



UNIVERSIDAD DE OVIEDO

Departamento de Química Física y Analítica

Programa de Doctorado en Análisis Químico, Bioquímico
y Estructural y Modelización Computacional

**ESTRATEGIAS BIOANALÍTICAS AVANZADAS
PARA LA CARACTERIZACIÓN CUANTITATIVA
DE BIOMOLÉCULAS Y NANOPARTÍCULAS.**

TESIS DOCTORAL

LAURA CID BARRIO

Oviedo, 2020



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: Estrategias bioanalíticas avanzadas para la caracterización cuantitativa de biomoléculas y nanopartículas	Inglés: Advanced bioanalytical strategies for the quantitative characterization of biomolecules and nanoparticles
2.- Autor	
Nombre: LAURA CID BARRIO	DNI/Pasaporte/NIF
Programa de Doctorado: Análisis Químico, Bioquímico y Estructural y Modelización Computacional	
Órgano responsable: Centro Internacional de Postgrado	

RESUMEN (en español)

La cuantificación absoluta de biomoléculas es uno de los principales desafíos actuales en distintas ramas de las Ciencias de la Vida. Esta información es clave en clínica a la hora de llevar a cabo el diagnóstico y pronóstico de diversas patologías, revelando alteraciones del estado biológico de los organismos. De particular importancia es la cuantificación de posibles biomarcadores de ciertas enfermedades, entendiéndose como biomarcador cualquier molécula o compuesto químico que pudiera indicar la existencia de patologías o procesos relacionados con las mismas. Uno de los principales problemas a la hora de llevar a cabo dicha cuantificación se debe a los niveles extremadamente bajos de concentración en los que se encuentran los biomarcadores, especialmente en etapas tempranas de una enfermedad, momento en el que su determinación permitiría un diagnóstico precoz. Por tanto, existe una necesidad de desarrollar metodologías bioanalíticas con una sensibilidad suficiente para estas aplicaciones.

Los avances en la espectrometría de masas elemental (ICP-MS) la han convertido en una alternativa viable para la cuantificación absoluta de biomoléculas, ya sea a través de la monitorización de los elementos que se encuentran presentes de forma natural en su estructura, de los heteroátomos añadidos artificialmente, o de la unión de estos heteroátomos a elementos de reconocimiento (como es el caso de los inmunoensayos). Adicionalmente, el crecimiento exponencial que ha experimentado la nanotecnología ha dado lugar a la síntesis de distintos tipos de nanopartículas (NPs) con excelentes propiedades optoelectrónicas, que han sido ampliamente explotadas como marcas de extraordinario valor en el desarrollo de métodos analíticos para la cuantificación absoluta de biomoléculas.

Además de los biomarcadores proteicos bien reconocidos, las NPs en sí mismas pueden ser un marcador de contaminación medioambiental: dado el aumento de la utilización de estos materiales como aditivos en multitud de productos de uso cotidiano, la acumulación de NPs en el medioambiente es una realidad. Por tanto, se requieren metodologías analíticas para la determinación de los efectos tóxicos de las mismas en organismos vivos, así como para llevar a cabo una caracterización cuantitativa de la cantidad de NPs presentes en el medio.

En este contexto, la presente Tesis Doctoral se centra en el desarrollo de estrategias analíticas para la cuantificación absoluta de biomoléculas de interés biológico y de NPs inorgánicas empleando ICP-MS y técnicas ópticas.

En los Capítulos 1 y 2 se ha evaluado el potencial y las limitaciones del ICP-MS como herramienta para la cuantificación absoluta de biomoléculas y de NPs sin necesidad de patrones específicos. Para ello, se ha llevado a cabo la comparación estadística de los factores de respuesta de 13 biomoléculas distintas y unos Quantum Dots (QDs) de CdSe/ZnS, utilizando 3 sistemas de nebulización diferentes. Se ha evaluado también la influencia de las distintas condiciones de nebulización sobre los factores de respuesta de los analitos, como el flujo de gas de nebulización, la temperatura de la cámara de nebulización, el flujo de líquido portador o el contenido salino. Finalmente, gracias a la capacidad multielemental del ICP-MS, se han podido validar los resultados obtenidos para los factores de respuesta de una de las



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

biomoléculas, a través de la medida de otro heteroátomo presente en su estructura.

En el Capítulo 3 se ha desarrollado un inmunoensayo para la detección ultrasensible de un reconocido biomarcador de cáncer, el antígeno prostático específico (PSA), a través de una detección óptica sencilla y rápida mediante microscopía Confocal de reflexión, en el mismo soporte sólido sobre el que se realiza el inmunoensayo. Para conseguir esta sensibilidad se han empleado QDs de ZnS dopados con Mn como marcas ancladas a un anticuerpo específico, y se ha recurrido a la deposición catalítica de Au sobre la superficie de los QDs, obteniendo así unas partículas de mayor tamaño (en el rango de los μm) visibles en el microscopio.

En el Capítulo 4, se ha comparado el comportamiento citotóxico de NPs de HgSe solubles en medio acuoso frente a otras especies tóxicas de Hg ampliamente estudiadas (Metilmercurio y Hg inorgánico) tras su exposición en cultivos celulares humanos. Se ha determinado la viabilidad celular en dos líneas celulares tras su exposición a los tóxicos, evaluando la influencia de distintas concentraciones y tiempos de incubación. Gracias a la fluorescencia intrínseca de las NPs se ha estudiado su capacidad de penetrar en el interior de las células y su localización en el interior de las mismas. Por último, se ha determinado de forma cuantitativa la cantidad de Hg internalizada en función de la especie de Hg añadido en cada línea celular.

RESUMEN (en Inglés)

Absolute quantification of biomolecules is one of the main challenges in Life Sciences research nowadays. This information is required to understand system biology, evaluate compound toxicity, or discover of new biomarkers. Particularly, biomarker quantification at very low concentration levels in complex samples which could be used for early disease diagnosis, requires new bioanalytical methodologies that could achieve such high sensitivity

In this sense, new developments in elemental mass spectrometry (ICP-MS) have turned this technique into a real alternative for absolute biomolecule quantification via the detection of heteroatoms either present within their structure, artificially added directly to the biomolecules, or added to the recognition elements (as in immunoassays approaches). Additionally, the exponential developments in nanotechnology research has promoted an effort on the pursuit of new nanoparticles (NPs) which exhibit excellent optoelectronic properties. Such new NPs have been extensively used as tags for the development of new bioanalytical strategies for absolute biomolecule quantification.

In addition to well recognized biomarkers, NPs could be a potential biomarker in environmental analysis. NP accumulation in environmental samples already has been described due to their employ in a wide range of new products. For that reason, the potential cytotoxic effects of NPs in living organisms should be evaluated and a proper characterization of the number of NPs present in the biological media is required.

In this context, the general objective of this PhD Thesis is the development of bioanalytical strategies for absolute quantification of biomolecules and inorganic NPs through ICP-MS and optical detection methods.

In the first and second chapters, the capabilities of ICP-MS to provide absolute quantification of different biomolecules and NPs without the need of specific standards was evaluated. A statistical comparison of the ICP-MS response factors obtained for 13 different biomolecules and CdSe/ZnS QDs with those obtained for their corresponding inorganic standards was performed. Three different nebulization systems, operational conditions (nebulization flow rate, carrier flow rate, spray chamber temperature or salt content) and a wide range of concentration was evaluated.

In the third chapter, an ultrasensitive immunoassay for biomarker detection employing Prostate Specific Antigen (PSA) as model protein was developed. A simple and fast detection based on reflection confocal microscopy, in the same solid surface where the immunoassay was performed, has been carried out. To achieve such ultrasensitive detection, Mn doped ZnS QDs were used as tags and an amplification step based on the catalytic deposition of gold onto QDs surface, acting as catalytic seeds, was used. As consequence of this amplification process, enlarged particles were formed in the μm range, allowing their detection by confocal microscopy.



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

In the fourth chapter, a critical comparison of the differential toxic effects of the most common Hg species found in nature (inorganic and methylmercury) with water-stabilized HgSe NPs was carried out. The cytotoxicity induced by these Hg species was evaluated using two human cell lines (HeLa and HEK 293) and different incubation conditions (Hg concentration and exposure time). Additionally, quantitative determination of Hg uptake was determined using elemental detection and intracellular location was achieved using the intrinsic fluorescence of HgSe NPs.

**SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO
EN ANÁLISIS QUÍMICO, BIOQUÍMICO Y ESTRUCTURAL Y MODELIZACIÓN
COMPUTACIONAL**

TABLA DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE FIGURAS	1
ÍNDICE DE TABLAS	1
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	4
1. Retos en la cuantificación absoluta de biomoléculas	3
2. Metodologías de cuantificación de biomoléculas.....	5
2.1. Cuantificación relativa.....	6
2.2. Cuantificación absoluta de biomoléculas.....	9
3. Cuantificación absoluta de biomoléculas empleando espectrometría de masas elemental.....	11
3.1. La espectrometría de masas elemental como herramienta para la cuantificación absoluta de biomoléculas.....	11
3.2. Estrategias de cuantificación absoluta de biomoléculas empleando MS elemental.....	20
4. Inmunoensayos con marcaje elemental	29
4.1. Tipos generales de inmunoensayo	30
4.2. Tipos de marcaje elemental	33
4.3. Nanopartículas como marcas en inmunoensayos.....	35
4.4. Amplificación de la señal analítica en inmunoensayos basada en NPs	38
5. Nanopartículas como marcadores de la contaminación ambiental	43
5.1. Nanopartículas como diana en análisis ambiental	44

5.2. Estrategias para evaluar la toxicidad de Nanopartículas	45
Referencias bibliográficas	48
OBJETIVOS GENERALES.....	57
CAPÍTULO 1: Evaluación crítica del potencial y las limitaciones de la	
espectrometría de masas elemental para la cuantificación absoluta de	
biomoléculas empleando patrones genéricos	
1. Introducción	67
1.1. El ICP-MS como herramienta para la cuantificación absoluta	
de biomoléculas	67
1.2. Importancia de la medida de S	70
2. Objetivos	72
3. Experimental	73
3.1. Selección de los analitos.....	73
3.2. Instrumentación.....	75
3.3. Procedimientos.....	76
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	94
4.1. Comparación crítica de los factores de respuesta en ICP-MS	
utilizando rectas de calibrado.....	94
4.2. Evaluación de distintas condiciones de operación.....	108
4.3. Medida simultánea de P y S en la proteína β -caseína.....	116
5. Conclusiones.....	119
CAPÍTULO 2: Evaluación del potencial y las limitaciones del ICP-MS para la	
cuantificación de Nanopartículas empleando patrones genéricos	
1. Introducción	127
1.1. El ICP-MS como herramienta de caracterización de	
Nanopartículas	127

2.	Objetivos.....	132
3.	Experimental	133
3.1.	Selección de los analitos	133
3.2.	Instrumentación.....	134
3.3.	Procedimientos.....	135
4.	Resultados y discusión.....	142
4.1.	Comparación de los factores de respuesta obtenidos para los QDs empleando un nebulizador de consumo total (TCN)	142
4.2.	Comparación de los factores de respuesta obtenidos para los QDs empleando nebulizadores de flujo normal.....	145
4.3.	Comparación global de los factores de respuesta.....	149
5.	Conclusiones.....	151

CAPÍTULO 3: Deposición catalítica de oro para el desarrollo de un inmunosensor óptico ultrasensible para la detección de Antígeno Prostático Específico		157
---	--	-----

1.	Introducción	159
1.1.	Nanopartículas como marcas en inmunoensayos.....	159
1.2.	Técnicas de amplificación basadas en NPs.....	160
2.	Objetivos.....	162
3.	Experimental	163
3.1.	Instrumentación.....	163
3.2.	Procedimientos.....	166
4.	Resultados y discusión.....	175
4.1.	Caracterización de los NPs sintetizadas y sus bioconjugados	

4.2. Deposición de oro sobre la superficie de Mn-ZnS QDs y AuNPs como semillas catalíticas.....	180
4.3. Optimización del proceso de amplificación de las nanoestructuras.....	187
4.4. Desarrollo del inmunoensayo para la detección de PSA mediante deposición catalítica de Au y Microscopía Confocal.....	195
5. Conclusiones.....	201

CAPÍTULO 4: Evaluación de los efectos citotóxicos y determinación cuantitativa de la incorporación celular nanopartículas de Seleniuro de Mercurio (HgSe NPs) en líneas celulares humanas..... 205

1. Introducción.....	207
1.1. Importancia de la determinación de especies de Hg.....	207
1.2. Antagonismo Se-Hg.....	208
1.3. Citotoxicidad inducida por NPs.....	209
2. Objetivos.....	211
3. Experimental y reactivos.....	212
3.1. Instrumentación.....	212
4. Resultados y Discusión.....	219
4.1. Síntesis y caracterización de las NPs de HgSe.....	219
4.2. Localización intracelular de las NPs de HgSe.....	220
4.3. Estudio de liberación de Hg ²⁺ de la superficie de las NPs de HgSe en medio de cultivo.....	223
4.4. Estudio de citotoxicidad de las distintas especies de Hg....	225
4.5. Determinación cuantitativa de la incorporación celular de Hg	232
5. Conclusiones.....	237

CONCLUSIONES GENERALES..... 243

RESUMEN DE PUBLICACIONES.....	249
-------------------------------	-----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación del dinamismo del proteoma expresado en abundancia de diferentes proteínas en sangre	4
Figura 2. Estrategias de cuantificación de proteínas.....	5
Figura 3. Estrategias de cuantificación absoluta de proteínas empleando ICP-MS.....	13
Figura 4. Esquema de la reacción de yodación entre el tetraborato de yodobispiridina y los residuos de tirosina.....	18
Figura 5. Estructura de los complejos quelatantes, a)DTPA y b) DOTA.....	19
Figura 6. Procedimiento empleado para la obtención del cromatograma de flujo másico a partir del cromatogramama de intensidades y la ecuación de la ID en línea.....	28
Figura 7. Esquema de la estructura básica de una inmunoglobulina.....	29
Figura 8. Clasificación de los inmunoensayos según su formato.....	31
Figura 9. Esquema de los diseños de inmunoensayo más utilizados basados en marcaje con NPs y detección son cp-ICP-MS. Reproducido de Hu <i>et al.</i> ⁷¹	40
Figura 10. Esquema del desarrollo de un inmunoensayo en fase heterogénea para la detección ultrasensible de PSA empleando Mn-ZnS QDs y amplificación elemental con deposición química de oro.....	42
Figura 11. Configuración ICP-MS/MS para la medida de ³² S libre de interferencias.....	71
Figura 12. Estructura de los compuestos de S seleccionados.....	74
Figura 13. Diagrama de la configuración instrumental para la comparación de factores de respuesta de biomoléculas de azufre en ICP-MS empleando dilución isotópica en línea (IDMS).....	77
Figura 14. Diagrama obtenido para el patrón inorgánico de S empleando el nebulizador concéntrico.....	79
Figura 15. Diagrama de la estructura de las partículas de la fase estacionaria de una columna tipo coreshell.....	81

Figura 16. Cromatogramas obtenidos para las distintas biomoléculas de S mediante HPLC capilar (fase reversa) y detección mediante ICP-MS/MS.....	82
Figura 17. Cuantificación de S en los calibrados de FIA mediante IDMS en línea.	88
Figura 18. Cromatograma obtenido para la proteína β -caseína mediante capHPLC –ICP-MS/MS.....	91
Figura 19. Cuantificación de P en la disolución de β -caseína mediante calibración externa.	93
Figura 20. Curvas de calibrado obtenidas para cada uno de los 14 compuestos de S estudiados utilizando el micronebulizador de consumo total.	95
Figura 21. Concentración experimental de S obtenida para todos los compuestos de S ensayados a los distintos niveles de concentración representados frente a la concentración teórica de S en cada punto utilizando un micronebulizador de consumo total (TCN).....	97
Figura 22. Curvas de calibrado obtenidas para cada uno de los 14 compuestos de S estudiados utilizando A) nebulizador concéntrico y B) Nebulizador de flujo cruzado.	99
Figura 23. Factores de respuesta relativos (%) obtenidos utilizando el nebulizador concéntrico (azul), nebulizador de flujo cruzado (naranja) y TCN (gris) para todas las biomoléculas estudiadas.....	104
Figura 24. Evolución de la señal en ICP-MS para ^{32}S (rombos) procedente del S natural de la BSA y ^{34}S (círculos) procedente del trazador enriquecido obtenidas para una disolución de BSA con un nebulizador concéntrico con la modificación del flujo de gas de nebulización.	109
Figura 25. Factores de respuesta relativos (%) obtenidos para una disolución de BSA empleando un nebulizador concéntrico con distintos flujos de gas de nebulización.....	110
Figura 26. Evolución de la señal en ICP-MS para ^{32}S (rombos) procedente del S natural de la BSA y ^{34}S (círculos) procedente del trazador enriquecido obtenidas para una disolución de BSA con un nebulizador concéntrico con la modificación del flujo de líquido.	111

Figura 27. Factores de respuesta relativos (%) obtenidos para una disolución de BSA empleando un nebulizador concéntrico con distintos flujos de líquido.	111
Figura 28. Factores de respuesta relativos (%) obtenidos para una disolución de BSA empleando un nebulizador concéntrico con distintas temperaturas de la cámara de nebulización.	112
Figura 29. Factores de respuesta relativos (%) obtenidos para la disolución de BSA con diferente contenido salino desde 0 a 1M de dos sales distintas: acetato de amonio (barras negras), TRIS-HCl (barras blancas).	114
Figura 30. Esquema de la estructura de los QDs de CdSe/ZnS recubiertos con polímero anfífilico.	133
Figura 31. Procedimiento de síntesis de los QDs de CdSe/ZnS recubiertos de polímero anfífilico.	135
Figura 32. Diagrama de la configuración instrumental empleada para la determinación de los factores de respuesta de Se en QDs de CdSe/ZnSe mediante IDMS en línea e ICP-MS.	138
Figura 33. Diagrama obtenido para el patrón inorgánico de Se empleando un nebulizador concéntrico. La línea naranja corresponde a la señal de ⁸⁰ Se procedente de Se presente en los QDs y la línea verde corresponde a la señal de ⁷⁷ Se procedente del trazador añadido en línea tras la inyección.	140
Figura 34. Curvas de calibrado obtenidas para los QDs de CdSe/ZnS recubiertos de polímero y el patrón inorgánico de Se utilizando el micronebulizador de consumo total.	142
Figura 35. Concentración experimental obtenida de Se para las 2 especies analizadas a los distintos niveles de concentración representados frente a la concentración teórica de Se en cada punto utilizando un nebulizador de consumo total (TCN).	144
Figura 36. Curvas de calibrado obtenidas para los QDs de CdSe/ZnS recubiertos de polímero y el patrón inorgánico de Se utilizando: A) nebulizador concéntrico y B) nebulizador de flujo cruzado.	146
Figura 37. Definición de los parámetros instrumentales t_d y t_g en la medida de fosforescencia.	163

Figura 38. Diagrama del funcionamiento de un equipo de microscopía confocal.	165
Figura 39. Esquema del procedo de síntesis de QDs de Mn-ZnS recubiertos de L-Cisteína.	167
Figura 40. Esquema del procedimiento de intercambio de ligandos de la superficie de los QDs de Mn-ZnS con DHLA.	168
Figura 41. Esquema de la reacción de bioconjugación de los Mn-ZnS QDs con el anticuerpo monoclonal via química de la carbodiimida.	170
Figura 42. Esquema del proceso de bioconjugación por adsorción del Anticuerpo sobre la superficie de las AuNPs.	171
Figura 43. Diagrama del inmunoensayo tipo sándwich para la detección de PSA empleando la deposición catalítica de oro sobre la superficie de las NPs utilizadas como marcas.	172
Figura 44. Espectros de fosforescencia de los QDs de ZnS dopados con Mn recubiertos con DHLA tras el intercambio de ligandos. Espectro de excitación (línea negra) y espectro de emisión (línea gris).	175
Figura 45. Imágenes de HR-TEM de los QDs de Mn-ZnS recubiertos con DHLA.	176
Figura 46. Espectros de fosforescencia de emisión obtenidos para: los QDs de Mn-ZnS libres (línea negra continua) y para el bioconjugado Ab:QDs (línea gris de puntos) con una longitud de onda de excitación de 290 nm.	178
Figura 47. Espectro de absorbancia de las AuNPs recubiertas de citrato178	178
Figura 48. Imagen de HR-TEM de las AuNPs recubiertas de citrato179	179
Figura 49. Espectros de absorbancia de las AuNPs (línea negra continua) y del bioncojugado Ab:AuNPs (línea gris de puntos)179	179
Figura 50. Imágenes de microscopía confocal de pequeñas áreas de los pocillos contenidos en el portaobjetos obtenidas después del inmunoensayo completo para la detección de PSA seguido de la deposición catalítica de Au para utilizando dos tips de semillas catalíticas: (a-b) AuNPs y (c-d) Mn-ZnS QDs..181	181
Figura 51. Imágenes de microscopía confocal para a) AuNPs y c) QDs de Mn-ZnS tras llevar a cabo el inmunonensayo completo de PSA y la correspondiente	

deposición catalítica de Au. Distribución de tamaños de las nanoestructuras amplificadas b) AuNPs y d) QDs de Mn-ZnS.....	182
Figura 52. Imágenes de microscopía confocal de pequeñas áreas de los pocillos obtenidas después del inmunoensayo completo seguido de la deposición catalítica de Au para muestras con un contenido de PSA de 10 pg mL ⁻¹ . Las imágenes se tomaron en distintas zonas del mismo pocillo de los dos tipos de semillas estudiadas: a) AuNPs y b) QDs de Mn-ZnS.....	184
Figura 53. Imágenes de microscopía confocal de pequeñas áreas de los pocillos obtenidas después del inmunoensayo completo seguido de la deposición catalítica de Au con distintas concentraciones de PSA y agentes de bloqueo.	186
Figura 54. Imágenes de microscopía confocal de pequeñas áreas de los pocillos obtenidas después del inmunoensayo completo seguido de la deposición catalítica de Au con dos concentraciones de PSA ,variando la concentración de hidroxilamina durante el proceso de amplificación.....	189
Figura 55. Imágenes de microscopía confocal de pequeñas áreas de los pocillos obtenidas después del inmunoensayo completo seguido de la deposición catalítica de Au con dos concentraciones de PSA ,variando la concentración de NaAuCl ₄ durante el proceso de amplificación	190
Figura 56. Número de estructuras de Au amplificadas sobre la superficie de los QDs de Mn.ZnS medidas tras el desarrollo del inmunonesayo para la detección de PSA en dos concentraciones, utilizando diferentes condiciones de amplificación: a) variando la concentración de Hidroxilamina y b) variando la concentración de NaAuCl ₄	191
Figura 57. Imágenes de microscopía confocal de pequeñas áreas de los pocillos obtenidas después del inmunoensayo completo seguido de la deposición catalítica de Au, variando el tiempo de amplificación.....	193
Figura 58. Imágenes de microscopía confocal de pequeñas áreas de los pocillos obtenidas después del inmunoensayo completo con la correspondiente deposición catalítica de Au sobre la superficie de los QDs de Mn-ZnS con distintas concentraciones de PSA.	196

Figura 59. Curva de respuesta del inmunoensayo obtenida tras el procesado de imágenes de microscopía confocal de las estructuras de oro amplificadas con diferentes concentraciones de PSA, representada en escala logarítmica.	197
Figura 60. Imágenes de microscopía confocal de pequeñas áreas de los poicillos obtenidas tras el inmunoensayo y la deposición catalítica de Au utilizando las condiciones óptimas para dos muestras de PSA: a) 0 pg mL ⁻¹ y b) 10 pg mL ⁻¹ , ambas en presencia de un elevado contenido de proteína (BSA 1%).	199
Figura 61. Esquema del proceso de síntesis de las NPs de HgSe insolubles....	213
Figura 62. Reducción de la sal de tretrazolio (amarillo) a formazan (azul) en presencia de enzimas reductasas mitocondriales.	216
Figura 63. A) Imagen de las NPs de HgSe recubiertas con DHLA obtenidas mediante HR-TEM. b) Histograma de la distribución de tamaños obtenida.	220
Figura 64. Espectro de emisión de las NPs de HgSe recubiertas con DHLA (línea verde) y espectro de absorbancia de las NPs (línea azul).....	220
Figura 65. Imágenes de campo abierto de las células control (a) HeLa y (b) HEK 293, que no fueron expuestas a las NPs de HgSe e imágenes de microscopía confocal de fluorescencia de las células (b-d) HeLa y (f-h) HEL 293 tras su exposición durante 24 horas a las NPs de HgSe estabilizadas en medio acuoso.	222
Figura 66. Fracción de Hg correspondiente a las NPs de HgSe obtenido tras la incubación de las NPs durante diferentes tiempos de incubación en medio de cultivo (DMEM)..	224
Figura 67. Valores de viabilidad celular (%) obtenidos para las células HeLa (a) y HEK 293 (b) tras su incubación a 37°C con atmósfera controlada de 5% CO ₂ durante 24 h con MeHg ⁺ (rojo), Hg ²⁺ (azul) y las NPs de HgSe (negro) con diferentes concentraciones de Hg: 0, 1, 5, 10, 50 y 100 μM.	226
Figura 68. Valores de viabilidad celular (%) obtenidos para las células HeLa (a) y HEK 293 (b) tras su incubación a 37°C con atmósfera controlada de 5% CO ₂ durante 48 h con MeHg ⁺ (rojo), Hg ²⁺ (azul) y las NPs de HgSe (negro) con diferentes concentraciones de Hg: 0, 1, 5, 10, 50 y 100 μM.	228
Figura 69. Valores de viabilidad celular (%) obtenidos para las células (a,b) HeLa y (c,d) HEK 293 tras su incubación a 37 °C y atmósfera controlada de 5% de CO ₂	

durante (a,c) 24 y (b,d) 48 h con NPs de HgSe (color negro), Hg^{2+} + 5 μM Selenito (color azul) y Hg^{2+} + 50 μM Selenito (color rojo) a diferentes concentraciones Hg: 1, 5, 10, 50 y 100 μM 230

Figura 70. Valores de viabilidad celular (%) obtenidos para las células (a,b) HeLa y (c,d) HEK 293 tras su incubación a 37 °C y atmósfera controlada de 5% de CO_2 durante (a,c) 24 y (b,d) 48 h con NPs de HgSe (color negro), MeHg^+ + 5 μM Selenito (color azul) y MeHg^+ + 50 μM Selenito (color rojo) a diferentes concentraciones Hg: 1, 5, 10, 50 y 100 μM 231

Figura 71. Incorporación celular de Hg obtenida mediante ICP-MS/MS tras la exposición a 1 μM de Hg en forma de Hg^{2+} , MeHg^+ y NPs de HgSe de los cultivos celulares humanos de HeLa y HEK 293. El Hg intracelular está indicado en las barras de color naranja, mientras que el Hg que no se incorporó está representado en las barras de color azul. 233

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Técnicas inmunoquímicas en función de la marca empleada.....	33
Tabla 2. Tamaño y secuencia de aminoácidos de los péptidos seleccionados. .	73
Tabla 3. Condiciones instrumentales empleadas para la comparación de los factores de respuesta de compuestos de S mediante FIA-ICP-MS e IDMS.....	78
Tabla 4. Condiciones cromatográficas empleadas para el análisis de las biomoléculas de S mediante fase reversa con una columna C4 y HPLC capilar e ICP-MS.....	80
Tabla 5. Pureza en masa obtenida para los distintos compuestos de S mediante IDA.....	85
Tabla 6. Comparación estadística de los valores de las pendientes obtenidas para el patrón inorgánico y los compuestos estudiados utilizando un micronebulizador de consumo total (TCN)..	96
Tabla 7. Comparación estadística de los valores de las pendientes obtenidas para el patrón inorgánico y los compuestos estudiados utilizando el nebulizador concéntrico.....	102
Tabla 8. Comparación estadística de los valores de las pendientes obtenidas para el patrón inorgánico y los compuestos estudiados utilizando el nebulizador de flujo cruzado.....	103
Tabla 9. Tamaño, carácter hidrofóbico y factores de respuesta relativos de los péptidos y proteínas estudiados.....	106
Tabla 10. Factores de respuesta relativos (%) obtenidos en ICP-MS para las disoluciones de BSA intacta y digerida empleando un nebulizador concéntrico y un micronebulizador de consumo total.	115
Tabla 11. Valores de la regresión obtenidos para las curvas de calibrado (n=10 puntos) en la determinación de P en β -caseína utilizando los nebulizadores TCN, concéntrico y flujo cruzado.....	117

Tabla 12. Factores de respuesta relativos (%) obtenidos en las determinaciones de S y P para las disoluciones de β -caseína en ICP-MS utilizando los nebulizadores TCN, concéntrico y de flujo cruzado.....	118
Tabla 13. Condiciones instrumentales empleadas para la comparación de los factores de respuesta de compuestos de S mediante FIA-ICP-MS e IDMS.....	139
Tabla 14. Comparación estadística de los valores de las pendientes obtenidas para el patrón inorgánico y los compuestos estudiados utilizando un micronebulizador de consumo total (TCN).....	143
Tabla 15. Comparación estadística de los valores de las pendientes obtenidas para el patrón inorgánico y los compuestos estudiados utilizando un nebulizador concéntrico y de flujo cruzado.	147
Tabla 16. Factores de respuesta relativos (%) obtenidos utilizando los tres nebulizadores para los QDs de CdSe/ZnS recubiertos de polímero. a.	150
Tabla 17. Condiciones de Medida del ICP-MS/MS para la determinación del %Mn y la concentración de los QDs de Mn-ZnS.....	164

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

2D-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida en dos dimensiones (“*Two dimensional polyacrilamide gel electrophoresis*”)

Ab: Anticuerpo

Ag: Antígeno

AQUA: “*Absolute Quantification*”

BSA: Albúmina de Suero Bovino (“*Bovine Serum Albumin*”)

CDRs: Regiones determinantes de complementariedad (“*Complementarity-Determining Regions*”)

CE: Electroforesis capilar (“*Capillary electrophoresis*”)

Cys: Cisteína

DMEM: “*Dulbecco’s Modified Eagle’s – Medium*”

EIA: Enzima inmunoensayo (“*Enzyme Immunoassay*”)

ELISA: Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (“*Enzyme-linked immunosorbent assay*”)

ESI: Ionización por electrospray (“*Electrospray ionization*”)

FIA: Fluoroimunoensayos (“*Fluoroimmunoassays*”)

FRET: Transferencia de energía de resonancia de Foster (“*Foster Resonance Energy Transfer*”)

His: Histidina

HR-TEM: Microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (“*High Resolution Transmission Electron Microcopy*”)

ICP: Plasma de acoplamiento inductivo (“*Inductively coupled plasma*”)

ICAT: “*Isotope-Coded Affinity Tags*”

ID: Dilución isotópica (“*Isotope Dilution*”)

iTRAQ: “*Isotope Tags for Relative and Absolute Quantification*”

Lys: Lisina

MALDI: Ionización Láser asistida por la matriz (*"Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization"*)

Met: Metionina

MS: Espectrometría de masas (*"Mass spectrometry"*)

NMs: Nanomateriales

NPs: Nanopartículas

PSA: Antígeno de Próstata Específico (*"Prostate Specific Antigen"*)

Q: Cuadrupolo

QconCAT: *"Quantification Concatamer"*

SEC: Cromatografía de exclusión por tamaños (*"Size Exclusion Chromatography"*)

SERS: Espectroscopía Raman con superficie mejorada (*"Surface Enhanced Raman Spectroscopy"*)

sp: *single particle*

SPR: Resonancia de plasmón superficial (*"Surface Plasmon Reference"*)

QDs: Quantum Dots

TCN: Nebulizador de Consumo Total (*"Total Consumption Nebulizer"*)

TMT:

TOP: Trioctilfosfina

TOPO: Óxido de trioctilfosfina

TRFIA: Fluoroimmunoensayo de tiempo resuelto (*"Time Resolved Fluoroimmunoassay"*)

Tyr: Tirosina

XRD: Difracción de rayos X (*"X Ray Diffraction"*)

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. Retos en la cuantificación absoluta de biomoléculas

La cuantificación absoluta de biomoléculas relevantes como proteínas, ADN, cofactores o enzimas, entre otras; se ha convertido en un requisito esencial para la comprensión de los sistemas biológicos, ya que la mayor parte de los cambios experimentados en dichos sistemas se atribuyen a alteraciones en los niveles de expresión de estas biomoléculas, dependiendo de las condiciones fisiológicas en las que se encuentren.¹

Dentro de los diversos campos englobados en el estudio de los sistemas biológicos, la Proteómica ha sido uno de los más relevantes. La proteómica se centra en el estudio del proteoma, es decir, es el estudio del conjunto de proteínas presentes en un sistema biológico en un momento dado. Este estudio del proteoma es complejo, puesto que, a diferencia del genoma, este es dinámico. Esto quiere decir, que los niveles de expresión de proteínas que se encuentran en un organismo, varía en función de las condiciones fisiológicas en las que se encuentre.^{2,3} Por lo tanto, el estudio del proteoma, proporciona información de crucial importancia para el diagnóstico y el pronóstico de diversas patologías, revelando alteraciones en el estado biológico normal de los organismos o incluso, determinando posibles biomarcadores de enfermedades. En este contexto, es importante destacar que la FDA-NIH Biomarker Working Group (Food and Drug Administration) ha definido como biomarcador a cualquier característica medible como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patogénicos o respuestas a una exposición o intervención incluyendo intervenciones terapéuticas.^{4,5}

Uno de los retos más importantes hoy en día en proteómica es debido al enorme rango dinámico de concentraciones en las que se encuentran las especies en una muestra dada. Esta limitación está muy bien ilustrada en las muestras de suero o sangre, el tipo de muestra biológica más empleado como primer cribado, puesto que, además de ser una muestra fácil de obtener, ofrece información relevante para el diagnóstico de diversas enfermedades, la

Introducción General

evolución de las mismas y efectividad de los tratamientos empleados.^{3,6} Por lo tanto, el mapeo o estudio de todo el panel de biomoléculas presentes en sangre, requiere del uso de técnicas sensibles que permitan determinar una única proteína o varias proteínas seleccionadas. Como ya se ha mencionado, la dificultad de este tipo de muestras biológicas radica en el amplio rango de concentraciones en el que se pueden encontrar las biomoléculas de interés. En este sentido, la proteína más abundante en el plasma sanguíneo es la Albúmina (55%), pero además de ella existen multitud de especies en mucha menor concentración, como se puede ver claramente en la Figura 1, donde se representa la abundancia de diversas biomoléculas presentes en muestras de plasma sanguíneo. Por lo tanto, se hace notable la necesidad de desarrollar técnicas sensibles que permitan la cuantificación absoluta de biomarcadores y, además, con un amplio rango lineal, puesto que la abundancia de estos en las muestras es muy dispar, dependiendo del analito o analitos que se deseen determinar de forma simultánea.^{7,8}

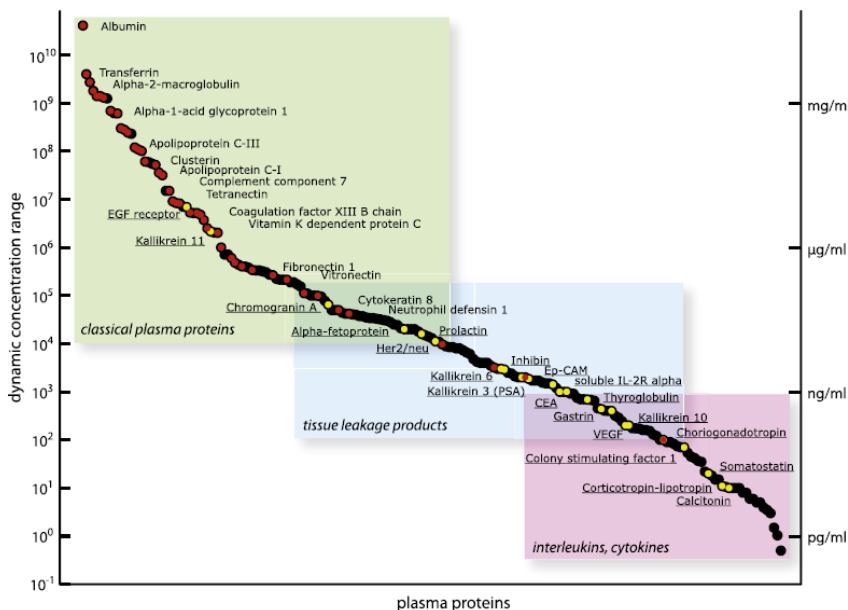


Figura 1. Representación del dinamismo del proteoma expresado en abundancia de diferentes proteínas en sangre clasificadas según Anderson *et al*⁷ en proteínas clásicas del plasma, productos de liberación de tejidos y citoquinas (o moléculas señal). La abundancia se expresa en forma de Log de la concentración (eje izquierdo) y rango de concentraciones (eje derecho). Adaptado de Sheiss *et al*.⁸

2. Metodologías de cuantificación de biomoléculas

La cuantificación de biomoléculas se puede llevar a cabo empleando, principalmente, dos estrategias. En la Figura 2 se recoge un esquema de las estrategias de cuantificación de proteínas más importantes.

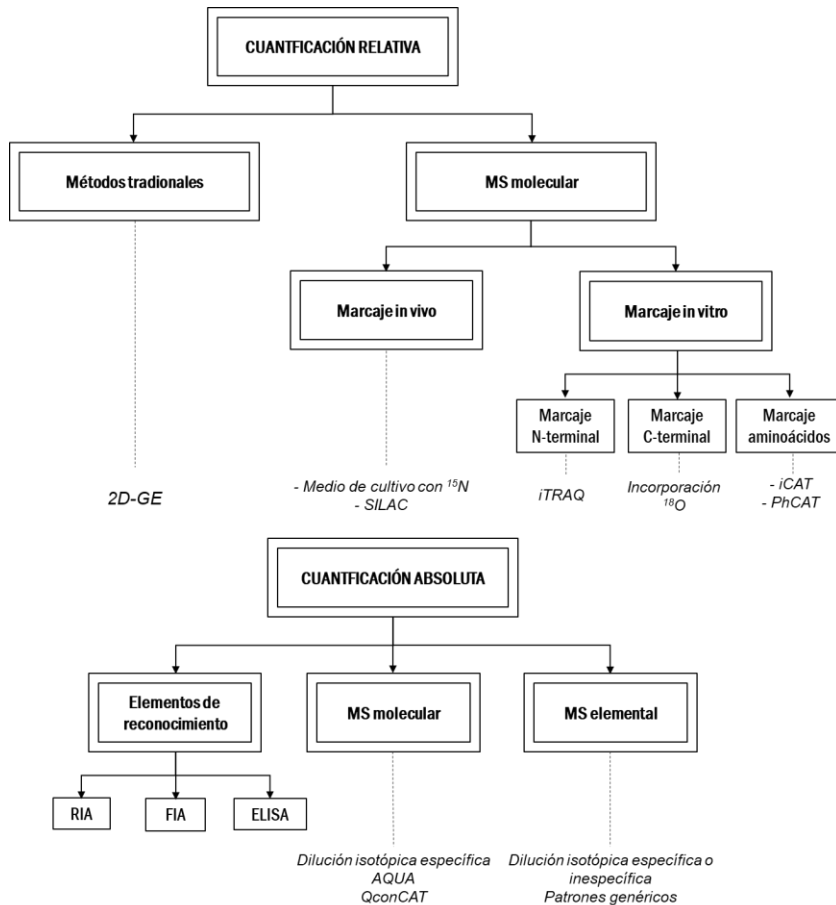


Figura 2. Estrategias de cuantificación de proteínas.

En la primera de las estrategias se lleva a cabo una cuantificación “relativa”. Esta es la estrategia más empleada y está basada en el estudio de la variación de la concentración de las biomoléculas de interés entre dos sistemas celulares diferentes, uno de ellos considerado de referencia. Este es el caso por ejemplo de

un sistema sano y otro enfermo; es decir, la cuantificación relativa se basa en la medida del cambio en los niveles de expresión de las biomoléculas de interés entre dos estados diferentes. Por otra parte, la cuantificación se puede llevar a cabo de manera “absoluta”. En este tipo de cuantificación se determina la cantidad total de la biomolécula diana en una muestra problema, es decir la concentración de la misma en el sistema biológico. A continuación, se desarrollan de manera más detallada ambos tipos de cuantificación.

2.1. Cuantificación relativa

El primero de los tipos de cuantificación utilizados es la cuantificación relativa de biomoléculas, cuya base radica en la comparación de los niveles de expresión de las biomoléculas entre dos (o más) estados. Estas estrategias abarcan desde el empleo de técnicas convencionales, como la separación de electroforesis en gel, tras el correspondiente marcaje de las proteínas de interés con colorantes o fluoróforos que permitan su visualización, hasta el empleo de técnicas más complejas, como la espectrometría de masas (MS).

Tradicionalmente, la técnica más empleada ha sido la separación en geles de poliacrilamida, normalmente utilizando dos dimensiones (2D-PAGE), donde la cuantificación se lleva a cabo a través de la comparación de la intensidad de las bandas, que corresponden a las proteínas presentes en la muestra, observadas en el gel. Si bien esta técnica es capaz de resolver un gran número de proteínas, está limitada al estudio de las especies más abundantes, dificultando el estudio de proteínas en baja concentración. Adicionalmente, esta estrategia presenta normalmente ligeras variaciones en la localización de las bandas de las proteínas, lo que puede dificultar la comparación. Por otra parte, se puede asociar con técnicas de espectrometría de masas molecular, lo que permite la identificación de las distintas especies.⁹

Alternativamente, la reciente evolución de la espectrometría de masas (MS), ha permitido el auge del desarrollo de nuevas metodologías de cuantificación de biomoléculas, llegando ésta a convertirse en la técnica de referencia.² La

espectrometría de masas, se basa en la medida de relaciones masa/carga (m/z) de los iones formados en la fuente, ya sean moleculares o elementales, de los analitos de interés, permitiendo así el análisis de biomoléculas. La elevada precisión de la medida, que permite discernir entre moléculas con tamaños semejantes y el desarrollo de la espectrometría de masas en tándem (MS/MS), que permite la obtención de información estructural a partir de la fragmentación de los iones moleculares de los analitos, han convertido a la espectrometría de masas en la técnica por excelencia para la determinación de biomoléculas.²

Estas estrategias basadas en MS, requieren de una separación previa, que permita el aislamiento de las especies dentro de una muestra compleja, y su posterior análisis mediante espectrometría de masas molecular utilizando habitualmente, fuentes de ionización débiles como Electro spray (ESI) o Desorción/ionización láser asistida por la matriz (MALDI). Las técnicas de separación más empleadas son la electroforesis capilar (CE) y la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)

Sin embargo, la MS molecular no es directamente un método cuantitativo, puesto que la relación entre la cantidad de biomolécula y la señal obtenida en la fuente de ESI o MALDI es compleja, debido a la diferencia en la eficiencia de nebulización de las especies y la gran influencia de otras especies o sales presentes en la matriz sobre la señal obtenida.¹⁰ Por este motivo, para llevar a cabo una cuantificación empleando espectrometría de masas molecular, es necesario el uso de patrones específicos de las especies a determinar. Debido a esta limitación, muchos de los métodos desarrollados para cuantificación de proteínas basados en MS molecular son precisamente relativos.

En este sentido, el marcaje con isótopos estables permite la cuantificación, por comparación de las intensidades obtenidas para los péptidos/proteínas marcados y sin marcar, debido a la diferencia de masa obtenida con el marcada isotópico de la especie. Este marcaje se puede llevar a cabo de diferentes formas (ver Figura 2b):

Introducción General

Marcaje metabólico: conocido como SILAC,¹¹ donde el marcaje isotópico se introduce en las moléculas a través del enriquecimiento del medio en el que crece la célula que produce la biomolécula. Es decir, las proteínas se sintetizan en un medio que se ha suplementado previamente con aminoácidos enriquecidos isotópicamente, normalmente $^{13}\text{C}_6$ -arginina o $^{13}\text{C}_6$ -lisina, puesto que así se asegura que al menos exista una marca en los péptido trípticos de la proteína de interés. De forma que cuando la proteína se sintetice se utilizarán estos aminoácidos marcados isotópicamente.

Marcaje químico: se basa en la introducción de grupos que ofrezcan una diferencia de masa detectable por MS molecular. Entre ellos destacan, los reactivos ICAT (isotope coded affinity reagents).¹² Estos reactivos constan de tres partes: un grupo de afinidad (biotina), empleado para la purificación de los péptidos marcados gracias a la afinidad estreptavidina-biotina, un grupo de unión, donde se encuentran las marcas isotópicas y un grupo reactivo, que reacciona con los grupos funcionales de las proteínas. Para esta clase de cuantificación se introducen los reactivos ICAT en las muestras, uno de ellos con abundancia isotópica natural y el otro con la abundancia isotópica alterada, de forma que entre ellos existe una diferencia de masa. Una vez producido el marcaje, las muestras se purifican y se analizan por espectrometría de masas, obteniéndose la cuantificación relativa a través de la relación de intensidades entre los péptidos marcados.

Por otra parte, se pueden introducir marcas isobáricas, como el los métodos de iTRAQ o TMT.¹³ Estas marcas isobáricas, están formadas por tres partes: un grupo reactivo, que se emplea para llevar a cabo la unión con los grupos funcionales de las proteínas, un grupo reporter, cuya composición isotópica es diferente y un grupo compensador, cuya composición isotópica es también diferente, que se utiliza para compensar la variación de masas introducida por el grupo reportes. De forma que, la masa global de las diferentes marcas sea siempre la misma. Por tanto, al efectuar el marcaje de los correspondientes péptidos de la muestra con las marcas isobáricas, se obtiene péptidos marcados con la misma masa, y solamente tras la fragmentación de los mismos por MS/MS

se podrán observar las diferencias procedentes de los distintos grupos reporter. De manera que la cuantificación relativa, se obtiene al comparar las señales obtenidas por MS para los péptidos marcados.

Marcaje enzimático: este método consiste en el marcaje de los péptidos que conforman la proteína tras una digestión enzimática en presencia de $H_2^{18}O$, de forma que la reacción se cataliza reemplazando dos átomos de ^{16}O (O natural) en el extremo C-terminal de los péptidos proteolíticos por 2 átomos de ^{18}O .¹⁴

2.2. Cuantificación absoluta de biomoléculas

La información aportada por los métodos de cuantificación relativos es para la mayoría de las aplicaciones insuficiente, puesto que no basta con conocer si una proteína está más o menos expresada en ciertas condiciones, sino es también necesario conocer la cantidad de la misma en términos absolutos. Esta información solamente se puede obtener a través de metodologías de cuantificación absoluta de proteínas.

Tradicionalmente, la cuantificación absoluta de biomoléculas se ha llevado a cabo empleando técnicas basadas en inmunoensayos. Entre ellas destacan, la técnica conocida como Western Blot, que consiste en el uso de anticuerpos marcados enzimáticamente para la detección de las proteínas de interés basándose en una separación previa mediante electroforesis en gel de poliacrilamida. Otras metodologías tradicionales ampliamente extendidas son las basadas en inmunoensayos, que se abordarán más en profundidad en los siguientes apartados. Ambas técnicas están limitadas debido a la necesidad del empleo de patrones específicos, así como de la necesidad de anticuerpos que reconozcan específicamente a la(s) biomolécula (s) de interés.¹⁵

Como ya se ha comentado en el apartado anterior, el desarrollo de nuevos métodos de cuantificación de proteínas se ha incrementado con la mejora y desarrollo de la MS, siendo la MS molecular la más empleada. Sin embargo, al obtenerse una señal dependiente de la especie y de la matriz de la muestra, para

conseguir una cuantificación absoluta es imprescindible recurrir al uso de patrones específicos de las biomoléculas de interés. Por tanto, la gran mayoría de estas estrategias se basan en la combinación de la MS molecular con el uso de análogos de las biomoléculas de interés marcados isotópicamente. De esta forma, ambas especies presentan la misma eficiencia de ionización y el mismo comportamiento en las separaciones cromatográficas necesarias a fin de separar las distintas especies presentes en la muestra antes de su ionización en la fuente del espectrómetro de masas. Entre estos métodos destacan: AQUA (Absolute Quantification) y QconCAT (Quantification Concatemer), en los que se utilizan análogos sintéticos de los péptidos/proteínas que se quieren analizar.^{16,17} Cabe destacar, que para este tipo de cuantificación absoluta es necesario conocer con exactitud la secuencia de aminoácidos de las especies de interés, así como llevar a cabo la síntesis y correcta caracterización de los análogos marcados.

Por otra parte, el uso de la MS elemental con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP) en estudios de proteómica ha crecido enormemente en los últimos años, debido a las excelentes capacidades del ICP-MS.¹⁸⁻¹⁹²⁰ De hecho, el ICP-MS se ha empleado con éxito para la determinación de la concentración total de elementos traza y sus correspondientes especies en sistemas biológicos. Estas metodologías están basadas en estudios de especiación con el fin de obtener, además de la concentración total del elemento, la distribución de este entre las diferentes especies en las que se encuentra en la muestra, puesto que la información obtenida de la medida total de la concentración del elemento no es suficiente para conocer la toxicidad, biodisponibilidad y el impacto de dicho elemento.¹⁰ Debido a la importancia del ICP-MS en proteómica cuantitativa y puesto que ha sido una de las técnicas empleadas en la presente Tesis Doctoral, se explican a continuación con mayor profundidad las estrategias de cuantificación absoluta de biomoléculas empleando el ICP-MS como herramienta de detección.

3. Cuantificación absoluta de biomoléculas empleando espectrometría de masas elemental

3.1. La espectrometría de masas elemental como herramienta para la cuantificación absoluta de biomoléculas

Como ya se ha comentado a lo largo de la introducción, a pesar de que tradicionalmente las estrategias empleadas en la determinación de biomoléculas han estado basadas en la MS molecular, el ICP-MS ha logrado un gran avance y se ha convertido en una gran alternativa en algunos casos para llevar a cabo dicha cuantificación.^{10,18,19}

Esto se debe a las excelentes capacidades del ICP-MS, como la elevada sensibilidad, robustez, elevado rango lineal, capacidad de detección multielemental y multi-isotópica.^{21,22} Puesto que toda la muestra que llega a la fuente de ionización (plasma) se ioniza y atomiza, detectando únicamente los heteroátomos presentes en las biomoléculas, lo que conlleva una reducción de la complejidad del espectro obtenido en comparación con los obtenidos empleando MS molecular. De hecho, gracias a la destrucción de todo el entorno molecular que llega al plasma, el ICP-MS proporciona una señal virtualmente independiente de la especie en la que se encuentre el heteroátomo detectado, permitiendo de esta forma llevar a cabo la cuantificación empleando patrones genéricos, con la única condición de que contengan el mismo heteroátomo detectable por ICP-MS.

No obstante, el ICP-MS tiene una serie de limitaciones derivadas, precisamente, de esta pérdida de información estructural durante el análisis. A la hora de analizar muestras complejas, es necesario llevar a cabo una separación previa de las distintas especies que contiene dicha muestra antes de su atomización en el plasma, empleando por ejemplo cromatografía líquida o electroforesis capilar. En la actualidad la aplicación del ICP-MS en el campo de la

proteómica, está limitado a la cuantificación de péptidos/proteínas en muestras no muy complejas, debido a la falta de resolución obtenida en las separaciones cromatográficas en muestras relativamente complejas. Dado que el ICP-MS proporciona la cuantificación absoluta de los heteroátomos detectados en cada pico cromatográfico. Para transformar esta cantidad de elemento en cantidad de biomolécula, es un requisito indispensable conocer la estequiometría heteroátomo/biomolécula, proporcionada por MS molecular. Por tanto, la cuantificación absoluta de proteínas mediante ICP-MS, se obtiene a través de la combinación de la información proporcionada por la MS molecular y elemental.

En este sentido, se han llevado a cabo grandes avances en el desarrollo de metodologías de cuantificación de proteínas empleando ICP-MS en función de la naturaleza del heteroátomo que se va a determinar, recogidas en la Figura 3. En primer lugar la cuantificación se puede abordar a partir del análisis de heteroátomos (cualquiera diferente a C, H O, N o F) presentes de forma natural en las proteínas, como son el S, P, Se o metales coordinados a la estructura de diferentes metaloproteínas. Por otro lado, se pueden añadir de forma intencionada estos heteroátomos a la estructura. Esta última estrategia presenta una serie de ventajas sobre las marcas naturales, puesto que se pueden emplear diferentes elementos para el marcaje, normalmente metales de transiciones o tierras raras, que permiten obtener una mayor sensibilidad y además estos elementos suelen estar libres de interferencias.

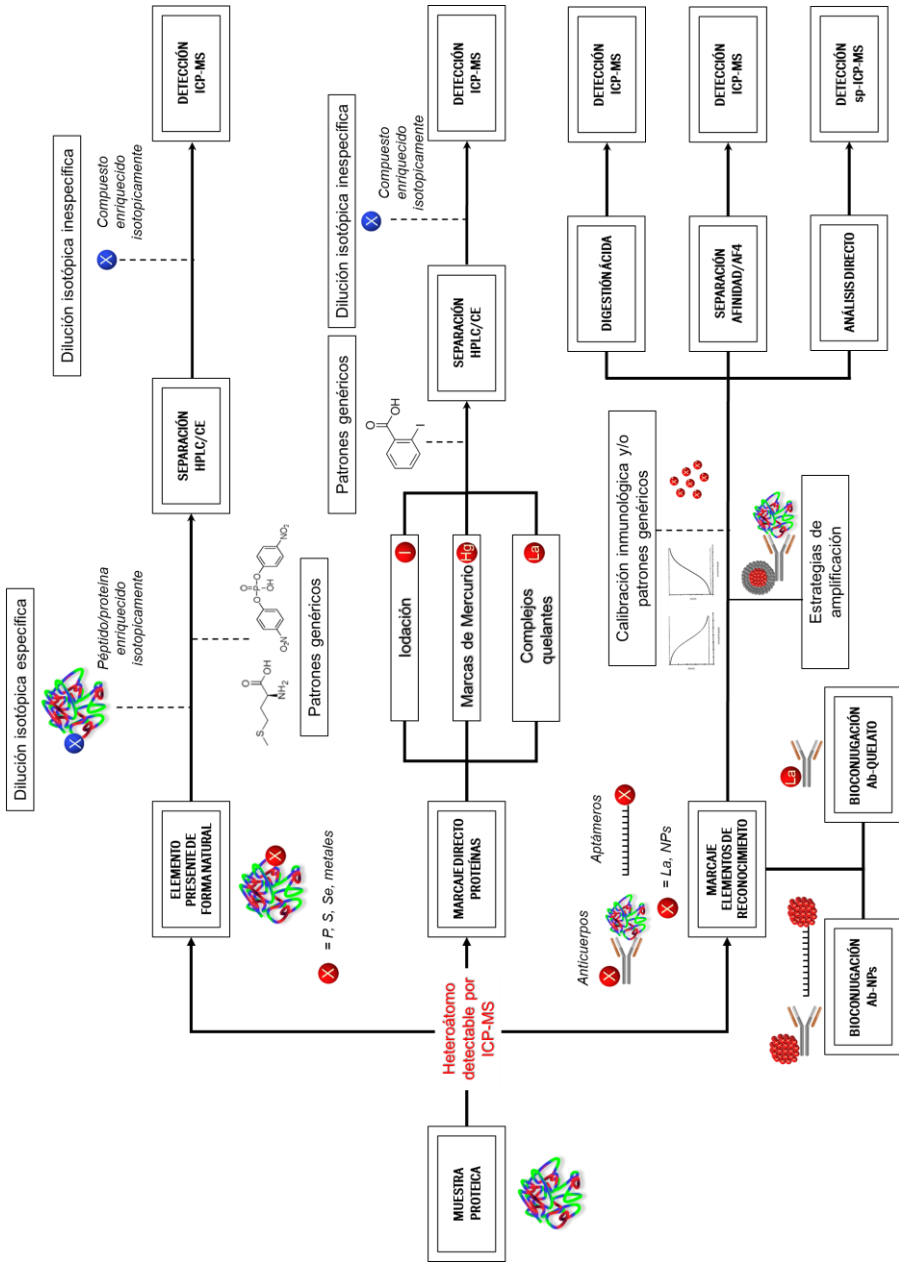


Figura 3. Estrategias de cuantificación absoluta de proteínas empleando ICP-MS. Adaptado de Calderón *et al.*²³

3.1.1. Heteroátomos presentes de forma natural

Como ya se ha mencionado, el ICP-MS es capaz de proporcionar cuantificación absoluta de biomoléculas sin necesidad de emplear patrones específicos, a través de la medida de los heteroátomos que estas contienen. Esta estrategia reduce la complejidad de la metodología, puesto que no es necesario llevar a cabo una etapa adicional de marcaje, de esta forma, se minimizan las fuentes de error que puedan afectar a la calidad de los resultados. En este sentido, la cuantificación se puede llevar a cabo de forma simple a través de la determinación de los heteroátomos presentes de forma natural en la estructura de las proteínas.

Una de las metodologías más explotadas hasta el momento en proteómica cuantitativa ha sido el estudio de metaloproteínas a través de la detección de los metales coordinados en su estructura como el Zn, el Fe, o el Cu, entre otros. El interés en el estudio de estas proteínas radica no solo en el hecho de conocer su estructura y las funciones biológicas en las que se ven envueltas, si no comprender el papel de los metales en muchas enfermedades.²⁴ De hecho se conoce, que el papel que juegan muchas de estas metaloproteínas en el organismo está relacionado con el transporte de metales (como es el caso de las chaperonas) o que la actividad de los centros catalíticos de muchas enzimas está directamente relacionada con la presencia o ausencia de los metales en su estructura.²² Sin embargo, estos metales no suelen encontrarse unidos de forma covalente a las proteínas, si no coordinados a estas, de forma que al llevar a cabo la separación necesaria para aislar las distintas especies presentes en la muestra, existe el riesgo de la pérdida de los metales en la estructura. Por tanto, esta pérdida lleva a una cuantificación errónea en las metaloproteínas.

En este sentido, la cuantificación también se puede llevar a cabo a través de la detección de elementos unidos covalentemente a la estructura de las proteínas como son el S, P, As o Se.¹⁹ Desafortunadamente, la detección de estos elementos semimetálicos o no metálicos mediante ICP-MS, ha estado tradicionalmente muy limitada debido a su baja ionización en el plasma y la presencia numerosas

interferencias poliatómicas.²⁵ Para superar estas limitaciones, se han desarrollado diferentes estrategias basadas en el empleo de celdas de colisión/reacción o instrumentos de alta resolución (sector field ICP-MS) que permiten la eliminación de dichas interferencias. Sin embargo, si bien las interferencias son eliminadas de forma correcta, la sensibilidad obtenida con este tipo de técnicas es a veces insuficientes para ciertas aplicaciones. En esta línea, la introducción en 2012 del concepto de MS en tándem (MS/MS), muy empleado en estrategias moleculares, en la MS elemental (ICP-MS/MS) ha permitido llevar a cabo la detección de estos elementos problemáticos con elevada sensibilidad y libres de interferencias espectrales (isobáricas y/o poliatómicas).²⁷ De hecho, el empleo del ICP-MS/MS ha demostrado recientemente ser una alternativa excelente en proteómica cuantitativa para la detección y/o cuantificación absoluta de péptidos y fosfopéptidos e incluso proteína intacta, ya sea a través de la medida de S o P.^{26,27,28}

Al igual que en MS molecular, la cuantificación de proteínas en ICP-MS se ha llevado a cabo tradicionalmente mediante el análisis de digeridos trípticos. Sin embargo, estas digestiones no están exentas de problemática, puesto que la eficiencia de la digestión suele no ser cuantitativa provocando errores en la cuantificación. En este sentido, el análisis de proteína intacta podría solventar los problemas derivados de las digestiones trípticas. Sin embargo, la aplicabilidad de estas estrategias ha estado limitada debido a cuestiones cromatográficas. En primer lugar, las recuperaciones no cuantitativas obtenidas para proteína intacta en las columnas cromatográficas frente a las recuperaciones cuantitativas obtenidas para péptidos. Por otra parte, la resolución cromatográfica para proteínas dista mucho de la conseguida para péptidos trípticos, sobre todo en el caso de muestras complejas. Con el desarrollo de una nueva generación de columnas cromatográficas, donde las recuperaciones obtenidas son cuantitativas y se mejora también la resolución, el uso del ICP-MS como herramienta para el análisis de proteína intacta se ha incrementado.

En este contexto, uno de los elementos que ofrece mayores ventajas es el S, presente estadísticamente en la mayoría de las proteínas, puesto que se encuentra en los aminoácidos de Cisteína (Cys) y Metionina (Met). Además, la determinación de S es importante más allá del campo de la proteómica, puesto que forma parte de una gran cantidad de biomoléculas relevantes como ácidos nucleicos, cofactores, metabolitos o ligandos bicompatibles, lo que convierte a la determinación de S en una excelente herramienta para la comprensión del funcionamiento de los organismo vivos, así como sus interacciones.²⁹ De hecho, se han desarrollado multitud de metodologías para la cuantificación absoluta de péptidos o proteínas empleando el S como elemento de detección.^{26,28}

3.1.2. Heteroátomos añadidos artificialmente

La derivatización química de biomoléculas con grupos cromóforos, fluoróforos, isótopos radioactivos o metales que permitan su detección por ICP, se ha empleado con mucha frecuencia en aplicaciones bioanalíticas, con objeto de desarrollar metodologías más sensibles.²¹ En este sentido, para la cuantificación absoluta de biomoléculas con detección por ICP-MS, se puede recurrir al marcaje con elementos metálicos, cuando la sensibilidad obtenida con la medida de no metales no es suficiente. A pesar de la introducción de una nueva etapa de marcaje, lo cual conlleva un mayor tiempo de análisis y el uso nuevos reactivos, las ventajas que ofrecen las marcas elementales, convierten a esta estrategia en una alterativa viable para la detección de biomoléculas. En primer lugar, los elementos introducidos suelen ser fácilmente ionizables y estar libres de interferencias. Además, se puede introducir más de un elemento en la estructura de la proteína, mejorando por tanto la sensibilidad. Por otro lado, con estas estrategias se pueden detectar biomoléculas que no contuvieran inicialmente un heteroátomo en su estructura. Cabe resaltar que el marcaje ofrece la posibilidad de la detección simultánea de varias proteínas en un mismo análisis con el empleo de varias marcar elementales.

La mayor limitación radica en la eliminación del exceso de reactivos utilizados durante la etapa de marcaje, la determinación de la estequiometría

metal-biomolécula (imprescindible para llegar a una cuantificación sin patrones) y la posible formación de productos indeseados durante el proceso de marcaje que interfieran en la detección. Por lo tanto, todas las moléculas marcadas deben ser debidamente caracterizadas y, generalmente, es necesario recurrir a técnicas de separación que permitan el aislamiento de las distintas especies.

Dentro de estas metodologías se distinguen diferentes tipos, como se indicó en la Figura 3, según el tipo de marca empleada. Estas pueden llevarse a cabo a través del marcaje directo de las biomoléculas de interés, o a través de la unión covalente a elementos de reconocimiento capaces de interactuar de forma específica con las biomoléculas de interés.

3.1.2.1. *Marcaje directo con moléculas pequeñas*

Como se ha mencionado, Las reacciones químicas se pueden emplear para marcar una proteína haciendo que esta sea detectable por ICP-MS. Existen muchos metales que pueden reaccionar con determinados grupos funcionales de forma más o menos selectiva. De entre todos ellos, uno de los más importantes es el mercurio (Hg), puesto que reacciona de forma selectiva con los grupos sulfidrilo (-SH) presentes en las proteínas.³⁰ El Hg se puede introducir empleando como reactivos distintas especies de Hg, como especies de bajo peso molecular como cloruro de metilmercurio (MeHgCl) o especies con estructuras más complejas como el p-clorometilmercuribenzoato o p-hidroximercuribenzoato.^{31,32} Al contrario que los no metales (presentes de forma natural en las proteínas), el Hg no presenta interferencias espectrales. Si bien es cierto, que en comparación con otros metales, la ionización del Hg en el plasma es baja (20%), además, de la existencia de efectos de memoria que dificultan su análisis.^{21,30}

De la misma forma, se pueden introducir otro tipo de elementos como los halógenos. De entre los que destaca la introducción de yodo (I), debido a los elevados potenciales de ionización que presentan otros halógenos como el fluor o el cloro. Dicha metodología de marcaje, denominada yodación, se basa en la

capacidad del yodo de reaccionar selectivamente con los anillos aromáticos presentes en los aminoácidos de Histisina (His) y Tirosina (Tyr). En este caso, utilizando un reactivo sencillo (NaI), el yodo se oxida in situ formando I^+ , el cual es capaz de reaccionar de forma selectiva con los anillos aromáticos. Sin embargo, con este tipo de reactivos no se produce una yodación completa y específica de las proteínas. Por el contrario, con el uso de reactivo más complejo como la tetrafluoroborato de yodobispiridina bisPyBF₄, se ha conseguido marcaje completo y específico de residuos de tirosina.³³ Se recoge en la Figura 4 un esquema de la reacción de yodación empleando dicho reactivo. Asimismo, las muestras biológicas pueden contener grandes cantidades de yodo, lo que hace que aumente la señal de fondo.²¹

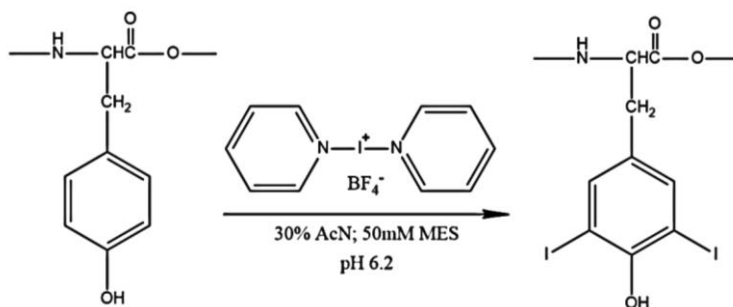


Figura 4. Esquema de la reacción de yodación entre el tetraborato de yodobispiridina y los residuos de tirosina. Reproducido de Pereira *et al.*³³

Sin embargo, estas marcas no se emplean habitualmente, debido a que solamente unos pocos grupos funcionales son susceptibles de ser derivatizados (Cys para Hg y Tyr e His para I) y el caso del marcaje con Hg debido a la elevada toxicidad que este presenta.²¹

3.1.2.2. Marcaje directo con agentes quelantes

Como alternativa al marcaje directo con moléculas pequeñas, se pueden introducir otros metales en la estructura de las biomoléculas empleando complejos de coordinación. Estas estrategias están basadas en su mayoría, en el uso de agentes quelantes bifuncionales compuestos por un grupo reactivo, un

espaciador y un complejo que contiene los heteroátomos detectables por ICP-MS. Los más comúnmente utilizados son los basados en el ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) o el ácido 1,4,7,10-tetraazaciclodecano-1,4,7,10-tetraacético (DOTA), cuyas estructuras se muestran en la Figura 5.

