

Biosíntesis de Quantum Dots

Rafael Hoyos Manchado

Resumen—Los Quantum Dots son nanopartículas con propiedades ópticas muy singulares, por lo que se usan en multitud de aplicaciones biomédicas o biológicas. Uno de los tipos más importantes son los calcogenuros, especialmente los de cadmio. Aunque existen otros métodos de síntesis, se ha estudiado la posibilidad de producir estas nanopartículas de forma biológica aprovechando los mecanismos de detoxificación de metales pesados que muchos organismos poseen de forma natural. La levadura de fisión, *Schizosaccharomyces pombe* fue el modelo pionero con este propósito pero, a lo largo de los años, se han logrado sintetizar estas nanopartículas en diversos microorganismos.

Palabras Claves— biosíntesis, quantum dots, calcogenuros, nanopartículas, *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida galbrata*.



1. INTRODUCCIÓN. QUANTUM DOTS

Los Quantum Dots (QDs) han sido una de las primeras nanopartículas con aplicaciones biológicas y biomédicas. Sus interesantes propiedades ópticas hacen que sean excelentes biomarcadores y que, casi medio siglo después de su primera descripción, se encuentren en la vanguardia tecnológica [1]. Los QDs son cristales de unos cuantos nanómetros de diámetro que, en comparación con los biomarcadores fluorescentes convencionales y a diferencia de su estado macroscópico, presentan un alto rendimiento cuántico (PhotoLuminiscence Quantum Yield, PLQY), amplio rango de absorción pero estrecho en la emisión y una gran fotoestabilidad [2]. Dependiendo del tamaño de las partículas, forma y estructura, las propiedades ópticas pueden ajustarse fácilmente según la aplicación en la que vayan a usarse. Esta versatilidad, junto a las propiedades previamente descritas, hacen que los QDs sean especialmente útiles en microscopía de fluorescencia múltiple (multiplexing).

Básicamente existen dos grandes tipos de QDs. Los II-VI (sales formadas por un átomo del grupo 12, o IIB, de la tabla periódica y otro del 16, o VIA), y los III-V (un átomo del grupo 13, o IIIA, y otro del 15, o VA). El primer tipo es posiblemente el que tiene mayores aplicaciones y ha sido más ampliamente estudiado. También son conocidos como calcogenuros, puesto que el grupo 16 es el de los calcógenos y está conformado por el oxígeno (O), el azufre (S), el selenio (Se), el Teluro (Te), el polonio (Po, radiactivo) y el Livermorio (Lv, anteriormente Uuh). Los calcogenuros de cadmio son a su vez los más utilizados, específicamente el CdS, CdSe y CdTe.

Durante muchos años se ha investigado la forma en que podían obtenerse nanopartículas de estas moléculas de la forma más sencilla y con las propiedades ópticas idóneas [1].

2. SÍNTESIS DE CALCOGENUROS

Para sintetizar estas nanopartículas encontramos tres métodos generales: dos químicos (síntesis organometálica y síntesis acuosa) y uno biológico (biosíntesis).

2.1. Síntesis Organometálica

La llamada síntesis organometálica, que produce QDs (orQDs) de naturaleza hidrofóbica y que, por lo tanto, deben recubrirse con ligandos hidrofílicos o recubrimientos poliméricos o de sílica para hacerlas solubles en agua. Este tratamiento, sin embargo, va en detrimento de sus propiedades ópticas (aumenta su tamaño y disminuye su PLQY) y por lo tanto también merma su aplicabilidad.

2.2. Síntesis Acuosa

La síntesis más usada ha sido probablemente la acuosa (aqQDs), ya que generalmente es más simple, barata y respetuosa con el medio ambiente, además de que ya son estables en agua, puesto que están rodeadas de un gran número de ligandos hidrofílicos. No obstante, aunque esto se traduzca en un diámetro hidrodinámico pequeño sus propiedades ópticas suelen ser pobres. De hecho un campo muy activo ha sido la búsqueda de aqQDs con propiedades ópticas mejoradas [1], [2].

