamente modificados o sustituidos, generando un amplio abanico de nanopartículas con funcionalidad muy variada.

La función biológica trascendental de esta molécula, su estructura como precursora de la preparación de otras nanopartículas metálicas, hacen de esta molécula un paradigma en Bioinorgánica y Nanociencia. Son numerosos los

científicos y grupos que han dedicado por completo su carrera en pro de conocer y entender mejor las propiedades y potencialidad de la ferritina. Esta tesis pretende aportar conocimiento en este largo camino, intentando abrir nuevos enfoques que no hayan sido explorados hasta la actualidad, que puedan derivar a medio plazo en conocimiento al servicio de aplicaciones biomédicas.

# ÍNDICE



## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS (Pág.1)

## RESUMEN (Pág.3)

## SUMMARY (Pág.9)

# 1. INTRODUCCIÓN

1.1. Metabolismo del hierro en los seres vivos y su regulación: la Ferritina (Pág.13)

1.2. Estructura de la ferritina y propiedades físico-químicas. (Pág.18)

1.3. Ferritina y enfermedades neurodegenerativas (Pág.24)

1.4. Ferritina: una biomolécula paradigmática en nanotecnología. Una cavidad-nanoreactor y una superficie-plataforma para su funcionalización. (Pág.30)

BIBLIOGRAFÍA (Pág.43)

# 2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

## PUESTA A PUNTO

2.1. Eliminación y reconstitución controlada de hierro en la ferritina. (Pág.47)

Síntesis de la ApoFt (Pág.48)

Preparación de ferritinas con diferente contenido en Fe (2200-200), mediante eliminación reductiva de Fe de la ferritina nativa, Ft<sub>1200</sub>, Ft<sub>500</sub> y Ft<sub>200</sub> (Pág.49)



Preparación de ferritina con 500 átomos de Fe (Ft<sub>500</sub> AcHA) mediante eliminación de Fe de la ferritina nativa Ft<sub>2200</sub> por ácido acetohidroxámico. (Pág.50)

2.2. La homocisteína (H-cys), elimina Fe de la ferritina (Pág.50)

2.3. Ferritinas de colores: blue-Ft y red-Ft. (Pág.52)

Preparación de los colorantes (Pág.52)

Síntesis: blue-Ft y red-Ft (Pág.53)

2.4. Deposición de la ferritina sobre superficies de oro (Pág.53)

Formación de la superficie SPDP-Au (Pág.53)

Ft+SPDP-Au (Pág.54)

Ft-SPDP+Au (Pág.55)

Ft-Au (Pág.55)

2.5. Ferritinas fluorescentes: Ft-NBD (7-(2- hidrox)-4-nitrobenzofurano) (Pág.55)

Síntesis NBD (Pág.56)

Síntesis del conjugado Ft-NBD (Pág.56)

Estudio del conjugado NBD-lisina (Pág.57)

2.6. Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET): Ft-AF350, Ft-AF430 y Ft-AF350-AF430 (Pág.57)

Síntesis Ft-AF350 (Pág.57)

Síntesis Ft-AF430 (Pág.58)

Preparación del conjugado Ft-AF350-AF430 (Pág.59)

Reconstitución de la proteína a partir de ApoFt-AF350 Y ApoFt-AF430 (RApoFt- AF350-AF430) (Pág.59)

2.7. Modificación del núcleo metálico de la ferritina (Pág.60)

Síntesis Apo-Cu(0) (Pág.60)

Estudio de eliminación de Cu(II) desde la apoferritina (Pág.61)

2.8. Nanopartículas decorando nanopartículas: MFt<sub>200</sub>-QD525, MFt<sub>200</sub>-QD655, MFt<sub>200</sub>-QD800 (Pág.61)

## INSTRUMENTAL

- Diálisis (Pág.63)
- Cromatografía por exclusión de tamaño (Pág.64)
- Espectroscopia UV-visible (UV/vis) (Pág.66)
- Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) (Pág.67)
- Espectroscopia de fluorescencia (Pág.68)
- Espectroscopia de Absorción Atómica (AAS) (Pág.70)
- Medidas de Magnetismo (SQUID) (Pág.70)
- Difracción de RX en polvo (XRD) (Pág.74)
- Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM) (Pág.75)
- Microscopia confocal de fluorescencia (Pág.75)
- Microscopia de fuerza atómica (AFM) (Pág.76)
- Espectroscopia de pérdida de energía de los electrones (EELS) (Pág.77)
- Espectroscopia de absorción de rayos X (XAS) (Pág.79)
- Imagen de resonancia magnética (MRI) (Pág.83)
- Imagen óptica (OI) (Pág.85)

## BIBLIOGRAFÍA (Pág.88)

# **3. FERRITINA: ¿UN BIOMARCADOR PARA LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER?**

3.1. Generación de magnetita en la ferritina durante el proceso de eliminación de Fe. (Pág.93)

3.2. La Homocisteína elimina Fe de la ferritina: implicaciones biológicas. (Pág.104)

## BIBLIOGRAFÍA (Pág.110)

## 4 . FUNCIONALIZACIÓN DE LA FERRITINA NATIVA

4.1. Ferritinas de colores: Funcionalización de la ferritina a través de los residuos de lisina con colorantes orgánicos. (Pág.115)

4.2. Ferritina como precursor de materiales nanoestructurados. (Pág.121)

4.3. Ferritinas fluorescentes:

Nanopartículas magnético-ópticas. (Pág.126)

FRET: Tráserencia de Energía de Fluorescencia (Pág.135)

BIBLIOGRAFÍA (Pág. 151)

## 5 . MODIFICACIÓN DEL NÚCLEO METÁLICO DE LA FERRITINA

5.1. Ruta para la modificación interna del núcleo metálico de la ferritina. Síntesis de nanopartículas de Cu. (Pág.160)

BIBLIOGRAFÍA (Pág.172)

## 6 . MODIFICACIÓN INTERNA Y FUNCIONALIZACION

6.1. Nanopartículas decorando a nanopartículas (Pág.177)

6.2. Magneto ferritina-Qdot 800, bimodalidad: MRI-OI. (Pág.185)

BIBLIOGRAFÍA (Pág. 204)

**7. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS** (Pág.207)

**A**NEXO. **ARTÍCULOS PUBLICADOS** (Pág. 215)



## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS



En la siguiente tabla se presentan los acrónimos de las especies químicas y técnicas experimentales frecuentemente usadas a lo largo de todo el texto.

ACRÓNIMOS	SIGNIFICADO
ApoFt	Apoferritina de bazo de caballo (Sigma-Aldrich)
AD	Enfermedad de Alzheimer
AF350	Fluoróforo de la familia Alexa Flúor (emisión a 350 nm)
AF430	Fluoróforo de la familia Alexa Flúor (emisión a 430 nm)
AAS	Espectroscopia de absorción atómica
AFM	Microscopia de fuerza atómica
bipy	2,2'-bipiridilo
EELS	Espectroscopia de pérdida de energía de electrones
EXAFS	Espectroscopia de absorción de Rayos X de estructura fina
Ft	Ferritina de bazo de caballo (Sigma-Aldrich)
HEPES	(ácido 4-(2-hidroxietil)-1- piperazín-etano-sulfónico)
HREM	Microscopia electrónica de transmisión de alta resolución
MRI	Imagen de Resonancia Magnética
NIR	Longitudes de onda cercanas al infrarrojo
OI	Imagen Óptica
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
QD	Quantum dots
TTMAPP	tetra- <i>p</i> -tosilato de 5,10,15,20-tetrakis (4(trimetilamino) fenil)-21H,23H-porfirina
TGA/AcONA	ácido tioglicólico/aceto sódico
TEM	Microscopia electrónica de transmisión
UV-Vis	Espectroscopia Ultravioleta visible
XAS	Espectroscopia de absorción de Rayos X
XANES	Espectroscopia de absorción de Rayos X cerca del borde
XRD	Difracción de Rayos X en polvo



En esta tabla se presentan los acrónimos de los compuestos sintetizados

<b>COMPUESTOS SINTETIZADOS</b>	
<b>ACRÓNIMOS</b>	<b>SIGNIFICADO</b>
Ft <sub>2200</sub>	Ft nativa (2200 átomos de Fe)
Ft <sub>1200</sub>	Ft 1200 átomos de Fe
Ft <sub>500</sub>	Ft 500 átomos de Fe
Ft <sub>200</sub> ó MFt <sub>200</sub>	Ft 200 átomos de Fe
Ft <sub>1200</sub> H-cys	Ft 1200 átomos de Fe con homocisteína como agente reductor
Ft <sub>500</sub> H-cys	Ft 500 átomos de Fe con H-cys como agente reductor
Ft <sub>1200</sub> AcHA	Ft 1200 átomos de Fe con actohidroxámico como quelante
blue-Ft	Ft funcionalizada con Brilliant blue Remazol (colorante azul)
red-Ft	Ft funcionalizada con Reactive Orange 16 (colorante rojo)
Ft+SPDP-Au	Ft deposita en una superficie de Au tratada con SPDP
Ft-SPDP+Au	Ft tratada con SPDP deposita en una superficie de Au
Ft-NDB	Ft funcionalizada con NBD-OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH (fluoróforo)
Ft-AF350	Ft funcionalizada con Alexa Flúor 350 (fluoróforo)
Ft-AF430	Ft funcionalizada con Alexa Flúor 430 (fluoróforo)
Ft-AF350-AF430	Ft funcionalizada con ambos Alexa Flúor, 350 y 430.
RFt-AF350-AF430	Ft-AF350-AF430 tras disociación/asociación
ApoFt-Cu(II)	ApoFt encapsulando óxidos/hidróxidos de Cu(II)
ApoFt-Cu(0)	ApoFt encapsulando nanopartículas de Cu(0)
MFt <sub>200</sub> -QD525	MFt funcionalizada con Quantum Dot (emisión 525 nm)
MFt <sub>200</sub> -QD655	MFt funcionalizada con Quantum Dot (emisión 655 nm)
MFt <sub>200</sub> -QD800	MFt funcionalizada con Quantum Dot (emisión 800 nm)

# RESUMEN



El Fe es un elemento esencial en la vida de la mayoría de los seres vivos, pero un pequeño exceso de este elemento químico es altamente tóxico para el organismo, por ello debe almacenarse de forma adecuada. La principal forma de almacenaje del Fe en los organismos es la ferritina, polipéptido constituido por 24 subunidades que se autoasocian formando una esfera hueca, de 12-13 nm de diámetro, con una cavidad central de unos 6 nm, capaz de almacenar hasta 4500 átomos de Fe en forma de un mineral tradicionalmente descrito como ferrihidrita.

La función de la ferritina es almacenar el Fe que no es requerido inmediatamente por el organismo, protegiéndolo frente a la generación de los radicales libres. El Fe(II) libre es capaz de generar, mediante la reacción de Fenton, radicales hidroxilos  $\text{OH}\cdot$ , especies altamente tóxicas que provocan graves daños celulares e incluso muerte celular.

Debido a la importancia del Fe en el organismo el estudio de su metabolismo podría ayudarnos a entender el origen y desarrollo de ciertas enfermedades, especialmente aquéllas en las que aparentemente los radicales libres juegan un papel principal. Sin embargo el papel del Fe en la mayoría de las enfermedades, y por tanto el de la ferritina, ha pasado desapercibido.

Recientemente, se ha considerado el daño oxidativo generado por los radicales libres como una causa primaria en la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas, como puede ser el Alzheimer (AD). También se ha observado que en la mayoría de estas enfermedades neurodegenerativas el Fe se acumula de forma anómala. Un hecho sorprendente que ha demostrado la relación entre la ferritina y las enfermedades neurodegenerativas, es que el mineral de Fe de la ferritina sufre ciertas modificaciones en su estructura en los enfermos de Alzheimer con respecto a individuos sanos. En concreto se observa un incremento en la concentración de una mezcla de óxidos de  $\text{Fe}^{2+}$ - $\text{Fe}^{3+}$  (ej. magnetita) en los cerebros de enfermos de Alzheimer.

Considerando todo lo anteriormente dicho podemos sugerir que un mal metabolismo de la ferritina puede estar involucrado en la generación de Fe(II) libre y por tanto en la síntesis de radicales libres capaces de provocar daños celulares mediante estrés oxidativo favoreciendo el desarrollo y progreso de ciertas enfermedades neurodegenerativas, como puede ser el Alzheimer. Por tanto, el estudio de la estructura del núcleo metálico de la ferritina, podría permitirnos localizar la alteración de la ferritina y el papel que juega en el desarrollo de estas enfermedades neurodegenerativas.

En este estudio se ha demostrado que el núcleo metálico de la ferritina está formado por distintas fases de óxidos de Fe (principalmente ferrihidrita y magnetita), cuya proporción va modificándose al eliminar progresivamente Fe de la ferritina mediante un proceso de eliminación reductiva. Concretamente, al ir eliminando Fe de la ferritina se incrementa el porcentaje de magnetita y disminuye el de ferrihidrita. Por tanto, hemos llegado a la conclusión de que el contenido de magnetita en la ferritina está directamente relacionado con el proceso de eliminación reductivo de Fe. En condiciones de exceso de reductor y carencia de la chaperona que captura el Fe(II) se da una eliminación descontrolada de Fe. Numerosos estudios han demostrado que la homocisteína (H-Cys), un aminoácido no esencial, aparece a altas concentraciones en los enfermos de Alzheimer mientras que el ácido fólico, posible quelante de Fe(II), es deficiente. Debido a los resultados experimentales obtenidos, hemos propuesto un protocolo de diagnóstico precoz de AD, en el que asumimos que altas concentraciones de H-Cys promueven la liberación de Fe(II) que puede por una parte intervenir en la reacción de Fenton generando radicales libres y por otra reinternalizarse en la cavidad de la ferritina generando magnetita, al reaccionar con la ferrihidrita propia de la ferritina.

Por tanto, un incremento en los niveles sanguíneos de homocisteína y el incremento en la concentración de magnetita a nivel cerebral podrían usarse como un doble marcador para el diagnóstico precoz de Alzheimer. Esta hipótesis requiere un estudio *in vivo* más detallado.

La cavidad de la ferritina ha sido ampliamente usada como un nanoreactor para la síntesis de nanopartículas metálicas. Históricamente, la ferritina ha sido la primera biomolécula utilizada en la síntesis de nanopartículas metálicas, por lo que la podemos considerar una “molécula escuela”, que ha permitido establecer principios de síntesis que luego podrán ser extrapolados a otros sistemas que ofrezcan alguna posibilidad diferente a la que nos ofrece la ferritina, como pueden ser cavidades más complejas como las cápsidas víricas.

La capa polipeptídica externa de la ferritina a su vez posibilita su funcionalización química. Puesto que la superficie externa de la ferritina expone ciertos residuos de lisina hacia el exterior que permiten unir covalentemente ciertas moléculas, confiriéndole así una nueva propiedad a las nanopartículas de ferritina. Al manipular conjuntamente la superficie externa de la ferritina y el material que alberga en su interior podemos obtener una librería de nanopartículas bifuncionales solubles en agua con una gran aplicación tecnológica, tanto en nanociencia como en biomedicina. En bibliografía se pueden encontrar distintos tipos de nanopartículas metálicas sintetizadas en el interior de la ferritina mediante distintos protocolos, sin embargo muy pocos son los casos descritos sobre la funcionalización externa de la misma. La síntesis de nanopartículas con una bifuncionalidad magnético-óptica es de especial interés para estudios de biomarcaje, por ejemplo mediante MRI-OI.

A lo largo de esta tesis se han unido de forma covalente a la superficie externa de la ferritina colorantes orgánicos, fluoróforos, y los denominados quantum dots (QDs). El marcaje de la ferritina con colorantes orgánicos nos permite cambiar su color y con los fluoróforos podemos modificar sus propiedades ópticas. Al incubar la proteína con dos fluoróforos de la familia Alexa Flúor (AF350 y AF430), hemos obtenido un fenómeno denominado FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer), en este fenómeno la longitud de onda de emisión del fluoróforo dador (a 350 nm) coincide con la de excitación del aceptor, permitiéndonos obtener una única emisión del fluoróforo aceptor (a 430 nm)

cuando irradiamos únicamente al dador. El fenómeno de FRET requiere la presencia de ambos fluoróforos (AF350 y AF430) en la misma subunidad de la ferritina a una distancia suficientemente corta como para que pueda darse la transferencia de energía.

El éxito obtenido en la funcionalización de la ferritina en su superficie externa nos abre la posibilidad de “decorar” partículas de ferritina nativas y artificiales (en las que se ha modificado su material interno) con distintas finalidades. Siguiendo esta dinámica de síntesis de nanoestructuras bifuncionales magnético-fluorescentes, un paso más ambicioso ha sido funcionalizar la capa externa de la ferritina con nanopartículas metálicas del tipo quantum dot (QD), ya que las nanopartículas de semiconductores ofrecen numerosas ventajas frente a los fluoróforos orgánicos tradicionales, debido a su alta fotoestabilidad, alto rendimiento cuántico, estrecha emisión, etc. Los conjugados QD-MFt tienen una gran aplicación como sensores ópticos y magnéticos en MRI-OI (magnetic resonance imaging-optical imaging).

Tres QDs de CdSe/ZnS (core/shell) con emisiones a 525-, 655-, y 800 nm (QD525, QD655 y QD800 respectivamente) se unieron de forma covalente a nanopartículas de ferritina con un contenido de 200 átomos de Fe en forma de magnetita predominantemente (MFt). Mediante estudios de TEM, (HAADF-STEM y EELS) se demostró que estas nanoestructuras se organizaban en forma de dímeros MFt-QD. Las propiedades magnéticas y fluorescentes de cada uno de los precursores de estas nanoestructuras se mantienen en el bioconjugado.

El par MFt-QD800 se ha probado en ensayos *in vivo* como un posible agente bimodal MRI-OI. Hay que recordar que el QD800 emite cercano al infrarrojo lo cual es esencial para las aplicaciones biomédicas, puesto que permite penetrar en los tejidos.

La medida de la relajación transversal,  $r_2$ , del par MFt-QD800 es un parámetro crucial para evaluar la potencialidad de dicha nanoestructura como un posible agente de contraste en MRI. El valor obtenido para  $r_2$  fue extremadamente bajo,  $\sim 6 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ , lo que indica claramente que se requiere un incremento en los valores de magnetización espontánea de la partícula de ferritina. Sin embargo los resultados de OI indican que el bioconjugado, MFt-QD800, presenta una alta vida media en sangre y se dirige de forma preferencial a los pulmones. Esto indica que dicha nanoestructura no es rápidamente detectada por el sistema inmunitario y persiste el tiempo suficiente en la sangre como para reaccionar de forma específica con ciertos tejidos. Por tanto podemos concluir que las nanoestructuras MFt-QD800 representan una vía prometedora para la preparación de agentes bimodales MRI-OI con altos valores de vida media en sangre, que en un futuro pueden ser vehiculados de forma específica a un tejido concreto.





# SUMMARY



Iron is an essential element for living organisms but is highly toxic in excess. The main intracellular storage form of iron is ferritin, a spherical hollow protein (apoferritin) composed of 24 subunits that surround a cavity capable of accommodating thousands of iron atoms (up to 4500) as an iron mineral, traditionally described as ferrihydrite.

Ferritin stores iron that is not required for immediate metabolic needs and at the same time protects against the toxic effects of its excess. Free intracellular Fe(II) catalyzes the production of hydroxyl radical  $\text{OH}\cdot$  via Fenton reaction, an extremely powerful oxidizing agent capable of causing extensive cell damage.

Therefore, understanding the management of iron in cells could be the key to the origin and development of some diseases, especially those of free radical nature. However, it can be said that the role of iron, and then ferritin, were ignored for many years in too many diseases.

In recent years, oxidative damage by  $\text{OH}\cdot$  radicals in neurons is known to be a primary cause of degenerative diseases such as Alzheimer's disease (AD). Furthermore, it has been clearly evidenced that iron is accumulated in brain in several neurodegenerative diseases. Likewise, a surprising fact has been demonstrated: the mineral iron core composition significantly differs between physiological and pathological (especially Alzheimer's) brain ferritins. Specifically, mixed  $\text{Fe}^{2+}$ - $\text{Fe}^{3+}$  iron oxide (e.g., magnetite) appears to be the main phase in brain ferritin of patients with Alzheimer's disease.

Considered together, this evidence suggests that ferritin dysfunction would increase toxic brain ferrous ions, which may contribute to producing free radicals that induce cellular oxidative stress associated with cognitive decline and Alzheimer's disease. Therefore, understanding the chemical structure of the ferritin core may help to elucidate the alteration or dysfunction of ferritin and its role in the development of degenerative diseases.

In this study, it has been demonstrated that the structure of ferritin iron core is formed by several Fe oxide phases (mainly ferrihydrite and magnetite), which are modified in percentage terms as iron is gradually removed by a biomimetic process. Specifically, when Fe is removed from ferritin, there is an increase in the magnetite phase with a corresponding decrease in the ferrihydrite phase.

Furthermore, we have concluded that magnetite content comes directly from the reductive iron removal process. The presence of a reductor excess and the simultaneous lack of a Fe(II) chaperone are the critical conditions for an uncontrolled iron delivery. Interestingly, homocysteine, a non-essential amino acid, is present in a large excess in the brain of AD patients whereas folic acid, a possible Fe(II) chaperone, is absent. After the experimental results obtained in this work, a new approach to AD can be proposed, in which the excess of homocysteine would remove a large amount of Fe(II), part of which would produce toxic OH· radicals and other part would re-enter the ferritin cavity and produce magnetite by reaction with the remaining native ferrihydrite.

Therefore, the blood level of homocysteine and the increase in magnetite in brain could be used as a double biomarker for the early diagnosis of Alzheimer disease. This hypothesis needs an *in vivo* validation.

The ferritin cavity has been widely used as a chemically and spatially confined environment for building metallic nanoparticles. Historically, ferritin was the first bioplatfrom to be used as a template for the synthesis of metallic nanoparticles and can be considered as a “molecule-school”, in which we learn to produce nanostructures in other more complex bionanocavities, such as virus capsides.

Furthermore, the outer ferritin organic shell provides a platform for chemical functionalization. Thus, native ferritin contains lysine residues on the external surface that can be used to covalently couple molecules that can

contribute a new functionality to the ferritin particle. Therefore, manipulation of the cavity and exterior surface of ferritin particles could produce a library of bifunctional nanoparticles for applications in material sciences and biomedicine. Although various metallic nanoparticles have been synthesized within the empty ferritin cavity by different strategies, few reports have been published on the use of its outer surface as a platform for chemical modifications. Thus, the incorporation of fluorescence functionality into magnetic nanoparticles is of considerable interest, since the combination of optical and magnetic properties in a single nanostructure would allow simultaneous biolabeling, for example as MRI-optical dual-modal probes, which could be a tool of enormous importance for multimodal diagnostics, one of the most exciting challenges in Biomedicine.

In this thesis, organic dyes, fluorophores and the so-called quantum dots (QDs) nanoparticles were covalently coupled to ferritin. The labelled organic dyes allow the colour and fluorescence of the ferritin particle to be modulated. It proved possible to couple two different fluorophores whose excitation and emission curves overlap (Alexa F 350- and 430), acting as a donor-acceptor pair when irradiated at UV wavelengths. The UV irradiation of the doubly-labelled ferritin particle produces an emission at 350 nm of the donor AF350, which is used for exciting the AF430 acceptor, finally giving rise to an emission at 430 nm. It was demonstrated that this phenomena of fluorescence resonance energy transfer (FRET) requires the presence of both AF350 and AF430 fluorophores in the same ferritin subunit, at a short enough distance for the energy transfer to take place.

This success in coupling functional molecules to the ferritin external shell opens up the possibility of “decorating” native and artificial ferritins for diverse aims. As an ambitious objective, an attempt was made to go one step further and it proved possible to prepare magnetic-fluorescent particles with potential use as bimodal MRI-OI agents. For this purpose, QDs rather than organic fluorophores were coupled to the ferritin shell because, in comparison with the latter, QDs have unique fluorescent properties: narrow emission and broad excitation bands, size-

dependent wavelength tunability, high photostability and 10–50 fold larger molar extinction coefficients, making them bright enough for *in vivo* conditions, for real biomedical application as bioimaging agents.

Three carboxyl 525-, 655-, and 800nm-emitting CdSe/ZnS core/shell QDs (QD525, QD655 and QD800) were covalently coupled to a 200 iron-containing ferritin in which the majority phase is magnetite. The coupling reaction gave rise to nanostructures formed by dimers of ferritin-QD, as demonstrated by TEM, HAADF-STEM and EELS. The magnetic (high spontaneous magnetization values, superparamagnetism) and fluorescent (narrow emission peaks, uniform brightness) properties of both nanoblocks (ferritin and QD) are maintained in the final nanostructure, ferritin-QD.

The nanoprobe ferritin-QD 800 was tested *in vivo* as bimodal MRI-OI agent. It is interesting to note that QD800 extends its emission into the near-infrared, improving tissue penetration depth, a crucial step for biomedical applications.

Measurement of the relaxativity  $r_2$  of the ferritin-QD800 nanostructure, a crucial parameter to evaluate the potential of a probe for use as MRI agent, was extremely low, about  $6 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . This low value clearly indicates that an increase in the mass magnetization of the ferritin particle is required. However, the nanoprobe ferritin-QD800 exhibits high enough half-life plasma to reach the lungs at high concentration. This means that these nanostructures are not quickly attacked by the MPS system and persist long enough to reach a specific tissue. Considering these results together, the ferritin-QD nanoprobe represents an ideal starting point for the successful preparation of new water soluble superparamagnetic-fluorescent nanostructures capable of acting as real bimodal MRI-OI agents.



# 1 . INTRODUCCIÓN.

## 1.1 . Metabolismo del hierro en los seres vivos y su regulación: La Ferritina.

El Fe es un elemento esencial para la vida. Es el elemento metálico más abundante y el que se involucra en un mayor número de funciones biológicas, la mayoría de ellas cruciales para el organismo, tales como: síntesis de ADN, respiración, reducción de nitrógeno, transporte de oxígeno, transporte electrónico y oxidación de algunos substratos. De hecho, salvo contadas excepciones, no existen formas de vida sin la presencia de Fe.

Cabe preguntarse por qué la Naturaleza eligió el Fe para llevar a cabo el

mayor y más importante número de funciones vitales. (a) Un factor que parece decisivo es el hecho de que entre los elementos de transición presentes en los organismos vivos, el Fe es el de mayor abundancia relativa en la corteza terrestre ( $5 \times 10^{-4}$  ppm) y uno de los más abundantes en el mar ( $3 \times 10^{-3}$  ppm). No parece lógico imaginar el desarrollo de una vida basado en un elemento poco



abundante. (b) Un segundo factor puede ser deducido del hecho de que los centros metálicos en los sistemas biológicos son siempre cinéticamente lábiles y termodinámicamente estables. El hecho de que sean lábiles facilita la rápida asociación y disociación con substratos. Ambas propiedades están presentes en las dos especies principales de Fe, Fe(II) y Fe(III). (c) En tercer lugar hay que señalar la facilidad del Fe para llevar a cabo reacciones redox, debido a la existencia de dos estados de oxidación a valores de potenciales “accesibles”, unido además al hecho de que puede ampliar el rango de potenciales redox mediante sustitución o modificación de los ligandos que lo coordinan.

Se conocen numerosas biomoléculas que contienen Fe como centro activo, pudiendo clasificarlas en tres grupos:

- Sistemas que contiene *hierro porfirínico*. Son las proteínas de Fe que contienen el grupo hemo, dentro de las cuales se encuentra la hemoglobina (transporta oxígeno, O<sub>2</sub>), la mioglobina (almacena el oxígeno en los tejidos musculares), citocromos (catalizan diversas reacciones).
- Proteínas *hierro-azufre*. Son biomoléculas complejas que contienen Fe como ión central coordinado a través de azufre “inorgánico” (S<sup>2-</sup>) y azufre “orgánico” procedente de restos de cisteína. Cabe citar las ferredoxinas, relacionadas con el transporte electrónico.
- Complejos con unidades estructurales *Fe-O-Fe*. A este grupo pertenecen las hemeritrinas (proteínas transportadoras de oxígeno en artrópodos y moluscos), las fosfatasas ácidas púrpura, la ribonucleótida reductasa (que interviene en la síntesis del ADN), y la metano-monooxigenasa (en las bacterias metanotróficas, que emplean el metano, CH<sub>4</sub>, como fuente de energía y de carbono, este tipo de enzimas, catalizan la oxidación desde CH<sub>4</sub> a CO<sub>2</sub>).

La distribución normal del Fe en el organismo está siempre asociada a biomoléculas, siendo del orden de 75% en hemoglobina, 10% en mioglobina, citocromos y otras enzimas que contienen Fe y 10-20% en proteínas de almacenamiento como la ferritina y la hemosiderina. Su requerimiento en humanos es a nivel traza, así el hombre y la mujer adultos presentan respectivamente 55 y 45 mg de Fe por kg de peso, presentando un metabolismo finamente regulado, mediante el cual a diario se absorben desde la dieta 1-2 mg y se excreta (pérdidas obligatorias) igual cantidad de este ión. <sup>1</sup>

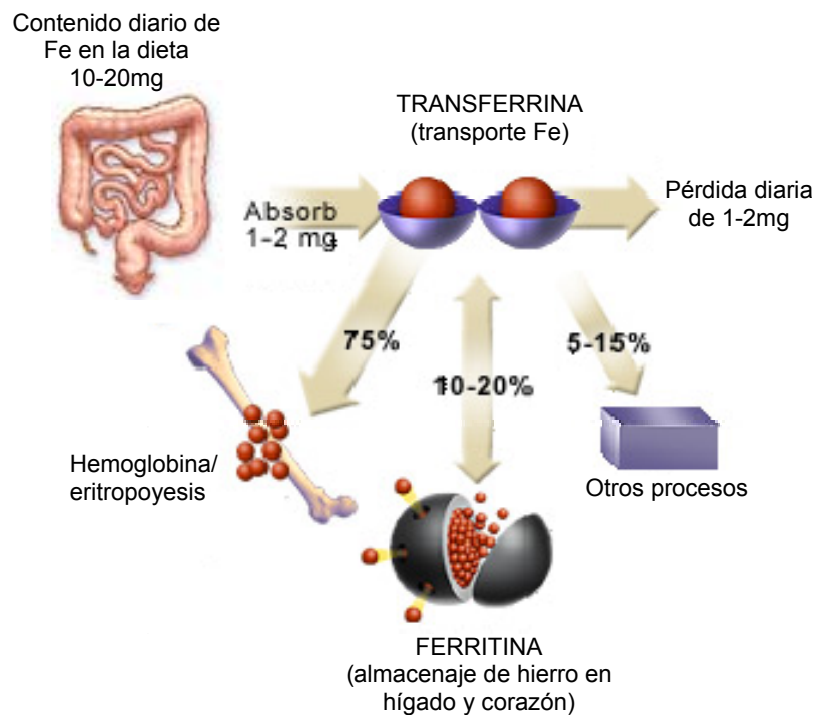
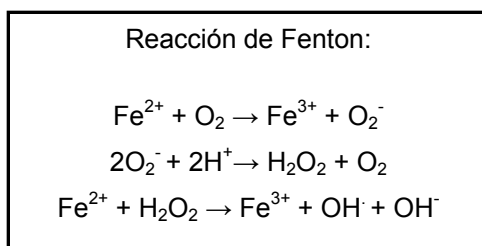


Figura 1.1. Distribución del Fe en los sistemas biológicos.

De todo lo anterior se deduce la gran importancia biológica del Fe. Sin embargo, hay que señalar que el rango de concentración óptima de Fe en los

organismos es sensiblemente estrecho y que un ligero exceso del mismo desencadena un alto riesgo de toxicidad para los sistemas celulares. El ión Fe(II) es capaz de activar al O<sub>2</sub>, molécula que bajo condiciones normales es estable y muy poco reactiva. La interacción Fe(II)-O<sub>2</sub>, mediante la reacción de Fenton genera radicales de muy corta vida media y alta reactividad. En este tipo de radicales la molécula de oxígeno se encuentra en estado de superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), el cual por sucesivos procesos reductivos puede generar radicales peróxidos e hidroxilo. A este último tipo de radical libre, se le responsabiliza de iniciar a nivel celular procesos oxidativos que podrían provocar un desbalance en el estado de óxido-reducción e incluso la muerte celular.



Por lo tanto, cuando un estímulo prooxidante, como por ejemplo una sobrecarga de Fe, provoca un desbalance entre la generación de radicales libres y su detoxificación, la célula entra en un proceso degenerativo que puede terminar en su muerte.

Por todo ello, los sistemas biológicos requieren almacenar Fe (en cantidades importantes) para un posible uso posterior al mismo tiempo que se regula su concentración dentro del rango óptimo, evitando reacciones tóxicas. Los organismos han desarrollado un sistema para almacenar Fe que cumple de forma extraordinaria todos estos requisitos, el constituido por la *ferritina*.

La ferritina es la proteína natural de almacenaje de Fe en los sistemas biológicos. La ferritina constituye una clase de proteínas ubicuas en todos los

dominios de la vida, existiendo sutiles diferencias entre las ferritinas presentes en los distintos reinos animales, eucariotas, procariotas y archaeas.

Los principales tejidos de almacenamiento de este metal son el hígado, que contiene el 60% del Fe de depósito, mientras que en las células del sistema reticuloendotelial y el tejido muscular se encuentra el 40% restante. El Fe en los depósitos está unido a proteínas específicas, la ferritina contiene el 95% del Fe hepático mientras que su forma degradada, la hemosiderina, contiene el 5% restante.<sup>2</sup>

Numerosos trabajos han demostrado que el nivel de ferritina se correlaciona con los niveles intracelulares de Fe y se ha descrito que la síntesis de ferritina está regulada por el contenido intracelular de Fe.

Los enterocitos regulan el balance de Fe de tal manera que altos niveles corporales bloquean, y bajos niveles incrementan, la absorción intestinal de este ión. Por lo tanto, se considera a la absorción intestinal como el paso clave en la regulación de los niveles corporales del Fe.

Para la mayoría de las células humanas, se ha descrito que el mecanismo de incorporación de Fe, es realizado a través de la endocitosis de *transferrina* (proteína implicada en el transporte del Fe a través del torrente sanguíneo) vía receptores de transferrina (RTf).<sup>3</sup>

Los niveles de Fe intracelulares se regulan finamente: cuando los niveles intracelulares de Fe bajan, se induce la síntesis del RTf, este proceso aumenta la incorporación de Fe a la célula por la vía de endocitosis basolateral. Cuando, por el contrario, el suplemento de Fe satisface o excede las necesidades, se incrementa la síntesis de ferritina, con lo que aumenta la capacidad de almacenamiento intracelular de Fe (figura 1.2).<sup>4</sup>

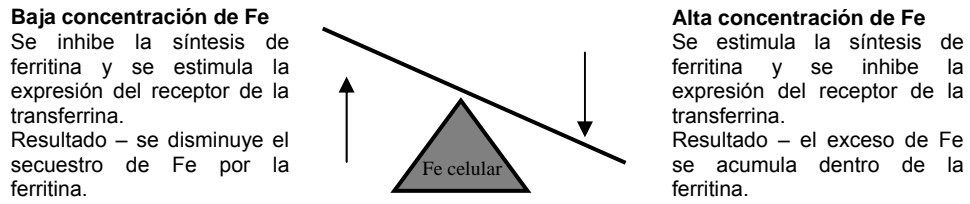


Figura 1.2. Regulación opuesta de la transcripción de los receptores de ferritina y transferrina. Sistema de contrabalanza

Esta regulación es llevada a cabo a nivel transduccional por una proteína citoplasmática llamada “proteína regulada por hierro” (Iron Regulatory Protein, IRP). La IRP se une a un motivo presente en el ARNm del RTf y de la ferritina denominado elemento de respuesta al hierro (Iron Responsive Element, IRE)

La degradación de la ferritina, pese a que es una proteína citosólica, se lleva a cabo en compartimentos vesiculados.

### 1.2. Estructura de la Ferritina y propiedades físico-químicas.

La ferritina consiste en un polipéptido externo en forma de esfera hueca (apoferritina), cuyo peso molecular es de ~ 450 kDa, de unos 12 nm de diámetro con un núcleo central de unos 8 nm de un mineral de Fe (figura 1.3). La ferritina es capaz de almacenar en su interior hasta 4500 átomos Fe/molécula, aunque las cantidades habituales son de unos 2000 Fe.

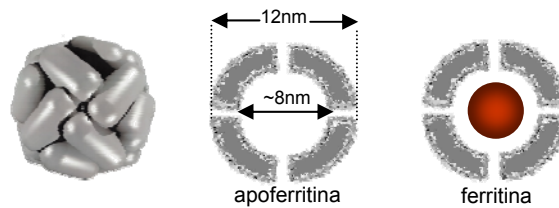


Figura 1.3. Estructura real de la apoferritina y forma esquematizada utilizada para la apoferritina y ferritina.

La apoferritina en mamíferos está formada por 24 subunidades, mezcla de dos tipos diferentes de subunidades, las cadenas H (pesadas, 22-24 KDa) y cadenas L (ligeras, 20-22 KDa).<sup>5</sup> Estructuralmente los dos tipos de subunidades son similares, ya que presentan un 50-55% de homología de secuencia. Cada subunidad está compuesta por cuatro hélices  $\alpha$  enlazadas por cinco dominios helicoidales (figura 1.4 A).

Determinaciones de la composición tejido-específica de la ferritina, indican que está compuesta por diferentes proporciones de subunidades H y L en distintos tejidos, lo cual le otorga diferentes propiedades de almacenamiento. Así en el hígado la alta proporción de subunidades L le otorgan a la ferritina características ácidas y alta capacidad de almacenamiento de Fe, mientras que en el tejido cardíaco la subunidad preferencial es la H.

En la estructura cuaternaria las subunidades se autoensamblan de tal forma que generan dos tipos de poros o canales generados por la intersección de tres o cuatro subunidades peptídicas, que conectan la cavidad interior con el medio exterior: seis de naturaleza hidrofóbica y ocho de naturaleza hidrofílica.

Los poros hidrofílicos son los que presentan simetría  $C_3$  (figura 1.4 B) y poseen una mayor composición de residuos del tipo aspartato y glutamato, son de aproximadamente 5 Å, permiten la entrada y salida de la cavidad al medio exterior, y viceversa, de moléculas de agua, iones metálicos y moléculas orgánicas de tamaño adecuado. A través de estos canales entran los iones de Fe(II), que mediante oxidación catalítica generarían el mineral de Fe en la cavidad interior, igualmente estos canales son críticos para la función de la ferritina de liberar Fe de forma controlada. En contraste, los canales de simetría  $C_4$ , debido a la intersección de las cuatro subunidades peptídicas (figura 1.4 C) son mayoritariamente hidrofóbicos y de diámetro irregular y angosto.

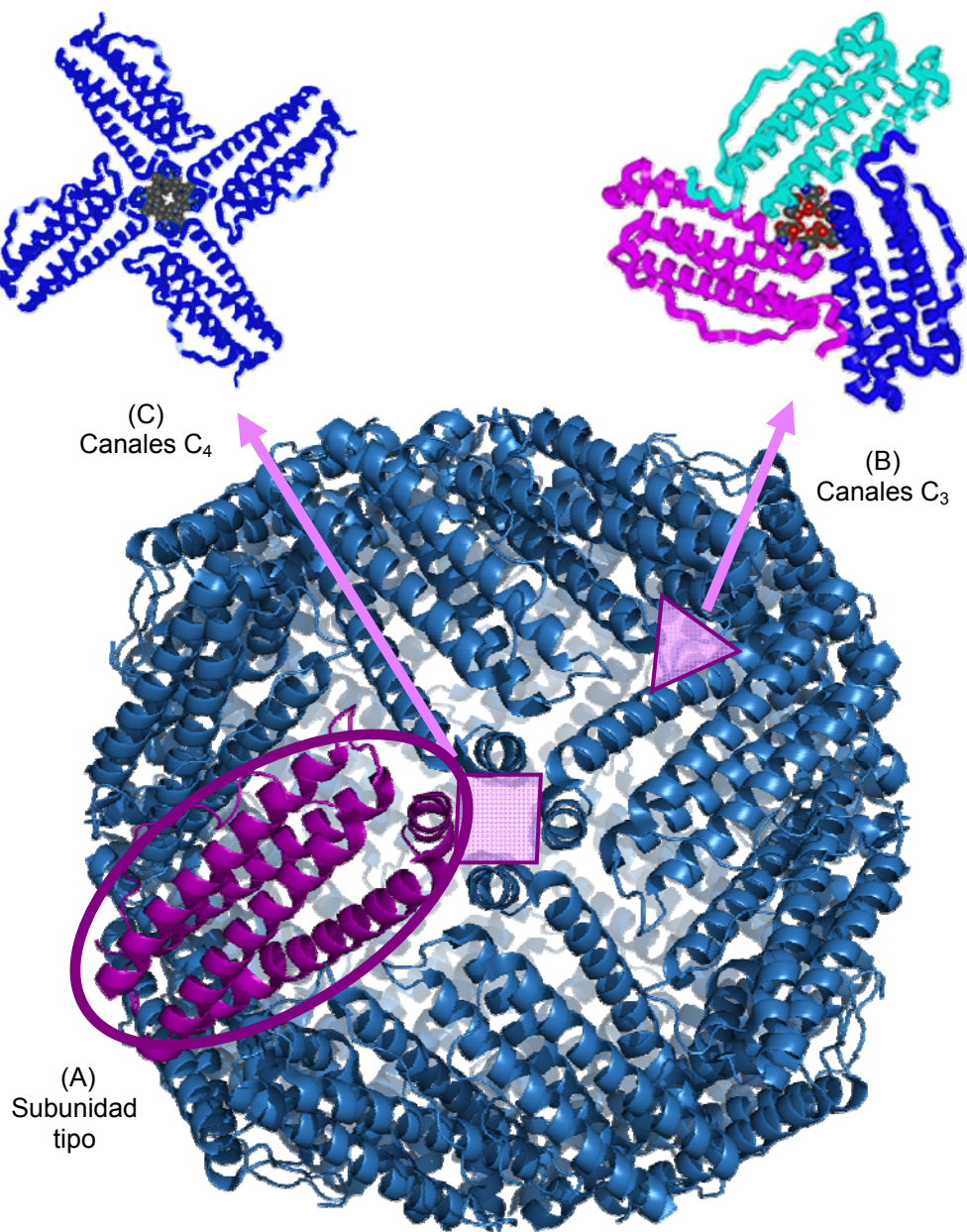


Figura 1.4. (A) Subunidad tipo de la apoferritina, (B) Poro de simetría C<sub>3</sub>, (C) Poro de simetría C<sub>4</sub>.

En cada una de las subunidades L que componen la capa proteica de la ferritina existen tres grupos amino pertenecientes a residuos de lisina, por lo que en la superficie de la proteína que contiene únicamente subunidades L hay un total de 72 residuos de lisina dirigidos hacia el exterior (figura 1.5).

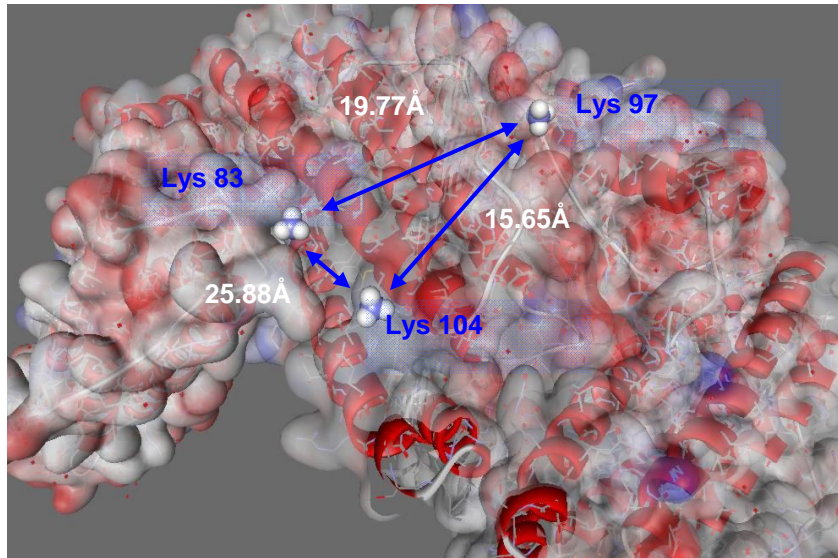


Figura 1.5. Subunidad tipo de la apoferritina mostrando las tres lisinas que expone en su superficie y las distancias que hay entre ellas.

Aunque la estructura del mineral de Fe en el interior de la ferritina no ha sido totalmente establecida, tradicionalmente se ha considerado que es del tipo ferrihidrita,  $5\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ , un óxido-hidróxido de Fe(III), aunque más adelante se discutirá que en realidad la ferritina está compuesta por un material polifásico cuya composición es dependiente del contenido de Fe.<sup>6</sup>

Mediante la técnica de microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HREM) se pueden obtener imágenes reales de la estructura de la ferritina diferenciándose claramente los núcleos metálicos correspondientes al



mineral de Fe, ya que presentan una mayor electrodensidad (Figura 1.6 A), la morfología de los núcleos metálicos es bastante homogénea y con una distribución muy estrecha de tallas. Al contrastar una imagen de este tipo con Acetato de Uranilo conseguimos poner de manifiesto simultáneamente el núcleo metálico y la cubierta polipeptídica que le hace de envoltorio al núcleo metálico, como se puede observar en la figura 1.6 B.

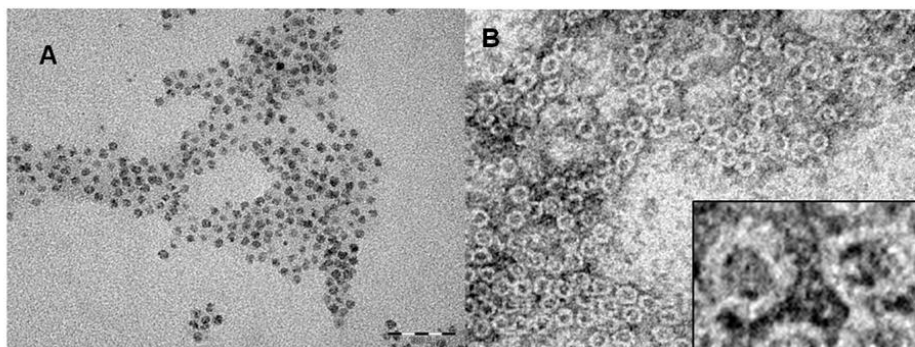


Figura 1.6. (A) Imagen de TEM de la ferritina nativa, (B) Imagen de TEM de la ferritina nativa contrastada con AcOU (ampliación en el recuadro inferior).

El material polifásico encapsulado en la ferritina es antiferromagnético por debajo de 140 K, pero presenta un momento magnético debido a la no compensación de los espines, sobre todo los dispuestos en la superficie del mineral. Esto hace que la ferritina se comporte como un material superparamagnético por debajo de 20 K. Por debajo de la temperatura de bloqueo,  $T_B \approx 15$  K, la energía térmica no es suficiente para permitir la oscilación de los momentos magnéticos a través de la barrera anisotrópica y por tanto los momentos magnéticos se bloquean. Como consecuencia de dichas propiedades magnéticas, las curvas de magnetización Zero Field Cooled (ZFC) y Field Cooled (FC) presentan diferente comportamiento a temperaturas inferiores a la de bloqueo (figura 1.7). La ZFC presenta un máximo proporcional a la  $T_B$  y la curva FC aumenta continuamente conforme disminuye la temperatura. Otra consecuencia

de la aparición de la  $T_B$  es que por debajo de dicha temperatura aparece un marcado ciclo de histéresis (recuadro superior de la figura 1.7).<sup>7</sup>

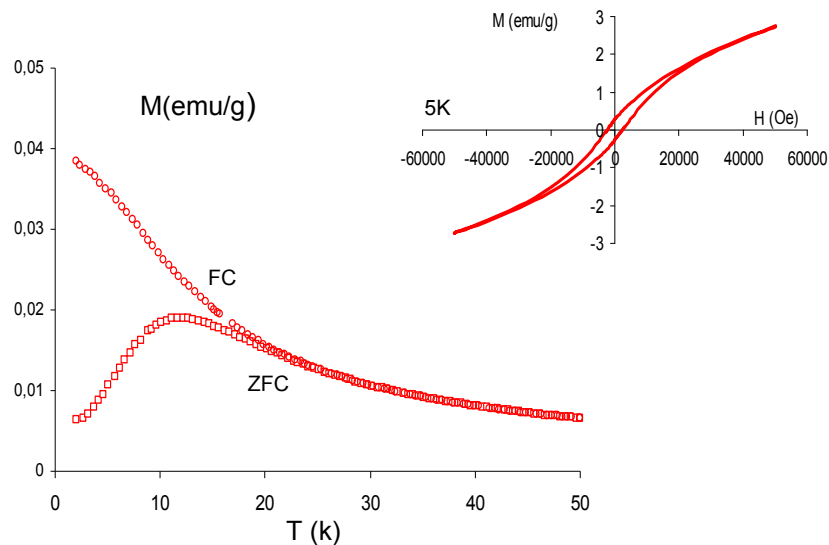


Figura 1.7. Curvas ZFC y FC de la ferritina nativa. En la parte superior se observa el ciclo de histéresis a 5 K.

El proceso de mineralización de la ferrihidrita dentro de la ferritina es un proceso que se lleva a cabo en sucesivos pasos y que implica, la oxidación del Fe(II), hidrólisis, nucleación y crecimiento del cristal. Los iones de Fe(II) pasan al interior de la cavidad a través de los canales hidrofílicos (simetría  $C_3$ ). En la ferritina humana los sitios de unión al metal están presentes en las cadenas H mientras que están ausentes en las cadenas de tipo L. Estos sitios de unión al metal se llaman centros ferroxidasas, y son los encargados de catalizar la oxidación de Fe(II) a Fe(III). Los residuos de ácido glutámico presentes en el interior de la cavidad ayudan a la nucleación.

Los canales de simetría  $C_3$ , en los que se encuentran los centros ferroxidasa, y los sitios de nucleación poseen valores negativos para el potencial electrostático mientras que la región externa de los canales hidrofílicos está rodeada por regiones de potencial positivo, creando así un gradiente electrostático dirigido hacia el interior de la cavidad interna. Este gradiente electrostático favorece la entrada de los iones al interior de los canales y finalmente al interior de la cavidad de la ferritina, como un mecanismo de guía para la entrada de los cationes, sugiriendo así que los canales hidrofílicos son la mejor vía de entrada en la proteína.

La envuelta proteica (la apoferritina) es muy estable a la degradación térmica y química debido a las fuertes interacciones presentes entre las subunidades. Aguanta bien temperaturas de hasta 85°C y un intervalo de pH de entre 3.5-8.5. Se trata por tanto de una proteína robusta que permite una manipulación química suave sin detrimento de alterar su estructura esencial.

### **1.3. Ferritina y enfermedades neurodegenerativas**

En la Edad Media y Renacimiento, se utilizó por primera vez el Fe para el tratamiento de ciertas enfermedades, pero sin mucho conocimiento de causa. A principios del siglo XVI se relacionó la deficiencia de Fe con una enfermedad llamada "enfermedad verde" o clorosis (nombre que se le asignaba a la anemia ferropénica). La primera persona en utilizar el Fe como medicamento específico en el tratamiento de la clorosis fue Thomas Sydenham, médico inglés del siglo XVII.

En 1713, Lemery y Geoffry demostraron por primera vez que el Fe se encontraba presente en las cenizas de la sangre, relacionando directamente a este tejido con dicho metal, estableciendo de esta manera las bases científicas en la terapéutica de su deficiencia.

En 1832 el médico francés Pierre Blaud inició el tratamiento de la clorosis mediante la administración de Fe por vía oral, utilizando una píldora compuesta por sulfato ferroso ( $\text{FeSO}_4$ ) y carbonato de potasio ( $\text{K}_2\text{CO}_3$ ), la cual fue denominada "píldora de Blaud".

En 1920 Whipple y colaboradores demostraron que el hígado cocido era más eficaz que el carbonato ferroso ( $\text{FeCO}_3$ ) en la regeneración de la sangre. Sin embargo en 1932, Castle y colaboradores demostraron la eficacia del Fe inorgánico en la regeneración de la hemoglobina, cuando el mismo era administrado por vía parenteral a pacientes con anemia hipocrómica.

En 1937, McCance y Widdowson, comenzaron a realizar los primeros trabajos sobre balance de Fe, los que sugerían una absorción y eliminación limitadas de este metal. El mismo año, Heilmeyer y Plotner midieron las concentraciones plasmáticas de Fe y postularon su mecanismo de transporte.<sup>8</sup>

El Fe es considerado un metal esencial no sólo para el crecimiento normal, sino también para el desarrollo mental y motor normal del individuo. Siendo tan crucial, su deficiencia es padecida por una gran proporción de la población mundial. El Fe juega un papel de capital importancia en un órgano esencial como es el cerebro, ya que en este órgano es donde el Fe alcanza su mayor concentración. La concentración a nivel cerebral del Fe no es homogénea, lo que indica que existen áreas con una mayor concentración como es la Sustancia Nigra y parte del Núcleo Estriado, y es allí donde podemos correlacionar el porqué su deficiencia se asocia con alteraciones de diversos neurotransmisores como son la Dopamina y la Noradrenalina, y todo esto repercutirá en el deterioro de la función neurológica del individuo.<sup>9</sup>

Los cambios de los niveles de Fe a nivel cerebral son muy lentos debido al proceso por el cual el Fe atraviesa la barrera hematoencefálica (BHE), ya que esta barrera sólo permite la captación del suplemento de Fe en caso de deficiencia.

Debido a la importancia de las funciones que desarrolla el Fe a nivel cerebral, se ha relacionado la desregulación de los niveles de Fe con la aparición de ciertas enfermedades neurológicas. En los últimos años se ha producido un avance importante en el descubrimiento de los mecanismos implicados en el metabolismo férrico, descubriéndose las relaciones existentes con el sistema inmune y el sistema nervioso, ya que se ha detectado que existe relación entre niveles anormales de Fe en el cerebro y numerosas enfermedades neurodegenerativas, como en la enfermedad de Parkinson, Alzheimer, etc.

El Alzheimer a nivel histopatológico, se caracteriza principalmente por la formación de dos tipos de agregados proteicos: los ovillos neurofibrilares (ONFs), que se localizan en el interior de la neurona y las placas seniles (PS), ubicadas en el espacio extracelular. Los ONFs comprenden una red filamentosa compacta formada por los filamentos pareados helicoidales (PHFs), los cuales constituyen agregados de la proteína tau hiperfosforilada. Estas estructuras anómalas generan serios trastornos en la actividad neuronal, provocando una pérdida en su capacidad de transmitir los impulsos nerviosos y ocasionando finalmente el proceso neurodegenerativo. Las placas seniles (PS) son lesiones multicelulares esféricas que contienen en el centro depósitos extracelulares de un péptido de 40-43 aminoácidos, denominado  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ).<sup>9, 10</sup>

En cierta forma, las placas seniles pueden ser consideradas como “basura química” que estrangula la funcionalidad del sistema neuronal en el cerebro. Y durante muchos años han sido el centro de atención sobre esta enfermedad, tanto a nivel diagnóstico como terapéutico. Un símil que puede explicar la realidad química del cerebro de un enfermo de Alzheimer, colapsado por una sobreacumulación de la proteína  $\beta$ -amiloide, que estrangula el correcto funcionamiento de la transmisión de señal entre neuronas puede ser el siguiente: si uno entra en su casa y se encuentra amontonada tal cantidad de basura que impide la funcionalidad de parte de la misma, lo peor que puede hacer es echarle la culpa a la propia basura. Necesitamos conocer cuál es la razón que conlleva

esta acumulación de “basura química” de la misma forma que necesitaríamos saber quiénes son las personas que se han encargado de tirar, y no recoger, la basura en nuestra casa. Si nos limitamos a recoger basura (a disolver las placas de  $\beta$ -amiloide) sin detener la fuente que la origina, no podremos paliar el problema.

Parte del trabajo llevado a cabo en la presente tesis viene a ordenar un puzzle de datos y hechos experimentales que correlacionan la enfermedad de Alzheimer con un mal metabolismo del hierro a nivel cerebral. Las dos piezas claves en todo este puzzle de datos, en la mayoría de los casos desconectados, son dos: la ferritina y un exceso de homocisteína.

La homocisteína es un aminoácido originado en el metabolismo de la metionina (aminoácido esencial, precursor y componente de péptidos y proteínas que participa en la transferencia de grupos metilo), que no circula en grandes cantidades y que puede ser reciclada a partir de la vía de recuperación de metionina (remetilación) o de la vía de formación de cisteína (transulfuración). La vitamina B12 es el donante directo del grupo metilo a la homocisteína para la recuperación de metionina; el ácido fólico sirve de fuente del grupo metilo para la formación de metilcobalamina, y la vitamina B6 sirve de cofactor para la regeneración de ácido fólico.

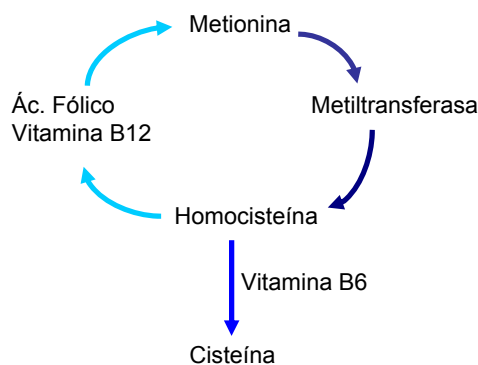


Figura 1.8. Esquema del metabolismo de la Homocisteína

Las concentraciones de homocisteína plasmática, no obstante, pueden alterarse por defectos congénitos o por deficiencias nutricionales en los cofactores vitamínicos. Este aminoácido está adquiriendo un papel trascendental en la medicina moderna debido a su relación con un buen número de enfermedades. Estudios epidemiológicos han puesto de manifiesto que niveles altos de homocisteína en sangre se correlacionan con enfermedades neurodegenerativas, insuficiencia cardíaca y aterosclerosis.<sup>11</sup> Por otra parte, un estudio epidemiológico basado en datos estadísticos demostró que las personas con hiperhomocisteinemia presentan un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer.<sup>12</sup> Recientemente, estudios del mismo tipo han demostrado que la hiperhomocisteinemia se relaciona con la pérdida de memoria que antecede a la demencia. Ya en 1990 se observó una relación directa entre hiperhomocisteinemia y demencia degenerativa primaria, ya que la homocisteína produce microangiopatía cerebral, disfunción endotelial y estrés oxidativo, así como aumento en la producción de  $\beta$ -amiloide.<sup>11, 13</sup>

Como se ha comentado anteriormente, el nivel de homocisteína en sangre depende de factores genéticos y de la alimentación. Un alto nivel de homocisteína en sangre podría ser consecuencia de deficiencias de diversas vitaminas, como la B6, B12 y ácido fólico. Teddy Reynolds, neurólogo que ha dedicado más de 30 años al estudio de las relaciones del ácido fólico y el sistema nervioso con el envejecimiento, concluye que con la edad va disminuyendo la concentración de ácido fólico en suero y en líquido cefalorraquídeo y por tanto va aumentando el nivel de la homocisteína plasmática.<sup>14</sup> Recientemente se han realizado estudios que demuestran que la administración de este tipo de suplementos (ácido fólico, vitamina B12 y B6) es capaz de retrasar el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer en pacientes que presentan la enfermedad en estadios iniciales.<sup>15</sup>

Sin embargo, no se conoce hasta el momento ningún mecanismo de acción de la homocisteína que pueda explicar su implicación en todas estas enfermedades. El hecho de que esté implicada en tantas y tan importantes

enfermedades le ha valido ya el calificativo de “colesterol del siglo XXI”. Y no cabe duda que en años venideros va a ser objeto de un estudio intenso y probablemente protagonice líneas de actuación fundamentales en medicina preventiva.

Una serie de hechos experimentales ponen de manifiesto una conexión entre daños neurodegenerativos del cerebro con la ferritina y la propia homocisteína. Estos hechos son los siguientes:

- 1.El cerebro de un enfermo de Alzheimer tiene una cantidad significativamente mayor de hierro que el de uno sano.<sup>16</sup>
- 2.Estudios recientes ponen de manifiesto una correlación entre altos niveles de homocisteína y demencia senil y Alzheimer.<sup>17,11a</sup>
- 3.El RNA mensajero de la proteína  $\beta$ -amiloide contiene un centro de tipo IRE (iron responsive element) por el que la presencia de Fe(II) libre promueve la sobreexpresión de esta proteína y su subsecuente acumulación.<sup>18</sup>
- 4.La composición del núcleo metálico de la ferritina se modifica en estados fisiológicos y patológicos, concretamente se ha descrito que en estados fisiológicos hay un mayor porcentaje de ferrihidrita y sin embargo en pacientes de Alzheimer la fase mayoritaria es la magnetita,<sup>19</sup> incrementándose por tanto la magnetización/g a nivel cerebral. Probablemente este sea el hecho que explica la visualización “fortuitamente” más favorable del cerebro en enfermos de Alzheimer mediante Resonancia Magnética (MRI) puesto que la relajación transversal  $r_2$ , uno de los parámetros claves para una mayor resolución mediante MRI, es proporcional a la magnetización.



La presencia e incremento de magnetita en cerebro de enfermos de Alzheimer y la existencia simultánea de un alto nivel de homocisteína no son dos hechos aislados como se pretende demostrar en la presente tesis. Esta conexión abre las puertas, en primer lugar a formular una nueva aproximación al origen de la enfermedad y en segundo lugar, a elaborar un protocolo de diagnóstico precoz, basados en estos dos biomarcadores: homocisteína y ferritina.

#### **1.4. Ferritina: una biomolécula paradigmática en nanotecnología. Una cavidad-nanoreactor y una superficie-plataforma para su funcionalización.**

En los últimos años la nanotecnología (campo de las ciencias aplicadas dedicado al control y manipulación de la materia a una escala menor que 0.1 micrómetro) está en auge, puesto que nos abre un amplio abanico de aplicaciones tecnológicas, en forma de ferrofluidos, sistemas de refrigeración magnéticos, potenciador del contraste en imágenes de resonancia magnética, portadores magnéticos de fármacos, agentes catalíticos, etcétera, debido a la aparición de nuevas propiedades físico-químicas en los materiales nanoestructurados frente a los materiales clásicos.<sup>20</sup>

La aparición de estas propiedades deriva del tamaño nanométrico del material en estudio. Cuando nos encontramos en la escala nanométrica en la que el tamaño de las partículas se encuentra en un rango de entre 1-100 nm el “efecto de superficie” adquiere una gran importancia, puesto que hay un aumento en la proporción del número de átomos superficiales conforme disminuimos el tamaño de la materia (figura 1.9).

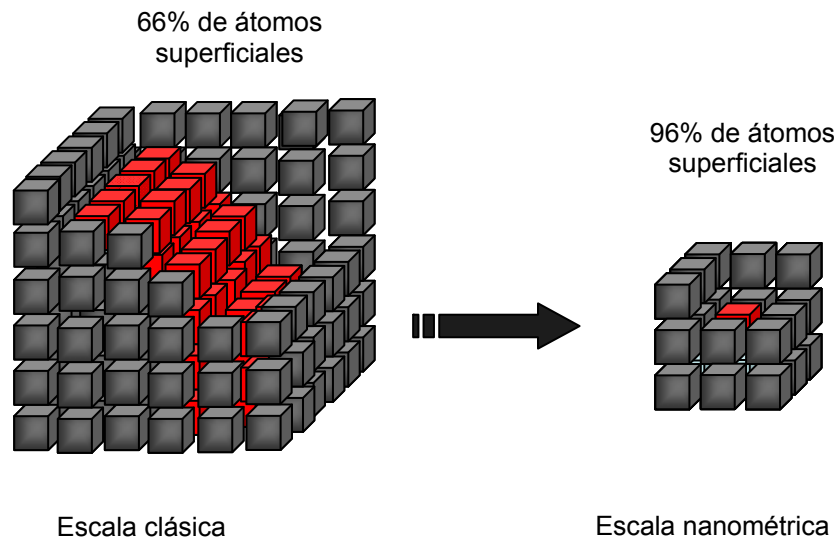


Figura 1.9. La partícula inicial (en escala clásica) se divide en ocho más pequeñas, pero con un incremento en el número de sus átomos superficiales (pasando de tener un 66% de átomos superficiales a un 96%).

La diferencia de propiedades entre las partículas a escala nanométrica y escala clásica deriva, en parte, del distinto entorno químico que poseen los átomos superficiales y los átomos internos, ya que los átomos superficiales no se ven afectados de igual modo que los internos por sus átomos vecinos. Podemos observar como cuando la partícula tiene un mayor tamaño (imagen de la izquierda) la proporción de átomos superficiales frente a la de los átomos internos es bastante menor, sin embargo al pasar a la escala nanométrica (imagen de la derecha) la proporción de átomos superficiales frente a la de los internos incrementa considerablemente (pasando de un 66% a un 96% en el ejemplo dado en la figura 1.9). Cuando el número de átomos superficiales es mayor frente al número de átomos internos las propiedades del material en conjunto se rigen por las de los átomos superficiales (que son los mayoritarios), al contrario de lo que pasa cuando nos encontramos en la escala clásica

Las propiedades que generalmente se modifican al pasar de la escala clásica a la escala nanométrica son:

- Cambios de *color* por la aparición de nuevas bandas de absorción en el espectro UV-Visible: la denominada resonancia de plasmones de superficie (SPR, Surface Plasmon Resonance). En una nanopartícula metálica, los electrones de la banda de conducción oscilan colectivamente a una frecuencia dentro del espectro visible. Esta oscilación es muy dependiente del tamaño y del entorno químico de la superficie de la partícula. Estas bandas son típicas sobre todo en las nanopartículas de Au y Ag, y son las responsables de originar toda la gama de colores que pueden adquirir las partículas de estos materiales.
- Aparición de *superparamagnetismo*. El superparamagnetismo es un fenómeno por el que los materiales exhiben un comportamiento similar al paramagnetismo (tendencia de los momentos magnéticos libres a alinearse paralelamente a un campo magnético) por debajo de la temperatura de Curie o de Néel (temperatura en la cual la magnetización se hace 0). La energía requerida para cambiar la dirección del momento magnético de la partícula es comparable a la energía térmica y por tanto las partículas, aleatoriamente cambiarán el signo de magnetización sobrepasando una barrera de energía anisotrópica. Sin embargo por debajo de una temperatura, denominada temperatura de bloqueo, el momento magnético se bloquea. Además, la aplicación de un campo magnético externo por debajo de esta temperatura de bloqueo genera la orientación del momento magnético de forma paralela a dicho campo, llegando a magnetizarse la nanopartícula y comportándose como un imán, pero la supresión del campo magnético externo no provoca la desmagnetización: el momento magnético de la partícula “no sigue” al campo magnético externo, sino que relaja en una situación fuera del

equilibrio, dando lugar a la aparición de fenómenos de histéresis magnética.

- Aparición de *fluorescencia* en semiconductores inorgánicos clásicos, los denominados “quantum dots”. La cuantización de estados permite la existencia de fenómenos de fluorescencia. Además, la fluorescencia de los quantum dots se caracteriza por tener una banda muy ancha de excitación y una banda muy fina de emisión. Ambas longitudes de onda son también muy dependientes del tamaño de la partícula.

La aparición de estas nuevas e interesantes propiedades hace que la nanotecnología presente una gran variedad de aplicaciones tecnológicas. Son numerosas las aplicaciones de las nanopartículas en la industria, por ejemplo, (a) la aplicación de nanopartículas como aditivos en recubrimientos orgánicos es un campo muy prometedor con un gran potencial de desarrollo tecnológico; (b) la aplicación de las nanopartículas en la formación de los nanodispositivos electrónicos capaces de almacenar información; (c) uno de los campos de mayor aplicación de las nanopartículas es el relacionado con la biomedicina.

La posibilidad de *implementar* las nanopartículas en el cuerpo humano ofrece enormes posibilidades en biomedicina, tanto desde el punto de vista de diagnóstico como terapéutico.<sup>21</sup> Poder introducir en el organismo estas partículas, y aprovechar las propiedades que anteriormente hemos citado, representa un gran campo de investigación con enormes aplicaciones. Algunos de los campos más relevantes para la aplicación de estas nanopartículas en la biomedicina se encuentran ilustrados en la figura 1.10.

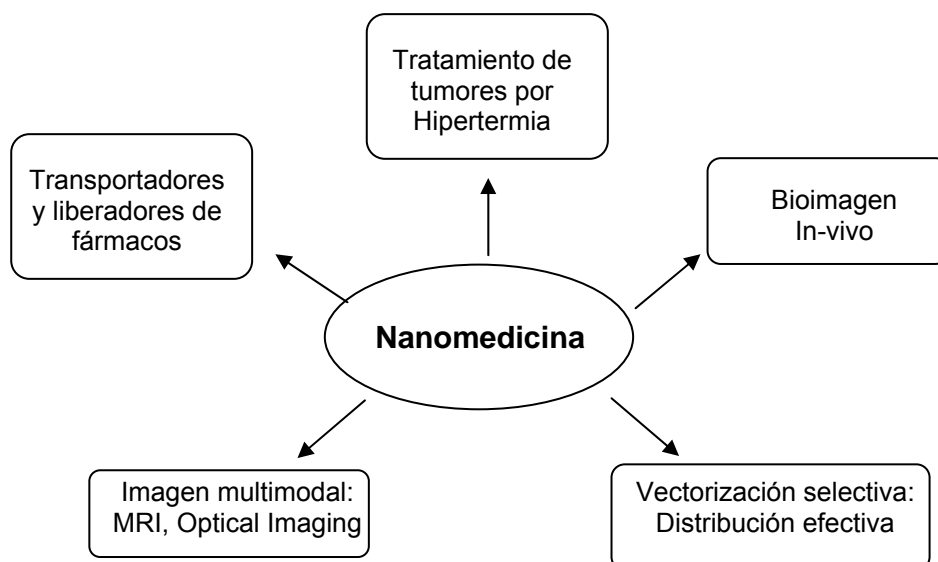


Figura 1.10. Algunos de los campos más relevantes para la aplicación de las nanopartículas en la biomedicina, denominada nanomedicina.

Se pueden citar numerosos ejemplos de nanopartículas con aplicación biomédica, algunos de estos ejemplos se encuentran ya en el mercado y otros muchos son prototipos que continúan en estudio con la esperanza de tener una aplicación tecnológica en un futuro muy próximo:

- En *MRI*, el uso de nanopartículas de óxido de hierro superparamagnéticas del tipo de endorem o sinorem (partículas SPIOs, Superparamagnetic Iron Oxides, ~ 60 nm, y USPIOs, Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxides, ~ 50 nm, existentes en el mercado) permite acortar considerablemente los tiempos de relajación de los protones circundantes como consecuencia del campo magnético heterogéneo que se genera alrededor de las partículas. En las imágenes obtenidas de este modo, dicho efecto se hace evidente por un contraste negativo debido a la reducción de la señal de MRI, permitiéndonos

resolver mejor la visualización de un tejido u órgano. La tendencia en este sentido ha sido sintetizar cada vez partículas de menor tamaño e inocuas al organismo consiguiendo así tiempos mayores de circulación en el torrente sanguíneo. Los últimos avances intentan vectorizar los agentes de contraste de forma que se dirijan específicamente al órgano o tejido en estudio.

- El uso de partículas de Au y Ag como *biosensores*. En 1990 BIAcore AB (Suecia) lanzó el primer kit basado en la aplicación de la banda SPR como biosensor. Concretamente fabricó una capa delgada de partículas de Au que llevaban anclado un receptor específico de proteína. La unión de la proteína cambiaba el índice de refracción del entorno, la banda SPR y por tanto el color.

- En la farmacéutica es muy importante no sólo el control de la liberación del fármaco, sino también el control estricto de la distribución del mismo, para minimizar los efectos sistémicos de los potentes fármacos o tóxicos. El uso de nanopartículas permite el tratamiento de enfermedades localizadas, como por ejemplo tumores sólidos, ya que dichas nanopartículas pueden ser funcionalizadas de forma específica contra el tejido maligno en tratamiento, lo que permite que el tratamiento vaya dirigido específicamente al tejido maligno por lo que se requieren dosis menores de administración para obtener un resultado satisfactorio. Numerosos son los ejemplos citados en la bibliografía,<sup>22</sup> tanto para el *transporte específico del fármaco* (un ejemplo muy significativo es el dado por la empresa Biophan explotando una patente de M. R. Ibarra<sup>23</sup>, figura 1.11) como para la *liberación controlada* del mismo, mediante la aplicación de campos magnéticos alternantes que descomponen el recubrimiento de las nanopartículas que envuelve el compuesto o bien por calentamiento de las nanopartículas al ser irradiadas con longitudes de ondas cercanas al infrarrojo (NIR).

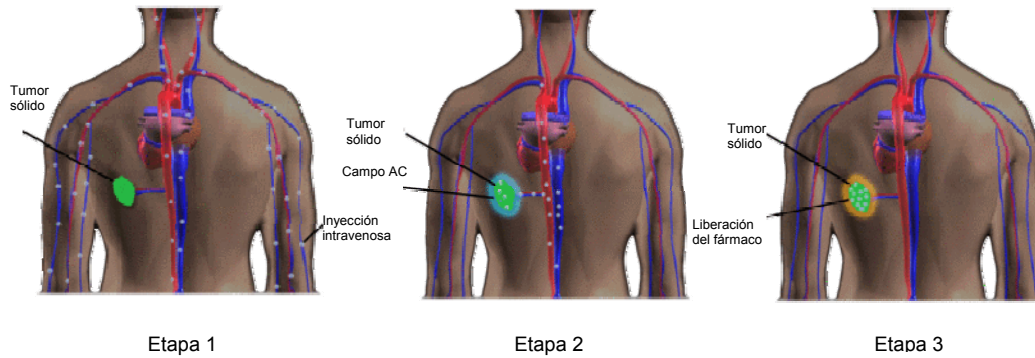


Figura 1.11. La partícula magnética se inyecta de forma intravenosa y circula por el torrente sanguíneo hasta alcanzar el tumor sólido a tratar (etapa 1). Para favorecer la concentración de las partículas en el tumor se aplican campos magnéticos que dirigen a dichas partículas a la zona del cuerpo en tratamiento (etapa 2). Cuando la totalidad de las partículas magnéticas se disponen en el tumor se comienzan a aplicar campos magnéticos oscilantes que permiten la liberación del fármaco (etapa 3). Este es un método que permite una liberación controlada y dirigida del fármaco.

- El uso de nanopartículas magnéticas en el *tratamiento de tumores por hipertermia* podría ser en breve una alternativa terapéutica frente a los tratamientos clásicos. El principio de este calentamiento es diferente si se trata de partículas ferromagnéticas con multidominios o superparamagnéticas. En el primer caso, el campo magnético AC aplicado provoca un alineamiento apropiado del campo de alguno de los dominios, mientras que otros merman. Este fenómeno es irreversible y provoca la aparición del conocido ciclo de histéresis, que alcanzado el valor de magnetización y retirado el campo magnético disipa energía. En materiales superparamagnéticos, el mecanismo es diferente porque no existen estos multidominios. En estos sistemas, el campo magnético AC aplicado suministra energía para que los momentos magnéticos roten sobrepasando una barrera de energía potencial  $E = KV$  (K es una constante de anisotropía y V es el volumen de las nanopartículas

magnéticas). Esta energía es disipada cuando los momentos magnéticos de la partícula vuelven a su orientación de equilibrio (relajación de Néel). Este fenómeno está caracterizado por una temperatura denominada temperatura de bloqueo. En ambos casos, existe una contribución del calor provocada por la fricción de la partícula con el medio debido a la oposición del medio a la orientación de dichas partículas por el campo externo.<sup>24</sup>

· Uso de *nanopartículas multimodales*.<sup>25</sup> Las técnicas de imagen, MRI (magnetic resonance imaging), PET (positron emission tomography), CT (computed X-ray tomography), etc., son de especial importancia en biomedicina para el diagnóstico de numerosas enfermedades. Cada una de estas técnicas posee ciertas ventajas y desventajas para cada tipo de diagnóstico, pero ninguna de ellas por si sola es capaz de analizar la imagen con la suficiente resolución, por ello los sistemas multimodales que permiten analizar la imagen con más de una técnica de imagen son de especial interés. Hay una gran variedad de combinaciones de dichas técnicas: (a) *MRI-OI*,<sup>26</sup> a una nanopartícula magnética se le adiciona un compuesto con propiedades ópticas (fluorescentes, Qdots). El uso de fluoróforos con emisiones cercanas al infrarrojo (NIRF) permite obtener imágenes in vivo con una mayor profundidad en los tejidos, lo que junto con las imágenes obtenidas en MRI posibilita la detección de tumores in vivo, (b) *MRI-PET*, genera señales con una mayor resolución espacial y mayor sensibilidad, ya que la técnica PET da información espacial mientras que MRI da la información anatómica de la que carece el PET.<sup>27</sup>

Para poder explotar todas las posibilidades biomédicas y demás aplicaciones tecnológicas que las nanopartículas presentan a priori, es necesario el desarrollo de métodos eficaces, reproducibles, que usen condiciones de síntesis suaves para la preparación de nanopartículas metálicas. Un método ideal de



preparación de nanopartículas debería cumplir ciertos requisitos, siendo imprescindibles los siguientes:

- *Control y homogeneidad del tamaño* de las nanopartículas. Como ya se ha comentado, las propiedades de las nanopartículas son tremendamente dependientes del tamaño. Por tanto, si se quiere establecer correlaciones rigurosas entre propiedades y tamaño, es obligatorio que el rango de tamaño de las nanopartículas sea lo más estrecho y homogéneo posible.
- *Evitar aglomeración*. La aglomeración de las nanopartículas podría generar la pérdida de las propiedades inherentes a su escala nanométrica.
- *Flexibilidad* para poder preparar nanopartículas de *composición química* variada que permita un amplio repertorio fenomenológico y de posibles aplicaciones tecnológicas. Posiblemente este sea uno de los principales handicaps de la mayoría de los métodos.