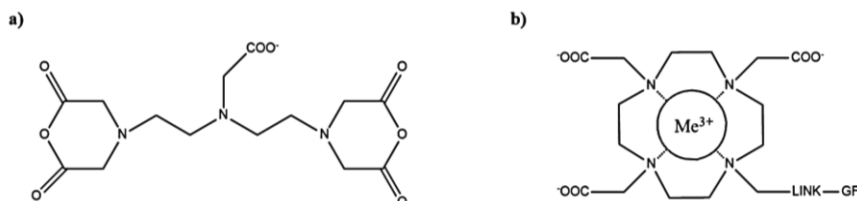


Figura 5. Estructura de los complejos quelatantes, a) DTPA y b) DOTA.

La reacción de estos complejos con los correspondientes residuos aminoacídicos de las proteínas, tiene como resultado la formación de complejos muy estables con múltiples marcas elementales, lo que los hace idóneos para su detección por ICP. En este sentido, los elementos más empleados habitualmente para esta clase de marcaje son lantánidos (tierras raras), debido a su bajo potencial de ionización, baja señal de fondo (son elementos muy poco abundantes en matrices biológicas) y a la ausencia de interferencias poliatómicas. Además, existen un elevado número de lantánidos e isótopos de los mismos que permitirían el análisis de varias biomoléculas simultáneamente a través del uso de varias marcas. Por todo ello, este tipo de marcas elementales se han convertido en una importante alternativa para la cuantificación absoluta de proteínas con detección elemental.^{21,34}

A pesar de las excelentes características que los Lantánidos presentan para su detección por ICP-MS y la estabilidad de los complejos formados, la sensibilidad está limitada por el número de metales presentes en los correspondientes quelatos y el elevado carácter polar de éstos, haciendo que su separación por fase reversa (comúnmente empleada en la separación de péptidos/proteínas) se dificulte enormemente. Finalmente, en muchos casos la derivatización es de nuevo incompleta, y la eficiencia ha de tenerse en cuenta en los resultados cuantitativos.^{21,30,35,}

Un grupo especial de marcas basadas en agente quelantes son los metalocenos, cuya estructura está formada por un metal de transición con dos aniones ciclopentadienil. Dentro de ellos el más importante es el ferroceno, un metaloceno cuyo metal es el Fe, puesto que es el más estable de estos derivados. El marcaje tiene lugar a través de una reacción de sustitución electrófila aromática entre los anillos ciclopentadieno y los residuos de lisina (Lys) de las proteínas.³⁶ Las limitaciones del empleo de Fe como elemento de detección en ICP-MS, comparado con los lantánidos son obvias. La detección de Fe requiere del uso de sistemas de corrección de interferencias, como celdas de colisión/reacción o sistemas de alta resolución, puesto que el isótopo mayoritario de ^{56}Fe , se encuentra muy interferido por la formación de iones poliatómicos de Ar ($^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$). Además, la presencia de Fe en muchas muestras de origen biológico (como en sangre) incrementan las señales de fondo.²¹

3.1.2.3. *Marcaje indirecto*

El marcaje de elementos de reconocimiento, es una de las estrategias más empleadas debido a la buena sensibilidad y selectividad que estos proporcionan. Entre ellos, destacan los inmunoensayos, donde un anticuerpo es marcado y reconoce específicamente al antígeno, incluso en muestras complejas. Dada la importancia de los inmunoensayos en los análisis de muestras de interés biológico, y puesto que es una de las metodologías de cuantificación empleadas en el desarrollo de la presente Tesis Doctoral, se tratarán a continuación en una nueva sección.

3.2. Estrategias de cuantificación absoluta de biomoléculas empleando MS elemental

Como se ha comentado, el empleo de detectores elementales, como el ICP-MS, permite llevar a cabo la cuantificación a través de la medida de los heteroátomos presentes en la estructura o añadidos artificialmente. En este sentido, la mayor ventaja de cara a la cuantificación absoluta que presenta el ICP-

MS bajo ciertas condiciones, es la señal virtualmente independiente de la especie química en la que se encuentre el heteroátomo.

Esta característica nos permitiría llevar a cabo la cuantificación sin necesidad de utilizar patrones específicos, es decir, empleando patrones genéricos, con el único requisito de que estos contengan el mismo heteroátomo detectable por ICP-MS. No obstante, dado que el analito y matriz se ionizan al mismo tiempo, los efectos de matriz han de ser correctamente evaluados, puesto que se han observado variaciones de la señal analítica en ICP-MS en presencia de materia orgánica, muy comunes en muestras de origen biológico.¹⁹ Por tanto, se podrían cometer errores si la cuantificación se obtiene por comparación directa de los factores de respuesta de los elementos en patrón y muestra, si la matriz empleada no es la misma.

Sin embargo, esta no es la única condición necesaria para llevar a cabo una cuantificación sin patrones específicos. Como se ha mencionado a lo largo de la introducción, las metodologías basadas en una detección por ICP-MS, están siempre acompañadas de una etapa de separación cromatográfica previa, dada la pérdida de información estructural en la fuente. Por lo tanto, es indispensable, en primer lugar, que el factor de respuesta se mantenga constante a lo largo de dicha separación y, en segundo lugar, la recuperación cromatográfica ha de ser cuantitativa. Es importante mencionar, que de entre los distintos tipos de cromatografía existente (exclusión por tamaños, intercambio catiónico o aniónico, entre otras), el más ampliamente extendido para el análisis de péptidos/proteínas es la cromatografía de fase reversa. Esta se caracteriza por el empleo de fases orgánicas (normalmente metanol o acetonitrilo). En este tipo de cromatografías, la cantidad de fase orgánica aumenta con el gradiente cromatográfico permitiendo, así, la elución de las proteínas atrapadas en la fase estacionaria. De forma que, la cantidad de materia orgánica que llega al plasma aumenta con el tiempo, observándose un aumento en la señal de los elementos debido a efectos del carbono. Las estrategias para la corrección de estos cambios de sensibilidad observados, se detallarán a continuación.

3.2.1. Calibración externa y/o estandarización interna

Una vez evaluada la casuística de las variaciones en la señal producidas en ICP-MS. Si esta permanece constante y no existen efectos de matriz, el análisis total, es decir, la cantidad total de elemento presente en la muestra, se puede obtener fácilmente a través de una calibración externa con el/los elemento/s de interés. Cabe resaltar, que en este tipo de cuantificaciones no se corrigen las posibles derivas instrumentales o las variaciones en el volumen de inyección (si el análisis se lleva a cabo mediante análisis por inyección en flujo, FIA). Obviamente, tampoco tiene en cuenta las pérdidas que tengan lugar durante la preparación de la muestra. Estas problemáticas suelen solventarse empleando un patrón interno adecuado, que no se encuentre presente en la muestra.

Cuando existen efectos de matriz se debe considerar la posibilidad de llevar a cabo la cuantificación empleando estrategias que permitan compensar tales efectos: calibración en la misma matriz, adiciones estándar o calibración mediante un patrón interno adecuado.

La calibración sobre la misma matriz, requiere del uso de una matriz lo más semejante a la muestra, pero sin que ésta contenga el analito de interés. Si bien es cierto que no es habitual disponer de matrices libres de analito, sobre todo en el caso de muestras reales. Una alternativa para compensar los efectos de matriz es la calibración mediante adiciones estándar. Éstas se basan en la adición de concentraciones crecientes del analito sobre una cantidad constante de muestra. Este método de cuantificación es el menos práctico puesto que es más laborioso.

Finalmente, la cuantificación se puede llevar a cabo utilizando un patrón interno adecuado, muy empleado en estrategias basadas en ICP-MS para reducir el impacto de las inestabilidades en la señal, la deriva instrumental y, también, la matriz de la muestra. Este patrón interno se añade a la muestra en una concentración conocida, de modo que se puede calcular el factor de respuesta que corresponde al heteroátomo presente en patrón y analito(s). Cabe destacar, como se ha comentado con anterioridad, que debido a la pérdida de información estructural que ocurre en ICP, es necesario el empleo de separaciones previas,

que permitan el aislamiento de las distintas especies contenidas en la muestra, para obtener la cuantificación individual de las especies. Por lo tanto, una característica imprescindible del patrón interno a utilizar es, además de la presencia del mismo heteroátomo detectable, que eluya en un tiempo de retención diferente al de el/los analito/s de interés. De manera que, una vez calculado el factor de respuesta para el patrón interno, éste se puede aplicar de forma sencilla a los analito y determinar su concentración en términos absolutos. Obviamente, el uso de gradientes cromatográficos puede afectar a la señal de ICP, modificando el factor de respuesta para el mismo heteroátomo a lo largo del cromatograma, como es el caso de los gradientes de fase reversa. En este tipo de gradiente, el porcentaje de materia orgánica que llega al plasma aumenta con el tiempo, transformándose en un aumento de la señal analítica obtenida para los elementos debido a efectos de transferencia de carga del carbono. Además, este incremento de la fase orgánica trabajando a flujos normales es incompatible con el ICP-MS, puesto que el plasma se enfría con los flujos llegando a apagarse en porcentajes bajos de fase orgánica. Por este motivo, se han desarrollado multitud de estrategias que permitan minimizar la cantidad de materia orgánica que llega al plasma, como es el caso del empleo de cromatografías de microflujos, con el consecuente desarrollo de interfase que permitan su acoplamiento con la fuente de ICP-MS.³⁷

En este sentido, a lo largo de la historia reciente se han desarrollado diversas estrategias a fin de corregir estos efectos de cambio de sensibilidad observados al emplear cromatografía de fase reversa. Entre ellos se encuentran el uso de membranas de desorción/adsorción, el empleo de flujos tras la separación cromatográfica de fase orgánica que compensen la modificación de C que llega al plasma en cada momento^{38,39} o la adición de un patrón interno en continuo tras la separación cromatográfica, normalmente un isótopo enriquecido del mismo elemento que se va a determinar (conocido con dilución isotópica online, que se explicará a continuación).²⁶ Sin embargo, la estrategia más destacable desarrollada hasta el momento, es la adición de carbono al plasma directamente en forma de gas, que permite la corrección de las pequeñas variaciones de C que se llegan al plasma en el cambio del gradiente cromatográfico. En este sentido se

ha comparado la adición directa a través del flujo de gas opcional del ICP-MS, de dos gases diferentes que contienen carbono: metano y dióxido de carbono.^{40,41} Los resultados obtenidos para ambos gases, muestran que con determinados flujos de CH₄ y CO₂ se consigue que la sensibilidad de los elementos seleccionados (todos ellos relevantes en el estudio de biomoléculas: S, P, Se, As, I, Br) se mantenga constante a lo largo del gradiente cromatográfico. A pesar que se obtienen resultados positivos para ambos gases, el uso del CO₂ implica utilizar un menor flujo de gas para obtener la misma compensación en la señal y este gas es menos peligroso que el CH₄.⁴¹

3.2.2. Dilución isotópica

Alternativamente, la capacidad del ICP-MS de medir varios isótopos al mismo tiempo, permite combinar la detección elemental por ICP-MS con la dilución isotópica (IDMS). Ésta se divide en IDMS clásica (“batch IDMS”) y IDMS en línea, según el modo en el que se añade el trazador. En la IDMS clásica, el analito (en el caso de la espectrometría de masas elemental, el analito es el elemento) se mezcla con el análogo marcado isotópicamente, denominado trazador, antes de comenzar con el procedo analítico. Por el contrario, en la IDMS en línea, la mezcla se produce de forma continua durante el análisis.⁴² A continuación se desarrollan las ecuaciones de la dilución isotópica que serán utilizadas en los Capítulos 3 y 4 de la presente Tesis Doctoral.

3.2.2.1. *Dilución isotópica clásica*

El procedimiento de la dilución isotópica determinando relaciones molares fue desarrollado por primera vez por H. Hintenberger.⁴³ En este, la muestra, cuya abundancia isotópica corresponde a la natural, se mezcla con el trazador, enriquecido isotópicamente. El número de átomos o moles del elemento en la mezcla de trazador y muestra, N_m , viene dado por:

$$N_m = N_s + N_t \quad (1)$$

donde N_s es el número de átomos o moles del elemento poli-isotópico en la muestra y N_t el número de átomos o moles del trazador. Para dos isótopos a y b de abundancias (A) conocidas, se puede establecer un balance de masas:

$$N_m A_m^a = N_s A_s^a + N_t A_t^a \quad (2)$$

$$N_m A_m^b = N_s A_s^b + N_t A_t^b \quad (3)$$

Tras la división de las ecuaciones anteriores se obtiene:

$$R_m = \frac{A_m^a}{A_m^b} = \frac{N_s A_s^a + N_t A_t^a}{N_s A_s^b + N_t A_t^b} \quad (4)$$

A continuación, despejando de la ecuación N_s :

$$N_s = N_t \frac{R_m A_t^b - A_t^a}{A_s^a - R_m A_s^b} \quad (5)$$

De esta ecuación (5) se puede calcular el número de moles del elemento en la muestra a partir de la medida de la Relación isotópica, R_m , obtenida experimentalmente, teniendo en cuenta el valor de las abundancias isotópicas naturales del elemento y las del trazador enriquecido, así como los moles añadidos de trazador inicialmente.

Gracias a esta ecuación, es fácil deducir también cuales son las principales ventajas de la dilución isotópica. En primer lugar, para la cuantificación, solamente se necesita la medida instrumental de la relación isotópica de la mezcla, R_m . Por otro lado, al medir precisamente la relación isotópica, los efectos de matriz o las derivas instrumentales no inducen ningún error en la cuantificación. Por último, debido a que el equilibrio isotópico se produce antes del comienzo del proceso analítico, cualquier pérdida o dilución de la mezcla no influye en el resultado final.⁴²

El número de moles calculado según la ecuación (5), se puede transformar fácilmente en concentración, teniendo en cuenta las masas tomadas de muestra y trazador, m_s y m_t , y las masas atómicas del elemento en la muestra y el trazador,

W_s y W_t , respectivamente. Además, en lugar de abundancias isotópicas, es frecuente emplear las relaciones isotópicas para muestra y trazador, siendo $R_s = A_s^b/A_s^a$ y $R_t = A_t^b/A_t^a$, respectivamente. De esta forma, si se sustituye en la ecuación (5), se puede determinar la concentración de la analito en la muestra a través de una única medida de la relación isotópica en la mezcla, R_m .

$$C_s = C_t \cdot \frac{m_t}{m_s} \cdot \frac{W_s}{W_t} \cdot \frac{A_t^b}{A_s^a} \cdot \left(\frac{R_m - R_t}{1 - R_m \cdot R_s} \right) \quad (6)$$

Por tanto, este procedimiento, aplicado correctamente, es directamente trazable al Sistema Internacional de Unidades.⁴²

3.2.2.2. Dilución isotópica en línea

Por otra parte, existe también la dilución isotópica en línea, descrita por primera vez en 1989 para el análisis total,⁴⁴ y, posteriormente, se extendió a los análisis de especiación de elementos traza.⁴⁵

En la dilución isotópica en línea, el flujo de muestra se mezcla con el del trazado en continuo. Este trazador puede ser el elemento enriquecido isotópicamente, lo que se conoce como IDMS inespecífica, o un análogo de la molécula que se quiere determinar enriquecido isotópicamente en el elemento detectado, lo que se conoce como IDMS específica. En este caso, el equilibrio isotópico ocurre en la fuente de ionización, donde muestra y trazador se atomizan e ionizan.⁴⁶

De esta forma, una muestra de muestra contiene una concentración molar C_s (mol/g) de un elemento a un determinado flujo F_s (g/min), se mezcla con un flujo de trazador F_t (g/min) que contiene el elemento o compuesto enriquecido en una concentración C_t (mol/g). Por tanto, el flujo molar total del elemento en la mezcla (M_m) se puede expresar como:

$$M_m = C_s F_s + C_t F_t = M_s + M_t \quad (7)$$

El flujo molar del trazador (M_t) se mantiene constante, pero el flujo molar de la muestra (M_s) puede variar (por ejemplo, a lo largo de un pico cromatográfico),

de modo que el flujo molar de la mezcla (M_m) puede ser también constante o variable. Para dos isótopos a y b de abundancias A, se puede establecer un balance de masas:

$$M_m A_m^a = M_s A_s^a + M_t A_t^a \quad (8)$$

$$M_m A_m^b = M_s A_s^b + M_t A_t^b \quad (9)$$

donde los subíndices m, s y t se refieren a mezcla, muestra y trazador, respectivamente. Dividiendo ambas ecuaciones, se obtiene:

$$R_m = \frac{A_m^a}{A_m^b} = \frac{M_s A_s^a + M_t A_t^a}{M_s A_s^b + M_t A_t^b} \quad (10)$$

siendo R_m la relación isotópica entre los isótopos en la mezcla del trazador y la muestra. De nuevo, R_m puede cambiar con el tiempo si M_s varía con el tiempo. Si se despeja M_s en la ecuación (10) y se sustituye $M_t = C_t F_t$, se obtiene:

$$M_s = C_t F_t \frac{R_m A_t^b - A_t^a}{A_s^a - R_m A_s^b} \quad (11)$$

La ecuación anterior, es la ecuación básica de la dilución isotópica en línea. Conociendo la composición isotópica del elemento de abundancia natural y del trazador, la concentración del trazador y su flujo y midiendo la relación isotópica R_m en función del tiempo, se puede calcular el flujo molar de la muestra. Al contrario que en la IDMS clásica, esta estrategia no permite corregir las pérdidas previas al equilibrio isotópico (que se da en la fuente de ionización) y la cuantificación no es directamente trazable al Sistema Internacional de Unidades.⁴⁷ Sin embargo, permite cuantificar compuestos de los que no se dispone patrones específicos empleando un patrón genérico que contiene el elemento de interés y un mismo trazador. Esta característica es de especial ventaja cuando se emplea en especiación, como se verá posteriormente.

Generalmente, la IDMS en línea utiliza señales transientes obtenidas del análisis por inyección en flujo o tras una separación cromatográfica. A

continuación, se explica cómo se procede para la cuantificación elemental en cada uno de las especies:

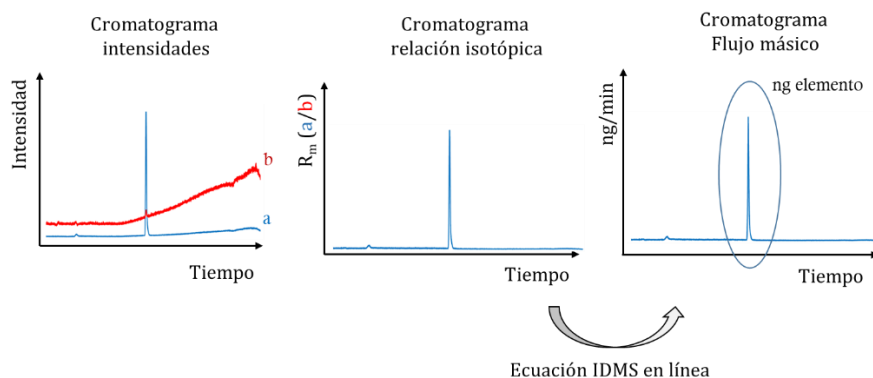


Figura 6. Procedimiento empleado para la obtención del cromatograma de flujo másico a partir del cromatograma de intensidades y la ecuación de la ID en línea.

Un cromatograma de intensidades del elemento con isótopos a y b, como el representado en la Figura 6, se puede transformar fácilmente en un cromatograma de flujo másico con la aplicación de la ecuación de la IDMS en línea. Para ello se calcula en cada punto el valor de la relación isotópica, R_m , mediante la división de la intensidad de los isótopos a y b en cada punto. Una vez obtenida R_m , se aplica la ecuación de la IDMS en línea clásica en cada punto. De esta manera, se obtiene un valor de flujo másico, M_s , para el elemento en la muestra en cada punto. A continuación, representando el valor del flujo másico del elemento respecto al tiempo, se obtiene el cromatograma o Diagrama de flujo másico. De forma que, al integrar los valores de área en cada uno de los picos proporciona directamente la masa del elemento natural, m_s , en cada pico.

Conociendo la estequiometría entre el elemento y la biomolécula que se desea determinar, así como su peso molecular, se puede calcular de forma sencilla la cantidad de analito presente en cada pico.

4. Inmunoensayos con marcaje elemental

Los anticuerpos (Antobody, Ab), son glicoproteínas que pertenecen a la familia de las Inmunoglobulinas, producidas en los organismos vivos como respuesta a la presencia de una sustancia desconocida en el organismo. Existen cinco tipos de inmunoglobulinas en la mayoría de los mamíferos superiores, que se diferencian en su peso molecular, la composición de aminoácidos y el contenido de carbohidratos. Dentro de estas inmunoglobulinas, las más utilizadas en bioanálisis son las inmunoglobulinas G (IgG), cuya estructura principal se muestra en la Figura 7. Están formadas por cuatro cadenas: dos de ellas “pesadas” (H) y dos “ligeras” (L), formando una “Y” en su estructura que se mantiene por un número variable de puentes disulfuro. En cada cadena se encuentran dominios constantes (C_H y C_L) y variables (V_H y V_L). En estos dominios variables están presentes regiones de hipervariabilidad en la secuencia, denominados CRDs (*complementary-determining regions*) que forman el sitio de unión con el antígeno (Ag) a través de una región complementaria.

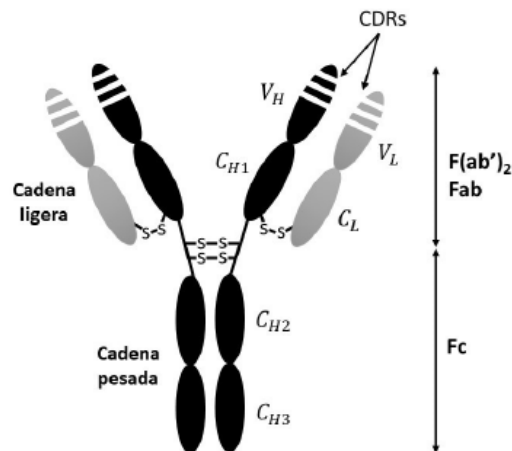


Figura 7. Esquema de la estructura básica de una inmunoglobulina.

Es este mecanismo de afinidad existente entre Ab y Ag, el principio en el que se basan los inmunoensayos, donde el analito diana es reconocido por su Ab específico. Debido a esta especificidad del inmunocomplejo Ag-Ab, los

inmunonesayos presentan buena sensibilidad y selectividad, con muy buenos límites de detección, lo cual los constituye como una excelente herramienta para la determinación de biomoléculas en muestras extremadamente complejas, incluso si en la muestra se encuentran presentes sustancias similares al analito.⁴⁸

4.1. Tipos generales de inmunoensayo

Cabe mencionar, antes de describir la clasificación, que habitualmente la detección del inmunocomplejo Ag-Ab, se produce indirectamente gracias a la señal procedente de una marca externa (radioisótopos, enzimas, moléculas luminiscentes), ya sea unida al Ag o al Ab. Alternativamente, existen otros formatos en los que el inmunoensayo se lleva a cabo sin necesidad de marcas (label-free) o directo, generalmente, basado en la detección del cambio de alguna propiedad físico-química (como el cambio en el índice de refracción) producida por la interacción Ag-Ab, o puede visualizarse debido a fenómenos de aglutinación o precipitación. Sin embargo, este último tipo de inmunoensayos directos, suelen llevar asociada una baja sensibilidad y el uso de una gran cantidad de reactivos. Por todo ello, los inmunoensayos más ampliamente utilizados son los que usan marcas para su detección y, es precisamente, este formato con marcaje el empleado en la presente Tesis Doctoral.

4.1.1. Tipos de inmunoensayos según el formato

La estructura de un inmunoensayo puede variar enormemente dependiendo del diseño que se lleve a cabo. En primer lugar, los inmunoensayos se pueden clasificar en heterogéneos y homogéneos, según la necesidad o no, de realizar una etapa de separación previa a la detección.

En los inmunoensayos homogéneos, no se necesita una separación de las especies libres del inmunocomplejo Ab-Ag, puesto que solo la señal del complejo es detectable o se puede discernir perfectamente entre la señal de complejo y las especies libres. Los inmunonesayos de tipo heterogéneo, son los más ampliamente utilizados, están basados en la formación del complejo Ag-Ab en un soporte sólido, que sirve para anclar el complejo, facilitando así la etapa de

separación. Estos inmunoensayos heterogéneos se pueden clasificar a su vez, en función del formato empleado. En la Figura 8 se recoge un resumen de dicha clasificación.

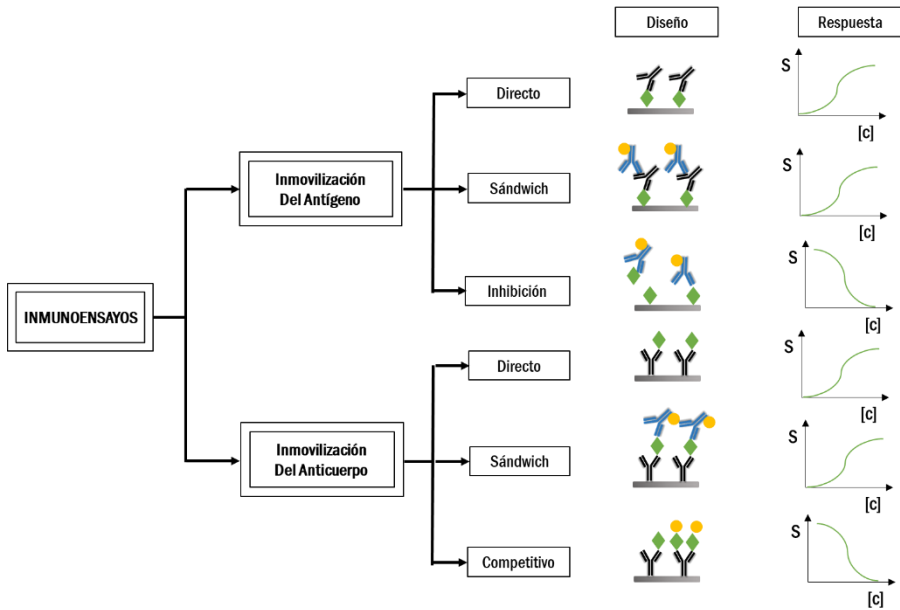


Figura 8. Clasificación de los inmunoensayos según su formato.

La diferencia más reseñable entre los distintos tipos de inmunoensayos presentados, radica en la respuesta que producen. Como se puede ver, en los inmunoensayos competitivos, el analito presente en la muestra compite con su forma marcada por los sitios de unión disponibles en el Ab (que vienen limitados por la cantidad de reactivo). Por tanto, la señal de la especie marcada es inversamente proporcional a la concentración del analito.

Por el contrario, es los inmunoensayos tipo sándwich o no competitivos, se trabaja con un exceso de reactivos, asegurando que la totalidad del analito reaccione formando el inmunocomplejo. En este caso, la señal es directamente proporcional a la concentración del analito en la muestra.

4.1.2. Tipos de inmunoensayos según el tipo de marca

Hoy en día, las marcas utilizadas en los inmunoensayos son de diversa naturaleza. Los radioisótopos fueron las primeras marcas utilizadas en inmunoensayos.⁴⁹ Estos inmunoensayos conocidos como RIA (*Radioimmunoassays*) son extremadamente sensibles. Sin embargo, debido a la necesidad de técnicas especiales y medidas de seguridad derivadas del empleo de especies radioactivas, estas marcas se han ido desplazando por otro tipo de marcas más simples como los enzimas o moléculas luminiscentes.

Otro tipo de marcas muy empleadas son las enzimas, Estos métodos enzimáticos se basan en la detección de los productos de una reacción catalizada por el enzima. El método de detección depende de las propiedades del sustrato empleado durante la reacción enzimática, puede dar lugar a una molécula coloreada o la formación de un complejo luminiscente. Este tipo de ensayos, conocidos comúnmente como EIA (*enzyme-immunoassay*) o ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), tienen como principal ventaja la amplificación de la señal derivada del uso de enzimas.

Por otro lado, los fluoroinmunoensayos (FIA, *fluoroimmunoassays*) se basan en el empleo de un marcador luminiscente para la detección. Si bien la determinación de fluorescencia presenta una elevada sensibilidad, superior a la de las técnicas de absorbancia convencionales, esta está limitada por la composición de la muestras. Esto se debe a la presencia de elevadas señales de fluorescencia de fondo procedentes de otras especies contenidas en la muestra (autofluorescencia). Además, en función del tipo de marcar, esta puede sufrir un proceso de apagamiento de la luminiscencia durante el proceso (*quenching*). Por todo ello, el empleo de sondas fluorescentes convencionales se ha visto limitado. Estos problemas pueden minimizarse con la medida de fluorescencia resuelta en el tiempo (*Time Resolved fluoroimmunoassay*, TRFIA).⁵⁰

Otra alternativa a los fluoróforos convencionales, es la quimioluminiscencia, puesto que al no utilizar una radiación externa fuerte, no se produce la excitación de otros componentes de la muestra, que podrían interferir en la medida. Con

ello se puede llevar a conseguir un límite de detección muy bajo y amplio rango lineal de respuesta. A modo de resumen, se muestran en la Tabla 1 los principales inmunoensayos basados en el empleo de marcas convencionales.

Tabla 1. Técnicas inmunoquímicas en función de la marca empleada

Marca	Técnica	Detección
Isótopo radioactivo	RIA (<i>Radioimmunoassay</i>)	Radiactividad de la marca
	IRMA (<i>Imunoradiometric assay</i>)	
Enzimática	EMIT (<i>Enzyme multiplied immunoassay technique</i>)	Producto coloreado
	CEDIA (<i>Cloned enzyme donor immunoassay</i>)	Producto coloreado
	ELISA (<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>)	Producto coloreado
	MEIA (<i>Microparticle enzyme immunoassay</i>)	Producto fluorescente
	CLIA (<i>Chemiluminescence immunoassay</i>)	Sustrato quimioluminiscente
Fotoluminiscente o quimioluminiscente	FPIA (<i>Fluorescence polarization immunoassay</i>)	Intensidad de luz polarizada
	TR-FIA (<i>Time-resolved fluoreimmunoassay</i>)	Fluorescencia de tiempo resuelto de la marca
	DELFA (<i>Dissociation-enhanced lanthanide fluorescent immunoassay</i>)	Fluorescencia de tiempo resuelto de la marca
	ECLIA (<i>Electro-chemiluminescence immunoassay</i>)	Quimioluminiscencia como resultado de la oxidación de la marca

4.2. Tipos de marcaje elemental

Como alternativa a estas marcas convencionales basadas en detección óptica, las nuevas marcas elementales, descritas previamente para el marcaje de biomoléculas, se han venido utilizando también en el desarrollo de

inmunoensayos. En este sentido, de nuevo el ICP-MS se ha convertido en una alternativa viable para la detección ultrasensible de biomoléculas.⁵¹ La combinación de elevada sensibilidad obtenida para metales con detección por ICP-MS, junto con la elevada especificidad de las reacciones Ag-Ab, tiene un enorme potencial en la cuantificación absoluta de biomoléculas en muestras complejas.⁵² Del mismo modo que para el marcaje directo de biomoléculas, las metodologías de marcaje explicadas hasta el momento a lo largo de la introducción, pueden ser utilizadas para el marcaje de anticuerpos.²¹

En este sentido, el marcaje basado en cadenas poliméricas en cuya estructura se encuentran numerosos elementos metálicos, pueden ser empleadas para el marcaje de anticuerpos. En este caso, por cada polímero el número de elementos metálicos introducidos es muy elevado, lo que incrementa enormemente la señal obtenida en ICP-MS, puesto que esta es directamente proporcional al número de metales. La ventaja de este tipo de reactivos, radica de nuevo en el tipo de marcas elementales, los lantánidos, que como ya se ha manifestado, poseen ciertas ventajas con respecto a otros elementos. Sin embargo, la ventaja más destacable, es la posibilidad de introducir más de un elemento en cada reactivo. En este contexto, se han desarrollado diversas aplicaciones en las que el número de lantánidos introducidos por anticuerpo se encuentra entre 60-120.⁵³ Con este tipo de marcas se obtienen de nuevo las ventajas relacionadas con el elevado número de lantánidos disponibles y sus isótopos estables, así como las bajas señales de fondo que presentan este tipo de elementos en muestras biológicas y la posibilidad de llevar a cabo ensayos multianálisis.⁵⁴ Sin embargo, la síntesis de estos polímeros con átomos elementales es compleja y los reactivos tienen un precio elevado. Asimismo, la capacidad de reconocimiento de los anticuerpos puede verse afectada al introducir una cadena polimérica voluminosa.²¹

En la actualidad, existen otro tipo de marcas que están ganando cada vez más protagonismo. Con el crecimiento exponencial que ha experimentado la nanotecnología en las últimas décadas, ligado al desarrollo de nuevas NPs

funcionalizadas, las nanopartículas (NPs) se han convertido en un excelente recurso para el marcaje en inmunoensayos.^{55,56}

En este caso, una gran cantidad de átomos detectables por ICP se introducen en los anticuerpos.^{51,57} Además de la elevada sensibilidad obtenida con detección por ICP-MS, las NPs ofrecen la posibilidad de llevar a cabo su detección empleando diferentes técnicas luminiscentes, electroquímicas u ópticas. Debido a las características inherentes de las nanopartículas, su aplicación en inmunoensayos se abordará en los siguientes apartados.

4.3. Nanopartículas como marcas en inmunoensayos

Antes de comenzar con las aplicaciones bionalíticas de los nanomateriales es necesario definir el concepto de nanotecnología. El concepto de nanomaterial (NM), en ciencia y tecnología, se refiere tanto al reducido tamaño del material, contenido en la escala nanométrica, como a las propiedades especiales completamente nuevas y ventajosas (ya sean electrónicas, óptica, mecánicas) que presentan estos materiales en comparación con el material macroscópico con la misma composición.⁵⁸

No obstante la definición de nanomaterial no ha sido una tarea sencilla. La Comisión Europea definió en 2011 el término "nanomaterial" como "*material natural, secundario o manufacturado que contiene partículas, en estado libre o como agregado o aglomerado y donde, para el 50% o más de las partículas en la distribución de tamaño en número, una o más dimensiones externas está en el rango de tamaño 1 nm-100 nm*".⁵⁹ Se considera Nanopartícula, cuando todas sus dimensiones caen en la escala nanométrica, sin importar cuál sea su origen, ya sea natural o sintético.⁵⁸

Las características optoelectrónicas excepcionales que presentan los nanomateriales, los han convertido en una poderosa herramienta para la detección y/o cuantificación de biomoléculas en aplicaciones bioanalíticas, reemplazando a los fluoróforos convencionales o marcadores radioactivos que se empleaban hasta la fecha. No obstante, para hacer que una NP pueda ser

empleada en bioanálisis es un requisito indispensable que esta sea biocompatible y específica para el analito deseado. Lo cual implica llevar a cabo una correcta funcionalización con moléculas de reconocimiento apropiadas que proporcionen la especificidad necesaria en este tipo de ensayos.⁶⁰ En este sentido, se han desarrollado diversas estrategias a fin de solubilizar NPs en medios acuosos, haciéndolas biocompatibles en medios biológicos, así como su funcionalización con biomoléculas de reconocimiento (aptámeros o anticuerpos), algunas de las cuales se abordarán a lo largo de los distintos Capítulos de la presente Tesis Doctoral.

Con estas estrategias de funcionalización de la superficie de las NPs, junto con las excelentes propiedades mostradas por éstas, han propiciado que el desarrollo de este tipo de inmunoensayos basados en el marcaje con NPs sea una de las líneas de investigación de mayor interés en campos de las ciencias de la vida. Además, la capacidad de estos conjugados NP-elemento de reconocimiento, de mantener la funcionalidad abrió las puertas a la su aplicación en el campo de la inmunología.^{61,62} Así numerosos formatos de ensayo se han desarrollado utilizando diversos tipos de NPs, incluyendo: NPs de metálicas y sus óxidos, nanomateriales con base de carbono, nanoestructuras híbridas y NPs semiconductoras, como es el caso de los Quantum Dots (QDs).⁵⁶

Dentro de las características que estos NMs, una de las más interesantes es la actividad óptica. Este es el caso de las AuNPs, que muestra una emisión que depende del tamaño de la mismas, produciendo un efecto conocido como Resonancia de Plasmón Superficial (*surface plasmon resonance*, SPR), el cual puede ser utilizado para la detección colorimétrica de los analitos.⁶³ No obstante, como se ha comentado con anterioridad, la detección fluorescente ofrece ciertas ventajas en comparación con la medida de absorbancia. No es de extrañar, por tanto, que con el desarrollo de NPs fluorescentes, se haya incrementado su uso como marcas. En este sentido, destacan los QDs, dadas sus excelentes propiedades ópticas, mostrando un espectro de emisión más estrecho, una intensidad de emisión mayor y una fotoestabilidad superior que muchos de los fluoróforos convencionales.⁶⁴

El campo de aplicación de los QDs en bionálisis, se expandió en gran medida gracias a su capacidad de funcionar como donador en los proceso FRET (*Foster Resonance Energy Transfer*).⁶⁵ Estos ensayos se basan en un proceso no radiativo de transferencia de energía entre el estado excitado de un donador y el estado fundamental de un aceptor. Si el aceptor es un fluoróforo, ras la transferencia de energía y población de sus niveles superiores, la desactivación puede producirse mediante emisión fluorescente. Para que este se produzca han de ocurrir dos condiciones: que exista una distancia adecuada entre el donador y el aceptor y que haya un solapamiento espectral entre la emisión del donador y la absorción del aceptor. Basándose en este fenómeno FRET, se han desarrollado diversas estrategias de cuantificación de biomoléculas entre los que se incluyen inmunoensayos directos o indirectos con QDs.^{66,67}

Pero la aplicación más prometedora de este tipo de ensayos basados en el uso de QDs, es el desarrollo de ensayos multianalito (*multiplexing assays*). Esto se debe a la capacidad de los QDs de modificar su longitud de onda de emisión en función de su tamaño. Desafortunadamente, existen todavía serias limitaciones en el desarrollo de este tipo de ensayos, como el solapamiento espectral de las bandas de emisión las diferentes marcas luminiscentes, sigue limitando en la actualidad el desarrollo de metodologías de detección multianalito de forma simultánea basadas en detección óptica.⁵¹

Como alternativa a los métodos de detección luminiscentes convencionales, el marcaje con NPs metálicas de anticuerpos con su correspondiente detección elemental, ha permitido la cuantificación de biomoléculas que se encuentran en niveles muy bajos de concentración con una elevada sensibilidad. Esto es debido al incremento en el número de átomos detectables durante el marcaje de los anticuerpos de reconocimiento.⁵¹ Se han empleado multitud de NPs diferentes como marcas en inmunoensayos, incluyendo nanopartículas de oro (AuNPs) nanopartículas de plata (AgNPs),⁶⁸ diferentes tipos de nanoclústeres (AuNCs o AgNCs)⁶⁹ e incluso quantum dots (QDs).⁵⁵ Este tipo de marcas permite llevar a cabo la cuantificación de las biomoléculas a través de la detección del elemento o elementos que forman parte de las NPs. Este tipo de cuantificaciones, se basan

en el desarrollo de curvas de respuesta con patrones de las biomoléculas. Sin embargo, para poder llegar a conseguir una cuantificación sin necesidad de patrones específicos, es imprescindible conocer la estequiometría exacta Ab/NP. Esto nos permitiría determinar la cantidad de heteroátomo presente en la NP, empleando un patrón elemental simple del heteroátomo, y transformar la cantidad del elemento en cantidad de proteína utilizando la estequiometría conocida. Sin embargo, es bien sabido que en las reacciones de funcionalización de la superficie de las NPs, no se obtiene una estequiometría única, si no que se obtienen mezclas con diferente relación Ab-NP.⁷⁰

A pesar de las excelentes características que presentan las NPs, su uso como marcas no está exento de desventajas. Una de las más destacadas radica en la elevada afinidad que tienen algunos tipos de NPs por la superficie sobre la que tiene lugar la reacción de reconocimiento y en los sistemas de introducción de muestra del ICP-MS. Por todo ello, es importante el uso de agentes de bloqueo adecuados y etapas de lavado durante la realización del ensayo, a fin de evitar adsorciones inespecíficas.⁵⁴

4.4. Amplificación de la señal analítica en inmunoensayos basada en NPs

A pesar de la elevada sensibilidad obtenida con las marcas explicadas hasta el momento con detección por ICP-MS, existen ciertas aplicaciones en las que la sensibilidad conseguida no es suficiente. Este es el caso de algunas aplicaciones clínicas, como por ejemplo para la detección de biomarcadores de alarma temprana o para la elucidación de los mecanismos de moléculas de diversas enfermedades.^{51,57} En estos casos, se pueden emplear estrategias de amplificación de la señal analítica basadas en inmunoensayos y el uso de NPs como marcas. Estas estrategias se pueden abordar de diferentes maneras, que se explican a continuación.

4.4.1. Single particle ICP-MS

El efecto de amplificación de la señal analítica que se consigue cuando introducimos un mayor número de marcas en la biomolécula, como es el caso de las marcas metálicas basadas en cadenas poliméricas explicadas en el apartado 3.1.2, puede obtenerse directamente utilizando una única marca que posea un número significativamente superior de átomos en su estructura, como las NPs, Por lo tanto, las NPs se pueden considerar en sí mismas una marca amplificada.

Esta detección de las NPs se lleva a cabo habitualmente a través de la medida de sus correspondientes elementos en disolución, tras una digestión de la muestra. Esta etapa de digestión, además de ser una etapa lenta, puede introducir fuentes de error y contaminaciones que afecten a la determinación de las biomoléculas correspondientes. Los límites de detección obtenidos para el análisis de biomoléculas empleando estas estrategias de disolución, suelen encontrarse en torno a los ng mL^{-1} , lo cual limita su aplicabilidad en ensayos ultrasensibles, especialmente en diagnósticos tempranos de enfermedades.⁷¹²⁵

Una alternativa a esta determinación es el empleo de la tecnología de detección de partícula única (*single particle*, sp-ICP-MS), que permite detectar NPs con elevada sensibilidad. Esta técnica se basa en que una partícula produce un paquete de iones gaseosos a partir de los átomos de analito presentes en la misma, que se pueden medir como un pulso individual en el detector. Para conseguir detectar partículas de forma individual, ha de trabajarse con disoluciones lo suficientemente diluidas que contengan concentraciones muy bajas de partículas y con velocidades de adquisición lo suficientemente altas. De tal forma que se obtiene un espectro en el que la frecuencia de los pulsos se relaciona con la concentración de NPs en la muestra y la altura (intensidad) con la concentración de átomos de analito en la nanopartícula, o lo que es lo mismo, número de nanopartículas si estas son puras.⁷²

Esta técnica se ha empleado tradicionalmente para la determinación y caracterización de suspensiones de NPs, en términos de concentración en número de NPs, concentración en masa de NPs, tamaño y distribución de

Introducción General

tamaño. Adicionalmente, el empleo de unos tiempos de adquisición bajos permite obtener una extremadamente elevada relación señal/ruido.⁷¹ Por lo tanto, cuando se emplean NPs como marcas en aplicaciones bioanalíticas, el empleo del sp-ICP-MS ofrece la posibilidad de desarrollar análisis inmunológicos o de detección de ácidos nucleicos de elevada sensibilidad. En este contexto, se han desarrollado diversas plataformas para la detección ultrasensible de biomoléculas en matrices biológicas empleando diferentes tipos de NPs como marcas. Se muestra en la Figura 9 un esquema de los formatos más ampliamente utilizados de inmunoensayo basados en detección sp-ICP-MS (ensayo competitivo o tipo sándwich).

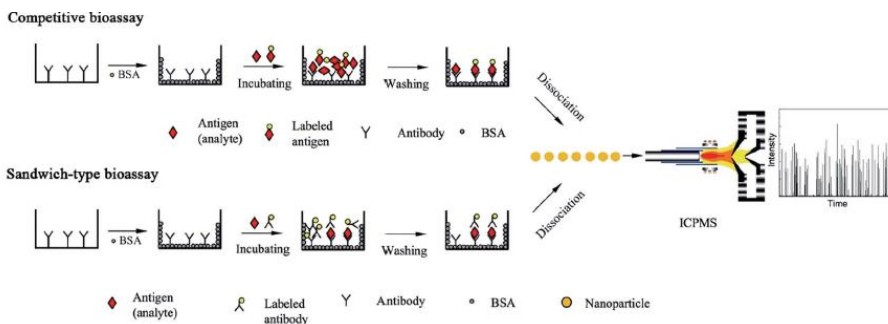


Figura 9. Esquema de los diseños de inmunoensayo más utilizados basados en marcaje con NPs y detección son cp-ICP-MS. Reproducido de Hu *et al.*⁷¹

De entre todas las NPs existentes, las más ampliamente extendidas son las AuNPs, puesto que estas se pueden ser sintetizadas en un amplio rango de tamaños y formas, además las características de este tipo de NPs permiten desarrollar multitud de plataformas con diferentes modos de detección.⁷⁴ Recientemente, se ha desarrollado un inmunoensayo homogéneo para la detección de DNA basado en la hibridación a moléculas de DNA complementarias al analito, de forma que cuando el DNA se encuentra en la muestra, las cadenas hibridan y se las AuNPs se agregan y son detectadas por sp-ICP-MS.⁷³ Este tipo de estrategias, se han empleado también para la detección de inmunoensayos en fase heterogénea, añadiendo un último paso previo a la detección con HNO₃ al 2% o ultrasonidos, consiguiendo con ello romper el inmunocomplejo Ag-Ab y liberar así el bioconjugado Ab-NP para ser detectado

en disolución. Con este método se han desarrollado inmunoensayos muy sensibles, con límites de detección de 16pgmL^{-1} de AFP⁷⁴ y 100pgmL^{-1} de IgG.⁷⁵

4.4.2. Otras estrategias de amplificación

Una de las propiedades más conocidas y explotadas de las AuNPs es su capacidad para actuar como semillas catalizadoras para la reducción y deposición de otros metales en su superficie, utilizando para ello sales metálicas (generalmente Au y Ag). Gracias a esta característica, se han obtenido NPs con diferentes formas y tamaños,⁷⁶ que han permitido un aumento significativo de la señal analítica obtenida a la hora de detectar las NPs. En este sentido, la deposición y amplificación de otro sobre NMs ha sido ampliamente utilizada para la detección de biomarcadores con técnicas sensibles al tamaño y al número de átomos que poseen las NPs, como son la técnica SERS, técnicas electroquímicas o el ICP-MS.^{77,78}

En este contexto, se han desarrollado diversos inmunoensayos con amplificación metálica sobre la superficie de diferentes tipos de NPs, para la detección de biomarcadores con detección elemental. Es el caso del desarrollo de un inmunoensayo en fase heterogénea empleando Mn-ZnS QDs como marcas para la detección ultrasensible del Antígeno de Próstata Específico (PSA) gracias a la deposición química de Au sobre la superficie de los QDs y detección elemental, obteniendo límite de detección en el rango de los atomoles⁷⁹. En la Figura 10 se encuentra un esquema del desarrollo de esta plataforma.

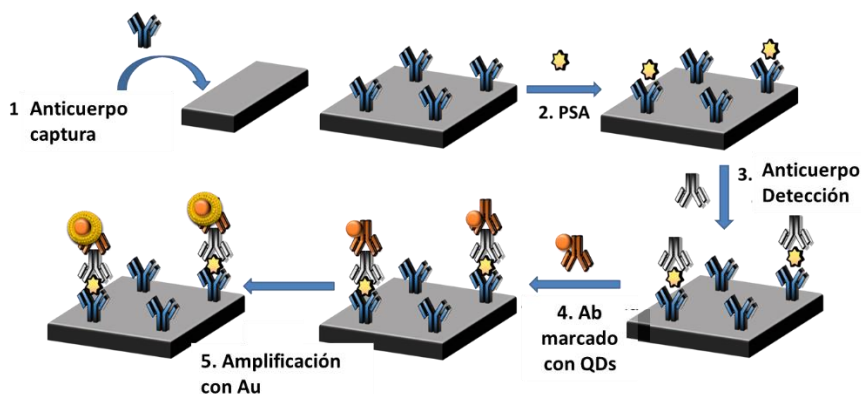


Figura 10. Esquema del desarrollo de un inmunoensayo en fase heterogénea para la detección ultrasensible de PSA empleando Mn-ZnS QDs y amplificación elemental con deposición química de oro. Reproducido de García-Cortés *et al.*⁷⁹

Este método también ha sido empleado para la detección de CEA empleando deposición de Ag sobre AuNPs con detección elemental.⁸⁰ Sin embargo, este tipo de metodologías no solo ofrecen ventajas para la detección por ICP-MS, sino que existen otras técnicas que se ven beneficiadas de este aumento del número de átomos detectables, como las técnicas electroquímicas, donde el biomarcador es detectado a través de una corriente de electrones producida por la reacción de oxidación/reducción de un sustrato determinado, dicha reacción se ve amplificada mucho más debido a la acción electrocatalítica de las NPs.⁷⁸ Con este tipo de detección se han conseguido cuantificar de forma simultánea varios biomarcadores de cáncer de mama (CA125, CA153 y CEA) utilizando un sensor desechable.⁸¹

Por otro lado, la inmunodeposición de Ag sobre AuNPs, se ha empleado también para la visualización de biomarcadores empleando técnicas inmunohistoquímicas convencionales y la combinación con varias técnicas cuantitativas, ha permitido no solo la determinación cualitativa sino también cuantitativa. Si bien las NPs tienen un tamaño demasiado pequeño para ser observadas con microscopios convencionales, la deposición de Ag conlleva un aumento de tamaño que hace posible que la marca llegue a ser visible con técnicas de microscopía convencionales.⁸² Sin embargo, la amplificación con Ag ha demostrado ser poco reproducible debido a su gran reactividad.⁷⁹ Como

alternativa, la amplificación con Au empleando como semillas AuNPs u otro tipo de NPs o, incluso sobre QDs, abre las puertas no solo a llevar a cabo una visualización de las marcas empleando técnicas microscópicas si no también su cuantificación.

Cabe destacar además de la microscopía, las nuevas técnicas de imagen son una buena alternativa para la visualización de las NPs y por tanto, de las biomoléculas a las que se encuentran unidas, como las técnicas de ablación láser (LA) acopladas a ICP-MS. Estas técnicas han demostrado ser efectivas para la determinación de la distribución de biomoléculas en tejidos biológicos, tanto a través de heteroátomos presentes de forma natural en las proteínas como a través del marcaje con NP a anticuerpos que reconocen a dichas biomoléculas.¹⁹ Adicionalmente, la combinación de la amplificación con deposición metálica con la detección por LA-ICP-MS se ha empleado para la detección de la distribución de proteínas asociadas con el cáncer de mama, obteniendo una sensibilidad mejor que la obtenida con técnicas microscópica.⁸²

5. Nanopartículas como marcadores de la contaminación ambiental

El crecimiento emergente que ha experimentado la nanotecnología en los últimos años ha generado la producción de una gran cantidad de productos entre cuyos componentes se encuentran las nanopartículas. De forma que se ha incrementado enormemente la liberación de las mismas en el ambiente, poniendo de manifiesto la necesidad de considerar el impacto de los nanomateriales, tanto en la salud humana como en el medio ambiente, así como la seguridad de la manipulación de dichos materiales.⁸³ Por ello, agencias reguladoras como la EPA (*Environmental Protection Agency USA*) o la Unión Europea ya han incluido algunos NMs en la lista de contaminantes emergentes,^{84,85} y han destacado la necesidad de investigar sus posibles riesgos, su impacto medioambiental (persistencia y comportamiento) y sus efectos en los sistemas biológicos.⁸⁶ Paralelamente a la actividad investigadora basada en la búsqueda de nuevas NPs con mejores características, se ha creado una nueva

área de investigación relacionada con la toxicología inducida por las NPs, conocida como Nanotoxicología.⁸⁷

5.1. Nanopartículas como diana en análisis ambiental

La acumulación en el medioambiente de los nuevos nanomateriales derivados de su creciente producción, así como de su utilización como aditivos en diversos productos de consumo, puede acarrear importantes riesgos para la salud humana y medioambiental. Por todo ello, existe un gran interés en la investigación sobre la seguridad del uso de dichos NMs para los organismos vivos.

Los NMs se pueden clasificar según su origen como los que se forman en la naturaleza (como los fulerenos, óxidos de hierro), procesados (óxidos de titanio, aluminio o silicio) o los sintetizados de forma artificial (AgNPs, AuNPs, QDs, nanotubos de carbono, entre otros). No obstante la clasificación más extendida es sin duda la referente al origen, diferenciando entre NMs con base de carbono o NMs inorgánicos. La distribución de las NPs en los diferentes compartimentos medioambientales ha sido ampliamente estudiada en función de su movilidad, degradación y persistencia en el medio, y depende del tipo de NPs analizadas. A la hora de evaluar el potencial impacto de las NPs en el medioambiente ha de tenerse en cuenta no solo el efecto inherente a la presencia de NPs, sino también las posibles transformaciones que sufren estas en el medio, debido a interacciones con la materia orgánica, con la radiación, la presencia de oxidantes o microorganismos.⁸⁸

Por lo tanto, conocer las transformaciones sufridas por las NPs en su interacción con el medio es de vital importancia. Existen unos pocos ejemplos del comportamiento de las NPs en el medioambiente, debido sobre todo a la falta de métodos analíticos capaces de detectar y cuantificar el amplio rango de NPs.⁸⁹

Hasta el momento se han enumerado algunos de los posibles efectos de los NMs de origen antropogénico, en su mayoría nanopartículas, los cuales presentan posibles efectos tóxicos. Sin embargo, de entre los NMs de origen

natural destacan los coloides, suspensiones orgánicas o inorgánicas de partículas cuyo tamaño se encuentra entre 1 y 1000 nm, que han demostrado estar involucrados en procesos de transporte de contaminantes adsorbidos en aplicaciones medioambientales.⁹⁰

5.2. Estrategias para evaluar la toxicidad de Nanopartículas

El empleo generalizado de las NPs en productos de uso cotidiano, ha facilitado la exposición de las células a las mismas, por tanto, existe la necesidad de llevar a cabo estudios centrados en el comportamiento de las NPs en medios biológicos. Dado su pequeño tamaño y su elevada área superficial, la capacidad de dichos NMs de atravesar las membranas celulares es muy elevada, y puesto que su tamaño es muy similar al de otros componentes celulares, su introducción podría inducir cambios estructurales en proteínas o ácidos nucleicos, pudiendo afectar a las funciones celulares e incluso a su viabilidad.⁹¹

Desafortunadamente, los mecanismos de interacción de las NPs en los sistemas biológicos son en su mayoría desconocidos todavía. No obstante existen evidencias que demuestran que la incorporación celular depende del tipo de NPs, su tamaño, el recubrimiento e incluso la carga superficie.⁹² Asimismo, la incorporación depende del tipo celular y el tiempo de exposición, lo que dificulta enormemente una unificación de los resultados obtenidos en diferentes investigaciones sobre la toxicidad de la nanopartículas.

Dicha toxicidad puede estudiarse *in vitro* e *in vivo*. En los estudios *in vitro* se evalúa la toxicidad inducida por los nanomateriales en cultivos celulares (citotoxicidad). Con estos estudios se obtiene información preliminar del comportamiento de los NMs en sistemas biológicos. Mientras que en los estudios *in vivo* se emplean modelos animales para obtener una visión más compleja de las interacciones biológicas en los organismos vivos. De entre ellos, los más ampliamente utilizados son los estudios *in vitro*, puesto que son más rápidos, permiten un mayor control y minimizan las cuestiones éticas del uso de animales en el laboratorio.

5.2.1. Evaluación de la citotoxicidad de Nanopartículas.

Antes de llevar a cabo el estudio de la citotoxicidad inducida por NPs es necesario haber llevado a cabo previamente una caracterización completa de la suspensión de NPs de interés. Uno de los puntos que genera una mayor controversia, es la determinación del número de NPs presentes en la disolución, puesto que la concentración influye en los efectos tóxicos de las NPs sobre las células. Por tanto, además de las propiedades luminiscentes de las NPs, es necesario también obtener una correcta determinación en términos de concentración, que como se explicará a en la introducción correspondiente al Capítulo 2, es una tarea compleja.

A la hora de la evaluación de la citotoxicidad de NPs se debe determinar, en primer lugar, la internalización de las mismas por parte de las células. En este sentido, se pueden emplear técnicas microscópicas, como TEM, Microscopia Laser Confocal, entre otras. Con el empleo de TEM se puede discriminar entre NPs que se han internalizado correctamente en la célula y las que han permanecido en el medio e incluso, se puede obtener una visión detallada de las interacciones de las NPs con las estructuras celulares. Por otro lado, haciendo uso de las propiedades luminiscentes de las NPs, se puede utilizar la Microscopía confocal de fluorescencia, permitiendo obtener secciones ópticas de alta resolución y contraste a distintas profundidades de las células. Adicionalmente, se pueden marcar diferentes orgánulos de la célula con fluoróforos convencionales, facilitando la determinación de la distribución de las NPs en el interior de las células.

Por otra parte, puesto que la mayoría de las NPs poseen heteroátomos en su estructura, el ICP-MS puede ser una alternativa para la cuantificación de la cantidad de NPs introducidas en las NPs. Basándose en la determinación elemental, se han desarrollado estrategias de cuantificación de NPs incorporadas en el interior celular.

No obstante, lo más importante, además de la cuantificación de la concentración de NPs introducidas, es la evaluación de los efectos citotóxicos

inducidos por éstas en las células. Estos ensayos se basan en la medida de parámetros afectados por los agentes tóxicos sobre las funciones de las células, es decir, en la medida del daño celular. De entre ellos destacan los mecanismos de viabilidad celular (relación entre células vivas y muertas).

La viabilidad celular es un término general que se puede ser evaluada mediante diversos ensayos, los cuales determinan una o varios parámetros celulares: 1) Ensayos de actividad mitocondrial, donde destaca el ensayo MTT; 2) Ensayos de permeabilidad celular, como la monitorización de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en el medio celular, que indica la necrosis celular, o el uso de un colorante capaz de penetrar la membrana, el azul de tripano, de forma que las células muertas se tiñen de azul, distinguiéndose fácilmente de las sanas; 3) medida de la actividad esterasa intracelular; 4) monitorización de indicadores de apoptosis celular, como los sustratos de las enzimas caspasas.⁹²

Referencias bibliográficas

¹ Ong, S. E., Mann, M. Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative. *Nature chemical biology*, (2005), 1, 252-262.

² Patterson, S. D., Aebersold, R. H. Proteomics: the first decade and beyond. *Nature genetics*, (2003), 33, 311-323.

³ Mallick, P., Kuster, B. Proteomics: a pragmatic perspective. *Nature biotechnology*, (2010), 28, 695.

⁴ Geyer, P. E., Holdt, L. M., Teupser, D., Mann, M. Revisiting biomarker discovery by plasma proteomics. *Molecular systems biology*, (2017), 13, 942.

⁵ F.N.B.W. Group, BEST (Biomarkers, EndpointS, and other Tools) Resource, 2016.

⁶ da Costa, J. P., Santos, P. S., Vitorino, R., Rocha-Santos, T., Duarte, A. C. How low can you go? A current perspective on low-abundance proteomics. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, (2017), 93, 171-182.

⁷ Anderson, N. L., Anderson, N. G. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Molecular & cellular proteomics*, (2002), 1, 845-867.

⁸ Schiess, R., Wollscheid, B., Aebersold, R. Targeted proteomic strategy for clinical biomarker discovery. *Molecular oncology*, (2009), 3, 33-44.

⁹ Bantscheff, M., Lemeer, S., Savitski, M. M., Kuster, B. Quantitative mass spectrometry in proteomics: critical review update from 2007 to the present. *Analytical and bioanalytical chemistry*, (2012), 404, 939-965.

¹⁰ Wang, M., Feng, W. Y., Zhao, Y. L., Chai, Z. F. ICP-MS-based strategies for protein quantification. *Mass spectrometry reviews*, (2010), 29, 326-348.

¹¹ Ong, S. E.; Blagoev, B.; Kratchmarova, I.; Kristenssens, D. B.; Steen, H.; Pandey, A.; Mann, M. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Molecular Cell Proteomics*. (2002); 1, 376-386.

¹² Gygi, S. P.; Rist, B.; Gerber, S. A.; Turecek, F.; Gelb, M. H.; Aebersold, R. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nature Biotechnology*. (1999); 17, 994-999.

¹³ Thompson, A.; Schafer, J.; Kuhn, K.; Kienle, S.; Schwarz, J.; Schmidt, G.; Neumann, T.; Hamon, C. - Tandem mass tags: A novel quantification strategy for comparative analysis of complex protein mixtures by MS/MS. *Analytical Chemistry*. (2003); 75, 1895-1904.

¹⁴ Zhou, Y.; Shan, Y.; Zhang, L.; Zhang Y. Recent advances in stable isotope labeling based techniques for proteome relative quantification. *Journal of Chromatography A*. (2014); 1365, 1-11.

¹⁵ Lilley, K. S.; Razzaq, A.; Dupree, P. Two-dimensional gel electrophoresis: Recent advances in sample preparation, detection and quantitation. *Current Opinion in Chemical Biology*.(2002); 6, 46-50.

¹⁶ Gerber, S. A.; Rush, J.; Stemman, O.; Kirschner, M. W.; Gygi, S. P. Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. (2003); 100, 6940-6945.

¹⁷ Beynon, R. J.; Doherty, M. K.; Pratt, J. M.; Gaskell, S. J. Multiplexed absolute quantification in proteomics using artificial QCAT proteins of concatenated signature peptides. *Nature Methods*. (2003); 2, 587-589.

¹⁸ Bettmer, J., Bayón, M. M., Encinar, J. R., Sánchez, M. L. F., Medel, A. S. The emerging role of ICP-MS in proteomic analysis. *Journal of proteomics*, (2009), 72, 989-1005.

¹⁹ Cid-Barrio, L., Calderón-Celis, F., Abásolo-Linares, P., Fernández-Sánchez, M. L., Costa-Fernández, J. M., Encinar, J. R., Sanz-Medel, A. Advances in absolute protein quantification and quantitative protein mapping using ICP-MS. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*,(2018), 104, 148-159.

²⁰ Chahrour, O., Malone, J. Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) applications in quantitative proteomics. *Protein and peptide letters*, (2017), 24, 253-266.

²¹ Tholey, A., Schaumlöffel, D. Metal labeling for quantitative protein and proteome analysis using inductively-coupled plasma mass spectrometry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, (2010), 29, 399-408.

²² Sanz-Medel, A., Montes-Bayón, M., Bettmer, J., Fernández-Sánchez, M. L., Ruiz Encinar, J. ICP-MS for absolute quantification of proteins for heteroatom-tagged, targeted proteomics. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, (2012), 40, 52-63.

²³ Calderón-Celis, F., Encinar, J. R. Sanz-Medel, A. Standardization approaches in absolute quantitative proteomics with mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, (2018), 37, 715-737.

²⁴ Mounicou, S., Szpunar, J., Lobinski, R. Metallomics: the concept and methodology. *Chemical Society Reviews*, (2009), 38, 1119-1138.

²⁵ Bolea-Fernandez, E., Balcaen, L., Resano, M., Vanhaecke, F. Overcoming spectral overlap via inductively coupled plasma-tandem mass spectrometry (ICP-MS/MS). A tutorial review. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, (2017), 32, 1660-1679.

²⁶ Calderon-Celis, F., Diez-Fernandez, S., Costa-Fernández, J. M., Ruiz Encinar, J. Calvete, J. J., Sanz-Medel, A. Elemental mass spectrometry for absolute intact protein quantification without protein-specific standards: application to snake venomics. *Analytical chemistry*, (2016), 88, 9699-9706.

²⁷ Fernández, S. D., Sugishama, N., Encinar, J. R., Sanz-Medel, A. Triple quad ICPMS (ICPQQQ) as a new tool for absolute quantitative proteomics and phosphoproteomics. *Analytical chemistry*, (2012), 84, 5851-5857.

²⁸ Calderón-Celis, F., Cid-Barrio, L., Ruiz Encinar, J., Sanz-Medel, A., Calvete, J. J. Absolute venomics: Absolute quantification of intact venom proteins through elemental mass spectrometry. *Journal of proteomics*, (2017), 164, 33-42.

²⁹ Raab, A., Feldmann, J. Biological sulphur-containing compounds—Analytical challenges. *Analytica chimica acta*, (2019), 1079, 20-29.

³⁰ Campanella, B., Bramanti, E. Detection of proteins by hyphenated techniques with endogenous metal tags and metal chemical labelling. *Analyst*, (2014), 139, 4124-4153.

³¹ Guo, Y., Chen, L., Yang, L., Wang, Q. Counting sulfhydryls and disulfide bonds in peptides and proteins using mercurial ions as an MS-tag. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, (2008), 19, 1108-1113.

³² Kutscher, D. J., del Castillo Busto, M. E., Zinn, N., Sanz-Medel, A., Bettmer, J. Protein labelling with mercury tags: fundamental studies on ovalbumin derivatised with p-hydroxymercuribenzoic acid (pHMB). *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, (2008), 23, 1359-1364.

³³ Pereira Navaza, A., Encinar, J. R., Ballesteros, A., Gonzalez, J. M., Sanz-Medel, A. Capillary HPLC–ICPMS and tyrosine iodination for the absolute quantification of peptides using generic standards. *Analytical chemistry*, (2009), 81, 5390-5399.

³⁴ Giesen, C., Waentig, L., Panne, U., Jakubowski, N. History of inductively coupled plasma mass spectrometry-based immunoassays. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, (2012), 76, 27-39.

³⁵ Schwarz, G., Mueller, L., Beck, S., Linscheid, M. W. DOTA based metal labels for protein quantification: a review. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, (2014), 29, 221-233.

³⁶ Bomke, S., Sperling, M., Karst, U. Organometallic derivatizing agents in bioanalysis. *Analytical and bioanalytical chemistry*, (2010), 397, 3483-3494.

³⁷ Schaumlöffel, D., Ruiz Encinar, J., Łobiński, R. Development of a sheathless interface between reversed-phase capillary HPLC and ICPMS via a microflow total consumption nebulizer for selenopeptide mapping. *Analytical chemistry*, (2003), 75, 6837-6842.

³⁸ Pereira Navaza, A., Ruiz Encinar, J., Sanz-Medel, A. Absolute and accurate quantification of protein phosphorylation by using an elemental phosphorus standard and element mass spectrometry. *Angewandte Chemie International Edition*, (2007), 46, 569-571.

³⁹ Pröfrock, D., Prange, A. Compensation of gradient related effects when using capillary liquid chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry for the absolute quantification of phosphorylated peptides. *Journal of Chromatography A*, (2009), 1216, 6706-6715.

⁴⁰ Calderón-Celis, F., Sanz-Medel, A., Ruiz, Encinar, J. Universal absolute quantification of biomolecules using element mass spectrometry and generic standards. *Chemical Communications*, (2018), 54, 904-907.

⁴¹ Calderón-Celis, F., Sugiyama, N., Yamanaka, M., Sakai, T., Diez-Fernández, S., Calvete, J. J., Ruiz Encinar, J. Enhanced universal quantification of biomolecules using element MS and generic standards: application to intact protein and phosphoprotein determination. *Analytical chemistry*, (2018), 91, 1105-1112.

⁴² García Alonso, J. I., Rodríguez-González P., *Isotope Dilution Mass Spectrometry*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 2013.

⁴³ Hintenberger, H. (1956). A survey of the use of stable isotopes in dilution analyses. In *Electromagnetically enriched isotopes and mass spectrometry* (pp. 177-188). Butterworths, London, UK.

