

Actividad peroxidasa en nanopartículas de ferrita de manganeso $MnFe_2O_4$

V. Figueroa-Espí^a, A. Alvarez-Paneque^a, A. J. Otero-González^b y E. Reguera^a

a) Instituto de Ciencia y Tecnología de Materiales, Universidad de La Habana, Cuba; vivianafe@imre.oc.uh.cu[†]

b) Centro de Estudios de Proteínas, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba

[†] Autor para la correspondencia

Recibido el 9/04/2009. Aprobado en versión final el 19/06/09.

Sumario. Se estudió la actividad peroxidasa intrínseca de nanopartículas (NPs) magnéticas de $MnFe_2O_4$ (27,5 nm), en presencia de diferentes sustratos de la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP). Las nanopartículas de $MnFe_2O_4$ se obtuvieron mediante el método de microemulsión en micelas inversas en el sistema agua/tolueno. Las muestras fueron caracterizadas por difracción de rayos X y microscopía de electrónica de transmisión. La actividad observada para las nanopartículas de $MnFe_2O_4$ resultó ser dependiente tanto del pH como de la concentración de H_2O_2 .

Abstract. The intrinsic peroxidase-like activity of $MnFe_2O_4$ magnetic nanoparticles (27,5 nm), using three different substrates and peroxidase enzyme, was studied. The magnetic $MnFe_2O_4$ nanoparticles were prepared by the reverse micelle method. The size distribution of these NPs was characterized from X-ray diffraction and transmission electron microscopy data. The observed peroxidase-like activity of $MnFe_2O_4$ nanoparticles was found to be dependent on the used pH and the H_2O_2 concentration.

Palabras clave. Chemical synthesis nanofabrication 81.16.Be, Electron microscopy in observations of crystal defects, 61.72.Ff, Powder diffraction x-ray, 61.05.cp

1 Introducción

Dentro de los diferentes tipos de nanomateriales, las nanopartículas (NPs) magnéticas presentan una atención especial, debido a sus aplicaciones en Biomedicina como agentes de contraste en Imagenología por Resonancia Magnética (MRI)¹, en técnicas de separación de moléculas² y en la muerte por hipertermia de células tumorales³ así como otras aplicaciones potenciales.⁴

Por lo general se considera que las nanopartículas de óxidos de hierro son química y biológicamente inertes, lo que constituye una de las razones por las que son empleadas en imagenología y técnicas de separación. Por tal motivo se ha hecho necesario recubrirlas con metales catalíticamente activos o conjugarlas con enzimas para

combinar sus propiedades magnéticas con la actividad del metal o la enzima, de manera que se obtengan nanoconjugados bifuncionales.⁵ Recientemente un grupo de investigadores de la universidad de Tokio, demostró que las nanopartículas de Fe_3O_4 presentan actividad peroxidasa intrínseca.⁶

Las enzimas peroxidases catalizan reacciones bisustrato de carácter redox, utilizando un peróxido como oxidante, y un segundo sustrato de característica reductora que es oxidado por el peróxido.⁷ En vegetales es de destacar a la peroxidasa de rábano (horseradish peroxidase, HRP), que es ampliamente usada en técnicas inmunológicas e inmunoensayos para el diagnóstico clínico, debido a su facilidad de conjugación con anticuerpos y a su sencillez para detectarla por métodos colorimétricos y fluorimétricos.⁸

La obtención de sistemas que mimetizan la actividad enzimática resulta de gran interés en Bioquímica Clínica, debido al elevado costo de producción y la poca estabilidad de las enzimas.

En esta contribución se reportan los resultados de un estudio orientado a evaluar la actividad peroxidasa de NPs de $MnFe_2O_4$ sin ningún tratamiento previo de funcionalización.

2 Parte experimental

Las NPs de $MnFe_2O_4$ a estudiar se obtuvieron empleando el método de microemulsión en micelas inversas en el sistema agua/tolueno, según un procedimiento ya descrito.⁹ Las muestras obtenidas se caracterizaron mediante difracción de rayos X (DRX) y microscopía electrónica de transmisión (MET). Los patrones de DRX se registraron con radiación CuK_{α} en un equipo D8 Advance (Bruker) con monocromador secundario. Las imágenes de MET se obtuvieron con un microscopio JEOL 4000-EX operado a 400 kV. Sobre rejillas de Cu de 200 mesh recubiertas de una fina capa de grafito se depositó una suspensión de las NPs a estudiar. El mismo equipamiento y condiciones experimentales fueron usados para obtener los patrones de difracción de electrones de determinada área seleccionada.

