

DESARROLLO DE UN SENSOR COLORIMÉTRICO PARA DETECTAR PLOMO

Pablo Tancredi

Tutores: Dr. Eduardo Méndez
MSc. Leticia Pérez

Facultad de Ciencias, UdelaR
Montevideo, Uruguay

AGRADECIMIENTOS

A PEDECIBA Química, ANII y CSIC por el financiamiento otorgado. A los integrantes del Laboratorio de Biomateriales y del Laboratorio de Interacciones Moleculares de la Facultad de Ciencias, UdelaR.

Montevideo, Diciembre 2011

RESUMEN

Uno de los motivos del creciente interés en el desarrollo de sensores químicos radica en la capacidad que poseen estos dispositivos para descentralizar el proceso analítico. En particular, los sensores colorimétricos se adaptan muy bien a este tipo de funciones.

La necesidad de generar estrategias que permitan descentralizar los mecanismos de ensayo resulta especialmente atractivo en el diagnóstico de la contaminación con Plomo. La exposición al Plomo ambiental en las zonas altamente urbanizadas afecta la salud de una enorme cantidad de personas en todo el mundo, y Uruguay no escapa a esta realidad. En este sentido, la posibilidad de desarrollar un sensor colorimétrico que permita realizar un primer diagnóstico cualitativo sobre la población de riesgo tendría un impacto potencial sumamente positivo.

En los últimos años la investigación vinculada a diferentes disciplinas dentro de la Nanotecnología ha presentado posibles soluciones a varios problemas concretos de diversas áreas, por ejemplo la construcción de sensores para especies químicas específicas. En particular, la combinación de nanopartículas con propiedades ópticas dependientes de la distancia con DNAzymas con alta selectividad por iones metálicos ha presentado grandes oportunidades para el desarrollo de sensores colorimétricos.

La construcción de un sensor colorimétrico específico para Plomo que se detalla en este trabajo se realiza a partir de la DNAzima 17E y de nanopartículas de Oro, responsables de la detección del analito y del cambio de color del medio respectivamente. De la interacción de estos dos elementos se obtiene un complejo sistema de color violeta, que cambia de color a rojo cuando se le adiciona una solución que contiene Plomo.

Hasta ahora, se ha demostrado que este sistema funciona de forma efectiva como ensayo tipo “positivo/negativo” sobre soportes inertes y ofrece resultados inmediatos y a simple vista para soluciones acuosas de Plomo de concentraciones por encima de 4ppm. A pesar de que el elevado límite de detección obtenido en este primer diseño impediría la aplicación del sensor para determinaciones de Plomo en sangre, el sistema ofrece perspectivas positivas, que permitirán continuar el trabajo y la búsqueda de soluciones con el fin de optimizar los diferentes parámetros del instrumento.

ÍNDICE

PARTE 1: DESARROLLO TEÓRICO

SENSORES QUÍMICOS	6
INTRODUCCIÓN	6
BIOSENSORES	7
PROPIEDADES DE LOS SENSORES	7
SENSORES COMO INSTRUMENTOS PARA ANÁLISIS DESCENTRALIZADOS	8
PLOMO	9
PROPIEDADES GENERALES, APLICACIONES Y EXPOSICIÓN AL PLOMO	10
CONTAMINACIÓN POR PLOMO	11
IDENTIFICACIÓN DE PLOMO	14
SENSORES COMO PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN INTERDISCIPLINARIA	16
NANOTECNOLOGÍA Y NANOPARTÍCULAS	17
INTRODUCCIÓN	17
HISTORIA	17
NANOPARTÍCULAS METÁLICAS	18
NANOPARTÍCULAS DE ORO	20
QUÍMICA SUPRAMOLECULAR DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ORO	24
ADN FUNCIONAL y DNAzymas	27
ADN COMO NANOMATERIAL	27
ENDONCLUEASAS Y DNAzymas “8-17”	32
DNAzymas COMO SENSORES DE IONES METÁLICOS	35
DESARROLLO DE UN BIOSENSOR COLORIMÉTRICO PARA LA DETECCIÓN DE PLOMO	37
2ª GENERACIÓN DEL BIOSENSOR DE Pb(II)	38
3ª GENERACIÓN DEL BIOSENSOR DE Pb(II)	40
4ª GENERACIÓN DEL BIOSENSOR DE Pb(II)	41

PARTE 2: DESARROLLO EXPERIMENTAL

OBJETIVOS	43
MATERIALES	44
MÉTODOS	45
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48

CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ORO	48
ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DE LA DNAZYMA 17E	54
DERIVATIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ORO CON LAS MOLÉCULAS DE ADN TIOLADAS.	59
ENSAMBLADO DEL SENSOR	61
PUESTA A PUNTO DEL SENSOR Y CURVA DE CALIBRACIÓN	65
PERSPECTIVAS DEL SENSOR PARA ANÁLISIS DE Pb(II) EN SANGRE	69
CONCLUSIONES	71
BIBLIOGRAFÍA	72

PARTE 1:

DESARROLLO
TEÓRICO

SENSORES QUÍMICOS

INTRODUCCIÓN

Los sensores químicos nacen de la necesidad de extender la percepción y aumentar la sensibilidad que tenemos sobre los diferentes componentes del mundo que nos rodea. Según la definición IUPAC, un sensor químico es un dispositivo integrado capaz de proporcionar información química específica cuantitativa o semicuantitativa, formado por un elemento de reconocimiento que está en contacto directo con un elemento de transducción.[1] La información química obtenida del sensor se convierte en una señal analítica útil y eso permite diagnosticar y determinar la presencia de diferentes agentes en un sistema puntual. La capacidad de analizar químicamente un sistema que integra nuestro entorno directo resulta de vital importancia debido a que su composición química está fuertemente relacionada y determina varios aspectos vinculados con nuestra calidad de vida. Por ejemplo, la presencia de toxinas o metales pesados en el ambiente puede afectar severamente a la salud humana.[2] De la misma forma, determinados agentes que a bajas concentraciones pueden ser tolerables, dejan de serlo cuando aumenta su presencia en el sistema. Por este motivo, el desarrollo de sensores químicos ha sido un importante objeto de investigación de varias aéreas del conocimiento analítico, entre ellas el monitoreo ambiental, el diagnóstico médico o el control de calidad en la industria.[2]

Los sensores químicos pueden clasificarse de diferentes maneras. Una de las clasificaciones más comunes se realiza según la naturaleza de la señal que se obtiene de la interacción sensor-analito. Así, los sensores químicos pueden agruparse en sensores electroquímicos (incluyendo sensores conductimétricos, amperométricos y potenciométricos), sensores de masa, sensores calorimétricos y sensores ópticos.[3] Este último grupo, los sensores ópticos, incluye a todos los sistemas que aprovechan la interacción materia/radiación electromagnética y utilizan como señal de detección a una onda de este tipo. En estos casos, la evaluación del cambio en el parámetro óptico puede relacionarse con la concentración del analito. Los principios analíticos aplicables a los sensores ópticos están anclados en la espectroscopía clásica, aunque difieren en el arreglo y en algunos elementos experimentales. En un sensor óptico, la radiación electromagnética es guiada desde un espectrofotómetro, interactúa con la materia, y luego se reintroduce en el instrumento para un procesamiento electrónico. Del procesamiento de esta señal, se obtiene el resultado del análisis realizado.[4] La ubicación de la onda dentro del espectro electromagnético permite realizar una nueva clasificación de los elementos de este grupo. De esta nueva clasificación surgen los sensores colorimétricos o sensores basados en absorción de luz visible, cuya principal característica de medición consiste en el cambio de las propiedades ópticas del sistema dentro del rango visible del espectro. Esto quiere decir que la señal transmitida por el sensor como consecuencia de la interacción con el analito es un cambio de color del sistema detectable por el ojo humano, que puede ser tanto en la intensidad del tono original como en el pasaje de un color a otro. La principal ventaja de este tipo de sensores es que permite eliminar el instrumental analítico, ya que no precisa de ningún procesamiento electrónico de la señal.[2]

De todas modos, el procesamiento de la señal lumínica mediante un equipo espectrofotométrico en el rango UV-Visible puede resultar útil para obtener datos más precisos y fiables. A partir del estudio del espectro y su variación en presencia del analito

se puede resolver de mejor manera el cambio de color del sistema, y así obtener un sensor que no depende de la subjetividad del operario.[2]

Como ya se venía mencionando, un sensor químico debe contener, al menos, dos componentes: uno que permite el reconocimiento del objetivo y otro que traduce esta relación en una señal detectable.

El elemento de reconocimiento o receptor debe ser capaz de interactuar con las moléculas del analito, catalizar una reacción selectivamente o participar de un equilibrio químico.[3] Idealmente, esta interacción debe ser de alta afinidad, alta especificidad, buen rango dinámico, rápida respuesta en el tiempo y relativa estabilidad. Los elementos de reconocimiento pueden ser cualquier entidad química o biológica capaz de establecer la interacción con el analito, como por ejemplo, pequeñas moléculas orgánicas, péptidos, proteínas (anticuerpos), ADN o incluso células completas.[2]

Por otro lado, el elemento responsable de la señal o transductor es el encargado de convertir el evento de reconocimiento del receptor en una señal físicamente detectable.[2] Para la mayoría de los sensores, el transductor transforma esta interacción en una señal eléctrica a ser procesada por un circuito electrónico de medición. Sin embargo, en los sensores colorimétricos la propia señal del transductor es el cambio de color, y puede ser interpretada visualmente por el analista sin la necesidad del procesamiento electrónico.

BIOSENSORES

Las características del sistema de reconocimiento también permite crear una nueva definición para un grupo específico de sensores: los biosensores. Los biosensores son todos aquellos sensores químicos que, a través de reacciones bioquímicas específicas, aprovechan las propiedades de los mecanismos biológicos y los utilizan como sistema de reconocimiento para la detección de compuestos químicos.[5-6] Por ejemplo, los anticuerpos (proteínas de unión de alta afinidad y especificidad) han sido largamente utilizados en el desarrollo de sensores químicos y biológicos. También, el apareamiento de bases de Watson-Crick y la hibridación de hebras asociada al ADN han sido aprovechadas en estos sistemas. Más recientemente, el descubrimiento de nuevas aplicaciones y posibilidades vinculadas a esta biomolécula, como su capacidad de catalizar ciertas reacciones químicas, también ha permitido el desarrollo de toda una nueva gama de biosensores.[2,7] La utilización de mecanismos biológicos como sistemas de reconocimiento ofrece varias ventajas sobre los mecanismos químicos; las más importantes están asociadas a la alta especificidad y sensibilidad del reconocimiento.

PROPIEDADES DE LOS SENSORES

La idoneidad de un sensor para cualquier aplicación particular depende de su *performance* en diferentes sistemas y condiciones. Existen varias propiedades que permiten definir esta *performance*, y a partir de ellas es posible determinar la perspectiva y las posibilidades reales de aplicación práctica:

Sensibilidad y límite de detección: La *sensibilidad de un sensor* es la magnitud en la señal de salida (respuesta) producida por el cambio de una unidad en la señal de entrada.[8] Por otro lado, la *sensibilidad analítica* es el mínimo cambio detectable en la señal de entrada.[8] En un sensor químico, la señal de entrada está definida por la

capacidad para transferir información entre en el sistema de reconocimiento y el transductor. De estas dos propiedades depende el límite de detección o resolución, que representa la mínima concentración de analito detectable por el sensor en el ensayo.[8] La *sensibilidad del sensor* varía frente a diferentes concentraciones de analito. Por definición, en el rango de respuesta lineal del sensor el valor de esta propiedad se mantiene constante; esto quiere decir que cambios iguales en la concentración del analito producen cambios cuantitativos iguales en la señal de entrada.[4] El rango dinámico es otro parámetro relacionado con la *sensibilidad del sensor*. Representa la zona de medición activa y está delimitada por la *sensibilidad analítica* como límite inferior y por la máxima concentración de analito detectable como límite superior.[4] A partir de este último punto, el límite superior de detección, comienza la zona de saturación y es en ella donde la *sensibilidad del sensor* se vuelve nula; esto significa que la señal de entrada no se modifica a pesar del aumento de analito en el medio.[3] De la futura aplicación práctica del instrumento va a depender cuál de estos parámetros es más importante priorizar.

Facilidad de uso y costo: Aunque no depende directamente de la tecnología de medición, la facilidad de uso y el bajo costo siempre son propiedades deseables en cualquier tipo de instrumento. Los sensores colorimétricos son particularmente sencillos de utilizar debido a que evitan los dispositivos de procesamiento electrónico. De todas formas, en el diseño de nuevos sensores de este tipo se busca, entre otros aspectos, la posibilidad de reducir al mínimo las operaciones previo a la medida o mejorar la interfaz de reacción de manera de hacer lo más cómodo posible la visualización del cambio de color.[8] Para los sensores que funcionan de manera discreta y en análisis no recuperables, es importante evaluar el costo que implica cada ensayo particular. El precio por análisis va a estar determinado por el valor de cada uno de los componentes del sensor y por el volumen utilizado en la medida.[8]

Rendimiento y Robustez: Tanto el rendimiento (cantidad de ensayos que se pueden realizar por unidad de tiempo) como la robustez (adaptabilidad del sensor para analizar diferentes matrices) determinan las posibilidades reales de aplicación de un sensor para, por ejemplo, ensayos tipo barrido.[8] En los sensores colorimétricos, es ideal que la respuesta frente al agregado de la muestra sea inmediata y que no existan demasiados elementos de la matriz que puedan interferir en el resultado del ensayo.

SENSORES COMO INSTRUMENTOS PARA ANÁLISIS DESCENTRALIZADOS

Uno de los aspectos más interesantes que presenta el desarrollo de sensores químicos es la posibilidad de descentralizar físicamente el proceso analítico. Durante mucho tiempo, el análisis químico estaba centralizado en grandes laboratorios, lejos de los sitios de muestreo, y solo podía ser llevado a cabo por personal especializado. La evolución de esta forma de trabajo se veía muchas veces limitada por las características físicas y de tamaño del instrumental necesario para las medidas y por la compleja operativa que implicaba el análisis. Sin embargo, el rápido avance científico de las últimas décadas ha permitido reemplazar a los grandes y altamente concentrados centros de procesamiento por instrumentos móviles y automatizados que permiten realizar el análisis en el mismo sitio de muestreo.[3] Estas técnicas de análisis que utilizan sensores pequeños y transportables cada vez atraen más el interés de parte de los desarrolladores y de los analistas. En especial, los sensores colorimétricos se adaptan muy bien a este tipo de

aplicaciones debido a que no precisan de ningún tipo de instrumental analítico que procese la información del transductor.[2] Otros ejemplos de sensores automáticos y transportables son los sensores electroquímicos, como los electrodos selectivos para iones o el electrodo de vidrio para pH.

El carácter de la señal de transducción de los sensores colorimétricos muchas veces hace imposible su utilización como instrumentos cuantitativos, especialmente si el diseño no incorpora dispositivos informáticos que procesen el cambio de color. En determinados sistemas, resulta demasiado complejo interpretar las diferentes transiciones cromáticas dentro del rango dinámico y por eso no es fácil asociar a cada concentración de analito un tono de color en particular. Incluso, puede que el rango dinámico del sensor sea demasiado estrecho o directamente inexistente como consecuencia del modo en que funciona la señal de entrada. Así, para facilitar el diseño, muchos sensores colorimétricos reconocen únicamente dos estados del analito en la matriz: ausencia / presencia, o mejor, concentración por debajo de X / concentración por encima de X, siendo X el valor umbral de concentración de analito que “activa” el sensor y permite el cambio de color. Este modo de funcionamiento convierte a los sensores colorimétricos en instrumentos ideales para ensayos tipo positivo / negativo. La información que se obtiene de estos ensayos se reduce a si la concentración del analito en la muestra está por debajo o por encima de este valor umbral.

Las aplicaciones prácticas de los sensores tipo positivo / negativo muchas veces están asociadas a procedimientos de preselección, que funcionan como análisis tipo barrido o *screening*. Esta forma de ensayo sirve como filtro primario ya que permite analizar un grupo relativamente grande de muestras y seleccionar aquellas de concentración superior al valor umbral del test para su posterior análisis por metodologías aprobadas internacionalmente. La preselección evita el análisis cuantitativo de la totalidad de las muestras y se vuelve sumamente ventajosa en casos donde la ejecución de este último es costosa en tiempo y dinero.

Además del resultado del ensayo en la forma positivo/negativo, los sensores colorimétricos reúnen otras propiedades (facilidad de uso, resultado del ensayo instantáneo, etc.) que los convierte en instrumentos ideales para esta aplicación.

PLOMO

PROPIEDADES GENERALES, APLICACIONES Y EXPOSICIÓN AL PLOMO

El Plomo ($Z = 82$, masa atómica = 207,2 uma) es un metal pesado que ha venido siendo empleado por el hombre significativa y constantemente desde épocas pre-industriales. Su amplia distribución y fácil extracción y manejo han favorecido su explotación a lo largo de la historia y han permitido su uso en una gran cantidad de aplicaciones social e industrialmente relevantes.[9]

Desde épocas del imperio romano (500 A.C.) y hasta no hace muchas décadas atrás el Plomo metálico era el material más comúnmente utilizado en la construcción de cañerías para la distribución de agua. Más recientemente (principios del s. XX), diferentes propiedades químicas asociadas a este metal permitieron su incorporación, principalmente como aditivo, en varios productos relacionados a la industria petroquímica, como la gasolina, las pinturas o las baterías.[9]

Tabla 1: Propiedades generales del Plomo

Símbolo químico	Pb	Grupo, período, bloque	14, 6, p
Número atómico	82	P. de Fusión	327.4 °C
Peso atómico	207.2	Densidad	11.34 g/cm ³
Configuración electrónica	[Xe] 4f ¹⁴ 5d ¹⁰ 6s ² 6p ²	Electronegatividad	2.33
Radio atómico	175 pm	Estados de Oxidación	2, 4
Aspecto	Metal gris-azulado, tono opaco y apagado. Flexible e inelástico		
Abundancia isotópica	²⁰⁴ Pb (1,4%), ²⁰⁶ Pb (24.1%), ²⁰⁷ Pb (22.1%), ²⁰⁸ Pb (52.4%)		

El extendido uso industrial ha convertido al Plomo en un elemento habitual en el entorno urbano y su presencia puede rastrearse en el suelo, el aire y el agua de las zonas altamente industrializadas. Sin embargo, el contacto directo y la exposición constante con este metal resulta por demás problemática y es una causa común asociada a varias patologías médicas. La contaminación por Plomo es uno de los problemas de salud más comunes en varias regiones del mundo; se cree que afecta a 1 de cada 5 personas que vive en áreas urbanizadas. En especial, la población que más sufre las consecuencias de este problema son los niños menores de 5 años.[10]

La contaminación ambiental y el origen de las fuentes de exposición están directamente relacionadas al uso industrial del Plomo en diferentes productos:

La gasolina con Plomo ha sido utilizada durante gran parte del s. XX y en Uruguay su comercialización recién se prohibió en 2003. En la gasolina, el Plomo forma parte del compuesto orgánico tetraetilo de Plomo que actúa como antidetonante.[10] La liberación de los gases posterior a la quema del combustible en los motores de combustión reintroducía al metal en la atmósfera, resultando una de las fuentes de contaminación más importantes en el ambiente urbano. Estudios recientes también han demostrado que la principal causa de contaminación con Plomo en suelos se debe a la deposición de estos gases liberados por los automóviles.

La presencia de Plomo en pinturas, en especial aquellas empleadas en juguetes para niños y pinturas para exteriores, también ha sido reportada como una importante fuente

de exposición. En Estados Unidos, el uso de pinturas con Plomo fue prohibido en 1978 luego de que se registraran varios casos de intoxicación en niños asociada a esta fuente. Uruguay todavía no cuenta con una legislación que regule la fabricación de este tipo de pinturas, pero las industrias del área ya han comenzado a reducir el contenido de Plomo en sus productos.[10]

Muchos de los desechos originados en fábricas vinculadas a la industria pesada (fundiciones, combustibles, etc.) tienen alto contenido de Plomo, y se ha reportado que la contaminación de los suelos aumenta significativamente en las áreas que bordean estos establecimientos.[11] La situación se vuelve especialmente comprometida cuando existen zonas pobladas en las cercanías de las fábricas que, como consecuencia de su ubicación, resultan fuertemente afectadas por las emisiones industriales. La utilización de desechos con Plomo (baterías, residuos industriales, etc.) como relleno sanitario también favorece al aumento de la concentración del metal en el suelo.[9, 12]

Otras fuentes de exposición ambiental reportadas por varios autores son: agua para beber que circula por cañerías de Plomo, cosméticos de fabricación casera, lozas vidriadas y latas con soldadura de Plomo utilizadas para almacenar alimentos.[12]

Aparte de las fuentes ambientales, el Plomo también es un gran contaminante químico de los lugares de trabajo, y la exposición y contaminación ocupacional afecta a una gran cantidad de trabajadores de diferentes industrias, como los recuperadores de Plomo de fuentes secundarias (fundiciones), los plomeros que trabajan con cañerías antiguas o los fabricantes de pinturas y baterías.[13]

CONTAMINACIÓN POR PLOMO

El Plomo ambiental de las diferentes fuentes puede ser inhalado y absorbido a través del sistema respiratorio o ingerido y absorbido por el tracto gastrointestinal. La intoxicación o envenenamiento se conoce como Plombemia, y en su estado más avanzado, cuando la intoxicación es crónica, se denomina Saturnismo. El Plomo absorbido circula por el torrente sanguíneo y se distribuye a los diferentes sistemas del organismo. En especial, los sistemas que resultan más afectados son el nervioso, gastrointestinal, renal y hematopoyético.[9]

A nivel bioquímico, la toxicidad del Plomo es consecuencia de varias interacciones:

El Plomo tiene especial afinidad por el grupo sulfhidrilo (SH) de las proteínas, y se une a ellos a través de enlaces covalentes ($346 \pm 1.7 \text{ kJ mol}^{-1}$). La unión del Plomo a este átomo modifica la geometría de la proteína y altera completamente la función enzimática.[14] Estudios más recientes también han revelado que se une fuertemente a los sitios del zinc y el calcio en diferentes proteínas, aprovechándose de cierta similitud química con estos dos elementos (en la carga, por ejemplo); el intercambio de átomos de Plomo por zinc o calcio también altera la estructura proteica y la actividad de la enzima.[15] En el sistema hematopoyético, la biosíntesis del grupo hemo se ve especialmente afectada, incluso por cantidades traza del metal en la sangre. El Plomo sustituye a los átomos de zinc en la enzima ácido-aminolevulínico deshidratasa (ALAD), responsable de la síntesis de precursores de porfirina a través de la conversión de ácido aminolevulínico (ALA) a porfobilinógeno (PBG). La sustitución en el centro catalítico inhibe la actividad de la proteína y desencadena la acumulación del precursor ALA, potente neurotóxico que puede depositarse en los tejidos si no es excretado con suficiente rapidez.[16] Niveles de ALA por encima del promedio metabólico se utilizan como indicadores indirectos de intoxicación por Plomo. Los casos de anemia reportados y

vinculados de forma directa con la contaminación con Plomo son resultado de la deficiencia de grupos hemo, como consecuencia del bloqueo en la ruta de síntesis de porfirinas.[17]

La contaminación con Plomo se diagnostica directamente a través del análisis de sangre.* Debido que este metal no cumple ningún rol biológico en el organismo, no existen niveles de contaminación recomendables ni 100% “seguros”. Sin embargo, el cuerpo humano ofrece cierto margen de tolerancia con este elemento y eso permite que los organismos internacionales pueden fijar diferentes límites de intoxicación.[10]

Tabla 2: Clasificación y recomendaciones de la Central of Disease Control (CDC) para los diferentes niveles de Plomo en sangre

Clase	Plombemia (µg/L)	Recomendaciones y Tratamiento
I	0 – 90	Sin peligro inmediato
IIA	100 - 140	Buscar fuente/s de exposición y eliminarla/s; educación acerca de la exposición y prevención de la contaminación con Plomo. Realizar controles periódicos
IIB	150 - 190	Buscar fuente/s de exposición y eliminarla/s; educación acerca de la exposición y prevención de la contaminación con Plomo. Realizar controles periódicos. Si se mantienen los niveles de Plomo, re-investigar el medio y realizar intervención eficaz sobre la/s fuente/s.
II	200 - 440	Retirada inmediata de la/s fuente/s de exposición. El paciente debe recibir tratamiento médico.
IV	450 - 690	Retirada inmediata de la/s fuente/s de exposición. El paciente debe recibir atención médica para tratamiento con quelantes.
V	> 700	Nivel de emergencia médica. El paciente debe ser hospitalizado de inmediato y recibir tratamiento con quelantes.

Para el Center of Disease Control (CDC) de Estados Unidos y el World Health Organization (WHO), cantidades de Plomo en sangre por encima de 100 µg/L (100 ppb, o aproximadamente 0.5 µM) son suficientes para comenzar a tomar medidas de intervención y combate activo. Además, el CDC también tiene elaborado una clasificación con los diferentes niveles de contaminación y las recomendaciones médicas y tratamientos para cada situación (Tabla 2).[10] Por otro lado, la Organización Mundial de la Salud (OMS) fija el *límite de tolerancia biológica* en 100 µg/L en niños y 250 µg/L en adultos.[18]

* De acuerdo a la referencia bibliográfica, el término plumbemia es utilizado indistintamente para referirse a la patología médica asociada a la intoxicación, o al parámetro que indica el contenido real de Plomo que circula en sangre, incluso en personas no contaminadas y que no manifiestan ningún síntoma; la unidad de medida de este parámetro es masa de Plomo sobre volumen de sangre. En este texto se utiliza la segunda acepción.

En Uruguay, la problemática de la contaminación con Plomo se ignoró completamente durante varias décadas y recién adquirió notoriedad en 1996, después de la aparición del trabajo publicado por el Departamento de Toxicología e Higiene Ambiental de la Facultad de Química de la Universidad de la República.[12] En el artículo, se reportaba que el 36% de los niños analizados (más de 1 de cada 3) tenían niveles de plumbemia por encima del límite de intervención de la CDC y WHO (100 $\mu\text{g/L}$) (Figura 1). Este porcentaje, aclaran, es sensiblemente mayor a los obtenidos en estudios similares realizados en países europeos. También se reportaba que había una marcada correlación entre el nivel de intoxicación y la edad de los niños; los valores de plumbemia más altos se registraban en niños de menor edad. Esta relación resulta por demás preocupante, ya que la intoxicación a edades muy tempranas compromete las etapas más importantes del desarrollo biológico.

Desde la publicación de este trabajo se han tomado algunas medidas (la eliminación del Plomo en las naftas, por ejemplo) que han permitido mitigar o directamente eliminar diferentes fuentes de exposición. Sin embargo, los casos de contaminación todavía no han desaparecido y el problema central está lejos de solucionarse. Por estos motivos resulta necesario tomar las medidas adecuadas de prevención y acción para erradicar al problema completamente.

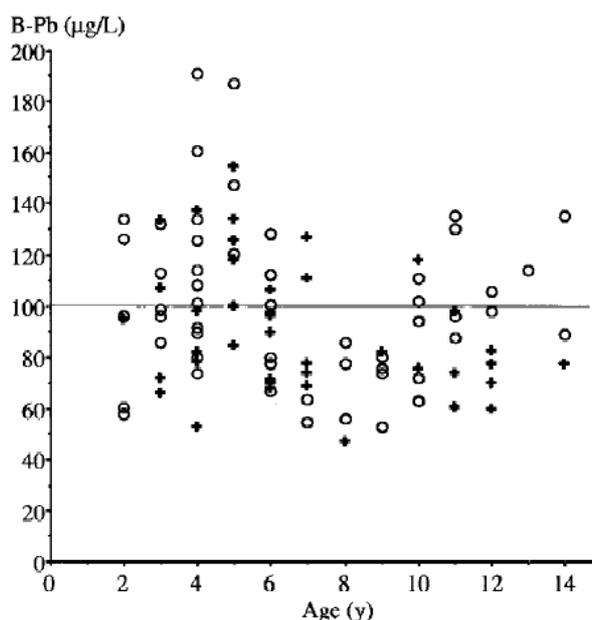


Figura 1: Resultados del estudio de contaminación por Plomo realizado por la Facultad de Química de la Universidad de la República (Uruguay). Se muestran los niveles de Plomo en sangre en niños de diferentes edades (círculos: varones; cruces: niñas). La línea a 100 $\mu\text{g/L}$ corresponde con el límite de intervención de la WHO. Adaptado de Ref. [12]

Para diseñar un sistema de contención que permita eliminar o mitigar la contaminación con Plomo es necesario, ante todo, delimitar a la población de riesgo. Después, el diagnóstico clínico de todas estas personas permitirá determinar quiénes están contaminadas y precisar del tratamiento médico correspondiente.

En Uruguay, el análisis de Plomo en sangre sólo se realiza en la Facultad de Química (método de espectrometría de absorción atómica con horno de grafito) y en el Hospital Filtro (método voltamperométrico). Sin embargo, la capacidad analítica de estos dos establecimientos es insuficiente para diagnosticar a toda la población de riesgo. En este

contexto, el desarrollo de un sensor sencillo y barato para la detección de Plomo en sangre como el propuesto en este trabajo, permitiría aumentar esta capacidad de medida, de forma de poder estudiar a toda la población de riesgo y detectar a las personas intoxicadas para incorporarlas al sistema primario de salud. Un sensor colorimétrico positivo/negativo puede ser utilizado en ensayos tipo barrido y permitirá analizar múltiples muestras (toda la población de riesgo), de manera de seleccionar aquellas potencialmente contaminadas para su posterior análisis por las metodologías aprobadas internacionalmente.

