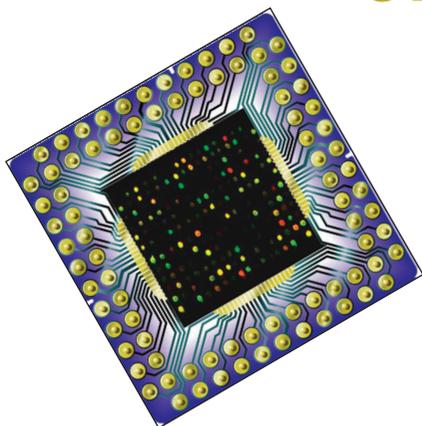


NANOTECNOLOGÍA

en la detección biológica



Mildred Quintana-Ruiz, Alma Gabriela Palestino-Escobedo,
Héctor Flores y Elías Pérez

En los últimos años se han desarrollado una gran cantidad de métodos para fabricar nanodispositivos (dispositivos de dimensiones nanométricas, es decir, de millonésimas de milímetro) que puedan tener aplicaciones en la detección biológica. Entre ellos que se encuentran marcadores celulares, trazadores celulares, nanodispositivos para realizar imagenología *in vivo* y para la detección de ácido desoxirribonucleico (ADN). Estos nanodispositivos son capaces de revelar la presencia de una sola molécula dentro de una célula viva y poseen la habilidad de diferenciar en forma paralela varias señales en una sola muestra.

Haciendo una comparación con los marcadores orgánicos tradicionales, los nanodispositivos son más brillantes, estables, pueden ser excitados en un amplio intervalo de longitudes de onda y responden con una emisión monocromática, lo que facilita el diseño de detectores en distintos colores. Materiales de este tipo pueden llegar a reducir considerablemente los costos de producción y de manejo de los materiales convencionales debido a su tamaño y preparación, por lo que se espera un

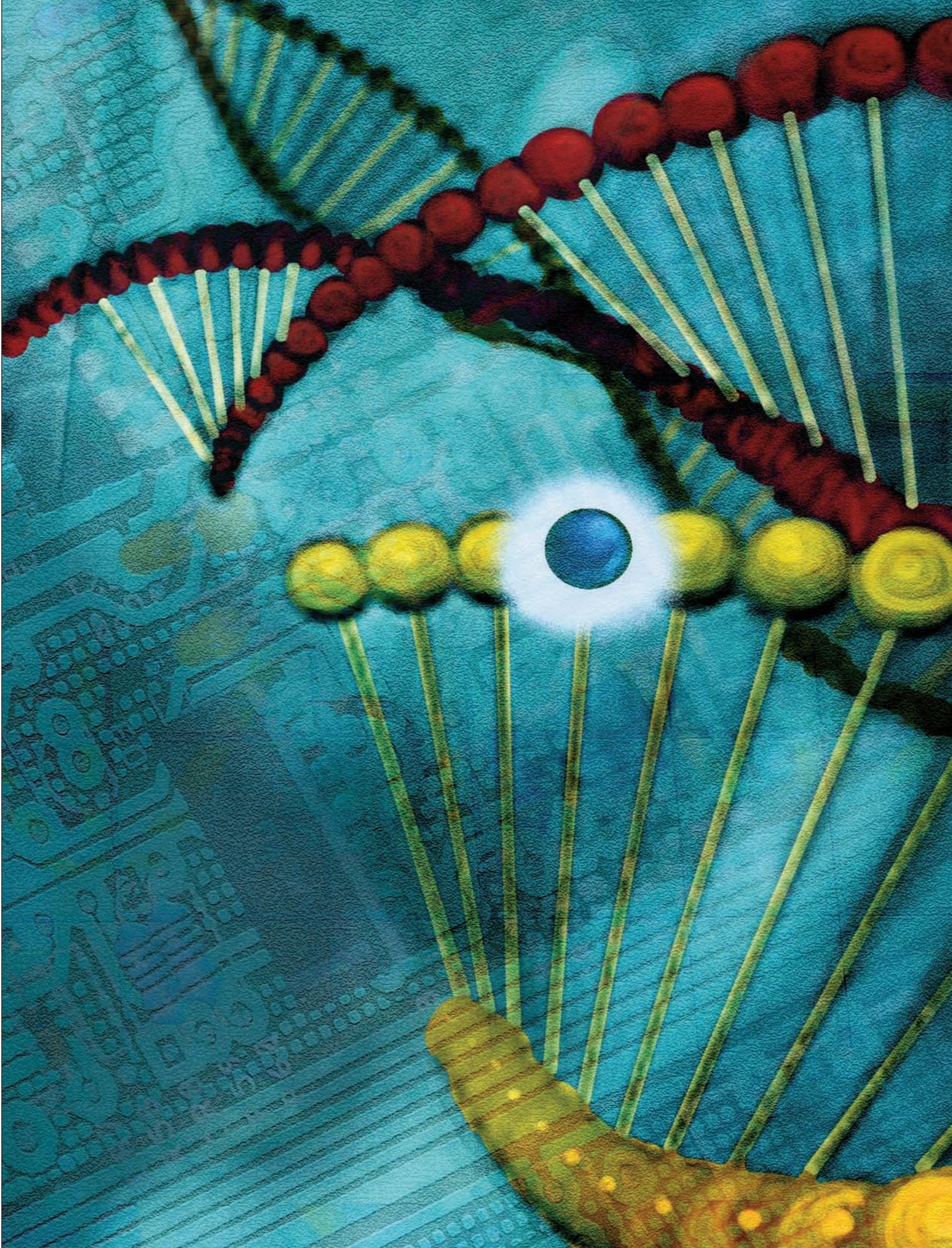
considerable aumento en sus aplicaciones médicas y tecnológicas en un futuro cercano (Figura 1).