Para el análisis de la actividad se usaron 3 sustratos diferentes de la enzima:

- diazoaminobenceno (DAB) en buffer 0,05 M Tris-HCl, 0,15 M NaCl, pH 7.5
- o-fenilendiamina (OPD) en buffer de $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 0,2 mol/L y 0,1 mol/L de ácido cítrico
- 3,3,5,5 tetrametilbencidina (TMB) en NaAc 0,2 M y pH 3,5.

Se usaron 20 μg de NPs, en 500 μL de buffer, con 800 μM de sustrato y la concentración de H_2O_2 fue 530 mM. La reacción se detuvo con H_2SO_4 2 mol/L, y se registró la absorbancia a 492 nm para el OPD y a 452 nm para el TMB. Todos los reactivos empleados son de Sigma, grado analítico.

3 Resultados y discusión

La figura 1 muestra el patrón de DRX característico de las muestras de $MnFe_2O_4$ cuya actividad peroxidasa fue evaluada. Ese patrón corresponde a la celda unitaria cúbica centrada en las caras (*fcc*), propia de la estructura de espinela en la cual cristaliza esta ferrita. A partir del semi-ancho de los picos a su semi-altura y empleando la fórmula de Scherrer¹⁰ se pudo estimar que el tamaño de cristalita era de unos 27.5 nm.

En la figura 2 aparece una imagen típica de MET de este sistema de partículas donde se pueden distinguir con claridad sus planos atómicos. La asignación de esas imágenes al material estudiado se realizó con ayuda del patrón de difracción de electrones de área seleccionada, el cual corresponde a la misma fase cúbica identificada por DRX. De acuerdo a las imágenes de TEM las mues-

tras se componen de una distribución de partículas de varios tamaños donde el valor de 27.5 nm, estimado por DRX se encuentra por debajo del valor medio.

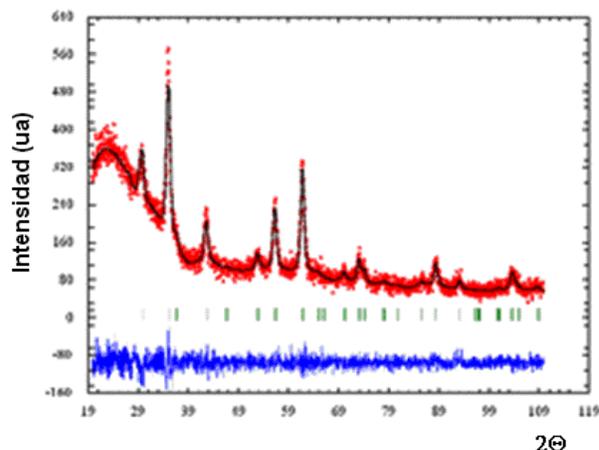
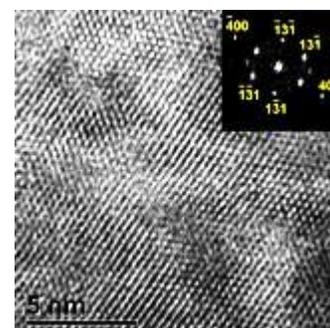


Figura 1. Ajuste final del perfil total de DRX por el método de Le Bail para nanopartículas de $MnFe_2O_4$. El tamaño estimado por la fórmula de Scherrer fue de 27,5 nm.

Figura 2. Micrografía de microscopía electrónica de transmisión de nanocristales de $MnFe_2O_4$ correspondiente a una red cúbica centrada en las caras (*fcc*). Insertado se muestra la transformada rápida de Fourier (FFT) de la imagen de alta resolución a lo largo del eje de zona [013], el cual corresponde a una red cúbica centrada en las caras (*fcc*).



Las NPs de $MnFe_2O_4$ estudiadas presentaron actividad peroxidasa, catalizando la oxidación de los 3 sustratos estudiados. En la figura 3 se muestran los mismos cambios que se producen en la coloración de cada reacción si se empleara la enzima HRP, en dependencia del sustrato oxidado.⁶

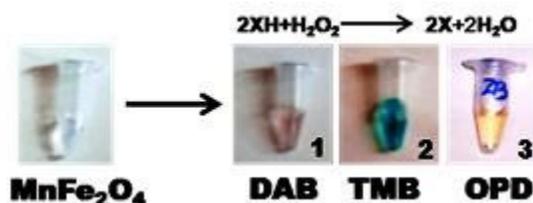


Figura 3. La enzima peroxidasa cataliza la oxidación de un amplio número de sustratos orgánicos e inorgánicos, utilizando el poder oxidante del peróxido de hidrógeno. (1: Reacción con DAB; 2: reacción con TMB; 3: reacción con OPD).