Adicionalmente, el sensor también facilitaría el análisis obligatorio de plumbemia de los trabajadores expuestos a este contaminante, según estipula la Ley No. 17.774 promulgada por el Poder Ejecutivo en el año 2004.[13]

IDENTIFICACIÓN DE PLOMO

Existen varios métodos, clásicos e instrumentales, que permiten la detección y la cuantificación de Plomo. En una solución acuosa típica la determinación cualitativa del ión Pb(II) está incorporada en las marchas analíticas clásicas. Dentro de estos métodos, la verificación se realiza mediante el agregado de ácido clorhídrico para lograr la precipitación de cloruro de Plomo ($PbCl_2$) y otras sales de cloro ($AgCl$ o Hg_2Cl_2 , por ejemplo), la filtración y redisolución del precipitado en agua caliente (el cloruro de Plomo es el único que se disuelve en este caso), y la formación de un nuevo precipitado amarillo frente al agregado de cromato de potasio a la solución en caliente.[19]

La cuantificación analítica clásica, el Método de la Ditizona, es un procedimiento colorimétrico que tiene como principio la extracción del Pb(II) de una solución acuosa acidulada con ditizona en cloroformo para formar ditiozonato de Plomo, de color rojo cereza característico; la absorbancia del extracto orgánico a 460nm sirve como indicador de la concentración de Pb(II) en la solución original. Sin embargo, este procedimiento ha caído en desuso frente a los métodos instrumentales más recientes debido a su costosa operativa, poca precisión y relativamente alto límite de detección.[19-20]

Los métodos instrumentales comúnmente empleados y recomendados para la determinación de Plomo son: Espectrometría de Absorción Atómica a la Llama (FAAS) y en Horno de Grafito (GFAAS), Espectrometría de Emisión Atómica por Plasma Acoplado Inductivamente (ICP/AES), Espectrometría de masa por Plasma Acoplado Inductivamente (ICP/MS), y Voltamperometría de redisolución anódica (ASV).[21] Los límites de detección de cada técnica pueden variar de acuerdo a la matriz y el tratamiento realizado a la muestra (Tabla 3). En general, la mayoría de estos equipos precisan de muestras previamente digeridas y con pocas especies ajenas al analito que puedan interferir en la medida.[19, 21]

El análisis típico por FAAS puede detectar niveles de Plomo en el entorno de 0.1 ppm, mientras que la incorporación del horno de grafito en GFAAS puede llevar al límite de detección a casi 1 ppb. Este último procedimiento es el recomendado por los diferentes organismos de referencia (EPA, OMS) para realizar el análisis de Pb(II) en sangre.[21] Los métodos inductivos también tienen límites de detección en el entorno de partes por billón (10 ppb para ICP/AAS y 0.1 ppb para ICP/MS), pero requieren de tratamientos previos más complejos e instrumental más sofisticado y costoso. El procedimiento voltamperométrico puede medir concentraciones de hasta 5 ppb.[21]

Tabla 3: Métodos utilizados en análisis de Plomo en sangre, tratamiento sobre la muestra y límite de detección de cada uno de ellos

Método Analítico	Tratamiento de la Muestra	Límite de Detección (ppb)	Referencia
FAAS	Digestión con HNO ₃	500	[22]
FAAS	Digestión con HNO ₃ , quelación con APDC y extracción con metil-isobutil-cetona	50	[23]
GFAAS	Digestión y dilución con Triton X-100 [®] , HNO ₃ y fosfato de amonio	2	[24]
GFAAS	Incineración en mufla y redisolución	4	[25]
ICP/MS	Incineración en mufla y redisolución	0.1	[25]
ICP/AES	Digestión con HNO ₃ -HClO ₄ -H ₂ SO ₄	10	[26]
ASV	Digestión en HClO ₄ o extracción con Metexchange [®]	5	*

* Resultados experimentales obtenidos en el Laboratorio de Biomateriales, Facultad de Ciencias.

SENSORES COMO PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN INTERDISCIPLINARIA

De acuerdo a las características y exigencias de los diferentes componentes de un sensor químico, existe la posibilidad de incorporar y combinar en un mismo dispositivo materiales que, en principio, tienen muy pocos elementos en común. Cada uno de los componentes que forma parte del sensor puede provenir de áreas del conocimiento científico completamente disímiles, pero que sin embargo son capaces de proveer los elementos que mejor se ajustan a una de las funciones específicas del instrumento. La integración de estos elementos en un único sistema y la capacidad de transferir y vincular la información entre ellos permite construir dispositivos sumamente novedosos y efectivos.

En los últimos años, la utilización e integración de diferentes materiales, especialmente aquellos productos asociados a la investigación en Nanotecnología, ha permitido el desarrollo de una enorme cantidad de instrumentos de medición. En especial, el desarrollo de sensores químicos a partir de nanopartículas metálicas y ADN funcional se ha transformado en un área de investigación con excelentes resultados.[2] Las nanopartículas metálicas pueden actuar como sistema responsable de la señal de detección, debido a que sus propiedades físicas (color, campo magnético asociado, conductividad, etc.) cambian con el estado de agregación del sistema. Por otro lado, el ADN funcional puede actuar como sistema de reconocimiento de diferentes especies químicas.[2, 7]

Los sensores construidos a partir de estos dos elementos tienen las características típicas de los instrumentos de medición para análisis descentralizados. En especial, los sensores colorimétricos diseñados con nanopartículas de Oro presentan un enorme potencial en este tipo de aplicaciones analíticas.

En los últimos años (sobre todo en la segunda mitad de la pasada década) varios equipos de investigación han desarrollado dispositivos capaces de censar e identificar la presencia de diferentes analitos.[2] Sin embargo, muy pocos de los sensores desarrollados han sido utilizados en aplicaciones reales, a pesar de las varias ventajas y facilidades que, en principio, puede presentar su empleo en estos casos. Probablemente, uno de los objetivos a futuro consista en encontrar diferentes campos de aplicación que puedan verse beneficiados con el empleo de este tipo de sensores. En este sentido, el desarrollo de un sensor colorimétrico para la detección de Plomo y su potencial uso en análisis de sangre implicaría una primera aproximación a una aplicación práctica real de un diseño que, hasta ahora, solo ha sido ensayado en el laboratorio en muestras sintéticas sin interés analítico.

El sensor colorimétrico para la detección de Plomo funciona a través de la integración de dos componentes, responsables por separado de la transducción de la señal y el reconocimiento del metal.[27] Estos dos materiales son el resultado de áreas del conocimiento completamente diferentes; por tanto, sus principios pueden ser estudiados y entendidos por separado. Una vez detalladas las propiedades de cada uno de ellos, va a ser posible comprender cómo se integran y permiten que funcionen como instrumento de medición.

NANOTECNOLOGÍA Y NANOPARTÍCULAS

INTRODUCCIÓN

La Nanotecnología es un área de investigación interdisciplinaria que trata sobre las diferentes estructuras de la materia a escala nanométrica. El prefijo nano hace referencia a la milmillonésima parte de una unidad, en este caso, la milmillonésima parte de un metro. A esta escala, se logra manipular la materia directamente a nivel atómico y molecular.[28]

La “United States Science Foundation” define a la Nanociencia/Nanotecnología como el estudio de materiales y sistemas que poseen las siguientes propiedades clave:

- 1- Dimensión: al menos una de las dimensiones del sistema debe ser menor de 100nm
- 2- Proceso: diseñadas con metodologías que permiten controlar los atributos físicos y químicos de estructuras a escala molecular.
- 3- Propiedades de “construcción-en-bloque”: los sistemas nanoestructurados pueden ser combinadas para formar estructuras más grandes, pero que conservan las propiedades de sus bloques constituyentes.[29]

La Nanotecnología se nutre de varias disciplinas científicas clásicas, como la física, la química o la informática, y sus avances, la creación de nuevas estructuras, afecta y tiene aplicaciones en áreas tan diversas como la medicina, la agroindustria o las telecomunicaciones.[28-29]

Hay varias razones que explican por qué la Nanotecnología se ha vuelto un área de investigación tan relevante en los últimos tiempos:

- Las propiedades cuánticas de los electrones se ven influenciadas por variaciones en su entorno más cercano, definido por un radio de unos pocos nanómetros de distancia. En los elementos nanoestructurados, con una distribución definida y controlada a escala atómica durante la síntesis, el entorno diferencial en estos electrones permite que algunas propiedades micro y macroscópicas del sistema (propiedades ópticas o magnéticas, conductividad, etc.) pueden variar sin que cambie la composición química del material original.
- Las nanomateriales poseen una relación superficie/tamaño muy alta, y pueden tener una densidad y conductividad mayor a las estructuras normales. Estas propiedades posibilitan su uso en una enorme cantidad de aplicaciones, que van desde el almacenamiento de energía y el transporte de fármacos al desarrollo de dispositivos eléctricos y semiconductores.
- La combinación de procesos biológicos, organizados de forma sistemática a escala atómica y molecular, y la investigación y desarrollo de nanomateriales capaces de interactuar con estos sistemas también resulta un campo de investigación muy prometedor. Los trabajos en esta área permitirán construir nanoestructuras artificiales, y vincularlas con sistemas vivos para potenciar funciones específicas en células y tejidos.[30]

HISTORIA

Se puede decir que la Nanotecnología como disciplina científica tuvo un nacimiento “teórico” varios años antes de consolidarse como campo de investigación real. En 1959, el físico Richard Feynman en la famosa conferencia titulada “There’s Plenty of Room at

the Bottom”, planteaba cómo la posibilidad de manipular la materia átomo por átomo no viola ninguna ley de la naturaleza y que sí todavía no se había alcanzado ese nivel de control sobre los elementos se debía solo a limitaciones puramente tecnológicas.[31] A partir de este razonamiento, también planteaba como el cambio en la escala de manipulación podía alterar las magnitudes de varios fenómenos físicos y conjeturaba sobre el potencial de las estructuras creadas con este tipo de tecnología.[31] Sin embargo, no fue hasta la década de los 80s que la Nanotecnología abandonó su status de hipótesis como resultado de la convergencia de varios avances técnicos y científicos realizados en esos años. La invención del microscopio de efecto túnel (STM) en 1981, el desarrollo de la microscopía de fuerza atómica (AFM) en 1984 y el descubrimiento de los fulerenos en 1985, son los tres grandes acontecimientos que suelen definir el nacimiento de esta ciencia.[29] Así, una vez consolidada como disciplina científica, la Nanotecnología también incorporó y fue asociada a otras áreas de investigación ya existentes, como por ejemplo, el estudio de interfaces y sistemas coloidales.[32] El trabajo en Nanotecnología continuó creciendo en las siguientes décadas, y a principios de este nuevo siglo logró consolidarse como una de las disciplinas con mayor proyección y potencial en todo el ámbito científico. Actualmente, las investigaciones en Nanotecnología constituyen un espectro de actividades que abarca casi todas las disciplinas científicas clásicas, y que prometen ser la plataforma de la próxima gran revolución industrial. Sin embargo, el rápido desarrollo de estas tecnologías y las características de los avances logrados hasta ahora plantean una enorme cantidad de debates sobre las implicancias, regulaciones y posibles aplicaciones de los resultados, y los productos y beneficios sociales que podemos obtener de ellos. En este sentido, los organismos internacionales y estatales, con una participación activa de toda la comunidad científica, tienen la necesidad de evaluar el impacto en todas sus aristas, social, ética, ambiental y política, con el objetivo de que la investigación en este campo reporte los mayores beneficios a la sociedad en su conjunto.[28-29]

NANOPARTÍCULAS METÁLICAS

Como ya se mencionó anteriormente, las aplicaciones y el estudio de los sistemas coloidales metálicos es anterior a la consolidación de la Nanotecnología como disciplina científica. Las nanopartículas de oro, plata y hierro (o coloides metálicos, como se llamaban en ese entonces) se han utilizado como pigmentos en vidrios y telas desde hace varios siglos debido a sus propiedades ópticas y colores únicos. La síntesis de este tipo de estructuras no se aleja demasiado de los procedimientos químicos clásicos, y por eso fue posible desarrollar varias técnicas de síntesis incluso antes de conocer los fenómenos físicos detrás de estos sistemas.[28]

En la década de 1850, Michael Faraday comenzó con el estudio científico de los sistemas coloidales metálicos, y en particular, de los coloides con oro. El trabajo en esta área le permitió desarrollar un método de síntesis de nanopartículas de Oro puras por medio de la reducción con fósforo. Más tarde, las bases físicas de los fenómenos ópticos observados en las nanopartículas fueron descritas en 1861 en las ecuaciones de Maxwell. En 1904, Gustav Mie presentó soluciones algebraicas exactas a estas ecuaciones que permitían describir la dispersión de las ondas electromagnéticas por cuerpos esféricos.[28, 33] A través de estas soluciones, es posible calcular los coeficientes de extinción molar y las propiedades ópticas de, por ejemplo, las nanopartículas esféricas de oro, de acuerdo a la ecuación:

$$\sigma_{ext} = \frac{9V\epsilon_m^{\frac{3}{2}} \cdot \omega\epsilon_2(\omega)}{c \cdot (\epsilon_1(\omega) + 2\epsilon_m)^2 + \epsilon_2(\omega)^2} \quad (1)$$

donde V es el volumen de la partícula, c la velocidad de la luz, ω la frecuencia angular de la onda electromagnética incidente, ϵ_m la constante dieléctrica del medio externo, y ϵ_1 y ϵ_2 describen las componentes real e imaginaria respectivamente de la función dieléctrica del material de la partícula.[34]

El coeficiente de extinción, σ_{ext} , se vuelve significativo a medida que el denominador adquiere dimensiones cada vez menores; esto se logra cuando $\epsilon_2(\omega) = -2\epsilon_m$. [34]

La ec. 1 también permite calcular la frecuencia del pico de máxima absorción para partículas esféricas de volumen y medio externo fijo; al analizar σ_{ext} en función de ω se puede obtener una aproximación teórica del espectro de absorción para cualquier sistema compuesto por figuras geométricas de este tipo.

Los conceptos plasmón y resonancia del plasmón están directamente relacionados con las propiedades ópticas de las nanopartículas. Cuando una partícula metálica esférica es irradiada con una onda electromagnética, la oscilación del campo eléctrico de la onda genera una oscilación coherente de los electrones del metal (Figura 2).[33] Este fenómeno se denomina resonancia del plasmón, por analogía al movimiento de los iones en un plasma.[28, 35] La frecuencia de vibración de esta nube electrónica, el plasmón (ω_p), se relaciona con la energía de acuerdo a la ecuación de Planck:

$$E_p = h \times \omega_p \quad (2)$$

donde E_p es la energía del plasmón y h es la constante de Planck.[28]

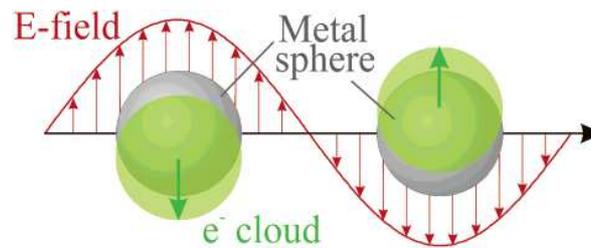


Figura 2: Esquema ilustrativo de la resonancia del plasmón. Se representa la oscilación de la nube electrónica del metal (en verde) cuando una onda electromagnética atraviesa la partícula (en gris). Adaptado de Ref. [35]

En un cuerpo metálico cualquiera, el alcance de la resonancia del plasmón depende directamente de la relación área/volumen, la forma geométrica y el tamaño de la/s partícula/s. Para objetos de dimensiones macroscópicas, la gran mayoría de los electrones se encuentran confinados dentro del volumen interno del metal, formando parte del enlace metálico del bloque. Como consecuencia, la energía y el momento de los fotones que pueden incidir sobre la sustancia, y la cantidad de electrones inmediatos a la interfase metal/ambiente no son suficientes para establecer una resonancia del plasmón significativa. En cambio, en algunos objetos nanoestructurados de geometrías específicas y que poseen una relación área/volumen mucho más importante, la incidencia de las

ondas electromagnéticas sobre la extensa superficie metálica origina una resonancia apreciable de los electrones inmediatos a la interfase. La vibración de este grupo de electrones se denomina resonancia del plasmón superficial (SRP, por sus siglas en inglés), y se vuelve significativa cuando el número de electrones en la superficie es de órdenes similares al número de electrones internos responsables del enlace metálico intra-partícula.[28]

En estos sistemas, la frecuencia de la onda electromagnética absorbida y responsable de la resonancia depende también del entorno más inmediato del elemento. En algunas nanopartículas metálicas, la frecuencia de este pico máximo de absorción cae dentro del rango visible del espectro y eso genera los colores característicos de los coloides metálicos.[28, 35]

NANOPARTÍCULAS DE ORO

Dentro de los elementos que pueden formar nanoestructuras, las nanopartículas de Oro ($Z = 79$, masa atómica = 197.0 uma) han sido uno de los sistemas más estudiados y uno de los que ha encontrado más aplicaciones prácticas hasta ahora. Las inusuales propiedades ópticas de las nanopartículas de Oro (AuNPs a partir de ahora), su electroquímica dependiente del tamaño, y su alta estabilidad química las han convertido en un excelente modelo para la investigación de varios fenómenos, como el auto-ensamblaje, biomarcado, catálisis, teorías de transferencia de electrones, transferencia de fase o crecimiento de cristales. Estas mismas propiedades también han permitido su aplicación e incorporación en dispositivos e instrumentos de una amplia variedad de disciplinas vinculadas con alta tecnología, como la microscopía electrónica, la electrónica, la ciencia de los materiales y el desarrollo de sensores para metales, moléculas orgánicas y biomoléculas.[32, 36]

Hasta el momento se han desarrollado varios métodos que permiten sintetizar AuNPs. Sin embargo, la mayoría de ellos comparte el mismo principio de síntesis y la misma reacción electroquímica: la nanoestructuras de Au metálico se forman por la reducción controlada de iones Au(III) o Au(I) disueltos en un medio líquido. Las características del medio de reacción y la naturaleza y concentración del agente reductor determinan las propiedades, el tamaño y la forma de las AuNPs obtenidas en el proceso. Los distintos mecanismos de síntesis requieren, además, la presencia de un agente estabilizador que recubra a las nanopartículas formadas y mantenga el sistema coloidal estable.[28]

El método de síntesis de AuNPs más simple y difundido fue desarrollado por J. Turkevich en 1951, refinado por G. Frens en la década del setenta, y es universalmente conocido por el apellido de estos dos científicos (Método de Turkevich o Método de Frens según la referencia bibliográfica). El procedimiento, que permite obtener partículas esféricas monodispersas en solución acuosa, es una normalización de los procesos de síntesis utilizados históricamente.[37-38]

La reacción de los iones Au(III) (derivados del ácido tetracloroáurico, HAuCl_4) se realiza en un medio acuoso calentado a 100° , y utiliza citrato de sodio como agente reductor. Este último compuesto también recubre y actúa como agente estabilizador de las AuNPs formadas en la reacción.[37] El proceso de síntesis en el método de Turkevich está gobernado por un mecanismo termodinámico; esto quiere decir que la alta energía del sistema (en este caso, consecuencia de la temperatura del solvente), el exceso de agente

reductor y el extenso tiempo de reacción determinan la formación de AuNPs esféricas, la forma geométrica más estable termodinámicamente.

La formación de las AuNPs en el proceso se evidencia por un rápido cambio del color del sistema de reacción: después de la adición de citrato de sodio, la solución de HAuCl_4 pierde el color amarillo pálido característico de las soluciones de Au(III) y se torna rojo intenso. Entremedio, durante el proceso de nucleación, la solución adquiere una coloración azul oscuro, casi negro. El pico de absorción del plasmón superficial de la solución de AuNPs obtenidas por este método se ubica entre 515-530nm y depende del tamaño promedio de las partículas sintetizadas.[34]

OTROS MÉTODOS DE SÍNTESIS DE AuNPs:

El método de Brust fue desarrollado por Brust y Schiffrin a principios de los noventa, y permite sintetizar AuNPs en solventes orgánicos apolares. El procedimiento se realiza en un sistema compuesto por dos fases e involucra la reacción de Au(III) presente en la fase acuosa con bromuro de tetraoctilamonio (TOAB) y borohidruro de sodio, que actúan como anticoagulante y agente reductor respectivamente. El TOAB es un catalizador de transferencia de fase y permite el pasaje de las AuNPs del agua al solvente orgánico; además, también actúa como agente estabilizante en la fase orgánica. Otros métodos de síntesis que emplean borohidruro de sodio en medio acuoso permiten sintetizar AuNPs de diámetros cercanos a 1nm. Sin embargo, los sistemas coloidales que se obtienen en estas síntesis no suelen ser demasiado estables.

El método de Perrault, desarrollado en 2009, es una variante del método de Frens. Utiliza quinidrona como agente reductor e incorpora AuNPs que actúan como origen de siembra para la nueva síntesis. Este procedimiento permite obtener AuNPs de entre 30-250nm con una menor dispersión de tamaños que el método de Turkevich. También se han desarrollado métodos de síntesis que utilizan agentes reductores tales como aminoácidos, hidrogeno gaseoso o incluso electrones libres directamente inyectados al sistema.

El método de Turkevich permite sintetizar AuNPs con diámetros de entre 8-150nm y una dispersión del 95% menor de alrededor de 10% en reacciones bien controladas.[34] El diámetro promedio del producto de la síntesis depende de la proporción HAuCl_4 /citrato en el medio de reacción. G. Frens estudió por primera vez esta relación en 1973 y demostró que el diámetro de las AuNPs aumenta a medida que se añade menos cantidad de agente reductor (Figura 2).[38] En ese mismo estudio y en otros más recientes también se detalla que la síntesis de AuNPs mayores a 100nm utilizando este procedimiento requiere de tiempos de reacción más extensos, y que, además, no se logran distribuciones homogéneas de las partículas.[34, 38]

La influencia del citrato en el tamaño de las AuNPs se cree se debe más a su rol como mediador del pH que como agente reductor. Al variar el pH del sistema, el propio citrato de sodio y los complejos de Au(III) presentes en el medio de reacción cambian marcadamente su reactividad. Estas variaciones generan cambios estructurales que influyen en las rutas de reacción y en la naturaleza de los productos de la síntesis.[39]

Experimental Data on the Preparation of Mono-disperse Gold Sols					
Sol	Amount of Solution II (ml.)	Diameter (Å)	Colour	t_{blue} (s)	t_{red} (s)
A	1.00	160	Orange	25	145
B	0.75	245	Red	25	120
C	0.50	410	Red	25	70
D	0.30	715	dark red *	40	140
E	0.21	975	violet *	60	435
F	0.16	1470	violet *	80	850

* With a yellow Tyndall effect of the scattered light.

Figura 3: Resultados de las diferentes síntesis realizadas por G. Frens con cantidades variables de citrato de sodio. La concentración de la "Solution II" es de 10 g de citrato de sodio / Litro. t_{blue} y t_{red} indican el tiempo que demoró a la solución en tornarse azul y roja respectivamente Adaptado de Ref. [38]

El empleo de diferentes agentes reductores también puede variar el tamaño de las AuNPs sintetizadas. En especial, la rapidez en la descomposición y/o el potencial redox de estos reactivos tienen una marcada influencia en los productos de la reacción. Una reducción rápida a través de un agente reductor fuerte aumenta el ritmo de nucleación, disminuye la disponibilidad de átomos para el crecimiento del núcleo, e induce la formación de AuNPs más pequeñas. Este argumento explica por qué se obtienen nanopartículas más pequeñas cuando se utiliza un agente reductor fuerte (borohidruro de sodio) en lugar de uno débil (citrato de sodio).

Las propiedades ópticas de las AuNPs dependen de varios factores. Para nanopartículas esféricas aisladas, el espectro de absorción del sistema coloidal está fuertemente determinado por el diámetro promedio de las especies en suspensión. El análisis de las soluciones de Mie y los resultados experimentales de diferentes estudios prueban que el pico máximo de absorción del plasmón superficial se corre a longitudes de onda mayores a medida que aumenta el tamaño de las AuNPs (Figura 4).[34, 40-41]

A nivel macroscópico, esto se traduce en una transición de color que va del rojo-anaranjado hacia el violeta-azulado (Figura 5).[42]

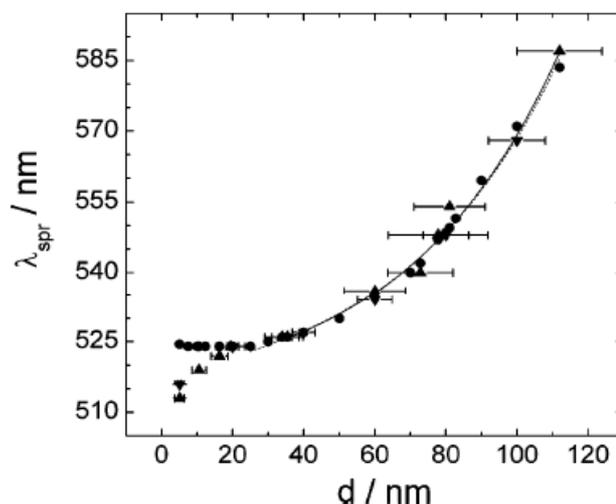


Figura 4: Posición del pico del plasmón superficial en función del tamaño de las AuNPs. Se grafican círculos (resultados del cálculo teórico) y triángulos (resultados de medidas experimentales), y se realiza un ajuste exponencial con toda la serie de datos. Adaptado de Ref. [41]

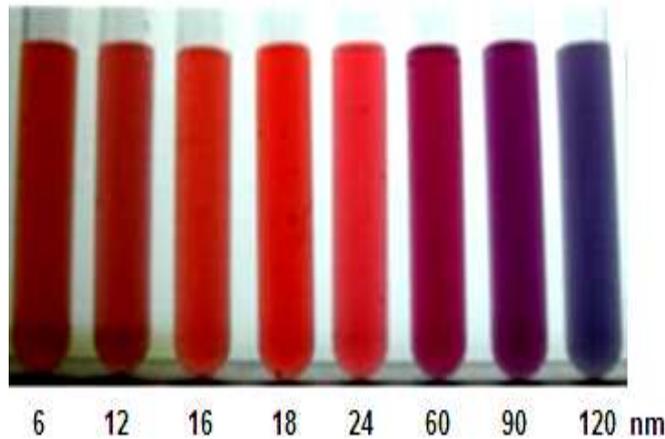


Figura 5: Nanopartículas esféricas de oro de diferentes tamaños sintetizadas por el Método de Turkevich. Se observa la transición del color a medida que aumenta el diámetro de la partícula. Adaptado de Ref. [42]

Aparte, la forma general del espectro puede verse afectada por la presencia de nanopartículas no esféricas, con la aparición de nuevos picos o pisos de absorción de fondo más significativos.[34]

El proceso de nucleación y crecimiento durante la síntesis también ha sido ampliamente estudiado. Las primeras hipótesis planteadas por Turkevich y Frens proponían dos etapas diferenciadas en la formación de AuNPs: primero, la rápida creación de núcleos por la reducción de Au(III), y segundo, el crecimiento controlado por difusión de los cristales originales.[37-38] El tamaño y la distribución de los cristales formados en el proceso seguían los principios del Modelo de LaMer (Figura 6).[43] Sin embargo, este modelo de desarrollo no se ajusta de forma exacta a las observaciones realizadas sobre la evolución temporal de las nanopartículas.

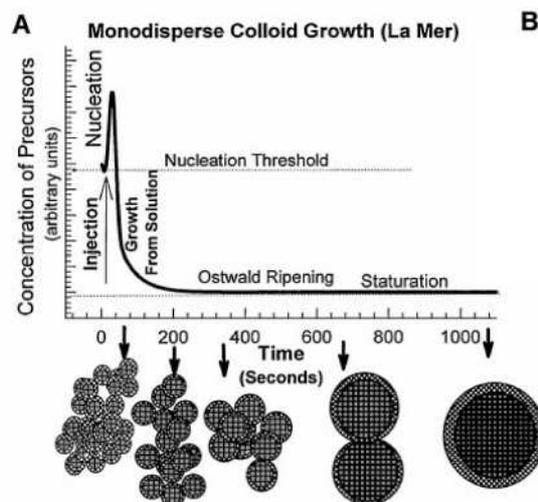


Figura 6: Etapas de nucleación y crecimiento para cristales y nanopartículas según el Modelo de LaMer. Adaptado de Ref. [43]

Un nuevo mecanismo descrito a principios de la década pasada propone una etapa novedosa posterior a la nucleación de los cristales: las nanopartículas de aproximadamente 5nm de diámetro originadas en la primera nucleación se autoensamblan para formar una extensa red agregados, en forma de nanotubos. El diámetro

de estos nanotubos aumenta progresivamente a medida que se reduce el Au(III); después de alcanzar un espesor determinado, la red se fragmenta en pequeños segmentos que se re-dispersan para formar las nanopartículas esféricas (Figura 7).[44-45] La red de nanotubos sería responsable del color azul oscuro que adquiere el medio de reacción al momento de agregar el citrato de sodio.

