
Impacto medioambiental de nanopartículas

Bernardo Herradón

Ayudas a la investigación 2010

Autor

Bernardo Herradón
(IQOG-CSIC)

Índice

1.	Introducción	4
2.	Resumen de los resultados	4
	2.1. Síntesis y caracterización de AuNPs	4
	2.2. Estudios de estabilidad de AuNPs en el medio de cultivo	4
	2.3. Estudios biológicos	8
	2.4. Estudios computacionales preliminares	9
	2.5. Intentos de obtener nanopartículas de óxidos de hierro	9
3.	Conclusiones	9
4.	Referencias	9

1. INTRODUCCIÓN

Los nanomateriales están constituidos por agregados de átomos, iones o moléculas que forman partículas de tamaño en la escala nanométrica, del orden de las decenas a las centenas de nanómetros (nm, $1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$). Estos materiales prometen revolucionar la sociedad en las próximas décadas, pues permitirán fabricar artificio versátiles, de múltiples aplicaciones, con considerable ahorro energético y de espacio.

Por lo tanto, es de esperar que en un futuro próximo, nuestra sociedad hará un uso masivo de nanomateriales. Las regulaciones legales, el sentido común y los requisitos medioambientales obligarán a que todo compuesto químico usado en aplicaciones industriales, tecnológicas, agrarias, sanitarias, cosmética, etc., sea caracterizado por su potencial peligrosidad para personas, animales, plantas y ecosistemas.

Como ha ocurrido frecuentemente en el desarrollo industrial de los dos últimos siglos, las aplicaciones prácticas de compuestos químicos han progresado mucho más que sus evaluaciones toxicológicas. Para evitar que esta situación ocurra en el área de nanomateriales, es necesario que investiguemos intensamente su toxicidad potencial.

En este contexto se ha enmarcado el presente proyecto, cuyos objetivos a medio-largo plazo son obtener datos fiables de actividad biológica y toxicológica de nanomateriales y la modelización computacional de los mismos. Los estudios computacionales darán información sobre la estructura de los materiales que permitirán establecer relaciones estructura-actividad biológica. Esta información será de gran valor en las áreas de la química médica y toxicología de materiales; pues proporcionará la base para predecir las actividades biológicas de materiales antes de prepararlos, lo que es especialmente útil en el área de toxicología; pues ahorrará numerosos experimentos que son costosos y difíciles de interpretar.

En este proyecto hemos realizado estudios preliminares sobre nanopartículas de oro modificadas por moléculas orgánicas de naturaleza peptídica.

Las nanopartículas de oro (AuNPs) modificadas con moléculas orgánicas han sido ampliamente descritas en la bibliografía, con aplicaciones prácticas que ya se están vislumbrando.^[1] Existen resultados contradictorios sobre la toxicidad de los nanomateriales basados en AuNPs. Posiblemente, esta propiedad es muy dependiente de la parte orgánica unida al núcleo metálico.^[2]

Los compuestos peptídicos investigados son derivados de bifenilo que en investigaciones anteriores de nuestro grupo habían mostrado diversas actividades biológicas. La elección de estos compuestos (denominados genéricamente *híbridos péptido-biarilo*) como estabilizantes de las nanopartículas se han basado en su fácil síntesis, su diversidad estructural y sus interesantes actividades biológicas.

Las nanopartículas de oro modificadas por híbridos péptido-biarilo se han caracterizado estructuralmente, se han estudiado su estabilidad en diversas condiciones, se han realizado ensayos de toxicidad (en fase inicial) y se

ha explorado alguna metodología computacional para estudiar este tipo de materiales.

Esta investigación se inició antes de la fecha de inicio del proyecto financiado por la Fundación MAPFRE y durante el año 2011 se ha realizado con su patrocinio.

2. RESUMEN DE LOS RESULTADOS

2.1. Síntesis y caracterización de AuNPs

Se han sintetizado AuNPs con diferentes tamaños y funcionalizadas con compuestos orgánicos de diferente estructura. Para ello, se han elegido híbridos péptido-bifenilo (HPBs) como estabilizantes, cuya estructura consiste en dos cadenas péptidas unidas a las posiciones 2 y 2' de la unidad bifenilo.^[3] Esta familia de compuestos presenta interesantes características como propiedades dinámicas en disolución, estructuras ordenadas en fase sólida y actividad biológica como inhibidores de calpaína.^[4] Además, nuestro grupo ha publicado recientemente el uso de estos compuestos como agentes estabilizadores para sintetizar AuNPs, proporcionando estabilidad y evitando procesos de aglomeración en disoluciones coloidales de AuNPs.^[5]

Las estructuras de los HPBs usados se indica en la Figura 1. Las AuNPs modificadas con HPBs se han preparado en una fase formada por 2-propanol/agua/metanol y mediante la reducción del precursor metálico (HAuCl_4) con borohidruro de sodio (NaBH_4) como se indica en el Esquema 1.