Los resultados obtenidos con las NPs de ferrita de manganeso concuerdan con los reportados para la magnetita.⁶ Casi todas las enzimas peroxidasa son hemo-

proteínas con una porfirina IX férrica como grupo prostético. Sin embargo existen otros tipos de peroxidasa que también contienen en sus centros activos selenio (glutatiox peroxidasa) y manganeso (manganeso peroxidasa).⁷ Igualmente, los sistemas miméticos de las peroxidasa presentan iones Fe^{2+} ó Fe^{3+} en sus centros de reacción, y es bien conocido el reactivo de Fenton, que consiste en una disolución de iones $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ que cataliza la degradación del peróxido de hidrógeno y es ampliamente usado para el tratamiento de aguas residuales.¹¹

La oxidación del TMB catalizada por la enzima y en presencia de H_2O_2 produce una reacción de color azul con un máximo de absorbancia a 652 nm.¹² Al igual que la actividad enzimática, esta reacción es detenida con H_2SO_4 y el producto se torna amarillento con un máximo de absorbancia a 450 nm. En la figura 4 se muestra la actividad peroxidasa de las NPs de MnFe_2O_4 , en el tiempo, sin detener la reacción con ácido sulfúrico y usando el TMB como sustrato. El comportamiento es similar que el de las NPs de Fe_3O_4 del estudio primario, al no ser detenida, la reacción continua ocurriendo, oxidándose el TMB.⁶

En el caso de la enzima HRP, podemos plantear un mecanismo catalítico general que transcurre a través de la formación de un intermediario de la enzima formado por un ion oxiferrilo ($\text{Fe}^{4+}=\text{O}$) y un radical libre porfirínico de tipo π (P^+), donde el Fe^{3+} del grupo hemo es oxidado por el H_2O_2 , (que se reduce a H_2O), tras lo cual la forma oxidada de la enzima se reduce a la forma nativa mediante dos procesos consecutivos de transferencia electrónica con dos moléculas del sustrato reductor.^{13,14} Nuestro sistema (ferrita de manganeso) tiene hierro en forma Fe^{3+} por lo que es de esperar que la actividad de las NPs ocurre mediante la oxidación de los átomos superficiales de esta especie en presencia del H_2O_2 . De tal forma que el sustrato orgánico (TMB, OPD, DAB) cede sus electrones y queda en su forma oxidada, lo que produce un cambio de coloración.

Para estudiar la influencia del pH y de la concentración de H_2O_2 en la actividad de las NPs magnéticas, se usaron como sustratos el TMB y el OPD. Para esto se hicieron mediciones de absorbancia a diferentes pH (entre 1 y 11) y para diferentes valores de concentración de H_2O_2 (entre 0,1 y 2,0 mol/L). En la Fig. 5 se muestran los resultados para el TMB. El valor óptimo de pH para el caso del TMB fue aproximadamente 7.3 (fig. 5a), un resultado diferente al que se obtiene con OPD, donde la mayor actividad peroxidasa se alcanza alrededor de pH 5, para cada concentración de H_2O_2 estudiada.

A medida que se incrementa la concentración de peróxido de hidrógeno, la actividad peroxidasa de las NPs de MnFe_2O_4 aumenta hasta un valor determinado (0,4 mol/L) en el cual la actividad se mantiene relativamente constante. Si se continúa aumentando la concentración de H_2O_2 , la actividad peroxidasa se inhibe (Fig 5b). En el caso del estudio con OPD este valor límite fue mayor, 0,8 mol/L.

Este comportamiento es similar al de la enzima HRP

y al de las NPs de Fe_3O_4 , según lo reportado por Gao y col.,⁶ pero en ambos nanomateriales el valor de concentración de peróxido al cual se alcanza la mayor actividad es superior al que se requiere con la enzima. Esto puede deberse a que en la enzima sólo hay un grupo Fe en contraste con las NPs, donde el número de átomos en la superficie es mayor.

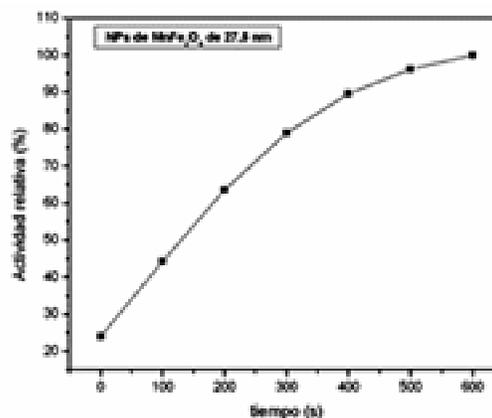


Figura 4. Actividad peroxidasa de las nanopartículas de ferrita de manganeso en el tiempo. El máximo valor de la curva fue tomado como el 100% de actividad.