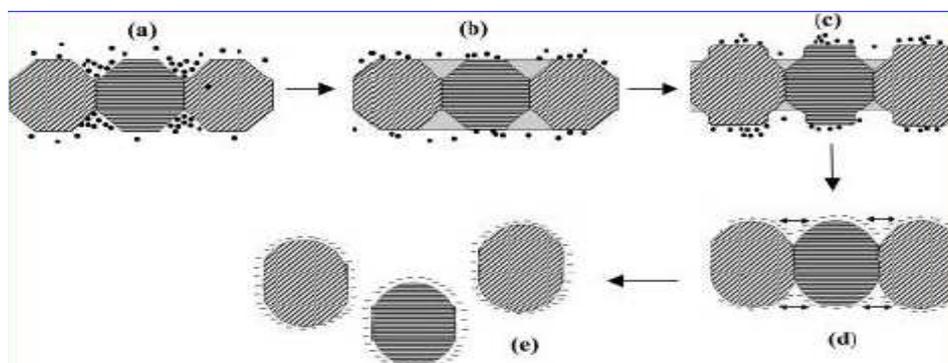


Figura 7: Etapas de formación de AuNPs. (a) Los átomos de Au(III) se adsorben sobre los núcleos y promueven la formación de agregados lineales. Los nuevos átomos de Au reducidos se depositan irregularmente en las cavidades entre los núcleos. (b) Cuando las cavidades están llenas, los átomos se depositan preferencialmente sobre los cristales y crean constricciones en el nanotubo. (c) Se eliminan las regiones no cristalinas de las cavidades (proceso análogo a la maduración de Ostwald). (d) Los iones citrato se vuelven los agentes de recubrimiento dominantes y repelen a los átomos de Au(III) adyacentes al nanotubo. La fuerza de repulsión entre los núcleos originales separa a las partículas del tubo, y se forman las AuNPs esféricas recubiertas de citrato (e). Adaptado de Ref. [44]

QUÍMICA SUPRAMOLECULAR DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ORO

Hasta ahora, solo se han descrito las propiedades ópticas de los sistemas coloidales estables, es decir, suspensiones de nanopartículas aisladas y recubiertas por un agente estabilizante. En estos sistemas, la separación existente entre las partículas suspendidas evita posibles variaciones en las frecuencias de absorción del plasmón superficial asociado. En otras palabras, el entorno cercano de cada nanopartícula (responsable en parte de la naturaleza del plasmón superficial) no se ve perturbado por la presencia cercana de otro elemento (otra nanopartícula).

En gran medida, el responsable de mantener este aislamiento es el agente estabilizante: el ion citrato, por ejemplo, recubre a las AuNPs y aprovecha la repulsión electrostática entre las diferentes moléculas; así, cada nanopartícula se encuentra rodeada por una esfera de carga negativa, que la mantiene aislada del resto de los elementos del coloide.

Sin embargo, la propia teoría de Mie prevé que las propiedades ópticas de los sistemas coloidales dependen de la distancia que separa a las nanopartículas en la suspensión. A medida que dos nanopartículas se acercan en el espacio, la naturaleza y el perfil de absorción del plasmón superficial de cada una de ellas se ven afectados y cambian por el nuevo entorno. En particular, la presencia de otra nanopartícula altera las constantes dieléctricas del medio externo, que, como se ve en la ec. 1, tiene una relación directa con los coeficientes de extinción del plasmón.[34]

El nuevo perfil de absorción del plasmón superficial como consecuencia del cambio en la distancia que separa a las nanopartículas se traduce en una transición de color del sistema

coloidal. Para AuNPs, el pico bien definido en 515-530 nm pierde intensidad, y aumenta de forma pareja, sin ningún pico específico, la absorción para longitudes de onda entre 550nm-750 nm. Como resultado, a nivel macroscópico el color del sistema cambia desde rojo intenso, característico de las AuNPs aisladas, y se vuelve violeta-azulado de acuerdo al grado de agregación (más agregado, más azul).

En el sistema coloidal, la aproximación espacial de las nanopartículas se puede lograr por diferentes vías:

La adición de un electrolito fuerte permite remover al agente estabilizante del entorno cercano de la nanopartícula y favorece la formación de estructuras compuestas por varios elementos. En particular, se ha estudiado que la agregación de AuNPs inducida por cloruro de sodio (NaCl) altera completamente la naturaleza de la suspensión. La remoción de los iones citrato inmediatos a las nanopartículas producida por la sal, conduce al colapso del sistema coloidal y a la formación de una única gran estructura en forma de red por la condensación de los partículas originales.

Otras formas de agregación se pueden lograr a través de especies unidas covalentemente a las nanopartículas.[46] En los agregados formados por esta vía, las AuNPs no se colapsan en una única estructura y mantienen su identidad a pesar de la modificación de la separación espacial. Este estado diferencial del sistema permite que algunas referencias discriminen entre agregados (las nanopartículas se condensan y pierden su identidad original) y aglomerados (las nanopartículas se acercan espacialmente, pero no hay contacto directo entre ellas y mantienen su identidad).[47]

Una de las propiedades más interesantes que presentan las AuNPs es la posibilidad de establecer enlaces covalentes entre los átomos de la superficie y determinadas especies químicas. Este proceso, conocido como derivatización, permite la creación de nuevas estructuras, con propiedades únicas y novedosas surgidas de la asociación de la nanopartícula y la molécula unida a ella. A través de la derivatización, es posible funcionalizar a la nanopartícula y lograr sistemas adaptables a varias funciones, como el reconocimiento molecular o la promoción de la formación de aglomerados.[46]

Las AuNPs pueden derivatizarse fácilmente con grupos tiol a través de la formación de enlaces covalentes entre los átomos de Oro de la superficie de la nanopartícula y el átomo de Azufre del grupo funcional. La presencia del grupo tiol en determinadas moléculas orgánicas y biomoléculas permite construir las estructuras mencionadas y funcionalizar a la nanopartícula con una especie de interés (Figura 8a).[46]

Si las biomoléculas unidas a la nanopartícula tienen afinidad por otras especies químicas o biológicas es posible promover la formación de agregados de AuNPs a través del reconocimiento y la unión de estos elementos. El acoplamiento entre las biomoléculas derivatizadas produce el acercamiento espacial de las AuNPs, y como consecuencia, el cambio de color del sistema coloidal (Figura 8b). Este fenómeno de acoplamiento y cambio de color a nivel macroscópico es el principio en el que se basan la mayoría de los sensores colorimétricos que emplean AuNPs. En 1997, Storhoff *et al.* diseñaron un sistema colorimétrico que permite diferenciar oligonucleótidos con imperfecciones de una única base a través de la derivatización de AuNPs con moléculas de ADN.[48] Desde entonces, se han reportado varios sistemas de este tipo que permiten detectar y diferenciar una gran cantidad de especies químicas y biológicas, desde proteínas hasta iones metálicos.[2, 32]

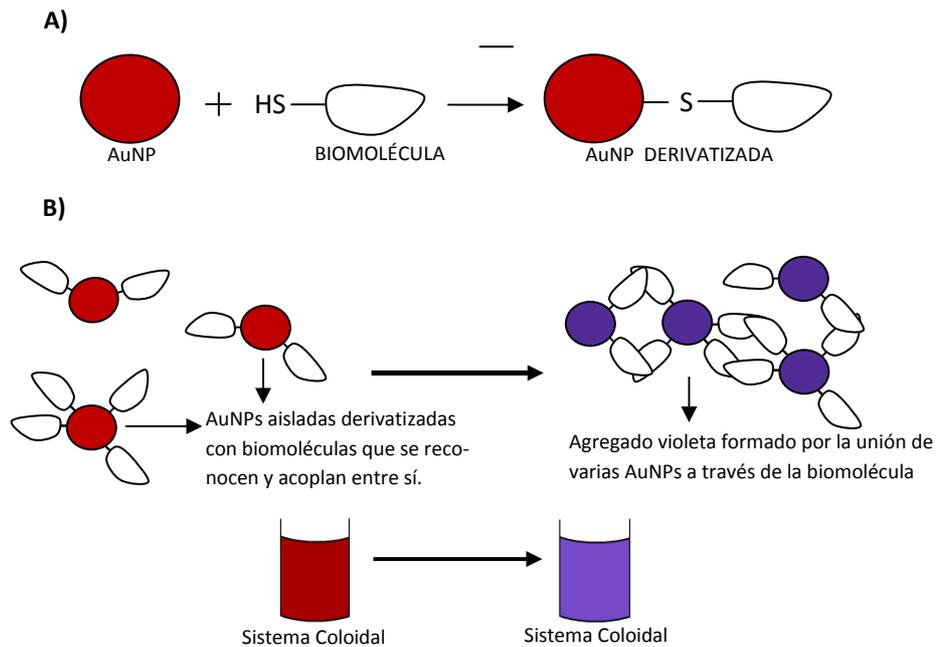


Figura 8: A) Derivatización de una AuNP a través del grupo tiol de una biomolécula. El elevado ΔH de formación del enlace Au-S (418 ± 25 kJ/mol) hace que la unión “nanopartícula-biomolécula” sea sumamente estable y fuerte, y permite que el enlace se forme de manera espontánea al entrar en contacto las dos especies.

B) Formación de agregados de AuNPs derivatizadas con biomoléculas capaces de reconocerse y unirse entre sí. La formación del agregado altera el color del sistema coloidal como consecuencia del cambio y la fijación de la separación espacial existente entre las AuNPs. A nivel macroscópico, el sistema coloidal cambia de color desde rojo intenso a violeta-azulado.

ADN FUNCIONAL y DNazymas

ADN COMO NANOMATERIAL

Hasta no hace muchos años atrás, dentro del ámbito científico se entendía y convenía que el ADN solo funcionaba como la biomolécula encargada de contener la información genética y asegurar la transmisión de la misma de una generación a otra. En todos los seres vivos, el rol del ADN se reduce a estas dos únicas funciones. En cambio, otras biomoléculas como las proteínas (o incluso el ARN) tienen un abanico de roles mucho más amplio. Es esta versatilidad de funciones lo que ha permitido adoptar y utilizar a las proteínas ya desde mediados de la década de 1980 en varios sistemas vinculados con la Nanotecnología, como sensores, dispositivos de reconocimiento o bloques de construcción molecular. En contrapartida, prácticamente no se habían realizado estudios y trabajos que incorporaran ADN con estos fines.

Como sistema molecular optimizado a través de millones de años de evolución, la biomolécula del ADN tiene varias propiedades que le permiten cumplir con su rol biológico de forma sumamente eficaz. A diferencia de las proteínas, el ADN es una molécula lineal que está compuesta únicamente por 4 monómeros, y tiene una estabilidad térmica y química mucho más significativa que las primeras. Además, su mecanismo de síntesis y ensamblado es rápido y sencillo, y puede enlazarse específicamente a través de enlaces de hidrógeno a otra molécula de ADN de secuencia complementaria para formar la doble hebra.[49]

Ya en tiempos más recientes, han sido estas mismas propiedades asociadas a la molécula de ADN las que han despertado el interés de varios grupos científicos de disciplinas relacionadas con la nanoingeniería y los biomateriales. La idea de aprovechar las propiedades químicas de la molécula de ADN e incorporarla en el diseño de diferentes estructuras y dispositivos se ha convertido en un campo de investigación sumamente fértil.[49-50]

El ADN presenta varias ventajas para su empleo como nanomaterial: En comparación con el ARN y las proteínas, las moléculas de ADN son más estables y menos susceptibles a la hidrólisis. Además, las vías artificiales de síntesis y amplificación permiten crear secuencias de ADN bien definidas de forma sencilla, rápida y controlada. El ADN también puede modificarse con diferentes grupos funcionales y fluoróforos que le permiten conjugarse con nanopartículas y otras estructuras artificiales. Por ejemplo, la conjugación de los terminales 3' o 5' de una hebra de ADN con tioles permite funcionalizar AuNPs según se detalla en el capítulo anterior.[48, 51] Es así que la incorporación de ADN en las investigaciones en Nanotecnología ha promovido el desarrollo de varias nanoestructuras, como cables, sistemas de procesamiento de la información, biocatalizadores, y máquinas y dispositivos moleculares.[7]

Los primeras aplicaciones del ADN como nanomaterial aprovechaban su estructura lineal, y a partir de ella, la posibilidad de reconocer y enlazarse con otras hebras de secuencias complementarias. La formación de la doble hebra a través del apareamiento de bases de Watson-Crick y las oportunidades que presenta este tipo de interacción específica ha sido la base para la creación de, por ejemplo, semiconductores, nanobloques de construcción o sensores colorimétricos de oligonucleótidos (Figura 9).[7, 48, 52-53]

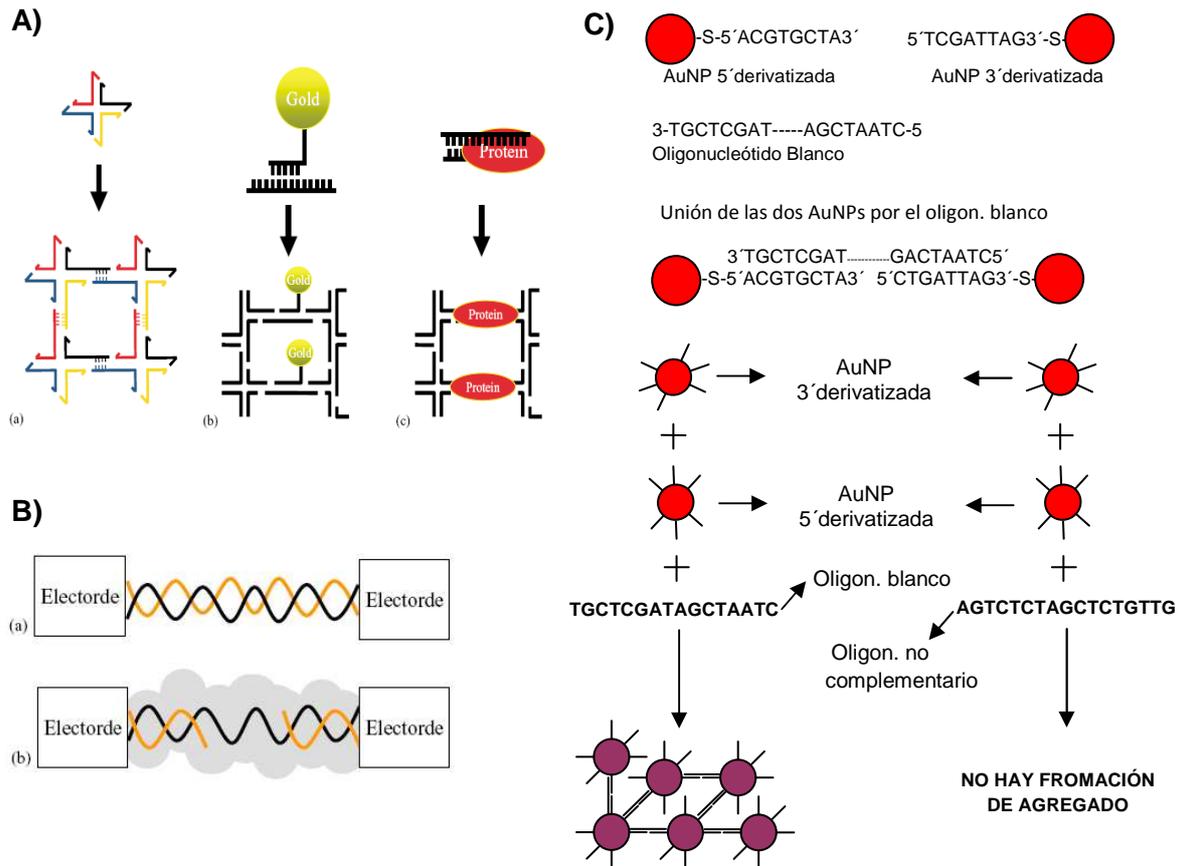


Figura 9: Ejemplos de diferentes nanoestructuras que incorporan ADN aprovechando el emparejamiento de bases de Watson-Crick.

A) ADN utilizado como bloque de construcción en “nanoarquitecturas”. Las 4 hebras complementarias en tramos específicos de sus secuencias permiten formar una red de ADN o “cristal 2D”, con espacios de tamaño bien definido entre las doble hebras (a). Esta red de ADN puede ser utilizada como molde para la unión a espacios controlados de nanopartículas (b) o proteínas (c). Adaptado de Refs. [7, 52]

B) “Nanocables” semiconductores preparados a partir de ADN. Bajo determinadas condiciones, la molécula de ADN puede conducir la corriente entre dos polos. El pasaje de corriente eléctrica se logra cuando dos microelectrodos se conectan entre sí debido a su funcionalización con dos oligonucleótidos de ADN de secuencias complementarias. El ADN puede ser el único material conectando estos electrodos (a) o puede estar asociado a conductores metálicos (b). Adaptado de Refs. [7, 53]

C) Sensor colorimétrico que permite identificar secuencias de bases en oligonucleótidos.

Después de establecer la secuencia de ADN blanco que es necesario reconocer, se realiza la funcionalización de dos grupos de AuNPs: el primer grupo se derivatiza a través del átomo de azufre de un oligonucleótido modificado con un tiol en su extremo 5'; este primer oligo es complementario a la secuencia de bases sobre el extremo 3' del ADN blanco; el segundo grupo se derivatiza a través del átomo de azufre de otro oligonucleótido modificado con un tiol en su extremo 3'; este segundo oligo es complementario a la secuencia de bases sobre el extremo 5' del ADN blanco.

El ADN de las dos derivatizaciones se une a cada uno de los extremos del ADN blanco a través del emparejamiento de bases de Watson-Crick para formar la doble hebra. Esta unión acerca a las AuNPs y fija la separación espacial entre los dos elementos funcionalizados. Entonces, si la mezcla de las dos AuNPs derivatizadas se encuentra con el oligonucleótido blanco se produce la agregación todas las partículas del sistema y, como consecuencia, el cambio de color del medio. La formación del agregado es específica y depende de la presencia del oligonucleótido blanco.

Con esta técnica es posible obtener un sensor colorimétrico que permite identificar secuencias bien definidas de ADN de forma inmediata y a simple vista. Elaborado a partir de resultados de Ref. [48]

En paralelo al desarrollo de la Nanotecnología con base en el ADN, la continua y progresiva caracterización de este sistema y los resultados de diferentes investigaciones han permitido expandir, desde los roles y propiedades clásicas, las funciones químicas de esta biomolécula. A principios de la década de 1990, diferentes grupos de investigación crearon las bases del ADN funcional, o sea, moléculas construidas con nucleótidos que tienen propiedades químicas más allá de las clásicas e históricas asociadas a la molécula de ADN.[49]

Los primeros sistemas de ADN funcional nacieron en 1991, cuando, por primera vez, se logran sintetizar por distintos procesos de selección moléculas de ADN aisladas y de secuencias bien definidas que son capaces de reconocer y unirse con alta afinidad y especificidad a un amplio rango de estructuras químicas y/o biológicas. Los aptámeros, como se denominaron a esta nueva clase de moléculas funcionales de ADN, pueden entenderse, en cierta medida, como análogos basados en ADN de los anticuerpos proteicos.[54]

Los aptámeros son oligonucleótidos de cadena sencilla con tamaños entre 70 y 100 nucleótidos. Por lo general tienen una región central de tamaño variable con una secuencia aleatoria, y dos regiones flanqueantes de secuencia conocida. La longitud de la región central suele estar comprendida entre los 30 y 60 nucleótidos. La secuencia fija en los extremos permite la unión de *primers* y la amplificación por PCR.

Los aptámeros son capaces de adoptar estructuras globulares, que les confieren unas complejas y sofisticadas propiedades de reconocimiento molecular. El plegado del oligonucleótido le permite reconocer y unirse de una manera estable y muy específica a sus sistemas diana. Las dianas de los aptámeros pueden ser pequeñas moléculas como cofactores enzimáticos, aminoácidos o ácidos nucleicos, proteínas, o incluso complejas estructuras multiméricas.[54]

Las novedosas propiedades de los aptámeros han despertado el interés de diferentes grupos de investigación y han permitido su incorporación en diferentes aplicaciones tecnológicas. En comparación a los sistemas nanotecnológicos de ADN basados en el apareamiento de bases de Watson-Crick, el empleo de ADN funcional puede resultar en estructuras mucho más versátiles y dinámicas. Los aptámeros pueden ser sumamente útiles en sistemas vinculados con la biotecnología y Nanotecnología debido a sus propiedades de reconocimiento molecular que rivalizan con los anticuerpos, las biomoléculas comúnmente utilizadas en este tipo de aplicaciones. Sobre todo, la incorporación de estas biomoléculas en el diseño de sensores químicos y biológicos puede ofrecer excelentes resultados (Figura 10).

Para este tipo de aplicaciones, los aptámeros ofrecen algunas ventajas particulares sobre los anticuerpos: pueden ser sintetizados completamente y de forma rápida y masiva por vías artificiales; pueden almacenarse fácilmente y por tiempos prolongados debido a su elevada estabilidad química; provocan muy pequeña o nula respuesta del sistema inmune en aplicaciones terapéuticas.[49-50]

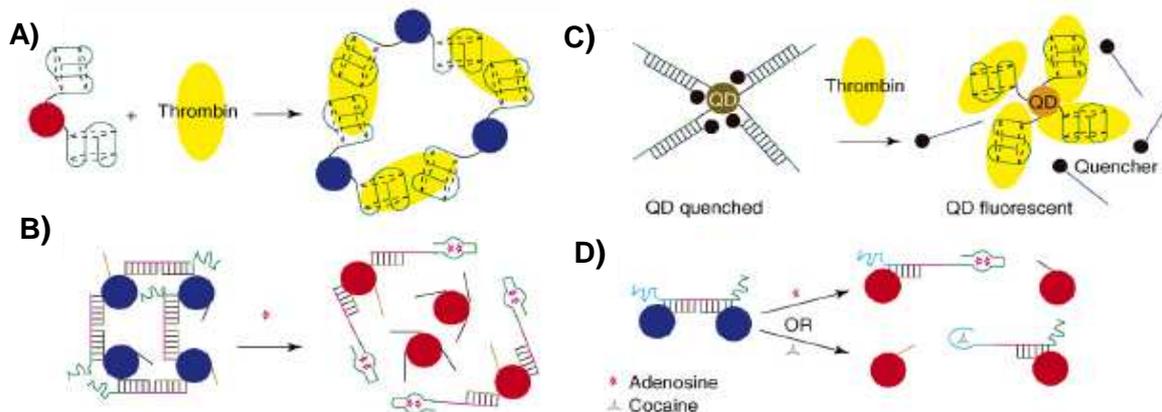


Figura 10: Ejemplos de sensores nanoestructurados que incorporan aptámeros.

- A) Agregado de AuNPs funcionalizadas con el aptámero de trombina por la presencia de trombina. Cada molécula de trombina puede unirse a dos aptámeros y eso permite la formación del agregado.
- B) Agregados de AuNPs funcionalizadas con aptámeros sensibles a especies químicas específicas (adenosina, en este caso). La presencia de la diana desagrega el sistema.
- C) Emisión de fluorescencia controlada por un aptámero. La adición de trombina y la unión con su aptámero libera al ADN con el *quencher* y desenmascara la fluorescencia del emisor.
- D) Sensor no cooperativo que incorpora aptámeros de adenosina y cocaína y permite identificar la presencia de estas dos especies. Adaptado de Ref. [49]

Pero los aptámeros no son la única clase de ADN funcional. En 1994 Breaker y Joyce descubrieron que moléculas de ADN aisladas mediante un procedimiento de selección *in vitro* eran capaces de desarrollar actividades catalíticas.[55] Desde entonces, muchas moléculas de ADN catalítico, o DNAzymas, han sido reportadas por diferentes equipos de investigación y se ha demostrado su capacidad para actuar sobre una amplia variedad de reacciones, como el clivaje, ligación y fosforilación de ARN/ADN, metilación de porfirinas o clivaje de enlaces fosfatilamida.[56] Además, varias de estas biomoléculas han mostrado eficiencias catalíticas comparables a las enzimas proteicas o las ribozimas. Las DNAzymas aún no se han encontrado en la naturaleza y la selección *in vitro* permanece como la única vía que permite aislar e identificar nuevas biomoléculas con actividades desconocidas.

Mientras que las enzimas proteicas disponen de 20 diferentes monómeros para su construcción, la variedad de estructuras disponibles de las DNAzymas se reduce a los 4 nucleótidos comúnmente conocidos. Además, la ausencia del grupo funcional 2'-OH en el ADN en comparación al ARN reduce aún más la diversidad de conformaciones que puede tomar la DNAzima para el reconocimiento efectivo de la diana.[56]

La solución natural para corregir este tipo de problemas es el empleo de cofactores. En este sentido, para competir con las otras clases de biomoléculas catalíticas, el requerimiento de cofactores se vuelve crítico para el funcionamiento de las DNAzymas.

Para la gran mayoría de las DNAzymas, el empleo de iones metálicos como cofactores permite desencadenar la actividad catalítica en condiciones fisiológicas. Sin embargo, y a diferencia de las proteínas, los iones metálicos utilizados por las DNAzymas comúnmente se limitan a un pequeño grupo de elementos como, Mg(II), Ca(II) o Mn(II). A pesar de ello, algunas DNAzymas han mostrado cierta selectividad de unión con algunos metales menos comunes, aunque la afinidad encontrada hasta ahora es menor que las asociadas a metaloproteínas.

La fuerza de la unión DNAzima-ión metálico puede ser modificada utilizando el mismo proceso que permite crearlas artificialmente, la selección *in vitro*. [56]

La clave para generar nuevas DNAzymas y/u optimizar a las descritas anteriormente (ya sea en la afinidad y selectividad o en la diversificación de los iones metálicos que emplean como cofactores) reside en el proceso de selección (Figura 11).

La selección de moléculas con actividad catalítica comienza con un pool de entre 10^{14} y 10^{15} secuencias aleatorias de ADN. Bajo condiciones puntuales, las secuencias que pueden presentar las funciones catalíticas deseadas son separadas del resto del pool. Estas secuencias activas son amplificadas por PCR para la próxima ronda de reacción y selección (al igual que los aptámeros, las DNAzymas tienen en sus extremos secuencias que pueden ser reconocidas por primers). El rigor de la selección puede ser aumentado al reducir el tiempo de reacción o la concentración del cofactor. Las rondas de selección se repiten hasta que sea posible identificar y aislar secuencias de ADN con elevada actividad y especificidad. Teóricamente este proceso de selección puede llevarse a cabo con cualquier ion metálico con el objetivo de identificar DNAzymas con actividades específicas que dependan de la presencia elemento deseado. En este sentido, se han logrado aislar moléculas de ADN con actividad dependiente de iones metálicos menos comunes que los mencionados anteriormente, como Cu(II), Zn(II), Co(II), UO^{+2} o Pb(II). [56]

Uno de los problemas inherentes a esta estrategia de selección *in vitro* es que, a pesar de que las DNAzymas se obtienen bajo condiciones controladas, no se excluye la posibilidad que los productos aislados puedan funcionar en diferentes circunstancias o con diferentes cofactores. Este problema se puede resolver mediante estrategias de selección negativa. La selección negativa implica la incubación del pool de secuencias activas con los iones metálicos sobre los que no se desea que exista actividad. En este caso, se aíslan las moléculas que no reaccionan con el cofactor presente. [56]

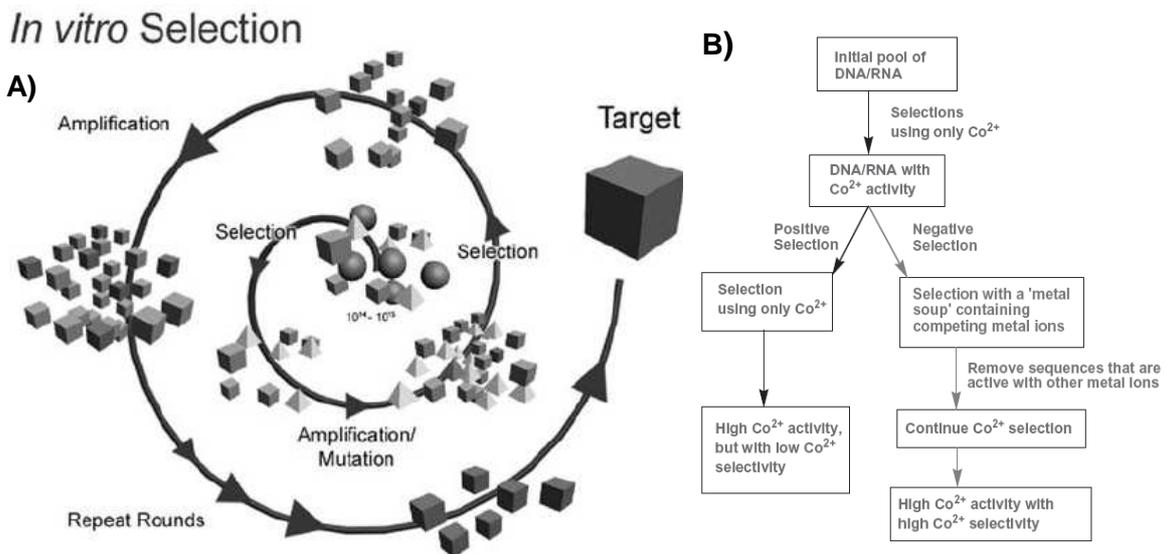


Figura 11: A) Representación esquemática del proceso de selección *in vitro*. **B)** Diagrama de la selección en paralelo de una DNAzima dependiente de Co(II) con y sin selección negativa. Adaptado de Ref. [56]

ENDONCLUEASAS Y DNAzymas “8-17”

Muchas de las DNAzymas aisladas por la selección *in vitro* han demostrado gran actividad en reacciones de clivaje de ADN y ARN. En particular, se han obtenido varias endonucleasas con reactividad específica para algunos metales de transición.