Se ha comprobado cómo la estructura del HPB utilizado en la síntesis de las NPs influye tanto en el tamaño de las AuNPs resultantes como en su estabilidad. Así, los HPBs 2, 3 y 4 proporcionan AuNPs aglomeradas y con heterogénea distribución de tamaño, como puede verse en la figuras 3a, 3b y 3c obtenidas en el estudio realizado mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).

En cambio cuando se utilizaron los HPBs 1, 5 y 6 las AuNPs formadas, Au-1, Au-5 y Au-6, resultaron ser estables y con una distribución de tamaños bastante homogénea como puede observarse en las Figuras 4a, 4b y 4c correspondientes a las imágenes obtenidas del análisis de TEM.

Las AuNPs que resultaron ser más estables y a su vez que presentan una mayor homogeneidad de tamaños, Au-1, Au-5 y Au-6, fueron caracterizadas estructuralmente mediante técnicas diversas como espectroscopía de ultravioleta visible (UV-vis), espectroscopía infrarroja (FT-IR), microscopía electrónica de transmisión (TEM-EDX) y análisis elemental. Con ello se ha comprobado su funcionalidad y aporta información de los grupos funcionales que pueden estar implicados en el enlace del HPB con la superficie de la AuNP.

2.2. Estudios de estabilidad de AuNPs en el medio de cultivo

Una vez caracterizadas las AuNPs y antes de proceder a iniciar los estudios de citotoxicidad se realizaron estudios

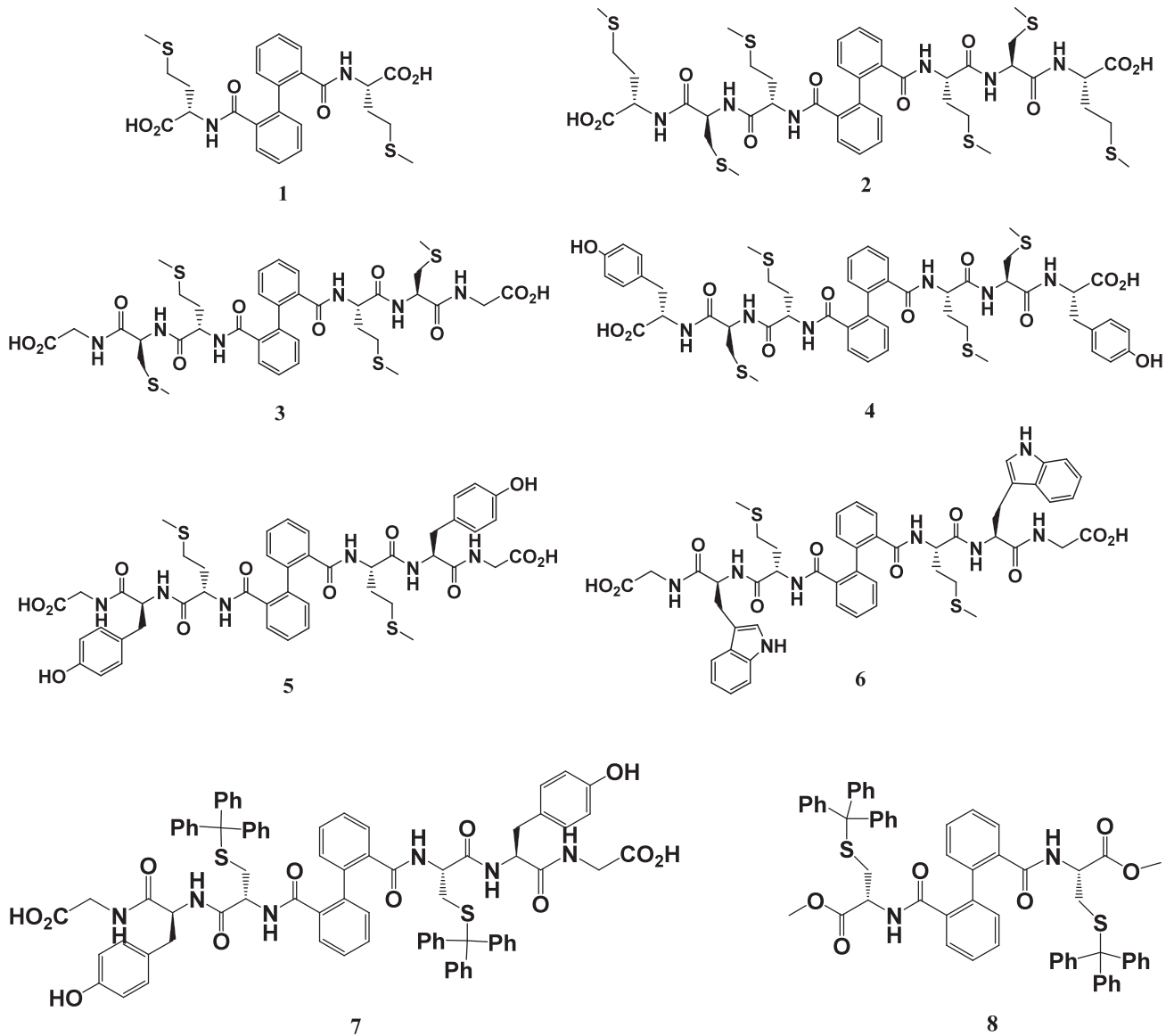
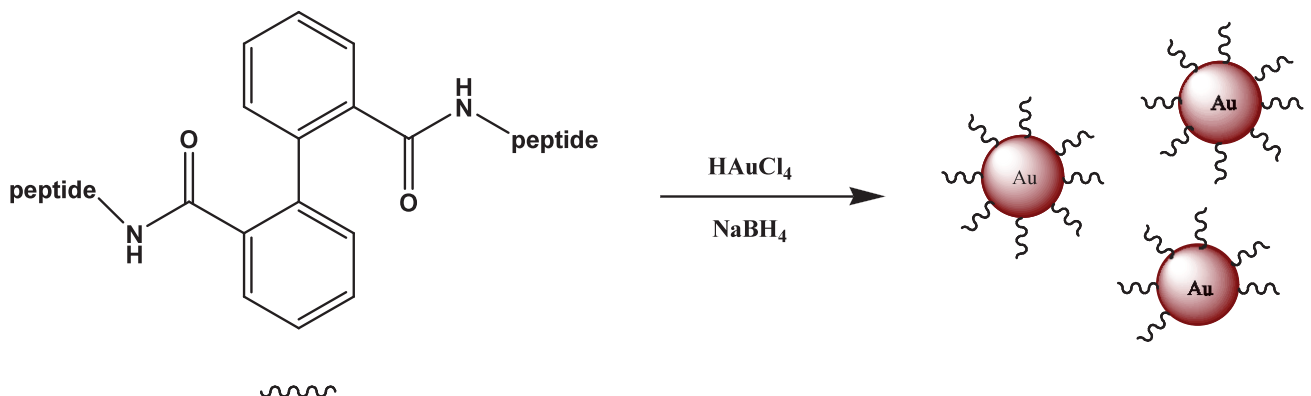