Semiconductores en escala nanométrica

La tecnología moderna nos permite la construcción de dispositivos generados a partir de semiconductores (sustancias cuya conductividad eléctrica varía entre la de un conductor o un aislante, según las condiciones) de tan sólo algunos nanómetros (millonésimas de milímetro), lo que hace posible que las propiedades



Figura 1. Con tan sólo variar su tamaño, las nanopartículas semiconductoras, o puntos cuánticos, pueden tener distintos colores. El color rojo corresponde a puntos cuánticos de seleniuro de cadmio (CdSe) de aproximadamente 7.5 nanómetros (millonésimas de milímetro), mientras que el azul corresponde a nanopartículas de aproximadamente 2 nanómetros.



cuánticas de los electrones se manifiesten. En esta región los electrones solamente podrán asumir ciertos valores de energía que estarán definidos por el confinamiento del dispositivo en un tamaño tan pequeño.

Este fenómeno se observó por primera vez en dispositivos construidos a partir de capas alternas de materiales aislantes y semiconductores sobre un soporte sólido. Los semiconductores tienen tanto una banda electrónica de conducción, típica de los materiales conductores, como una banda de valencia, que los hace conductores solamente ante una fuerza externa aplicada, por ejemplo, excitación luminosa o eléctrica.

L. Chang y L. Esaki (1992) demostraron que la geometría de los dispositivos determina efectivamente los niveles energéticos de los electrones de los semiconductores confinados, y que estos niveles pueden ser controlados por una fuente de voltaje externo. Los niveles ocupados definen la *carga* eléctrica de los dispositivos, dado que la corriente eléctrica que pasa a través de ellos ocurre exclusivamente a ciertos valores del voltaje aplicado, razón por la que son conocidos como “átomos artificiales” (Kastner, 1993). Este fenómeno es consecuencia de un efecto de resonancia que ocurre cuando el voltaje coincide con un nivel energético del electrón confinado, lo que promueve que los electrones “escapen” del confinamiento (pueden consultarse los detalles de la explicación del fenómeno en Capasso y Datta, 1990). Precisamente, esta propiedad cuántica les confiere propiedades ópticas, eléctricas y magnéticas a estos dispositivos útiles en el desarrollo tecnológico (Figura 2).

Paredes, alambres y puntos cuánticos

Los primeros experimentos de sistemas cuánticos confinados pasaron del estudio de capas de átomos, descritos anteriormente y conocidos como “paredes cuánticas”, a líneas o “alambres cuánticos”, y posteriormente a cúmulos de átomos o “puntos cuánticos” (QD o *quantum dots*). Estos últimos han tenido un gran impacto dentro de las aplicaciones tecnológicas, ya que la separación entre los niveles de energía puede ser controlada directamente a través de variar su tamaño y composición.