⁴⁴ Lásztity, A., Viczián, M., Wang, X., Barnes, R. M. Sample analysis by on-line isotope dilution inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, (1989), 4, 761-766

⁴⁵ Rottmann, L.; Heumann, K. G. *Fresenius' journal of analytical chemistry* (1994), 350, 221-227.

⁴⁶ Giné, M. F., & Packer, A. P. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, (2010), 21, 575-589.

⁴⁷ Rodríguez-González, P., Marchante-Gayón, J. M., Alonso, J. I. G., Sanz-Medel, A. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, (2005), 60, 151-207.

⁴⁸ D. Wild, *The immunoassay handbook*, Elsevier, 2013.

⁴⁹ Yalow, R. S., Berson, S. A. Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. *Nature*, (1959), 184, 1648-1649.

⁵⁰ Hagan, A. K., Zuchner, T. Lanthanide-based time-resolved luminescence immunoassays. *Analytical and bioanalytical chemistry*, (2011), 400, 2847-2864.

⁵¹ Liu, R., Wu, P., Yang, L., Hou, X., Lv, Y. Inductively coupled plasma mass spectrometry-based immunoassay: A review. *Mass spectrometry reviews*, (2014), 33, 373-393.

⁵² Mairinger, T., Wozniak-Knopp, G., Rüker, F., Koellensperger, G., Hann, S. Elemental labeling of antibody fragments for ICP-MS based immunoassays. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, (2016), 31, 2330-2337.

⁵³ Tanner, S. D., Bandura, D. R., Ornatsky, O., Baranov, V. I., Nitz, M., Winnik, M. A. Flow cytometer with mass spectrometer detection for massively multiplexed single-cell biomarker assay. *Pure and Applied Chemistry*, (2008), 80, 2627-2641.

⁵⁴ Lou, X., Zhang, G., Herrera, I., Kinach, R., Ornatsky, O., Baranov, V., Winnik, M. A. Polymer-based elemental tags for sensitive bioassays. *Angewandte Chemie International Edition*, (2007), 46, 6111-6114.

⁵⁵ Esteve-Turrillas, F. A., Abad-Fuentes, A. Applications of quantum dots as probes in immunosensing of small-sized analytes. *Biosensors and Bioelectronics*, (2013), 41, 12-29.

⁵⁶ Pei, X., Zhang, B., Tang, J., Liu, B., Lai, W., Tang, D. Sandwich-type immunosensors and immunoassays exploiting nanostructure labels: A review. *Analytica chimica acta*, (2013), 758, 1-18

⁵⁷ Liu, R., Wu, P., Yang, L., Hou, X., Lv, Y. Inductively coupled plasma mass spectrometry-based immunoassay: A review. *Mass spectrometry reviews*, (2014), 33, 373-393.

⁵⁸ Arts, J. H., Hadi, M., Keene, A. M., Kreiling, R., Lyon, D., Maier, M., Wiench, K. A critical appraisal of existing concepts for the grouping of nanomaterials. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, (2014), 70, 492-506.

⁵⁹ J. Potočník, Commission recommendation of 18 October 2011 on the definition of nanomaterial (2011/696/EU). 2011.

⁶⁰ Moreira-Alvarez, B., Cid-Barrio, L., Ferreira, H. S., Costa-Fernández, J. M., & Ruiz Encinar, J. Integrated analytical platforms for the comprehensive characterization of bioconjugated inorganic nanomaterials aiming at biological applications. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, (2020), 35, 1518-1529.

⁶¹ Brakmann, S. DNA-Based Barcodes, Nanoparticles, and Nanostructures for the Ultrasensitive Detection and Quantification of Proteins. *Angewandte Chemie International Edition*, (2004), 43, 5730-5734.

⁶² Amaro, M., Oaew, S., Surareungchai, W. Scano-magneto immunoassay based on carbon nanotubes/gold nanoparticles nanocomposite for *Salmonella enterica* serovar Typhimurium detection. *Biosensors and Bioelectronics*, (2012), 38, 157-162.

⁶³ Szunerits, S., Spadavecchia, J., Boukherroub, R. Surface plasmon resonance: signal amplification using colloidal gold nanoparticles for enhanced sensitivity. *Reviews in Analytical Chemistry*, (2014), 33(3), 153-164.

⁶⁴ Chan, W. C., Nie, S. Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection. *Science*, (1998), 281(5385), 2016-2018.

⁶⁵ Willard, D. M. Nanoparticles in bioanalytics. *Analytical and bioanalytical chemistry*, (2003), 376, 284-286.

⁶⁶ Shi, J., Tian, F., Lyu, J., Yang, M. Nanoparticle based fluorescence resonance energy transfer (FRET) for biosensing applications. *Journal of materials chemistry B*, (2014), 3, 6989-7005.

⁶⁷ Goryacheva, O. A., Beloglazova, N. V., Vostrikova, A. M., Pozharov, M. V., Sobolev, A. M. Goryacheva, I. Y.. Lanthanide-to-quantum dot Förster resonance energy transfer (FRET): Application for immunoassay. *Talanta*, (2017), 164, 377-385.

⁶⁸ Tang, D., Cui, Y., Chen, G. Nanoparticle-based immunoassays in the biomedical field. *Analyst*, (2013), 138, 981-990.

⁶⁹ Alonso, M. C., Trapiella-Alfonso, L., Fernández, J. M. C., Pereiro, R., Sanz-Medel, A. Functionalized gold nanoclusters as fluorescent labels for immunoassays: Application to human serum immunoglobulin E determination. *Biosensors and Bioelectronics*, (2016), 77, 1055-1061.

⁷⁰ Bouzas-Ramos, D., García-Alonso, J. I., Costa-Fernández, J. M., Ruiz Encinar, J. Quantitative Assessment of Individual Populations Present in Nanoparticle-Antibody Conjugate Mixtures Using AF4-ICP-MS/MS. *Analytical chemistry*, (2019), 91, 3567-3574.

⁷¹ Hu, J., Deng, D., Liu, R., Lv, Y. Single nanoparticle analysis by ICPMS: a potential tool for bioassay. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, (2018), 33, 57-67.

⁷² Degueldre, C., Favarger, P. Y., Bitea, C. Zirconia colloid analysis by single particle inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, (2004), 518, 137-142.

⁷³ Han, G., Xing, Z., Dong, Y., Zhang, S., Zhang, X. One-step homogeneous DNA assay with single-nanoparticle detection. *Angewandte Chemie*, (2011), 123, 3524-3527.

⁷⁴ Hu, S., Liu, R., Zhang, S., Huang, Z., Xing, Z., Zhang, X. A new strategy for highly sensitive immunoassay based on single-particle mode detection by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, (2009), 20, 1096-1103.

⁷⁵ Liu, R., Xing, Z., Lv, Y., Zhang, S., Zhang, X. Sensitive sandwich immunoassay based on single particle mode inductively coupled plasma mass spectrometry detection. *Talanta*, (2010), 83, 48-54.

⁷⁶ O'Brien, M. N., Jones, M. R., Brown, K. A., Mirkin, C. A. Universal noble metal nanoparticle seeds realized through iterative reductive growth and oxidative dissolution reactions. *Journal of the American Chemical Society*, (2014), 136, 7603-7606.

⁷⁷ Xu, S., Ji, X., Xu, W., Li, X., Wang, L., Bai, Y., Ozaki, Y. Immunoassay using probe-labelling immunogold nanoparticles with silver staining enhancement via surface-enhanced Raman scattering. *Analyst*, (2004), 129, 63-68.

⁷⁸ Ding, L., Bond, A. M., Zhai, J., Zhang, J. Utilization of nanoparticle labels for signal amplification in ultrasensitive electrochemical affinity biosensors: a review. *Analytica chimica acta*, (2013), 797, 1-12.

⁷⁹ García-Cortés, M., Ruiz Encinar, J., Costa-Fernández, J. M., Sanz-Medel, A. Highly sensitive nanoparticle-based immunoassays with elemental detection: Application to Prostate-Specific Antigen quantification. *Biosensors and Bioelectronics*, (2016), 85, 128-134.

⁸⁰ Liu, R., Liu, X., Tang, Y., Wu, L., Hou, X., Lv, Y. Highly sensitive immunoassay based on immunogold- silver amplification and inductively coupled plasma mass spectrometric detection. *Analytical chemistry*, (2011), 83, 2330-2336.

⁸¹ Cui, Z., Wu, D., Zhang, Y., Ma, H., Li, H., Du, B., Ju, H. Ultrasensitive electrochemical immunosensors for multiplexed determination using mesoporous platinum nanoparticles as nonenzymatic labels. *Analytica chimica acta*, (2014), 807, 44-50.

⁸² Liu, R., Zhang, Y., Zhang, S., Qiu, W., Gao, Y. Silver enhancement of gold nanoparticles for biosensing: from qualitative to quantitative. *Applied Spectroscopy Reviews*, (2014), 49, 121-138.

⁸³ Laborda, F., Bolea, E., Jiménez-Lamana, J. Single particle inductively coupled plasma mass spectrometry for the analysis of inorganic engineered nanoparticles in environmental samples. *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, (2016), 9, 15-23.

⁸⁴ Peralta-Videa, J. R., Zhao, L., Lopez-Moreno, M. L., de la Rosa, G., Hong, J., Gardea-Torresdey, J. L. Nanomaterials and the environment: a review for the biennium 2008–2010. *Journal of hazardous materials*, (2011), 186, 1-15.

⁸⁵ Lapresta-Fernández, A., Fernández-Camacho, A., Blasco, J. (2012). Public concern over ecotoxicology risks from nanomaterials: Pressing need for research-based information.

⁸⁶ Colman, B. P., Espinasse, B., Richardson, C. J., Matson, C. W., Lowry, G. V., Hunt, D. E., Bernhardt, E. S. Emerging contaminant or an old toxin in disguise? Silver nanoparticle impacts on ecosystems. *Environmental science & technology*, (2014), 48, 5229-5236.

⁸⁷ Boverhof, D. R., David, R. M. Nanomaterial characterization: considerations and needs for hazard assessment and safety evaluation. *Analytical and bioanalytical chemistry*, (2010), 396, 953-961.

⁸⁸ da Silva, B. F., Pérez, S., Gardinalli, P., Singhal, R. K., Mozeto, A. A., Barceló, D. Analytical chemistry of metallic nanoparticles in natural environments. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, (2011), 30, 528-540.

⁸⁹ Richardson, S. D. (2009). Water analysis: emerging contaminants and current issues. *Analytical chemistry*, 81(12), 4645-4677.

⁹⁰ Oberdörster, G., Stone, V., Donaldson, K. Toxicology of nanoparticles: a historical perspective. *Nanotoxicology*, (2007), 1(1), 2-25.

⁹¹ Farré, M., Sanchís, J., Barceló, D. Analysis and assessment of the occurrence, the fate and the behavior of nanomaterials in the environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, (2011), 30, 517-527.

⁹² Soenen, S. J., Rivera-Gil, P., Montenegro, J. M., Parak, W. J., De Smedt, S. C., Braeckmans, K. Cellular toxicity of inorganic nanoparticles: common aspects and guidelines for improved nanotoxicity evaluation. (2011), *Nano today*, 6, 446-465.

OBJETIVOS GENERALES

Objetivos

Como se ha reflejado en la Introducción de esta Tesis, uno de los principales retos actuales en el análisis de muestras de interés biológico y medioambiental es el desarrollo de metodologías de cuantificación absoluta de biomoléculas y nanopartículas. Además, la necesidad de cuantificar niveles muy bajos de concentración de éstas en muestras complejas, como biomarcadores de alarma temprana en muestras biológicas o NPs en muestras de interés medioambiental o en estudios de citotoxicidad, requiere inherentemente de métodos cuantitativos ultrasensibles que se adecúen al fin concreto.

El objetivo general de la presente Tesis Doctoral consiste en el desarrollo de nuevas metodologías para la cuantificación de proteínas y nanopartículas en muestras de interés clínico y toxicológico. Este objetivo general se abordó a través de los siguientes objetivos específicos:

1. **CAPÍTULO 1:** Como se comentó a lo largo de la introducción, uno de las principales limitaciones en la cuantificación absoluta de biomoléculas es la falta de patrones específicos para cada una de las biomoléculas de interés así como la correcta caracterización de los pocos patrones existentes. En este contexto, es de especial interés el desarrollo de metodologías capaces de proporcionar la cuantificación requerida sin recurrir a dichos patrones específicos. La espectrometría de masas elemental (ICP-MS) permite obtener una cuantificación absoluta de los elementos presentes en una biomolécula empleando patrones genéricos, gracias a su señal virtualmente independiente de la especie. Por tanto, para llevar a cabo una cuantificación de forma adecuada con patrones genéricos, es necesario asegurar que efectivamente la respuesta del ICP es independiente de la especie. El objetivo del primer capítulo consiste en la comparación de los factores de respuesta obtenidos en ICP para 13 biomoléculas de distinta naturaleza, tamaño y carácter hidrofóbico, con su correspondiente patrón inorgánico del mismo heteroátomo. Dado que la señal del ICP depende fundamentalmente del sistema de nebulización utilizado, se

emplearán para la comparación, tres sistemas de nebulización diferentes: dos de flujo normal y un micronebulizador de consumo total.

2. CAPÍTULO 2: De nuevo, uno de los factores limitantes para la cuantificación de nanopartículas (NPs), en auge en los últimos años, es la falta de patrones adecuadamente certificados, que permitan llevar a cabo una cuantificación apropiada en términos de concentración. Por tanto, en este capítulo se evaluará de forma análoga al Capítulo 1, la capacidad del ICP-MS de llevar a cabo una cuantificación de NPs sin necesidad de utilizar patrones específicos. Se compararán los factores de respuesta obtenidos, utilizando los tres sistemas de nebulización anteriores, para unos Quantum Dots (QDs) y su correspondiente patrón inorgánico del elemento de interés.

3. CAPÍTULO 3: Como se introdujo en la presente memoria, la cuantificación de biomarcadores que se encuentran en muy baja concentración en muestras complejas constituye todavía un reto. Por ello, este capítulo se perdigue el desarrollo de un inmunoensayo con una detección sencilla y rápida, para la detección ultrasensible de Antígeno de Próstata Específico (PSA) en muestras de interés biológico. Se recurre a la combinación de estrategias de amplificación empleando nanomateriales: la capacidad de éstos de actuar como semillas catalíticas en la reducción de metales sobre su superficie y la amplificación de la señal analítica. Se estudiarán la capacidades catalíticas de dos tipos de NPs como semillas: AuNPs y QDs de Mn-ZnS y la posibilidad de llevar a cabo la detección sobre el mismo soporte sólido en el que se lleva a cabo el inmunoensayo mediante la detección del aumento de tamaño de las partículas por microscopía confocal de reflexión. Una vez seleccionada la semilla catalítica con mejores propiedades, se llevará a cabo un proceso de optimización de las variables involucradas en la etapa de amplificación. Finalmente, se evaluarán las capacidades de la metodología desarrollada para la determinación ultrasensible de PSA.

4. CAPÍTULO 4: Como se ha comentado, las NPs son también un indicador de contaminación ambiental y se requiere la monitorización de su comportamiento en los organismos vivos. Sin embargo, se han descrito que la formación de NPs no tóxicas podría ser un posible mecanismo en los procesos

de detoxificación de ciertos metales tóxicos, este es el caso particular del Hg, donde se ha observado la formación de NPs de HgSe como último producto del metabolismo del Hg. Por ello, durante este capítulo se llevará a cabo la comparación de la citotoxicidad inducida por tres especies de Hg: dos tóxicos bien reconocidos (metilmecurio y Hg inorgánico) y unas NPs HgSe sintetizadas solubles en medio acuoso. Dos líneas celulares humanas se expondrán a los 3 tóxicos utilizando diferentes concentraciones de Hg y tiempos de incubación se estudiara la viabilidad celular en función de las condiciones ensayadas. Asimismo se determinará la cantidad de Hg incorporado en el interior celular según la especie.

Objectives

As stated in the Introduction section of this PhD, one of the main challenges for biological and environmental related samples analysis, is the development of quantitative strategies for biomolecules and nanoparticles (NPs) detection. Moreover, the presence of these targets in extremely low concentrations levels in complex samples, such as early diagnosis biomarkers or NPs in environmental samples and cytotoxicity assays, required from ultrasensitive quantitative methodologies.

This PhD Thesis has aimed to the development of methodologies to quantify in absolute terms biomolecules and NPs in clinical and environmental relevant samples. This general objective will be addressed through the following specific partial objectives:

1. Chapter 1: As mentioned above, one of the main limitations nowadays in absolute quantification of biomolecules is related to the lack of adequate and well characterized specific standards, which allows us to quantify properly such biomolecules. For that reason, ICP-MS has become in a good alternative for biomolecule quantification, due to its capabilities to achieve absolute quantification using generic standards. However, such quantification is carried out assuming the same response factor for generic standards (usually inorganic standards) and target biomolecules. In this chapter the capabilities of ICP-MS to provide species-independent response will be evaluated for a wide range of biomolecules (all S-containing biomolecules) covering a wide range of sizes a hydrophobic character. Different nebulization systems, operational conditions and wide concentration range will be tested. Corresponding response factors for the 13 different relevant biological compounds will be statistically compared.
2. Chapter 2: In the same way, only a few Nanoparticle (NP) reference materials, which provide the NP number and mass concentration, are available. In this context, ICP-MS is widely used for NP quantification based on NP reference materials or inorganic standards, assuming again the same ICP

response factor between for NPs, regardless of its different nature, size or surface covering and such NP reference materials or inorganic standards. For that reasons, and based on the same statistical comparison carried out for biomolecule response factor, the capabilities of ICP-MS to provide the same response for different nanoparticulated species will be evaluated. Different nebulization systems, operational conditions and wide concentration ranges will be tested.

3. Chapter 3: Methodologies for highly sensitive biomarker detection at very low concentration levels are demanded for diagnosis applications. Herein, we will be evaluated the development of an ultrasensitive immunoassay for biomarker determination, using PSA as model analyte. To achieve the high sensitivity required, the combination of the specificity provided by immunoassays and an amplification strategy using nanomaterials will be tested. First, the ability of nanomaterials to act as catalytic seeds to reduce metals on their surface and the consequent enhanced of analytical signal will be evaluated. First, two different NPs will be tested as catalytic seeds: AuNPs and Mn-ZnS QDs and the possibility to carry out a simple and fast optical detection, in the same solid surface where the immunoassay is performed, based on confocal microscopy in reflection mode. Finally, the amplification step will be optimized and then, applied to PSA determination in clinical relevant samples.

4. Chapter 4: As has been mentioned, NPs are also used to monitored environmental contamination and the determination of their behavior in living organisms is required. However, some examples where the formation of non-toxic NPs as possible mechanism in the detoxification processes of certain toxic metals has been described, this is the particular case of Hg, where the formation of HgSe NPs has been observed as the last product of the Hg metabolism. For that reason, a critical comparison with the cytotoxicity of the most common Hg species found in nature (inorganic and MeHg) and a water stabilized HgSeNPs will be assayed. For this purpose, two human cell lines were selected and che viability induced for such Hg species will be evaluated, at different Hg concentrations and incubation times. Additionally, quantification of Hg uptake by cells and its location will be determined.

CAPÍTULO 1: Evaluación crítica del potencial y las limitaciones de la espectrometría de masas elemental para la cuantificación absoluta de biomoléculas empleando patrones genéricos

1. Introducción

A lo largo de la Introducción de la presente Tesis Doctoral se ha definido la importancia de llevar a cabo una cuantificación absoluta de biomoléculas en diversos campos como de las Ciencias de la Vida.¹ Esta determinación de la concentración exacta de biomoléculas (ya sean péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, cofactores, enzimas, etc), permite obtener un conocimiento más profundo de los mecanismos biológicos que controlan el metabolismo de los organismos vivos. Dicha cuantificación absoluta es relevante sobre todo en el ámbito de la clínica para el diagnóstico de enfermedades o para el descubrimiento de nuevos biomarcadores.^{2,3} Además, es necesario conocer la cantidad en términos absoluto de un gran número de biomoléculas, así como la relación en la que se encuentran distintas biomoléculas, para conocer con exactitud el estado biológico en el que se encuentra el sistema.⁴

La mayor parte de las estrategias de cuantificación absoluta de biomoléculas están basadas en las Espectrometría de Masas Molecular, lo que requiere del uso de patrones específicos.^{3,5} Estas metodologías están enormemente limitadas por la falta de patrones específicos adecuados y correctamente caracterizados para cada biomolécula de interés. La exactitud de los resultados de cuantificación obtenidos viene dada por la calidad y certificación de pureza de dichos patrones. Por tanto, existe una necesidad de desarrollar metodologías analíticas para la cuantificación de biomoléculas que no requieran de uso de patrones específicos, que permitan obtener resultados cuantitativos de elevada calidad.⁶

1.1. El ICP-MS como herramienta para la cuantificación absoluta de biomoléculas

En este sentido, el potencial del ICP-MS de proporcionar una cuantificación absoluta sin necesidad de utilizar patrones específicos, lo ha convertido en una alternativa a la MS molecular, con la única condición de que las biomoléculas

diana contengan un heteroátomo en su estructura (cualquier elemento distinto a C, H, N, O y F).^{5,7,8} Sin embargo, puesto que la muestra en ICP-MS es totalmente atomizada e ionizada, la información estructural se pierde durante el análisis. Esto conlleva la necesidad de realizar una separación previa que permita distinguir entre las distintas especies, normalmente empleando cromatografía de líquidos (LC). En esta línea, la combinación de la MS elemental (ICP) con la MS molecular (ESI) en paralelo, se ha aplicado de forma satisfactoria a la identificación y cuantificación, empleando patrones genéricos, de péptidos y/o proteínas^{7,9} y otras biomoléculas relevantes en muestras biológicas, como por ejemplo metabolitos en orina o antioxidantes en extractos de agua en muestras de ostras.^{10,11} Teniendo en cuenta que la cuantificación obtenida mediante ICP-MS es elemental, es decir, cantidad del heteroátomo, la transformación en cuantificación absoluta de la biomolécula correspondiente se lleva a cabo utilizando la estequiometría heteroátomo/biomolécula determinada previamente mediante el análisis de MS molecular.

1.1.1. Problemática en la cuantificación absoluta en ICP-MS empleando patrones genéricos:

Esta cuantificación absoluta mediante ICP-MS sin necesidad de patrones específicos descrita en el apartado anterior, se basa en el supuesto de que la respuesta obtenida en ICP-MS es independiente de la especie, es decir, que esta solamente depende de la cantidad de heteroátomo presente en dichas biomoléculas. Sin embargo, alrededor de esta suposición existe todavía mucha controversia y se han publicado resultados contradictorios. De hecho, todavía no se han establecido en qué condiciones el empleo de un patrón genérico sencillo que contenga el heteroátomo, puede ser empleado para la cuantificación absoluta de biomoléculas complejas que contengan el mismo heteroátomo.

En este contexto, es bien sabido que los sistemas de nebulización convencionales empleados en equipos de ICP-MS poseen una eficiencia e nebulización baja (normalmente por debajo del 10%). Además, se asume que

esta eficiencia es igual para todos los tipos de compuestos, independientemente de sus características químicas como el tamaño, estructura, hidrofobicidad, etc.¹² Cabe resaltar que las capacidades del ICP-MS para llevar a cabo cuantificación independiente de la especie, se pueden ver gravemente comprometidas si la respuesta elemental del ICP-MS no es idéntica entre distintas especies químicas. Basándose en esta premisa, se han realizado diferentes estudios centrados en el análisis de compuestos de bajo peso molecular, sobre todo compuestos organometálicos de As, Hg, Sn, I y Se, en cuyos resultados se han observado diferencias en la señal obtenida en ICP-MS entre las especies y sus correspondientes patrones inorgánicos de los elementos,^{13,14} dependiendo de la volatilidad de las especies estudiadas^{15;16} y el sistema de nebulización empleado.¹⁴

A pesar del número de estudios centrados en la posible diferencia de respuesta en ICP-MS, no existen todavía evidencias que demuestren la diferencia o igualdad de los factores de respuesta obtenidos para compuestos no volátiles con estructuras más complejas (como péptidos o proteínas). De hecho, algunos estudios han encontrado factores de respuesta idénticos en equipos de ICP-MS equipados con un nebulizador concéntrico, para el análisis de patrones de Cobalto y cianocobalina (1,34 kDa)¹² y para distintos compuestos de Selenio como selenato, selenometionina o trimetrilselenomio.¹⁷ Por otro lado, Pereira *et al*¹⁸, hallaron que la respuesta para distintos compuestos de fósforo utilizando un micronebulizador de consumo total (*Total Consumption Nebulizer*, TCN) es independiente de la especie. Dentro de las especies estudiadas se incluían fosfopéptidos (1,54 kDa). La misma respuesta independiente de la especie fue encontrada por Guo *et al*¹⁹, para el análisis de pequeñas proteínas, con tamaños menores a 15 kDa, marcadas con metilmercurio (MeHg), basándose en el empleo de otro nebulizador de elevada eficiencia (*Direct Injection High Efficiency Nebulizer*, DIHEN). Desafortunadamente, no se han reportado estudios centrados en la respuesta independiente de la especie de compuestos de mayor peso molecular

1.2. Importancia de la medida de S

La falta de estudios de compuestos de mayor peso molecular como proteínas, puede estar relacionado en gran medida con las limitaciones asociadas a los equipos tradicionales de ICP-MS equipados con un cuadrupolo (Q) como analizador de masas para la medida de azufre. El S es uno de los elementos de mayor interés en campos relacionados con las ciencias de la vida, debido al amplio rango de los compuestos que contienen S presentes en la naturaleza, entre los que se encuentran los aminoácidos (metionina y cisteína), carbohidratos, lípidos, metabolitos, entre otros.²⁰

En este sentido, la medida de S mediante ICP-MS ha estado tradicionalmente limitada debido a su elevado potencial de ionización y al enorme número de interferencias poliatómicas.²¹ Sin embargo, gracias a la introducción del concepto de espectrometría de masas en tándem, típicamente empleado en MS molecular, en la MS elemental (ICP-MS/MS) ha permitido la medida de S libre de interferencias y con elevada sensibilidad.^{22,23} Con esta nueva tecnología, la medida de S se lleva a cabo empleando un gas reactivo, como es el caso del oxígeno, con objeto de formar una nueva especie (SO^+), que permite la medida del elemento libre de las interferencias poliatómicas existentes en su masa original. Además, con esta configuración se eliminan las interferencias que afectan a la medida de la masa del nuevo ion generado en la celda de colisión/reacción, debido a la existencia de un primer cuadrupolo (Q1) previo a la celda de colisión, que actúa como filtro de iones permitiendo únicamente el paso de los elementos con la relación masa carga (m/z) de interés. Un esquema del funcionamiento de la configuración MS en tándem para la medida de S se encuentra recogido en la Figura 11. La aplicación de esta configuración para cuantificación absoluta de biomoléculas en cuyas estructuras se encuentra presente el S, como péptidos o proteínas, ha crecido de forma exponencial en los últimos 10 años.^{24,25}

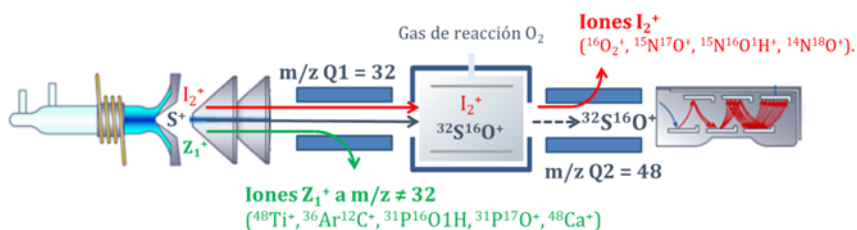


Figura 11. Configuración ICP-MS/MS para la medida de ^{32}S libre de interferencias.

Sorprendentemente, no hay estudios centrados en la evaluación de la respuesta independiente de la especie del ICP-MS para este tipo de compuestos de gran tamaño y no volátiles, especialmente cuando se emplean nebulizadores convencionales. Sin embargo, muchas de las aplicaciones del ICP-MS en el campo de la proteómica emplean la dilución isotópica en línea como estrategia de cuantificación,^{26,27} que como ya se ha comentado en la introducción, se basa en la adición de un flujo constante de un patrón enriquecido isotópicamente (normalmente un compuesto inorgánico) que contiene el elemento de interés, una vez que se ha producido la correspondiente separación cromatográfica de las distintas especies. Estas estrategias basadas en la IDMS en línea proporcionarán una cuantificación absoluta apropiada siempre y cuando la respuesta obtenida mediante la medida de ICP-MS para las proteínas sea, efectivamente, independiente de la especie.

2. Objetivos

Dado el crecimiento exponencial del empleo del ICP-MS como herramienta para la cuantificación absoluta de biomoléculas, así como la falta de estudios centrados en la evaluación de la respuesta independiente de la especie de compuestos no volátiles y de alto peso molecular, sobretodo utilizando nebulizadores convencionales, el objetivo principal del presente capítulo es la evaluación de la respuesta independiente de la especie del ICP-MS para la cuantificación absoluta de péptidos y proteínas sin necesidad de utilizar patrones específicos.

Se evaluó en primer lugar, el factor de respuesta obtenido en ICP-MS para compuestos de diferente naturaleza (tamaño, hidrofobicidad, estructura), todos ellos con S en su estructura, empleando tres tipos de nebulizadores distintos: un micronebulizador de consumo total (TCN), un nebulizador concéntrico de flujo normal y un nebulizador de flujo cruzado también de flujo normal. Para ello, se comparan estadísticamente los factores de respuesta obtenidos para cada compuesto con cada nebulizador, comparándolos con el factor de respuestas obtenido para el correspondiente patrón inorgánico de S (SO_4^{2-}).

Posteriormente, se valoró la influencia de las condiciones de operación empleadas durante el análisis sobre la respuesta obtenida en ICP-MS. Tomando como modelo uno de los compuestos de S (BSA) y comparando los resultados con los obtenidos para el patrón inorgánico de S, se ensayaron distintas condiciones para el flujo de gas de nebulización, el flujo de líquido introducido, la temperatura de la cámara de nebulización o el contenido salino, con el fin de determinar si las condiciones afectan a la diferencia en los factores de respuesta.

Finalmente, los resultados obtenidos para los factores de S en proteínas se validaron a través de la comparación de los factores de respuesta obtenidos para S con los obtenidos para P, utilizando para ello una proteína fosforilada, la β -caseína.

3. Experimental

3.1. Selección de los analitos

Los compuestos seleccionados para la comparación de factores de respuesta en ICP-MS incluyen una gran variedad de tamaños, naturaleza química y estructuras. En primer lugar, se seleccionaron tres compuestos de bajo peso molecular muy relevantes en términos biológicos: un aminoácido proteínogénico, la L-metionina, y dos cofactores, la S-adenosilmetionina (SAM) y la biotina, los cuales se ven envueltos en reacciones de metilación²⁸ y procesos redox²⁹ en organismos biológicos. Por otro lado, se eligieron tres péptidos de diferentes tamaños cubriendo un amplio rango de hidrofobicidades (% de porcentaje de residuos hidrofóbicos respecto al total de aminoácidos presentes en su estructura).³⁰ Los péptidos seleccionados, cuya secuencia de aminoácidos se encuentra recogida en la Tabla 2, fueron: el fragmento 1-17 de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH, con un peso molecular de 2,1 kDa y un % de hidrofobicidad del 29%), Vasopresina (1,1 kDa y 22% de hidrofobicidad) y Neurokinina A (1,1 kDa y 40% de hidrofobicidad).

Tabla 2. Tamaño y secuencia de aminoácidos de los péptidos seleccionados.

	Número de aminoácidos	Secuencia de aminoácidos
ACTH Fragmento 1-17	17	SYSMEHFRWGPVGGKKR
Vasopresina	9	CYFQNCPKG-NH ₂
Neurokinina A	10	HKTDSFVGLM

A continuación, se seleccionaron compuestos de la misma naturaleza aminoacídica y con distinto carácter hidrofóbico, pero con un peso molecular superior como son las proteínas. Como compuestos modelo de proteínas cubriendo un rango amplio de estructuras y tamaño se tomaron el Citocromo C (13 kDa), β -caseína (24 kDa), Albúmina de Suero Bovino (BSA, 66 kDa) y un anticuerpo monoclonal (mAb) intacto (145 kDa). Finalmente, a fin de estudiar

Capítulo 1

otros compuestos biológicamente relevantes con una estructura completamente diferente, se seleccionaron tres derivados del polietilenglicol (PEGs) cuyas estructuras recogidas en la Figura 12, están formadas por cadenas lineales muy hidrofílicas. Estos derivados del PEG son ampliamente empleados en estudios biológicos para aumentar la solubilidad y biocompatibilidad de algunas moléculas o incluso, para nanopartículas o medicamentos.³¹ Se escogieron tres derivados de distintos tamaños: uno de 1 kDa y dos de 20kDa, uno de ellos totalmente lineal y el otro ramificado, todos ellos con un grupo tiol en uno de sus extremos.

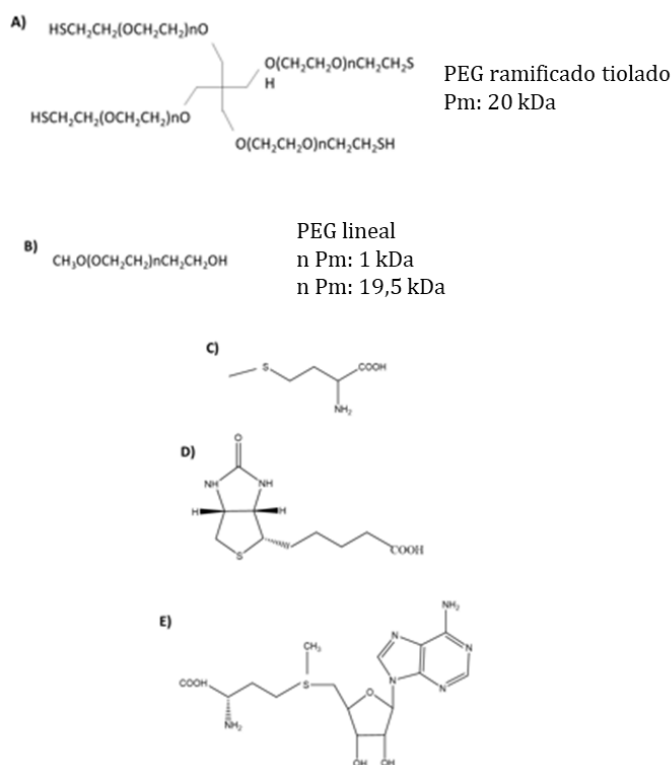


Figura 12. Estructura de los compuestos de S seleccionados: A) PEG tiolado de 20 kDa ramificado, B) PEG tiolado lineal de 1 y 20 kDa, C) Metionina, D) Biotina y E) SAM.

Como se puede apreciar en la Figura 12 y la Tabla 2, todos los compuestos seleccionados poseen S en su estructura, lo que hace posible su detección por ICP-MS/MS.^{23,32} Además la determinación de S es importante no solo en los

compuestos seleccionados (péptidos, proteínas o cofactores) sino que el S está presente en multitud de biomoléculas relevantes como oligosacáridos, vitaminas o metabolitos.^{29,33}

3.2. Instrumentación

El sistema de ICP-MS empleado durante los análisis consiste en un equipo de tipo triple cuadrupolo 8900 ICP-MS/MS de la empresa Agilent. Para la comparación de los factores de respuesta los análisis se mediante análisis por inyección en flujo (Flow injection analysis, FIA), utilizando en el caso de los análisis de flujo normal una válvula de inyección de 6 vías (Rheodyne) con un volumen de inyección de 20 μL y unas conexiones de PEEK con un diámetro interno de 0.254mm. Mientras que para los análisis llevado a cabo con microflujos, se emplea un HPLC capilar tipo Infinity 1260 equipado con un automuestreador con un volumen de inyección de 1 μL de la empresa Agilent Technologies, con unas conexiones de nuevo de PEEK, pero en esta ocasión con un diámetro interno de 25 μm .

La comparación de los factores de respuesta se lleva a cabo utilizando tres tipos de nebulizadores distintos, dos de ellos de flujo normal: un nebulizador concéntrico Micromist de la empresa Agilent y un nebulizador de flujo cruzado de la empresa Savillex, ambos acoplados a una cámara de nebulización de doble paso tipo Scott y un micronebulizador de consumo total (TCN) de la empresa Agilent.

Para la dilución isotópica en línea se utilizó una bomba peristáltica miniplus 3 (Gibson) durante los análisis de flujo normal, mientras que para los análisis de flujo capilar, se empleó una bomba de jeringa kdScientific (Holliston).

3.3. Procedimientos.

3.3.1. Preparación curvas de calibrado

Puesto que la concentración de las biomoléculas estudiadas pueden tener un papel relevante en los factores de respuesta obtenidos en ICP-MS, se llevaron a cabo rectas de calibrado con un total de 10 puntos ($n=10$) cubriendo más de un orden de magnitud (desde 40 hasta 1300 ppb de S). Además se inyectaron 4 réplicas de cada punto de los correspondientes calibrados)

Para construir las rectas de calibrado de S para cada una de las distintas especies, se seleccionó como método de introducción de las muestras el análisis por inyección el flujo (FIA) para disminuir la influencia de los fondos de la señal de S, típicamente observados en ICP-MS asociados a los componentes del equipo, el flujo de argón o a las disoluciones empleadas, así como para incrementar el rendimiento de los análisis. En la Figura 13 se muestra un diagrama de la configuración instrumental utilizada para la comparación de los factores de respuesta de ICP-MS mediante FIA.

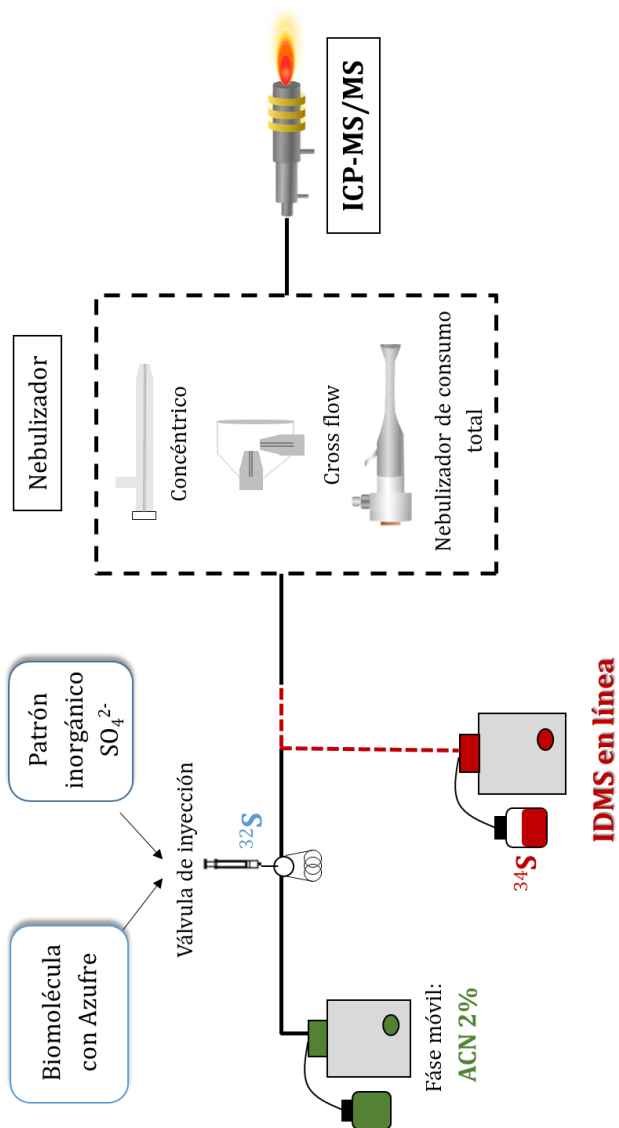


Figura 13. Diagrama de la configuración instrumental para la comparación de factores de respuesta de biomoléculas de azufre en ICP-MS empleando dilución isotópica en línea (IDMS).

Capítulo 1

Las condiciones instrumentales empleadas para la comparación de los factores de respuesta empleadas con cada uno de los nebulizadores ensayados se recogen en la Tabla 3.

Tabla 3. Condiciones instrumentales empleadas para la comparación de los factores de respuesta de compuestos de S mediante FIA-ICP-MS e IDMS.

	Nebulizador concéntrico	Nebulizador de Flujo cruzado	Nebulizador de consumo total
Potencia		1550 W	
Distancia antorcha		8 mm	
Flujo gas de nebulización	1,1 L min ⁻¹	1,2 L min ⁻¹	1,0 L min ⁻¹
Flujo fase móvil	350 µL min ⁻¹	350 µL min ⁻¹	5 µL min ⁻¹
Flujo trazador ³⁴ S añadido en línea	350 µL min ⁻¹	350 µL min ⁻¹	2 µL min ⁻¹
Concentración trazador ³⁴ S	30 ng mL ⁻¹	45 ng mL ⁻¹	300 ng mL ⁻¹
Volumen de inyección	20 µL	20 µL	1 µL

La influencia de la estructura de los compuestos en la señal del ICP-MS se evaluó directamente a través de la comparación de los factores de respuesta de S obtenidos para cada uno de los compuestos ensayados, con el factor de respuesta obtenido para el patrón de S inorgánico certificado (³²SO₄²⁻). Para ello, se construyeron rectas de calibrado donde la concentración experimental obtenida mediante la dilución isotópica en línea, se representó frente a la concentración de S teórica en cada punto del calibrado. A modo de ejemplo, la Figura 14 muestra el Diagrama obtenido con el esquema instrumental descrito para el patrón de S inorgánico utilizando el nebulizador concéntrico.

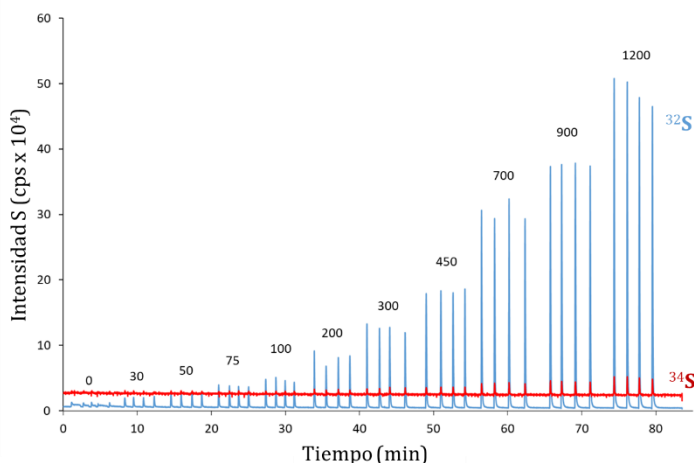


Figura 14. Diagrama obtenido para el patrón inorgánico de S empleando el nebulizador concéntrico. La línea azul se corresponde con la señal de ^{32}S procedente del S natural presente en los analitos y la línea roja corresponde a la señal de ^{34}S procedente del trazador añadido en línea tras la inyección. Además se representa también la concentración de S en cada punto del calibrado ($n=4$ réplicas por cada concentración) en ppb de S.

Una vez construidas las rectas de calibrado para cada biomolécula de S y para el patrón certificado de sulfato, se comparan las pendientes mediante un test estadístico t-Student (con un 95% de confianza) utilizando los 3 nebulizadores citados previamente. Una descripción detallada del tratamiento estadístico se recoge en el siguiente apartado.

3.3.2. Consideraciones previas

Existen una serie de consideraciones que han de tenerse en cuenta para llevar a cabo una comparación apropiada de los factores de respuesta en ICP-MS con los distintos nebulizadores.

En primer lugar, es necesario asegurar la ausencia de cualquier otro compuesto de S en las disoluciones de las biomoléculas seleccionadas que se emplean durante el análisis, que son diluidos directamente de los patrones sólidos. Dado que lo que se pretende con este estudio es evaluar la influencia de las distintas especies en los factores de respuesta de S, la presencia de otras

Capítulo 1

especies en el patrón analizado, podría influir en la señal detectada en ICP-MS ya que al tratarse de una especie diferente al analito seleccionado, el factor de respuesta obtenido en ICP-MS puede verse afectado. La posible presencia de otras especies de S en los patrones de los analitos es especialmente relevante para las proteínas, debido a la mayor dificultad de sus procesos de síntesis y purificación de los correspondientes patrones comerciales.

Para la evaluar la presencia o ausencia de otras especies, cada uno de los patrones se diluyó de forma individual y se analizó mediante cromatografía de líquidos capilar utilizando dos columnas de fase reversa con cadenas C4 y C18, en función de la retención de cada uno de los compuestos analizados. Utilizando la columna C4 se analizaron todas las proteínas seleccionadas (BSA, β -caseína, Citocromo C y el anticuerpo), Neurokinina A y los distintos PEGs tiolados (1 kDa, 20 kDa lineal y 20 kDa ramificado), mientras que con la columna C18 se analizaron los compuestos de bajo peso molecular (biotina, SAM y metionina) así como los péptidos de vasopresina y ACTH. Las condiciones cromatográficas utilizadas para el análisis con ambas columnas se recogen en la Tabla 4.

Tabla 4. Condiciones cromatográficas empleadas para el análisis de las biomoléculas de S mediante fase reversa con una columna C4 y HPLC capilar e ICP-MS.

	Condiciones experimentales
Fase móvil A	H ₂ O + 0,2% ácido fórmico
Fase móvil B	Acetonitrilo + 0,2% ácido fórmico
Volumen de inyección	1 μ L
Flujo fase móvil	4,5 μ L min ⁻¹
Gradiente cromatográfico (min-%B)	0-2, 5-2, 25-60, 28-90
Columnas	C4 Bioshell 300 μ m, 150 mm x 3,5 μ m (400 Å) C18 Bioshell 300 μ m, 150 mm x 3,5 μ m (400 Å)

Cabe destacar que las columnas empleadas poseen una fase estacionaria formada por un núcleo duro (*Core*) alrededor del que se dispone una capa fina (*Shell*) de partículas de sílice, tal y como se puede ver en la Figura 15 en lugar de tener una fase completamente porosa. Debido a esta característica este tipo de columnas son denominadas coreshell. Esta particularidad le confiere una distribución más homogénea de las partículas en su interior, además de un camino de difusión más corto, lo cual se traduce en una separación de proteínas más eficiente y con recuperaciones cromatográficas cuantitativas, incluso para moléculas hidrofóbicas.³⁴

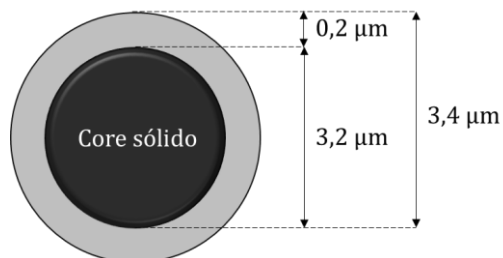


Figura 15. Diagrama de la estructura de las partículas de la fase estacionaria de una columna tipo coreshell.

Los cromatogramas correspondientes del análisis de cada uno de los compuestos se encuentran a continuación, en la Figura 16.

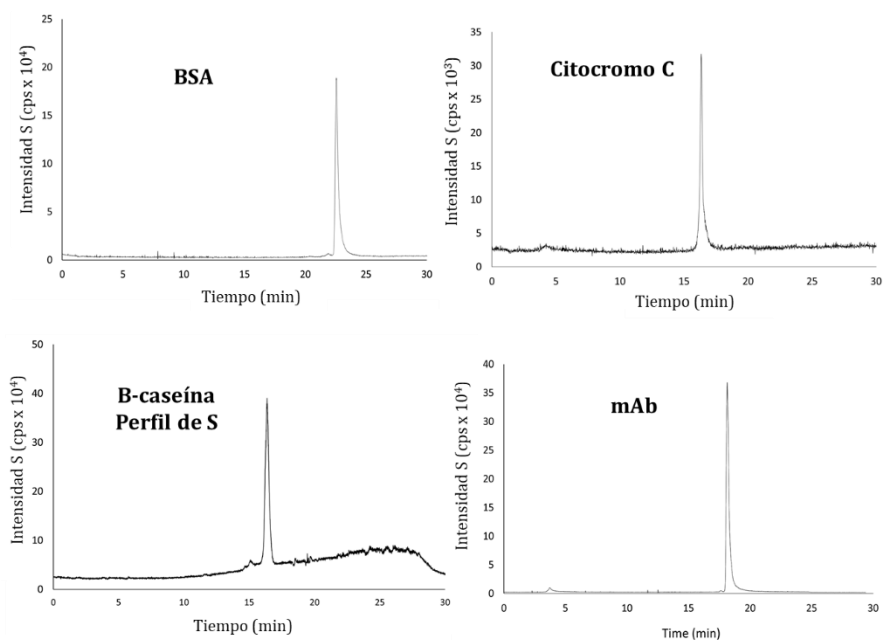


Figura 16. Cromatogramas obtenidos para las distintas biomoléculas de S mediante HPLC capilar (fase reversa) y detección mediante ICP-MS/MS. Las señales de S corresponden a la relación m/z 48 ($^{32}\text{S}^{16}\text{O}^+$).

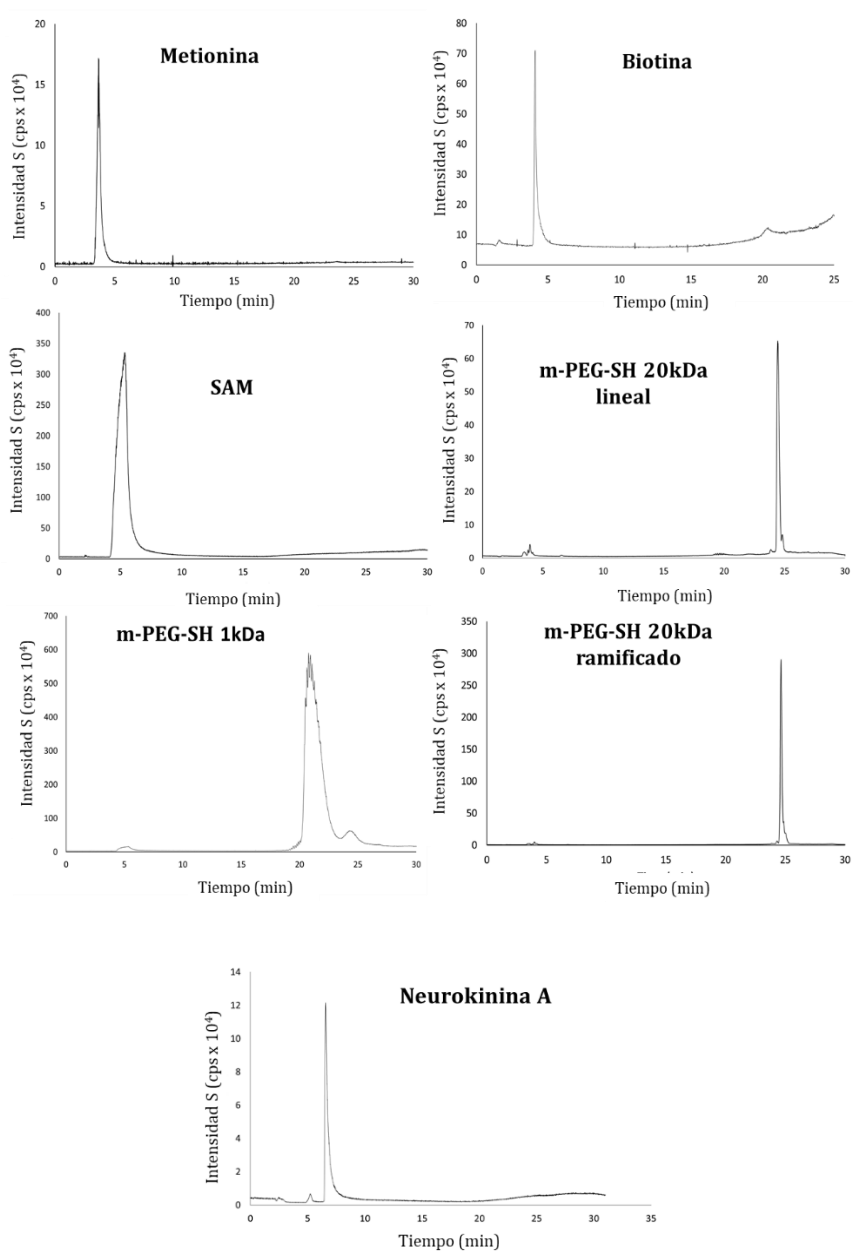


Figura 16. Continuación

Como se puede observar en la Figura 16, las señales correspondientes a las posibles impurezas de bajo peso molecular son inferiores a un 4% en todos los casos. Cabe resaltar que en los cromatogramas de β -caseína y PEG 1kDa se

obtienen picos de S ($\leq 6\%$) eluyendo muy cerca del pico mayoritario de la especie. Estas impurezas observadas corresponden a otras isoformas de la especie³⁴ y, por lo tanto, no afecta a la interpretación de los resultados de los posibles efectos de nebulización, puesto que al tratarse de isoformas del mismo compuesto se espera que tengan un comportamiento similar.

Una vez demostrada la ausencia de impurezas de S que puedan interferir en el comportamiento de los distintos compuestos en el sistema de introducción de muestra, es necesario certificar la cantidad de S presente en cada compuesto, puesto que la interpretación de los resultados obtenidos en ICP-MS se vería seriamente comprometida al utilizar una cantidad de S errónea. Con este propósito, se emplea el análisis por dilución isotópica (ID) para la cuantificación de S en cada compuesto. A cada una de las disoluciones de cada biomolécula se le añadió una cantidad conocida de trazador ^{34}S . Posteriormente, las disoluciones se sometieron a una digestión ácida, de forma que todo el S presente, tanto en las biomoléculas como el del trazador, se convirtieron en sulfato (SO_4^{2-}). Finalmente, la cantidad de S se determina en las digestiones correspondientes utilizando las ecuaciones de la dilución isotópica descritas en el apartado 3.2.2 de la introducción.³⁵ Dicha cuantificación de S determinada en cada disolución, permite calcular la pureza en masa de cada uno de los compuestos estudiados. La Tabla 5 muestra los resultados de pureza en masa obtenidos experimentalmente para cada uno de los compuestos de S, además de los valores de pureza proporcionados por el proveedor y la técnica utilizada para su obtención.

Tabla 5. Pureza en masa obtenida para los distintos compuestos de S mediante IDA. La incertidumbre asociada a cada determinación corresponde a la 1SD y se obtiene de la propagación de los errores individuales procedentes de la digestión ácida (n=3) y de las medidas de ICP-MS/MS (n=10).

Compuesto	Pureza (proveedor)	Pureza en masa (digestión + IDA)
Metionina	≥98% (HPLC)	99 ± 1
Biotina	≥99% (HPLC)	102 ± 1
SAM	≥75% (HPLC)	102 ± 3
m-PEG-SH 1kDa	-	96 ± 3
m-PEG-SH 20kDa lineal	-	101 ± 2
m-PEG-SH 20kDa ramificado	-	102 ± 1
ACTH	100% (HPLC)	70 ± 1
	Contenido péptido:69% (AAA)	
Vasopresina	100% (HPLC)	83 ± 1
	Contenido péptido: 83% (AAA)	
Neurokinina A	97,7% (HPLC)	77 ± 2
	Contenido péptido: 80% (AAA)	
Citocromo C	≥95% (Electroforesis)	89 ± 2
B-caseína	≥98% (Electroforesis)	90 ± 2
BSA	≥96% (Electroforesis)	91 ± 1
mAb	-	76 ± 1

Como se puede observar, la pureza obtenida para los compuestos de bajo peso molecular y para los PEGs es cercana al 100%, valores que encajan perfectamente con los proporcionados por el proveedor. Por el contrario, para los péptidos y proteínas elegidas, la pureza en masa obtenida es inferior al 100%. Cabe resaltar, que los valores de pureza proporcionados por el proveedor en el caso de los péptidos incluyen la pureza de péptido, obtenida mediante

HPLC-UV/Vis (es decir, la determinación de la ausencia de otras especies de naturaleza peptídica) y el contenido en péptido obtenido utilizando análisis de aminoácidos como método de referencia (*Amino Acid Analysis*, AAA). Dichos valores, permitieron validar los resultados obtenidos mediante la metodología propuesta por IDMS con su correspondiente digestión ácida. Los resultados recogidos en la Tabla 5 para los péptidos Vasopresina, ACTH y Neurokinina A ($83\pm 1\%$, $70\pm 1\%$ y $77\pm 2\%$, respectivamente) encajan perfectamente con los del proveedor (83% , 69% y 80% , respectivamente). Mientras que para el caso de las proteínas, los valores de pureza en masa obtenidos para Citocromo C, BSA y β -caseína ($89\pm 2\%$, $90\pm 2\%$ y $91\pm 1\%$, respectivamente) son significativamente inferiores a los proporcionados por el proveedor ($>95\%$, $>98\%$ y $>96\%$, respectivamente). En el caso de las proteínas, el fabricante solo incluye los valores de pureza de proteína obtenidos mediante electroforesis. Estos valores solamente hacen referencia a la presencia o ausencia de otras especies proteicas presentes en el patrón de proteína, pero no tienen en cuenta la presencia de sales y otras impurezas minoritarias presentes en el liofilizado. Por último, el proveedor del anticuerpo monoclonal no proporciona un valor de pureza.

Estos valores certificados de contenido de S en cada uno de los compuestos estudiados obtenidos experimentalmente, son los empleados para el cálculo de las concentraciones de S teóricas de cada una de las disoluciones del calibrado para cada una de las biomoléculas ensayadas.

Otro de los factores que pueden afectar a la calidad de los resultados obtenidos, es la estabilidad del plasma durante el desarrollo de los análisis, debido a las posibles derivas en la señal y a los efectos de matriz. Por lo tanto, han de corregirse las posibles variaciones de la sensibilidad tanto dentro del mismo calibrado, como entre los calibrados llevados a cabo para las distintas biomoléculas ensayadas. Por este motivo, se añadió un flujo constante de una disolución de trazador de ^{34}S ($^{34}\text{SO}_4^{2-}$), que se mezcla en línea con el flujo de FIA (ver Figura 13). De esta forma, al emplear el trazador como patrón interno, se pudo determinar la relación isotópica $^{32}\text{S}/^{34}\text{S}$ ($R_{exp}^{32/34}$), a partir de la señal de ^{32}S procedente de las distintas biomoléculas y la señal de ^{34}S procedente del

trazador añadido en línea. A continuación, empleando el tratamiento matemático de la IDA en línea para normalizar las áreas de pico obtenidas mediante los análisis por FIA. Obviamente, dichas áreas normalizadas corresponden a la masa de S presente en cada pico de FIA y estas, se pueden transformar fácilmente en concentración, teniendo en cuenta los volúmenes de inyección empleados en cada análisis, como se puede ver en el ecuación (12)

$$Conc_{exp}^{IDA} = \frac{[fcd]_{tr}^{34}}{V_{iny}} \left(\frac{Aw_m}{Aw_{tr}} \right) \left(\frac{A_{tr}^{34}}{A_m^{32}} \right) \int_{t_1}^{t_2} \frac{R_{exp}^{32/34} - R_{tr}^{32/34}}{1 - R_{exp}^{32/34} R_m^{32/34}} \quad (12)$$

donde d es la densidad de la disolución de trazador ^{34}S , Aw_m corresponde al peso atómico del S en la muestra y Aw_{tr} al peso atómico del S en el trazador; A_{tr}^{34} y A_m^{32} corresponden a las abundancias de los isótopos de ^{34}S y ^{32}S en el trazador y la muestra (natural), respectivamente. $R_{tr}^{32/34}$ y $R_m^{32/34}$ son las relaciones isotópicas en el trazador y la muestra (natural), respectivamente. Finalmente, t_1 y t_2 son el tiempo inicial y final de los correspondientes picos de FIA. Cabe resaltar que el contenido de ^{34}S presente en el patrón enriquecido fue certificado previamente mediante dilución isotópica inversa, obteniéndose unas abundancias isotópicas certificadas de ^{32}S : $3,01 \pm 0,03\%$, ^{33}S : $1,24 \pm 0,02\%$ y ^{34}S : $95,75 \pm 0,133\%$.

A modo de resumen, se recoge en la Figura 17 un esquema del procedimiento llevado a cabo para la cuantificación de S en las correspondientes rectas de calibrado.

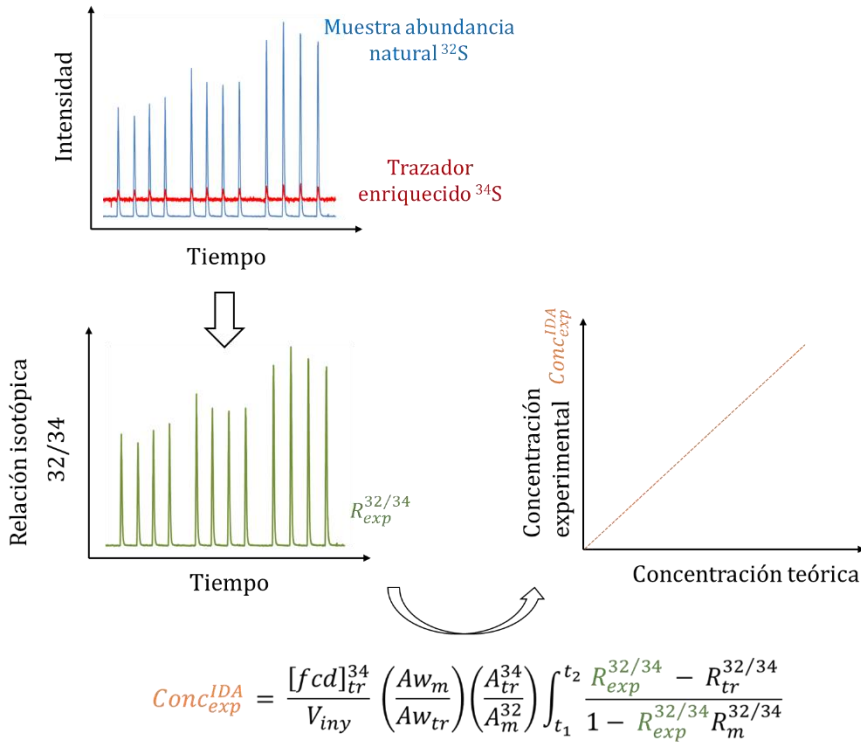


Figura 17. Cuantificación de S en los calibrados de FIA mediante IDMS en línea.

Como se puede ver en la Figura anterior, la concentración experimental de S en cada pico obtenido mediante IDMS en línea se representa frente a la concentración teórica utilizada. De esta forma, una pendiente de 1 significa que la concentración experimental obtenida es idéntica a la concentración teórica calculada en cada punto, lo cual quiere decir que la eficiencia de nebulización (o lo que es lo mismo el factor de respuesta), es idéntico al del S inorgánico del trazador empleado para la cuantificación. Además, esta normalización de la señal utilizada permite no solo la comparación de los factores de respuesta de las distintas biomoléculas con respecto al patrón inorgánico de S, sino también la comparación de las diferencias entre los distintos nebulizadores empleados puesto que el primer término de la ecuación (12) tiene en cuenta el cambio de flujo (f), la concentración (c) del trazador de ^{34}S y el V_{iny} de la muestra empleado en cada nebulizador.

Cabe resaltar que cada uno de los calibrados se normalizó con la señal de ^{34}S añadida en línea, por tanto en cada calibrado se está comparando directamente con la señal de un patrón inorgánico de sulfato (enriquecido en ^{34}S). Por ello, el factor de respuesta obtenido para cada biomolécula indica en sí mismo, el factor de respuesta relativo, es decir, la diferencia en la eficiencia de nebulización, con respecto al patrón inorgánico. Prueba de ello es, como se verá continuación, que los factores de respuesta obtenidos con la metodología propuesta para los patrones de S inorgánico (natural) es siempre cercano a 1 para todos los nebulizadores empleados.

3.3.3. Comparación estadística de las pendientes de calibrado

Con objeto de comparar los factores de respuesta de cada biomolécula ensayada con el factor de respuesta del patrón inorgánico de S, se lleva a cabo una comparación estadística de dos rectas de calibrado mediante un test estadístico t-Student. Para ello, se toma como hipótesis nula H_0 la igualdad de las pendientes a comparar ($H_0: b_1 = b_2, b_1 - b_2 = 0$), siendo b la pendiente obtenida de la correspondiente regresión lineal.

En primer lugar, es necesario asegurar que la similitud de las varianzas de las poblaciones envueltas en la comparación mediante un test F Fisher-Snedecor. Dicho test, consiste en la división de las dos varianzas asegurando un valor superior a 1. Una vez obtenido el valor de F_{exp} se compara con el valor de F tabulado en las tablas F-Fisher de una cola. En este caso, la hipótesis nula es la igualdad de las varianzas estudiadas ($H_0: S^2_1 = S^2_2$). El cálculo del valor de F_{exp} se obtiene mediante la siguiente ecuación:

$$F_{exp} = S^2_{(yx)1} / S^2_{(yx)2} \quad (13)$$

Siendo $S^2_{(yx)1}$ el cuadrado del error estándar relativo de las regresiones lineales que sigue una distribución F-Fisher con $n_1 - 1$ y $n_2 - 1$ grados de libertad, donde n es el tamaño de la población. Según los resultados obtenidos a partir del test F de Fisher, existen dos posibilidades.

1. La hipótesis nula no puede ser rechazada si el valor de F tabulado es menor que el valor de F obtenido experimentalmente ($F_{\text{tab}} < F_{\text{exp}}$), por tanto, las varianzas son estadísticamente indistinguibles. En este caso, se considera que las poblaciones a comparar siguen una distribución t de Student con n_1+n_2-4 grados de libertad. El valor de t experimental (t_{exp}) se calcula mediante la siguiente ecuación

$$t_{\text{exp}} = (b_1 - b_2) / \sqrt{S_{(yx)\text{comb}}^2 \left(\frac{1}{\sum(X_{i,1} - \bar{X}_1)^2} + \frac{1}{\sum(X_{i,2} - \bar{X}_2)^2} \right)} \quad (14)$$

$$\text{con } S_{(yx)\text{comb}}^2 = \frac{(n_1-2)s_{(yx)1}^2 + (n_2-2)s_{(yx)2}^2}{n_1 + n_2 - 4} \quad (15)$$

siendo b_1 y b_2 los valores de las pendientes y $S_{(yx)1}$ y $S_{(yx)2}$ el cuadrado de los errores estándar de las dos líneas de regresión a comparar.