Figura 1. Híbridos péptido-bifenilo usados para estabilizar las AuNPs.



Esquema 1. Esquema de síntesis de las AuNPs.

de estabilidad de las AuNPs en el medio de cultivo en el que se harán los experimentos.

Mediante la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS) se ha estudiado el diámetro de las AuNPs dispersadas en el medio de cultivo. El diámetro obtenido me-

dante esta técnica es el denominado diámetro hidrodinámico y representa cómo la NP difunde en el fluido. Las nanopartículas tienen tendencia a aglomerarse en el medio de cultivo debido principalmente a la presencia de las sales. Las AuNPs no aglomeradas en solución son

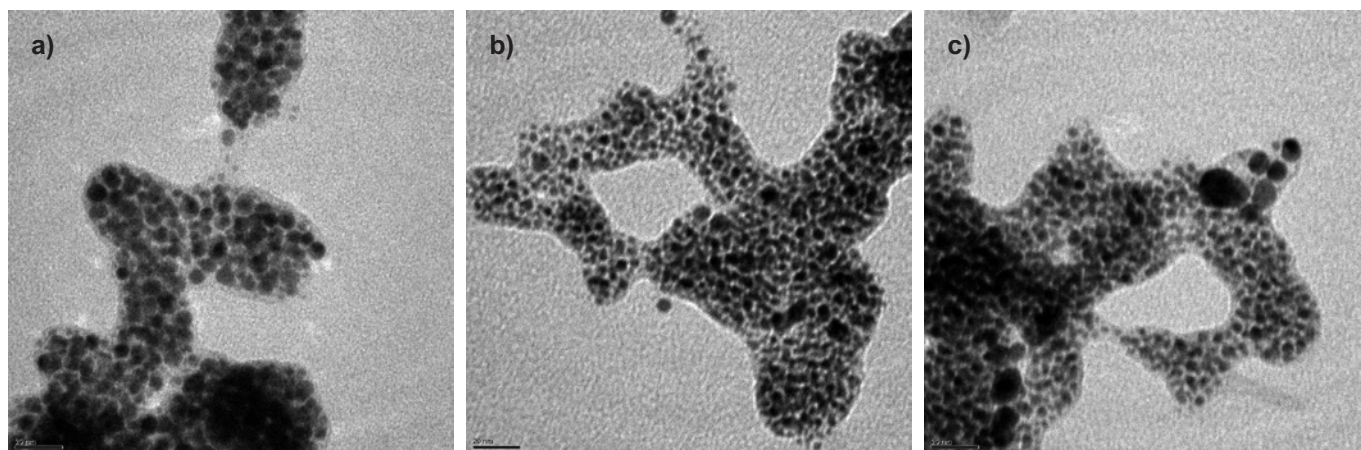


Figura 3. Imágenes de TEM de AuNPs estabilizadas con HPBs a) HPB 2 b) HPB 3 y c) HPB 4. Barra de escala: 20 nm.