Otro punto a tener en cuenta en el diseño de dichas nanopartículas para su posible introducción en el cuerpo humano, es que hay que procurar *tiempos altos de circulación en el torrente sanguíneo*. El tiempo que nuestro organismo tarda en detectar y eliminar estas partículas es vital para que puedan llevar a cabo su actividad. Cuanto mayor es el tamaño de las partículas, más fácil resulta su detección por los macrófagos, más rápidamente son eliminadas y por consiguiente, menor es el tiempo de circulación en sangre. De hecho, la primera generación de SPIOs, tenía como principal problema su rápida eliminación del torrente sanguíneo. Este problema fue en cierta medida superado por la segunda generación, los USPIOs, que debido a su menor tamaño alcanzan tiempos de circulación en sangre mayores.<sup>21</sup> Otra alternativa para incrementar los tiempos de circulación de las nanopartículas en sangre consiste en modificar apropiadamente la superficie externa de la partícula. En este sentido, hay claros ejemplos de que el

recubrimiento de la partícula con polietilenglicol (PEG), impide una fagocitosis violenta, permitiendo un mayor tiempo de residencia de la partícula en sangre.<sup>28</sup>

De gran importancia es también tratar de dirigir las nanopartículas al sitio deseado de la forma más específica posible, *vectorizar las nanopartículas* a la “diana” (órgano o tejido) deseada.<sup>5</sup> De entre las muchas estrategias existentes para esta vectorización específica, podemos nombrar (a) el uso de partículas magnéticas que puedan ser llevadas al órgano adecuado por aplicación de un campo magnético externo; (b) otra estrategia, química, se basa en el principio de la interacción específica antígeno-anticuerpo o del par biotina-avidina; (c) una tercera vía, muy por explorar es lograr que las nanopartículas puedan ser endocitadas o reconocidas a nivel de membrana y puedan penetrar en la célula, en la naturaleza existen ejemplos diversos como pueden ser las vesículas recubiertas por clatrina con receptores específicos.

Viendo estas premisas podemos deducir que la biomimética nos proporciona un nuevo camino para la síntesis y ensamblaje de nanomateriales magnéticos, ya que ofrece la posibilidad de controlar el tamaño, la forma, la estructura cristalina, la orientación y la organización. Uno de los objetivos de la biomimética es la síntesis de materiales diana que incorporan propiedades específicas por diseño, por ejemplo: el uso de la arquitectura proteica para controlar la morfología de las nanopartículas en diseño y la utilización de secuencias peptídicas específicas para el reconocimiento de material polimórfico con una alta afinidad. Por ello algunos autores<sup>5</sup> han utilizado macromoléculas con forma y tamaño predefinido (proteínas, ciclodextrinas, cápsidas de virus...) que sean capaces de albergar en su interior un cluster o una nanopartícula metálica y que permitan su funcionalización posterior permitiendo por ejemplo la vectorización. De esta forma se controla el tamaño de la nanopartícula, puesto que estaría limitado por el tamaño propio de la cavidad de la macromolécula y se evita aglomeración, debido a que la capa orgánica de la macromolécula aísla el núcleo

metálico que alberga. Un ejemplo genuino de este tipo de macromolécula lo representa la **ferritina**.

Históricamente la ferritina es la primera proteína que se ha usado como plataforma para la síntesis de nanopartículas metálicas.<sup>29</sup> La utilización de la ferritina como “host” donde albergar una nanopartícula metálica fue desarrollada fundamentalmente por el grupo de S. Mann, que fueron capaces de reconstituir de forma artificial la ferritina desde la proteína vacía (apoferritina) sintetizando las nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (o  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) (S. Mann, Science 1993, 261, 1286) e incluso variaron el material encapsulado generando nanopartículas de óxidos o hidróxidos de manganeso y cobalto (S. Mann, J. Am. Chem. Soc. 1993, 115, 8471), nanopartículas de sulfuro ferroso (S. Mann, Science, 1995, 269, 54) y CdS (S. Mann, Adv. Mater. 1996, 8, 928).

Tras los trabajos de Mann y col. han sido numerosos los trabajos que han ido apareciendo mostrando diferentes estrategias basadas en apoferritina/ferritina, para la síntesis de nanopartículas metálicas:<sup>30</sup> (a) Algunos de ellos continuaron con la dinámica de trabajo del grupo de S. Mann, sintetizando nanopartículas de óxidos e hidróxidos de diversos elementos químicos,  $\text{Cr}(\text{OH})_3$ ,  $\text{Ni}(\text{OH})_3$  (Yamashita, Biotechnol. Bioeng. 2003, 84, 187),  $\text{Co}(\text{O})\text{OH}$ ,  $\text{Co}_3\text{O}_4$  (Watt, Chem. Comm. 2005, 4101),  $\text{In}_2\text{O}_3$  (Yoshimura, Nano Lett. 2005, 5, 991). (b) También se han sintetizado nanopartículas de azul de Prusia encapsuladas en la apoferritina (Domínguez-Vera, Inorg. Chem. 2003, 42, 6983), haciendo uso de la propiedad de disociación/autoensamblaje de las subunidades que componen la estructura polipeptídica de la ferritina. (c) Se han sintetizado nanopartículas que albergan a su vez dos elementos químicos, CoPt (Mayes, IEEE Trans, Magn. 2000, 36, 3009), ZnSe (Yamashita, Inorg. Chem. 2005, 44, 6393), Co/Fe (Douglas, J. Am. Chem. Soc. 2007, 129, 197). En el caso del ZnSe se observó que las nanopartículas solamente se sintetizaban en el interior de la proteína si se adicionaba el  $\text{Zn}^{2+}$  previamente al  $\text{Se}^{2-}$ , lo que podría deberse a la capacidad que posee la proteína para albergar cationes en su interior gracias al gradiente de potencial negativo que

va desde el exterior al interior de la cavidad. (d) Numerosas nanopartículas metálicas de Pd (Ueno, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2004, 43, 2527), Cu (Domínguez-Vera, *Dalton Trans.* 2005, 2492), Co, Ni (Domínguez-Vera, *J. Mat. Chem.* 2006, 16, 2757), se han sintetizado en el interior de la ferritina por preincubación de la proteína con la sal metálica correspondiente seguida de una reducción química con agentes reductores del tipo  $\text{NaBH}_4$ .

Por tanto como indican los antecedentes bibliográficos la ferritina nos da la posibilidad de intercambiar su material interno, permitiéndonos introducir en ella otro material inorgánico, diferente al óxido de Fe nativo. Nuestro grupo ha desarrollado un método que permite la formación de partículas de metales en el interior de la apoferritina (figura 1.12). Este material puede ser por ejemplo, un material con propiedades magnéticas que eventualmente puedan ser de mayor interés que el del material nativo de la ferritina, como la magnetita o materiales ferromagnéticos del tipo Co o Ni.

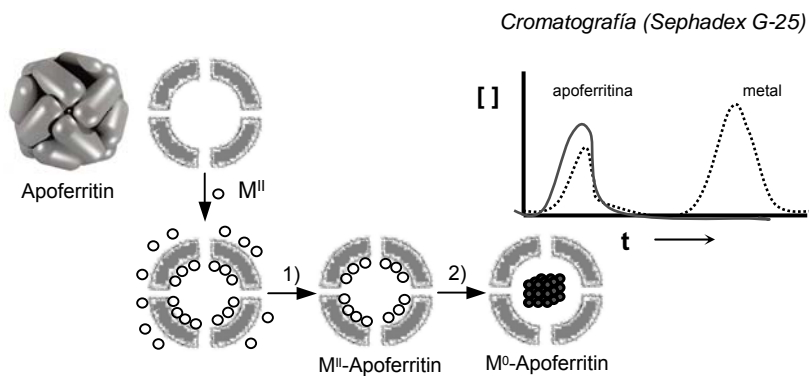


Figura 1.12. Esquema general de la modificación del material interno de la ferritina. En la parte superior se observa un perfil general de cromatografía en una columna del tipo Sephadex G-25.

La estructura de la ferritina pone de manifiesto la existencia en su capa externa de grupos aminos de lisinas apuntando al exterior (ver figura 1.5), concretamente tres lisinas por cada subunidad. La existencia de los grupos amino

terminales de estas lisinas representan químicamente una puerta abierta a la funcionalización de la ferritina.

La capacidad de la superficie proteica de la ferritina para formar enlaces amida a través de los residuos de lisina ha sido utilizada para su funcionalización con anticuerpos,<sup>31</sup> unión covalente de biotina y largas cadenas de alquilos. También hay algunos ejemplos en los que la capa externa de la ferritina se ha funcionalizado a través de los residuos carboxílicos que presenta, mediante la unión covalente de largas cadenas de aminas primarias con la formación del correspondiente enlace amida,<sup>32</sup> obteniéndose así una ferritina hidrofóbica, que podría ser transferida de una disolución acuosa a disolventes orgánicos sin modificación de la estructura cuaternaria de la ferritina ni agregación entre las distintas moléculas de ferritina.

La superficie externa de la ferritina también ha sido utilizada como plataforma para la modificación química, por ejemplo mediante la introducción genética de un péptido que reconoce específicamente titanio, (RKLPGA), confiriéndole a la subunidad de la ferritina cierta afinidad por el titanio metálico.<sup>33</sup>

## BIBLIOGRAFÍA

- 
- 1.- Aurora Navajas, Unidad de Hemato-Oncología Pediátrica del Hospital de Cruces/Baracaldo, Bizkaia. Universidad del País Vasco. Gladys Pérez, Daniela Vittori, Nicolás Pregi, Graciela Garbossa, Alcira Nesse, *Acta Bioquím. Clin. Latinoam.* **2005**, 39(3), 301-14
  - 2.- (a) Dallman P. Iron. Present knowledge in nutrition. Sixth edition. International Life Sciences Institute. ILSI. North America. **1990**. (b) Deiss A. Iron metabolism in reticuloendothelial cells. *Semin Hematol.* **1983**; 20, 81-90.
  - 3.- Gaetano Cairo and Antonello Pietrangelo. *Biochem. J.* **2000**. 352, 241-250.
  - 4.- P. R. Reynolds, *Arch. Dis. Child.* **2002**; 86; 322-324.
  - 5.- (a) Masaki Uchida et al. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 16626-16633. (b) Mei Li, Kim K. W. Wong, and Stephen Mann, *Chem. Mater.* **1999**, 11 23-26.
  - 6.- N. Gálvez, et al, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 8062.
  - 7.- Miguel Clemente-León, Eugenio Coronado, Alejandra Soriano-Portillo, Enrique Colacio, José M. Domínguez-Vera, Natividad Gálvez, Rafael Madueño and María T. Martín-Romero. *Langmuir*, **2006**, 22, 6993-7000.
  - 8.- (a) Castro del Pozo S. Metabolismo del hierro normal y patológico. Segunda edición. Masson. Barcelona. España. **1995**. (b) Goodman Gilman. The pharmacological basis of therapeutics. Pergamon Press Inc. New York. USA. **1996**.
  - 9.- Ya Ke, Zhong Ming Qian, *Progress in Neurobiology* 83, **2007**, 149–173

---

10.- George Bartzokis, Todd A. Tishler, Po H. Lua, Pablo Villablanca, Lori L. Altshuler, Michele Carter, Danny Huanga, Nancy Edwards, Jim Mintz. *Neurobiology of Aging* 28, **2007**, 414–423

11.- (a) Rima Obeid, Andrew McCaddon and Wolfgang Herrmann. *Clin. Chem. Lab. Med.* **2007**, 45, 1590-606. (b) Morris M.S. *Lancet Neurol* **2003**, 2:245-8. (c) Herrmann W. *Clin. Chem. Lab. Med.* **2001**, 39, 666-74. (d) Welch GN, Loscalzo J. *N Engl J Med* **1998**; 338:1042-50.

12.- (a) McCaddon A, Davies G, Hudson P, Tandy S, Cattell H. *Int J Geriatr Psychiatry* **1998**; 13(4):235–9. (b) Lehmann M, Gottfries CG, Regland B. *Dement Geriatr Cogn Disord* **1999**; 10(1): 12–20. (c) Seshadri S, Beiser A, Selhub J, et al. *N Engl J Med* **2002**; 346(7):476–83. (d) Schafer JH, Glass TA, Bolla KI, Mintz M, Jedlicka AE, Schwartz BS. *J Am Geriatr Soc* **2005**; 53(3):381–8.

13.- McCaddon A, Hudson P, Davies G, Hughes A, Williams JHH, Wilkinson C, *Dement Geriatr Cogn Disord*, **2001**; 12:309-313

14.- Reynolds EH, *BMJ*, **2002**; 324:1512-1515

15.- (a) Adair JC, Knoefel JE, Morgan N. *Neurology*, **2001**, 57(8): 1515–1517. (b) Andrew McCaddon and Gareth Davie. *Int J Geriatr Psychiatry*, **2005**; 20: 998–1000.

16.- (a) Gerlach M, Trautwein AX, Zecca L, Youdim MBH, Riederer Mossbauer P. *J Neurochem*, **1995**; 65:923–6. (b) Small SA, Perera GM, DelaPaz R, Mayeux R, Stern Y. *Ann Neurol*, **1999**; 45:466–72. (c) Small SA, Nava AS, Perera GM, DelaPaz R, Stern Y. *Microsc Res Tech*, **2000**; 51: 101– 8. (d) Bartzokis G, Sultzer D, Cummings J, Holt L, Hance DB, Henderson VW, et al. *Arch Gen Psychiatry*, **2000**; 57:47 – 53. (e) Connor JR. *Boca Raton:CRC Press*; **1992**. p. 365–93.

- 
- 17.- (a) Ángeles García, Katherine Zanibbi. *CMAJ*, 12, **2004**, 171(8), (b) Barney E. Dwyer, Arun K. Raina, George Perry and Mark A. Smith. *Free radical Biology and Medicine*, **2004**, 36 (11), 1471-1475.
- 18.- Rogers, J.T. et al. *J. Biol.Chem*, **2002**, 277, 45518-45528.
- 19.- Quintana, C. J. *Alzheimer's Dis.* **2007**, 12, 157
- 20.- Taeghwan Hyeon. *Chem. Commun.* **2003**, 927-934.
- 21.- Fabio Sonvico, Catherine Dubernet, Paolo Colombo and Patrik Couvreur, *Current Pharmaceutical Desing*, **2005**, 11, 2091-2105.
- 22.- (a) Goya, G.F, Grazu, V., Ibarra M.R. *Current Nanoscience*, **2008**, 4, 1, 1-16. (b) Fernandez-Pacheco, R., Ibarra M.R., Valdivia, J.C., Marquina, C. Serrate, D. Romero, M.S., Gutierrez, M., Arbiol, J. *Nanotech*, **2005**, 1, 144-147. (c) Teresa, J.M., Marquina, C. Serrate, D., Fernandez-Pacheco, R., Morellon, L., Algarabel, P.A., Ibarra M.R. *International Journal of Nanotechnology*, **2005**, 2, 3-22.
- 23.- M. R. Ibarra, J. G. Valdivia, C. Marquina. Patente, título: "Farmacoterapia parental focalizada mediante el implante de imanes permanentes en los órganos diana". N° solicitud **2003**, 02, 803. Universidad de Zaragoza
- 24.- (a) Andreas Jordan et al, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, **2001**, 225, 118-126. (b) Stéphane Mornet, Sébastien Vasseur, Fabbien Grasset and Etienne Duguet, *J. Mater. Chem.*, **2004**, 14, 2161-2175.
- 25.- Jinwoo Cheon, and Jae-Hyun Lee. *Acc. Chem. Res.*, **2008**, 41 (12), 1630-1640.



---

26.- (a) Kircher, M. F.; Mahmood, U.; King, R. S.; Weissleder, R.; Josephson, L. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 8122–8125. (b) Mulder, W. J. M.; Koole, R.; Brandwijk, R. J.; Storm, G.; Chin, P. T. K.; Strijkers, G. J.; de Mello Donega, C.; Nicolay, K.; Griffioen, A. W. *Nano Lett.* **2006**, *6*, 1–6.

27.- Misselwitz, B. *Eur. J. Radiol.* **2006**, *58*, 375–382.

28.- Ruxandra Gref et al. *Science*, **1994**, *263*, 1600-1603

29.- T. Douglas, *Wiley*, New York, **1996**.

30.- Masaki Uchida et al. *Adv. Mater.* **2007**, *19*, 1025-1042.

31.- D. Danon, E. Skutelsk, Y. Marikoversus, L. Goldstein, *J. Ultrastruct. Res.* **1972**, *38*, 500.

32.- (a) K. K. W. Wong, N. T. Whilton, H. Colfen, T. Douglas, S. Mann, *Chem. Commun.* **1998**, 1621. (b) K. K. W. Wong, H. Colfen, N. T. Whilton, T. Douglas, S. Mann, *J. Inorg. Biochem.* **1999**, *76*, 187.

33.- (a) K. Sano, K. Ajima, K. Iwahori, M. Yudasaka, S. Iijima, I. Yamashita, K. Shiba, *Small* **2005**, *1*, 826. (b) T. Hayashi, K. Sano, K. Shiba, Y. Kumashiro, K. Iwahori, I. Yamashita, M. Hara, *Nano Lett.* **2006**, *6*, 515.

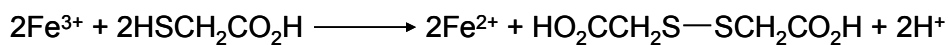
## 2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

### PUESTA A PUNTO

#### 2.1. Eliminación y reconstitución controlada de hierro de la ferritina.

Para la preparación de estas nanopartículas se trabajó con una ferritina nativa (Ft) suministrada por Sigma-Aldrich (procedente de bazo de caballo).

Para sintetizar la apoferritina (ApoFt) y las ferritinas con distinto contenido en Fe se procedió a eliminar el Fe de la ferritina por tratamiento reductivo <sup>1</sup> con ácido tioglicólico (TGA/AcONA), que reduce el Fe(III) de la ferritina a Fe(II). La reacción correspondiente a este paso es la siguiente:



Posteriormente se añadió un agente quelante de Fe(II), el 2,2'-bipiridilo (bipy), que se coordina al Fe(II) formando el complejo catiónico,  $[\text{Fe}(\text{bipy})_3]^{2+}$ ,

(figura 2.1). Posteriormente el complejo  $[\text{Fe}(\text{bipy})_3]^{2+}$  será eliminado de la ferritina por simple diálisis, purificando así el sistema.

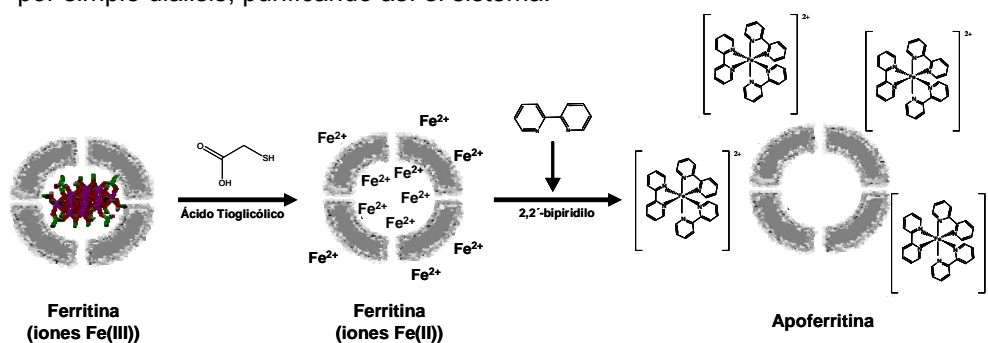


Figura 2.1. Reacciones implicadas en el proceso de reducción de la ferritina hasta la obtención de la apoferritina.

El número de átomos de Fe que contiene cada muestra se calculó por espectroscopia de absorción atómica (AAS) y del valor de la absorción a 280 nm en el espectro UV-visible se obtuvo la concentración de la apoferritina ( $\epsilon^{280} = 427200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). A partir de la relación entre la concentración molar de Fe (obtenida por absorción atómica) y de proteína (según la ley de Lambert-Beer) obtenemos el número de átomos de Fe por molécula de ferritina.

### **Síntesis de la Apoft**

Para llevar a cabo la obtención de la ApoFt se preparó una disolución de la Ft (1 ml de 38 mg/ml, Sigma-Aldrich lot. 083K7051) en agua bidestilada. La muestra se puso a dializar frente a una disolución 0.1 M de TGA/AcONa que contiene a su vez 0.1 mg de NaCl y bipy en agua bidestilada, se incubó a temperatura ambiente y en agitación durante 24 horas. Tras el periodo de incubación la muestra se dializó exhaustivamente frente a agua bidestilada en una membrana Spectra/Por Float-A-Lyzer (300 KDa), realizando varios cambios de agua, para asegurarnos de que la muestra estaba totalmente libre de Fe(II) lo que se comprobó por espectroscopia UV-vis a 280 nm y AAS.

***Preparación de ferritinas con diferente contenido en Fe (2200-200), mediante eliminación reductiva de Fe de la ferritina nativa, Ft<sub>1200</sub>, Ft<sub>500</sub> y Ft<sub>200</sub>.***

Para la preparación de ferritinas con distinto contenido en Fe se partió en todos los casos de la Ft comercial (Sigma-Aldrich lot. 083K7051) con un contenido en Fe de 2200 Fe/proteína (Ft<sub>2200</sub>).

La Ft<sub>1200</sub> se sintetizó partiendo de una disolución de Ft<sub>2200</sub> (1 ml de 38 mg/ml,) en agua bidestilada y se le añadió 0.1 ml de una disolución 0.1 M de TGA/AcONa, 0.3 M de bipy y 0.1 mg de NaCl. Se incubó a temperatura ambiente y en agitación durante 1.30 h. Tras el periodo de incubación la muestra se filtró cuidadosamente para eliminar el exceso de bipy y posteriormente se dializó exhaustivamente frente a agua bidestilada realizando varios cambios de agua. La muestra final se recogió y analizó por microscopía electrónica de transmisión (TEM) y por absorción atómica (AAS).

En el caso de la Ft<sub>500</sub> partiendo de una disolución de Ft<sub>2200</sub> (1ml de 38 mg/ml, Sigma-Aldrich lot. 083K7051) se realizó el mismo tratamiento que para la preparación de la Ft<sub>1200</sub>, con una única excepción y es que, en este caso, el proceso se repitió tres veces para llegar a la cantidad de Fe/proteína deseado, de 500 Fe/ prot.

Al repetir el proceso explicado en el caso de la Ft<sub>500</sub>, pero añadiendo un cuarto tratamiento con el agente reductor llegamos a obtener la Ft<sub>200</sub> (ó MFt)

***Ensayo de eliminación de Fe***

Para el ensayo de determinación del Fe liberado desde la ferritina se partió de una disolución de ferritina (2 ml, 38 mg/ml; Sigma-Aldrich lot. 083K7051) con NaCl 0.15 M y se incubó a temperatura ambiente con una disolución de ferrozina (ácido(3-(2-piridil)-5,6-bis(4fenil-sulfónico)-1,2,4-triazina) (2 mM) en

tampón 0.1 M TRIS/0.1 M NaCl a pH 7.4. La formación del complejo  $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{ferrozina})_3]^{2+}$  se siguió en todo el transcurso de la reacción mediante espectroscopia UV-vis a 562 nm, fijando el coeficiente de extinción molar a  $\epsilon^{562} = 27900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Se tomaron 20 ciclos cada 10 minutos en un espectrofotómetro visible Thermospectronic UV300 usando como control una disolución de ferrozina en tampón 0.1 M TRIS/0.1 M NaCl. Tras estos 20 ciclos la reacción llega a un estado de saturación, en el que la absorbancia a 562 nm se mantiene constante. En este punto de saturación es en el que se toma el valor de absorbancia para calcular el porcentaje de Fe eliminado. Los experimentos se realizaron en condiciones aeróbicas.

***Preparación de ferritina con 500 átomos de Fe ( $\text{Ft}_{500}$  AcHA), mediante eliminación de Fe de la ferritina nativa  $\text{Ft}_{2200}$  por ácido acetohidroxámico.***

Se preparó una disolución de ferritina de 38 mg/ml (1.5 ml) en tampón acetato 0.1 M con un pH final de 5.2. La disolución de ferritina se incubó durante 1 h y a temperatura ambiente con una concentración final de 100 mM del agente quelante, ácido acetohidroxámico (AcHA), condiciones en las cuales se espera una concentración de 500 Fe/prot.<sup>2</sup> Tras el periodo de incubación la muestra se dializó, inicialmente frente a agua bidestilada y posteriormente frente al tampón acetato, en una membrana de diálisis Spectra/Por Float-A-Lyzer (100 KDa). Mediante AAS se determinó la concentración de Fe/prot en la muestra.

**2.2. La homocisteína (H-cys) elimina Fe de la ferritina.**

Se llevó a cabo el mismo procedimiento de eliminación de Fe que en el caso anterior pero usando un agente reductor presente en el organismo de forma natural que está altamente involucrado en el metabolismo del Fe, la Homocisteína (H-Cys), que es un aminoácido que se obtiene como catabolito en el metabolismo de la L-Metionina (L-Met), aminoácido esencial implicado en la metilación del ADN. (remitirse a la figura 1.8 del Capítulo 1)

Para la preparación de la Ft<sub>1200</sub> con homocisteína como agente reductor (Ft<sub>1200</sub> H-cys) se partió de una disolución de Ft<sub>2200</sub> (1 ml de 38 mg/ml, Sigma-Aldrich lot. 083K7051) en agua bidestilada y se le añadió 0.1 ml de una disolución 0.1 M de H-Cys, 0.3 M de bipy y 0.1 mg de NaCl. Se incubó a temperatura ambiente y en agitación durante 1.30 h. Tras el periodo de incubación la muestra se filtró cuidadosamente para eliminar el exceso de bipy y posteriormente se dializó exhaustivamente frente a agua bidestilada realizando varios cambios de agua. La muestra final se recogió y se analizó por TEM y AAS.

En el caso de la Ft<sub>500</sub> (Ft<sub>500</sub> H-cys) el tratamiento llevado a cabo fue el mismo que para la Ft<sub>1200</sub> H-cys, con una única excepción y es que, en este caso, el proceso se repitió tres veces para llegar a la cantidad de Fe/proteína deseado, de 500 Fe/prot.

Simultáneamente se desarrollaron varios ensayos de eliminación de Fe desde la ferritina, usando la H-cys y la L-Met. En cada caso se partió de una disolución de ferritina (2 ml, 0.1 mg/ml; Sigma-Aldrich lot.096K70121) con NaCl 0,15 M y se incubó a temperatura ambiente con una disolución de ferrozina (0.01g/2ml, 0.02 M) en agua bidestilada y una disolución de H-cys (0.5 µl, 0.1 M) o L-Met (0.5 µl, 0.1 M). La formación del complejo [Fe<sup>II</sup>(ferrozina)<sub>3</sub>]<sup>2+</sup> se siguió en todo el transcurso de la reacción mediante espectroscopia UV-vis a 562 nm, fijando el coeficiente de extinción molar a  $\epsilon^{562} = 27900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Se tomaron 50 ciclos cada 10 minutos en un espectrofotómetro visible Thermospectronic UV300 usando como control una disolución de ferritina con ferrozina en iguales condiciones que en la muestra. Tras estos 50 ciclos la reacción llega a un estado de saturación, en el que la absorbancia a 562 nm se mantiene constante. En este punto de saturación es en el que se toma el valor de absorbancia para calcular el porcentaje de Fe eliminado. Los experimentos se realizaron en condiciones aeróbicas.

### 2.3. Ferritinas de colores: blue-Ft y red-Ft.

Los colorantes utilizados para este ensayo, Remazol Brilliant Blue y Reactive Orange 16, se compraron en Acros Organic y se modificaron químicamente por eliminación directa de los grupos sulfonatos obteniéndose las correspondientes vinil sulfonas (figura 2.2).

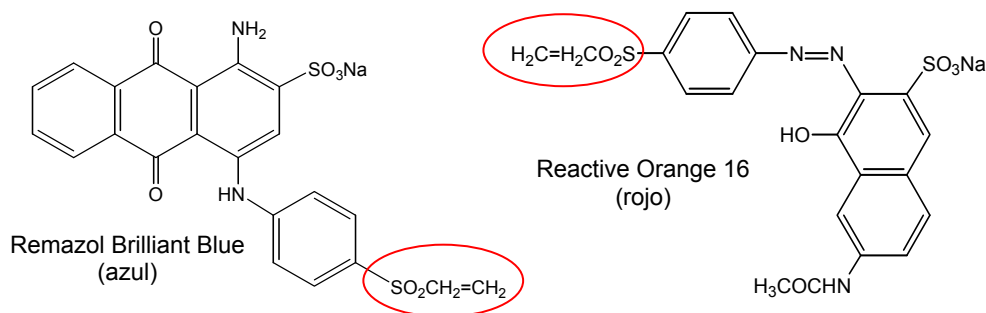


Figura 2.2. Estructura de las vinil sulfonas de los colorantes comerciales Reactive Orange 16 y Remazol Brilliant Blue.

#### **Preparación de los colorantes**

Se disolvieron 2 g de Remazol Brilliant Blue comercial en agua (40 ml) y NaOH (1 M, 1.45 ml) para llegar a un pH de trabajo de 11.4. La reacción se realizó a temperatura ambiente, con un tiempo de incubación de 3 h. Posteriormente se añadió HCl (5%) hasta un valor de pH 7.6. Esta disolución se mantuvo durante toda la noche a 4°C y el precipitado formado se recuperó por filtración, que posteriormente se lavó con agua y etanol (75%). El sólido obtenido se secó a vacío y 60°C. El rendimiento obtenido fue del 79%.

El derivado del Reactive Orange 16 se obtuvo por un procedimiento similar al explicado para el Remazol Brilliant Blue.

Dicha reacción la realizó la Dra. Julia Morales, perteneciente al grupo de Carbohidratos dirigido por el Profesor D. Francisco Santoyo del Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Granada.<sup>3</sup>

### ***Síntesis: blue-Ft y red-Ft***

Trabajamos con una solución de ferritina comercial de bazo de caballo (Sigma lot. 083K7051, 2000 Fe/ferritina, 76 mg/ml). Se preparó una solución de la ferritina comercial, 2 ml de 1 mg/ml en tampón HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazín-etano-sulfónico) pH 8, que se hizo reaccionar con 5 mg del colorante en cuestión, lo que suponía un gran exceso del colorante, de aproximadamente 500 equivalentes con respecto a la ferritina, y se incubó durante 24 h a temperatura ambiente.

Tras la reacción de la proteína con los reactivos, el exceso de colorante se eliminó por diálisis exhaustiva usando membranas de diálisis de un determinado tamaño de poro (Spectrapor 100 kDa, SpectrumLabs) frente a agua milli-Q durante 2 días, haciendo cambios de agua cada 6 h. Las soluciones resultantes se cromatografiaron por exclusión de tamaño en columnas Sephadex G-25, para eliminar el resto de colorante no unido covalentemente y se recuperaron las fracciones que contenían proteína.<sup>3</sup>

## **2.4. Deposición de la ferritina sobre superficies de oro**

### ***Formación de la superficie SPDP-Au***

Previamente a la deposición la superficie de oro (suministrada por Arrandee company) se sometió a un proceso de lavado. Dicha superficie se



sumergió en una disolución de ácido sulfúrico,  $H_2SO_4:H_2O_2$  (3:1) durante 10 minutos y posteriormente se realizaron varios lavados con agua bidestilada (5 ml) y se sonicó durante 5 minutos (680 W, 20°C), finalmente las placas de oro se secaron durante 1 minuto con una corriente de argón. Antes de incubar la superficie de oro con SPDP se secó con corriente de argón y se hizo un control mediante medida de AFM (microscopio de fuerza atómica) para comprobar que estaba limpia.

Cuando la placa de oro estaba lista se trató con el SPDP (N-succinimidil-3-(2-piridil-ditio) propionato. Para ello la placa de oro se sumergió en una disolución de SPDP en metanol (10 mM) durante 5 minutos, y el exceso de SPDP que no había reaccionado se eliminó al realizar varios lavados con metanol (3 lavados de 1ml de metanol), posteriormente se secó durante 1 minuto con una corriente de argón.

Este estudio se realizó en el laboratorio del Profesor D. Félix Zamora, del Departamento de Química Inorgánica de la Universidad Autónoma de Madrid.

#### ***Deposición de la Ft sobre la superficie SPDP-Au (Ft+SPDP-Au)***

Se preparó una disolución de ferritina 1 mg/ml en agua (Sigma-Aldrich, lot. 083K7051, 76 mg/ml) en la cual se sumergió la superficie de oro tratada con SPDP. La incubación se hizo a dos tiempos distintos, 1 y 3 h. El exceso de ferritina que no había reaccionado se eliminó mediante varios lavados de la placa de oro con agua bidestilada (3 lavados con 1 ml de agua milli-Q cada uno). Posteriormente con corriente de argón se secaron las placas de oro para poder hacer las medidas de AFM.

***Deposición de la Ft-SPDP sobre la superficie de Au (Ft-SPDP+Au)***

Se partió de una disolución de Ft 1 mg/ml (Sigma-Aldrich, lot. 083K7051, 76 mg/ml) en PBS 8.0 y se incubó durante 24 h con una disolución de SPDP (20 mM, 1 ml). La disolución resultante se dializó exhaustivamente frente a agua bidestilada (Milli-Q) para eliminar el SPDP que no había reaccionado.

La superficie de oro lavada se sumergió en la disolución de Ft-SPDP (1 mg/ml), tras 3 h de incubación la superficie se lavó con agua bidestilada (1 ml x 3 veces) y finalmente se secó bajo un flujo de argón antes de realizar la visualización por AFM.

***Deposición Ft-Au***

Se preparó una disolución de ferritina 1 mg/ml en agua bidestilada (Sigma-Aldrich, lot. 083K7051, 76 mg/ml). Se hicieron distintos ensayos de deposición a diferentes tiempos de incubación sobre placas de oro lavadas con metanol pero que no habían sido tratadas con SPDP. Tras el tiempo de incubación al igual que en los casos anteriores las placas de oro se lavaron con agua bidestilada (3 lavados con 1 ml de agua milli-Q cada uno), para eliminar el exceso de producto que no hubiese reaccionado y posteriormente se visualizaron por AFM.

Los estudios de AFM se realizaron en colaboración con el Profesor D. Julio Gómez-Herrero, del Departamento de Física de la Materia Condensada, de la Universidad Autónoma de Madrid.

**2.5. Ferritinas fluorescentes: Ft-NBD (7-(2-hidroxi)-4 nitrobenzofurano)**

Para dicha funcionalización hemos utilizado el 7-(2-hidroxi)-4-nitrobenzofurano perteneciente a la familia de los fluoróforos 7-X-4-nitro-2, 1, 3, benzofurazano (NBD-X).

### **Síntesis del NBD**

El fluoróforo fue preparado por la Dra. Julia Morales del grupo de Carbohidratos dirigido por el Profesor D. Francisco Santoyo del Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Granada.<sup>4</sup>

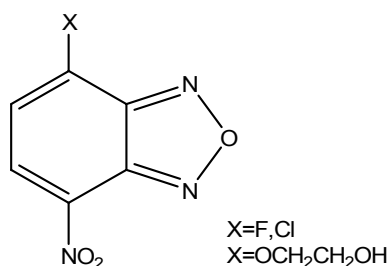


Figura 2.3. Estructura de los fluoróforos NBD-X

### **Síntesis del conjugado Ft-NBD**

Se trabajó con una solución de ferritina de bazo de caballo (Sigma lot. 083K7051, 2000 Fe/ferritina) en tampón HEPES 0.05 M pH 8.0, y se incubó con 7 mg de NBD-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH, lo que se corresponde con un exceso molar de 160 fluoróforos con respecto al número total de residuos de lisina (72 lys) que expone la proteína en su superficie externa. La incubación se llevó a cabo a diferentes tiempos, 2, 8, 14, 18, 24, 48 y 72 h, siempre a temperatura ambiente y en agitación. El exceso de fluoróforo se eliminó por diálisis usando las membranas de Spectrapor con 100 kDa de tamaño de poro (SpectrumLabs). La diálisis se hizo frente a agua milli-Q durante 2 días, con cambios de agua cada 6 h.

Para la preparación de las muestras con apoferritina se llevó a cabo un procedimiento similar.

### ***Estudio del conjugado NBD-lisina***

Se incubaron 1.4 ml de una disolución  $5.7 \times 10^{-3}$  M de NBD-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH con 1 ml de la disolución 0.5 M de lisina, que previamente había sido tratada con NaHCO<sub>3</sub> (125 mg). La incubación se realizó a temperatura ambiente y a pH 8. La formación del complejo NBD-lisina se siguió por espectroscopia visible (Thermospectronic UV300 spectrophotometer) tomando espectros en un rango de 210-600 nm. Al cabo de 3h, cuando no se observaba ningún cambio en el espectro UV-Vis se consideró que la reacción había finalizado. A partir del valor de absorbancia a 475 nm y conociendo la cantidad de fluoróforo inicial se calculó el coeficiente de extinción molar del NBD, siendo este de  $23000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

### **2.6. Fluorescence Energy Transfer (FRET): Ft-AF350, Ft-AF430 y Ft-AF350-AF430**

#### ***Síntesis Ft-AF350***

A partir de la disolución de ferritina comercial de bazo de caballo (Sigma lot. 083K7051, 2000 Fe/ferritina), se preparó una disolución, 2 ml de 1 mg/ml, en tampón HEPES pH 8, que se hizo reaccionar con 0.4 mg del derivado succinimidil éster del Alexa Flúor 350 (AF350, figura 2.4) y se incubó durante 5 h a temperatura ambiente protegiéndolas de la luz. Se trabajó con un fuerte exceso del succinimidil éster Alexa Flúor 350 con respecto a la ferritina, de aproximadamente 300 equivalentes. El exceso de alexa se eliminó por diálisis exhaustiva y cromatografía, de igual modo que en los casos anteriores.

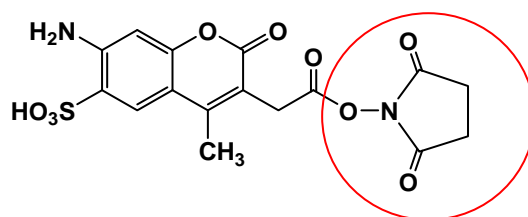


Figura 2.4. Estructura del Succinimidil éster Alexa Flúor 350

De igual manera se llevó a cabo la incubación del succinimidil éster Alexa Flúor 350 con la apoferritina (Sigma lot. 034K70131, 53 mg/ml).

### **Síntesis Ft-AF430**

El procedimiento llevado a cabo para la incubación del succinimidil éster del fluoróforo Alexa Flúor 430 (AF430, figura 2.5) es idéntico al que se siguió para el fluoróforo succinimidil éster Alexa Flúor 350, tanto para la ferritina como para la apoferritina.

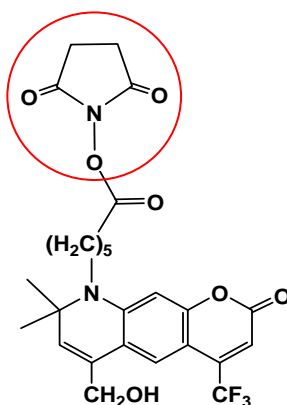


Figura 2.5. Estructura del Succinimidil éster Alexa Flúor 430

***Preparación del conjugado Ft-AF350-AF430***

Se prepararon distintas soluciones de ferritina (2 ml de 1 mg/ml) partiendo de las disoluciones comerciales de igual forma que en el caso anterior, y se incubaron con distintas cantidades de ambos fluoróforos, probando las proporciones molares 1:1, 1:2, 1:3, 1:5 y 1:10 (AF350:AF430). También se probó un amplio rango de tiempos de incubación que van desde las 3 h a las 24 h. La incubación siempre se realizó en oscuridad y a 4°C.

El exceso de los alexas flúor se eliminó al igual que en el caso en el que únicamente adicionábamos uno de los fluoróforos a la proteína, por diálisis exhaustiva y posterior cromatografía por exclusión de tamaño, recuperándose las fracciones que contienen la proteína.

Este mismo procedimiento se lleva a cabo para las muestras realizadas con apoferritina (Sigma lot. 055K7012, 66 mg/ml).

***Reconstitución de la proteína a partir de ApoFt-AF350 y ApoFt-AF430 (RApoFt-AF350-AF430)***

Partiendo de una solución de apoferritina comercial (Sigma lot. 055K7012, 66 mg/ml) se prepararon dos disoluciones de 2 ml con una concentración de 1 mg/ml, en HEPES 8. Cada una de estas disoluciones se incubó separadamente con únicamente uno de los fluoróforos. La muestra ApoFt-AF350 se incubó con 0.4 mg del fluoróforo succinimidil éster Alexa Flúor 350 y la otra muestra, ApoFt-AF430, se incubó con 1.3 mg de succinimidil éster Alexa Flúor 430. El tiempo de incubación en ambos casos fue de 3 h y la incubación se hizo a 4°C y protegidas frente a la luz. El exceso de fluoróforo de cada una de las muestras se eliminó por diálisis exhaustiva frente a agua milli-Q durante 2 días, haciendo cambios de agua cada 6 h.

Se recuperaron las disoluciones dializadas y el pH se llevó a 2 mediante diálisis frente a HCl 0.1 M (15 min de diálisis). Una vez que ambas muestras ApoFt-AF350 y ApoFt-AF430 estaban a pH 2, se mezclaron durante 30 minutos. A continuación, se volvió a subir el pH a 8, por diálisis de la muestra frente a HEPES 8.0 durante 3 h, para asegurar la reconstitución de la proteína. Es conveniente recordar que estudios previos han demostrado que la proteína a pH límite, pH 2, se desnaturaliza rompiéndose en sus 24 subunidades y que cuando volvemos a subir el pH a un pH fisiológico, con un rango comprendido entre 7.4-8 la proteína se renaturaliza volviendo a su configuración nativa.<sup>5</sup>

En este ensayo la cantidad final de los fluoróforos en la partícula reconstituida se corresponde con una proporción molar 1:2 entre los dos fluoróforos (AF350:AF430).

## **2.7. Modificación del núcleo metálico de la ferritina**

### ***Síntesis Apo-Cu(0)***

La apoferritina comercial de bazo de caballo ( $4 \cdot 10^{-5}$  mmol; Sigma–Aldrich, lot. 055K7012) se incubó con el ión metálico, Cu(II) (0.1 M CuSO<sub>4</sub>, 0.1 mmol), el pH fue continuamente ajustado a 8 con NaOH 0.01 M. Se obtuvo una disolución azul que se dializó exhaustivamente frente a agua bidestilada y posteriormente se cromatografió por cromatografía de exclusión de tamaño (G-25 Sephadex). A las fracciones de la cromatografía que contenían la proteína y Cu, se le adición un agente reductor (4 mg NaBH<sub>4</sub>), produciéndose un viraje del color de la solución de azul a negro debido al paso del Cu(II)-ApoFt a Cu(0)-ApoFt. La disolución final fue dializada frente a agua bidestilada y a 4°C.<sup>6</sup>

Todas las disoluciones fueron previamente desgasificadas y la reacción se llevó a cabo en una caja seca en atmósfera de argón.

### ***Estudio de eliminación del Cu (II) desde la apoferritina***

La disolución de Cu(II)–ApoFt (1.5 ml, con una concentración de Cu  $3.8 \cdot 10^{-4}$  M) y la disolución del tetra-*p*-tosilato de 5,10,15,20-tetrakis (4(trimetilamino) fenil)-21H,23H-porfirina (TTMAPP, 0.1 ml,  $1 \cdot 10^{-3}$  M) se incubaron juntos a dos temperaturas (25 y 40 °C) en una cubeta de cuarzo específica para la espectroscopia UV/Vis.

La formación del complejo Cu(II)–TTMAPP en el transcurso de la reacción se siguió mediante espectroscopia UV/Vis (Thermospectronic UV300) a 432 nm, usando como control una disolución de Cu(II)–ApoFt idéntica a la utilizada para la preparación de la muestra. Se realizaron 20 ciclos, uno cada 10 minutos, que no mostraron cambios significativos con respecto al de partida, poniendo de manifiesto que el ligando TTMAPP no compleja Cu(II) del sistema Cu(II)-ApoFt.

### **2.8. Nanopartículas decorando nanopartículas: MFt-QD525, MFt-QD655, MFt-QD800**

Los quantum dots (QD525, QD655, QD800) se compraron en la casa comercial Invitrogen. Los quantum dots están recubiertos por un polímero funcionalizado con grupos carboxílicos, que serán los que reaccionarán con el grupo amino de la ferritina. Los residuos carboxílicos de los QDs deben activarse con EDC (1-etil-3-[3-dimetilaminopropil] carbodiimida). 20  $\mu$ l de la solución stock del QD comercial (8 mM) se incubaron con 10  $\mu$ l de una disolución stock de EDC (10 mg/ml en agua bidestilada) durante 30 min para su activación.

A la solución de MFt<sub>200</sub> o Ft<sub>200</sub>, 2 ml 1 mg/ml, en tampón PBS (preparada como se especifica en el apartado 2.1) se le adicionó la mezcla anterior del QD y se dejó incubando durante 24 h en agitación y a 4°C. Posteriormente la muestra se purificó en una columna de cromatografía por exclusión de tamaño (Sephacryl 5,5



cm x 1,5 cm de lecho, Sigma) con el fin de eliminar el exceso de producto que no hubiese reaccionado.

## INSTRUMENTACIÓN

### *Diálisis*

La diálisis es un método de purificación, cuyo fundamento se basa en el transporte pasivo de solutos a través de membranas semipermeables, concretamente es el paso de solutos desde una disolución de mayor concentración a otra de menor concentración.

La diálisis es el proceso de separar las moléculas en una solución por la diferencia en sus índices de difusión y tamaño a través de una membrana semipermeable.

Las bolsas de diálisis utilizadas se compraron a Spectrum Laboratories. Las membranas de diálisis son del tipo Spectra/Pro Float-A-Lyzer; consisten en una membrana de éster de celulosa con un poro de 100 KDa. Este tipo de bolsas de diálisis son utilizadas para la separación de productos biológicos con alta pureza, como pueden ser proteínas, péptidos, anticuerpos, DNA, etc. También son ampliamente utilizadas para purificación porque eliminan moléculas contaminantes de bajo peso molecular, permiten la eliminación de sales y permiten cambios de soluciones tampones.

La solución impurificada que contiene varios tipos de moléculas se introduce en la bolsa semipermeable de diálisis y se coloca en un envase con una solución tampón o agua bidestilada (milli-Q). Las moléculas lo suficientemente pequeñas como para pasar a través de los poros (a menudo agua, sales y otras moléculas pequeñas) tienden a moverse hacia adentro o hacia afuera de la bolsa de diálisis en la dirección de la concentración más baja. Aquellas moléculas que poseen un mayor peso molecular (a menudo proteínas, ADN, o polisacáridos) y que por tanto tienen dimensiones mayores al diámetro del poro son retenidas

dentro de la bolsa de diálisis. Permittiéndonos así la purificación de la muestra sin pérdida alguna de producto.

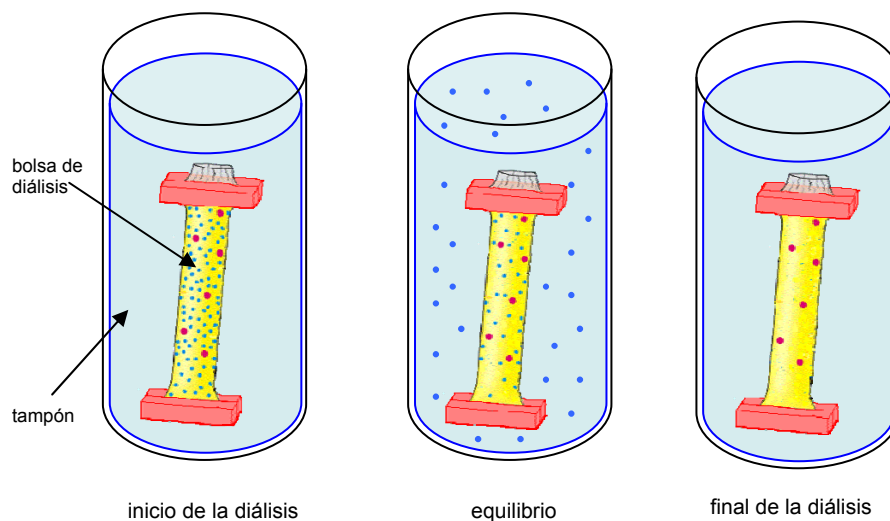


Figura 2.6. Proceso de diálisis

### ***Cromatografía por exclusión de tamaño***

La cromatografía es una técnica que permite la separación de moléculas diferentes presentes en una misma muestra. El método está basado en la circulación de una fase móvil, que eluye la muestra a separar, a través de una fase estacionaria. Dependiendo de la afinidad relativa que por ambas fases tengan los distintos compuestos presentes en la mezcla resultará su separación. En la cromatografía de exclusión por tamaño (llamada a veces columna de filtración en gel) la separación se lleva a cabo por diferencias en el tamaño molecular y la habilidad de las diferentes moléculas para penetrar en los poros de la fase estacionaria.

Los elementos básicos de una columna de cromatografía por exclusión de tamaño son la fase estacionaria y la fase móvil:

- La *fase estacionaria*, está formada por un sólido poroso soportado en el interior de una columna de plástico o vidrio. La matriz de la columna esta formada por un polímero entrecruzado que puede ser de varios tipos: dextranos con enlaces cruzados (sephadex), agarosa (sepharose, Bio-gel A), poliacrilamida (Bio-gel B), etc. Todos estos geles (fase estacionaria) se hallan constituidos por gránulos (partículas) de un material esponjoso hidratado, que contiene poros con un tamaño de diámetro determinado.
- La *fase móvil* se encuentra formada por la solución que lentamente va atravesando la fase estacionaria. La solución que sale al final de la columna se reemplaza constantemente por nueva solución que se suministra por la parte superior de la columna.

La muestra que se va a separar se coloca en una capa sobre la parte superior de la columna y se permite que lentamente se introduzca en el interior de la matriz sólida mientras se añade nueva solución también por la parte superior de la columna. La solución heterogénea forma una banda dentro de la fase móvil que inicialmente corresponde a la anchura de la banda de muestra aplicada sobre la columna. Conforme los solutos a separar migran a través de la columna, su avance se encuentra retardado en diferente grado por las interacciones diferenciales que cada uno de ellos pueda ejercer con la fase estacionaria.

Cuando se hace pasar una mezcla de moléculas de distinto tamaño, a través de una columna de filtración en gel, aquellas moléculas con un tamaño mayor que el diámetro de los poros de las partículas, sólo podrán moverse en su camino, a través de la fase estacionaria, en el espacio que queda entre las partículas ya que son demasiado grandes para introducirse en los poros de las partículas de polímero, y por lo tanto, no se verán retrasadas en su descenso. En

cambio aquellas moléculas capaces de penetrar en las partículas se verán retrasadas por la fase estacionaria, ya que tienen que atravesar los laberintos que se encuentran en el interior de las partículas de polímero en su marcha a lo largo de la columna, en mayor medida, cuanto menor sea su tamaño. Por lo tanto, las moléculas eluyen en este tipo de cromatografía por orden decreciente de tamaño molecular.

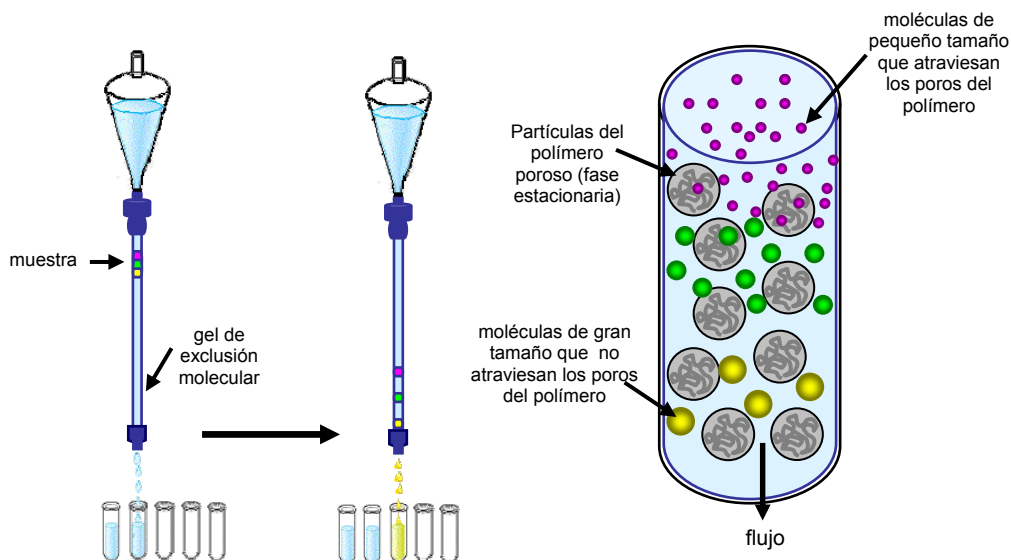


Figura 2.7. Proceso de cromatografía por exclusión de tamaño

La cromatografía de exclusión por tamaño se usa generalmente para las separaciones preparativas de macromoléculas de origen biológico, así como para la purificación de polímeros orgánicos sintéticos.

### ***Espectroscopia UV-visible***

Las medidas de UV-visible se realizan en un espectrofotómetro Thermospectronic UV300. Estas medidas nos permiten monitorizar la proteína en todo momento ya que presenta una banda de absorción muy característica a

280 nm. Aunque en el caso de la ferritina posee una segunda banda anchísima que alcanza hasta el visible, a 400 nm. De igual forma podemos controlar la presencia de fluoróforos y colorantes en la muestra.

La cantidad de moléculas de colorante unidas por proteína se determina mediante los valores de absorbancia a 495 y 596 nm, para el colorante rojo y azul, respectivamente, ya que en esta zona no hay contribución de la proteína, que es monitorizada a 280 nm. Los coeficientes de extinción molar para cada uno de los colorantes utilizados, son  $10000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  para el colorante rojo y  $21000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  para el azul.

Para el NBD los datos de absorbancia se toman a 475 nm (estos valores se corrigen sustrayéndole el espectro original de la ferritina, ya que a esta longitud de onda la proteína tiene una pequeña contribución a aproximadamente 400 nm). El coeficiente de extinción molar usado es el calculado a partir de la incubación de NBD con la lisina,  $23000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

En el caso de los fluoróforos pertenecientes a la familia alexa, las medidas de absorbancia se toman a 350 y 430 nm, para el Alexa Flúor 350 y Alexa Flúor 430, respectivamente. Se realiza la debida corrección de estos valores de absorbancia. Los valores del coeficiente de extinción molar usados para cada uno de los fluoróforos han sido los publicados en la bibliografía:  $19000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  para el Alexa Flúor 350 y  $16000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  para el Alexa Flúor 430.<sup>7</sup>

### ***Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE)***

Es un método analítico basado en la separación de sustancias cargadas al aplicar un campo eléctrico, aquellas partículas cargadas positivamente (cationes) migrarán hacia el cátodo y las cargadas negativamente (aniones) hacia el ánodo.

La electroforesis nativa se hace en gel de poliacrilamida (PAGE) sin uso de ningún tipo de desnaturalizante, para evitar el desensamblaje de la proteína en sus 24 subunidades. Se prepara un gel con dos fases siguiendo el protocolo de Lammeli, que comprende un gel concentrador (stacking gel) en el que se cargan las muestras [4% de acrilamida 0.125 M, Tris 0.5 M pH 6.8, 0.1% TEMED (N,N,N',N'- tetrametilendiamina), 0.05% de persulfato amónico] y un gel separador (separating gel) [7,5% de acrilamida 0.375 M, Tris 1.5 M pH 8.8, 0.05% TEMED (N,N,N',N'- tetrametilendiamina), 0.05% de persulfato amónico]. La electroforesis se corre a 200V durante 4h con polaridad cátodo-ánodo convencional en una cubeta de electroforesis del tipo PROTEAN II xi Cell (BIORAD).

En cada pocillo se cargan 50 µl donde está la muestra diluida en un tampón de carga que contiene 1.0 ml de Tris 0.5 M a pH 6.8, 0.8 ml glicerol al 99%, 0.4 ml de azul de bromofenol 0.05% y 3.8 ml de agua bidestilada.

El gel se tiñe con Azul de Coomasie Brilliant Blue R250 que marca la capa proteica (0.1% del fijador en una mezcla agua/metanol/ácido acético glacial, 40% MeOH, 10% HOAc) durante 30 minutos y posteriormente se destiñe con una solución agua/metanol/ácido acético glacial (40% MeOH, 10% HOAc), se realizan varios cambios de la solución decolorante durante 2 h-3 h.

### ***Espectroscopia de fluorescencia***

Los espectros de fluorescencia, emisión y excitación, se toman en un espectrofotómetro Cary Eclipse (ELO7023675). Todos los espectros se toman a temperatura ambiente.

En el caso de NBD los espectros de emisión se toman excitando las muestras a 470 nm, puesto que en el espectro de excitación se encuentran dos picos, un máximo centrado a 485 nm con un hombro a 475 nm, la anchura de rendija usada es de 5 y 10 nm para el monocromador de excitación y emisión

respectivamente. En el caso de los espectros de excitación la emisión se fija a una longitud de onda de 542 nm, ya que el espectro de emisión del NBD muestra un único máximo alrededor de 550 nm, con una anchura de rendija de 10 y 5 nm, al igual que en el caso anterior.

Los datos del espectro de fluorescencia recopilados en la bibliografía <sup>7</sup> para el Alexa Flúor 350 indican que el máximo de excitación se centra a 346 nm y el de emisión a 442 nm. A la hora de tomar el espectro de emisión la muestra se excita a 327 nm con un ancho de rendija de 5 y 10 nm para el monocromador de excitación y emisión respectivamente. Y para el espectro de excitación la emisión se fija en un rango de 400 a 600 nm, también con anchuras de rendija de 10 y 5 nm, respectivamente.

En el caso del Alexa Flúor 430, cuyo máximo de excitación se encuentra a 434 nm y el de emisión a 531 nm, el espectro de emisión se toma excitando la muestra a 425 nm con una anchura de rendija de 5 y 10 nm para el monocromador de excitación y emisión respectivamente. Y el espectro de excitación se toma fijando la emisión a un rango de longitud de onda comprendido entre 440 y 600 nm, siendo las anchuras de rendija de 10 y 5 nm, respectivamente.

Los quantum dots (QD) son semiconductores y debido a su tamaño nanométrico presentan unas características especiales en la fluorescencia, y es que tienen un rango de excitación muy amplio y un espectro de emisión muy estrecho. En este caso la longitud de onda elegida para excitar cada uno de los quantum dots es la misma y se corresponde con 340 nm, con un ancho de rejilla de 5 y 5 nm para el monocromador de excitación y emisión respectivamente. Y para los espectros de excitación la emisión se fija en un rango de 400 a 900 nm, también con anchuras de rendija de 5 y 5 nm, encontrándose los máximos centrados a 525 nm, 655 nm y 800 nm para los QD525, QD655 y QD800 respectivamente.



### ***Espectroscopia de absorción atómica (AAS)***

Para las medidas de Espectroscopia de Absorción Atómica en el caso de las muestras de Cu en las que la concentración de partida de la proteína es de 5 mg/ml, se toman 0.4 ml de la muestra y los llevamos hasta 4 ml en agua bidestilada (dilución 10). Mientras que para las muestras de Fe en las que la concentración de partida de la proteína es de 38 mg/ml se hace una dilución 100, tomando 0.05 ml de la muestra que se llevan a 5 ml de agua bidestilada con el objeto de que el rango de concentración de metal medido en ppm (partes por millón) entre dentro del rango medible por el espectrómetro de absorción atómica.

Las medidas se realizan en un espectrómetro de absorción atómica PERKIN ELMER mod.5100 con una cámara de grafito PERKIN ELMER mod. 5100 ZL ZEEMAN

Estas medidas se realizan en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada

### ***Medidas de magnetismo (SQUID)***

El estudio de las propiedades magnéticas de las muestras se realiza mediante un magnetómetro tipo SQUID ("Superconducting Quantum Interference Device") de la marca Quantum Design. Este equipo es un sofisticado instrumento analítico configurado específicamente para el estudio de la magnetización ( $M$ ) y la susceptibilidad ( $\chi_M$ ) de muestras sobre un amplio rango de temperaturas (de 1.9 K a 400 K) y campos magnéticos (de 5 T a  $-5$  T). Además, la gran sensibilidad del magnetómetro SQUID permite determinar la susceptibilidad magnética con apenas unos miligramos de muestra.

Las muestras utilizadas en este tipo de medidas deben ser previamente liofilizadas, usando un liofilizador del tipo CRYODOS-50. Para ello se congela la

muestra con nitrógeno líquido y se liofilizan durante 24 horas a una temperatura del condensador de  $-50^{\circ}\text{C}$  y bajo un vacío de  $7 \times 10^{-2}$  mbar. Posteriormente las muestras se molturan y pesan, puesto que las medidas obtenidas en el SQUID deben referirse a una unidad de masa (emu/g) o de volumen (emu/cm<sup>3</sup>).

En esta tesis se han llevado a cabo principalmente dos tipos de medidas magnéticas:

*Curvas de magnetización a campo cero (ZFC) y a campo no nulo (FC)*

Los datos obtenidos de las medidas de magnetización a campo cero (zero field-cooling) y campo no nulo (field cooling) evalúan la dependencia de la susceptibilidad magnética de los materiales con la temperatura (figura 2.8). Esta medida se utiliza normalmente para determinar la llamada temperatura de bloqueo ( $T_B$ ). Las medidas de magnetización ZFC-FC son llevadas a cabo de la siguiente manera:

Para la curva ZFC la muestra primero se enfría en ausencia de campo magnético externo desde temperatura ambiente hasta una temperatura baja normalmente 2 K. Entonces se aplica un campo magnético y la magnetización en función de la temperatura se mide durante el proceso de calentamiento hasta temperatura ambiente.

La curva FC se obtiene midiendo la magnetización cuando la muestra se enfría en el mismo campo magnético antes aplicado para la ZFC.

En las medidas ZFC los dipolos magnéticos de la muestra están ordenados al azar a temperatura ambiente y permanecen así después del enfriamiento. A baja temperatura los dipolos no tienen energía térmica suficiente para rotar pero cuando se incrementa la temperatura los dipolos magnéticos se orientan en dirección al campo resultando en un incremento del momento

magnético. En las medidas FC los dipolos están alineados a temperatura ambiente y son enfriados en este estado. Posteriormente, cuando se hace subir la temperatura, esta proporciona la energía para que los momentos magnéticos vuelvan a orientarse al azar dando como resultado una disminución del campo. La temperatura que corresponde al punto más alto del pico de la curva ZFC es la temperatura de bloqueo  $T_B$  y depende del volumen de la partícula, su anisotropía y su orientación con respecto al campo aplicado. Por debajo de esta no hay energía térmica suficiente para que los dipolos magnéticos se orienten al azar y el material se comporta como ferromagnético o ferrimagnético. Por encima de ella sí hay suficiente energía térmica, los dipolos se orientan al azar comportándose el material como paramagnético o superparamagnético. Si esta temperatura coincide con la temperatura de separación de las ramas ZFC y FC significa que las partículas son muy homogéneas, pero si no coincide, nos indica que existe una distribución de barreras de energía que puede estar relacionado con tamaño de partícula, cristalinidad, etc. Si cuando nos desplazamos hacia temperaturas más bajas la rama FC no permanece horizontal, sino que sube nos indica que no existe mucha interacción entre las partículas.

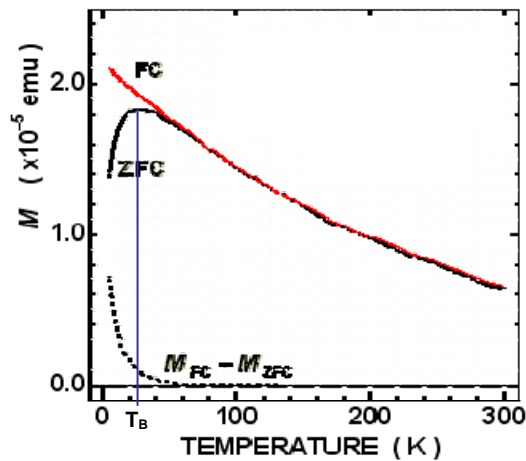


Figura 2.8. Ejemplo de una curva ZFC-FC.

En nuestro caso las medidas se realizaron en el rango de temperaturas comprendido entre 2-300 K y aplicando un campo constante de 50 G o 0.005 T.

### *Curva de Histéresis*

Las curvas de magnetización indican la variación de la magnetización (también llamada imanación o imantación) cuando se aplica un campo magnético (figura 2.9). Se basan en métodos inductivos, concretamente en la medida de la tensión inducida en un sistema de bobinas detectoras cuando varía el flujo magnético que la atraviesa según la ley de Faraday.

Los parámetros magnéticos que podemos determinar a partir de estos ciclos son:

- La magnetización a saturación ( $M_S$ ), que es la magnetización de un material cuando todos sus momentos magnéticos bipolares están alienados a lo largo del campo magnético aplicado.
- La magnetización remanente ( $M_R$ ), que es la parte de la inducción magnética que queda en el núcleo cuando el campo que realizó dicha inducción es nulo, es decir, la magnetización de la muestra a campo magnético cero después de que haya llegado a la  $M_S$ .
- La coercitividad magnética ( $H_C$ ), que es la fuerza del campo magnético necesaria para eliminar la magnetización remanente del material.

La magnetización de saturación es una propiedad intrínseca que depende del tipo de material, mientras que la magnetización remanente, la coercitividad y la susceptibilidad magnética son propiedades extrínsecas, que dependen del campo y de la preparación de la muestra y varían enormemente con el tamaño y la forma de las partículas, la rugosidad superficial, porosidad, cristalinidad, presencia de impurezas, exceso de agua, etc.

Las curvas de magnetización están originadas a partir de barreras de energías locales que surgen como consecuencia de la anisotropía intrínseca de las partículas. Esta anisotropía determinará el mecanismo a través del cual tiene lugar la saturación y posterior inversión de la magnetización, y consecuentemente, los valores de los parámetros característicos de esta curva. Cada curva caracteriza perfectamente a cada tipo de material magnético y nos permite deducir su comportamiento.

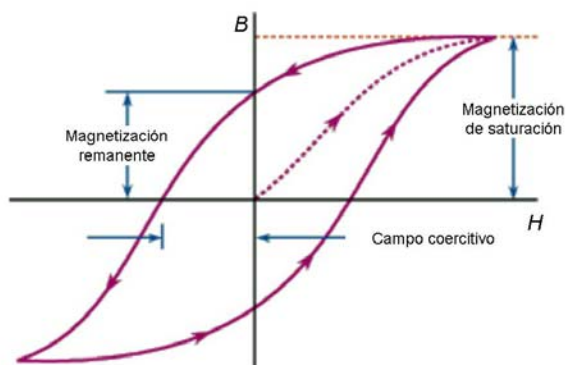


Figura 2.9. Curva de histéresis típica, dónde se indican H<sub>C</sub>, H<sub>S</sub> y M<sub>R</sub>

En nuestro caso los ciclos de histéresis se llevaron a cabo a una temperatura constante de 2 K y variando el campo desde +5 T a -5T.

Estas medidas se realizan en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada.

### ***Difracción de RX en polvo (XRD)***

Las medidas de XRD se realizan en un difractor BRUKER D8 ADVANCE usando radiaciones de CuK $\alpha$  con unas medidas de 0,08° 2 $\theta$ min<sup>-1</sup>.

Estas medidas se realizan en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada.

### ***Microscopia electrónica de transmisión (TEM)***

Las muestras usadas para los estudios TEM se preparan depositando una gota de la muestra sobre una rejilla de carbón revestida con Cu (carbon coated Cu grid) y secada al aire y a temperatura ambiente. Las micrografías electrónicas se toman en un Microscopio Electrónico de Transmisión (Philips CM-20HR) a 200 keV.

Estas medidas se realizan en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada.

### ***Microscopia confocal de fluorescencia.***

El microscopio de fluorescencia es una variación del microscopio de luz ultravioleta en el que los objetos son iluminados por rayos de una determinada longitud de onda. El sistema óptico del microscopio confocal de fluorescencia, no ilumina toda la preparación a la vez, sino que en cada momento sólo ilumina un pequeño punto a una cierta profundidad de la muestra. Para ello se necesitan fuentes luminosas de gran potencia, habitualmente haces láser, cuya luz pasa a través de un diafragma. La imagen observada es el resultado de la radiación electromagnética emitida por las moléculas que han absorbido la excitación primaria y reemitido una luz con mayor longitud de onda. Para dejar pasar sólo la emisión secundaria deseada, se deben colocar filtros apropiados debajo del condensador y encima del objetivo. Se usa para detectar sustancias con autofluorescencia (por ejemplo la vitamina A) o sustancias marcadas con fluorocromos.

Las muestras se depositaron sobre portas tratados con poli-L-lisina: cuando la muestra es depositada en el porta éste se sella y se deja secar durante unos minutos a temperatura y atmosfera ambiente.

Las imágenes del conjugado QDs-MFt se obtuvieron usando un microscopio confocal del tipo Leica (DMI6000) equipado con un rango de láseres que barren el espectro UV-visible: diodo azul (405 nm), Argón (458, 476, 488, 496, 514 nm) He/Ne (543 nm, 594 nm, 633 nm).

Estas medidas se realizan en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada.

### ***Microscopía de fuerza atómica (AFM)***

AFM son las siglas en inglés de Microscopía de Fuerza Atómica y a veces es también llamado SPM o Microscopio de Sonda de Barrido, es una técnica de imagen de alta resolución que puede resolver características tan pequeñas como un patrón atómico en espacio real.

El AFM trabaja llevando la punta del cantilever en contacto con la superficie de la cual va a hacer la imagen. Una fuerza iónica repulsiva aplicada desde la superficie a la punta dobla el cantilever hacia arriba. La cantidad de doblamiento, medida por un punto láser, se refleja en un fotodetector y se puede usar para calcular la fuerza. Al mantener la fuerza constante mientras rastrea la punta sobre la superficie, el movimiento vertical de la punta sigue el perfil de la superficie y se graba como la topografía de la superficie por el AFM.

En el caso de la deposición de la ferritina sobre la superficie de oro se usó un microscopio de fuerza atómica en el que las imágenes se recopilaban en el modo dinámico usando un Nanotec Electronica System. Los cantilevers usados (Olympus cantilevers) aplicaban una fuerza constante de 0.75 N/m. Dichas

mediadas fueron realizadas en el grupo del Profesor Félix Zamora de la Universidad Autónoma de Madrid.

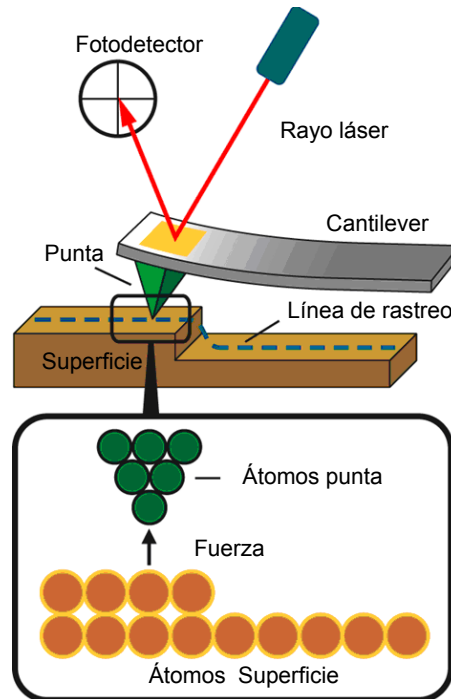


Figura 2.10. Esquema del funcionamiento de un AFM

### ***Espectroscopia de pérdida de energía de los electrones (EELS)***

En la espectroscopia de pérdida de energía de los electrones (EELS, Electron Energy Loss Spectroscopy) un material es expuesto a un haz de electrones con un conocido y estrecho rango de energía cinética. Algunos de estos electrones experimentarán una dispersión inelástica, lo que significa que pierden energía y tienen un camino escaso y desviado al azar. La cantidad de energía perdida puede ser medida por un espectrómetro e interpretada en términos de lo que causa la pérdida de energía.



Las pérdidas de energía se producen cuando los electrones del haz excitan tanto a los electrones de valencia del material, como a los electrones en las capas internas de los átomos de la red. Para que una de estas últimas excitaciones se produzca, es necesario que el haz cruce muy próximo al átomo excitado, dado que la energía de la excitación es característica del átomo.

Un espectro típico de pérdida de energía se puede analizar en tres regiones energéticas:

- *Región de pérdida cero (0 eV)*: principalmente contiene a los electrones que aún tienen la energía del haz original y tienen sólo interacción elástica. En especímenes finos, la intensidad del haz de pérdida cero es alta. No ofrece información analítica del espécimen, sólo ofrece información sobre el espesor de la muestra, por lo que el haz de pérdida cero es a menudo omitido durante la recogida del espectro.
- *Región de baja pérdida (5-100 eV)*: aquí, ocurre la excitación de los plasmones y las transiciones inter-bandas. La generación de los plasmones es la interacción inelástica más frecuente de los electrones con la muestra, la intensidad en esta región es relativamente alta. La pérdida de energía de los plasmones es proporcional a la densidad electrónica de las capas externas. Por tanto puede ser utilizada para calcular las fases estructurales del compuesto.
- *Región de pérdida del núcleo (< 100 eV)*: ocurren las transiciones desde los estados del núcleo ocupados hacia los estados inocupados sobre el nivel de Fermi. Para la ionización de los átomos, una energía mínima específica, la energía de ionización crítica o ionización umbral, debe ser transferida desde los electrones incidentes a los electrones expulsados de las capas internas (K, L, M,...) lo cual lleva a la ionización umbral en el espectro a pérdidas de energía que son características para un elemento.

De esta manera, EELS es complementaria a la espectroscopia de rayos X (EDX), y puede ser también utilizada para los análisis cuali- y cuantitativos de los elementos.

La espectrometría EELS asociada a la microscopía STEM (Scanning Transmission Electron Microscopy) le aporta la ventaja de la alta resolución espacial.

En nuestro caso en concreto, las micrográficas de los bioconjugados MFT-QD800, se realizaron en un TEM (Philips CM-20 HR a 200 keV) y las imágenes de HAADF-STEM (campo oscuro) y los datos de EELS en un equipo JEOL2010F en colaboración con el grupo del Profesor José J. Calvino de la Universidad de Cádiz. Se tomó una serie de 50 espectros de EELS con una sonda (haz de electrones) de 0.5 nm de ancho y una corriente de 0.5 eV que va escaneando la muestra a lo largo de una línea imaginaria que se trazó en la muestra. Simultáneamente también se recogieron en cada punto dentro del área analizada la intensidad de la señal dispersada de campo oscuro de alto ángulo (HAADF), cuya intensidad es proporcional a  $Z^2$ , es decir, el número atómico, por eso se denominan imágenes de contraste en Z. El tiempo de adquisición de los espectros fue de 1 segundo para evitar la degradación de la muestra ya que esto puede limitar la resolución espacial de las medidas.

Las muestras han sido preparadas por la deposición de una gota de la disolución a analizar en una rejilla de carbón (carbon-coated Cu grid) y secada al aire.

### ***Espectroscopia de absorción de rayos X (XAS)***

Los rayos-X son muy útiles para caracterizar los sólidos y sus estructuras. Pueden ocurrir fenómenos de difracción (interacción elástica) en la que no hay transferencia de energía entre los átomos y la radiación, sino un simple cambio de

dirección de la radiación electromagnética incidente. Sin embargo, los rayos-X también son absorbidos por la materia (interacción inelástica) que producen consecuencias como transiciones electrónicas de los niveles internos de los átomos.

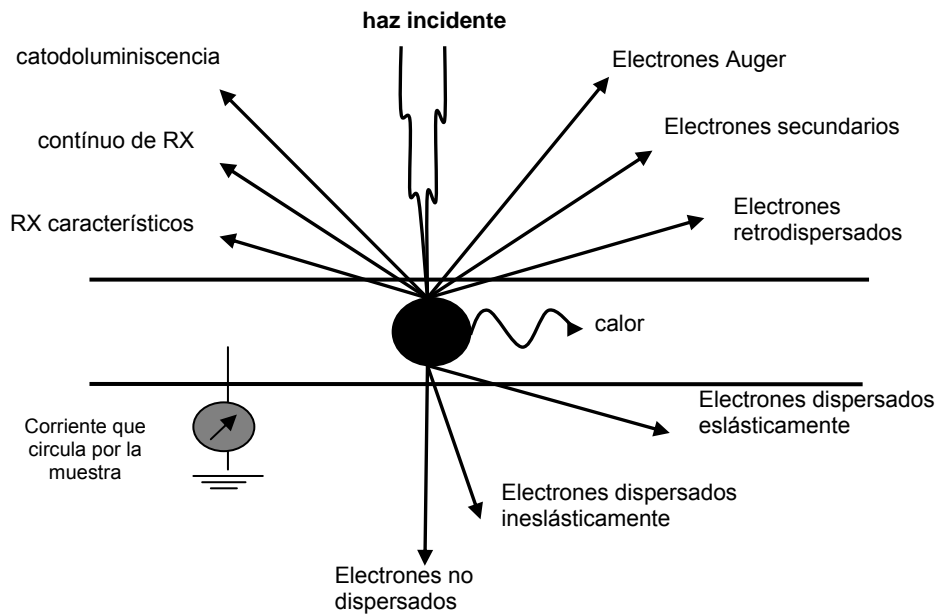


Figura 2.11. Dirección que siguen los electrones del haz incidente

El material puede responder de diversas formas a la absorción de rayos-X lo que origina un conjunto de técnicas relacionadas pero que pueden dar información complementaria. (1) Se pueden analizar las energías de los electrones emitidos que constituye la técnica XPS (X-ray Photoelectron Spectroscopy); (2) Se pueden analizar la energía de los electrones secundarios emitidos (electrones Auger) lo que da lugar a la técnica Auger; (3) Se pueden analizar las energías de los rayos-X emitidos por la muestra que constituye la técnica XRF (X-Ray Fluorescence); (4) Se puede analizar el espectro de energías absorbidas por la muestra lo que da lugar a las técnicas EXAFS (Extended X-ray Absorption Fine

Structure) y XANES (X-ray Absorption Near Edge Structure). En la figura 2.11 se representan los diversos fenómenos que se pueden dar con las técnicas correspondientes, cuando se irradia la muestra con una fuente de rayos-X intensa.<sup>8</sup>

La técnica denominada EXAFS analiza las variaciones en los bordes de absorción de los diferentes elementos. Experimentalmente, la señal de absorción se mide en transmisión analizando la relación entre la intensidad incidente y la transmitida mientras van cambiando las energías de las radiaciones que inciden sobre las muestras provenientes de un anillo sincrotrón.<sup>9</sup>

Es un hecho experimental que para un elemento (o muestra dada) la absorción de los rayos-X disminuye cuando la energía de la radiación incidente aumenta. Sin embargo, esta disminución no es monótona sino que hay discontinuidades en el coeficiente de absorción. Estas discontinuidades se denominan bordes de absorción y hay de diferentes capas: K, L, M... Esto saltos se deben a la absorción extra de fotones con la relajación por emisión de un electrón de las diferentes capas.