2. Cuando la hipótesis nula puede ser rechazada ($F_{\text{tab}} > F_{\text{exp}}$), es decir, las varianzas de las pendientes que se van a comparar son estadísticamente diferentes. Entonces, el valor de t experimental (t'_{exp}) se calcula empleando la ecuación

$$t'_{\text{exp}} = (b_1 - b_2) / \sqrt{\left(\frac{S_{(yx)1}^2}{\sum(X_{i,1} - \bar{X}_1)^2} \right) + \left(\frac{S_{(yx)2}^2}{\sum(X_{i,2} - \bar{X}_2)^2} \right)} \quad (16)$$

$$\text{Con } f \text{ grados de libertad } f = \frac{\left[\left(\frac{S_{(yx)1}^2}{\sum(X_{i,1} - \bar{X}_1)^2} \right) + \left(\frac{S_{(yx)2}^2}{\sum(X_{i,2} - \bar{X}_2)^2} \right) \right]}{\frac{\left(\frac{S_{(yx)1}^2}{\sum(X_{i,1} - \bar{X}_1)^2} \right)^2}{n_1} + \frac{\left(\frac{S_{(yx)2}^2}{\sum(X_{i,2} - \bar{X}_2)^2} \right)^2}{n_2}} \quad (17)$$

En ambos casos descritos, si el valor de t_{exp} o t'_{exp} supera el valor crítico de t (t_{tab}), al nivel de confianza dado (en este caso, 95%), que se puede encontrar en las tablas t de Student³⁶, la hipótesis nula ($H_0: b_1 = b_2$) es rechazada. Esto quiere decir, que las pendientes no son estadísticamente indistinguibles.³⁷

Adicionalmente, todos los resultados estadísticos se comprobaron empleando el software Statgraphics Centurion XVI (disponible en Statgraphic.net) obteniendo los mismos resultados.

3.3.4. Caso particular del análisis de la fosfoproteína β -caseína: medida de P

Por último, se compararon los factores de respuesta en ICP-MS obtenidos para dos elementos distintos presentes en la misma biomolécula, a fin de validar los resultados obtenidos para S. En este caso, se eligió el análisis de P en la β -caseína, que se encuentra fosforilada. Además la β -caseína se ha empleado con regularidad en estudios de fosforilación. Análogamente a los análisis de las biomoléculas de S, se determinó la ausencia de otras impurezas de P en la disolución del patrón de proteína. Para ello, se analizó la proteína mediante HPLC capilar equipado con una columna de fase reversa C4, utilizando los mismos parámetros instrumentales que los empleados para los compuestos de S (Tabla 4). El cromatograma obtenido se muestra en la Figura 18

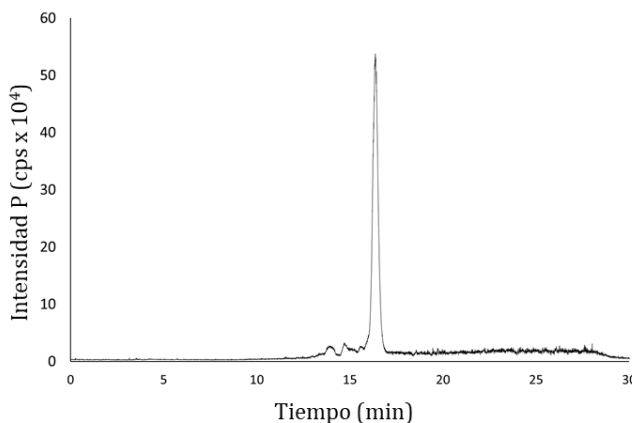


Figura 18. Cromatograma obtenido para la proteína β -caseína mediante capHPLC – ICP-MS/MS. La señal corresponde a la relación m/z 47 ($^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$).

Como se puede ver, las impurezas de bajo peso molecular presentes en la disolución del patrón es $<1\%$. Asimismo, se observaron de nuevo las isoformas de la proteína detectadas en el análisis de S, eluyendo justo antes del pico

principal de proteína, cuya presencia no afecta al comportamiento de la proteína en el sistema de nebulización puesto que se trata de la misma especie.

A continuación, se determinó el contenido total de P presente en la disolución. De forma análoga a la determinación de S total realizada para las biomoléculas de S, la cantidad de P total se determinó tras una digestión ácida de la disolución que contiene β -caseína, con objeto de convertir todas las especies de P en fosfato, y su correspondiente medida en ICP-MS/MS. Sin embargo, debido a la imposibilidad de llevar a cabo el análisis mediante IDMS (puesto que el ^{31}P es monoisotópico), en este se empleó un calibrado externo para la cuantificación construido con un patrón inorgánico certificado de P. De esta forma, la cantidad de P determinada en la disolución de β -caseína, se empleó para el cálculo de las concentraciones teóricas de P en cada punto.

A diferencia de los análisis de las biomoléculas de S, para la comparación de los factores de respuesta de P en ICP no se empleó un flujo constante de un isótopo enriquecido, ya que como se ha comentado el P es monoisotópico. En este caso, la cuantificación de P (concentración de P experimental) se determinó a través de la medida de un calibrado de P inorgánico certificado. De forma que se construyeron de nuevo las correspondientes rectas de calibrado para el P presente en la β -caseína, representando la concentración experimental de P, obtenida mediante calibración externa de un patrón de P inorgánico, frente a la concentración de P teórica en cada punto para los tres nebulizadores ensayados. Un esquema de la metodología descrita se muestra en la Figura 19.

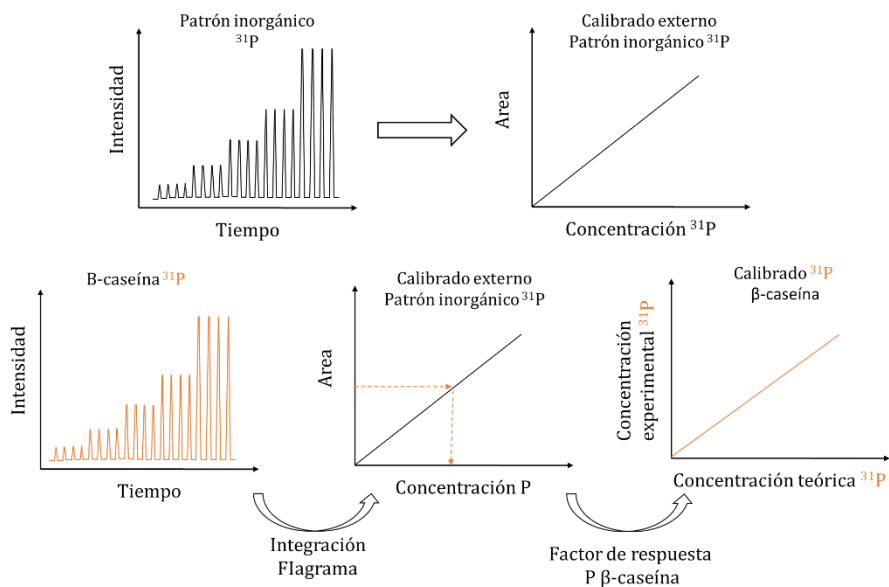


Figura 19. Cuantificación de P en la disolución de β -caseína mediante calibración externa.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Comparación crítica de los factores de respuesta en ICP-MS utilizando rectas de calibrado

Como se comentó en el apartado Experimental del presente Capítulo, se construyeron las rectas de calibrado de las distintas especies de S seleccionadas utilizando los Fiagramas para cada uno de los tres nebulizadores ensayados (uno concéntrico, uno de flujo cruzado y un micronebulizador de consumo total), con el objetivo de llevar a cabo una comparación estadística de los factores de respuesta obtenidos en ICP-MS con los tres sistemas de nebulización. Para la construcción de las rectas de calibrado, se empleó la media de las 4 inyecciones realizadas para cada punto del calibrado (n=10 puntos de calibrado) y las incertidumbres correspondientes se representaron frente a la concentración teórica en cada punto, para cada una de las biomoléculas escogidas (n=14 compuestos).

4.1.1. Comparación factores de respuesta obtenidos empleando un nebulizador de microflujos de consumo total:

En primer lugar, se evaluaron los factores de respuesta de los 14 compuestos de S empleando un micronebulizador de consumo total (TCN). Las rectas de calibrado obtenidas para cada uno de los 14 compuestos, tras la integración de los correspondientes Fiagramas y la transformación del área obtenida en cada punto en concentración experimental de S utilizando la ecuación (12), se encuentran recogidas en la Figura 20.

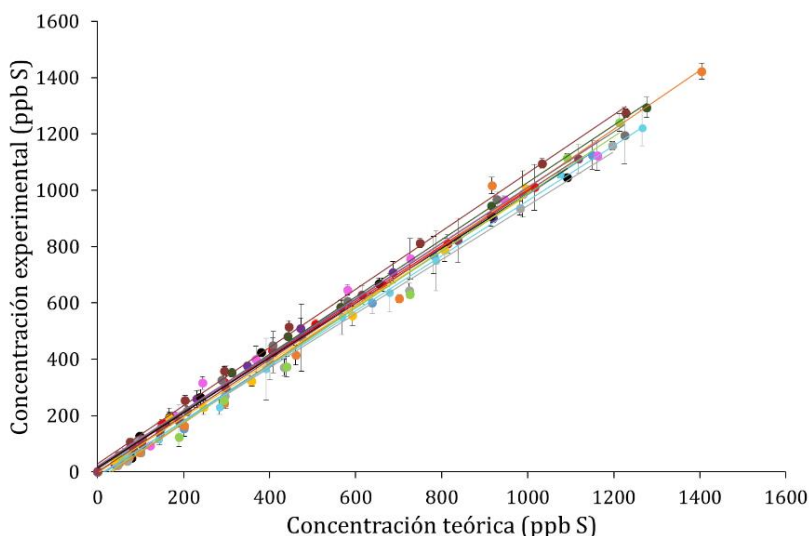


Figura 20. Curvas de calibrado obtenidas para cada uno de los 14 compuestos de S estudiados utilizando el micronebulizador de consumo total. Las barras de incertidumbre corresponden a un 95% de confianza (2 desviaciones estándar, 2SD de las 4 réplicas inyectadas en cada punto). Los colores corresponden a: sulfato (azul), metionina (marrón), SAM (rojo), biotina (violeta), .PEG-SH 1kDa (rosa), m.PEG.SH 20 kDa lineal (verde oscuro), m-PEG-SH 20kDa ramificado (negro), Citocromo C (naranja), β -caseína (gris), BSA (amarillo), mAb (verde claro), ACTH (granate), Vasopresina (gris oscuro) y Neurokinina A (azul claro).

Como se puede ver claramente en la Figura anterior, los factores de respuesta obtenidos para cada uno de los compuestos son idénticos, estando todos ellos en un rango entre $0,958 \pm 0,020$ y $1,043 \pm 0,036$, cuyos valores corresponden a los factores de respuesta de β -caseína y Citocromo C, respectivamente. Además, la precisión asociada a cada punto individual de las rectas del calibrado de las distintas especies fue adecuada, encontrándose todos los valores entre 0,5 y 15%, con un valor medio de 5,0% de desviación estándar relativa (*Relative Standar Deviation*, RSD).

Adicionalmente, se llevó a cabo la comparación estadística de las pendientes de las rectas de calibrado para cada uno de los compuestos de S con la pendiente obtenida para el patrón de S inorgánico. Dichos valores estadísticos obtenidos siguiendo el protocolo descrito en el apartado experimental, así como los valores de pendiente, ordenada en el origen y coeficiente de regresión se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Comparación estadística de los valores de las pendientes obtenidas para el patrón inorgánico y los compuestos estudiados utilizando un micronebulizador de consumo total (TCN). Se aplicó un test t-Student de dos colas a un 95% de confianza: tamaño de la población en cada regresión n=10, S_b: error estándar de la pendiente (1SD), S_a: error estándar de la ordenada en el origen (1SD), S_(yx): error estándar de la regresión (1SD), t_{exp} and t'_{exp} se calcularon según las ecuaciones (14) y (16) Los valores críticos de t se obtuvieron de las tablas de t-Student a un 95% de confianza.

Compuesto	Pendiente	Sb	Ordenada en el origen	S _a	Coefficiente de regresión, r ²	S _(yx)	t _{exp}	t' _{exp}	Valor crítico de t (t _{tab})	Igualdad estadística
Patrón inorgánico	1,003	0,016	-19	10	0,998	18,5	-	-	-	-
Metionina	1,033	0,016	28	9,4	0,998	21,1	1,156	-	2,120	Igual
Biotina	1,003	0,021	11	8,7	0,997	10,6	0,015	-	2,120	Igual
SAM	0,989	0,012	13	6,0	0,999	12,0	0,683	-	2,120	Igual
PEG-SH 1kDa	0,992	0,031	22	18	0,992	38,0	-	0,345	2,228	Igual
PEG-SH 20kDa lineal	1,016	0,012	12	6,9	0,999	15,4	0,642	-	2,120	Igual
PEG-SH 20kDa ramificado	0,973	0,024	15	13	0,995	28,5	1,026	-	2,120	Igual
Vasopresina	0,990	0,019	19	10	0,997	22,9	0,495	-	2,120	Igual
ACTH	0,995	0,010	1,5	5,0	0,999	10,8	0,214	-	2,120	Igual
Neurokinina A	0,982	0,018	-9,7	12	0,997	17,7	0,568	-	2,120	Igual
Citocromo C	1,043	0,036	-35	22	0,991	49,0	-	1,022	2,228	Igual
B-caseína	0,958	0,020	-12	11	0,997	24,9	1,740	-	2,120	Igual
BSA	0,986	0,019	-3,5	9,1	0,997	20,2	0,686	-	2,120	Igual
mAb intacto	1,015	0,033	-28	19	0,992	43,6	-	0,331	2,228	Igual

Los resultados recogidos en la Tabla anterior, confirman la igualdad entre los factores de respuesta de todos los compuestos de S estudiados y el patrón de S inorgánico cuando se emplea un micronebulizador de consumo total. De hecho, el valor medio de todos los factores de respuesta obtenidos (es decir, las pendientes de calibrado) es de 0,998. Además, los valores de incertidumbre asociados a las pendientes son en todos los casos menores a un 3,5 % RSD. De hecho, todos los puntos de los distintos calibrados (n= 10) de los 14 compuestos de S analizados se pudieron representar en una misma grafica “multiespecies” dando como resultado la gráfica recogida en la Figura 21 con n=140 puntos.

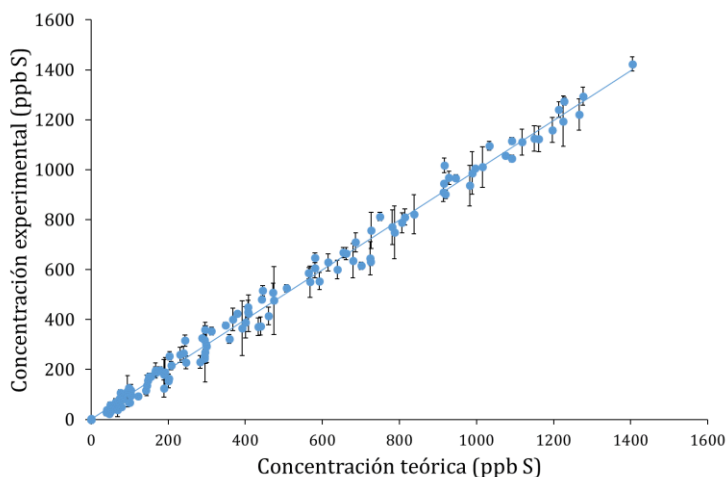


Figura 21. Concentración experimental de S obtenida para todos los compuestos de S ensayados (n=14) a los distintos niveles de concentración (n=10) representados frente a la concentración teórica de S en cada punto utilizando un micronebulizador de consumo total (TCN). La incertidumbre asociada a cada punto individual corresponde a un 95% de confianza (2SD, n=4 réplicas).

Como se puede ver, se obtuvo un excelente correlación entre la concentración experimental y la teórica para todos los puntos ($0,997x + 1,069$) con una muy buena linealidad ($r^2=0,993$).

Estos resultados demostraron que se puede obtener una respuesta completamente independiente de la especie cuando se usa un TCN acoplado al ICP-MS. Basándose en los resultados obtenidos para los factores de respuesta utilizando un TCN, que la certificación del contenido de S llevada a cabo

previamente fue adecuada. De igual modo, los resultados demuestran una completa disolución de las especies en el medio utilizado durante el estudio. Dichas conclusiones son relevantes puesto que las mismas disoluciones empleadas durante los ensayos con el micronebulizador de consumo total, se utilizaron para los análisis con los dos nebulizadores de flujo normal (concéntrico y flujo cruzado) y, por tanto, cualquier diferencia en la respuesta de los compuestos observados solamente puede ser adscrita a una diferencia en la eficiencia de nebulización de las especies.

4.1.2. Comparación de los factores de respuesta obtenidos empleando nebulizadores de flujo normal

A continuación, se evaluaron los posibles efectos en la respuesta en ICP-MS utilizando dos nebulizadores de flujo normal: uno de ellos concéntrico y otro de flujo cruzado, ambos equipados con una cámara de nebulización de doble paso tipo Scott. Para la comparación de los factores de respuesta, se prepararon las mismas rectas de calibrado que las descritas en el apartado anterior para TCN empleando FIA-IDMS en línea. Una vez obtenidos los Diagramas correspondientes, tanto para el patrón inorgánico de S como para los distintos compuestos, se construyeron las correspondientes regresiones siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.3 de la parte experimental del presente Capítulo. Las rectas de calibrado obtenidas para ambos nebulizadores se muestran en la Figura 22.

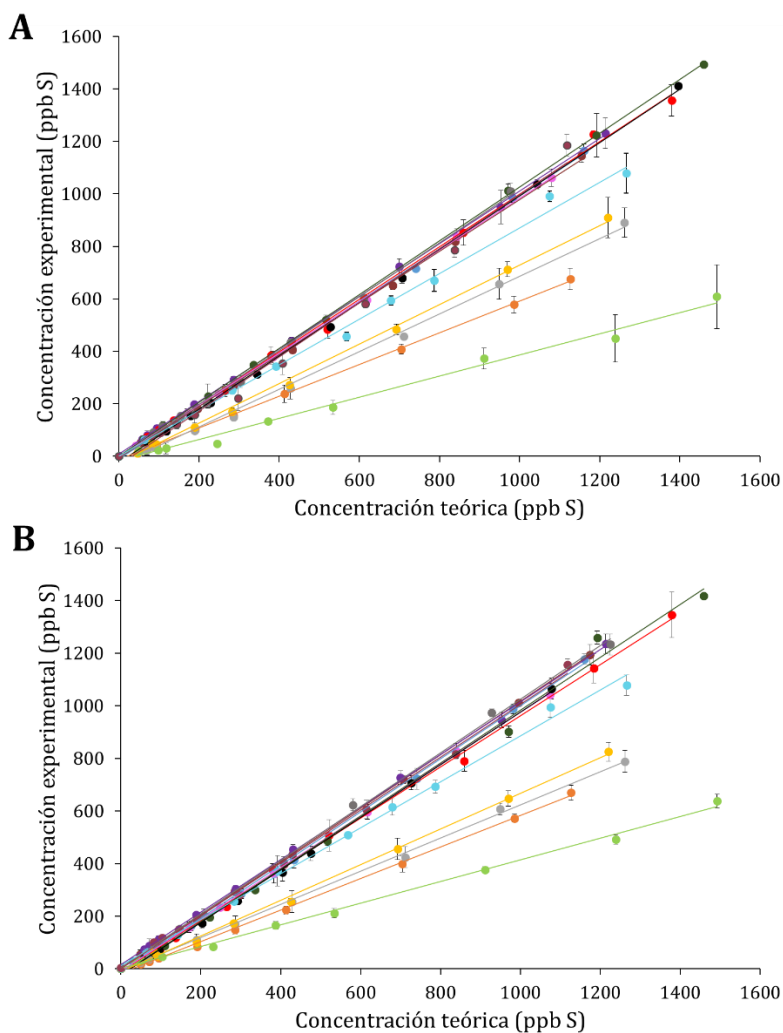


Figura 22. Curvas de calibrado obtenidas para cada uno de los 14 compuestos de S estudiados utilizando A) nebulizador concéntrico y B) Nebulizador de flujo cruzado. Las barras de incertidumbre corresponden a un 95% de confianza (2 desviaciones estándar, 2SD de las 4 réplicas inyectadas en cada punto). Los colores corresponden a: sulfato (azul), metionina (marrón), SAM (rojo), biotina (violeta), .PEG-SH 1kDa (rosa), m.PEG.SH 20 kDa lineal (verde oscuro), m-PEG-SH 20kDa ramificado (negro), Citocromo C (naranja), β -caseína (gris), BSA (amarillo), mAb (verde claro), ACTH (granate), Vasopresina (gris oscuro) y Neurokinina A (azul claro).

Tal y como se puede ver en la figura anterior, al contrario de los que sucedía cuando se empleaba el TCN, existen diferencias significativas en la respuesta en ICP-MS para los distintos compuestos en ambos nebulizadores. En cuanto a los

valores de precisión asociados a cada punto individual del calibrado, fueron de nuevo adecuados, con valores medios de 5,1 % y 4,4 %, para el nebulizador concéntrico y el de flujo cruzado, respectivamente. Análogamente a los resultados del TCN, se llevó a cabo el tratamiento estadístico correspondiente a fin de concretar cuáles de las especies estudiadas presentaron una respuesta significativamente distinta a la del patrón inorgánico de S. Los valores estadísticos de la comparación de las regresiones obtenidos tras el tratamiento estadístico aplicado, se recogen en las Tabla 7 y Tabla 8.

De nuevo, los valores de incertidumbre de las pendientes (Tabla 7 y Tabla 8) fueron adecuados, por debajo de un 3,5% en el caso del nebulizador concéntrico y 2,4 % RSD para el nebulizador de flujo cruzado. Del mismo modo, los coeficientes de regresión obtenidos para todos los compuestos fueron excelentes, encontrándose estos en un rango entre 0,990-0,999 y 0,996-0,999 para el nebulizado concéntrico y el de flujo cruzado, respectivamente.

En la Figura 22 se puede ver claramente como los factores de respuestas de un conjunto de compuestos están muy cercanos a la unidad en ambos nebulizadores, es decir, al mismo valor proporcionado por el patrón inorgánico. Este grupo de compuestos con factores de respuesta indistinguibles, corresponden a los compuestos de bajo peso molecular (biotina, SAM, metionina). Sorprendentemente, esta misma tendencia se observó también para los derivados del PEG, incluso para aquellos con un peso molecular más elevado (20kDa) y una estructura más compleja (PEG 20kDa ramificado), además de para los péptidos de Vasopresina y ACTH. De hecho, el valor medio obtenido para las pendientes de todos estos compuestos (con un factor de respuesta cercado a 1) fue de 1,008 y 1,001 para el nebulizador concéntrico y el de flujo cruzado, respectivamente. Adicionalmente, el tratamiento estadístico llevado a cabo (Tablas 6 y 7) demostró que los factores de respuestas proporcionados por dichos compuestos eran estadísticamente indistinguible al mostrado por el patrón inorgánico.

Por el contrario, las proteínas mostraron unos factores de respuesta en ICP-MS significativamente diferentes, como se ve claramente en la Figura 22a y b.

De hecho, los resultados del tratamiento estadístico (Tablas 6 y 7) del test t de Student de comparación de pendientes, demostraron que las pendientes son estadísticamente distinguibles cuando éstas se compararon con la pendiente correspondiente al patrón inorgánico para ambos nebulizadores. En el caso de las proteínas de bajo y medio peso molecular (Citocromo C, β -caseína y BSA) los valores de las pendientes obtenidos abarcan valores desde 0,603 a 0,752 para el nebulizador concéntrico y 0,599 a 0,678 para el nebulizador de flujo cruzado. Sin embargo, para el anticuerpo monoclonal, con un mayor peso molecular y estructura más compleja, el factor de respuesta observado fue mucho más bajo, de 0,403 y 0,412 para el nebulizador concéntrico y el de flujo cruzado, respectivamente. Sorprendentemente, uno de los péptidos estudiados, Neurokinina A, mostraba un comportamiento diferencial con respecto al patrón inorgánico, con un valor intermedio entre el comportamiento de las proteínas y el de los compuestos de bajo peso molecular y los derivados del PEG. El valor de la pendiente, es decir, el factor de respuesta obtenido fue ligeramente inferior a 1, 0,871 y 0,874 para el nebulizador concéntrico y de flujo cruzado, respectivamente. A pesar de ser un valor muy cercano a 1, fue suficiente para observar diferencias estadísticas en su comportamiento.

Los resultados aquí descritos mostraron una evidencia clara de la influencia de las especies en la señal de ICP-MS, al menos cuando se emplean nebulizadores de flujo normal para las cuatro proteínas estudiadas y el péptido más hidrofóbico de los ensayados.

Tabla 7. Comparación estadística de los valores de las pendientes obtenidas para el patrón inorgánico y los compuestos estudiados utilizando el nebulizador concéntrico. Se aplicó un test t-Student de dos colas a un 95% de confianza: tamaño de la población en cada regresión $n=10$, S_b : error estándar de la pendiente (1SD), S_a : error estándar de la ordenada en el origen (1SD), $S_{(yx)}$: error estándar de la regresión (1SD), t_{exp} and t'_{exp} se calcularon según las ecuaciones (14) y (16). Los valores críticos de t se obtuvieron de las tablas de t-Student a un 95% de confianza

Compuesto	Pendiente	Sb	Ordenada en el oringe	Sa	Coefficiente de regresión, r ²	S(yx)	t _{exp} (eq S2)	t' _{exp} (eq S4)	Valor crítico de t (ttab)	Igualdad estadística
Patrón inorgánico	1,001	0,009	-10	5,4	0,999	11,7	-	-	-	-
Metioninae	0,986	0,009	-8,0	4,9	0,999	10,6	0,854	-	2,120	Igual
Biotina	1,004	0,006	7,3	3,6	0,999	8,09	0,194	-	2,120	Igual
SAM	1,003	0,015	-3,9	10	0,998	22,5	-	0,097	2,228	Igual
PEG-SH 1kDa	0,985	0,005	-1,7	2,6	0,999	5,71	-	1,569	2,228	Igual
PEG-SH 20kDa lineal	1,026	0,005	1,3	3,3	0,999	7,45	1,788	-	2,120	Igual
PEG-SH 20kDa ramificado	1,017	0,010	-25	6,7	0,999	14,5	0,890	-	2,120	Igual
Vasopresina	1,017	0,011	-0,5	6,1	0,999	13,4	1,114	-	2,120	Igual
ACTH	1,032	0,036	-34	19	0,995	39,6	-	0,835	2,228	Igual
Neurokinina A	0,871	0,020	0,1	13	0,996	26,0	-	5,983	2,228	Diferente
Citocromo C	0,603	0,005	-13	2,9	0,999	6,36	25,93	-	2,120	Diferente
B-caseína	0,717	0,015	-31	8,5	0,997	19,2	13,80	-	2,120	Diferente
BSA	0,752	0,013	-24	7,3	0,998	16,5	12,91	-	2,120	Diferente
mAb intacto	0,403	0,014	-17	10	0,990	22,6	28,91	-	2,120	Diferente

Tabla 8. Comparación estadística de los valores de las pendientes obtenidas para el patrón inorgánico y los compuestos estudiados utilizando el nebulizador de flujo cruzado. Se aplicó un test t-Student de dos colas a un 95% de confianza: tamaño de la población en cada regresión n=10, S_b: error estándar de la pendiente (1SD), S_a: error estándar de la ordenada en el origen (1SD), S_(yx): error estándar de la regresión (1SD), t_{exp} and t'_{exp} se calcularon según las ecuaciones (14) y (16). Los valores críticos de t se obtuvieron de las tablas de t-Student a un 95% de confianza

Compuesto	Pendiente	Sb	Ordenada en el oringe	Sa	Coefficiente de regresión, r ²	S(yx)	texp (eq S2)	t'exp (eq S4)	Valor crítico de t (ttab)	Igualdad estadística
Patrón inorgánico	1,005	0,014	8,7	8,0	0,999	17,8	-	-	-	-
Metioninae	1,015	0,003	1,3	1,4	0,999	3,23	0,719	-	2,120	Igual
Biotina	1,005	0,019	9,1	7,7	0,997	17,8	0,022	-	2,120	Igual
SAM	0,974	0,012	-11,2	7,8	0,999	17,0	1,728	-	2,120	Igual
PEG-SH 1kDa	0,984	0,006	-8,9	2,9	0,999	6,44	1,337	-	2,120	Igual
PEG-SH 20kDa lineal	1,005	0,024	-23	17	0,996	37,5	-	0,004	2,228	Igual
PEG-SH 20kDa ramificado	1,000	0,012	-23,6	5,7	0,999	12,5	0,268	-	2,120	Igual
Vasopresina	1,021	0,014	4,18	7,5	0,999	16,5	1,144	-	2,120	Igual
ACTH	1,004	0,017	0,47	8,9	0,998	19,0	0,051	-	2,120	Igual
Neurokinina A	0,874	0,018	12,5	12	0,997	22,7	7,33	-	2,120	Diferente
Citocromo C	0,599	0,008	-16,6	4,4	0,999	9,75	24,73	-	2,120	Diferente
B-caseína	0,631	0,007	-7,6	4,1	0,999	9,21	23,71	-	2,120	Diferente
BSA	0,678	0,011	-11,2	6,2	0,998	14,0	18,80	-	2,120	Diferente
mAb intacto	0,412	0,008	1,8	5,8	0,997	13,1	18,30	-	2,110	Diferente

4.1.3. Comparación global de los factores de respuesta relativos

Por último, a modo de resumen de todos los resultados obtenidos para los factores de respuesta observados para los distintos compuestos con los 3 nebulizadores escogidos, se calcularon los factores de respuesta relativos (expresado en porcentaje) para cada uno de ellos. Para ello, el factor de respuesta (pendiente del calibrado) para cada uno de los compuestos es estudio, se refirió al factor de respuesta del patrón inorgánico (muy cercano a la unidad) con cada uno de los nebulizadores. De forma que, un valor de factor de respuesta relativo de un 100% significaría que la especie se comporta de la misma manera que el patrón inorgánico elegido como referencia. Los valores obtenidos como resultado de la operación se recogen en la Figura 23.

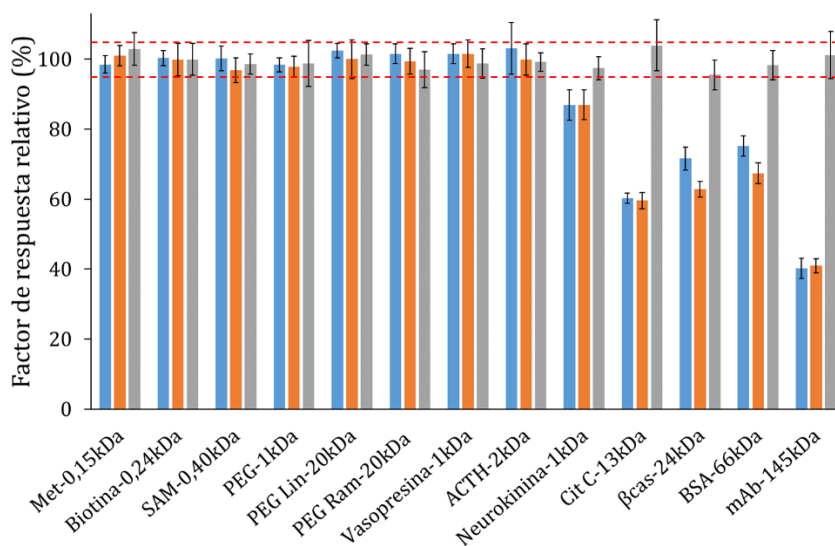


Figura 23. Factores de respuesta relativos (%) obtenidos utilizando el nebulizador concéntrico (azul), nebulizador de flujo cruzado (naranja) y TCN (gris) para todas las biomoléculas estudiadas. La incertidumbre asociada a cada pendiente corresponde a un nivel de confianza de 95% (2SD) y fue propagada teniendo en cuenta la incertidumbre asociada a las pendientes del patrón inorgánico y de la correspondiente biomolécula.

Como se puede ver, y como ya se comentó en el apartado anterior, todos los valores obtenidos empleando el TCN, así como los de los compuestos de bajo peso molecular (biotina, SAM y metionina), derivados del PEG y los péptidos de Vasopresina y ACTH para los nebulizados de flujo cruzado y concéntrico se encontraron muy cercanos al 100%. De hecho, encajan perfectamente en el intervalo de valores aceptados con un 95% de confianza (desde 95 hasta 105%, que se encuentran representados en la Figura 23 con una línea roja de puntos). Dichos datos, confirman los resultados observados durante el tratamiento estadístico donde se demostró la igualdad estadística de los factores de respuesta de estas especies con respecto al patrón inorgánico. Por otro lado, como se pudo ver en la Figura 23A y B, los factores de respuesta para las proteínas y el péptido Neurokinina A fueron significativamente inferiores al 100%.

Los resultados recogidos en la Figura 23, sugieren que el comportamiento diferencial observado con los nebulizadores de flujo normal, no depende únicamente del tamaño de las especies estudiadas, puesto que, compuestos de elevado tamaño como los PEGs de 20kDa pero con una estructura más lineal mostraron una respuesta indistinguible a la del patrón inorgánico (con valores que se encuentran entre $97\pm 5\%$ y $103\pm 2\%$). Mientras que proteínas de un menor tamaño como el Citocromo C (13,5 kDa) o de un tamaño similar como la β -caseína (23,5 kDa) mostraron un valor significativamente inferior. De hecho, a pesar de la diferencia de tamaño existente entre los PEGs estudiados de 1 a 20 kDa, no se observaron respuestas diferentes en ICP-MS. Por tanto, parece que otro factor que juega un papel importante en el comportamiento diferencial observado en la nebulización es la hidrofobicidad de los compuestos. Para facilitar la interpretación de los resultados obtenidos, se recoge en la Tabla 9 un resumen de las características hidrofóbicas y el tamaño de los péptidos y proteínas estudiados.

Tabla 9. Tamaño, carácter hidrofóbico y factores de respuesta relativos de los péptidos y proteínas estudiados.

	Tamaño, kDa	% hidrofobicidad³⁰
ACTH	2,1	22
Vasopresina	1,1	29
Neurokinina A	1,1	40
Citocromo C	13	31
B-caseína	24	54
BSA	66	38
mAb intacto	145	38

La influencia del carácter hidrofóbico en la respuesta del ICP-MS se pudo ver claramente en el análisis de los péptidos (ver Figura 23), donde el único de ellos que mostró una respuesta inferior al patrón inorgánico ($87\pm 4\%$ para los dos nebulizadores), fue el de mayor hidrofobicidad, Neurokinina A con un 40% de hidrofobicidad³⁰ a pesar de su pequeño tamaño (1,1 kDa). Mientras que para los otros dos péptidos analizados, sus respuestas fueron indistinguibles ($103\pm 7\%$ y $100\pm 4\%$), incluso para la hormona ACTH cuyo peso molecular es el doble que para los demás péptidos.

En cuanto a los análisis de las proteínas, una proteína de pequeño tamaño como el Citocromo C presentó un valor significativamente inferior al del patrón inorgánico ($60\pm 4\%$). En el caso de proteínas de mayor peso molecular β -caseína y BSA, proporcionaron valores similares de factores de respuesta en ambos nebulizadores para el nebulizador concéntrico los valores fueron de $72\pm 3\%$ y $75\pm 3\%$, respectivamente, mientras que para el nebulizador de flujo cruzado fue de $63\pm 2\%$ y $67\pm 3\%$, respectivamente. Por otra parte, el valor mostrado por el anticuerpo fue muy inferior al del resto de biomoléculas, $40\pm 3\%$ para nebulizador concéntrico y $41\pm 2\%$ para nebulizador de flujo cruzado. Cabe resaltar, que ambos nebulizadores mostraron la misma tendencia y cabe

esperar, que otros nebulizadores con principios de nebulización y características semejantes tengan un comportamiento muy similar.

Sin embargo, los valores de hidrofobicidad de las proteínas (ver Tabla 9) no parecen explicar por sí solos las diferencias observadas en los factores de respuesta para dichos compuestos con nebulizadores de flujo normal. De hecho, las diferencias de nebulización observadas en las proteínas parecen ser resultados de la combinación del carácter hidrofóbico con el tamaño de las biomoléculas. Por ejemplo, al comparar los valores obtenidos para la Neurokinina A, con un valor de hidrofobicidad elevado (40%) con los de las proteínas BSA o mAb (cuyos valores de hidrofobicidad son muy similares a los del péptido, 38%), la diferencia en los factores de respuesta mostrados por estos tres compuestos parecen venir dados por la enorme diferencia en sus tamaños (1,1, 66 y 145 kDa). Dichos factores de respuestas disminuyeron a medida que el tamaño de las biomoléculas aumenta para ambos nebulizadores de flujo normal

En este punto es interesante mencionar que el cálculo del % de hidrofobicidad³⁰ solamente tiene en cuenta el número de residuos hidrofóbicos presentes en la estructura, por tanto, la presencia de otros grupos como modificaciones postraduccionales o grupos prostéticos dentro de la proteína, que podrían aportar hidrofobicidad a la estructura, no se reflejan en este cálculo. Este es el caso del Citocromo C, puesto que su comportamiento no se puede explicar solamente teniendo en cuenta su pequeño tamaño o el carácter hidrofóbico. El Citocromo C posee en su estructura un grupo Hemo muy hidrofóbico, que además debe alojarse en una cavidad muy hidrofóbica de la estructura aminoacídica,³⁸ lo que le confiere una enorme hidrofobicidad que no está reflejada con el cálculo de los residuos que lo componen. Este podría ser el motivo por el cual el factor de respuesta proporcionado por el Citocromo C fue inferior al de otras proteínas de mayor tamaño como la BSA o β -caseína, a pesar de su hidrofobicidad relativamente baja (31%). En esta misma línea, la incorporación de hasta 5 grupos fosfato hidrofílicos en la estructura de la β -caseína, podría explicar los factores de respuesta relativamente altos obtenidos

(en el orden de los obtenidos para la BSA), a pesar de que su valor de hidrofobicidad calculado son los residuos que forman parte de su estructura es más elevado (54%).

4.2. Evaluación de distintas condiciones de operación

Una vez demostrada la existencia de diferencias en la eficiencia de nebulización de las especies en ICP-MS cuando se emplearon nebulizadores de flujo normal, se evaluó si estas diferencias persistían en distintas condiciones de operación. Para ello, se seleccionó el nebulizador concéntrico y la proteína BSA como modelo para llevar a cabo el estudio, puesto que dicha proteína presentaba un comportamiento intermedio de todas las especies estudiadas, además de ser una proteína muy empleada como proteína de referencia en metodologías de cuantificación absoluta.³⁹ Para estos estudios se seleccionó el IDA en disolución, en lugar de la IDMS en línea para minimizar la cantidad de análisis.

A una disolución de concentración conocida de BSA (que contiene en su estructura S natural) se le añadió una cantidad conocida de disolución de trazador enriquecido isotópicamente en ^{34}S ($^{34}\text{SO}_4^{2-}$). De esta forma, en la misma disolución se pudo determinar la relación isotópica $^{32}\text{S}/^{34}\text{S}$, la cual se transformó directamente (empleando las ecuaciones de la dilución isotópica convencional descritas en el apartado 3.2.2.1 de la Introducción General) en concentración de S. Por lo tanto, el factor de respuesta relativo (%) se obtuvo directamente de la comparación de la concentración experimental de ^{32}S obtenida mediante IDMS y la concentración teórica añadida inicialmente.

4.2.1. Evaluación del flujo de gas de nebulización empleado

En primer lugar, se evaluó la influencia del flujo de gas de nebulización (Argón) en la respuesta dependiente de la especie del ICP-MS. Se variaron los flujos de argón desde 1 hasta 1,25 L min⁻¹ en intervalos de 0,05 L min⁻¹, manteniendo constante el flujo de líquido (400 μL min⁻¹). Como resultado de análisis se obtuvo la Figura 24, donde se puede ver cómo evoluciona la señal de

^{32}S , procedente del S natural de la proteína BSA, y la señal de ^{34}S , que proviene del trazador enriquecido añadido.

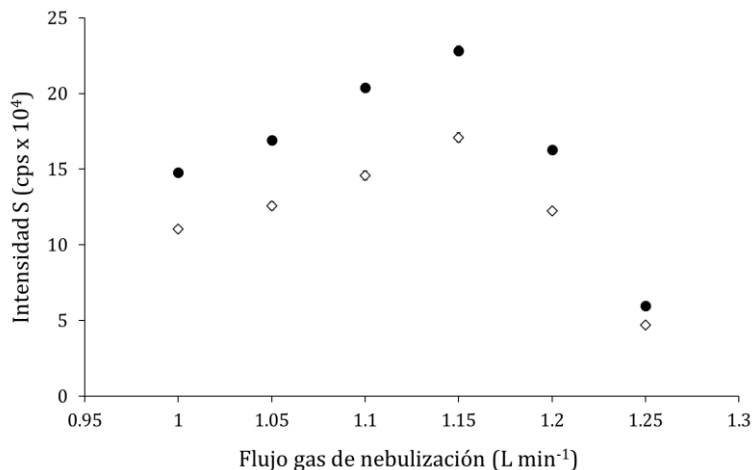


Figura 24. Evolución de la señal en ICP-MS para ^{32}S (rombos) procedente del S natural de la BSA y ^{34}S (círculos) procedente del trazador enriquecido obtenidas para una disolución de BSA con un nebulizador concéntrico con la modificación del flujo de gas de nebulización.

Como se puede observar, la señal se vio afectada por el cambio de flujo de gas de nebulización en ambos isótopos (^{32}S y ^{34}S), llegando a un máximo de sensibilidad con un valor de $1,15 \text{ L min}^{-1}$ de Argón. Sin embargo, la diferencia entre las señales de los dos isótopos parece permanecer constante. De hecho, al tomar los datos recogidos en la Figura y transformarlos en el factor de respuesta relativo, es decir, al cuantificar la cantidad de ^{32}S presente en la disolución empleando las ecuaciones de la dilución isotópica y referirlo a la cantidad de ^{32}S teórica de la disolución, se pudo ver cómo, efectivamente, la diferencia en la nebulización observada para la BSA en el estudio anterior ($75 \pm 3\%$), donde se comparaban las pendientes (es decir, los factores de respuesta) de rectas de calibrado mediante IDMS en línea, no se vio afectada por el cambio en el flujo de argón, obteniéndose un valor medio para este factor de respuesta de $71 \pm 4\%$.

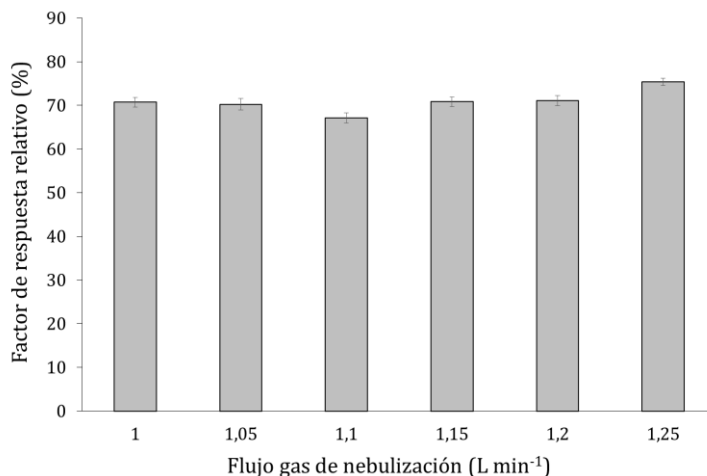


Figura 25. Factores de respuesta relativos (%) obtenidos para una disolución de BSA empleando un nebulizador concéntrico con distintos flujos de gas de nebulización. Las barras de error corresponden a un nivel de confianza del 95% (2SD).

4.2.2. Evaluación del flujo de líquido portador

En segundo lugar, se llevó a cabo el mismo estudio pero manteniendo en este caso el flujo de gas de nebulización constante (1,1 L min⁻¹), pero modificando el flujo de líquido que llega al plasma. De nuevo, la cantidad de flujo que llega al plasma influye en la sensibilidad obtenida en el ICP-MS, es decir, la señal obtenida para ambos isótopos (ver Figura 26). Como se puede ver, la señal aumentaba cuanto mayor era el flujo de líquido empleado para la introducción de la muestra, aunque esta variación en la sensibilidad observada fue mucho menos acusada que en el caso del flujo de gas de nebulización.

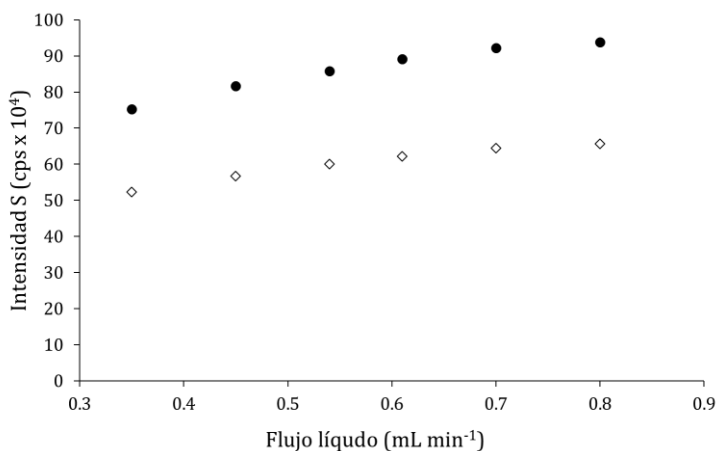


Figura 26. Evolución de la señal en ICP-MS para ³²S (rombos) procedente del S natural de la BSA y ³⁴S (círculos) procedente del trazador enriquecido obtenidas para una disolución de BSA con un nebulizador concéntrico con la modificación del flujo de líquido.

Sin embargo, igual que en el caso del gas de nebulización, esta variación en el flujo no modificó la diferencia de nebulización observada en los estudios previos para la disolución de BSA (ver Figura 27), obteniendo de nuevo un valor medio muy próximo al obtenido con los análisis por FIA e IDMS de $72 \pm 2\%$.

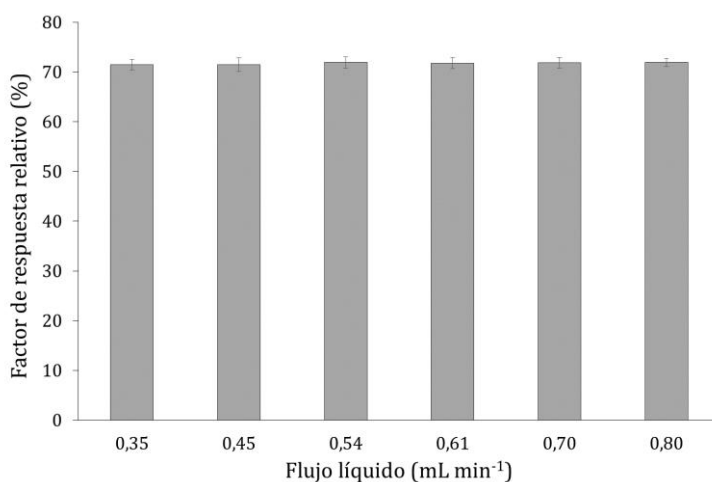


Figura 27. Factores de respuesta relativos (%) obtenidos para una disolución de BSA empleando un nebulizador concéntrico con distintos flujos de líquido. Las barras de error corresponden a un nivel de confianza del 95% (2SD).

4.2.3. Evaluación de la temperatura de la cámara de nebulización

Otro de los factores que pueden afectar a la respuesta obtenida en ICP-MS es la temperatura de la cámara de nebulización. La misma disolución de BSA a la que se le añadió una cantidad conocida de trazador ^{34}S se analizó variando la temperatura de la cámara de nebulización, de nuevo, empleando un nebulizador concéntrico acoplado a una cámara de nebulización de doble paso. Se evaluó la influencia de cuatro temperaturas diferentes (-5, 2, 10 y 20°C). Los resultados obtenidos en dicho análisis se recogen en la Figura 28.

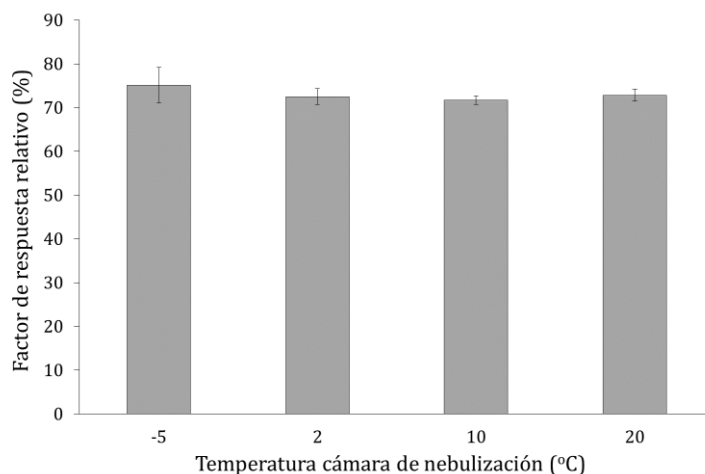


Figura 28. Factores de respuesta relativos (%) obtenidos para una disolución de BSA empleando un nebulizador concéntrico con distintas temperaturas de la cámara de nebulización. Las barras de error corresponden a un nivel de confianza del 95% (2SD).

De forma análoga a los estudios anteriores, donde se varió el flujo de gas de nebulización y el flujo de introducción de muestra, no se observaron variaciones en el factor de respuesta de la BSA en ninguna de las temperaturas ensayadas. El valor medio obtenido en este caso, fue de $73 \pm 2\%$, muy similar al obtenido en los estudios de FIA-IDMS realizados previamente ($75 \pm 3\%$).

4.2.4. Evaluación del contenido salino

Por último, se evaluó el posible impacto del contenido salino en el factor de respuesta de la BSA en ICP-MS. Dada la pérdida de información estructural en la fuente de ICP-MS, como se ha comentado a lo largo de la introducción del presente Capítulo, para obtener una cuantificación absoluta de las distintas especies presentes en una muestra biológica, es necesario el uso de una cromatografía previa que nos permita discernir entre las especies antes de su atomización e ionización en el ICP. Los tipos de cromatografía más empleados en análisis de proteínas con ICP-MS son la cromatografía de exclusión por tamaños (SEC) y la cromatografía de intercambio iónico (IEC)^{40,41} ambas basadas en el uso de sales, ya sea en isocrático o en gradiente, para la elución de las especies. Por ello, se seleccionaron dos sales típicamente empleadas en este tipo de análisis, acetato de amonio y TRIS-HCl (pH 7,4), para evaluar la influencia de la presencia de sales en la disolución de BSA estudiada, emulando las condiciones que se producen a la salida de una columna cromatográfica antes de su entrada en el ICP-MS.

Se empleó para el análisis, la misma disolución de BSA utilizada en los estudios previos con el trazador de ³⁴S, pero en esta ocasión se le añadió una cantidad creciente de las sales elegidas, acetato de amonio y TRIS-HCl. De forma que la concentración final de las sales en la disolución de BSA se encontraba en un rango desde 0 hasta 1M.

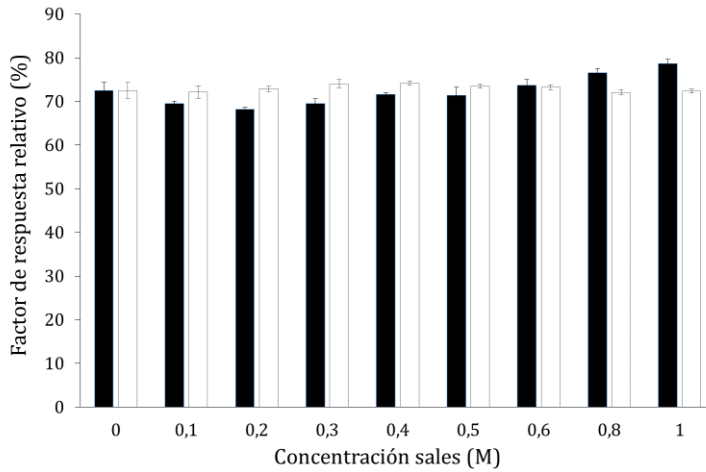


Figura 29. Factores de respuesta relativos (%) obtenidos para la disolución de BSA con diferente contenido salino desde 0 a 1M de dos sales distintas: acetato de amonio (barras negras), TRIS-HCl (barras blancas). Las barras de error corresponden a un nivel de confianza del 95% (2SD).

Una vez más, el cálculo de los factores de respuesta relativos obtenido para la BSA en las distintas condiciones salinas empleando IDA convencional, permaneció inalterado (Figura 29). Los valores de precisión obtenidos para las distintas sales en las nueve concentraciones salinas estudiadas, fueron excelentes, $73 \pm 4\%$ para las disoluciones de acetato de amonio y $73 \pm 1\%$ para el TRIS-HCl. Dichos valores, son de nuevo muy semejantes a los obtenidos tanto en el estudio de los factores de respuesta de BSA mediante FIA-IDMS en línea, como en los realizados variando las condiciones de operación descritos previamente.

4.2.5. Evaluación de la respuesta independiente de la especie en una digestión ácida de BSA

Dados los resultados obtenidos en los estudios llevados a cabo empleando una dilución de BSA a la que se le añadió una cantidad conocida de trazador ^{34}S , se confirmó la necesidad de que se produzca el equilibrio isotópico para obtener una cuantificación absoluta apropiada empleando dilución isotópica. Este equilibrio isotópico se produce, evidentemente, en el plasma y la diferencia en

la eficiencia de nebulización observada entre la proteína y el trazador inorgánico puede influir en los resultados.

A fin de demostrar esta suposición, la misma disolución de BSA utilizada hasta el momento, con el trazador de ^{34}S se analizó mediante ICP-MS/MS antes y después de una digestión ácida. Para el análisis tanto de la disolución de proteína intacta, como para el de la disolución de proteína digerida, se emplearon dos nebulizadores distintos: el nebulizador concéntrico, donde se observaron diferencias en la eficiencia de nebulización cuando se analizó la proteína intacta, y el micronebulizador de consumo total (TCN), que demostró proporcionar una respuesta independiente de la especie incluso para el caso de las proteínas intactas. Análogamente a los estudios anteriores, la cuantificación de los factores de respuesta relativos se llevaron a cabo utilizando las ecuaciones de la IDA convencional y se determinaron como la relación entre la concentración de ^{32}S (procedente de la BSA) calculada experimentalmente, respecto a la concentración teórica de ^{32}S añadida inicialmente en forma de BSA. Los datos obtenidos como resultado del análisis se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10. Factores de respuesta relativos (%) obtenidos en ICP-MS para las disoluciones de BSA intacta y digerida empleando un nebulizador concéntrico y un micronebulizador de consumo total.

	Nebulizador concéntrico	Micronebulizador de consumo total (TCN)
BSA intacta	$73 \pm 1\%$	$97 \pm 2\%$
BSA digerida	$98 \pm 1\%$	$100 \pm 2\%$

Como era de esperar, el factor de respuesta obtenido para la proteína BSA intacta con el nebulizador concéntrico proporcionó un valor de $73 \pm 1\%$, el cual se encuentra en el mismo rango que todos los factores de respuesta obtenidos para BSA con este nebulizador mencionados a lo largo del capítulo. Por el contrario, en el análisis de la disolución de proteína con el trazador de ^{34}S tras su digestión con este mismo nebulizador concéntrico, el factor de respuesta

obtenido fue de $97 \pm 2\%$, lo que demuestra una vez más la respuesta dependiente de la especie observada previamente para este tipo de nebulizadores de flujo convencional, puesto que la cuantificación llevada a cabo para la misma disolución de BSA, pero encontrándose esta en dos formas distintas (intacta o en forma de sulfato tras la digestión) evidenció las mismas diferencias en la eficiencia de nebulización para la proteína. Sin embargo, al utilizar un micronebulizador de consumo total, no se observaron diferencias significativas en los factores de respuesta relativos entre las disoluciones de BSA intacta y digerida.

Los resultados obtenidos en este último experimento, fueron consistentes con los resultados previos, demostrando una vez más la respuesta independiente de la especie proporcionada por el micronebulizador de consumo total (TCN).

4.3. Medida simultánea de P y S en la proteína β -caseína

Finalmente, para demostrar que las diferencias de nebulización observadas en el caso de las proteínas y compuestos con hidrofobicidad alta, es independiente del elemento detectado en ICP-MS y solamente depende de la especie analizada, se seleccionó la fosfoproteína β -caseína puesto que posee en su estructura al mismo tiempo S (en los aminoácidos metionina y cisteína) y P (en los fosfatos de los sitios de fosforilación).

En este caso, como se mencionó en el apartado experimental, la comparación de los factores de respuesta de P en las disoluciones de β -caseína se determinó de nuevo mediante la construcción de las correspondientes rectas de calibrado de P con los tres nebulizadores estudiadas hasta el momento, representando la concentración experimental obtenida para P en cada punto del calibrado con respecto a la concentración experimental de P añadido. Debido a la imposibilidad de llevar a cabo IDMS en línea, puesto que el P a diferencia del S es monoisotópico, se recurrió a la cuantificación de P en cada punto del

calibrado de β -caseína mediante calibración externa con un patrón de P inorgánico certificado. Los valores de pendiente y ordenada en el origen para las rectas de calibrado obtenidas con cada uno de los nebulizadores, así como la incertidumbre asociada a la pendiente (S_b) y a la ordenada en el origen (S_a) y el coeficiente de la regresión obtenidos para la cuantificación de Pen las disoluciones de β -caseína se muestran en Tabla 11.

Tabla 11. Valores de la regresión obtenidos para las curvas de calibrado (n=10 puntos) en la determinación de P en β -caseína utilizando los nebulizadores TCN, concéntrico y flujo cruzado.

	Pendiente	S_b	Ordenada en el origen	S_a	Coefficiente de regresión, r^2
TCN	0,976	0,028	1,0	16	0,993
Concéntrico	0,753	0,023	-1,7	13	0,992
Flujo cruzado	0,680	0,016	-5,9	9,2	0,996

Como se puede ver, la pendiente (factor de respuesta) obtenido con el TCN fue de nuevo muy semejante a la unidad (0,976), mientras que los valores proporcionados por los nebulizadores convencionales son una vez más inferiores a 1, 0,753 para el nebulizador concéntrico y 0,680 para el nebulizador de flujo cruzado.

Adicionalmente, se pudieron comparar los factores de respuesta relativos para β -caseína obtenidos en los análisis de S con los nuevos valores obtenidos para P en la misma proteína. Dichos factores de respuesta para P concordaban perfectamente con los obtenidos previamente para S, como se puede ver a modo de resumen en la Tabla 12, demostrando que las diferencias en la eficiencia de nebulización de las especies en ICP-MS no depende del elemento detectado sino únicamente de la forma química en la que estos estén presentes.

Tabla 12. Factores de respuesta relativos (%) obtenidos en las determinaciones de S y P para las disoluciones de β -caseína en ICP-MS utilizando los nebulizadores TCN, concéntrico y de flujo cruzado.

	S	P
TCN	96 \pm 4%	97 \pm 6%
Concéntrico	72 \pm 3%	75 \pm 5%
Flujo cruzado	63 \pm 2%	68 \pm 5%

5. Conclusiones

En este trabajo se ofrece por primera vez, evidencias de la respuesta diferencial obtenida en ICP-MS empleando nebulizadores de flujo convencional para biomoléculas como proteínas y péptidos hidrofóbicos en comparación con otras moléculas biológicamente relevantes como aminoácidos, cofactores, hormonas o derivados del PEG, todas ellas con la condición de contener un heteroátomo detectable por ICP-MS (en este caso el S). No obstante, al emplear un sistema de introducción de muestra equipado con un micronebulizador de consumo total (TCN), las respuestas obtenidas en ICP demostraron ser independientes de la especie en la que se encuentre el heteroátomo detectado. Estas evidencias manifestaron que la razón detrás de la cual se obtenían diferencias en la respuesta cuando se empleaban nebulizadores de flujo convencional no se debía a diferencias en la ionización de las especies, en la solubilidad de las proteínas en el medio analizado o errores en la certificación de la concentración de los patrones de los analitos sino a diferencias en la eficiencia de nebulización con estos sistemas de introducción de muestra.

En este sentido, la hidrofobicidad parece ser el parámetro más importante en la eficiencia de nebulización de las biomoléculas, Aunque, entre biomoléculas con similar carácter hidrofóbico, la magnitud de la diferencia observada en la nebulización está directamente relacionada con el tamaño de estas.

Adicionalmente se han empleado distintas estrategias de cuantificación como el FIA con IDMS en línea o la IDA convencional de la disolución de proteína a la que se le añadió una cantidad conocida de trazador enriquecido isotópicamente, obteniéndose resultados indistinguibles, lo cual demostró la robustez de los resultados aquí mostrados.

Aunque los análisis se hayan centrado en el análisis de S, debido a su importante presencia en moléculas biológicamente relevantes, se demostró la aplicabilidad del método a la determinación de otros elementos presentes en las mismas biomoléculas, como es el caso del P en una proteína fosforilada. De

forma que, las conclusiones aquí extraídas se podrían extender a otros elementos presentes en biomoléculas como el Se en las seleproteínas y, también, a cualquier metal coordinado a la estructura de las proteínas (como el caso Fe, Mn, V, Ti, Cu, Zn en metalproteínas o enzimas).

Los hallazgos aquí descritos, demuestran que la cuantificación absoluta de biomoléculas mediante ICP-MS sin necesidad de utilizar patrones específicos, no se puede llevar a cabo de forma apropiada para proteínas o especies muy hidrofóbicas a no ser que se emplee un sistema de introducción de muestra basado en un micronebulizador de consumo total u otros similares denominados de alta eficiencia. Desafortunadamente, este no es el caso de la mayoría de las estrategias de cuantificación empleadas en proteómica cuantitativa basadas en ICP-MS, donde se emplean separaciones cromatográficas (normalmente SEC) con nebulizadores de flujo convencional y la cuantificación se lleva a cabo con patrones inorgánicos o IDMS en línea.^{41,42} Por supuesto, el uso de otras moléculas que contengan el mismo heteroátomo, podría proporcionar valores adecuados de cuantificación. No obstante, es necesario asegurar en primer lugar que el factor de respuesta en ICP-MS el mismo para el patrón empleado durante la cuantificación y el analito. Cabe destacar que las conclusiones aquí mostradas no afectan a las estrategias de cuantificación basadas en IDA específica,^{43,44} puesto que en ellas, se emplea para la cuantificación un patrón de la misma especie que se quiere determinar enriquecido isotópicamente, por tanto la eficiencia de nebulización será la misma para la especie de abundancia natural y la enriquecida.

Referencias bibliográficas

¹ Mallick, P., Kuster, B. Proteomics: a pragmatic perspective. *Nature biotechnology*, (2010), 28(7), 695.

² Kirkpatrick, D. S., Gerber, S. A., Gygi, S. P. The absolute quantification strategy: a general procedure for the quantification of proteins and post-translational modifications. *Methods*, (2005), 35, 265-273.

³ Brönstrup, M. Absolute quantification strategies in proteomics based on mass spectrometry. *Expert review of proteomics*, (2004), 1, 503-512.

⁴ Conley, J. M., Berg, L. J. TCR signaling: it's all about the numbers. *Nature Immunology*, (2019), 20, 1415-1416.

⁵ Calderón-Celis, F., Encinar, J. R., Sanz-Medel, A. Standardization approaches in absolute quantitative proteomics with mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, (2018), 37, 715-737.

⁶ Boja, E. S., Fehniger, T. E., Baker, M. S., Marko-Varga, G., Rodriguez, H. Analytical validation considerations of multiplex mass-spectrometry-based proteomic platforms for measuring protein biomarkers. *Journal of proteome research*, (2014), 13, 5325-5332.

⁷ Mounicou, S., Szpunar, J., Lobinski, R. Metallomics: the concept and methodology. *Chemical Society Reviews*, (2009), 38, 1119-1138.

⁸ Yan, X., Yang, L., Wang, Q. Detection and quantification of proteins and cells by use of elemental mass spectrometry: progress and challenges. *Analytical and bioanalytical chemistry*, (2013), 405, 5663-5670.

⁹ Calderón-Celis, F., Cid-Barrío, L., Ruiz Encinar, J., Sanz-Medel, A., Calvete, J. J. Absolute venomomics: Absolute quantification of intact venom proteins through elemental mass spectrometry. *Journal of proteomics*, (2017), 164, 33-42.

¹⁰ Losada, C., Albertí, J. J., Saurina, J., Sentellas, S. Determination of S-containing drug metabolites from in vitro and in vivo metabolism studies by using LC-ICP/MS. *Analytical and bioanalytical chemistry*, (2012), 404, 539-551.

¹¹ Kroepfl, N., Marschall, T. A., Francesconi, K. A., Schwerdtle, T., Kuehnelt, D. Quantitative determination of the sulfur-containing antioxidant ergothioneine by HPLC/ICP-QQQ-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, (2017), 32, 1571-1581.

¹² Svantesson, E., Pettersson, J., Markides, K. E. The use of inorganic elemental standards in the quantification of proteins and biomolecular compounds by inductively coupled plasma spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, (2002), 17, 491-496.

¹³ Grotti, M., Ardini, F., Terol, A., Magi, E., Todolí, J. L. Influence of chemical species on the determination of arsenic using inductively coupled plasma mass spectrometry at a low liquid flow rate. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, (2013), 28, 1718-1724.

¹⁴ Montiel, J., Grindlay, G., Gras, L., de Loos-Vollebregt, M. T., Mora, J. The influence of the sample introduction system on signals of different tin compounds in inductively coupled plasma-based techniques. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, (2013), 81, 36-42.

¹⁵ Langlois, B., Dautheribes, J. L., Mermet, J. M. Comparison of a direct injection nebulizer and a micronebulizer associated with a spray chamber for the determination of iodine in the form of volatile CH₃I by inductively coupled plasma sector field mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, (2003), 18, 76-79.

¹⁶ Juresa, D., Kuehnelt, D., Francesconi, K. A. Consequences of vapor enhancement on selenium speciation analysis by HPLC/ICPMS. *Analytical chemistry*, (2006), 78, 8569-8574.

¹⁷ Anan, Y., Nakajima, G., Ogra, Y. Complementary Use of LC-ICP-MS and LC-ESI-Q-TOF-MS for Selenium Speciation. *Analytical Sciences*, (2015), 31, 561-564.

¹⁸ Navaza, A. P., Ruiz Encinar, J., Carrascal, M., Abián, J., Sanz-Medel, A. Absolute and site-specific quantification of protein phosphorylation using integrated elemental and molecular mass spectrometry: its potential to assess phosphopeptide enrichment procedures. *Analytical chemistry*, (2008), 80, 1777-1787.

¹⁹ Guo, Y., Xu, M., Yang, L., Wang, Q. Strategy for absolute quantification of proteins: CH₃Hg⁺ labeling integrated molecular and elemental mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, (2009), 24, 1184-1187.

²⁰ Raab, A., & Feldmann, J. Biological sulphur-containing compounds—Analytical challenges. *Analytica chimica acta*, (2019), 1079, 20-29.

²¹ Bolea-Fernandez, E., Balcaen, L., Resano, M., Vanhaecke, F. Overcoming spectral overlap via inductively coupled plasma-tandem mass spectrometry (ICP-MS/MS). A tutorial review. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, (2017), 32, 1660-1679.

²² Fernández, S. D., Sugishama, N., Ruiz Encinar, J., Sanz-Medel, A. Triple quad ICPMS (ICPQQQ) as a new tool for absolute quantitative proteomics and phosphoproteomics. *Analytical chemistry*, (2012), 84, 5851-5857.

²³ Balcaen, L., Woods, G., Resano, M., & Vanhaecke, F. Accurate determination of S in organic matrices using isotope dilution ICP-MS/MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, (2013), 28, 33-39.

²⁴ Cid-Barrio, L., Calderón-Celis, F., Abásolo-Linares, P., Fernández-Sánchez, M. L., Costa-Fernández, J. M. Ruiz, Encinar, J., Sanz-Medel, A. Advances in absolute protein quantification and quantitative protein mapping using ICP-MS. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, (2018), 104, 148-159.