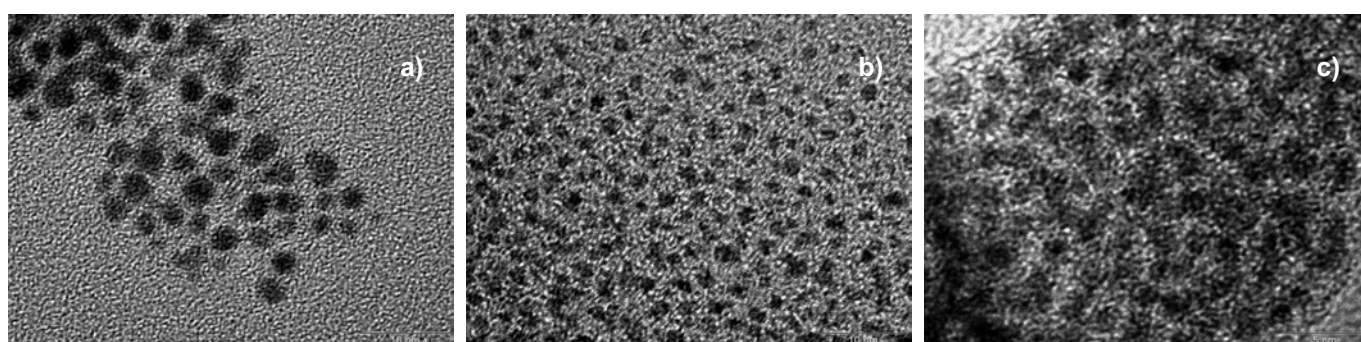


Figura 4. Imágenes de TEM de AuNPs estabilizadas con HPBs a) HPB 1 b) HPB 5 y c) HPB 6. Barra de escala: 10 nm para a) y b) y 5 nm para c).

preferibles en los estudios de citotoxicidad por dos razones principales: libre movimiento y más facilidad y rapidez en atravesar la membrana.^[6] En los estudios preliminares de DLS se observan diferencias en diámetro hidrodinámico frente a distinta concentración utilizada y con respecto al distinto HPB utilizado para estabilizar las AuNPs.

Los estudios de DLS se han realizado a diferentes concentraciones entre 0,78 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y a diferentes tiempos de incubación 0, 2, 4 y 24 h. Los resultados a tiempo 0 y después de 24 h se representan en las figuras 5 y 6, respectivamente. En la gráfica se representa el diámetro hidrodinámico frente a cada una de las concentraciones utilizadas para las AuNPs Au-1, Au-5, Au-6 y Au-7 (Figura 1)^[5]. Según los resultados, sólo en el caso de las AuNPs estabilizadas con HPB 6 (Au-6) y HPB 7 (Au-7) no se observan diferencias en el diámetro hidrodinámico frente a la concentración utilizada a tiempo 0. Además, sólo la muestra Au-7 mantiene su diámetro después de 24 h de exposición con el medio de cultivo. Por tanto, las AuNPs estabilizadas con HPB 7 presentan mayor libertad de movimiento, esto es, mayor facilidad en atravesar la membrana de las células.

Paralelamente a los estudios de DLS se han realizado estudios de espectroscopía UV-vis de las AuNPs dispersadas en el medio de cultivo, para observar si

existía desplazamiento del máximo de absorbancia obtenido para las AuNPs, lo que daría idea de que existe interacción de las AuNPs con el medio, o si se observaba aparición de una nueva banda a mayor longitud de onda que podría atribuirse a una posible agregación de las NPs en el medio de cultivo. En estos estudios, llevados a cabo para las diferentes muestras de AuNPs dispersadas en el medio de cultivo, no se observan grandes diferencias en los espectros de las cuatro muestras. En todas ellas se observa desplazamiento de la banda de absorbancia (presencia $t=0$) con respecto a lo observado para las AuNPs en ausencia del medio de cultivo (ausencia) y disueltas en H_2O . Esto puede observarse en las figura 7 y 8 que representan los espectros de UV-vis de la muestras Au-5 y Au-7, respectivamente. Esto indica que en todos los casos existe interacción de las AuNPs con el medio de cultivo. Además, después de 2 h aparece una nueva banda cerca de 600 cm^{-1} que podría deberse a una posible agregación de las NPs en el medio de cultivo.