2.3. Síntesis Biológica (Biosíntesis)

Aunque los dos métodos químicos, descritos anteriormente, permiten obtener con éxito QDs, se han intentado desarrollar vías alternativas que fueran más limpias, biocompatibles, no tóxicas y respetuosas con el medio ambiente, como es el caso de la biosíntesis. Mediante el uso de microorganismos, se han propuesto una serie de métodos que permiten obtener QDs de forma barata, no tóxica, reproducible y a temperatura y presión ambientes. Para ello, se aprovechan los mecanismos naturales que los microorganismos tienen para protegerse de la acción de los metales pesados, como es el caso del Cd o el Zn. Existen varios mecanismos de tolerancia a estos metales: la modificación de sus sistemas de transporte en la membrana, la oxidación o reducción mediante enzimas, la alteración del flujo de iones y la precipitación con azufre, fósforo o biopolímeros [1].

3. ESTUDIO DE LA SÍNTESIS BIOLÓGICA

3.1. Cadistinas y Fitoquelatinas

El microorganismo pionero en estos estudios no es otro que la levadura de fisión, *Schizosaccharomyces pombe*. Es bien sabido que esta levadura unicelular ha sido clave en el conocimiento de la morfogénesis y el ciclo celular. Sin embargo, en 1981 [3], se descubre que en presencia de CdCl_2 , la levadura no sólo produce metalotioneínas (detoxificación de metales) sino que también se induce la formación de unos péptidos cortos que se unen al cadmio. En 1983 [4], se publica la estructura de la cadistina de *S. pombe*, determinándose posteriormente en otros organismos que la estructura general es $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$, o lo que es lo mismo $(\gamma\text{EC})_n\text{G}$, siendo $n=3-4$. Esto significa que el enlace peptídico entre el glutamato y la cisteína se produce por el carbono γ (en vez de α que es lo usual) y que estos dímeros se repiten un cierto número de veces. En ese mismo artículo se les da el nombre de cadistinas, pero si $n=1$ la molécula es el glutatión y no se considera una de ellas. En 1985 se descubren los homólogos de las cadistinas en plantas, denominándose fitoquelatinas, nombre más extendido y general en la actualidad [5].

Entre diversos mutantes de *S. pombe* sensibles a Cd(II) , se encontraron algunos que no sintetizaban cadistina. De estos, unos poseían mutaciones en las enzimas implicadas en la síntesis del glutatión, la γ -glutamilcisteín sintetasa (ahora conocida como glutamato-cisteína ligasa) y la glutatión sintetasa. Esto corroboraba que también eran necesarias para la síntesis de las cadistinas, como era de suponer dada su similitud. Sin embargo, se encontraron mutantes incapaces de sintetizar cadistinas pero que tenían unos niveles totalmente silvestres de glutatión por lo que también debían existir enzimas específicas de la síntesis de cadistinas. No fue una sorpresa cuando poco después se identificaron en *Silene cucubalus* [6] y *S. pombe* [7] la enzima fitoquelatina sintasa, que mediante una transpeptidación permite obtener las fitoquelatinas. Sin embargo, no fue hasta 1999 cuando se comenzaron a aislar los genes que codifican para esta enzima. La mayoría se denominan *CAD1* y *PCS1* (en *S. pombe* es *pcs2* porque ya existía un *pcs1*), y están considerablemente conservados en plantas y levaduras [8].

3.2. Nanopartículas de CdS como Quantum Dots. Estudios en *S. pombe* y *C. glabrata*

Las cadistinas (o fitoquelatinas) tienen pues el papel de proteger al organismo de una alta concentración de ciertos iones metálicos mediante la acción quelante de estos péptidos contra los iones. Se propuso que el conjunto se estabiliza gracias al azufre [9] y que de hecho, los complejos que se forman debían consistir en un centro de CdS rodeado de los péptidos [10]. Desde muy pronto se supo los nanocristales de CdS en solución acuosa tenían características ópticas especiales [11]. Sin embargo, fue en 1989 cuando se publicó una carta en Nature que describía la biosíntesis de "cristalitos semiconductores cuánticos de CdS" en *S. pombe* y *Candida glabrata*, y donde por primera vez se propone su uso como Quantum dots, independien-

temente del estudio de la resistencia a Cd(II) de los organismos usados [12].

La formación de quantum dots en *S. pombe* y *C. glabrata* es bastante similar. En ambos casos se producen intracelularmente y con tamaños parecidos (1,8 y 2.0 nm, respectivamente, Figura 1) [13], ya que aunque extracelularmente también se producen unos agregados de cadmio no tienen las propiedades que deseamos [12]. Por lo tanto, para recuperar los nanocristales intracelulares debían romperse las células y separarlos del contenido celular junto con el que eran liberados al medio. No obstante, en 1996 se describe cómo en *S. pombe* sometiendo a las células a un proceso de congelación-descongelación se pueden extraer de forma selectiva las nanopartículas. Esto conlleva dos beneficios: que se purifica más fácilmente y que no destruimos las células de forma que pueden seguir produciendo [13]. De hecho, para que se induzca la formación de las nanopartículas también se ha observado que se debe añadir el cadmio al cultivo cuando este se encuentra en exponencial, y no en la fase lag o en la estacionaria [14]. También se han sintetizado estos QDs mediante cultivo en lote [14] y en lote alimentado [15] en un intento por maximizar su producción.