Esta técnica es menos precisa que los métodos difractométricos, sin embargo, tiene una ventaja puesto que se puede utilizar para el estudio de gases, líquidos y sólidos amorfos.

XANES es una técnica muy relacionada con el EXAFS pero sólo analiza la zona de absorción justo después del borde y permite principalmente el estudio de los estados de oxidación de los diferentes elementos aunque no tiene gran utilidad para abarcar estudios estructurales. Es muy utilizado para la caracterización de los estados de oxidación de los metales de transición.

Los experimentos de SAXS y XAS se realizaron en los equipos D11ASAXS1 y D04B-XAFS1, respectivamente, de la estación experimental

Synchrotron Light National Laboratory (LNLS), Campinas, Brasil. Los experimentos de SAXS se realizaron a una temperatura constante de 22°C, que se controlaba mediante un circuito de agua caliente. La longitud de onda incidente se fijó a 1.448Å y la distancia del detector (gas-filled 1D detector) fue de 1066 mm. Cada espectro se obtuvo como la combinación de al menos cinco espectros. Las correcciones de la intensidad de la luz incidente, de la absorción de la muestra y la interferencia del tampón se llevaron a cabo según el protocolo standard. Los experimentos de XAS se realizaron a temperatura ambiente (~ 22 °C). El tratamiento de los datos se realizó con los programas ATHENA y ARTEMIS, respectivamente, del IFFEFIT. Las amplitudes y fases se calcularon con el programa FEFF 6.0.

Las funciones de distribución (PDF) se obtuvieron de las medidas al ser tratadas por el programa GNOM 4.51 aplicando la transformada de Fourier.

Para la preparación de las muestras se mezclaron 2 mg de la muestra de ferritina con 10 ó 15 mg de nitruro de boro. Posteriormente las muestras se compactaron hasta llegar a un espesor de menos de 1 mm. La concentración media de Fe calculada fue de 0.1-0.2 g cm<sup>-3</sup>. Las muestras se expusieron durante 30 min a la radiación incidente y se realizaron cinco medidas independientes de cada una de las muestras. El estudio de la primera y última medida de cada muestra indicó que no existía daño alguno en la muestra debido a la radiación incidente. Los experimentos se llevaron a cabo usando una sonda de Si220 con un monocromador a 1.5 eV. Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente (22°C) en modo de transmisión usando una lámina de hierro metálico para la calibración y el alineamiento individual de cada medida. La referencia de las muestras se preparó mediante la deposición de la muestra de forma uniforme sobre filtros de una membrana de celulosa de 5 µm de diámetro celulosa. Todos los reactivos químicos se compraron en Sigma-Aldrich, sin necesidad de ningún proceso de purificación o preparación previo (ferrihidrita) siguiendo el

procedimiento descrito en la bibliografía.<sup>10</sup> El tratamiento de los datos se realizó con el programa IFEFFIT.<sup>11</sup>

### ***Imagen de resonancia magnética (MRI)***

La imagen de resonancia magnética (MRI) es una técnica de imagen usada principalmente en estudios médicos para obtener imágenes de alta calidad de los órganos internos del cuerpo humano. MRI se basa en los principios básicos de la resonancia magnética nuclear (NMR), una técnica espectroscópica usada para obtener información química y física de las moléculas a nivel microscópico.

En la breve historia de dicha técnica hay que mencionar a Felix Bloch y Edward Purcell, quienes obtuvieron el Premio Nobel en 1952, por el descubrimiento del fenómeno de la resonancia magnética en 1946. Desde el 1950 al 1970, la NMR se usó en el análisis molecular de propiedades tanto físicas como químicas.

En 1971 Raymond Damadian demostró que los tiempos de relajación en tejidos sanos y tumores eran diferentes, lo que motivó a los científicos a considerar la resonancia magnética para detección de tejidos tumorales.<sup>12</sup> En 1973 Hounsfield introdujo la técnica de tomografía basada en rayos X (CT). En 1975 Richard Ernst propuso el tratamiento de la imagen obtenida por resonancia magnética mediante el uso de la transformada de Fourier.<sup>13</sup> Esta técnica es la base de los principios usados en la MRI actual. En 1991, Richard Ernst obtuvo el Premio Nobel en química por dicho descubrimiento. Posteriormente se ha ido mejorando la técnica para disminuir los tiempos de adquisición en la imagen hasta conseguir la obtención de imágenes a tiempo real.<sup>14</sup>

La imagen de resonancia magnética (MRI) se basa en la absorción y emisión de energía en el rango de radio frecuencias del espectro electromagnético. Muchos científicos piensan que no se pueden obtener imágenes

de objetos menores que la longitud de onda de la energía que se usa para obtener la imagen. La MRI, teniendo en cuenta esta limitación, toma imágenes basándose en la variación de la fase y la frecuencia de la radio frecuencia de la energía absorbida y emitida por el objeto en estudio.

El cuerpo humano está formado en su mayoría por grasas y agua. Los ácidos grasos y el agua poseen numerosos átomos de hidrógeno, lo que hace que el cuerpo humano esté compuesto por un 63% de átomos de hidrógeno, que tiene una señal muy característica en NMR. Cada molécula de agua tiene un átomo de oxígeno y dos de hidrógeno. En la nube electrónica del hidrógeno se encuentran los protones, que tienen la propiedad de comportarse como espines: generan un pequeño campo magnético y son capaces de generar una señal en NMR.

Todos los experimentos de MRI se han realizado en colaboración con el grupo de la Dra. Pasquina Marzola de la Facultad de Medicina de la Universidad de Verona, en un equipo Biospec Tomograph System (Bruker, Karlsruhe, Germany) con un campo fijo de 4.7 T, y una barra magnética horizontal de 33 cm (Oxford Ltd, UK) y con una frecuencia de 200 MHz.

Los *tiempos de relajación transversales* ( $T_2$ ) se midieron usando un protocolo estándar SPIN-ECHO MULTI-ECHO con una secuencia que muestra los siguientes parámetros: FOV =  $2 \times 2 \text{ cm}^2$ , tamaño de la matriz =  $64 \times 64$ , espesor de la capa = 5 mm, número de eco = 8, el TR y el TE se van modificando en cada muestra según el valor de  $T_2$  esperado.

En el caso de la medida del *tiempo de relajación longitudinal* ( $T_1$ ), se usó la técnica de mapeo rápido de  $T_1$  con una secuencia IR-SNAPSHOT. Los parámetros fijados para la adquisición de los datos fueron: FOV =  $2 \times 2 \text{ cm}^2$ , tamaño de la matriz =  $64 \times 64$ , espesor de capa = 5 mm, TR/TE = 10/3.6 ms, ángulo de excitación =  $5^\circ$ . El pulso de inversión se hace mediante una secante hiperbólica de 5 ms. Las medidas se hacen variando el número de puntos

tomados en el eje X, 8, 16 y 32 puntos, con el fin de incrementar la resolución de la medida. Cuanto más corto es el valor de  $T_1$  mayor debe ser el número de puntos que se toman en el eje X. EL tiempo máximo de adquisición de la medida fue de 5 min.

Las imágenes de *First-passage* se adquirieron usando una secuencia ECHO PLANAR IMAGING (EPI) fijando los siguientes parámetros: tamaño de la matriz  $64 \times 64$ , FOV  $38 \times 38 \text{ mm}^2$  (en la rata) y  $20 \times 20 \text{ mm}^2$  (en el topo), grosor de la capa 2 mm, TE = 15 ms, TR = 50 ms y 4 repeticiones (con un tiempo de resolución de 5 imágenes/s).

Las *imágenes estáticas* (Steady-state images), que representan el decaimiento de la señal en un punto concreto del cerebro con el paso del tiempo, se adquirieron usando una secuencia de GRADIENTE ECO fijando los parámetros: TR/TE = 350/15 ms, ángulo =  $30^\circ$ , tamaño de la matriz =  $256 \times 192$ , FOV =  $35 \times 35 \text{ mm}^2$ , espesor de la capa = 1 mm. El tiempo de adquisición de cada imagen fue de 134 s; las imágenes comenzaron a tomarse 268 s tras la administración del agente de contraste. Como referencia externa, se uso un estándar de Gd, una disolución salina de 1 mM Gd-DTPA, para poder normalizar la imagen adquirida por el espectrofotómetro.

### ***Imagen óptica (OI)***

Es una técnica de imagen que usa como fuente de contraste la fluorescencia, bioluminiscencia, absorción o reflexión del agente de contraste. Es una técnica no invasiva que no genera fuertes preocupaciones de seguridad en el individuo, al igual que las demás modalidades de imagen médica.<sup>15</sup>

El inconveniente de dicha técnica es la falta de profundidad de penetración, especialmente cuando se trabaja en longitudes de onda visibles, ya que la profundidad de penetración se relaciona con la absorción y dispersión de la



luz, que es principalmente una función de la longitud de onda de la fuente de excitación. En general, la absorción de la luz y la dispersión disminuye al aumentar la longitud de onda. Así, cuando se trabaja en la región visible del espectro, sólo es posible la evaluación superficial del tejido, pero cuando nos movemos en la región cercana al infrarrojo 700-900 nm (NIR), la luz puede penetrar más profundamente, a profundidades de varios centímetros, debido a que el coeficiente de absorción de los tejidos es considerablemente inferior en dicha región.<sup>16</sup>

La imagen óptica ofrece la posibilidad de estudios in vivo no invasivos para el estudio de marcadores moleculares. Esta técnica se ha usado para el seguimiento a nivel molecular de la progresión de algunas enfermedades, la distribución de fármacos en el organismo, el desarrollo de biomarcadores específicos de enfermedades y tratamientos oncológicos.

Las sondas y etiquetas fluorescentes son una importante herramienta en la imagen óptica. Una gran cantidad de fluoróforos que emiten cerca del infrarrojo (NIR) se han empleado para obtener las imágenes in vivo, entre los cuales podemos citar, Cy5.5, Cy7, Alexa Fluor. Los quantum dots han generado un gran interés en este campo frente a los fluoróforos orgánicos debido a su alta fotoestabilidad y gran eficiencia cuántica.<sup>17</sup>

Los experimentos de imagen óptica se han realizado en colaboración con el grupo de la Dra. Laura Calderán de la Facultad de Medicina de la Universidad de Verona, en un equipo Vivo Vision Systems, IVIS<sup>®</sup> 200 Series (Xenogen Corporation, Alameda USA), constituido por una cámara negra con sensor de profundidad y retro iluminación CCD 1 (2.7 x 2.7 cm, -90°C) mediante una lámpara 150 W y 3250° Kelvin, con una resolución mínima de 20 µm (dimensión del píxel 13.5 µm, pixeles de la imagen 2048 x 2048), con una eficiencia cuántica superior al 85 % en la región comprendida entre 500-700 nm, al movernos a la zona superior del espectro UV-Vis llegando al IR, 400-900 nm, la eficiencia cuántica se disminuye al 30 %. El IVIS 200 puede trabajar en dos modalidades diferentes:

fluorescencia y bioluminiscencia y está equipado con un con un conjunto de filtros de excitación y emisión: GFP (445-490 nm), GFP background (410-440 nm) DsRed (500-550 nm), DsRed background (460-490 nm) Cy5.5 (615-665 nm), Cy5.5 background (580-610 nm), ICG (710-760 nm) y ICG background (665-695 nm).

Las imágenes se adquirieron y analizaron con el software Living Image 2.6 y Living Image 3D (Xenogen Corporation, Alameda USA).

Para llevar a cabo estos experimentos in vivo se suministraron (10  $\mu$ l/1 g ratón de MFt-QD800, 40 pM de una disolución de QD800). Se adquirió una imagen control inicial previa al suministro del agente de contraste y tras el suministro del agente se tomaron imágenes con el mismo protocolo que la serie control durante las 3 h sucesivas al suministro del MFt-QD800.

El protocolo seguido para la adquisición de las imágenes de Fluorescencia fue: tiempo de exposición = 1 segundo (tiempo que se está excitando la muestra); binning = 8 (parámetro que relaciona la sensibilidad con la precisión de la imagen); f/stop = 2 (apertura del objetivo, cromador); filtros de excitación = GFP, DsRed, Cy5.5, ICGbkg, ICG; filtros de emisión = ICG; FOV = 12.8 cm; altura del animal = 1.5 cm. Las fotografías se tomaron con un tiempo de exposición de 0.2 seg; binning = 4; f/stop = 8.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- 1.- Clemente-León, M.; Coronado, E.; Soriano-Portillo, A.; Colacio, E.; Domínguez-Vera, J. M.; Gálvez, N.; Madueño, R.; Martín-Romero, M. T. *Langmuir* **2006**, *22*, 6993–7000.
- 2.- Natividad Gálvez, Beatriz Ruiz, Rafael Cuesta, Enrique Colacio y José M. Domínguez Vera. *Inorg.Chem.* **2005**, *44*, 2706-2709.
- 3.- Fernández B, Gálvez N, Sánchez P, Morales J, Santoyo F, Cuesta R, Domínguez-Vera JM. *Inorganica Chimica Acta* **2007**, *360*,3951–3954.
- 4.- L. Johnson, S. Lagerkvist, P. Lindroth, M. Ahnoff, K. Martinsson, *Anal. Chem.* **1982**, *54*, 939.
- 5.- (a) B. Webb, J. Frame, Z. Zhao, M. L. Lee, G. D. Watt. *Arch. Biochem. Biophys.* **1994**, *309*, 178-183. (b) José. M. Domínguez-Vera et al. *Inorg. Chem.* **2003**, *42*, 6983. (c) Gerl M, Jaenicke R, *Eur Biophys J*, **1987**, *15*, 103.
- 6.-(a) Natividad Gálvez, Purificación Sánchez, José M. Domínguez-Vera, Alejandra Soriano-Portillo, Miguel Clemente-León and Eugenio Coronado. *J. Mater. Chem.*, **2006**, *16*, 2757–2761. (b) Miguel Clemente-León, Eugenio Coronado, Alejandra Soriano-Portillo, Natividad Gálvez and José M. Domínguez-Vera. *J. Mater. Chem.*, **2007**, *17*, 1–4.
- 7.- Invitrogen detection technologies. Molecular Probes. Amino Reactives Probes. Alexa Fluor Succidimyl Esters
- 8.- (a) Cramer, SP; Hodgson, KO. *Prog. Inorg. Chem.* **1979**, *25*, 1-39. (b) Scott, RA. *Structural and Resonance Techniques in Biological Research*; DL Rousseau, Ed.; Academic: New York, **1984**; pp 295-362.

9.- (a) Scott, RA. *Methods Enzymol.* **1985**, 117, 414-459. (b) Charnock, JM. *Rad. Phys. Chem.* **1995**, 45, 385-391.

10.- Towe, K. M.; Bradley, W. F. *J. Colloid Interface Sci.* **1967**, 24, 384–392.

11.- Newville, M. *J. Synchrotron. Radiat.* **2001**, 8, 322–324.

12.- R.V. Damadian, *Science* **1971**, 171: 1151,.

13.- A. Kumar, D. Welti, R.R. Ernst. *J. Magn. Reson.* **1975**, 18:69-83. *Naturwissenschaften*, **1975**, 62: 34,.

14.- B. Chapman, R. Turner, R.J. Ordidge, M. Doyle, M. Cawley, R. Coxon, P. Glover, P. Mansfield. *Magn. Reson. Med.* **1987**, 5:246-254,.

15.- Weissleder, R., Mahmood, U. *Radiology*, **2001**; 219:316-333.

16.- Harry L. Osterman and Amy Schutz-Geschwender *.LI-COR Biosciences*, **2007**.

17.- Olive D.M., Kovar, J.L., Simpson, M.A., Schutz-Geschwender, A. *Analytical Biochemistry*, **2007**; 367, 1-12.



### **3. FERRITINA: ¿UN BIOMARCADOR PARA LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER?**

El Fe es un elemento esencial para la mayoría de los seres vivos debido a las funciones vitales que desarrolla, sin embargo su exceso puede ser dañino por su alto carácter reactivo. El Fe en estado divalente es altamente tóxico, ya que al reaccionar con el peróxido de hidrógeno y el oxígeno genera radicales libres, a través de la reacción de Fenton (remitirse al apartado 1.1 de la Introducción). Dichos radicales libres pueden promover la peroxidación de los lípidos, rotura de las hebras de ADN, modificación y degradación de biomoléculas e incluso la muerte celular. Por todo esto el Fe se encuentra regulado por un complejo sistema, que garantiza unos niveles idóneos de Fe intracelular para realizar las funciones metabólicas en las cuales está implicado.<sup>1</sup>



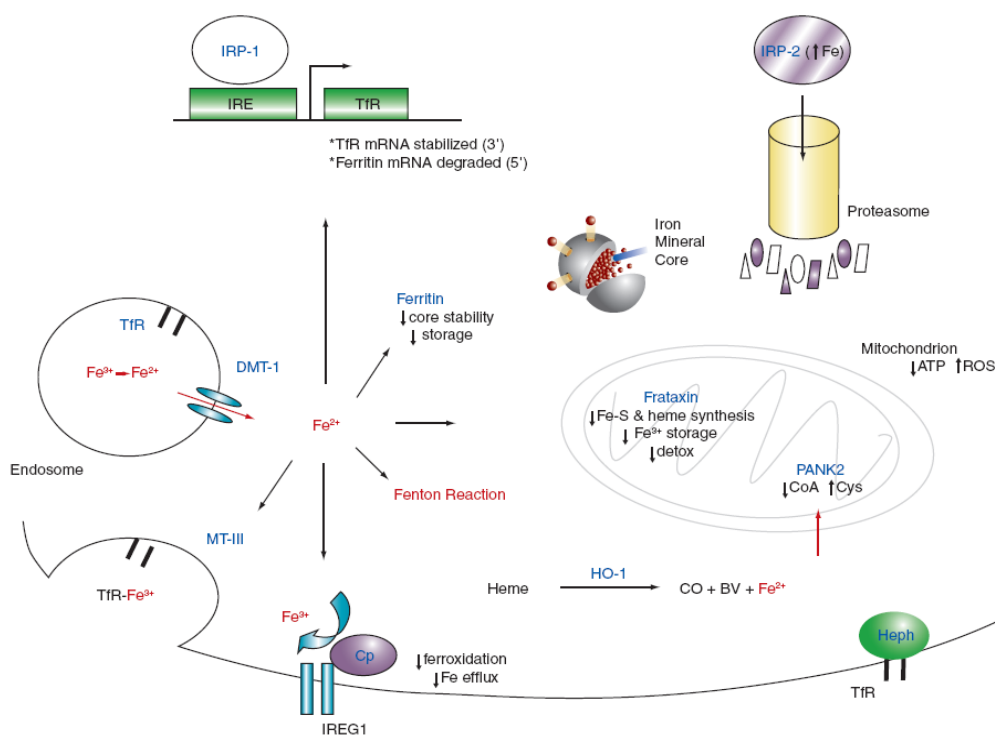


Figura 3.1. Sistema de regulación del Fe intracelular.

En la figura 3.1 se muestran las posibles rutas intracelulares del Fe. Cuando los niveles de Fe(III) son altos actúa el receptor de la transferrina (TfR), que a través de endosomas introduce el Fe en la célula. Una vez que el endosoma, que contiene el Fe en su interior se localiza en el citoplasma de la célula, la reductasa lo acidifica transformando el Fe(III) en Fe(II). Posteriormente el transportador divalente, el DMT-1, libera el Fe(II) al espacio citosólico. Este Fe(II) pasa a formar parte del Fe lábil (Labil Iron Pool, LIP), pudiendo: (a) intervenir en los procesos de regulación dirigidos por el sistema IRP/IRE, (b) ser secuestrado por chaperonas o proteínas de almacenaje de Fe, como son la ferritina, metalotioninas y frataxina, (c) reoxidación a Fe(III) y reintroducción en el flujo

sanguíneo a través de las proteínas transportadoras, Cp y IREG1 o (d) participar en reacciones catalizadas por Fe para generar especies reactivas (PANK-2).

De especial interés es el papel que juega el Fe en el cerebro, puesto que es requerido en el mantenimiento de la alta actividad respiratoria a nivel cerebral, mielinogénesis, síntesis de neurotransmisores como son la dopamina, serotonina o ácido aminobutírico (GABA), etc., por lo tanto los desniveles de Fe se han relacionado con el desarrollo de numerosas enfermedades neurodegenerativas, Alzheimer (AD), Parkinson (PD), enfermedad de Huntington (HD), esclerosis múltiple, infartos cerebrales, talasemia, etc.<sup>2</sup>

Como se ha comentado anteriormente en el apartado 1.3 de la Introducción son numerosos los hechos experimentales que corroboran la relación existente entre la desregulación de los niveles de Fe (ferritina) y las enfermedades neurodegenerativas, básicamente, mayor concentración de Fe y homocisteína a nivel cerebral y modificación en la composición del núcleo metálico de la ferritina, concretamente la aparición de magnetita.

En la presente tesis se han llevado a cabo un estudio pormenorizado de la composición del mineral de Fe en ferritinas a las que hemos ido eliminando químicamente y de forma gradual la cantidad de Fe. La preparación de ferritinas con diferente contenido en Fe es un escenario ideal para poder estudiar como se modifica la composición del mineral ferritínico cuando se lleva a cabo una de sus funciones elementales: liberar gradualmente Fe.

### **3.1. Generación de magnetita en la ferritina durante el proceso de eliminación de Fe.**

El estudio de la estructura del mineral de Fe albergado en la ferritina se llevó a cabo en un conjunto de muestras de ferritinas en las cuales el Fe fue



eliminado de forma gradual y controlada mediante el proceso de eliminación reductiva con TGA/AcONa (remitirse al capítulo 2, apartado 2.1).

Se prepararon muestras con distinto contenido en Fe partiendo siempre desde la Ft nativa (2200 Fe/prot) llegando a contenidos de 1200 Fe/prot ( $Ft_{1200}$ ), 500 Fe/prot ( $Ft_{500}$ ) y 200 Fe/prot ( $Ft_{200}$ ).

Para la preparación de las muestras ( $Ft_{1200}$ ,  $Ft_{500}$ ,  $Ft_{200}$ ) se partió de una disolución de  $Ft_{2200}$  (1 ml de 38 mg/ml) en agua bidestilada y se incubaron con una disolución TGA/AcONa (0.1 ml, 0.1 M), bipy (0.3 M) y NaCl (0.1 mg). Tras el periodo de incubación las muestras se filtraron cuidadosamente y posteriormente se dializaron exhaustivamente frente a agua bidestilada realizando varios cambios de agua.

Las muestras sintetizadas se analizaron por TEM, para estudiar los posibles cambios en la morfología del núcleo metálico de la Ft tras el tratamiento reductivo (figura 3.2). Se analizaron aproximadamente unas 100 partículas de cada una de las muestras en estudio, de las que se obtuvieron los tamaños medios de  $6.0 (\pm 0.7)$ ,  $5.9 (\pm 0.9)$ ,  $5.7 (\pm 0.1)$ ,  $5.1 (\pm 0.1)$ , para la  $Ft_{2200}$ ,  $Ft_{1200}$ ,  $Ft_{500}$  y  $Ft_{200}$  respectivamente. Esto nos indica que el proceso de eliminación de Fe no provoca una disminución del tamaño de la partícula, lo que sí es evidente en las imágenes de TEM es que conforme se elimina Fe, la forma de las partículas se va haciendo cada vez más irregular y pierden contraste. Esto queda patente al comparar las partículas de  $Ft_{2200}$  con las de  $Ft_{200}$ , que son los casos más extremos.

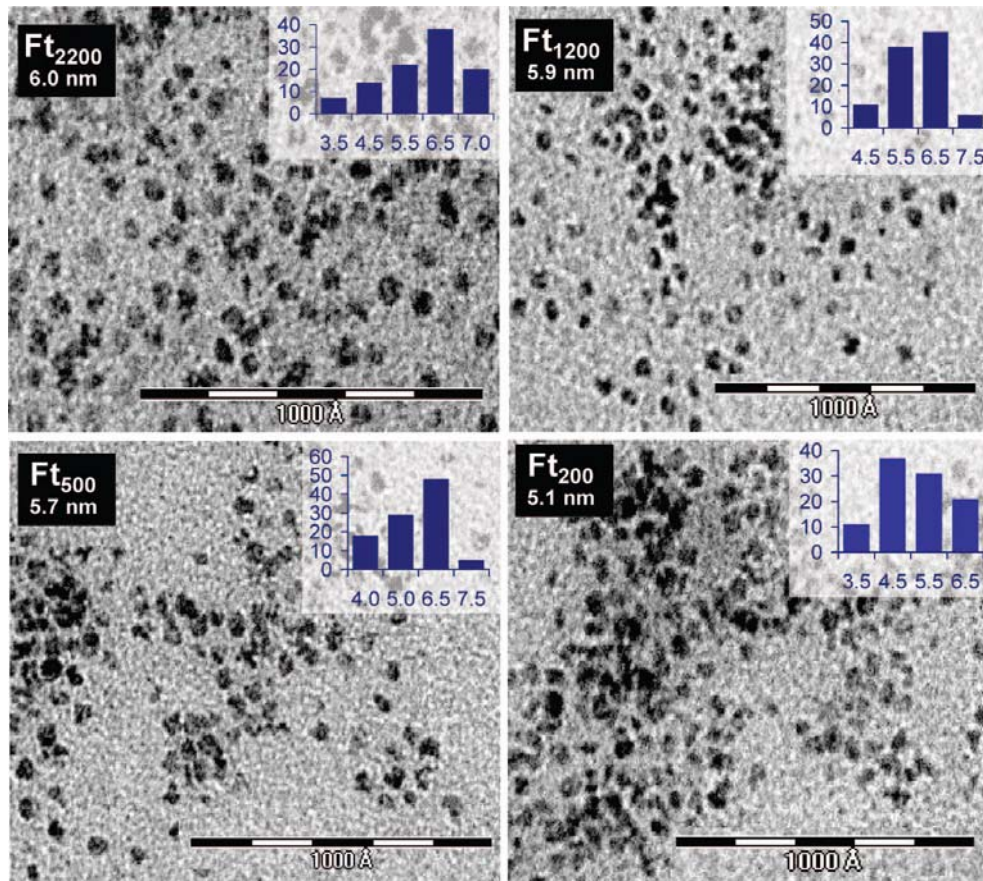


Figura 3.2. Micrografías de TEM para las muestras  $Ft_{2200}$ ,  $Ft_{1200}$ ,  $Ft_{500}$  y  $Ft_{200}$  (escala de 100 nm). Dentro de cada imagen se muestra su histograma de tallas correspondiente y se indica la talla media calculada para cada caso.

De los resultados obtenidos por TEM se podría pensar que sólo una parte de las partículas presentes en la muestra eliminaban Fe de su interior mientras que el resto permanecían intactas. Esta hipótesis se descartó al realizar el mismo estudio de TEM pero contrastando las muestras con acetato de uranilo, lo que permitió la visualización de la capa polipeptídica encapsulando todas y cada una de las partículas.

Por tanto, la mínima modificación del tamaño de las partículas de ferritina observada experimentalmente sugiere que hay una eliminación de Fe en todas las partículas y que dicha eliminación tiene lugar preferencialmente en el núcleo y no en la superficie de la misma.

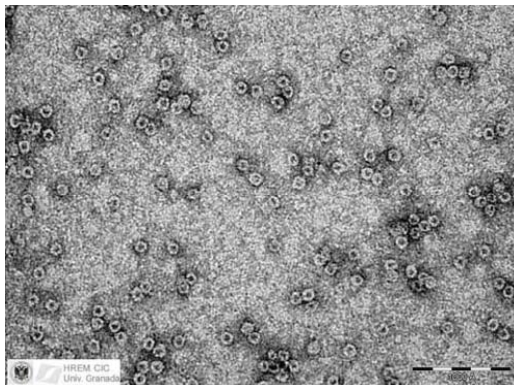


Figura 3.3. Micrografía de TEM de la muestra  $Ft_{500}$  contrastada con AcOU para resaltar la capa polipeptídica (por claridad sólo se presenta una de las muestras en estudio, puesto que el resto son similares).

Los análisis de SAXS y XANES se realizaron en colaboración con el Dr. Marcelo Ceolín, en la estación experimental Synchrotron Light National Laboratory (LNLS), Campinas, Brasil.

Al extrapolar los resultados de SAXS se obtuvieron las curvas correspondientes a las funciones de distribución (PDF) que indican una tendencia clara en la disminución de la densidad electrónica del núcleo metálico conforme se reduce el número de átomos de Fe por Ft. Las curvas de PDF se encuentran en un rango de  $R$  de 0-140 Å, lo que teóricamente se corresponde con el diámetro de las nanopartículas. Las curvas de PDF de la apoferritina nativa presentan un máximo de  $R$  de 80-100 Å, lo que se corresponde con la densidad electrónica propia de la capa polipeptídica, mientras que en el caso de la ferritina nativa el máximo de la curva se localiza a valores menores de  $R$  (20-60 Å). Al comparar las

curvas de PDF (figura 3.4) para las muestras Ft<sub>2200</sub>, Ft<sub>1200</sub> y Ft<sub>500</sub>, se observa como al pasar de la Ft con mayor contenido en Fe a la de menor, la curva va desplazando su máximo de  $R$  desde 40 Å a 90 Å, lo que se corresponde con una pérdida de la densidad electrónica del núcleo metálico y consecutivamente una ganancia de la representatividad de la capa orgánica frente al núcleo interno (línea verde).

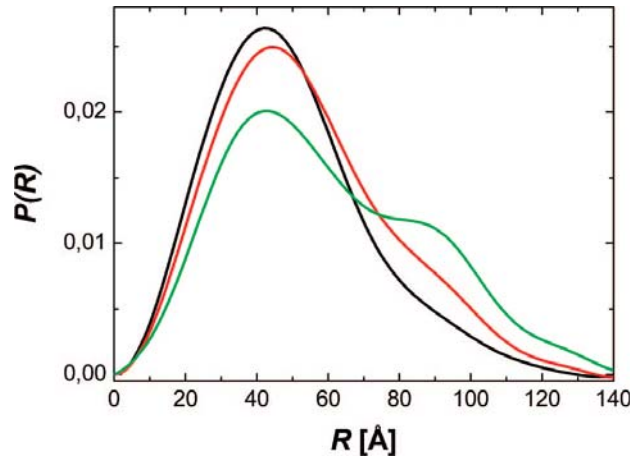


Figura 3.4. Curvas de PDF obtenidas para las muestras Ft<sub>2200</sub> (línea negra), Ft<sub>1200</sub> (línea roja), Ft<sub>500</sub> (línea verde).

La espectroscopia denominada XANES es una herramienta altamente sensible, que permite el estudio de la estructura electrónica y el ambiente que rodea a ciertos átomos en el interior de una molécula o un sólido. Aunque el mineral de Fe que alberga la ferritina tradicionalmente se había considerado como ferrihidrita,<sup>3</sup> numerosos estudios más recientes ya apuntaban a la existencia de una estructura polifásica constituida, además de por ferrihidrita, por magnetita y hematita.<sup>4,5</sup> El análisis XANES de las muestras Ft<sub>2200</sub>, Ft<sub>1200</sub>, Ft<sub>500</sub> y Ft<sub>200</sub> confirmó esta naturaleza polifásica y lo que es más importante, el carácter dinámico en el porcentaje de cada fase conforme vamos eliminando Fe. Este análisis se llevó a cabo mediante ajuste por mínimos cuadrados de los datos experimentales con ayuda del programa ATHENA-IFFEFIT.

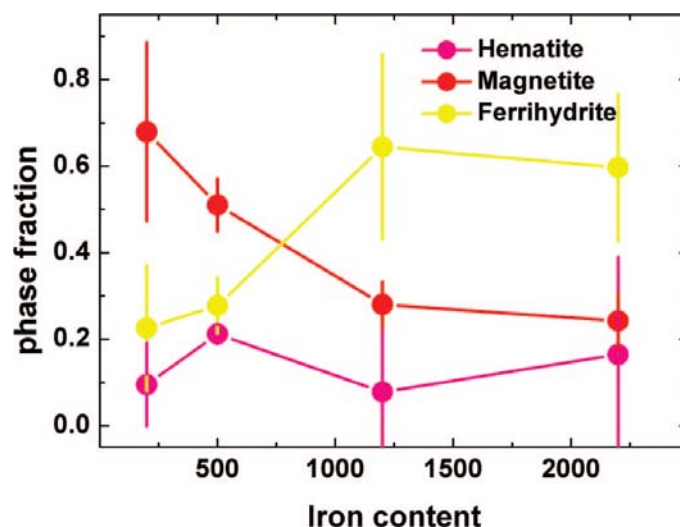


Figura 3.5. Distribución de fases (magnetita, hematita y ferrihidrita) por molécula de Ft. Las muestras en estudio fueron Ft<sub>2200</sub>, Ft<sub>1200</sub>, Ft<sub>500</sub> y Ft<sub>200</sub> (rango de 200- 2200 átomos de Fe).

En la figura 3.5 se muestra el porcentaje de cada una de estas fases presentes en las distintas muestras. Como se puede observar, conforme disminuimos el contenido de Fe, el contenido de magnetita aumenta considerablemente pasando de valores del 20% al 70% y simultáneamente los valores de ferrihidrita disminuyen pasando de un 60% a un 20%, permaneciendo constante los valores de hematita.

Con objeto de conocer la distribución de estas fases en el núcleo metálico de la ferritina se llevó a cabo un estudio de espectroscopia de pérdida de energía de electrones (EELS) para localizar los distintos estados de oxidación en una misma partícula. Concretamente, analizando el pico FeL<sub>2,3</sub> podemos distinguir entre Fe(II) y Fe(III) y conocer así su distribución en cada partícula. El análisis de EELS-SL se llevó a cabo en un conjunto de nanopartículas de Ft<sub>500</sub>, (figura 3.6). Se recogen una serie de espectros de EELS a lo largo de una línea que atraviesa la partícula, con una sonda de unos pocos Angstroms. En este estudio, concretamente se recogieron 64 espectros con una sonda de 0.5 nm, por lo que

cada punto en el que se toma un espectro dista del siguiente una distancia de 0.4 nm, y con una energía de dispersión de 0.3 eV. El tiempo de adquisición del espectro es de 1 s, ya que si el tiempo de adquisición se alarga la muestra podría resultar dañada.

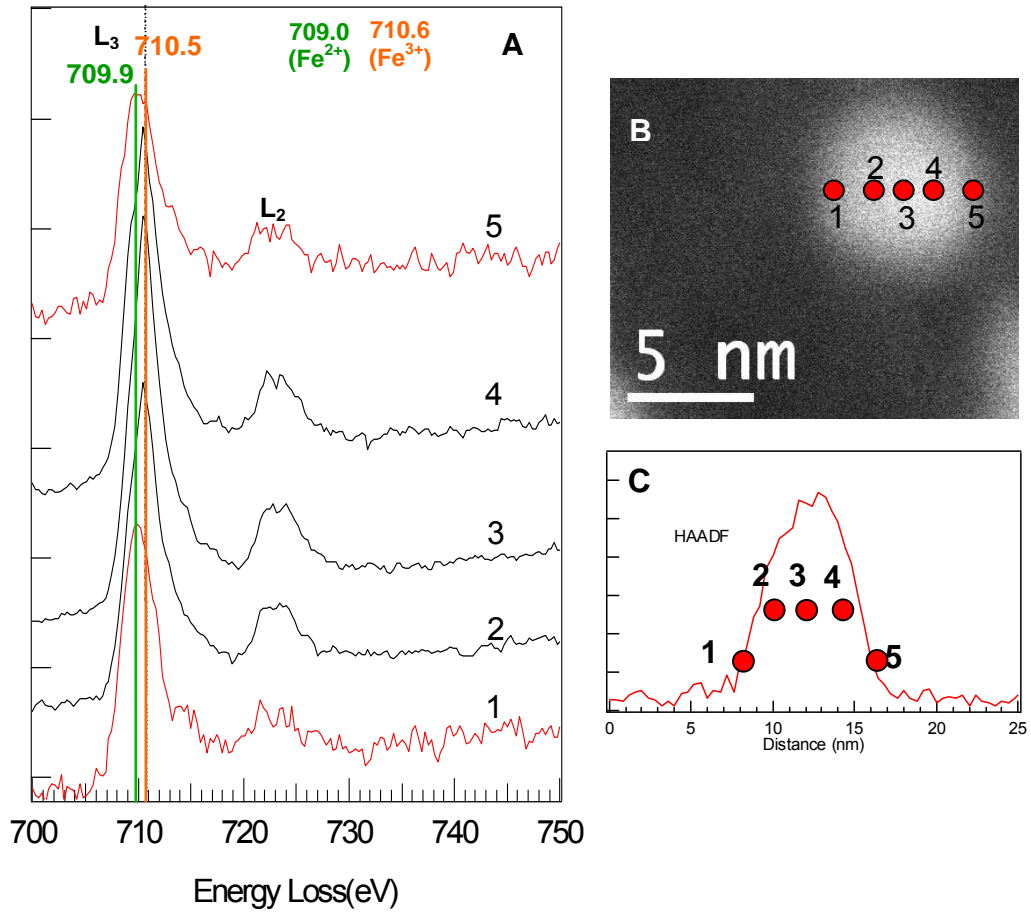


Figura 3.6. (a) Espectros EELS correspondientes al pico  $Fe_{L_{2,3}}$ ; espectros 1 y 5 correspondientes a las regiones superficiales de la partícula, y espectros 2, 3 y 4, que se corresponden con la zona interna de la molécula, (b) Imagen HAADF de una partícula de  $Fe_{500}$ . Los puntos rojos marcan las cinco localizaciones donde se tomaron los espectros de EELS, (c) Perfil de la variación de intensidad a lo largo de la partícula mostrada en la imagen b.

En la figura 3.6 se muestran los espectros EELS representativos de una de las nanopartículas de Ft<sub>500</sub>. Se muestran cinco espectros EELS (figura 3.6 a) correspondientes a cinco zonas diferentes dentro de la misma partícula (figura 3.6 b). En la figura 3.6 c se muestra el perfil de electrodensidad de la partícula en estudio. Los puntos rojos, mostrados en las figuras 3.6 a y b, son los puntos en los cuales se tomaron los espectros EELS, que representan las distintas partes de la partícula, los puntos extremos (1 y 5) se corresponden con la superficie de la partícula, cercana a la capa polipeptídica, mientras que los puntos centrales (2, 3 y 4) muestran la parte más interna de la partícula, que se corresponde con el núcleo metálico.

Al analizar los espectros obtenidos en la figura 3.6 a se observa cómo el pico L<sub>3</sub>, sufre un desplazamiento al pasar de los bordes al interior de la partícula, puesto que en el caso de la superficie de la partícula (puntos 1 y 5) dicho pico se localiza a 709.9 eV y en el resto de los puntos (2, 3 y 4) el pico se centra a 710.5 eV. Este desplazamiento del pico L<sub>3</sub> se corresponde con la presencia de distintos estados de oxidación. De acuerdo con Gloter y col.<sup>6</sup> la posición de la línea L<sub>3</sub> a un valor de energía de 709 eV se corresponde con especies de Fe en estado de oxidación (II), mientras que el desplazamiento de dicha línea a zonas de mayor energía (710.6 eV) se corresponde con especies de Fe(III).

Los resultados de EELS, para las partículas de Ft<sub>500</sub>, nos muestran claramente una mayor presencia de Fe(II) en las zonas más superficiales de la partícula mientras que en la zona interna de la partícula predominan las especies de Fe(III).

El análisis conjunto de los datos de TEM, SAXS, XANES y EELS ponen de manifiesto que la estructura del mineral de la ferritina es polifásica de tipo core-shell, con un núcleo rico en ferrihidrita (y trazas de hematites) que se rodea por una capa compuesta preferencialmente de magnetita (figura 3.7). Teniendo en cuenta este modelo, al analizar los datos obtenidos en las muestras de Ft con



distinto contenido en Fe ( $Ft_{2200}$ ,  $Ft_{1200}$ ,  $Ft_{500}$  y  $Ft_{200}$ ), podemos postular que la ferrihidrita es la fase más lábil y por tanto la primera que se ve afectada por la reducción química, y consecuentemente la primera que se moviliza, lo que está de acuerdo con los datos obtenidos en SAXS y XANES, puesto que al ir eliminando Fe de la ferritina va aumentando la concentración de magnetita mientras que la de ferrihidrita disminuye.

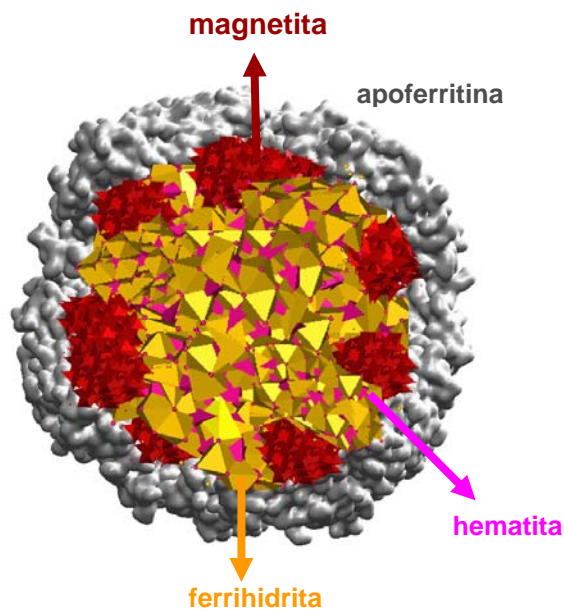


Figura 3.7. Modelo estructural de la distribución de las distintas fases (ferrihidrita, hematita y magnetita) en el core de la ferritina.

Los cambios en la composición química del núcleo metálico de la ferritina mostrados tras la eliminación reductiva de Fe, especialmente el incremento de la fase magnetita, también debían reflejarse como una modificación de las propiedades magnéticas de dichas nanopartículas, debido a que la magnetita presenta una alta magnetización remanente y bajos valores de campos coercitivos. Las propiedades magnéticas de la ferritina nativa ( $Ft_{2200}$ ) se han publicado ampliamente en bibliografía,<sup>7</sup> presentando un comportamiento



superparamagnético bajo una temperatura de bloqueo de 20 K con un marcado ciclo de histéresis.

El comportamiento magnético de la  $Ft_{200}$  (70% magnetita, 20% ferrihidrita, 10% hematita) se estudió de forma comparativa con el presentado por la  $Ft_{2200}$  (60% ferrihidrita, 20% magnetita y 20% hematita). En la figura 3.8 se muestra una gran variación en el comportamiento magnético a bajas temperaturas (2 K) de ambas muestras ( $Ft_{200}$  y  $Ft_{2200}$ ). La  $Ft_{2200}$  presenta un comportamiento antiferromagnético, similar al presentado por la ferrihidrita, con un alto campo coercitivo y una baja magnetización a saturación, mientras que en el caso de la  $Ft_{200}$  el comportamiento magnético se acentúa exhibiendo mayores valores de magnetización remanente y mayores valores de magnetización a saturación que los de la ferritina nativa, lo que se corresponde más con un comportamiento ferrimagnético típico, como el de la magnetita.

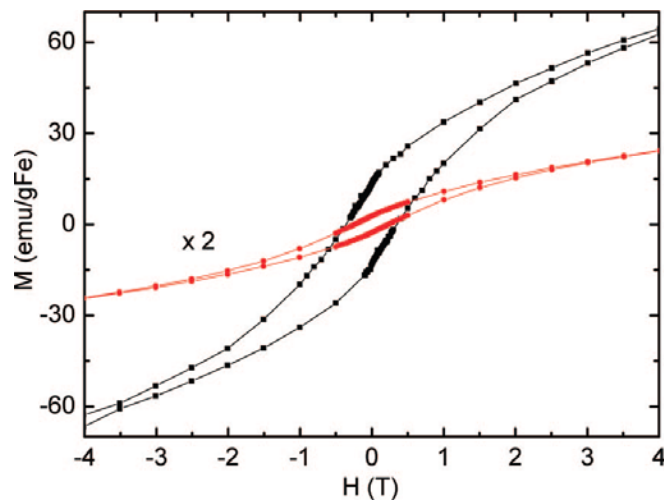


Figura 3.8. Ciclo de histéresis (emu/gFe) de las muestras de  $Ft_{200}$  (línea negra) y  $Ft_{2200}$  (línea roja). En el caso de la  $Ft_{2200}$  los valores de magnetización se representan multiplicados por 2 para mayor claridad.

Este modelo estructural core-shell ferrihidrita-magnetita y su evolución con la disminución de Fe, plantea el interrogante acerca del origen de la formación de magnetita. Con objeto de poder formular una hipótesis en este sentido, llevamos a cabo varios experimentos comparativos entre ferritinas con el mismo contenido en Fe, pero preparadas en diferentes condiciones experimentales.

Por un lado, se preparó una Ft<sub>500</sub> (Ft<sub>500</sub>-AcHA) sintetizada por un procedimiento diferente al reductivo, concretamente mediante complejación directa por un agente quelatante con gran afinidad por Fe(III), como es el acetohidroxámico (AcHA).<sup>8</sup> En este caso, la eliminación de Fe de la ferritina tiene lugar mediante la formación de un complejo AcHA-Fe(III) sin cambio de estado de oxidación. El análisis XANES de esta muestra puso de manifiesto que la composición del mineral de Fe era prácticamente 100% ferrihidrita. (figura 3.9).

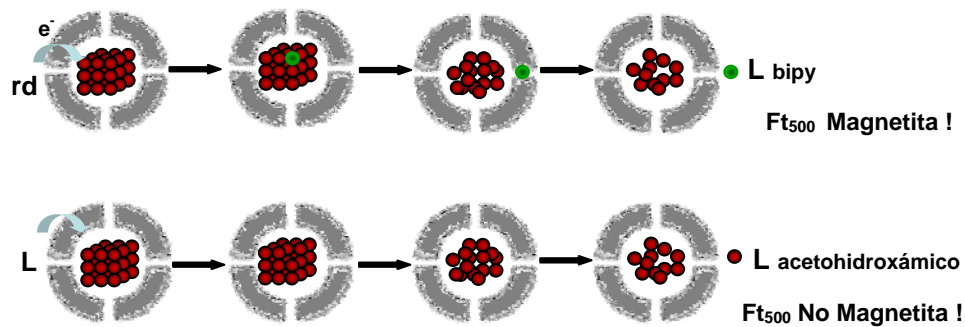


Figura 3.9. Esquema comparativo de los distintos procesos de eliminación de Fe de la ferritina, reductivo (esquema superior) y complejante (esquema inferior), y la síntesis de magnetita como consecuencia del mecanismo de eliminación de Fe. (rd = reductor, L = ligando)

El resultado obtenido era una prueba irrefutable de que el mecanismo de eliminación de Fe desde la ferritina por un proceso reductivo genera un exceso de Fe(II), en condiciones estables, parte del cual, bien por que se queda retenido en el interior de la ferritina<sup>9</sup> o bien por una deficiencia de ligando que lo compleje,

puede volver a entrar en el interior de la ferritina y reaccionar con la ferrihidrita para generar magnetita en la superficie de la partícula. Con respecto a esta hipótesis hay que recordar que la ferrihidrita es un mineral altamente activo que actúa como precursor de estructuras cristalinas más estables como son la hematita.<sup>10</sup>

Una última comparativa que indirectamente relaciona la eliminación reductiva con la presencia de magnetita es el hecho experimental de que mientras que el tamaño de las partículas obtenidas por eliminación reductiva, Ft<sub>2200</sub>, Ft<sub>1200</sub>, Ft<sub>500</sub> y Ft<sub>200</sub>, no varía significativamente, el tamaño de las partículas de ferritina reconstituidas a partir de la apoferritina (2000 Fe, 1000 Fe, 500 Fe y 200 Fe), si presentan una disminución considerable con el menor contenido en Fe como ha sido publicado en numerosas ocasiones.<sup>11</sup> Concretamente el análisis TEM reveló tamaños de 5.6 (± 0.1), 4.4 (± 0.4), 3.9 (± 0.7), y 2.8 (± 0.1) nm para las muestras RFt<sub>2000</sub>, RFt<sub>1000</sub>, RFt<sub>500</sub> y RFt<sub>250</sub>.<sup>12</sup> Estos resultados nos sugieren que hay una diferencia estructural entre las partículas obtenidas por reconstitución oxidativa (apartado 2.1) y las obtenidas por eliminación reductiva.<sup>13,5</sup>

### **3.2. La homocisteína libera Fe de la ferritina: implicaciones biológicas.**

La evidencia experimental de la presencia de magnetita en enfermos de Alzheimer generó un debate acerca de que esta magnetita estuviera relacionada con el origen de la enfermedad o bien fuera una consecuencia más de la misma.<sup>5</sup> Con la idea de esclarecer esta polémica, estudiamos la liberación espontánea de Fe(II) en las muestras de Ft que contenían un alto porcentaje de magnetita, concretamente la Ft<sub>500</sub> y Ft<sub>200</sub>. Para ello, se incubaron dichas ferritinas con un exceso de ferrozina a pH básico (pH = 7.4). La formación del complejo [Fe(ferrozina)<sub>3</sub>]<sup>2+</sup> se monitorizó por espectroscopia UV-visible, analizando la banda característica que presenta dicho complejo a 562 nm ( $\epsilon^{562} = 27900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).<sup>14</sup> Ninguna de las muestras en estudio mostró cambios significativos en los valores de absorbancia a 562 nm tras un periodo de 200 min. Obteniéndose valores

cercanos al 0.26 % de eliminación de Fe para las muestras Ft<sub>200</sub> y Ft<sub>500</sub>. Esto nos indica que ninguna de estas ferritinas y por tanto que la magnetita presente en ellas no libera Fe(II) de forma espontánea, en contra de lo que algunos autores habían propuesto.

En nuestra hipótesis la magnetita procede del proceso de eliminación reductiva de Fe de la ferritina. Como previamente se ha expuesto, los experimentos de liberación de Fe que dan lugar a la preparación de las muestras Ft<sub>2200</sub>, Ft<sub>1200</sub>, Ft<sub>500</sub> y Ft<sub>200</sub> se llevaron a cabo mediante incubación de ferritina con ácido tioglicólico. En vista de que altos niveles de homocisteína parecen estar relacionados con el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer y de que dicha molécula posee carácter reductor con participación de un grupo tiol, al igual que en el caso del ácido tioglicólico, trasladamos los ensayos realizados anteriormente sobre el mecanismo de liberación de Fe desde la ferritina y los posibles cambios del núcleo metálico de Fe de la ferritina a un sistema más similar al biológico, usando como agente reductor la propia homocisteína, H-cys. Según bibliografía los niveles de H-cys en el organismo pueden variar en condiciones normales entre 5-20 µmol/l, pasando a considerarse niveles elevados cuando la concentración de Hcys es cercana a 100 µmol/l.

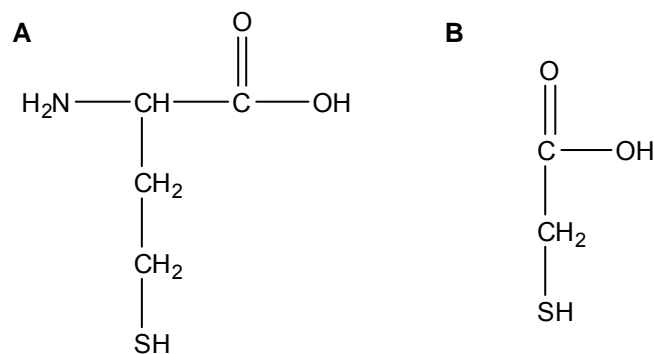


Figura 3.10. Formula molecular de la H-cys (A) y Ácido tioglicólico (B).

Hemos realizado dos ensayos de eliminación de Fe en presencia de H-cys a dos concentraciones límite, a 5  $\mu\text{mol/l}$  (condiciones normales) y 100  $\mu\text{mol/l}$  (incremento severo de H-cys). Para llevar a cabo estos ensayos de eliminación de Fe, se partió de una disolución de Ft (2 ml, 0.1 mg/ml) que se incubó a temperatura ambiente con una disolución de ferrozina (0.01g/2ml) y con la concentración adecuada de H-cys en cada caso. La capacidad de eliminación de Fe de la H-cys, a cada una de estas concentraciones, se valoró por el porcentaje de formación del complejo  $[\text{Fe}(\text{ferrozina})_3]^{2+}$ . La formación del complejo  $[\text{Fe}(\text{ferrozina})_3]^{2+}$  se siguió en todo el transcurso de la reacción mediante espectroscopia UV-vis a 562 nm, fijando el coeficiente de extinción molar a  $\epsilon^{562} = 27900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Se tomaron 50 ciclos cada 10 minutos. El porcentaje de Fe eliminado calculado cuando la concentración de H-cys era de 25  $\mu\text{mol/l}$  fue 0.8 %, mientras que cuando la concentración era más elevada (100  $\mu\text{mol/l}$ ) el porcentaje fue del orden del 2 %, lo que nos indica que a mayor concentración de H-cys mayor capacidad tiene la Ft de eliminar Fe.

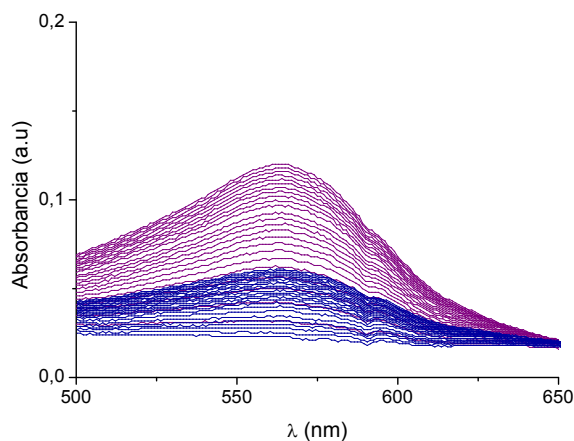


Figura 3.11. Espectros Uv-vis de la capacidad de eliminación de Fe por la H-cys a dos concentraciones extremas, a 25  $\mu\text{M}$  (azul) y 100  $\mu\text{M}$  (violeta).

Para corroborar que es la H-cys la que directamente actúa como agente reductor del Fe llevamos a cabo el mismo experimento de eliminación de Fe (en condiciones idénticas) pero usando como agente reductor la L-Met, catabolito de

la H-cys (figura 3.12). Tras la obtención de los 50 ciclos, no se observó ningún cambio indicativo de la formación del complejo  $[\text{Fe}(\text{ferrozina})_3]^{2+}$ , puesto que no se observó incremento de la banda específica a 562 nm. Lo que se debe a que la L-Met, precursor de la H-cys, posee menor reactividad debido a la presencia del  $\text{CH}_3$  terminal que bloquea el grupo S, siendo así menos efectivo como agente reductor que la H-cys, puesto que el grupo tiol le confiere a la H-cys un gran poder reactivo.

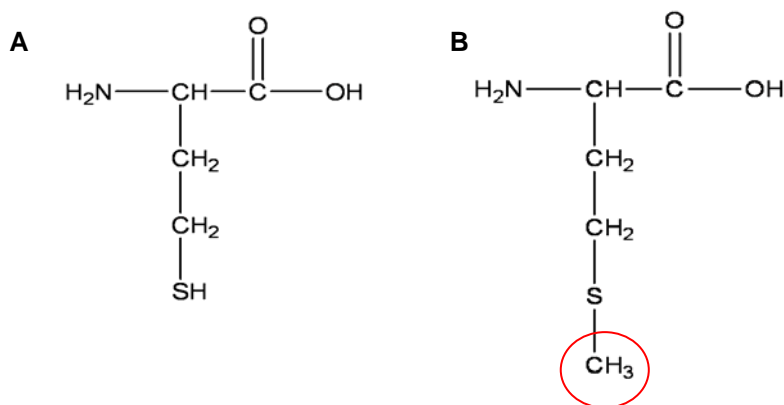


Figura 3.12. Fórmula molecular de la H-cys (A) y L-Met (B).

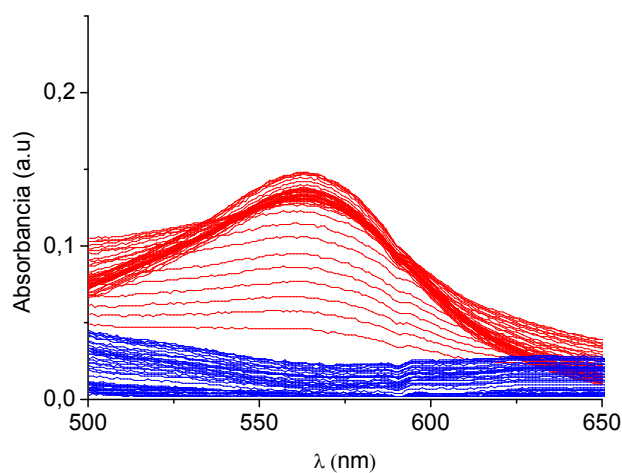


Figura 3.13. Espectro UV-vis de la comparativa entre la capacidad de eliminación de Fe de la H-cys (rojo) y L-Met (azul) a la misma concentración ( $25 \mu\text{M}$ ).

Resultados preliminares de XANES y TEM sobre las muestras de ferritinas obtenidas en condiciones de exceso de homocisteína (100  $\mu\text{mol/l}$ ) muestran las mismas tendencias que las observadas en las muestras de ferritinas preparadas con ácido tioglicólico. En vista de lo cual estos resultados apuntan a que un exceso de homocisteína provocaría una liberación “descontrolada” de Fe(II) de la ferritina. Descontrolada viene a significar que no se produce bajo demanda celular. Este Fe(II), una vez fuera de la ferritina podría dar lugar a la reacción de Fenton, generando radicales hidroxilos  $\text{OH}\cdot$ , capaces de llevar a cabo procesos neurodegenerativos, como es bien conocido y causar oxidación y muerte neuronal. Por otra parte, este Fe(II) libre daría lugar a una sobreexpresión de  $\beta$ -amiloide, como ha sido recientemente publicado.<sup>15</sup> Finalmente, nuestros trabajos ponen de manifiesto que parte de este Fe(II) libre puede volver a entrar en la ferritina, reaccionado con el mineral de ferrihidrita para dar lugar a una corteza de magnetita.<sup>16</sup> Un estudio *in vivo* de este sistema sería necesario para confirmar esta hipótesis

En base a esta hipótesis todo el proceso neurodegenerativo que tiene lugar en el cerebro de enfermos de Alzheimer sería consecuencia de la liberación descontrolada de hierro de la ferritina y lo que es extraordinariamente importante, que dicho proceso neurodegenerativo nos dejaría una marca: la aparición de magnetita en la ferritina del cerebro. Esta magnetita aumenta la magnetización por unidad de masa y por tanto aumenta los valores de relajación  $r_2$ , que permiten una mejor visualización por MRI del tejido cercano. Probablemente este sea el hecho que explica la visualización “fortuitamente” más favorable del cerebro de enfermos de Alzheimer mediante MRI.

De acuerdo a este enfoque, podemos diseñar un protocolo de actuación que permita diagnosticar de forma precoz la enfermedad de Alzheimer:

1. En primer lugar un control del nivel de homocisteína en sangre. Únicamente personas que presenten valores de homocisteína en sangre

mayores de 20  $\mu\text{mol/l}$ , serían consideradas de riesgo de desarrollar la enfermedad.

2. A las personas que sobrepasen este nivel de homocisteína en sangre se les llevaría a cabo un control periódico por Resonancia Magnética (MRI) del cerebro. La evolución de la resolución de la imagen MRI (proporcional al valor de  $r_2$ ) permitiría evaluar semicuantitativamente la cantidad de magnetita presente en el cerebro y por tanto el grado de desarrollo de la enfermedad. Personas cuya imagen MRI de cerebro, sobretudo a nivel de la sustancia blanca<sup>17</sup> no se viera modificada, podrían considerarse que no están evolucionando hacia el desarrollo de la enfermedad.

En definitiva, el control de homocisteína en sangre y la medición periódica de  $r_2$  mediante MRI convencional, pueden servir como un doble sistema biomarcador para diagnosticar de forma precoz la aparición y desarrollo de los primeros procesos neurodegenerativos que den lugar a un Alzheimer precoz.





## BIBLIOGRAFÍA

---

- 1.- Donna W. Lee, Julie K Andersen, and Deepinder Kaur. Review, *Molecular Interventions*, **2006**, 6 (2), 89-97.
  
- 2.- E. Mark Haackea, Norman Y.C. Cheng, Michael J. House, Qiang Liu, Jaladhar Neelavalli, Robert J. Ogg, Asadullah Khan, Muhammad Ayaz, Wolff Kirsch, Andre Obenaus. *Magnetic Resonance Imaging*, 23, **2005**, 1 –25.
  
- 3.- (a) Chasteen, N. D.; Harrison, P. M. *J. Struct. Biol.* **1999**, 126, 182– 194. (b) Harrison, P. M.; Arosio, P. *Biochim. Biophys. Acta* **1996**, 1275, 161–203. (c) Theil, E. C.; Takagi, H.; Small, G. W.; He, L.; Tripton, A. R.; Danger, D. *Inorg. Chim. Acta* **2000**, 297, 242–251. (d) Liu, X.; Theil, E. C. *Acc. Chem. Res.* **2005**, 38, 167–175.
  
- 4.- (a) Quintana, C.; Cowley, J. M.; Marhic, C. *J. Struct. Biol.* **2004**, 147, 166–178. (b) Cowley, J. M.; Janney, D.; Gerkin, R. C.; Buseck, P. R. *J. Struct. Biol.* **2000**, 131, 210–216.
  
- 5.- Quintana, C. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2007**, 7, 961–975.
  
- 6.- (a) Gloter, A.; Douiri, A.; Tence, M.; Colliex, C. *Ultramicroscopy*, **2003**, 96, 385–400. (b) Gloter, A.; Zbinden, M.; Guyot, F.; Gaill, F.; Colliex, C. *Earth Planet. Sci. Lett.* **2004**, 222, 947–957.
  
- 7.- (a) Barco, L. F.; Hernández, E.; Remiro, J. M.; Bartolomé, E.; Tejada, J. *Phys. Rev. B*, **1999**, 59, 11837. (b) Clemente-León, M.; Coronado, E.; Soriano-Portillo, A.; Colacio, E.; Domínguez-Vera, J. M.; Gálvez, N.; Madueño, R.; Martín-Romero, M. T. *Langmuir*, **2006**, 22, 6993–7000.
  
- 8.- Natividad Gálvez, Beatriz Ruiz, Rafael Cuesta, Enrique Colacio, and José M. Domínguez-Vera. *Inorg. Chem.* **2005**, 44, 2706-2709

- 9.- Jacobs, D. L.; Watt, G. D.; Frankel, R. B.; Papaefthymiou, G. C. *Biochemistry* **1989**, *28*, 1650–5.
- 10.- Schwertmann, U.; Friedl, J.; Stanjek, H. *J. Colloid Interface Sci.* **1999**, *209*, 215–223.
- 11.- Ying-Hsi Pan et al. *J.Struct.Biol.* **2009**, doi:10.1016/j.jsb.2008.12.001.
- 12.- Liu, G.; Debnath, S.; Paul, K. W.; Han, W.; Hausner, D. B.; Hosein, H.-A.; Michel, F. M.; Parise, J. B.; Sparks, D. L.; Strongin, D. R. *Langmuir*, **2006**, *22*, 9313–9321.
- 13.- Gider, S.; Awschalom, D. D.; Douglas, T.; Mann, S.; Chaparala, M. *Science* **1995**, *268*, 77–80.
- 14.- Linert, W.; Herlinger, E.; Jameson, R. F.; Kienzl, E.; Jellinger, K.; Youdim, M. B. H. *Biochim. Biophys. Acta*, **1996**, *1316*, 160–168.
- 15.- Rogers, J.T. et al. *J. Biol.Chem*, **2002**, *277*, 45518-45528.
- 16.- Natividad Gálvez, Belén Fernández, Purificación Sánchez, Rafael Cuesta, Marcelo Ceolín, Miguel Clemente-León, Susana Trasobares, Miguel López-Haro, Jose J. Calvino, Odile Stéphan, José M. Domínguez-Vera. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 8062-8068.
- 17.- Hogervorst E, Ribeiro HM, Molyneux A, Budge M, Smith AD. *Arch Neurol* **2002**; *59*:787-93.





## 4. FUNCIONALIZACIÓN DE LA FERRITINA NATIVA.

La presencia de grupos amino terminales, procedentes de lisinas, en la capa externa de la apoferritina representa químicamente una puerta abierta a la funcionalización de ferritinas, independientemente del material inorgánico depositado en su cavidad. Esta ruta ha sido sorprendentemente muy poco explotada en la bibliografía, a pesar de representar a priori múltiples posibilidades, por ejemplo, la funcionalización mediante reacción covalente de los residuos de lisina con grupos carboxílicos de un reactivo adecuado, para dar lugar a enlaces covalentes de tipo amida.

Un análisis detallado de la estructura de la apoferritina revela la existencia de 3 lisinas por subunidad apuntando hacia el exterior. Existiendo por tanto un total de 72 grupos aminos por partícula de ferritina (capítulo 1).

En el presente capítulo se muestra cómo hemos explotado esta vía, con la idea de incorporar covalentemente a través de estos grupos aminos, moléculas que podían aportar nueva funcionalidad. Comenzando por sistemas funcionales más simples hasta llegar a otros más complejos, empezamos el trabajo



incorporando colorantes y fluoróforos orgánicos clásicos, que nos han permitido modificar el color y aportar fluorescencia a la ferritina nativa, sin que el núcleo metálico magnético se haya visto modificado. Esta ruta química representa por tanto una vía fácil para la obtención de nanopartículas bifuncionales magnético-ópticas, ya que partimos de una molécula que posee propiedades magnéticas per se. Además, el hecho de que la ferritina sea soluble en agua, hace que estas partículas magnético-ópticas puedan serlo también, lo que ofrece numerosas ventajas de cara a hipotéticas implementaciones tecnológicas.

La idea es por tanto poder incorporar covalentemente a la superficie externa de la partícula moléculas adecuadas, independientemente del material que tengamos dentro de la cavidad proteica, obteniendo así una gran variedad de nanopartículas magnético-ópticas (figura 4.1).

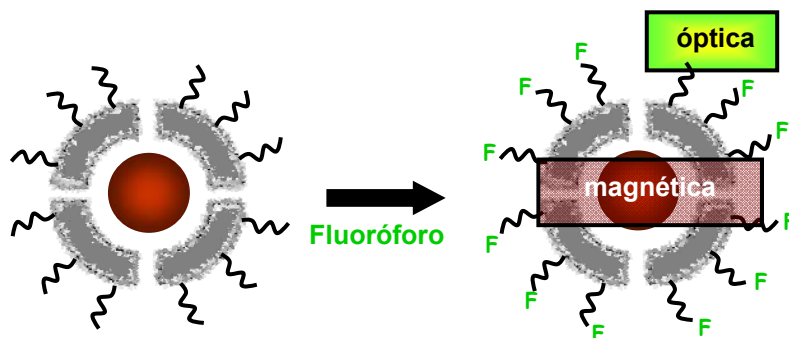


Figura 4.1. Modificación de la superficie externa de la ferritina

Conseguir este punto es en definitiva desarrollar un método que permitiría la preparación de “librerías” de nanopartículas metálicas bifuncionales: un material inorgánico de la cavidad que aporta una función (magnética) y una molécula orgánica en el exterior aportando la segunda propiedad (óptica).

#### 4.1. Ferritinas de colores: Funcionalización de la ferritina a través de los residuos de lisina con colorantes orgánicos.

La primera aproximación que se realizó en este sentido fue la incorporación de dos colorantes orgánicos a la proteína. Para ello, se utilizaron los derivados vinil sulfonas de dos colorantes comerciales. Los colorantes usados han sido: Reactive Orange 16 (red) y Remazol Brilliant Blue R (blue), con los que podemos cambiar el color a la ferritina obteniendo disoluciones de ferritina de diversos colores.<sup>1</sup> Los colorantes utilizados para este ensayo, fueron adquiridos en Acros Organic y se modificaron químicamente por eliminación directa de los grupos sulfonatos obteniéndose las correspondientes vinil sulfonas (figura 4.2).

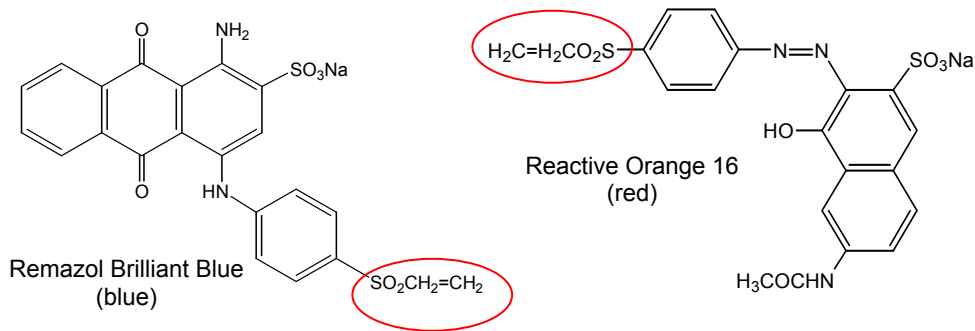


Figura 4.2. Estructura de las vinil sulfonas de los colorantes comerciales Reactive Orange 16 y Remazol Brilliant Blue

Se preparó una disolución de la ferritina comercial, 2 ml de 1 mg/ml en tampón HEPES pH 8, que se hizo reaccionar con 5 mg del colorante correspondiente, trabajando así en exceso de colorante con respecto a la proteína. El esquema general de la reacción se muestra en la figura 4.3.

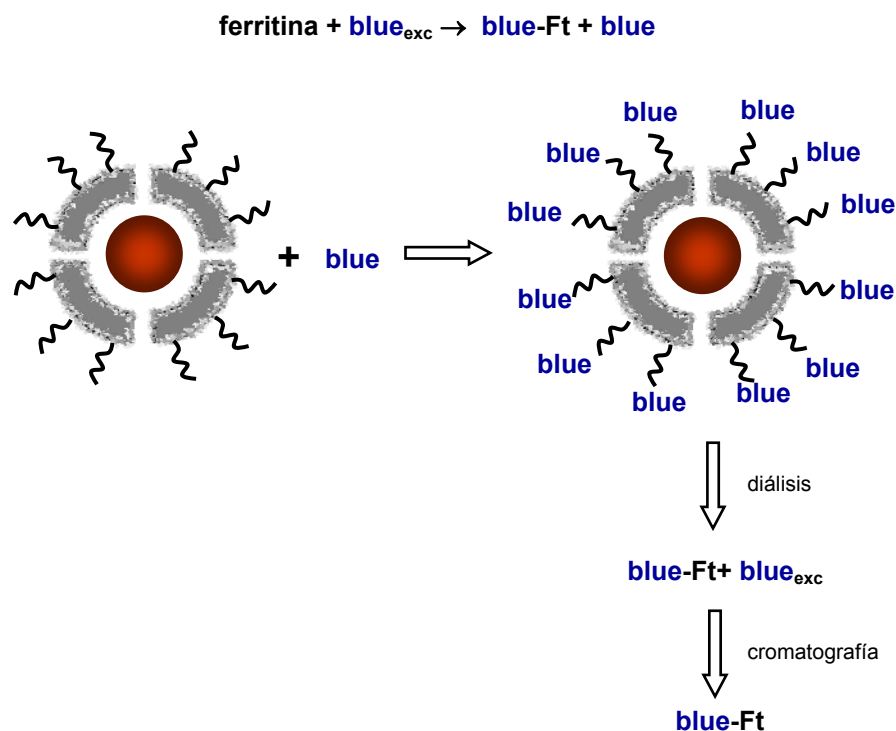


Figura 4.3. Esquema general para la funcionalización de la ferritina a través de los residuos de lisina presentes en la superficie externa de la ferritina.

Tras la reacción de la proteína con los reactivos, el exceso de colorante se eliminó por diálisis exhaustiva usando membranas de diálisis de un tamaño de poro adecuado frente a agua milli-Q durante 2 días, haciendo cambios de agua cada 6 h. Las soluciones resultantes se cromatografiaron por exclusión de tamaño (Sephadex G-25) para eliminar el resto de colorante no unido covalentemente y se recuperaron las fracciones que contenían proteína. El perfil de elución de la cromatografía (figura 4.4) demostraba que el colorante estaba unido a la ferritina, ya que se observaba coelución. Estas medidas se obtuvieron en el espectrofotómetro UV-visible, en el que se midieron las 10 fracciones recogidas de la cromatografía de exclusión por tamaño. Para cada una de las fracciones de la

cromatografía se tomaron los valores de absorbancia a dos longitudes de onda específicas para este compuesto, a 280 nm (característica de la proteína) y a 596 nm (máximo de absorbancia para el colorante azul utilizado).

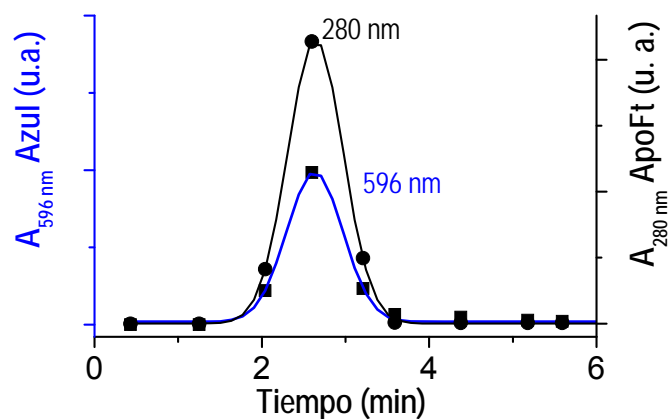


Figura 4.4. Perfil de elución de la cromatografía de la blue-Ft. La apoferritina y el colorante azul se monitorizaron por absorbancia UV-vis, a 280 nm (apoferritina) y 596 nm (colorante azul). Se observa un patrón de coelución similar para el caso de la red-Ft.

La coelución también quedaba patente con los ensayos de electroforesis nativa en gel de poliacrilamida (PAGE), usando como referencia proteína no marcada con el colorante frente a la que sí estaba modificada con el colorante. La electroforesis nativa, sin desnaturalización, (figura 4.5) también nos indicaba que se mantenía la integridad de la proteína tras su funcionalización, ya que mostraba un comportamiento similar entre la apoferritina/ferritina y la apoferritina/ferritina funcionalizadas superficialmente, puesto que la introducción de nuevos grupos en la superficie no variaban la configuración de la proteína, su peso molecular de forma significativa, ni movilidad electroforética.



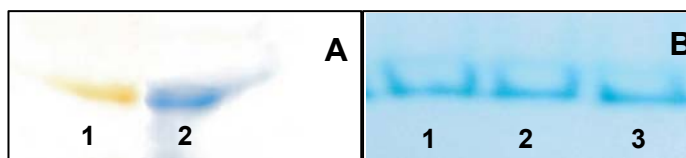


Figura 4.5. Movilidad electroforética de la apoferritina no modificada y modificada en su superficie externa. (A) Fotografía del gel de electroforesis sin teñir, (B) Fotografía del gel de electroforesis teñido con azul de Coomasie. En los distintos carriles se disponen: red-Ft en el carril 1, blue-Ft en el carril 2 y la apoferritina sin funcionalizar en el carril 3.

En el espectro UV-vis de las muestras red-ApoFt y blue-ApoFt, mostrado en la figura 4.6, se deduce que no hay modificación del espectro tras la unión covalente de los distintos colorantes a la superficie externa de la proteína, dado que la posición de las bandas características tanto de la proteína como de los colorantes no varía. Este espectro tampoco presenta cambios significativos en un periodo de tres meses, lo que pone de manifiesto la gran estabilidad de las partículas coloreadas.