²⁵ Chahrour, O., Malone, J. Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) applications in quantitative proteomics. *Protein and peptide letters*, (2017), 24, 253-266.

²⁶ Nuevo Ordóñez, Y., Montes-Bayón, M., Blanco-González, E., Sanz-Medel, A. Quantitative analysis and simultaneous activity measurements of Cu, Zn-superoxide dismutase in red blood cells by HPLC- ICPMS. *Analytical chemistry*, (2010), 82, 2387-2394.

²⁷ Martínez-Sierra, J. G., Sanz, F. M., Espílez, P. H., Santamaria-Fernandez, R., Gayón, J. M. Alonso, J. G. Evaluation of different analytical strategies for the quantification of sulfur-containing biomolecules by HPLC-ICP-MS: Application to the characterisation of 34 S-labelled yeast. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, (2010), 25, 989-997.

²⁸ Lu, S. C. S-adenosylmethionine. *The international journal of biochemistry & cell biology*, (2000), 32, 391-395.

²⁹ Mueller, E. G. Trafficking in persulfides: delivering sulfur in biosynthetic pathways. *Nature chemical biology*, (2006), 2, 185-194.

³⁰ Kyte, J., Doolittle, R. F. (1982). A simple method for displaying the hydrophatic character of a protein. *Journal of molecular biology*, (1982), 157, 105-132.

³¹ Hutanu, D., Frishberg, M. D., Guo, L., Darie, C. C. Recent applications of polyethylene glycols (PEGs) and PEG derivatives. *Modern Chemistry & Applications* (2014), 2, 1-6.

³² Calderón-Celis, F., Sanz-Medel, A., Ruiz Encinar, J. Universal absolute quantification of biomolecules using element mass spectrometry and generic standards. *Chemical Communications*, (2018), 54, 904-907.

³³ Feldmann, J., Raab, A., Krupp, E. M. Importance of ICPMS for speciation analysis is changing: future trends for targeted and non-targeted element speciation analysis. *Analytical and bioanalytical chemistry*, (2018), 410, 661-667.

³⁴ Calderon-Celis, F., Diez-Fernandez, S., Costa-Fernández, J. M., Ruiz Encinar, J., Calvete, J. J., Sanz-Medel, A. Elemental mass spectrometry for absolute intact protein quantification without protein-specific standards: application to snake venomics. *Analytical chemistry*, (2016), 88, 9699-9706.

³⁵ García Alonso, J. I, Rodríguez-González P., *Isotope Dilution Mass Spectrometry*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 2013.

³⁶ Miller, J. N. and Miller, J. C. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, 6th Ed, Pearson, England, 2010.

³⁷ Andrade, J. M., Estévez-Pérez, M. G. Statistical comparison of the slopes of two regression lines: A tutorial. *Analytica chimica acta*, (2014), 838, 1-12.

³⁸ Koch, H., Schneider, D. en Capítulo 28 en *Cytochrome C Complexes: Evolution, Structures, Energy transduction and signaling*. Ed Crammer, W.A., Kallas, T. Springer, USA, 2016, pag 555-584.

³⁹ Kumar, M., Joseph, S. R., Augsburg, M., Bogdanova, A., Drechsel, D., Vastenhouw, N. L., Shevchenko, A. MS Western, a method of multiplexed absolute protein quantification is a practical alternative to western blotting. *Molecular & Cellular Proteomics*, (2018), 17, 384-396.

⁴⁰ Palacios, Ò., Ruiz Encinar, J., Schaumlöffel, D., Lobinski, R. Fractionation of selenium-containing proteins in serum by multiaffinity liquid chromatography before size-exclusion chromatography-ICPMS. *Analytical and bioanalytical chemistry*, (2006), 384, 1276-1283.

⁴¹ Bettmer, J., Bayón, M. M., Ruiz Encinar, J., Sánchez, M. L. F., Sanz-Medel, A. The emerging role of ICP-MS in proteomic analysis. *Journal of proteomics*, (2009), 72, 989-1005.

⁴² Wang, M.; Feng, W. yue; Zhao, Y.-L.; Chai, Z.-F. ICP-MS-based strategies for protein quantification. *Mass Spectrometry. Reviews*. 2009, 221-235.

⁴³ Sarmiento-González, A.; Ruiz Encinar, J.; Cantarero-Roldán, A. M.; Marchante-Gayón, J. M.; Sanz-Medel, A. HPLC-ICPMS and Stable Isotope-Labeled Approaches To Assess Quantitatively Ti(IV) Uptake by Transferrin in Human Blood Serum. *Analytical Chemistry*, (2008), 80, 8702-8711.

⁴⁴ Deitrich, C. L.; Cuello-Nunez, S.; Kmietek, D.; Torma, F. A.; Del Castillo Busto, M. E.; Fiscaro, P.; Goenaga-Infante, H. Accurate Quantification of Selenoprotein P (SEPP1) in Plasma Using Isotopically Enriched Seleno-peptides and Species-Specific Isotope Dilution with HPLC Coupled to ICP-MS/MS. *Analytical Chemistry*, (2016), 88, 6357-6365.

CAPÍTULO 2: Evaluación del potencial y las limitaciones del ICP-MS para la cuantificación de Nanopartículas empleando patrones genéricos

1. Introducción

Como se ha comentado a lo largo de la Introducción de la presente Tesis Doctoral, las excelentes propiedades electrónicas, ópticas y químicas de las nanopartículas, las han convertido en excelentes herramientas en multitud de disciplinas. Este hecho, junto con el desarrollo de las nuevas tecnologías, han da lugar a un incremento en el uso de NPs ya sea en sí mismas (como añadidos para mejorar las propiedades de un determinado producto o, incluso, en estudios de citotoxicidad) o como herramientas para la detección de biomoléculas de interés en el ámbito clínico. No obstante, para su correcta aplicación ha de llevarse a cabo una caracterización de dichos nanomateriales.

En este sentido, existe una gran variedad de técnicas, empleadas para la caracterización de las NPs en cuanto a su morfología, tamaño y la dispersión de este, estructura, propiedades luminiscentes.¹ Uno de los parámetros más importantes y, a la vez, uno de los más complicados de cuantificar es la concentración de nanopartículas contenidas en una dispersión. Con este objetivo existen diversas aproximaciones que nos permiten calcular la concentración de nanopartículas, haciendo uso de sus propiedades de absorbancia como es el caso de las AuNPs² o CdSe QDs³, asumiendo ciertos parámetros de las ecuaciones utilizadas. Sin embargo, no dejan de ser cálculos aproximados del número de partículas.

1.1. El ICP-MS como herramienta de caracterización de Nanopartículas

Dado que la mayor parte de las NPs existentes tienen un núcleo metálico, la detección y cuantificación de NPs en matrices complejas en diversos campos, como la nanobiotecnología o en estudios medioambientales, se vería enormemente beneficiada por el uso de técnicas elementales. Adicionalmente, la gran cantidad de átomos de heteroátomos presentes en su estructura hace del

ICP-MS una técnica ideal para la caracterización de dichos nanomateriales.⁴ El ICP-MS ha demostrado su capacidad para ofrecer información sobre el tamaño, distribución de tamaños, concentración en masa y número de NPs, composición o, incluso, la presencia de otros elementos como impurezas a bajos niveles. Actualmente, la caracterización de NPs mediante ICP-MS se puede abordar de diferentes maneras,⁵ que se comentan a continuación:

1.1.1. Cuantificación directa y caracterización elemental de las NPs

La determinación directa de la concentración de NPs mediante ICP-MS suele requerir una digestión ácida previa. Esta determinación conlleva la necesidad de la combinación de la información elemental del ICP-MS con otras técnicas de caracterización, a fin de obtener el del número de átomos presentes en cada NP, dato imprescindible para transformar la cantidad del elemento en cantidad de partículas. Entre estas técnicas destacan la difracción de rayos X (XRD), capaz de proporcionar información sobre la estructura de las NPs, el microscopio electrónico de transmisión (TEM), que proporciona información sobre el tamaño y morfología.

En este caso, la caracterización de las NPs en términos de concentración en masa de elemento, se lleva a cabo por comparación se la señal obtenida para un patrón elemental del heteroátomo (calibración externa), con la señal proporcionada por la digestión ácida de la muestra de NPs. Por tanto, las especies comparadas en ICP-MS son de la misma naturaleza, lo que como se demostró en el Capítulo anterior, no supone un problema en la cuantificación por ICP-MS, puesto que el factor de respuesta obtenido es el mismo. Esta estrategia se ha empleado con éxito para el cálculo de la concentración en número de NPs como en NPs de HgSe⁶ o QDs de Mn-ZnS.⁷

1.1.2. sp-ICP-MS.

La técnica sp-ICP-MS desarrollada por Degueldre y Favarger⁸ se ha convertido en una técnica imprescindible para la caracterización de NPs. La medida en sp-ICP-MS se basa, como se mencionó en la introducción, en el empleo de una disolución lo suficientemente diluida de las NPs, que permita la detección de una única NP por cada pulso del detector.⁹ De esta forma se consigue información sobre el tamaño de las NPs, según la intensidad adquirida en cada pulso, así como el número de NPs en la disolución, según la frecuencia de dichos pulso.

Esta determinación de la concentración de partículas está relacionada con la eficiencia de transporte, y esta eficiencia depende del nebulizador y la cámara de nebulización empleadas en el sistema de introducción del ICP-MS, así como de las condiciones de operación. Por tanto, a diferencia de lo que ocurría en el caso de biomoléculas de gran tamaño como las proteínas, en el caso de las NPs es bien sabido que la eficiencia de las partículas es distinta a la de sus correspondientes patrones inorgánicos.¹⁰ Además, se ha determinado que las propiedades físicas de las NPs pueden dar lugar a una incompleta vaporización en el ICP, lo que se traduce en resultados inexactos dependiendo del tamaño y de la naturaleza de las NPs.¹¹

El cálculo de la eficiencia de transporte requiere de materiales certificados de NPs, y consiste en la comparación de intensidades de las medidas del patrón certificado de NPs con su correspondiente patrón inorgánico.¹² Cabe resaltar, que la enorme limitación asociada a este tipo de cálculos, está relacionada con la disponibilidad de materiales certificados de NPs. Existen muy pocos materiales certificados e, incluso, en muchos casos, la certificación en masa y en número de NPs no se proporciona. Además, solamente existen materiales certificados para muy poco tipos de NPs, lo que no hace más que limitar las posibles aplicaciones de la metodología sp-ICP-MS a un reducido grupo de NPs. Si bien es cierto que se ha ampliado el uso de esta técnica a otros tipos de NPs,

asumiendo que tienen el mismo comportamiento en cuanto a eficiencia de nebulización y de transporte igual al tipo de NPs utilizadas como patrón (normalmente AuNPs o AgNPs).

1.1.3. Técnicas de separación

Por último, la caracterización de NPs mediante ICP-MS se puede llevar a cabo utilizando técnicas de separación, que permitan aislar las distintas poblaciones de tamaños que existen en una misma dispersión de NPs. Las técnicas de separación cromatográficas, muy utilizadas para la separación de biomoléculas en muestras complejas, también se han empleado en la caracterización de NPs. De entre todas ellas, destaca la cromatografía de exclusión por tamaños (SEC),¹³ dada su capacidad para discriminar entre tamaños. Son numerosos los ejemplos que nos deja este tipo de cromatografía en la caracterización de suspensiones de NPs.^{13,14} Sin embargo, una de las mayores limitaciones de la cromatografía líquida en este tipo de aplicaciones radica en el limitado rango de separación.

Como alternativa a este tipo de separaciones, surgen como herramienta preferente para la separación de NPs las estrategias basadas en el fraccionamiento en flujo con campo de flujo asimétrico (AF4, *Assymetric Flow Field Flow Fractionation*).⁴ Estas son una familia de técnicas de fraccionamiento que permiten separar macromoléculas, coloides, nano y micropartículas en función de su masa molecular/tamaño. El fraccionamiento se consigue en un canal estrecho, por el que circula un flujo en régimen laminar, en base a la interacción de las especies con un campo externo que aplica una fuerza perpendicular al flujo del canal.¹⁵ La separación es muy similar a la cromatografía de líquidos con la salvedad de que se elimina la presencia de una fase estacionaria. En la variación de flujo asimétrico, el campo externo es un segundo flujo (flujo cruzado) que empuja al analito hacia la base del canal, donde se coloca una membrana semipermeable, que permite la circulación del flujo cruzado.

El uso del AF4 como técnica de caracterización de suspensiones de NPs se ha incrementado en los últimos años y son muchos los tipos de NPs analizadas, como QDs de CdSe/ZnS,¹⁶ QDs de Mn-ZnS, AuNPs,¹⁷ AgNPs¹⁸, TiO₂ NPs¹⁹ entre otros.²⁰

Normalmente, en todas las técnicas de separación utilizadas para la caracterización de NPs mediante ICP-MS, la determinación del número de NPs, se lleva a cabo por comparación de la señal proporcionada por las NPs en el correspondiente pico cromatográfico o fractográfico, con la señal de un patrón inorgánico del heteroátomo detectado, asumiendo que el factor de respuesta de cada una de las especies analizadas es indistinguible. Este hecho, como se demostró en el Capítulo 3, puede no ser cierto para todas las especies. Por tanto, existe una necesidad de evaluar hasta qué punto esta afirmación es cierta.

2. Objetivos

El aumento de aplicaciones con base en el uso de NPs, ya sea para su análisis directo o su empleo como herramientas para la detección de otras biomoléculas, hace necesaria llevar a cabo una correcta caracterización de las mismas en términos de concentración en número de NPs.

A pesar de la existencia de diversas técnicas que permiten dicha caracterización, estas suelen basarse en la hipótesis de que el factor de respuesta proporcionado por distintas especies, ya sean patrones inorgánicos con materiales certificados, es idéntica al que presentan las NPs, aunque éstas no sean de la misma naturaleza que la de los patrones. Además, la diferencia en el comportamiento de ciertas biomoléculas en función de su tamaño y carácter hidrofóbico, hace pensar que el tipo de NPs, su tamaño y la naturaleza de las especies utilizadas para su recubrimiento y estabilización pueda afectar también su señal en ICP-MS. Por todo ello, se requiere de la evaluación de los factores de respuesta de estas NPs en ICP-MS en comparación a sus correspondientes patrones inorgánicos.

Para ello, se han seleccionado un tipo de nanomaterial, QDs de CdSe/ZnS recubiertos con un polímero anfifílico, que les confiere estabilidad en disolución acuosa. Análogamente al Capítulo anterior, se compararon los factores de respuesta obtenidos para los QDs con los obtenidos para sus correspondientes patrones inorgánicos, utilizando tres nebulizadores diferentes: dos de ellos de flujo normal (concéntrico y flujo cruzado), y uno de microflujos (TCN).

3. Experimental

3.1. Selección de los analitos

Para la evaluación de la capacidad del ICP-MS para llevar a cabo la cuantificación de NPs utilizando patrones genéricos se seleccionaron unos QDs de tipo *core/Shell*, que poseen un núcleo de CdSe y una corteza de ZnS recubiertos con un polímero que se entrecruza con las cadenas TOP/TOPO, de forma que los QDs son solubles en agua. Un esquema de la estructura de estos QDs de CdSe/ZnS se muestra en la Figura 30.

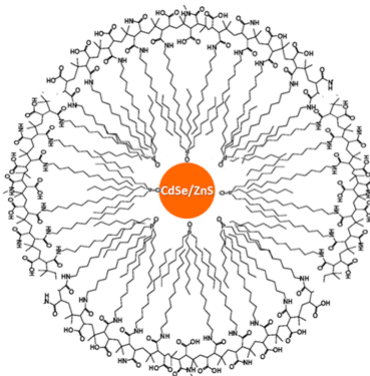


Figura 30. Esquema de la estructura de los QDs de CdSe/ZnS recubiertos con polímero anfifílico.

Estos QDs están formados por cuatro elementos distintos, distribuidos en núcleo y corteza. Para este análisis se seleccionó el Se, como elemento para la comparación de los factores de respuesta en ICP-MS, debido a su carácter multi-isotópico. Además, debido a la estabilidad de los QDs de CdSe/ZnS, cuya solubilidad solamente se asegura con pH básicos, para llevar a cabo una correcta comparación de los factores de respuesta, se requería el uso de un elemento estable a estos pHs.

Al igual que para el análisis de S, la determinación de Se en ICP se encuentra limitada por su bajo potencial de ionización y el elevado número de

interferencias poliatómicas que presentan las m/z del Se (74, 76, 77, 78 y 80). De entre todas ellas, la interferencia más destacable es, también, la que condiciona la medida de su isótopo mayoritario (^{80}Se), la interferencia en base argón $^{40}\text{Ar}_2^+$. Por ello, se han desarrollado multitud de estrategias de corrección de interferencias para la determinación de Se, basadas en el uso de celdas de colisión/reacción con gas como el He o el H_2 . Sin embargo, la introducción del ICP-MS/MS permitió la medida de Se libre de interferencias, basándose en el uso de un gas de reacción para la corrección de interferencias.

De nuevo, el uso de la tecnología MS/MS permite la determinación de Se en su isótopo mayoritario. Para ello, se selecciona en el primer cuadrupolo Q1 la m/z 80, eliminando en este punto las demás m/z que no entran en la celda de colisión. El analito entra en la celda de colisión, reaccionando con el O_2 que se encuentra en ella, dando como resultado la formación de $^{80}\text{Se}^{16}\text{O}^+$ (m/z 96). De forma que al seleccionar en el segundo cuadrupolo Q2, la m/z 96, solamente se detecta el Se que ha reaccionado en la celda, eliminando las interferencias poliatómicas en base Ar.

3.2. Instrumentación

El sistema de ICP-MS empleado durante los análisis consiste en un equipo de tipo triple cuadrupolo 8900 ICP-MS/MS de la empresa Agilent. Para la comparación de los factores de respuesta los análisis se mediante análisis por inyección en flujo (Flow injection analysis, FIA), utilizando en el caso de los análisis de flujo normal una válvula de inyección de 6 vías (Rheodyne) con un volumen de inyección de 20 μL y unas conexiones de PEEK con un diámetro interno de 0.254mm. Mientras que para los análisis llevado a cabo con microflujos, se emplea un HPLC capilar tipo Infinity 1260 equipado con un automuestreador con un volumen de inyección de 1 μL de la empresa Agilent Technologies, con unas conexiones de nuevo de PEEK, pero en esta ocasión con un diámetro interno de 25 μm .

La comparación de los factores de respuesta se lleva a cabo utilizando tres tipos de nebulizadores distintos, dos de ellos de flujo normal: un nebulizador

concéntrico Micromist de la empresa Agilent y un nebulizador de flujo cruzado de la empresa Saville, ambos acoplados a una cámara de nebulización de doble paso tipo Scott y un micronebulizador de consumo total (TCN) de la empresa Agilent.

Para la dilución isotópica en línea se utilizó una bomba peristáltica miniplus 3 (Gibson) durante los análisis de flujo normal, mientras que para los análisis de flujo capilar, se empleó una bomba de jeringa kdScientific (Holliston).

3.3. Procedimientos

3.3.1. Síntesis y solubilización de los QDs de CdSe/ZnS

La síntesis de los QDs de CdSe/ZnS se llevó a cabo según el protocolo optimizado previamente en el grupo de investigación²¹ basada en la tura de síntesis organometálica descrita por Peng *et al.*²² Todas las disoluciones se prepararon en atmósfera inerte. Un esquema del procedimiento de síntesis se recoge en la Figura 31.

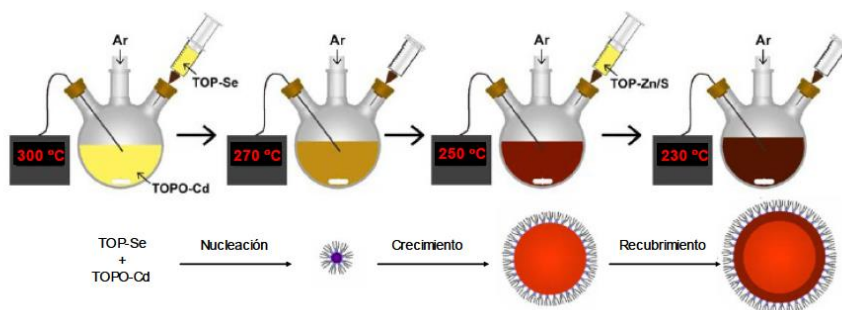


Figura 31. Procedimiento de síntesis de los QDs de CdSe/ZnS recubiertos de polímero anfifílico.²⁴

En primer lugar, se depositaron en un matraz de tres bocas los moles correspondientes del precursor de Cd (CdO), ácido hexilfosfónico (HPA) y óxido de trietilfosfina (TOPO). La mezcla se calentó hasta 300-320 °C bajo un flujo

conteste de Argon durante 15 minutos, de forma que se asegure que todo el CdO se disuelva en el HPA y el TOPO. A continuación se enfrió la disolución hasta 270°C y se añadió rápidamente una disolución de Se preparada en TOP (Se-TOP). Tras la adición, los nanocristales se dejan crecer durante 10-15 minutos a 250 °C. Una vez obtenido el tamaño deseado de núcleo, se añade una disolución que contiene ZnS-TOP, obtenida de la mezcla de los moles correspondientes de Hexametildisilatano, dietilzinc y TOP. La mezcla se calienta a 230 °C, de manera que se comienza a formar la corteza. A continuación se enfrió hasta 100 °C durante una hora. Transcurrida ese tiempo, la mezcla se dejó enfriar hasta temperatura ambiente y se transfirió a un vial de vidrio diluido con cloroformo anhidro. Finalmente, se lleva a cabo el proceso de purificación mediante la precipitación de los QDs en metanol. La suspensión resultante se centrifugó y se eliminó el exceso de reactivos por decantación del sobrenadante de la centrifugación. El precipitado, que contiene los QDs, fue entonces redisolto en cloroformo anhidro y guardado a temperatura ambiente en oscuridad. Tras la síntesis el tamaño del núcleo de los QDs de CdSe-ZnS no polares obtenidos como resultado se estimó utilizando la ecuación de Peng.²³

Los QDs obtenidos como resultado de la síntesis descrita tienen un carácter hidrofóbico. Por tanto, es necesaria una etapa de estabilización en medio acuoso con el fin de poder utilizarlos en aplicaciones bioanalíticas. En este caso, se eligió una estrategia de solubilización, la encapsulación de los QDs mediante el empleo de un polímero anfifílico. Este polímero está formado por unas cadenas anfifílicas, de forma que estas pueden entrecruzarse con las cadenas hidrofóbicas que recubren la superficie de los QDs dejando en la parte externa las partes hidrofílicas del polímero, lo que le confiere solubilidad a las NPs en medios acuosos. Para ello, se siguió el procedimiento previamente descrito.²⁴ Los 200µL de la disolución de QDs de CdSe/ZnS disueltos en cloroformo se añaden sobre una disolución que contiene el polímero. El proceso consiste en una serie de etapas sucesivas de adición y evaporación del polímero y una disolución de entrecruzante. Los QDs de CdSe/ZnS recubiertos con polímero de

dispersan en una disolución regulara de 50mM de boratos (SBB) a pH 12 hasta su uso.

3.3.2. Preparación de las curvas de calibrado

De forma análoga a la comparación de factores de respuesta en biomoléculas, en este caso se llevó a cabo construyendo las correspondientes rectas de calibrado para los QDs de CdSe/ZnS a través de la medida de Se, tal y como se comentó en el aparatado experimental del presente capítulo, con el factor de respuesta obtenido para el patrón certificado de Se inorgánico. Dicha comparación se realizó utilizando tres nebulizadores de distinta naturaleza: uno de flujo concéntrico, otro de flujo cruzado y un nebulizador de microflujos de consumo total. De nuevo, se seleccionó la ID en línea para la normalización de la señal del ICP-MS, evitando así problemas con las derivas de la señal o efectos de matriz. El esquema utilizado (análogo al utilizado durante el Capítulo 3) se recoge en la Figura 32.

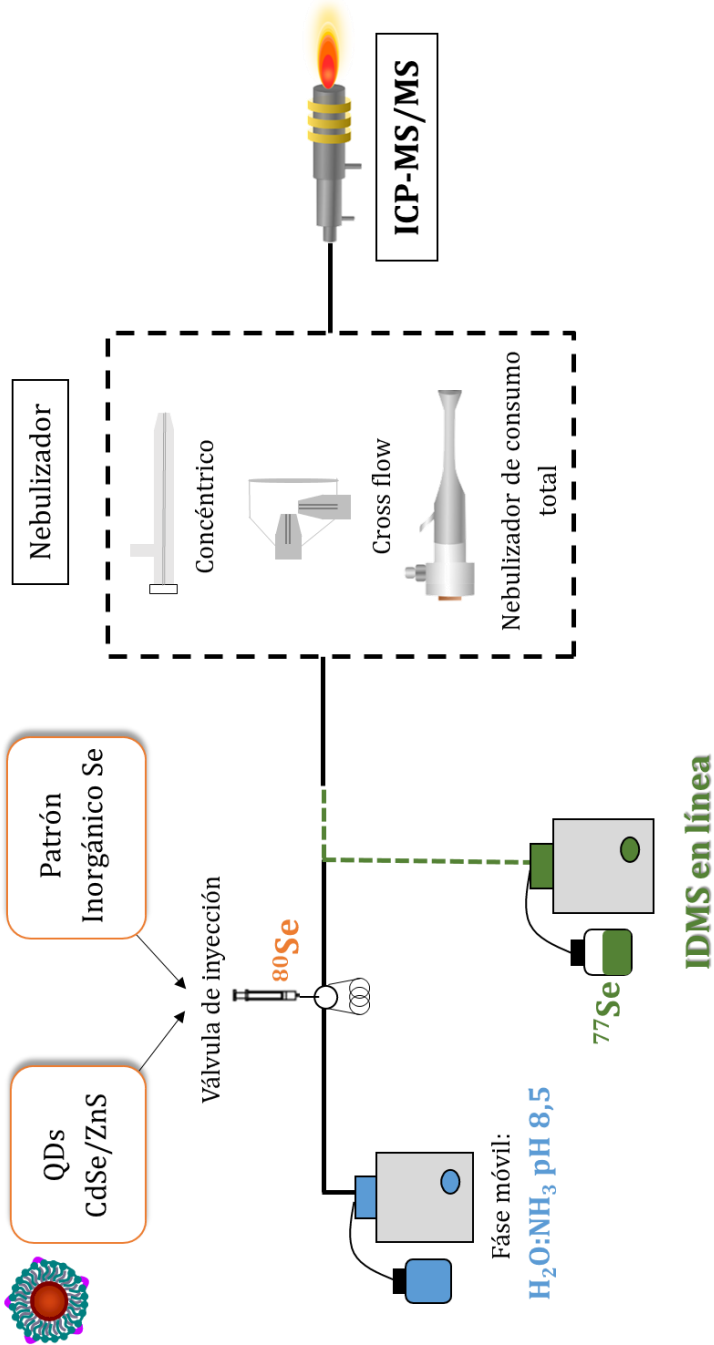


Figura 32. Diagrama de la configuración instrumental empleada para la determinación de los factores de respuesta de Se en QDs de CdSe/ZnSe mediante IDMS en línea e ICP-MS.

En este caso, como líquido portador se seleccionó una disolución de H₂O ultrapura con NH₃, cuyo pH se ajustó hasta un valor de 8,5, para asegurar la estabilidad de los QDs durante el análisis. Asimismo, todas las disoluciones, tanto de patrones inorgánicos de Se natural y enriquecido, como las de los QDs se realizaron en la misma disolución de pH 8,5. Además, para el análisis por IDMS en línea, se utilizó un patrón enriquecido en ⁷⁷Se en un 99,86%.

Las condiciones instrumentales empleadas para la comparación de los factores de respuesta empleadas con cada uno de los nebulizadores ensayados se recogen en la Tabla 13.

Tabla 13. Condiciones instrumentales empleadas para la comparación de los factores de respuesta de compuestos de S mediante FIA-ICP-MS e IDMS.

	Nebulizador concéntrico	Nebulizador de Flujo cruzado	Nebulizador de consumo total
Potencia		1550 W	
Distancia antorcha		8 mm	
Flujo gas de nebulización	1,1 L min ⁻¹	1,2 L min ⁻¹	1,0 L min ⁻¹
Flujo fase móvil	350 µL min ⁻¹	350 µL min ⁻¹	5 µL min ⁻¹
Flujo trazador ⁷⁷ Se añadido en línea	350 µL min ⁻¹	350 µL min ⁻¹	2 µL min ⁻¹
Concentración trazador ⁷⁷ Se	100 ng mL ⁻¹	100 ng mL ⁻¹	300 ng mL ⁻¹
Volumen de inyección	20 µL	20 µL	1 µL

Análogamente al Capítulo anterior, para la comparación de los factores de respuesta, se llevaron a cabo calibrados con concentraciones crecientes de Se en forma de QDs y en forma de patrón inorgánico de Se, desde 5 hasta 300 ppb de

Se en el caso de los análisis de flujo normal y desde 50 hasta 1300 ppb de Se en los análisis de microflujos, mediante análisis por inyección en flujo. De forma que se compararon directamente los factores de respuesta obtenidos a partir de las rectas de calibrado para el Se en forma inorgánica y en forma nanoparticulada. Un ejemplo del resultado de estos calibrados se recoge en la Figura 33.

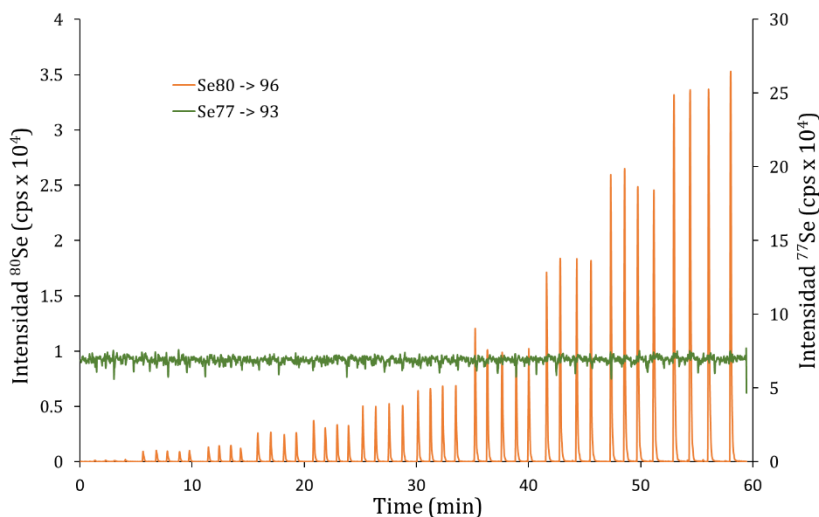


Figura 33. Diagrama obtenido para el patrón inorgánico de Se empleando un nebulizador concéntrico. La línea naranja corresponde a la señal de ^{80}Se procedente de Se presente en los QDs y la línea verde corresponde a la señal de ^{77}Se procedente del trazador añadido en línea tras la inyección. **Figura 14.** Diagrama obtenido para el patrón inorgánico de S empleando el nebulizador concéntrico. La línea azul se corresponde con la señal de ^{32}S procedente el S natural presente en los analitos y la línea roja corresponde a la señal de ^{34}S procedente del trazador añadido en línea tras la inyección. Además se representa también la concentración de S en cada punto del calibrado ($n=4$ réplicas por cada concentración) en ppb de S.

3.3.3. Consideraciones previas

De igual modo que para el estudio previo de las biomoléculas, en el caso de los QDs, es necesario conocer con exactitud la cantidad del elemento que vamos a determinar presente en la suspensión de los QDs. Para ello, se llevó a cabo la digestión ácida asistida por ultrasonidos, utilizando agua regia, se la suspensión de QDs, de forma que todos los elementos presentes en las NPs pasen a estar en

disolución en su forma inorgánica. Una vez digerida, la disolución resultante se diluyó con agua ultrapura, de manera que el contenido final de ácido fuera el apropiada para su introducción en el ICP-MS. El contenido de Se en la dilución, se determinó mediante calibrado externo, realizado con el correspondiente patrón certificado de Se inorgánico. Esta concentración de Se determinada en el suspensión de QDs, fue la utilizada para la construcción de las rectas de calibrado correspondientes.

Cada uno de los calibrado fue de nuevo normalizado con la señal de un patrón elemental enriquecido isotópicamente, en este caso ^{77}Se , añadido en línea. De forma que cada calibrado, se está comparando directamente con la señal de un patrón inorgánico, así el factor de respuesta obtenido para los QDs de CdSe/ZnS es ya un factor de respuesta relativo que indica la diferencia de nebulización con respecto al patrón inorgánico. Es por este motivo, por el que el factor de respuesta obtenido para el patrón natural de Se (también inorgánico) tiene un valor muy cercano a la unidad para todos los nebulizadores empleados.

3.3.4. Comparación estadística de las pendientes de calibrado

La comparación de los factores de respuesta de las rectas de calibrado se llevó a cabo de la misma forma que en el Capítulo 3. Se compararon las pendientes obtenidas de las rectas de calibrado para el patrón inorgánico de Se, con la obtenida para los QDs mediante un test estadístico t de Student de 2 colas con un nivel de confianza del 95%, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.3. Comparación estadística de las pendientes de calibrado, del Capítulo 3 de la presente Tesis Doctoral.

4. Resultados y discusión

4.1. Comparación de los factores de respuesta obtenidos para los QDs empleando un nebulizador de consumo total (TCN)

En primer lugar se llevó a cabo la comparación de los factores de respuesta obtenidos para los QDs de CdSe/ZnS recubiertos de polímero y el correspondiente patrón inorgánico de Se, empleando un nebulizador de microflujos de consumo total (TCN). Las rectas de calibrado obtenidas para las dos especies analizadas, tras la integración de los correspondientes Figramas y el cálculo de la concentración experimental de Se obtenida en cada punto del calibrado utilizando la ecuación (12), se encuentran recogidas en la Figura 34.

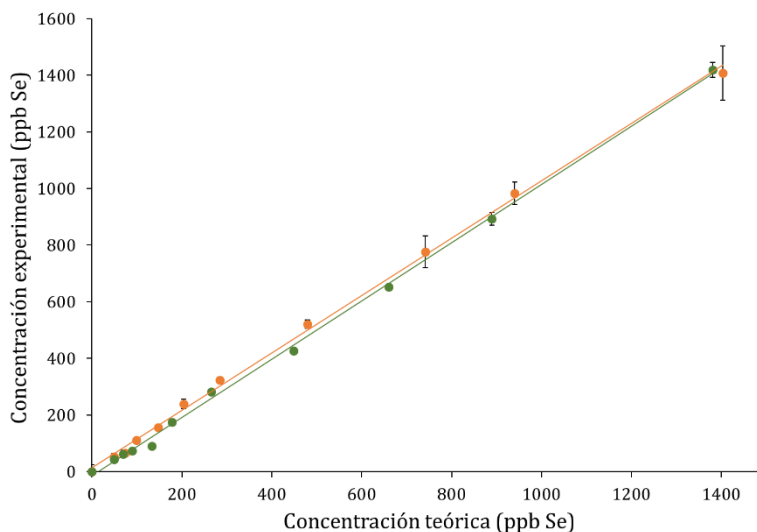


Figura 34. Curvas de calibrado obtenidas para los QDs de CdSe/ZnS recubiertos de polímero y el patrón inorgánico de Se utilizando el micronebulizador de consumo total. Las barras de error corresponden a un 95% de confianza (2SD de las 4 réplicas de cada punto). Los colores corresponden a: Se inorgánico (naranja), CdSe/ZnS QDs (verde).

Como se puede ver claramente en la Figura anterior, los factores de respuesta obtenidos para las dos especies son idénticos, $1,013 \pm 0,014$ para Se inorgánico y $1,029 \pm 0,014$ para los QDs. Además, la precisión asociada a cada

punto individual de las rectas del calibrado de las distintas especies fue adecuada, encontrándose todos los valores ente 0,6 y 12%, con un valor medio de 5,0% de desviación estándar relativa (RSD)

Adicionalmente, se llevó a cabo la comparación estadística de las pendientes de las rectas de calibrado para los dos compuestos de Se. Los valores estadísticos obtenidos siguiendo el protocolo descrito en el apartado experimental, así como los valores de pendiente, ordenada en el origen y coeficiente de regresión se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14. Comparación estadística de los valores de las pendientes obtenidas para el patrón inorgánico y los compuestos estudiados utilizando un micronebulizador de consumo total (TCN). Se aplicó un test t-Student de dos colas a un 95% de confianza: tamaño de la población en cada regression n=10, S_b : error estándar de la pendiente (1SD), S_a : error estándar de la ordenada en el origen (1SD), $S_{(yx)}$: error estándar de la regresión (1SD), t_{exp} se calculó según la ecuación (14). Los valores críticos de t se obtuvieron de las tablas de t-Student a un 95% de confianza-.

Regresión				
Compuesto	Pendiente	S_b	Ordenada en el origen	S_a
Patrón inorgánico	1,01	0,01	14	8
QDs	1,03	0,01	-15	7
Comparación estadística				
Compuesto	$S_{(yx)}$	t_{exp} (ec 14)	t_{tab}	Igualdad estadística
Patrón inorgánico	19,2	-	-	-
QDs	19,4	0,902	2,101	Igual

Los resultados recogidos en la Tabla anterior, confirman la igualdad entre los factores de respuesta de todos los compuestos de Se estudiados cuando se emplea un micronebulizador de consumo total. De hecho, el valor medio de todos los factores de respuesta obtenidos (es decir, las pendientes de calibrado)

Capítulo 2

es de 1,021. Además, los valores de incertidumbre asociados a las 2 pendientes son menores a un 1 % RSD. De forma adicional, se pueden representar en una misma gráfica todos los puntos de 2 rectas de calibrado recogidas en la Figura 34 obteniendo una gráfica “multiespecie”, que se muestra en la Figura 35 con n=22 puntos.

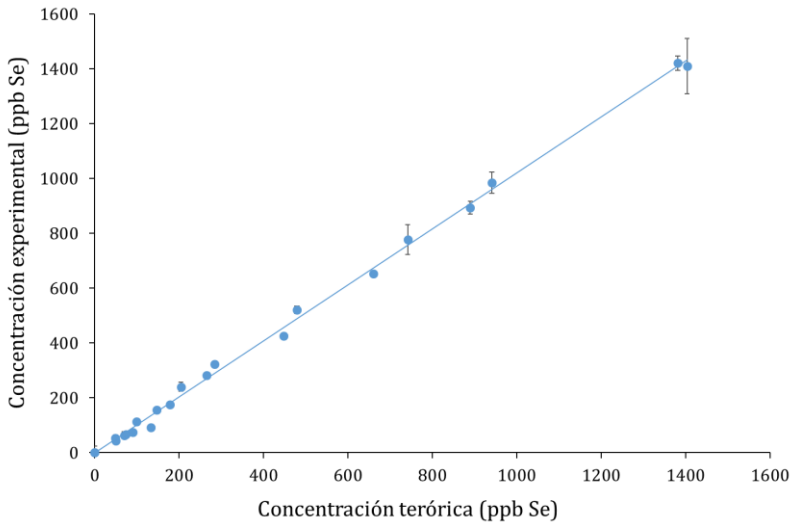


Figura 35. Concentración experimental de Se obtenida para las 2 especies analizadas a los distintos niveles de concentración (n=11) representados frente a la concentración teórica de Se en cada punto utilizando un nebulizador de consumo total (TCN). La incertidumbre asociada a cada punto individual corresponde a un 95% de confianza (2SD, n=4 réplicas).

Como se puede observar, la regresión obtenida en la representación gráfica de todos los puntos de Se fue excelente, $1,022 x - 0,035$ con un coeficiente de regresión de 0,998.

Estos resultados demostraron, al igual que para los análisis de biomoléculas descritos en el Capítulo 1, la capacidad del ICP de proporcionar una respuesta independiente de la especie cuando se utiliza un TCN. Basándose en estos resultados, se puede asegurar que se llevó a cabo una certificación adecuada del contenido de Se en la disolución de los QDs de CdSe/ZnS recubiertos de polímero mediante la digestión ácida de la dispersión de QDs. Asimismo, se logró una completa disolución de los QDs en el medio empleado para el análisis

($\text{NH}_3:\text{H}_2\text{O}$ pH 8,5), puesto que los problemas de solubilidad se habrían reflejado en una diferencia en los factores de respuesta. Cabe resaltar que las mismas disoluciones de patrones y QDs empleadas en este estudio, se utilizaron para la comparación de los factores de respuesta obtenidos empleando los nebulizadores de flujo normal. Por lo tanto, las posibles diferencias observadas en los factores de respuesta solamente pueden ser debidas a diferencias en su comportamiento en los sistemas de nebulización.

4.2. Comparación de los factores de respuesta obtenidos para los QDs empleando nebulizadores de flujo normal.

A continuación se evaluaron los posibles efectos en los factores de respuesta de ICP-MS utilizando los mismos nebulizadores que operan a flujo normal seleccionados en el capítulo anterior: nebulizador concéntrico y de flujo cruzado, ambos acoplados a una cámara de nebulización de doble paso tipo Scott. La comparación se llevó a cabo a través de la construcción de rectas de calibrado empleando el sistema FIA-IDMS en línea descrito en la Figura 32 y con las condiciones de operación recogidas en la Tabla 13. Dado el aumento de masa inyectada en los análisis de flujo normal, el calibrado se realizó en un rango de concentraciones menor que para los análisis de microflujos (desde 5 hasta 300 ppb de Se) a fin de obtener una señal adecuada. Los Diagramas obtenidos con esta configuración, se integraron y se calculó de nuevo la concentración experimental de Se en cada punto, según la ecuación (12), y se representaron frente a la concentración teórica. Las regresiones resultantes se muestran en la Figura 36.

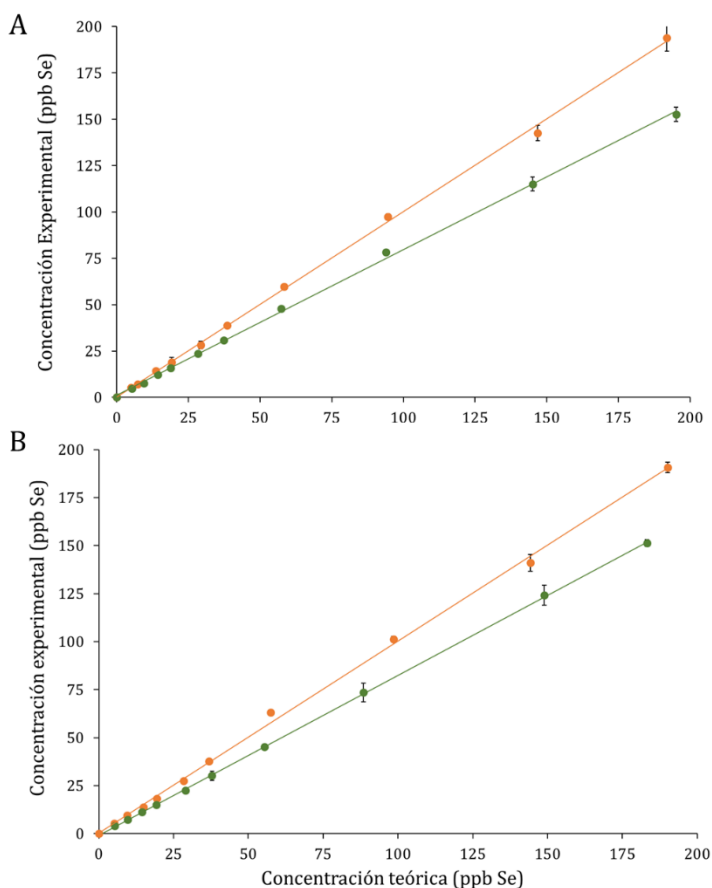


Figura 36. Curvas de calibrado obtenidas para los QDs de CdSe/ZnS recubiertos de polímero y el patrón inorgánico de Se utilizando: A) nebulizador concéntrico y B) nebulizador de flujo cruzado. Las barras de error corresponden a un 95% de confianza (2SD de las 4 réplicas de cada punto). Los colores corresponden a: Se inorgánico (naranja), CdSe/ZnS QDs (verde).

A raíz de los resultados obtenidos para los factores de respuesta de las dos especies de Se, se pudo determinar que existen diferencias significativas entre las señales proporcionadas en ICP dependiendo de la especie analizada. Estos resultados corroboran de nuevo la limitación de los sistemas convencionales de nebulización a la hora de proporcionar una señal independiente de la especie. Los valores de precisión asociados a cada punto individual del calibrado fueron de nuevo adecuados, mostrando unos valores medios de 3,5% para el nebulizador concéntrico y 2,8% para el nebulizador de flujo cruzado.

Análogamente, se llevó a cabo la comparación estadística de los factores de respuesta de los QDs y el Se del patrón certificado inorgánico. Los valores estadísticos obtenidos, así como los valores de las regresiones para los dos nebulizadores se recogen en la Tabla 15.

Tabla 15. Comparación estadística de los valores de las pendientes obtenidas para el patrón inorgánico y los compuestos estudiados utilizando un nebulizador concéntrico y de flujo cruzado. Se aplicó un test t-Student de dos colas a un 95% de confianza: tamaño de la población en cada regresión $n=10$, S_b : error estándar de la pendiente (1SD), S_a : error estándar de la ordenada en el origen (1SD), $S_{(yx)}$: error estándar de la regresión

Capítulo 2

(1SD), t_{exp} y t'_{exp} se calcularon según las ecuaciones (14) y (16). Los valores críticos de t se obtuvieron de las tablas de t-Student a un 95% de confianza.

Nebulizador concéntrico										
Compuesto	Pendiente	Sb	Ordenada en el origen	S_a	Coefficiente de regresión, r^2	$S_{(yx)}$	t_{exp} (ec 14)	t'_{exp} (ec 16)	Valor crítico de t (t_{tab})	Igualdad estadística
Patrón inorgánico QDs	1,00	0,01	0,2	0,8	0,999	1,91	-	-	-	-
	0,79	0,01	1,2	0,6	0,999	1,43	20,8	-	2,101	Diferente
Nebulizador de flujo cruzado										
Compuesto	Pendiente	Sb	Ordenada en el origen	S_a	Coefficiente de regresión, r^2	$S_{(yx)}$	t_{exp} (ec 14)	t'_{exp} (ec 16)	Valor crítico de t (t_{tab})	Igualdad estadística
Patrón inorgánico QDs	1,00	0,01	0,3	1	0,999	2,45	-	-	-	-
	0,83	0,01	-0,9	0,2	0,999	0,56	13,4	-	2,201	Diferente

Una vez más, los valores de incertidumbre de las pendientes de las regresiones, recogidos en la Tabla 15, fueron excelentes, con valores de RSD del 1% o incluso menores. Del mismo modo, los coeficientes de regresión obtenidos para los dos compuestos de Se con ambos nebulizadores fue en todos los casos de 0,999.

Los resultados obtenidos tras la aplicación del test t de Student para la comparación de los factores de respuesta, corroboraron las diferencias observadas en las representaciones gráficas (ver Figura 36), puesto que los valores de las pendientes son claramente estadísticamente distinguibles. El valor de la pendiente para los QDs de CdSe/ZnS recubiertos de polímero obtenido fue inferior a la unidad, 0,786 y 0,834 para el nebulizador de concéntrico y de flujo cruzado, respectivamente.

Los resultados descritos mostraron de nuevo una evidencia clara de la influencia de la especie en la señal de ICP-MS, al menos cuando se emplean nebulizadores de flujo normal. Cabe destacar que el núcleo de estos QDs CdSe/ZnS tienen un núcleo con un diámetro de 3,6 nm, pero estos están recubiertos de cadenas hidrofóbicas TOP/TOPO y un polímero anfifílico entrecruzado con estas cadenas (ver Figura 30), lo que le confiere un diámetro hidrodinámico mayor (de alrededor de 18-20 nm). Además, se ha demostrado en el capítulo anterior que el carácter hidrofóbico de las biomoléculas es un factor determinante en su comportamiento en el sistema de nebulización. Por tanto, cabe esperar que el recubrimiento hidrofóbico de estos QDs influya en la señal obtenida en ICP-MS, abriendo las puertas a estudios de mayor profundidad centrados en la evaluación de la influencia del recubrimiento de estas NPs además de en el tipo de NPs y su tamaño.

4.3. Comparación global de los factores de respuesta

A modo de resumen, se calculó el factor de respuesta relativo para los QDs de CdSe/ZnS recubiertos de polímero con respecto al factor de respuesta del patrón inorgánico para los tres nebulizadores. De manera que un valor del 100 incida que los factores de respuesta entre las dos especies son idénticos. Estos valores calculados se recogen en la Tabla 16.

Tabla 16. Factores de respuesta relativos (%) obtenidos utilizando los tres nebulizadores para los QDs de CdSe/ZnS recubiertos de polímero. La incertidumbre asociada a cada factor corresponde a un nivel de confianza de 95% (2SD) y fue propagada teniendo en cuenta la incertidumbre asociada a las pendientes del patrón inorgánico y de la correspondiente biomolécula.

Tipo de nebulizador	Factor de respuesta relativo, %
Concéntrico	79 ± 2
Flujo cruzado	83 ± 2
TCN	102 ± 4

Los factores de respuesta relativos vuelven a confirmar la señal independiente de la especie para los QDs obtenida cuando se emplea un micronebulizador de consumo total (102 ± 4%). Por el contrario, los datos mostraron una diferencia significativa en los factores de respuesta relativos para los QDs en estudio con los nebulizadores de flujo normal ensayados, 79 ± 2 % para nebulizador concéntrico y 83 ± 2% para nebulizador de flujo cruzado. Como se comentó en el apartado anterior, a pesar del pequeño tamaño que presentan el núcleo de los QDs de CdSe/ZnS (3,6 nm determinado por HR-TEM), el volumen hidrodinámico de éstos puede jugar un papel relevante en su comportamiento en el sistema de nebulización y dada la influencia del carácter hidrofóbico en la señal del ICP-MS, evidenciada en el capítulo anterior, esta diferencia podría ser debida en gran medida a los grupos hidrofóbicos que se encuentran recubriendo la superficie de los QDs.

5. Conclusiones

En este trabajo, continuando con los estudios realizados para biomoléculas, evidencia la respuesta diferencial obtenida en ICP-MS cuando se emplean nebulizadores de flujo convencional para unos QDs de CdSe/ZnS recubiertos de polímero, necesario para conferirle estabilidad en medio acuoso, en comparación con un patrón inorgánico certificado de uno de los elementos contenidos en la estructura de los QDs (Se). No obstante, al emplear un sistema de introducción de muestra equipado con un micronebulizador de consumo total (TCN), las respuestas obtenidas en ICP demostraron ser independientes de la forma en la que se encuentre el heteroátomo detectado. Estos hallazgos manifestaron que las diferencias observadas en la respuesta del ICP-MS para los QDs cuando se emplean nebulizadores de flujo convencional, se deben únicamente a cuestiones de nebulización, puesto las posibles diferencias en la ionización de las especies nanoparticuladas y su estabilidad en disolución fueron descartadas al obtenerse una respuesta idéntica entre el patrón genérico y los QDs empleando un TCN.

Los hallazgos aquí descritos, demuestran que la cuantificación absoluta de de nanopartículas mediante ICP-MS sin necesidad de utilizar patrones específicos, no se puede llevar a cabo de forma apropiada al menos para estos QDs con un recubrimiento polimérico que le confiere un mayor tamaño hidrodinámico, a no ser que se utilice un sistema de introducción de muestra basado en un micronebulizador de consumo total u otros similares denominados de alta eficiencia. Desafortunadamente, numerosas estrategias para la cuantificación de NPs basadas en ICP-MS asumen que una respuesta idéntica entre las NPs y el patrón inorgánico, o un comportamiento en el sistema de nebulización idéntico entre las NPs de interés y un patrón certificado de NPs, que se emplea para calibrar el equipo y determinar la “eficiencia de nebulización”, a pesar de que ambos tipos de NPs no sean de la misma naturaleza o mismo tamaño.

Referencias bibliográficas

¹ Moreira-Alvarez, B., Cid-Barrio, L., Ferreira, H. S., Costa-Fernández, J. M., Encinar, J. R. Integrated analytical platforms for the comprehensive characterization of bioconjugated inorganic nanomaterials aiming at biological applications. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, (2020), 35, 1518-1529.

² Liu, X., Atwater, M., Wang, J., Huo, Q. Extinction coefficient of gold nanoparticles with different sizes and different capping ligands. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, (2007), 58, 3-7.

³ Liu, P., Wang, Q., & Li, X. Studies on CdSe/L-cysteine quantum dots synthesized in aqueous solution for biological labeling. *The Journal of Physical Chemistry C*, (2009), 113, 7670-7676.

⁴ Costa-Fernández, J. M., Menéndez-Miranda, M., Bouzas-Ramos, D., Ruiz Encinar, J. Sanz-Medel, A. Mass spectrometry for the characterization and quantification of engineered inorganic nanoparticles. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, (2016), 84, 139-148.

⁵ Laborda, F., Bolea, E., Cepriá, G., Gómez, M. T., Jiménez, M. S., Pérez-Arantegui, J., Castillo, J. R. Detection, characterization and quantification of inorganic engineered nanomaterials: A review of techniques and methodological approaches for the analysis of complex samples. *Analytica chimica acta*, (2016), 904, 10-32.

⁶ Bouzas-Ramos, D., Menéndez-Miranda, M., Costa-Fernández, J. M., Ruiz Encinar, J. Sanz-Medel, A. Precise determination of the nanoparticle concentration and ligand density of engineered water-soluble HgSe fluorescent nanoparticles. *RSC advances*, (2016), 6, 19964-19972.

⁷ Garcia-Cortes, M., Sotelo González, E., Fernández-Argüelles, M. T., Ruiz Encinar, J., Costa-Fernández, J. M., Sanz-Medel, A. Capping of Mn-doped ZnS quantum dots with DHLA for their stabilization in aqueous media: determination of the nanoparticle number concentration and surface ligand density. *Langmuir*, (2017), 33, 6333-6341.

⁸ C. Degueldre, P.Y. Favarger, Colloid analysis by single particle inductively coupled plasma-mass spectroscopy: a feasibility study, *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* (2003), 217, 137–142.

⁹ Laborda, F., Bolea, E., Jiménez-Lamana, J. Single particle inductively coupled plasma mass spectrometry: a powerful tool for nanoanalysis. *Analytical Chemistry*, (2014), 86, 5, 2270–2278.

¹⁰ D. M. Mitrano, E. K. Leshner, A. Bednar, J. Monserud, C. P. Higgins and J. F. Ranville, *Environmental Toxicol. Chem.*, 2012, 31, 115–121.

¹¹ Lee, W. W., Chan, W. T. Calibration of single-particle inductively coupled plasma-mass spectrometry (SP-ICP-MS). *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, (2015), 30, 1245-1254.

¹² Laborda, F., Bolea, E., Jiménez-Lamana, J.. Single particle inductively coupled plasma mass spectrometry for the analysis of inorganic engineered nanoparticles in environmental samples. *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, (2016), 9, 15-23.

¹³ Pitkänen, L., Striegel, A. M. Size-exclusion chromatography of metal nanoparticles and quantum dots. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, (2016), 80, 311-320.

¹⁴ Trapiella-Alfonso, L., Bustos, A. R. M., Encinar, J. R., Costa-Fernández, J. M., Pereiro, R., Sanz-Medel, A. New integrated elemental and molecular strategies as a diagnostic tool for the quality of water soluble quantum dots and their bioconjugates. *Nanoscale*, (2011), 3, 954-957.

¹⁵ Gigault, J., Pettibone, J. M., Schmitt, C., Hackley, V. A. Rational strategy for characterization of nanoscale particles by asymmetric-flow field flow fractionation: a tutorial. *Analytica chimica acta*, (2014), 809, 9-24.

¹⁶ Menendez-Miranda, M., Fernandez-Arguelles, M. T., Costa-Fernandez, J. M., Ruiz Encinar, J., Sanz-Medel, A. Elemental ratios for characterization of quantum-dots populations in complex mixtures by asymmetrical flow field-flow fractionation on-line coupled to fluorescence and inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, (2014), 839, 8-13.

¹⁷ López-Sanz, S., Fariñas, N. R., Zougagh, M., Martín-Doimeadios, R. D. C. R., Ríos, Á.. AF4-ICP-MS as a powerful tool for the separation of gold nanorods and nanospheres. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. (2020)

¹⁸ Mitrano, D. M., Barber, A., Bednar, A., Westerhoff, P., Higgins, C. P., Ranville, J. F. Silver nanoparticle characterization using single particle ICP-MS (SP-ICP-MS) and asymmetrical flow field flow fractionation ICP-MS (AF4-ICP-MS). *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, (2012), 27(7), 1131-1142.

¹⁹ Contado, C., Pagnoni, A. TiO₂ in commercial sunscreen lotion: flow field-flow fractionation and ICP-AES together for size analysis. *Analytical chemistry*, (2008), 80, 7594-7608.

²⁰ Rameshwar, T., Samal, S., Lee, S., Kim, S., Cho, J., Kim, I. S. Determination of the size of water-soluble nanoparticles and quantum dots by field-flow fractionation. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, (2006), 6, 2461-2467.

²¹ Trapiella-Alfonso, L., Costa-Fernández, J. M., Pereiro, R., Sanz-Medel, A. Development of a quantum dot-based fluorescent immunoassay for progesterone determination in bovine milk. *Biosensors and Bioelectronics*, (2011), 26, 4753-4759.

²² Li, Z., & Peng, X. Size/shape-controlled synthesis of colloidal CdSe quantum disks: ligand and temperature effects. *Journal of the American Chemical Society*, (2011), 133(17), 6578-6586.

²³ Yu, W. W., Qu, L., Guo, W., Peng, X. Experimental determination of the extinction coefficient of CdTe, CdSe, and CdS nanocrystals. *Chemistry of Materials*, (2003), 15, 2854-2860.

²⁴ Fernández-Argüelles, M. T., Yakovlev, A., Sperling, R. A., Luccardini, C., Gaillard, S., Sanz Medel, A., Parak, W. J.. Synthesis and characterization of polymer-coated quantum dots with integrated acceptor dyes as FRET-based nanoprobos. *Nano letters*, (2007), 7, 2613-2617.

CAPÍTULO 3: Deposición catalítica de oro para el desarrollo de un inmunosensor óptico ultrasensible para la detección de Antígeno Prostático Específico

1. Introducción

En la Introducción de la presente Tesis Doctoral, se abordó la importancia de la detección y cuantificación de biomarcadores. Dentro de la complejidad de la detección de biomarcadores, destaca la cuantificación de biomoléculas en muestras de interés biológico, que se encuentran en niveles muy bajos de concentración. Esta cuantificación es particularmente relevantes para el diagnóstico temprano y la evaluación de la progresión de la enfermedad.¹ Por tanto, se hace evidente la necesidad del desarrollo de estrategias bioanalíticas sensibles para la detección de biomarcadores a niveles muy bajos de concentración.

En este sentido, como se mencionó en la introducción, los inmunoensayos se han convertido en una de las herramientas más empleadas para este tipo de fines, debido al reconocimiento específico entre antígeno y anticuerpo. Tradicionalmente, la detección y cuantificación de este tipo de ensayos se llevaba a cabo a través de la medida de fluorescencia de un fluoróforo que se encontraba directamente conjugado al anticuerpo de detección. Sin embargo, la detección de la fluorescencia procedente del fluoróforo empleada como marca suele llevar asociada una serie de limitaciones. Entre los inconvenientes de las marcas convencionales destacan, la elevada señal del fondo, procedente de otras especies fluorescentes presentes en la muestra analizada, e incluso, en ocasiones los límites de detección no eran suficientes para su aplicación en diagnóstico clínico.²

1.1. Nanopartículas como marcas en inmunoensayos

Con el rápido crecimiento de la nanotecnología y la producción nuevas nanopartículas con excelentes propiedades optoelectronicas, biocompatibles y con una elevada relación superficie volumen, se ha incrementado la aplicación de éstas como marcas en inmunoensayos.^{3,4} En este sentido, se han desarrollado multitud de inmunoensayos basados en las propiedades luminiscentes de las NPs.^{5,6} No obstante, cuando los biomarcadores que se quieren cuantificar se

encuentran en matrices muy complejas, la sensibilidad alcanzada con este tipo de ensayos luminiscente es en ocasiones insuficiente para los niveles de concentración en los que éstos se encuentran. Este es el caso del Antígeno de Próstata Específico (PSA), un reconocido biomarcador de cáncer de próstata. La PSA es segregada por la próstata y las células cancerosas de próstata.⁷ Esta glicoproteína de un tamaño de 33-34 kDa, se encuentra en una de 4 ng mL⁻¹ o inferior, indicando una probabilidad baja de sufrir la enfermedad. Mientras que cuando se sufre cáncer de próstata, su concentración aumenta en suero, considerando que una concentración por encima de 10 ng mL⁻¹ alta probabilidad de padecer la enfermedad.^{8,9} Sin embargo, la detección de PSA es importante no solo para el diagnóstico, sino también para la monitorización de la recurrencia de la enfermedad una vez que se ha tratado la enfermedad con una cirugía. En estos casos, los niveles de PSA considerados normales se encuentran en valores por debajo de 0,1 ng mL⁻¹ y con niveles superiores a 0,2 ng mL⁻¹ se considera que la enfermedad persiste.¹⁰ Adicionalmente, se ha sugerido recientemente la determinación de PSA como un posible biomarcador de cáncer de mama en mujeres en los primeros estadios de la enfermedad.¹¹ En mujeres, los niveles normales de PSA se encuentran por debajo de 1 pg mL⁻¹. Si bien se han desarrollado métodos con límites de detección entorno a los 0,001 ng mL⁻¹ PSA,¹² estos siguen siendo muy poco numerosos y, en muchas ocasiones, no emplean técnicas accesibles en laboratorios de rutina. Dichos niveles, típicamente indetectables con los métodos convencionales de cuantificación de biomarcadores, implican la necesidad del desarrollo de métodos ultrasensibles para su detección.

1.2. Técnicas de amplificación basadas en NPs

Para la obtención de métodos ultrasensibles, como los requeridos para la cuantificación de biomarcadores de alarma temprana, se han desarrollado múltiples estrategias de amplificación de la señal analítica. Dichas estrategias, se basan normalmente en el empleo de reactivos y etapas complejas, que requieren mucho tiempo y con un elevado precio.^{13,14}

Como alternativa a estos métodos complejos, se ha desarrollado una metodología de amplificación basada en una deposición catalítica de metales sobre la superficie de las nanopartículas.^{15,16} En este contexto, se ha desarrollado una metodología basada en esta simple técnica de amplificación, para la cuantificación ultrasensible de PSA en muestras de suero empleando QDs como semillas catalíticas para la deposición de Au.¹⁷ En esta, se emplea la espectrometría de masas elemental (ICP-MS) para la detección, debido al aumento del número de átomos detectables por ICP tras la deposición de Au. A pesar de los excelentes límites de detección conseguidos con la metodología y la simpleza del método de amplificación, el empleo del ICP-MS como herramienta de detección requiere de una etapa previa de digestión que además de conllevar un aumento en el tiempo de análisis es, en muchas ocasiones, incompleta. Dicha etapa adicional puede llevar a una cuantificación errónea de la cantidad de biomarcador en la muestra.¹⁸ Esto sumado al elevado precio del equipamiento necesario, limitan la aplicabilidad de la metodología.

En estudios previos se ha demostrado la capacidad de las nuevas metodologías de imagen, basadas en técnicas ópticas, para la detección de nanomateriales en muestras reales.^{19,20} Además, la combinación del aumento de tamaño producido como resultado de la deposición metálica sobre la superficie de las NPs con la detección óptica¹⁶, abre las puertas al desarrollo de un inmunoensayo simple para la cuantificación de biomarcadores a niveles de concentración bajos, con una rápida detección en la misma superficie en la que se produce el inmunoensayo.

2. Objetivos

Como se ha expuesto en la introducción del presente capítulo, el desarrollo de metodologías ultrasensibles simples y de bajo coste para la cuantificación de biomarcadores proteicos en muestras complejas es una necesidad hoy en día, no solo para la detección temprana de enfermedades, sino también para la monitorización de la recurrencia de ciertas enfermedades para el tratamiento. Por ello, el objetivo principal de este capítulo fue el desarrollo de un inmunosensor de elevada sensibilidad para la detección de biomarcadores proteicos, basada en la deposición catalítica de metales sobre la superficie de NPs, una vez que se ha producido el inmunoensayo completo. Con objetivo de minimizar la complejidad de la metodología y dada la capacidad de las técnicas de imagen de detectar nanomateriales en la superficie de tejidos o incluso en la misma superficie donde se lleva a cabo el inmunoensayo, se eligió la microscopía confocal para la detección de las estructuras amplificadas que surgen como resultado de la deposición catalítica en la misma superficie del inmunoensayo.

En primer lugar, se llevó a cabo la síntesis y caracterización exhaustiva de dos tipos de nanopartículas: Quantum dots de ZnS dopados con Mn recubiertas con L-cisteína y AuNPs recubiertas de citrato. Posteriormente, se realizó el intercambio de ligandos de los Mn-ZnS QDs de las Cisteínas que recubrían su superficie por ácido dihidrolipoico (DHLA), con su correspondiente caracterización. Una vez obtenidos los dos tipos de NPs, se llevó a cabo la correcta bioconjugación de las mismas con el anticuerpo específico contra PSA, elegida como biomarcador modelo.

Finalmente, se evaluó el empleo de dos tipos de nanomateriales como semillas catalíticas para la deposición de oro sobre su superficie. Una vez seleccionado el tipo de nanopartículas, se optimizó el proceso de amplificación modificando el tiempo y la concentración de los reactivos, a fin de buscar la mayor sensibilidad.

3. Experimental

3.1. Instrumentación

Durante la caracterización de las NPs, se emplearon un Espectrofotómetro UV-Vis tipo Genesis 10S de la empresa Thermo Scientifics para las medidas de absorbancia, y un Espectrómetro Varian Cary Eclipse de la empresa Varian Ibérica, para las correspondientes medidas de fosforescencia de los QDs.

Al tratarse de medidas de fosforescencia, además de los parámetros instrumentales típicos de fluorescencia (como el ancho de rendijas de excitación y emisión, voltaje del detector) fue necesario optimizar dos nuevas variables instrumentales, el tiempo de demora (t_d) y el tiempo de integración (t_g) (ver Figura 37). El tiempo de demora indica el tiempo a partir del cual se integra la señal fosforescente, este debe estar comprendido entre el pulso de la lámpara y el impuesto por la vida media del compuesto fosforescente (en este caso, los QDs de Mn-ZnS). El tiempo de integración es el tiempo durante el cual se integra la señal fosforescente. Ambos parámetros, han de ser correctamente optimizados puesto que afectan a la sensibilidad.