Estudios realizados mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) de las muestras en presencia del medio de cultivo corroboran lo observado en los espectros de UV-vis. En la figura 9 se representa una imagen de Au-7 en presencia de medio de cultivo después de 24 h de incubación.

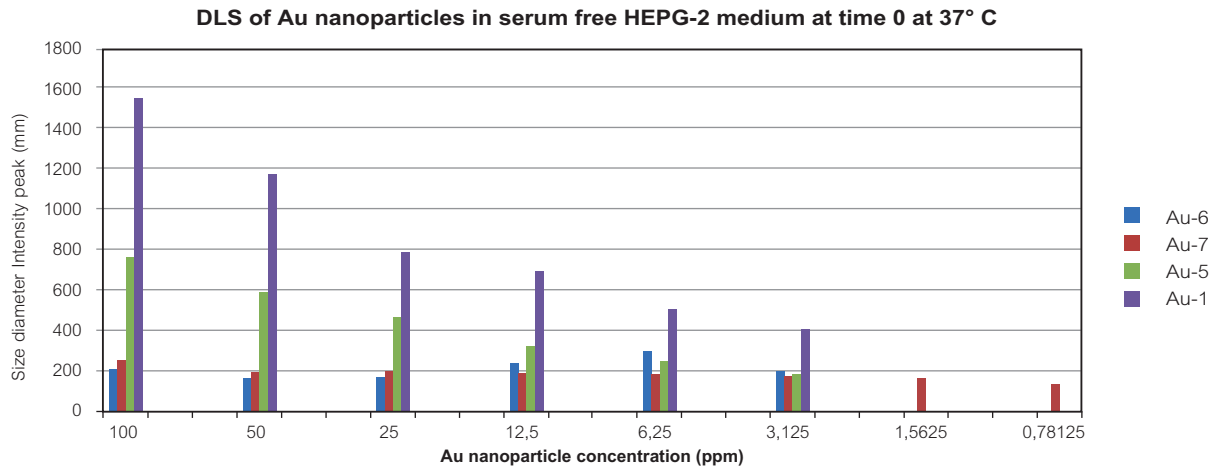


Figura 5. Diámetro hidrodinámico frente a la concentración para las muestras Au-1, Au-5, Au-6 y Au-7 a tiempo 0.

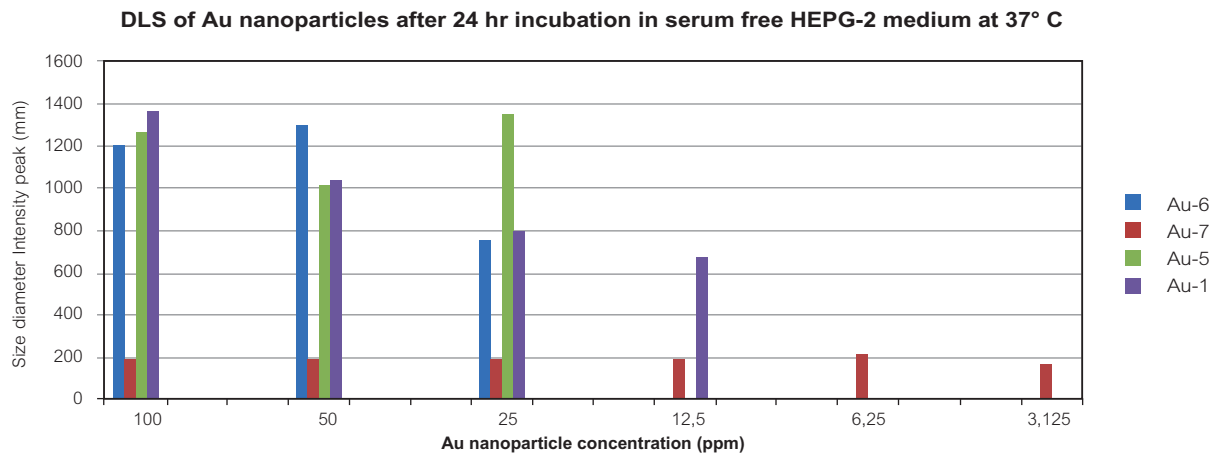


Figura 6. Diámetro hidrodinámico frente a la concentración para las muestras Au-1, Au-5, Au-6 y Au-7 después de 24 h de incubación.