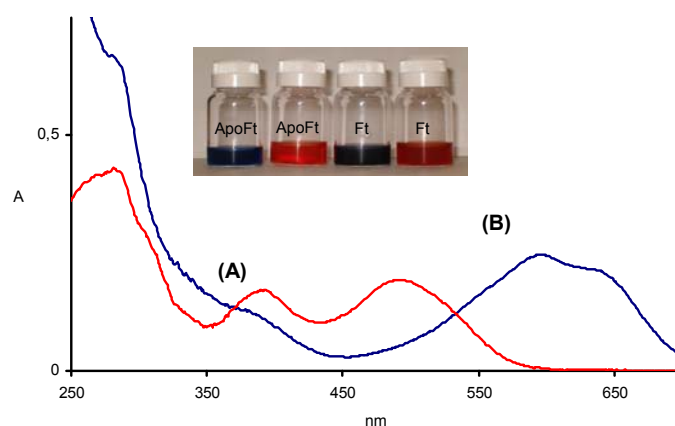
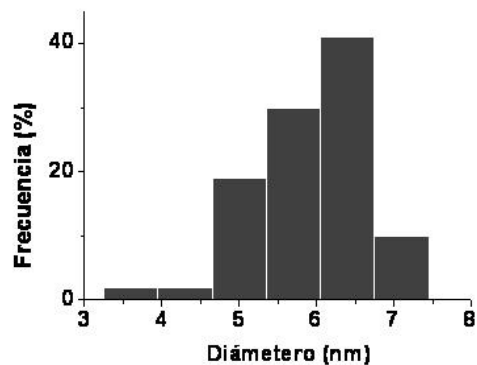
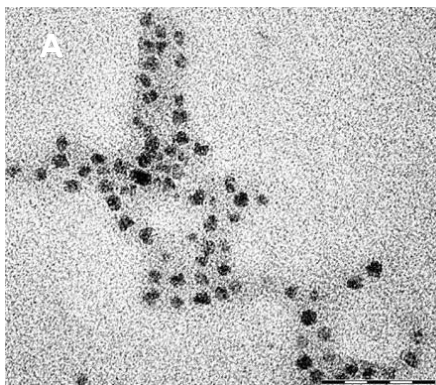


Figura 4.6. Espectro UV-visible de las muestras de red-ApoFt (A) y blue-ApoFt (B). En el recuadro superior se muestran las disoluciones obtenidas para las muestras: blue-ApoFt, red-ApoFt, blue-Ft y red-Ft, de izquierda a derecha.

La cantidad de moléculas de colorante unidas por proteína se determinó mediante los valores de absorbancia a 495 y 596 nm, para el colorante rojo y azul, respectivamente, ya que en esta zona del espectro visible no hay contribución de la proteína. Mediante la ley de Lambert-Beer podemos relacionar el valor de absorbancia del colorante con la concentración del mismo. Para ello, previamente tuvimos que calcular el coeficiente de extinción molar para cada uno de los colorantes utilizados, siendo éstos de  $10000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  para el colorante rojo y  $21000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  para el azul. Finalmente se obtuvieron valores de 22 moléculas de colorante rojo y 40 del azul unidas a la proteína, tanto a la apoferritina como a la ferritina. La diferencia en el número de colorantes unidos por molécula de proteína pone de manifiesto un acceso más favorable del colorante azul que del colorante rojo a la misma como consecuencia de distintos factores conformacionales, estéricos, etc.

Las muestras de ferritina modificadas covalentemente con los colorantes, red-Ft y blue-Ft, también se analizaron por TEM. Como se puede observar en la figura 4.7, el núcleo metálico permanece compacto y con un tamaño similar al de la ferritina original,<sup>2</sup> lo que sugiere que el material metálico encapsulado en la cavidad no se ve modificado por la funcionalización de la capa externa de la ferritina.



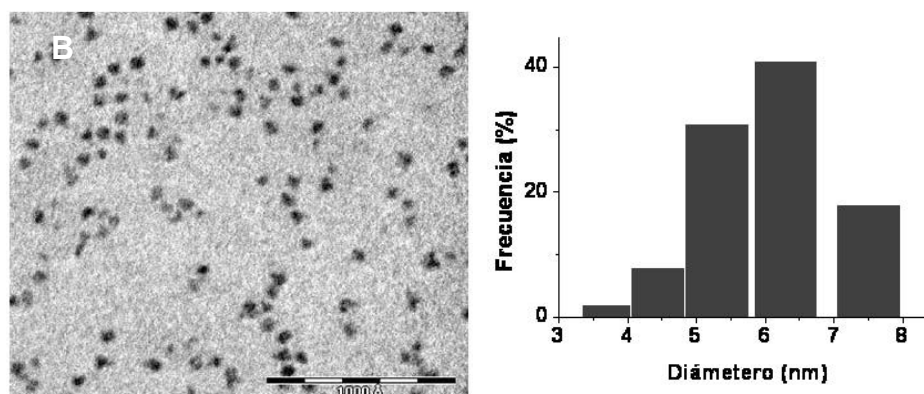


Figura 4.7. Imágenes de TEM e histogramas de tamaño de las ferritinas-colorantes: (A) red-Ft y (B) blue-Ft.

Los valores de magnetización expresados en emu/g de las nanopartículas de ferritina marcadas con los colorantes son muy cercanos a los mostrados por la ferritina nativa.<sup>3</sup> Las curvas ZFC y FC de las red y blue ferritinas son similares entre sí (figura 4.8) y a su vez a la ferritina nativa. A altas temperaturas dichas curvas coinciden, pero al ir disminuyendo la temperatura comienzan a separarse mostrando un máximo en el caso de la ZFC a una temperatura de bloqueo de  $T_B=12$  K. Una consecuencia de la aparición de la temperatura de bloqueo es la existencia de un marcado ciclo de histéresis por debajo de esta temperatura, con un campo coercitivo de 2400 G a una temperatura de 2K.

Los valores de  $T_B$ , campo coercitivo y forma de los ciclos de histéresis de la red-Ft y blue-Ft son muy similares a los mostrados por la ferritina nativa.

Los datos obtenidos por TEM y el estudio de las propiedades magnéticas, ponen de manifiesto que esta ruta química permite la modificación externa de las partículas de ferritina sin que se altere el núcleo metálico nativo. Estamos por tanto añadiendo una funcionalidad nueva en la capa externa (óptica), manteniendo la funcionalidad original del núcleo metálico (magnética).

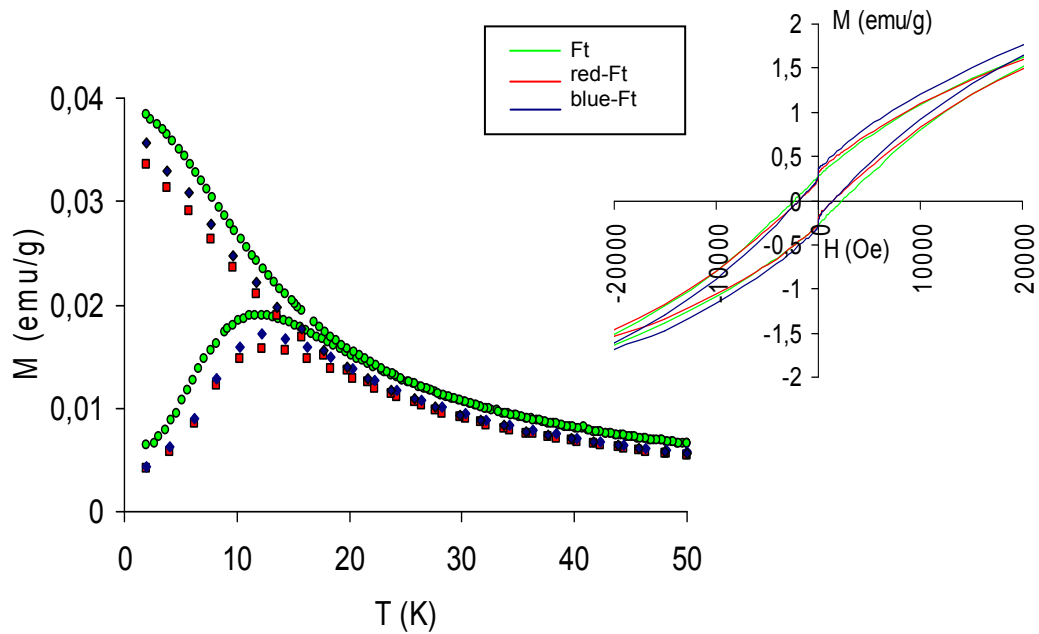


Figura 4.8. Curvas de magnetización ZFC/FC de las nanopartículas de ferritina marcadas con los colorantes azul, blue-Ft (rombos azules) y rojo, red-Ft (cuadros rojos) y de la ferritina nativa (línea verde). En la parte superior se observa el ciclo de histéresis a 5K.

#### 4.2. Ferritinas funcionalizadas como precursores de materiales nanoestructurados.

Tradicionalmente se ha considerado que hay dos enfoques para la preparación de materiales nanoestructurados: el enfoque top-down y el enfoque bottom-up:

- En el *top-down*, más utilizado por los físicos, se parte de un material a escala clásica y mediante diferentes técnicas se consigue obtener un material nanoestructurado. De forma somera se puede visualizar como la nanominiaturación de un objeto macroscópico.

- El *bottom-up*, más propio de los químicos, tiene un enfoque radicalmente opuesto: se manipulan “bloques” atómicos o moleculares para ensamblarlos de forma organizada y obtener el material nanoestructurado.

Aprender a funcionalizar la ferritina a nivel de su capa externa nos permite diseñar una aproximación *bottom-up* que radique en colocar de forma ordenada partículas de ferritinas sobre superficies apropiadas. Estas superficies deberían contener grupos terminales capaces de reaccionar con las lisinas de la capa externa de la ferritina. En definitiva, el principio es trasladar la química llevada a cabo en el apartado 4.1, pero en vez de “marcar” la ferritina con una molécula mediante formación de un enlace covalente ferritina-molécula, en esta ocasión fijamos covalentemente la ferritina a una superficie que contiene grupos químicos capaces de reaccionar con los grupos aminos de las lisinas de la capa externa de la ferritina. En cierta forma, este tipo de reacción nos permite “decorar” de forma ordenada una superficie adecuada, construyendo un material nanoestructurado a partir de una deposición controlada de nanopartículas sobre un soporte determinado.

Son numerosos los métodos de deposición de la ferritina que se han desarrollado en los últimos años, debido al gran número de aplicaciones tecnológicas que pueden desarrollarse en nanotecnología.<sup>4</sup> La mayoría de estos métodos se basan en la adsorción de la ferritina sobre diversos sustratos a través de interacciones electrostáticas o hidrofóbicas.<sup>5,3,4</sup> Al igual que para el caso de la ferritina, numerosos tipos de nanomoléculas magnéticas se han depositado sobre distintos sustratos esperando que tuviesen una amplia aplicación tecnológica como dispositivos de almacenaje electrónico,<sup>6</sup> un claro ejemplo en este sentido son los clusters de  $Mn_{12}$ .<sup>7</sup> Veciana y colaboradores fabricaron un exitoso dispositivo de almacenaje electrónico basado en clusters de  $Mn_{12}$  depositados sobre una superficie adecuada.<sup>8</sup>

El uso de la ferritina con la intención de obtener dispositivos magnéticos de este tipo puede ser interesante, ya que permitiría depositar un mayor número de iones magnéticos, que además presentan supermagnetismo con temperaturas de bloqueo mayores que las observadas para los clusters de  $Mn_{12}$  (5 K).

Hemos desarrollado un proceso para construir nanomateriales a partir de partículas de ferritina, basado en la reacción de reconocimiento específico del SPDP (n-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato) con proteínas. Depositando partículas de ferritina sobre una superficie de Au modificada con SPDP.<sup>9</sup> Esta molécula posee un extremo de tipo tiol, ideal para fijarse sobre superficies de Au, mientras que el otro extremo contiene un éster activado que queda disponible para reaccionar con las aminas de las lisinas de la capa externa de ferritina, dando lugar a la formación de grupos amidas que permite la inmovilización química de la ferritina en la superficie de Au modificada (figura 4.9).

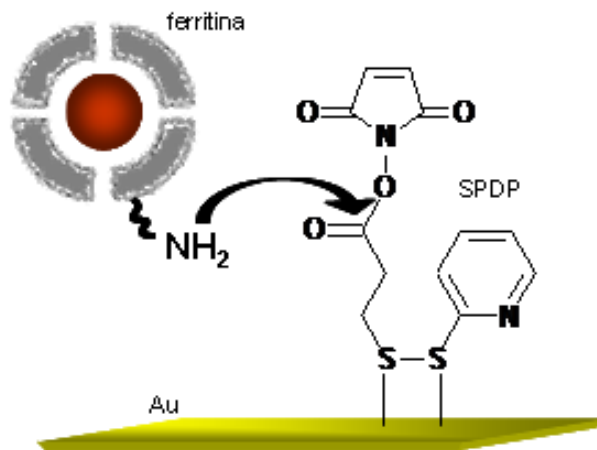


Figura 4.9. Esquema de la reacción llevada a cabo en la deposición de la ferritina sobre la capa de oro.

El protocolo seguido se puede dividir en dos pasos. En un primer paso, la superficie de oro fue perfectamente lavada y posteriormente se trató con el SPDP;

tras 10 minutos de incubación se lavó exhaustivamente la superficie para eliminar el exceso de material SPDP no fijado con MeOH y se secó con corriente de argón. Se hizo un control mediante medidas de AFM (microscopio de fuerza atómica). Las imágenes obtenidas por AFM se muestran en la siguiente figura (figura 4.10).

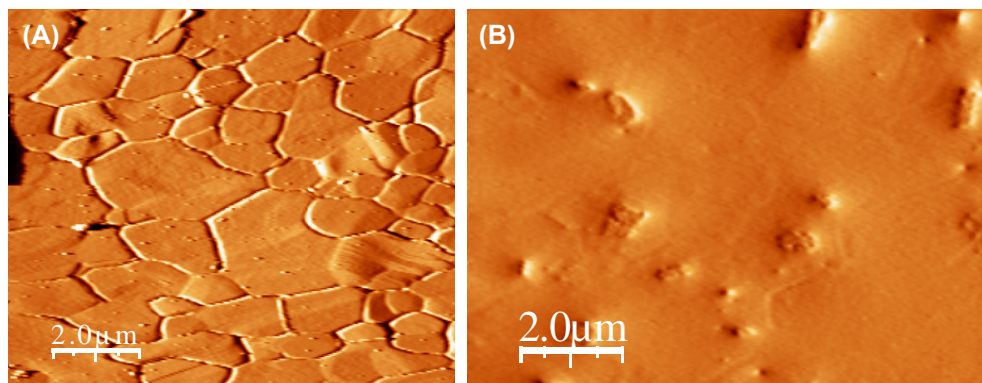


Figura 4.10. (A) blanco de la capa de oro usada para la deposición, (B) capa de oro tratada con tioles tras un periodo 1.30 h de incubación.

Posteriormente en el segundo paso se depositaron las moléculas de ferritina sobre la capa de Au modificada (Au-SPDP) durante 3 h, lavada con agua y secada con Ar y se pasó a su estudio por AFM. La figura 4.11 muestra una distribución bastante homogénea de partículas Ft sobre la superficie de Au. El tamaño de las partículas de ferritina medidas mediante el AFM es del orden de 10 nm de diámetro (recuadro superior de la figura 4.11 C), que es la altura habitualmente observada experimentalmente para ferritinas depositadas sobre diferentes superficies.<sup>10</sup>

Estos resultados ponen de manifiesto que de acuerdo a lo diseñado, la reacción de ferritina con la superficie Au-SPDP da lugar a la formación de monocapas de partículas de ferritinas ancladas covalentemente a la superficie.

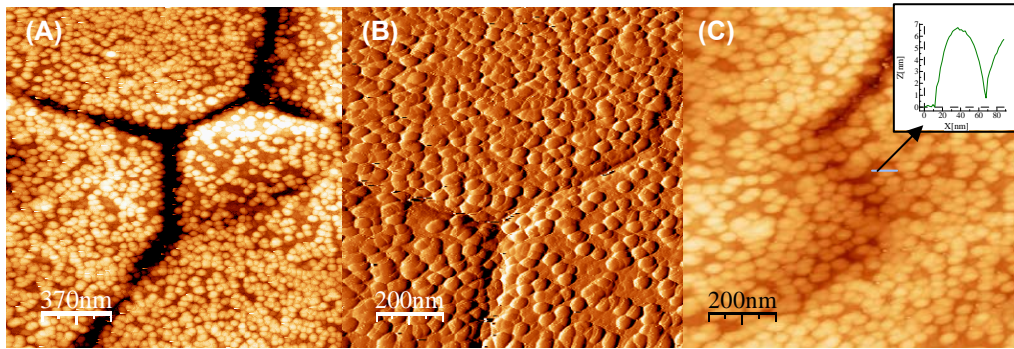


Figura 4.11. Imágenes de AFM de la deposición de las partículas de ferritina sobre la capa de oro tratada con tioles. (A y B) dos imágenes a distintos aumentos, 370 y 200 nm respectivamente. (C) Imagen recíproca de B; en el recuadro superior se observa una medida de la talla de la partícula depositada.

Para poner en evidencia la ventaja del tratamiento de la capa de oro con el recubrimiento de los tioles en la distribución de la proteína en la superficie de oro, se hizo un blanco de ferritina sobre una superficie de oro no modificada con los tioles (SPDP). Tras una deposición de 15h de la ferritina sobre la superficie de Au las imágenes de AFM muestran acumulaciones de partículas de ferritina de forma incontrolada (figura 4.12).

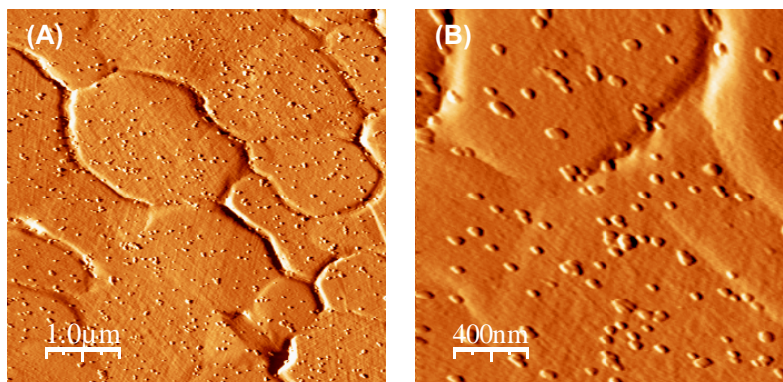


Figura 4.12. Imágenes de AFM de la deposición de las partículas de ferritina sobre la capa de oro sin tratarla con tioles. Se muestran dos imágenes a distintos aumentos (A) 1 μm y (B) 400nm.



La funcionalización de la superficie externa de la ferritina para dirigir su deposición sobre capas de Au previamente modificadas parece ser un método adecuado para la fabricación de nanoarrays de ferritinas. Este procedimiento puede llevarse a cabo con otras metaloproteínas y concretamente con ferritinas modificadas tanto interna como externamente, dándoles una mayor utilidad o especificidad a dichos arrays.<sup>9</sup>

Todos los estudios de AFM se han llevado a cabo en colaboración con el Profesor D. Félix Zamora, y el Profesor D. Julio Gómez-Herrero, de la Universidad Autónoma de Madrid.

### 4.3. Ferritinas fluorescentes

#### *Nanopartículas magnético-ópticas*

La funcionalización de la proteína con fluoróforos es más interesante desde el punto de vista tecnológico que la incorporación de colorantes, puesto que aporta una propiedad más interesante y de mayor potencialidad tecnológica. Para dicha funcionalización se utilizó el 7-(2- hidroximetil)-4-nitro-2,1,3-benzofurano perteneciente a la familia de los fluoróforos 7-X-4-nitro-2,1,3,benzofurano (NBD-X).<sup>11</sup>

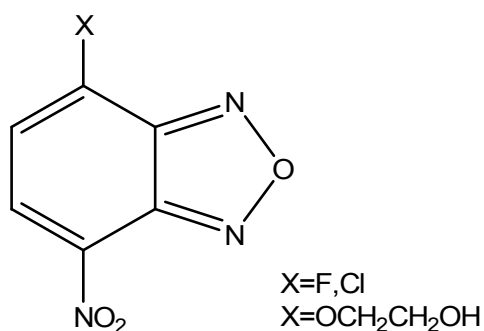


Figura 4.13. Estructura de los fluoróforos NBD-X

Los fluoróforos de la familia NBD-X tienen una alta capacidad de reacción con grupos amino y sulfhidrilo,<sup>12</sup> permitiendo así detectar proteínas mediante espectroscopia de fluorescencia.<sup>13</sup> La principal limitación de los NBD-X comerciales (NBD-Cl y NBD-F) es que poseen una baja solubilidad en agua. Por ello nosotros hemos trabajado con un derivado, en el que el grupo X es un alcohol alifático terminal, el 7-(2-hidroxi-etoxi)-4-nitrobenzofurazano (NBD-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH, que denominaremos a partir de ahora NBD) (remitirse al apartado 2.5 del capítulo 2),<sup>14</sup> que presenta mayor solubilidad en agua y además, una mayor reactividad que sus precursores (figura 4.13).

Con objeto de poder caracterizar adecuadamente el producto de reacción entre el fluoróforo y ferritina, se hizo previamente un estudio de la reactividad del fluoróforo con el aminoácido lisina (figura 4.14).

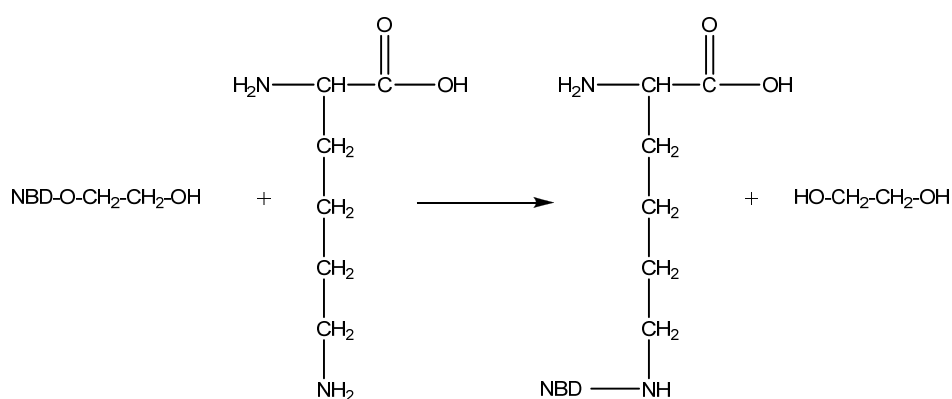


Figura 4.14. Esquema de reacción NBD-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH + lisina

Al tratar el NBD con un exceso de lisina a pH básico, pH 8.0, se observó que el espectro UV-visible cambiaba drásticamente mostrando un incremento muy significativo de la banda de absorbancia a 475 nm. Para llevar a cabo este experimento se mezclaron 1.4 ml de una disolución  $5.7 \times 10^{-3}$  M de NBD con 1 ml de una disolución de lisina 0.5 M, previamente tratada con NaHCO<sub>3</sub>, y se

incubó a temperatura ambiente. El desarrollo de la reacción se siguió en todo momento mediante espectroscopia UV-visible en el rango 210-600 nm. La reacción se considera finalizada cuando la absorbancia en el espectro UV-visible no cambió en un periodo considerable de tiempo (3 h). A través de los datos obtenidos por este experimento se calculó el coeficiente de extinción molar a través del valor dado en la banda a 475 nm, asumiendo que se da la completa conversión del NBD, estimando un valor de  $\epsilon^{475} = 23000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

Al trasladar la misma reacción a la apoferritina, es decir hacer reaccionar NBD con ApoFt, se observa la misma tendencia (figura 4.15).

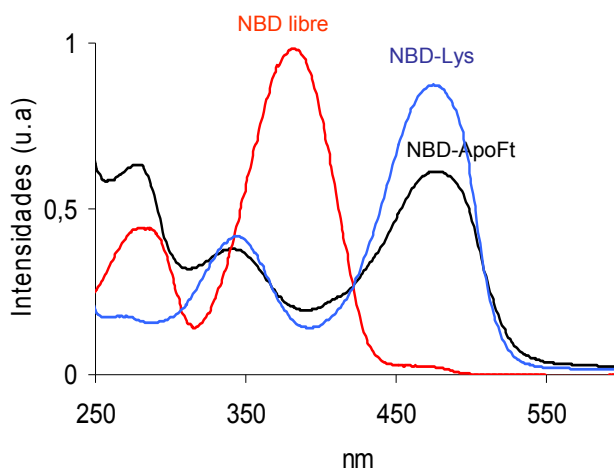


Figura 4.15. Espectro Uv-vis del fluoróforo libre (NBD libre) y el fluoróforo marcado con lisina (NBD-Lys) y apoferritina (NBD-ApoFt)

De igual modo se incubó la Ft con el fluoróforo a distintos tiempos (2, 8, 14, 18, 24, 48, 72 y 96 horas) a temperatura ambiente y a pH básico. Se preparó una disolución, 2 ml de 1 mg/ml (en tampón HEPES, pH 8) y se le añadieron 7 mg de NBD-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH, lo que se corresponde con un exceso molar de 160 con respecto a los 72 residuos de lisina expuestos por la proteína por los cuales se llevará a cabo la reacción. El exceso de fluoróforo se eliminó, de igual forma que en el caso de los colorantes, por diálisis exhaustiva frente a agua bidestilada y

cromatografía por exclusión de tamaño (Sephadex G-25). Finalmente se recuperaron las fracciones que contenían la proteína.

El espectro UV-visible de las fracciones dializadas se muestra en la figura 4.16. Aunque la banda característica de la ferritina en la región del visible no permite observar el cambio completo del espectro UV-visible, la principal característica de la reacción entre el fluoróforo y los residuos de lisina, es decir, el incremento de la absorbancia a 475 nm, sí es evidente.

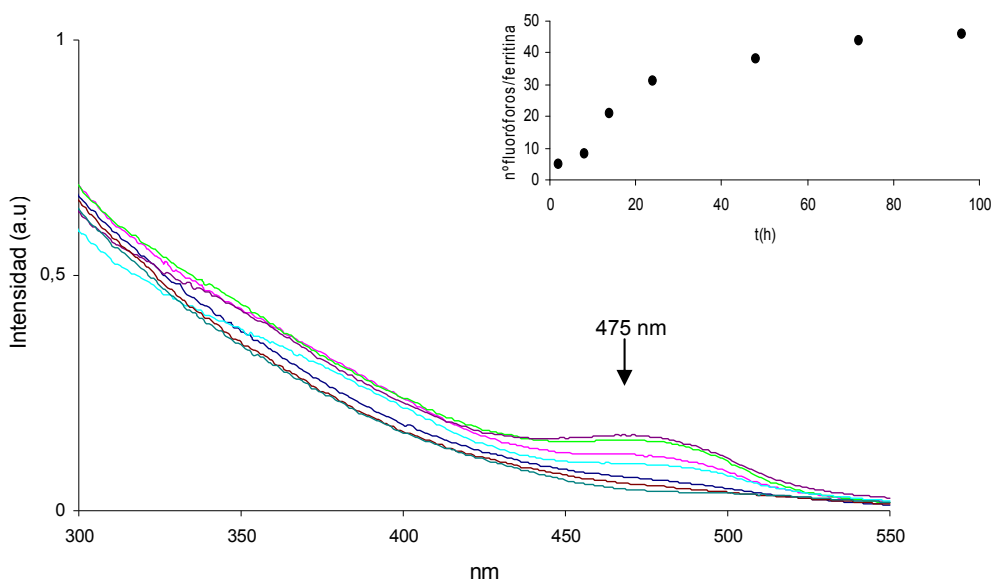


Figura 4.16. Espectro UV-vis de las fracciones de diálisis obtenidas tras la incubación de la ferritina con NBD a diferentes tiempos (2-100 h). En el recuadro superior se muestra el número de fluoróforos unido por proteína a los diferentes tiempos de incubación.

La cantidad de moléculas de fluoróforo unidas por proteína se determinó mediante los valores de absorbancia a 475 nm, que se corresponden con la cantidad de enlaces entre lisinas y NBD. Previamente los espectros se corrigieron sustrayéndole el espectro original de la ferritina, ya que esta también presenta una pequeña contribución en la absorbancia a

aproximadamente 400 nm. Mediante la ley de Lambert-Beer podemos relacionar el valor de absorbancia del fluoróforo con la concentración del mismo. El coeficiente de extinción molar usado fue, el calculado anteriormente, de  $23000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

El número de fluoróforos unidos por ferritina se estabiliza en 48 aunque incrementemos el tiempo de incubación, como se puede observar en la gráfica 4.16 (recuadro superior) la curva se satura a tiempos superiores de 70 h, de hecho mayores tiempos de incubación provocaban una disminución o “quenching” de la fluorescencia, esto sugiere que como máximo sólo dos de los tres residuos de lisina presentes en cada una de las subunidades de la proteína son accesibles al fluoróforo ( $2 \times 24 = 48$ ) (Figura 4.16; 4.17).

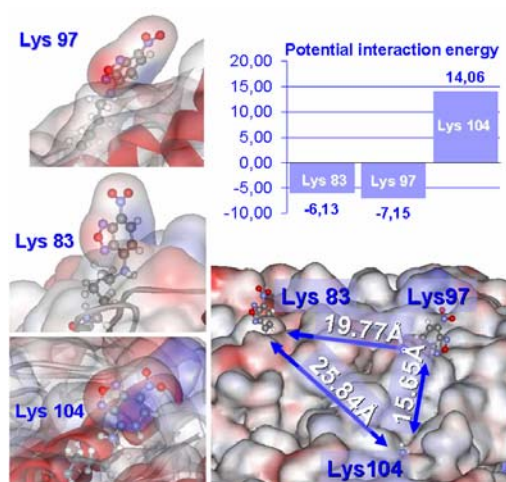


Figura 4.17. Modelización del marcaje Lys-NBD con sus potenciales de energía ( $\text{Kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ )

Con objeto de entender mejor el alcance de esta vía de reacción, entre los aminoácidos de lisinas presentes en la superficie externa de la ferritina y NBD, se llevó a cabo un estudio de simulación mediante potenciales de energía para dilucidar cuáles eran los dos residuos de lisina que eran atacados por el fluoróforo (Figura 4.17). Los residuos de lisina expuestos por cada una

de las subunidades de lisina son: lys83, lys97 y lys104. Los diferentes valores para el potencial de energía de estos tres residuos de lisina sugieren que los residuos lys83 y lys97 son los más favorables para reaccionar con el NBD, mientras que el residuo lys104 generalmente queda intacto. Igualmente se calculó la distancia existente entre los dos residuos de lisina que quedan marcados con el fluoróforo (lys83 y lys97), observándose un valor de 19.77 Å.

El espectro de fluorescencia del NBD libre (espectro 1, Fig. 4.18) presenta dos grandes diferencias con respecto al espectro obtenido cuando el fluoróforo está unido a la ferritina (NBD-Ft, espectro 3-8), ya que hay un desplazamiento de las bandas de emisión y excitación, y un incremento de la intensidad de fluorescencia cuando el fluoróforo está unido a la ferritina. Estas dos características, excluyen la posibilidad de que el fluoróforo esté adherido a la superficie de la ferritina únicamente por fuerzas electrostáticas, sino que demuestran la existencia de un enlace químico, el cual es responsable del aumento de la fluorescencia.

El espectro de fluorescencia de las nanopartículas NBD-Ft a diferentes tiempos (espectros 3-8, Fig. 4.18) se comparó con dos controles, el fluoróforo libre (espectro 1) y el fluoróforo unido a la lisina (NBD-Lys, espectro 2). En los casos en los que el fluoróforo se incubó con la ferritina o la lisina, se observó un incremento de la señal de fluorescencia con respecto al espectro mostrado por el fluoróforo libre, este incremento de la intensidad de fluorescencia parece ser debido a la formación del enlace amida entre los grupos amino y el NBD.<sup>15</sup> Al comparar las intensidades de fluorescencia de las muestras NBD-Lys (espectro 2) y NBD-Ft (espectro 3), incubadas con la misma concentración de fluoróforo, se observó un incremento en la intensidad de fluorescencia cuando el NBD se encontraba anclado a la ferritina (NBD-Ft), lo cual indica que la ferritina genera un efecto potenciador de la fluorescencia con respecto a la Lys libre. Un efecto similar se ha observado en algunos casos en los que se ha

llevado a cabo una reacción química entre fluoróforos del tipo carbocianina (Cy5) y cápsidas de virus.<sup>16</sup>

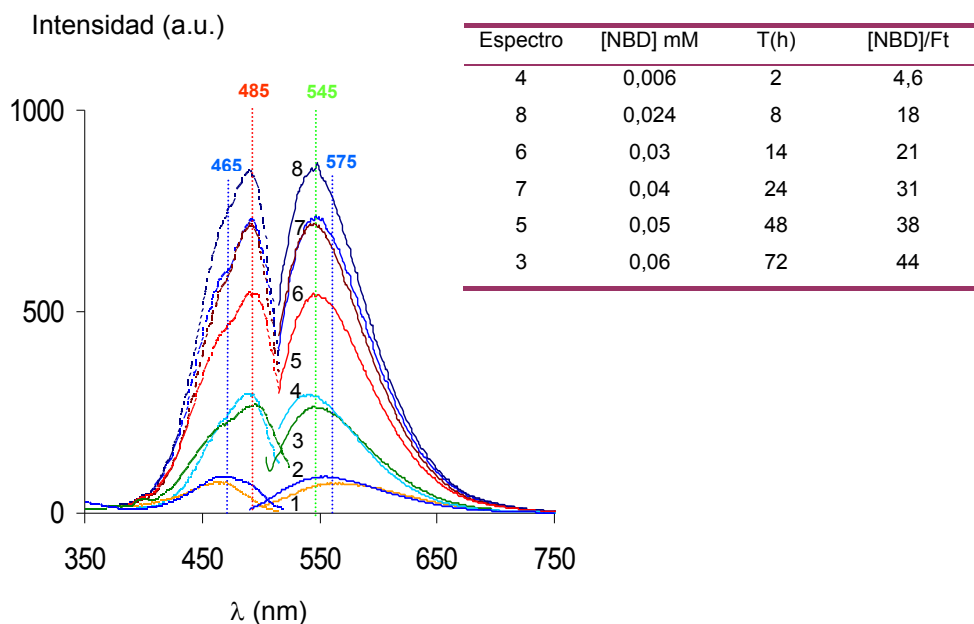


Figura 4.18. Espectro de fluorescencia (excitación y emisión) de: NBD libre (espectro 1), NBD-Lys (espectro 2) y NBD-Ft (espectro 3-8) a distintas concentraciones. En la tabla se muestran el número de moléculas de NBD unidas por ferritina a los distintos tiempos de incubación.

Los estudios realizados mediante TEM muestran que la estructura nativa del núcleo de la ferritina permanece intacta tras la funcionalización química de su envoltura proteica. Una imagen típica de TEM de las nanopartículas de ferritina funcionalizadas con el NBD, NBD-Ft, se muestra en la figura 4.19. El diámetro medio de dichas nanopartículas fue de 5 nm, lo que indica que no había agregación y que se trataba de partículas perfectamente aisladas y solubles en agua.

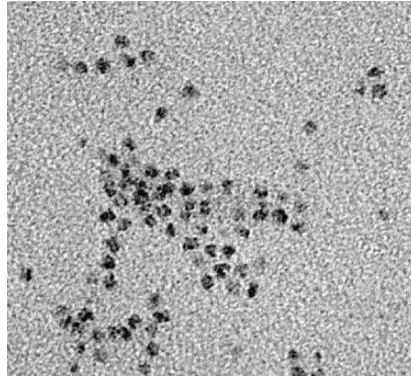


Figura 4.19. Micrografía de TEM de la ferritina funcionalizada con el fluoróforo (NBD-Ft)

El estudio de las propiedades magnéticas de las partículas de ferritina funcionalizadas con el fluoróforo perteneciente a la familia NBD-X muestra que no existen cambios significativos, permaneciendo intactas las propiedades magnéticas del núcleo metálico tras la modificación externa de la nanopartículas como se puede observar en la siguiente figura (figura 4.20).

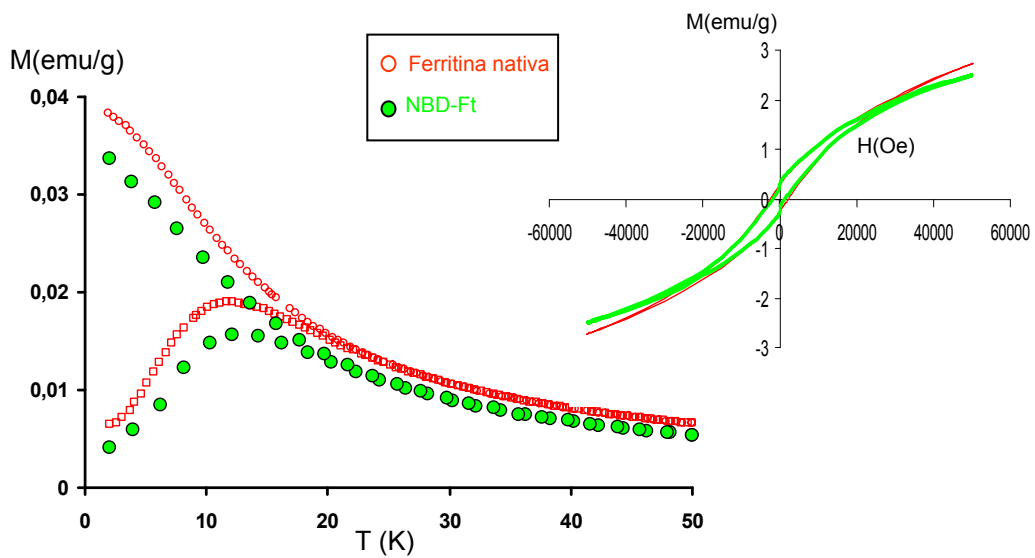


Figura 4.20. Curvas de ZFC/FC de las nanopartículas de NBD-Ft y de la ferritina nativa. En la parte superior se observa el ciclo de histéresis de dichas muestras a 5 K



Las partículas de ferritina marcadas con el fluoróforo NBD mantienen su solubilidad en agua. También se ha demostrado que el fluoróforo mantiene su actividad después de cuatro meses anclado a la ferritina (pérdida del 3% de fluorescencia), lo que pone de manifiesto una alta estabilidad química y fotoestabilidad de estas partículas fluorescentes.

La solubilidad en agua y estabilidad de estas nanopartículas funcionalizadas, hacen que estas partículas puedan ser adecuadamente manipuladas en disolución para ser depositadas sobre un sustrato, para la fabricación de materiales nanoestructurados, por ejemplo mediante la técnica de Langmuir-Blodgett (LB), obteniendo así capas finas o “films” de nanopartículas ordenadas que mantienen las propiedades de dichas nanopartículas (magnéticas y ópticas).

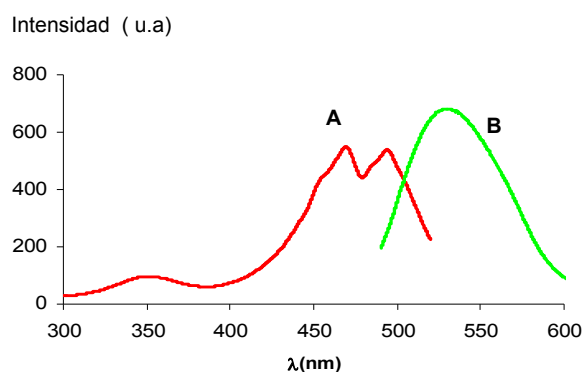


Figura 4.21. Espectro de fluorescencia de la deposición en films de NBD-Ft, (A) espectro de excitación del film (470 nm), (B) espectro de emisión del film (542 – 600 nm)

Este trabajo se llevó a cabo en colaboración con el Dr. Miguel Clemente y el Profesor Eugenio Coronado (ICMMol-Universidad de Valencia.). Las propiedades fluorescentes de las partículas NBD-Ft persisten en los LB “films”, (como se muestra en la figura 4.21) de igual manera, dichos “films” presentan unas propiedades superparamagnéticas similares a las que muestra la ferritina nativa.<sup>3</sup> Podemos por tanto concluir que este procedimiento permite trasladar las

propiedades de la nanopartículas al nanomaterial en este caso del tipo Langmuir-Blodgett.

La deposición organizada de ferritina constituye un importante paso en la investigación en el campo de los materiales, ya que presenta numerosas aplicaciones. En este sentido, la viabilidad de esta posibilidad ha abierto una ruta a explorar en un futuro inmediato, la deposición de diferentes nanopartículas de ferritinas magnético-ópticas.

***FRET: Transferencia de Energía de Fluorescencia en una nanopartícula.***

La presencia de dos fluoróforos adecuados a una distancia apropiada puede generar fenómenos de transferencia de energía (FRET): la excitación a la longitud de onda del dador puede generar una energía de emisión que es utilizada para excitar al fluoróforo receptor, dando lugar a la de emisión del receptor y por consiguiente a un aumento del valor de Stokes (que se corresponde con la diferencia de longitudes de onda entre la excitación y emisión del fluoróforo) (figura 4.22).

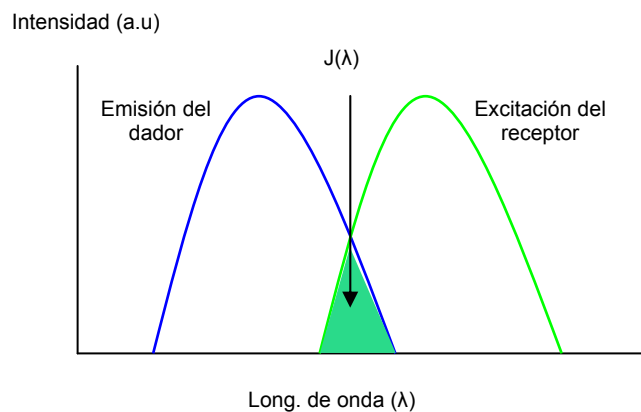


Figura 4.22. Solapamiento de la banda de emisión y excitación de ambos fluoróforos que permiten la existencia de fenómenos de transferencia de energía de fluorescencia, FRET.

La obtención de un fenómeno de este tipo nos abre un amplio abanico de aplicaciones, como por ejemplo, como sensor de la asociación-disociación de las subunidades constituyentes de un buen número de biomoléculas.

El espectro de excitación del fluoróforo Alexa Flúor 430 (AF430, banda de excitación a 350 nm y de emisión a 430 nm) solapa con el espectro de emisión del fluoróforo Alexa Flúor 350 (AF350, excitación a 327 nm y emisión a 350 nm). Por ello los elegimos como candidatos, a priori, para generar el fenómeno de FRET al unir covalentemente ambos fluoróforos a la superficie de la ferritina a través (al igual que en el caso del NBD) de los residuos de lisina que la ferritina expone en su capa externa. Inicialmente se llevó a cabo un estudio de cada uno de los fluoróforos por separado, tanto con la ferritina como con la apoferritina.<sup>17</sup>

Para la incorporación de estos fluoróforos a la apo- o ferritina, se utilizaron sus ésteres activados (succinimidil ésteres), que son muy reactivos con los grupos  $\text{NH}_2$  de la ferritina. Los Alexa Flúor muestran una gran intensidad de fluorescencia y alta fotoestabilidad (al menos durante tres meses). Entre sus ventajas también podemos citar que son solubles en agua, permiten trabajar en un amplio rango de pH (2-10), y como se comentó anteriormente, su derivado succinimidil éster presenta una alta reactividad frente a aminas primarias ( $\text{R-NH}_2$ ), formando enlaces amidas muy estables.

A una disolución de apo- o ferritina comercial se le añadió un exceso del derivado succinimidil éster del AF350, (figura 4.23) y se incubó durante 5 h a temperatura ambiente protegiéndolas de la luz. El exceso de alexa se eliminó por diálisis exhaustiva y cromatografía de igual modo que en los casos anteriores (colorantes orgánicos y fluoróforo NBD)

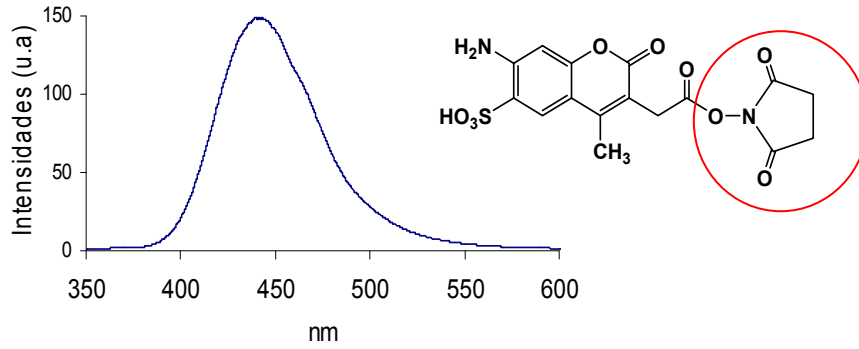


Figura 4.23. Estructura del Succinimidil éster Alexa Flúor 350 y espectro de emisión del succinimidil éster del Alexa Flúor 350 al excitar a 325 nm.

El procedimiento llevado a cabo por la incubación del succinimidil éster del AF430, (figura 4.24) es idéntico al que se siguió para el fluoróforo succinimidil éster Alexa Flúor 350, tanto para la ferritina como para la apoferritina.

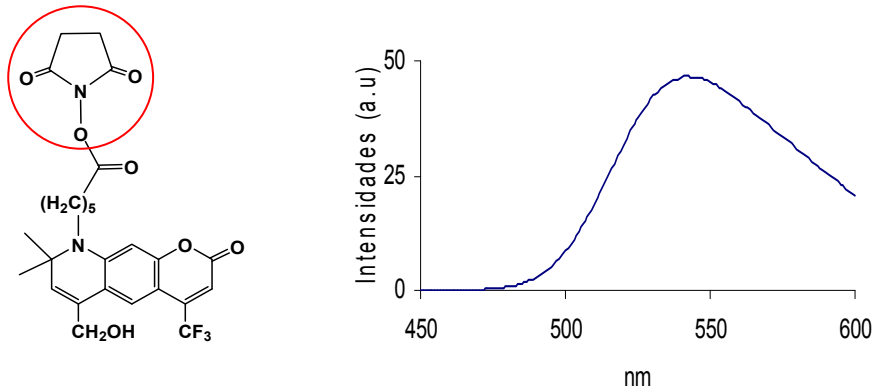


Figura 4.24. Estructura del Succinimidil éster Alexa Flúor 430 y espectro de emisión del succinimidil éster del Alexa Flúor 430 al excitar a 425 nm.

La coelución ferritina/Alexa 350 se puede observar en la figura 4.25, donde se representan los valores de absorbancia de los espectros UV-visible a 280 nm (proteína) y fluorescencia de emisión (al excitar las muestras a 327 nm) de las fracciones obtenidas de la cromatografía. Resultados similares se obtienen para el perfil de coelución de la Ft-AF430.

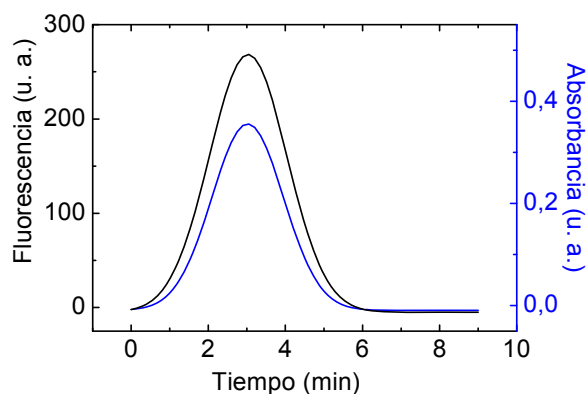


Figura 4.25. Perfil de coelución de la Ft-AF350.

La comigración por electroforesis nativa en gel de poliacrilamida (figura 4.26) del sistema ApoFt-Alexa Flúor es una prueba experimental más de la exitosa funcionalización de la proteína con los fluoróforos de tipo Alexa Fluor. La proteína funcionalizada y la proteína nativa presentan el mismo patrón de migración lo que indica que mantienen su integridad estructural, puesto que la introducción de nuevos grupos en la superficie no varía la configuración de la proteína ni varían en gran medida su peso molecular ni su carga.

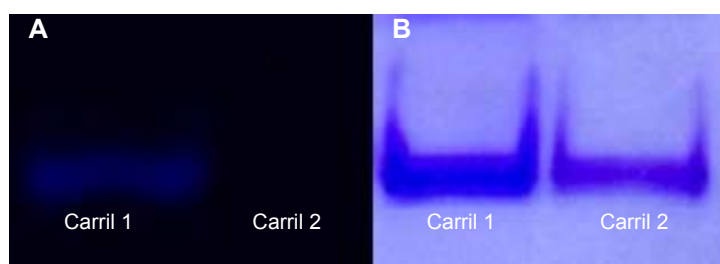


Figura 4.26. Movilidad electroforética de la apoferritina no modificada y modificada en su superficie externa, (A) Fotografía del gel de electroforesis sin teñir bajo la luz ultravioleta, (B) Fotografía del gel de electroforesis teñido con azul de Coomassie. En ambas fotografías en el carril 1 se representa apoferritina- AF350 y en el carril 2 la apoferritina sin modificar

La cantidad de moléculas de fluoróforos unidas por proteína se determinó mediante la ley de Lambert-Beer. Para ello se tomaron los valores de absorbancia en el espectro UV-visible a 350 nm para el AF350 y la proteína se monitoriza a 280 nm. En el caso del AF430 los valores de absorbancia se toman a 430 nm y la apoferritina se monitoriza igualmente a 280 nm. Los valores de los coeficientes de extinción molar usados son los indicados en la bibliografía,<sup>18</sup> para el fluoróforo AF350 es de  $19000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  y para el fluoróforo AF430 es de  $16000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . El coeficiente de extinción usado para la apoferritina es  $\epsilon^{280} = 427200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . En el caso de la ferritina la concentración utilizada en este cálculo es la inicial.

Los valores obtenidos son de nueve moléculas del AF350 por apoferritina y de seis moléculas del AF430 por apoferritina. Estos valores son muy cercanos a los obtenidos para la ferritina.

Viendo que los resultados obtenidos para la funcionalización de la ferritina con cada uno de los fluoróforos por separado eran bastante alentadores y exitosos, nos planteamos que si era posible anclar covalentemente los fluoróforos independientemente, por qué no hacerlo de forma simultánea trabajando con disoluciones que contuvieran mezcla de ambos alexa flúor (AF), buscando los fenómenos de transferencia de energía. Se llevaron a cabo reacciones de ferritina y apoferritina con mezcla de ambos fluoróforos AF350/AF430, con la idea de incorporar diferente número de cada uno de los fluoróforos y hacer un estudio de en qué situaciones aparecen fenómenos de FRET. Para ello se prepararon distintas soluciones de ferritina, y se incubaron con distintas cantidades de ambos fluoróforos, probando las proporciones molares 1:1, 1:2, 1:3, 1:5 y 1:10 (AF350:AF430). También se probó un amplio rango de tiempos de incubación que van desde las 3 h a las 24 h. El exceso de los fluoróforos, alexa flúor, se eliminó al igual que en el caso en el que únicamente adicionamos uno de los fluoróforos a la proteína, por diálisis exhaustiva frente a agua milli-Q y posterior cromatografía por exclusión de tamaño (Sephadex-G25), recuperándose las fracciones que



contenían la proteína. Este mismo procedimiento se llevó a cabo para las muestras realizadas con apoferritina.

Como se puede observar en el espectro de emisión de la figura 4.27, al incubar la apoferritina con los dos fluoróforos en proporción molar 1:2, e irradiar a 327 nm, no solamente vemos la emisión del Alexa Flúor 350 (441 nm) sino también la del Alexa Flúor 430 (540 nm). Esta segunda emisión nos confirma la existencia de la transferencia de energía debida al fenómeno de FRET, ya que parte de la emisión del Alexa Flúor 350 excita al AF430, por lo que aparece la emisión a 540 nm debida a la excitación del Alexa Flúor 430.

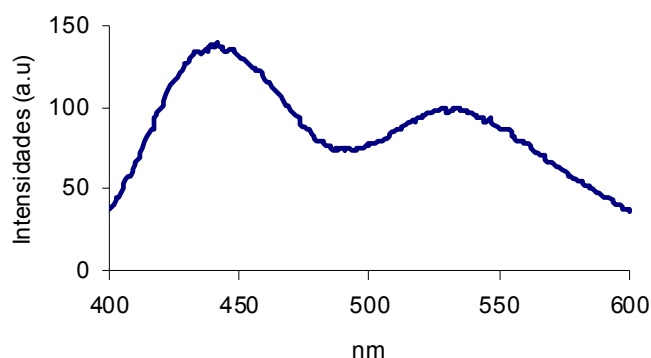


Figura 4.27. Espectro de emisión de la apoferritina-AF350/430 en proporción 1:2 ( $\lambda$  de excitación de 324 nm)

Lo primero que se estudió es el efecto de la estequiometría del dador y el aceptor sobre el FRET (figura 4.28 y 4.29). Cuando la proporción molar que existe entre Alexa Flúor 350 y Alexa Flúor 430 es 1:1, no se observa FRET. Si la proporción molar entre los dos fluoróforos es 1:2, se observa un claro fenómeno de FRET en el que la fluorescencia debida al Alexa Flúor 350 es de la misma magnitud que la correspondiente al AF430. La incubación de la proteína con los dos fluoróforos se realizó de forma directa y posteriormente las muestras fueron dializadas y cromatografiadas para eliminar el posible exceso de fluoróforo.

Se intentó aumentar el efecto haciendo que la transferencia de energía entre el dador y el aceptor fuera total (es decir que desapareciera por completo la emisión del fluoróforo dador, AF350) y para ello se incrementó la concentración del aceptor frente al dador. En el caso de la apoferritina se probó con una proporción molar entre los dos fluoróforos de 1:3; los resultados muestran que sí hay FRET y que al igual que en el caso anterior el pico de fluorescencia debido al AF350 es mayor que el obtenido para el AF430 e incluso las intensidades se incrementaron considerablemente frente a las obtenidas en la proporción 1:2, pero no conseguimos que la transferencia de energía fuera total, sino que se incrementan las intensidades de los dos fluoróforos por igual, puesto que se mantiene la relación de intensidades entre los picos debidos a AF350 y AF430. Continuamos incrementando la proporción del fluoróforo aceptor frente al dador, en este caso incubamos la apoferritina con una proporción 1:10 del AF350:AF430. Y así nos acercamos mucho a la transferencia total de energía, ya que conseguimos que el pico debido al segundo fluoróforo, el aceptor, sea muy superior en intensidad frente al primero, el dador.

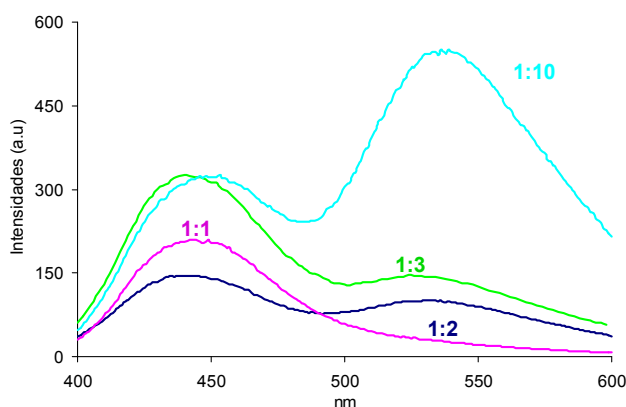


Figura 4.28. Espectro de emisión de la ApoFt-AF350-AF430 a distintas proporciones de ambos fluoróforos ( $\lambda$  de excitación de 324 nm).

Un resultado similar se obtuvo al incubar la ferritina con los dos fluoróforos con una proporción molar entre AF350:AF430 de 1:5.



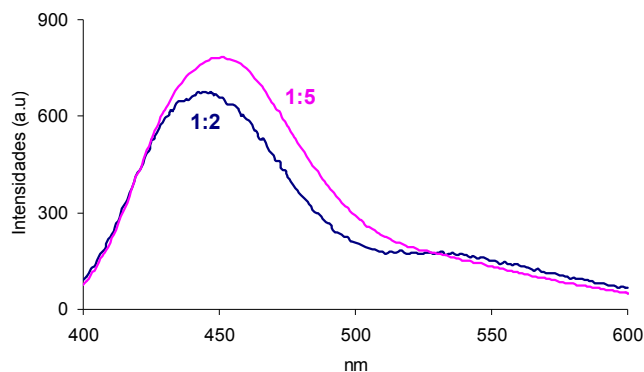


Figura 4.29. Espectro de emisión de la Ft-AF350-AF430 a distintas proporciones de ambos fluoróforos ( $\lambda$  de excitación de 324 nm).

Se calculó el número de moléculas de cada uno de los fluoróforos que se unen por proteína en las distintas proporciones mediante espectroscopia UV-visible (tabla 4.1).

Concretamente, la concentración del AF430 se determinó directamente del valor de la absorbancia a 430 nm, puesto que a esta longitud de onda, la absorción de la proteína y AF350 son despreciables. A partir del valor de absorbancia a 430 nm y considerando el coeficiente de extinción molar ( $\epsilon^{430} = 16000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), se obtuvo por aplicación de la ley de Lambert-Beer, el valor de concentración. Para calcular la concentración del segundo fluoróforo, AF350, se midió la absorbancia experimental a 350 nm en el espectro UV-visible y se le restó la correspondiente al AF430, que absorbe a esta longitud de onda con un coeficiente de extinción molar de  $\epsilon^{350}(\text{AF430}) = 8000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . A partir de este valor de absorbancia corregida y considerando un  $\epsilon^{350}(\text{AF350}) = 19000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , se obtuvo el valor de la concentración de AF350. Finalmente, la concentración de proteína se calculó directamente del valor de absorbancia a 280 nm ( $\epsilon^{280} = 427200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), considerando, por nuestras observaciones, que la absorbancia de ambos fluoróforos a esta longitud de onda es despreciable con respecto a la proteína.

Para el caso de las muestras con ferritina, la concentración de la proteína fue considerada la inicial. En este sentido, los experimentos llevados a cabo con apoferritina ponen de manifiesto que no hay cambios significativos en la concentración inicial y final de la proteína.

Los resultados obtenidos para las muestras realizadas con apoferritina son los mostrados en la tabla 4.1 y dichos valores son trasladables a los ensayos realizados con ferritina.

AF350:AF 430	n° AF350	n°AF430	FRET
1:1	8	10	NO
1:2	6	17	SI
1:3	10	19	SI
1:10	6	35	SI

Tabla 4.1. Número de moléculas de fluoróforo por proteína calculado mediante la ley de Lambert-Beer y presencia o no del fenómeno de transferencia de energía para cada una de las proporciones estudiadas.

Se estudió la influencia del tiempo de incubación y se realizaron ensayos con distintos tiempos (3 h y 24 h).

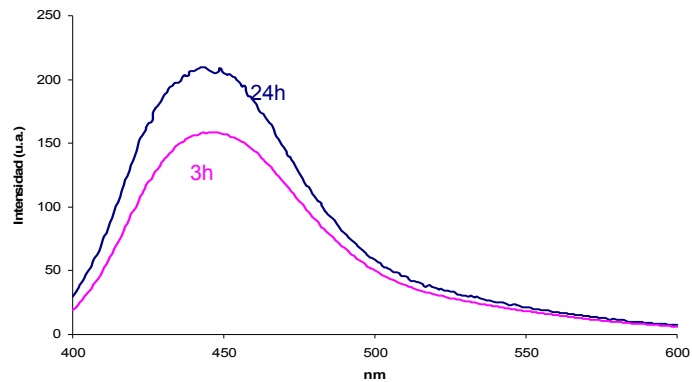


Figura 4.30. Espectro de emisión de ApoFt-AF350-AF430 (1:1) a tiempos de incubación de 3 y 24 h.

Comparando los valores de intensidad de fluorescencia y el número de moléculas de fluoróforo unidas por apoferritina, se observó que no había grandes diferencias (figura 4.30), lo que nos indica que estos fluoróforos son altamente reactivos y que con 3 h de incubación era suficiente para llevar a cabo la reacción de los fluoróforos con la proteína, tal y como se muestra en la siguiente figura.

Por tanto se demostró que incubando la proteína con distintas proporciones del AF350 y AF430 se obtienen distintos perfiles de FRET, por lo que controlando la proporción entre los dos fluoróforos podemos controlar dicha transferencia de energía. De los valores presentados en la tabla 4.1 dedujimos que cuando el número total de fluoróforos unidos covalentemente a la ferritina era inferior a 24 (que si recordamos es el número de subunidades que componen la proteína) no se daba el fenómeno de transferencia de energía y sin embargo cuando este número es mayor o igual a 24 si existía FRET.

La existencia de FRET requiere lógicamente una cercanía espacial entre el fluoróforo dador y el fluoróforo aceptor, se considera que las distancias entre los fluoróforos deben ser menores a 6 nm para que se pueda dar el fenómeno de transferencia de energía.<sup>19</sup> Esto, junto con los datos obtenidos en la tabla 4.1 que indican que sólo cuando el número de fluoróforos anclados a la superficie externa de la ferritina es superior o igual al número de subunidades de la proteína (24), nos hizo pensar que probablemente la existencia de FRET requeriría la presencia de ambos fluoróforos en una misma subunidad de ferritina, donde la distancia entre fluoróforos se hace mínima (concretamente la distancia existente entre las distintas lisinas de una misma subunidad es del orden de 1.5 a 3 nm). Para investigar más este aspecto se llevaron a cabo varios experimentos, basados todos ellos en el conocido hecho de que la apoferritina se disocia en sus subunidades a pH 2 para volverse a autoasociar a pH por encima de 7.<sup>20</sup>

Cuando a una muestra de apoferritina, que se había incubado con los dos fluoróforos de la familia Alexa, AF350 y AF430, en proporción 1:2 y que por tanto

presentaba FRET, se le sometió a un cambio de pH, pasando de pH 8 a pH 2, mediante 15 min de diálisis frente a HCl 0.1 M y tras 3 h de incubación asegurándonos que las partículas estaban totalmente disociadas en sus 24 subunidades, se observó la permanencia de FRET mediante estudios de fluorescencia, puesto que no se observaron diferencias significativas entre las intensidades de fluorescencia medidas a pH 8 y a pH 2 (tabla 4.2).

$\lambda$ excitación (nm)	Ancho rendija	pH 8 ( $\lambda_{em}440nm$ )	pH 8 ( $\lambda_{em}540nm$ )	pH 2 ( $\lambda_{em}440nm$ )	pH 2 ( $\lambda_{em}540nm$ )
327	5-5	143.50	45.24	129.53	51.81
327	5-10	502.59	150.25	448.78	190.24
425	5-5	-	146.34	-	170

Tabla 4.2. Valores de intensidad de la fluorescencia de la ApoFt-AF350-AF430 (1:2) al variar el pH de 8 a 2. ( $\lambda_{em}$  = longitud de onda de emisión)

Este resultado sugiere que el FRET permanece aunque disociemos la apoferritina en sus subunidades. Esta permanencia de FRET en la apoferritina disociada debe ser consecuencia de la existencia de ambos fluoróforos en al menos alguna subunidad, y de ahí que la disociación no afecte a la intensidad ni el patrón del FRET (figura 4.31).

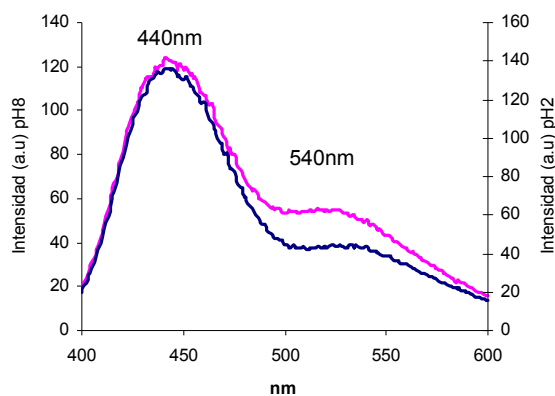


Figura 4.31. Espectro de fluorescencia de la ApoFt-AF350-AF430 (1:2) al variar el pH de 8 a 2.

Un segundo experimento confirmó esta hipótesis (figura 4.32). Realizamos un ensayo en el que se prepararon dos muestras en las que se incubó la proteína con cada uno de los fluoróforos por separado. Partiendo de una solución de apoferritina comercial se prepararon dos disoluciones (2 ml 1 mg/ml). Cada una de estas disoluciones se incubó separadamente con únicamente uno de los fluoróforos. La muestra ApoFt-AF350 se incubó con 0.4 mg del fluoróforo succinimidil éster Alexa Flúor 350 y la otra muestra, ApoFt-AF430, se incubó con 1.3 mg de succinimidil éster Alexa Flúor 430. El tiempo de incubación en ambos casos fue de 3 h a 4°C y protegidas frente a la luz. El exceso de fluoróforo de cada una de las muestras se eliminó por diálisis exhaustiva frente a agua milli-Q durante 2 días, haciendo cambios de agua cada 6 h.

Se recuperaron las disoluciones dializadas y se les realizó un cambio de pH mediante 15 min de diálisis frente a HCl 0.1 M llegando a un pH final de 2. Una vez que ambas muestras ApoFt-AF350 y ApoFt-AF430 estaban a pH 2 y por tanto la proteína se había disociado en subunidades se juntaron las dos disoluciones, la que contenía ApoFt-AF350 y la de ApoFt-AF430, y se incubaron durante media hora en agitación para que la disolución resultante se homogeneizara. A continuación, se les volvió a subir el pH a 8, por diálisis de la muestra frente a HEPES 8, para que la proteína se autoensamblara, obteniendo así moléculas de apoferritina que contendrían subunidades marcadas con AF350 y subunidades con AF430, pero obligatoriamente los dos fluoróforos se dispondrían en subunidades diferentes (RApoFt-AF350-AF430). Es conveniente recordar que estudios previos han demostrado que la proteína a pH límite, pH 2, se desnatura rompiéndose en sus 24 subunidades y que cuando volvemos a subir el pH a un pH fisiológico, con un rango comprendido entre 7,4-8 la proteína se renaturaliza volviendo a su configuración nativa.<sup>20</sup>

En este ensayo la cantidad final de los fluoróforos en la partícula reconstituida se corresponde con una proporción molar 1:2 entre los dos fluoróforos (AF350:AF430)

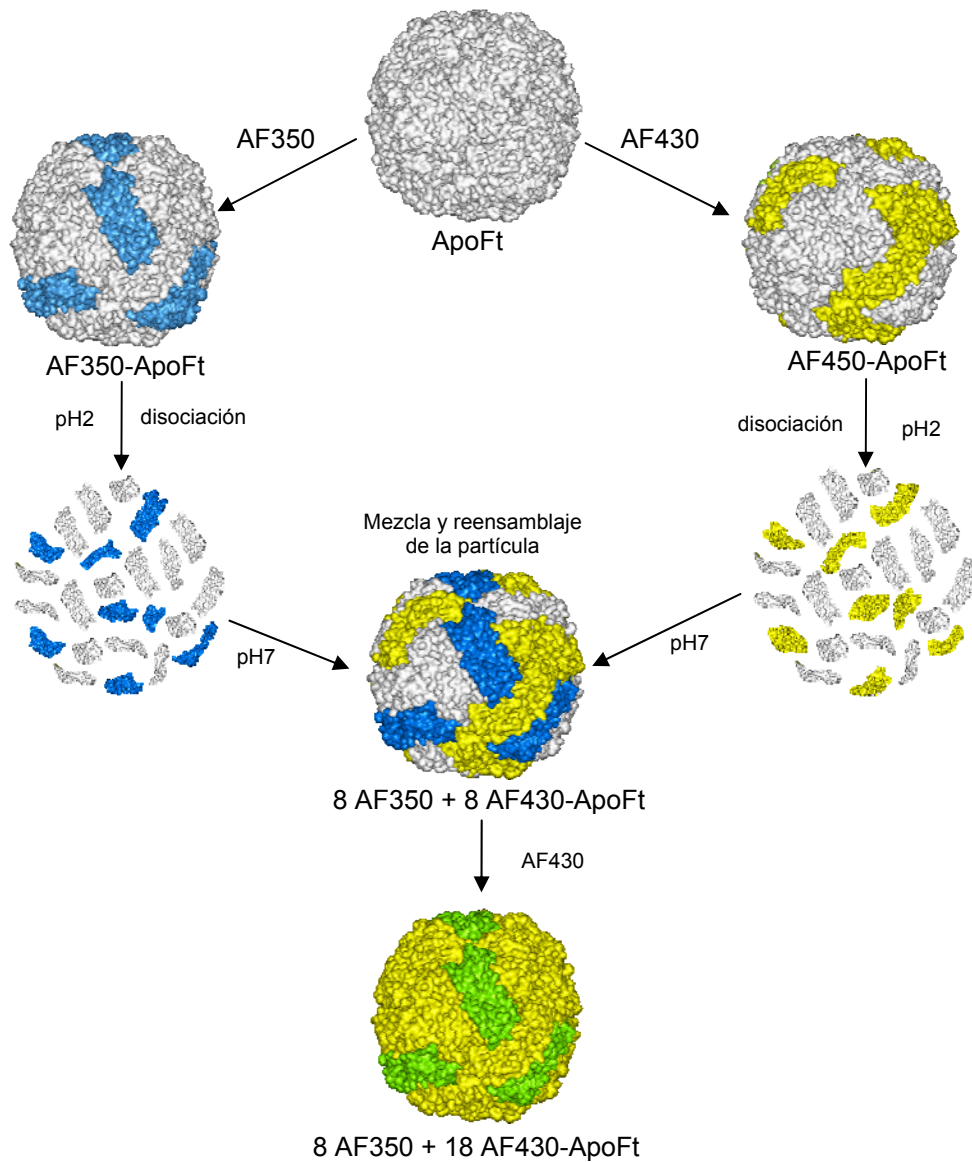


Figura 4.32. Disociación de las partículas AF350-ApoFt y AF430-ApoFt en sus subunidades y posterior reensamblaje de las subunidades de la mezcla, obteniéndose partículas RApoFt-AF350-AF430 compuestas por AF350 y AF430 (8 AF350 + 8 AF430-ApoFt), adición de más AF430 incrementando la proporción de AF430 en la muestra anterior, 8 AF350 + 18 AF430-ApoFt. Las subunidades azules y amarillas representan las subunidades de AF350-ApoFt y AF430-ApoFt, respectivamente. Las subunidades blancas son aquellas que no han sido funcionalizadas con ningún fluoróforo. Las subunidades verdes son las que contienen ambos fluoróforos a la vez.

Al estudiar la fluorescencia irradiando la muestra a 350 nm observamos (figura 4.33) que no había FRET, ya que aparecía un único pico de emisión centrado a 440 nm, y al irradiar a 427 nm se observaba una única emisión a aproximadamente 520 nm, lo que indicaba que los dos fluoróforos estaban unidos a la proteína, sin embargo no había FRET. Los resultados de este segundo ensayo nos ponen de manifiesto que cuando los fluoróforos están unidos en subunidades diferentes no se da el fenómeno del FRET.

El número de fluoróforos unidos a la proteína se calculó nuevamente a través de la ley de Lambert-Beer, en este caso el número de moléculas de Alexa Flúor 350 que se unieron fue de 8 moléculas por apoferritina y para el Alexa Flúor 430 se unieron 8 moléculas por apoferritina.

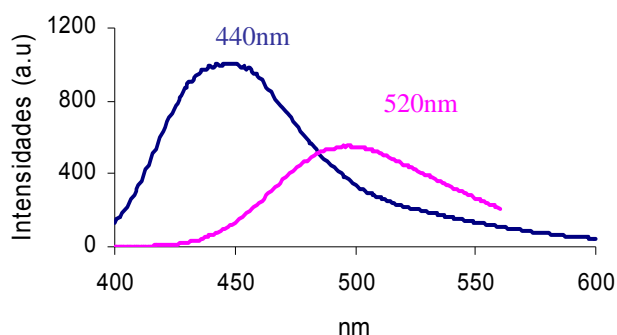


Figura 4.33. Espectro de emisión de las nanopartículas de apoferritina reconstituidas con cada uno de los fluoróforos en subunidades diferentes. El espectro se toma en el caso de la línea azul (AF350) excitando a 324 nm y fijando la emisión en un rango de 400-600 nm; y en el caso de la línea magenta (AF430), la  $\lambda$  de excitación es de 425 nm y la emisión se fija en un rango que va desde los 450 a los 600 nm.

Confirmamos nuevamente que es imprescindible que ambos fluoróforos se dispongan en la misma subunidad para que se de el fenómeno de transferencia de energía (FRET) puesto que al incubar la muestra anterior, en la que AF350 y AF430 se encontraban indiscutiblemente unidos a subunidades diferentes de la apoferritina, con una mayor cantidad del fluoróforo aceptor (AF430) apareció

nuevamente dicho fenómeno. Tras incubar la muestra con AF430 hasta tener una proporción de 1:3 (AF350:AF430) y excitarla a 327 nm el espectro de fluorescencia (figura 4.34) nos muestra dos picos claros de emisión uno menos marcado a aproximadamente 440 nm (debido a la excitación del fluoróforo dador) y otro de mayor intensidad a aproximadamente 540 nm (correspondiente a la excitación del fluoróforo aceptor).

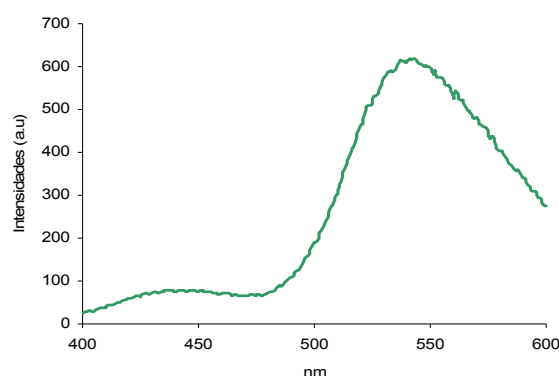


Figura 4.34. Espectro de emisión de las nanopartículas de apoferritina reconstituidas, con cada uno de los fluoróforos en subunidades diferentes, incubadas con mayor cantidad de AF430 llegando a una proporción final de 1:3.

Cabía la posibilidad de que en la muestra de disociación/asociación (8 AF350 + 8 AF430-ApoFt, figura 4.32) no se diese el fenómeno de transferencia de energía debido a que la cantidad de fluoróforos con la cual se había conjugado la ApoFt no era suficiente para mostrar FRET. Para eliminar esta posibilidad se hizo un estudio de dilución, en el cual se tomó una muestra de ApoFt marcada con ambos fluoróforos en proporción 1:2 y que presentaba FRET (11 AF350 + 16 AF430-ApoFt), se disoció en sus 24 subunidades mediante diálisis frente a HCl (pH 2, 30 min), cuando la muestra estaba ya totalmente disociada se incubó con la misma cantidad de ApoFt no marcada con AF e igualmente disociada en sus subunidades. La mezcla de ambas muestras disociadas en subunidades (ApoFt con FRET y ApoFt no funcionalizada) se incubó durante 20 min.



Tras el periodo de incubación se subió el pH de la disolución hasta 8 por adición de NaOH, reconstituyéndose así la proteína. Por espectroscopia UV-Vis se estudió el número de fluoróforos por proteína reconstituida, los valores obtenidos fueron de 4 AF350 + 9 AF430 por molécula de ApoFt. Al estudiar las propiedades de fluorescencia de dichas partículas se observó la permanencia de FRET, lo que nos demostró irrevocablemente que si ambos fluoróforos están anclados a una misma subunidad de la proteína se da dicho fenómeno de transferencia de energía aunque la cantidad de fluoróforos por ferritina sea muy pequeña.

## BIBLIOGRAFÍA

- 
- 1.- Belén Fernández, Natividad Gálvez, Purificación Sánchez, Julia Morales, Francisco Santoyo, Rafael Cuesta, José M. Domínguez-Vera. *Inorganica Chimica Acta*, **2007**, 360 (1,3) 3951-3954
- 2.- (a) Michael T. Klem, Mark Young and Trevor Douglas. *Materials today, Review Feature*. **2005**. (b) Granier T; Gallois B; Dautant A; Langlois d'Estaintot B; Precigoux G. *Acta crystallographica*, **1997**, 53, 580-7.
- 3.- Miguel Clemente-León, Eugenio Coronado, Alejandra Soriano-Portillo, Enrique Colacio, José M. Domínguez-Vera, Natividad Gálvez, Rafael Madueño and María T. Martín-Romero, *Langmuir*, **2006**, 22, 6993-7000.
- 4.- (a) Cherry R. J, Bjornsen A. J. y Zapien D. C, **1998**, *Langmuir*, 14, 1971 (b) Yamaki M, Matsubara K y Nagayama, K. **1993**, *Langmuir*, 9, 3154 (c) Yoshimura H, Scheybani T, Baumeister W y Nagayama K, **1993**, *Langmuir*, 10, 3290 (d) Yoshinobu T, Suzuki J, Kurooka H, Moon W, C y Iwasaki H, **2003**, *Electrochim. Acta*, 48, 3131 (e) Tominaga M, Ohira A, Yamaguchi Y, y Kunitake M. J. J. *Electroanal. Chem.* **2004**, 566, 323.
- 5.- Britt D. W, Möbius D. y Hlady V, **2000**, *Phys Chem.Chem.Phys.* 2, 4594.
- 6.- (a) Chudnovsky E. M, *Nature*, **1996**, 274, 938. (b) Mannini M. et al. *Nano Lett.* **2005**, 5, 1435.
- 7.- (a) Cavallini M, Biscarini F, Gomez-Segura J, Ruiz D y Veciana J. *Nano Lett.* **2003**, 3, 1527. (b) Fleury B, Catala L, Huc V, David C, Zhong W Z, Jegou P, Baraton L, Palacin S, Albouy P-A y Mallah T. *Chem. Commun.* **2005**, 2020 (c) Clemente-León M, Soyer H, Coronado E, Mingotaud C, Gómez-García C. J y Delhaes P. *Angew. Chem. Int. Edn Engl.* **1998**, 37, 2842.

---

8.- Cavallini M, Gómez-Segura J, Ruiz-Molina D, Massi M, Albonetti C, Rovira C, Veciana J y Biscarini F. *Angew. Chem. Int. Edn*, **2005**, 44, 888.

9.- J. M. Domínguez-Vera et al. *Nanotechnology*, 19, **2008**, 025302 (3pp)

10.- (a) Tominaga M, Soejima K, Matsumoto M y Taniguchi I, *J. Electroanal. Chem.* **2005**, 579, 51. (b) Xu D, Watt G D, Harb J. N. y Davis R. C. *Nano Lett.* **2005**, 5, 571.