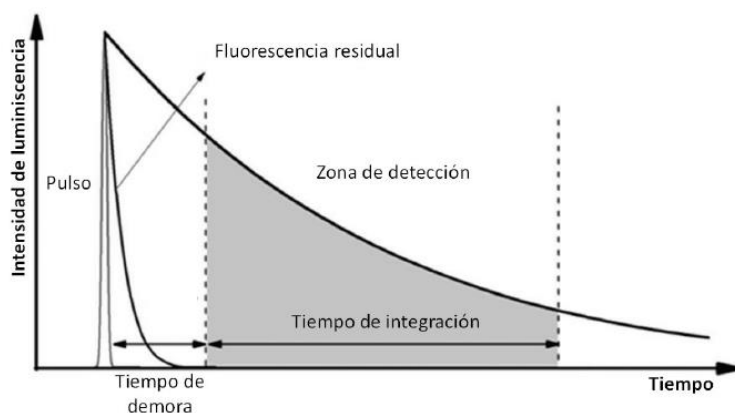


Figura 37. Definición de los parámetros instrumentales t_d y t_g en la medida de fosforescencia.

Las medidas de morfología de las NPs se llevaron a cabo mediante un Microscopio de transmisión electrónica de alta resolución (HR-TEM). Por

último, para las medidas del contenido elemental de los QDs de Mn-ZnS, así como de las AuNPs, se utilizó un ICP-MS/MS Agilent 8800 ICP-MS. Para la correcta corrección de las interferencias poliatómicas asociadas a la medida de Zn, se empleó He como gas de colisión en la celda de reacción. Las condiciones de dichos análisis se recogen en la Tabla 17.

Tabla 17. Condiciones de Medida del ICP-MS/MS para la determinación del %Mn y la concentración de los QDs de Mn-ZnS.

Parámetro	Condiciones
Potencia plasma, W	1550
Flujo nebulización, L min ⁻¹	1,1
Distancia antorcha, mm	8
Isótopos monitorizados	⁵⁵ Mn, ⁶⁴ Zn y ⁶⁶ Zn
Parámetros celda	Condiciones
Gas de colisión	Helio
Flujo gas	4,5

3.1.1. Microscopía láser confocal

Por otro lado, las medidas de la caracterización cuantitativa de las muestras de PSA se obtuvieron empleando un Microscopio Laser Confocal Spectra Leica RCS-SP2-AOBS, con un objetivo de 63 aumentos de inmersión en aceite. Un esquema del funcionamiento de un equipo de Microscopía Confocal se encuentra en la Figura 38.

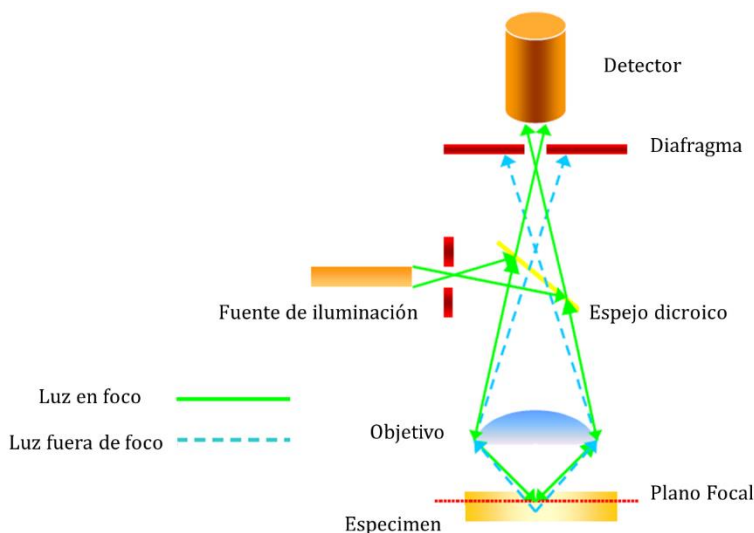


Figura 38. Diagrama del funcionamiento de un equipo de microscopía confocal. Adaptado del *Handbook of biological confocal microscopy*.²¹

El principio de la microscopía de base en eliminar la luz reflejada o fluorescente procedente de los planos fuera de foco, Para ello se ilumina una pequeña zona de la muestra t se toma la luz procedente únicamente del plano focal,²² eliminando con un diafragma los haces de luz que provienen de los planos inferiores y superiores (ver Figura 38).

Parte de la luz procedente de la fuente de iluminación atraviesa un primer diafragma, esta es reflejada mediante un espejo dicróico y se enfoca en un punto concreto del espécimen o muestra mediante el objetivo. La señal emitida por la muestra iluminada, ya sea fluorescencia o luz reflejada) vuelve por el mismo amino óptico, atravesando en esta ocasión el espejo dicróico y se enfoca en el detecto, pasando por un segundo diafragma que es el que elimina la luz procedente de fuera del plano focal. Además de los dos diafragmas, el uso de un láser como fuente de iluminación permite focalizar la iluminación en una región muy pequeña de la muestra.

En muestras biológicas, la microscopia laser confocal es utilizada en la mayor parte de las aplicaciones para la detección de la fluorescencia, ya sea la emitida por la propia muestra o por los fluoróforos empleados para teñir la

muestra. Sin embargo, existe otro modo de medida basado en la medida de la luz reflejada por la muestra, denominado microscopía confocal de reflexión. Este modo se ha empleado típicamente en aplicaciones de ciencia de materiales con el análisis de muestras opacas. Aunque en mucho menor uso que las aplicaciones anteriores, el modo reflexión se puede emplear en muestras biológicas para obtener una información adicional a la proporcionada por la luminiscencia de un espécimen, sin casi preparación de muestra adicional, en tejidos sin teñir o con tejidos marcados con sondas que reflejen la luz.²³

Es el modo reflexión el que se eligió en este capítulo para la detección y cuantificación del inmunosensor, dada la capacidad de reflejar la luz que poseen las nanoestructuras amplificadas tras la deposición metálica. Para la adquisición de las imágenes, la muestra fue irradiada con un Laser de Helio-Neon de 543 nm. El tratamiento de las correspondientes imágenes se llevó a cabo utilizando el software Image J Confocal Uniovi, como se explicará a continuación en el apartado procedimientos.

3.2. Procedimientos

3.2.1. Síntesis de los Quantum dots de ZnS dopados con Mn (Mn-ZnS QDs) recubiertos con L-Cisteína e intercambio de ligandos

La síntesis de los QDs de Mn-ZnS recubiertos con L-Cisteína solubles en agua se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por García-Cortés *et al*²⁴. Se siguieron los siguientes pasos, recogidos en el esquema de la Figura 39.

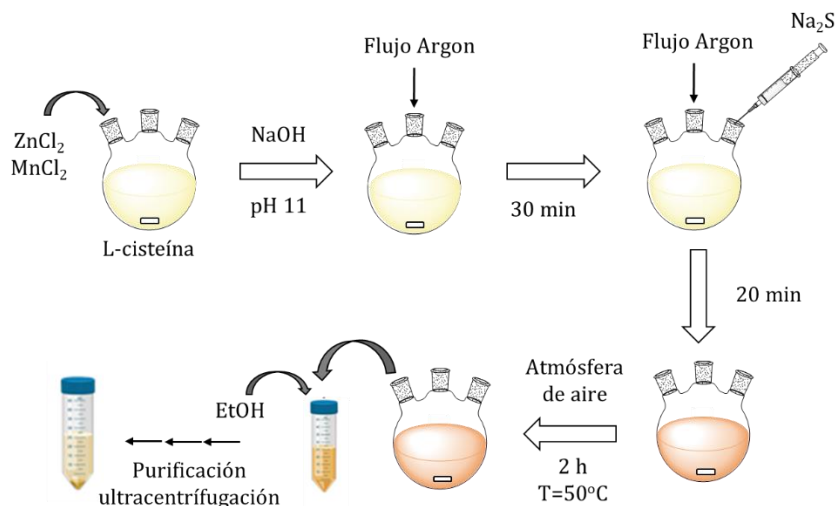


Figura 39. Esquema del proceso de síntesis de QDs de Mn-ZnS recubiertos de L-Cisteína.

En primer lugar, se mezclaron, 50 mL de L-cisteína 0,02 M, 5 mL de $ZnCl_2$, 0,15 mL de $MnCl_2$ y 1,35 mL de agua ultrapura. A continuación, se incrementó el pH de la mezcla resultante hasta un valor de pH 11 con una disolución de $NaOH$ 1 M. Seguidamente, se vierte la mezcla en un matraz de tres bocas de fondo redondo y, esta, se mantiene bajo agitación constante con un flujo constante de Argón, para la desoxigenación de la disolución. Tras 30 minutos, se añade rápidamente con una jeringa 5 mL de Na_2S 0,1 M, manteniendo durante 20 minutos más la agitación y el flujo de Argón. A continuación, la temperatura de la disolución se elevó hasta $50^\circ C$ durante 2 horas bajo atmósfera de aire y con agitación. Durante esta última etapa, las nanopartículas que se obtienen como resultado de la síntesis, están sometidas a un proceso de envejecimiento, el cual mejora su cristalinidad y disminuye los efectos superficiales.

Finalmente, se llevó a cabo la purificación de los QDs resultantes por ultracentrifugación. Para ello, la disolución de los QDs se diluye 1:1 con $EtOH$, que favorece la precipitación de los QDs. Esta mezcla se sometió a un proceso de ultracentrifugación a 5000 rpm durante 5 minutos, durante 3 ciclos. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado obtenido se sometió a un proceso de secado,

dando como resultados un polvo de color marrón pardo de Mn-ZnS QDs recubiertas con L-cisteína solubles en agua.

Para el uso de los QDs sintetizados como marcas en inmunoensayos, se necesita que estos sean solubles en agua y estables en medios biológicos. Sin embargo, a pesar de la solubilidad de los QDs recubiertos con L-cisteína, es precisamente este recubrimiento el que hace que los QDs no sean estables en medios biológicos. Las cisteínas se oxidan fácilmente debido a los grupos tioles que presentan en su estructura, además a la hora de llevar a cabo la bioconjugación de los QDs con el anticuerpo, podrían ocurrir problemas de entrecruzamiento entre distintos QDs puesto que las cisteínas presentan en su estructura los dos grupos funcionales involucrados en la reacción de bioconjugación (como se verá en el apartado siguiente). Por todo ello, se decidió recubrir los QDs con otro ligando que le confiera más estabilidad, el ácido dihidrolipoico (ya utilizado para la solubilización en medio acuoso de las NPs de HgSe del Capítulo 1 de la presente Tesis Doctoral).

Análogamente al Capítulo 1, el intercambio de ligandos de los QDs se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Clapp *et al.*²⁵. Un esquema del procedo de intercambio de ligandos se recoge en la Figura 40.

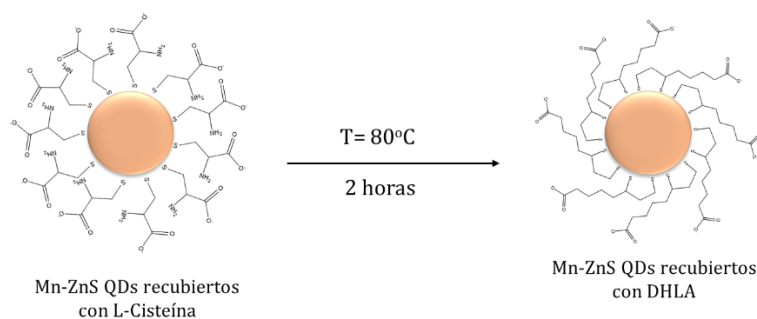


Figura 40. Esquema del procedimiento de intercambio de ligandos de la superficie de los QDs de Mn-ZnS con DHLA.

Para ellos se adicionó un exceso de DHLA (0,4 mL) sobre el polvo de los QDs de Mn-ZnS (10 mg) recubiertos con L-cisteína. La temperatura de la mezcla se elevó hasta 80°C y se dejó con agitación durante 2 horas. A continuación, tras

toda la noche en agitación se precipitan los QDs con 4 mL de metanol anhidro y tect butóxido potásico ($t\text{BuOk}$) en exceso, para desprotonar los grupos carboxilo del DHLA. Los QDs se sedimentan mediante centrifugación (5000 rpm durante 15 minutos) y se transfirieron a medio acuoso. Finalmente, se llevó a cabo una etapa de purificación adicional mediante ultrafiltración (5000 rpm durante 10 minutos tres veces) utilizando filtros de centrifuga de 3 kDa.

3.2.2. Síntesis de NPs de oro (AuNPs)

Las nanopartículas de oro (AuNPs), se sintetizaron siguiendo el procedimiento previamente descrito.²⁶ Se mezclaron 98 mL de agua ultrapura con 1 mL de 25 mM de la sal sódica de tetracloroaurato (NaAuCl_4). La disolución resultante se calentó hasta ebullición con agitación continua. Una vez ésta entró en ebullición, se añadió 1 mL de una disolución 33 mg mL^{-1} de citrato sódico tribásico. La mezcla se dejó durante 10 minutos en ebullición. Finalmente, las AuNPs resultantes se purificaron por centrifugación a 7500 g durante 15 min y 4°C (tres ciclos).

3.2.3. Proceso de bioconjugación química de los Mn-ZnS QDs

A lo largo de este Capítulo de la presente Tesis Doctoral, se seleccionaron dos procesos de bioconjugación en función del tipo de nanopartícula empleada para el marcaje. La vía de bioconjugación seleccionada para la unión de los Mn-ZnS QDs con el anticuerpo monoclonal específico contra la PSA (mAb-PSA) fue la química de la carbodiimida. Esta ruta establece una unión covalente mediante la formación de un enlace amida entre la los grupos carboxilo que recubren la superficie de los QDS, con los grupos amida de los aminoácidos contenidos en el anticuerpo.²⁷ Un esquema del proceso de bioconjugación se recoge en la Figura 41.

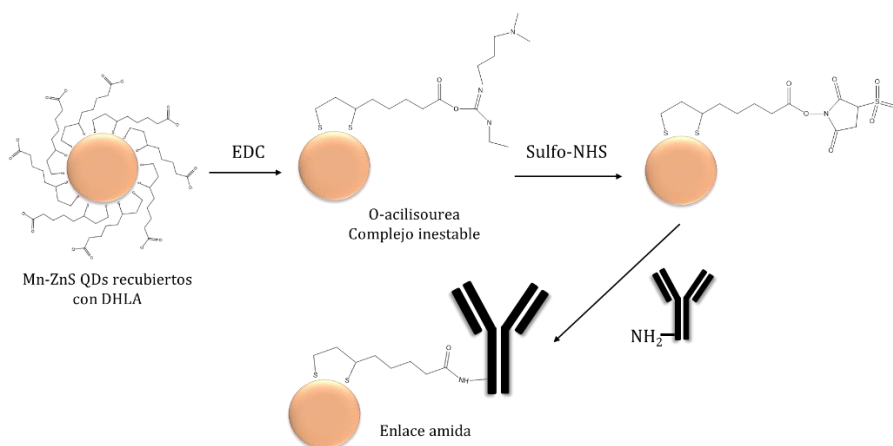


Figura 41. Esquema de la reacción de bioconjugación de los Mn-ZnS QDs con el anticuerpo monoclonal via química de la carbodiimida.

Esta reacción de bioconjugación se llevó a cabo en un vial, con agitación y a temperatura ambiente. En primer lugar, se añadieron las cantidades necesarias de QDs, en un exceso 3:1 con respecto al anticuerpo, y el exceso correspondiente de EDC (1500) y NHS (3000) con respecto a los QDs en este caso. Se dejó reaccionar durante 10 minutos, para activar los grupos carboxilo de la superficie de los QDs. A continuación, se añadió la cantidad correspondiente de anticuerpo, y se dejó agitando en las mismas condiciones de temperatura hasta un tiempo total de 2 horas. Cabe destacar, que las relaciones molares entre la biomolécula (en este caso el anticuerpo) y el nanomaterial se han optimizado, intentando obtener la mayor homogeneidad del bioconjugado (es decir, que existan el menor número de estequiometrías distintas dentro de la mezcla) y el mantenimiento de la funcionalidad del anticuerpo y las propiedades luminiscentes de la nanopartícula. Finalmente, se llevó a cabo la eliminación del exceso de los reactivos empleados durante la bioconjugación. Para ello, se emplearon filtros de centrífuga con un paso de 100 kDa, se centrifugó durante 15 min a 13000 rpm. Posteriormente, el bioconjugado que se encontraba retenido en el filtro, se redispersó en una disolución 10 mM de PBS + 0,05% Tween 20.

3.2.4. Proceso de bioconjugación por adsorción de las AuNPs

Al contrario que la bioconjugación de los QDs, el procedimiento de bioconjugación de las AuNPs a los correspondientes anticuerpos específicos contra PSA se realizó por adsorción, según el protocolo descrito previamente con algunas modificaciones.²⁸ Dicho protocolo se encuentra esquematizado en la Figura 42.

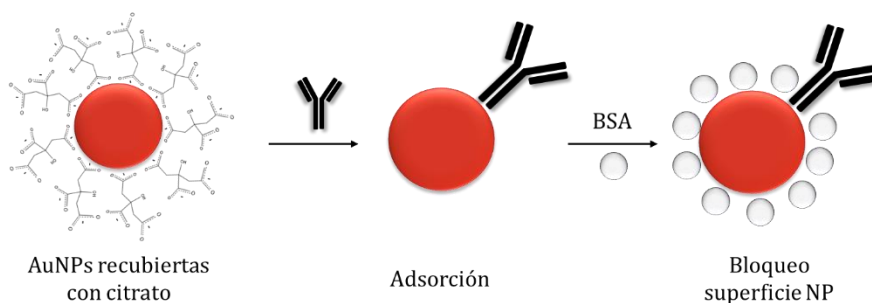


Figura 42. Esquema del proceso de bioconjugación por adsorción del Anticuerpo sobre la superficie de las AuNPs.

En primer lugar, se ajustó el pH de la suspensión de AuNPs a 8,5 utilizando una disolución de NaOH 1 M. A continuación, la suspensión se incubó con una disolución de anticuerpo, con una relación molar 1:1 durante 1 hora a 4°C. Una vez transcurrido el tiempo, se añadió la cantidad correspondiente de BSA para tener una concentración final de 0,25% (p/v), a fin de recubrir la superficie de las AuNPs que no se hubiera conjugado. La mezcla se incubó durante 20 minutos. Posteriormente, se purificó el bioconjugado resultante mediante ultracentrifugación a 12000 g durante 30 minutos a 4°, seguido de una redispersión del precipitado del bioconjugado AuNPs:Ab en un 10 mM de PBS con 0,25 % BSA (p/v) y 0,01 % Tween 20.

3.2.5. Desarrollo del inmunoensayo tipo sándwich para la detección de PSA

Un esquema del inmunoensayo tipo sándwich llevado a cabo para la cuantificación de PSA se recoge en la Figura 43. A fin de llevar a cabo la detección

mediante microscopía confocal, la superficie seleccionada para el desarrollo del inmunoensayo fueron unos portaobjetos de microscopio convencionales recubiertos con poli-L-Lisina, para facilitar la deposición de proteínas en su superficie, en lugar de utilizar las placas convencionales tipo ELISA.

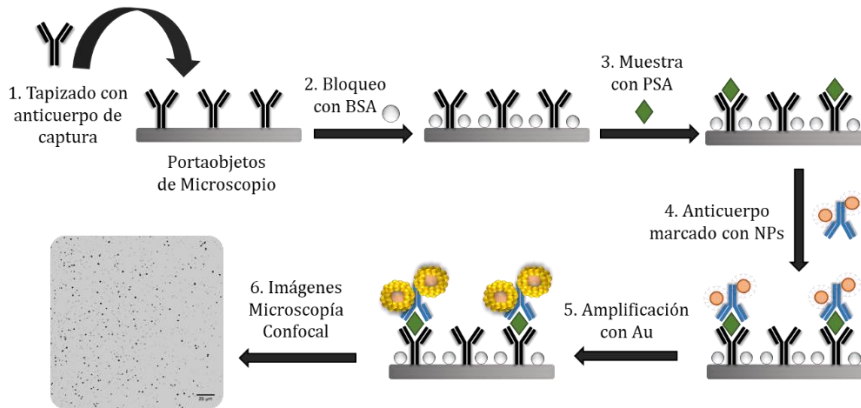


Figura 43. Diagrama del inmunoensayo tipo sándwich para la detección de PSA empleando la deposición catalítica de oro sobre la superficie de las NPs utilizadas como marcas.

En primer lugar, se coloca sobre el portaobjetos una pegatina de silicona que contiene 8 pocillos, de forma que los pocillos quedan delimitados por la pegatina, evitando contaminaciones entre muestras. Una vez colada la pegatina se procedió con el procedimiento completo del inmunoensayo tipo sándwich. Para ello, se tapiza la placa con el anticuerpo de captura anti-PSA (pAb-PSA) utilizando 100 μL de una disolución 3 $\mu\text{g mL}^{-1}$, dejando incubar durante 6 horas en estufa a 37 $^{\circ}\text{C}$. Trascurrido el tiempo correspondiente, se bloquea la superficie del portaobjetos que haya quedado sin recubrir por los anticuerpos con 150 μL de una disolución de BSA al 3% (preparada en PBS 10mM pH 7,4). Esta disolución de incuba durante toda la noche a 4 $^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, se elimina la disolución de bloqueo y cada uno de los pocillos, se lava con 150 μL de 10mM PBS + 0,05% de Tween 20, se repitió el proceso de lavado veces. Entonces se añadieron los 100 μL de las muestras con PSA correspondientes en cada pocillo, dejando que incuben durante 2 h a 37 $^{\circ}\text{C}$. Se llevó a cabo otra etapa de lavado con 150 μL de 10mM PBS + 0,05% de Tween 20 y, finalmente, se añadieron 100 μL de la disolución de bioconjugado (Ab:NP) en una

concentración de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ (referida al anticuerpo). Se dejó incubar durante 2 h a 37°C .

Una vez llevado a cabo el inmunoensayo completo, se continuó el proceso con la etapa de amplificación. Tras el correspondiente lavado con $50 \mu\text{L}$ de $10\text{mM PBS} + 0,05\%$ de Tween 20, se añadió a cada pocillo una disolución 1:1 de los precursores de oro y el reductor necesarios para la deposición catalítica, $0,5 \text{ mM NaAuCl}_4$ y $5 \text{ mM hidroxilamina}$. Dicha mezcla se incubó durante 15 min a 60°C con agitación constante. Por último, se eliminó el exceso de reactivos y se lavaron los pocillos con agua ultrapura antes de la detección por microscopía.

3.2.6. Tratamiento de imágenes cuantitativo de las medidas de Microscopía Confocal

Las imágenes digitales adquiridas en cada uno de los pocillos de los portaobjetos, que contienen el inmunoensayo completo con la correspondiente etapa de amplificación, se trataron empleando el software Image J Confocal Uniovi. Con el fin de analizar la mayor cantidad posible de toda la superficie de los pocillos, éstos se dividieron en dos partes, tomando 4 imágenes en cada una de las zonas delimitadas. De forma que de cada uno de los pocillos se procesaron 8 imágenes en total.

Cada una de las imágenes de reflexión obtenidas se convirtieron en las correspondientes imágenes binarias mediante la aplicación de un segmentado. El cual clasifica los píxeles contenidas en cada imagen en dos tipos: fondo (que corresponde al fondo de los portaobjetos utilizados como superficie del inmunosensor) y primer plano (que corresponde a las nanoestructuras amplificadas). Como resultado del segmentado, se obtiene una imagen binaria donde todos los píxeles están clasificados como $a_0=1$ cuando el valor del píxel es inferior al del segmentado utilizado o $a_1=255$ cuando el valor del píxel es superior al valor del segmentado. Dicho valor se segmentado se seleccionó de formar que todas las partículas se contasen correctamente, asegurando que ningún píxel correspondiente a la señal de fondo estuviera mal clasificado. Este

valor, se seleccionó al principio de cada experimento y se aplicó a todas las imágenes obtenidas durante el mismo.

Una vez obtenidas las imágenes binarias, se puede utilizar el software Image J confocal para contar todas las partículas con un tamaño inferior a uno impuesto, a través de la aplicación de algoritmos. En este caso, no se seleccionó ningún valor límite de tamaño, puesto que el tamaño de las partículas tras el proceso de amplificación dependía de la semilla catalítica empleada y las condiciones utilizadas en cada una. Como resultado, se obtuvo el número total de partículas de cada imagen, y se calculó, con estos datos, en el número total de partículas en cada zona delimitada en los pocillos.

4. Resultados y discusión

4.1. Caracterización de los NPs sintetizadas y sus bioconjugados

En primer lugar se llevó a cabo la caracterización luminiscente de los QDs de Mn-ZnS recubiertos con L-cisteína, así como de los QDs recubiertos con DHLA resultantes tras el intercambio de ligandos.

El espectro de emisión de ambas suspensiones de QDs (recubiertos con L-cisteína o con DHLA) se recogió tras su excitación a 295 nm, mostrando un máximo de emisión a 595 nm. Una vez obtenidos los espectros de emisión, se realizó un espectro de excitación, a fin de asegurar que la longitud de onda de excitación era la correcta, y no había sufrido ningún desplazamiento durante el proceso de intercambio de ligandos. Los espectros de emisión y excitación de los QDs de ZnS dopados con Mn recubiertos con DHLA se muestran en la Figura 44.

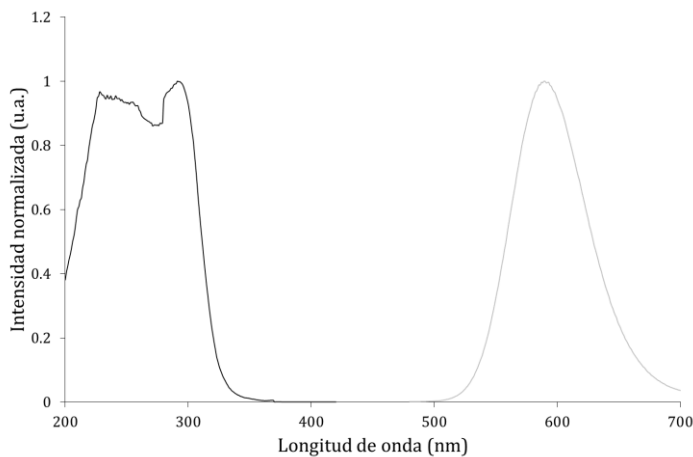


Figura 44. Espectros de fosforescencia de los QDs de ZnS dopados con Mn recubiertos con DHLA tras el intercambio de ligandos. Espectro de excitación (línea negra) y espectro de emisión (línea gris).

Estos QDs tienen una emisión fosforescente centrada en 590 nm con una excitación a 290 nm. Además, no se observó ninguna modificación en las

propiedades luminiscentes tras el intercambio de los ligandos que recubren su superficie.

Además, se llevó a cabo una caracterización morfológica de los QDs a través mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM). En este caso, puesto que el núcleo de los QDs es el mismo para ambos, y no se espera ningún cambio en el tamaño tras el intercambio de ligando, se obtuvieron imágenes solamente de los QDs recubiertos con DHLA (puesto que serán los empleados durante el presente capítulo). Las imágenes de los QDs de Mn-ZnS (Figura 45) muestran un tamaño de 3,6 nm.

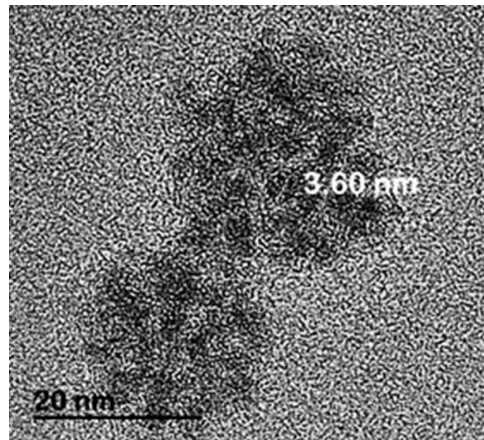


Figura 45. Imágenes de HR-TEM de los QDs de Mn-ZnS recubiertos con DHLA.

Una vez obtenida la caracterización morfológica y luminiscente de los QDs, para llevar a una bioconjugación apropiada de los QDs con el anticuerpo correspondiente, es necesario conocer la concentración de dichos QDs. De acuerdo con las ecuaciones desarrolladas por García-Cortés *et al.*²⁴ la concentración de QDs se puede calcular a través de la ecuación (18).

$$C_{QDs}(\mu mol) = \frac{M_{Zn(\mu g)} \times X_{blenda}}{n_{Zn}^{at} \times A_w^{Zn}} \quad (18)$$

Donde, $M_{Zn(\mu g)}$ es la masa de Zn presente en los QDs, X_{blenda} es la fracción molar de blenda de la estructura, n_{Zn}^{at} el número de átomos de Zn por QDs y A_w^{Zn} el peso atómico del Zn. El X_{blenda} y el n_{Zn}^{at} se obtuvo fácilmente a través de las

medidas de XRD, y éstos vienen dados por el % de Mn presente en la estructura de los QDs. En este caso, puesto que el %Mn utilizado es un 3%, la fracción molar de blenda en la estructura se asumió que era de un 0.97.²⁹ De la misma forma, basándose en las medidas de XRD previas, se asumió un número de átomos de Zn por QD de 155. Para las medidas de la masa de Zn en la suspensión, se recurrió al ICP-MS, donde se determinó la cantidad de Zn de los QDs tras su correcta digestión ácida, mediante un calibrado externo. En este caso, solamente se realizó el cálculo de la concentración molar de la suspensión de los QDs de Mn-ZnS recubiertos con DHLA, puesto que son los que se emplean durante el desarrollo del inmunoensayo.

A continuación, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.2.3 del presente Capítulo, se llevó a cabo la bioconjugación utilizando los valores de concentración de QDs previamente calculados con las medidas de ICP-MS. Tras la bioconjugación y purificación de la mezcla resultante, se llevó a cabo de nuevo la caracterización luminiscente, a fin de determinar si las propiedades de los QDs habían sufrido alguna modificación con el proceso de recubierto de su superficie con el anticuerpo. Los espectros de emisión y excitación fosforescente se recogen con las mismas condiciones utilizadas previamente durante la caracterización de los QDs libres, y se muestran en la Figura 46.

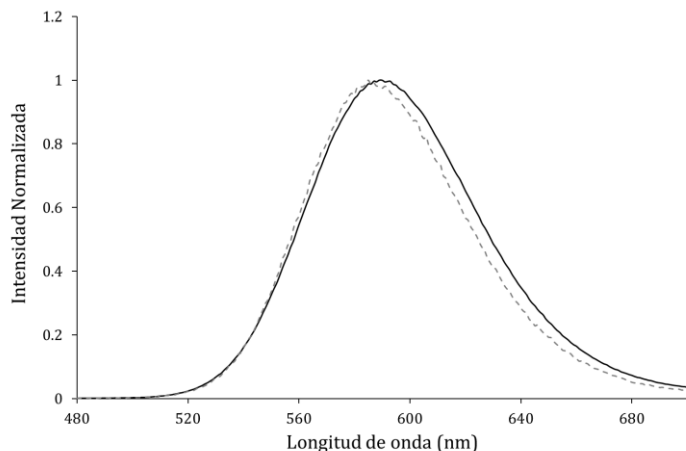


Figura 46. Espectros de fosforescencia de emisión obtenidos para: los QDs de Mn-ZnS libres (línea negra continua) y para el bioconjugado Ab:QDs (línea gris de puntos) con una longitud de onda de excitación de 290 nm.

Análogamente, se llevó a cabo la caracterización de las AuNPs y su correspondiente bioconjugado. En primer lugar, se obtuvo el espectro de absorbancia de las AuNPs, que presentaron un máximo de absorbancia a 521 nm (ver Figura 47), así como la determinación de su tamaño mediante HR.TEM (figura ZZ b), mostrando un tamaño de 19nm.

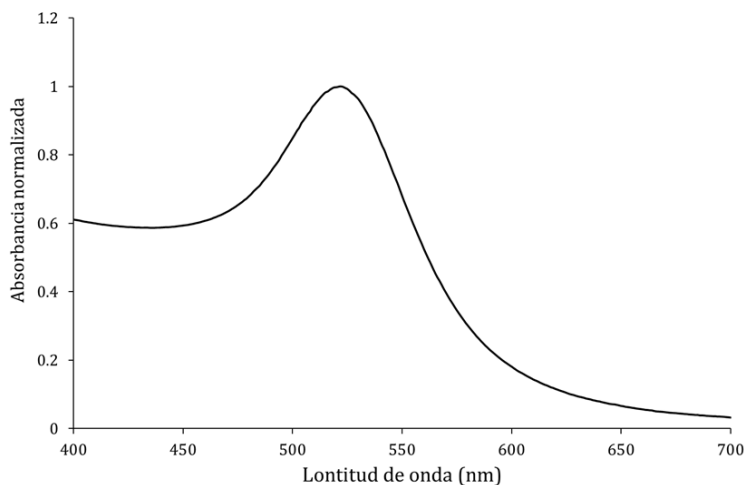


Figura 47. Espectro de absorbancia de las AuNPs recubiertas de citrato

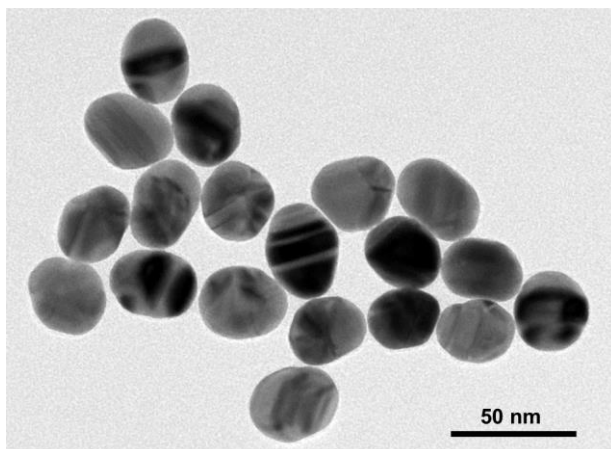


Figura 48. Imagen de HR-TEM de las AuNPs recubiertas de citrato

De nuevo, para llevar a cabo una correcta bioconjugación de las NPs con el anticuerpo, se determinó la concentración en número de NPs. En este caso, el número de AuNPs se determinó a través de la estimación del coeficiente de extinción molar de las AuNPs y las medidas de absorbancia de las mismas.³⁰

Posteriormente, se llevó a cabo la caracterización por absorbancia del bioconjugado de AuNPs:Ab (ver Figura 49). Como se puede ver, se aprecia un desplazamiento del máximo de longitud de onda desde 521 a 523 nm, dicho desplazamiento concuerda perfectamente con lo descrito en la bibliografía.

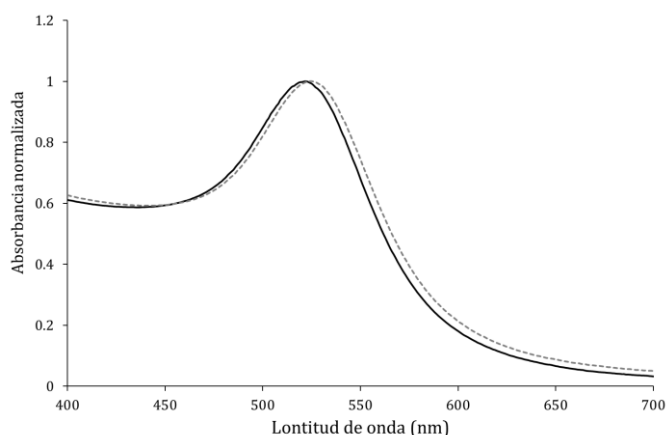


Figura 49. Espectros de absorbancia de las AuNPs (línea negra continua) y del bioncojugado Ab:AuNPs (línea gris de puntos).

4.2. Deposición de oro sobre la superficie de Mn-ZnS QDs y AuNPs como semillas catalíticas

La deposición catalítica de metales sobre la superficie de NPs de distinta naturaleza, así como su correspondiente aumento de tamaño y detección mediante técnicas microscópicas se ha venido desarrollando a lo largo de los últimos años.³¹ En un estudio reciente, se evaluó la deposición de Au (III) sobre la superficie de AuNPs depositadas en tejidos, de forma que a través de la medida de la luz dispersada por estas nuevas estructuras amplificadas mediante microscopía confocal, fueron capaces de localizar proteínas de muy baja abundancia en tejidos transparentes.¹⁹ Pero esta deposición metálica no se ha limitado únicamente al oro, sino que la deposición catalítica de plata, sobre la superficie de distintas nanopartículas, CdSe/ZnS QDs y AuNPs también se ha estudiado.²⁸ Sin embargo, esta deposición de Ag ha demostrado ser un proceso rápido y sencillo, pero con una reproducibilidad muy baja ligado a la dificultad de controlar el proceso cinético durante la etapa de amplificación.^{32,33} Por el contrario, la deposición catalítica de oro ha demostrado en un reciente estudio, ser más reproducible y efectiva.¹⁷

Por todo ello, para la detección ultrasensible de PSA, se seleccionó en este caso la deposición catalítica de oro empleando dos NPs como semillas catalíticas de distinta naturaleza y con diferentes recubrimientos, AuNPs recubiertas con citrato y QDs de Mn-ZnS recubiertos con DHLA.

En primer lugar, se evaluó la capacidad de producción de estructuras de oro amplificadas, así como la posibilidad de detectar dichas estructuras en la misma superficie en la que se llevó cabo el inmunoensayo. Con este propósito, se realizó el procedimiento completo del inmunoensayo tipo sándwich (descrito en el apartado experimental del presente capítulo), utilizando una muestra dopada con PSA (100 pg mL^{-1}) y otra muestra de blanco (es decir, sin PSA). El protocolo se repitió utilizando ambos tipos de NPs: AuNPs y QDs de Mn-ZnS. Tras la etapa de incubación de los bioconjugados, se llevó a cabo la amplificación mediante la deposición de Au sobre la superficie de las NPs catalizada por un reductor

(hidroxilamina). Como resultado del análisis por microscopía confocal, se obtuvieron las imágenes recogidas en la Figura 50.

Como se puede ver claramente en la Figura, se formaron estructuras de Au con un tamaño superior al inicial en ambas semillas catalíticas. Además, la aplicabilidad del microscopio confocal para la detección de la luz reflejada por estas estructuras amplificadas quedó demostrada. Cabe resaltar en esto que la amplificación del tamaño de las partículas se produce una vez que todo el proceso de inmunoensayo ha tenido lugar, por tanto, no se comprometen las capacidades de reconocimiento de los anticuerpos, que sí podrían verse afectadas al emplear directamente partículas más grandes durante el marcaje.

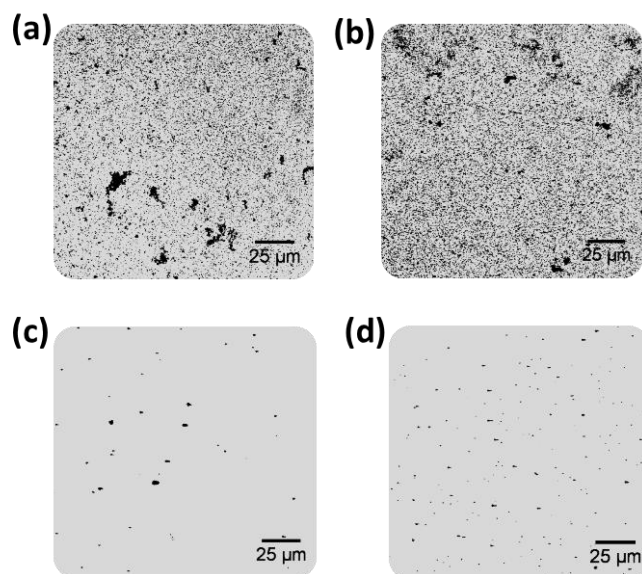


Figura 50. Imágenes de microscopía confocal de pequeñas áreas de los pocillos contenidos en el portaobjetos ($160 \times 160 \mu\text{m}^2$) obtenidas después del inmunoensayo completo para la detección de PSA seguido de la deposición catalítica de Au para utilizando dos tipos de semillas catalíticas: (a-b) AuNPs con 0 y 100 pg mL^{-1} PSA y (c-d) Mn-ZnS QDs con 0 y 100 pg mL^{-1} PSA, respectivamente.

La amplificación de tamaño observada en la Figura anterior se pudo cuantificar, de forma que la comparación directa con los tamaños iniciales de las NPs utilizadas como semillas, obtenidos mediante TEM (ver Figura 51a y c) es mucho más sencilla. En el caso de las AuNPs, el tamaño se incrementó desde 21

± 1 nm hasta $1,5 \pm 1,1$ μm . Mientras que los QDs de Mn-ZnS de $3,6 \pm 0,2$ nm pasaron a tener un tamaño de $1,2 \pm 0,3$ μm . Si bien el tamaño obtenido para las estructuras amplificadas de AuNPs fue superior a la de los QDs, la dispersión en los tamaños de las mismas, 73% para las AuNPs con respecto a un 17%, indica que la amplificación sobre la superficie de los QDs ocurre de manera más controlada. Esto puede verse fácilmente en la Figura siguiente, donde se muestra una ampliación de las imágenes obtenidas con cada una de las semillas catalíticas, así como un histograma de los tamaños de las estructuras amplificadas obtenidas en cada caso.

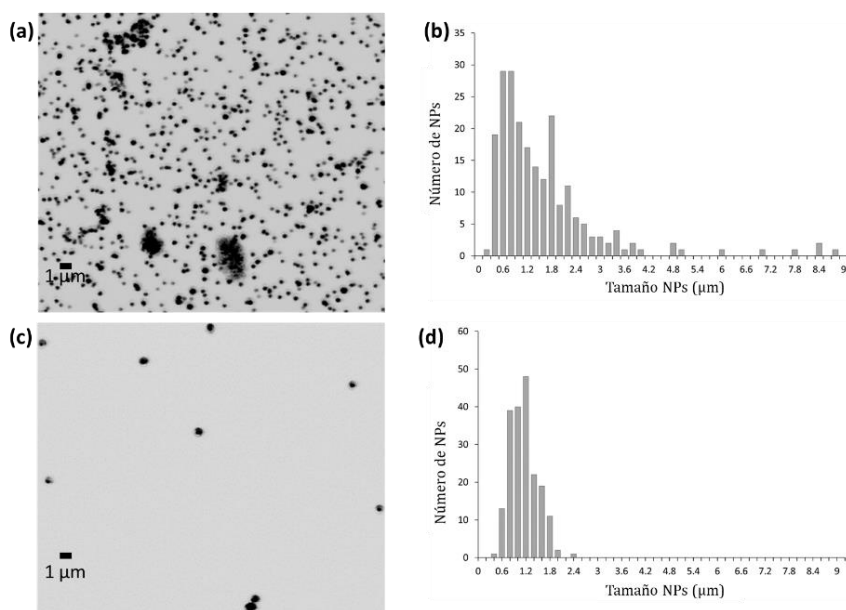


Figura 51. Imágenes de microscopía confocal para a) AuNPs y c) QDs de Mn-ZnS tras llevar a cabo el inmunonensayo completo de PSA y la correspondiente deposición catalítica de Au. Distribución de tamaños de las nanoestructuras amplificadas b) AuNPs y d) QDs de Mn-ZnS.

A pesar del drástico aumento de tamaño desde los pocos nm a las micras obtenido, el comportamiento de cada una de las NPs como semillas catalíticas fue claramente distinguible. El oro depositado creció con una mayor rapidez sobre la superficie de las AuNPs, produciendo una amplificación instantánea del tamaño, llegando incluso a la formación de agregados (como los mostrados en la Figura 51a) que se podía ver a simple vista por un cambio en el color del

pocillo desde transparente a un color azulado (color típico asociado a los agregados de AuNPs). Este crecimiento incontrolado de las NPs, se tradujo en una señal del blanco muy elevada (ver Figura 50a) prácticamente indistinguible de la señal observada para la muestra dopada con PSA (Figura 50b).

Por el contrario, en el caso de los QDs de Mn-ZnS la deposición de Au se produce de una forma más controlada, dando como resultado la formación de partículas con tamaños mucho más similares (ver Figura 51b). Además, esto se tradujo en una señal de blanco mucho más baja que la presentada por las AuNPs (Figura 50c), que en esta ocasión si es claramente distinguible de la señal obtenida para la muestra dopada con PSA (Figura 50d). Además, puesto que el tipo de inmunoensayo seleccionado fue un tipo sándwich, el número de nanoestructuras obtenido en la muestra dopada con PSA fue claramente superior al del blanco.

Finalmente, para demostrar la amplificación incontrolada de Au sobre las AuNPs en contraposición a la ocurrida sobre QDs de Mn-ZnS, se tomaron imágenes a lo largo de todo el pocillo, a fin de determinar si este comportamiento era puntual. Las imágenes tomadas de distintas zonas de los pocillos de AuNPs y QDs de Mn-ZnS se recogen en la Figura 52.

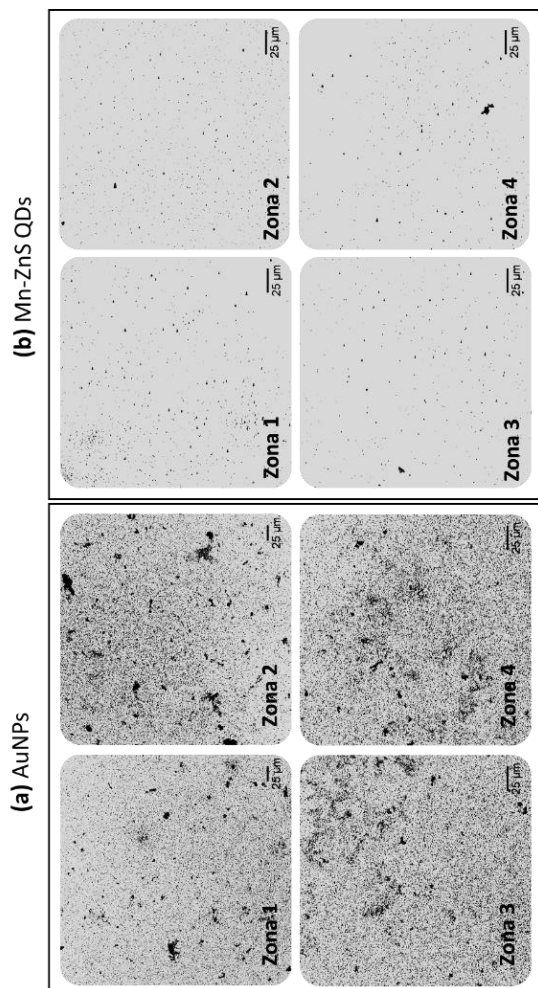


Figura 52. Imágenes de microscopía confocal de pequeñas áreas de los pocillos ($230 \times 230 \mu\text{m}^2$) obtenidas después del inmunoensayo completo seguido de la deposición catalítica de Au para muestras con un contenido de PSA de 10 pg mL^{-1} . Las imágenes se tomaron en distintas zonas del mismo pocillo de los dos tipos de semillas estudiadas: a) AuNPs y b) QDs de Mn-ZnS.

A raíz de las imágenes anteriores, se pudo determinar que la heterogeneidad mostrada por la amplificación de Au sobre las AuNPs se mantenía a lo largo de todo el pocillo, mostrando agregados de partículas de gran tamaño así como una dispersión de tamaños elevada. Por el contrario, las imágenes tomadas de distintas zonas del pocillo de los QDs, mostraron una homogeneidad de la amplificación de Au y una dispersión de tamaños pequeña, como ya se había determinado con el histograma de distribución de tamaños.

4.2.1. Evaluación de la amplificación incontrolada y adsorciones inespecíficas

Dada la amplificación incontrolada observada cuando se emplean AuNPs como semillas catalíticas han de evaluarse una serie de factores a fin de mejorar dicha amplificación heterogénea. En primer lugar, se evaluó la posibilidad de que las micropartículas se formasen de manera espontánea sobre el pocillo simplemente con la mezcla de los precursores (NaAuCl_4 e hidroxilamina), incluso en ausencia de las semillas catalíticas. Para comprobarlo, se llevó a cabo el mismo inmunoensayo tipo sándwich, incluida la amplificación metálica, pero en este caso utilizando un anticuerpo específico contra PSA sin marcaje alguno. De forma análoga al experimento anterior, se evaluaron dos concentraciones distintas de PSA (0 y 5 ng mL^{-1}). Como resultado, no se obtuvo ninguna señal en las imágenes de reflexión tomadas con el microscopio confocal. Lo cual indica que no se producía la formación de micropartículas de oro en ausencia de semillas catalíticas. Dicho resultado, era de esperar, indicaba que el crecimiento incontrolado de oro sobre AuNPs era debido al tipo de semillas catalíticas y a no a las condiciones de amplificación.

El segundo factor a tener en cuenta son las adsorciones inespecíficas, típicas en el desarrollo de inmunoensayos basados en NPs. Estas adsorciones inespecíficas podrían explicar la enorme diferencia en la amplificación observada cuando se utilizan las AuNPs como semillas catalíticas en lugar de los QDs. Con objetivo de minimizar las adsorciones inespecíficas, se evaluó el empleo de dos agentes de bloqueo, BSA y caseína (muy empleados en inmunoensayos). Se llevó a cabo el mismo inmunoensayo tipo sándwich para detección de PSA, utilizando las mismas dos concentraciones de nuevo, con la correspondiente etapa de amplificación. Puesto que el objetivo de este ensayo era el estudio de la disminución de las adsorciones inespecíficas asociadas a la NP empleada como semilla catalítica, se añadió la sonda marcada con ambas NPs (Ab:NPs). Además, se probaron los dos agentes de bloqueo seleccionados: BSA 3% y caseína 1%. Una vez realizado el inmunoensayo completo y la

Capítulo 3

correspondiente amplificación metálica, se procedió a su detección en el mismo portaobjetos donde se llevó a cabo el ensayo mediante microscopía confocal de reflexión. Las imágenes obtenidas como resultado para ambos tipos de agentes de bloqueo se recogen en la Figura 53.

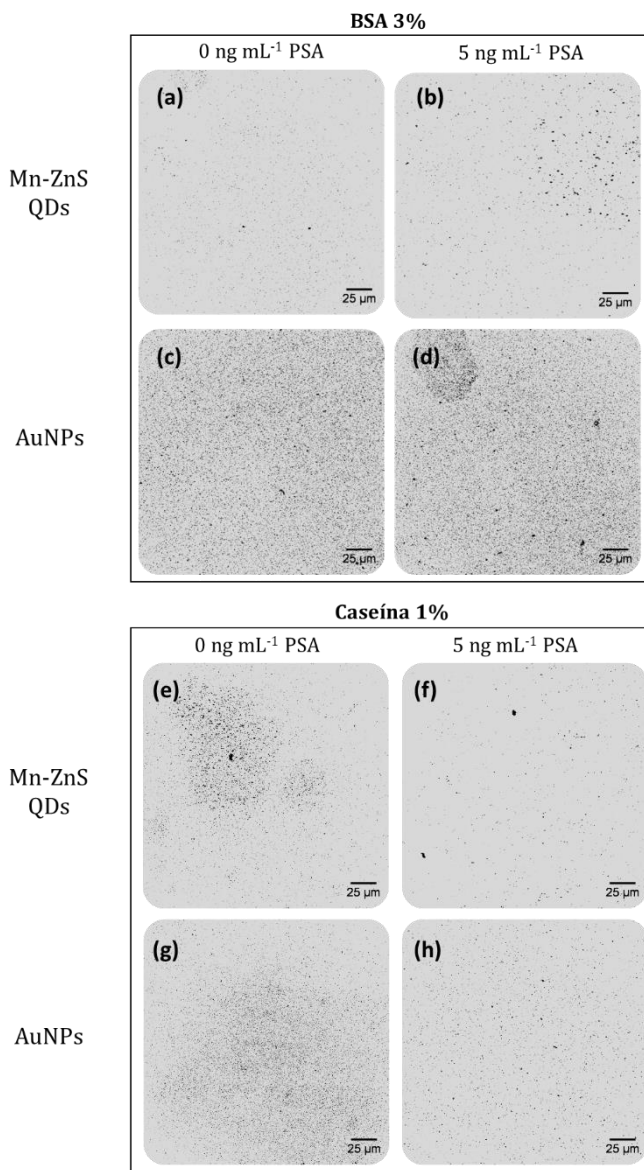


Figura 53. Imágenes de microscopía confocal de pequeñas áreas de los pocillos (230 x 230 μm²) obtenidas después del inmunoensayo completo seguido de la deposición catalítica de Au con distintas concentraciones de PSA y agentes de bloqueo.

De nuevo se formaron estructuras amplificadas en todas las condiciones ensayadas, sin embargo, a simple vista se puede distinguir un comportamiento diferencial entre ambos agentes de bloqueo y el tipo de semilla catalítica. En el caso de los QDs de Mn-ZnS, el empleo de BSA 3% como bloqueante, proporcionó una menor cantidad de estructuras amplificadas en el pocillo correspondiente al blanco (Figura 53a), además de un aumento en el número de partículas para la muestra dopada con PSA (Figura 53b), Por el contrario, el número de NPs observado para el bloqueo con caseína 1% es superior (Figura 53e), dificultando la discriminación de la muestra dopada (Figura 53f) con respecto al blanco. En el caso de las AuNPs, se observó un comportamiento muy similar entre los dos agentes de bloqueo, una mayor señal de fondos (en el pocillo de blanco) cuando se utiliza caseína 1% como bloqueante (Figura 53g y h), mientras que la señal del blanco disminuía con el uso de BSA 3% (Figura 53). Sin embargo, seguían existiendo una enorme cantidad de adsorciones inespecíficas que hacían muy complicado distinguir la señal de la muestra dopada con la obtenida para el blanco (Figura 53c y d).

Dada la imposibilidad de reducir las adsorciones inespecíficas asociadas a la AuNPs, y por tanto, la amplificación incontrolada y heterogénea de oro sobre su superficie, se seleccionaron los QDs de Mn-ZnS como semillas catalíticas, continuando con ellos durante los estudios de optimización para la cuantificación de PSA.

4.3. Optimización del proceso de amplificación de las nanoestructuras

Un parámetro clave en el procedimiento es el proceso de amplificación de tamaño que sufren las NPs como resultado de la deposición de oro. Por tanto, para conseguir una mayor sensibilidad y un proceso de cuantificación reproducible, fue necesario optimizar las variables relacionadas con el proceso de amplificación. Dentro de estas variables, la más importante, es la concentración de los reactivos utilizada durante el proceso de amplificación.

Con este objetivo, se llevó a cabo el mismo inmunonesayo tipo sándwich descrito (ver Figura 43), en este caso únicamente con los QDs de Mn-ZnS, con dos concentraciones de PSA (0 y 10 pg mL⁻¹). Se comenzó con el estudio de la variación de la concentración de hidroxilamina, manteniendo constante la concentración de la sal de Au (III), 0,5 mM. Se ensayaron 5 concentraciones de hidroxilamina desde 1 hasta 15 mM, basándose en estudios previos del proceso de amplificación en disolución.¹⁷ Por otro lado, se optimizó la concentración de la sal de Au, manteniendo constante la concentración de hidroxilamina en 5 mM, En este caso, se varió la concentración de NaAuCl₄ desde 0,1 hasta 1 mM. De nuevo, los resultados de la optimización se determinaron mediante microscopía confocal a través de la medida de la luz reflejada por la superficie de las partículas formadas durante el proceso de amplificación. Se tomaron imágenes de dos zonas de cada uno de los pocillos, que se utilizaron para el posterior procesado. En las Figura 54y Figura 55 se recogen las imágenes tomadas en los pocillos correspondientes para la optimización de la concentración de hidroxilamina y la del oro, respectivamente.

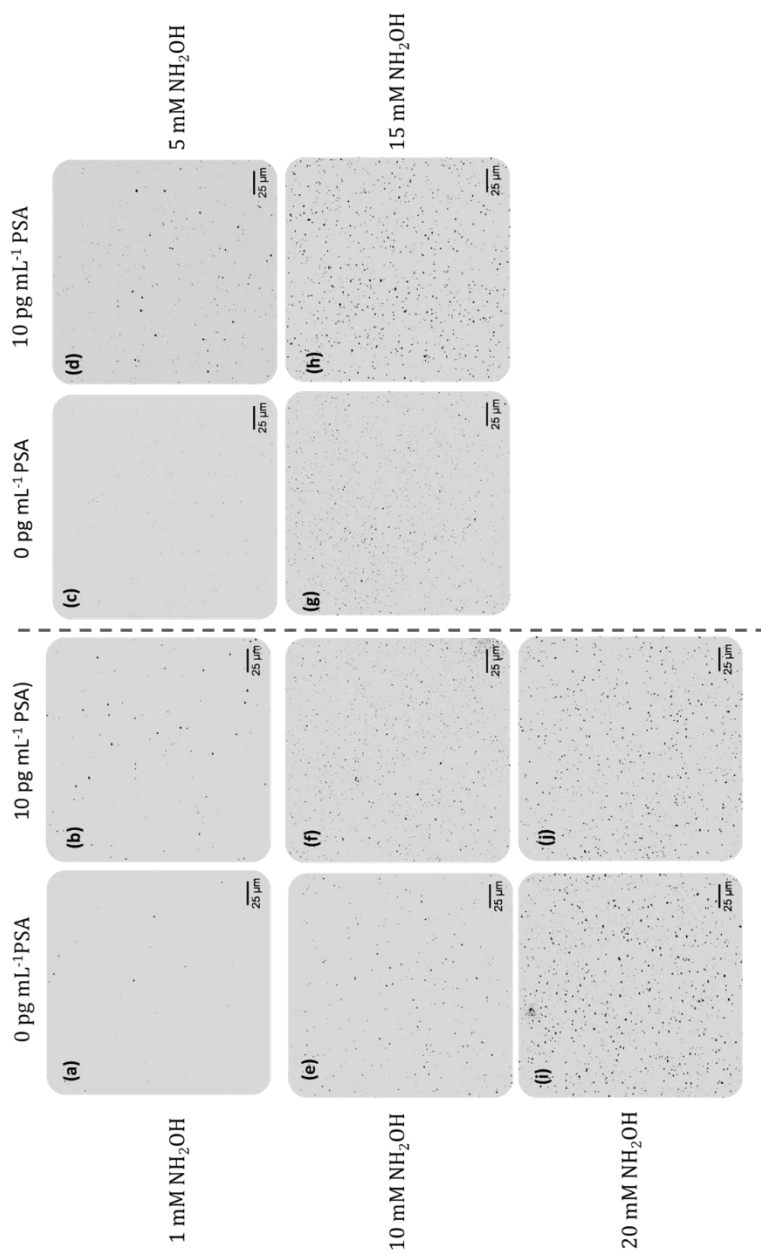


Figura 54. Imágenes de microscopía confocal de pequeñas áreas de los pocillos (230 x 230 μm²) obtenidas después del inmunoensayo completo seguido de la deposición catalítica de Au con dos concentraciones de PSA, variando la concentración de hidroxilamina durante el proceso de amplificación con una concentración constante de NaAuCl₄ de 0,5 mM.

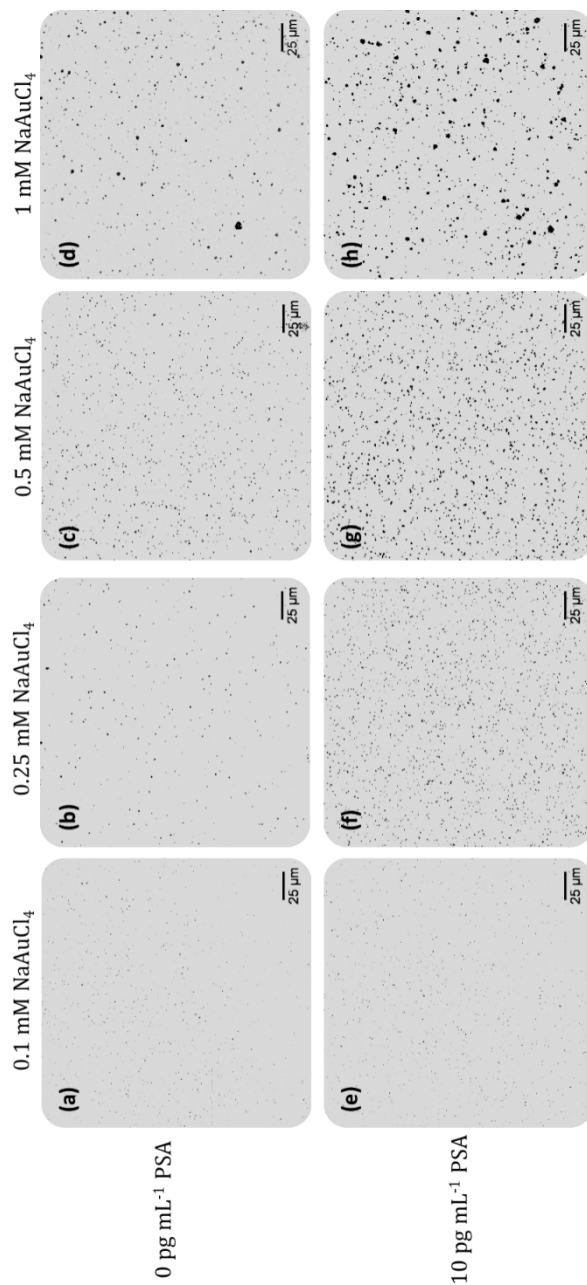


Figura 55. Imágenes de microscopía confocal de pequeñas áreas de los pocillos ($230 \times 230 \mu\text{m}^2$) obtenidas después del inmunoensayo completo seguido de la deposición catalítica de Au con dos concentraciones de PSA, variando la concentración de NaAuCl_4 durante el proceso de amplificación con una concentración constante de hidroxilamina de 5 mM.

Los resultados mostraron que con el aumento de la concentración de cualquiera de los precursores, aumentaba también el número de partículas amplificadas en los pocillos. Si bien es cierto que este aumento no ocurría solo en el pocillo que contenía la muestra dopada de PSA, sino que ocurría también en los pocillos correspondientes al blanco (0 PSA). Para facilitar la visualización de los datos obtenidos en cada pocillo, las imágenes recogidas en las Figura 54 y Figura 55, se trataron siguiendo el procedimiento descrito en el apartado experimental, utilizando el software Image J Confocal Uniovi. De este procesado de imágenes se obtuvo el número de NPs contenidas en cada uno de los pocillos. En la Figura 56, se muestra el contaje obtenido para cada una de las condiciones en la disolución de blanco (barras blancas) y en la muestra dopada con PSA (barras grises). Además, se pudo cuantificar la señal de la muestra con respecto a la del blanco, representada como los puntos rojos en la misma figura (S/B), para cada una de las condiciones ensayadas.

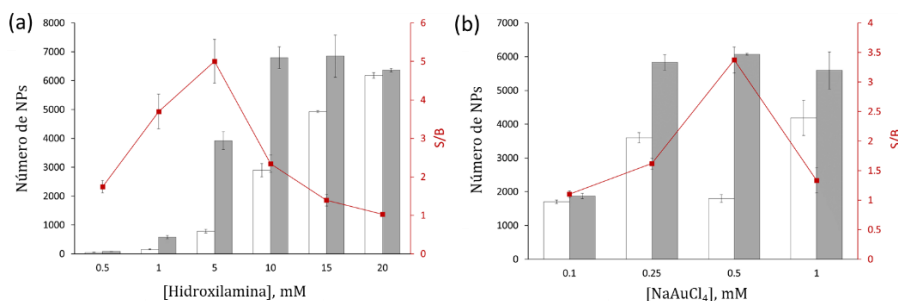


Figura 56. Número de estructuras de Au amplificadas sobre la superficie de los QDs de Mn.ZnS medidas tras el desarrollo del inmunoensayo para la detección de PSA en dos concentraciones: 0 (barras blancas) y 10 pg mL⁻¹(barras grises), utilizando diferentes condiciones de amplificación: a) variando la concentración de Hidroxilamina y b) variando la concentración de NaAuCl₄. La relación entre la señal de la muestra dopada y la señal del blanco se encuentra también representada (puntos rojos). Las barras de error corresponden a 1SD.

De los resultados anteriores, se pudo determinar que con el uso de las concentraciones más elevadas, tanto para hidroxilamina como para la sal de Au, la amplificación aumentaba llegando a un punto donde la señal del blanco era prácticamente igual a la de la muestra dopada. Este hecho se puede ver claramente en la S/B calculada para cada una de las condiciones (ver Figura 56a

y b). De esta forma, tomando la relación S/B como parámetro crítico se seleccionaron las concentraciones de 5 mM para hidroxilamina y 0,5 mM para NaAuCl₄, para continuar con la optimización.

A continuación, se evaluó la influencia del tiempo de amplificación sobre la el número de partículas amplificadas. Se utilizaron tiempos de amplificación de 10, 15, 20 y 30 minutos tras el desarrollo del inmunoensayo completo, con las condiciones de hidroxilamina y sal de oro optimizadas previamente, utilizando de nuevo dos concentraciones de PSA: una disolución de blanco y una muestra dopada. Las imágenes obtenidas se recogen a continuación, en la Figura 57.

De nuevo se observa un aumento de la señal obtenida con el tiempo de amplificación utilizado. Sin embargo, como cabía esperar, el aumento de la señal se produce tanto en la señal del blanco como en el de la muestra dopada.

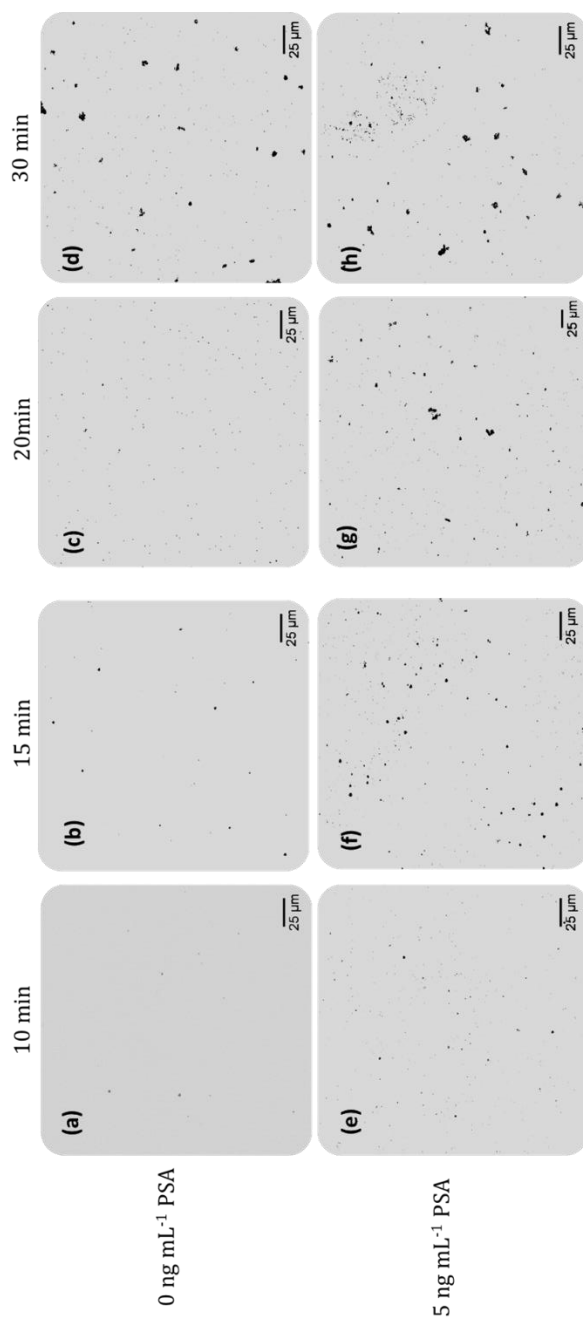


Figura 57. Imágenes de microscopía confocal de pequeñas áreas de los pocillos (230 x 230 μm²) obtenidas después del inmunoensayo completo seguido de la deposición catalítica de Au, variando el tiempo de amplificación.