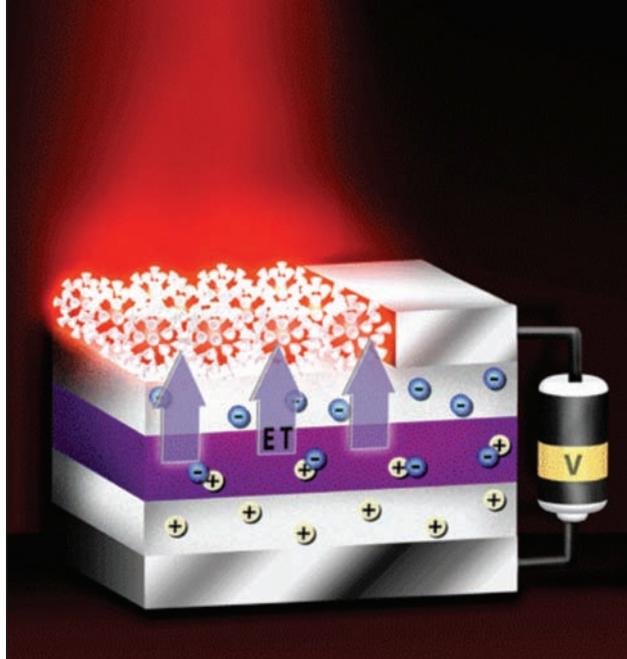


Figura 2. Átomos artificiales: dispositivos construidos con capas alternas de aislantes y semiconductores sobre un soporte sólido. Los extremos de este mecanismo son conectados a una fuente de diferencia de potencial.

Los puntos cuánticos se utilizan en diversas áreas tecnológicas: en la fabricación de detectores, en el diseño de dispositivos de estado sólido con aplicaciones en la computación cuántica, en la fabricación de láseres, en el diseño de celdas solares y en la detección y marcaje en sistemas biológicos. Esto último será el tema central de este artículo.

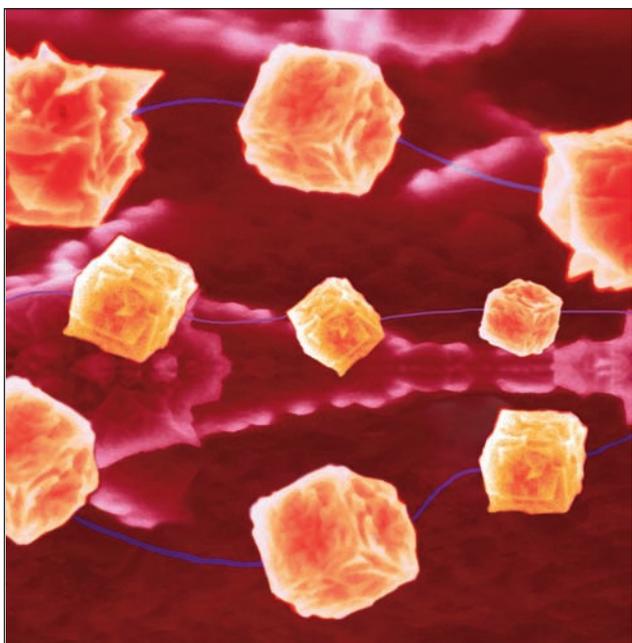
¿Cómo se fabrican los puntos cuánticos?

Un punto cuántico se fabrica a partir de una combinación de un precursor metálico u organometálico, llamados así por contar con un enlace carbono-metal –como puede ser cinc, cadmio o mercurio– con elementos pertenecientes al grupo 16 de la tabla periódica –o familia del oxígeno, conocidos como *calcógenos*: oxígeno, azufre, selenio o telurio– en un disolvente adecuado, razón por la cual también se les llama “semiconductores coloidales nanocrystalinos”, es decir, partículas sólidas dispersas en un líquido.

En general, como en el caso de los semiconductores comunes, los puntos cuánticos se forman a partir de la combinación de los elementos de la tabla periódica del grupo III con el grupo V (por ejemplo, fósforo y arsenuro de indio) o de la combinación de los grupos IV y VI, como son el selenuro, telurio y sulfuro de plomo.