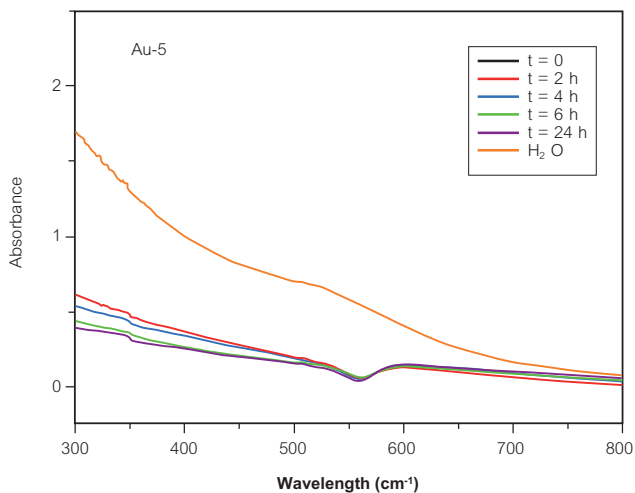


Figura 7. Espectros de UV-vis de la muestra Au-5 en H₂O y en presencia del medio de cultivo a distintos tiempos.

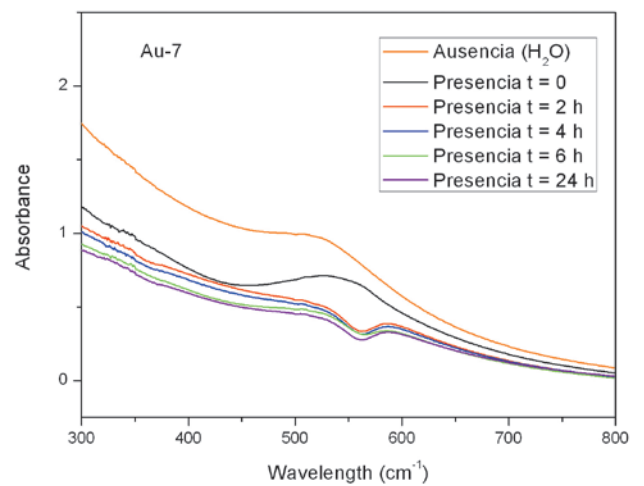


Figura 8. Espectros de UV-vis de la muestra Au-7 en ausencia del medio de cultivo H₂O y en presencia del medio de cultivo a distintos tiempos.

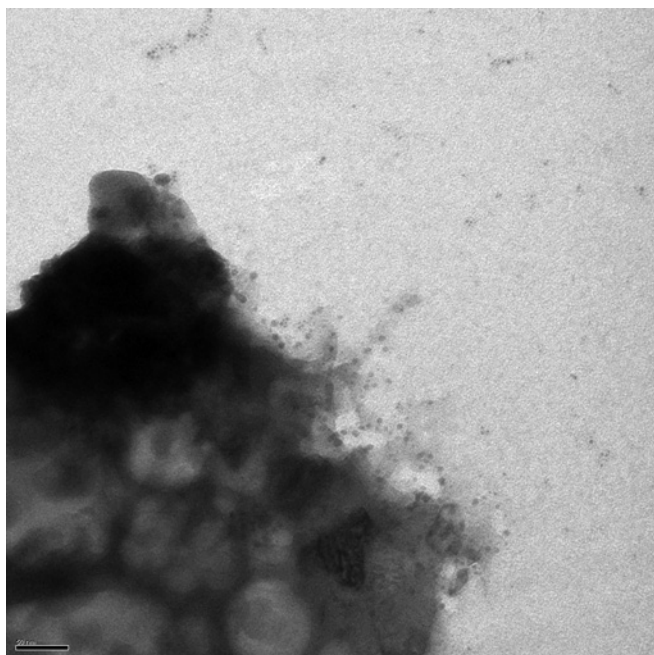


Figura 9. Imagen de TEM de Au-7 en presencia del medio de cultivo después de 24 horas de incubación.

2.3. Estudios biológicos

A través de una colaboración con el profesor Bautista (Facultad de veterinaria de la UCM) estamos ensayando actividad antimalárica de compuestos preparados en nuestro

grupo. Hemos suministrado algunas muestras de las AuNPs con péptido-bifenilo y hemos encontrado actividad antimalárica. Estos resultados son aún muy preliminares y deben ser confirmados por el grupo de la UCM.

Por otro lado, hemos realizado estudios de toxicidad en colaboración con el grupo del Dr. Navas (INIA). Se están obteniendo resultados interesantes, observando que la actividad biológica depende de la estructura del ligando orgánico. Hemos realizado estudios de estrés oxidativo (en la línea celular HEP G2) y citotoxicidad de las AuNPs en el medio de cultivo biológico: EMEM con suero (EMEM/S+) y EMEM sin suero (EMEM/S-) (EMEM es el acrónimo de *Eagle's minimal essential medium*, un medio de cultivo habitual en biología).

Investigaciones anteriores habían mostrado que las NPs inducen estrés oxidativo como un mecanismo de toxicidad y este estrés oxidativo puede dar como resultado la muerte de la célula.^[7]

Nuestra investigación ha mostrado que la respuesta a estrés oxidativo se ha observado dependiendo de la AuNPs sintetizada y la concentración de exposición.