Análogamente a la optimización anterior, se calculó el número de partículas en cada pocillo, siguiendo el protocolo descrito en el procedimiento experimental del presente Capítulo, procesando las imágenes obtenidas en cada una de las zonas delimitadas de cada pocillo. Como resultado se obtuvo una gráfica muy similar a la anterior, recogida en la Figura 58.

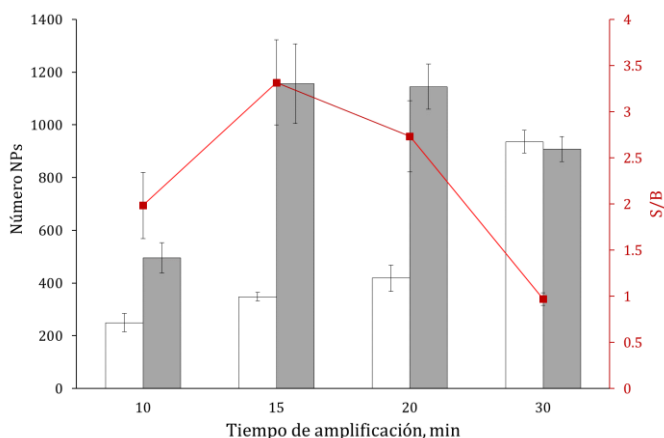


Figura 58. Número de estructuras de Au amplificadas sobre la superficie de los QDs de Mn.ZnS medidas tras el desarrollo del inmunonesayo para la detección de PSA en dos concentraciones: 0 (barras blancas) y 10 pg mL^{-1} (barras grises), utilizando diferentes tiempos de amplificación. La relación entre la señal de la muestra dopada y la señal del blanco se encuentra también representada (puntos rojos). Las barras de error corresponden a 1SD.

Esta Figura demostró como el aumento del tiempo conllevaba un aumento en la señal obtenida tanto en el blanco como en la muestra dopada con PSA, llegando a ser estas dos muestras indistinguibles con un tiempo de amplificación de 30 minutos. A la vista de los resultados y tomando de nuevo del valor de S/B como referencia, se seleccionó un tiempo de 15 minutos como tiempo de amplificación.

4.4. Desarrollo del inmunoensayo para la detección de PSA mediante deposición catalítica de Au y Microscopía Confocal

Una vez se han optimizado las variables correspondientes al proceso de amplificación, se procedió con la investigación de las características analíticas del inmunoensayo desarrollado. Para ello, se llevó a cabo el inmunoensayo completo para la detección de PSA utilizando los QDs de Mn-ZnS como semillas catalíticas para la deposición de Au en las condiciones óptimas, siguiendo el protocolo recogido en la Figura 43. Se utilizaron concentraciones crecientes de PSA (desde 0,01 hasta 100 pg mL⁻¹) preparadas en 10 mM PBSA pH 7,4, para la construcción de la curva de respuesta. Tras el procedimiento del inmunoensayo y su correspondiente amplificación catalítica, los pocillos se analizaron en el mismo portaobjetos en el que se llevó a cabo el inmunosensor, mediante microscopía confocal en modo reflexión. Debido a las limitaciones del número de pocillos (que vienen dados por la pegatina utilizada sobre el portaobjetos), no se pudieron realizar réplicas de los puntos del calibrado. No obstante, se tomaron imágenes de dos zonas delimitadas del pocillo que se tomaron como réplicas del procedimiento.

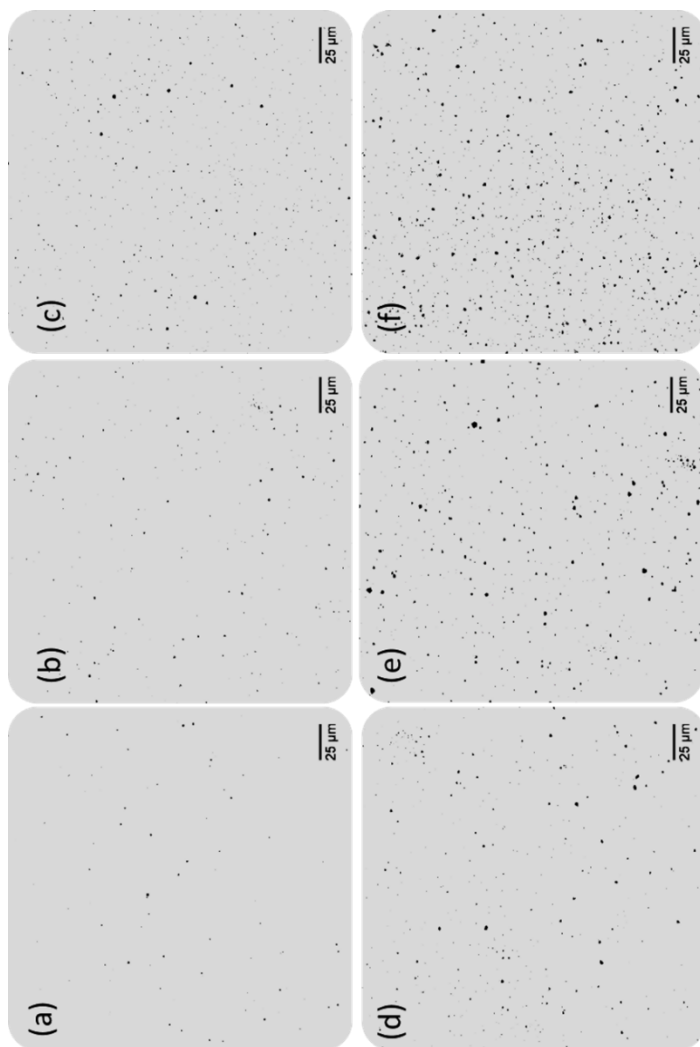


Figura 59. Imágenes de microscopía confocal de pequeñas áreas de los pocillos ($230 \times 230 \mu\text{m}^2$) obtenidas después del inmunoensayo completo con la correspondiente deposición catalítica de Au sobre la superficie de los QDs de Mn-ZnS con distintas concentraciones de PSA: a) 0 pg mL^{-1} , b) $0,01 \text{ pg mL}^{-1}$, c) $0,1 \text{ pg mL}^{-1}$, d) 1 pg mL^{-1} , e) 10 pg mL^{-1} y f) 100 pg mL^{-1} PSA.

La Figura 59, muestra las imágenes obtenidas de las partículas amplificadas para concentraciones crecientes de PSA. Como cabía esperar, el aumento de PSA conlleva un incremento en el número de partículas, puesto que el inmunoensayo utilizado es un tipo sándwich. Como ya se ha comentado, a fin de obtener un área representativa de los pocillos, se tomaron 8 imágenes de cada pocillo en

dos zonas delimitadas. Dichas imágenes se procesaron siguiendo el mismo protocolo utilizado hasta el momento (descrito en el apartado experimental). Por tanto, se calculó el número de partículas presentes en cada pocillo, pudiendo obtener la correspondiente curva de respuesta del inmunoensayo. La señal obtenida sigue una curva típica de respuesta de un inmunoensayo, con una parte lineal obtenida tras la aplicación de la escala logarítmica sobre el eje x (que contiene la concentración de PSA). Esta curva de respuesta se muestra en la Figura 60.

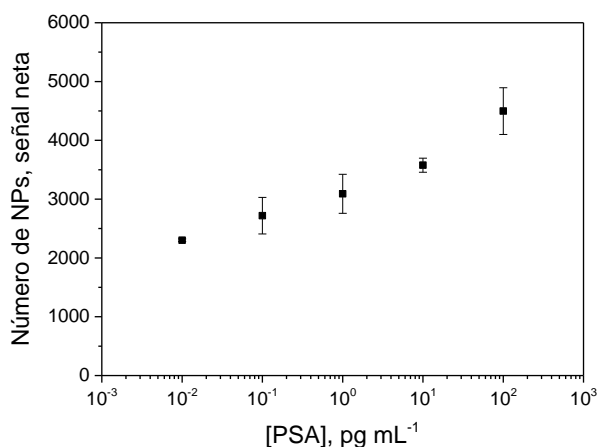


Figura 60. Curva de respuesta del inmunoensayo obtenida tras el procesado de imágenes de microscopía confocal de las estructuras de oro amplificadas con diferentes concentraciones de PSA, representada en escala logarítmica. Las barras de error corresponden a 1SD de las dos zonas delimitadas medidas en cada pocillo.

Basándose en la curva anterior y la señal obtenida para el blanco (con su correspondiente desviación estándar), se calculó el límite de detección (*Limit of detection*, LOD) para la cuantificación de PSA como la señal correspondiente a la señal del blanco más 3 veces su desviación estándar, resultando en un LOD de 1,1 fg mL⁻¹. Este excelente LOD demuestra que la metodología propuesta es útil para la cuantificación ultrasensible de PSA en muestras de interés biológico, como es el caso de la determinación de PSA en muestras de suero humano en hombres que se han sometido a un tratamiento quirúrgico de extirpación de la próstata (cuyos niveles de PSA se encuentra por debajo 0,1 ng mL⁻¹), No

obstante, este LOD es suficiente incluso para la determinación de PSA en muestras de suero de mujeres, cuyos niveles de PSA en sangre son mucho menores (1 pg mL^{-1}).

De hecho, el método propuesto es uno de los métodos más sensibles descritos hasta la fecha, para la cuantificación de PSA en muestras biológicas, con un amplio rango lineal, de cuatro órdenes de magnitud, basado en una simple estrategia de amplificación con detección en la misma superficie del inmunosensor. Existen numerosas estrategias de amplificación que presentan unos mejores límites de detección, pero estas requieren el empleo de técnicas con una mayor complejidad y de elevado precio,^{17,34} además de largos tiempos de análisis y la dificultad asociada a los procesos requeridos de amplificación de la señal.³⁵

Finalmente, para demostrar la aplicabilidad del método desarrollado para el análisis de PSA en una muestra real, se estudió la influencia de otra posible especie presente en la misma muestra sobre la señal obtenida. Dado que el propósito final de la metodología es la determinación de PSA es muestras que contienen una elevada cantidad de proteínas, se evaluó la cuantificación de PSA en un amuestra sintética, con PSA en dos concentraciones de 0 y 10 pg mL^{-1} en presencia de un elevado contenido de Albumina (BSA 1%). De nuevo, se llevó a cabo el inmunoensayo completo, pero esta vez añadiendo como muestras de PSA, las muestras sintetizadas con alto contenido en proteína dopadas con PSA. Una vez completado el inmunoensayo y la correspondiente amplificación por deposición catalítica de oro, se analizaron los pocillos mediante microscopía confocal, a fin de determinar si la presencia de una muestra con alto contenido proteico afectaba a la señal obtenida en el microscopio o al proceso de amplificación. Las imágenes obtenidas de dicho análisis se encuentran en la Figura 61.

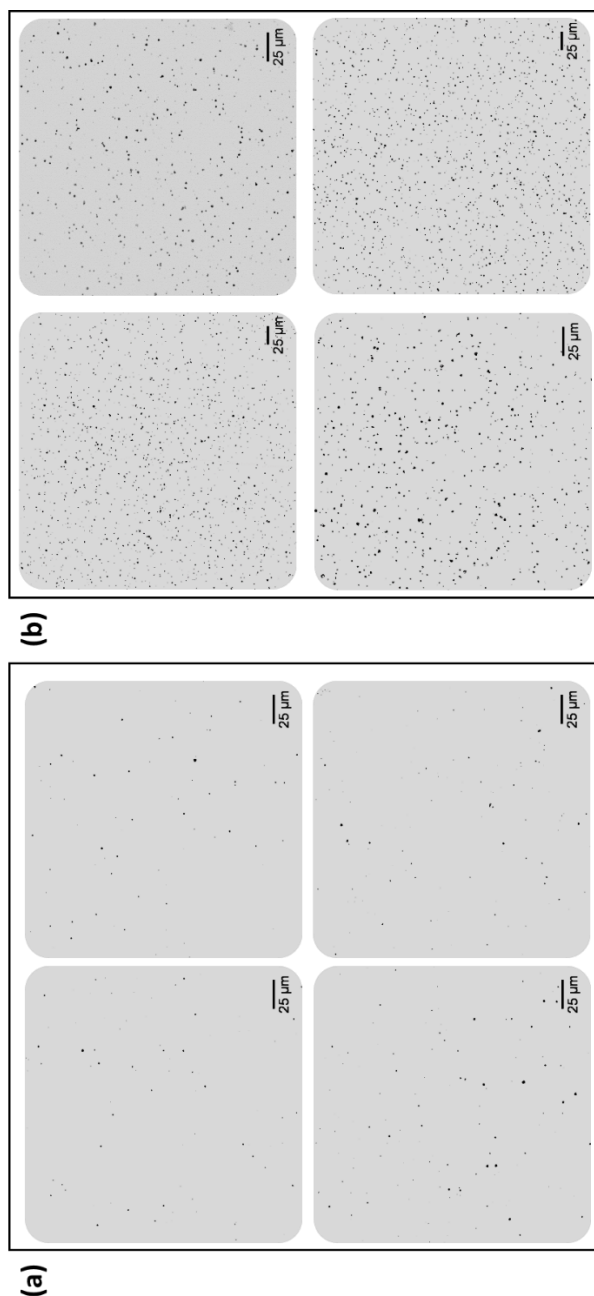


Figura 61. Imágenes de microscopía confocal de pequeñas áreas de los pocillos ($230 \times 230 \mu\text{m}^2$) obtenidas tras el inmunoensayo y la deposición catalítica de Au utilizando las condiciones óptimas para dos muestras de PSA: a) 0 pg mL^{-1} y b) 10 pg mL^{-1} , ambas en presencia de un elevado contenido de proteína (BSA 1%). Las imágenes se tomaron en diferentes zonas del pocillo.

La presencia de una proteína interferente en un elevado contenido (BSA 1%), no indujo ningún efecto de aumento o disminución de la señal obtenida en los pocillos. De hecho, cuando se llevó a cabo la cuantificación del número de partículas presentes en cada uno de los pocillo, y se determinó la cantidad de PSA con la correspondiente curva de respuesta, se obtuvo una concentración de $11,9 \pm 0,8 \text{ pg mL}^{-1}$ PSA, lo cual corresponde a una recuperación cuantitativa ($119 \pm 9\%$) de la cantidad de PSA añadida inicialmente sobre la muestra. Dichos resultados validan la metodología propuesta para la cuantificación de PSA y prueba su potencial aplicabilidad en muestras de interés biológico.

5. Conclusiones

Se ha desarrollado un inmunoensayo tipo sándwich para cuantificar el biomarcador proteico PSA con una sensibilidad extremadamente elevada tras una simple lectura de las muestras, sobre la misma superficie empleada para el inmunoensayo. Para obtener esta sensibilidad elevada, se recurrió a un proceso de amplificación del tamaño de las partículas empleadas como marcas durante el inmunoensayo (QDs de Mn-ZnS). Dicho aumento de tamaño se consiguió a través de la deposición catalítica de oro sobre la superficie de las mencionadas NPs, justo antes de su detección. Este aumento de tamaño permitió su detección mediante la recolección de la luz reflejada por la superficie de las mismas mediante microscopía confocal. La plataforma desarrollada se aplicó con éxito a la medida de PSA en niveles desde los pocos fg mL^{-1} hasta los ng mL^{-1} .

La excelente sensibilidad conseguida con el proceso de amplificación, junto con la elevada especificidad y robustez asociada a los inmunoensayos, podría permitir la detección sensible de muchos otros biomarcadores en análisis de rutina, basadas en la aplicación de un proceso simple de amplificación y una detección óptica rápida, con el único requisito de seleccionar un anticuerpo de captura y de reconocimiento apropiados.

Referencias bibliográficas

¹ Liu, R., Wu, P., Yang, L., Hou, X., Lv, Y. Inductively coupled plasma mass spectrometry-based immunoassay: A review. *Mass spectrometry reviews*, (2014), 33, 373-393.

² Pei, X., Zhang, B., Tang, J., Liu, B., Lai, W. Tang, D. Sandwich-type immunosensors and immunoassays exploiting nanostructure labels: A review. *Analytica chimica acta*, (2013), 758, 1-18.

³ Moro, L., Turemis, M., Marini, B., Ippodrino, R., Giardi, M. T. Better together: Strategies based on magnetic particles and quantum dots for improved biosensing. *Biotechnology advances*, (2017), 35, 51-63.

⁴ Tang, D., Cui, Y., Chen, G. Nanoparticle-based immunoassays in the biomedical field. *Analyst*, (2013), 138, 981-990.

⁵ Liu, R., Liu, X., Tang, Y., Wu, L., Hou, X., Lv, Y. Highly sensitive immunoassay based on immunogold- silver amplification and inductively coupled plasma mass spectrometric detection. *Analytical chemistry*, (2011) 83, 2330-2336.

⁶ Liu, B., Jiang, B., Zheng, Z., Liu, T. Semiconductor quantum dots in tumor research. *Journal of Luminescence*, (2019), 209, 61-68.

⁷ Negahdary, M., Sattarahmady, N., Heli, H. Advances in prostate specific antigen biosensors-impact of nanotechnology. *Clinica Chimica Acta*, (2020), 504, 43-55.

⁸ Perfézou, M., Turner, A., Merkoçi, A. Cancer detection using nanoparticle-based sensors. *Chemical Society Reviews*, (2012), 41, 2606-2622.

⁹ Yang, L., Zheng, J., Zou, Z., Cai, H., Qi, P., Qing, Z., .Yang, R. Human serum albumin as an intrinsic signal amplification amplifier for ultrasensitive assays of the prostate-specific antigen in human plasma. *Chemical Communications*, (2020), 56, 1843-1846.

¹⁰ Thaxton, C. S., Elghanian, R., Thomas, A. D., Stoeva, S. I., Lee, J. S., Smith, N. D. Mirkin, C. A. Nanoparticle-based bio-barcode assay redefines “undetectable” PSA and biochemical recurrence after radical prostatectomy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, (2009), 106, 18437-18442.

¹¹ Chang, Y. F., Hung, S. H., Lee, Y. J., Chen, R. C., Su, L. C., Lai, C. S., Chou, C. Discrimination of breast cancer by measuring prostate-specific antigen levels in women's serum. *Analytical chemistry*, (2011), 83, 5324-5328.

¹² Biswas, T., Datta, A., & Sen, P. (2011). Prostate-specific antigen in females: a new tool *Journal of Research in Medical Sciences.*, (2011), 16, 1257.

¹³ Liu, R., Zhang, Y., Zhang, S., Qiu, W., Gao, Y. Silver enhancement of gold nanoparticles for biosensing: from qualitative to quantitative. *Applied Spectroscopy Reviews*, (2014), 49, 121-138.

¹⁴ Fenzl, C., Hirsch, T., Baeumner, A. J. Nanomaterials as versatile tools for signal amplification in (bio) analytical applications. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, (2016), 79, 306-316.

¹⁵ Chou, L. Y., Fischer, H. C., Perrault, S. D., Chan, W. C. (2009). Visualizing quantum dots in biological samples using silver staining. *Analytical chemistry*, (2009), 81, 4560-4565.

¹⁶ Syed, A. M., Sindhvani, S., Wilhelm, S., Kingston, B. R., Lee, D. S., Gommerman, J. L., Chan, W. C. Three-dimensional imaging of transparent tissues via metal nanoparticle labeling. *Journal of the American Chemical Society*, (2017), 139, 9961-9971.

¹⁷ Garcia-Cortes, M., Ruiz Encinar, J. Costa-Fernandez, J. M., Sanz-Medel, A. Highly sensitive nanoparticle-based immunoassays with elemental detection: Application to Prostate-Specific Antigen quantification. *Biosensors and Bioelectronics*, (2016), 85, 128-134.

¹⁸ Hu, J., Deng, D., Liu, R., Lv, Y. Single nanoparticle analysis by ICPMS: a potential tool for bioassay. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, (2018), 33, 57-67.

¹⁹ Sindhvani, S., Syed, A. M., Wilhelm, S., Chan, W. C. Exploring passive clearing for 3D optical imaging of nanoparticles in intact tissues. *Bioconjugate chemistry*, (2017), 28, 253-259.

²⁰ Liu, Z., Hu, C., Li, S., Zhang, W., Guo, Z. Rapid intracellular growth of gold nanostructures assisted by functionalized graphene oxide and its application for surface-enhanced Raman spectroscopy. *Analytical chemistry*, (2012), 84, 10338-10344.

²¹ Pawley, J. (Ed.). (2006). *Handbook of biological confocal microscopy* (Vol. 236). Springer Science & Business Media.

²² Nwaneshiudu, A., Kuschal, C., Sakamoto, F. H., Anderson, R. R., Schwarzenberger, K., Young, R. C. Introduction to confocal microscopy. *Journal of Investigative Dermatology*, (2010), 132, 1-5.

²³ Paddock, S. Confocal reflection microscopy: the other confocal mode. *Biotechniques*, (2002), 32, 274-278.

²⁴ Garcia-Cortes, M., Sotelo González, E., Fernández-Argüelles, M. T., Ruiz Encinar, J. Costa-Fernández, J. M., Sanz-Medel, A. Capping of Mn-doped ZnS quantum dots with DHLA for their stabilization in aqueous media: determination of the nanoparticle number concentration and surface ligand density. *Langmuir*, (2017), 33, 6333-6341.

²⁵ Clapp, A. R., Goldman, E. R., Mattoussi, H. Capping of CdSe–ZnS quantum dots with DHLA and subsequent conjugation with proteins. *Nature protocols*, (2006), 1, 1258-1266.

²⁶ Frens, G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions. *Nature physical science*, (1973), 241, 20-22.

²⁷ Hermanson G. T. (2013) *Bioconjugate Techniques* Ed. Academic Press

²⁸ Paul, N., Metwalli, E., Yao, Y., Schwartzkopf, M., Yu, S., Roth, S. V., .Paul, A. Templating growth of gold nanostructures with a CdSe quantum dot array. *Nanoscale*, (2015), 7, 9703-9714.

²⁹ Sotelo-Gonzalez, E., Roces, L., Garcia-Granda, S., Fernandez-Arguelles, M. T., Costa-Fernandez, J. M. Sanz-Medel, A. Influence of Mn²⁺ concentration on Mn 2+-doped ZnS quantum dot synthesis: evaluation of the structural and photoluminescent properties. *Nanoscale*, (2013), 5, 9156-9161.

³⁰ Liu, X., Atwater, M., Wang, J., Huo, Q. Extinction coefficient of gold nanoparticles with different sizes and different capping ligands. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, (2007), 58, 3-7.

³¹ Danscher, G., Stoltenberg, M. Silver enhancement of quantum dots resulting from (1) metabolism of toxic metals in animals and humans,(2) in vivo, in vitro and immersion created zinc–sulphur/zinc–selenium nanocrystals,(3) metal ions liberated from metal implants and particles. *Progress in histochemistry and cytochemistry*, (2006), 41, 57-139.

³² Kim, D., Daniel, W. L., Mirkin, C. A. Microarray-based multiplexed scanometric immunoassay for protein cancer markers using gold nanoparticle probes. *Analytical chemistry*, (2009), 81, 9183-9187.

³³ Weizmann, Y., Patolsky, F. Willner, I. Amplified detection of DNA and analysis of single-base mismatches by the catalyzed deposition of gold on Au-nanoparticles. *Analyst*, (2001), 126, 1502-1504.

³⁴ Ma, W., Yin, H., Xu, L., Wu, X., Kuang, H., Wang, L., Xu, C. Ultrasensitive aptamer-based SERS detection of PSAs by heterogeneous satellite nanoassemblies. *Chemical communications*, (2014), 50, 9737-9740.

³⁵ Zhu, Y., Wang, H., Wang, L., Zhu, J., Jiang, W. Cascade signal amplification based on copper nanoparticle-reported rolling circle amplification for ultrasensitive electrochemical detection of the prostate cancer biomarker. *ACS Applied Materials & Interfaces*, (2016), 8, 2573-2581.

**CAPÍTULO 4: Evaluación de los efectos
citotóxicos y determinación
cuantitativa de la incorporación celular
nanopartículas de Seleniuro de
Mercurio (HgSe NPs) en líneas
celulares humanas.**

1. Introducción

Como se ha mencionado en la Introducción General de la presente Tesis, las NPs pueden ser consideradas en sí mismas marcadores de contaminación ambiental. El crecimiento exponencial de la nanotecnología, ha dado lugar al desarrollo de nuevos nanomateriales con excelentes propiedades optoelectrónicas, lo que ha derivado en el empleo de dichos NMs en una gran variedad de productos de uso diario. No es de extrañar, por tanto, el aumento de la acumulación de NPs en el medioambiente. Por todo ello, el estudio del comportamiento de las NPs en los sistemas biológicos, sus interacciones con otras biomoléculas del medio y su posible toxicidad, supone hoy en día una línea de investigación en auge de un gran interés. En contraposición a las NPs de origen antropogénico, algunas NPs formadas en la naturaleza muestran una actividad favorable para los organismos vivos, como en el transporte de biomoléculas o como productos del metabolismo de detoxificación de ciertos metales, este último es el caso particular de los efectos tóxicos del Hg.

1.1. Importancia de la determinación de especies de Hg

El Hg es un reconocido contaminante medioambiental e industrial, capaz de inducir importantes efectos tóxicos en los tejidos biológicos tanto para humanos como animales, dependiendo de la forma química en la que este se encuentre. El Hg se encuentra principalmente formando parte de tres formas químicas: elemental, como sal inorgánica, o unido a moléculas orgánicas.¹ La toxicidad del Hg, así como su migración, biodisponibilidad y transformación está relacionada con la forma en la que este se encuentre en el medioambiente.²

Las distintas especies de Hg son capaces de penetrar en la membrana celular, de manera que este se ha introducido en la cadena alimentaria de diversos organismos acuáticos.³ El consumo de pescados contaminados es hoy en día un grave riesgo para la salud humana, de hecho se han documentado los efectos tóxicos asociados a una elevada exposición de los organismos vivos a MeHg.^{4,5} En este sentido, en las últimas décadas se han desarrollado numerosas

estrategias de especiación de las distintas especies de Hg con el objetivo de determinar la movilidad, toxicidad y metabolismo del Hg.

1.2. Antagonismo Se-Hg.

Dentro de todos los avances llevados a cabo en la comprensión del metabolismo del Hg, una de los posibles mecanismos de detoxificación más extendido está asociado al efecto protector que ejerce el Se sobre la toxicidad de las especies de Hg. Este efecto antagónico entre el Hg y Se se ha estudiado ampliamente durante las últimas décadas y se han llevado a cabo numerosos estudios que demuestran que diferentes especies de Se disminuyen los efectos tóxicos de Hg tanto en organismos vivos como en cultivos celulares.⁶⁷⁸ Hoy en día se conoce que la acumulación de Hg en tejidos está en numerosas ocasiones acompañada por la acumulación de Se en una relación molar 1:1 (ref). Sin embargo, el mecanismo de detoxificación en el que se estos se ven envueltos no se ha esclarecido todavía.

Algunos autores han postulado la formación de partículas de HgSe como último metabolito en el proceso de detoxificación del Hg.⁹¹⁰¹¹ De hecho, se han encontrado minerales de HgSe y nanopartículas de Seleniuro de Mercurio (HgSe NPs) en tejidos de ballenas,¹² grandes mamíferos acuáticos¹³ e, incluso, en cerebro humano.¹⁴ En este sentido, Gajdosechova *et al.*¹⁵ han demostrado el papel que juega el Se biodisponible en el proceso de detoxificación del MeHg. En estos estudios los autores describen la formación de NPs de HgSe durante proceso de detoxificación del MeHg en ballenas, hallando dichas NPs en tejidos de hígado y cerebro.

Sin embargo, la información de la que se dispone hasta la fecha sobre la formación *in vivo* de HgSe NPs, su metabolismo y su toxicidad, es todavía preliminar debido en gran medida a la falta de patrones apropiados que puedan ser empleados en estudios de exposición tanto *in vivo* o *in vitro*. Por tanto, para obtener un conocimiento más profundo sobre el mecanismo de detoxificación de las especies de Hg, se requiere del uso de nanopartículas solubles en medios acuosos que permitan iniciar estudios de viabilidad celular.

1.3. Citotoxicidad inducida por NPs.

Como se ha comentado previamente, es necesario llevar a cabo estudios rigurosos sobre la posible citotoxicidad inducida por NPs, para regular los posibles efectos tóxicos de las nuevas NPs sintetizadas artificialmente, así como para asegurar su aplicabilidad.¹⁶ En este sentido, los estudios de citotoxicidad de NPs suelen llevarse a cabo en cultivos celulares (*in vitro*) debido en gran medida a la facilidad de ejecución que estos suponen frente a los estudios *in vivo*.¹⁷ Para llevar a cabo estos estudios se necesitan patrones de NPs adecuados, solubles en medio acuoso y estables en medios biológicos. Se han desarrollado numerosos estudios de citotoxicidad basados en el uso tanto de NPs comerciales como sintetizadas en los propios laboratorios, entre otras destacan las NPs de Au, Fe, Ag y Ti. Sin embargo, la falta de patrones de NPs de HgSe estables, biocompatibles y caracterizados de forma apropiada, no permitía el estudio en mayor profundidad del mecanismo de detoxificación de Hg propuesto, basado en la formación de NPs de HgSe. En este sentido, en el grupo de investigación se ha llevado a cabo con éxito la síntesis, estabilización en medio acuoso y la caracterización de NPs de HgSe recubiertas con ácido dihidrolipoico (DHLLA)¹⁸, cuyo empleo en estudios de citotoxicidad podría suplir la falta de patrones estándar en este campo y ayudar a esclarecer uno de los posibles procesos de eliminación del Hg.

Por tanto, una vez se poseen los patrones adecuados, los estudios de citotoxicidad en cultivos celulares son extremadamente importantes como evaluación preliminar de la toxicidad inducida por NPs en organismos vivos. Existen numerosas estrategias a fin de determinar la viabilidad celular tras la exposición de cultivos a NPs. Una de las más empleadas se basa en la determinación de la actividad metabólica de las células, a través de la medida de un indicador sensible como es el ensayo MTT ¹⁹, que se explicará a continuación en el apartado de procedimientos.

Sin embargo, existen otros aspectos además de la viabilidad celular a tener en cuenta en la evaluación de la toxicidad inducida por NPs como son la

determinación de la cantidad incorporada y su localización en el interior celular. De entre todas las técnicas utilizadas para la determinación de la incorporación de NPs en células, destaca la espectroscopia de fluorescencia puesto que permite, haciendo uso de las propiedades luminiscentes de las NPs, determinar la localización de las NPs en el interior celular. No obstante, cuando se requiere información cuantitativa sobre la cantidad de NPs interiorizada en las células es necesario acudir a otro tipo de técnicas debido a que a la elevada fluorescencia basal presente en medios biológicos que dificulta las tareas de cuantificación. Con este objetivo, técnicas como la espectrometría de masas elemental (ICP-MS) se han empleado para llevar a cabo la determinación cuantitativa de las NPs y los iones liberados de la superficie de las mismas. De hecho, esta técnica ha demostrado ser capaz de aportar información cuantitativa exacta y sensible de la internalización de diferentes tipos de NPs en líneas celulares como por ejemplo CdSe-ZnS QDs²⁰²¹, CdTe QDs²², TiO₂ NPs, AgNPs²³ o AuNPs²⁴ tanto en estudios *in vivo* como en *in vitro*.

2. Objetivos

Debido a la enorme importancia del estudio de los posibles efectos tóxicos de las distintas especies de Hg, así como a la necesidad de comprensión de los distintos mecanismos de detoxificación propuestos hasta el momento para el ciclo de dichas especies, el objetivo principal de este capítulo de la Tesis Doctoral es la evaluación de los efectos citotóxicos de nanopartículas de HgSe en dos líneas celulares humanas, HeLa y HEK 293.

En primer lugar, se ha llevado a cabo la síntesis, solubilización en medio acuoso y la correspondiente caracterización de unas HgSe NPs recubiertas con ácido dihidrolipoico (Dihydrolipoic Acid, DHLA). La citotoxicidad inducida por estas nanopartículas (que han sido propuestas como último producto en el mecanismo de detoxificación de Hg en organismos vivos) se comparan con la citotoxicidad inducida por dos especies tóxicas de Hg ampliamente descritas en bibliografía, como son el Hg inorgánico (Hg^{2+}) y Hg orgánico (metilmercurio, MeHg^+). Con este objetivo, se estudiarán diferentes concentraciones de Hg así como tiempos de exposición de las células a los distintos tóxicos de Hg. Por otro lado, se evaluará el efecto protector del Se frente a la toxicidad inducida por el Hg, exponiendo las células de forma simultánea a ambas especies, utilizando como precursor de Se el selenito (SeO_3^{2-}), cuyo efecto protector frente al Hg ha sido descrito previamente.

Por último, se determinará de manera cuantitativa la incorporación del Hg en ambas líneas celulares tras su exposición a las diferentes especies de Hg (Hg inorgánico, Hg orgánico y Hg nanoparticulado). De esta manera, se podrá evaluar si los potenciales efectos tóxicos de las especies de Hg observados se deben a una mayor o menor incorporación de dicha especie por parte de las células.

3. Experimental y reactivos

3.1. Instrumentación

La síntesis de HgSe NPs se llevó a cabo utilizando una sonda de ultrasonidos de alta potencia VibraCell VC250 de la empresa Sonics & Materials. Para la caracterización exhaustiva de las nanopartículas sintetizadas se obtuvieron imágenes mediante un microscopio electrónico de transmisión de alta resolución (HR-TEM) JEM-2100F de la empresa JEOL provisto de una rejilla de cobre. Dicho Microscopio estaba equipado con un espectrómetro de difracción de rayos X (*Energy dispersive X-ray spectrometer*, EDX) lo que permitió el análisis del contenido elemental de las nanopartículas. Las medidas de difracción de rayos X (X-ray difracción, XRD) se llevaron a cabo empleando el difractorómetro X'Pert Pro (PANalytical). Se empleó también para la caracterización el equipo de (*X-ray photoelectron spectroscopy*, XPS) Phoibos 100 hemispherical analyzer con un detector MCD-5 de la casa comercial SPECS.

Las medidas de absorbancia se obtuvieron en un espectrofotómetro UV/Vis Genesys 10S Spectrophotometer de la casa comercial Thermo Scientific. Los espectros de fluorescencia se llevaron a cabo en el equipo LS-45 Luminescence Spectrometer de la empresa Perkin Elmer fijando la longitud de onda de excitación un 415 nm utilizando unas rendijas de excitación y emisión de 10 nm. Todas las medidas de absorbancia y luminiscencia se llevaron a cabo en cubetas de cuarzo convencionales.

Las medidas elementales para la caracterización de las HgSe NPs y para los estudios de incorporación de las distintas especies de Hg se realizaron en un Espectrómetro de masas de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS/MS) de tipo triple cuadrupolo, 8900 ICP-MS/MS de la empresa Agilent. Adicionalmente, se utiliza para la digestión de las especies de Hg se utilizó un baño de ultrasonidos JP Selecta, para mejorar la digestión ácida de las muestras.

3.2. Procedimientos

3.2.1. Síntesis y solubilización de Nanopartículas de Seleniuro de Mercurio (HgSe NPs)

La síntesis de las HgSe NPs se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Bouzas-Ramos *et al.*¹⁸, que se encuentra resumido en la Figura 62. Para ello se emplearon como precursores Se en polvo y acetato de Hg ($\text{Hg}(\text{OAc})_2$). Se disolvieron 5 mmol de polvo de Se en 50 mL de hidróxido sódico (NaOH) 5M. La mezcla resultante se irradió con ultrasonidos utilizando una sonda de ultrasonidos durante 30 minutos con una potencia de 80 W cm^{-3} , mientras que se añade lentamente una cantidad equimolar de Hg^{2+} disuelto en 0.1 M de AEDT. Tras la adición del Hg, se continúa con la irradiación de ultrasonidos durante 3 horas más. Trascurrido el tiempo de irradiación, la suspensión resultante se centrifugó obteniendo un precipitado negro que se lavó siguiendo la secuencia siguiente: 0.1 M AEDT, agua y, por último, etanol absoluto. El polvo insoluble obtenido se secó en un vial abierto al aire.

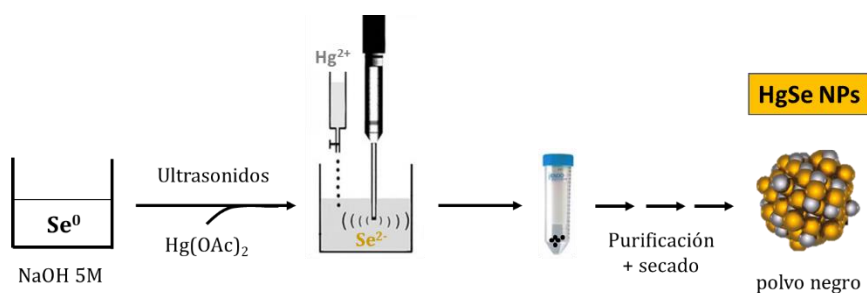


Figura 62. Esquema del proceso de síntesis de las NPs de HgSe insolubles.

Finalmente, el polvo insoluble de NPs de HgSe se transfiere a un medio acuoso a través de la dispersión de dichas NPs en ácido dihidrolipoico (DHLA). De esta forma, las nanopartículas se recubren de moléculas de DHLA que le proporcionan estabilidad en medio acuoso. Para esto, se añade 1mL de DHLA sobre 50 mg de polvo seco de NPs de HgSe. La dispersión se calienta a 80°C durante horas con agitación. Trascurrido ese tiempo, la mezcla se deja a temperatura ambiente continuando con la agitación durante toda la noche. A

continuación, se añaden sobre la suspensión 5mL de metanol anhidro y un exceso de tert-butóxido potásico a fin de desprotonar los grupos carboxilo del DHLA.²⁵ El precipitado obtenido se sedimenta mediante centrifugación y las HgSe NPs recubiertas con DHLA se transfieren a medio acuoso. Por último, se lleva a cabo una etapa adicional de purificación para eliminar el exceso de reactivos, empleando para ello unos filtros de centrífuga con un tamaño de poro de 100 kDa.

3.2.2. Cultivos celulares

Las líneas celulares de HeLa (células de carcinoma cervical) y HEK 293 (células embrionarias de riñón) empleadas a lo largo de la investigación se obtuvieron de *American Culture Colection* (ATCC, EEUU). Las células fueron cultivadas en un medio de cultivo Dubelco,s Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS), 2 mM de L-glutamina , 10 mM de HEPES y una mezcla de antibióticos, que contiene 100 U/mL de penicilina, 10 µg/mL de estreptomina y 0.25 µg/mL de anfotericina B, y se utilizó un buffer salino de fosfato (Dubelco's buffer Phosphate saline) para los lavados. Las células se incubaron en una estufa con una temperatura controlada de 37°C y atmósfera de 5% de CO₂. El medio celular se cambió cada dos días.

3.2.3. Estudio de incorporación de las NPs de HgSe en células humanas mediante Microscopía Confocal

Para comprobar la incorporación de las HgSe NPs sintetizadas y estabilizadas en medio acuoso se emplea un Microscopio Confocal Leica TCS-SP5. De esta forma, haciendo uso de las propiedades luminiscentes de las HgSe NPs, se puede visualizar la distribución de las NPs en el interior de las células estudiadas (HeLa y HEK 293). Para ello las células se siembran en una placa estéril de 6 pocillos. A continuación se incuban con 2 mL de las nanopartículas de HgSe con una concentración final de 20 µM de Hg en medio de cultivo (DMEM). Tras la incubación celular con las NPs durante 24 horas, las células de lavan con PBS e, inmediatamente, son fijadas con una disolución de

folmaldehído al 4% en PBS. Las células se lavan de nuevo con PBS. Se toman imágenes de fluorescencia mediante Microscopía Confocal empleando un láser con una longitud de onda de excitación de 405 nm. Para el tratamiento de las correspondientes imágenes se utiliza el programa image J.

3.2.4. Estudio de liberación de Hg²⁺ de la superficie de HgSe NPs

Para el estudio de la posible liberación de iones Hg²⁺ de la superficie de las HgSe NPs en las condiciones de incubación celular, se añade sobre el medio de cultivo (empleado para el crecimiento celular y los estudios de viabilidad) una disolución de las HgSe NPs con una concentración final de Hg de 100 µM. Se evalúa la posible liberación de iones de Hg²⁺ utilizando diferentes tiempos de incubación (0, 2, 4, 8, 24 y 48 h) cada uno de ellos por triplicado. Para la incubación se emplean las mismas condiciones de incubación a las que se someten las células para su crecimiento (37 °C y 5% de CO₂). Tras el tiempo de incubación, las suspensiones resultantes se centrifugan a 13000 rpm durante 10 min a fin de separar el precipitado de las HgSe NPs, de los iones de Hg²⁺ liberados de la superficie de las NPs que se encuentran en el sobrenadante. La cuantificación del Hg que se encuentra en ambas fases (NPs e iones de Hg²⁺) se llevó a cabo empleando espectrometría de masas elemental tras la digestión ácida de cada una de las muestras. Para esto, se transfieren las muestras a tubos de centrífuga y se añaden 250 µL de agua regia para la completa digestión de las NPs. Dicha digestión se acelera mediante la inmersión de los tubos de digestión en un baño de ultrasonidos durante 30 min. Finalmente, las digestiones fueron diluidas con HNO₃ 1% antes de su determinación. La concentración total de Hg se determinó mediante calibración externa.

3.2.5. Estudios de viabilidad celular de las diferentes especies de Hg

Se determina la viabilidad celular en ambas líneas celulares (HEK 293 y HeLa) tras la exposición de las células a los 3 tóxicos de Hg: HgSe NPs, Hg²⁺ y

Capítulo 4

MeHg⁺. Para ello, se emplea un ensayo MTT de proliferación celular por la empresa Bioquochem.²⁶ Este ensayo se basa en la evaluación de la actividad metabólica celular, debido a la capacidad de las enzimas oxidorreductasas presentes en las células vivas, de reducir la sal de tetrazolio MTT, bromuro de 3-(4,5-simetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, a un insoluble formazan. Dicha reducción de la sal de tetrazolio a formazan, recogida en la Figura 63, se determina colorimétricamente gracias al cambio de color producido durante la reacción, de amarillo a morado. Por tanto, la actividad metabólica celular, o lo que es lo mismo la viabilidad celular, se determina a través de la medida de absorbancia a 570 nm.

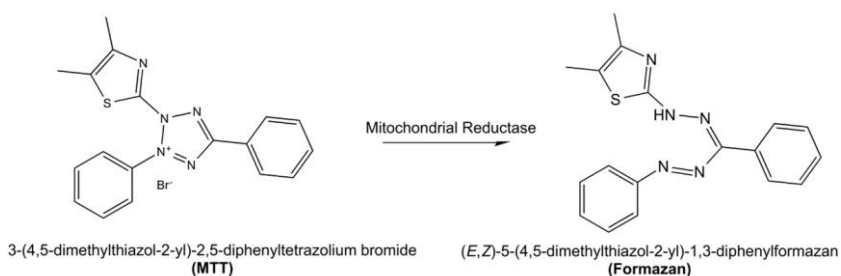


Figura 63. Reducción de la sal de tetrazolio (amarillo) a formazan (azul) en presencia de enzimas reductasas mitocondriales.

Para la determinación de la posible toxicidad de los compuestos de Hg ensayados en líneas celulares de HeLa y HEK 293, se siembran 20.000 células/mL en una placa ELISA de 96 pocillos. Estas se dejan crecer durante toda la noche a 37°C en una atmósfera controlada de 5% de CO₂. Posteriormente, ambas líneas celulares se incuban con las diferentes especies de Hg, utilizando en cada pocillo distintas concentraciones de Hg (0, 1, 5, 10, 50 y 100 μM) durante dos tiempos de incubación, 24 y 48 h. Cada una de las distintas condiciones de incubación estudiadas se realiza por triplicado.

Adicionalmente, se evalúa el posible efecto protector del Se sobre la toxicidad del Hg a través de la incubación simultánea de ambas líneas celulares con Hg y Se. Con este fin se incuban las células con una combinación de Hg²⁺ y MeHg⁺ en los mismos niveles de concentración empleados en el estudio previo, añadiendo en este caso Se en forma de selenito a dos niveles de concentración

distintos (5 y 50 μM). Análogamente al estudio de viabilidad celular, las células se incuban a 37°C en una atmósfera de 5% de CO_2 durante 24 h. Cada una de las distintas condiciones de incubación estudiadas se realiza por triplicado.

Finalmente, tras los distintos tiempos de incubación se añade el reactivo MTT en cada uno de los pocillos y se incuba durante 4 h en las mismas condiciones de atmósfera y temperatura. Transcurrido ese tiempo, las células se lisan, tras la adición de correspondiente buffer de lisado y su incubación durante 1 h en oscuridad. Finalmente, se mide la absorbancia de cada uno de los pocillos a 570 nm utilizando para ello un lector de microplacas Cary 50-MPR (Agilent).

3.2.6. Evaluación cuantitativa de la incorporación celular de Hg

Finalmente, se determina de forma cuantitativa la cantidad de Hg incorporado por las dos líneas celulares estudiadas, en función de la especie de Hg empleada para la incubación (HgSe NPs, Hg y MeHg) a la que estas son expuestas. De forma análoga al estudio de viabilidad celular, se siembran 20.000 células/mL en una placa de 96 pocillos durante toda la noche a 37°C en una atmósfera controlada de 5% CO_2 . Transcurrido ese tiempo, las células se exponen a las diferentes especies de Hg utilizando una concentración final de Hg de 1 μM durante 24 h. Una vez se ha cumplido el tiempo de exposición, el medio celular de cada uno de los pocillos se transfiere a viales para su posterior digestión, mientras que las células adheridas al fondo de los correspondientes pocillos, se lavan con PBS 10 mM pH 7.4 un total de tres veces. Cada uno de los lavados es recogido y guardado para su digestión.

Posteriormente, se procede a la determinación de la cantidad de Hg total incorporada en la células, así como la cantidad de Hg que no se ha incorporado. Para ello, se digieren con agua regia tanto las células adheridas en los pocillos, como el medio de cultivo que se encontraba en cada pocillo con sus correspondientes lavados. De esta manera, se puede determinar el Hg incorporado por parte de las células a través de la medida del Hg presente en

las digestiones celulares, y el Hg no incorporado mediante la determinación en las digestiones del medio de cultivo y los lavados con PBS 10 mM. Además de las correspondientes medidas de Hg en las distintas incubaciones, se utiliza como blanco el medio de cultivo eliminado en los pocillos de las células control, es decir, las células que no habían recibido ningún tratamiento con los tóxicos de Hg.

4. Resultados y Discusión

4.1. Síntesis y caracterización de las NPs de HgSe

En primer lugar, se llevó a cabo la síntesis y caracterización exhaustiva de las NPs de HgSe. Dado que el objetivo principal de este capítulo es el empleo de estas nanopartículas como patrones analíticos en estudios de viabilidad celular, es un requisito indispensable que dichas nanopartículas sean estables en medio acuoso para su correcta internalización en las células. Como se ha comentado en el apartado experimental 3.2.1 de este Capítulo, la síntesis de nanopartículas de HgSe asistida por ultrasonidos, tiene como resultado un polvo de NPs de HgSe insoluble. Por este motivo, se recurre al recubrimiento de la superficie de las mismas con ácido dihidrolipoico (DHLA). Cabe resaltar que la síntesis de las NPs de HgSe se llevó a cabo empleando una relación 1:1 de Hg:Se,¹⁸ puesto que numerosos estudios han demostrado que la acumulación de Hg en organismos vivos se encuentra en la mayoría de los casos acompañada de una cantidad equimolar de Se.^{8,27}

Antes de proceder con el estudio de incorporación celular de las NPs de HgSe, es necesario llevar a cabo una caracterización exhaustiva de las mismas. En primer lugar, se determinó su morfología y tamaño mediante microscopía electrónica de transmisión HR-TEM. Como se puede ver en la Figura 64, las NPs de HgSe estabilizadas con DHLA obtenidas consisten en una nanopartículas casi esféricas con un tamaño medio de 23 ± 2 nm. En la misma Figura, se recoge un histograma de la distribución de tamaños producida durante la síntesis.

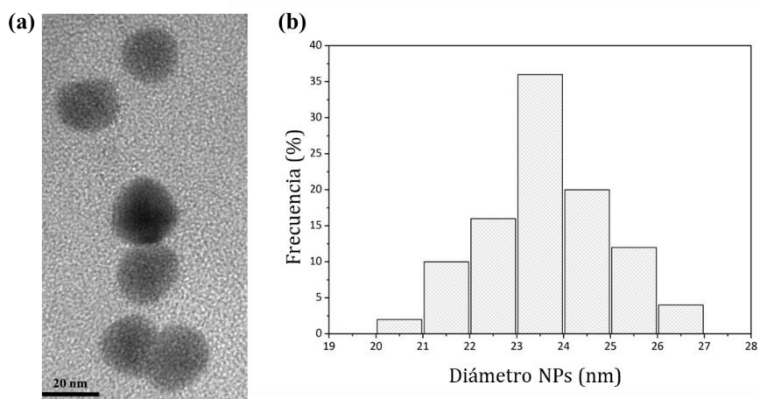


Figura 64. A) Imagen de las NPs de HgSe recubiertas con DHLA obtenidas mediante HR-TEM. b) Histograma de la distribución de tamaños obtenida.

Adicionalmente, las NPs de HgSe resultantes exhiben una intensa fluorescencia con una emisión centrada en 575 nm. Los espectros de emisión y excitación de las NPs de HgSe se recogen a continuación en la Figura 65.

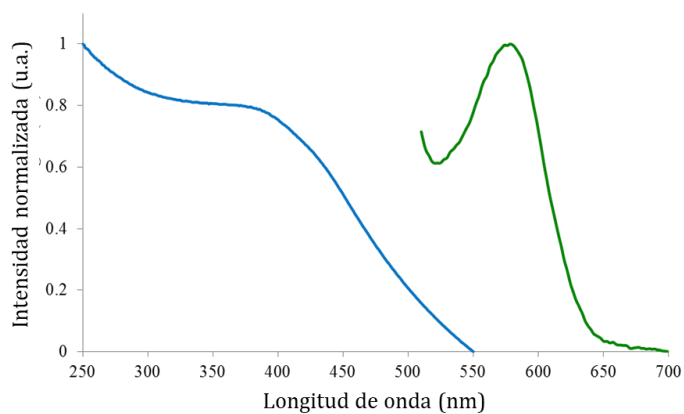


Figura 65. Espectro de emisión de las NPs de HgSe recubiertas con DHLA (línea verde) y espectro de absorción de las NPs (línea azul).

4.2. Localización intracelular de las NPs de HgSe

Como se ha comentado a lo largo de la introducción del presente Capítulo, la formación *in vivo* de nanopartículas de HgSe se ha postulado como último producto del metabolismo de detoxificación de las especies tóxicas de Hg. De hecho, estas nanopartículas se han hallado en tejidos de hígado y cerebro de

grandes mamíferos acuáticos como ballenas piloto o calderones Sin embargo, el conocimiento sobre la formación, metabolismo y distribución de estas nanopartículas en organismos vivos está todavía en desarrollo. Existe una ingente necesidad de desarrollar patrones de NPs de HgSe estables en medio acuoso, para su empleo como estándares en estudios de citotoxicidad.

Una vez se ha llevado a cabo con éxito la síntesis y estabilización de las nanopartículas de HgSe en medio acuoso, así como su apropiada caracterización,¹⁸ antes de su utilización en estudios de citotoxicidad, es necesario demostrar la capacidad de estas NPs de atravesar la membrana celular y, por tanto, entrar en las células. Con este objetivo, se seleccionaron dos líneas celulares humanas extensamente utilizadas en estudios de citotoxicidad:²⁸ una línea celular de tumoral (HeLa) y una línea celular de tejido sano (HEK 293). La selección de estos tipos de líneas celulares permite evaluar el posible comportamiento diferencial en la incorporación de los tóxicos debido a su diferente naturaleza.

La internalización de las NPs de HgSe estabilizadas con DHLA por parte de las células se determinó mediante la adquisición de las correspondientes imágenes de microscopía confocal de fluorescencia, haciendo uso de las propiedades luminiscentes de las NPs previamente descritas. Dichas imágenes se adquieren empleando una fuente de luz láser a 405 nm como longitud de onda de excitación. Además, se pudo determinar la localización intracelular de estas NPs en ambas líneas celulares tras la incubación de las mismas con las NPs durante 24 h con un nivel de concentración de Hg de 20 μ M.

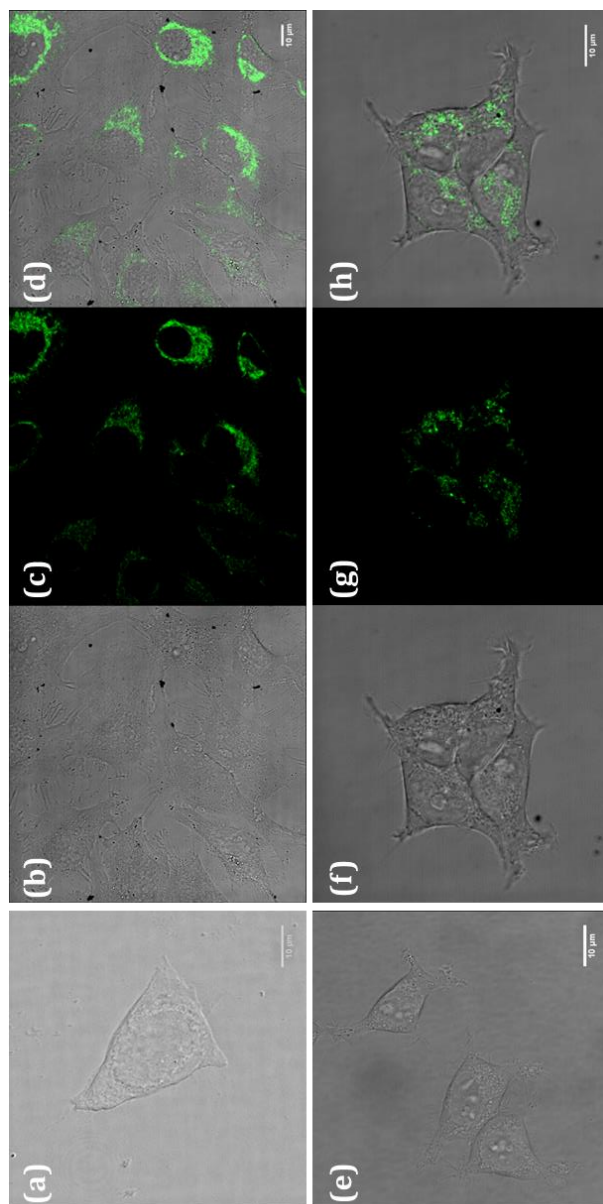


Figura 66. Imágenes de campo abierto de las células control (a) HeLa y (b) HEK 293, que no fueron expuestas a las NPs de HgSe e imágenes de microscopía confocal de fluorescencia de las células (b-d) HeLa y (f-h) HEK 293 tras su exposición durante 24 horas a las NPs de HgSe estabilizadas en medio acuoso. Las imágenes de la distribución celular de las NPs se tomaron bajo campo abierto (b, f), las imágenes de fluorescencia se tomaron a una longitud de onda de excitación de 405 nm (c, g) y la mezcla de las imágenes correspondientes al campo abierto y a la fluorescencia (d, h). La escala corresponde a 10 μm .

Como se puede observar en la Figura 66, se obtiene una emisión fluorescente muy intensa en el interior de las células, lo cual confirma la capacidad de las NPs de HgSe recubiertas con DHLA de atravesar las membranas celulares en las condiciones estudiadas. De hecho, gracias a la intensa fluorescencia de las NPs, se puede determinar que las NPs tienden a acumularse en el citosol, sin penetrar en los núcleos celulares. Además, estas imágenes recogidas en la Figura 66 parecen indicar una acumulación preferente en los lisosomas y otros orgánulos. Por otro lado, las imágenes de las células control, es decir, aquellas a las que no se han incubado con las NPs, no muestran ningún tipo de emisión fluorescente, tal y como se puede ver fácilmente en las Fig XX y xx, para Hela y HEK 293, respectivamente. Por tanto, se puede concluir que la emisión fluorescente observada en las células tratadas con las NPs de HgSe, se debe únicamente a la presencia de dichas NPs.

Finalmente, la intensa fluorescencia obtenida tras la exposición de las células a las NPs, parece indicar que, a pesar de las condiciones de incubación empleadas, la presencia de electrolitos o la elevada fuerza iónica derivada del uso de medio de cultivo, no se produce ninguna degradación en las NPs debida al entorno. Este hecho es de vital importancia de cara a los estudios de citotoxicidad, puesto que la liberación de iones de la superficie de las nanopartículas podría tener terribles consecuencias en la viabilidad celular. Sin embargo, se requieren estudios más exhaustivos que permitan asegurar la estabilidad de las NPs en las condiciones de incubación.

4.3. Estudio de liberación de Hg²⁺ de la superficie de las NPs de HgSe en medio de cultivo

El mantenimiento de la fluorescencia de las NPs durante el proceso de incubación observado mediante microscopía de fluorescencia confocal, parece indicar que las NPs permanecen estables en las condiciones de exposición. Sin embargo, ha de considerarse la posibilidad de que se produzca una posible degradación de las mismas, debido a procesos de fotooxidación o interacciones superficiales con componentes presentes en el medio, que puede desencadenar

la liberación de iones de su superficie.²⁹ Dichos iones Hg^{2+} liberados podrían inducir efectos tóxicos en las líneas celulares. Por este motivo, con el fin de llevar a cabo un estudio apropiado de la citotoxicidad de las NPs de HgSe , es necesario asegurar que los posibles efectos tóxicos inducidos por las NPs no son debidos a la liberación de iones tóxicos de su superficie durante el proceso de exposición.³⁰ Con este objetivo, se evaluó la posible liberación de iones Hg^{2+} de la superficie de las NPs, a través de la determinación elemental de Hg tras su incubación en las mismas condiciones de exposición en las que se llevan a cabo los estudios de citotoxicidad (medio de cultivo DMEM, 37°C y atmósfera controlada de 5% de CO_2). Se estudiaron distintos tiempo de incubación (0, 2, 4, 8, 24 y 48 horas) con una concentración final de $100 \mu\text{M}$ Hg.

Para ello, una vez transcurridos los distintos tiempos de incubación, la cantidad de Hg liberado se determinó a través de la medida de ICP-MS/MS del Hg presente en el medio de cultivo tras la centrifugación de las suspensiones. A su vez, el Hg que continúa en forma de NPs, se determinó en el precipitado obtenido en la centrifugación. Los resultados obtenidos para la determinación de Hg en el precipitado, es decir el Hg que permanece en forma de NPs, se encuentra recogidos en la Figura 67.

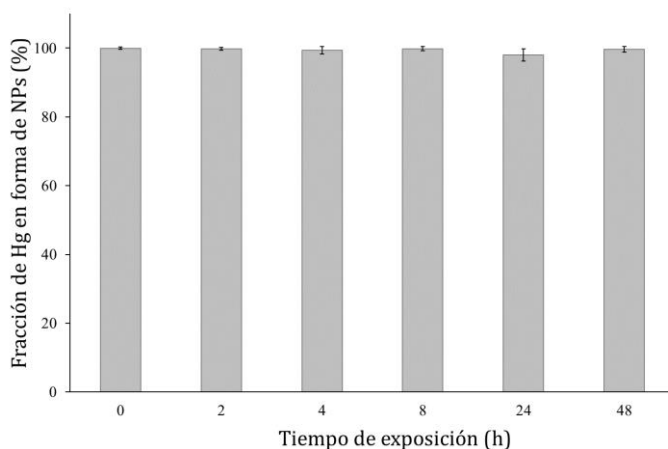


Figura 67. Fracción de Hg correspondiente a las NPs de HgSe obtenido tras la incubación de las NPs durante diferentes tiempos de incubación en medio de cultivo (DMEM). Las barras de error corresponden a un nivel de confianza de 95% (2 veces la desviación estándar, 2SD, $n = 3$ réplicas).

Como se puede observar en la Figura anterior, el porcentaje de Hg que se encuentra presente en forma de NPs de HgSe tras su incubación en medio de cultivo y en las condiciones de exposición celular, para todos los tiempos de incubación estudiados, es cuantitativo y estadísticamente indistinguible entre las distintas condiciones. Estos resultados sugieren que no hay una liberación significativa de iones de Hg bajo las condiciones de exposición celular, incluso para los tiempos de exposición más largos de 24 y 48 horas. Estos resultados, en conjunto con los obtenidos mediante microscopía confocal de fluorescencia, confirman la estabilidad de las NPs de HgSe sintetizadas en el medio de cultivo y las condiciones de incubación empleadas para los estudios de citotoxicidad. Por tanto, cualquier efecto tóxico inducido por las nanopartículas se puede atribuir únicamente a la presencia de las NPs.

4.4. Estudio de citotoxicidad de las distintas especies de Hg

Una vez que se ha demostrado que las nanopartículas son capaces de penetrar en el interior de las células y que se produce una liberación de iones Hg se la superficie de NPs en las condiciones de incubación, se procede a la medida de la actividad metabólica celular por medio de un ensayo MTT,²⁶ con el objetivo de determinar una toxicidad eventual inducida por las NPs de HgSe. Asimismo, se comparó la viabilidad celular de ambas líneas (HeLa y HEK 293), cuando estas son expuestas a las mismas concentraciones de Hg formando parte de dos especies distintas: Hg inorgánico (Hg^{2+}) y el metilmercurio (MeHg^+). Con este propósito, ambas líneas celulares se exponen durante 24 y 48 h a los tres tóxicos de Hg en evaluación: NPs de HgSe, Hg^{2+} y MeHg^+ . Es importante resaltar, que en medios biológicos tanto el Hg y el MeHg se encuentran normalmente unidos a biomoléculas por medio de enlaces tiol. Sin embargo, los precursores de Hg empleados en el presente estudio son sales de los correspondiente tóxicos de Hg y MeHg. En este sentido, es importante mencionar que todas las disoluciones empleadas para el estudio de viabilidad celular fueron preparadas en medio de cultivo (DMEM) en presencia de un 10% de suero fetal bovino

(FBS). Dicho FBS contiene proteínas, péptidos y aminoácidos con los que los compuestos de Hg podrían formar los enlaces tiol, por tanto, las conclusiones extraídas del estudio *in vitro*, podrían extrapolarse al comportamiento de los tóxicos en medios biológicos.

En primer lugar, se evaluó la toxicidad inducida por las tres especies de Hg en ambas líneas celulares tras 24 y 48 h de incubación utilizando diferentes concentraciones de Hg: 0, 1, 5, 10, 50 y 100 μM . Se recogen a continuación en la Fig XX, los resultados de viabilidad celular en porcentaje, obtenidos con el ensayo MTT para las células HeLa (Figura 68a) y HEK 293 (Figura 68b)

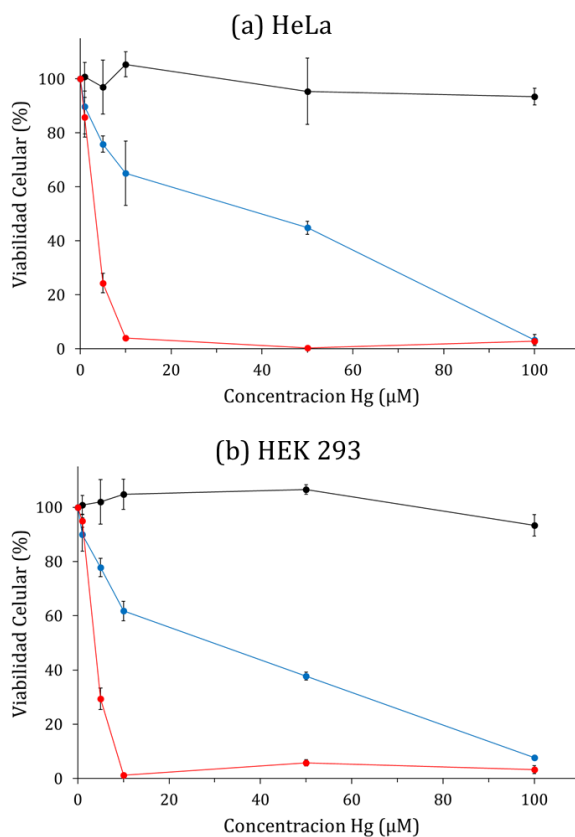


Figura 68. Valores de viabilidad celular (%) obtenidos para las células HeLa (a) y HEK 293 (b) tras su incubación a 37°C con atmósfera controlada de 5% CO₂ durante 24 h con MeHg⁺ (rojo), Hg²⁺ (azul) y las NPs de HgSe (negro) con diferentes concentraciones de Hg: 0, 1, 5, 10, 50 y 100 μM . El valor representado corresponde al valor de viabilidad celular promedio \pm la desviación estándar (SD) de n=3 réplicas.

Como se puede ver en la Figura anterior, las NPs de HgSe no producen un efecto remarcable en la viabilidad celular tras 24 h de incubación en ninguna de las líneas celulares humanas incluso para las concentraciones más elevadas estudiadas (50 y 100 μM). Al contrario de lo ocurrido durante la incubación de las NPs de HgSe, la viabilidad celular se ve altamente afectada cuando las células se exponen a Hg inorgánico (Hg^{2+}) o Hg orgánico (MeHg^+). Como se muestra en la Figura anterior, tanto para las células de tipo HeLa como para las células HEK 293, la viabilidad celular se reduce en un 50% tras su exposición a Hg^{2+} en concentraciones superiores a 50 μM . En el caso de las incubaciones con MeHg^+ , se observó una toxicidad todavía superior a la inducida por el Hg inorgánico. Puesto que con concentraciones inferiores de Hg (5 μM), la viabilidad celular se reduce drásticamente a valores por debajo del 50%, llegando incluso a una disminución de la viabilidad de un 90% para una concentración de 10 μM de Hg.

A continuación, se evaluó la toxicidad de las mismas especies de Hg durante un tiempo de incubación celular de 48 h, a fin de determinar un posible incremento de la toxicidad de las NPs de HgSe con un mayor tiempo de exposición. Los resultados de viabilidad celular obtenidos para ambas líneas celulares se recogen en la Figura 69.