Las endonucleasas están compuestas por dos hebras de ADN (o ARN): La hebra enzima, con afinidad por el cofactor metálico y responsable de la actividad del sistema, y la hebra sustrato, que posee el sitio de clivaje que permite la reacción enzimática (Figura 12).[2, 56]

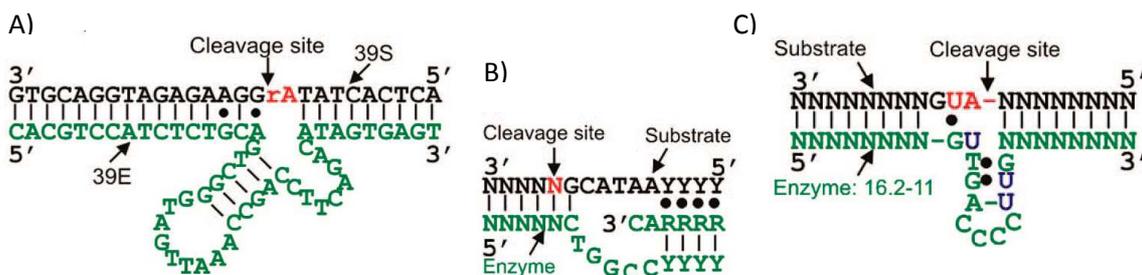


Figura 12: Ejemplos de DNAzymas con actividad endonucleasa. En cada ejemplo se indica la hebra sustrato (negro), la hebra enzima (verde) y el sitio de corte (rojo). “N”= cualquier nucleótido que permita el apareamiento con la hebra complementaria. “R” = Purina. “Y” = Pirimidina. A) DNAzima 39E específica para iones UO²⁺. B) DNAzima específica para Cu(II). C) DNAzima específica para Zn(II). Adaptado de Ref. [2]

En una reacción típica catalizada por DNAzymas, primero se produce la hibridación de las hebras sustrato y enzima. Luego, la presencia del ión metálico diana y el reconocimiento de éste por el núcleo catalítico de la DNAzima, producen el clivaje del sustrato en dos nuevas moléculas, que inmediatamente pierden la unión y se apartan de la hebra enzima.[2]

Dentro del grupo de DNAzymas con actividad endonucleasa, las biomoléculas de la familia “8-17” han sido uno de los sistemas mejor caracterizados hasta el momento.

Las DNAzymas “8-17” son las endonucleasas de ARN de menor tamaño aisladas hasta ahora. Son capaces de clivar sustratos formados completamente por ARN, o también sustratos de ADN con un nucleótido de ARN embebido en el sitio de corte.[56]

Diferentes variantes de esta DNAzima han sido seleccionadas de forma independiente por el proceso de selección *in vitro* al menos en tres oportunidades. En 1997, Santoro & Joyce aislaron la secuencia catalítica original en presencia de MgCl₂ (Figura 13).[57] A esta primer secuencia se la denominó “8-17” y se obtuvo a partir de un sustrato compuesto íntegramente por ARN. En paralelo, se han logrado aislar secuencias análogas en presencia de Mg(II) e histidina (DNAzima Mg5), y Zn(II) (DNAzima 17E) (Figura 14). Posteriormente, Lu *et al.* demostraron que el cofactor más efectivo para todas las variantes de este sistema es el ión Pb(II), un metal no ensayado en ninguna de las selecciones realizadas previamente. La k_{obs} en presencia de Pb(II) para cada una de las tres variantes es de 0.5 min⁻¹ (“8-17”), 2 min⁻¹ (Mg5) y 1 min⁻¹ (17E) a pH = 5.0 y concentración de Pb(II) de 20 μM.[58]

El proceso de selección de la secuencia original evitó las rondas de selección negativa, lo que permite que varios iones metálicos activen el clivaje del sustrato.[59] Para la variante “17E” las constantes de la reacción siguen el orden Pb(II) >> Zn(II) >> Mn(II) ≈ Co(II).[58] La notoria diferencia de reactividad a favor del ión Pb(II) se debe a que este cofactor obliga a la DNAzima a emplear un mecanismo de reacción diferencial. El

clivaje empleando cofactores como Zn(II) o Mg(II) transita por dos etapas: la primera de ellas involucra un cambio conformacional del sistema enzima-sustrato. El plegado de las dos hebras es necesario para que se produzca el clivaje en la segunda etapa. En cambio, la reacción con Pb(II) saltea la primer etapa y el corte en la hebra sustrato se logra de forma directa sin la necesidad del plegado del sistema (Figura 15).[60]

La zona conservada de la DNAzima 17E ha sido definida en varias publicaciones. La región desapareada en el bucle hacia el extremo 3' posee la secuencia "5'-ACGAA-3'" y es una de los motivos claves para la actividad catalítica. Aparte de este motivo, se ha demostrado que la secuencia 5'-AGC-3' que forma el codo de la hebra enzima y el *wobble* T-G previo al sitio de corte también son indispensables para el funcionamiento del sistema.[61]

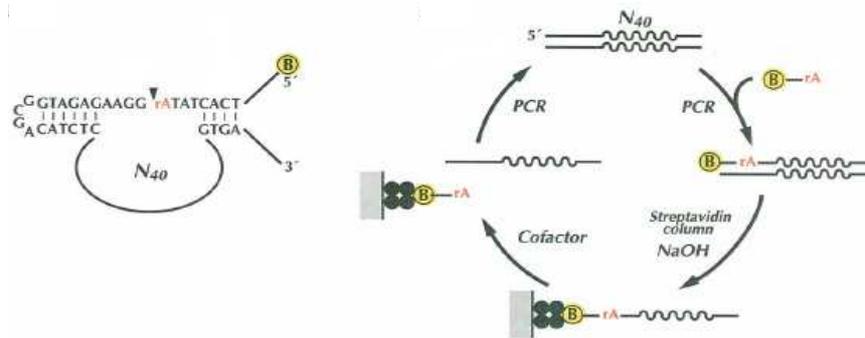


Figura 13: Mecanismo de aislado de secuencias con actividad endonucleasa que utilizan cofactores metálicos. A) Pool de arranque de secuencias aleatorias de ADN diseñadas para contener dos dominios de unión al sustrato. Cada molécula del pool contiene una biotina en el extremo 5', un nucleótido de ARN (rA) que define el sitio de corte y la secuencia aleatoria de 40pb en el dominio central. B) Esquema de la amplificación y el aislado selectivo de moléculas de ADN que catalizan el clivaje en presencia del cofactor metálico. Adaptado de Ref. [58]

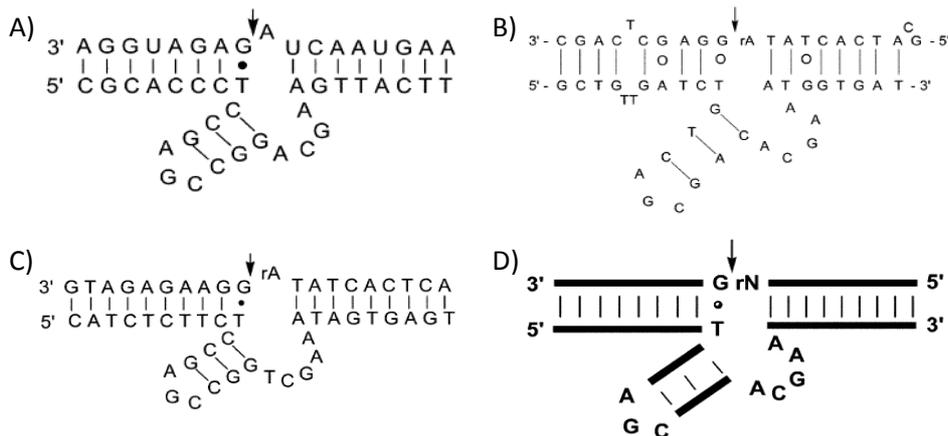


Figura 14: DNAzymas de la familia "8-17". A) DNAzima "8-17" (única del grupo de sustrato íntegro de ARN). B) DNAzima Mg5 C) DNAzima 17E. D) Secuencia conservada de la DNAzima 17E; solo se revelan los nucleótidos claves para lograr la actividad catalítica. Adaptado de Ref. [56]

La cinética del clivaje está fuertemente determinada por el medio de reacción. Para pH 7.0 y concentraciones de buffer de 50 mM la actividad enzimática comienza a notarse

con concentraciones de Pb(II) cercanas a 2.5 μM . Valores de k_{obs} de alrededor de 1 min^{-1} se alcanzan en 3.5 μM y a partir de 4.5 μM la velocidad se despega y no es posible medir la constante de la reacción (Figura 16a).[61] La velocidad de reacción baja notoriamente al disminuir la fuerza iónica del medio. Al pasar a concentraciones de buffer de 10 mM los valores de k_{obs} caen cerca de dos órdenes (Figura 16b). Sin embargo, para estas condiciones, el perfil de la reacción se acerca más al modelo clásico de Michaelis-Menten que se aplica en enzimas proteicas. Se cree que esta diferencia de velocidades es reflejo de dos conformaciones diferenciadas del sitio activo, y como consecuencia, dos mecanismos de reacción divergentes.[61]

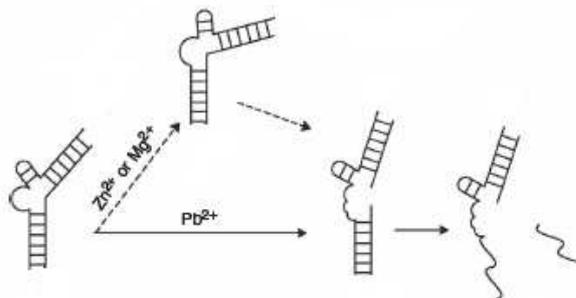


Figura 15: Mecanismo de reacción propuesto para las DNAzimas “8-17” en presencia de Pb(II) o Mg(II) y Zn(II). Adaptado de Ref. [60]

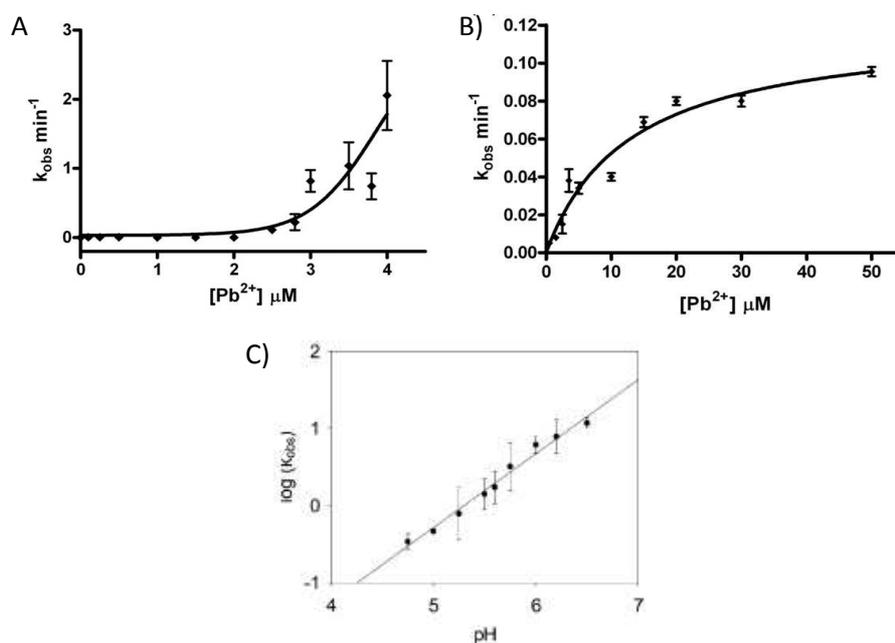


Figura 16: Estudios cinéticos de la catálisis del clivaje por la DNAzima 17E en presencia de Pb(II). A) Gráfica de la constante de velocidad observada (k_{obs}) en función de la concentración de Pb(II) en buffer de reacción 50 mM Na-Hepes pH 7.0. B) Misma gráfica que A) en buffer de reacción 10 mM Na-Hepes pH 7.0. C) Cambio de la velocidad de reacción al variar el pH del medio. La concentración de Pb(II) para cada medida es de 100 μM . Adaptado de Refs. [56] y [61]

El pH también tiene una marcada influencia en la velocidad de reacción. Brown *et al.* estudiaron esta relación y demostraron que, para concentraciones fijas de Pb(II), la k_{obs} de la reacción aumenta a medida que aumenta el pH (Figura 16c).[58]

En el mecanismo de clivaje que emplea Pb(II) se forma un producto intermediario que contiene un 2'3'-ciclofosfato. Esta especie es consistente con un mecanismo de transesterificación interna, en el que el grupo 2'-OH en el sitio de corte ataca el enlace fosfodiéster para formar un fosfato pentacoordinado, seguido de la pérdida del oxígeno en el extremo 5'. Al final de la reacción el 2'3'-ciclofosfato se hidroliza y la hebra sustrato original queda dividida en las dos nuevas moléculas.[58]

DNAzymas COMO SENSORES DE IONES METÁLICOS

El clivaje de hebras de ARN/ADN como consecuencia de la actividad de las DNAzymas, y la dependencia que tienen estas reacciones de la presencia de iones metálicos ha permitido la creación de toda una nueva clase de biosensores altamente sensibles y selectivos.

Estos sistemas de detección aprovechan el empleo de cofactores metálicos por parte de las DNAzymas. Los productos de la reacción pueden ser monitoreados de diferentes maneras, lo que permite identificar y/o cuantificar la presencia del ión metálico involucrado en la reacción.

Las DNAzymas tienen varias ventajas a la hora de emplearse en sensores para iones metálicos en comparación a los sistemas de detección convencionales. En primer lugar, las DNAzymas pueden reducir los requerimientos de instrumental complejo y voluminoso, y pueden incorporarse en dispositivos portables para análisis *in situ*. Segundo, el mecanismo de aislado y acción de las DNAzymas permite obtener nuevos sistemas y/o modificar a los ya creados con el objetivo de generar y amplificar las señales de detección para análisis más sensibles. Los biosensores basados en DNAzymas también son amigables con el medio ambiente debido a que sus componentes, moléculas de ADN, son biocompatibles y biodegradables; además, sus efectos toxicológicos en el cuerpo humano serían mínimos. En comparación a los sensores basados en proteínas o RNA, las DNAzymas son más resistentes a la hidrólisis y permiten su almacenamiento y aplicación por períodos de tiempo más largos. Por último y quizá más importante, las DNAzymas proveen una plataforma común para el desarrollo de sensores para iones metálicos nuevos o incluso otras dianas más allá de estos elementos. Una vez establecida una estrategia de transducción que permita convertir la actividad catalítica en una señal medible analíticamente, el mismo diseño puede ser aplicado a otras dianas tan pronto se aislen DNAzymas específicas para estas especies. Esta plataforma de mejora flexible se espera reduzca el costo de desarrollo de diferentes sistemas de detección, y permita convertir a los biosensores basados en DNAzymas en instrumentos efectivos e idóneos para la detección múltiple y en paralelo en muestras complejas en ensayos tipo barrido.[56]

Hasta ahora se han encontrado varias soluciones que permiten transducir el evento de reconocimiento de la DNAzima (el clivaje de la hebra sustrato por la presencia del cofactor metálico) y convertirlo en una señal analítica y operativamente útil. El primer biosensor para iones metálicos desarrollado con DNAzymas utilizaba mediciones de fluorescencia como señal de detección. En este primer sistema, a la DNAzima 17E para Pb(II) se le incorpora un fluoróforo (TAMRA) en el extremo 5' de la hebra sustrato y un *quencher* (Dabcyl) en el extremo 3' de la hebra enzima. De esta forma, la señal de fluorescencia a 580nm no puede ser detectada debido al quencheado del fluoróforo. En

presencia de Pb(II) la emisión de fluorescencia aumenta hasta 400 veces como consecuencia del clivaje de la hebra sustrato y la liberación del producto de reacción unido al fluoróforo. Este sensor es altamente sensible y selectivo, y permite medidas semi-cuantitativas de concentraciones de Pb(II) entre 10 nM y 4 μM (Figura 17).[2, 62]

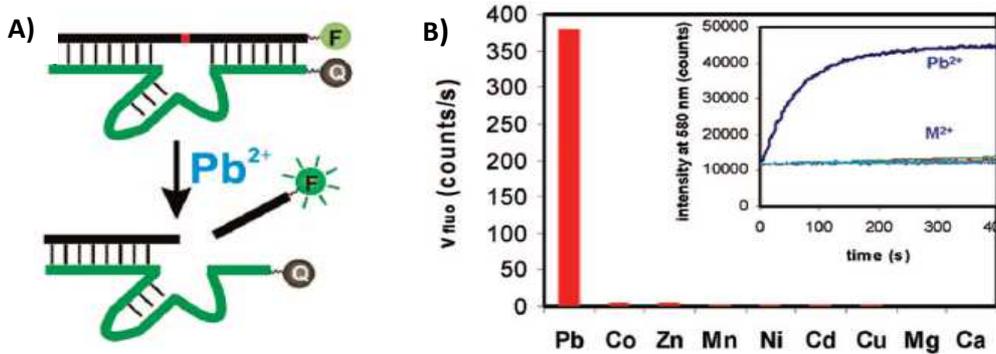


Figura 17: Sensor de Pb(II) basado en fluorescencia que incorpora la DNAzima 17E. A) Esquema de la generación de la señal por el clivaje de la hebra sustrato en presencia del ión metálico. “F” representa al Fluoróforo y “Q” al *Quencher*. B) Selectividad del sensor. El ión Pb(II) ([Pb(II)] = 2 μM) es el único metal que produce una señal de fluorescencia apreciable. Adaptado de Ref. [2]

Otros diseños realizados hasta el momento incorporan soluciones nanotecnológicas para la transducción de la señal al aprovechar las propiedades de los sistemas nanoestructurados como los descritos en el capítulo anterior. En este sentido, se han construido biosensores con DNAzimas que incorporan nanopartículas metálicas de Fe₂O₃ (la señal de transducción se relaciona con el cambio del campo magnético del sistema), sistemas de detección electroquímica (el clivaje del sustrato modifica la conductividad de una lamina nanoestructurada de Au), o nanopartículas de Oro en sistemas de detección colorimétricos.[2] Este último grupo está integrado por un conjunto de instrumentos con características, algunas ya demostradas y otras aún por demostrar, sumamente interesantes y valiosas. Los sensores colorimétricos de AuNPs-DNAzimas reúnen casi todas las propiedades deseadas en instrumentos de medición descentralizados descritas en el primer capítulo. Sin embargo, el desarrollo de esta clase biosensores es un área de investigación muy reciente, que recién se encuentra en la búsqueda de sistemas reales que puedan verse beneficiados a través del diagnóstico con alguno de los instrumentos ya diseñados.

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR COLORIMÉTRICO PARA LA DETECCIÓN DE PLOMO

Por un lado, hemos comentado y descrito las características de las nanopartículas de oro, y detallado sus propiedades ópticas dependientes de la distancia y su capacidad para interactuar con otras especies en agregados supramoleculares. Por otro lado, también hemos presentado al ADN funcional, y en particular a la DNAzima 17E y su capacidad de utilizar al ión metálico Pb(II) como cofactor en una reacción de clivaje de ARN. Aparte, también hemos discutido como cada uno de estos dos sistemas reúne algunas propiedades específicas que pueden ser aprovechadas en el diseño de sensores químicos.

En el año 2003, Liu & Lu de la Universidad de Illinois en Urbana-Champaign se inspiraron en el sistema desarrollado por Santoro & Joyce para detectar moléculas de ADN (Figura 9c), y crearon un biosensor colorimétrico para la detección específica de iones Pb(II) a partir de la combinación de AuNPs y la DNAzima 17E. En este sistema, la DNAzima 17E actúa como elemento de reconocimiento del objetivo (el ión Pb(II)) y las AuNPs traducen este evento en una señal detectable (el cambio de color del medio).[27]

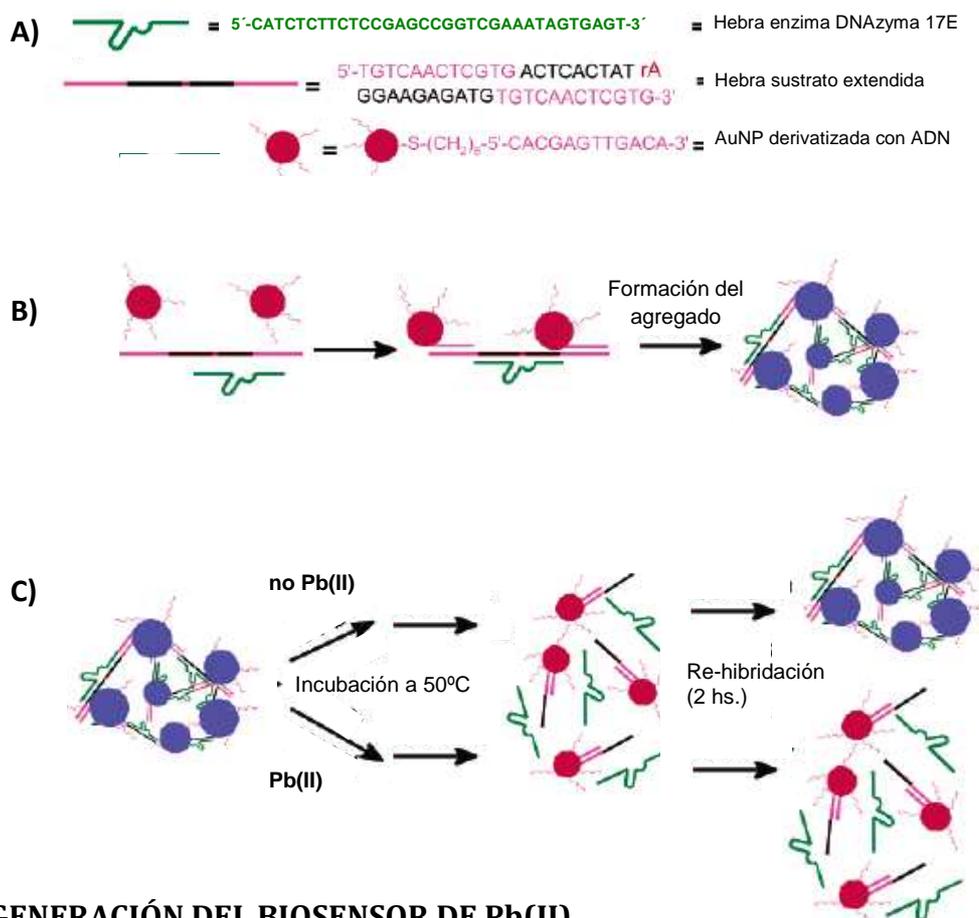
El sensor diseñado por Liu & Lu está compuesto por: la hebra enzima de la DNAzima 17E; la hebra sustrato, extendida 12 pb en cada uno de los extremos 5' y 3'; y AuNPs de 13 nm de diámetro, derivatizadas a través del átomo de Azufre con una molécula de ADN de 12 pb de secuencia definida y modificada con un tiol en su extremo 5' (Figura 18a). Las extensiones en la hebra sustrato se realizan de forma que pueda formar la doble hebra con las secuencias de ADN unidas a la nanopartículas. Este apareamiento de bases, sin embargo, mantiene libre la porción de la hebra sustrato que reconoce y se une a la hebra enzima. Cada molécula de sustrato tiene dos secuencias, una en cada extremo, que pueden formar la doble hebra con el ADN de las AuNPs. Con este diseño, la mezcla de los tres componentes del sensor en el medio de reacción produce la agregación de las nanopartículas y el cambio de color de rojo a azul-violeta después de un proceso de incubación-enfriamiento (Figura 18b). Este complejo sistema formado por las AuNPs funcionalizadas y la DNAzima 17E puede funcionar como sensor colorimétrico para la identificación de Pb(II). En presencia de Pb(II), la hebra enzima podría catalizar el clivaje de la hebra sustrato y promover el desensamblado del sistema y el cambio de color de azul-violeta a rojo, como consecuencia de la desagregación y el cambio de distancia entre las AuNPs en el medio de reacción.[63]

Para una análisis semi-cuantitativo, Liu y Lu utilizan el cociente entre la absorbancia a 522 nm y a 700 nm. Estas dos longitudes de onda fueron seleccionadas por que representan la cantidad relativa de AuNPs aisladas y agregadas, respectivamente. El empleo del cociente en los diferentes ensayos permite distinguir concentraciones de Pb(II) entre 0.1 μM y 4 μM . Sin embargo, a simple vista, la diferencia recién se hace notoria a partir de 1 μM . [27, 63]

De todas formas, esta primera versión aún no optimizada del sensor presenta algunos puntos a mejorar: En principio, no se ha podido demostrar que la adición de Pb(II) sobre el sistema agregado genere el clivaje de la hebra sustrato de forma efectiva. Como consecuencia, el sistema formado por las AuNPs funcionalizadas y la DNAzima no logra desarmarse inmediatamente, y no se produce el cambio de color que permite revelar la presencia del metal en el medio de reacción. En este diseño, la reacción

catalizada por la DNAzima y la detección de Pb(II) recién se logra después de incubar el sistema a 50°, desaparecer a la doble hebra de ADN y producir la desagregación de las AuNPs como consecuencia del aumento de la temperatura. En presencia de Pb(II), el sensor mantiene el color rojo de las AuNPs aisladas durante la incubación; el clivaje de la hebra sustrato catalizado por la DNAzima ocurrido previamente no permite que el sistema se agregue de nuevo. En contrapartida, en ausencia de Pb(II) no hay clivaje del sustrato, y el agregado de AuNPs y la DNAzima vuelve a formarse a medida que desciende la temperatura del medio (Figura 18c). Este mecanismo de detección resulta sumamente incómodo ya que la necesidad de una etapa intermedia de incubación-enfriamiento y la espera para que los componentes del sistema vuelvan (o no) a formar el agregado alargan demasiado el tiempo necesario para obtener el resultado del ensayo. Además, el mecanismo de detección utilizado es del tipo “*light-down*”; el cambio de color del sistema, el pasaje de rojo a azul-violeta en este caso, se produce en ausencia del analito. Por lo general, no se recomienda el empleo de este tipo de sensores debido a que aumentan significativamente el riesgo de obtener resultados falsos positivos.[27]

Por este motivo, Liu y Lu continuaron trabajando sobre este sistema. Su objetivo: optimizar el mecanismo de funcionamiento y lograr un sensor colorimétrico más cómodo y mejor adaptado a las necesidades reales.