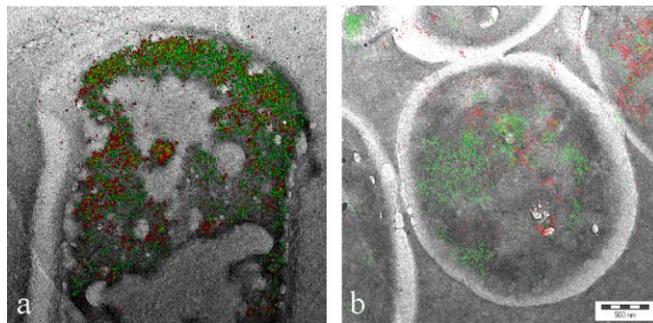


Figura 1. Imágenes EFTEM-ESI de *S. pombe* (a) y *C. glabrata* (b). El cadmio aparece en rojo y el azufre en verde. Hay una gran cantidad de cadmio en el interior celular que sin embargo, no es tóxico. Esto se debe a que está inmovilizado y recubierto. Como puede observarse, no hay grandes agregados debido a que lo que se obtienen son nanopartículas de no más de 2 nm [16]

3.3. Calcogenuros en otros organismos

La producción de quantum dots no es algo exclusivo de los organismos "modelo" que hasta ahora hemos comentado. Durante todo este tiempo se han identificado otros microorganismos que producen una variedad considerable de nanopartículas. Si seguimos centrándonos en los calcogenuros de cadmio iniciales encontramos que también se han producido quantum dots de CdS y CdTe en *Saccharomyces cerevisiae* [17], [18], de CdS y CdSe en el hongo *F. oxysporum* [19], [20] y de CdS, CdSe y CdTe en *E. coli* [21], [22], [23]. En las bacterias *Rhodospseudomonas palustris* [24], *Clostridium thermoaceticum* [25], *Klebsiella pneumoniae* [26], *Klebsiella aerogenes* [27] y *Gluconoacetobacter xylinus* [28] se han producido quantum dots de CdS con diferentes tamaños, formas y localizaciones. También en diversas plantas como *Linaria maroccana* [29]. Un caso curioso es el de diversas estirpes obtenidas de una muestra de suelo antártico, que eran capaces de producir estas

nanopartículas a baja temperatura [30]. El ejemplo más reciente es probablemente la producción de QDs de CdTe en gusanos de tierra [31].

4. PERSPECTIVAS FUTURAS

El estudio a nivel molecular de cómo las diferentes especies pueden producir QDs nos puede ofrecer vías de mejora que permitan controlar con precisión el tamaño, forma y estructura de las nanopartículas producidas, así como la optimización y escalado de la biosíntesis. Sin embargo, hasta que esto se consiga, la síntesis biológica no se plantea como una alternativa real a la síntesis organometálica o la acuosa. Además de los inconvenientes ya descritos, hay que tener en cuenta que el uso de microorganismos puede resultar complejo para personal inexperto en su cultivo y manipulación.

Por otro lado, a pesar de su aplicabilidad, se ha demostrado que los QDs basados en metales pesados son tóxicos también para las células en las que se usan: inducen respuestas a estrés que pueden alterar los resultados obtenidos durante el experimento o el diagnóstico. Al parecer, el hecho de que sean nanopartículas ya aporta un grado de citotoxicidad que *a priori* parece insalvable. Por ello se está poniendo mucho empeño en desarrollar nuevos QDs que al menos eliminen la citotoxicidad producida por los metales pesados. Que la síntesis biológica tenga cabida en este caso es algo aún por determinar.

AGRADECIMIENTOS

Gracias al profesor Dr. Víctor Álvarez Tallada por hacerme entender que una levadura puede enseñarnos mucho sobre la vida.