En la Figura 10 se representa el estrés oxidativo en el tiempo frente a cada una de las concentraciones de exposición en el rango 0,781-100 $\mu\text{g/ml}$ para las AuNPs Au-1, Au-5, Au-6, Au-7 y Au-8. Según los resultados en la línea celular HEP G2, se observa cómo al incrementar la concentración de exposición los niveles de estrés oxidativo se ven incrementados. Después de 24 h de exposición las células HEP G2 muestran altos niveles de estrés oxidativo,

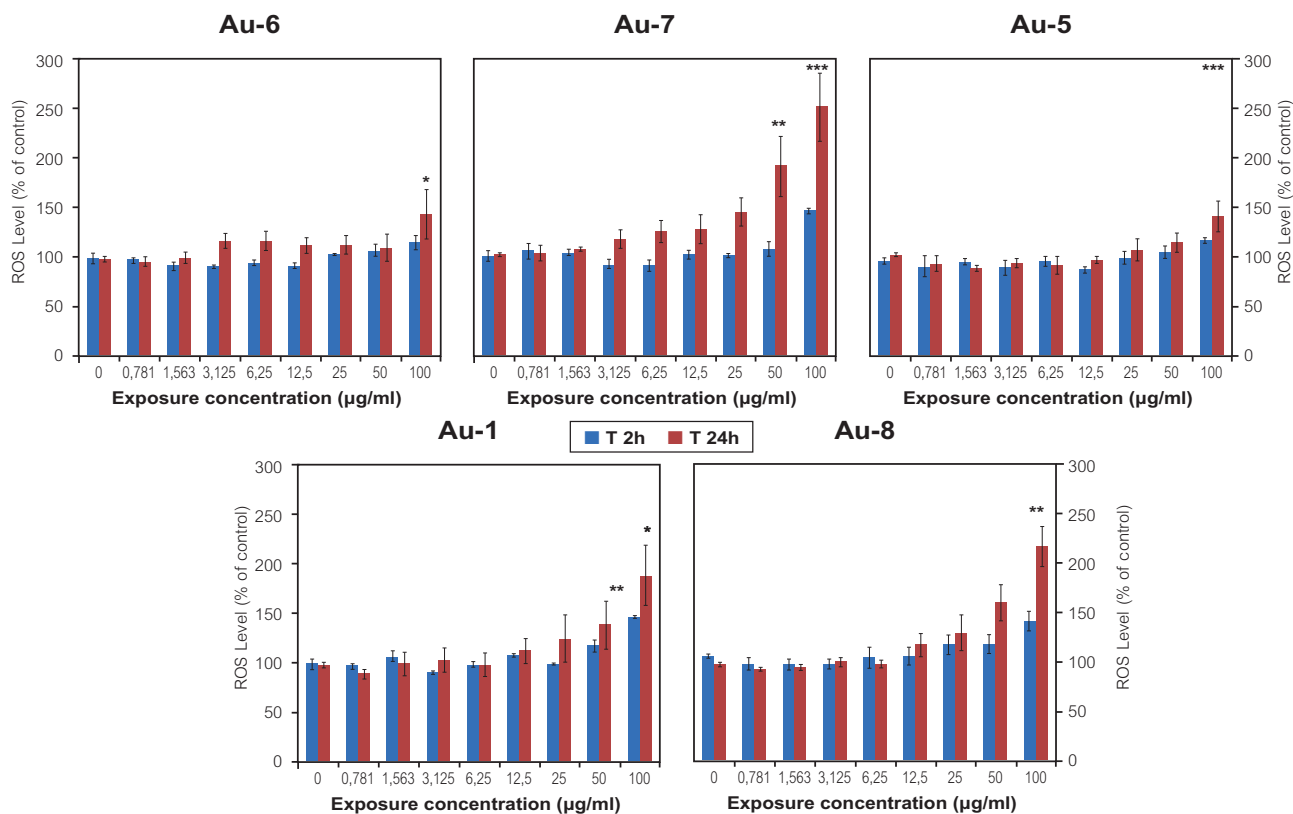


Figura 10. Estrés oxidativo con el tiempo de exposición, 2 h y 24 h, para las diferentes preparaciones de AuNPs en EMEM/S-.

sugiriendo la dependencia del tiempo de exposición con el estrés oxidativo como un mecanismo de toxicidad para las AuNPs preparadas. Hay diferencias en los niveles de estrés oxidativo dependiendo de las AuNPs estabilizadas con los distintos HPBs. La muestra Au-7 produce la mayor respuesta de estrés oxidativo y Au-5 muestra el más bajo potencial oxidativo.