A la fecha se han desarrollado un gran número de métodos para producir puntos cuánticos. Entre ellos podemos mencionar dos grandes grupos: los métodos descendentes (*top-down*), como las técnicas de bombardeo de fotones o electrones sobre sólidos semiconductores para producir materiales nanométricos; y las técnicas ascendentes (*bottom-up*), sistemas simples que evolucionan a estructuras realmente complejas, también conocidos como *sistemas emergentes* o de autoensamblado. Las técnicas de autoensamblado han sido fundamentales para la producción de puntos cuánticos.

Una parte importante para la síntesis de autoensamblado de puntos cuánticos es el disolvente, el cual tiene que ser estable a altas temperaturas y actuar como tensoactivo, evitando la agregación de las partículas y controlando la velocidad de crecimiento. El tamaño de los puntos cuánticos puede ser determinado ya sea por la concentración inicial del precursor metálico y el volumen del solvente, o por la temperatura en la cual se realiza la síntesis. Sin embargo, existen algunas técnicas más sencillas (Díaz, 1999) en las que la síntesis se realiza a temperatura ambiente y en disolventes biológicamente afines.



Biosensor para la detección de glucosa en la sangre que utiliza estructuras huecas ("alambres cuánticos") llamadas nanotubos de carbono, ancladas a nanocubos recubiertos de oro.

© Jeff Goecker, Discovery Park, Purdue University.

Tipos de detección que realizan los puntos cuánticos

Los eventos moleculares que se llevan a cabo en sistemas biológicos pueden ser detectados usando principalmente tres tipos de detección: óptica, eléctrica y magnética.

Detección óptica: las propiedades ópticas en los sistemas en los que intervienen los puntos cuánticos se relacionan con la interacción del material con radiaciones electromagnéticas. Cuando los fotones interactúan con la estructura electrónica o cristalina de un material, se produce una gran diversidad de efectos ópticos que incluyen la absorción, transmisión, refracción, reflexión y luminiscencia (esta última consiste en la conversión de radiación y otras formas de energía en luz visible). Si la longitud de onda de los fotones está dentro del espectro de luz visible, aparecerá la luminiscencia. Ésta proviene de los electrones excitados que regresan a la banda de valencia una vez que los fotones correspondientes son emitidos. En los dispositivos cuánticos confinados es posible controlar la energía con la cual esperamos que se emita la luminiscencia, por lo que es posible separar estas señales de las que emiten los sistemas biológicos, o bien se pueden acoplar dependiendo del tipo de detección que se busque.

Esta clase de detección ha sido el mecanismo más usado para la localización de enlaces biológicos y para la producción de imágenes en sistemas vivos. Actualmente es posible la detección de una molécula *in vivo*, sin importar la gran variedad química que se encuentra presente en un organismo. Esto se ha logrado mediante la combinación de puntos cuánticos y nanopartículas metálicas con la manipulación del campo energético local en sus propios ambientes. Esto serviría para producir dispositivos capaces de detectar una sola molécula de organismos causantes de ciertos padecimientos en hombres y animales, lo que reduciría sustancialmente el costo en el diagnóstico de enfermedades.

Detección eléctrica: los sistemas eléctricos presentan la ventaja de que pueden ser miniaturizados e integrados con otros sistemas, lo que ofrece mejoras sobre los esquemas de detección óptica. Lieber y colaboradores (2001) han demostrado que nanoestructuras unidimensionales o "alambres cuánticos", como son nanotubos de carbono, ofrecen una gran posibilidad para crear

detectores bioelectrónicos. En cualquier sistema unidimensional, el flujo de corriente presenta una gran sensibilidad a perturbaciones menores, además de que en ellos el flujo de corriente viaja fundamentalmente sobre la superficie. Un alambre cuántico unido a una macromolécula biológica que sufra un proceso de cambio conformacional o de cambio de estado en la carga, perturbará el flujo de corriente en el alambre, lo que produce una señal detectable.

Bayley y colaboradores (2000) demostraron la posibilidad de realizar detección en sistemas biológicos a partir del transporte de iones. Estos investigadores pudieron seguir la cinética de transporte de iones a través de poros individuales con proteínas pegadas a su superficie. El experimento esencialmente se lleva a cabo dentro de los nanoporos, donde los iones se mueven a través de un canal unidimensional, lo que hace posible controlar al máximo la sensibilidad. La selectividad se logra mediante la proteína utilizada.