2ª GENERACIÓN DEL BIOSENSOR DE Pb(II)

Figura 18: Sensor colorimétrico “*light-down*” para la detección de Pb(II). A) Componentes del sensor. B) Esquema de la formación del agregado de AuNPs por la acción de la DNAzima. El acercamiento y la fijación de la distancia entre las AuNPs produce el cambio de color del sistema coloidal. C) Esquema del mecanismo de detección del sensor. La presencia de Pb(II) impide que se vuelva a formar el agregado después de la incubación. Adaptado de Refs. [27] y [63]

El segundo diseño desarrollado por Liu & Lu incorporaba algunos cambios puntuales con el fin de optimizar el mecanismo de detección del sensor. En primer lugar, se propuso cambiar el modelo de derivatización de las nanopartículas, adoptando un sistema más similar al presentado por Santoro & Joyce en el sensor original de ADN. En lugar de trabajar con una única molécula de ADN, la nueva propuesta realiza dos derivatizaciones sobre dos grupos diferentes de AuNPs. Un grupo de AuNPs se funcionaliza a través de la modificación en el extremo 5' del oligonucleótido; el otro grupo, se funcionaliza a través del extremo 3' (Figura 19a). Este modelo de derivatización permite obtener un alineamiento en el agregado del tipo “cola-cola”, a diferencia del alineamiento “cabeza-cola” que se lograba anteriormente (Figura 19b). El nuevo alineamiento permite que el agregado de AuNPs-DNAzyme se logre de forma espontánea, sin cambio de temperatura, en un tiempo que no excede los 20min (Figura 19c). Además, con este diseño la adición de Pb(II) sobre el sistema agregado sí consigue catalizar el clivaje del sustrato a pesar de la presencia de las AuNPs; de todas formas, la reacción sobre el ADN no logra por sí sola la desagregación del sistema, y de esta forma revelar de manera inmediata la presencia del metal. Para el nuevo sensor, también se determina que el largo ideal de estos los oligonucleótidos de ADN de la derivatización es de 9 pb.[63-64]

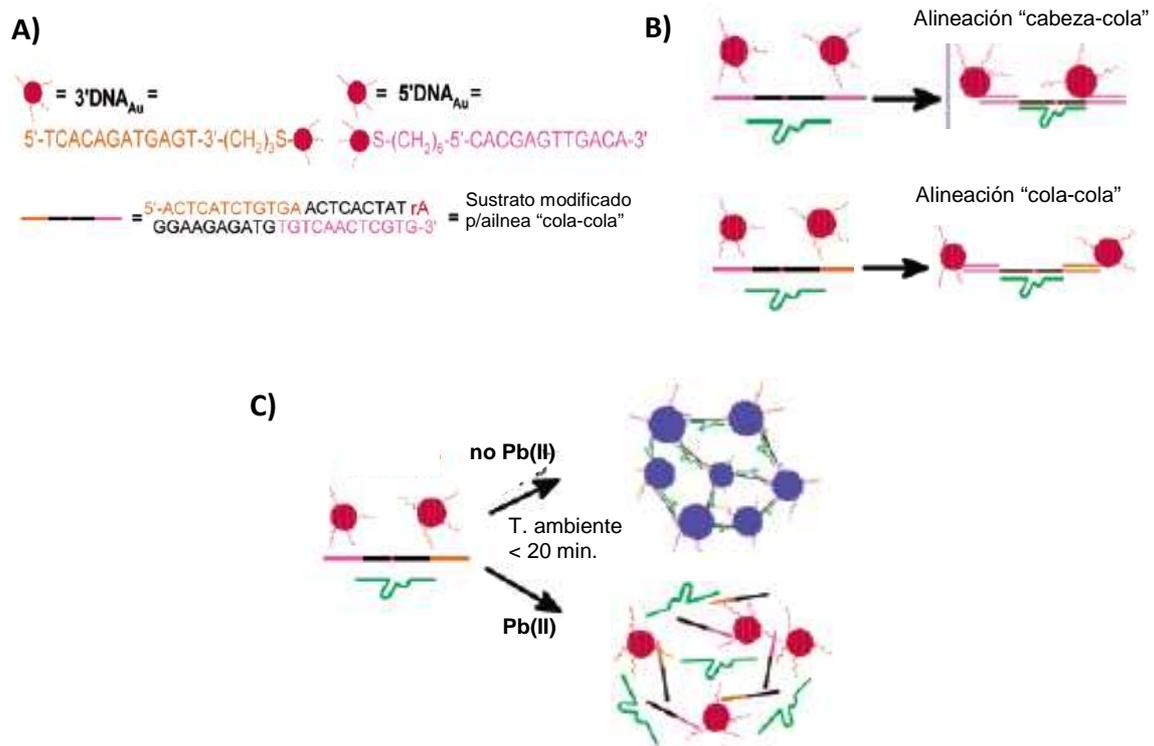


Figura 19: Segundo diseño del sensor. A) Derivatización de AuNPs y hebra sustrato modificada para lograr la alineación “cola-cola” en el agregado. B) Alineación “cabeza-cola” y alineación “cola-cola”. Se cree que la formación del agregado se ve favorecida con el segundo diseño debido que existe mayor libertad y menor impedimento estérico entre los componentes del sensor. C) Esquema del mecanismo de detección del sensor. A diferencia del primer diseño, este sensor no precisa la etapa de incubación-enfriamiento. Adoptado de Ref. [64]

Aparte, se identificaron otros factores que afectan el cambio de color del sensor y el tiempo requerido de ensayo, como el diámetro de las nanopartículas, la relación de

concentraciones entre los tres componentes, o la temperatura, el pH y la concentración de NaCl óptimos del medio de reacción.[64]

Tras la optimización de todos estos factores, el nuevo diseño del sensor no necesita la etapa de incubación-enfriamiento posterior a la adición de Pb(II) y se logra reducir considerablemente el tiempo de las determinaciones a cerca de 20 min. Sin embargo, el mecanismo de detección sigue siendo del tipo “light-down”.

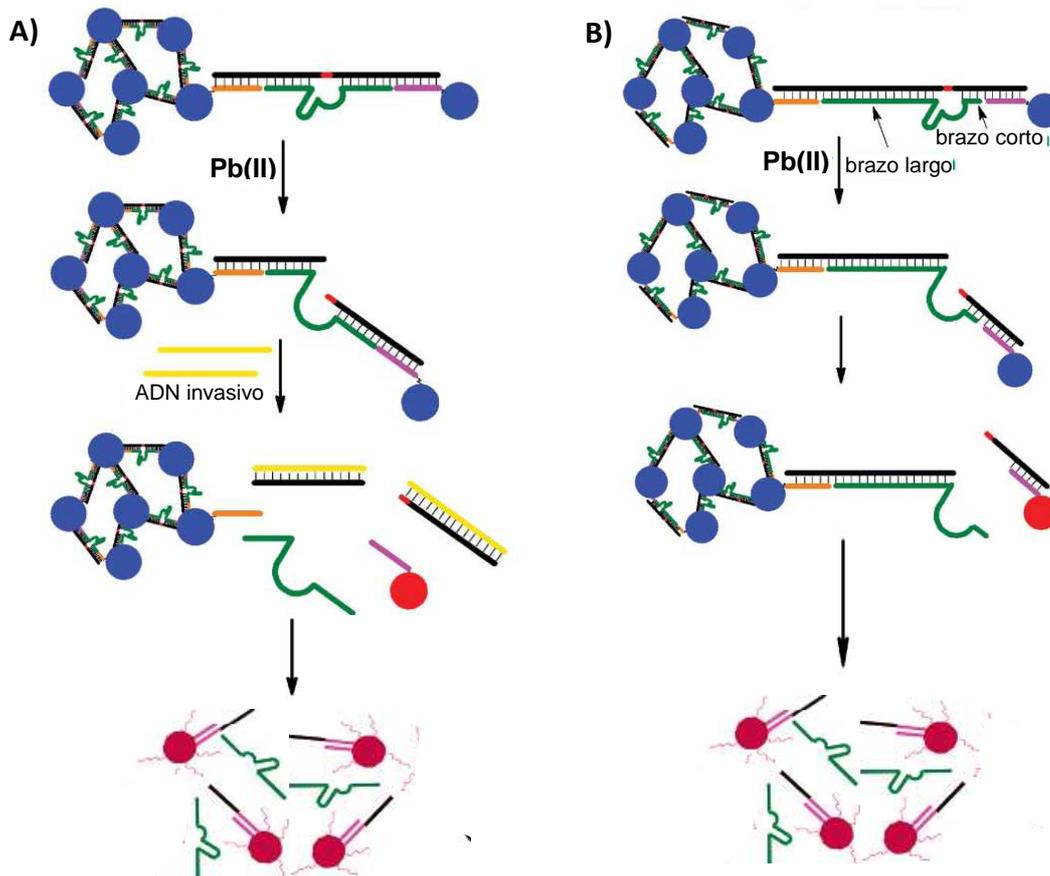


Figura 20: Sensores “light-up”. Tercer y cuarto diseño. A) Esquema del mecanismo de detección del sensor que incorpora ADN “invasivo”. La presencia de esta molécula permite la desagregación del sistema después del clivaje de la hebra sustrato. B) Esquema del mecanismo de detección del sensor con la DNAzima asimétrica. El brazo corto de la DNAzima no logra mantenerse apareado con el sustrato después del clivaje, lo que permite la desagregación del sistema en presencia de Pb(II). Adaptado de Refs. [65] y [66].

3ª GENERACIÓN DEL BIOSENSOR DE Pb(II)

Finalmente, en el tercer sistema desarrollado por Liu y Lu se logró transformar el mecanismo de detección del sensor de “light-down” a “light-up”. Manteniendo la base del segundo diseño, el nuevo sensor consigue que la adición de Pb(II) en el medio de reacción sea la responsable de la separación del agregado de AuNPs-DNAzima. A diferencia de los sistemas anteriores, con este diseño se obtiene un sensor que cambia de color (de azul-violeta a rojo en este caso) en presencia y al momento de interactuar con la diana.

Sin embargo, para que se produzca esta desagregación del sistema se requiere la adición de un nuevo componente: una molécula “invasiva” de ADN. Este oligonucleótido tiene

una secuencia complementaria a los productos de clivaje de la hebra sustrato. Después de producirse la reacción catalizada por la DNAzima sobre el sistema agregado, el ADN “invasivo” forma la doble hebra con los productos de reacción y favorece la desagregación y el cambio de color del sistema (Figura 20a). En ausencia de Pb(II), por más adición de ADN “invasivo” que se realice, no se logra promover la desagregación de las nanopartículas.[65]

4ª GENERACIÓN DEL BIOSENSOR DE Pb(II)

El último sistema descrito hasta ahora mantiene el mecanismo de detección “*light-up*” pero prescinde del ADN “invasivo” utilizado para favorecer y permitir la desagregación del sistema y la liberación de las AuNPs. En este nuevo diseño, la desagregación se puede acelerar e independizar del ADN “invasivo” si se varía la simetría de los brazos de la DNAzima.

La DNAzima original tiene una extensión idéntica de 10 pb desde el centro catalítico hacia los extremos 5' y 3'. Al acortar el brazo 3' a 5 pb y alargar el 5' a 15 pb, la actividad catalítica no se ve alterada, pero se facilita la etapa de desagregación del sistema en presencia de Pb(II) (Figura 20b). En esta nueva optimización también se estudio el efecto de la fuerza iónica del medio, y se demostró que el mejor desempeño del sistema se logra a concentraciones de NaCl de 200 mM.[66]

Hasta ahora, el diseño que incorpora la variante asimétrica de la DNAzima 17E es el sistema que posee las mejores cualidades para ensayos tipo barrido y una eventual aplicación sobre muestras reales. Sin embargo, el artículo donde se reporta este diseño no aclara el límite de detección del sistema ni la respuesta frente a diferentes concentraciones de Pb(II). Esta información, en cambio, sí se reporta para los primeros diseños.

Para el primer sistema con alineamiento “cola-cola”, el sensor prácticamente carece de un rango de detección lineal, o por lo menos, de un intervalo de concentraciones en los que la señal cambia de forma más progresiva. El pasaje del estado agregado al estado desagregado se da de forma abrupta, frente a concentraciones de Pb(II) de alrededor de 0,6 μ M (120 ppb). El mismo límite de detección se ha reportado para el primer diseño con alineamiento “cabeza-cola” y el sistema que incorpora el ADN invasivo.

Esta naturaleza de la señal de detección, definida por el cambio abrupto de color y la ausencia de rango lineal, puede ser útil para ensayos tipo positivo/negativo como los descritos en el primer capítulo. Además, el cambio de la señal se produce a concentraciones similares a los límites de intervención de Pb(II) en sangre establecidos por los diferentes organismos de referencia, lo que en principio podría permitir adaptar el instrumento para análisis de este tipo.

PARTE 2:

DESARROLLO
EXPERIMENTAL

OBJETIVOS

De acuerdo a los antecedentes presentados en el Desarrollo Teórico, la combinación e interacción de nanopartículas de Oro (AuNPs) con la DNAzima 17E permite crear un sensor colorimétrico específico para Plomo. Por otro lado, en Uruguay la contaminación con Plomo es una problemática actual de importancia, y los sistemas y centros de diagnóstico existentes son insuficientes para analizar a toda la población de riesgo. En este contexto, es deseable encontrar alternativas reales que permitan descentralizar el análisis de plumbemia en el país, y el sensor desarrollado por Liu & Lu es una opción potencialmente válida.

Por lo tanto, los objetivos generales propuestos en el presente trabajo son:

- Construir el sensor colorimétrico específico para Pb(II), poner a punto las condiciones del ensayo, y determinar el modo de detección óptimo y los diferentes parámetros del sistema.
- A partir de los resultados de los ensayos con soluciones de referencia, evaluar la viabilidad del sensor y la posibilidad de adaptar el sistema para análisis de plumbemia.

Como objetivos particulares, se plantean:

- Sintetizar nanopartículas de Oro de tamaño y forma definidas, y caracterizarlas por TEM y espectroscopía UV-Visible.
- Evaluar la actividad de la variante de la DNAzima 17E empleada en la construcción del sensor mediante el análisis electroforético en geles de poliacrilamida.

MATERIALES

Reactivos y disoluciones: Todos los reactivos empleados fueron de calidad analítica o superior y fueron utilizados sin posterior purificación: ácido tetracloroáurico trihidratado ($\text{AuHCl}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$, 99,9%, Sigma-Aldrich); citrato de sodio di-hidratado ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, Carlo Ebra, 99%); cloruro de sodio (NaCl , 99%, Anedra); tris-hidroximetil-aminometano, Tris ($(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$); ácido acético (CH_3COOH , 99%, Fluka); ácido sulfúrico (H_2SO_4 , 99.5%, Biopack); ácido nítrico (HNO_3 , 70%, Biopack), Solución estándar de Plomo para AAS, (Pb(II) 1.000g/L como $\text{Pb(NO}_3)_2$, Fluka).

Todas las soluciones fueron preparadas en agua ultrapura (MilliQ, resistividad $> 18.2 \text{M}\Omega\text{cm}$).

Los oligómeros de ADN fueron adquiridos de Biomers (Ulm, Alemania) y purificadas por HPLC por la propia empresa (Tabla 1). Previo al uso, los reactivos de ADN liofilizado se disolvieron en agua ultrapura para obtener soluciones stock de concentraciones de $100 \mu\text{M}$ para la hebra “enzima” y la hebra “sustrato”, y 1mM para las moléculas modificadas con el tiol. Las soluciones empleadas en el estudio electroforético y su composición se detallan en la Tabla 2.

Tabla 1: Oligonucleótidos empleados en el trabajo

Nombre del oligonucleótido	Secuencia (5' a 3')
Oligonucleótido 5' tiolado	GCACACGAGTTGACA - $(\text{CH}_2)_6$ - S
Oligonucleótido 3' tiolado	S - $(\text{CH}_2)_3$ - CGCTGAGTAGACACT
Hebra “enzima”	ACAGACATCTCTTCTCCGAGCCGGACGAAATAGT
Hebra “sustrato”	GCGACTCATCTGTGAACTATrAGGAAGAGATGTCTCTTC TCAACTCGTGTGC

Tabla 2: Soluciones empleadas en el estudio electroforético

Solución	Composición
Buffer de corrida TBE 0.5X	0.045 M Trisborato de Sodio + 0.001 M EDTA, pH = 8
Buffer de carga	0.25% (m/v) Azul de bromofenol + 0.25% (m/v) Xilene cianol + 30% (v/v) Glicerol
Solución fijadora	10% (v/v) Etanol + 0.5% (v/v) Ácido Acético
Solución de tinción	0.2% (m/v) Nitrato de Plata
Solución de revelado	3% (m/v) NaOH + 0.5% (v/v) Formaldehído

Equipos: Las medidas espectrofotométricas se realizaron en un espectrofotómetro UV-Visible-NIR UV-1603 (Shimadzu, Japón). Se emplearon celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico. Aparte, un grupo de medidas espectrofotométricas de la curva de calibración del sensor se realizó en el espectrofotómetro de microvolúmenes ACTGene ASP-3700. Las imágenes de Microscopía de Transmisión Electrónica (TEM) fueron tomadas con el Microscopio JEOL, modelo JEM 1010 (Japón). El tratamiento informático de los datos (espectros de absorción UV-Vis, distribución de tamaños de AuNPs, etc.) se realizó con el programa Microcal Origin 7.0. Para medir el tamaño de las AuNPs se empleó el *software* de edición de imágenes ImageJ.[67]

MÉTODOS

Preparación del material: El material de vidrio empleado en la síntesis de AuNPs fue sumergido en mezcla sulfonítrica, $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HNO}_3$ (1:1 v/v) por al menos 1 h, y luego enjuagado con abundante agua ultrapura. Para el estudio de la actividad de la DNAzima y la construcción del sensor se trabajó casi únicamente con material de plástico descartable.

Síntesis de Nanopartículas de Oro: Se emplea una variante de la técnica reportada por Santoro *et al.* para la síntesis de AuNPs esféricas de aproximadamente 13nm de diámetro.[48] La técnica empleada está basada en el método de síntesis de Turkevich.[37]

En un balón de dos bocas se agregan 0.0195g de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ (45 μ moles de Au) y 50mL de agua ultrapura y se calienta hasta ebullición en un sistema a reflujo. Sobre el sistema a 100°C se agregan 5mL de una disolución fresca de citrato de sodio 38.8mM preparados previamente y se continúa calentando. En esta etapa se observa un rápido cambio de color del sistema desde el amarillo pálido original al rojo intenso, pasando por una etapa intermedia de color negro-azulado. Después del cambio final de color, se mantiene el reflujo durante 15 min más y luego se deja reposar la mezcla de reacción hasta alcanzar temperatura ambiente. Las AuNPs sintetizadas se centrifugan a 10.000 rpm durante 25 min y se resuspenden en agua ultrapura.

Caracterización de las nanopartículas de Oro: Se registra el espectro electrónico entre 400-800nm de las AuNPs obtenidas en la síntesis, y se determina la longitud de onda del máximo del espectro. También se estudia la aditividad de dos propiedades (absorbancia e índice de refracción) para los productos de la síntesis.

A partir de las AuNPs resuspendidas, se mide la absorbancia en el pico de máxima absorción de las siguientes disoluciones en agua ultrapura de la suspensión madre de AuNPs: 100%; 80%; 60%; 40%; 20%; 15%; 10% y 5% (todas v/v).

Actividad de la DNAzima 17E: La evaluación de la actividad catalítica de la DNAzima en presencia de Pb(II) se realiza mediante la detección de los productos de clivaje de la hebra “sustrato” en geles de poliacrilamida en condiciones nativas.

Para evaluar la actividad de la DNAzima se preparan 2 tubos eppendorf (“Reacción” y “Control”) para cargar en el gel. En cada eppendorf se agrega 2 μ L de la hebra “sustrato” 50 μ M, 6 μ L de la hebra “enzima” 50 μ M y 7 μ L de buffer Tris-acetato 25mM pH = 8.0/NaCl 200mM. Se incuban a 80°C durante 1 min y se dejan enfriar hasta temperatura ambiente. Al tubo “Reacción” se agregan 5 μ L de solución acuosa de Pb(II) 500 μ M, y al tubo “Control”, 5 μ L de agua MilliQ. Se dejan reaccionar durante 18 hs y se cargan, en un carril por tubo, 10 μ L de la reacción más 2 μ L de buffer de carga en un gel nativo de poliacrilamida 20%. En dos carriles aparte, se cargan únicamente 2 μ L de hebra “enzima” 50 μ M y 2 μ L de hebra “sustrato” 50 μ M respectivamente. Se dejan correr durante 45 min a 100 V en buffer TBE 0.5X.

Además, se verifica la formación del complejo hebra “enzima” – hebra “sustrato” mediante la detección del sistema bi-molecular empleando las mismas condiciones

electroforéticas. Para ello, en un tubo eppendorf se agrega 5 μ L de buffer Tris-acetato 25mM pH = 8.0/NaCl 200mM, 4 μ L de la hebra “sustrato” 50 μ M, y 2 μ L de la hebra “enzima” 50 μ M. Se incuba a 80°C durante 1 min y se dejan enfriar hasta temperatura ambiente. Se cargan 10 μ L de la solución más 2 μ L de buffer de carga en un gel de poliacrilamida 20%. En dos carriles aparte, se cargan únicamente 2 μ L de hebra “enzima” 50 μ M y 2 μ L de hebra “sustrato” 50 μ M respectivamente. Se dejan correr durante 45 min a 100 V en buffer TBE 0.5X.

Para el revelado de las bandas se realiza la tinción de plata. Primero, el gel de poliacrilamida se sumerge en la solución fijadora y se calienta 30 s en horno de microondas. Luego, se sumerge en la solución de tinción, y se calienta nuevamente 30 s. Por último se enjuaga con agua ultrapura y se sumerge en la solución de revelado hasta aparición de las bandas de la corrida. La reacción se detiene sumergiendo el gel nuevamente en solución fijadora.

Derivatización de las nanopartículas de Oro: A 12mL de una dispersión de AuNPs de absorbancia 1.5 se agregan 60 μ L de ADN 3'-tiolado 1 mM. Después de incubar durante 24 hs se adicionan, gota a gota, 1.2mL de buffer Tris-acetato 0.1 M pH = 8.2/NaCl 1M. Después de una segunda incubación de 48 hs, la solución se centrifuga a 12.000 rpm durante 30 min y se resuspende en buffer Tris-acetato 25mM pH = 8.2/NaCl 0.1 M. La centrifugación/resuspensión se repite 3 veces más para reducir la cantidad de ADN-libre. El mismo procedimiento anterior se repite para el ADN 5'-tiolado. Por último, se registra el espectro electrónico UV-Vis de los dos dispersiones de AuNPs funcionalizadas.

Ensamblado de los componentes del sensor: En un eppendorf de 1.5mL que contiene 230 μ L de buffer Tris-acetato 25mM pH = 8.2/NaCl 0.5 M, se mezclan 100 μ L de la dispersión de AuNPs derivatizadas con ADN 3' de absorbancia 2.0, 100 μ L de la dispersión de AuNPs derivatizadas con ADN 5' de abosrbancia 2.0, 120 μ L de hebra “enzima” 100 μ M y 50 μ L de hebra “sustrato”100 μ M. La mezcla se calienta por 2 min a 80°C y se deja reposar 24 hs. Luego, se centrifuga por 1 min a 1000 rpm. En esta etapa, se observa la rápida precipitación de los agregados de AuNPs de color violeta. El agregado violeta se resuspende en 230 μ L de buffer Tris-acetato 25mM pH = 8.2/NaCl 0.5M. Después, se vuelve a centrifugar/resuspender 3 veces más. La última resuspensión se realiza en un mínimo volumen del buffer original. Por último, se registra el espectro electrónico UV-Visible de los agregados resuspendidos.

Ensayo del sensor y curva de calibración con Plomo: Con el sensor ensamblado y preparado para el análisis de Pb(II) a través de un mecanismo de detección “*light-up*”, se procede a ensayar diferentes concentraciones del metal para obtener una curva de calibración y el límite de detección del sensor.

Se colocan sobre un nylon de Parafilm® 10 μ L de AuNPs agregadas y resuspendidas (sensor ensamblado). Espontáneamente, las AuNPs precipitan sobre el soporte y es posible eliminar el buffer sobrenadante. Después de eliminar la mayor cantidad de solvente, sobre los agregados sólidos se adicionan 10 μ L de solución acuosa de Pb(II) de forma de lograr resuspender los agregados. Para la curva de calibración se ensayaron las siguientes concentraciones de Pb(II): 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 y 20 ppm (1ppm Pb(II) = 5 μ M

Pb(II)). La desagregación del sistema a causa del Pb(II) se analiza visualmente y a través del espectro electrónico UV-visible

Obtención de micrografías por Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM): Se tomaron y analizaron imágenes microscópicas de 3 muestras: 1) AuNPs aisladas sin modificar; 2) AuNPs agregadas por NaCl; 3) AuNPs agregadas por la DNAzima (sensor ensamblado).

Para las muestras 2) y 3) se agregan 100µL de la suspensión sobre una rejilla de cobre de 200 mesh con *film* de formivar y carbono y se deja reposar y decantar el agregado sobre la grilla durante 1 h. Luego, se elimina el excedente de solvente secando la rejilla con papel absorbente y se coloca la grilla en el equipo de medición. Para la muestra 1) se agregan 10µL de muestra de absorbancia 0.5 sobre otra rejilla y se deja reposar hasta lograr evaporar la mayor parte del solvente (aproximadamente 24 hs). Por último, se elimina el agua restante y se coloca la nueva grilla en el equipo de medición. Para las medidas se fija la aceleración de electrones en 100kV.

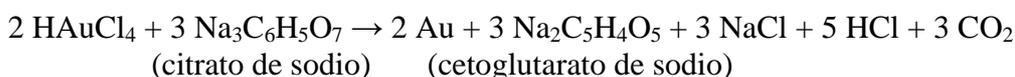
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ORO

El método de síntesis desarrollado por Turkevich en la década de 1950 y refinado por Frens en la década de 1970 permite sintetizar AuNPs cuasiesféricas de diámetro homogéneo.[37-38] El diámetro de los productos va a estar definido por la relación molar “agente reductor / Au(III)” empleada en la reacción.[38] En particular, la técnica empleada en este trabajo fue elaborada para obtener AuNPs de 13nm de diámetro.

El artículo de donde se extrajo el procedimiento no se detiene demasiado en los resultados de la síntesis; solo especifica el tamaño de las AuNPs, (“aproximadamente 13nm”), pero no realiza ningún estudio de la distribución de formas y tamaños.[48]

En el sistema a ebullición, la adición de citrato de sodio reduce a los iones Au(III) de acuerdo a la siguiente reacción:



Los átomos de Oro reducidos por el citrato se asocian para formar las nanopartículas tal como se describe en el Desarrollo Teórico.

El sistema coloidal obtenido de la síntesis es traslúcido y de color rojo intenso, tal como se esperaba de acuerdo a las diferentes referencias consultadas. El espectro electrónico de este sistema tiene un único máximo de absorción bien definido en 520nm, igual al reportado en el artículo de la técnica; la absorción para la dilución empleada es de 0.5244ua (Figura 1). Hacia la derecha de este pico el espectro cae abruptamente, y prácticamente no hay absorción lumínica a longitudes de onda comprendidas entre 650-800nm. Hacia la izquierda existe un mínimo relativo a 431nm (0.3234ua) de aproximadamente 2/3 de altura con respecto al máximo de absorción.

El espectro electrónico obtenido coincide con la forma general planteada para AuNPs esféricas.[48]

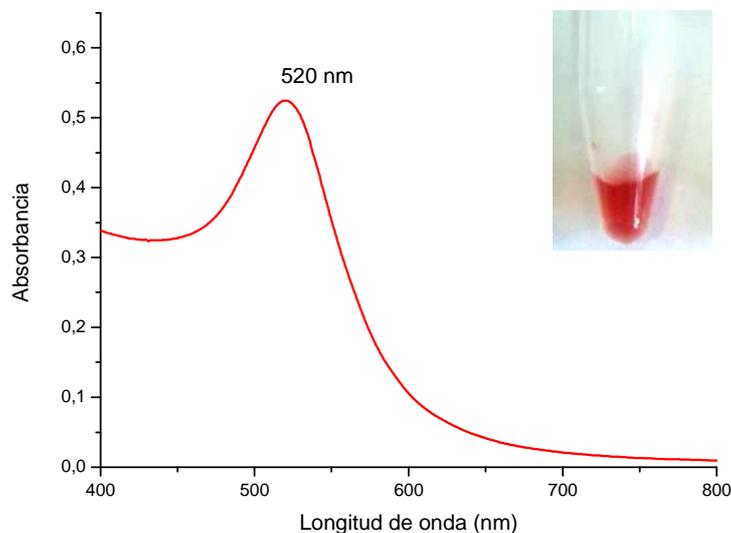


Figura 1: Espectro electrónico en el rango visible y fotografía macroscópica de la suspensión de AuNPs sintetizada. Se indica la longitud de onda del máximo del espectro, 520nm.

El único máximo presente en la gráfica se debe al modo de vibración bipolar, el único modo de vibración del plasmón superficial significativo dentro de la región visible del espectro en nanopartículas esféricas de diámetros tan pequeños.[35]

Una vez definido el máximo de absorción, es posible estudiar la aditividad de esta propiedad al variar la concentración del sistema. Los resultados de este estudio muestran que la absorción a 520nm es una propiedad aditiva para valores por debajo de 1.48ua (30% de AuNPs) (Figura 2). A partir de este punto las limitaciones propias de los fenómenos de absorción en el rango UV-Visible y del espectrofotómetro empleado en el estudio no permiten mantener la aditividad de la propiedad. Como era de esperar, la aditividad en el rango 0-1.48ua sugiere que la concentración de las AuNPs en el solvente no afecta ni tiene relación con el alcance y la forma de los modos de vibración electrónica presentes en las esferas, y responsables de la absorbancia del sistema coloidal.

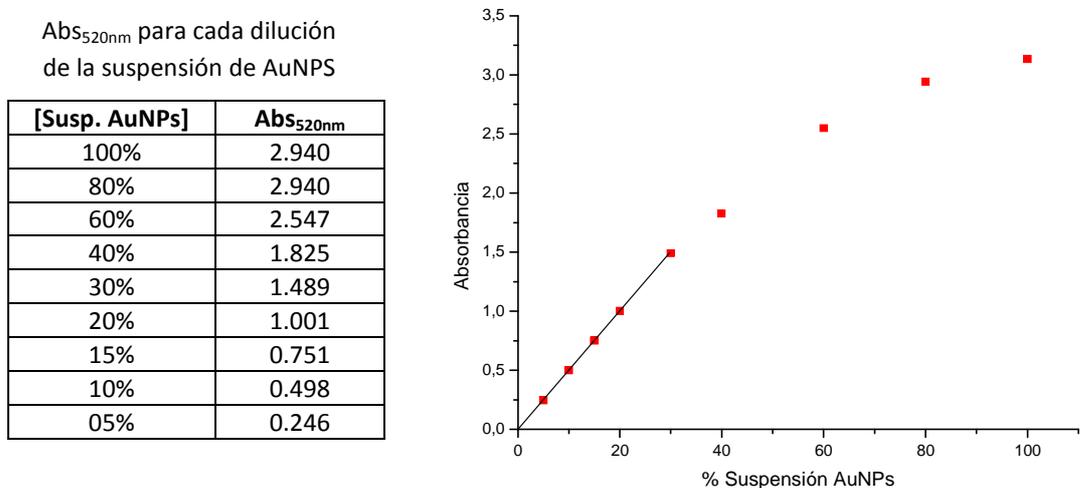


Figura 2: Estudio de la aditividad de la absorbancia a 520nm. En la gráfica de la izquierda se muestra y diferencian claramente las dos regiones de concentración: el rango lineal y aditivo entre 0% y 30%; y el rango no aditivo a partir de 40%.