Para determinar si el estrés oxidativo responde a muerte celular en las líneas celulares HEP G2, se han realizado también estudios de citotoxicidad. Los estudios de citotoxicidad muestran también dependencia con el tiempo de exposición. Las muestras de AuNPs Au-7, Au-1 y Au-8 en concentración 100 µg/ml causan tan sólo un decrecimiento de la viabilidad del 10%. Este dato es el más alto encontrado después de 24 h de incubación. Este nivel de reducción de la viabilidad no es más alto que el encontrado en células control libres de AuNPs (11-24%).

Después de 48 h de incubación el nivel de citotoxicidad se incrementa significativamente para todas las muestras de AuNPs, excepto para la muestra Au-7. La viabilidad se ha visto reducida a 62%, 72% y 77% para las muestras de AuNPs Au-5, Au-1 y Au-8, respectivamente.

2.4. Estudios computacionales preliminares

Hemos realizado algunos estudios computacionales *ab initio* de clusters de átomos de oro, usando HF-DFT y bases de cálculo relativística; y de clusters de óxido de zinc (para modelizar resultados obtenidos en el INIA) usando métodos híbridos HF-DFT. Debido a la complejidad de los sistemas, los cálculos son muy largos y no han dando resultados satisfactorios. Estamos empezando a utilizar otra estrategia computacional, pero aún no tenemos resultados. Puesto que lo importante de estas estructuras es la superficie, estamos empleando métodos computacionales que modelizan la superficies de estos materiales, en vez de entrar en el detalle atómico. Se está usando la metodología ADF implantada en Cerius 2.

2.5. Intentos de obtener nanopartículas de óxidos de hierro

Se han generado óxidos de hierro de valencia mixta (II, III) nanoparticulados siguiendo procedimientos de la bibliografía^[8] en presencia de ligandos derivados de los híbridos péptido-bifenilo indicados en la figura 1. Aunque hemos obtenido NPs magnéticas, los tamaños de estas no son homogéneos y presentan estructuras conglomeradas. Tenemos que investigar en profundidad el método de preparación de estas NPs para optimizar y hacer reproducible el procedimiento. Tener NPs magnéticas es un objetivo muy deseable debido a sus potenciales aplicaciones.^[9]

3. CONCLUSIONES

Cuando se planteó el proyecto, los objetivos propuestos eran limitados debido a la corta duración del mismo. Los resultados descritos en esta memoria muestran que la aproximación que hemos usado está dando resultados satisfactorios y, al menos desde el punto de vista cualitativo, se pueden determinar relaciones entre la toxicidad y la estructura de las AuNPs.

Además, los resultados biológicos (tanto de toxicidad como de antimalaria) permiten aventurar que las NPs modificadas por híbridos péptido-biarilo pueden ser herramientas útiles en toxicología molecular y en biomedicina. Aunque en 2012 no dispondremos de financiación de la Fundación MAPFRE, seguiremos investigando en este tipo de compuestos.

4. REFERENCIAS

- [1] a) Y. P. Bao, T.-F. Wei, P. A. Lefebvre, H. An, L. He, G. T. Kunkel, U. R. Muller, *Anal. Chem.* 78 (2006) 2055. b) W. Dong, C. Dong, S. Shuang, M. M. F. Choi, *Biosens. Bioelectron.* 25 (2010) 1043. c) J.-A. Park, P. A. N. Reddy, H.-K. Kim, I. S. Kim, G.-C. Kim Y. Chang, T.-J. Kim, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 18 (2008) 6135. d) Y. Pérez, C. Aprile, H. García, A. Corma, *Catal. Lett.* 134 (2010) 204.
- [2] E. E. Connor, J. Mwamuka, A. Gole, C. J. Murphy, M. D. Wyatt, *Small* 1 (2005) 325. R. Shukla, V. Bansal, M. Chaudhary, A. Basu, R. R. Bhonde, M. Sastry, *Langmuir* 21 (2005) 10644.
- [3] B. Herradon, A. Montero, E. Mann, M. A. Maestro, *Cryst. Eng. Commun.* 6 (2004) 512.
- [4] a) E. Mann, A. Montero, M. A. Maestro, B. Herradon, *Helv. Chim. Acta* 85 (2002) 3624. b) A. Montero, E. Mann, A. Chana, B. Herradon, *Chem. Biodiversity* 1 (2004) 442.
- [5] Y. Pérez, E. Mann, B. Herradón, *J. Colloid and Interface Sci.* 359 (2011) 443.
- [6] D. Williams, S. H. Ehrman, T. R. P. Holoman, *J. Nanobiotech.* 4 (2006) 1.
- [7] H. K. Patra, S. Banerjee, U. Chaudhuri, P. Lahiri, A. K. Dasgupta *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 3 (2007) 111.
- [8] S. C. McBain, H. H. P. Yiu, J. Dobson, *Int. J. Nanomedicine* 3 (2008), 169.
- [9] L. Xiao *et al.* *ACS Nano* 5 (2011) 6315.