Este proceso puede ser usado como un principio en la nueva generación de biosensores. Estos experimentos están relacionados con el proceso de la secuenciación rápida de moléculas de ADN, con el que se identifican los pares de bases conforme pasan a través de electrodos que se encuentran embebidos alrededor de un nanoporo en un material semiconductor. En estos sistemas, los diferentes polinucleótidos –polímeros formados de varios nucleótidos, como el ADN y ARN– se pueden distinguir unos de otros conforme pasan a través de un canal de la proteína alfa hemolisina. Este experimento inició toda una búsqueda de nanodetectores completamente artificiales.

Detección magnética: la importancia del campo magnético terrestre sobre algunos animales ha sido reconocida desde tiempo atrás. Por ejemplo, en bacterias

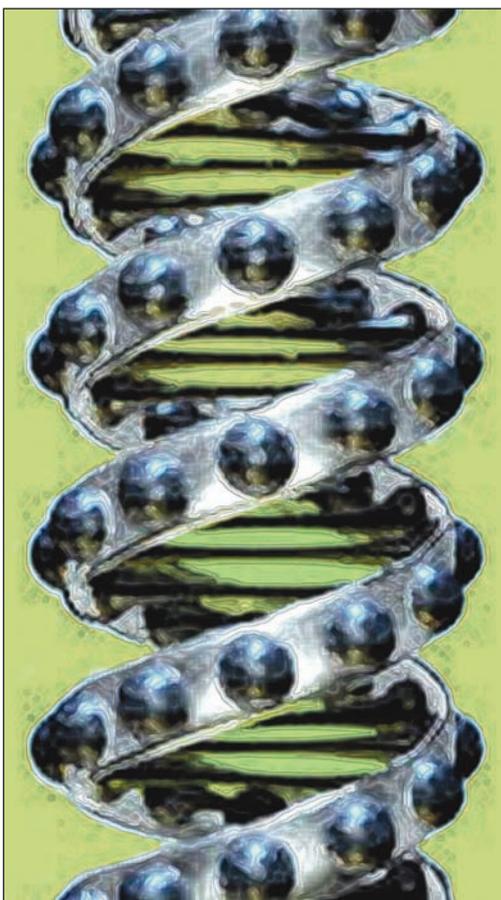
magnetotácticas (*Magnetospirillum magnetotacticum*) están presentes nanocristales magnéticos de 25 nanómetros en forma de cadena que actúan como una brújula, dirigiendo el movimiento de la bacteria (Dunin-Borkowski y colaboradores, 1998).

En forma similar, el comportamiento de una amplia selección de organismos parece estar influido por el campo magnético terrestre, incluyendo peces, abejas, salamandras, tortugas, aves, y algunos mamíferos acuáticos. Los nanocristales son una pieza clave en la descripción de estos mecanismos. A esta escala, los nanocristales se comportan como dominios magnéticos

individuales, con todos los espines acoplados en una sola dirección, lo que crea un momento magnético muy grande. En un cristal pequeño y a una temperatura lo suficientemente alta, el momento magnético se comporta en forma aleatoria –lo que se conoce como un *cristal paramagnético*–, mientras que por debajo de un tamaño crítico, este momento se convierte en un valor fijo debido a la alineación espontánea de todos los espines, lo que da origen a un *cristal ferromagnético*. Por ejemplo, el tamaño crítico para los nanocristales de cobalto es aproximadamente de 11 nanómetros.

Las partículas nanocristalinas también han sido utilizadas en la detección y separación de componentes dentro de sistemas biológicos, como agentes de contraste en resonancia magnética

y como base de una serie de experimentos en *magnetoforesis* (la migración de moléculas que contienen algún metal mediante la aplicación de un campo magnético: las moléculas que son afectadas por el campo magnético migran a través del sustrato, mientras las que no tienen algún componente metálico permanecen estáticas). Los superconductores actualmente son importantes en el campo de la biomedicina, pues forman la



base de los magnetos usados para crear imágenes de alta resolución en resonancia magnética. En este sentido, se busca diseñar dispositivos magnéticos a escala nanométrica e interfases cuánticas superconductoras.

Aplicaciones biológicas de los puntos cuánticos

En 1998, el grupo de Alivisatos, en la Universidad de Berkeley, y el grupo de Nie, en la de Indiana, reportaron por primera vez el uso de puntos cuánticos como marcadores biológicos y sugirieron que debido a su estabilidad fotoquímica y al control que se puede tener sobre sus propiedades de adsorción y emisión de luz podrían ser materiales extremadamente útiles en la detección biológica.