11.- Natividad Gálvez, Belén Fernández, Julia Morales, Francisco Santoyo, Rafael Cuesta, Ruperto Bermejo, José M. Domínguez-Vera. *Solid State Science.* **2008**, 1-6.

12.- (a) D. J. Birkett, N. C. Price, G. K. Radda, A. G. Salmon, *FEBS Letters*, **1970**, 6, 346. (b) R. Owusu-Apenten, *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* **2005**, 45, 1. (c) M. Ahnoff, I. Grundevik, A. Arfwidsson, J. Fonselius, B. A. Persson, *Anal. Chem.* **1981**, 53, 481. (d) S. Uchiyama, T. Santa, N. Okiyama, T. Fukushima, K. Imai, *Biomed. Chromatogr.* **2001**, 15, 295.

13.- C. Aoyama, T. Santa, M. Tsunoda, T. Fukushima, C. Kitada, K. Imai, *Biomed. Chromatogr.* **2004**, 18, 630.

14.- L. Johnson, S. Lagerkvist, P. Lindroth, M. Ahnoff, K. Martinsson, *Anal. Chem.* **1982**, 54, 939

15.- T. W. Houk, M. Ovnicek, S. Karipides, *J. Biol. Chem.* **1983**, 258, 5419.

16.- C. M. Soto, A. Szuchmacher, G. J. Vora, N. Lebedev, C. E. Meador, A. P. Won, A. Chatterji, J. E. Johnson, B. R. Ratna, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 5184.

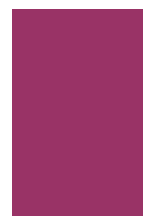
---

17.- Belén Fernández, Natividad Gálvez, Purificación Sánchez, Rafael Cuesta, Ruperto Bermejo, José M. Domínguez-Vera. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, **2008**, 13, 349-355.

18.- Invitrogen detection technologies. Molecular Probes. Amino Reactives Probes. Alexa Fluor Succidimyl Esters.

19.- Elizabeth S. Barret, Trevor J. Dale, and Julios Rebek, Jr. *J.Am.Chem.Soc.* **2007**, doi.10.1021/ja0700956.

20.- (a) B. Webb, J. Frame, Z. Zhao, M. L. Lee, G. D. Watt. *Arch. Biochem. Biophys.* **1994**, 309. 178-183. (b) José. M. Domínguez-Vera. *Inorg. Chem.* **2003**, 42, 6983.





## 5. MODIFICACIÓN DEL NÚCLEO METÁLICO DE LA FERRITINA

Son numerosos los procedimientos de síntesis, tanto físicos como químicos, que se han desarrollado en las últimas décadas para la síntesis de nanopartículas, con el propósito general de controlar sus propiedades. Algunos de los puntos importantes que debemos tener en cuenta en el procedimiento de la síntesis son: <sup>1</sup>

- Control de la distribución de las nanopartículas (uniformidad) y control del tamaño de las partículas ¿Pueden ser sintetizadas nanopartículas monodispersas? ¿Podemos controlar el tamaño de las nanopartículas de manera reproducible?
- Cristalinidad y estructura cristalina. ¿Podemos obtener materiales con un grado satisfactorio de cristalinidad y la estructura cristalina deseada?



- Control de la forma. ¿Podemos sintetizar nanopartículas no esféricas y anisotrópicas?
- Ordenamiento de las nanopartículas en substratos.
- Control de la agregación de las nanopartículas.
- Control y flexibilidad de la composición química de las nanopartículas.

Son muchos los métodos químicos empleados en la síntesis de materiales nanoestructurados. Se pueden sintetizar partículas de un rango de tamaño comprendido entre la escala nanométrica y la micrométrica, por control durante la síntesis mediante el uso de competidores entre la nucleación y el crecimiento. En general, el tamaño de las nanopartículas puede ser controlado por ajuste de los distintos parámetros de reacción, como son el tiempo de reacción, la temperatura, la concentración de los reactivos y la estabilización del surfactante.

De entre los numerosos métodos de preparación de nanopartículas que se encuentran en la bibliografía, cabe citar: <sup>2</sup>

- Coprecipitación. Los primeros intentos de sintetizar nanopartículas se realizaron mediante este proceso, la coprecipitación de productos desde soluciones acuosas seguida de una descomposición térmica de estos productos. (a) *Precipitación de metales por descomposición de precursores organometálicos*. Es el método más antiguo que se conoce en la preparación de metales coloidales. Se ha logrado la síntesis de nanopartículas esféricas monodispersas (2 nm) de Fe a partir de la descomposición termal de un precursor organometálico, en concreto el  $[\text{Fe}(\text{CO})_5]$  en presencia de un surfactante, el óxido de trioctilfosfina (TOPO). (b) *Precipitaciones controladas*. Los reactivos se mezclan a temperatura ambiente, la mezcla resultante de la reacción se calienta

suavemente para generar los núcleos metálicos de manera controlada. Posteriormente el crecimiento de las partículas ocurre por la adición de especies reactivas. El tamaño de la partícula puede ser también incrementado por procesos de “Oswalt ripening” al aumentar la temperatura, en el que las nanopartículas de menor tamaño se redisuelven y se depositan sobre las nanopartículas de mayor tamaño. El crecimiento de las nanopartículas se puede detener por disminución de la temperatura de reacción. (c) *Precipitación de metales por reducción*. La precipitación de metales desde soluciones acuosas o no acuosas requiere la reducción química del catión metálico. Se pueden usar distintos tipos de reductores como el  $H_2$ , el citrato sódico o el borohidruro sódico ( $NaBH_4$ ) (d) *Precipitación de metales por reducción electroquímica*. No es un método muy utilizado. Implica la reducción de la disolución aniónica del metal a la sal metálica intermediaria en el cátodo. Dicha reducción debe ser llevada a cabo en presencia de un estabilizador para prevenir que las partículas se depositen sobre el cátodo. Mediante este método Reetz<sup>3</sup> obtuvo partículas de Pd de  $\approx 4.8$  nm, que tras la reducción ( $0.1$  mA/cm<sup>2</sup> y 1V) se recuperaron por decantación y se resuspendieron en tetrahidrofurano o tolueno. (e) *Precipitación de metales por reducción mediante radiación*. El ejemplo más obvio es la fotoreducción de soluciones acuosas de  $AgNO_3$  bajo la exposición de luz UV (243 nm) y en presencia de poli(N-vinilpirrolidona) (PVP) como estabilizador. Todos los metales nobles y un gran número de iones metálicos de potencial de reducción muy negativo pueden ser reducidos en solución acuosa bajo la exposición de radiaciones- $\gamma$ .

· Procesos de Sol-Gel. Este proceso se caracteriza por una serie de pasos: Inicialmente se sintetiza una solución estable que se usa como precursor (sol). Posteriormente se obtiene el gel mediante reacciones de poliesterificación o policondensación, incrementando la viscosidad de la solución. A través de un proceso denominado “Syneresis”, el gel se



transforma en una masa sólida, mediante reacciones de policondensación. El gel se lleva a secado, en este paso se elimina el agua y los líquidos volátiles, y posteriormente se deshidrata, se eliminan los grupos OH<sup>-</sup> de la superficie, estabilizando así el gel frente a la rehidratación. Finalmente se descompone el gel a altas temperaturas ( $T > 800^{\circ}\text{C}$ ).

- Microemulsión reversa. El pequeño tamaño de las micelas reversas permite que estén en un continuo movimiento Browniano, lo que favorece la colisión entre ellas: una de cada mil de estas colisiones resulta en la formación de un dímero con una vida media de  $\approx 100$  ns, tiempo en el cual puede intercambiarse el material que hay en el interior de cada una de estas micelas, ya que se forma un equilibrio que favorece la distribución del contenido. Cuando una de las micelas contiene una disolución de una sal metálica y se adiciona otra micela que posee un agente reductor, los cationes metálicos serán reducidos a estado metálico ( $M^0$ ). Este proceso ha sido extrapolado para la formación de partículas de derivados del azul de Prusia mediante reacción de dos microemulsiones que contienen dos “building blocks” metálicos pertinentes.<sup>4,5</sup>

- Procesos Hidrotermales/Solvotermiales. Los disolventes se llevan a temperaturas cercanas a las de su punto de ebullición. En estas condiciones de temperatura y alta presión el disolvente pasa a estar en estado supercrítico, en el cual posee propiedades intermedias entre el estado gas y líquido, lo que incrementa la solubilidad y reactividad de los metales.

- “Templated Synthesis”. Esta técnica se utiliza generalmente para aumentar el tamaño medio de las nanopartículas, ya que se usa como base una partícula ya existente y sobre esta se genera la nueva partícula. Un ejemplo es la deposición de  $\text{Au}^{3+}$  sobre partículas de Au coloidal o  $\text{Ag}^+$

sobre partículas coloidales de Ag. Este método también se puede usar en la síntesis de estructuras del tipo “core-shell” u “onion structures”.

- Biomimética. En este procedimiento se usan biomoléculas cuyas propiedades físicas, químicas y estructurales permiten la generación de materiales o partículas a escala nanométrica.

Nos basamos en este último procedimiento de la biomimética, en particular en el uso de la cavidad hueca de la proteína apoferritina, para la formación de nanopartículas metálicas no agregadas y solubles en agua, puesto que un ejemplo típico de este tipo de moléculas es la *ferritina*.<sup>6</sup> Este procedimiento nos permite mantener un control de la homogeneidad del tamaño y la forma de las nanopartículas, ya que las nanopartículas se encapsulan en la cavidad interna de la proteína, por lo que adquirirán la forma y tamaño propios de la misma, a su vez evita la aglomeración de las nanopartículas metálicas, puesto que las capas orgánicas actúan de separadores entre los núcleos metálicos vecinos, y ofrece una amplia flexibilidad para poder preparar nanopartículas de composición química variada con diversos fines.

Las primeras aproximaciones que se realizaron en este sentido fueron el uso de la apoferritina como nanoreactor para la síntesis de nanopartículas del tipo óxidos e hidróxidos metálicos mediante reacciones de hidrólisis oxidativa, siguiendo lo que se puede considerar una síntesis biomimética, puesto que se opera de la misma forma que en el proceso natural que da lugar a ferritina a partir de apoferritina.<sup>7</sup> Los siguientes progresos en este sentido se basan en la alta afinidad que poseen algunos metales para introducirse y alojarse en la cavidad de la apoferritina generando nanopartículas metálicas del tamaño de la cavidad interna de la apoferritina al reaccionar los iones metálicos encapsulados en dicha cavidad con un agente reductor apropiado.<sup>8</sup> Douglas y Ripoll (1998) hicieron varios estudios del potencial electrostático de la apoferritina y concluyeron que hay un gradiente de potencial negativo hacia el interior de la cavidad de la apoferritina, lo



que explica la facilidad de algunos cationes metálicos para encapsularse en dicha cavidad.

## **5.1. Ruta para la modificación interna del núcleo metálico de la ferritina.**

### **Síntesis de nanopartículas de Cu.**

Gerald Watt y col. demostraron que la cavidad interna de la apoferritina tiene la capacidad de albergar iones metálicos en su interior, ya que posee ciertos sitios con afinidad para la unión de iones, con una estequiometría no superior a 60 átomos por apoferritina trabajando a un pH fisiológico, cercano a 7.4.<sup>9</sup> Posteriormente se demostró que el número de iones metálicos que pueden ser albergados en la cavidad de la apoferritina para su posterior mineralización puede ser incrementado al trabajar en condiciones de pH más básico, sintetizándose así numerosas nanopartículas metálicas de Fe, Mn, U, Co, Ni y Cu.<sup>10</sup>

Por tanto el método que ha desarrollado nuestro grupo para la síntesis de las partículas metálicas está basado en el hecho de que la apoferritina estabiliza iones metálicos en su interior.<sup>11</sup>

La apoferritina comercial de bazo de caballo se incubó con EDTA (10 mM) durante 1 h y se cromatografió (Sephadex G-25) con el fin de purificar la proteína. Posteriormente la apoferritina se incubó con el ión metálico,  $\text{Cu}^{2+}$ , a pH 8 durante 24 h. Se obtuvo una disolución azul que se dializó exhaustivamente frente a agua bidestilada y posteriormente se cromatografió por cromatografía de exclusión de tamaño (Sephadex G-25). A las fracciones de la cromatografía que contenían la proteína y el  $\text{Cu}^{2+}$ , se le adicionó un agente reductor. La adición del agente reductor,  $\text{NaBH}_4$ , produjo un viraje del color de la solución de azul a negro debido al paso del  $\text{Cu(II)-ApoFt}$  a  $\text{Cu(0)-ApoFt}$ . La disolución final fue dializada frente a agua bidestilada y a 4°C.

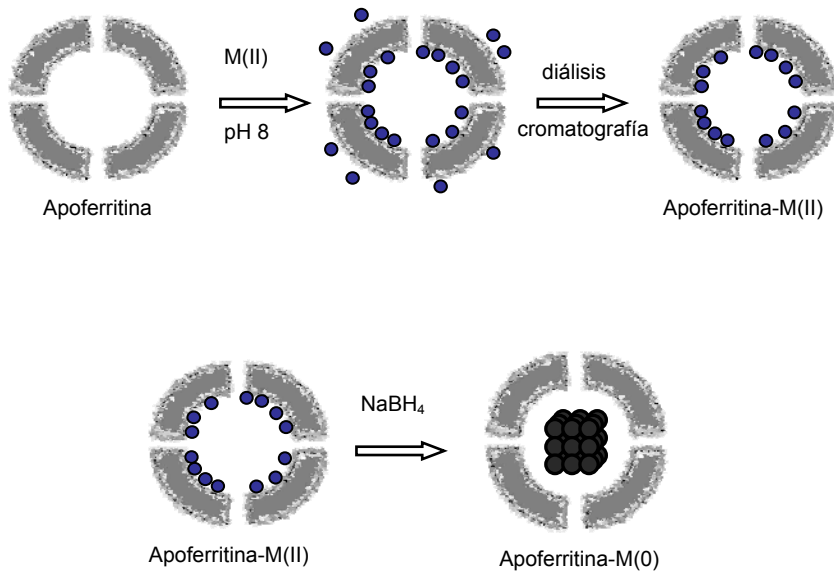


Figura 5.1. Método general para la modificación del material interno de la apoferritina

La concentración de apoferritina se calculó por el valor de absorbancia recogido a 280 nm en el espectro UV-Vis y la concentración de Cu se analizó por absorción atómica (AAS), obteniéndose así las curvas de coelución de la figura 5.2

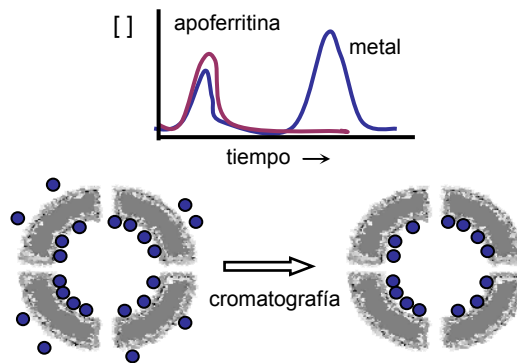


Figura 5.2. Perfil general de coelución en una columna de cromatografía Sephadex G25

La coelución de la apoferritina y el metal (figura 5.3. A), demuestra que los iones metálicos de Cu(II) se encuentran unidos a la apoferritina. En este sentido los estudios de electroforesis nativa en gel de poliacrilamida (PAGE) (figura 5.3. B) muestran una coelución entre la apoferritina y el metal. La comigración entre las muestras estudiadas por PAGE, (apoferritina nativa y Cu(II)-ApoFt) indican, en un primer lugar, que la estructura de la proteína permanece intacta tras la incubación de la apoferritina con los iones metálicos, Cu(II), y en segundo lugar, pone de manifiesto que los iones metálicos están encapsulados en la cavidad interior, ya que se muestra un comportamiento electroforético similar entre la apoferritina nativa y la apoferritina dopada con iones metálicos (Cu(II)-ApoFt).

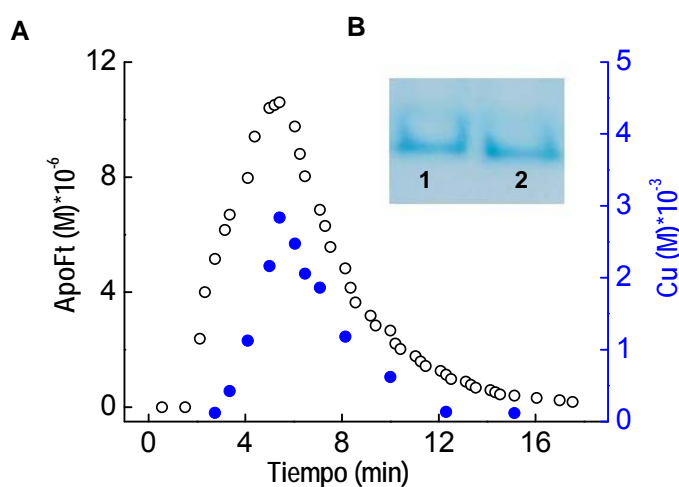


Figura 5.3. (A) Perfil de colección de Cu(II)-ApoFt monitorizando la apoferritina por espectroscopia UV-Vis a 280 nm (puntos blancos) y el Cu por AAS (puntos azules), (B) Movilidad electroforética de la apoferritina nativa (carril 1) y Cu(II)-ApoFt (carril 2).

A partir de los estudios de AAS y espectroscopia UV-Vis de las fracciones en las que coelúan la apoferritina y el Cu se obtuvo que el valor de concentración de Cu, obtenido mediante absorción atómica, fue de  $3.0 \cdot 10^{-3}$  M y la concentración de apoferritina, determinada por espectroscopia a 280 nm y considerando un coeficiente de extinción de  $\epsilon^{280} = 468000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , fue de  $1.08 \cdot 10^{-5}$  M, lo que se

corresponde con una concentración de 300 átomos de cobre por molécula de apoferritina.

Las fracciones que contenían la apoferritina y el metal que fueron reducidas con el  $\text{NaBH}_4$  mostraron un cambio en su espectro UV-Vis debido a la presencia de la típica banda de plasmones a 570 nm (surface plasmon resonance, SPR) presente en las nanopartículas de cobre metálico lo que se puede observar en la figura 5.4.

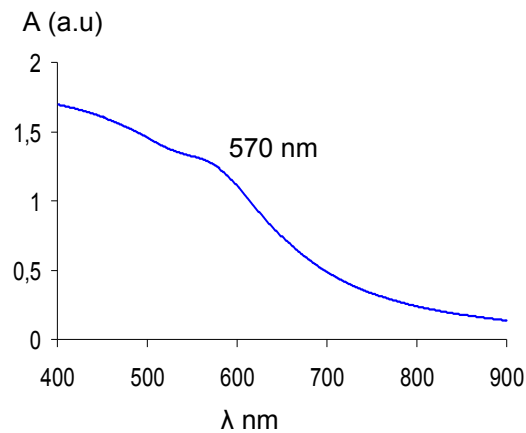


Figura 5.4. Espectro UV-vis de la formación de las nanopartículas Cu, mostrando la SPR característica a 570 nm.

Por tanto, este nuevo procedimiento desarrollado en nuestro grupo pone de manifiesto que la apoferritina actúa como nanorreactor en la síntesis de nanopartículas metálicas de valencia cero. Es capaz de encapsular los iones metálicos,  $\text{M(I)}$  o  $\text{M(II)}$ , los cuales posteriormente mediante una reacción química con un agente reductor adecuado, lo suficientemente pequeño como para atravesar los canales de la apoferritina, generarán las nanopartículas metálicas encapsuladas en la apoferritina,  $\text{M(0)-ApoFt}$ .

La principal ventaja que ofrece el protocolo de síntesis de nanopartículas desarrollado en nuestro grupo recae en que somos capaces de aislar las

fracciones que contienen el ión metálico encapsulado en la apoferritina (M(II)-ApoFt), que en un segundo paso actuarán como nanoprecusores de las nanopartículas metálicas de valencia cero encapsuladas en la apoferritina (M(0)-ApoFt), evitando así la precipitación del ión metálico que no haya sido encapsulado en la apoferritina

Para conocer la estabilidad del intermediario que se formaba en el procedimiento de síntesis, se incubaron las fracciones de Cu(II)-ApoFt con un reactivo específico para detectar la presencia de iones de Cu(II), el TTMAPP, (tetra-*p*-tosilato de 5,10,15,20-tetrakis (4(trimetilamino) fenil)-21H,23H-porfirina). La incubación se realizó a dos temperaturas, 25 y 40 °C, y la formación del complejo Cu(II)-TTMAPP se siguió mediante espectroscopia UV/Vis a 432 nm durante todo el transcurso de la reacción, usando como control una disolución de Cu(II)-ApoFt idéntica a la utilizada para la preparación de la muestra. Se realizaron 20 ciclos, uno cada 10 minutos, que no mostraron cambios significativos con respecto al de partida, ya que la banda característica debida a la formación del complejo TTMAPP-Cu(II) a 432 nm no incrementó con el tiempo. Lo que nos indicó que el Cu encapsulado en la apoferritina no se libera con el tiempo y permanece estable, e igualmente pudimos demostrar que obtenemos un sistema limpio en el cual no hay iones metálicos de Cu(II) libres.

Las imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de la disolución precursora, Cu(II)-ApoFt, mostradas en la figura 5.5 confirman la presencia de partículas metálicas de tamaño medio (tamaño aproximado de 3.5 nm ± 0.5) relativamente homogéneo. El tamaño medio de las partículas y la desviación estándar se calculó mediante el análisis de 100 partículas en TEM. Es importante remarcar que los núcleos metálicos están perfectamente aislados y no forman agregados, lo que se observa claramente en la imagen de microscopía (figura 5.5 A y D). Al contrastar la capa proteica de la ferritina con acetato de uranilo se pone de manifiesto como efectivamente la partícula metálica está

encapsulada en la cavidad interna de la ferritina, ya que la estructura de la capa proteica se mantiene intacta tras la modificación del material interno de la ferritina.

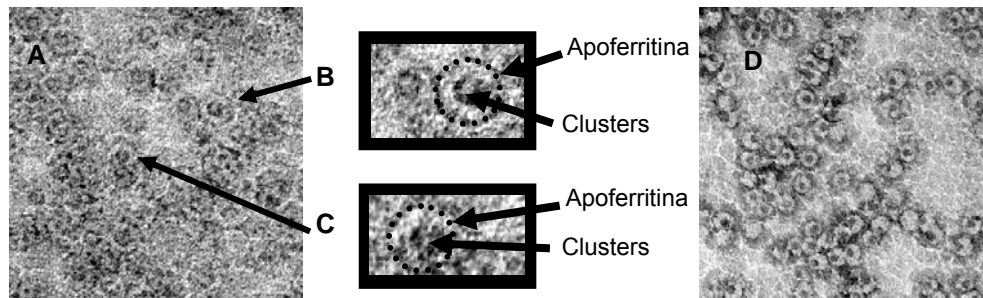


Figura 5.5. Micrográficas de TEM (A) nanopartículas Cu(II)-ApoFt; (B) y (C) zoom de la imagen (A) donde se observan más claramente la capa orgánica de la apoferritina y los pequeños clusters de Cu (D) nanopartículas Cu(0)-ApoFt.

También es remarcable que las nanopartículas Cu(II)-ApoFt (figura 5.5 A) presentan un menor contraste en las imágenes de microscopía que las de Cu(0)-ApoFt (figura 5.5 D), aunque sí son evidentes los cluster de Cu que se forman en las nanopartículas de Cu(II)-ApoFt (figura 5.5 B y C), lo que se corroboró mediante EDX (energy dispersive spectroscopy) de las nanopartículas de Cu(II)-ApoFt y Cu(0)-ApoFt confirmando la presencia de Cu encapsulado en la apoferritina, mientras que no se observó Cu no encapsulado.

Con la idea de obtener más información de cómo se encuentra dispuesto el ion metálico Cu(II) en las nanopartículas de Cu(II)-ApoFt así como el Cu(0) en las nanopartículas de Cu(0)-ApoFt, se hicieron análisis de SAXS (small angle X-ray scattering), EXAFS (Extended X-ray Absorption Fine Structure) y XANES (X-ray Absorption Near Edge Structure). Estos análisis se realizaron en colaboración con el Dr. Marcelo Ceolín, en la estación experimental Synchrotron Light National Laboratory (LNLS), Campinas, Brasil.



En la figura 5.6 se muestran las curvas PDF, obtenidas al tratar los datos obtenidos en SAXS mediante la transformada de Fourier,<sup>12</sup> para las nanopartículas de Cu, (Cu(II)–ApoFt y Cu(0)–ApoFt) así como para la apoferritina y ferritina que se usaron como controles. Las curvas PDF se encuentran en un rango de  $R$  de 0-120 Å, siendo la distancia máxima  $D_{\text{máx}} \approx 120$  Å, lo que teóricamente se corresponde el diámetro de las nanopartículas.

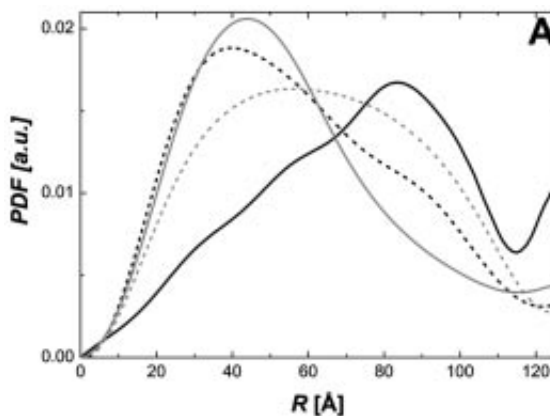


Figura 5.6. Curvas PDF de los datos de SAXS para la apoferritina (línea negra), ferritina (línea gris), Cu(0)-ApoFt (línea discontinua negra y círculos blancos) y Cu(II)-ApoFt (línea discontinua gris y círculos negros).

La curva PDF de la apoferritina presenta un máximo a altos valores de  $R$ , 80-100 Å, como se esperaba debido a su conformación de esfera hueca (hollow shell sphere). Las curvas PDF para estructuras del tipo core-shell, como es el caso de la ferritina, se pueden dividir en dos regiones, una primera región situada por debajo de  $D_{\text{máx}}/2$ , donde el PDF está dominado por  $\Delta\rho$  (variación de la electrodensidad), lo que se corresponde con la región central de la nanopartículas, es decir el core, y una segunda región por encima de  $D_{\text{máx}}/2$ , donde la curva está dominada por los valores iniciales de  $\Delta\rho$  correspondientes a la capa orgánica, shell. En el caso de la apoferritina, la zona de la curva PDF inferior a  $D_{\text{máx}}/2$  es significativamente menor que el área que se encuentra por encima de  $D_{\text{máx}}/2$ , lo que sugiere que el valor de  $\Delta\rho$  para la capa orgánica es mayor que para el núcleo.

En contraste, en la curva PDF para la ferritina el máximo se desplaza a menores valores de  $R$  (inferiores a  $D_{\text{máx}}/2$ ), debido a la presencia de un núcleo metálico más electrodenso que la capa orgánica.

En el caso de las nanopartículas de Cu(0)–ApoFt la curva PDF es muy similar a la correspondiente a la ferritina, ambas curvas tienen una forma similar, lo que indica que los dos tipos de nanopartículas (ferritina y Cu(0)–ApoFt) presentan una estructura del tipo core-shell con un núcleo metálico con una alta densidad electrónica y el máximo de las dos curvas más o menos coincide, lo que indica que el core de Cu(0) se dispone en el centro de la cavidad de la apoferritina.<sup>13</sup> Este resultado corrobora los datos obtenidos por TEM, que indican la presencia de un núcleo metálico compacto más electrodenso, en el interior de la cavidad de la apoferritina, recubierto por la capa orgánica que posee una menor densidad electrónica. Cuando analizamos la curva PDF de las nanopartículas Cu(II)–ApoFt, observamos que posee características intermedias entre las de la ferritina y la apoferritina, lo que podría ser explicado por la presencia de un núcleo metálico de menor electrodensidad (con valores de densidad electrónica similares a los de la capa orgánica). Este aspecto también es coherente con la imagen TEM, donde se aprecian clusters metálicos “pegados” a la capa orgánica de la cavidad interna.

La alta sensibilidad de la técnica de espectroscopia XANES nos permitió obtener información sobre el estado de oxidación y la naturaleza química de las nanopartículas de Cu(II)-ApoFt. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 5.7, junto con el espectro obtenidos para el Cu metálico y Cu(OH)<sub>2</sub> utilizados como materiales de referencia. Tanto la forma como la estructura de los espectros indican claramente que los átomos de Cu encapsulados en la apoferritina están como especies Cu en estado de oxidación II. El ajuste de los datos de XANES por mínimos cuadrados indican que el Cu(II) presente en las nanopartículas de Cu(II)-ApoFt se encuentra en forma de óxidos e hidróxidos a iguales proporciones.

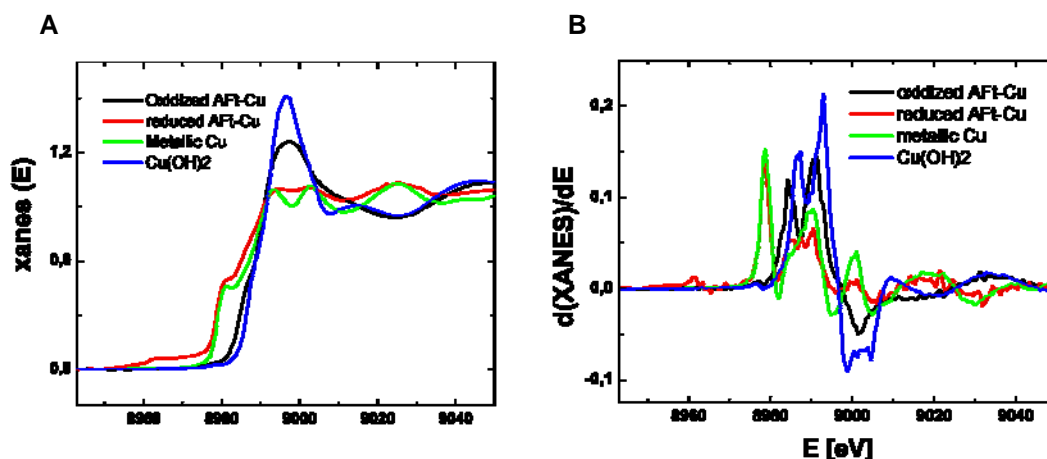


Figura 5.7. Espectro XANES (A) y su primera derivada,  $d(\text{XANES})/dE$  (B) de las nanopartículas de Cu(II)-ApoFt (línea negra), Cu(0)-ApoFt (línea roja), Cu metálico (línea verde), y Cu(OH)<sub>2</sub> (línea azul).

A pH 8 ocurre la condensación de la fase inorgánica lo que sugiere que a dicho pH el Cu(II) precipita en el interior de la cavidad apoferritina, como una mezcla amorfa de óxidos e hidróxidos de Cu(II), lo que está de acuerdo con los resultados obtenidos en XANES. Para obtener más conocimiento sobre la estructura básica del Cu(II) se ajustaron los espectros EXAFS obtenidos para las muestras de Cu(II)-ApoFt suponiendo una disposición de los ligandos de oxígeno octaédrica axial (a partir de los datos de XAS no es posible determinar si los ligandos son  $\text{O}^-$ ,  $\text{OH}^-$  ó  $\text{H}_2\text{O}$ ). Los datos de EXAFS (Tabla 1), su transformada de Fourier (FT) y las correspondientes curvas ajustadas se presentan en la figura 5.8. Estos datos representados en la figura 5.8 y los parámetros que figuran en la tabla 1 confirman nuestro modelo estructural, ya que sugieren que los iones de Cu(II) presentes en las nanopartículas de Cu(II)-ApoFt, se disponen como una colección de iones de Cu(II) coordinados por seis ligandos "oxígeno" dispuestos en una geometría octaédrica distorsionada.

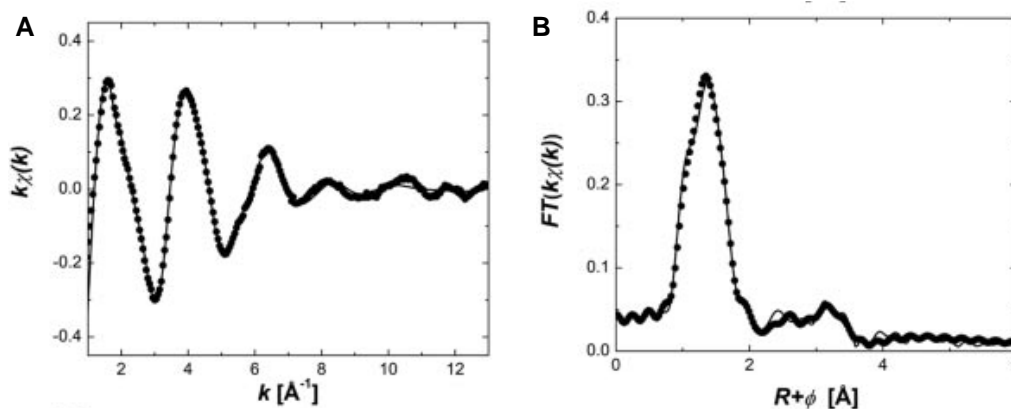


Figura 5.8. (A) Espectro EXAFS de las nanopartículas Cu(II)–ApoFt. (B) Transformada de Fourier del espectro EXAFS.

Átomo	Número de coordinación	R[Å]	$\sigma^2$ [Å <sup>-2</sup> ]
Azimutal O	4,3±0,6	1,97±0,01	1,1±0,3·10 <sup>-2</sup>
Axial O	2,2±0,3	2,34±0,03	1,5±0,4·10 <sup>-2</sup>

Tabla 1. Parámetros estructurales del ajuste del espectro EXAFS de las nanopartículas Cu(II)–ApoFt.

Como hemos explicado anteriormente la mezcla amorfa de óxidos e hidróxidos de Cu(II) albergados en la apoferritina tienen la capacidad de reaccionar con el NaBH<sub>4</sub> formando las nanopartículas de Cu(0). El espectro XANES (línea negra de la figura 5.7) obtenido en el caso de las nanopartículas de Cu(0)–ApoFt se asemeja al esperado para un cobre metálico. El desplazamiento de la curva hacia la zona del rojo en el espectro de absorción y la forma de la curva son indicativas de la presencia de especies de Cu(0), además, no se detectan especies oxidadas de Cu, lo que indica el tratamiento químico mediante el cual se reduce químicamente el Cu(II) a Cu(0) fue eficaz, confirmando que las nanopartículas de Cu reducido permanecen albergadas en el interior de la cavidad de la apoferritina. Las diferencias evidentes entre el espectro XANES de las nanopartículas de Cu(0)-ApoFt y el patrón de Cu metálico son debidas al limitado

tamaño de las nanopartículas de Cu(0)-ApoFt responsable de las oscilaciones en la forma del espectro de XANES de las nanopartículas problema frente al control.

Estos resultados nos indican que esta estrategia permite la obtención de nanopartículas de Cu albergadas en el interior de la cavidad de la apoferritina, solubles en agua y con cierto control sobre el tamaño final de las nanopartículas metálicas.

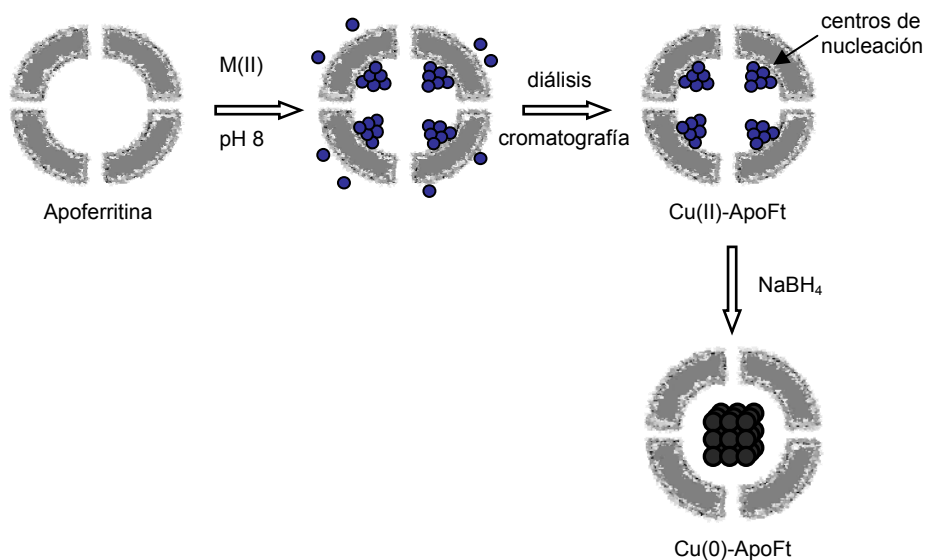


Figura 5.9. Modelo de síntesis propuesto en la síntesis de las nanopartículas de Cu-ApoFt.

Los resultados obtenidos en los experimentos de XANES y EXAFS corroboran el método propuesto para la síntesis de las nanopartículas de Cu-ApoFt (figura 5.9), en el que la apoferritina se incuba con iones de  $Cu(II)$  parte de los cuales penetran en la cavidad interna de la proteína a través de los canales hidrófilicos, formando pequeños núcleos de crecimiento de una mezcla amorfa de óxido/hidróxido de  $Cu(II)$ . Estos puntos de nucleación están formados por átomos de  $Cu$  coordinados con átomos de oxígeno mediante geometría octaédrica. Al

reducir el Cu(II) a Cu(0) los núcleos de crecimiento adheridos a la capa interna de la ApoFt se liberan y dan lugar a la formación de nanopartículas de Cu(0) en el centro de la apoferritina.



## BIBLIOGRAFÍA

---

- 1.- Taeghwan Hyeon: "Chemical synthesis of magnetic nanoparticles". *Chem. Commun.* **2003**, 927-934
- 2.- Brian L. Cushing, Vladimir L. Kolesnichenko, and Carles J. O'Connor. "Recent Advances in the Liquid-Phase Synthesis of Inorganic Nanoparticles". *Chem.Rev.* **2004**, *104*, 3893-3946.
- 3.- Reetz, M. T.; Helbig, W. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 7401.
- 4.- Sebastien Vaucher, John Fielden, Mei Li, Erik Dujardin, y Stephen Mann. *Nano Lett.*, Vol. 2, No. 3, **2002**, 225-229.
- 5.- Laure Catala, Corine Mathoniere, Alexandre Gloter, Odile Stephan, Thierry Gacoin, Jean-Pierre Boilot y Talal Mallah. *Chem. Commun.*, **2005**, 746–748.
- 6.- (a) E. X. Wu, H. Tang, K. K. Wong, J. Wang, *J. Magn. Reson. Imaging*, **19**, **2004**, 50; (b) S. H. Koenig, K. E. Kellar, *Acad. Radiol.* **3**, **1996**, 273; (c) D. K. Kim, Y. Zhang, J. Kehr, T. Klasson, B. Bjelke, M. Muhammed, *J. Magn. Magn. Mater.* **225**, **2001**, 256. (d) F. Bertorelle, C. Wilhelm, J. Roger, F. Gazeau, C. Manager, V. Cabuil, *Langmuir*, **2006**, *22*, 5385. (e) P. N. Prasad, *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **446**, **2006**, 1. (f) D. Ma, J. Guan, F. Normandin, S. Denommee, G. Enright, T. Veres, B. Simard, *Chem. Mater.* **18**, **2006**, 1920.
- 7.- (a) Y. Li, W. Kim, D. Wang, H. Dai, *Appl. Phys. A. Mater. Sci. Process.* **74**, **2002**, 325; (b) M. Allen, D. Willits, M. Young, T. Douglas, *Inorg. Chem.* **42**, **2003**, 6300; (c) M. Okuda, K. Iwahori, I. Yamashita, Y. Zhang, H. Yoshimura, *Biotechnol. Bioeng.* **84**, **2003**, 187; (d) K. K. W. Wong, S. Mann, *Adv. Mater.* **8**, **1996**, 928.
- 8.- N. Galvez, P. Sánchez, J. M. Dominguez-Vera, *Dalton Trans.* **2005**, 2492.

- 
- 9.- S. Pead, E. Durrant, B. Webb, C. Larsen, D. Heaton, J. Johnson y G. D. Watt, *J. Inorg. Biochem.*, **1995**, 59, 15.
- 10.- (a) T. Douglas, in *Biomimetic Materials Chemistry*, ed. S. Mann, Wiley, New York, **1996**, p. 91; (b) T. Douglas y V. T. Stark, *Inorg. Chem.*, **2000**, 39, 1828; (c) K. K. W. Wong, T. Douglas, S. Gider, D. D. Awschalom y S. Mann, *Chem. Mater.*, **1998**, 10, 279. (d) M. Okuda, K. Iwahori, I. Yamashita and H. Yoshimura, *Biotechnol. Bioeng.*, **2003**, 84, 187.
- 11.- (a) Natividad Gálvez, Purificación Sánchez, José. M. Domínguez-Vera, Alejandra Soriano-Portillo, Miguel Clemente-León, Eugenio Coronado. *J. Mater. Chem.*, **2006**, 16, 2757–2761. (b) Miguel Clemente-León, Eugenio Coronado, Alejandra Soriano-Portillo, Natividad Gálvez, José. M. Domínguez-Vera. *J. Mater. Chem.*, **2007**, 17, 1–4.
- 12.- D. Svergun, *J. Applied Crystallography* **1992**, 25, 495–503.
- 13.- O Glatter and O Kratky, *Small Angle X-ray Scattering*, Academic Press, London, **1982**, p. 181.



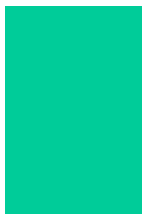




## 6. MODIFICACIÓN INTERNA Y FUNCIONALIZACIÓN

La integración de la Nanotecnología en la Biotecnología ha hecho florecer una nueva disciplina: la Nanomedicina. En este campo, se diseñan y preparan nanopartículas metálicas para obtener bioimágenes mediante el uso simultáneo de varias técnicas, distribución efectiva de fármacos o técnicas de terapias tan prometedoras como la hipertermia originada localmente por nanopartículas magnéticas. Es un área de tremendo potencial sujeta al desarrollo de nuevas nanoestructuras para su avance, como se comentó en el Capítulo de Introducción de esta Tesis.

Las nanopartículas magnéticas han atraído atención principalmente por su uso potencial como agentes de contraste en MRI. Esta técnica se basa en la resonancia magnética de los protones de tejidos del cuerpo (agua, membranas, lípidos, proteínas, etc.) y actualmente es el método más potente de diagnóstico. El contraste en MRI puede mejorarse con sustancias paramagnéticas. La capacidad de un compuesto para incrementar la velocidad de relajación de los espines de



protón de las moléculas de agua del entorno se llama relajación y se representa como  $r1 \sim 1/T1$  o  $r2 \sim 1/T2$  (Capítulo 2). Las nanopartículas superparamagnéticas son candidatos para actuar como agentes de contraste en MRI.<sup>1</sup> Al igual que las sustancias paramagnéticas, pierden su magnetización cuando se elimina el campo magnético externo, pero a diferencia de éstas, su magnetización es sensiblemente mayor. Por lo tanto, la relajación que producen es mucho más alta que la de los clásicos complejos paramagnéticos de Gd(III). El efecto de las nanopartículas superparamagnéticas se puede describir en base a la heterogeneidad del intenso campo magnético que afecta a los protones del alrededor, induciendo un desfase del momento magnético y dando lugar a un acortamiento del tiempo de relajación  $T2$ . De este modo, las nanopartículas superparamagnéticas son unos buenos candidatos para el desarrollo de nuevos agentes de contraste, permitiendo una detección temprana de patologías severas y de gran impacto social.

Por otro lado, los denominados quantum dots (QDs), han sido usados con éxito como nuevos marcadores fluorescentes en el campo biomédico y son considerados como una herramienta prometedora en "Optical Imaging" para diagnóstico clínico.<sup>2</sup> Los QDs son nanopartículas inorgánicas, generalmente compuestas de elementos de los grupos 2-6 y 3-5, los cuales, debido a su confinamiento cuántico de cargas en un diminuto espacio muestran unas propiedades fluorescentes únicas: espectros de emisión estrechos, rendimiento cuántico alto, espectros de absorción anchos, buena estabilidad química, alta fotoestabilidad y longitud de onda de emisión dependiente del tamaño, ampliando su rango de emisión y ofreciendo una mayor penetración en tejido para una mejor imagen.

Un enfoque dentro de la nanomedicina es el uso de nanopartículas que puedan combinar diferentes técnicas de bioimagen. Cada modalidad de bioimagen tiene sus propios méritos pero también ciertas desventajas y por lo tanto los métodos de imagen bimodales presentan mayor capacidad para obtener una imagen integral y más detallada. La combinación MRI-OI es un buen ejemplo de

un método bimodal y una ruta para su consecución es el uso de nanoestructuras que contengan dos componentes metálicos, uno magnético y otro fluorescente: nanopartículas bifuncionales magneto-fluorescentes.<sup>3</sup>

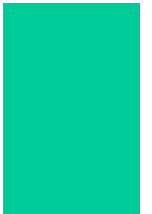
Si además estas nanoestructuras bifuncionales son solubles en agua el interés es aún mayor, ya que este es un requisito indispensable para las aplicaciones biomédicas. A pesar de su gran interés se conocen muy pocos ejemplos de nanoestructuras, con esta dualidad.<sup>4</sup>

La ruta más usual para la preparación de dichas nanopartículas es la introducción de grupos funcionales en la superficie de nanopartículas magnéticas sirviendo luego dichos grupos funcionales como zonas de anclaje para fluoróforos, colorantes orgánicos, vectores específicos, etc. El inconveniente habitual de esta ruta de síntesis es la baja solubilidad en H<sub>2</sub>O de las partículas obtenidas. En el caso de la ferritina, la presencia de grupos amino reactivos (residuos de lisina) en la superficie externa de la proteína nos permite modificar químicamente la partícula (apartado 1.2 del Capítulo 1).

### **6.1 . Nanopartículas decorando nanopartículas**

Entrando en la dinámica de síntesis de nanoestructuras bifuncionales, se pensó en funcionalizar la capa externa de la ferritina, a través de los grupos amino reactivos (residuos de lisina) de la superficie externa de la proteína con nanopartículas metálicas del tipo Quantum Dots (QD).

Los QDs recubiertos por grupos carboxilo que utilizamos se obtuvieron en la casa comercial Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA). Dichos QDs presentan una estructura del tipo core-shell que consiste en un corazón de un nanocrystal de material semiconductor (CdSe o CdSeTe) que presenta un ancho de banda pequeño recubierto por una corteza de otro material semiconductor (ZnS), éste con un ancho de banda mayor. Esta estructura core-shell está a su vez recubierta



por un polímero que expone hacia el exterior grupos carboxilo, lo que nos permite su funcionalización con diversas moléculas biológicas manteniendo las propiedades ópticas del core-shell semiconductor.

Se han preparado nanoestructuras bifuncionales (figura 6.1), magneto-fluorescentes, al anclar de forma covalente diversos QDs a la superficie proteica de la ferritina, cuyo núcleo como ya hemos comentado anteriormente presenta propiedades magnéticas per se. En bibliografía ya se ha reportado, con anterioridad, la importancia de las nanopartículas de ferritina en su aplicación como agentes de contraste para MRI.<sup>5</sup> De hecho la ferritina a nivel de cerebro puede ser usada por este tipo de técnicas como un agente de contraste natural, debido a la visualización de cúmulos de la misma en tejidos degenerados. Además, se ha observado que las nanopartículas (10-100 nm) se acumulan preferentemente en los sitios del tumor a través de un proceso llamado aumento de la permeabilidad y retención (EPR).<sup>6</sup>

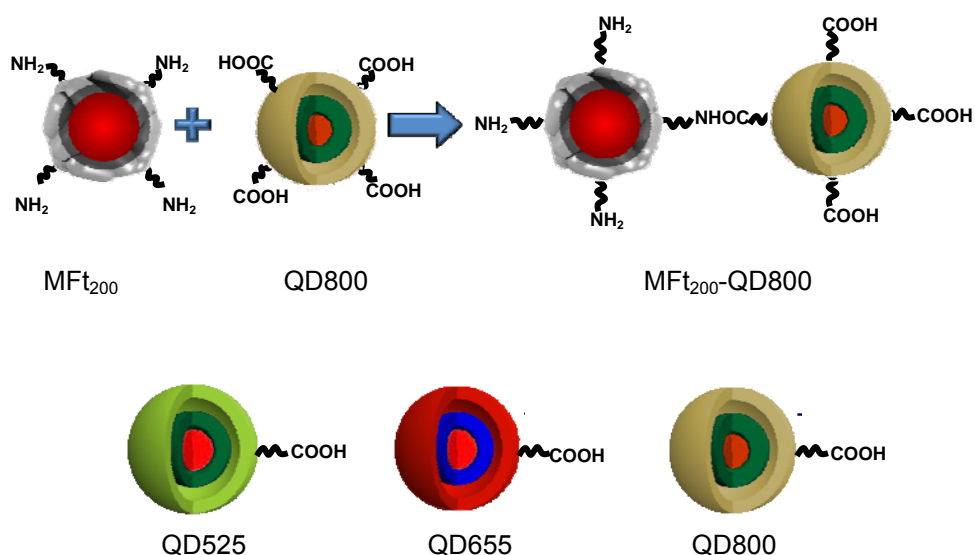


Figura 6.1. Esquema de la reacción MfT-QDs

En el caso de las nanoestructuras de Ft-QD, que aquí se exponen, hay una ventaja adicional, que es la existencia de dos tipos de nanopartículas diferentes: la ferritina, como precursora de numerosas nanopartículas metálicas y los QDs-carboxilo que permiten el marcaje de diferentes y múltiples tipos de vectores en los sistemas vivos; y sobretodo la mayor ventaja reside en que el sistema que obtenemos es soluble en agua, y mantiene las propiedades típicas que tienen cada una de las dos partículas por separado.

Dicha funcionalización se ha llevado mediante una reacción química entre los grupos COOH del QDs y los grupos aminos terminales de los residuos de lisina que presenta la ferritina en su superficie, generando así un enlace covalente del tipo amida (figura 6.1). Se han utilizado tres tipos de QDs: QD525 (verde), QD655 (rojo) y QD800 (IR) que emiten a 525 nm, 655 nm y 800 nm respectivamente, obteniendo así tres tipos de nanopartículas bifuncionales con una emisión de fluorescencia variable, que barre el espectro UV-vis hasta el IR.

Un estudio de TEM de los QDs (QD525, QD655, QD800) mostró que estos presentaban núcleos heterogéneos con diámetros medios de  $5.0 \pm 1.5$ ,  $20.0 \pm 2.0$ , y  $10.0 \pm 1.2$  nm, respectivamente (figura 6.2)

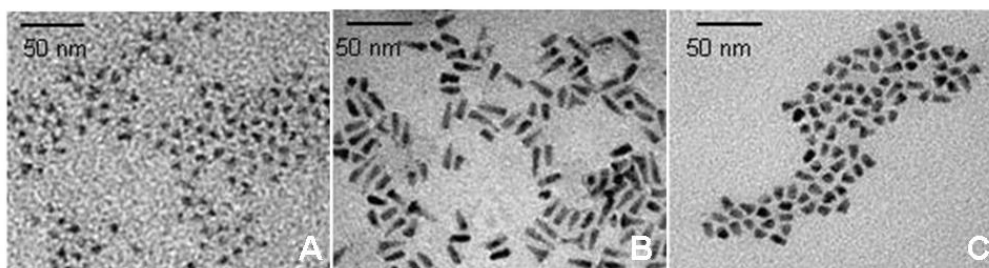


Figura 6.2. Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM Bright-Field) de los QDs: (a) QD525 (emisión a 525nm), (b) QD655 (emisión a 655nm) y (c) QD800 (emisión a 800nm)

La Ft es un ejemplo de una verdadera bionanopartícula magnética. Recientemente, nuestro grupo ha puesto de manifiesto que en realidad la estructura básica del núcleo magnético de la Ft es una estructura polifásica compuesta por una proporción de ferrihidrita, magnetita y hematites (ver el Capítulo 3). En concreto, se ha observado que con el proceso de eliminación de Fe de forma controlada, mediante reducción oxidativa, al alcanzar una concentración de Fe de  $\sim 200$  átomos de Fe por ferritina (MFt) la fase predominante parece ser la magnetita, llegando a valores cercanos del 70% de magnetita/ferritina. Estas nanopartículas de MFt presentan un alto valor de magnetización a saturación ( $M_s$ ) de  $\sim 70$  emu/gFe (cercana a la  $M_s$  de la magnetita que es de 95 emu/gFe).<sup>7,8</sup>

La MFt fue sintetizada de acuerdo con el método explicado anteriormente en el Capítulo 3.<sup>8</sup> En resumen, el hierro se eliminó de forma controlada por el procedimiento tradicional de eliminación reductiva y quelación de Fe(II). Los estudios de microscopía electrónica de transmisión (TEM) mostraron que las nanopartículas de MFt poseían un diámetro homogéneo de  $5.1 \pm 1.0$  nm. Es importante remarcar que, en estas nanopartículas en las que el contenido de Fe es menor, los núcleos metálicos son menos electrodensos y de formas más irregulares comparado con la Ft nativa, como se puede observar en la figura 6.3.

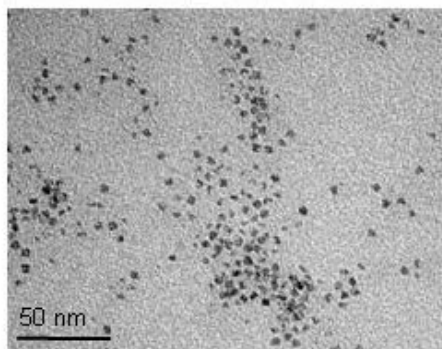


Figura 6.3 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM Bright-Field) de las nanopartículas de MFt.

Los quantum dots (QD525, QD655, QD800) como ya se ha mencionado anteriormente están recubiertos por un polímero que expone hacia el exterior grupos carboxilo que serán los que reaccionarán con el grupo amino de la ferritina. La reacción entre la MfT y el QD se llevó a cabo mediante una reacción de acoplamiento utilizando el conocido EDC (1-etil-3-[3-dimetilaminopropil] carbodiimida) como agente de acoplamiento. Para ello se incubaron 20  $\mu\text{l}$  de la solución stock del quantum dot comercial (8 mM) con 10  $\mu\text{l}$  de una disolución stock de EDC (10 mg/ml) durante 30 min. Transcurrido este tiempo se consideró que los grupos carboxilo ya estaban activados y por tanto se podía llevar a cabo la reacción con la ferritina (figura 6.4).

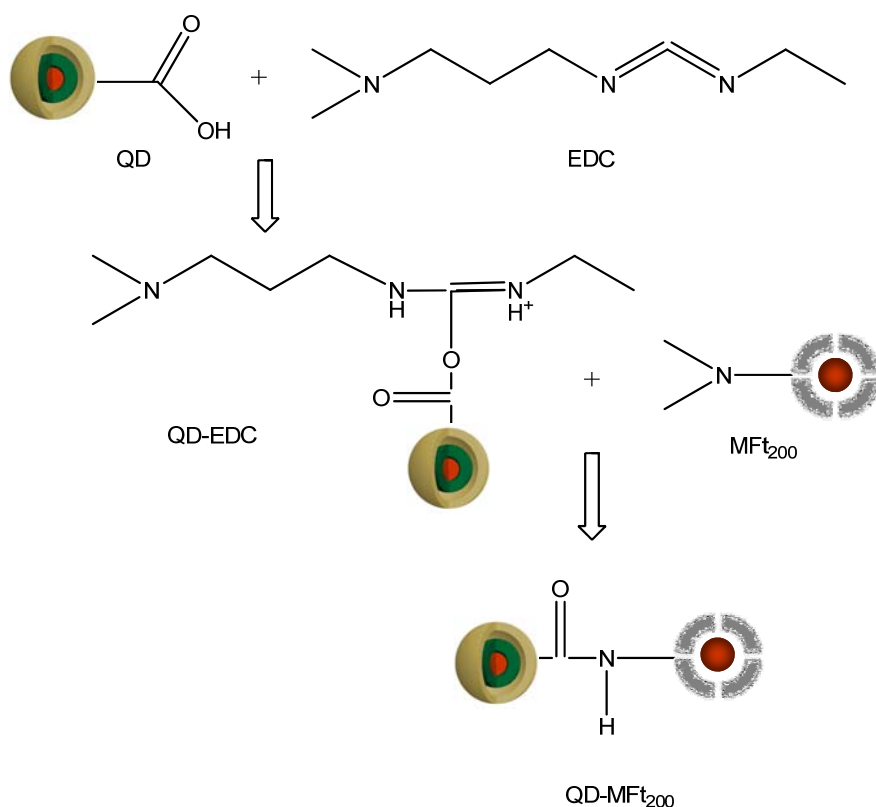


Figura 6.4. Reacción detallada de la activación del QD a través del EDC y la posterior conjugación del QD-MfT



A una disolución de MfT se le adicionó la mezcla anterior (QD+EDC) y se dejó incubando durante 24 h en agitación y a 4°C. Se trabajó en condiciones en las que la ferritina se encuentra en exceso frente al QD. Posteriormente la muestra se purificó en una columna de cromatografía por exclusión de tamaño (Sephacryl) con el fin de eliminar el exceso de producto que no hubiese reaccionado. La cromatografía muestra un perfil de coelución.

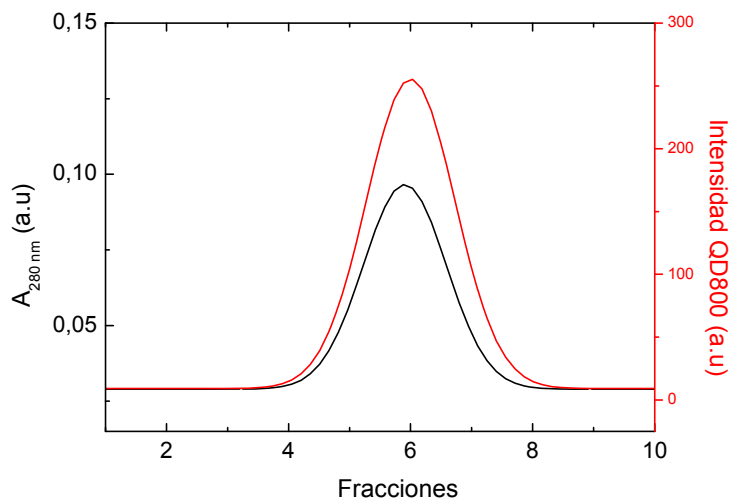


Figura 6.5. Perfil de coelución entre la MfT (valores de absorbancia a 280 nm, línea negra) y el QD800 (valores de intensidad de fluorescencia recogidos a una  $\lambda$  emisión de 800 nm al excitar el compuesto a 320 nm, línea roja)

De las fracciones de cromatografía se reservaron aquellas fracciones en las que aparecían tanto la proteína como el QD. La proteína se monitorizó por espectroscopia UV-vis a 280 nm, y los QDs se monitorizaron por espectroscopia de fluorescencia a 800 nm en el caso del QD800, 525 nm para el QD525 y finalmente a 655 nm el QD655. Dicho perfil de coelución en el caso del QD800 se muestra en la figura 6.5.

Las fracciones que presentaron coelución de la proteína y del QD se estudiaron por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones nativas de no

desnaturalización (PAGE, figura 6.6). Se usaron como controles MFt, QD525, QD655, QD800 libres y las muestras que se cargaron fueron los bioconjugados MFt-QD525, MFt-QD655, MFt-QD800. Como se puede observar en la figura 6.5, cuando la proteína está unida al QDs la movilidad electroforética del conjugado (carriles 1 y 3) es menor que la de los dos compuestos por separado (QDs y MFt, en los carriles 2 y 4 respectivamente), lo que hace que el conjugado se retrase en la electroforesis, apareciendo una banda característica del conjugado con un peso molecular de casi el doble que el de la proteína.

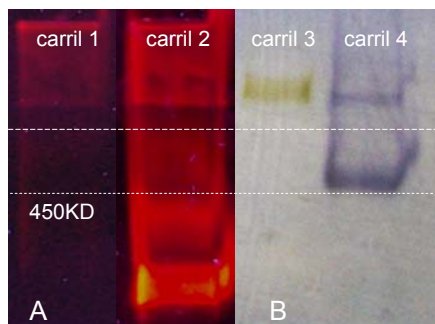


Figura 6.6. Electroforesis nativa en gel de poliacrilamida, A) imagen sin teñir bajo la lámpara UV. En el carril1 se muestra el conjugado MFt-QD655 y en el carril 2 se muestra el QD655 libre. B) Imagen de PAGE teñida con azul de Coomassie (Brilliant Blue R250), en el carril 3 se observa una única banda correspondiente al conjugado MFt-QD655 y en el carril 4 se muestra el patrón característico de la MFt, que se usa como control.

La comigración de las muestras indica, que el QD está unido a la ferritina de forma covalente y que no existe modificación alguna de la estructura cuaternaria de la proteína tras la funcionalización.

También se estudiaron las propiedades ópticas de los bioconjugados MFt-QD. Como se puede observar en la figura 6.7, las propiedades ópticas de las nanopartículas semiconductoras no se modifican tras la funcionalización, puesto que no hay modificación en el espectro de emisión ni en la intensidad de emisión.



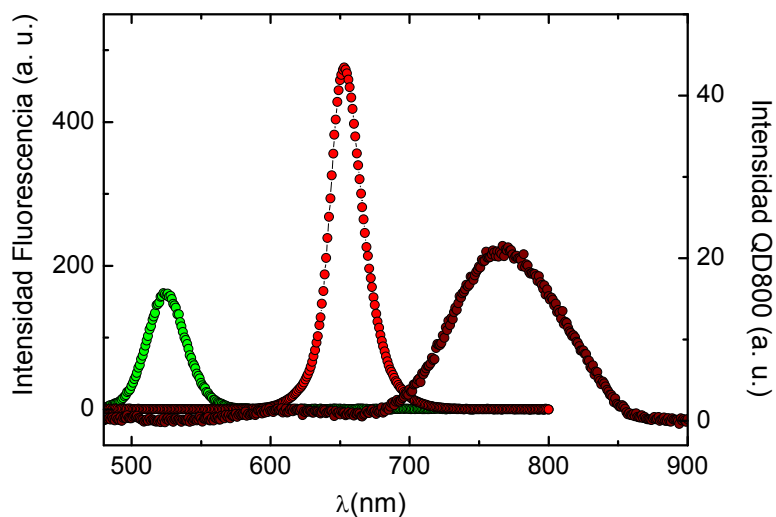


Figura 6.7. Espectro de Fluorescencia de los bioconjugados MFT-QD525 (verde), MFT-QD655 (rojo), y MFT-QD800 (vino), mostrando los picos de emisión a  $\sim 525$ ,  $\sim 655$ , y  $\sim 800$  nm, respectivamente.

Igualmente los estudios de dichos bioconjugados por microscopia confocal de fluorescencia (figura 6.8) ponen de manifiesto la alta eficiencia de dichos bioconjugados ya que mantienen su brillo y uniformidad, al igual que no presentan signos de agregación.

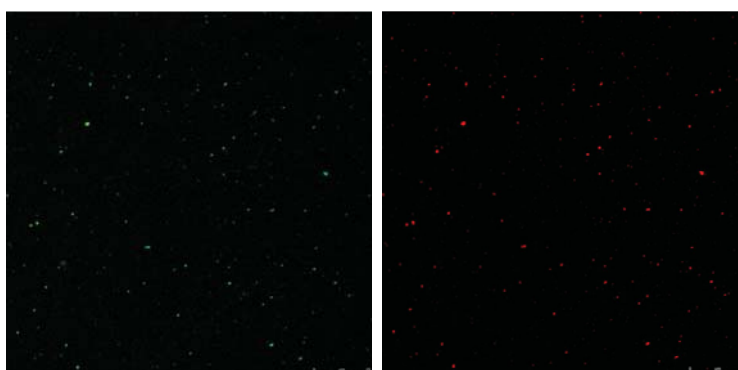


Figura.6.8. Imágenes de microscopia confocal de los bioconjugados MFT-QD655 (rojo) y MFT-QD525 (verde).

## 6.2. MFt-QD800, bimodalidad: MRI-OI.

Para los estudios in vivo de MRI-OI, se usó el QD800 que incluye Te en su composición química (CdSeTe) para ampliar la emisión a la región cercana al infrarrojo, buscando la mejora de la penetración de la radiación en los tejidos profundos,<sup>9</sup> ya que hay una ventana en la región del espectro de absorción cercana al infrarrojo que se denomina "ventana de transparencia de los tejidos" y en dicha región del espectro las moléculas biológicas (agua, hemoglobina oxigenada, hemoglobina no oxigenada, etc.) absorben menos radiación que en cualquier otra parte de la gama del espectro visible.

Los estudios de TEM de dicha muestra, MFt-QD800, indican primero, que la reacción de acoplamiento no conllevó agregación y segundo, que las partículas se disponen formando principalmente dímeros (figura 6.9).

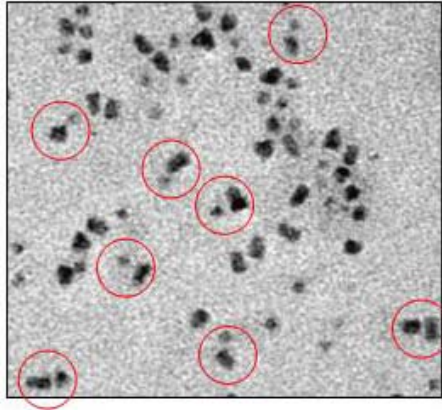


Figura 6.9. Microscopía Electrónica de Transmisión del bioconjugado. Por claridad, algunos dímeros se marcan con círculos rojos.

Las imágenes de campo oscuro en modo STEM (HAADF-STEM) confirmaron que los bioconjugados QD-MFt son principalmente dímeros (figura 6.10 A y B). La intensidad de las imágenes HAADF-STEM depende principalmente

del número atómico  $Z$  del elemento presente y el espesor de la muestra.<sup>10</sup> La imagen de HAADF-STEM del bioconjugado QD800-MFt (figura. 6.10 B) pone de manifiesto un contraste diferente entre los dos tipos de partículas, que sirve para distinguir entre ellas. Cada dímero contiene una partícula menos brillante, correspondiente a una estructura de tipo óxido de hierro con menor  $Z$ , y una más brillante, correspondiente al CdSeTe del QD. Ambas partículas se encuentran separadas entre si por una distancia de alrededor de 4-6 nm, lo que se corresponde con la suma del espesor del polímero que recubre el QD y la capa orgánica de la ferritina (MFt).

Se analizaron una serie de dímeros del bioconjugado MFt-QD800 utilizando la técnica de espectroscopia de pérdida de energía de electrones (EELS) (figura 6.10 C y D).

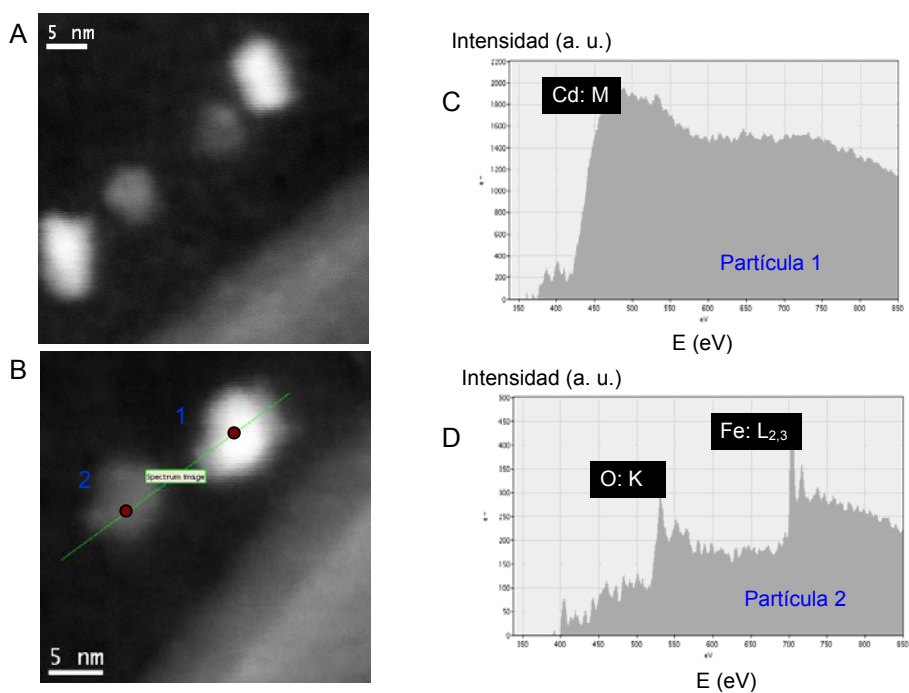


Figura 6.10. (A, B) Imágenes HAADF-STEM del QD800-MFt. Espectros EELS de cada una de las nanopartículas representando sus bordes específicos, (C) MFt (partícula 2) y (D) QD (partícula 1).

En la figura 6.10 se muestra un espectro EELS característico de cada una de las nanopartículas tomado en dos puntos concretos (figura 6.10 C y 6.10 D), la nanopartícula más oscura se corresponde con la MFt (partícula 2), cuyo espectro da un pico característico de Fe (~ 708 eV) y otro característico del O (~ 532 eV), y la otra partícula mas brillante, se corresponde con el QD (partícula 1), en cuyo espectro se localiza claramente el pico del Cd (~ 404 eV).

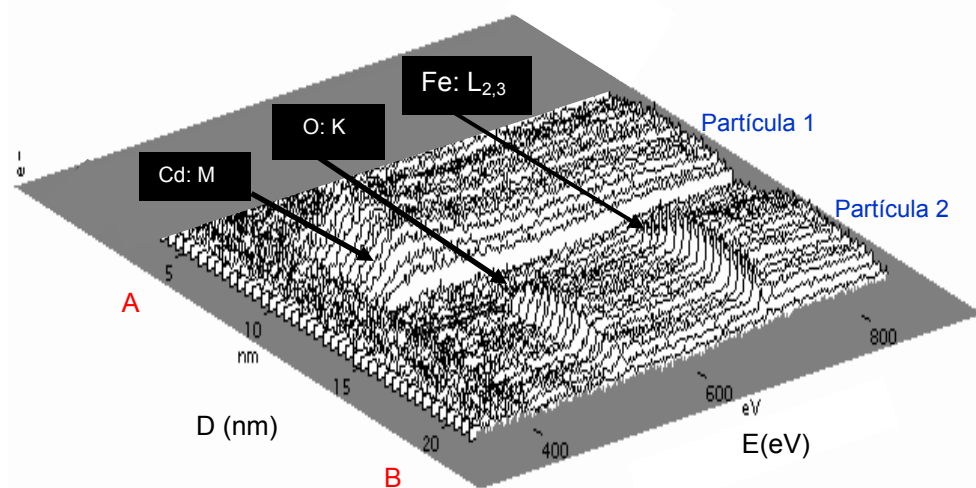
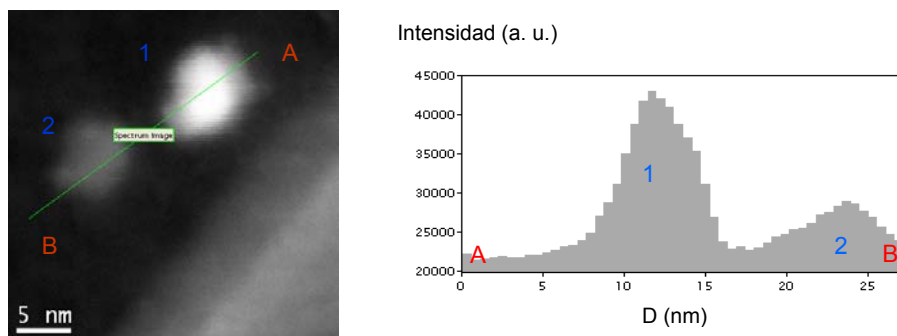


Figura 6.11 Recopilación de 50 espectros EELS a lo largo de una línea predeterminada.

En la figura 6.11 se muestra la colección de espectros EELS adquiridos a lo largo de la línea A-B, que atraviesa los dos tipos de nanopartículas. A lo largo de esta línea imaginaria, predeterminada, se recogen una serie de espectros de EELS con una sonda de unos pocos Angstroms. En este estudio, concretamente se recogieron 50 espectros con una sonda de 0.5 nm, por lo que cada punto en el que se toma un espectro dista del siguiente una distancia de 0.5 nm. Se hizo un análisis cualitativo de los elementos químicos presentes en la muestra, en donde cada una de estas partículas presenta unos bordes de ionización específicos correspondientes a sus elementos químicos mayoritarios, Fe:L<sub>2,3</sub>, O:K, para las partículas de MFt y Cd:M<sub>4,5</sub>, en el caso del QD. El tiempo de adquisición del espectro es de 1 s, ya que si el tiempo de adquisición se alarga la muestra podría resultar dañada.

La identificación de las dos partículas se hace al analizar los bordes O: K, Fe: L (partícula 2) y Cd: M (partícula 1) en los espectros adquiridos. Los 50 espectros se representan en la figura tridimensional, en la que se observa como al recorrer la línea desde el punto A al B inicialmente aparece una señal correspondiente a la partícula 1 (QD), apareciendo el borde característico del Cd, posteriormente hay un pequeño espacio carente de señal, que se corresponde con la zona que hay entre las partículas y finalmente aparece la señal correspondiente a la partícula 2 de MFt.

De hecho las intensidades de las señales son mayores cuando nos encontramos en el centro de las nanopartículas, ya sea MFt o QD, y van disminuyendo en los bordes de las nanopartículas, como se observa en el espectro general de la figura 6.11.

Los estudios de fluorescencia del conjugado MFt-QD800, al excitar la muestra a 340 nm muestran una emisión centrada a 800 nm, lo que indica que no hay un cambio significativo ni en la longitud de emisión, ni en la amplitud del pico de emisión del QD conjugado con respecto al libre (figura 6.7).

Igualmente, los estudios de magnetismo del conjugado indican que no hay cambios significativos con respecto a cuando no se ha anclado la MFt al QD. En la figura 6.12 se muestra una imagen de magnetización (M) frente al campo (H) del compuesto MFt-QD800, mostrando altos valores de magnetización a saturación ( $\sim 70$  emu/g).

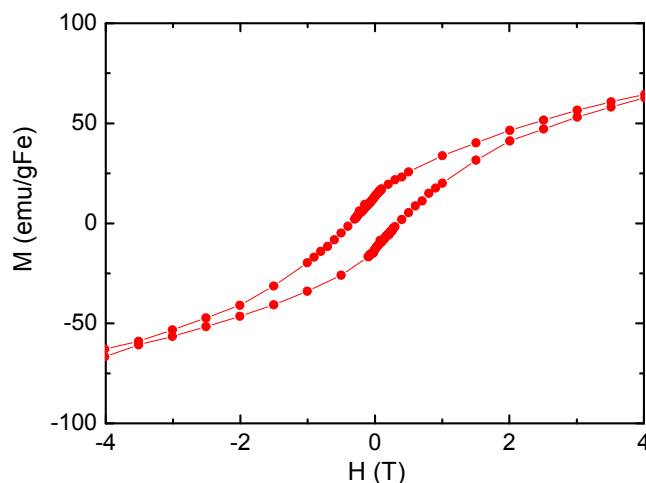


Figura 6.12. Ciclo de histéresis del conjugado MFt-QD800

Por tanto hemos desarrollado una ruta sencilla y flexible para la preparación de nanoestructuras bifuncionales, fluorescentes y magnéticas, solubles en agua. Los valores de magnetización a saturación de la MFt por átomo de Fe y las propiedades fluorescentes de los QD (especialmente el QD800) nos sugerían que estas nanoestructuras podrían usarse como agentes bimodales MRI-OI, y decidimos llevar a cabo un estudio in vivo para estimar este potencial.

Estos estudios se realizaron en el grupo de la Dra. Pasquina Marzola, de la Universidad de Verona.

Las imágenes MRI se generan a través de la medida de la densidad de la nube electrónica de los protones ( $^1\text{H}$ ), midiendo los tiempos de relajación espín-



espín ( $T_2$ ) y espín-celdilla ( $T_1$ ), ya que presentan diferentes valores en los diferentes tejidos. Generalmente el efecto que genera un agente de contraste en un tejido es la disminución de los tiempos de relajación,  $T_1$  y  $T_2$ . La eficacia del agente de contraste se evalúa mediante la medida de las relajaciones longitudinales ( $r_1$ ) y transversales ( $r_2$ ) que representan el incremento de la relajación del disolvente (agua o sangre) en presencia de un 1mM de un centro magnético.

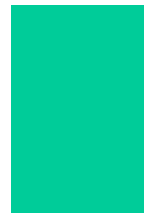
Los agentes de contraste pueden dividirse en dos tipos, los positivos o  $T_1$ -relajantes, y los negativos o  $T_2$ -relajantes. Los positivos generan un incremento de la señal, dando una imagen más brillante en donde se localiza el agente de contraste, mientras que los agentes negativos reducen parcial o totalmente la señal, por lo que dan una señal más oscura que la de referencia. Las nanopartículas superparamagnéticas se comportan generalmente como agentes de contraste negativos. Existen ya en el mercado algunos ejemplos de este tipo de partículas, como Endorem® (Feridex® en USA) y Sinerem® (Combidex® en USA), constituidas por un núcleo metálico de magnetita (5–6 nm de diámetro) recubiertas por un polímero del tipo dextrano, confiriéndoles un diámetro final de ~150 y 15 nm, respectivamente.<sup>11</sup>

Se han desarrollado numerosos y novedosos métodos de síntesis de diversos tipos de nanopartículas, con el fin de controlar y optimizar la eficiencia de dichas nanopartículas como agentes de contraste en MRI,<sup>12,13,14,15</sup> algunos ejemplos son las nanopartículas encapsuladas en las cápsidas de virus,<sup>16</sup> en matrices poliméricas<sup>17</sup> o incluso en el interior de las vesículas de surfactante.<sup>12,18</sup> En nuestro caso estudiamos la capacidad del bioconjugado MFt-QD800, para actuar como agente de contraste.