El diámetro de las AuNPs se determina a través de las micrografías obtenidas por TEM. Las imágenes de las AuNPs aisladas y sin modificar no son tan nítidas y reveladoras como se hubiera deseado, y no permiten realizar las medidas de forma simple pero precisa (Figura 3). La superposición de las AuNPs que se observa en las imágenes se debe más a la forma en que las diferentes partículas fueron depositándose sobre la grilla que a la propia naturaleza del sistema coloidal. Por ejemplo, las micrografías provenientes de una síntesis realizada previamente en otras condiciones a modo de prueba permiten observar mucho más claro a cada una de las nanopartículas aisladas y la ausencia de un patrón que las mantenga formando una única estructura (Figura 4). Por este motivo, para medir el diámetro de las AuNPs utilizadas en la construcción del sensor fue mucho más sencillo trabajar con las imágenes del sensor ensamblado (AuNPs agregadas por la DNAzima).

El rango de diámetros de las AuNPs de la síntesis va desde 12.5nm a 22nm. La distribución de tamaños se ajusta de manera bastante precisa a una distribución normal centrada en 17.7nm (Figura 5). Sin embargo las poblaciones más numerosas se encuentran entre 17.0-17.5nm y 18.0-18.5nm.

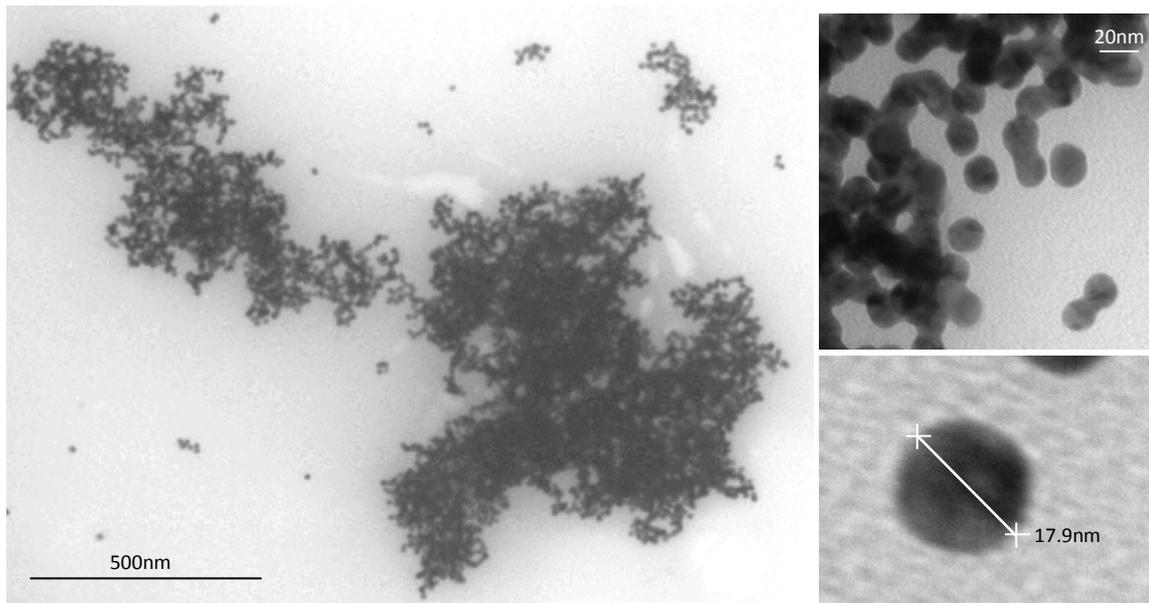


Figura 3: Micrografías de TEM de las AuNPs sintetizadas. Las diferentes imágenes permiten observar la distribución a distintas escalas. En las dos imágenes grupales se advierte una fuerte superposición espacial de las partículas y como esto dificulta la determinación de la distribución de tamaños. De todos modos, la superposición no debe asociarse a las características del sistema coloidal, sino que es resultado de la forma de deposición de las AuNPs en la rejilla del microscopio. Abajo a la izquierda se marca el diámetro de una única nanopartículas esférica.

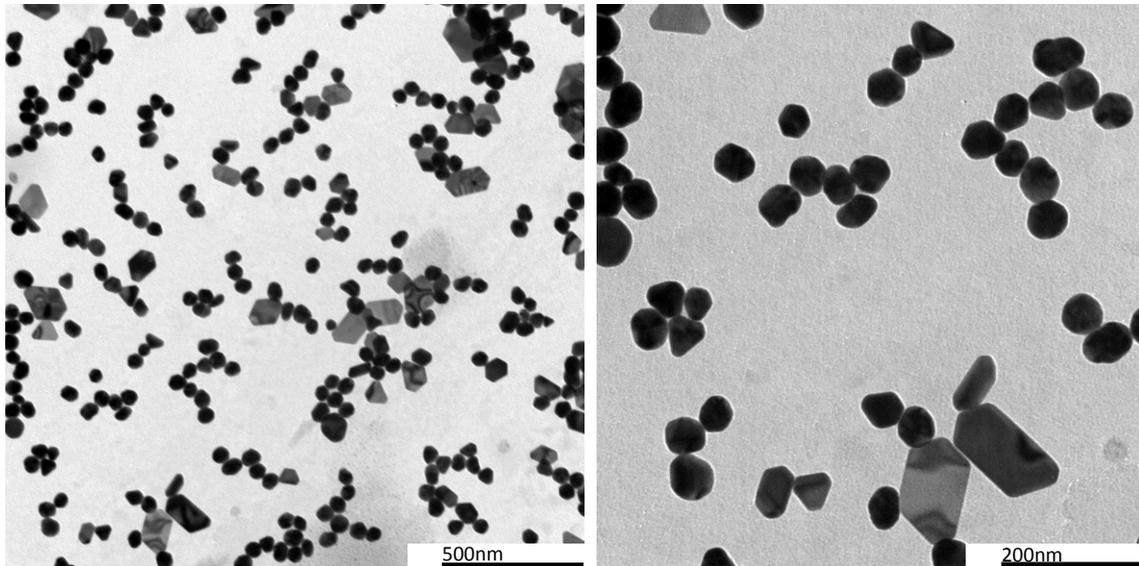


Figura 4: Micrografías de TEM de AuNPs provenientes de una síntesis realizada previamente a modo de prueba. En estas dos imágenes no hay superposición de las partículas y se puede observar mejor la distribución de tamaños y la ausencia de patrones de unión entre ellas. La ausencia de patrones de unión y el aislamiento de las AuNPs en el sistema coloidal son responsables del color rojo intenso de las suspensiones.

La varianza del ajuste normal es de 1.3nm, lo que determina que el diámetro del 95% de las AuNPs está comprendido entre 15.1nm y 20.3nm (dos varianzas en torno a la media). De este resultado se desprende que el diámetro del 95% de las AuNPs varía menos de

15% alrededor del valor medio de 17.7nm. El valor medio de 17.7nm se aleja un par de nanómetros del diámetro esperado según detalla el procedimiento empleado (13nm). Una de las hipótesis para explicar esta diferencia de tamaños está en el diseño del sistema de reacción. El equipo utilizado en nuestra síntesis no permitía la agitación vigorosa y constante del medio de reacción, por ejemplo con una pastilla magnética. Como consecuencia, al momento de agregar el citrato de sodio a la solución de Au(III) la reducción del metal pudo no haberse dado con la misma intensidad ni a la misma velocidad que en la síntesis original. Se ha demostrado que la agitación del medio tiene una fuerte influencia en el tamaño de las AuNPs que se forman durante la síntesis. Por ejemplo, en un estudio realizado por Tabrizi *et al.*, la agitación a diferentes velocidades del medio de reacción permite obtener AuNPs de diámetros que van desde 42nm a 4nm sin variar la relación de concentraciones de citrato y Au(III).[68]

Por otro lado, la dispersión de tamaños también es un poco mayor a la esperada y reportada para este tipo de reacciones. Esta diferencia también se puede atribuir a la ausencia de agitación del medio de reacción.

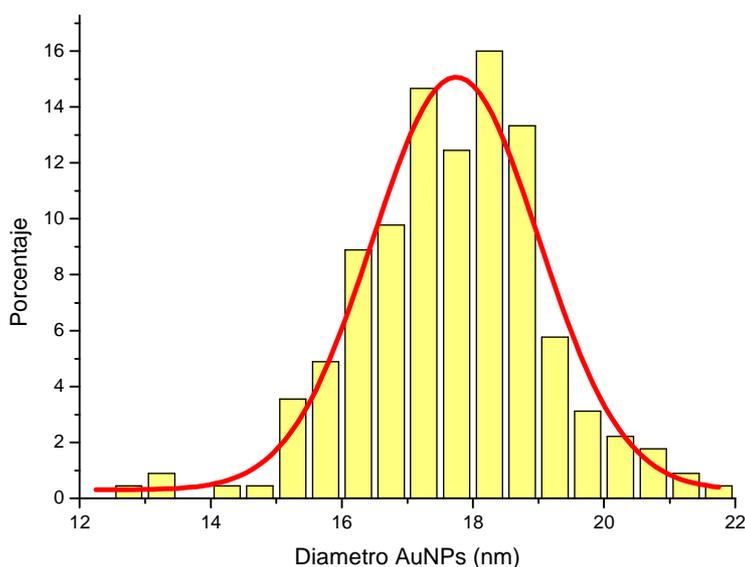


Figura 5: Proporción de tamaños de las AuNPs de la síntesis y ajuste normal de la distribución. En el gráfico las nanopartículas se agrupan en intervalos de 0.5nm. La media y la varianza del ajuste normal son 17.74nm y 1.33nm respectivamente.

La ausencia casi total de partículas no-esféricas también es otro aspecto a destacar. En las micrografías TEM de la síntesis de AuNPs a emplear en la construcción del sensor, la gran mayoría de las nanopartículas observadas son esferas o formas fácilmente asimilables a esferas.¹ Otro pequeño grupo está compuesto por ovoides y nanopartículas irregulares. Pero quizá lo más destacable de la distribución obtenida es que no se distinguen nanopartículas con formas geométricas no-esféricas bien definidas, como

¹ Las nanopartículas observadas en realidad son formas poligonales con muchas caras, y por eso en las imágenes terminan asimilándose a esferas. La presencia de caras cristalinas planas en la superficie no permite definir estas estructuras como esferas perfectas.

este trabajo, y permite calcular el coeficiente de extinción en la zona donde se cumple la aditividad (Figura 6).

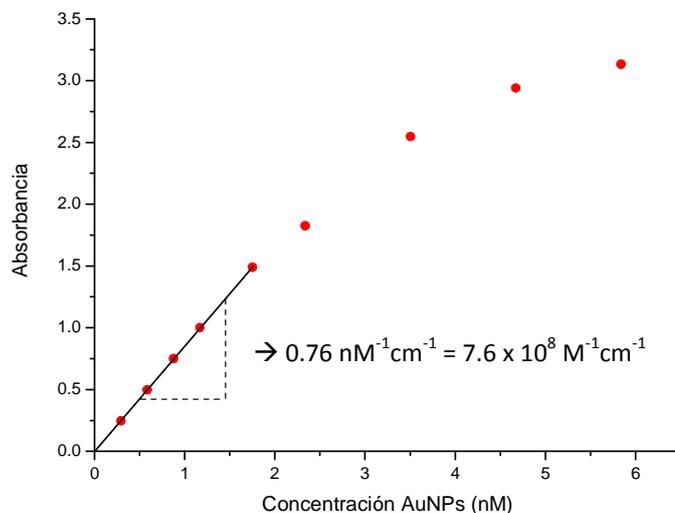


Figura 6: Gráfico de Beer-Lambert para la dispersión de AuNPs de 17.7nm. La pendiente de la recta en el intervalo donde se cumple que la absorbancia es una propiedad aditiva para las AuNPs (0 nM a 2 nM) determina el coeficiente de extinción y vale $7.6 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

La relación entre el tamaño de las AuNPs y el máximo de absorción en el espectro también coincide de forma bastante precisa con los resultados de la bibliografía consultada. En particular, estos dos parámetros pueden relacionarse a través de la ecuación empírica planteada por Khlebstov, y generada a partir de la recopilación de resultados de síntesis de nanopartículas realizadas por diferentes equipos de investigación. A partir de la frecuencia del máximo del plasmón superficial es posible calcular el tamaño promedio de las AuNPs responsables de este resultado. En este caso, al espectro con el máximo ubicado a 520nm le corresponde una suspensión de AuNPs de 16nm de diámetro.[69]

ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DE LA DNAZYMA 17E

Como resultado de las numerosas rondas de selección ensayadas, la variante clásica o simétrica de la DNAzima 17E está altamente optimizada y presenta gran reactividad en presencia de sus cofactores específicos. El clivaje de la hebra “sustrato” de la variante clásica puede darse de forma casi inmediata si las concentraciones de los reactivos y las condiciones del medio son las adecuadas.[56] Pero, al momento de construir el sensor de Pb(II), esta versión de la DNAzima no permite diseñar un instrumento con detección “*light-up*”, cosa que sí sucede con la variante de brazos asimétricos.

Al haber arribado a una variante de la DNAzima sumamente optimizada, la variación de diferentes aspectos del sistema, como la simetría de los brazos de las hebras, puede alterar la funcionalidad y la actividad catalítica. Los brazos de la hebra “enzima” son los responsables de mantener la unión entre la hebra “enzima” y “sustrato” a través del apareamiento de bases de Watson-Crick (Figura 7). En particular, el cambio en la extensión de estas secuencias modifica la energía de unión del sistema y la velocidad de disociación después del clivaje. Cuanto más largo los brazos de la hebra “enzima”, mayor será el número de bases apareadas, y más difícil de desaparecer el complejo entre las dos moléculas. Al emplear la variante asimétrica de la DNAzima, el cambio del factor energético permite la desagregación del sensor sin la necesidad de incubar a 50°C y, como resultado, se genera el sistema de detección “*light-up*”. Sin embargo es deseable y necesario evaluar esta modificación en el largo de los brazos y ver como altera, además de la energía de unión, la actividad de la DNAzima.

En principio, la extensión/compresión de los brazos de la hebra “enzima” no modifica el sitio catalítico ni los nucleótidos esenciales para la actividad. Liu & Lu estudiaron diferentes variantes de la DNAzima asimétrica y demostraron que la actividad se inhibe recién al eliminar al menos 7 nucleótidos del brazo derecho de la DNAzima.[66] El sensor construido en este trabajo incorpora una variante con 4 nucleótidos menos en el brazo derecho y 4 nucleótidos más en el brazo izquierdo (Figura 7).



Figura 7: Secuencias y estructura secundaria de los componentes de A): la variante clásica de la DNAzima 17E y B): la variante asimétrica empleada en el estudio electroforético. Las extensiones en la hebra “sustrato” en los dos extremos de la variante estudiada permiten enlazar a la DNAzima con las AuNPs derivatizadas. El empleo de este diseño es lo que posibilita la construcción del sensor de con detección “*light-up*”.

Sobre este sistema, en primer lugar se verificó mediante un estudio electroforético la formación del complejo entre la hebra “enzima” y la hebra “sustrato” en ausencia del

cofactor de la reacción. La formación de este complejo es indispensable para que se produzca la actividad y el clivaje una vez agregado el ión Pb(II).

En el carril 1 del gel de poliacrilamida en condiciones nativas se cargó la mezcla de hebra “enzima” y hebra “sustrato”; la presencia de la banda por debajo del marcador de peso de 100pb corresponde al complejo entre las dos moléculas (Figura 8). En los carriles adyacentes se observa la banda que corresponde a la “hebra enzima” de 30 bases (carril 2) y a la hebra “sustrato” de 50 bases (carril 3). En el carril del complejo también se revela la banda de la hebra “sustrato” debido a que se encontraba en exceso en relación a la hebra “enzima”.

Un vistazo rápido a las secuencias de las dos moléculas del sistema estudiado indicaba que no debía haber mayores problemas para el apareamiento y la formación de la doble hebra en algunos tramos puntuales de las moléculas. La formación del complejo es el primer paso para lograr el sistema con actividad catalítica. Sin embargo, con el anterior experimento es imposible saber si el complejo formado respeta la estructura secundaria de la DNazima (en particular, el *loop* en el centro de unión a los iones Pb(II)) y presenta la actividad endonucleasa reportada para este sistema.

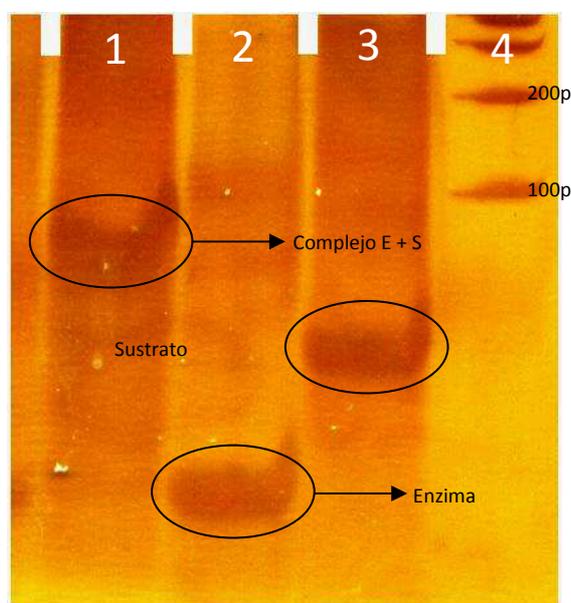


Figura 8: Gel de electroforesis en poliacrilamida 20% en condiciones nativas y revelado con tinción de plata que demuestra la formación del complejo entre la hebra “sustrato” y la hebra “enzima”. Carril 1: hebra “enzima” + hebra “sustrato”, Carril 2: hebra “enzima”, Carril 3: hebra “sustrato”, Carril 4: marcadores de peso molecular. La banda mayoritaria en el carril 1 corresponde al complejo entre las dos secuencias, que migra como una molécula de aprox. 80pb. Abajo, también se observa la banda de la hebra “sustrato” debido a que se encontraba en exceso en relación a la hebra “enzima”. En los carriles 2 y 3 se observan las bandas de la hebra “enzima” y la hebra “sustrato” respectivamente.

Una vez demostrada la formación del complejo, se procedió a evaluar la actividad de la DNazima.

En vista de que se ha reportado que el clivaje de la hebra sustrato se da de forma prácticamente instantánea en presencia de Pb(II) en el entorno de 5µM y fuerza iónica (200mM) y pH (8.0) fácilmente ensayables, los primeros experimentos realizados dejaban reaccionar el sistema por alrededor de solo 20 min en estas condiciones de reacción. Con el complejo de la DNazima ya formado se adicionaba un pequeño volumen de Pb(II), y después de 20 min se detenía la reacción mediante la quelación del metal con EDTA. En estos ensayos no se logró observar los productos de clivaje en los

geles de poliacrilamida; en el gel solo se distinguía una banda que corresponde al sustrato sin clivar, pero ningún producto del corte. De estos resultados se desprende que en estas condiciones de ensayo (fuerza iónica, pH, tiempo de reacción, etc.) no es posible verificar la actividad enzimática.

Manteniendo el tiempo de reacción se procedió a cambiar la concentración de Pb(II), la concentración de la DNAzima, la fuerza iónica y/o el pH sin resultados positivos.

Finalmente, recién al dejar reaccionar el sistema durante 18 hs se logró observar los productos de clivaje en el gel de electroforesis (Figura 9).

La hebra “sustrato” de 50 bases puede clivarse en presencia de Pb(II) en dos moléculas, de 30 y 20 bases. En el carril 1 del gel de poliacrilamida en condiciones nativas (tubo “Reacción” en el procedimiento) se observa una banda tenue hacia el final de la corrida, que correspondería al producto de clivaje de 20 bases. El producto de 30 bases no puede observarse individualmente debido a que se superpone con la banda de la hebra “enzima”, también de 30 bases. En este mismo carril, la marcada presencia de la banda de la hebra “sustrato” a 50 bases indica que el clivaje no fue completo. La banda del producto de clivaje a 20 bases, en cambio, no se observa en el carril 2 (tubo “Control” en el procedimiento). La ausencia de la banda en este carril se puede asociar con la ausencia del cofactor Pb(II) en el medio de reacción. Por lo tanto, sin el cofactor metálico no es posible que se produzca el clivaje de la hebra “sustrato”. Aparte, en los carriles 3 y 4 se observan las bandas que corresponden a la hebra “enzima” y “sustrato” respectivamente. Estas bandas sirven como patrón para identificar las moléculas en los carriles de la reacción.

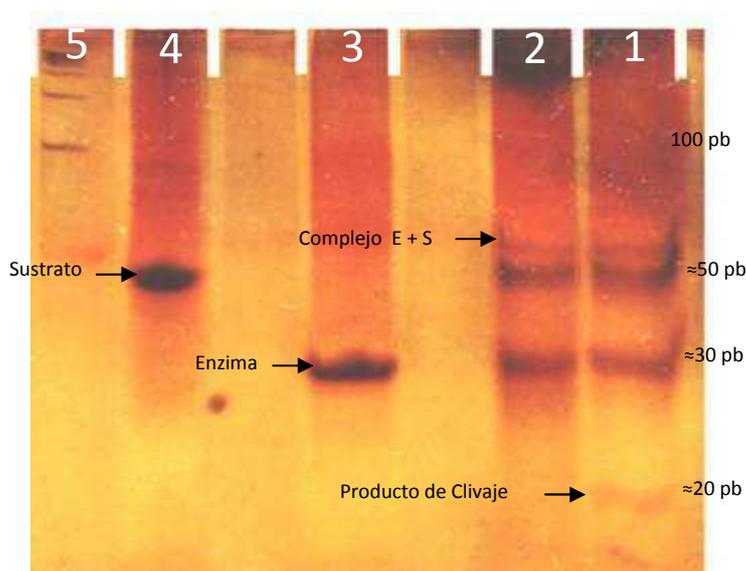


Figura 9: Gel de poliacrilamida al 20% en condiciones nativas revelado con tinción de plata que demuestra la actividad de la DNAzima y el clivaje de la hebra “sustrato” en presencia de Pb(II). El carril 1 corresponde al sistema de reacción que contenía la DNAzima y Pb(II), el cofactor que posibilita el clivaje. Se observan 4 bandas: de mayor a menor tamaño, la banda del complejo “enzima”-“sustrato”, la banda de la hebra “sustrato”, la banda de la hebra “enzima” y la banda de uno de los productos de clivaje. El otro producto de clivaje coincide en tamaño con la hebra “enzima”. El carril 2 corresponde a la solución de DNAzima pero sin Pb(II) adicionado. Se observan las mismas bandas que en el carril 1, salvo por la banda del producto de clivaje. La ausencia de esta molécula de ADN en el carril demuestra que la ausencia del cofactor impide que se produzca la actividad enzimática y el clivaje. En los carriles 3 y 4 se observan las bandas de la hebra “enzima” y la hebra “sustrato” respectivamente.

Con estas condiciones de reacción, se pudo demostrar que la adición de Pb(II) sobre el complejo de la DNAzima 17E genera el clivaje de un pequeño porcentaje de la hebra

“sustrato”. Sin embargo, el tiempo de reacción necesario (18 hs) y el bajo porcentaje de avance revelado se alejan de los resultados esperados y reportados sobre la actividad de esta variante de la DNAzima 17E. En este sentido, puede resultar atractivo realizar un estudio teórico de la estructura secundaria y las propiedades termodinámicas de la DNAzima para ver si ayudan a aclarar el por qué de los problemas observados en la reacción.

El *software* “mfold” permite visualizar las conformaciones más estables de una molécula de ADN y obtener los parámetros termodinámicos asociadas al proceso de formación de esa estructura secundaria.[70] Con los resultados otorgados por el programa, se puede evaluar cómo es esta estructura teórica en relación al planteo previo o qué tan estable son las uniones de las bases de la secuencia.

El programa mfold únicamente genera estructuras secundarias de una molécula simple de ADN. El sistema estudiado, la DNAzima 17E, sin embargo está compuesto por las dos moléculas mencionadas con anterioridad. Para adaptar el complejo de estudio al programa, la hebra “sustrato” y la hebra “enzima” pueden unirse para formar una única molécula, agregando un par de nucleótidos que permitan el “giro” de la secuencia en uno de los extremos. Como estos nucleótidos no pueden formar la doble hebra, no afectan de forma significativa los parámetros termodinámicos del sistema.

El análisis de la estructura secundaria se realizó para dos casos: la variante clásica de la DNAzima 17E y el sistema sobre el que se ensayó la reacción en este trabajo (variante asimétrica con la hebra “sustrato” extendida).

Fijando la concentración de Na^+ en 200mM y la temperatura en 20°C, el programa genera dos conformaciones (uno por cada caso) de estructura secundaria bien definida (Figura 10). Al estudiar las alineaciones calculadas, se puede ver que el *loop* que se forma espontáneamente corresponde de forma exacta al sitio de reconocimiento y unión del cofactor reportado en la bibliografía. En los dos casos, la estructura secundaria más estable del sistema determina la conformación que permite la actividad catalítica.* Este resultado, en principio revela que la conformación más estable en la variante asimétrica no presenta problemas estructurales al momento de unirse al cofactor metálico y provocar la actividad catalítica.

La energía total de Gibbs para la formación de la estructura secundaria y la temperatura de fusión de las dos conformaciones también son bastante similares entre sí.

En principio, estos valores indicarían que el cambio del largo y la simetría de los brazos de la DNAzima no afectan a las propiedades termodinámicas globales del proceso estudiado. Entonces, la diferencia significativa entre las dos variantes debe encontrarse en el ΔG local de cada uno de los brazos. En la DNAzima clásica, cada una de las dos uniones entre la hebra “enzima” y la “sustrato” tiene un ΔG de estabilización local de alrededor de -11 kcal/mol. En cambio, en la variante asimétrica el ΔG local varía entre los dos brazos del sistema; en el brazo largo vale -19.25 kcal/mol y en el brazo corto vale -4.93 kcal/mol. En función del bajo valor relativo del ΔG local, el brazo corto de la variante asimétrica puede gobernar y determinar los procesos de ensamblado, catálisis y desensamblado tanto en la DNAzima libre como en el sensor.[66]

Por un lado, la menor rigidez e intensidad del enlace permite liberar al producto de clivaje generado después de la reacción de manera más sencilla y eficiente. Esta

* El programa también generaba una segunda estructura de ΔG similar. En ella, se mantenía el pliegue global, pero el sitio catalítico se veía ligeramente modificado por el apareamiento de la adenina 10 con la timina 20 en la variante clásica (en la otra DNAzima el apareamiento era entre A15 y T25)

característica del sistema es aprovechada para construir el sensor de detección “*light-up*”. Pero por otro lado, es esta misma naturaleza de la unión la que quizá afecte la formación del *loop* de reconocimiento previo a la reacción debido a que el apareamiento de las hebras puede romperse fácilmente sin la necesidad de cambios energéticos significativos. En particular, este problema resulta más determinante en la DNazyma libre que en el sensor, ya que la mayor libertad del sistema en solución dificulta aún más la formación de la doble hebra en este tramo de las secuencias. En el sensor, en cambio, la mayor rigidez del complejo y la presencia de nuevas interacciones (entre la hebra “sustrato” y el ADN de las derivatizaciones, por ejemplo) quizá colabore para formar estos enlaces. La dificultad para establecer un apareamiento estable puede ser la causa de avance de la reacción llamativamente bajo observado en el gel de poliacrilamida. De todas maneras, en el sensor de Pb(II) existe la posibilidad de que la DNazyma se comporte de manera diferente debido a la presencia de los nuevos componentes que integran el complejo.

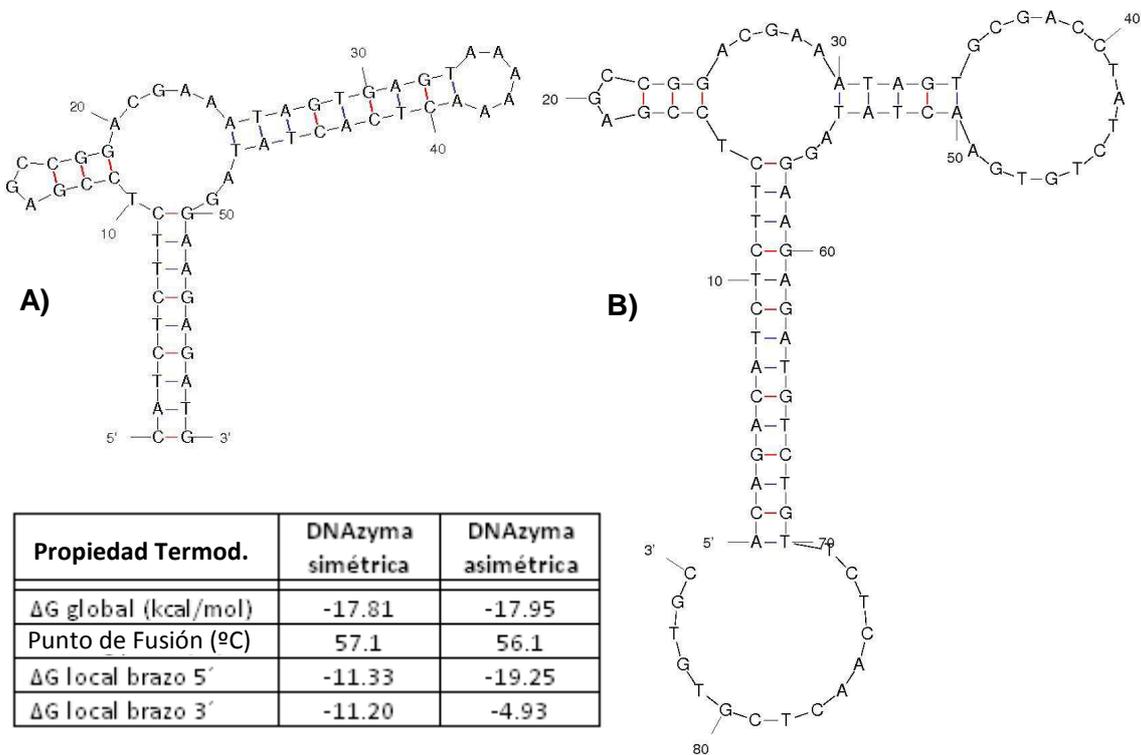


Figura 10: Estructuras secundarias más estables generadas por el software mfold para A): la variante clásica de la DNazyma 17E, y B): la variante asimétrica empleada en el estudio electroforético. En los dos casos, el resultado del programa y en especial el *loop* en la mitad de las secuencias, coinciden con la estructura reportada y que posibilita la actividad del sistema. Para el análisis de la variante clásica, se agregaron 5 adeninas entre el extremo 3' de la hebra “enzima” y el extremo 5' de la hebra “sustrato” para permitir el giro de la secuencia de ADN.