El tamaño de los puntos cuánticos es aproximadamente igual al de una proteína típica, por lo que una vez detectada la molécula se puede establecer en qué cantidad se encuentra. Actualmente esta área de investigación se ha desarrollado considerablemente, y se ha demostrado que los puntos cuánticos son emisores de luz muy estables y que por ser tan pequeños pueden ser introducidos sin ocasionar daños en organismos vivos.

Biosensores y marcadores biológicos

Los puntos cuánticos son indicadores que usan color, y son biológicamente inertes. Generalmente tienen una cubierta de moléculas estabilizantes. Sobre esta cubierta sintética se localizan moléculas orgánicas con grupos terminales amino o sulfuro, los cuales se encuentran disponibles para conjugarse con la biomolécula de interés. La conjugación con las biomoléculas se realiza a través de reactivos orgánicos que actúan como ligantes heterofuncionales cruzados que crean enlaces covalentes, que a su vez unen al punto cuántico con la biomolécula, lo cual facilita la detección *in vivo*. Sin embargo, la conjugación es aún una limitante en estos estudios, debido a la poca versatilidad que presentan los ligantes actualmente conocidos. Por eso es tan importante la investigación química en esta área.

En 1998 fue demostrada la primera aplicación de los puntos cuánticos como marcadores biológicos. En

este experimento se marcaron en multicolor los fibroblastos de ratón. Actualmente, esta ventaja es explorada exitosamente mediante la utilización de puntos cuánticos acoplados a anticuerpos específicos de moléculas intracelulares, con lo cual ha sido posible la obtención de información variada en una misma muestra. Recientemente se han utilizado para el marcaje y seguimiento de moléculas biológicamente activas, como péptidos, anticuerpos y ácidos nucleicos. Además, pueden ser usados para marcar ligantes de moléculas biológicas intracelulares (Figura 3).

Sin embargo la exitosa obtención de imágenes de células vivas marcadas con puntos cuánticos ha provocado un impresionante avance, al monitorear imágenes de células cancerosas. En 2003, Wu y colaboradores utilizaron puntos cuánticos de seleniuro de cadmio (CdSe) para marcar drogas anticancerígenas: lograron identificar los tumores que responden a cada una de ellas.

Los puntos cuánticos también han sido utilizados para localizar y monitorear tumores cancerosos en animales vivos. En este caso, los puntos cuánticos son encapsulados en un polímero, el cual a su vez es funcionalizado con un ligante capaz de reconocer la célula cancerígena específica. Mediante la combinación de estos dos métodos se han diseñado tratamientos en

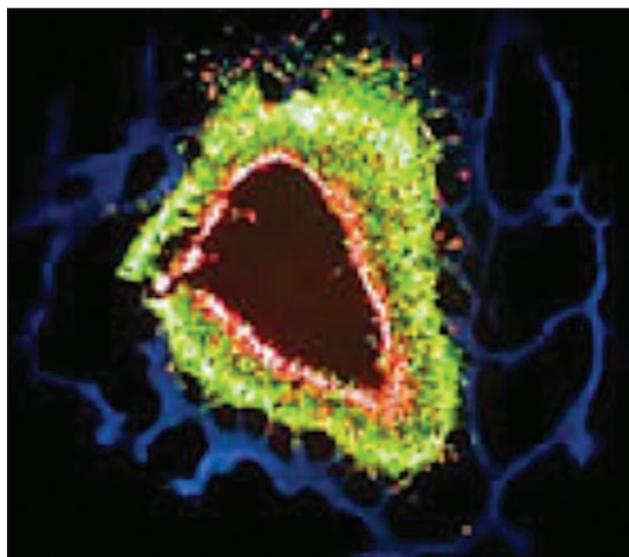


Figura 3. Aplicación de los puntos cuánticos como marcadores biológicos. En este experimento se marcaron en verde células llamadas fibroblastos de ratón.

los que simultáneamente los puntos cuánticos son utilizados para localizar células cancerosas y posteriormente para liberar fármacos específicos al ser estimulados con luz láser. De esta manera, sólo las células del tumor canceroso reciben el fármaco, lo que minimiza sus efectos secundarios.