En primer lugar se hizo un estudio comparativo, in vitro, de los valores de relajación transversal y longitudinal del bioconjugado MFt-QD800 y del compuesto comercial análogo, Endorem®, que se usa como control.

Los estudios se realizaron de forma independiente en cada una de las muestras. Los tiempos de relajación transversales ( $T_2$ ) se midieron usando un protocolo estándar *SPIN-ECHO MULTI-ECHO* con una secuencia general en la que se modifican los valores de TR (tiempo de relajación) y TE (tiempo de eco) según el valor esperado de  $T_2$ . Para tiempos cortos de  $T_2$  el valor de TR y TE debe ser menor que cuando los tiempos esperados de  $T_2$  son más largos. En el caso de la medida del tiempo de relajación longitudinal ( $T_1$ ), se usó la técnica de mapeo rápido de  $T_1$  con una secuencia *IR-SNAPSHOT*. En este caso las medidas se hacen variando el número de puntos tomados en el eje X, 8, 16 y 32 puntos, con el fin de incrementar la resolución de la medida. Cuanto más corto es el valor de  $T_1$  mayor debe ser el número de puntos que se toman en el eje X. El tiempo máximo de adquisición de la medida fue de 5 min.

Los tiempos de relajación transversales y longitudinales obtenidos ( $1/T_1$  y  $1/T_2$ ) se representaron frente a la concentración de Fe, al ajustar la curva a una línea recta se obtuvieron los valores de  $r_1$  y  $r_2$ . Esta representación muestra una correlación lineal entre la concentración de Fe en cada una de las muestras y los valores de  $1/T_1$  y  $1/T_2$ , lo que nos indica de forma indirecta que hay una alta homogeneidad en las muestras de MFt<sub>200</sub>. Los valores obtenidos fueron,  $r_1 = 0.1 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $r_2 = 3,86 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  y  $r_1 = 3.64 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $r_2 = 155.5 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  para la MFt<sub>200</sub> y el Endorem® respectivamente (figura 6.13 y tabla 6.1). En el caso del Endorem® los valores a las concentraciones más altas no se pueden estimar debido a que los tiempos esperados son excesivamente cortos.



[ ](mM)	MFt <sub>200</sub>				Endorem			
	T1 (ms)	1/T1 (s <sup>-1</sup> )	T2 (ms)	1/T2 (s <sup>-1</sup> )	T1 (ms)	1/T1 (s <sup>-1</sup> )	T2 (ms)	1/T2 (s <sup>-1</sup> )
15,2	487	2,05	16,7	59,88	-	-	-	-
7,6	826	1,21	31,6	31,64	-	-	-	-
3,56	1258,7	0,794	65	15,38	77	12,98	1,9	526
1,8	1652,9	0,6	128	7,81	160	6,25	3,2	312,5
0,72	1912	0,523	212	4,71	305	3,27	6,2	161
0,4	2095	0,477	338	2,95	556	1,79	13,4	74,62

Tabla 6.1. Tiempos de relajación transversales y longitudinales de MF<sub>t200</sub> y Endorem (control).

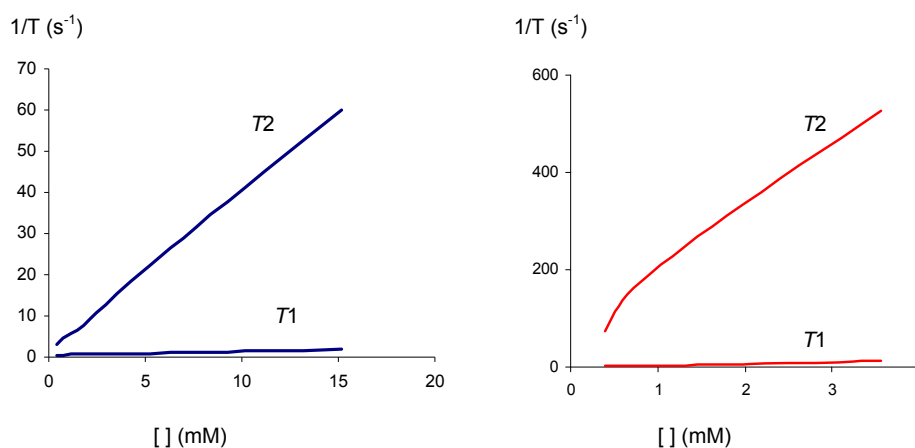


Figura 6.13. Ajuste lineal de los tiempos de relajación, T1 y T2 de la MFt500-QD800 (línea azul) y endorem (línea roja).

En la figura 6.13 se representan las medidas de relajación de la MFt<sub>200</sub> y del Endorem®, con la misma concentración de Fe en ambas muestras, para ello se ha asumido que en las nanopartículas de MFt<sub>200</sub> sólo el 40% del Fe se encuentra en forma de magnetita, que es la que da contribución en las medidas de resonancia, debido a su comportamiento superparamagnético. Las curvas de r1 y r2 de Endorem®, se usaron como control. Como se puede observar al comparar los valores de r1 y r2 de los dos compuestos el complejo MFt<sub>200</sub>-QD800 posee una

menor eficiencia que el agente de contraste comercial a la misma concentración de Fe.

Para calcular la capacidad de contraste del compuesto MFt<sub>200</sub>, se hicieron ciertos experimentos in vivo. Todos estos experimentos se llevaron a cabo en confrontación con el Endorem®, que se usa como control.

Los experimentos in vivo se realizaron con ratones Wistar (hembra) de 250 g. Se uso un animal para los experimentos del first passage del bioconjugado MFt<sub>200</sub>-QD800 y otro, similar al anterior, para los experimentos control con Endorem®. En cada uno de los animales se inyectó la misma cantidad de Fe (1 ml de una disolución 0.02 M de Fe).

Las imágenes se obtienen usando un Biospec Tomograph (Bruker, Karlsruhe, Germany) equipado con un barra magnética horizontal de 33 cm y 4.5 T (Oxford Ltd., Oxford, UK). Los ratones se anestesian de forma gaseosa (70 % N<sub>2</sub> y 30 % O<sub>2</sub> con un porcentaje inicial del 5 % de isoflurano que actúa como anestésico), una vez que el ratón está anestesiado la dosis de isoflurano (Fe<sub>3</sub>C-CHCl-OCHF<sub>2</sub>) se disminuye a 0.5-1.5 % y se mantiene así durante todo el experimento. Las imágenes se obtienen a través de una bobina superficial (figura 6.14) optimizada para la adquisición de datos a nivel del cerebro del ratón (bobina de jaula, 72 mm ID). A lo largo de todo el experimento se monitoriza la respiración del ratón, que debe comprenderse entre 30-20 respiraciones/min.





Figura 6.14. Disposición del ratón Wistar en los experimentos in vivo

En la figura 6.15 se muestran las curvas de la medida de first-passage (EPI) obtenidas en dos regiones de interés pertenecientes a dos regiones diferentes del cerebro, la primera (*roi1*) en una zona perteneciente a la vasculatura del cerebro, ya que se localiza sobre un vaso sanguíneo y otra segunda (*roi2*) que se corresponde con una zona de la corteza cerebral.

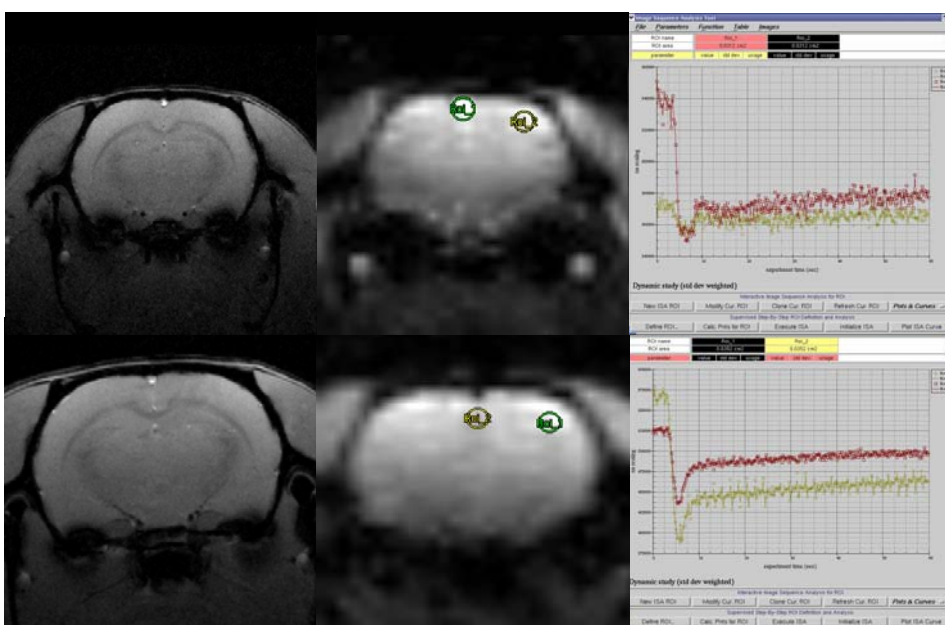


Figura 6.15. EPI y medida de  $T_2$ , de la MFT (imagen superior) y Endorem (imagen inferior).

Las curvas de first-passage se han normalizado mediante la siguiente relación:

$$\text{normalized SI\%} = (\text{SI}(t) - \text{SI}(0)) / \text{SI}(0) \cdot 100 \quad [1]$$

donde SI (0) es el promedio de las intensidades de la señal antes de la inyección y la SI (t) la intensidad de la señal en el momento t. En la figura 6.16, en la que se representan las curvas de EPI normalizadas, se puede observar que la caída de la señal producida por el Endorem® es superior a la producida por la MFt<sub>200</sub> en las correspondientes áreas cerebrales, sobretodo en la zona menos vascularizada (roi2) en la que la MFt<sub>200</sub> apenas presenta señal, sin embargo los datos muestran claramente que el uso de este tipo de nanopartículas para la adquisición de medidas de first-passage es viable.

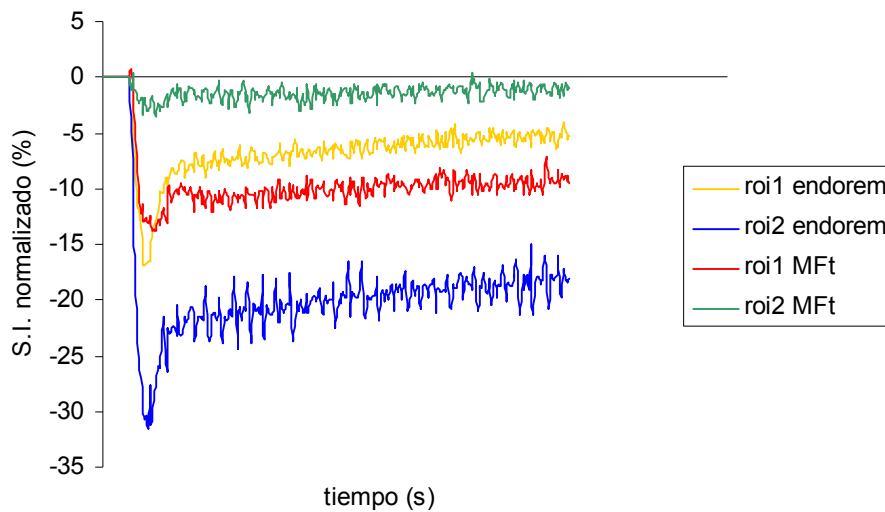


Figura 6.16. Comparativa de las curvas de EPI normalizadas de endorem y MFt frente al tiempo.

En la siguiente figura, (figura 6.17) se muestran las imágenes pre- y post-suministro del agente de contraste. Las imágenes post suministro se adquirieron 268 s después de la inyección del respectivo agente de contraste, MFt<sub>200</sub> y

Endorem®, por el método del bolus Trucking, en el que las imágenes se adquieren con una alta resolución temporal durante el primer paso del agente de contraste en el cerebro. Al adquirir las imágenes de RMN antes y después del suministro del agente de contraste, el decaimiento de la intensidad de la señal de RMN se corresponde con una estimación del volumen sanguíneo cerebral, por tanto el seguimiento de los cambios de la intensidad del valor de RMN con respecto al tiempo, representado mediante los valores de  $r2$  o  $r2^*$ , permite la monitorización de los cambios relativos del volumen sanguíneo,<sup>14,19</sup> ya que la variación de los valores de  $r2$  ó  $r2^*$  pre y post suministro del agente de contraste son linealmente proporcionales a la concentración media del agente de contraste en el volumen sanguíneo medio.

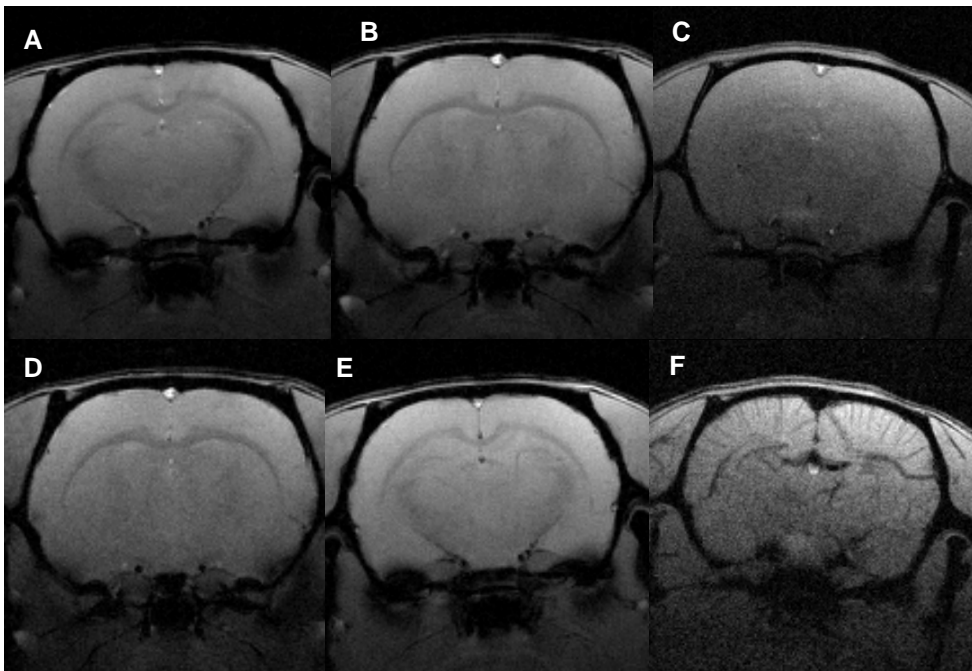
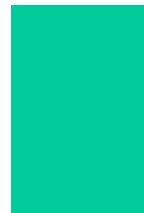


Figura 6.17. Mapas FLASH de las imágenes pre (A, B, C) y post (D, E, F) suministro de los agentes de contraste, MfT (29  $\mu$ l Fe/Kg animal), Endorem (29  $\mu$ l Fe/Kg animal) y Endorem (dosis concentrada, control) respectivamente

Bajo estas condiciones, el Endorem® produce una disminución de la señal levemente superior a la  $Mf_{t200}$ , pero como se puede observar al comparar estas imágenes con los estándar (dosis habitual de Endorem®, 145  $\mu\text{l}$  Fe/Kg animal) que representa muy bien el espacio y disposición de los vasos cerebrales, la dosis suministrada en este estudio (29  $\mu\text{l}$  Fe/Kg animal) es muy baja y no produce una señal muy visible, ni en el caso de la  $Mf_t$  ni en el Endorem®, por lo que los resultados obtenidos con esta dosis para ambos agentes de contraste ( $Mf_{t200}$  y Endorem®) son comparables.

Los resultados obtenidos en los experimentos de MRI indican que las partículas magnéticas obtenidas servirían como agentes de contraste si se lograra incrementar la concentración de magnetita/ferritina. En efecto, Douglas y col.<sup>20</sup> han puesto de manifiesto recientemente que la capacidad de contraste de dichas partículas está directamente relacionada con la magnetización/g y por ende con el tamaño de la partícula magnética. En este sentido, hay que señalar que las partículas  $Mf_t$  contienen solamente 200 átomos de Fe. Cabe por tanto concluir, que esta partícula debe ser un punto de partida para incrementar su contenido magnético, bien por recrecimiento de magnetita o por dopado con  $Mn^{2+}$ ,<sup>21</sup> con el fin de aumentar la magnetización/g y así mejorar el extremadamente bajo valor de  $r_2$  obtenido para estas partículas, que la inhabilitan para ser usadas como agente de contraste en MRI.

Simultáneamente se llevaron a cabo los estudios de "Optical Imaging" (OI), para comprobar la capacidad que tiene dicho biconjugado de actuar como un marcador bimodal magnético-óptico. Los experimentos de imagen óptica se han realizado en colaboración con el grupo de la Dra. Laura Calderán de la Facultad de Medicina de la Universidad de Verona, en un equipo Vivo Vision Systems, IVIS® 200 Series (Xenogen Corporation, Alameda USA) y las imágenes se adquirieron y analizaron con el software Living Image 2.6 y Living Image 3D (Xenogen Corporation, Alameda USA).





Lo primero que se hizo fue un estudio *in vitro* de la eficiencia cuántica de las nanopartículas MF<sub>t200</sub>-QD800 usando como control el QD800 libre. Se calculó la emisión de fluorescencia de la disolución MF<sub>t200</sub>-QD800 usando un abanico de filtros de excitación que barren el espectro UV-vis desde el azul hasta el IR, de acuerdo con el amplio espectro de excitación que muestra el QD800 libre y se enfrentó con la emisión del QD800 libre bajo las mismas condiciones de medida. La disolución MF<sub>t200</sub>-QD800 (20 pM QD) mostraba una eficiencia cuántica menor que la disolución de QD800 comercial (20 pM) pero con un comportamiento similar al del QD comercial a las diferentes longitudes de excitación. Los valores de fluorescencia medios obtenidos daban una eficiencia de señal compatible con los valores necesarios para realizar un experimento *in vivo*.

Para la realización de los experimentos *in vivo* se usaron ratones desnudos (hembras) de 3-4 semanas. Un grupo de 6 animales se trataron para llevar a cabo los experimentos *in vivo*, a cuatro (n=4) de estos animales se les inyectó la disolución de MF<sub>t200</sub>-QD800 (0.01 ml/gr animal) y dos controles (n=2), que se trataron con un disolución fisiológica (0.01 ml/gr animal). Las imágenes de fluorescencia se adquirieron antes de la inyección (pre suministro del compuesto) y durante las 3 h posteriores a la inyección, de forma consecutiva (tabla 6.2).

Muestra	N. animal	Identificación	Tiempo
MF <sub>t200</sub> -QD800	n=4	A,B,E,F	pre, 3h
Control	n=2	C,D	pre, 3h

Tabla 6.2. Grupo de animales tratados

Los resultados que se muestran a continuación son los obtenidos para las imágenes de fluorescencia con el filtro de excitación Cy5.5 (615-665 nm), puesto que con este filtro es con el que se obtuvo una mayor señal en las adquisiciones *in vivo*. Al igual que se hizo para los experimentos *in vitro* lo primero que se hizo fue medir la eficiencia cuántica de fluorescencia, concretamente en tres regiones de

interés, cerebro, pulmones e hígado. Las medidas se tomaron en la proyección del plano horizontal de los tres órganos mencionados anteriormente.

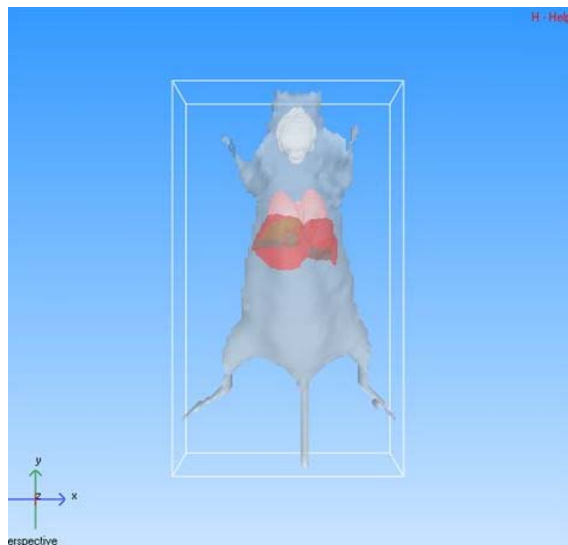
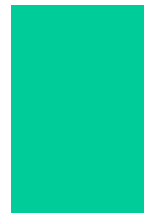


Figura 6.18. Proyección del plano horizontal de los órganos en estudio.

En la figura 6.19 se muestran las imágenes de fluorescencia de dos de los animales tratados, el primero con el suero fisiológico que se usa como control (6.19 A) y el segundo con MF<sub>200</sub>-QD800 (6.19 B y C) a distintos tiempos de administración del compuesto. A los 20 minutos de la administración del compuesto, se observa como la distribución del mismo por el organismo es relativamente homogénea, aunque se muestra un pequeño cúmulo en el hígado (*roi1*), posteriormente a las 3 horas se observa como la intensidad es mayor a nivel de los pulmones (*roi2*) y también aparece un cúmulo notable a nivel del cerebro (*roi3*) que no era patente en los tiempos iniciales.



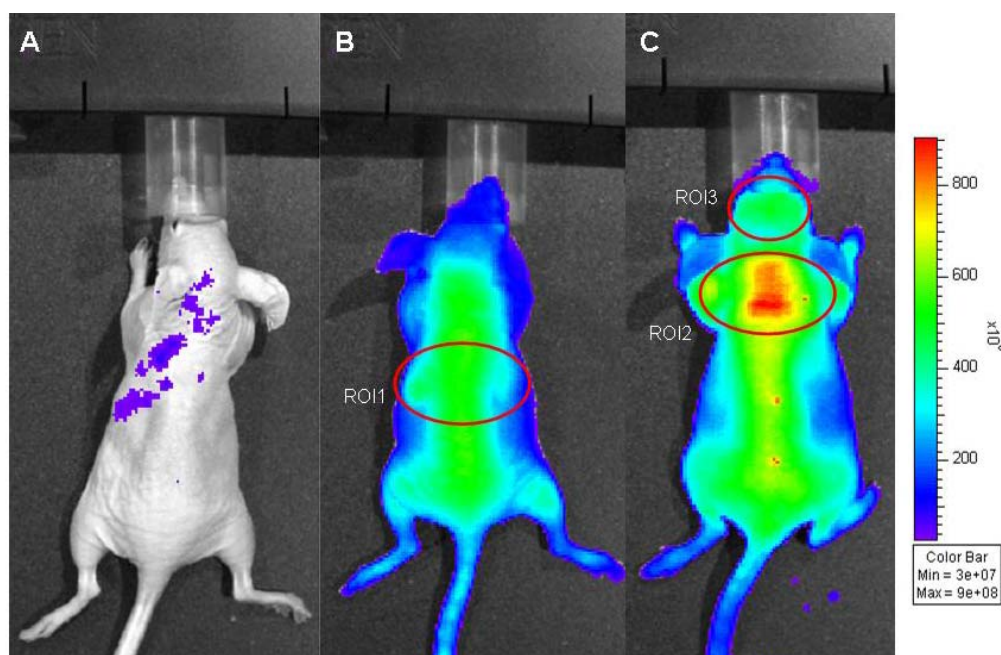


Figura 6.19. Imágenes de fluorescencia del control (A) y del compuesto  $MFT_{200}$ -QD800 a los 20 minutos de la administración del compuesto (B) y a las 3 horas del suministro (C). Se muestra la barra de intensidades de fluorescencia (máximo de intensidad de  $9e+08$  y mínimo  $3e+07$ ).

Por claridad se trataron las imágenes obtenidas representando la eficiencia media de fluorescencia medida frente al tiempo de administración (figura 6.20) a nivel de los tres órganos de interés en los seis animales tratados, los cuatro problema (A, B, C y D) y los dos controles (E y F). Se observa un comportamiento general en las tres regiones de estudio, hay un rápido incremento de la fluorescencia de emisión justo dos minutos después de la administración del compuesto y posteriormente la eficiencia de fluorescencia va disminuyendo a lo largo de las 3 horas de estudio.

Eficiencia media de fluorescencia (a.u)

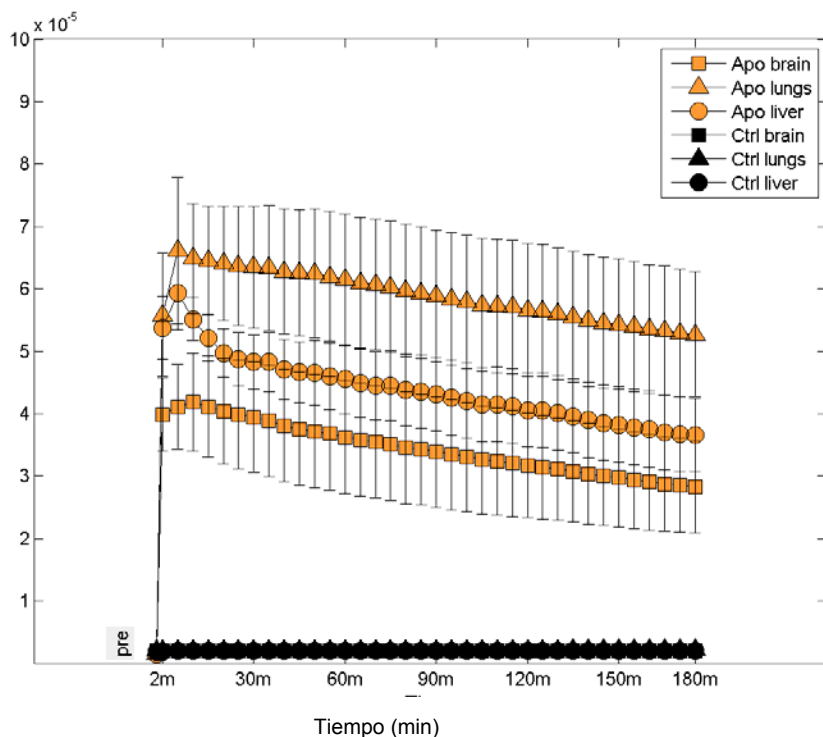
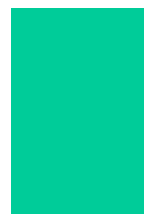


Figura 6.20. Eficiencia media de fluorescencia en las tres regiones anatómicas en estudio con respecto al tiempo de administración del compuesto, MF<sub>t200</sub>-QD800 (naranja) y control (negro).

Como se observa en la figura anterior el comportamiento es similar en las tres regiones anatómicas estudiadas, sólo se observan diferencias en los primeros instantes tras el suministro del compuesto, después de los 15 primeros minutos el comportamiento es similar en todas las regiones. La mayor eficiencia de emisión se localiza en los pulmones y posteriormente en cerebro e hígado. Es de resaltar como en el hígado la disminución de la señal de fluorescencia es mucho más patente que en el resto de los órganos.

Para concluir el estudio de la efectividad del conjugado MF<sub>t200</sub>-QD800 como agente bimodal para MRI-OI se realizaron ciertos análisis de toxicidad



celular del compuesto frente al agente de contraste comercial análogo, el Endorem®. Se hizo un estudio de toxicidad a 6, 12 y 24 h, en una placa multipocillo se incubaron células mesenquimales (ADAS, 100.000 céls/pocillo) y se incubaron con MFt<sub>200</sub>-QD800 a dos concentraciones (0.01 M y 0.001 M), se pusieron dos controles, las células sin agente de contraste para descartar las posibles muertes por estrés fisiológico o contaminación ambiental y otras tratadas con Endorem (0.01 M).

Se adicionaron 200 µl de cada una de las disoluciones problema a los pocillos que contenían el cultivo celular. Tras 3 h de incubación de las células con el agente de contraste se eliminó el sobrenadante y se añadieron 200 µl de medio de cultivo fresco.

Para estimar la supervivencia celular, se usó el ensayo de reducción comercial del (3-[4,5-dimethyl thiazol-2-y1]-2,5 diphenil tetrazolium bromide) (MTT, Sigma). Este compuesto es una sal de tetrazolio soluble, de color amarillo, que se transforma en un formazán insoluble, de color azul por acción de la actividad deshidrogenasa mitocondrial de las células vivas, que se disuelve con isopropanol para medir su absorbancia en el espectrofotómetro. Se considera que la cantidad de formazán que se produce en un cultivo es directamente proporcional a la cantidad de células vivas.

Pasados 5 minutos se adicionaron 10 µl de una disolución 3-(4,5-dimethylthiazol-2-y1)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, las placas se incubaron nuevamente durante 3 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente se adicionó de nuevo una disolución de MTT (100 µl), que en este caso contenía HCl para redissolver el precipitado azul violáceo que se forma al llevar a cabo la reacción de transformación en formazán. Las células se trataron posteriormente con Tripsina al 1%, a las 6, 12 y 24 h. Finalmente la muerte celular se determinó a través de la absorbancia a 590 nm. El valor de absorbancia a dicha longitud de onda se correlaciona directamente con el número de células vivas.

Tiempo	Endorem (0.01M)	MFT <sub>200</sub> (0.01M)	MFT <sub>200</sub> (0.001M)	Blanco
6h	0.409	0.181	0.2	0.472
12h	0.236	0.139	0.329	0.431
24h	0.179	0.127	0.431	0.482

Tabla 6.3. Absorbancia a 590 nm.

De estos datos se deduce que en las células control hay un 50% de muerte celular, por lo que sobreviven al tratamiento con MTT un total de 50.000 células/pocillo, mientras que en el caso del tratamiento con los agentes de contraste el porcentaje de muerte celular es un poco mayor, en el caso del Endorem (0.01 M) a las 6 h el porcentaje de muerte es del 60% mientras que a partir de las 12 h el porcentaje se eleva al 80%, mientras que para la MFT<sub>200</sub>-QD800 el porcentaje de muerte a la concentración más elevada (0.01 M) es del 80% desde el inicio y en el caso más diluido (0.001 M) es del 70%.

En conclusión, hemos desarrollado un método de preparación de nanoestructuras magnético-fluorescentes solubles en agua que representan un extraordinario punto de partida para la consecución de agentes de contrastes bimodales MRI-OI. De hecho, los parámetros de muerte celular y de Optical Imaging de las primeras nanoestructuras probadas in vivo cumplen con los requisitos exigibles, mientras que el gran inconveniente, el bajo valor de  $r_2$ , pone de manifiesto la necesidad de incrementar la magnetización/g del bloque ferritínico magnético con objeto de optimizar este parámetro y hacerlo efectivo para MRI. En este sentido, algunos trabajos llevados a cabo en nuestro grupo ya han logrado obtener valores de  $r_2$  por encima de  $100 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  utilizando oxihidróxidos de Gd<sup>22</sup> en vez de magnetita-ferrihidrita en la cavidad ferritínica. Hay que resaltar que la flexibilidad de la ruta de preparación de estas nanoestructuras multifuncionales es por tanto una puerta abierta para la optimización del conjunto de parámetros que puedan permitir la preparación de agentes bimodales MRI-OI con especificidad añadida.

## BIBLIOGRAFÍA

---

1.- (a) Robert. N. Muller et al. *Chem. Rev.* **2008**, 108, 2064. (b) Covreur et al. *Current Pharm. Desing.* **2005**, 11, 2091. (c) Duget et al. *J. Mater. Chem.* **2004**, 14, 2161.

2.- Willner et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 7602.

3.- (a) Jinwoo Cheon et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 5122-5135. (b) Jinwoo Cheon et al. *Acc. Chem.Res.*, **2008**, 41 (12), 1630-1640.

4.- (a) N. Gaponik, I. L. Radtchenko, G. B. Sukhorukov, A. L. Rogach, *Langmuir* **2004**, 20, 1449-1452. (b) D. K. Yi, S. T. Selvan, S. S. Lee, G. C. Papaefthymiou, D. Kundaliya, J. Y. Ying, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 4990-4991. (c) S. T. Selvan, P. K. Patra, C. Y. Ang, J. Y. Ying, *Angew. Chem.* **2007**, 46, 2448-2452. (d) G. Beaune, B. Dubertret, O. Clément, C. Vayssettes, V. Cabuil, C. Ménager, *Angew. Chem.* **2007**, 46, 5421-5424. (e) A. Agrawal, T. Sathe, S. Nie, *J. Agric. Food Chem.* **2007**, 55, 3778-3782. (f) L. Etgar, E. Lifshitz, R. Tannenbaum, *J. Phys. Chem. C.* **2007**, 111, 6238-6244.

5.- (a) B. Cohen, H. Dafni, G. Meir, A. Harmeliny, M. Neeman, *Neoplasia*, **2005**, 7, 109-117; (b) J. Vymazal, O. Zak, J. W. M. Bulte, P. Aisen, R. A. Brooks, *Mag. Res. Med.*, **1996**, 36, 61-65.

6.- (a) R. K. Jain, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **1999**, 1, 241. (b) R. K. Jain, *J. Controlled Release*, **2001**, 74, 7.

7.- C. Quintana, *Mini-Rev. Med. Chem.* **2007**, 7, 961.

- 
- 8.- N. Gálvez, B. Fernández, P. Sánchez, R. Cuesta, M. Ceolín, M. Clemente-León, S. Trasobares, M. López-Haro, J. J. Calvino, O. Stéphan, J. M. Domínguez-Vera, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 8062.
- 9.- S. W. Kim, J. P. Zimmer, S. Ohnishi, J. B. Tracy, J. V. Frangioni, M. G. Bawendi, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 10 526.
- 10.- A. Howie, *J. Microsc.* **1979**, 117, 11.
- 11.- Sophie Laurent, Delphine Forge, Marc Port, Alain Roch, Caroline Robic, Luce Vander Elst y Robert N. Muller. *Chem.Rev.*, **2008**, 108(6), 2064-2110.
- 12.- Bulte JWM, de Cuyper M, Despres D, Frank JA. *J Magn Magn Mater*, **1999**, 194:204–209
- 13.- Corti M, Lascialfari A, Marinone M, Masotti A, Micotti E, Orsini F, Ortaggi G, Poletti G, Innocenti C, Sangregorio C. *JmagnMagnMater*, **2008**, 320:316–319.
- 14.- Sbarbati A, Reggiani A, Lunati E, Arban R, Nicolato E, Marzola P, Asperio RM, Bernardi P, Osculati F. *Neuroimage*, **2000**, 12:418–424
- 15.- Masotti A, Moretti F, Mancini F, Russo G, Di Lauro N, Checchia P, Marianecchi C, Carafa M, Santucci E, Ortaggi G. *Bioorg Med Chem.* **2007**, 15(3):1504–1515.
- 16.- (a) Meldrum FC, Heywood BR, Mann S. *Science*, **1999**, 257:522–523. (b) Meldrum FC, Wade VJ, Nimmo DL, Heywood BR, Mann S. *Nature*, **1991**, 349:684–687. (c) Douglas T, Young. M, *Nature*, **1998**, 393:152–155



---

17.- (a) Mehrotra V, Russell MW, Huffman DR. *Science*, **1992**, 257:219–223 (b) Tang BZ, Geng Y, Lam JWY, Li B, Jing X, Wang X, Wang F, Pakhomov AB, Zhang XX. *Chem Mater*, **1999**, 11:1581–1589.

18.- (a) Mann S, Hannington JP, Williams RJP. *Nature*, **1986**, 324:565–567 (b) De Cuyper M, Joniau M. *Eur Biophys*, **1988**, J 15:311–319.

19.- Hamberg LM, Boccalini P, Stranjalis G, Hunter GJ, Huang Z, Halpern E, Weisskoff RM, Moskowitz MA, Rosen BR. *Magn Reson Med*, **1996**, 35:168–173.

20.- Masaki Uchida et al. *Magnetic Resonance in Medicine*, **2008**, 60:1073–1081.

21.- Cheon Jinwoo et al. *Nat. Med.* **2007**, 13, 95

22.- Purificación Sánchez, Elsa Valero, Natividad Gálvez, José M. Domínguez Vera, Massimo Marinone, Giulio Poletti, Maurizio Corti, y Alessandro Lascialfari. *Dalton Trans.*, **2009**, 800–804

## 7. CONCLUSIONES



A partir de los resultados obtenidos se pueden sacar las siguientes conclusiones en los dos frentes principales que se han abordado en el desarrollo de esta tesis. Un primer frente en el que se ha realizado un estudio más detallado de la estructura de la ferritina y su relación con algunas enfermedades neurológicas (conclusiones 1-2) y un segundo frente dedicado a la síntesis de nanopartículas metálicas bifuncionales con aplicaciones biomédicas (conclusiones 3-7).

#### Eliminación reductiva de Fe

1. El núcleo metálico de la ferritina está compuesto por una estructura polifásica de Fe, principalmente ferrihidrita y magnetita, donde la fase ferrihidrita es mayoritaria. Mediante un proceso de eliminación controlada de Fe podemos conseguir invertir las proporciones de manera que la fase magnetita pase a ser mayoritaria. La ferritina nativa así como las ferritinas obtenidas por eliminación reductiva de Fe, con 2200, 1200, 500 y 200 átomos de Fe se analizaron por Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM), Espectroscopia de Absorción de rayos X cercana al umbral (XANES), Espectroscopia de pérdida de energía de los electrones (EELS) y Dispersión de rayos X de pequeño ángulo (SAXS), permitiéndonos proponer un modelo estructural para el núcleo metálico de tipo corteza-núcleo: magnetita-ferrihidrita.

#### Sensor de Alzheimer

2. Un incremento en la concentración de los niveles sanguíneos de Homocisteína desencadena una liberación descontrolada de Fe desde la ferritina, lo que provoca la aparición de la fase magnetita, relacionada con el desarrollo de ciertas enfermedades neurológicas como el Alzheimer. La estimación de esta fase al igual que el exceso de homocisteína podrían ser útil para evaluar el progreso de esta enfermedad, usando este par magnetita-homocisteína como un biomarcador para la diagnosis precoz de la enfermedad.

### Funcionalización de la capa externa de la ferritina

3. La ferritina nativa puede ser funcionalizada, a nivel de su capa externa, a través de los grupos aminos de lisinas (concretamente tres lisinas por subunidad de ferritina), permitiéndonos obtener “ferritinas decoradas”. Hemos anclado covalentemente a la capa orgánica de la ferritina colorantes orgánicos (Remazol brilliant blue and Orange 16) y fluoróforos, el 4-(2-hydroxyethoxy)-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD), Alexa Flúor AF350 y AF430. La funcionalización simultánea de AF350 y AF430 en una misma subunidad de ferritina conlleva la aparición de un fenómeno de transferencia de energía denominado FRET. Dicho fenómeno puede ser regulado según la proporción de AF350- AF430.

### Deposición de ferritinas funcionalizadas

4. Siguiendo la dinámica de funcionalización se han depositado de forma ordenada las nanopartículas de ferritina sobre un soporte de Au, por reacción covalente entre el SPDP y los residuos de lisina presentes en la superficie externa de la ferritina. Hemos desarrollado una ruta sencilla y flexible para la obtención de redes dimensionales de ferritina.

### Modificación del material interno de la ferritina

5. Se ha desarrollado un método de síntesis que facilita la síntesis de nanopartículas metálicas albergadas en la cavidad de la apoferritina, incubándola con metales en estado de oxidación (II). La capa proteica de la ferritina evita la aglomeración de las nanopartículas metálicas y les confiere solubilidad en agua. Se ha propuesto un mecanismo de crecimiento y nucleación de las nanopartículas de Cu al usar la apoferritina como nanoreactor.

#### Modificación de la capa y el núcleo metálico de la ferritina

6. Se han obtenido nanoestructuras bifuncionales al funcionalizar la superficie externa de una ferritina artificial en la que se ha modificado su material interno. Concretamente se han desarrollado nanoestructuras magnético-ópticas por la combinación de dos nanopartículas, la magnetoferritina y los Qdots (525-, 655- o 800-nm). Dichas nanoestructuras (MFt-QD), generalmente organizadas como dímeros, mantienen las propiedades magnéticas y fluorescentes típicas de sus precursores.

#### Agentes de contraste MRI+OI

7. Los bioconjugados MFt-QD podrían ser utilizados como agentes bimodales MRI-OI, puesto que la MFt podría actuar como un agente de contraste en MRI y el QD debido a sus propiedades ópticas es un excelente candidato para OI. La MFt-QD800 se ha probado en ensayos *in vivo* como un posible agente bimodal para MRI-OI. Los resultados obtenidos en los ensayos *in vivo* indican que dicha nanoestructura es potencialmente viable como agente de marcaje óptico, mostrando diferencias importantes con respecto al Qdot libre, en cuanto a los resultados de MRI deben mejorarse, puesto que se obtienen valores muy bajos en los tiempos de relajación  $r_2$ , insuficientes para pruebas *in vivo*.





## 7. CONCLUSIONS





Ferritin is the main keyword of this thesis. Two different research topics have been developed based on ferritin seeking for its biomedical applications: the study of mineral core structure as a function of iron removal processes (conclusions 1-2) and the use of ferritin as a biological platform for building bifunctional nanoparticles (3-7).

#### Iron removal

1. The native ferritin iron core consists of a polyphasic structure (mainly ferrihydrite and magnetite) and the proportion of each phase is changed by gradual iron removal, magnetite being the predominant phase when iron content decreases. Transmission Electron Microscopy (TEM), X-ray Absorption Near Edge Spectroscopy (XANES), Electron Energy-Loss Spectroscopy (EELS), Small-Angle X-ray Scattering (SAXS) applied in a batch of horse spleen ferritins from which iron had been gradually removed, yielding samples containing 2200, 1200, 500 and 200 iron atoms, collectively demonstrate a ferrihydrite-magnetite core-shell structure of the ferritin mineral core.

#### Alzheimer's sensor

2. Excess of homocysteine produces a non controlled iron removal from ferritin, leaving a mark in the cavity: the occurrence of magnetite. Therefore, we propose that excess of homocysteine and its interaction with ferritin are at the origin and development of the Alzheimer's disease. Therefore, control over homocysteine blood level and magnetite brain content could be used as a double biomarker system for early diagnosis of this disease.

#### Ferritin external shell functionalization

3. Native ferritin can be used as a platform for chemical functionalization leading to "decorated ferritin nanoparticles". The outer ferritin surface exposes amine groups belonging to lysine residues which covalently react with ester and acid



groups. We have covalently coupled organic dyes (Remazol brilliant blue and Orange 16) and the fluorophores 4-(2-hydroxyethoxy)-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD), Alexa Fluor AF350 and AF430. It is possible to simultaneously couple AF350 and AF430 and when both fluorophores are present in the same ferritin subunit, Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) occurs. This FRET can be tuned by varying the A350-AF430 ratio.

#### Functionalized Ferritin Deposition

4. Likewise, we have made use of the functionalization way of the ferritin external surface (previously stated) for the fabrication of two-dimensional ferritin nanoarrays onto a modified gold surface.

#### Modification of the Ferritin core

5. Metal nanoparticles could be prepared within the apoferritin cavity using M(II)-loaded apoferritin as a chemically and spatially confined environment for their construction. The protein shell prevents bulk aggregation of the metal particles, rendering them water soluble. A growth mechanism of Cu nanoparticles has been proposed.

#### Simultaneous Modification of the Ferritin core and shell

6. It is possible to simultaneously build a non native inorganic material in the internal ferritin cavity and to “decorate” the external surface. Thus, a new class of water-soluble, fluorescent-magnetic 525-, 655- or 800-nm emitting quantum dots-magnetoferritin bioconjugates (MFt-QD) has been prepared. The nanostructures are patterned as dimer particles. Magnetic and fluorescent properties of both nanoblocks are maintained in the final nanostructure.

## MRI-OI agents

7. In the MFt-QD nanostructure family, the superparamagnetic magnetoferritin nanoblock can serve as contrast agent in MRI whereas the quantum dots as a fluorescent probe (OI). The MFt-QD800 nanostructure has been tested *in vivo* for this purpose. Preliminary results show that this nanostructure exhibits long blood half-time and high efficient fluorescence yield to be used as OI agent. The low mass magnetization and then low  $r_2$  values of MFt-QD were not adequate for getting high quality MRI images for *in vivo* applications.





## ANEXO . ARTÍCULOS PUBLICADOS



De este trabajo de tesis doctoral, se han derivado los siguientes trabajos científicos:

**“Comparative Structural and Chemical Studies of Ferritin Cores with Gradual Removal of their Iron Contents”**

Natividad Gálvez, **Belén Fernández**, Purificación Sánchez, Rafael Cuesta, Marcelo Ceolín, Miguel Clemente-León, Susana Trasobares, Miguel López-Haro, Jose J. Calvino, Odile Stéphan, José M. Domínguez-Vera.  
*J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 8062-8068.

**“Red and blue ferritin nanomagnets by dye-labeling to the protein shell”**

**Belén Fernández**, Natividad Gálvez, Purificación Sánchez, Julia Morales, Francisco Santoyo, Rafael Cuesta, José M. Domínguez-Vera  
*Inorganica Chimica Acta.* **2007**, 360, 3951-3954.

**“Covalent deposition of ferritin nanoparticles onto gold surfaces”**

José M. Domínguez-Vera, Lorena Welte, Natividad Gálvez, **Belén Fernández**, Julio Gómez-Herrero, Félix Zamora.  
*Nanotechnology*, **2008**, 19, 025302.

**“Magnetic-Fluorescent Langmuir-Blodgett films of Fluorophore-labeled Ferritin Nanoparticles”**

Natividad Gálvez, **Belén Fernández**, Purificación Sánchez, Julia Morales-Sanfrutos, Francisco Santoyo-Gonzalez, Rafael Cuesta, Ruperto Bermejo, Miguel Clemente-León, Eugenio Coronado, Alejandra Soriano-Portillo, José M. Domínguez-Vera  
*Solid State Sciences.* **2008**, 1-6.



**“Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) in Ferritin Labeled with Multiple Fluorescent Dyes”**

**Belén Fernández**, Natividad Gálvez, Purificación Sánchez, Rafael Cuesta, Ruperto Bermejo and José M. Domínguez-Vera.

*J. Biol. Inorg. Chem.* **2008**, 13, 349–355.

**“Structural characterization of Cu-oxide/hydroxide inside the apoferritin and its full conversion to Cu nanoparticles”**

Marcelo Ceolín, Natividad Gálvez, Purificación Sánchez, **Belén Fernández**, José M. Domínguez-Vera

*Eur. J. Inorg. Chem.* **2008**, 795-801.

**“Quantum Dots Decorating Magnetic Bionanoparticles”**

**Belén Fernández**, Natividad Gálvez, Rafael Cuesta, Ana B. Hungría, José J. Calvino and José M. Domínguez-Vera.

*Adv. Funct. Mater.* **2008**, 18, 3931–3935.

## Comparative Structural and Chemical Studies of Ferritin Cores with Gradual Removal of their Iron Contents

Natividad Gálvez,<sup>†</sup> Belén Fernández,<sup>†</sup> Purificación Sánchez,<sup>†</sup> Rafael Cuesta,<sup>‡</sup> Marcelo Ceolín,<sup>\*§</sup> Miguel Clemente-León,<sup>||</sup> Susana Trasobares,<sup>‡</sup> Miguel López-Haro,<sup>‡</sup> Jose J. Calvino,<sup>‡</sup> Odile Stéphan,<sup>#</sup> and José M. Domínguez-Vera<sup>\*†</sup>

*Departamento de Química Inorgánica, Universidad de Granada, 18071 Granada, Spain, Departamento de Química Inorgánica y Orgánica, EPS Linares, Universidad de Jaén, 23700 Linares, Spain, Instituto de Físico-Química Teórica y Aplicada, Universidad Nacional de La Plata, Argentina, Instituto de Ciencia Molecular, Universidad de Valencia, Fundació General de la Universitat de València (FGUV), Polígono de la Coma s/n, 46980 Paterna, Spain, Departamento Ciencia de Materiales e Ingeniería Metalúrgica y Química Inorgánica, Universidad de Cádiz, Campus Río San Pedro, 11510 Cádiz, Spain, and Laboratoire de Physiques des Solides, CNRS-UMR8502, Université Paris Sud, Bâtiment 510, 91405 Orsay, France*

Received January 21, 2008; E-mail: josema@ugr.es

**Abstract:** Transmission Electron Microscopy (TEM), X-ray Absorption Near Edge Spectroscopy (XANES), Electron Energy-Loss Spectroscopy (EELS), Small-Angle X-ray Scattering (SAXS), and SQUID magnetic studies were performed in a batch of horse spleen ferritins from which iron had been gradually removed, yielding samples containing 2200, 1200, 500, and 200 iron atoms. Taken together, findings obtained demonstrate that the ferritin iron core consists of a polyphasic structure (ferrihydrite, magnetite, hematite) and that the proportion of phases is modified by iron removal. Thus, the relative amount of magnetite in ferritin containing 2200 to 200 iron atoms rose steadily from ~20% to ~70% whereas the percentage of ferrihydrite fell from ~60% to ~20%. These results indicate a ferrihydrite–magnetite core–shell structure. It was also found that the magnetite in the ferritin iron core is not a source of free toxic ferrous iron, as previously believed. Therefore, the presence of magnetite in the ferritin cores of patients with Alzheimer's disease is not a cause of their increased brain iron(II) concentration.

### Introduction

Iron is an essential element for living organisms but is highly toxic in excess. The major intracellular storage form of iron is ferritin, a spherical protein composed of 24 subunits that surround an aqueous cavity capable of accommodating thousands of iron atoms (up to 4500) as an iron mineral, traditionally described as ferrihydrite.<sup>1</sup> Ferritin stores iron that is not required for immediate metabolic needs and at the same time protects against the toxic effects of its excess. Free intracellular iron catalyzes the production of oxygen free radicals via a Fenton reaction, which involves the reaction of hydrogen peroxide with iron(II) to produce the hydroxyl radical OH•, an extremely powerful oxidizing agent capable of causing extensive cell damage. Oxidative damage in neurons is known to be a primary cause of degenerative diseases such as Alzheimer's disease.<sup>2</sup>

Therefore, understanding the management of iron in the brain, especially the process of iron release from ferritin, is of great importance in the study of neurodegeneration. Once iron has been removed from ferritin, it is required for the activity of a number of cellular enzymes and pathways. Two experimentally established facts should be taken into account: (i) iron is accumulated in the brain in several neurodegenerative diseases,<sup>3</sup> and (ii) ferritin iron core composition significantly differs between physiological and pathological (especially Alzheimer's) brain ferritins.<sup>4</sup> Specifically, although both physiological and pathological ferritin cores have a polyphasic composition, the major phase is ferrihydrite (an iron(III) oxide) in physiological ferritin cores but mixed ferric–ferrous iron oxide (e.g., magnetite) in patients with Alzheimer's disease.<sup>5</sup> Considered together, this evidence suggests that ferritin dysfunction would

<sup>†</sup> Universidad de Granada.

<sup>‡</sup> Universidad de Jaén.

<sup>§</sup> Universidad Nacional de La Plata.

<sup>||</sup> Universidad de Valencia.

<sup>‡</sup> Universidad de Cádiz.

<sup>#</sup> Université Paris Sud.

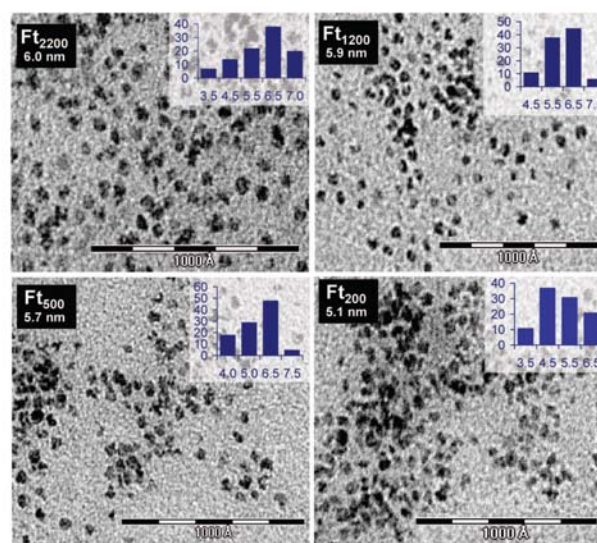
(1) (a) Chasteen, N. D.; Harrison, P. M. *J. Struct. Biol.* **1999**, *126*, 182–194. (b) Harrison, P. M.; Arosio, P. *Biochim. Biophys. Acta* **1996**, *1275*, 161–203. (c) Theil, E. C.; Takagi, H.; Small, G. W.; He, L.; Tripton, A. R.; Danger, D. *Inorg. Chim. Acta* **2000**, *297*, 242–251. (d) Liu, X.; Theil, E. C. *Acc. Chem. Res.* **2005**, *38*, 167–175.

(2) (a) Markesbery, W. R. *Free Radical Biol. Med.* **1997**, *23*, 134. (b) Perry, G.; Cash, A. D.; Smith, M. A. *J. Biomed. Biotechnol.* **2002**, *2*, 120–123.

(3) (a) Burdo, J. R.; Connor, J. R. *Biometals* **2003**, *16*, 63–75. (b) Ke, Y.; Qian, Z. M. *Lancet Neurol.* **2003**, *2*, 246–253.

(4) (a) Quintana, C.; Cowley, J. M.; Marhic, C. *J. Struct. Biol.* **2004**, *147*, 166–178. (b) Cowley, J. M.; Janney, D.; Gerkin, R. C.; Buseck, P. R. *J. Struct. Biol.* **2000**, *131*, 210–216.

(5) (a) Smith, M. A.; Harris, P. L. T.; Sayre, L. M.; Perry, G. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1997**, *94*, 9866–9868. (b) Moos, T.; Morgan, E. H. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **2004**, *1012*, 14–26.



**Figure 1.** TEM micrographs of the ferritin samples Ft<sub>2200</sub>, Ft<sub>1200</sub>, Ft<sub>500</sub>, and Ft<sub>200</sub>, showing discrete electrodense iron cores. Scale bars are 100 nm. Inset: Particle size histograms (particle size vs frequency). Average particle size is indicated for each sample.

increase toxic brain ferrous ions, which may contribute to producing free radicals that induce the cellular oxidative stress associated with cognitive decline and Alzheimer's disease.<sup>6</sup>

Understanding the chemical structure of the ferritin core may help to elucidate the alteration or dysfunction of ferritin and its role in the development of degenerative diseases. Although the ferritin mineral core was traditionally described as ferrihydrite,<sup>1</sup> more recent studies have revealed a polyphasic structure, consisting of "classic" ferrihydrite and other phases, including a magnetite-like phase,<sup>4,6</sup> although the different phases do not coexist within the same core.

The present paper reports the study of ferritin core structure in a batch of horse spleen ferritins in which iron was gradually removed in a controlled manner<sup>7</sup> by the traditional procedure of reduction and iron(II) chelation, obtaining native ferritins containing 2200, 1200, 500, and 200 iron atoms. These samples (Ft<sub>2200</sub>, Ft<sub>1200</sub>, Ft<sub>500</sub>, and Ft<sub>200</sub>) served as a biomimetic model for studying the relationship between natural iron removal and iron core structure in brain ferritin.

Transmission Electron Microscopy (TEM), X-ray Absorption Near Edge Spectroscopy (XANES), Electron Energy-Loss Spectroscopy (EELS), Small-Angle X-ray Scattering (SAXS), and SQUID magnetic measurements demonstrated that the structure of ferritin iron core is formed by several iron oxide phases, which are modified in percentage terms as iron is gradually removed. Thus, our results show an increase in the magnetite phase with a corresponding decrease in the ferrihydrite phase. These techniques (TEM, XANES, EELS, SAXS, and SQUID measurements), more frequently used in Material

Sciences than in Life Sciences, allowed us to clarify structural and chemical aspects of horse spleen ferritin under a process of gradual iron removal. Information obtained in this study can be used to solve the chemical composition of ferritin in pathological tissue samples and to interpret some properties, such as its NMR relaxometry. This technique could be a valuable tool for the diagnosis and follow-up of neurodegenerative diseases, as proposed by Brooks et al.<sup>8</sup>

We also found that the magnetite in ferritin is not a source of free ferrous ions for promoting the formation of OH• radicals, as widely believed.<sup>9</sup> Therefore, the presence of magnetite in the ferritin cores of patients with Alzheimer's disease is probably a consequence and not a cause of their increased brain iron(II) concentrations.

## Results and Discussion

**TEM Study.** Figure 1 depicts TEM micrographs of ferritin samples with iron contents of 2200, 1200, 500, and 200 atoms. Tests on 100 ferritin particles from each sample showed that particle size did not decrease as expected for an iron removing surface mechanism. Thus, mean diameters (and standard deviations) were 6.0(0.7), 5.9(0.9), 5.7(1.0), and 5.1(1.0) nm for Ft<sub>2200</sub>, Ft<sub>1200</sub>, Ft<sub>500</sub>, and Ft<sub>200</sub>, respectively. Note that iron cores of the sample with the least iron content (Ft<sub>200</sub>) are more irregular in shape and less electron dense compared with those of Ft<sub>1200</sub> and Ft<sub>2000</sub>.

One possible interpretation of the nonsignificant core size variation with iron removal is that some ferritin molecules lose

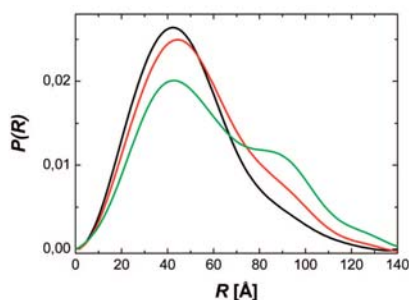
(6) Quintana, C. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2007**, *7*, 961–975.

(7) Clemente-León, M.; Coronado, E.; Soriano-Portillo, A.; Colacio, E.; Domínguez-Vera, J. M.; Gálvez, N.; Madueño, R.; Martín-Romero, M. T. *Langmuir* **2006**, *22*, 6993–7000.

(8) (a) Vymazal, J.; Zak, O.; Bulte, J. W. M.; Aisen, P.; Brooks, R. A. *Magn. Reson. Med.* **1996**, *36*, 61–65. (b) Vymazal, J.; Brooks, R. A.; Patronas, N.; Hajek, M.; Bulte, J. W. M.; Di Chiro, G. *J. Neurosci.* **1995**, *15*, 19–26.

(9) Quintana, C. *J. Alzheimer's Dis.* **2007**, *12*, 157.





**Figure 2.** PDFs obtained from SAXS experiments after regularized Fourier Transform. Ft<sub>500</sub> (green), Ft<sub>1200</sub> (red), and Ft<sub>2200</sub> (black)

all of their iron whereas others remain intact. However, this possibility can be ruled out, since negatively stained TEM images (Supporting Information) of all ferritin samples showed homogeneous metallic cores surrounded by apoferritin shells without the presence of empty apoferritin capsids.

Therefore, TEM results suggest that iron is removed from the center of the ferritin iron core, hollowing it out rather than reducing its size from the surface. Our observations contrast with the core diameters found (or calculated) for artificial horse spleen ferritins.<sup>10</sup> Thus, diameters of 5.6, 4.4, 3.9, and 2.8 nm were measured by TEM for synthesized ferritin containing 2000, 1000, 500, and 250 iron atoms, respectively. Another group that studied the apoferritin remineralization process reported diameters of 6.5 and 2.6 nm for cores with 2000 and 500 iron atoms.<sup>11</sup> Discrepancies between the present data and previous reports<sup>9,10</sup> reflect differences between ferritin cores obtained by artificially oxidative reconstitution of apoferritin and those obtained by iron removal reduction of native ferritin.

**SAXS Study.** Samples were studied by Small Angle X-ray Scattering. The method is based on the size and shape specificity of the scattering pattern of electromagnetic waves dispersed by electron density inhomogeneities in the sample. Figure 2 shows the PDFs (Pair Distribution Functions) obtained after regularized Fourier Transform of the scattering patterns obtained for Ft<sub>500</sub>, Ft<sub>1200</sub>, and Ft<sub>2200</sub>.

Chemical reduction induced dramatic changes in the PDFs corresponding to the iron release process. Initially, little change was observed in the position of the first maximum at  $R \approx 40$  Å, and there was no definite tendency. However, systematic reduction in the amplitude of the curve at  $R \approx 40$  Å was accompanied by a simultaneous increase in the intensity at  $R \approx 90$  Å. This behavior was also reflected in a shift in the mean  $R$  value from 44.3 Å in Ft<sub>2200</sub> to 54.1 Å in Ft<sub>500</sub>. It should be mentioned that the PDFs signal around 40 Å is dominated by the pair distances arising from the electronic density of the inorganic core, whereas the intensity of the PDFs curve around 90 Å is dominated by the electronic density of the protein shell. Keeping in mind that the PDFs curves presented in Figure 2 were normalized using the area below the curve between 0 and 130 Å, the increase of the signal at 90 Å reflects the fact that

a reduction of the core should be accompanied by the relative increase (because of the normalization) of the, otherwise low, shell signal. As previously stated, two possible iron release mechanisms can be proposed. Either iron atoms are reduced and extracted from the surface of the particle as can be expected for a compact defect-free particle or the atoms are extracted from within as expected for defective particles. Both mechanisms have well-defined signatures in the PDFs due to their different effects on the core structure. Whereas removal from the core surface produces a nucleus with a smaller size but constant excess electron density, depletion of occluded iron reduces the excess electron density of the core but keeps its size almost unchanged.

To obtain a deeper understanding of the structural aspects of the iron release mechanism, a low-resolution bead model of Ft<sub>2200</sub>, Ft<sub>1200</sub>, and Ft<sub>500</sub> was produced using the simulated annealing method implemented in the program DAMMIN.<sup>12</sup> From the structural file produced by DAMMIN, the center of mass of the particle was determined and the bead-counting histogram was calculated for each structure.

Figure 3 shows the normalized bead count histograms for Ft<sub>2200</sub>, Ft<sub>1200</sub>, and Ft<sub>500</sub>, respectively. The vertical line indicates the (nominal) position for the inner ( $R \approx 40$  Å) radius of the apoferritin shell. Red bars in the histogram represent the bead count for the inorganic oxide core ( $R < 40$  Å), and green bars correspond to the bead count for the protein shell ( $R > 40$  Å). A close inspection of the histograms in Figure 3 suggests the existence of holes inside the inorganic core. The release of iron from Ft<sub>2200</sub> to Ft<sub>1200</sub> mostly induces a reduction of the core density. The external core radius remains unchanged and the "internal core hole" slightly increases suggesting that the reductive demineralization does not proceed from the core surface but from within the particle. Further release of iron from Ft<sub>1200</sub> to Ft<sub>500</sub> proceeds in a similar fashion, although in this case an increase in the inner hole and a retreat of the outer surface of the core is also apparent, suggesting that both mechanisms (removal of iron from surface and from cavity) may be operative, which would explain the small variation in particle size, (5.9 to 5.7 nm) observed by TEM (Figure 1).

**XANES Study.** X-ray Absorption Spectroscopy (XAS) is a valuable tool for studying the electronic structure and local environment of specific atoms within a molecule or solid. The region extending up to  $\sim 100$  eV above the absorption threshold, usually called XANES, is dominated by multiple scattering processes between the photoelectron and its atomic environment and electronic transitions between the core level and empty bound states. In previous DXAS-XANES studies, Theil et al.<sup>13</sup> determined the rate of iron reduction in horse spleen ferritin and postulated that the ferritin core had a heterogeneous chemical and crystal structure. Recently, Quintana et al.<sup>4,6</sup> confirmed the polyphasic nature of the ferritin core. The aim in the present study was to construct a model of the phase distribution in the ferritin core using the highly sensitive XANES technique.

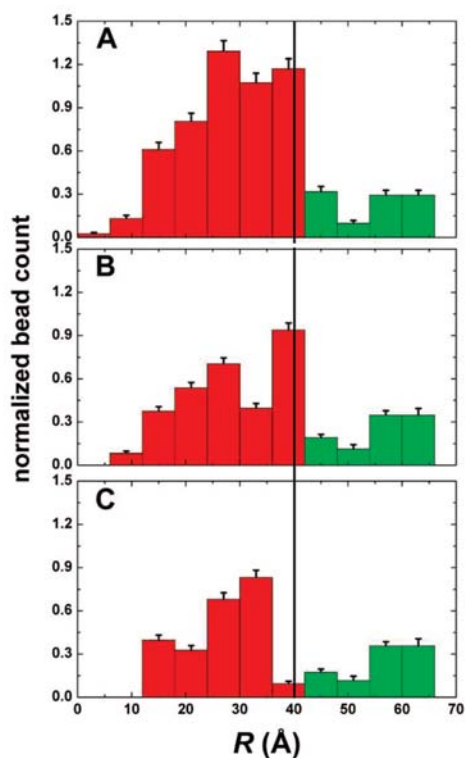
XANES on Ft<sub>200</sub>, Ft<sub>500</sub>, Ft<sub>1200</sub>, and Ft<sub>2200</sub> as well as those of the reference compounds ferrihydrite, magnetite, and hematite were measured under the same experimental conditions. The resulting spectra were used for linear combination fits (using the procedure implemented in the program ATHENA from the

(10) Gider, S.; Awschalom, D. D.; Douglas, T.; Mann, S.; Chaparala, M. *Science* **1995**, *268*, 77–80.

(11) Liu, G.; Debnath, S.; Paul, K. W.; Han, W.; Hausner, D. B.; Hosein, H.-A.; Michel, F. M.; Parise, J. B.; Sparks, D. L.; Strongin, D. R. *Langmuir* **2006**, *22*, 9313–9321.

(12) Svergun, D. I. *Biophys. J.* **1999**, *76*, 2879–2886.

(13) Joo, M.-S.; Tourillon, G.; Sayers, D. E.; Theil, E. C. *Biometals* **1990**, *3*, 171–175.

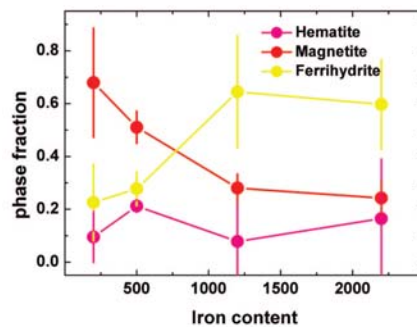


**Figure 3.** Normalized bead-count-histograms constructed from low resolution models of Ft<sub>200</sub> (panel A), Ft<sub>100</sub> (panel B), and Ft<sub>50</sub> (panel C) obtained from SAXS experiments using the DAMMIN program (see text). Green bars correspond to the volume expected to be occupied by the protein shell ( $R > 40$  Å), and red bars ( $R < 40$  Å) correspond to the volume expected to be occupied by the inorganic core.

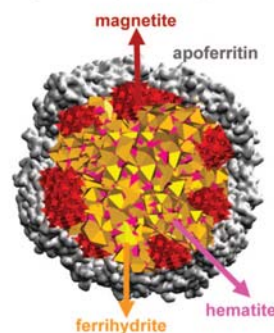
IFFEFIT package, between  $-20$  and  $+80$  eV around the absorption threshold; please see Supporting Information) to obtain the fraction of each iron oxide phase present in every ferritin sample. Figure 4 shows the fraction distribution in each sample for different degrees of iron removal. Error bars for the populations in Figure 4 were obtained measuring five independent spectra for each iron content and averaging the populations obtained for each independent spectrum. As iron was removed, the relative amount of magnetite (red) rose steadily from  $\sim 20\%$  to  $\sim 70\%$  and the percentage of ferrihydrite (yellow) fell from  $\sim 60\%$  to  $\sim 20\%$ . These results confirm the heterogeneous structure of the ferritin core.

Taken together, TEM, SAXS, and XANES findings suggest a ferrihydrite-enriched core with a surface predominantly formed by magnetite (Figure 5). Moreover, with this core-shell structure in mind, the present comparative study of ferritin cores with gradual reduction of their iron contents indicates that, as expected, the ferrihydrite phase is more labile to chemical reduction and mobilization compared with the magnetite phase.

**EELS Study.** Spatially resolved EELS was used to probe the iron oxidation state distribution across individual nanoparticles. In



**Figure 4.** Phase distribution for ferritin samples with different iron content (200–2200 atoms) obtained from XANES experiments (see text). Purple (hematite), red (magnetite), and yellow (ferrihydrite).



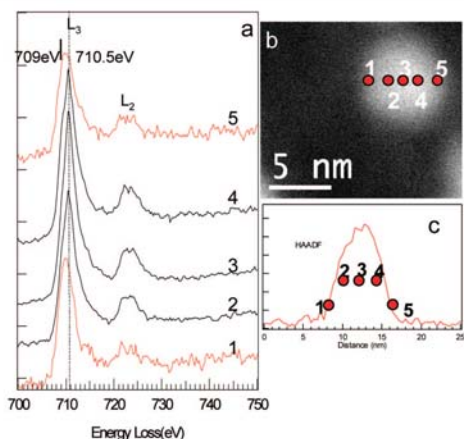
**Figure 5.** Schematic core-shell ferritin iron core structure.

particular, a qualitative analysis of the FeL<sub>2,3</sub> edge fine structures allowed us to distinguish between iron(II) and iron(III).

We analyzed a series of nanoparticles corresponding to the sample Ft<sub>50</sub> using the so-called Spectrum-Line (SL) technique. In this experimental approach, a collection of EEL spectra is sequentially acquired while a fine (usually in the order of a few angstroms) electron probe is scanned along a predefined path on the sample. In this study, 64 spectra were acquired with a  $0.5$  nm probe, a  $0.4$  nm step between spectra, an energy dispersion of  $0.3$  eV, and an acquisition time of  $1$  s per spectrum. These experimental conditions give access to energy and spatial resolutions of  $0.5$ – $0.7$  eV and  $0.5$ – $1$  nm, respectively.

Figure 6 shows representative results of this EELS-SL study. The High Angle Dark Field (HADF) image shows one of the Ft<sub>50</sub> particles (Figure 6b). The intensity line profile (Figure 6c) shows the HAADF variation along the particle, a signal that can be related to the projected sample mass. Figure 6a illustrates five spectra extracted from a spectrum line, with red points indicating the locations where the electron energy loss spectra were acquired. Positions 1 and 5 correspond to the surface of the particle, i.e., thinner regions, and positions 2, 3, and 4, to inner, bulk, sites. Figure 6a depicts the changes of the EEL spectra in the energy loss region of FeL<sub>2,3</sub> edges. Note how the position of the L<sub>3</sub> peak shifts slightly from the surface to the bulk. Thus, the peak is situated at  $709.9$  eV in spectra acquired at the surface (points 1 and 5) and at  $710.5$  eV in those recorded inside the particle (points 2–4). This change





**Figure 6.** (a) EEL spectra in the energy loss region of Fe $L_{2,3}$  edges. 1 and 5 correspond to the surface of the particle (the thinner regions), and 2, 3, and 4, to inner bulk sites. (b) A representative Ft<sub>500</sub> particle (red points mark the locations where the electron energy loss spectra were acquired). (c) Intensity line profile variation along the particle shown in image b.

in the fine structure of the spectra correlates with a change in the oxidation state of iron. According to Gloter et al.,<sup>14</sup> the  $L_3$  line displays a maximum at 709 eV for iron(III) species, while a shift toward a high energy value (710.5 eV) is observed for iron species. Consequently, our EELS results clearly evidence the presence of a higher fraction of iron(II) species at the surface of the ferritin cores.

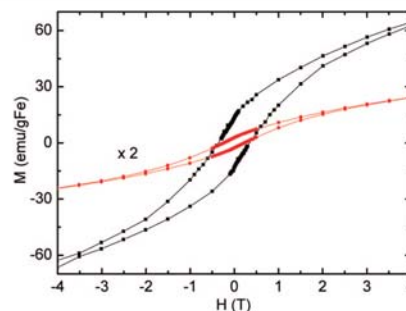
These results contrast with findings of previous electron nanodiffraction studies, which found no differences in structure at the surface of the ferritin core in comparison with bulk.<sup>4</sup> In this context, it should be noted that Cowley et al.<sup>4</sup> used commercial horse spleen, usually containing about 2000 Fe atoms, whereas we used a batch of horse spleen ferritins in which iron was gradually removed from 2200 to 200 iron atoms. The comparative structural study of these samples (Ft<sub>2200</sub>, Ft<sub>1200</sub>, Ft<sub>500</sub>, and Ft<sub>200</sub>) allowed us to gain an insight into differences between the core and shell ferritin structure. Specifically, the EELS study of Ft<sub>500</sub> indicated the existence of an iron(II)-enriched shell, which would not be evident in a ferritin containing 2000 Fe atoms, in which the mixed iron(II)–iron(III) phase shows an appreciably lower percentage.

**SQUID Magnetic Study.** The presence of a polyphasic structure in the ferritin core is consistent with recently reported magnetic studies on native ferritin.<sup>15</sup> Changes in the composition of the ferritin iron mineral during iron removal, especially the increase in magnetite, would affect the magnetic properties due to the high spontaneous magnetization and low coercivity of magnetite. The iron core of native ferritin containing about 2200 Fe atoms is antiferromagnetic below 140 K but has a net magnetic moment arising from uncompensated iron spins, largely at the surface of the core.<sup>7,16</sup> This ferritin behaves as a

(14) Gloter, A.; Douiri, A.; Tence, M.; Colliex, C. *Ultramicroscopy* **2003**, *96*, 385–400. (b) Gloter, A.; Zbinden, M.; Guyot, F.; Gaill, F.; Colliex, C. *Earth Planet. Sci. Lett.* **2004**, *222*, 947–957.

(15) Brem, F.; Stamm, G.; Hirt, A. M. *J. Appl. Phys.* **2006**, *99*, 123906.

(16) Barco, L. F.; Hernández, E.; Remiro, J. M.; Bartolomé, E.; Tejada, J. *Phys. Rev. B* **1999**, *59*, 11837.



**Figure 7.** Hysteresis loop of magnetization per Fe atom of the lyophilized samples Ft<sub>200</sub> (red) and Ft<sub>2200</sub> (black). The magnetization values of Ft<sub>2200</sub> were multiplied by 2 for clarity.

superparamagnet above 20 K with a marked hysteresis loop of magnetization below this blocking temperature. The magnetic behavior of Ft<sub>300</sub> (70% magnetite, 20% ferrihydrite, 10% hematite) was studied and compared with that of Ft<sub>2200</sub> (60% ferrihydrite, 20% magnetite and 20% hematite). A marked contrast between Ft<sub>300</sub> and Ft<sub>2200</sub> is observed in the variation of the magnetization with field at low temperature (2 K) (figure 7). The Ft<sub>2200</sub> has a magnetic behavior characteristic of an antiferromagnet as ferrihydrite, with high coercivity and low spontaneous magnetization, while the Ft<sub>200</sub> exhibits higher remanence and higher spontaneous magnetization values, more typical of a ferrimagnetic magnetite phase.

**Iron Removing Study.** The presence of mixed ferric–ferrous iron oxide phases, e.g., magnetite in the ferritin cores of patients with Alzheimer’s disease, has been proposed as a cause of increased brain concentration of ferrous toxic iron. Although dissolution of iron from the ferritin core experimentally requires reduction of iron(III), the presence of iron(III)–iron(II) mineral phases does not ensure spontaneous ferrous delivery from the ferritin core. We studied the spontaneous release of iron(II) from the ferritin samples (Ft<sub>2200</sub>, Ft<sub>1200</sub>, Ft<sub>500</sub>, and Ft<sub>200</sub>) by incubating the ferritin with excess ferrozine at pH 7.4. Formation of the iron(II)–ferrozine complex was monitored by the appearance of its characteristic UV–visible band at 562 nm. No sample showed a significant increase in absorbance values at 562 nm. As an example, in the experiment with Ft<sub>500</sub>, a concentration of  $4 \times 10^{-6}$  M was estimated from the absorbance value of 0.117 at 562 nm of the UV–visible spectrum and considering an extinction coefficient of  $27\,900\text{ cm}^{-1}\text{ M}^{-1}$  for  $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{ferrozine})_3]$  at 562 nm.<sup>17</sup> Based on the corresponding initial iron concentration in the ferritin solution, it was calculated that only 0.26% of the iron was removed from ferritin after 200 min. Close values (0.15–0.56%) were obtained for the remaining samples. Therefore, it can be reported that ferritin does not spontaneously release iron, even in samples with a predominance of a mixed ferric–ferrous iron oxide phase, e.g., magnetite.

## Conclusions

The results collectively demonstrate that the native ferritin iron core consists of a polyphasic structure (ferrihydrite, magnetite, hematite) and that the proportion of each phase is changed by gradual iron removal, since ferrihydrite is more

(17) Linert, W.; Herlinger, E.; Jameson, R. F.; Kienzl, E.; Jellinger, K.; Youdim, M. B. H. *Biochim. Biophys. Acta* **1996**, *1316*, 160–168.

labile to chemical reduction and mobilization compared to the magnetite phase. For the first time, a ferrihydrite–magnetite core–shell model has been tested for the ferritin iron mineral by TEM, SAXS, XANES, EELS, and SQUID magnetic measurements. The core mainly corresponds to a ferrihydrite phase in ferritin with physiological values of 1000–2000 irons, while magnetite appears to be the predominant phase when ferritin iron content decreases below 500 Fe. Moreover, iron core size does not significantly vary with iron removal, because iron is removed from the more chemically labile ferrihydrite core, hollowing it out, rather than from the magnetite shell.

The core–shell structure, which determines variations in the properties (size, magnetism, NMR relaxometry, etc.) of ferritin cores with gradual iron removal, can be produced by the chemical procedure used to prepare the ferritin batch. Iron(III) is reduced to iron(II) in the core and then leaves the ferritin cavity and is trapped by 2,2'-bipyridyl. Some of the as-formed iron(II) may be retained in the ferritin cavity, as reported by Watt et al.<sup>18</sup> or some that is not complexed out of the cavity can again penetrate into and make contact and react with ferrihydrite to produce magnetite at the core surface. In this respect, it is important to note that ferrihydrite is a highly active mineral and known to be a precursor of more crystalline minerals as hematite.<sup>19</sup> A complete study of iron removal from ferritin in the absence of an iron(II) chelating ligand is in progress to demonstrate this hypothesis.