REFERENCIAS

- [1] S. Mussa Farkhani and A. Valizadeh, "Review: three synthesis methods of CdX (X = Se, S or Te) quantum dots," *IET nanobiotechnology*, vol. 8, no. 2, pp. 59–76, Jun. 2014.
- [2] N. Chen, Y. He, Y. Su, X. Li, Q. Huang, H. Wang, X. Zhang, R. Tai, and C. Fan, "The cytotoxicity of cadmium-based quantum dots," *Biomaterials*, vol. 33, no. 5, pp. 1238–1244, Mar. 2012.
- [3] A. Murasugi, A. Colony, and Y. Hayashi, "Cadmium-Binding Peptide Induced in Fission Yeast, *Schizosaccharomyces pombe*," *J. Biochem.*, vol. 90, no. 5, pp. 1561–1564, 1981.
- [4] N. Kondo, M. Isobe, T. Goto, A. Murasugi, and Y. Hayashi, "Structure of cadystin, the unit-peptide of cadmium-binding peptides induced in fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*," *Tetrahedron Lett.*, vol. 24, no. 9, pp. 925–928, 1983.
- [5] E. Grill, E. L. Winnacker, and M. H. Zenk, "Phytochelatin: the principal heavy-metal complexing peptides of higher plants," *Science*, vol. 230, no. 4726, pp. 674–676, Nov. 1985.
- [6] E. Grill, S. Löffler, E. L. Winnacker, and M. H. Zenk, "Phytochelatin, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific gamma-glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase)," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 86, no. 18, pp. 6838–6842, Sep. 1989.
- [7] Y. Hayashi, C. W. Nakagawa, N. Mutoh, M. Isobe, and T. Goto, "Two pathways in the biosynthesis of cadystins (γ EC)nG in the cell-free system of the fission yeast," *Biochem. Cell Biol.*, vol. 69, no. 2–3, pp. 115–121, Feb. 1991.
- [8] S. Clemens, E. J. Kim, D. Neumann, and J. I. Schroeder, "Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatin synthases from plants and yeast," *EMBO J.*, vol. 18, no. 12, pp. 3325–3333, 1999.
- [9] R. N. Reese and D. R. Winge, "Sulfide Stabilization of the Cadmium- γ -Glutamyl Peptide Complex of *Schizosaccharomyces pombe*," *J. Biol. Chem.*, vol. 263, no. 26, pp. 12832–12835, 1988.
- [10] C. T. Dameron and D. R. Winge, "Peptide-mediated formation of quantum semiconductors," *TIBTECH*, vol. 8, pp. 3–6, 1990.
- [11] R. Rossetti, S. Nakahara, and L. E. Brus, "Quantum size effects in the redox potentials, resonance Raman spectra, and electronic spectra of CdS crystallites in aqueous solution," *J. Chem. Phys.*, vol. 79, no. 2, pp. 1086–1088, 1983.
- [12] C. T. Dameron, R. N. Reeses, R. K. Mehra, A. R. Kortan, P. J. Carrol, M. L. Steigerwald, L. E. Brus, and D. R. Winge, "Biosynthesis of cadmium sulphide quantum semiconductor crystallites," *Nature*, vol. 338, pp. 596–597, 1989.
- [13] P. Williams, E. Keshavarz-Moore, and P. Dunnill, "Efficient production of microbially synthesized cadmium sulfide quantum semiconductor crystallites," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 19, no. 3, pp. 208–213, 1996.
- [14] P. Williams, E. Keshavarz-Moore, and P. Dunnill, "Production of cadmium sulphide microcrystallites in batch cultivation by *Schizosaccharomyces pombe*," *J. Biotechnol.*, vol. 48, no. 3, pp. 259–267, 1996.
- [15] P. Williams, E. Keshavarz-Moore, and P. Dunnill, "Schizosaccharomyces pombe fed-batch culture in the presence of cadmium for the production of cadmium sulphide quantum semiconductor dots," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 30, no. 3, pp. 354–362, 2002.
- [16] N. Krumov, S. Oder, I. Perner-Nochta, A. Angelov, and C. Posten, "Accumulation of CdS nanoparticles by yeasts in a fed-batch bioprocess," *J. Biotechnol.*, vol. 132, no. 4, pp. 481–6, Dec. 2007.
- [17] H. Huang, M. He, W. Wang, J. Liu, C. Mi, and S. Xu, "Biosynthesis of CdS quantum dots in *Saccharomyces cerevisiae* and spectroscopic characterization," *Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi*, vol. 32, no. 4, pp. 1090–1093, Apr. 2012.
- [18] H. Bao, N. Hao, Y. Yang, and D. Zhao, "Biosynthesis of biocompatible cadmium telluride quantum dots using yeast cells," *Nano Res.*, vol. 3, no. 7, pp. 481–489, 2010.