También se han realizado estudios para conocer la cinética de las células tumorales, utilizando sílice cubierta con puntos cuánticos de seleniuro de cadmio y óxido de cinc para marcar las células tumorales. Las pistas fluorescentes que dejan los cristales confirman que las células cancerosas son invasivas y migratorias, mientras que las células no cancerosas no lo son (Figura 4).

Los puntos cuánticos han sido utilizados para el diseño de biosensores. Esta área se ha desarrollado a partir de la fotoestabilidad que presentan, lo que permite un monitoreo continuo y en tiempo real.

Uno de los métodos para la utilización de puntos cuánticos como biosensores es mediante la creación de un sistema de “encendido/apagado”, capaz de crear un efecto de transferencia de energía en donde uno de los componentes actúa como donador y otro como receptor de energía. Esta técnica ha sido utilizada acoplado biomoléculas a los puntos cuánticos a partir de pares anticuerpo-antígeno.

Un ejemplo es el antígeno sero-albúmina bovina que se conjuga a un punto cuántico de telurio de cadmio (CdTe), el cual emite radiación fluorescente roja, y el correspondiente anticuerpo de la sero-albúmina bovina se conjuga a un punto cuántico de telurio de cadmio, el cual emite radiación fluorescente verde. La formación del inmunocomplejo entre la sero-albúmina bovina y el anticuerpo resulta en la transferencia de energía entre los dos diferentes tipos de cristal; la luminiscencia del punto cuántico verde, correspondiente al donador (550 nanómetros) disminuye, mientras que la emisión del punto cuántico receptor de color rojo (615 nanómetros) aumenta. Uno de los beneficios de utilizar estos puntos cuánticos en inmunoensayos es la capacidad para excitar y detectar diferentes especies marcadas al mismo tiempo. Mattoussi y colaboradores (2000) prepararon sistemas conjugados con puntos cuánticos de seleniuro de cadmio/sulfuro de cinc (CdSe/ZnS) altamente luminiscentes y anticuerpos para realizar múltiples inmunoensayos, y demostraron que utilizando este efecto es posible detectar simultáneamente hasta cuatro diferentes moléculas en una misma muestra.

El avance en el diseño de aditamentos que incorporan una unidad emisora y una unidad extintora que

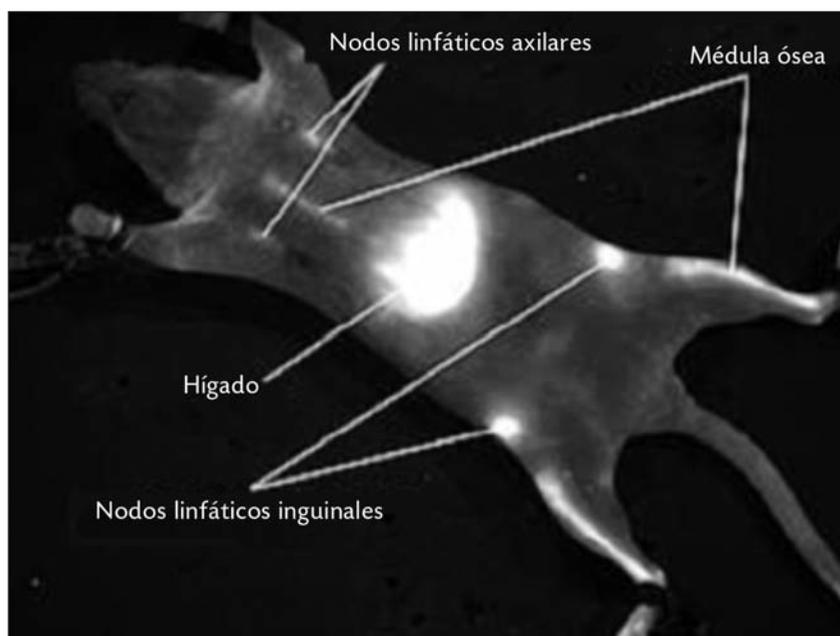


Figura 4. Los puntos cuánticos también han sido utilizados para localizar y monitorear tumores cancerosos en animales vivos.

puedan ser moduladas por estímulos biológicos permiten la creación de biosensores poderosos y compactos.