If magnetite is related to the free iron(II), the presence of magnetite in patients with Alzheimer's disease would not be a cause but a consequence of anomalies in the ferritin iron removal process. In the present paper, we have demonstrated that the presence of magnetite is not a source of free toxic iron(II).

### Experimental Section

**Preparation of Ferritin Samples.** Horse spleen ferritin (lot 083K7051) was obtained from Sigma-Aldrich and exhaustively dialyzed against mill-Q water using a Spectra/Por Float-A-Lyzer with a molecular weight cutoff (MWCO) of 300 000 Da before use. The ferritin samples were prepared by partial core reduction of the commercially available ferritin (Ft<sub>2200</sub>), using controlled thioglycolic acid/sodium acetate amount and reaction time in presence of 2,2'-bipyridyl (0.3 M).<sup>7</sup> After treatment, ferritin solutions were exhaustively dialyzed for 4 days at 4 °C with several changes of milli-Q water.

Atomic absorption analysis of the ferritin samples directly yielded iron concentrations, and apoferritin concentrations were determined on fully demetallated samples by a Lowry total protein micromethod assay (Sigma diagnostic) and confirmed by UV–visible absorbance at 280 nm ( $\epsilon^{280} = 468\,000\text{ cm}^{-1}\text{ M}^{-1}$ ). An iron/apoferritin ratio of 2200, 1200, 500, and 200 was obtained for the respective ferritin samples Ft<sub>2200</sub>, Ft<sub>1200</sub>, Ft<sub>500</sub>, and Ft<sub>200</sub>. Note that the apoferritin concentration remains unaltered after iron removal.

**Iron-Release Assays.** Ferritin (2 mL, 38 mg/mL) in 0.15 M NaCl was incubated at room temperature with ferrozine (3-(2-pyridyl)-5,6-bis(4-phenyl-sulfonic acid)-1,2,4-triazine (2 mM) at pH 7.4 (0.1 M TRIS, 0.1 M NaCl). Experiments were carried out in aerobic conditions. Development of the iron(II)-ferrozine complex was monitored spectrophotometrically at 562 nm, using  $\epsilon^{562} = 27\,900\text{ cm}^{-1}\text{ M}^{-1}$ . Twenty 10-min cycles were recorded in a Thermo-spectronic UV300 spectrophotometer against reference solutions containing appropriate amounts of buffer-saline and ferrozine. The

iron released from ferritin was expressed as a percentage of the iron–ferrozine formed and the initial ferritin iron concentrations.

**Electron Microscopic Study.** Samples used for the transmission electronic microscopy (TEM) study were prepared by placing a drop onto a carbon-coated Cu grid and drying it in a glovebox. Electron micrographs were taken with a Philips CM-20 HR analytical electron microscope operating at 200 keV. Electron Energy-Loss Spectra (EELS) were recorded in the VG-HB501 dedicated STEM at Orsay, working at 100 kV and using a 15 mrad convergence semiangle and 24 mrad collection angle. The spectrum line (SL) mode was used: this approach consists in acquiring a series of 64 EELS spectra while a 0.5 nm beam with a current of 0.1–0.3 nA is scanned along the sample. The high angle, dark field, scattered intensity signal (HADF) was also simultaneously collected at each point within the scanned area. This approach allows correlating nanoanalytical and structural information of the region under study. The above-mentioned instrument allows the recording of electron energy loss spectra, with high signal-to-noise ratios, using acquisition times as small as 1 s on the L<sub>2,3</sub> Fe edge. This small total acquisition time avoids sample drift, which could eventually limit the spatial resolution of the measurements. At the same time, sample irradiation problems are also minimized under these conditions, thereby increasing the reliability of the analytical data. This method was applied to six particles, and a high reproducibility of EELS was found, indicating that the particles are homogeneous and ruling out a possible system in which apoferritin molecules mostly contain ferrihydrite and the others magnetite.

**Magnetic Measurements.** Magnetic susceptibility measurements were performed on lyophilized samples using a magnetometer (Quantum Design MPMS-XL-5) equipped with a SQUID sensor. Variable-temperature measurements were carried out in the temperature range 2–300 K.

**SAXS Measurements.** SAXS experiments were performed in the D11A-SAXS1 experimental station of the National Synchrotron Light Laboratory, Campinas, Brazil. All experiments were performed at constant temperature (22 °C) using a circulating water bath. The incident wavelength was set at 1.448 Å, and the sample-to-detector distance, at 1066 mm. The scattering pattern was detected using a gas-filled 1D detector. Each spectrum was obtained as the average of at least five independent spectra. Corrections for beam intensity, sample absorption, and buffer scattering were performed following standard procedures. The Pair Distribution Function (PDF) was extracted from the scattering profiles using the regularized Fourier Transform method implemented in the GNOM 4.51 program.<sup>20</sup>

**XAS Measurements.** X-ray Absorption Spectroscopy (XAS) is a valuable tool for the study of the electronic structure and local environment of specific atoms within a molecule, cluster, or solid. The region extending up to ~100 eV above the absorption threshold, usually called XANES, is dominated by multiple scattering processes between the photoelectron and its atomic environment and electronic transitions between the core level and empty bound states. XAS measurements were performed in the D04B-XAFS1 experimental station of the National Synchrotron Light Laboratory, Campinas, Brazil.

The sample was prepared by mixing a 2 mg ferritin sample with 10–15 mg of boron nitride. After gentle and careful mixing, the sample was compacted to less than 1 mm.

The average iron concentration within the sample was calculated to be 0.1–0.2 g cm<sup>-3</sup>. Samples were exposed for ~30 min to the radiation beam, and typically, five independent frames were acquired for each sample. Visual inspection of first and last data frames ruled out the occurrence of radiation damage. The experiments were performed using a Si220 channel cut monochromator with a calculated energy resolution (at 7112 eV including experimental resolution and natural line width) of ~1.5 eV. All experiments were performed at room temperature (~22 °C) in transmis-

(18) Jacobs, D. L.; Watt, G. D.; Frankel, R. B.; Papaefthymiou, G. C. *Biochemistry* **1989**, *28*, 1650–5.

(19) Schwertmann, U.; Friedl, J.; Stanjek, H. J. *Colloid Interface Sci.* **1999**, *209*, 215–223.

(20) Svergun, D. J. *Appl. Crystallogr.* **1992**, *25*, 495–503.

sion mode using a metallic iron foil for energy calibration and individual spectra alignment. Reference samples were prepared by deposition onto 5  $\mu\text{m}$  cellulose filtering membranes to achieve uniform sample width. All chemicals were purchased from Aldrich and used without further purification or prepared (ferrihydrite) following the procedures described in the literature.<sup>21</sup> Data reduction and analysis were performed using the IFEFFIT package.<sup>22</sup>

**Acknowledgment.** We are grateful to the MEC (project CTQ2006-02840) and Junta de Andalucía (Proyecto Excelencia FQM-02525) for financial support. N.G. and S.T. thank the MEC for a research contract (Ramón y Cajal program). The authors acknowledge financial support from the France-Spain Bilateral Project HF2005-0046 and the EU under the Framework 6 program under a contract for an Integrated Infrastructure Initiative, Ref. 026019 ESTEEM. M.C. is a staff member of CONICET, Argentina

(21) Towe, K. M.; Bradley, W. F. *J. Colloid Interface Sci.* **1967**, *24*, 384–392.

(22) Newville, M. *J. Synchrotron. Radiat.* **2001**, *8*, 322–324.

and professor at the Universidad Nacional del Noroeste de Buenos Aires, Argentina. The authors also acknowledge Laboratorio Nacional de Luz Sincrotron, Campinas, Brazil, for partial financial support (Projects D11A-SAXS1-4172 and D04B-XAFS1-4581). M.C. acknowledges partial financial support from CONICET, Argentina.

**Supporting Information Available:** Figure SM1: Stained (uranyl acetate) TEM image of the ferritin sample containing 500 Fe atoms. Figure SM2: (Upper panel) Average XANES spectra obtained for different iron contents (see the legend inside the figure); (Lower panel) residual of the least-squares fit (black, Ft<sub>200</sub>; red, Ft<sub>1200</sub>; green, Ft<sub>500</sub>; blue, Ft<sub>200</sub>). Figure SM3: XANES data for the reference compounds (ferrihydrite, magnetite, and hematite). This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

JA800492Z





## Note

## Red and blue ferritin nanomagnets by dye-labeling to the protein shell

Belén Fernández <sup>a</sup>, Natividad Gálvez <sup>a,\*</sup>, Purificación Sánchez <sup>a</sup>, Julia Morales <sup>b</sup>,  
Francisco Santoyo <sup>b</sup>, Rafael Cuesta <sup>c</sup>, José M. Domínguez-Vera <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Química Inorgánica, Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, 18071 Granada, Spain

<sup>b</sup> Departamento de Química Orgánica, Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, 18071 Granada, Spain

<sup>c</sup> Departamento de Química Inorgánica y Orgánica, E.P.S. de Linares, 23700 Linares, Spain

Received 20 November 2006; received in revised form 29 January 2007; accepted 5 February 2007

Available online 21 February 2007

Paper presented in the MAGMANet-ECMM, European Conference on Molecular Magnetism.

---

**Abstract**

We report a flexible route to chemically modify the ferritin nanomagnet. Two dye-labeled ferritins (red- and blue-ferritin) have been prepared by covalently coupling the derivatives of the reactive orange 16 and Remazol brilliant blue R, respectively, to the ferritin surface lysine residues. The study of the particles by transmission electron microscopy showed that the native iron core ferritin remains intact after chemical functionalization of the protein shell. Likewise, magnetic measurements showed that the superparamagnetic properties of the iron core are preserved.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Nanomagnet; Ferritin; Metallic nanoparticles; Organic dye

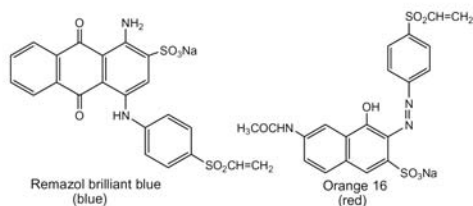
---

**1. Introduction**

One of the main challenges in nanoscience is to build multifunctionality in a nanostructure, for example, combining two or more physical properties in a nanoparticle. Among the bifunctional nanostructures, the preparation of magnetic optical nanoparticles is of special significance. Magnetic nanoparticles have been suggested for a great number of applications as new magnetic devices in high-density magnetic data storage [1], as magnetic carriers for bioseparation [2–4], labeling of cells [5] and contrast-enhancing media [6–8]. Incorporation of optical functionality to magnetic nanoparticles is of considerable value in numerous areas, especially in the biomedical one [9–11]. A common route for the preparation of magnetic optical particles is the incorporation of functionalized groups to

magnetic nanoparticle surfaces, which are used in a second step to couple an organic dye [12–19]. This strategy can be extrapolated to ferritin, a natural nanomagnet. The structure of the native horse spleen ferritin (the most used ferritin) consists of a spherical protein shell composed of 24 subunits surrounding an iron(III) mineral core, usually described as ferrihydrite. The organic shell is remarkably stable to thermal and chemical degradation. Moreover, the existence of lysine residues located at the external ferritin shell offers opportunities to chemically modify the ferritin particle with different aims. In this sense, we have succeeded in covalently coupling the organic dyes (Scheme 1), reactive orange 16 (a red dye) and Remazol brilliant blue R (a blue dye) to apo- and ferritin, thus obtaining the four combinations (red- and blue- with apo- and ferritin). Dyes were previously adapted to be reactive with the exposed amine groups of the ferritin shell by incorporation of vinyl sulfone groups (see Section 2). Transmission electron microscopic (TEM) and magnetic measurement studies of the dye-ferritins showed that the magnetic ferritin

\* Corresponding authors. Fax: +34 958 248526 (J.M. Domínguez-Vera).  
E-mail address: [josema@ugr.es](mailto:josema@ugr.es) (J.M. Domínguez-Vera).



Scheme 1. Structure of the vinyl sulfone derivative dyes.

iron core remains structurally intact after covalent attachment of the dyes.

## 2. Experimental

### 2.1. Preparation of the derivative dyes Remazol brilliant blue R (blue) and reactive orange 16 (red)

Dyes were purchased from Acros Organics. Remazol brilliant blue (2 g) was dissolved in water (40 ml) and NaOH (1 M, 1.45 ml) was dropwise added to reach a pH of 11.4. The reaction mixture was stirred at room temperature for 3 h and then neutralized with HCl (5%) up to pH 7.6. The solution was kept overnight at 4 °C. The formed precipitate was collected by filtration, washed with water and ethanol (75%). The solid was dried at 60 °C under vacuum. Yield: 79%.

A similar procedure was used to obtain the reactive orange 16 derivative.

### 2.2. Coupling of dyes to apo- or ferritin

2 ml of a 1 mg/ml solution of horse spleen ferritin (Sigma lot 083K7051, 2000 Fe/ferritin) in HEPES buffer, pH 8.0, mixed with 5 mg of dye was incubated for 24 h at room temperature. Excess of dye was removed by exhaustive dialysis using a Spectrapor 100 kDa molecular weight cut-off (MWCO) dialysis membrane (SpectrumLabs) against Milli-Q water for 2 days. The resulting solutions were chromatographed (Sephadex G-25) and the ferritin-containing fractions isolated. The purity and stability of the dye-protein were assessed by native PAGE. Gels were stained for protein for 1/2 h using 0.1% Coomassie Blue in fixative 40% MeOH/10% HOAc. The gels were destained by treatment with 40% MeOH/10% HOAc to remove the background during 3 h.

### 2.3. Physical measurements

Thermospectronic UV300 spectrophotometer was used for UV-Vis measurements. The samples used for TEM study were prepared by diluting the resulting solutions with Milli-Q water and then placing a drop onto a carbon-coated Cu grid and drying it in air at room temperature.

Electron micrographs were taken with a Philips CM-20 HR analytical electron microscope operating at 200 keV. Magnetic susceptibility measurements were performed on evaporated samples using a magnetometer (Quantum Design MPMS-XL-5) equipped with a SQUID sensor. Variable-temperature measurements were carried out in the temperature range 2–300 K.

## 3. Results and discussion

Commercial reactives orange 16 and Remazol brilliant blue R dyes were chemically modified by direct elimination of their *O*-sulfate groups, leading to the corresponding vinyl sulfone derivatives (Scheme 1). The UV-Vis spectra of the vinyl sulfone derivatives are similar to the starting dyes, showing characteristic bands at 495 and 596 nm, with extinction coefficients of 10000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> and 21000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>, for red and blue, respectively.

Apo- or ferritin and dye were incubated at pH 8 for 24 h. The resulting solutions were exhaustively dialyzed against Milli-Q water for two days to remove the unreacted dye. The solutions were analyzed by size exclusion chromatography. Apo- or ferritin and dyes were monitored by UV-Vis spectroscopy at 280 nm (protein) and 495 nm (red) and 596 nm (blue). The coelution of protein and dye (Fig. 1) indicates that both are attached.

In addition, native and dye-labeled apoferritins (or ferritins) were electrophoretically analyzed on polyacrylamide gel (PAGE), under native (non-denaturing) conditions (Fig. 2). The co-migration of the samples (native and labeled-apoferritins) indicates first that the protein (apo- or ferritin) remained intact after reaction with dyes and second that the dyes are really bounded to the protein.

UV-Vis spectra of the red- and blue-apoferritins (or the red- and blue-ferritins) consist of the superposition of the two corresponding component spectrums (dye and protein), which indicates that UV-Vis spectra of dyes do not change after covalent coupling to the protein surfaces (Fig. 3). The spectra did not significantly change after three months, making evident a great stability of the red- and

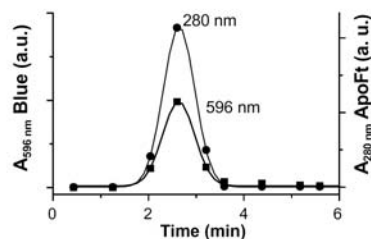


Fig. 1. Chromatography elution profile of the blue dye apoferritin. Protein and dye blue were monitored by the UV-vis absorbance at 280 (apoferritin – solid circles) and 596 nm (blue dye – solid squares). Similar coelution patterns were observed for the three other dye-labeled protein samples.

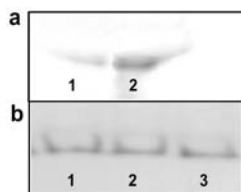


Fig. 2. Native polyacrylamide gel electrophoresis unstained (a) and stained (b) with Coomassie Blue. Lane 1 is red-dye apoferritin, lane 2 is blue-dye apoferritin and lane 3 is native apoferritin.

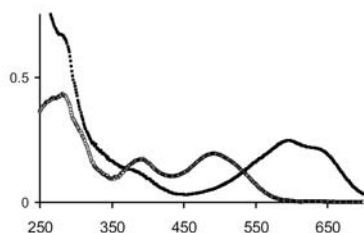


Fig. 3. UV-Vis spectra of the blue dye-apoferritin (solid squares) and the red dye-apoferritin (open circles) samples.

blue-coloured particles. The amount of dye per apo- of ferritin was determined by using absorbance values of the peak at 495 and 596 nm, for the red and blue dyes, respectively, and 280 nm for protein. Values of 22 red and 40 blue dyes per apo- or ferritin particles were obtained. The differ-

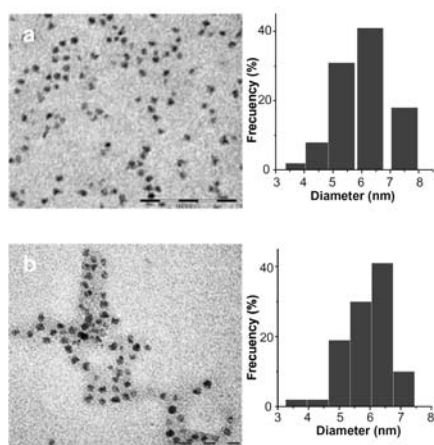


Fig. 4. TEM images (and size histograms) of the ferritin-dyes: (a) red- and (b) blue-ferritin.

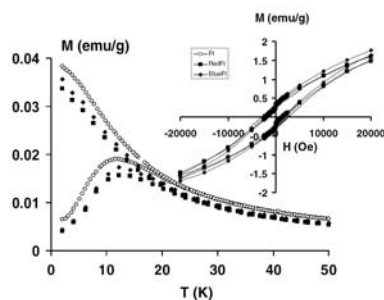


Fig. 5. ZFC and FC magnetization of the blue-(solid diamonds), red-(solid squares) and native ferritin nanoparticles (open circles). Inset: Hysteresis loop of magnetization of the blue-, red- and native ferritin at 5 K.

ence in the number of labeled dyes points out a more favourable access (due to shape, cross-section, charge) of blue than red dye to the protein surface.

Transmission electron microscopy images of the dye-ferritin samples are shown in Fig. 4. The particles average 5–6 nm in diameters and show no aggregation as for the native ferritin. These data strongly suggest that the ferritin iron core is structurally intact and that no degradation occurs during chemical functionalization of the protein shell.

Magnetization values per gram of the two labeled ferritin samples were found to be close to those of native ferritin within experimental uncertainty [20–22].  $M(T)$  and  $M(H)$  slightly decrease due to the presence of the non-magnetic dye-labeled on the surface of ferritin.

The temperature dependences of the zero-field-cooled (ZFC) and field-cooled (FC) magnetization of dye-ferritins are shown in Fig. 5 in comparison with those of the native ferritin. ZFC and FC curves coincide at high temperature and begin to separate as the temperature decreases, showing a maximum (in the case of the ZFC curve) at  $T_B = 12$  K. A consequence of the blocking of the magnetic moments below  $T_B$  is the existence of a marked hysteresis loop of magnetization with a coercitive field of 2400 G at 5 K. The shape of the hysteresis loop of magnetization is similar to that of native ferritin as it is evident from Fig. 5.

TEM and magnetic studies indicate that, as expected, functionalization of ferritin shell has a negligible effect on the magnetic properties of the core. This is therefore a simple and powerful route for chemically modifying the water soluble ferritin nanomagnet without losing its superparamagnetic properties.

#### Acknowledgements

Financial supports from the Spanish MEC (Project CTQ2005-07906) and Junta de Andalucía (Proyecto Excelencia FQM-00425) are gratefully acknowledged. N.G. thanks the Spanish MEC for a research contract (programa Ramón y Cajal).

## References

- [1] R.C. O'Handley (Ed.), *Modern Magnetic Materials*, Wiley, New York, 1999.
- [2] P.S. Doyle, J. Bibette, A. Bancaud, J. Viovy, *Science* 295 (2002) 2237.
- [3] H. Gu, P. Ho, K.W.T. Tsang, L. Wang, B. Xu, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 15702.
- [4] D. Wang, J. He, N. Rosenzweig, *Z. Rosenzweig, Nano Lett.* 4 (2004) 409.
- [5] J.M. Perez, F.J. Simeone, Y. Saeki, L. Josephson, R. Weissleder, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 10192.
- [6] E.X. Wu, H. Tang, K.K. Wong, J. Wang, *J. Magn. Reson. Imaging* 19 (2004) 50.
- [7] S.H. Koenig, K.E. Kellar, *Acad. Radiol.* 3 (1996) 273.
- [8] D.K. Kim, Y. Zhang, J. Kehr, T. Klasson, B. Bjelke, M. Muhammed, *J. Magn. Magn. Mater.* 225 (2001) 256.
- [9] F. Bertorelle, C. Wilhelm, J. Roger, F. Gazeau, C. Manager, V. Cabuil, *Langmuir* 22 (2006) 5385.
- [10] P.N. Prasad, *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* 446 (2006) 1.
- [11] D. Ma, J. Guan, F. Normandin, S. Denomme, G. Enright, T. Veres, B. Simard, *Chem. Mater.* 18 (2006) 1920.
- [12] M. Mikhaylova, D.K. Kim, C.C. Berry, A. Zagorodni, M. Toprak, A.S.G. Curtis, M. Muhammed, *Chem. Mater.* 16 (2004) 2344.
- [13] I. Koh, X. Wang, B. Varughese, L. Isaacs, S.H. Ehrman, D.S. English, *J. Phys. Chem. B* 110 (2006) 1553.
- [14] Y. Sahoo, A. Goodarzi, M.T. Swihart, T.Y. Ohulchansky, N. Kaur, E.P. Furlani, P.N. Prasad, *J. Phys. Chem. B* 109 (2005) 3879.
- [15] S. Santra, P. Zhang, K. Wang, R. Tapeç, W. Tan, *Anal. Chem.* 73 (2001) 4988.
- [16] X. Zhao, R. Dytico, W. Tan, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 11474.
- [17] X. Zhao, L.R. Hillard, S.J. Merchery, Y. Wang, R.P. Bagwe, S. Jin, W. Tan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (2004) 15027.
- [18] S. Santra, K. Wang, R. Tapeç, W. Tan, *J. Biomed. Opt.* 6 (2001) 160.
- [19] J. Guo, W. Yang, Y. Deng, C. Wang, S. Fu, *Small* 1 (2005) 737.
- [20] C. Gilles, P. Bonville, K.K.W. Wong, S. Mann, *Eur. Phys. J. B* 17 (2000) 417.
- [21] M. Clemente, E. Coronado, A. Soriano, E. Colacio, J.M. Dominguez-Vera, N. Galvez, R. Madueno, M.T. Martín, *Langmuir* 22 (2006) 6993.
- [22] S.A. Makhlof, F.T. Parker, A.E. Berkowitz, *Phys. Rev. B* 55 (1997) R14717.



# Covalent deposition of ferritin nanoparticles onto gold surfaces

José M Domínguez-Vera<sup>1</sup>, Lorena Welte<sup>2</sup>, Natividad Gálvez<sup>1</sup>,  
Belén Fernández<sup>1</sup>, Julio Gómez-Herrero<sup>3</sup> and Félix Zamora<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Química Inorgánica, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, 18071 Granada, Spain

<sup>2</sup> Departamento de Química Inorgánica, Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, Spain

<sup>3</sup> Departamento de Física de la Materia Condensada, Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, Spain

E-mail: josema@ugr.es, felix.zamora@uam.es and julio.gomez@uam.es

Received 21 August 2007, in final form 31 October 2007

Published 6 December 2007

Online at [stacks.iop.org/Nano/19/025302](http://stacks.iop.org/Nano/19/025302)

## Abstract

Ferritin nanoparticles have been deposited immobilized onto a properly modified gold surface by specific covalent bonding through lysine rests at the ferritin external surface. Atomic force microscopy (AFM) images confirmed the existence of a single ferritin monolayer. This is an easy and flexible route to form stable ferritin networks, which are covalently fixed to a gold substrate.

 Supplementary data are available from [stacks.iop.org/Nano/19/025302](http://stacks.iop.org/Nano/19/025302)

(Some figures in this article are in colour only in the electronic version)

Ferritin, the iron-storage protein in biological systems, is a paradigmatic metallic nanoparticle. (i) Its structure consists of an organic coat (apoferritin) surrounding a 8 nm sized cavity, that can be fully or partially occupied by a hydrated iron(III) oxide, traditionally described as ferritihydrate [1]. (ii) Native ferritin behaves as a superparamagnet above 20 K, showing a marked hysteresis loop of magnetization below the blocking temperature [2]. (iii) By different procedures, the native iron mineral can be replaced by other biomimetic inorganic materials, such as metal oxyhydroxides [3], or non-biomimetic ones, such as zero-valent metals [4] or Prussian blue polymers [5]. (iv) The apoferritin shell offers great possibilities for incorporating diverse functionalities [6]. (v) And finally, the existence of the protein coat avoids metallic core agglomeration and causes the particles to be water soluble.

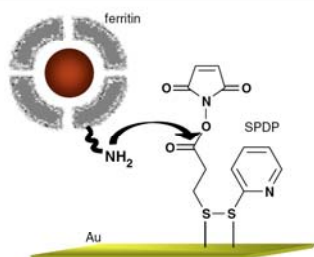
In view of the unique properties of ferritin, methods to obtain ferritin organized at surfaces have been intensely studied since they could be used in important applications in nanotechnology [7–10]. Most of these methods have been concerned with the adsorption of ferritin onto different substrates by electrostatic or hydrophobic interactions [7–11]. As for ferritin, other nanomagnets have also been deposited onto different substrates due to their potential applications as high-density information storage devices [12], the family of Mn<sub>12</sub> clusters being a genuine example [13]. Veciana *et al*

succeeded in encoding and reading out information from domains of Mn<sub>12</sub> patterned on a surface [14]. In this context, the use of ferritin for making this kind of magnetic device should be a good choice since it contains a much higher number of magnetic ions and exhibits superparamagnetic behavior at blocking temperatures higher than those observed in Mn<sub>12</sub> clusters (5 K).

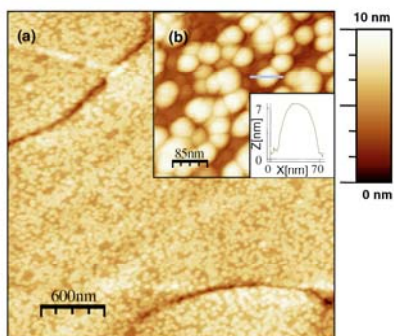
In this communication, we make use of the well-known recognition reaction between SPDP (*N*-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionate) and proteins [15], to deposit ferritin onto an SPDP-modified gold surface (see scheme 1).

The reaction between the activated ester of SPDP and amine groups belonging to lysine rests at the ferritin surface gives rise to chemical deposition of ferritins on the modified gold surface.

Horse spleen ferritin (Sigma) was exhaustively dialyzed and chromatographed (Sephadex G-25) to remove sodium chloride and possible free iron ions. SPDP was used as it was commercially available (Sigma). The Au-SPDP surface is formed upon treatment of a cleaned gold surface with a methanolic solution of SPDP (10 mM) for 5 min, washed with methanol then dried with a flow of argon. Then, the gold surfaces were immersed in a ferritin solution (1 mg ml<sup>-1</sup>) for 3 h, washed with water and dried using an argon flow (see supporting information available at



**Scheme 1.** Schematic representation of the reaction between amino groups at the external ferritin surface and SPDP adsorbed on the gold surface.

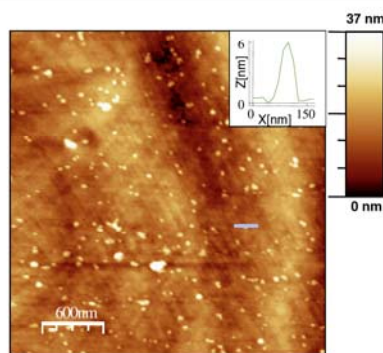


**Figure 1.** (a) AFM topography image of ferritin molecules deposited on a gold surface previously treated with a solution of SPDP. (b) An enlarged area showing typical particle organization and a height profile of a typical particle.

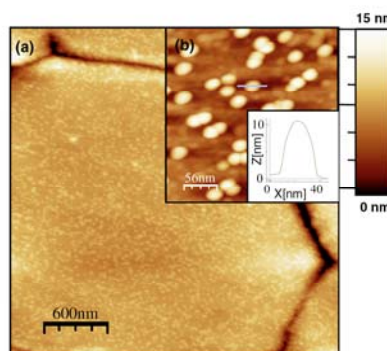
[stacks.iop.org/Nano/19/025302](http://stacks.iop.org/Nano/19/025302) for details). Finally the surface was imaged by atomic force microscopy (AFM) [16]. The images show characteristic gold terraces (figure 1) with a high density of particles, with few regions where the bare substrate can be seen (figure 1(a)). The particle height is found to be about 7 nm (figure 1(b)); an accurate height of  $6.5 \pm 0.7$  nm has been measured with lower particle coverage; see supporting information available at [stacks.iop.org/Nano/19/025302](http://stacks.iop.org/Nano/19/025302) for details). This value is in agreement with the heights measured by AFM for ferritin deposited on gold [17]. Based on this observation we infer that the AFM images are showing a single monolayer of ferritin molecules. This experiment suggests that SPDP-modified Au surfaces can be used as a suitable template for patterning ferritin.

In order to gain more information about the organization of these molecules, a solution of Ft-SPDP<sup>4</sup> was adsorbed on gold. However, in this case a much more inhomogeneous surface distribution of particles of variable height and low

<sup>4</sup> Ferritin ( $1 \text{ mg ml}^{-1}$ ) in PBS buffer, pH 8, was incubated with a methanolic solution of SPDP (20 mM, 1 ml) for 24 h. The resulting solution was exhaustively dialyzed against Milli-Q water to remove the excess of SPDP.



**Figure 2.** AFM topography image of Ft-SPDP molecules adsorbed on a gold surface.



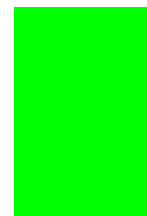
**Figure 3.** AFM topography image of ferritin molecules adsorbed on a gold surface (a) and (b) an enlarged area with the profile showing the height of a typical particle.

density is obtained (figure 2). This experiment suggests that the SPDP molecules self-assemble on the gold surface producing a well-ordered monolayer which is necessary for the subsequent organization of ferritin.

In addition, the selectivity in the adsorption of ferritin on the Au-SPDP surface can also be observed by comparing the results obtained by depositing ferritin molecules on gold. Thus, upon immersion of a gold surface on a ferritin water solution ( $1 \text{ mg ml}^{-1}$ ) for 3 h at  $25^\circ\text{C}$ , a large amount of inhomogeneous material is observed (figure S4 available at [stacks.iop.org/Nano/19/025302](http://stacks.iop.org/Nano/19/025302)).

Shorter adsorption times (1 h) lead to a partially covered surface of ferritin particles. Figure 3 shows particle heights larger than 8 nm ( $10.0 \pm 0.7$  nm, based on 50 particle measurements).

Since the typical height values are about 7 nm, [17], aggregation of several ferritin molecules is probably taking place, preventing the formation of well-ordered monolayers.



### Conclusions

Our method is useful for the fabrication of two-dimensional ferritin nanoarrays deposited onto a modified gold surface by a specific chemical reaction. This is the first example where assembly arose from a covalent chemical bonding between ferritin and the modified substrate. As commented on above, the current interest in the development of new ways to organize nanoparticles with magnetic properties makes this method very appealing for technological applications. This procedure may be transferable to other ferritins reconstituted with non-native inorganic materials. Work on this issue is currently in progress.

### Acknowledgments

Financial support by the MEC (project nos CTQ2006-02840, MAT2004-05589-C02-01/02, NAN2004-09183-C10-05/06, FP6-029192 and CTQ2006-027185-E), Comunidad de Madrid (project S-0505/MAT/0303) and Junta de Andalucía (Proyecto Excelencia FQM-00425) is gratefully acknowledged. NG thanks the Spanish MEC for a research contract (programa Ramón y Cajal).

### References

- [1] Harrison P M et al 1991 *Adv. Inorg. Chem.* **36** 449
- [2] Gilles C, Bonville P, Wong K K W and Mann S 2000 *Eur. Phys. J. B* **17** 417
- [3] Douglas T 1996 *Biomimetic Materials Chemistry* ed S Mann (New York: Wiley) pp 91–115 and references therein
- [4] Ueno T, Suzuki M, Goto T, Matsumoto T, Nagayama K and Watanabe Y 2004 *Angew. Chem. Int. Edn* **43** 2527
- [5] Domínguez-Vera J M and Colacio E 2003 *Inorg. Chem.* **42** 6983
- [6] Gálvez N, Sánchez P and Domínguez-Vera J M 2005 *Dalton Trans.* 2492
- [7] Uchida M et al 2006 *J. Am. Chem. Soc.* **128** 16626
- [8] Fernández B, Gálvez N, Sánchez P, Morales J, Santoyo F, Cuesta R and Domínguez-Vera J M 2007 *Inorg. Chim. Acta* **350** 3951
- [9] Cherry R J, Bjornsen A J and Zapfen D C 1998 *Langmuir* **14** 1971
- [10] Yamaki M, Matsubara K and Nagayama K 1993 *Langmuir* **9** 3154
- [11] Yoshimura H, Scheybani T, Baumeister W and Nagayama K 1993 *Langmuir* **10** 3290
- [12] Yoshinobu T, Suzuki J, Kurooka H, Moon W C and Iwasaki H 2003 *Electrochim. Acta* **48** 3131
- [13] Tominaga M, Ohira A, Yamaguchi Y and Kunitake M J 2004 *J. Electroanal. Chem.* **566** 323
- [14] Brito D W, Möbius D and Hlady V 2000 *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2** 4594
- [15] Clemente-León M, Coronado E, Soriano-Portillo A, Colacio E, Domínguez-Vera J M, Gálvez N, Madueno R and Martín-Romero M T 2006 *Langmuir* **22** 6993
- [16] Chudnovsky E M 1996 *Nature* **274** 938
- [17] Mannini M et al 2005 *Nano Lett.* **5** 1435
- [18] Cavallini M, Biscarini F, Gomez-Segura J, Ruiz D and Veciana J 2003 *Nano Lett.* **3** 1527
- [19] Fleury B, Catala L, Hue V, David C, Zhong W Z, Jegou P, Baraton L, Palacin S, Albouy P-A and Mallah T 2005 *Chem. Commun.* 2020
- [20] Clemente-León M, Soyer H, Coronado E, Mingotaud C, Gómez-García C J and Delhaes P 1998 *Angew. Chem. Int. Edn Engl.* **37** 2842
- [21] Cavallini M, Gómez-Segura J, Ruiz-Molina D, Massi M, Albonetti C, Rovira C, Veciana J and Biscarini F 2005 *Angew. Chem. Int. Edn* **44** 888
- [22] Carlsson J, Drevin H and Axen R 1978 *Biochem. J.* **173** 723
- [23] Horcas I, Fernandez R, Gomez-Rodriguez J M, Colchero J, Gomez-Herrero J and Baro A M 2007 *Rev. Sci. Instrum.* **78** 013705
- [24] Tominaga M, Soejima K, Matsumoto M and Taniguchi I 2005 *J. Electroanal. Chem.* **579** 51
- [25] Xu D, Watt G D, Harb J N and Davis R C 2005 *Nano Lett.* **5** 571



Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

Solid State Sciences xx (2008) 1–6

[www.elsevier.com/locate/ssscc](http://www.elsevier.com/locate/ssscc)

## Magnetic–fluorescent Langmuir–Blodgett films of fluorophore-labeled ferritin nanoparticles

Natividad Gálvez <sup>a,\*</sup>, Belén Fernández <sup>a</sup>, Purificación Sánchez <sup>a</sup>, Julia Morales-Sanfrutos <sup>b</sup>, Francisco Santoyo-González <sup>b</sup>, Rafael Cuesta <sup>c</sup>, Ruperto Bermejo <sup>d</sup>, Miguel Clemente-León <sup>e,f,\*\*</sup>, Eugenio Coronado <sup>c</sup>, Alejandra Soriano-Portillo <sup>c</sup>, José M. Domínguez-Vera <sup>a,\*,\*\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Química Inorgánica, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, 18071 Granada, Spain

<sup>b</sup> Departamento de Química Orgánica, Instituto de Biotecnología, Universidad de Granada, Facultad de Ciencias, 18071 Granada, Spain

<sup>c</sup> Departamento de Química Inorgánica y Orgánica, E.P.S. Linares, 23700 Linares, Spain

<sup>d</sup> Departamento de Química Física y Analítica, E.P.S. Linares, 23700 Linares, Spain

<sup>e</sup> Fundació General de la Universitat de València (FGUV), Universidad de Valencia, Polígono de la Coma s/n, 46980 Paterna, Spain

<sup>f</sup> Fundació General de la Universidad de Valencia, Spain

Received 21 May 2007; received in revised form 15 April 2008; accepted 25 April 2008

### Abstract

We have covalently coupled fluorophore 4-(2-hydroxyethoxy)-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD) to the external ferritin shell through lysine residues. An increase in the luminescence quantum yield of the fluorescent ferritin particles and a blue shift in its emission peak compared to individual fluorophore were observed. The study of the particles by transmission electron microscopy showed that the native iron core ferritin is intact and that no degradation occurs during chemical functionalization of the protein shell. The NBD-labeled ferritin particles are water soluble, which allowed their controlled deposition by the Langmuir–Blodgett (LB) technique. Superparamagnetic and fluorescent properties of the particles are preserved within the LB film.

© 2008 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

**Keywords:** Ferritin nanoparticles; Langmuir–Blodgett films; Magnetic properties; Fluorescent properties

### 1. Introduction

Magnetic nanoparticles are attracting considerable attention for their intriguing properties and potential applications as new magnetic devices in high-density magnetic data storage [1] and as biosensors [2]. In optical, electrical and magnetic devices, nanoparticles are mostly used in the form of thin films. Functionalization of these nanoparticles using molecular units may afford nanostructures with improved physical or chemical properties. In this context an interesting possibility is the

incorporation of fluorescence into a magnetic nanoparticle. The main drawback of most syntheses is that particles are soluble and photostable only in nonpolar solvents, which means that biological applications are hindered. In fact, only a few examples of water-soluble multifunctional nanoparticles have been reported [3].

Ferritin, the molecule that stores iron in biological systems, is one of the most paradigmatic biomaterials because of its iron biomineralization process, which has inspired the use of its cavity to produce a number of biomimetic ferritins reconstituted with non-native inorganic materials [4]. The native horse spleen ferritin (the most used ferritin) behaves as a superparamagnet above 20 K [5]. Its structure consists of a spherical protein shell composed of 24 subunits surrounding an iron(III) mineral core. The organic shell is remarkably stable to thermal and chemical degradations due to strong subunit–subunit interactions, a property

\* Corresponding author.

\*\* Corresponding author. Fundació General de la Universitat de València (FGUV), Universidad de Valencia, Polígono de la Coma s/n, 46980 Paterna, Spain.

\*\*\* Corresponding author.

E-mail address: [josema@ugr.es](mailto:josema@ugr.es) (J.M. Domínguez-Vera).



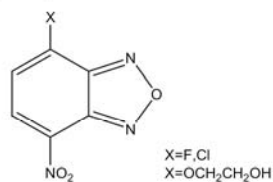
which offers broad applications for using the protein shell as a platform for incorporating diverse functionalities. Thus, native ferritin contains lysine and cysteine residues on the external surface that can be used to covalently couple molecules that can add a new functionality to the ferritin particle [6,7]. Therefore, we have made use of the lysine residues located at the external ferritin shell to couple the fluorophore: 4-(2-hydroxyethoxy)-7-nitro-2,1,3-benzoxa-diazole (NBD here after) (Scheme 1) for obtaining fluorescent ferritin particles. Transmission electron microscopy (TEM) and magnetic measurements showed that the magnetic ferritin iron core remains structurally intact after functionalization of the protein shell. An enhancement of the fluorescence and a blue shift in the emission peak of the fluorescent ferritin compared to individual fluorophore were observed. Fluorescent ferritin nanoparticles exhibit great water solubility due to the presence of the protein coat. This fact opens up the possibility of processing these systems. Thus, we have deposited these NBD-labeled ferritin particles in order to make a magnetic-fluorescent nanostructure, which could be a crucial step for possible applications. An elegant approach to arrange molecules into well-organized multilayered films is the Langmuir–Blodgett (LB) technique [8]. This technique provides homogeneous thin films with well-defined layered structure and a tunable thickness at a molecular level. LB films of these dual-function nanoparticles have been prepared, wherein the magnetic and optical properties can be studied in detail.

## 2. Experimental section

### 2.1. Samples preparation

The fluorophore was prepared according to a previously reported procedure [9].

For the coupling of NBD to ferritin two milliliters of a  $1 \text{ mg ml}^{-1}$  solution of horse spleen ferritin (Sigma lot 083K7051, 2000 Fe/ferritin) in 0.1 M HEPES buffer pH 8, mixed with 7 mg of NBD, corresponding to an addition of 160 M excess of fluorophore with respect to the total number of 72 exposed lysine residues on the protein shell, were incubated at different times, 2, 8, 14, 18, 24, 48, 72 and 100 h at room temperature. Excess of fluorophore was removed by dialysis using a Spectrapor 100 kDa molecular weight cut-off (MWCO) dialysis membrane (SpectrumLabs) against milli-Q water for 2 days. The iron concentration, measured by atomic absorption, before and after dye-labelling did not significantly change.



Scheme 1. Schematic structure of the fluorophores NBD-X.

For the coupling of NBD to lysine a total of 1.4 ml of a  $5.7 \times 10^{-3} \text{ M}$  solution of NBD mixed with 1 ml of a 0.5 M lysine solution, previously treated with  $\text{NaHCO}_3$  (125 mg), was incubated at room temperature. The pH of the solution was 8.1. The development of the compound was followed by UV–vis spectroscopy using a ThermoSpectronic UV300 spectrophotometer in the range 210–600 nm. The reaction was considered complete once the UV–vis spectra did not change with time (3 h). From the absorbance value at 475 nm and considering the concentration of the fluorophore, an extinction coefficient of  $23,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  was calculated for this band.

### 2.2. Samples Characterization

UV–vis spectroscopy was performed to determine the amount of fluorophore in the samples. The amount of NBD was determined from its absorbance at 475 nm (corrected by subtraction of the original ferritin spectrum), using the extinction coefficient calculated from the coupling of NBD with lysine. A ThermoSpectronic UV300 spectrophotometer was used for UV–vis measurements.

Fluorescence emission and excitation spectra were recorded on a Jasco FP-6500 spectrofluorometer (Kyoto, Japan). All spectra were recorded at room temperature. For the emission spectra, samples were excited at 470 nm with slit widths of 5 and 10 nm for both the excitation and emission monochromators. For the excitation spectra the emission was fixed at 542 nm using slits of 10 and 5 nm. The amount the NBD fluorophore bound to ferritin was chosen so that re-absorption of the emission was negligible.

Samples for transmission electron microscopy on carbon coated Cu grids, were imaged using a Philips CM-20 HR analytical electron microscope operating at 200 keV.

Magnetic susceptibility measurements were performed on evaporated samples using a magnetometer (Quantum Design MPMS-XL-5) equipped with a SQUID sensor. Variable-temperature measurements were carried out in the temperature range 2–300 K.

The modeling of the fluorophore-labeled lysines was based on the crystal structure of the  $\alpha$ -chain ferritin subunit. (PDB ID: 1IES) [10]. Since native horse spleen ferritin only contains about 15% of H subunits, we consider appropriate this model and its conclusions. Models were derived by bonding the fluorophore into the terminal amino group of lysine and minimizing the energy using the TINKER software [11]. The molecular mechanic minimizations were carried out using the Newton–Raphson algorithm with a convergence criterion for the energy gradient of  $0.001 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-1}$ . Non-bonded interactions were cut off at 12 Å using the CHARMM27 force-field parameters. The potential interaction energy  $\Delta E_{\text{int}}$ , was defined as  $\Delta E_{\text{int}} = \Delta E_{\text{pl}}/\text{NBD} - \Delta E_{\text{pl}} - \Delta E_{\text{pNBD}} - E_{\text{b}}(\text{N}-\text{C})$ , where  $\Delta E_{\text{pl}}/\text{NBD}$  is the total energy of the fluorophore-labeled lysine,  $\Delta E_{\text{pl}}$  and  $\Delta E_{\text{pNBD}}$  are the potential energies of the lysine and free fluorophore and  $E_{\text{b}}(\text{N}-\text{C})$  is the C–N bond energy.

### 2.3. LB film preparation

Eicosylamine (EA) and methyl stearate (SME) mixtures in a 1:4 ratio were dissolved in  $\text{CHCl}_3$  as spreading solution. An appropriate amount of this solution was carefully spread onto an aqueous subphase with  $0.008 \text{ mg ml}^{-1}$  of NBD-labeled ferritin and the spreading solvent was allowed to evaporate for 10 min prior to compression. The monolayer was compressed up to a surface pressure of  $30 \text{ mN m}^{-1}$  for transfer. Multilayer LB films were assembled to the substrates by the vertical lifting method, i.e., withdrawal ( $\uparrow$ ) and immersion ( $\downarrow$ ) of the substrate through the interface covered with the mixed film. The modified slide was dried after emersion with dry air during 2 min prior to the next immersion, otherwise the transfer ratio decreased in the successive dipping cycles. The dipping speed of the substrates was  $1 \text{ cm min}^{-1}$ . Transfer ratios close to unity were obtained.  $\text{CaF}_2$  substrates were used for infrared (IR) spectroscopy, glass substrates for fluorescence emission and excitation spectra and mylar substrates for magnetic measurements. A KSV3000 trough was used to prepare all the LB films. Millipore water with a resistivity higher than  $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$  was used in all the LB experiments.

### 3. Results and discussion

The family of fluorophores 4-(2-hydroxyethoxy)-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD-X, X = F, Cl) has been used as derivatization reagents for fluorescence detection of amino acids [12]. NBD-X reacts with amino groups [13] at high reaction rate and enables proteins to be detected with fluorescence spectroscopy. The main limitation of the commercial NBD-F and NBD-Cl lies on their low solubility in water. For this reason, we have used the derivative NBD- $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$  (abbreviated as NBD), which exhibits higher water solubility and reactivity [9].

When NBD is treated with an excess of lysine at basic pH (see Section 2), the UV-vis spectrum of the solution dramatically changes, showing an extraordinary intense band at 475 nm (Supporting information). After full reaction of NBD with lysine, an extinction coefficient of  $23000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  was calculated for this band, which is the signature of the product formation. Ferritin and NBD were incubated (pH 8) over time periods varying from 2 to 100 h. Once dialyzed, the protein was isolated by size exclusion chromatography. After removing excess of fluorophore, the absorbance intensity of the NBD-labeled ferritin was measured. Ferritin was monitored by UV-vis spectroscopy at 280 nm and NBD by fluorescence spectroscopy. The coelution of ferritin and fluorophore (Supporting information) indicates that NBD is really bounded to ferritin. The UV-vis spectra of the NBD-ferritins incubated at different times (2–100 h) are shown in Fig. 1. As the incubation time increases, the absorbance band at 475 nm boosts reaching a plateau after 70 h.

The number of fluorophores bound to ferritin was calculated from the absorbance values of the spectra at 475 nm and considering  $\epsilon^{475} = 23000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . The maximum fluorophore:ferritin ratio (plateau region) was around 48,

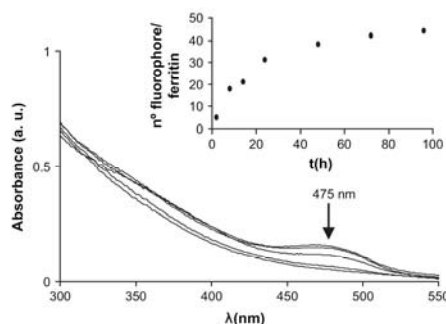


Fig. 1. UV-vis spectra of the dialyzed solutions obtained after incubating NBD and ferritin at different times. Inset: plot of the calculated number of fluorophore per ferritin as a function of the reaction time.

suggesting that only two of each three lysines per ferritin subunit are labeled with the fluorophore (Fig. 1).

The fluorescence spectra of the NBD-ferritin samples exhibit a red (20 nm) and blue (30 nm) shifts of the excitation and emission fluorescence bands, respectively, and a significant increase in the fluorescence signal with respect to those of the free fluorophore ( $\lambda_{\text{exc}} = 450$  and  $470 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{emission}} = 560 \text{ nm}$ ) (Fig. 2). These features eliminate the possibility of the fluorophore being grafted to the ferritin surface by electrostatic forces, and demonstrate the existence of a chemical bond, which enhances the fluorescence quantum yield.

The fluorescence signal of the fluorescent ferritin particles was compared with two controls: free NBD (spectrum 1, Fig. 2) and NBD-labeled lysine (spectrum 2). The enhancement of the fluorescence signal in the dye-labeled samples with respect to that of free dye is consequence of a chemical bond of the NBD to the protein via an amide group formation [14].

Fluorescence signal showed quenching when the number of fluorophores per ferritin approaches the saturation value (Fig. 2). As it was mentioned above, only two of each three

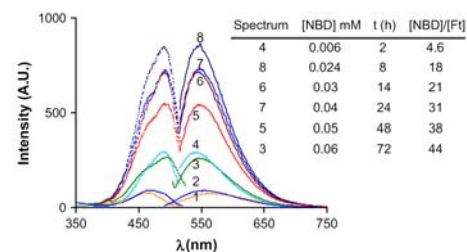


Fig. 2. Fluorescence excitation (dotted line) and emission (solid line) spectra of (1) free fluorophore [NBD] = 0.1 mM; (2) fluorophore-labeled lysine, [NBD] = 0.06 mM; (3–8) fluorophore-labeled ferritins. [Ft] (ferritin concentration) =  $1.33 \times 10^{-3} \text{ mM}$ . Inset: [NBD] concentration, incubation time (h) and [NBD]/[Ft] ratio.

lysine residues per ferritin subunit were labeled with NBD. We have tentatively analyzed the two fixation sites of the fluorophore on the ferritin shell: The ferritin subunits contain three exposed and reactive lysines: lys83, lys97 and lys104. A perspective view of a modeled ferritin subunit is shown in Fig. 3. The difference of the potential energy values (Fig. 3) suggests that ferritin is labeled by the NBD fluorophore at the lys83 and lys97 sites, whereas the more hindered lys104 would remain unlabeled. The distance between the labeled lysines (19.77 Å) is not large enough to avoid fluorophore self-quenching.

TEM images of the native and fluorescent ferritins with the same protein concentration are similar. A representative TEM image of the fluorescent particles is shown in Fig. 4. The particles average 5 nm in diameter and show no aggregation.

These data strongly suggest that the ferritin iron core is structurally intact and that no degradation occurs during chemical functionalization of the protein shell.

It is interesting to note that the functionalization of the ferritin molecule with the fluorophore NBD does not significantly modify its solubility in water. In fact, these solutions are extremely stable as shown by the UV–vis and fluorescence spectra, which remained unchanged even after 1 month. The water solubility and photostability of these functionalized biomolecules allow us to deposit them on different substrates by using the LB technique. In previous works we prepared LB films of native ferritin by using different surfactant mixtures [15,16]. The preparation method of these LB films is based on the adsorption of ferritin dissolved in the aqueous subphase, which is negatively charged at the pH of the water subphase (5.5), onto a positively charged monolayer. We proved that

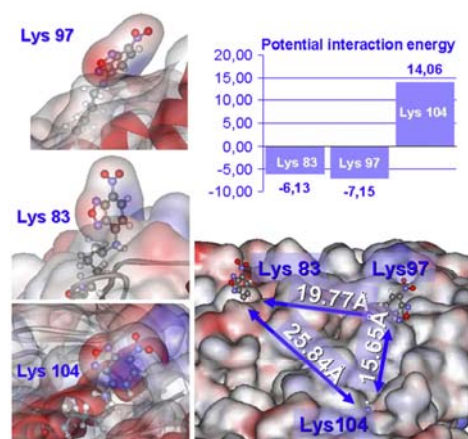


Fig. 3. Potential energy ( $\text{Kcal mol}^{-1}$ ) for the three modeled fluorophore-labeled lysines. A perspective view of the ferritin shell region containing the exposed lysine residues. Two fluorophore molecules have been coupled at lys83 and lys97. The models were implemented into TINKER 4.2 molecular modeling package and drawn with Weblab Viewer Lite (MSI Inc).

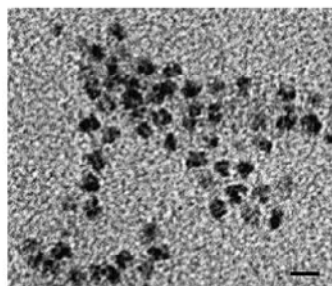


Fig. 4. TEM image of the fluorescent ferritin particles. Scale bar is 10 nm.

a surfactant mixture of eicosylamine (EA) and methyl stearate, SME in a 1/4 ratio gives rise to a homogeneous monolayer at the water–air interface with natural ferritin [16]. The same conditions can be also used to prepare LB films of the fluorescent ferritin particles. Thus, a 1/4 EA/SME mixture was spread on a subphase containing the NBD-labeled ferritin at a concentration of  $0.008 \text{ mg ml}^{-1}$ . A successful deposition of the monolayers onto solid substrates by the vertical lifting method was achieved at a constant surface pressure of  $30 \text{ mNm}^{-1}$ . Transfer ratios close to unity were obtained giving rise to Y-type and optically defect-free multilayer LB films.

The fluorescent properties of the ferritin-NBD particles persist in the LB film (Fig. 5). Thus, the excitation spectrum of an LB film of 19 monolayers deposited on glass exhibits two main maxima at 470 and 494 nm, and the emission spectrum a maximum at 530 nm, showing a blue shift of about 10 nm with respect to that observed when the particles are in solution. The stability with time of the LB film was monitored measuring the fluorescence intensities at 530 nm. The measurements were made every 7 days over a period of 4 months. After this period the percentage of fluorescence intensity loss with respect to the initial value was around 3%, pointing out the extraordinary stability of the ferritin-NBD film.

The magnetic properties of an LB film with 121 monolayers deposited onto a diamagnetic mylar substrate were recorded using a SQUID magnetometer. The temperature

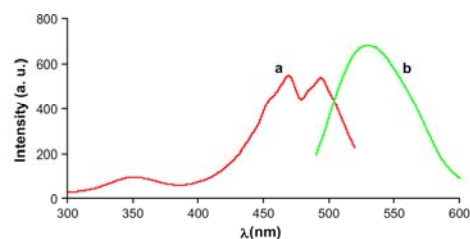


Fig. 5. Fluorescence excitation (a) and emission (b) spectra of the ferritin-NBD LB film.



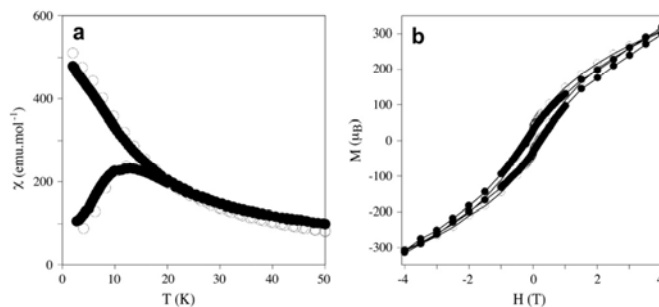


Fig. 6. (a) Thermal dependence of the ZFC and FC ( $H = 50$  Oe) magnetization of the LB film (black filled circles) and evaporated sample NBD-ferritin (white circles). (b) Hysteresis loop of magnetization of LB film (black filled circles) and evaporated sample (white circles) at 2 K.

dependence of the zero-field-cooled (ZFC) and field-cooled (FC) magnetization for the LB films is shown in Fig. 6a, and compared to the properties of a powder sample of NBD-ferritin. In both cases the ZFC curve presents a maximum of the susceptibility around 12.8 K and both curves are superimposed above 20 K (Fig. 6a). Such superparamagnetic behavior is similar to that shown in the native horse spleen ferritin containing 2000 iron atoms [5]. A marked hysteresis loop of magnetization is obtained with a coercive field of 2200 G (Fig. 6b). The shape of the hysteresis loop of magnetization is again very similar to that of powder measurements and to that of the native horse spleen ferritin [5]. This is an expected result that demonstrates the magnetic isolation provided by the diamagnetic apoferritin shell, which prevents any magnetic interaction between ferritin molecules to occur.

Another consequence of the molecular origin of the magnetic behavior is that the magnetic properties of ferritin are not affected by the functionalization of the external shell of ferritin with NBD. By comparison with powder samples we have calculated the number of ferritin molecules trapped within the LB film. As the area of the substrate ( $1.2 \text{ cm}^2$ ) and the number of monolayers (121) are known, it is straightforward to estimate the density of ferritin molecules within the monolayer and the mean area per molecule of ferritin within the LB film. A mean area around  $40,000 \text{ \AA}^2$  is obtained which is consistent with the results obtained for the LB films of natural ferritin [15,16].

#### 4. Conclusions

In this work we have developed a simple method to prepare molecular nanoparticles based on ferritin that combine magnetic and fluorescence properties. We have shown that the fluorescent ferritin nanoparticles preserved the superparamagnetic properties of the native ferritin iron core, exhibiting at the same time an enhancement in the fluorescence properties of the NBD fluorophore. Moreover, the water solubility of these bi-functional molecules has allowed us to prepare LB films of these molecules which are extremely stable and keep their magnetic and optical properties.

#### Acknowledgements

Financial support from the European Union (NoE MAGMANet), Spanish Ministerio de Educación y Ciencia (Project Consolider-Ingenio in Molecular Nanoscience, CSD2007-00010, and projects MAT2007-61584, CTQ2006-02840, MAT2004-3489 and CTQ2005-09385) Generalitat Valenciana and Junta de Andalucía (Proyecto Excelencia FQM-02525) are gratefully acknowledged. N.G. and M.C.-L. thank the Spanish Ministerio de Educación y Ciencia for a research contract (programa Ramón y Cajal).

#### Appendix. Supporting information

Supporting information associated with this article can be found in the online version, at doi: 10.1016/j.solidstatesciences.2008.04.026.

#### References

- [1] (a) R.C. O'Handley, *Modern Magnetic Materials*, Wiley, New York, 1999; (b) S. Sun, C.B. Murray, D. Weller, L. Folks, A. Moser, *Science* 287 (2000) 1989; (c) J. Hoinville, A. Bewick, D. Gleeson, R. Jones, O. Kasyutich, E. Mayes, A. Nartowski, B. Warne, J. Wiggins, K. Wong, *J. Appl. Phys.* 93 (2003) 7187; (d) Q. Song, Z.J. Zhang, *J. Am. Chem. Soc.* 126 (2004) 6164; (e) H. Zeng, J. Li, J.P. Liu, Z.L. Wang, S. Sun, *Nature* 420 (2002) 395; (f) C. Liu, B. Zou, A.J. Rondinone, Z.J. Zhang, *J. Am. Chem. Soc.* 122 (2000) 6263.
- [2] (a) S. Mornet, S. Vasseur, F. Grasset, E. Duguet, *J. Mater. Chem.* 14 (2004) 2161; (b) F. Sonvico, C. Dubernet, P. Colombo, P. Couvreur, *Curr. Pharm. Des.* 11 (2005) 2091.
- [3] (a) D.K. Yi, S.T. Selvan, S.S. Lee, G.C. Papaefthymiou, D. Kundaliyas, J.Y. Ying, *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 4990; (b) J. Kim, K.J. Lee, J. Lee, J.H. Yu, B.C. Kim, K. An, Y. Hwang, C.H. Shin, J.G. Park, J. Kim, T. Hyeon, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 688.
- [4] (a) T. Douglas, *Biomimetic Materials Chemistry*, Wiley, New York, 1996, (p. 91); (b) T. Douglas, V.T. Stark, *Inorg. Chem.* 39 (2000) 1828.

Please cite this article in press as: N. Gálvez et al., *Solid State Sci.* (2008), doi:10.1016/j.solidstatesciences.2008.04.026

- (c) K.K.W. Wong, T. Douglas, S. Gider, D.D. Awschalom, S. Mann, *Chem. Mater.* 10 (1998) 279.
- [5] (a) C. Gilles, P. Bonville, K.K.W. Wong, S. Mann, *Eur. Phys. J. B* 17 (2000) 417;  
(b) F. Luis, E. Del Barco, J.M. Hernández, E. Remiro, J. Bartolomé, J. Tejada, *Phys. Rev. B* 59 (1999) 11837.
- [6] (a) M. Uchida, M.T. Klem, M. Allen, P. Suci, M. Flenniken, E. Gillitzer, Z. Varpness, L.O. Liepold, M. Young, T. Douglas, *Adv. Mater.* 19 (2007) 1025;  
(b) N. Kameta, M. Masuda, H. Minamikawa, Y. Mishima, I. Yamashita, T. Shimizu, *Chem. Mater.* 19 (2007) 3553;  
(c) B. Fernández, N. Gálvez, P. Sánchez, J. Morales, F. Santoyo, R. Cuesta, J.M. Domínguez-Vera, *Inorg. Chim. Acta* 360 (2007) 3951;  
(d) B. Fernández, N. Gálvez, P. Sánchez, R. Cuesta, R. Bernejo, J.M. Domínguez-Vera, *J. Biol. Inorg. Chem.* 13 (2008) 349.
- [7] (a) M. Uchida, M.L. Flenniken, M. Allen, D.A. Willis, B.E. Crowley, S. Brumfield, A.F. Willis, L. Jackiw, M. Jutila, M. Young, T. Douglas, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 16626;  
(b) D. Danon, E. Skutelsk, Y. Marikoversus, L. Goldstein, *J. Ultrastruct. Res.* 38 (1972) 500;  
(c) K.K.W. Wong, H. Colfen, N.T. Whilton, T. Douglas, S. Mann, *J. Inorg. Biochem.* 76 (1999) 187;  
(d) M. Li, K.W. Wong, S. Mann, *Chem. Mater.* 11 (1999) 23.
- [8] A. Ulman, *Introduction to Ultrathin Organic Films*, first ed. Academic Press, Boston, 1991, (p. 442).
- [9] (a) L. Johnson, S. Lagerkvist, P. Lindroth, M. Ahnoff, K. Martinsson, *Anal. Chem.* 54 (1982) 939;  
(b) M. Ortega-Muñoz, J. Lopez-Jaramillo, F. Hernandez-Mateo, F. Santoyo-Gonzalez, *Adv. Synth. Catal.* 348 (2006) 2410.
- [10] T. Granier, B. Gallois, A. Dautant, B.L.D. Estaintot, G. Precigoux, *Acta Crystallogr. D, Biol. Crystallogr.* 53 (1997) 580.
- [11] J.W. Ponder, *TINKER: Software Tools for Molecular Design*, 4.3, Washington University School of Medicine, St. Louis, MO, 2003.
- [12] C. Aoyama, T. Santa, M. Tsunoda, T. Fukushima, C. Kitada, K. Imai, *Biomed. Chromatogr.* 18 (2004) 630.
- [13] (a) D.J. Birkett, N.C. Price, G.K. Radda, A.G. Salmon, *FEBS Lett.* 6 (1970) 346;  
(b) R. Owusu-Apenten, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 45 (2005) 1;  
(c) M. Ahnoff, I. Grundevik, A. Arfwidsson, J. Fonselius, B.A. Persson, *Anal. Chem.* 53 (1981) 481;  
(d) S. Uchiyama, T. Santa, N. Okiyama, T. Fukushima, K. Imai, *Biomed. Chromatogr.* 15 (2001) 295.
- [14] T.W. Houk, M. Ovníc, S. Karipides, *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 5419.
- [15] M. Clemente-León, E. Coronado, A. Soriano-Portillo, E. Colacio, J.M. Domínguez-Vera, N. Gálvez, R. Madueño, M.T. Martín-Romero, *Langmuir* 22 (2006) 6993.
- [16] M. Clemente-León, E. Coronado, A. Soriano-Portillo, M.T. Martín-Romero, T. Pérez-Morales, J.M. Domínguez-Vera, N. Gálvez, *Polyhedron* 26 (2007) 1871.

## Fluorescence resonance energy transfer in ferritin labeled with multiple fluorescent dyes

Belén Fernández · Natividad Gálvez ·  
Purificación Sánchez · Rafael Cuesta ·  
Ruperto Bermejo · José M. Domínguez-Vera

Received: 11 September 2007 / Accepted: 14 November 2007 / Published online: 27 November 2007  
© SBIC 2007

**Abstract** We simultaneously labeled ferritin with two Alexa Fluor fluorophores (AF350 and AF430). When both fluorophores label the same ferritin subunit, fluorescence resonance energy transfer (FRET) takes place from the excited AF350 to the acceptor AF430. By varying the number and the ratio of labeling fluorophores, we can modulate FRET such that the ferritin particles can exhibit multiple colors under UV illumination. Labeling of the ferritin shell does not affect the properties of the metallic core.

**Keywords** Ferritin · Fluorescence resonance energy transfer · Fluorescence · Alexa Fluor

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s00775-007-0323-x) contains supplementary material, which is available to authorized users.

B. Fernández · N. Gálvez · P. Sánchez ·  
J. M. Domínguez-Vera (✉)  
Departamento de Química Inorgánica,  
Facultad de Ciencias,  
Universidad de Granada,  
18071 Granada, Spain  
e-mail: josema@ugr.es

R. Cuesta  
Departamento de Química Inorgánica y Orgánica,  
EPS Linares,  
23700 Linares, Spain

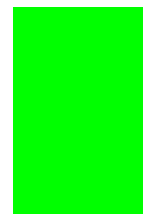
R. Bermejo  
Departamento de Química Física y Analítica,  
EPS Linares,  
23700 Linares, Spain

### Abbreviations

AF Alexa Fluor  
FRET Fluorescence resonance energy transfer  
PAGE Polyacrylamide gel electrophoresis  
SDS Sodium dodecyl sulfate  
TEM Transmission electron microscopy

### Introduction

Ferritin and ferritin-like proteins, e.g., viral capsids, lumazine, and small heat-shock proteins, assemble from a number of subunits to form robust structures that often have a spherical symmetry, therefore defining an interior cavity and an external surface. The cavity of these biomacromolecules is of nanometer size and has been widely used as a chemically and spatially confined environment for building metallic nanoparticles [1]. Moreover, their outer organic shells provide a platform for chemical functionalization. Thus, native ferritin contains lysine and cysteine residues on the external surface that can be used to covalently couple molecules that can contribute a new functionality to the ferritin particle [1–3]. Therefore, manipulation of the cavity and the exterior surface of ferritin particles could produce a library of bifunctional nanoparticles for applications in material sciences and nanotechnology. Although various metallic nanoparticles have been synthesized within the empty ferritin (apoferritin) cavity by different strategies [1, 4–6], few reports have been published on the use of the outer surface of ferritin as a template for chemical modifications [1, 7–10]. The incorporation of fluorescence functionality into magnetic nanoparticles is of considerable and widespread interest, especially in the biomedical field [11–13]. Thus, adequate functionalization could give rise to



fluorescence resonance energy transfer (FRET), commonly used as a sensor in biological research [14, 15].

### Materials and methods

#### Preparation of the fluorophore-labeled proteins

Horse spleen ferritin (2 mL, 1 mg/mL; Sigma Aldrich, lot 034K70131) or apoferritin (2 mL, 1 mg/mL, lot 055K7012) was incubated for 3 h at 277 K with an excess of the corresponding fluorophore succinimidyl ester derivatives. Specifically, in the case of sample 9AF350 + 6AF430-Apo (AF is Alexa Fluor; Table 1), an AF350 to AF430 to protein stoichiometry of 1,200:600:1 was used. A similar dye-to-protein excess was used for the rest of the samples. The resulting solution was then exhaustively dialyzed at 277 K for 2 days against several changes of Milli-Q water using a Spectra/Por Float-A-Lyzer with a molecular weight cutoff (MWCO) of 25,000 and then chromatographed (Sephadex G-25) to remove unbound fluorophore. Protein-containing fractions were isolated. Different protein-to-fluorophore stoichiometry and AF350-to-AF430 fluorophore ratios were used to prepare samples. Thus, the ratio between fluorophores was 1:1 (0.2 mg of AF350 and 0.34 mg of AF430) for the 8AF350 + 10 AF430-Apo sample, and 1:10 (0.2 mg of AF350 and 3.5 mg of AF430) for the 6AF350 + 35AF430-Ft sample.

For apoferritin samples containing both fluorophores, the concentration of AF430 in the labeled-apoferritin samples was directly calculated from the absorbance values of the UV-vis spectra at 430 nm ( $\epsilon^{430} = 16,000/\text{M}/\text{cm}$ ) because at this wavelength, the absorption of apoferritin

and AF350 is negligible. The concentration of AF350 was obtained from the absorbance at 350 ( $\epsilon^{350} = 19,000/\text{M}/\text{cm}$ ), once absorbance values corresponding to AF430 had been subtracted. The concentration of 24-mer apoferritin was obtained directly from the absorbance at 280 nm ( $\epsilon^{280} = 427,200/\text{M}/\text{cm}$ ), because the absorption of both fluorophores at this wavelength can be considered negligible. A similar procedure was performed to determine the number of fluorophores in the labeled-ferritin samples after subtracting the UV-vis spectrum of the starting ferritin from the spectrum of each labeled-ferritin sample.

#### Dissociation into subunits of fluorophore-labeled apoferritins

One milliliter of 11AF350 + 16AF430-Apo and 6AF350 + 28AF430-Apo samples was adjusted to pH 2 by addition of a 0.05 M HCl solution. After this pH had been maintained for 1 h, the fluorescence spectrum of the solution was then studied. It should be noted that Alexa dyes are insensitive to pH in the 2–10 range [23], and the emission intensity of the fluorophores was identical at pH 2 and 8.

#### Disassociation and reassembly of fluorophore-labeled apoferritin subunits

AF350- and AF430-labeled apoferritin solutions were slowly adjusted to pH 2 by dialysis against HCl solution containing 0.1 M NaCl at pH 2. After this pH had been maintained for 20 min, the two solutions were mixed and stirred for 15 min. The pH of the solution was slowly

**Table 1** Number of fluorophores labeling 24-mer apoferritin and ferritin protein and ratio of emissions at 540 nm/440 nm for all samples (only some of them exhibited fluorescence resonance energy transfer)

Apo-ferritin or ferritin sample	540 nm to 440 nm emission ratio	AF350-to-AF430 ratio <sup>a</sup>	AF350-to-protein ratio <sup>b</sup>	AF430-to-protein ratio <sup>b</sup>	FRET?
9AF350 + 6AF430-Apo	–	2:1	9	6	No
8AF350 + 10AF430-Apo	–	1:1	8	10	No
11AF350 + 16AF430-Apo	0.7	1:2	12	16	Yes
6AF350 + 35AF430-Apo	2.0	1:10	6	35	Yes
8AF350 + 8AF430-Apo	–	1:1 <sup>c</sup>	8	8	No
8AF350 + 18AF430-Apo	9.0	1:3 <sup>d</sup>	8	18	Yes
7AF350 + 8AF430-Ft	–	1:1	7	8	No
14AF350 + 25AF430-Ft	0.3	1:2	14	25	Yes

AF Alexa Fluor, Apo apoferritin, Ft ferritin, FRET fluorescence resonance energy transfer

<sup>a</sup> Experimental ratio used

<sup>b</sup> Number of dyes labeling the protein (measured by UV-vis spectroscopy, see “Materials and methods”)

<sup>c</sup> Reassembled apoferritin from different labeled subunits. Fluorophores must be in different subunits

<sup>d</sup> Sample 8AF350 + 8AF430-Apo treated with additional AF430 fluorophore

raised to 7.4 by addition, using a microsyringe, of a NaOH solution containing 0.1 M NaCl. The resulting solution was stirred at room temperature for 2 h and then exhaustively dialyzed against several changes of Milli-Q water using a Spectra/Por Float-A-Lyzer with a MWCO of 50,000. Once the apoferritin had been reassembled, the numbers of AF350 and AF430 were calculated as previously described, resulting in eight AF350 and eight AF430 per apoferritin. About 0.6 mg of AF430 was added to 2 mL of the 8AF350 + 8AF430-Apo sample and the mixture was then exhaustively dialyzed and chromatographed, with a sample containing 8AF350 and 18AF430 being obtained. The purity and stability of the dye–protein was assessed by native polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). Gels were stained for protein for 30 min using 0.1% Coomassie blue in 40% MeOH/10% HOAc fixative.

#### Dilution effect in FRET

Two milliliters of an apoferritin (1 mg/mL) labeled with AF350 and AF430 (1:2) was dissociated into its subunits by dialysis against a pH 2 HCl solution containing 0.1 M NaCl. Another 2 mL of an unlabeled apoferritin (1 mg/mL) solution was also dissociated into subunits by dialysis against a pH 2 HCl solution. After 20 min, both apoferritin samples were mixed and stirred for 15 min. The pH of the solution was slowly raised to 7.4 by addition, using a microsyringe, of a NaOH solution containing 0.1 M NaCl. The resulting solution was stirred at room temperature for 3 h and then exhaustively dialyzed against several changes of Milli-Q water using a Spectra/Por Float-A-Lyzer with a MWCO of 50,000. Once the apoferritin had been reassembled, occurrence of FRET was tested.

Sodium dodecyl sulfate (SDS) PAGE, transmission electron microscopy (TEM) and superconducting quantum interference device measurements were used to characterize the apoferritin and ferritin proteins after AF labeling. Size-exclusion chromatography showed coelution of the protein (280 nm) and AF350 (440 nm) or AF430 (550 nm) or both AF350 and AF430. The elution profile of fluorophore-labeled apoferritin or ferritin was similar to that of the native proteins. These results were confirmed by SDS-PAGE, in which the band corresponding to the AF350-labeled ferritin comigrated with the apoferritin subunit.

The samples used for TEM study were prepared by placing a drop onto a carbon-coated Cu grid and drying it in a glove box. Electron micrographs were taken with a Philips CM-20 HR analytical electron microscope operating at 200 keV.

Fluorescence emission and excitation spectra were recorded with a Cary Eclipse spectrofluorometer. Spectra

were recorded at room temperature. For the emission spectra, samples were excited at 327 or 430 nm with slit widths of 5 and 10 nm for both the excitation and the emission monochromators. The samples were exposed to a UV lamp and the fluorescence intensity was monitored for a period of 1 h; no photobleaching was observed.

Magnetic susceptibility measurements were performed on lyophilized samples using a magnetometer (Quantum Design MPMS-XL-5) equipped with a SQUID sensor. Variable-temperature measurements were carried out in the temperature range 2–300 K.

## Results and discussion

### One-fluorophore-labeled apoferritin or ferritin

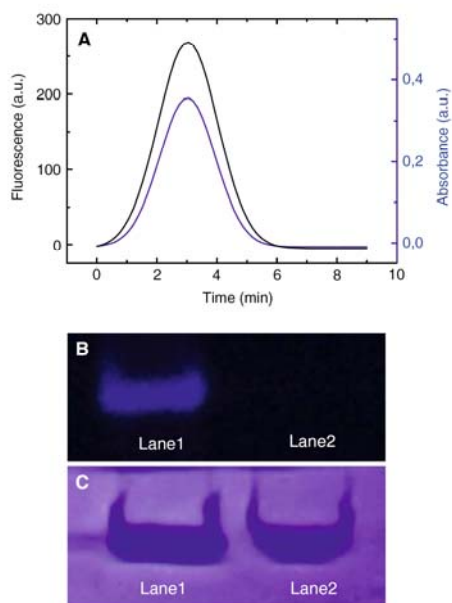
The 72 lysine residues on the outer apoferritin or ferritin shells were used to covalently couple different AF fluorophores. AF dyes are intensely fluorescent, and their succinimidyl ester derivatives react with amine groups, giving rise to conjugate proteins with high photostability. AF350 or AF430 molecules were chemically bound to the surface of apoferritin and ferritin by the formation of amide bonds. The reactivity of the lysine residues at basic pH is adequate to displace all AF fluorophores that might initially bind to cysteine, as previously reported [16]. Water-soluble fluorescent ferritins were obtained without apparent aggregation or disruption of the quaternary structure of the protein. In a typical experiment, apoferritin or ferritin was reacted with an excess of fluorophore for 3 h and then exhaustively dialyzed to remove unreacted fluorophore. The resulting solution was analyzed by size-exclusion chromatography. Protein was monitored by UV–vis spectroscopy at 280 nm, and AF350 was monitored by fluorescence spectroscopy at 440 nm (Fig. 1a) (AF430 was monitored at 540 nm, data not shown). Coelution of protein and fluorophore indicates that they are attached.

Apoferritin (control) and fluorophore-labeled apoferritin were electrophoretically analyzed on polyacrylamide gel under native (nondenaturing) conditions (Fig. 1b, c). Comigration of samples indicates that the fluorophore was truly bound to the protein and that there was no disruption of the quaternary structure of the protein after labeling.

Fluorescence spectra of AF350- and AF430-labeled apoferritin are shown in Fig. 2. Emission bands at 445 and 540 nm were observed upon excitation at 327 and 425 nm, respectively. Therefore, as expected, the fluorescence properties of AF350 and AF430 are not significantly modified after covalent coupling to apoferritin. Similar spectra were obtained for labeled ferritins.