- [19] A. Ahmad, P. Mukherjee, D. Mandal, S. Senapati, M. I. Khan, R. Kumar, and M. Sastry, "Enzyme Mediated Extracellular Synthesis of CdS Nanoparticles by the Fungus, *Fusarium oxysporum*," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 124, no. 41, pp. 12108-12109, Oct. 2002.
- [20] S. A. Kumar, A. A. Ansary, A. Ahmad, and M. I. Khan, "Extracellular Biosynthesis of CdSe Quantum Dots by the Fungus, *Fusarium Oxysporum*," *J. Biomed. Nanotechnology*, vol. 3, no. 2, pp. 190-194, 2007.
- [21] R. Y. Sweeney, C. Mao, X. Gao, J. L. Burt, A. M. Belcher, G. Georgiou, and B. L. Iverson, "Bacterial Biosynthesis of Cadmium Sulfide Nanocrystals," *Chem. Biol.*, vol. 11, pp. 1553-1559, 2004.
- [22] Z. Yan, J. Qian, Y. Gu, Y. Su, X. Ai, and S. Wu, "Green biosynthesis of biocompatible CdSe quantum dots in living *Escherichia coli* cells," *Mater. Res. Express*, vol. 1, no. 1, p. 015401, Mar. 2014.
- [23] H. Bao, Z. Lu, X. Cui, Y. Qiao, J. Guo, J. M. Anderson, and C. M. Li, "Extracellular microbial synthesis of biocompatible CdTe quantum dots," *Acta Biomater.*, vol. 6, no. 9, pp. 3534-3541, Sep. 2010.
- [24] H. J. Bai, Z. M. Zhang, Y. Guo, and G. E. Yang, "Biosynthesis of cadmium sulfide nanoparticles by photosynthetic bacteria *Rhodospseudomonas palustris*," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 70, no. 1, pp. 142-146, Apr. 2009.
- [25] D. P. Cunningham and L. L. Lundie, "Precipitation of cadmium by *Clostridium thermoaceticum*," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 59, no. 1, pp. 7-14, 1993.
- [26] J. D. Holmes, D. J. Richardson, S. Saed, R. Evans-, D. A. Russell, and J. R. Sodeaul, "Cadmium-specific formation of metal sulfide 'Q-particles' by *Klebsiella pneumoniae*," *Microbiology*, vol. 143, pp. 2521-2530, 1997.
- [27] H. Aiking, H. Govers, and J. van 't Riet, "Detoxification of mercury, cadmium, and lead in *Klebsiella aerogenes* NCTC 418 growing in continuous culture," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 50, no. 5, pp. 1262-1267, Nov. 1985.
- [28] X. Li, S. Chen, W. Hu, S. Shi, W. Shen, X. Zhang, and H. Wang, "In situ synthesis of CdS nanoparticles on bacterial cellulose nanofibers," *Carbohydr. Polym.*, vol. 76, no. 4, pp. 509-512, 2009.
- [29] M. N. Borovaya, A. P. Naumenko, N. A. Matvieieva, Y. B. Blume, and A. I. Yemets, "Biosynthesis of luminescent CdS quantum dots using plant hairy root culture," *Nanoscale Res. Lett.*, vol. 9, no. 1, pp. 1-7, 2014.
- [30] C. Gallardo, J. P. Monras, D. O. Plaza, B. Collao, L. A. Saona, V. Duran-Toro, F. A. Venegas, C. Soto, G. Ulloa, C. C. Vasquez, D. Bravo, and J. M. Perez-Donoso, "Low-temperature biosynthesis of fluorescent semiconductor nanoparticles (CdS) by oxidative stress resistant Antarctic bacteria," *J. Biotechnol.*, vol. 187, pp. 108-115, Oct. 2014.
- [31] S. R., HocknerM., PanneerselvamA., LevittJ., BouillardJ-S., TaniguchiS., DaileyL-A., R. A. Khanbeigi, R. V., ThanouM., SuhlingK., Z. V., and GreenM., "Biosynthesis of luminescent quantum dots in an earthworm," *Nat Nano*, vol. 8, no. 1, pp. 57-60, Jan. 2013.



Rafael Hoyos Manchado es graduado en Biotecnología por la Universidad Pablo de Olavide. Actualmente cursa el primer curso del Máster en Biotecnología Sanitaria de dicha Universidad.