Perspectivas

La versatilidad de los puntos cuánticos para el marcaje y reconocimiento dentro de sistemas biológicos abre una nueva línea de investigación en la interdisciplina entre la física, la química y la medicina, con un sinnúmero de posibles aplicaciones tecnológicas. La capacidad de marcar moléculas únicas y obtener múltiples emisiones en una sola muestra, además de poder seguir la señal a largo plazo, pueden ser la clave para conocer la función estructural y fisiológica de proteínas y biomoléculas que antes no podían ser detectadas ni seguidas en tiempo real. Esto ayudaría a descubrir la función de cada biomolécula para la cual codifica el ácido desoxirribonucleico.

La investigación de estos materiales y sus aplicaciones biológicas está comenzando a nivel nacional. Existen grupos investigando la síntesis de nanopartículas semiconductoras en instituciones como el Centro de Investigación y Estudios Avanzados (Cinvestav), la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, en la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y actualmente en el Instituto de Física de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí (UASLP). Sin embargo, hay pocos grupos trabajando en el acoplamiento con sistemas biológicos. Evidentemente, se trata de un problema de investigación importante que necesita ser considerado para su desarrollo en México.

Mildred Quintana es doctora en química por la Universidad Autónoma Metropolitana, miembro del SNI nivel C. Actualmente tiene una estancia posdoctoral en la Universidad de Trieste, Italia, en el Departamento de Fisiología y Patología, donde trabaja en el proyecto: Desarrollo de dispositivos neuroimplantables: integración de neuronas y nanotubos de carbono como unidades funcionales. mquintana@units.it

Gabriela Palestino es profesora de la Facultad de Química de la UASLP. Actualmente realiza estudios doctorales en la Universidad de Montpellier, Francia. Su tema de investigación es el

aumento de señales ópticas de sistemas biológicos en superficies porosas.

palestinogabriela@fcq.uaslp.mx

Héctor Flores es profesor investigador de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí (UASLP) y coordinador del Centro de Investigación de la Facultad de Estomatología. Tiene un doctorado en biomateriales por la Universidad Louis Pasteur de Estrasburgo, Francia (2005). Es miembro del Sistema Nacional de Investigadores. Su línea de investigación es la fabricación de sistemas de liberación controlada de fármacos y de nanotecnología utilizando partículas semiconductoras.

heflores@uaslp.mx

Elías Pérez es profesor investigador de la UASLP, con doctorado en fisicoquímica de polímeros por la Universidad Louis Pasteur de Estrasburgo, Francia (1997). Es miembro de la Academia Mexicana de Ciencias (2004) y del Sistema Nacional de Investigadores. Actualmente su trabajo de investigación se centra en problemas de adsorción molecular de macromoléculas (polielectrolitos, proteínas o partículas coloidales) sobre superficies modificadas.

elias@ifisica.uaslp.mx

Bibliografía

- Chang, L. y L. Esaki (1992), "Semiconductor quantum heterostructures", *Physics today*, octubre.
- Kastner, M. (1993), "Artificial atoms", *Physics today*, enero.
- Capasso, F. y S. Datta (1990), "Quantum electron device", *Physics today*, febrero.
- Díaz, D., M. Rivera, T. Ni, J. C. Rodríguez, S. E. Castillo-Blum, D. Nagesha, J. Robles, O. J. Álvarez-Fregoso y N. A. Kotov (1999), *J. Phys. Chem. B*, 103, 9854-9858.
- Cui, Y., Q. Q. Wei, H. K. Park y C. M. Lieber (2001), "Nanowire nanosensors for highly sensitive and selective detection of biological and chemical species", *Science*, 293, 1289-1292.
- Bayley, H., O. Braha y L. Q. Gu (2000), "Stochastic sensing with protein pores", *Adv. Mater.* 12, 139-142.
- Dunin-Borkowski, R. E. y colaboradores (1998), "Magnetic microstructure of magnetotactic bacteria by electron holography", *Science*, 282, 1868-1870.
- Alivisatos, P. (2004), "The use of nanocrystals in biological detection", *Nat. Biotechnol.* 22-1.
- Wu, X. y colaboradores (2003), *Nat. Biotechnol.* 21-1, 41.
- Tran, P. T., E. R. Goldman, G. P. Anderson, J. M. Mauro y H. Mattoussi (2002), *Phys. Stat. Sol. B*, 229, 427.