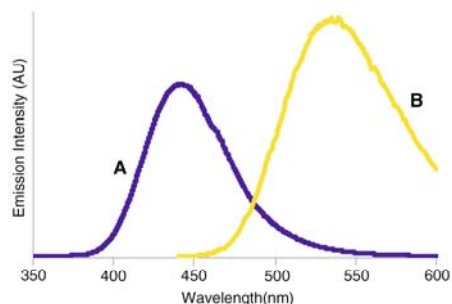
The emission band of AF350 overlaps with the excitation band of AF430; therefore, the simultaneous labeling of





**Fig. 1** a Chromatography elution profile of AF350-ferritin. Protein (black line) was monitored by the UV–vis absorption at 280 nm and AF350 (blue line) was monitored by fluorescence at 440 nm. b Native polyacrylamide gel electrophoresis, unstained, under a UV lamp. Lane 1 is AF350-labeled apoferritin and lane 2 is unlabeled apoferritin. c Stained electrophoresis (Coomassie brilliant blue R250)

the ferritin surface by both fluorophores (AF350 and AF430) may be a good method for achieving FRET in a metal particle. In this regard, there have been few reports of FRET near metallic structures [17–20].



**Fig. 2** Fluorescence spectra of AF350-labeled (A) and AF430-labeled (B) apoferritins

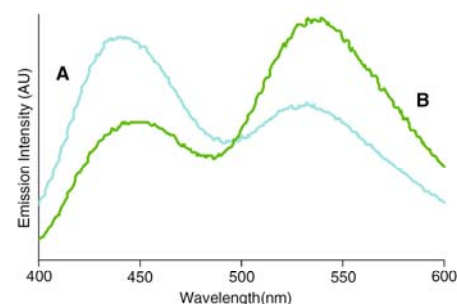
Two-fluorophore-labeled apoferritin or ferritin

Apoferritin or ferritin was incubated with different mixtures of AF350 and AF430, following the same procedure as for AF350 and AF430 labeling. By varying the protein-to-fluorophore stoichiometry and the AF350-to-AF430 ratio in the mixture, we obtained samples with different numbers of AF350 and AF430 simultaneously coupled to the protein (Table 1).

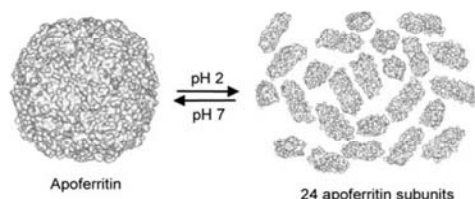
Apoferritin samples 9AF350 + 6AF430-Apo and 8AF350 + 10AF430-Apo and ferritin sample 7AF350 + 8AF430-Ft (Table 1) do not show FRET. Excitations at 327 and 425 nm produced corresponding single emission bands at 445 and 540 nm, indicating the presence of both fluorophores (data not shown). However, FRET occurred when there was a larger number of fluorophores, for example, in apoferritin samples containing 11AF350 + 16AF430-Apo or in the 14AF350 + 25AF430-Ft sample (Table 1). Thus, irradiation of the 11AF350 + 16AF430-Apo sample at 327 nm produced one emission band at 440 nm (corresponding to AF350) and a second band centered at 540 nm attributable to FRET (Fig. 3, spectrum A).

The efficiency of FRET is governed by the AF350-to-AF430 ratio. Thus, the ratio of emission intensities at 540 and 440 nm was higher for the 6AF350 + 35AF430-Apo sample (Table 1) than for the 12AF350 + 16AF430-Apo sample (Fig. 3, spectrum B). Consequently, FRET can be tuned in these systems, and different fluorescence lights can be obtained by carefully designing an AF350-to-AF430 ratio that allows partial transfer of energy from the donor AF350 to the acceptor AF430.

On the basis of the above results and the FRET and non-FRET samples (Table 1), it can be inferred that FRET only takes place when there is an adequate number of fluorophores bound to the protein. The cutoff appears to be



**Fig. 3** Fluorescence spectra of samples 12AF350 + 16AF430-apoferritin (A) and 6AF350 + 35AF430-apoferritin (B)



**Fig. 4** Dissociation of apoferritin into subunits

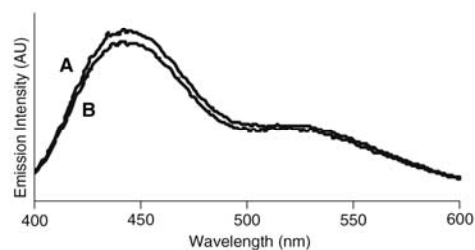
around 24, i.e., the number of protein subunits. According to these results, occurrence of FRET requires the presence of both fluorophores in at least one of the 24 ferritin subunits (the sum of both would be 24 or more), in which the distances between the fluorophores are sufficiently small. FRET is strongly dependent on the donor–acceptor distance (the distance between lysines at the subunit is 1.5–3 nm) [21]. The Förster distance, the distance at which FRET is 50% efficient, is usually 2–6 nm.

In order to gain greater insight into the FRET mechanism, we made use of the well-known dissociation–association process [22] of apoferritin into its subunits by modifying the pH (Fig. 4).

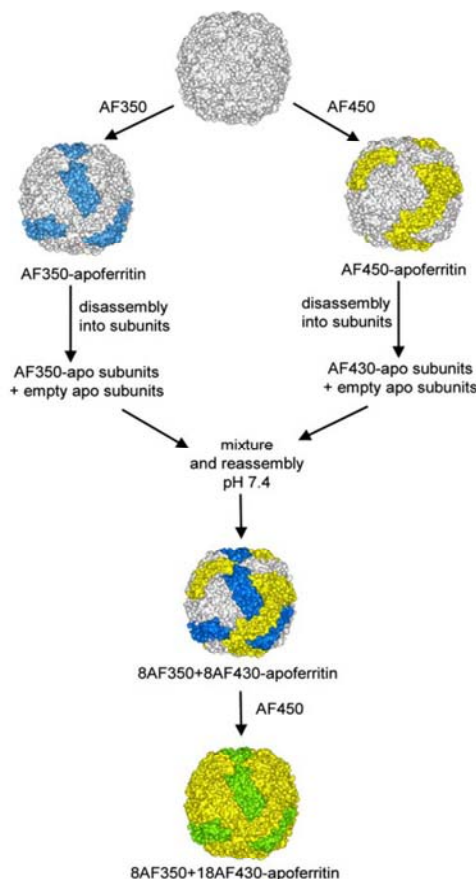
FRET apoferritin samples (11AF350 + 16AF430-Apo and 6AF350 + 35AF430-Apo) were dissociated into subunits by adjusting the pH to 2 for 1 h. After this treatment, fluorescence spectroscopy study of the solutions showed that FRET remained unaltered (Fig. 5).

If dissociation of the apoferritin cage into its subunits does not modify the FRET signature, fluorescence transfer must be intrasubunit rather than intersubunit; therefore, FRET samples must contain both fluorophores in the same subunit.

In order to test this assumption, one-fluorophore-labeled AF350- and AF430-apoferritin samples were dissociated into subunits by adjusting the pH to 2 for 1 h and then mixing the two samples (Fig. 6).

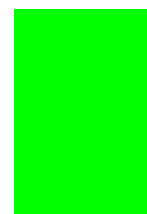


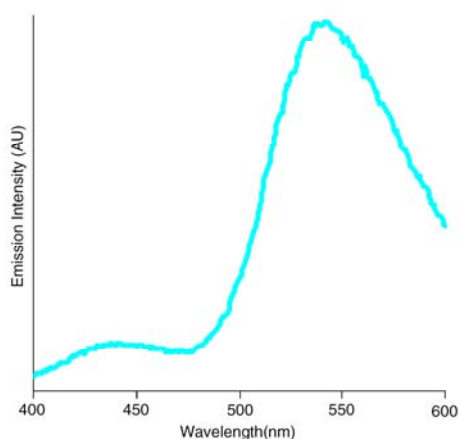
**Fig. 5** Fluorescence spectra of sample 12AF350 + 16AF430-apoferritin before (A) and after (B) treatment at pH 2. The slight differences in intensities are due to the dilution in B by addition of HCl



**Fig. 6** Dissociation into subunits of AF350- or AF430-labeled apoferritin followed by reassembly of the subunits from the mixture. After isolation of 8AF350 + 8AF430-apoferritin, addition of more AF430 gave rise to 8AF350 + 18AF430-apoferritin. Blue and yellow subunits represent the AF350- and AF430-labeled apoferritin subunits, respectively. White subunits do not contain fluorophore. The green subunits in 8AF350 + 18AF430-apoferritin contain both fluorophores

The pH of the solution was adjusted to 7.4 to reassemble the apoferritin molecule (Fig. 6). This reassembled apoferritin (8AF350 + 8AF430-Apo) now contained the two fluorophores but necessarily in different subunits (Fig. 6). Thus, upon excitation at 425 or 327 nm, the sample showed single emissions at 540 and 440 nm, corresponding to AF430 and AF350, respectively. However, no FRET occurred, indicating that the presence of AF350 and AF430





**Fig. 7** Fluorescence spectrum of 8AF350 + 18AF430-apoferritin after excitation at 327 nm. Fluorescence resonance energy transfer from excited AF350 to AF430 is almost complete

in different apoferritin subunits does not allow FRET. However, if this non-FRET sample (8AF350 + 8AF430-Apo) is treated with additional AF430, a new apoferritin sample, 8AF350 + 18AF430-Apo, is obtained. The sum of both fluorophores is now more than 24 (8 + 18), and this new sample exhibits FRET, as shown in Fig. 7.

Excitation at 327 nm produced an emission spectrum with a shoulder at 440 nm and an intense band at 540 nm. The emission maximum was attributed to the acceptor fluorophore and the shoulder to the donor fluorophore. Hence, there was an almost complete transfer of energy from the excited AF350 to AF430 in this sample.

It is possible that the disassembled/reassembled ferritin did not show FRET because not enough dye labeled the apoferritin. This possibility was tested in a dilution experiment, using the same procedure as for the reassembled apoferritin sample. One solution of the FRET 11AF350 + 16AF430-Apo sample was disassembled at pH 2. When this sample was dissociated into its subunits, it was mixed with totally unlabeled apoferritin subunits to prepare an assembled apoferritin only containing four AF350 and nine AF430, which exhibited FRET with a 540 nm to 440 nm emission ratio of 0.4.

TEM images of the ferritin samples (with or without FRET) were similar to those of native ferritin, showing isolated electron-dense particles of 6 nm (see the supplementary material). Likewise, the magnetic properties of the fluorescent ferritin particles were similar to those of the 2,000-iron-containing native horse spleen ferritin [2, 3]. Zero-field-cooled (ZFC) and field-cooled magnetization

curves begin to separate as the temperature decreases, showing a maximum in the ZFC magnetization curve at 12 K. The hysteresis loop in the nonsuperparamagnetic region is similar, with a coercive field of 2,400 G (see the supplementary material). Hence, the TEM and magnetic properties indicate that, as expected, functionalization of the ferritin shell does not affect the metallic core.

## Conclusion

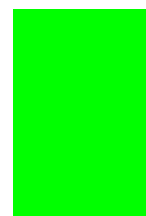
In this study, fluorescent apoferritins and ferritins were prepared by labeling the proteins with AF350, AF430 or both fluorophores. When there is a sufficient number of fluorophores in the same protein subunit, FRET occurs. This FRET can be tuned by varying the AF350-to-AF430 ratio such that the ferritin particles exhibit different colors under UV illumination. Furthermore, because these FRET ferritin particles are water-soluble and biocompatible, they may have a potential application for biological labeling in living systems. Finally, FRET apoferritin systems provide an opportunity for studying the modification of FRET by a metal particle, on which few data are available. Work on this issue is currently in progress.

**Acknowledgements** We are grateful to the MEC (project CTQ2006-02840) and Junta de Andalucía (Proyecto Excelencia FQM-00425) for financial support. N.G. thanks the MEC for a research contract (programa Ramón y Cajal).

## References

- Uchida M, Klem MT, Allen M, Suci P, Flenniken M, Gillitzer E, Varpness Z, Liepold LO, Young M, Douglas T (2007) *Adv Mater* 19:1025
- Kameta N, Masuda M, Minamikawa H, Mishima Y, Yamashita I, Shimizu T (2007) *Chem Mater* 19:3553
- Fernández B, Gálvez N, Sánchez P, Morales J, Santoyo F, Cuesta R, Domínguez-Vera JM (2007) *Inorg Chim Acta*. doi:10.1016/j.ica.2007.02.018
- Gálvez N, Sánchez P, Domínguez-Vera JM, Soriano-Portillo A, Clemente-León M, Coronado E (2006) *J Mater Chem* 16:2757
- Domínguez-Vera JM, Colacio E (2003) *Inorg Chem* 42:6983
- Galvez N, Sanchez P, Domínguez-Vera JM (2005) *Dalton Trans* 2492
- Uchida M, Flenniken ML, Allen M, Willits DA, Crowley BE, Brumfield S, Willis AF, Jackiw L, Jutila M, Young MJ, Douglas T (2006) *J Am Chem Soc* 128:16626
- Danon D, Skutelski E, Marikoversus Y, Goldstein L (1972) *J Ultrastruct Res* 38:500
- Wong KKW, Colfen H, Whilton NT, Douglas T, Mann S (1999) *J Inorg Biochem* 76:187
- Li M, Wong KW, Mann S (1999) *Chem Mater* 11:23
- Bertorelle F, Wilhelm C, Roger J, Gazeau F, Manager C, Cabuil V (2006) *Langmuir* 22:5385
- Prasad PN (2006) *Mol Cryst Liq Cryst* 446:1
- Ma D, Guan J, Normandin F, Denomme S, Enright G, Veres T, Simard B (2006) *Chem Mater* 18:1920

14. Wang YA, Li JJ, Chen HY, Peng XG (2002) *J Am Chem Soc* 124:2293
15. Green M, Howman E (2005) *Chem Commun* 5:121
16. Houk WT, Ovnic M, Karipides S (1983) *J Biol Chem* 9:5419
17. Ahang J, Fu Y, Lakowicz JR (2007) *J Phys Chem C* 111:10
18. Hua XM, Gersten JL, Nitzan A (1985) *J Chem Phys* 83:3650
19. Yun CS, Javier A, Jennings T, Fisher M, Hira S, Peterson S, Hopkins B, Reich NO, Strouse GF (2005) *J Am Chem Soc* 127:3115
20. Kim JH, Chaudhary S, Ozkan M (2007) *Nanotechnology* 8:195105
21. Granier Y, Gallois B, Dautant A, Estaintot BLD, Precigoux G (1997) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 53:580
22. Gerl M, Jaenicke R (1987) *Eur Biophys J* 15:103
23. Panchuk-Voloshina N, Haugland RP, Bishop-Stewart J, Bhalgat MK, Millard PJ, Mao F, Leung W, Haugland RP (1999) *J Histochem Cytochem* 47(9):1188





## Structural Aspects of the Growth Mechanism of Copper Nanoparticles Inside Apoferritin

Marcelo Ceolín,<sup>\*[a]</sup> Natividad Gálvez,<sup>[b]</sup> Purificación Sánchez,<sup>[b]</sup> Belén Fernández,<sup>[b]</sup> and José M. Domínguez-Vera<sup>\*[b]</sup>

**Keywords:** Copper nanoparticles / Apoferritin / X-ray absorption spectroscopy / Small-angle X-ray scattering

It is well known that some of the metal ions remain bound to apoferritin when incubating apoferritin with metal ions. In this study a structural insight, from X-ray absorption spectroscopy (XAS) and small angle X-ray scattering (SAXS) experiments, into the mechanism of inorganic core formation is presented. The results indicate that, in the case of Cu<sup>II</sup> at pH 8, the metal ions bound to apoferritin are in fact Cu<sup>II</sup> oxide/hydroxide. This Cu<sup>II</sup> species does not react with the Cu<sup>II</sup>-specific TTMAPP, traditionally used to detect Cu<sup>II</sup>, because TTMAPP is too large to penetrate the apoferritin channel and

interact with the metal ions. EXAFS results suggest that the Cu<sup>II</sup> precursor can be described as an amorphous network of oxygen/hydroxide-coordinating polyhedra surrounding the copper ions. XAS results demonstrate that this Cu<sup>II</sup>-oxide/hydroxide species is completely converted into zero-valent Cu nanoparticles when treated with NaBH<sub>4</sub>. Furthermore, a structural model for the final Cu<sup>0</sup> nanoparticle is offered.

(© Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 69451 Weinheim, Germany, 2008)

### Introduction

Over the last few years considerable research efforts have focused on the preparation of water-soluble metallic nanoparticles for their use in biomedical applications.<sup>[1–2]</sup> Numerous physical and chemical methods have been employed to produce metallic nanoparticles focusing on the tight control of particle size and shape. Because of the strong dependence of the properties on particle size and shape on the nanometer scale, methods yielding uniformly sized and shaped nanoparticles have become extremely important. One possible route for obtaining nonaggregated water-soluble metallic nanoparticles is the use of a preorganized molecular matrix as a chemical and spatial nanocage for their construction. A typical example of this type of molecule is the iron storage oligomeric protein apoferritin,<sup>[3–7]</sup> considered as a model for other nanocavity-containing macromolecules such as virus capsides.<sup>[8]</sup> Apoferritin consists of a spherical protein shell composed of 24 subunits surrounding an aqueous cavity with a diameter of about 8 nm.<sup>[9,10]</sup> Channels are generated by the multi subunit construction of the apoferritin shell. Eight hydrophilic channels of about 4 Å allow the passage of metal ions and molecules of sufficiently small size into the cavity of the protein.<sup>[11]</sup>

The first approach to produce apoferritin-encapsulated metallic nanoparticles was the use of the apoferritin cavity for biomimetic oxidative hydrolysis reactions, producing apoferritins that are reconstituted with non-native inorganic compounds, usually in the form of oxides or oxyhydroxides.<sup>[12–15]</sup> A more recent approach is based on the high affinity of some metal ions for the apoferritin cavity<sup>[16]</sup> and on the capacity of these bonded metal ions to react with an appropriate reagent to produce a metallic particle, constrained to the size of the cavity.<sup>[17]</sup> Apoferritin has been reported to bind metal ions in its cavity at specific sites, with stoichiometric binding not higher than 60 atoms per apoferritin at pH 7.4.<sup>[16]</sup> However, the number of metal ions strongly increases when working at a higher pH. For example, when horse spleen apoferritin is treated with Cu<sup>II</sup>, Co<sup>II</sup> or Ni<sup>II</sup> and the pH is dynamically adjusted to 8 the number of metal ions per apoferritin reaches values of about 300.<sup>[18,19]</sup> It has recently been reported that this route can be extended to the preparation of apoferritin-encapsulated Cu,<sup>[17,20]</sup> Co, Ni<sup>[18]</sup> and Pd.<sup>[21]</sup>

Douglas et al. found the existence of an electrostatic negative potential gradient directed toward the cavity of the ferritin, supporting the idea of positive ion encapsulation.<sup>[22]</sup> These encapsulated metal(II)-apoferritins are susceptible to reaction with an appropriate reductant to give rise to the nucleation and growth of a new metal<sup>0</sup>-apoferritin nanoparticle.<sup>[18,19]</sup> Recently, our group reported that this route could be extended to the preparation of apoferritin-encapsulated Cu, Co and Ni nanoparticles from a previous apoferritin-encapsulated metal ion solution. The advantage of our procedure lies in the fact that we succeeded in isolat-

[a] Instituto de Investigaciones Físico-Químicas Teóricas y Aplicadas, Universidad Nacional de La Plata and Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas, Diag. 113 y 64, 1900 La Plata, Argentine  
E-mail: mceolin@yahoo.com.ar

[b] Departamento de Química Inorgánica, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, 18071 Granada, Spain  
E-mail: josema@ugr.es

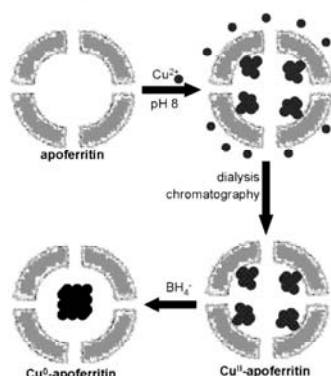
## FULL PAPER

M. Ceolin, J. M. Domínguez-Vera et al.

ing the metal(II) ion-loaded apoferritin species ( $\text{Cu}^{\text{II}}$ -apoferritin, Scheme 1), which, in a second step, can act as a nanoprecursor for the preparation of apoferritin-encapsulated zero-valent metal nanoparticles, avoiding any precipitation outside the apoferritin protein.<sup>[18,19]</sup>

However, the chemical nature and structure of the apoferritin-encapsulated metal ions remained uncertain. Unfortunately, no X-ray powder or electron diffraction could be obtained to determine the structure of the encapsulated material.

In the present work we performed small angle X-ray scattering (SAXS), X-ray near edge structure (XANES) and extended X-ray absorption fine structure (EXAFS) experiments on the intermediate species ( $\text{Cu}^{\text{II}}$ -apoferritin) as well as the final product obtained after chemical reduction ( $\text{Cu}^0$ -apoferritin). The results obtained point out that the encapsulated- $\text{Cu}^{\text{II}}$  metal ions are in fact a Cu-oxide/hydroxide apoferritin species and that it is completely transformed to a Cu zero-valent metal apoferritin after reduction with  $\text{NaBH}_4$  (Scheme 1).



Scheme 1. Structure of apoferritin and schematic representation of the preparation of  $\text{Cu}^{\text{II}}$ - and  $\text{Cu}^0$ -apoferritin nanoparticles.

## Results and Discussion

Apoferritin and  $\text{Cu}^{\text{II}}$  were incubated at pH 8 for 24 h. The resulting solution was exhaustively dialyzed against milli-Q water for two days to remove the  $\text{Cu}^{\text{II}}$  ions that were not bound to the protein. The apoferritin-containing fractions were isolated by G-25 Sephadex chromatography.

Apoferritin was monitored by UV/Vis spectroscopy at 280 nm and Cu by atomic absorption. The coelution of apoferritin and the metal (Figure 1, A) demonstrates that metal ions are attached to apoferritin. In addition, native apoferritin and  $\text{Cu}^{\text{II}}$ -apoferritin were electrophoretically analyzed on polyacrylamide gel (PAGE), under native (non-denaturing) conditions (Figure 1, B). The comigration of the samples (native and  $\text{Cu}^{\text{II}}$ -apoferritins) indicates, first, that the protein remained intact after reaction with  $\text{Cu}^{\text{II}}$

and, second, that the  $\text{Cu}^{\text{II}}$  atoms are indeed bound to the protein shell. The copper concentration of the mixed apoferritin-containing fractions, measured by atomic absorption, was  $3.0 \times 10^{-3}$  M and the apoferritin concentration, determined by the UV absorbance at 280 nm ( $\epsilon^{280} = 468000 \text{ M}^{-1}$ ), was  $1.08 \times 10^{-5}$  M corresponding to 300 copper atoms per apoferritin.

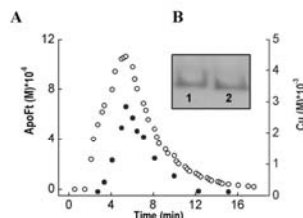


Figure 1. (A) Size-exclusion chromatography elution profile of  $\text{Cu}^{\text{II}}$ -apoferritin monitored by UV/Vis spectroscopy at 280 nm (○) and by copper atomic absorption (●). (B) Native polyacrylamide gel electrophoresis stained with Coomassie Blue: lane 1 is native apoferritin, lane 2 is  $\text{Cu}^{\text{II}}$ -apoferritin.

Interestingly,  $\text{Cu}^{\text{II}}$ -apoferritin does not react with the  $\text{Cu}^{\text{II}}$ -specific 5,10,15,20-tetrakis[4-(trimethylammonio)phenyl]-21H,23H-porphine tetratosylate (TTMAPP), traditionally used to detect  $\text{Cu}^{\text{II}}$ .  $\text{Cu}^{\text{II}}$ -apoferritin and TTMAPP were incubated together at two different temperatures (25 and 40 °C) and the characteristic TTMAPP- $\text{Cu}^{\text{II}}$  band at 432 nm did not increase with time. Although some radicals (7–9 Å in diameter) may slowly enter the apoferritin cavity,<sup>[23]</sup> the lack of the TTMAPP- $\text{Cu}^{\text{II}}$  interaction can be explained on the basis of the size of the apoferritin channel ( $\approx 4$  Å), which precludes the uptake of the large ( $\approx 18$  Å) TTMAPP ligand. However,  $\text{Cu}^{\text{II}}$  ions of  $\text{Cu}^{\text{II}}$ -apoferritin were reduced with  $\text{NaBH}_4$ , small enough to traverse the apoferritin channels, to yield zero-valent  $\text{Cu}^0$ . As a result of the reduction the UV/Vis spectrum of the solution dramatically changed showing the typical surface plasmon resonance band of nanosized metallic copper, centred at 570 nm.<sup>[18,19]</sup>

Unstained TEM images of the  $\text{Cu}^0$ -apoferritin nanoparticles show the presence of discrete electron-dense spherical cores.<sup>[18,19]</sup> The stained TEM images (with uranyl acetate) enabled the visualization of the organic apoferritin coating the metal particle (Figure 2).

On the other hand, stained and unstained TEM images of the  $\text{Cu}^{\text{II}}$ -apoferritin sample appear to have less contrast in general than those of  $\text{Cu}^0$ -apoferritin, although the presence of several small nanoparticles in the interior of apoferritin is evident (see parts B and C in Figure 2). Energy-dispersive spectroscopy of both samples of  $\text{Cu}^{\text{II}}$ - and  $\text{Cu}^0$ -apoferritin confirmed the presence of Cu inside the apoferritin (data not shown). Moreover, no Cu was detected outside the ferritin particles. The nature of the  $\text{Cu}^{\text{II}}$ -apoferritin structure, as well as other metal ions binding the apoferritin species, remains uncertain. Unfortunately, no X-ray powder

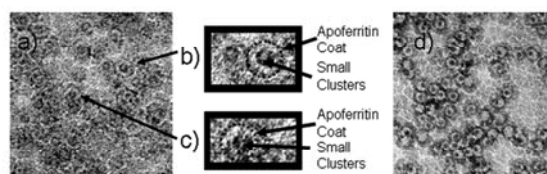


Figure 2. TEM negatively stained with uranyl acetate images: (a)  $\text{Cu}^{\text{II}}$ -apoferritin nanoparticles, scale bar 50; (b) and (c) zooms of image (a) where the apoferritin coat and the small clusters are highlighted for clarity; (d)  $\text{Cu}^0$ -apoferritin nanoparticles.

or electron diffraction could be obtained to determine the structure of the encapsulated material.

In order to gain information about the structure of the inorganic phase inside the apoferritin cavity both small angle X-ray scattering (SAXS) and X-ray absorption spectroscopy (XAS) were performed on oxidized and reduced copper–apoferritin particles.

A brief explanation of the physical origin of the SAXS signal and the meaning of the PDF curve will help us understand the results presented here. X-rays travelling through a medium with (average) uniform electron density should not deviate from their trajectory (in analogy with visible light across a medium with uniform refraction index). However, the presence of regions with different electron densities will scatter the photons rendering a size and shape specific pattern (SAXS signal). In the “infinite dilution limit”, the SAXS signal is proportional to  $\Delta\rho^2 = (\rho_{\text{part}} - \rho_{\text{matrix}})^2$ , the excess electron density (hereinafter  $\Delta\rho$ ) of the scatterer is also the additive since every different scatterer present in the sample will contribute independently to the SAXS signal.<sup>[24]</sup> The Fourier transformation of the SAXS signal produces the pair distribution function (PDF). Because of the linear properties of the Fourier transformation the PDF curve is also additive. The PDF curve can also be regarded as the autocorrelation function of the  $\Delta\rho$  of the particle.<sup>[24]</sup> In this sense, finite size particles should display a vanishing PDF above a critical maximum distance ( $D_{\text{max}}$ ) that, in the case of a spherical particle, will coincide with its diameter.

The intensity of the PDF curve for the case of core-shell structures can be qualitatively divided into two regions. While below  $D_{\text{max}}/2$  the PDF is dominated by  $\Delta\rho$ , arising from the core region, above  $D_{\text{max}}/2$ ,  $\Delta\rho$  originating in the shell structure dominates the curve.

Figure 3 shows the PDF curves obtained after a regularized Fourier transform<sup>[25]</sup> of the SAXS data (also shown as Guinier plots  $\{\ln[I(q)] \text{ vs. } q^2\}$  for  $\text{Cu}^{\text{II}}$ -apoferritin and  $\text{Cu}^0$ -apoferritin in Figure 3) obtained for apoferritin, iron-loaded-holo-ferritin (Fe-holo-ferritin) and oxidized and reduced Cu–apoferritin ( $\text{Cu}^{\text{II}}$ -apoferritin and  $\text{Cu}^0$ -apoferritin, respectively). All the PDF curves show the form expected for finite-sized particles with  $D_{\text{max}} \approx 120 \text{ \AA}$  although signals from high molecular weight aggregates can be seen above  $R = 120 \text{ \AA}$ .

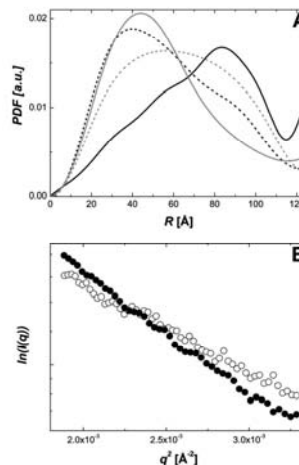


Figure 3. Pair distribution function (A) and Guinier plots (B) obtained from SAXS data for apoferritin (black full line), holo-ferritin (grey full line), reduced apoferritin (black dashed line and open circles) and oxidized apoferritin (grey dashed line and full circles).

The curve for apoferritin shows a maximum at high  $R$  values as expected for a spherical shell (i.e. a core-shell structure with a core that has a vanishing  $\Delta\rho$ ). Briefly, using the argument outlined above, the area of the PDF curve below  $D_{\text{max}}/2$  is significantly less than the area above  $D_{\text{max}}/2$  suggesting that  $\Delta\rho$  for the shell is greater than that for the core.

In contrast, the PDF curve for Fe–holoferritin shows a maximum displaced to lower  $R$  (lower than  $D_{\text{max}}/2$ ) expected for the presence of a dense inorganic core (i.e. a core with a higher  $\Delta\rho$  than the shell) filling the central cavity.

The PDF curve for  $\text{Cu}^0$ -apoferritin has several similarities with Fe–holoferritin. First, both curves have similar shapes indicating that  $\text{Cu}^0$ -apoferritin has, as with Fe–holoferritin, a core-shell structure with a high electron density core. Second, the maxima of both curves are almost coincident indicating that the  $\text{Cu}^0$  core occupies the centre of the



## FULL PAPER

M. Ceolin, J. M. Domínguez-Vera et al.

cavity.<sup>[24]</sup> Both observations support the results derived from the TEM images indicating the presence of a compact core centred in the apoferritin cavity with high imaging contrast between the core and the shell. With regard to Cu<sup>II</sup>-apoferritin, the PDF curve seems to be somewhat intermediate between a core-shell (represented by Fe-holoferitin) structure and a hollow shell sphere (represented by apoferritin). Assuming that the amount of apoferritin should not vary between both samples, a core with a lower electron density (similar to that of the shell) would explain the shape of the PDF curve.

The high sensitivity of the X-ray near edge structure (XANES) spectroscopic technique was used to gain information about the oxidation state and chemical nature of the Cu<sup>II</sup>-apoferritin species. The experimental results are shown in Figure 4 together with the spectra obtained for polycrystalline CuO and Cu(OH)<sub>2</sub> used as reference materials. Grey lines correspond to the spectra obtained for the Cu<sup>II</sup>-apoferritin sample (full line). Both the overall shape and structure of the spectra and their derivatives clearly indicate that the copper atoms are encapsulated as Cu<sup>II</sup> species. Detailed least-squares fits of the XANES data (not shown) indicate that Cu<sup>II</sup> is present as oxides and hydroxides in almost equal amounts.

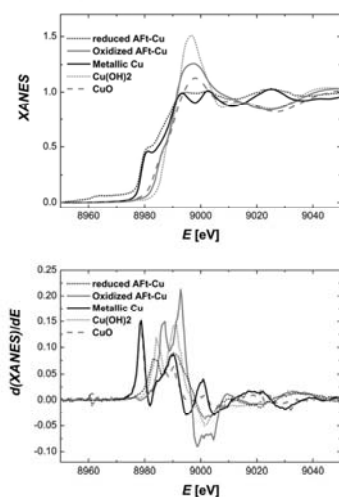


Figure 4. XANES spectra (upper panel) and their 1st derivatives (lower panel) of Cu<sup>II</sup>-apoferritin (full grey line), Cu<sup>0</sup>-apoferritin (dotted black line), metallic Cu foil (full black line), CuO (dashed grey line) and Cu(OH)<sub>2</sub> (dotted grey line).

The condensation of the inorganic phase took place at pH 8 suggesting that Cu<sup>II</sup> precipitated, inside the apoferritin cavity, as an amorphous Cu<sup>II</sup> oxide/hydroxide and our XANES results agree with this conclusion. To gain further structural knowledge about the Cu<sup>II</sup> core we fitted the EXAFS spectra obtained from the Cu<sup>II</sup>-apoferritin samples assuming an axially-distorted octahedral arrangement of the

oxygen ligands around the absorber (from XAS data it is not possible to determine whether the ligands are O=, OH- or H<sub>2</sub>O). The EXAFS data and its Fourier transform (FT) and the corresponding fitted curves are depicted in parts A and B of Figure 5, and the corresponding parameters are shown in Table 1. The quality of the fit in Figure 5 and the parameters shown in Table 1 confirm our structural model and suggest that the structural model for the Cu<sup>II</sup> precursor can be described as a collection of Cu<sup>II</sup> ions coordinated by six "oxygen" ligands in a distorted octahedral geometry.

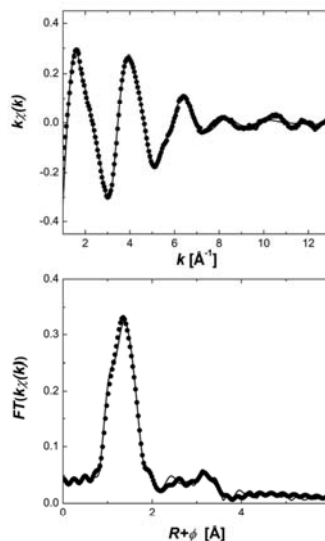


Figure 5. Upper plot EXAFS spectrum for Cu<sup>II</sup>-apoferritin. Lower plot: Fourier transform of the EXAFS spectrum. Full line corresponds to the fitted curve (see text).

Table 1. Structural parameters obtained fitting the EXAFS spectrum of Cu<sup>II</sup>-apoferritin. See main text for explanation.

Atom	CN	R [Å]	$\sigma^2$ [Å <sup>-2</sup> ]
Azimuthal O	4.3 ± 0.6	1.97 ± 0.01	1.1 ± 0.3 × 10 <sup>-2</sup>
Axial O	2.2 ± 0.3	2.34 ± 0.03	1.5 ± 0.4 × 10 <sup>-2</sup>

As already indicated the Cu<sup>II</sup> oxide/hydroxide reacted with NaBH<sub>4</sub> to build a Cu nanoparticle and, after chemical reduction, the XANES spectrum (full black line) obtained for the Cu-apoferritin particles dramatically changed, resembling the one expected for metallic copper. Both the "red shift" of the position of the absorption edge and the shape of the near edge region are clearly indicative of the presence of a Cu<sup>0</sup> species. Moreover, attempts to detect oxidized species were unsuccessful indicating that the chemical treatment was effective in promoting the reduction of the



Cu<sup>II</sup> to the Cu<sup>0</sup> species, confirming that full reduction of the Cu<sup>II</sup> species takes place within the apoferritin nanocavity.

The evident broadening of the resonances in the XANES spectrum of the reduced apoferritin sample (compared to the resonances observed for metal copper) is due to the truncation of long scattering paths (because of the finite size of the particle) responsible for sharp oscillations in the XANES region of the spectrum.

In order to analyze the geometry around the copper atoms, EXAFS experiments were performed on Cu<sup>0</sup>-apoferritin. Figure 6 shows the EXAFS spectra and their FTs for Cu<sup>0</sup>-apoferritin and metallic copper. Some immediate conclusions can be drawn from the comparison between both samples. A direct comparison of the EXAFS spectra of metallic copper and the Cu<sup>0</sup>-apoferritin sample reveals that, although similar, the atomic arrangement of Cu in the Cu-apoferritin sample can not be completely associated with a bulk FCC structure, as expected for metallic copper. The FT spectrum of Cu<sup>0</sup>-apoferritin also shows several maxima at increasing  $R$  indicating that copper atoms in the nanoparticle occupy crystalline sites in a well-ordered structure. The amplitude of the maximum at  $R_{\text{eff}} = 2.2 \text{ \AA}$  is 20% lower in Cu<sup>0</sup>-apoferritin than in metallic copper, which is compatible with a compact particle built from ca. 300 copper atoms.<sup>[26,27]</sup> Attempts to model the structure of the first coordination shell ( $R_{\text{eff}} = 2.2 \text{ \AA}$ ) of the Cu<sup>0</sup>-apoferritin nanoparticle with copper neighbours at about 2.55 Å in a FCC structure (as expected for metallic copper) were unsuccessful. To achieve a good fit of the experimental data, a two sub-shell model was proposed to reproduce the first coordination shell of Cu<sup>0</sup>-apoferritin and the correspond-

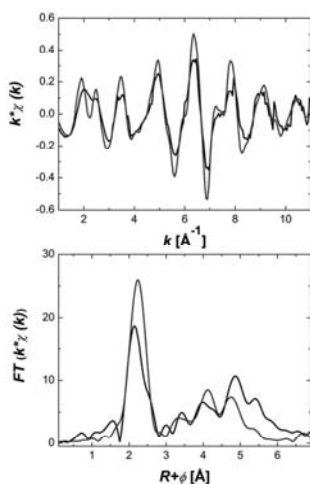


Figure 6. EXAFS (upper spectrum) and FT (lower spectrum) spectra for Cu<sup>0</sup>-apoferritin (black line) and a metallic copper foil (grey line).

ing fitted curves can be seen in Figure 7, and the fitting parameters are shown in Table 2. It is remarkable that the coordination distance for the first sub-shell in our model (2.48 Å) coincides rather well with the first coordination distance predicted using functional density theory for the BCC phase of metallic copper.<sup>[28]</sup> The small difference between the stabilization energy observed and calculated<sup>[28]</sup> between the FCC and BCC phases of metallic copper suggests that the energy associated with the surface tension of the particle would be enough to stabilize the, otherwise unstable, Cu-BCC phase.

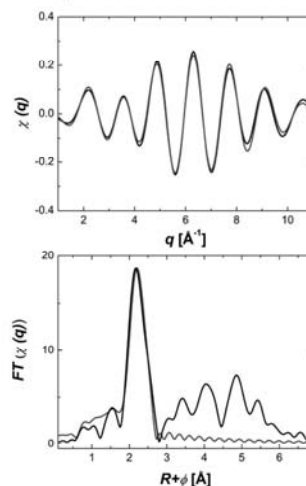


Figure 7. Back transformed (first shell) EXAFS (upper spectrum) and FT (lower spectrum) spectra for Cu<sup>0</sup>-apoferritin (black line) and the first shell fitted curve (grey line).

Table 2. Structural parameters obtained fitting the EXAFS spectrum of Cu<sup>0</sup>-apoferritin. See main text for explanation.

CN	$R$ [Å]	$\sigma^2$ [Å <sup>2</sup> ]
$5.2 \pm 0.4$	$2.48 \pm 0.02$	$1 \pm 1 \times 10^{-3}$
$4.2 \pm 0.5$	$2.62 \pm 0.02$	$1 \pm 1 \times 10^{-3}$

## Conclusion

Previous studies using apoferritin focused on demonstrating its use for the formation of metal nanoparticles rather than investigating the nature of their precursor species. This study demonstrates that it is possible to form Cu oxide/hydroxide by direct incubation of apoferritin and Cu<sup>II</sup> at high pH inside the apoferritin cavity, that it is also possible to isolate this species and finally that it can be used as a precursor to produce a Cu nanoparticle. In fact, as demonstrated by XANES, there is a full conversion from Cu<sup>II</sup> oxide/hydroxide to Cu<sup>0</sup> when Cu<sup>II</sup>-apoferritin is treated with NaBH<sub>4</sub>. On the basis of XANES, EXAFS and

## FULL PAPER

M. Ceolin, J. M. Domínguez-Vera et al.

TEM images of the  $\text{Cu}^{\text{II}}$ - and  $\text{Cu}^0$ -apoferritin species we succeeded in proposing a growth mechanism as outlined in Scheme 1: part of the  $\text{Cu}^{\text{II}}$  ions penetrate through the hydrophilic channels, forming small clusters of  $\text{Cu}^{\text{II}}$  oxide/hydroxide on the apoferritin cavity. The clusters are formed by a collection of octahedrally oxygen-coordinated  $\text{Cu}^{\text{II}}$  ions. Once  $\text{Cu}^{\text{II}}$  is reduced to  $\text{Cu}^0$  the clusters are destroyed and give rise to the formation of Cu nanoparticles in the interior of apoferritin. Although similar, the structure around copper atoms in  $\text{Cu}^0$ -apoferritin cannot be, solely, explained as a FCC structure as expected for metallic copper and the EXAFS spectra for the first coordination shell suggest a mixture between the stable Cu-FCC phase and an otherwise unstable Cu-BCC phase.

## Experimental Section

Horse spleen apoferritin (Sigma-Aldrich, lot. 055K7012) was incubated in the presence of EDTA (10 mM) for 1 h at 4 °C and purified in a Sephadex G-25 column, previously equilibrated with Tris-HCl buffer (20 mM) at pH 7.4, to remove loosely bound iron. The iron content was determined by atomic absorption spectroscopy and the protein content by UV/Vis spectroscopy. A ratio of 1:9 for Fe/apoferritin was obtained.

Sigma-Aldrich Horse spleen apoferritin ( $4 \times 10^{-5}$  mmol) was incubated with  $\text{Cu}^{2+}$  metal ions (0.1 M  $\text{CuSO}_4$ , 0.1 mmol) and the pH was dynamically adjusted to 8 with 0.01 M NaOH, to afford a homogeneous blue solution that was dialyzed against water. The apoferritin-containing fractions were isolated by G-25 Sephadex chromatography. Addition of  $\text{NaBH}_4$  (4 mg) to the blue solution of  $\text{Cu}^{2+}$ -apoferritin produced a black solution of  $\text{Cu}^0$ -apoferritin. The solution was exhaustively dialyzed against milli-Q water at 4 °C. Apoferritin was monitored by UV/Vis spectroscopy at 280 nm and Cu by atomic absorption yielding 300 Cu atoms per protein. The coelution of apoferritin and metal (Figure 3) indicates that metal ions are attached to apoferritin. The purity and stability of the  $\text{Cu}^{\text{II}}$ -protein was assessed by native PAGE. Gels were stained for protein for 1/2 hour using 0.1% Coomassie Blue in fixative 40%MeOH/10%HOAc. Gel was destained by treatment with 40%MeOH/10%HOAc to remove the background over 3 h. The solutions were finally lyophilized to yield blue-green and black powders of  $\text{Cu}^{2+}$ -apoferritin and  $\text{Cu}^0$ -apoferritin, respectively.

$\text{Cu}^{\text{II}}$ -apoferritin (1.5 mL,  $3.8 \times 10^{-4}$  M in Cu) and 5,10,15,20-tetrakis[4-(trimethylammonio)phenyl]-21H,23H-porphine tetratosylate (TTMAPP) (0.1 mL,  $1 \times 10^{-3}$  M) were incubated together in a UV/Vis quartz cuvette at two different temperatures (25 and 40 °C). The development of the  $\text{Cu}^{\text{II}}$ -TTMAPP complexes was followed by UV/Vis spectroscopy at 432 nm using a thermospectronic UV300 spectrophotometer against reference solutions containing appropriate amounts of  $\text{Cu}^{\text{II}}$ -apoferritin. Twenty cycles of 10 min were recorded. No significant changes were observed for the absorbance signal.

Full optimization of the geometry of TTMAPP was done using the MM2 method implemented from CS Chem3D software. Once the global minimum energy structure was obtained, the diameter was calculated using ChemProp Std Server software (both programs are trademarks of Cambridge Soft Corporation, Cambridge Scientific Computing, Inc., 2001).

The samples used for the TEM study were prepared by diluting the resulting solutions with milliQ water and then placing a drop onto

a carbon-coated Au grid and drying it in air at room temperature. The average particle sizes and the standard deviations were estimated from TEM image analyses of 100 particles. Electron micrographs were taken with a Philips CM-20 HR analytical electron microscope operating at 200 keV.

Both SAXS and XAS experiments were performed at the D11A-SAXS1 and D04B-XAFS1 experimental stations of the Synchrotron Light National Laboratory (LNLS), Campinas, Brazil, respectively. SAXS experiments were performed at constant temperature (22 °C) controlled using a circulating water bath. The incident wavelength was set to 1.448 Å and the sample-to-detector distance was kept at 1066 mm. The scattering pattern was detected using a gas-filled 1D detector. Each spectrum was obtained as the average of at least five independent spectra. Corrections for beam intensity, sample absorption and buffer scattering were performed following standard procedures. All XAS experiments were performed at room temperature (ca. 22 °C) in transmission geometry using a copper foil for calibration purposes. Data reduction and model fitting was performed using the programs ATHENA and ARTEMIS, respectively, from the IFFEFIT package.<sup>[29]</sup> Phases and amplitudes were calculated using FEFF6.0.<sup>[30]</sup>

## Acknowledgments

Financial support from the Spanish Ministerio de Educación y Ciencia (MEC) (project CTQ2006-02840) and Junta de Andalucía (Proyecto Excelencia FQM-00425) are gratefully acknowledged. N. G. thanks the Spanish MEC for a research contract (programa Ramón y Cajal). M. C. is a staff member of Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas, Argentina and full professor of Universidad Nacional del Noroeste de Buenos Aires, Argentina. Partial financial support is acknowledged from Laboratorio Nacional de Luz Sincrotron, Campinas, Brazil (projects D04B-XAFS1-5710 and D11A-SAXS1-4329).

- [1] S. Mornet, S. Vasseur, F. Grasset, E. Duguet, *J. Mat. Chem.* **2004**, *14*, 2161–2175.
- [2] F. Sonvico, C. Dubernet, P. Colombo, P. Couvreur, *Curr. Pharm. Des.* **2005**, *11*, 2091–2105.
- [3] B. L. Cushing, V. L. Kolesnichenko, C. J. O. Connor, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 3893–3946.
- [4] T. Douglas, *Biomimetic Materials Chemistry*, Wiley, New York, **1996**, p. 91.
- [5] T. Douglas, E. Strable, D. Willits, A. Aitouchen, M. Libera, M. Young, *Adv. Mater.* **2002**, *14*, 415–418.
- [6] T. Douglas, V. T. Stark, *Inorg. Chem.* **2000**, *39*, 1828–1830.
- [7] K. K. W. Wong, T. Douglas, S. Gider, D. D. Awschalom, S. Mann, *Chem. Mat.* **1998**, *10*, 279–285.
- [8] M. Uchida, M. T. Klem, M. Allen, P. Suci, M. Flenniken, E. Gillitzer, Z. Varpness, L. O. Liepold, M. Young, T. Douglas, *Adv. Mater.* **2007**, *19*, 1025–1042.
- [9] P. M. Harrison, P. Arosio, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **1996**, *1275*, 161–203.
- [10] P. M. Proulx-Curry, N. D. Chaspeen, *Coord. Chem. Rev.* **1995**, *144*, 347–368.
- [11] N. D. Chasteen, *Iron transport and storage in microorganisms, plants and animals*, Marcel Dekker, New York, **1998**, p. 498.
- [12] Y. Li, W. Kim, D. Wang, H. Dai, *Appl. Phys. A: Mater. Sci. Process.* **2002**, *74*, 325–328.
- [13] M. Allen, D. Willits, M. Young, T. Douglas, *Inorg. Chem.* **2003**, *42*, 6300–6305.
- [14] M. Okuda, K. Iwahori, I. Yamashita, Y. Zhang, H. Yoshimura, *Biotechnol. Bioeng.* **2003**, *84*, 187–194.
- [15] K. K. W. Wong, S. Mann, *Adv. Mater.* **1996**, *8*, 928–932.
- [16] S. Pead, E. Durrant, B. Webb, C. Larsen, D. Heaton, J. Johnson, G. D. Watt, *J. Inorg. Biochem.* **1995**, *59*, 15–27.

- [17] N. Galvez, P. Sánchez, J. M. Domínguez-Vera, *Dalton Trans.* **2005**, 2492–2494.
- [18] N. Galvez, P. Sánchez, J. M. Domínguez-Vera, A. Soriano-Portillo, M. Clemente-Leon, E. Coronado, *J. Mat. Chem.* **2006**, *16*, 2757–2761.
- [19] M. Clemente-Leon, E. Coronado, A. Soriano-Portillo, N. Galvez, J. M. Domínguez-Vera, *J. Mat. Chem.* **2007**, *17*, 49–51.
- [20] D. Ensign, M. Young, T. Douglas, *Inorg. Chem.* **2004**, *43*, 3441–3446.
- [21] T. Ueno, M. Suzuki, T. Goto, T. Matsumoto, K. Nagayama, Y. Watanabe, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 2527–2530.
- [22] T. Douglas, D. R. Ripoll, *Prot. Sci.* **1998**, *7*, 1083–1091.
- [23] X. Yang, N. D. Chasteen, *Biophys. J.* **1996**, *71*, 1587–1595.
- [24] O. Glatter and O. Kratky, *Small Angle X-ray Scattering*, Academic Press, London, **1982**, p. 181.
- [25] D. Svergun, *J. Applied Crystallography* **1992**, *25*, 495–503.
- [26] A. Frenkel, S. Frankel, T. Liu, *Phys. Scr.* **2005**, *T115*, 721–725.
- [27] A. Frenkel, *J. Synchrotron. Radiat.* **1999**, *6*, 293–295.
- [28] Z. Tang, M. Hasegawa, Y. Nagai, M. Saito, *Phys. Rev. B: Condens. Matter. Mater. Phys.* **2002**, *65*, 1951081–1951088.
- [29] M. Newville, *J. Synchrotron. Radiat.* **2001**, *8*, 322–324.
- [30] J. J. Rehr, J. Mustre de Leon, S. I. Zabinsky, R. C. Albers, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 5135–5140.

Received: August 29, 2007

Published Online: December 19, 2007

DOI: 10.1002/adfm.200800942

## Quantum Dots Decorated with Magnetic Bionanoparticles\*\*

By Belén Fernández, Natividad Gálvez,\* Rafael Cuesta, Ana B. Hungría, José J. Calvino, and José M. Domínguez-Vera\*

A new class of water-soluble, fluorescent, magnetic quantum dots—magnetoferritin bioconjugate—is prepared. The nanostructures are patterned mainly as dimer particles as characterized by high-angle annular dark-field scanning transmission electron microscopy and electron energy loss spectroscopy. Magnetic (high spontaneous magnetization values, superparamagnetism) and fluorescent (narrow emission peaks, uniform brightness) properties of both nanoblocks are maintained in the final nanostructure.

### 1. Introduction

Magnetic nanoparticles are being studied because of their numerous applications in the biomedical field as magnetic contrast agents in magnetic resonance imaging (MRI), colloidal mediators for cancer magnetic hyperthermia, and vectors that can be directed by means of an external magnetic field towards a desired location, such as in the case of targeted drug delivery.<sup>[1–5]</sup>

Incorporation of optical functionality to magnetic nanoparticles is of growing interest. The combination of optical and magnetic properties in a single nanometer-scaled probe would allow simultaneous biolabeling, optical or magnetic imaging, and cell sorting/separation, which could be of enormous importance, both from a diagnostic and therapeutic point of view.<sup>[6–9]</sup> The interest in magneto-optical nanoparticles is even greater if these particles are water soluble, a requisite for biomedical applications.<sup>[10–15]</sup>

Ferritin is an example of a genuine magnetic bionanoparticle. Ferritin is the major intracellular storage form of iron and is a spherical protein capable of accommodating an iron oxide mineral.<sup>[16]</sup> Recently,<sup>[17]</sup> we have reported that native ferritins are basically composed of a ferrihydrite/magnetite core/shell

structure. Specifically, magnetite appears to be the predominant phase when the ferritin iron content is gradually removed, reaching approximately 70% magnetite for the 200 Fe ferritin (herein MFt). A high spontaneous magnetization value of 70 emu g<sup>-1</sup> Fe was obtained ( $M_s = 95 \text{ emu g}^{-1} \text{ Fe}$  for magnetite). Furthermore, the exterior shell of ferritin provides a platform for chemical and genetic functionalization.<sup>[18]</sup> In fact, we have lately demonstrated that ferritin can be simultaneously conjugated with appropriate different Alexa Fluor dyes that exhibit fluorescence resonance energy transfer (FRET) in a single nanoparticle.<sup>[19]</sup>

Semiconductor nanoparticles or quantum dots (QDs) have emerged as an important alternative to “classic” organic dyes. In comparison with organic dyes and fluorescent proteins, QDs have unique optical and electronic properties: high photostability, high emission quantum yield, narrow emission peaks, size-dependent wavelength tunability, and molar extinction coefficients 10–50 times larger, which make them much brighter in *in vivo* conditions. Diverse application possibilities, including fluorescent labels for optoelectronics<sup>[20]</sup> and biology<sup>[21]</sup> (biolabeling and bioimaging) are currently being pursued.

Carboxyl-coated quantum dot or quantum rod (QR) systems, commercialized by Invitrogen, have a core/shell structure that consists of a nanometer-scale crystal of a lower-bandgap semiconductor material (CdSe) capped with a higher-bandgap semiconductor shell (ZnS) to improve the optical properties of the material. This core/shell material is further coated with a polymer shell that allows the materials to be conjugated to biological molecules while retaining their optical properties. For clarity, we will use herein the generic term ‘quantum dot’, even if the semiconductor particles have rod morphology.

### 2. Results and Discussion

In this Full Paper, we describe the preparation of dual-functional probes: fluorescent and magnetic quantum-dot-magnetoferritin (QD-MFt) bioconjugates, as a new class of water-soluble bifunctional carriers for optical and magnetic imaging. Neeman and co-workers<sup>[22a]</sup> demonstrated that the

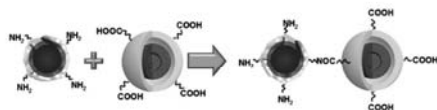
[\*] Dr. N. Gálvez, Dr. J. M. Domínguez-Vera, B. Fernández  
Departamento de Química Inorgánica  
Universidad de Granada  
Avda. Fuentenueva s/n, 18071 Granada (Spain)  
E-mail: ngalvez@ugr.es; josema@ugr.es

Dr. R. Cuesta  
Departamento de Química Inorgánica y Orgánica  
E.P.S. 23700 Linares (Spain)

Dr. A. B. Hungría, Dr. J. J. Calvino  
Departamento Ciencia de Materiales e Ingeniería Metalúrgica y  
Química Inorgánica  
Universidad de Cádiz  
Campus Río San Pedro, 11510 Cádiz (Spain)

[\*\*] We are grateful to the MEC (project CTQ2006-02840), Junta de Andalucía (Proyecto Excelencia FQM-02525), and EU I3 Project ESTEEM (Contract n° 026019 R113) for financial support. N.G. and A.B.H. thank the MEC for a research contract (Ramón y Cajal program). Supporting Information is available online from Wiley InterScience or from the author.





**Scheme 1.** Coupling between carboxyl-coated QDs and Mf to form the fluorescent, magnetic bioconjugated nanoprobe. The Mf surface  $\text{NH}_2$  group reacts with the carboxyl QD to form a covalent amide bond.

use of ferritin as an endogenous reporter for in vivo mapping of gene expression by MRI is feasible. In fact, brain ferritin can be used as a natural MRI contrast for visualizing neurodegenerative tissue accumulations.<sup>[22b]</sup> Taking into account the potential of both building blocks (magnetoferritin and QDs), we have used the lysine residues located at the external shell of the protein to covalently conjugate three types of carboxyl quantum dots: 525, 655, and 800 nm emitting CdSe/ZnS core/shell QDs (herein QD525, QD655, and QD800, respectively); thus, obtaining three magnetic nanostructures with variable fluorescence emission (Scheme 1). Specifically, the QD800-MfT includes CdSe/Te to extend the emission into the near-infrared region because of the improved tissue penetration depth at these wavelengths.<sup>[23]</sup> These QDs have a narrow, symmetric emission spectrum with the emission maximum centred at 525, 655, and 800 nm, respectively.

The use of nanoparticles instead of molecules has several advantages: Firstly, multiplexing, which is the simultaneous detection of multiple signals. Secondly, nanoparticles have more surface area to be linked to numerous ligands and thus can act as nanoscaled scaffolds for attachment of multiple diagnostic and/or therapeutic agents. Thirdly, it has been reported that nanoparticles (10–100 nm) are accumulated preferentially at tumour sites through a process called enhanced permeability and retention (EPR).<sup>[24]</sup> In the case of the water-soluble dual-functional probes (QD-MfT) we report herein, there is an additional advantage, which is the existence of two different platforms: Magnetoferritin with its heterofunctional surface, and carboxyl QDs for biolabeling different and multiple types of vectors in living systems.

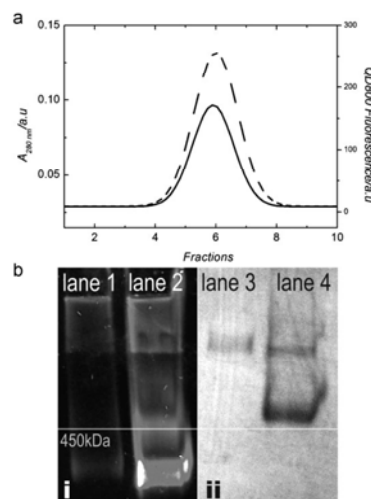
Ferritin with 200 Fe (MfT) was synthesized according to a previous reported method.<sup>[17]</sup> Briefly, iron was gradually removed in a controlled manner by the traditional procedure of reduction and Fe(II) chelation until ferritin containing 200 Fe was obtained. Transmission electron microscopy (TEM) showed a mean diameter of  $5.1 \pm 1.0$  nm. It is worth remarking that iron cores of this sample with less iron content are more irregular in shape and less electron dense compared with ferritin containing typical iron content (see Supporting Information, Fig. S11).

Carboxyl-coated QD probes were purchased from Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA). The surface of the QD, covered with free carboxyl (COOH) residues, enables covalent coupling to the QD probes. A TEM study (see Supporting Information, Fig. S12) of QDs (QD525, QD655, QD800) showed heterogeneous cores with mean diameters of  $5 \pm 1.5$ ,  $20 \pm 2$ , and  $10 \pm 1.2$  nm, respectively.

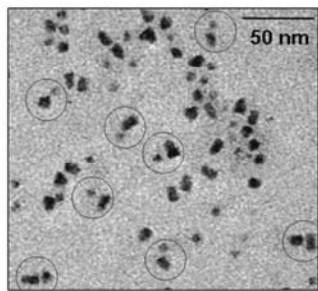
Magnetic, fluorescent bioconjugates were prepared by a facile one-step synthesis method. The conjugation process of QD (525, 650 or 800) to MfT has been achieved via covalent crosslinking chemistry using EDC (1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl] carbodiimide hydrochloride) as a catalyst. This crosslinking reaction takes place via amide bond formation. The advantage for the carboxylate-amine condensation process is that ferritin contains primary amine groups and does not need any chemical modification before QD conjugation. Therefore, the lysine residues on the outer MfT shells were used to crosslink the carboxylic acid ends on the QD surface via carbodiimide chemistry to produce QD-MfT bioconjugates.

In a typical experiment, a carboxyl-coated QD was allowed to react with an excess (25 equiv) of MfT for 24 h. The resulting solution was analyzed by size exclusion chromatography. The protein was monitored by UV-vis spectroscopy at 280 nm, and the QD was monitored by emission fluorescence at 800 nm (Fig. 1A) (QD525 and QD655 were monitored at 525 and 655 nm respectively, data not shown). Fractions where protein and QD coelution took place were isolated and then electrophoretically analyzed on polyacrylamide gel (PAGE) under native (non-denaturing) conditions.

Free MfT, QD525, QD655, QD800 (controls) and QD525-MfT, QD655-MfT, QD800-MfT bioconjugates were studied



**Figure 1.** a) Chromatography elution profile of the QD800-MfT sample. Protein (black line) was monitored by UV-vis absorbance at 280 nm, and QD800 (dashed line) was monitored by fluorescence at 800 nm. b-i) Native polyacrylamide gel electrophoresis unstained under a UV lamp. Native QD655-MfT and lane 2 is free QD655. ii) Stained electrophoresis (Coomassie Brilliant Blue R250). A unique band corresponding to QD655-MfT is observed (lane 3). Lane 4 is free MfT, showing the characteristic protein band pattern.



**Figure 2.** TEM (bright-field) image of the QD800-MFt fluorescent, magnetic nanoparticles. Some dimers are marked in grey circles.

(Fig. 1B, only the QD655-MFt sample is shown for clarity). Co-migration of samples indicates, firstly, that QDs are linked to the protein and, secondly, that there is no disruption of the quaternary structure of the protein after labeling.

The TEM image (Fig. 2) of the sample QD800-MFt shows that the crosslinking step does not result in aggregation. High-angle annular dark-field scanning transmission electron microscopy (HAADF-STEM) shows that the QD-MFt bioconjugates are patterned mainly as dimer particles. The intensity of the HAADF-STEM images depends primarily on the atomic number *Z* and the thickness of the specimen.<sup>[25]</sup> A typical HAADF image of the QD800-MFt bioconjugated dimer (Fig. 3a) clearly evidences a different contrast between the two kinds of particles, which serves to distinguish between MFt and QDs. Every dimer contains a less bright particle, corresponding to an iron oxide structure with lower *Z*, and a

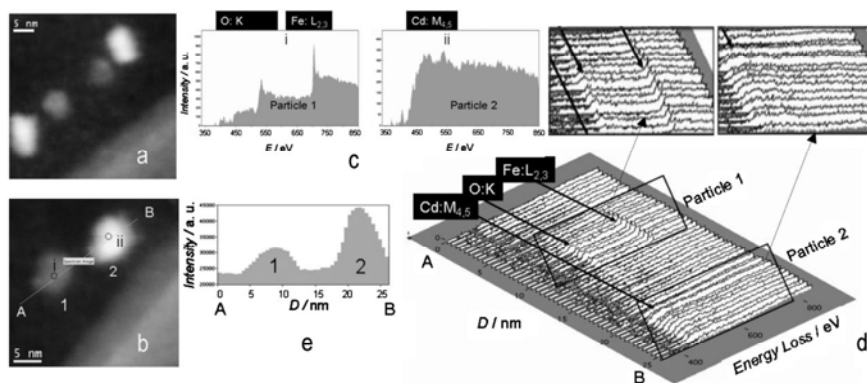
brighter particle, corresponding to the selenide QD. An interparticle distance range of around 4–6 nm is observed in the QD-MFt dimer, in agreement with the sum of the polymer (coating the QD) and organic shell (MFt) thicknesses.

We analyzed a series of bioconjugated dimers using the electron energy loss spectroscopy (EELS) spectrum-line (SL) technique (Fig. 3b). In this experimental approach, a collection of EEL spectra is sequentially acquired while a fine (usually in the order of a few angstroms) electron probe is scanned along a predefined path on the sample. In this study, 50 spectra were acquired using a 0.5 nm probe and a 0.5 nm pitch between spectra. A 0.5 eV energy dispersion value was used to perform a simultaneous qualitative analysis of the Fe:L<sub>2,3</sub>, O:K, and Cd:M<sub>4,5</sub> edges. By doing so, we could distinguish between MFt and QD particles. An acquisition time of 1 s per spectrum was used to avoid sample damage.

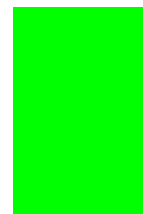
Figure 3c illustrates two individual spectra acquired at points *i* and *ii*. As marked on Figure 3b, they were recorded on particles 1 and 2, respectively. In particle 1 (MFt) the signal corresponds to the O (ca. 532 eV) and Fe (ca. 708 eV) edges whereas in particle 2 (QD) the spectrum shows the Cd edge (ca. 404 eV). Figure 3d shows the collection of EEL spectra acquired across the A–B line.

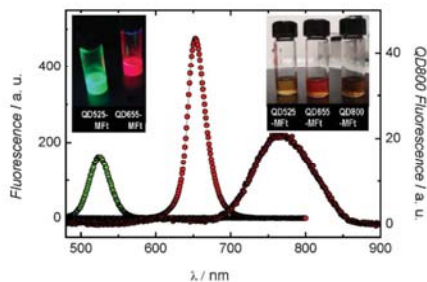
Identification of the two particles can be done following the appearance of the O:K and Fe:L edges (particle 1) and the Cd:M edge (particle 2). The HAADF signal intensity variation along the line scan recorded during the EEL spectra acquisition (Fig. 3e) confirms the identification and clearly indicates the absence of significant sample drift during the SL experiment.

Figure 4 shows the fluorescence emission spectra of QD525-MFt, QD625-MFt, and QD800-MFt bioconjugates under excitation at 340 nm. No significant changes in the QDs' peak



**Figure 3.** a) HAADF-STEM image showing two consecutive dimers of QD800-MFt; b) dimer analysed using the spectrum-line technique in (d); c) EEL spectra of points *i* and *ii*; d) EEL spectra taken between points A and B in the energy loss region of Cd:M<sub>4,5</sub>, O:K, and Fe:L<sub>2,3</sub> edges; upper images are higher magnification images of the regions of particles 1 and 2; e) HAADF signal intensity variation during acquisition of the spectrum line shown in (b).



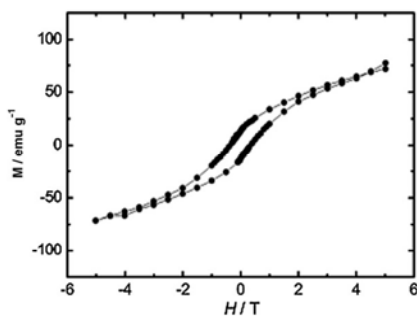


**Figure 4.** Fluorescence spectra of QD525–MFt (green), QD655–MFt (red), and QD800–MFt (wine) dual-function bioconjugates, showing bright emission bands at 525, 655, and 800 nm, respectively.

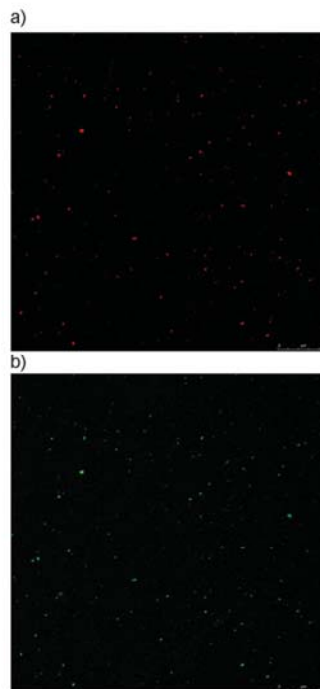
emission wavelengths and bandwidths were observed after the coupling process.

Likewise, magnetic studies of the QD–MFt bioconjugates were performed using a superconducting quantum interference device (SQUID). As an example, Figure 5 shows the magnetization ( $M$ ) versus magnetic field strength ( $H$ ) curve of QD800–MFt. High remanence and high spontaneous magnetization values (ca.  $70 \text{ emu g}^{-1} \text{ Fe}$ , theoretical value for magnetite is  $95 \text{ emu g}^{-1} \text{ Fe}$ ) were measured, typical of a ferrimagnetic magnetite phase.

Fluorescence microscopy was performed on QD525–MFt, QD655–MFt, and QD800–MFt (Fig. 6). For high-efficiency long-term imaging and multiplexing (simultaneous detection of multiple signals) analysis, the encoded bioconjugates should have uniform brightness. From the images, it is clear that the coupling of MFt does not cause visible aggregation or clustering of QDs and that fluorescent, magnetic QD–MFt particles keep their brightness and uniformity.



**Figure 5.** Hysteresis loop of magnetization per Fe atom at  $T=2 \text{ K}$  of the bioconjugated QD800–MFt sample.



**Figure 6.** Confocal fluorescence images showing the brightness and uniformity of dual-function bioconjugates: a) QD655–MFt red emission and b) QD525–MFt green emission. (QD800–MFt showed a very poor signal as its emission is on the detection limit of the microscope.)

### 3. Conclusions

We have succeeded in developing a flexible route for the preparation of water-soluble, bifunctional (fluorescent, magnetic) nanostructures, which is one of the key challenges for the application of nanoscience in the biomedical field. The high spontaneous magnetization values of the superparamagnetic magnetoferritin nanoblock can serve as contrast agent in MRI and the other nanoblock, the quantum dot, renders the full nanostructure fluorescent (with variable emission).

### 4. Experimental

**Preparation of the Ferritin Sample (MFt):** Horse spleen ferritin (lot 083K7051) was obtained from Sigma–Aldrich. The magnetoferritin sample was prepared by partial core reduction by using a controlled amount of thioglycolic acid/sodium acetate and controlled reaction time in the presence of 2,2'-bipyridyl (0.3 M). After treatment, ferritin solutions were exhaustively dialyzed for 4 days at  $4^\circ \text{C}$  with several changes of milli-Q water [17].



**Conjugation of QDs with the Protein MFI:** Carboxyl-coated quantum dots (OD525, OD655, OD800) were purchased from Invitrogen. The other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich. A stock solution (10  $\mu$ L, 10 mg mL<sup>-1</sup>) of EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride) in double-distilled water was mixed with a carboxyl QD stock solution (20  $\mu$ L, 8 mM) for 30 min. An MFI (2 mL, 1 mg mL<sup>-1</sup>) solution, in phosphate-buffered saline (10 mM, pH 8.0), was added to this mixture and incubated for 24 h to allow the reaction to occur. After the reaction was completed, the solution mixture was purified using a gel filtration column with Sephacryl 5.5 cm  $\times$  1.5 cm beads (Sigma) to remove any unbound proteins and reaction byproducts. Size exclusion chromatography showed coelution of the protein (UV-visible absorption at 280 nm) and QDs (fluorescence emission at 525, 655, or 800 nm). Likewise, native electrophoresis (SDS-PAGE) showed a unique band that corresponded to the entire QD-MFI.

**Electron Microscopy Studies:** Samples were prepared by placing a drop of the QD-MFI solution onto a carbon-coated Cu grid. Electron micrographs were taken with a Philips CM-20 HR electron microscope operating at 200 keV. HAADF images and EELS spectra were recorded in a JEOL 2010F instrument working at 200 keV. The spectrum-line (SL) mode was used: this approach consists of acquiring a series of 50 EELS spectra while a 0.5 nm beam is scanned along the sample. The HAADF intensity signal was also simultaneously collected at each point within the scanned area. This approach allows correlation of the nanoanalytical and structural information of the region under study. The above-mentioned instrument allows the recording of EELS spectra using acquisition times as small as 1 s on the Cd:M<sub>1,5</sub>, O:K, and Fe:L<sub>2,3</sub> edges.

**Fluorescence Measurements:** Fluorescence emission and excitation spectra were recorded on a Cary Eclipse spectrofluorometer. For the emission spectra, samples were excited at 340 nm with slit widths of 5 nm for both the excitation and emission monochromators.

**Confocal Laser Scanning Microscopy:** Fluorescence images of QD-MFI bioconjugates were obtained using a Leica (DMI6000) inverted microscope equipped with lasers: blue diode (405 nm), argon (458, 476, 488, 496, 514 nm), He/Ne (543, 594, 633 nm).

**Magnetism Measurements:** Magnetic susceptibility measurements were performed on lyophilized samples using a magnetometer (Quantum Design MPMS-XL-5) equipped with a SQUID sensor.

Received: July 8, 2008

Published online: November 18, 2008

- [1] P. S. Doyle, J. Bibette, A. Bancaud, J. Viovy, *Science* **2002**, 295, 2237.
- [2] S. Mornet, S. Vasseur, F. Grasset, E. Duguet, *J. Mater. Chem.* **2004**, 14, 2161.
- [3] F. Sovinco, C. Dubernet, P. Colombo, P. Couvreur, *Curr. Pharm. Des.* **2005**, 11, 2091.
- [4] J. M. Perez, F. J. Simeone, Y. Saeki, L. Josephson, R. Weissleder, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 10 192.
- [5] E. X. Wu, H. Tang, K. K. Wong, J. Wang, *J. Magn. Reson. Imaging* **2004**, 19, 50.

- [6] a) V. Salgueirino-Maceira, M. A. Correa-Duarte, M. Spasova, L. M. Liz-Marzán, M. Farle, *Adv. Funct. Mater.* **2006**, 16, 509. b) T.-J. Yoon, K. N. Yu, E. Kim, J. S. Kim, B. G. Kim, S.-H. Yun, B.-H. Sohn, M.-H. Cho, J.-K. Lee, S. B. Park, *Small* **2006**, 2, 209. c) F. Wetz, K. Soultanica, A. Falqui, M. Respaud, E. Snoeck, B. Chaudret, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, 46, 7079.
- [7] G. P. Wang, E. Q. Song, H. Y. Xie, Z. L. Zhang, Z. Q. Tian, C. Zuo, D. W. Pang, D. C. Wu, Y. B. Shi, *Chem. Commun.* **2005**, 4276.
- [8] D. Wang, J. He, N. Rosenzweig, Z. Rosenzweig, *Nano Lett.* **2004**, 4, 409.
- [9] T. R. Sathe, A. Agrawal, S. Nie, *Anal. Chem.* **2006**, 78, 5627.
- [10] N. Gaponik, I. L. Radtchenko, G. B. Sukhorukov, A. L. Rogach, *Langmuir* **2004**, 20, 1449.
- [11] D. K. Yi, S. T. Selvan, S. S. Lee, G. C. Papaefthymiou, D. Kundaliya, J. Y. Ying, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 4990.
- [12] S. T. Selvan, P. K. Patra, C. Y. Ang, J. Y. Ying, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, 46, 2448.
- [13] G. Beaune, B. Dubertret, O. Clément, C. Vayssettes, V. Cabuil, C. Ménager, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, 46, 5421.
- [14] A. Agrawal, T. Sathe, S. Nie, *J. Agric. Food Chem.* **2007**, 55, 3778.
- [15] L. Etgar, E. Lifshitz, R. Tannenbaum, *J. Phys. Chem. C* **2007**, 111, 6238.
- [16] C. Quintana, *Mini-Rev. Med. Chem.* **2007**, 7, 961.
- [17] N. Gálvez, B. Fernández, P. Sánchez, R. Cuesta, M. Ceolín, M. Clemente-León, S. Trasobares, M. López-Haro, J. J. Calvino, O. Stéphan, J. M. Domínguez-Vera, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 8062.
- [18] M. Uchida, M. T. Klem, M. Allen, P. Suci, M. Flenniken, E. Gillitzer, Z. Varpness, L. O. Liepold, M. Young, T. Douglas, *Adv. Mater.* **2007**, 19, 1025.
- [19] B. Fernández, N. Gálvez, P. Sánchez, R. Cuesta, R. Bermejo, J. M. Domínguez-Vera, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2008**, 13, 349.
- [20] a) A. P. Alivisatos, *Science* **1996**, 271, 933. b) R. Ashoori, *Nature* **1996**, 379, 413. c) D. L. Klein, R. Roth, A. K. L. Lim, A. P. Alivisatos, P. L. McEuen, *Nature* **1997**, 389, 699. d) V. I. Klimov, A. A. Mikhailovsky, S. Xu, A. Malko, J. A. Hollingsworth, C. A. Leatherdale, H.-J. Eisler, M. G. Bawendi, *Science* **2000**, 290, 314.
- [21] a) P. Alivisatos, *Nat. Biotechnol.* **2004**, 22, 47. b) I. L. Medintz, H. T. Uyeda, E. R. Goldman, H. Mattoussi, *Nat. Mater.* **2005**, 4, 435. c) A. P. Alivisatos, W. Gu, C. Larabell, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2005**, 7, 55. d) X. Michalet, F. F. Pinaud, L. A. Bentolila, J. M. Tsay, S. Doose, J. J. Li, G. Sundaresan, A. M. Wu, S. S. Gambhir, S. Weiss, *Science* **2005**, 307, 538. e) S. Kim, Y. T. Lim, E. G. Soltész, A. M. De Grand, J. Lee, A. Nakayama, J. A. Parker, T. Mihaljevic, R. G. Laurence, D. M. Dor, L. H. Cohn, M. G. Bawendi, J. V. Frangioni, *Nat. Biotechnol.* **2004**, 22, 93. f) W. C. W. Chan, S. Nie, *Science* **1998**, 281, 2016. g) S. Nie, Y. Xing, G. J. Kim, J. W. Simons, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2007**, 9, 257.
- [22] a) B. Cohen, H. Dafni, G. Meir, A. Harmeliny, M. Neeman, *Neoplasia* **2005**, 7, 109. b) J. Vymazal, O. Zak, J. W. M. Bulte, P. Aisen, R. A. Brooks, *Magn. Reson. Med.* **1996**, 36, 61.
- [23] S. W. Kim, J. P. Zimmer, S. Ohnishi, J. B. Tracy, J. V. Frangioni, M. G. Bawendi, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 10 526.
- [24] a) R. K. Jain, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **1999**, 1, 241. b) R. K. Jain, *J. Controlled Release* **2001**, 74, 7.
- [25] A. Howie, *J. Microsc.* **1979**, 117, 11.