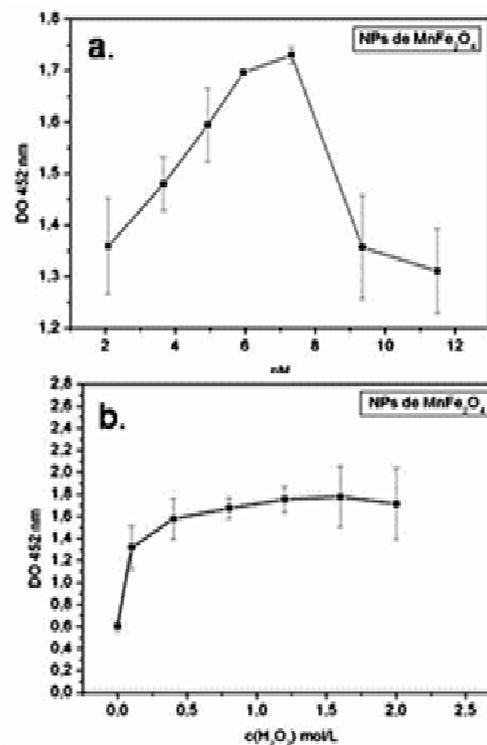


Figura 5. Influencia del pH y la c (H_2O_2) en la actividad peroxidasa usando como sustrato el TMB. a. El valor de pH óptimo encontrado para el análisis con TMB fue de 7,3. b. La actividad peroxidasa se incrementa con el aumento de la concentración de H_2O_2 .¹⁵

4 Conclusiones

Las nanopartículas de MnFe_2O_4 muestran actividad peroxidasa intrínseca frente a varios sustratos de la enzima HRP. Esta actividad depende del pH y de la concentración de H_2O_2 . Es recomendable seguir estudiando la actividad peroxidasa de estas NPs magnéticas funcionalizadas y conjugadas con anticuerpos, con el propósito de poder aplicarlas en inmunoensayos.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Dr. Carlos Rodríguez el interés mostrado por este estudio.

Referencias

1. Brahler, M. et al. Magnetite-loaded carrier erythrocytes as contrast agents for magnetic resonance imaging. *Nano Lett.* 6:2505–2509 (2006)
2. H.Gu, et al. Biofunctional magnetic nanoparticles for protein separation and pathogen detection. *Chem. Commun.*, 941-949, (2006)
3. M. Johannsen et al. Magnetic Fluid Hyperthermia (MFH) reduces prostate cancer growth in the orthotopic dunning R3327 rat model. *The Prostate* 64:283-292, (2005)

4. Q.A. Pankhurst, J. Connolly, J. Dobson. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicina. *J. Phys. D: Appl. Phys.* 36 R167-R181, (2003)
5. J.M. Pérez. Iron oxide nanoparticles. Hidden talent. *Nature Nanotechnology*, 2:535-536, (2007)
6. L. Gao, J. Zhuang, L. Nie, J. Zhang, Y. Zhang, N. Gu, et al. Intrinsic peroxidase-like activity of ferromagnetic nanoparticles; *Nature Nanotechnology*, 2:577-583, (2007)
7. W. Adam, M. Lazarus et al. Biotransformations with peroxidases. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, Vol 63. 74-75
8. G.T. Hermanson. *Bioconjugate Techniques*. Pierce Chemical Company. p.630-631
9. A. Alvarez-Paneque, S. Diaz, P. Santiago-Jacinto, E. Reguera, Síntesis y caracterización de nanopartículas magnéticas basadas en la MnFe_2O_4 tipo espinela; *Rev. Cub. Física* 25 (2B) 117-122, (2008)
10. A. Guinier, *X-Ray Diffraction*; Dover Publications: Mineola, NY, 1994.
11. Walling, Cheves "Fenton's Reagent Revisited", in *Accts of Chem. Research*, vol. 8, pp. 125-131 (1975).
12. Bos, E.E., et al., *J. Immunoassay* 2, 187 (1981)
13. J.L. Lyon, K.J. Stevenson. Electron transfer of peroxidase assemblies at tailored nanocarbon electrodes. *Electrochimica Acta* 53 6714-6721 (2008)
14. M. A. Castriciano, A. Romeo, M. C. Baratto, R. Pogni y L. M. Scolaro. Supramolecular mimetic peroxidase based on hemin and PAMAM dendrimers. *Chem. Commun.*, , 688–690, (2008).