En el recuadro inferior se indican las propiedades termodinámicas calculadas por el *software* para cada una de las estructuras generadas.

DERIVATIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ORO CON LAS MOLÉCULAS DE ADN TIOLADAS.

La derivatización de las AuNPs con las moléculas de ADN modificadas se logra a través de la formación del enlace covalente entre los átomos de Oro de la superficie de la nanopartícula y el átomo de Azufre del extremo de las secuencias. La formación de este enlace se da de manera prácticamente instantánea al entrar en contacto las dos especies, incluso si los grupos tiol se encuentran en un estado de oxidación más elevado formando puentes disulfuro. Una vez establecida la derivatización, la unión de los átomos es sumamente estable y difícil de romper como consecuencia de la elevada energía del enlace entre Oro y Azufre.

La reacción de derivatización tal cual se describe en los Métodos es relativamente sencilla. La mezcla de los dos componentes, AuNPs aisladas y ADN modificado, y el cambio de las condiciones salinas del medio de reacción logran generar fácilmente la unión entre los átomos.

El propio procedimiento, además, permite verificar si se produjo la modificación de las AuNPs de forma efectiva. En el Desarrollo Teórico, se detalló como el cambio de la fuerza iónica por la adición de un electrolito induce la formación de estructuras compuestas por varias nanopartículas. Macroscópicamente, esto se asocia a un cambio de color de la suspensión. En una de las etapas del procedimiento empleado se adiciona NaCl 1M al sistema de reacción. Si las AuNPs no lograron modificarse, el aumento de la fuerza iónica rápidamente induciría la formación de agregados y el cambio de color de la suspensión. Pero en el procedimiento, y tal como se pudo observar en la práctica, el cambio de color no se produce, debido a que la funcionalización de las AuNPs con las moléculas de ADN impide la formación de los agregados por el aumento de la fuerza iónica.

La comparación del espectro electrónico de las AuNPs sin modificar y las modificadas también permite evaluar la unión del ADN. De nuevo, en el Desarrollo Teórico se explicó cómo el patrón de absorción del plasmón superficial de las AuNPs está fuertemente determinado por el entorno cercano de las nanopartículas. En este caso, la modificación covalente podría cambiar, aunque sea de forma mínima, algunos rasgos del espectro electrónico.[48]

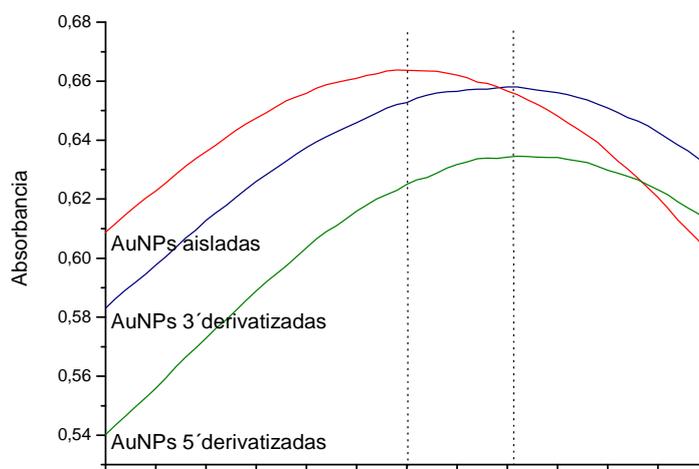


Figura 11: Zoom del espectro electrónico en la zona del máximo de absorción, que permite observar el corrimiento del pico hacia la derecha para las AuNPs funcionalizadas en comparación a las AuNPs aisladas sin funcionalizar. El corrimiento observado es de aprox. 5nm y sirve como evidencia de la modificación del entorno cercano de las nanopartículas.

En el espectro de las AuNPs modificadas, tanto para el ADN tiolado en 5' como para el 3', se observa un corrimiento hacia la derecha del máximo de absorción, que revela un cambio del entorno de las nanopartículas del sistema (Figura 11).

El máximo del espectro también se relaciona con la concentración de las AuNPs funcionalizadas como resultado de la purificación por centrifugación y determina los volúmenes de suspensión a utilizar en la construcción del sensor. De todos modos, la tolerancia a la agregación de la suspensión frente a cambios de la fuerza iónica, y la variación del máximo del espectro no necesariamente deben asociarse a la unión covalente entre el Azufre del ADN y la nanopartícula. Se ha reportado que las moléculas de ADN simple hebra sin modificar también son atraídas por las AuNPs, se unen a ellas por atracciones electrostáticas no covalentes e impiden la formación de agregados por fuerza iónica.[71]

ENSAMBLADO DEL SENSOR

La funcionalización de los dos grupos de AuNPs fue el último paso necesario para comenzar la construcción del sensor. Completada esta etapa, ya disponemos de los cuatro componentes en condiciones de iniciar el ensamblado.

El ADN de las derivatizaciones puede formar la doble hebra con las extensiones en los dos extremos de la secuencia de la hebra “sustrato”. De esta forma, la hebra “sustrato” actúa como “puente” entre las AuNPs derivatizadas, las acerca espacialmente y fija la distancia de separación entre ellas. El nuevo entorno de las AuNPs genera cambios en el perfil del plasmón superficial, que se asocian al cambio de color de la suspensión. También, como consecuencia del gran tamaño, el agregado de AuNPs-DNAzima pierde la estabilidad coloidal propia de las AuNPs aisladas y puede precipitar y centrifugarse más fácilmente.

Después de completada la formación del agregado y las diferentes etapas de purificación por centrifugación, se obtiene una suspensión violeta-azulada, que rápidamente precipita en el fondo del tubo si se deja estabilizar por un par de minutos. El espectro del agregado de AuNPs-DNAzima cambia de forma notoria en comparación al espectro de las AuNPs aisladas (Figura 12). El máximo a 520nm se corre hacia la izquierda y pierde intensidad en relación al piso de absorción del espectro. También, la absorbancia aumenta de forma pareja, sin ningún máximo puntual para longitudes de onda comprendidas entre 650-800nm. El perfil del espectro en esta última zona es consecuencia de la componente de absorción vinculada a las AuNPs agregadas. En particular, se puede tomar el valor de Abs_{700nm} como indicador relativo del monto de AuNPs agregadas, y a través de la relación Abs_{520nm}/Abs_{700nm} determinar el grado de agregación del sistema. Como era de esperar, este cociente resulta mucho mayor para las AuNPs aisladas que para el agregado de AuNPs-DNAzima.

El cambio de color y de perfil del plasmón superficial y la precipitación de estructuras macroscópicas demuestran la existencia de un acercamiento espacial de las AuNPs y la formación de agregados compuestos por varias partículas.

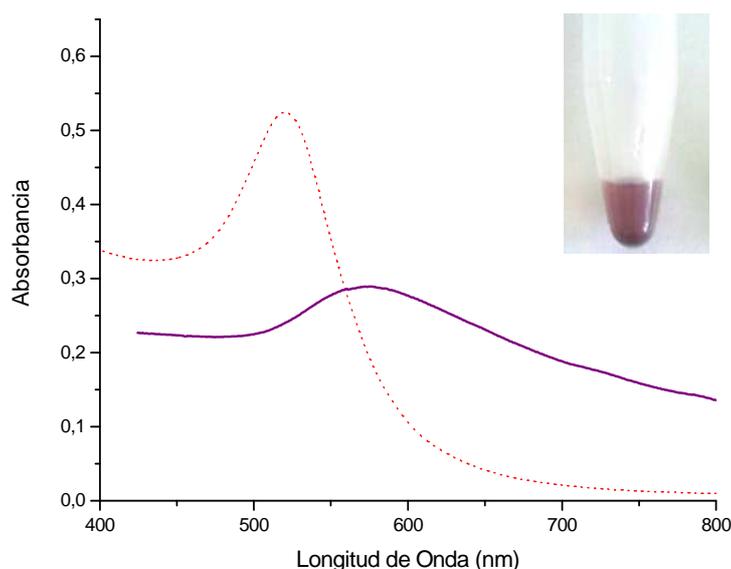


Figura 12: Espectro electrónico en el rango visible y fotografía macroscópica del agregado de AuNPs-DNAzima (violeta). La gráfica roja punteada corresponde al espectro de las AuNPs aisladas.

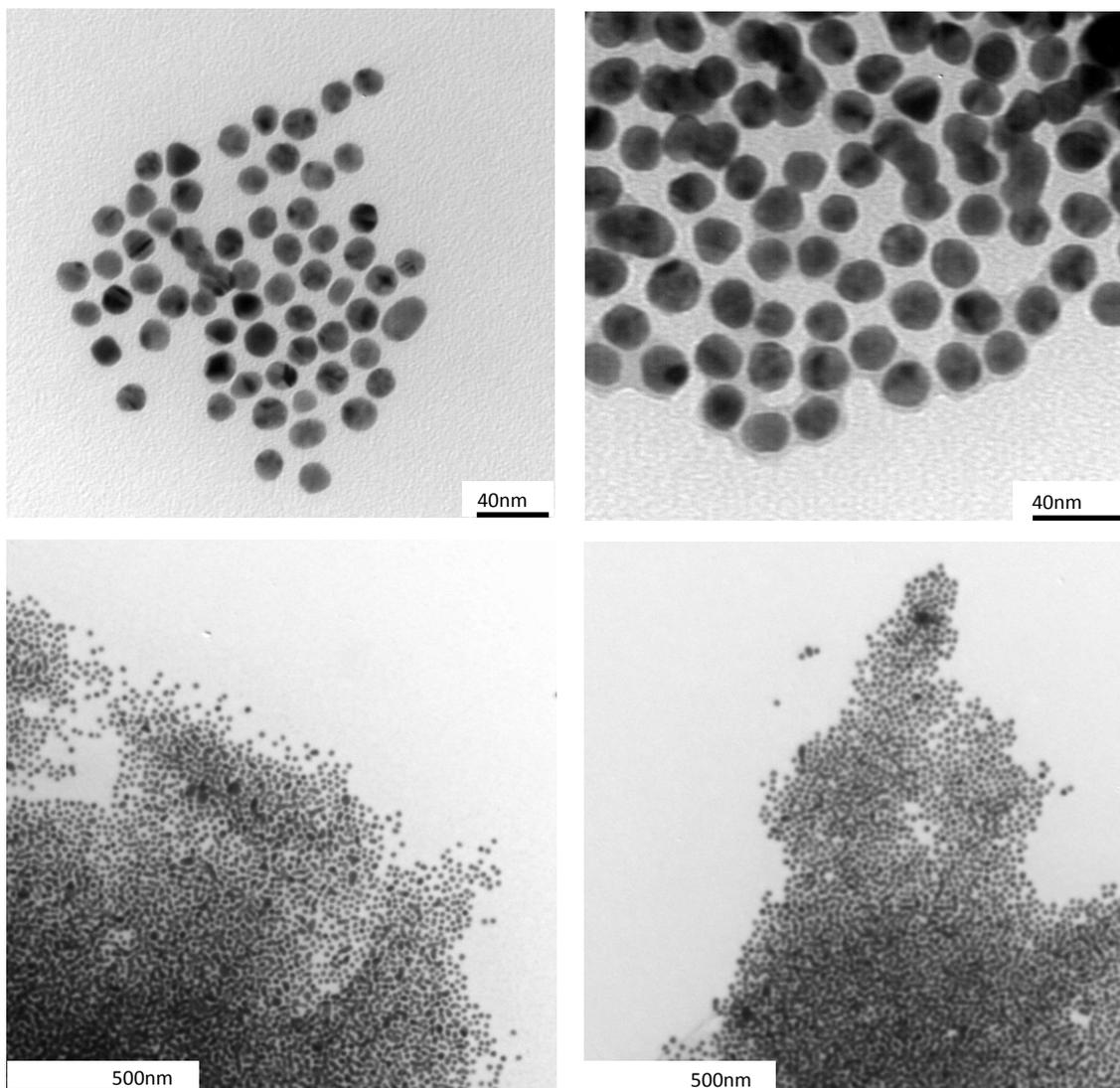


Figura 13: Micrografías de TEM de los agregados AuNPs-DNAzima. Las diferentes imágenes permiten observar el sistema a distintas escalas. La imagen superior izquierda corresponde a un pequeño agregado de apenas un par de decenas de AuNPs. En esta imagen, prácticamente no hay superposición de nanopartículas, y se puede ver como la distancia de unión entre cada una de ellas se mantiene bastante estable. La imagen superior derecha corresponde un extremo de un agregado de mayores proporciones. En las dos imágenes inferiores, el aumento de la escala permite observar el extremo agrupaciones de AuNPs mucho más importantes. En las cuatro micrografías también se ve como las nanopartículas mantienen su identidad esférica a pesar de formar parte de agregados supramoleculares.

Las micrografías de TEM también permiten observar y demostrar la formación de los agregados de AuNPs-DNAzima. En estas micrografías, se observa que las AuNPs forman estructuras compuestas por varias nanopartículas, con un patrón de separación que se mantiene fijo en casi todas las uniones (Figura 13). Hacia el extremo de los agregados, prácticamente no hay superposición ni AuNPs aisladas; todas se ven en un mismo plano, respetando una separación espacial que se repite de forma casi constante. Volviendo al principio de esta sección, en las micrografías de las AuNPs aisladas también se veía uniones entre las partículas (Figura 3), pero no había el patrón de separación estable que se observa en estas imágenes

Sabiendo que el largo de cada nucleótido de ADN es de 0.34nm y que la hebra “sustrato” tiene 51 nucleótidos, la distancia de separación teórica entre las AuNPs, de no existir ningún pliegue adicional, debería ser de alrededor de 17nm. En las imágenes sin embargo, esta distancia es claramente menor. Probablemente, en el “puente” de unión entre las AuNPs la hebra “sustrato” no se encuentra completamente extendida, de forma que la separación entre las nanopartículas se reduce notoriamente.

Otro punto a destacar de las micrografías es que, a pesar del nuevo aspecto observado en el sistema, las AuNPs de los agregados mantienen la identidad geométrica. La agregación por fenómenos de este tipo produce la aproximación en el espacio de las nanopartículas funcionalizadas, pero evita la fusión de estas estructuras en un único cuerpo de mayores dimensiones. En este sentido, resulta interesante comparar las suspensiones y las imágenes obtenidas de estos agregados por ADN con los agregados inducidos por NaCl.

Sobre una suspensión de AuNPs aisladas, la adición de una solución concentrada de NaCl genera cambios macroscópicos inmediatos en el sistema coloidal. La suspensión de AuNPs, antes roja intensa, se vuelve azul en cuestión de segundos. El perfil del espectro electrónico acompaña este cambio de color del sistema (Figura 14).

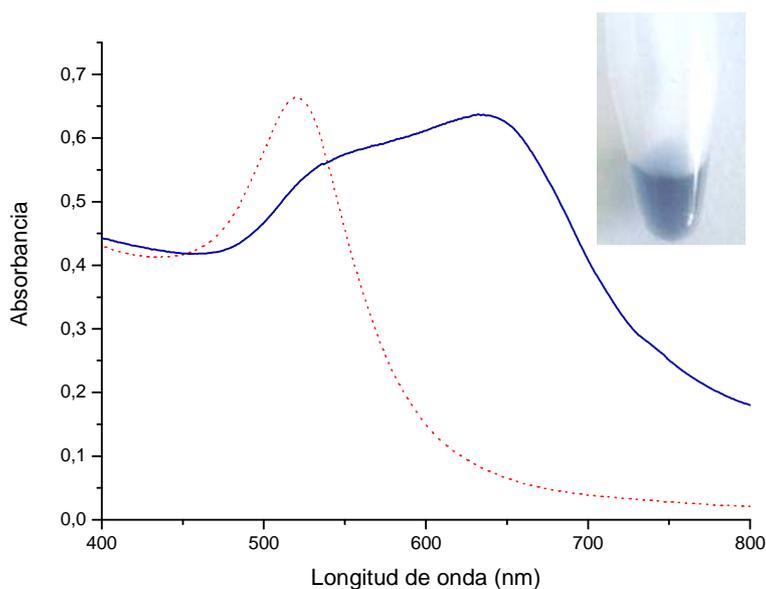


Figura 14: Espectro electrónico en el rango visible y fotografía macroscópica del agregado de AuNPs inducido por NaCl (azul). La gráfica roja punteada corresponde al espectro de las AuNPs aisladas.

Las micrografías de TEM de los agregados inducidos por NaCl revelan que las AuNPs aisladas y esféricas han perdido completamente su identidad y se encuentran fusionadas en una especie de gran red metálica (Figura 15). En este caso, ya no se puede hablar de separación espacial entre las nanopartículas debido al colapso y la fusión de las esferas originales. Al comparar los dos sistemas, AuNPs agregadas por ADN y AuNPs agregadas por NaCl, las diferencias microscópicas entre los dos sistemas son notorias. El estado de agregación se vincula directamente con el color macroscópico de la suspensión. La suspensión de AuNPs aisladas, de color rojo intenso, va volviéndose “más azul” a medida que las esferas se aproximan en el espacio. Las AuNPs funcionalizadas en el complejo con ADN presentan un estado de agregación

“intermedio” y por eso su color violeta. Finalmente, el color azul bien definido en las AuNPs agregadas por NaCl se debe a que ya no hay separación entre las esferas.

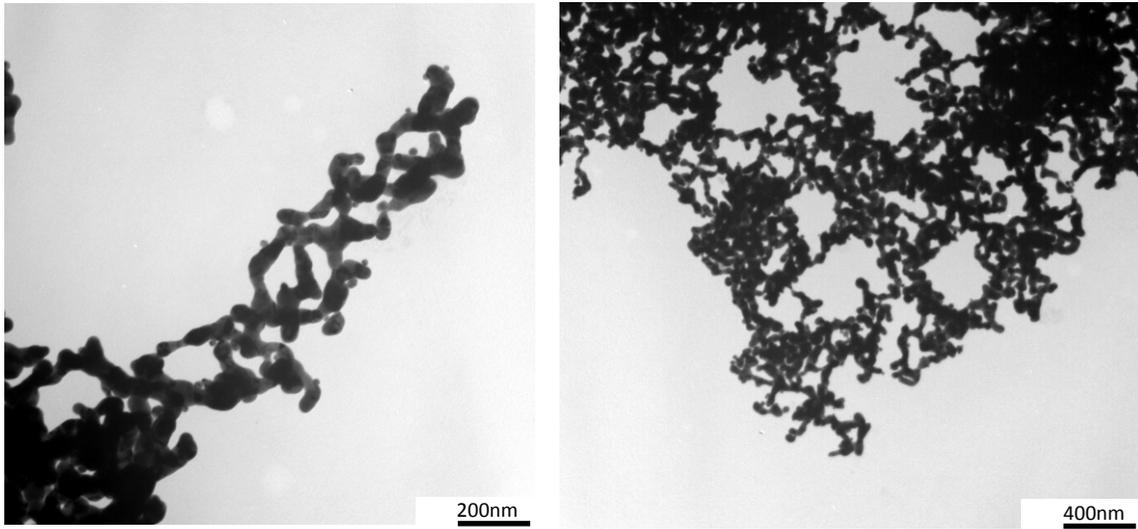


Figura 15: Micrografías de TEM de los agregados AuNPs inducidos por NaCl. En las dos imágenes se observa una estrecha red de nanopartículas, sobre la que resulta imposible distinguir elementos aislados. La adición de NaCl provoca la pérdida de la identidad esférica de las AuNPs y el colapso en una única gran estructura en forma de red.

PUESTA A PUNTO DEL SENSOR Y CURVA DE CALIBRACIÓN

La mezcla de los cuatro componentes del sensor dio lugar a una suspensión violeta, y dentro de ella, un agregado de aspecto sólido que precipita si el sistema se mantiene estático. En principio, esta suspensión puede actuar como un sensor colorimétrico para Pb(II), de acuerdo al mecanismo de detección “*ligh-up*” planteado en el Desarrollo Teórico.

Es así que se ensayaron distintas soluciones acuosas de Pb(II) de varias concentraciones para evaluar la respuesta del sensor y verificar si realmente permite revelar la presencia del ión metálico.

La precipitación espontánea de los agregados AuNPs-DNAzima resultó sumamente beneficiosa a la hora de elaborar el protocolo de uso del sensor. Esta propiedad del sistema permite realizar los ensayos sobre un soporte inerte (Parafilm[®], en este caso). El ensayo realizado de forma directa sobre el agregado AuNPs-DNAzima resulta mucho más ventajoso que trabajar directamente en solución, por ejemplo. La forma de trabajo descrita en los Métodos permite conservar la alta intensidad del color del sensor, ya que, entre el volumen de sobrenadante que se quita y el volumen adicionado de Pb(II), no se realiza una dilución excesiva y se logra mantener el volumen de la solución original.

En una primera serie de medidas se evalúa la respuesta del sensor frente a soluciones de Pb(II) de 0ppm, 1ppm, 3ppm, 6ppm y 10ppm. Aplicando la metodología descrita anteriormente, la adición de la solución sobre el agregado produce un cambio de color inmediato del sistema de detección únicamente en los ensayos de 6ppm y 10ppm. Después de la re-suspensión en la solución del ensayo, el sensor, originalmente violeta-oscuro, se torna rojo intenso indicando la presencia de AuNPs aisladas. (Figura 16) En cambio, esta variación del color no se produce para la solución blanco y las soluciones de Pb(II) de 1ppm y 3ppm. En este caso, al resuspender en el solvente, el agregado mantiene el color violeta original.

La experiencia se repitió varios meses más tarde con reactivos nuevos y un nuevo sensor construido desde cero en iguales condiciones, empleando ahora soluciones de Pb(II) de 0ppm, 2ppm, 4ppm, 8ppm y 20ppm. En este caso, se observan cambios colorimétricos significativos únicamente para las soluciones de 4ppm y 8ppm. En contrapartida, el ensayo con la solución 20ppm produce una reacción inesperada en el sensor, que no se vincula con el mecanismo de detección asociado al instrumento. La adición de la solución de Pb(II) produce la precipitación total del agregado y la formación de un sólido negro imposible de caracterizar en el espectro Uv-Vis. Por lo tanto, resulta imposible aplicar este sistema para concentraciones de Pb(II) de esta magnitud.

A partir de estos resultados, se puede proyectar un primer límite de detección para ensayos colorimétricos a “ojo-desnudo”. De las diferentes soluciones ensayadas, 4ppm es la menor concentración de Pb(II) que logra activar a la DNAzima y producir la desagregación y el cambio de color visible del sensor. Los ensayos realizados con soluciones de menor concentración no logran desensamblar los agregados, y el color del sensor se mantiene idéntico al ensayo sin Plomo.

Para las evaluaciones a “ojo-desnudo” también resulta difícil establecer un rango de detección semi-cuantitativo. El cambio de color observado en los diferentes ensayos con resultados positivos es prácticamente el mismo, y no es posible distinguir de manera sencilla tonos de rojo diferentes en cada una de estas medidas. En este sentido, el sensor diseñado y la metodología aplicada resultan adecuados para un instrumento de detección de resultados positivo/negativo.

El límite de detección estaría fijado en 4ppm de Pb(II), la menor concentración que logra producir el cambio de color del sistema (Figura 16). Además de las características de la señal de transducción, la posibilidad de trabajar sobre soportes inertes y el resultado instantáneo del análisis también son cualidades positivas en vistas de posibles aplicaciones prácticas.

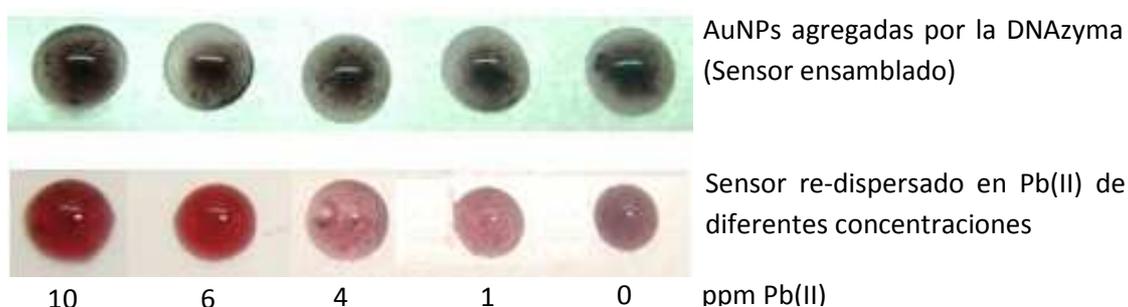


Figura 16: Sensor antes y después de ensayar las soluciones de Pb(II) de la primera serie de medidas. Se observa como el cambio de color, de violeta oscuro a rojo, se produce solamente en los ensayos de 6ppm y 10ppm.

El resultado y el color de cada uno de los ensayos también puede evaluarse a través del espectro electrónico (Figura 17).

En los resultados de la primera serie de medidas se observa claramente como el espectro de los ensayos de 6ppm y 10ppm resultan muy similares al espectro de las AuNPs aisladas (Figura 17a). En comparación al espectro del sensor ensamblado, la adición de Pb(II) corre el máximo de la gráfica hacia la izquierda y gana en intensidad en relación al piso de absorción a longitudes de onda mayores, comprendidas entre 650-800nm. En cambio, el espectro de los ensayos no positivos de 3ppm y 1ppm prácticamente no varía respecto a la medida con la solución blanco.

Aparte, también puede observarse como los espectros de los dos resultados positivos presentan diferencias entre sí. Para el ensayo de 6ppm, la componente del espectro a 700nm (consecuencia de las AuNPs agregadas) es mucho más apreciable que para el ensayo de 10ppm, e indicaría que la desagregación del complejo AuNPs-DNAzima todavía no se dio de forma completa. Esta diferencia se vuelve evidente al calcular el cociente de Abs_{520nm}/Abs_{700nm} , el parámetro utilizado para intuir el grado de agregación del sistema.

El mismo estudio se realiza para la segunda serie de medidas. En este caso, el perfil del espectro de los dos resultados positivos también resulta similar al espectro de las AuNPs aisladas (Figura 17b). Además, en estos dos ensayos se puede ver de nuevo como la Abs_{700} es mayor para el análisis de la solución con menos Pb(II).

A partir de estos resultados, es posible trabajar con el parámetro Abs_{520nm}/Abs_{700nm} utilizado por Liu & Lu para evaluar el grado de desagregación del complejo AuNPs-DNAzima.[27, 63-65] Como se mencionó anteriormente, estas dos longitudes de onda se asocian directamente con las componentes de absorción de las AuNPs aisladas (Abs_{520nm}) y de las AuNPs agregadas (Abs_{700nm}); cuanto más grande la diferencia entre las dos mediciones, caso esperado para un sistema de AuNPs aisladas, más grande también el valor del parámetro de ensayo.

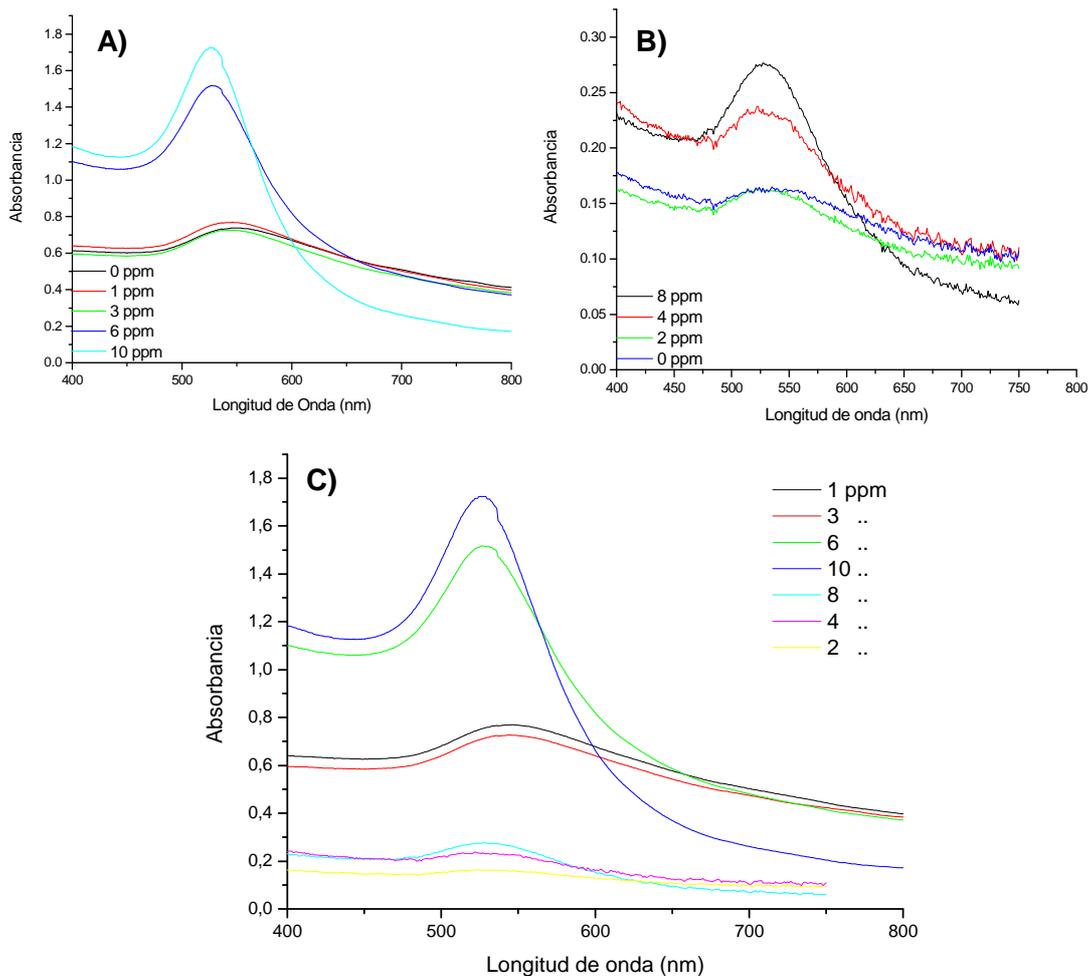


Figura 17: Espectro electrónico de los resultados de A): la primera serie de medidas y B): la segunda serie de medidas (realizadas en el equipo ACTGene ASP-3700). Para la primera serie, los resultados negativos de 1ppm y 3ppm tienen el mismo perfil que el espectro electrónico de la solución blanco. En cambio, en los ensayos con 6ppm y 10ppm el Pb(II) adicionado logra desagregar el complejo AuNPs-DNAzima y el espectro electrónico obtenido se asemeja al de las AuNPs aisladas. Lo mismo sucede con la segunda serie. El ensayo de 2ppm presenta el mismo perfil que la solución blanco, mientras que los ensayos de 4ppm y 8ppm tienen un comportamiento similar al de los resultados positivos anteriores. Los valores de absorbancia absolutos son notoriamente diferentes entre las dos series, como puede notarse en C). Sin embargo, como la absorbancia es una propiedad aditiva para el sistema en estudio (Figura 2), el empleo el cociente Abs_{520nm}/Abs_{700nm} como indicador del estado de agregación entre los diferentes ensayos no precisa de medidas del mismo orden de magnitud.

La gráfica Abs_{520nm}/Abs_{700nm} vs. Concentración de Plomo tiene dos zonas bien diferenciadas (Figura 18). La primera zona va hasta 3ppm, y en ella el parámetro desagregación es prácticamente el mismo para las 4 medidas realizadas, incluida la solución blanco. Estos ensayos eran los resultados no positivos observados en la evaluación a “ojo-desnudo”. La segunda zona comienza con la medida de 4ppm, el límite de detección fijado en la primera etapa. En esta área se produce un aumento sostenido del cociente de absorbancias, que puede asociarse directamente con mayores niveles de desagregación del complejo AuNPs-DNAzima como consecuencia del aumento de la concentración de Pb(II), el cofactor que permite el clivaje. En particular, el valor del

parámetro para el ensayo de 10ppm se encuentra muy cerca del límite de Abs_{520nm}/Abs_{700nm} teórico, que surge del cociente calculado para las AuNPs aisladas previo a la construcción del sensor (el límite teórico surge de asumir que “las AuNPs del sensor no pueden desagregarse aún más que las AuNPs aisladas”).

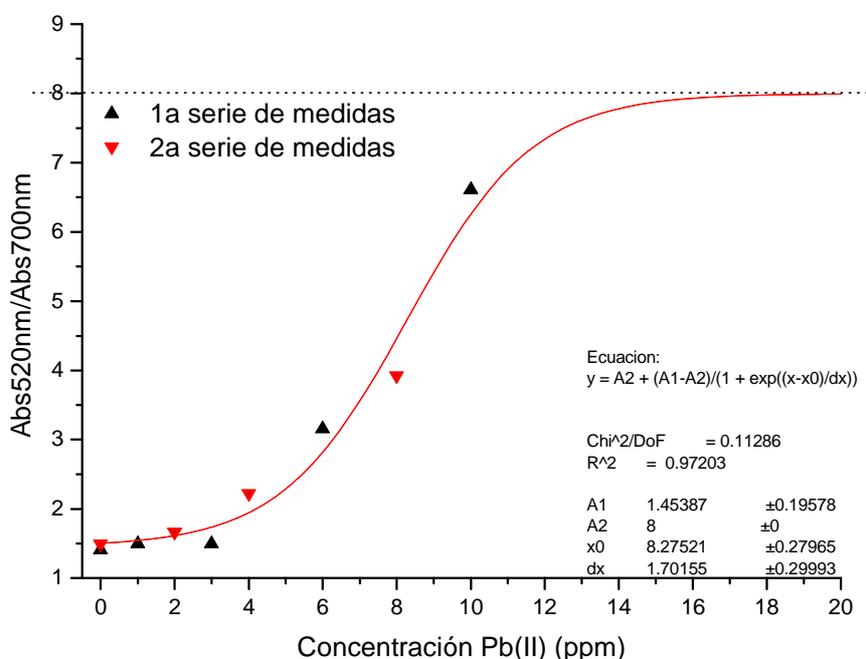


Figura 18: Gráfica Concentración de Pb(II) vs. Abs_{520nm}/Abs_{700nm} y ajuste sigmoideo a los resultados experimentales. Se distinguen las medidas provenientes de las dos series realizadas y se observa cómo se ajustan a una única tendencia a pesar de que sus valores de absorbancia absolutos (Figura 17) son completamente diferentes.

Las dos zonas bien diferenciadas y el límite teórico establecido sirven para realizar un ajuste sigmoideo con los resultados obtenidos en los ensayos. Este tipo de ajuste es el mismo que realizan Liu & Lu en los artículos originales.[27, 63] La zona de transición de la curva se ubica entre 4ppm y 12ppm, y podría utilizarse como indicador de la concentración de Pb(II) para análisis semi-cuantitativos. La estabilización del cociente de absorbancias en este ajuste se lograría para valores por encima de 12ppm. De todas formas, se recuerda que el ensayo de 20ppm no arroja resultados positivos ya que se produce una reacción inesperada entre el complejo AuNPs-DNAzima y el ión metálico.

En resumen, el empleo de AuNPs de 17.7nm de diámetro funcionalizadas con oligómeros de ADN y de una variante asimétrica de la DNAzima 17E permitió construir un sensor colorimétrico para detectar Pb(II) en soluciones acuosas. El sensor funciona sobre un soporte inerte y ofrece resultados inmediatos, cambia de color de violeta oscuro a rojo intenso, para concentraciones de Pb(II) por encima de 4ppm. Para medidas a “ojo-desnudo” el sensor solamente funciona como instrumento en ensayos cualitativos, ya que resulta muy complicado distinguir diferentes tonos de rojo entre los resultados positivos obtenidos. En cambio, empleando el cociente Abs_{520nm}/Abs_{700nm} es posible establecer un rango de detección semi-cualitativo entre 4ppm y 12ppm. Valores de Pb(II) por debajo de 4ppm producen la misma señal que la solución blanco.

PERSPECTIVAS DEL SENSOR PARA ANÁLISIS DE Pb(II) EN SANGRE

¿Es posible adaptar el sistema diseñado para realizar estudios de Plombemia? En principio, el primer gran problema surge al evaluar el límite de detección instrumental. El sensor solo puede detectar concentraciones de Pb(II) por encima de 4ppm, mientras que el límite de intervención de Pb(II) en sangre definido por los organismos internacionales es de 0.1ppm, cifra poco más de un orden por debajo del límite de detección del instrumento. Con el sensor tal como fue diseñado en este trabajo, la diferencia entre los dos límites resulta infranqueable y no sería posible determinar casos de contaminación por Plomo analizando directamente una muestra de sangre cruda.

En la construcción del sensor se esperaba llegar a un límite de detección más bajo, similar a los que obtienen Liu & Lu en las diferentes versiones de sus instrumentos.[27, 63]

Diferentes alternativas se presentan para solucionar este problema del límite de detección. Empleando el mismo sistema construido en este trabajo, se podría trabajar sobre muestras de sangre digeridas y concentradas. Al evaporar todos los componentes volátiles y digerir la materia orgánica, las cenizas resultantes de este proceso contienen todo el Pb(II) de la muestra original y pueden resuspenderse en un volumen de solvente menor, cuestión de aumentar la concentración y alcanzar el límite de detección. Sin embargo, realizar este proceso de digestión aumenta significativamente el tiempo y la complejidad del análisis y además implica desaprovechar varias de las características principales y deseables de los sensores colorimétricos.

Otra alternativa pasa por buscar soluciones que permitan bajar el límite de detección a través de cambios en el diseño del sensor. Por ejemplo, asumiendo que el problema se encuentra en la etapa de desagregación posterior a la adición de Pb(II), se pueden modificar algunos aspectos del sistema, como la relación de enlaces AT sobre CG en la DNAzima o el largo de los oligonucleótidos de las derivatizaciones. Estas modificaciones permiten lograr uniones más lábiles que pueden romperse frente a variaciones de energía menores o quizá menores concentraciones de Pb(II). Además, también se ha estudiado que el aumento del tamaño de las AuNPs puede favorecer algunos aspectos de esta etapa, como la velocidad de desagregación del sistema.[64]

También se desconoce cómo pueden interferir en el ensayo los otros componentes presentes en la sangre. El Pb(II) puede encontrarse de varias formas dentro del torrente sanguíneo (libre en solución, ocupando los sitios de Zn en la enzima ALAD de los eritrocitos, entre otros), y la disponibilidad de cada una de ellas para la reacción de la DNAzima no está estudiada. El color de la sangre para análisis de muestras crudas sin diluir también puede resultar un problema.

Las dos alternativas planteadas conservan el diseño y el mecanismo de detección empleado en este trabajo, pero también puede resultar atractivo investigar sobre otros sistemas de características similares.

Un artículo publicado en 2009 describe un nuevo sensor colorimétrico para detectar Pb(II), también elaborado a partir de AuNPs y la DNAzima 17E.[72] Este nuevo sistema aprovecha las propiedades de unión diferencial entre el ADN simple hebra y doble hebra con las AuNPs, y permite crear un diseño y mecanismo de detección más simple, ya que prescinde de la funcionalización a través del ADN tiolado (Figura 19).

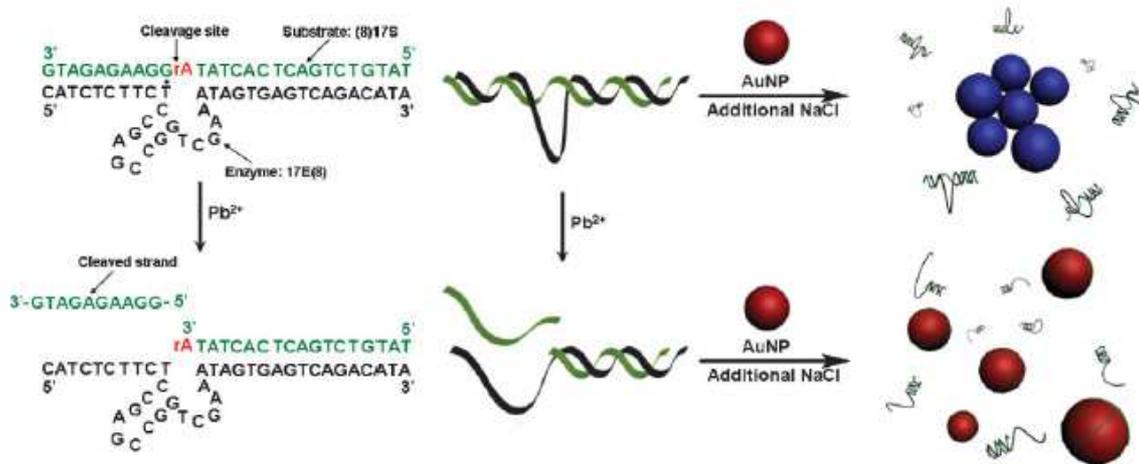


Figura 19: Mecanismo de detección del nuevo sensor. Después del clivaje inducido por el Pb(II), se produce la liberación de una molécula simple hebra de ADN, que se adsorbe en la superficie de las AuNPs. La adición de NaCl al complejo no afecta a las AuNPs adsorbidas con ADN, pero produce la agregación de las AuNPs no tratadas con Pb(II). Adaptado de Ref. [72].

Otro aspecto a evaluar es el costo de cada ensayo. En este sentido, para tener cierta ventaja en futuras aplicaciones reales la alternativa de medición planteada no debe ser más costosa que los métodos de referencia. A partir de los precios de cada uno de los reactivos y de la cantidad que se emplea en cada medida se calcula que el precio de ensayo es de alrededor de € 0.8 (Cuadro 2). Este valor puede compararse con los US\$ 55 que cuesta realizar el análisis actualmente empleando la técnica AAS.

CUADRO 2: DETERMINACIÓN DEL COSTO DE ENSAYO

Precio de los componentes del sensor:

- $\text{HAuCl}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O} \approx 100 \text{ €}$ por 0.5g
- Hebra "enzima" $\approx 30 \text{ €}$ por 0.2 μmoles
- Hebra "sustrato" $\approx 70 \text{ €}$ por 0.2 μmoles
- ADN 5' modificado $\approx 70 \text{ €}$ por 0.2 μmoles
- ADN 3' modificado $\approx 70 \text{ €}$ por 0.2 μmoles

$\text{HAuCl}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ en síntesis 0.0195g $\rightarrow 3.9\text{€}$, sirve para realizar aprox. 5 derivatizaciones

ADN 5' modificado en derivatización 0.06 μmoles $\rightarrow 21\text{€}$, sirve para realizar aprox. 10 ensamblados

ADN 3' modificado en derivatización 0.06 μmoles $\rightarrow 21\text{€}$, sirve para realizar aprox. 10 ensamblados

Hebra "enzima" en ensamblado 0.012 μmoles $\rightarrow 1.8\text{€}$, sirve para 10 ensayos de Pb(II)

Hebra "sustrato" en ensamblado 0.005 μmoles $\rightarrow 1.75\text{€}$, sirve para 10 ensayos de Pb(II)

1 Síntesis de AuNPs permite realizar 10 derivatizaciones. 1 derivatización permite realizar 10 ensamblados. 1 ensamblado permite analizar 10 soluciones de Pb(II)

Costo por ensayo = Costo AuNPs + Costo ADN 5' y 3' + Costo H. "sustrato" + Costo H. "enzima"

Costo por ensayo $\approx 2 \times (3.9\text{€} / (5 \times 10 \times 10)) + 2 \times (21\text{€} / (10 \times 10)) + (1.75\text{€} / 10) + (1.8\text{€} / 10)$

Costo por ensayo $\approx 0.8\text{€}$

CONCLUSIONES

Se logró construir un sensor colorimétrico “positivo/negativo” que funciona sobre soportes inertes y que permite detectar, a simple vista y de forma inmediata, soluciones de Pb(II) con concentraciones iguales o mayores a 4ppm. Para concentraciones de Pb(II) entre 4ppm y 12ppm, el cociente de Abs_{520nm}/Abs_{700nm} podría llegar a ser útil para establecer un rango de análisis “semi-cuantitativo”.

Para poder adaptar el sensor de Pb(II) para análisis de Plombemia es necesario optimizar varios aspectos del sistema. El principal problema en el sensor diseñado surge por la diferencia entre el límite de detección del instrumento y el límite de intervención de Pb(II) en sangre establecido por los organismos de referencia. Sin embargo, las características del ensayo, como la señal colorimétrica o el resultado instantáneo, y el bajo costo relativo por medida son algunas de las ventajas que presenta este sistema y que motivan a continuar el trabajo en este sentido.

BIBLIOGRAFÍA

1. Hulanicki, A., S. Geab, and F. Ingman, *Chemical sensors definitions and classification*. Pure & App. Chem., 1991. **63**(8): p. 1247-1250.
2. Liu, J., Z. Cao, and Y. Lu, *Functional nucleic acid sensors*. Chem. Rev., 2009. **109**: p. 1948-1998.
3. Janata, J., *Priciples of Chemicals Sensors*. 2ª ed. 2009, Nueva York: Springer.
4. Grundler, P. and L. Springer., *Chemical Sensors, An Introduction dor Scientist and Engineers*. 1ª ed. 2007, Leipzig: Springer.
5. Theavenot, D., et al., *Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification*. Pure & App. Chem., 1999. **71**(12): p. 2333-2348.
6. IUPAC. *IUPAC Gold Book - biosensor*. 2011 [cited 2011 25/06]; Available from: <http://goldbook.iupac.org/B00663.html>.
7. Ito, Y. and E. Fukusaki, *DNA as a 'Nanomaterial'*. J. Mol. Cat. B: Enzymatic, 2004. **28**: p. 155-166.
8. Cooper, M., *Label-Free Biosensors*. 1ª ed. 2009, London: Cambridge University Press.
9. Selbst, S., D. Carrasco, and L. Matrai, *Envenenamiento por Plomo en los niños*. Archivos de Pediatría del Uruguay, 2001. **72**(1): p. 1-12.
10. Ascione, I., *Intoxicación por Plomo en pediatría*. Archivos de Pediatría del Uruguay, 2001. **72**(2): p. 1-15.
11. Meikel, H.W., *Lead in the inner cities*. American Scientist, 1999. **87**: p. 62-73.
12. Schutz, A., et al., *Blood Lead in Uruguayan Children and Possible Sources of Exposure*. Enviromental Research, 1997. **74**: p. 17-23.
13. Danza, F. *Contaminación por Plomo*. 2011 [cited 2011 16/06]; Available from: <http://www.smu.org.uy/sindicales/resoluciones/informes/Plomo-0501.html>.
14. Kobus, C., et al., *Intoxicación por Plomo*. Pediatría al día, 1991. **7**(1): p. 148-152.
15. Godwin, H.A., *The biological chemistry of lead*. Current Opinion in Chemical Biology, 2001. **5**: p. 223-227.
16. Hu, H., et al., *The δ -Aminolevulinic Acid Dehydratase (ALAD) Polymorphism and Bone and Blood Lead Levels in Community-Exposed Men: The Normative Aging Study*. Environmental Health Perspectives, 2001. **109**(8): p. 827-832.
17. Ahamed, M., et al., *Environmental lead exposure as a risk for childhood aplastic anemia*. BioScience Trends, 2011. **5**(1): p. 48-53.
18. Espinal, G., et al., *Niveles de Plomo en sangre y rendimiento académico en escolares de 11-14 años de la escuela primaria de la República de Uruguay*. Ciencia y Sociedad, 2007. **32**(1): p. 1-14.
19. Harris, D., *Análisis Químico*. 1ª ed. 1991, Barcelona: Grupo Editorial Iberoamérica.
20. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 18ª ed, Washington: American Public Health Association (A.P.H.A.).
21. *Toxicological Profile for Lead*. 2007, Agency for Toxic Substances and Disease Registry: Atlanta.
22. DINAMA, *Manual de procedimientos analíticos para aguas y efluentes*. 1ª ed. 1996, Montevideo: DINAMA, MVOTMA.
23. NIOSH, *1994e. Method 8003. Lead in blood and urine. NIOSH manual of analytical methods (NMAM)*. 1ª ed, Cincinnati: National Institute for Occupational Safety and Health.
24. Aguilera, Z., R. Fraile, and N. Carrion, *Determination of lead in whole blood by electrothermal atomization atomic absorption spectrometry using tube and platform atomizers and dilution with Triton X-100*. J. Anal. Atom. Spectrom., 1989. **4**: p. 397-400.

25. Zhang, W., G. Zhang, and H. He, *Early health effects and biological monitoring in persons occupationally exposed to tetraethyllead*. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 1994. **65**: p. 395-399.
26. NIOSH, 1994b. *Method 8005. Elements in blood or tissue. NIOSH manual of analytical methods (NMAM)*. 1^a ed, Cincinnati: National Institute for Occupational Safety and Health.
27. Liu, J. and Y. Lu, *A Colorimetric Lead Biosensor Using DNAzyme-Directed Assembly of Gold Nanoparticles*. *J. Am. Chem. Soc.*, 2003. **125**(22): p. 6642–6643.
28. Feldheim, D. and C.F. Jr., *Metal Nanoparticles: Synthesis, Characterization & Applications*. 1^a ed. 2002, Nueva York: Marcel Dekker, Inc.
29. Ali-Mansoori, G., *Principles of Nanotechnology*. 1^a ed. 2004, Nueva York: Springer.
30. Roco, M.C., S. Williams, and P. Alivisatos, *Nanotechnology Research Directions: IWGN Workshop Report - Vision for Nanotechnology R&D in the Next Decade*". 1^a ed. 1999, Maryland: WTEC, Loyola College.
31. Gribbin, J. and M. Gribbin, *Richard Feynman: A Life in Science*. 1^a ed. 1997, Nueva York: Plume.
32. Sardar, R., et al., *Gold Nanoparticles: Past, Present, and Future*. *Langmuir*, 2009. **25**(24): p. 13840–13851.
33. Botasini, S., *Estudio de la Cinética y Estabilidad de Soluciones de Nanopartículas Metálicas Planas*, in *Instituto de Química Biológica*. 2009, Facultad de Ciencias, UdelaR: Montevideo.
34. Kimling, J., et al., *Turkevich Method for Gold Nanoparticle Synthesis Revisited*. *J. Phys. Chem. B*, 2006. **110**(32): p. 15700-15707.
35. Kelly, K.L., et al., *The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment*. *J. Phys. Chem. B*, 2002. **107**(3): p. 668-677.
36. Wilson, R., *The use of gold nanoparticles in diagnostics and detection*. *Chem. Soc. Rev.*, 2008. **37**: p. 2028-2045.
37. Turkevich, J., P.C. Stevenson, and J. Hillier, *A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold* *Discuss. Faraday Soc.*, 1951. **11**: p. 55-75.
38. Frens, G., *Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Solutions*. *Nature Physical Science*, 1973. **241**(1): p. 20-22.
39. Ji, X., et al., *Size Control of Gold Nanocrystals in Citrate Reduction: The Third Role of Citrate*. *J. Am. Chem. Soc.*, 2008. **129**(45): p. 13939-13948.
40. Yguerabide, J. and E.E. Yguerabide, *Light-Scattering Submicroscopic Particles as Highly Fluorescent Analogs and Their Use as Tracer Labels in Clinical and Biological Applications*. *Anal. Biochem.*, 1998. **262**: p. 137-156.
41. Haiss, W., et al., *Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from UV-Vis Spectra*. *Anal. Chem*, 2007. **79**: p. 4215-4221.
42. Nano-Optical-Materials, N.O.M. *Colloidal Gold*. [cited 2011 02/10]; Available from: <http://www.nanoopticalmaterials.com/archives/986>.
43. Murray, C.B. and C.R. Kagan, *Synthesis and characterization of Monodisperse Nanocrystals and Close-packed Nanocrystal Assemblies*. *Annu. Rev. Mater. Sci.*, 2000. **30**: p. 545-610.
44. Pong, B.-K., et al., *New Insights on the Nanoparticle Growth Mechanism in the Citrate Reduction of Gold(III) Salt: Formation of the Au Nanowire Intermediate and Its Nonlinear Optical Properties*. *J. Phys. Chem. C*, 2007. **111**: p. 6281-6287.
45. Chow, M.K. and C.F. Zukoski, *Gold sol formation mechanisms: role of colloidal stability*. *J. Col. & Interf. Sci.*, 1994. **165**(1): p. 97-109.
46. Daniel, M.-C. and D. Astruc, *Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology*. *Chem. Rev.*, 2004. **104**: p. 293-346.

47. Nagarajan, R., *Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Passivation, and Functionalization*, in *Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Passivation, and Functionalization*, A.C. Society, Editor. 2008: Washington. p. 2-15.
48. Storhoff, J.J., et al., *One-Pot Colorimetric Differentiation of Polynucleotides with Single Base Imperfections Using Gold Nanoparticle Probes*. *J. Am. Chem. Soc.*, 1998. **120**: p. 1959-1964.
49. Lu, Y. and J. Liu, *Functional DNA nanotechnology: emerging applications of DNAzymes and aptamers*. *Current Opinion in Biotechnology*, 2006. **17**: p. 580–558.
50. Wang, H., et al., *Nucleic Acid Conjugated Nanomaterials for Enhanced Molecular Recognition*. *Am. Chem. Soc. Nano*, 2009. **3**(9): p. 2451–2460.
51. Elghanian, R., et al., *Selective Colorimetric Detection of Polynucleotides Based on the Distance-Dependent Optical Properties of Gold Nanoparticles*. *Science*, 1997. **27**(August): p. 1078-1081.
52. Seeman, N.C., *DNA in a material world*. *Nature*, 2003. **421**(6921): p. 427–431.
53. Keren, K., et al., *DNA-Templated Carbon Nanotube Field-Effect Transistor*. *Nature*, 2003. **302**(5649): p. 1380-1382
54. Klussmann, S., *The Aptamer Handbook Functional Oligonucleotides and Their Applications*. 1st ed. 2006, Berlin: Wiley-VCH.
55. Breaker, R. and G. Joyce, *A DNA enzyme that cleaves RNA*. *Chem Biol*, 1994. **1**: p. 223-229.
56. Cao, Z. and Y. Lu, *New Metallo-DNAzymes: Fundamental Studies of Metal–DNA Interactions and Metal Sensing Applications*, in *Metal Complex–DNA Interactions*, Wiley, Editor. 2009: Wiltshire. p. 395-414.
57. Santoro, S. and G. Joyce, *A general purpose RNA-cleaving DNA enzyme*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997. **94**: p. 4262–4266.
58. Brown, A.K., et al., *A Lead-Dependent DNAzyme with a Two-Step Mechanism*. *Biochemistry*, 2003. **42**: p. 7152-7161.
59. Breaker, R. and G. Joyce, *A DNA enzyme with Mg²⁺-dependent RNA phosphoesterase activity*. *Chemistry & Biology*, 1995. **2**: p. 655-660.
60. Kim, H., et al., *Dissecting metal ion–dependent folding and catalysis of a single DNAzyme*. *Nature Chem. Biol.*, 2007. **3**(12): p. 763-768.
61. Liu, Y. and D. Sen, *Local Rather than Global Folding Enables the Lead-dependent Activity of the 8-17 Deoxyribozyme: Evidence from Contact Photo-crosslinking*. *J. Mol. Biol.*, 2010. **395**: p. 234–241.
62. Li, J. and Y. Lu, *A Highly Sensitive and Selective Catalytic DNA Biosensor for Lead Ions*. *J. Am. Chem. Soc.*, 2000. **122**(42): p. 10466–10467.
63. Liu, J. and Y. Lu, *Optimization of a Pb²⁺-Directed Gold Nanoparticle/DNAzyme Assembly and Its Application as a Colorimetric Biosensor for Pb²⁺*. *Chem. Mater.*, 2004. **16**: p. 3231-3238.
64. Liu, J. and Y. Lu, *Accelerated Color Change of Gold Nanoparticles Assembled by DNAzymes for Simple and Fast Colorimetric Pb²⁺ Detection*. *J. Am. Chem. Soc.*, 2004. **126**: p. 12298-12305.
65. Liu, J. and Y. Lu, *Stimuli-Responsive Disassembly of Nanoparticle Aggregates for Light-Up Colorimetric Sensing*. *J. Am. Chem. Soc.*, 2005. **127**: p. 12677-12683.
66. Liu, J. and Y. Lu, *Design of asymmetric DNAzymes for dynamic control of nanoparticle aggregation states in response to chemical stimuli*. *Org. Biomol. Chem.*, 2006. **4**: p. 3435–3441.
67. Rasband, W., *ImageJ version 1.30v*, U.S. National Institute of Health: Bethesda, MD.
68. Tabrizi, A., F. Ayhan, and H. Ayhan, *Gold Nanoparticle Synthesis and Characterisation*. *Hacettepe J. Biol. & Chem.*, 2009. **37**(3): p. 217-226.
69. Khlebtsov, N.G., *Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from Extinction Spectra*. *Anal. Chem.*, 2008. **80**: p. 6620–6662.

70. Zuker, M., *mfold v3.5*, The RNA Institute: University at Albany, NY.
71. Li, H.X. and L.J. Rothberg, *Colorimetric detection of DNA sequences based on electrostatic interactions with unmodified gold nanoparticles*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2004. **101**: p. 14036-14039.
72. Wang, Z., J.H. Lee, and Y. Lu, *Label-Free Colorimetric Detection of Lead Ions with a Nanomolar Detection Limit and Tunable Dynamic Range by using Gold Nanoparticles and DNAzyme*. Adv. Mater., 2008. **20**: p. 3263-3267.