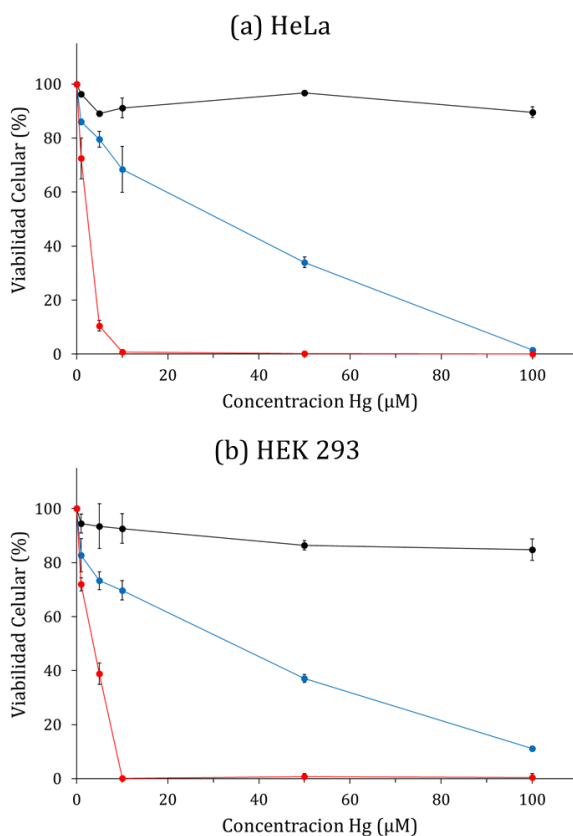


Figura 69. Valores de viabilidad celular (%) obtenidos para las células HeLa (a) y HEK 293 (b) tras su incubación a 37°C con atmósfera controlada de 5% CO₂ durante 48 h con MeHg⁺ (rojo), Hg²⁺ (azul) y las NPs de HgSe (negro) con diferentes concentraciones de Hg: 0, 1, 5, 10, 50 y 100 µM. El valor representado corresponde al valor de viabilidad celular promedio ± la desviación estándar (SD) de n=3 réplicas

Como se puede observar, el incremento en el tiempo de exposición de ambas líneas celulares a las NPs de HgSe, no produce un aumento en la toxicidad inducida por las mismas. Análogamente a los resultados obtenidos con un tiempo de exposición menos, de 24 horas, la viabilidad celular permanece inalterada incluso en las concentraciones de Hg más elevadas (50 y 100 µM). Por el contrario, cuando las células HEK 293 y HeLa fueron expuestas a Hg en forma orgánica e inorgánica, se observó de nuevo una disminución drástica en la viabilidad celular. Cabe resaltar, que los datos de viabilidad celular aquí expuestos para los estudios de incubación con NPs de HgSe, en contraposición a la disminución de dicha viabilidad cuando las células son expuestas a sus

correspondientes iones en disolución, fue observado previamente para nanopartículas de diferente naturaleza como es el caso de los iones Cd (II) y sus correspondientes NPs de CdSe-ZnS.²⁰ Los resultados obtenidos parecen indicar que la formación de especies nanoparticuladas de Hg puede ser considerado como uno de los posibles mecanismos de protección dentro del proceso de detoxificación de las especies de Hg.

A fin de obtener un mayor conocimiento de dichos mecanismos de detoxificación de las especies de Hg y el papel que desempeña el Se dentro de estos, ambas líneas celulares humanas se expusieron de forma simultánea a ambas especies. Con este estudio, se pretende evaluar si el mantenimiento de la viabilidad celular observado en ambas líneas tras su exposición a las NPs de HgSe, se debe a la presencia de Se en la estructura de dichas NPs. Para ello, ambas líneas celulares humanas (HEK 293 y HeLa) fueron expuestas a una mezcla de las especies tóxicas de Hg junto con selenito. Se evaluó la viabilidad celular de ambas líneas tras someterlas a los dos tóxicos de Hg, Hg^{2+} y MeHg^+ en las mismas concentraciones de Hg estudiadas previamente (1, 5, 10, 50 y 100 μM), pero añadiendo en este caso, en la misma disolución, selenito utilizando dos concentraciones, 5 y 50 μM .

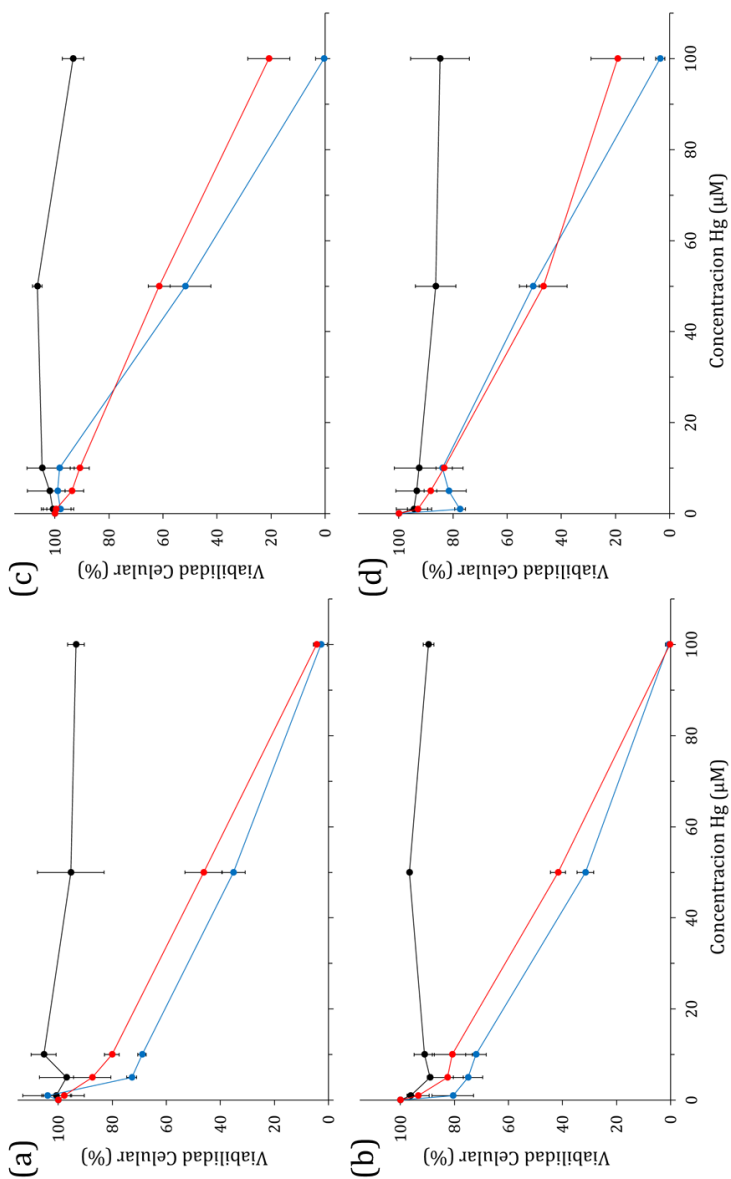


Figura 70. Valores de viabilidad celular (%) obtenidos para las células (a,b) HeLa y (c,d) HEK 293 tras su incubación a 37 °C y atmósfera controlada de 5% de CO₂ durante (a,c) 24 y (b,d) 48 h con NPs de HgSe (color negro), Hg²⁺ + 5 µM Selenito (color azul) y Hg²⁺ + 50 µM Selenito (color rojo) a diferentes concentraciones Hg: 1, 5, 10, 50 y 100 µM. Los datos mostrados corresponden a la media con su desviación estándar (n = 3 réplicas).

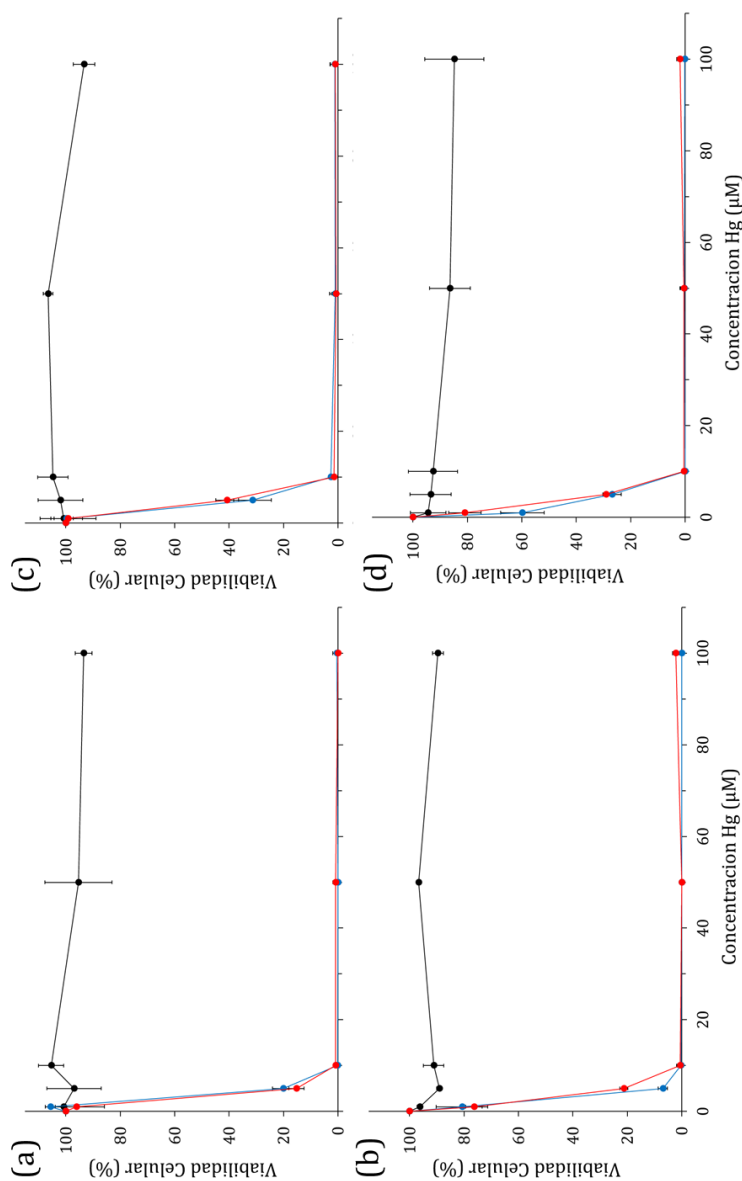


Figura 71. Valores de viabilidad celular (%) obtenidos para las células (a,b) HeLa y (c,d) HEK 293 tras su incubación a 37 °C y atmósfera controlada de 5% de CO₂ durante (a,c) 24 y (b,d) 48 h con NPs de HgSe (color negro), MeHg⁺ + 5 µM Selenito (color azul) y MeHg⁺ + 50 µM Selenito (color rojo) a diferentes concentraciones Hg: 1, 5, 10, 50 y 100 µM. Los datos mostrados corresponden a la media con su desviación estándar (n = 3 réplicas).

Como se puede observar en las Figura 70 y Figura 71, existe una disminución en los valores de viabilidad celular tanto para las células HeLa como para las HEK, muy similar al observado durante la exposición de las mismas solamente a los tóxicos de Hg (ver Figura 70 y Figura 71 las dos anteriores). De hecho, ninguna de las combinaciones de Hg^{2+} o MeHg^+ con selenito estudiadas mejora los resultados de viabilidad celular obtenidos tras la incubación de las células individualmente con Hg. De forma similar al caso anterior, la viabilidad se vio disminuida en un 50%, a pesar de la presencia de Se en forma de Selenito, para una concentración de Hg^{2+} de 50 μM y de MeHg^+ de 5 μM .

Cabe destacar, que el efecto protector del Se sobre la toxicidad de las especies de Hg ha sido ampliamente descrito en estudios previos.^{3,31} Sin embargo dicho efecto está íntimamente relacionado con la naturaleza de la especie de Se. Los resultados aquí mostrados, indican que la adición de Se en forma de selenito no produce ningún efecto protector significativo en la toxicidad del Hg en las condiciones ensayas. En esta línea, Wang *et al*³² obtuvieron las mismas conclusiones, cuando expusieron simultáneamente a mejillones y diatomeas con distintas especies de Hg (Hg(II) y MeHg) y selenito. Sin embargo, los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran que la presencia de Hg y Se en cantidades equimolares en forma de NPs de HgSe ofrece una protección total frente a la toxicidad del Hg.

4.5. Determinación cuantitativa de la incorporación celular de Hg

Muchos de los efectos citotóxicos observados dependen del número de especies tóxicas que se incorporan en las células y no solamente se deben a la concentración que se emplea durante la exposición de las mismas. Por lo tanto, como complemento a los estudios previos de viabilidad celular, se evaluó de forma cuantitativa, la cantidad de Hg incorporado en las células, en función de la especie de Hg utilizada en ambas líneas celulares. Con este objetivo, se eligió una concentración de Hg de 1 μM y un tiempo de incubación de 24 h, puesto que la viabilidad celular obtenida en estas condiciones para los tóxicos de Hg en

estudio fue superior al 80% en ambas líneas celulares (ver Figura XX). Dicha concentración intracelular de Hg se determinó a través de la medida elemental de Hg mediante ICP-MS/MS, después de la correspondiente incubación y etapa de separación del Hg incorporado del Hg extracelular como se describió en el apartado 3.2.6 del procedimiento experimental. De esta forma, se determinó el Hg no incorporado (extracelular) en las disoluciones de los sobrenadantes de cada pocillo así como en sus correspondientes lavados con PBS. Del mismo modo, se determinó experimentalmente mediante ICP-MS/MS, la cantidad de Hg total añadida en las mismas disoluciones de Hg utilizadas para la incubación tras su correspondiente digestión ácida. Estos resultados se encuentran recogidos en la Figura 72.

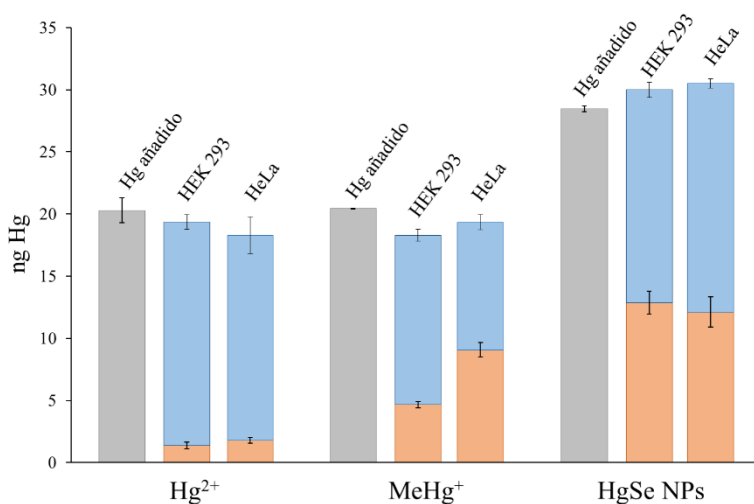


Figura 72. Incorporación celular de Hg obtenida mediante ICP-MS/MS tras la exposición a 1 μ M de Hg en forma de Hg²⁺, MeHg⁺ y NPs de HgSe de los cultivos celulares humanos de HeLa y HEK 293. El Hg intracelular está indicado en las barras de color naranja, mientras que el Hg que no se incorporó está representado en las barras de color azul. Así mismo, en gris se encuentra representada la cantidad de Hg total añadida para cada especie. La incertidumbre asociada a las barras de error corresponde a 1 desviación estándar y se obtuvo de la propagación de las incertidumbres individuales del proceso de incubación y digestión (n=3) y de las medidas de ICP-MS/MS (n=10).

Como se puede observar en la Figura 72, la incorporación celular de Hg varía mucho en función de la naturaleza de la especie de Hg. Se observó una mayor incorporación de Hg cuando las células se exponen a Hg orgánico

(MeHg⁺) obteniéndose una cantidad de Hg en masa de $4,6 \pm 0,2$ y $9,6 \pm 0,6$ para las células HEK 293 y HeLa, respectivamente; en comparación con el Hg inorgánico ($1,4 \pm 0,3$ y $1,8 \pm 0,3$ ng de Hg para las células HEK 293 y HeLa, respectivamente). Estos resultados concuerdan con otros previos encontrados en bibliografía, donde se describe una mayor bioacumulación de Hg en forma de MeHg⁺ en comparación con Hg²⁺. Este comportamiento diferencial se ha atribuido a la mayor solubilidad en medios biológicos y a una mayor permeabilidad del MeHg⁺, lo que se traduce en una mayor citotoxicidad de dicha especie ^{14,33,34}(REF). Adicionalmente, se encontró una elevada incorporación de Hg en forma de NPs de HgSe para ambas líneas celulares ($12,9 \pm 0,9$ y $12,2 \pm 1,2$ ng de Hg para las líneas celulares de HEK 293 y HeLa, respectivamente), lo que se traduce en una incorporación del 43 ± 3 y 40 ± 4 del total del Hg añadido inicialmente. En este sentido, se ha descrito en bibliografía previa, la mayor facilidad de determinadas nanopartículas de penetrar en las membranas celulares comparadas con sus correspondientes iones en disolución.^{35,36}

Cabe resaltar, que a pesar de la elevada concentración intracelular de Hg encontrada en forma de nanopartículas, éstas no inducen ningún efecto tóxico en las líneas celulares humanas HEK 293 y HeLa, tal y como se ha demostrado previamente. Por lo tanto, la no inducción de mortalidad no puede adscribirse a una falta de incorporación de dichas NPs por parte de las células. De nuevo, estos resultados sugieren la formación de especies nanoparticuladas de Hg como posible mecanismo de detoxificación de Hg. Además, se pudo llevar a cabo el balance de masas de Hg con las 3 especies. Como se puede ver claramente en la Figura XX, la masa total de Hg añadida inicialmente en cada cultivo celular se recuperó en todos los casos (obteniendo recuperaciones desde un 85 a un 106%, siendo el valor medio de 97%).

Por otro lado, se pudo determinar también el número total de nanopartículas de HgSe introducidas en cada línea celular, utilizando las medidas de ICP-MS/MS. Para transformar la cantidad de Hg en número de NPs, es necesario conocer previamente el número de átomos por cada nanopartícula así como la relación de átomos Hg:Se. En primer lugar, se determinó la relación

molar Hg:Se en las NPs. Para ello, se llevó a cabo la medida simultánea de Hg y Se mediante ICP-MS de una suspensión de las NPs, para evitar posibles pérdidas durante el proceso de digestión, resultando en una relación molar de 1,2:2 Hg:Se. Por otro lado, el cálculo del número de átomos por cada nanopartícula se obtuvo gracias a la combinación de los datos elementales aportados por las medidas de ICP-MS y el tamaño de las NPs (23 nm) obtenido a través de las medidas de HR-TEM de las mismas. De esta forma, asumiendo que las partículas son perfectamente esféricas, se obtuvo un valor de 222000 ± 8400 átomos (la incertidumbre corresponde a una desviación estándar, $n=8$ réplicas).¹⁸ Por lo tanto, combinando la relación molar previamente obtenida con el número de átomos de Hg por NP, se pudo determinar fácilmente el número de átomos de Se por NP (124320 ± 4928 átomos Hg/NP). Por último, teniendo en cuenta la cantidad de Hg incorporada por cada línea celular en forma de NPs y la cantidad de células sembrada, se determinó que el número de NPs incorporadas fue de $(1,55 \pm 0,05) \times 10^4$ NPs para las células HEK 293 y $(1,47 \pm 0,06) \times 10^4$ para las células HeLa. La incertidumbre asociada en cada caso se obtiene de la propagación de las incertidumbres individuales obtenidas de la digestión de las incubaciones de los correspondientes cultivos celulares ($n=3$) así como de las medidas de ICP-MS y la desviación estándar asociada al cálculo de átomos por NP. Si bien es cierto que la incorporación celular depende del tipo de nanopartículas, el tamaño y su recubrimiento, así como del tipo de línea celular, los resultados observados para las NPs de HgSe son consistentes con los obtenidos previamente en bibliografía. Por ejemplo, Hsiao *et al*²³, encontraron que el número de NPs de dióxido de titanio (TiO₂) por parte de la línea celular Neuro 2a fue de 2×10^4 NP por célula. Mientras que en un estudio posterior, Arnida *et al*³⁷ observaron valores de incorporación de $1,4 \times 10^4$ en la línea celular PC-3, utilizando para el estudio nanopartículas de oro (AuNPs) de 30 nm (cuyo tamaño es muy similar a las NPs de HgSe empleadas en este estudio, 23 nm). Sin embargo, se debe ser cauteloso a pesar de la similitud de los resultados puesto que la incorporación de NPs por parte de las células es dependiente enormemente no solamente del tipo de celular sino también de la carga superficial de las NPs,

el tipo de recubrimiento o incluso el tipo de técnica utilizada para la cuantificación.^{23,38}

5. Conclusiones

La síntesis y estabilización en medio acuoso de unas nanopartículas de HgSe recubiertas con DHLA, llevada a cabo previamente en el grupo de investigación, así como su correspondiente caracterización exhaustiva, ha permitido el uso de dichas NPs como patrones en estudios *in vitro* en cultivos celulares.

En primer lugar, gracias a las propiedades fluorescentes intrínsecas de las NPs de HgSe sintetizadas, se ha podido demostrar por primera vez la capacidad de dichas nanopartículas de penetrar en el interior de celular. Además, usando de nuevo la fluorescencia emitida por las NPs, se ha observado una acumulación preferente de las mismas en el citosol celular. Sin embargo, la conclusión más importante extraída de los estudios de citotoxicidad descritos en el presente capítulo, es que a pesar de la elevada incorporación de las NPs en el interior celular, éstas no han inducido ningún efecto tóxico en las líneas celulares estudiadas de HEK 293 y HeLa, mientras que las mismas cantidades de Hg administradas en forma de Hg orgánico (MeHg^+) o inorgánico (Hg^{2+}) han mostrado una elevada toxicidad. Dichos efectos citotóxicos de las especies de Hg iónicas se han mantenido inalterados incluso tras una exposición simultánea de los tóxicos de Hg con distintas cantidades de Se en forma de selenito.

Los resultados expuestos en el presente capítulo, abren las puertas hacia una mayor comprensión de los mecanismos de detoxificación de las especies de Hg en organismos vivos, puesto que en numerosos estudios se ha propuesto el efecto protector del Se ante la toxicidad del Hg, además de la formación *in vivo* de NPs de HgSe como último producto del proceso de detoxificación. Por tanto, los hallazgos presentados en este estudio que demuestran un comportamiento citotóxico distintivo de las NPs de HgSe en comparación con otras especies de Hg, podrían servir de base para llevar a cabo estudios en mayor profundidad del comportamiento de dichas NPs de HgSe estables en medio acuoso en organismos vivos.

Referencias bibliográficas

¹ M. Berlin, Mercury, in: L. Friberg, G.F. Nordberg, J Vostal (Eds.). Handbook on the Toxicology of metals, 2nd ed, Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam, (1987), pp 387-445.

² Bai, X. Li, Y., Liang, X., Li, H. Zhao, J. Li, Y. Gao, Y. Botanic Metallomics of Mercury and Selenium: Current understanding of mercury antagonisms in plant with the traditional and advanced technology. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology (2019) 102, 628-634.

³ Luque-García, J.L., Cabezas-Sánchez, P., Anunciação, D.S., Camara, C. Analytical and bioanalytical approaches to unravel the selenium-mercury antagonism: A review, Analytica Chimica Acta, (2013) 801, 1-13.

⁴ Beyrouthy, P., Chan, H. M. Co-consumption of selenium and vitamin E altered the reproductive and developmental toxicity of methylmercury in rats. Neurotoxicology and Teratology, (2006), 28, 49-58.

⁵ Nyland, J. F., Fillion, M., Barbosa Jr, F., Shirley, D. L., Chine, C., Lemire, M., Silbergeld, E. K. Biomarkers of methylmercury exposure immunotoxicity among fish consumers in Amazonian Brazil. Environmental Health Perspectives, (2011), 119, 1733-1738..

⁶ García-Sevillano, M. A., Rodríguez-Moro, G., García-Barrera, T., Navarro, F., Gómez-Ariza, J. L. Biological interactions between mercury and selenium in distribution and detoxification processes in mice under controlled exposure. Effects on selenoprotein. Chemico-Biological Interactions, (2015), 229, 82-90.

⁷ Pařízek, J., Ošťádalová, I. The protective effect of small amounts of selenite in sublimate intoxication. Experientia, (1967), 23(2), 142-143..

⁸ Yoneda, S., Suzuki, K. T. Detoxification of mercury by selenium by binding of equimolar Hg-Se complex to a specific plasma protein. Toxicology and applied pharmacology, (1997), 143, 274-280..

⁹ Gailer, J., George, G. N., Pickering, I. J., Madden, S., Prince, R. C., Yu, E. Y., Aposhian, H. V. (2000). Structural basis of the antagonism between inorganic mercury and selenium in mammals. Chemical Research in Toxicology, (2000), 13, 1135-1142.

¹⁰ Khan, M. A., Wang, F. Chemical demethylation of methylmercury by selenoamino acids. Chemical research in toxicology, (2010), 23, 1202-1206.

¹¹ Asaduzzaman, A. M., Schreckenbach, G. Degradation mechanism of methyl mercury selenoamino acid complexes: a computational study. Inorganic chemistry, (2011), 50, 2366-2372.

¹² Nakazawa, E., Ikemoto, T., Hokura, A., Terada, Y., Kunito, T., Tanabe, S., Nakai, I. The presence of mercury selenide in various tissues of the striped dolphin: evidence from μ -XRF-XRD and XAFS analyses. *Metallomics*, (2011), 3, 719-725.

¹³ Nigro, M., Leonzio, C. Intracellular storage of mercury and selenium in different marine vertebrates. *Marine Ecology Progress Series*, (1996), 135, 137-143.

¹⁴ Korbas, M., O'Donoghue, J. L., Watson, G. E., Pickering, I. J., Singh, S. P., Myers, G. J., George, G. N. The chemical nature of mercury in human brain following poisoning or environmental exposure. *ACS chemical neuroscience*, (2010), 1, 810-818.

¹⁵ Gajdosechova, Z., Lawan, M. M., Urgast, D. S., Raab, A., Scheckel, K. G., Lombi, E., Brownlow, A. In vivo formation of natural HgSe nanoparticles in the liver and brain of pilot whales. *Scientific reports*, (2016), 6, 1-11.

¹⁶ Lewinski, N., Colvin, V., Drezek, R. (2008). Cytotoxicity of nanoparticles. *Small*, (2008), 4, 26-49.

¹⁷ Soenen, S. J., Rivera-Gil, P., Montenegro, J. M., Parak, W. J., De Smedt, S. C., Braeckmans, K. Cellular toxicity of inorganic nanoparticles: common aspects and guidelines for improved nanotoxicity evaluation. *Nano today*, (2011), 6, 446-465.

¹⁸ Bouzas-Ramos, D., Menéndez-Miranda, M., Costa-Fernández, J. M., Encinar, J. R., Sanz-Medel, A. Precise determination of the nanoparticle concentration and ligand density of engineered water-soluble HgSe fluorescent nanoparticles. *RSC advances*, (2016), 6, 19964-19972.

¹⁹ Shen, M., Cai, H., Wang, X., Cao, X., Li, K., Wang, S. H., Shi, X. (2012). Facile one-pot preparation, surface functionalization, and toxicity assay of APTS-coated iron oxide nanoparticles. *Nanotechnology*, (2012), 23, 105601.

²⁰ Peng, L., He, M., Chen, B., Wu, Q., Zhang, Z., Pang, D., Hu, B. Cellular uptake, elimination and toxicity of CdSe/ZnS quantum dots in HepG2 cells. *Biomaterials*, (2013), 34, 9545-9558.

²¹ Zhu, Z. J., Yeh, Y. C., Tang, R., Yan, B., Tamayo, J., Vachet, R. W., & Rotello, V. M. Stability of quantum dots in live cells. *Nature chemistry*, (2011), 3, 963-968.

²² Cho, S. J., Maysinger, D., Jain, M., Röder, B., Hackbarth, S., Winnik, F. M. Long-term exposure to CdTe quantum dots causes functional impairments in live cells. *Langmuir*, (2007), 23, 1974-1980.

²³ Hsiao, I. L., Bierkandt, F. S., Reichardt, P., Luch, A., Huang, Y. J., Jakubowski, N., Haase, A. Quantification and visualization of cellular uptake of TiO₂ and Ag nanoparticles: comparison of different ICP-MS techniques. *Journal of nanobiotechnology*, (2016), 14, 1-13.

²⁴ Alkilany, A. M., Nagaria, P. K., Hexel, C. R., Shaw, T. J., Murphy, C. J., & Wyatt, M. D. Cellular uptake and cytotoxicity of gold nanorods: molecular origin of cytotoxicity and surface effects. *Small*, (2009), 5, 701-708.

²⁵ Clapp, A. R., Goldman, E. R., Mattoussi, H. Capping of CdSe-ZnS quantum dots with DHLA and subsequent conjugation with proteins. *Nature protocols*, (2006) 1, 1258-1266.

²⁶ Cell growth determination kit (MTT), Bioquochem S.L. disponible en <http://www.labjot.com/uploads/Bioquochem/MTT%20Book.pdf>. Verificado en Agosto de 2020.

²⁷ Koeman, J. H., Van de Ven, W. S. M., De Goeij, J. J. M., Tjioe, P. S., Van Haaften, J. L. Mercury and selenium in marine mammals and birds. *Science of the Total Environment*, (1975), 3, 279-287.

²⁸ Kumar, V., Sharma, N., Maitra, S. S. In vitro and in vivo toxicity assessment of nanoparticles. *International Nano Letters*, (2017), 7, 243-256.

²⁹ Llopis, M. V., Rodríguez, J. C. C., Martín, F. J. F., Coto, A. M., Fernández-Argueelles, M. T., Costa-Fernández, J. M., Sanz-Medel, A. Dynamic analysis of the photoenhancement process of colloidal quantum dots with different surface modifications. *Nanotechnology*, (2011), 22, 385703.

³⁰ Brunner, T. J., Wick, P., Manser, P., Spohn, P., Grass, R. N., Limbach, L. K., Stark, W. J. In vitro cytotoxicity of oxide nanoparticles: comparison to asbestos, silica, and the effect of particle solubility. *Environmental science & technology*, (2006), 40, 4374-4381.

³¹ Cordero-Herrera, I., Cuello, S., Goya, L., Madrid, Y., Bravo, L., Cámara, C., Ramos, S. Molecular mechanisms involved in the protective effect of selenocystine against methylmercury-induced cell death in human HepG2 cells. *Food and chemical toxicology*, (2013), 59, 554-563.

³² Wang, W. X., Wong, R. S., Wang, J., Yen, Y. F. Influences of different selenium species on the uptake and assimilation of Hg (II) and methylmercury by diatoms and green mussels. *Aquatic toxicology*, (2004), 68, 39-50.

³³ Lohren, H., Blagojevic, L., Fitkau, R., Ebert, F., Schildknecht, S., Leist, M., Schwerdtle, T. Toxicity of organic and inorganic mercury species in differentiated human neurons and human astrocytes. *Journal of trace elements in medicine and biology*, (2015), 32, 200-208.

³⁴ Korbas, M., MacDonald, T. C., Pickering, I. J., George, G. N., Krone, P. H. Chemical form matters: differential accumulation of mercury following inorganic and organic mercury exposures in zebrafish larvae. *ACS chemical biology*, (2012), 7, 411-420.

³⁵ Colognato, R., Bonelli, A., Ponti, J., Farina, M., Bergamaschi, E., Sabbioni, E., Migliore, L. Comparative genotoxicity of cobalt nanoparticles and ions on human peripheral leukocytes in vitro. *Mutagenesis*, (2008), 23, 377-382.

³⁶ Limbach, L. K., Wick, P., Manser, P., Grass, R. N., Bruinink, A., Stark, W. J. Exposure of engineered nanoparticles to human lung epithelial cells: influence of chemical composition and catalytic activity on oxidative stress. *Environmental science & technology*, (2007), 41, 4158-4163.

³⁷ Malugin, A., Ghandehari, H. Cellular uptake and toxicity of gold nanoparticles in prostate cancer cells: a comparative study of rods and spheres. *Journal of Applied Toxicology: An International Journal*, (2010), 30, 212-217.

³⁸ Ashraf, S., Park, J., Bichelberger, M. A., Kantner, K., Hartmann, R., Maffre, P., Nienhaus, G. U. Zwitterionic surface coating of quantum dots reduces protein adsorption and cellular uptake. *Nanoscale*, (2016), 8, 17794-17800.

CONCLUSIONES GENERALES

Conclusiones Generales

En esta Tesis Doctoral se ha abordado la cuantificación de dos tipos de analitos de gran importancia en diversas ramas de las Ciencias de la Vida: las biomoléculas, relevantes para el conocimiento del funcionamiento de los organismos vivos, y las nanopartículas, cuyo empleo se encuentra en pleno auge en los últimos años tanto directamente en productos de uso cotidiano, como en su utilización como herramientas para la cuantificación de biomoléculas, además de ser en sí mismas un indicador de contaminación ambiental.

En el Capítulo 1 se evaluaron las limitaciones de la cuantificación absoluta de biomoléculas en ICP-MS sin necesidad de utilizar patrones específicos. El estudio de los factores de respuesta obtenidos en ICP-MS para 14 biomoléculas diferentes demostró la posibilidad de llevar a cabo una cuantificación adecuada con este tipo de estrategias, cuando se emplea el ICP-MS acoplado a un micronebulizador de consumo total. Sin embargo, se encontraron diferencias significativas en los factores de respuesta de ICP-MS para estas mismas biomoléculas cuando se emplean nebulizadores de flujo convencional, en función del carácter hidrofóbico del compuesto analizado y su tamaño. Estos hallazgos evidenciaron las limitaciones del ICP-MS para llevar a cabo una cuantificación absoluta apropiada para biomoléculas de gran tamaño o con marcado carácter hidrofóbico, como es el caso de algunos péptidos y proteínas, al menos cuando se emplea nebulizadores de flujo convencional.

Basándose en estas investigaciones, en el Capítulo 2 se evaluó la capacidad del ICP-MS de proporcionar una cuantificación independiente de la especie en el caso de las Nanopartículas. De nuevo se demostró que no existían diferencias entre los factores de respuesta de ICP-MS para un patrón inorgánico y unos QDs de CdSe/ZnS recubiertos de polímero, cuando se utiliza un micronebulizador de consumo total. En el caso de los análisis llevados a cabo con los nebulizadores convencionales, se corroboró un comportamiento diferencial similar al observado para las biomoléculas. Las diferencias significativas observadas para los factores de respuesta de los QDs de CdSe/ZnS con respecto al patrón genérico, ponen de manifiesto de nuevo la influencia de la especie en ICP-MS cuando se emplean sistemas de nebulización convencionales.

Conclusiones Generales

El Capítulo 3 surge de la necesidad del desarrollo de metodologías bioanalíticas ultrasensibles para la detección de biomarcadores proteicos, cuya concentración se encuentra en niveles muy bajos en etapas tempranas de una determinada enfermedad, de una forma rápida y con métodos de detección sencillos. La combinación de la elevada especificidad de los inmunoensayos con las extraordinarias propiedades de los nanomateriales fue la base del desarrollo de una plataforma ultrasensible para la detección de PSA en el mismo soporte sólido en el que se desarrolló el inmunoensayo. En esta metodología se ha evaluado y optimizado un proceso de amplificación de la señal analítica basado en una sencilla y rápida deposición catalítica de oro sobre la superficie de los QDs empleados como marcas durante el inmunoensayo (QDs de ZnS dopados con Mn). Además, la detección se llevó a cabo en el mismo soporte sólido sobre el que se desarrolla el inmunoensayo completo mediante microscopía confocal en modo reflexión, minimizando así el tiempo de análisis y eliminando etapas de preparación de muestra previas a la detección.

Finalmente, el Capítulo 4 se centró en el estudio de las NPs como marcador de contaminación medioambiental. En este caso, se evaluó la citotoxicidad de unas NPs de HgSe en comparación con la toxicidad inducida por dos tóxicos de Hg bien reconocidos: metilmercurio y Hg inorgánico, en dos líneas celulares humanas (HeLa y HEK 293). Curiosamente, las NPs de HgSe inducen ningún efecto negativo en ambas celulares, mientras que pequeñas dosis de Hg en forma orgánica o inorgánica producen un efecto acusado en la viabilidad celular. Por último, se desarrolló una metodología basada en la espectrometría de masas elemental en combinación con la información estructural proporcionada por otras técnicas de caracterización, para la determinación de la cantidad de NPs de HgSe acumuladas en el interior celular. Los resultados obtenidos podrían constituir la base para futuros estudios medioambientales y toxicológicos más detallados sobre los mecanismos de detoxificación de Hg por parte de los organismos vivos, que ya postulan la formación de este tipo de NPs de HgSe como último producto metabólico.

Overall Conclusions

The main conclusions that can be extracted from the results of this PhD Thesis focused on the development of quantitative strategies for two relevant analytes in many fields of Life Sciences: biomolecules, which are very important for clinical diagnosis and for understanding biological systems and nanoparticles, widely used as tags in bioanalytical applications and employed as biomarkers in environmental analysis, have been summarized as follows:

In Chapter 1 limitations of ICP-MS absolute biomolecule quantification without the need of specific standards was evaluated. The use of a total consumption nebulizer led to identical response factors for all biomolecules under study. In contrast, differential ICP-MS response factors were obtained employing conventional nebulization systems for proteins and hydrophobic peptides. Such differential behavior only can be ascribed to species-dependent nebulization efficiencies, as ionization efficiency, protein solubility or error in the certification concentration were proved by TCN analysis. These findings provide compelling evidence of the limitations of species-independent ICP-MS quantification of intact proteins or hydrophobic species when conventional nebulization systems are used.

Based on these findings, in Chapter 2 the capabilities of ICP-MS to provide absolute quantification of nanoparticles was investigated. Again, no differences were observed between ICP-MS response factors for an inorganic standard and polymer-coated CdSe / ZnS QDs when a total consumption nebulizer was used. For conventional nebulizers, differential behavior similar to those observed for biomolecules was corroborated. These significant differences observed for the response factors of the CdSe / ZnS QDs with respect to the generic standard, revealed the influence of the species in ICP-MS signal when conventional nebulization systems are used.

Chapter 3 arises from the need for the development of ultrasensitive bioanalytical methodologies for biomarker detection, whose concentration is found at very low levels in the early stages of a given disease, quickly and with simple detection methods. An ultrasensitive platform for the detection of PSA on the same solid support on which the immunoassay based on combination of

Conclusiones Generales

the high specificity of immunoassays with nanomaterials was developed. In this methodology, an amplification step based on a simple and rapid catalytic deposition of gold on the surface of the QDs used as labels during the immunoassay (Mn-doped ZnS QDs) has been evaluated and optimized. In addition, the detection was carried out on the same solid support on which the complete immunoassay was performed by confocal microscopy in reflection mode, thus minimizing the analysis time and eliminating sample preparation steps prior to detection.

Finally, Chapter 4 was focused on the study of NPs as a marker of environmental analysis. In this case, HgSe NPs cytotoxicity was evaluated in comparison with toxicity induced by two well-recognized Hg toxic species: methylmercury and inorganic Hg, in two human cell lines (HeLa and HEK 293). Interestingly, any negative effect was induced by HgSe NPs, while small doses of Hg in organic or inorganic form produced a remarkable effect on cell viability. A methodology based on elemental mass spectrometry was developed in combination with the structural information provided by other characterization techniques, to determine the amount of HgSe NPs incorporated by cells. Results obtained could constitute the basis for future environmental and toxicological studies focused on the Hg detoxification mechanism, as the formation of HgSe NPs as the last metabolic product has been postulated.

RESUMEN DE PUBLICACIONES

Los estudios realizados durante esta Tesis Doctoral han dado lugar a las siguientes publicaciones científicas:

- Cid-Barrio, L., Calderón-Celis, F., Abásolo-Linares, P., Fernández-Sánchez, M. L., Costa-Fernández, J. M., Ruiz Encinar, J. Sanz-Medel, A. Advances in absolute protein quantification and quantitative protein mapping using ICP-MS. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, (2018), 104, 148-159.
- Cid-Barrio, L., Bouzas-Ramos, D., Salinas-Castillo, A., Ogra, Y., Encinar, J. R., & Costa-Fernández, J. M. Quantitative assessment of cellular uptake and differential toxic effects of HgSe nanoparticles in human cells. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. (2020). DOI: 10.1039/D0JA00162G.
- Cid-Barrio L., Calderón-Celis, F., Costa-Fernández, J. M., Ruiz Encinar, J. Assessment of the potential and limitations of elemental mass spectrometry in Life Sciences for absolute quantification of biomolecules using generic standards. (2020) *Analytical Chemistry*, DOI: 10.1021/acs.analchem.0c02942.

Adicionalmente, se encuentra en proceso de revisión la publicación científica enviado a la revista *Sensors*, que lleva por título: Catalytic gold deposition for ultrasensitive optical immunosensing of Prostate Specific Antigen. Autores: Cid-Barrio, L. Ruiz Encinar, J. Costa-Fernández, J. M.



Advances in absolute protein quantification and quantitative protein mapping using ICP-MS



Laura Cid-Barrio, Francisco Calderón-Celis, Patricia Abásolo-Linares, M. Luisa Fernández-Sánchez, José Manuel Costa-Fernández, Jorge Ruiz Encinar*, Alfredo Sanz-Medel^{*,*}

Department of Physical and Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Oviedo, Julian Clavería 8, 33006 Oviedo, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Available online 30 September 2017

Keywords:

ICP-MS
Absolute quantification
Elemental labelling
Heteroatom tag
Laser ablation
Mass spectrometry
Targeted proteomics

ABSTRACT

Protein and peptide detection with inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) can provide their direct and reliable absolute quantification without the need for specific standards, which greatly complements molecular mass spectrometry features in proteomics. We discuss recent research to shed new light on this particular surge in the analytical applicability of ICP-MS and identify possible niches that could attract future analytical activity within this emerging field.

© 2017 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

One of the main challenges in proteomics nowadays is absolute protein quantification, a must in order to get a deeper understanding of protein functions and their interaction networks. In particular, that type of quantitative knowledge turns out to be critical now to assess the potential of biomarkers in clinical applications [1]. It is worth mentioning here that “absolute quantification” is a well-established term in proteomics [2,3], which involves the determination of amount of substance of the target analyte (i.e., ng g⁻¹ or copy number per cell) in a given sample. Conversely, in relative quantification the amount of the analyte in the sample is given always in relation to the amount of the same analyte in another sample that is used as reference (i.e., differential protein expression).

Molecular mass spectrometry (MS) has become the reference technique for protein analysis in general and for proteomics in particular. Molecular MS uses soft ionization sources, such as matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) or

electrospray ionization (ESI), to preserve molecular information. However, MALDI or ESI-MS are not inherently quantitative ion sources because the signal intensity they provide is strongly affected not only by the molecular structure of the target biomolecule, but also by the sample matrix and solvents used. As a consequence, MS signal intensity cannot be directly related to the analyte amount [1,4], and so specific standards for each target peptide/protein (mostly isotopically labelled standards) are usually required in order to obtain absolute quantities.

ICP-MS has been the reference technique in elemental speciation studies during the last 20 years. Additionally, in recent years, there is a rising awareness of the potential of ICP-MS in proteomic analysis. Its excellent analytical features, including robustness, sensitivity, multi-element and multi-isotope detection and virtual species- and matrix-independent ionization [5,6], turn ICP-MS in a powerful technique able to provide absolute amounts of biomolecules in complex samples without the need of specific standards [7]. In this sense, absolute protein quantification based on ICP-MS detection, can be carried out by direct measurement of proteins through “heteroatoms” (meaning here any element except C, H, N or O). Moreover, the heteroatom to be measured may be naturally occurring, as S, Se, P and metals in proteins, selenoproteins, phosphoproteins and metalloproteins, respectively, or be

* Corresponding author.

** Corresponding author.

E-mail addresses: ruizjorge@uniovi.es (J.R. Encinar), asm@uniovi.es (A. Sanz-Medel).

<https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.09.024>

0165-9936/© 2017 Published by Elsevier B.V.

intentionally bioconjugated as an elemental tag. This expands today the ICP-MS application field to almost any biomolecule [8,9].

However, ICP-MS as a stand-alone technique is very limited for quantitative proteomic analysis. Due to the loss of structural information taking place in the ICP, reliable analysis of complex samples requires previous separations (e.g., with liquid chromatography, gel electrophoresis, etc) in order to isolate the different species containing the ICP-MS-detectable heteroatom before its final measurement [5]. In fact, absolute protein quantification based on heteroatom-tagged proteomics [6] via ICP-MS has been mostly limited to relative simple mixtures of peptides or intact proteins [5,10].

In this review, we discuss actual trends and update instrumental advances in heteroatom-tagged proteomics using ICP-MS [6] mostly heading towards the possibility of direct absolute quantification of proteins even in relatively complex liquid samples (as in the case for protein analysis). From our point of view, the development of this proteomics branch is certainly a most promising leap forward in the chemical speciation field. The importance of molecular MS in such ICP-MS-based workflows, in order to provide a more complete qualitative and quantitative proteomics picture (concept of “integrated speciation”) is here highlighted. On the other hand, recent progress on the use of novel element labelling strategies, particularly the combination of metal tagged and/or nanoparticle-based immunoassays with final amplified ICP-MS detection, as a convenient alternative to

chromatographic separations, is examined as well. Finally, the growing potential of direct solid analysis in proteomics via ICP-MS, which is opening the door not only to metalloproteins or heteroatom-tagged absolute protein quantification but also to their distribution assessment (e.g., protein mapping with laser ablation (LA) imaging) in biological samples and tissues is also introduced. A clarifying scheme summarizing the today different “absolute” protein quantification strategies with ICP-MS is given in Fig. 1.

2. Absolute protein quantification using naturally present heteroatoms

Most molecular MS-based absolute quantitative proteomics methods reported so far are greatly limited by the need of a proper external standardization [1]. Such quantitative approaches typically require the use of isotope-labelled analogous standards of each target analyte to provide the sought absolute determination required [11]. Such standards must be synthesized first, then they have to be characterized and finally accurately certified, successive steps entailing severe quantitative limitations. On the contrary, elemental MS may achieve absolute protein quantification without the need for such specific standards due to its robust, virtually species-independent signal [12]. The ICP-MS capacity to quantify peptide/proteins through the direct detection of a heteroatom present within the protein structure (the so-called heteroatom-tag

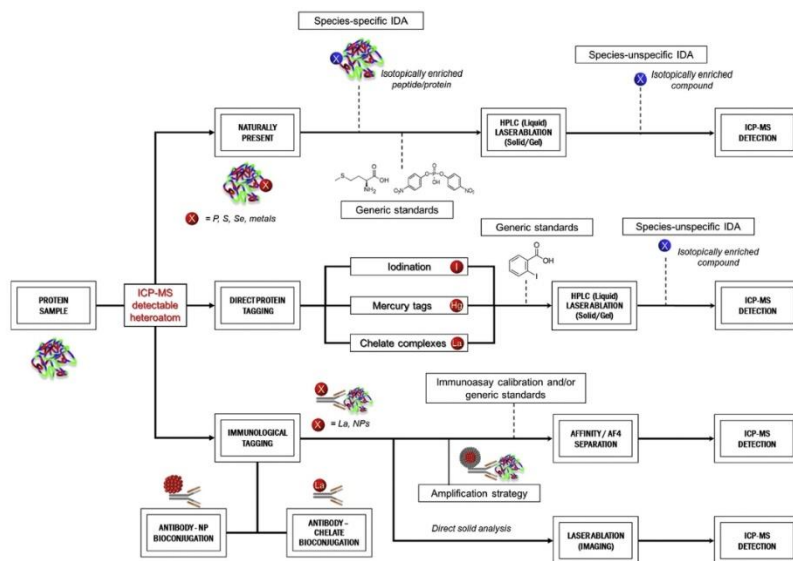


Fig. 1. Schematic illustration of different elemental MS-based absolute quantitative proteomic strategies. Reproduced from Calderón-Celis et al. (2017) [7] with permission from Wiley.

natural targeted proteomics) [6,10] implies that typical protein tagging or labelling procedures are not needed anymore. This analytical shortcut reduces complexity, while minimizing sources of error that might affect quality and reliability of the results. Nevertheless, a crucial consideration in ICP-MS-based quantification is that ICP-MS can only provide elemental quantities of the target heteroatom. Therefore, it is necessary to know the heteroatom/protein stoichiometry in order to transform that elemental quantification into protein quantity. In addition, given that the detection is exclusively elemental, and thus no structural or identification information can be obtained, previous complete separation of the species, via chromatographic or electrophoretic techniques, is required in order to assign the ICP-MS determined heteroatom quantity to that of the protein to which it belongs (i.e., quantitative elemental speciation) [6].

According to the above narrative, it is not surprising that one of the main application fields of ICP-MS in quantitative proteomics has been the study of metalloproteins, through the detection of the metallic heteroatom stoichiometrically bonded to the protein. It is well known that the actual activity and function of such proteins (metalloenzymes) is somehow controlled or affected by the presence of the metal in the protein [13]. Consequently, ICP-MS quantification of the metal might provide vital information to understand the trace element role in biological and biochemical processes, as well as its effect in the metalloprotein functions [14]. However, metals are not usually covalently bonded to the protein's moiety, but to prosthetic groups; hence, the needed separation, prior to the ICP-MS detection poses eventually a great risk of metal losses. Of course, such losses will entail important errors in the protein quantification [15].

In this line, quantitative speciation analysis via LC-ICP-MS of naturally present non-metal element "tags" (e.g., S, Se, or P, which are covalently bonded to the protein primary structure) is a promising approach for protein quantification because such target heteroatoms are unlikely to be lost during the previous preparation or separation steps [16]. Unfortunately, ICP-MS analysis of such non-metal heteroatoms has been traditionally hampered due to their high ionization potentials (limited ionization in the plasma) and their numerous polyatomic interferences. In fact, the use of collision reaction cells and high-resolution ICP-MS instrumentation, to remove such polyatomic interferences may offer limited sensitivity for those elements [17,18], what hindered the applicability of ICP-MS quantification in biological applications, usually requiring low LODs. In this sense, the introduction of tandem configurations into ICP-MS instrumentation (ICP-QQQ) in 2012 provided an efficient way for elimination of polyatomic interferences and so for highly sensitive detection of non-metallic heteroatoms. As a matter of fact, tandem ICP-MS enables today highly sensitive quantification of S- and P-containing peptides [19] and proteins [20].

As for molecular MS, protein quantification with elemental MS has been principally carried out through the analysis of tryptic peptides, taking advantage of the well-developed proteomics bottom-up strategies [21,22]. In contrast, direct ICP-MS analysis of full-length intact proteins has not been noteworthy until just recently. The reason behind this fact, lies in the great analytical limitations plaguing the analysis of intact proteins, particularly non-quantitative recoveries, implying the need for prone to error correction factors for each individual analyte. In addition, chromatographic resolution typically attainable for intact proteins is lower in comparison to peptides, especially in complex samples. Progressive overcoming of such limitations would result in significant advances in the consolidation of entire proteins quantification with ICP-MS. Unlike using tryptic peptides bottom-up analysis, full-length proteins quantification is not dependent upon digestion

efficiency (missed cleavages) that might result in incomplete peptide analytical recoveries and hence, produce serious errors in the final protein quantitative results. Using ICP-MS, entire proteins can be directly quantified with a single species-unspecific standard through the detection of a naturally present heteroatom, needless of complicated sample preparation or digestion steps. Moreover, intact protein ICP-MS analysis via S measurement is favoured because the number of putative S atoms per molecule is much higher in proteins than peptides leading to lower protein LODs. Implementation of micro/nano-flow chromatography (μ nHPLC) in ICP-MS [23] has allowed a robust coupling of reversed-phase HPLC, which holds great chromatographic resolution and is one of the preferred separation techniques for speciation analysis of peptides and proteins [24,25]. Such resolution improvement in HPLC-ICP-MS is not sufficient to produce a straightforward turnaround from peptide to intact protein speciation, but its use, together with relatively new-developed core-shell column packing [26] might do. Such core-shell silica particles, composed of a solid silica core surrounded by a porous shell, show several advantages respect to fully-porous particles, including narrower particle size distribution, more consistent packed bed and shorter diffusion path. All those features explain their better chromatographic efficiency and reduced band broadening and open the possibility to work at higher temperatures and pressures [26,27]. In addition, lower hydrophobicity of these particles, as compared with fully-porous particles, reduces retention factors enabling quantitative chromatographic recoveries for larger biomolecules (e.g., proteins [20]) to be obtained. Moreover, the observed increasing trend of using μ nHPLC with ESI-MS based methods confirms and boosts the synergic combination of elemental and molecular MS approaches for proteomic analysis. Such "integrated" speciation approach is critical for quantifications, because the heteroatom/protein ratio has to be well known to translate elemental data into molecular protein determination. More and more parallel molecular and elemental MS analysis under the same LC conditions, as shown by Fig. 2 [20,28], are demanded in order to pursue absolute protein determinations. As we will see in Section 6, the alternative of carrying out direct solid analysis with LA-ICP-MS, has attracted a great interest in this field during the latest years as well [29], as it enables the study of metalloproteins distribution (mapping) and even their quantification in the biological tissue investigated.

3. Elemental labelling for protein quantification

ICP-MS sensitivity for the detection of heteroatoms naturally present in proteins, even using tandem MS configuration, might be not sufficient for certain quantitative applications in biomedical research where extreme sensitivity is required [5]. In this sense, elemental labelling is becoming a trend to achieve higher selectivity and sensitivity in quantitative analysis of proteins with ICP-MS. Of course, labelling approaches are more laborious and time-consuming than direct heteroatom-tag proteomics strategies and, what is worse, they may change protein properties (e.g., the possible modification of selected antibody recognition capability). However, labelling offers advantages that might render their use as an attractive alternative to those approaches previously discussed in Section 2. More than one element can be introduced in the target protein (usually a tagging element with easy ionization in the plasma and low background), in such way that achievable sensitivity is much higher than for the non-metal elements (S, P, Se) naturally present in proteins [16]. Additionally, via labelling strategies, any peptide or protein can be made detectable with ICP-MS, even if it does not contain any heteroatom within its structure [6]. Moreover, the use of several elemental labels simultaneously, enables multiplexed analysis of many proteins. The potential of MS

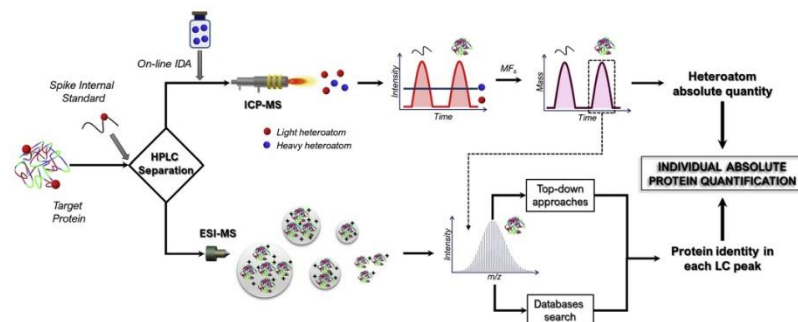


Fig. 2. Scheme of an "absolute" quantitative proteomics workflow based on combining elemental and molecular MS detection after identical separation (HPLC) conditions. ICP-MS: the sample containing the target analyte is spiked with a species-specific standard containing the detected heteroatom. After LC separation, heteroatom absolute content of the standard and the analyte(s) is accomplished by on-line isotope dilution analysis (mass flow equation, MF_i) by relating the peak areas of the standard (of known concentration added to the sample to correct for injection errors and simplify IDA computations) and the analyte. ESI-MS: the detection of the analyte species provides their identification and/or sequence characterization, either by MS and MS/MS analysis (top-down workflow), or by MS analysis together with database information. This provides the stoichiometry heteroatom:protein molecule, hence the absolute amount of the corresponding protein can be finally obtained from the element content determined. Reproduced from Calderón-Celis et al. (2017) [7] with permission from Wiley.

compared to that of the more common optical methods, such as fluorescence, expands the possibilities of really quantitative multiplex protein analysis [30].

As shown in Fig. 1, protein labelling can be carried out directly on the target protein or indirectly through its corresponding antibody (immunological approach). The main limitations of both approaches are dealing with the reagent excess, stoichiometry determination and the possible generation of undesirable products or fragments during the labelling process. Thus, all labelling resulting mixtures have to be properly characterized, and usually we have to resort to separations techniques (as LC or gel electrophoresis) to resolve the potentially interfering compounds for most proteomic applications [16,31].

3.1. Direct labelling with the ICP-MS-detectable element

Chemical reactions may be used to attach covalently a certain heteroatom to a target protein, in order to make it detectable with ICP-MS. Many metals can react, more or less selectively, directly with functional groups of proteins. Mercury reactions can be almost specific because of the strong affinity of protein sulfhydryl groups (-SH) to some Hg compounds. So far, several mercury labels have been proved adequate for protein quantification via ICP-MS, particularly small mercury containing molecules [32] and also more complex compounds such as *p*-chloromethylmercurybenzoate and *p*-hydroxymethylmercurybenzoate [33]. A general benefit of such Hg labels is that, in contrast to non-metal tags such as S or Se, there are no relevant spectral interferences for Hg with ICP-MS [5]. Nonetheless, its relatively high ionization potential makes Hg detection less sensitive in comparison to other metals (only about 20% of mercury is ionized in the ICP). Persistent memory effects may limit the application of Hg compounds for ICP-MS analysis as well [5,34]. Those analytical limitations, in combination with the high toxicity of mercury compounds, have strongly hindered the practical applicability of this Hg-based approach.

Likewise, halogens detectable by ICP-MS can be conjugated directly to the protein organic moiety and so can be used as labels

in protein quantification. In this line, only derivatization with iodine has been developed because of the low ionization observed for other halogens (e.g., F or Cl) in ICP. This derivatization is based on the capability of iodine to react selectively with aromatic rings present in amino acid residues. The procedure, called iodination, consists of the *in situ* oxidation of iodine (coming for a simple reagent, such as NaI) to I^+ , which can then react with the aromatic rings of the amino acid residues. Nevertheless, it has to be taken into account that incomplete labelling and unspecific iodination can be observed [5]. In contrast, the use of a more complex reagent like *bis*(pyridine)iodonium tetrafluoroborate (IPy_2BF_4) has proved to provide complete and specific iodination of tyrosine residues in peptides and tryptic digests [35]. Of course, iodine ICP-MS detection is less sensitive than that of metals, but more sensitive than that of non-metals naturally present in proteins (e.g., P or S). In addition, two iodine atoms are introduced per tyrosine enabling better detection limits.

3.2. Labelling based on chelate reagents containing an easy ICP-MS-detectable metal

Besides direct covalently bound approaches, metals can also be introduced in proteins via coordinated complexes. Bifunctional ligands, composed of a reactive group, a linker (or spacer) and a chelate complex containing the detectable heteroatom, are used. The most popular of such reagents typically bind a single heteroatom per tag using ligands of the type diethylene-triamine-pentaacetic acid (DTPA), 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid (DOTA) or diethylene-triamine-tetraacetic acid (DTTA). The high stability constant of the metal complex formed favours the applicability of this approach [36]. In this line, the most used labelling heteroatoms are rare-earth elements due to their low first ionization potential, very low background (lanthanides are low-abundant elements in biological sample matrices), and rarely significant polyatomic interferences in comparison with lighter elements. Those features together lead to extreme ICP-MS sensitivity. In addition, the large number of

lanthanides available with their corresponding isotopes facilitate multiplexed analysis via ICP-MS detection [5,37].

In this vein, the so-called “metal-codded affinity tags” (MeCAT) methods are based on the use of different lanthanide chelates which are captured in a macrocyclic complex. This MeCAT reagent contains a second reactive group able to react with protein cysteine thiol groups [38,39]. Despite the excellent features of lanthanides as labels for ICP-MS detection, the sensitivity is still limited by the number of metal ions that can be loaded in such chelates. Moreover, relatively high polarity of these derivatives makes difficult their separation in reverse phase columns, commonly used in peptide/protein separations [5]. Finally, derivatization reaction is not complete in most cases, and so the actual efficiency of the labelling process have to be controlled and taken into account for quantitative analysis [34].

A special group of chelate-based labels are metallocenes tags, which contain a transition metal coordinated within two cyclopentadienyl anions. Ferrocene, an iron compound, is most promising because other metallocenes frequently decompose under derivatization conditions [34]. Linking is based on an electrophilic aromatic substitution reaction on the cyclopentadienyl ring (present in lysine residues) [40]. Although ferrocene derivatizing reagents are frequently employed as labels for protein determination, mostly in combination with LC and electrochemical detection [41], iron detection with ICP-MS is hampered by polyatomic interferences. Therefore high-resolution or quadrupole instruments equipped with a collision/reaction cell are required. Moreover, the presence of high iron levels in many biological samples produces high background levels limiting the final protein sensitivity achievable [5,34].

3.3. ICP-MS based immunoassays

Antibody-based immunoassays are primary tools for quantitative proteomics due to their good sensitivity, selectivity and throughput, especially ELISA-based approaches. In essence, suitable heteroatom-labelled antibodies can specifically recognize and bind to the target antigen protein or analyte even in complex matrices [42]. Conventional immunoassay-platforms are usually combined with luminescence detection due to the properties of the label typically employed. This provides rapid and sensitive protein determination. However, luminescence detection is affected by some important limitations, including matrix effects and poor dynamic range [43].

ICP-MS detection has been lately considered as an alternative method to molecular detection in immunoassays through the use of metal-labelled antibodies, via the so-called element-tagged immunoassays. The combination of the high-sensitive ICP-MS detection of metals with the specificity of the antigen:antibody assay holds great potential to quantify biomolecules in complex samples [30]. However, as for any other immunoassay approach, specific antibodies have to be designed for each target proteins and only a few metal-labelled antibodies are commercially available nowadays. Therefore, a bioconjugation reaction between the chosen antibody and the elemental label must be typically developed and such reaction must be first optimized and kept under control in order to preserve the function of the recognition of antibody [5].

Lanthanide-chelate complexes have been widely used to label antibodies, using macrocyclic compounds that have been described previously [5]. By labelling different antibodies with a range of lanthanides as detectable heteroatoms extremely powerful multiplexed protein analysis has been demonstrated. In this context, Bendall et al. [44] determined 30 cell-surface proteins in single cells using a novel ICP-MS based technique called mass cytometry, which consists of an ICP source equipped with a fast TOF mass

analyser (CyTOF). However, sensitivity of this approach can be limited by the reduced number of detectable heteroatoms labelled to antibodies (if there is only one lanthanide ion per chelate).

An innovative strategy to overcome such limitations is resorting to polymer-based metal tags to label antibodies: here, primary antibodies are labelled with chelating polymer chains each containing multiple metal atoms per tag, chelated again by macrocyclic structures. These polymer tags have been reported to bind up to 60–120 lanthanides per antibody [45] and so increasing greatly the final ICP-MS sensitivity. Again, the advantage of this approach is related to the wide number of available lanthanide elements and isotopes, their low levels in biological systems and the possibility of using multiple labels simultaneously [46]. However, preparation of polymer tags is relatively complicate and the reagents are expensive. Also, the recognition capability of the labelled antibodies can be affected by the introduction of such a very voluminous polymer chain [5].

A recent alternative way to introducing many metals per biomolecule in a more compact manner consists of using metal-containing nanoparticles (NPs) as ICP-MS labels. Thousands of ICP-detectable atoms can be present in each nanoparticle [42]. In this context, numerous types of NPs with different physicochemical properties have been investigated so far including: gold nanoparticles (AuNPs), silver nanoparticles (AgNPs), nanoclusters (NCs) or Quantum Dots (QDs). Notably, if the exact number of metal atoms per nanoparticle and the stoichiometry nanoparticle:antibody are known, absolute quantification of proteins/peptides, without the need for specific standards, can be accomplished. A typical disadvantage of using nanoparticles as labels is that they often show a high affinity for the surface of the immunoreaction vessels and sample introduction systems used in ICP-MS. Hence, the use of adequate surface blocking agents and washing steps are required to prevent nonspecific adsorptions [42].

Despite the high sensitivity accomplished with bi-functional reagents or nanoparticle-based immunoassays with ICP-MS detection, there are problems requiring higher analytical sensitivity, particularly for biological or/and biomedical applications (e.g., the determination of biomarkers for early alarm diagnosis of disease). In those cases, a drastic amplification of the ICP-MS signal is still possible, as shown in Fig. 3, because of a controlled deposition of a further thick elemental layer after the immunoassay has been successfully carried out. The surface of the original nanoparticle is very active and may function as a catalytic seed for reduction. Much bigger nanoparticles are so obtained (see Fig. 3) and hence much better sensitivity with ICP-MS detection can be achieved (detection limits below fg mL^{-1} level of the protein [47] have been already reported). In contrast with direct use of very big nanoparticles, the recognition capabilities of antibodies are not compromised.

Along with amplification, single particle ICP-MS analysis could be used for inorganic NP-based immunoassays. Briefly, this approach is based on introducing a flow of a highly diluted nanoparticles suspension in the plasma so that fast MS analyser enables to detect a single nanoparticle per reading. In this way, every single nanoparticle produces a pack of ions in the ICP resulting in a transient signal. The frequency of transient signals is directly correlated to the concentration of the nanoparticles in the colloidal solution whereas their intensity is related to the nanoparticle size [48]. In this context, single particle mode ICP-MS can be employed to detect antibodies labelled with adequate nanoparticles in order to obtain absolute protein quantification [49].

4. Quantitative strategies

As already stressed before, the ideal ICP-MS species-independent elemental response would enable absolute protein

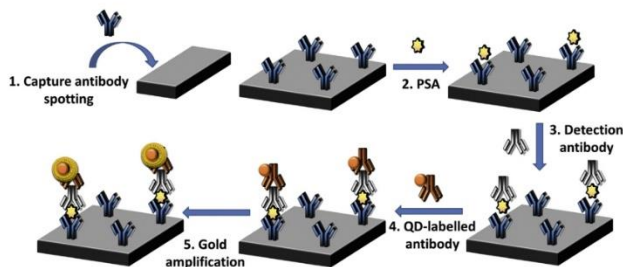


Fig. 3. Schematic diagram of sandwich immunoassay for the detection of human PSA based on gold enhancement with Mn-doped ZnS QDs tags. Reprinted from García-Cortés et al. (2016) [47], Copyright (2016), with permission from Elsevier.

quantification provided that an adequate quantification standard, containing the target element to be measured, is available. As a consequence, conventional external calibration methods, employing such elemental standards, can provide protein absolute quantities by the direct measurement of the target heteroatom, provided that the stoichiometry heteroatom:protein is known. Nevertheless, this approach is hindered by contamination occurrence, because any species in the sample containing the detected element, apart from the target protein, would contribute to the final heteroatom signal detected by ICP-MS. This is the main reason explaining that such approach has been mostly applied to pure or highly purified samples [13,50,51].

Most of the times two or more proteins need to be quantified in the same sample. In such cases availability of robust platforms to secure pre-MS separations of each and every protein is required if ICP-MS-based approaches are to be used. Quantification can be carried out by spiking a standard containing the heteroatom to the sample prior to the chromatographic separation, as shown in Fig. 1. This approach allows to determine an instrumental elemental response factor (peak area per ng of element injected), which could be used to quantify the element content of the other chromatographic peaks (i.e., some element-containing proteins in the sample mixture). A significant problem here is that chromatographic analysis (especially in reversed-phase chromatography so widely used in peptide/protein analysis) produces a significant variation of the response factor because of the variation of the LC mobile phase during the separation gradient (i.e., increasing organic content). This effect causes that elemental response is different for each of those species as they elute at different retention times. In order to correct such variations the use of organic sheath flows, which are added after chromatographic separations [24,52,53], can be employed.

Alternatively, the capacity of ICP-MS to measure isotopes enables to combine elemental ICP-MS detection with isotope dilution (ID) procedures to quantify elements that have more than one stable isotope [54]. This approach consists on the spiking of an isotopically enriched species (of known concentration and isotopic composition) to the sample, which results in an alteration of the element isotopic composition, so that quantification of the analyte can be carried out by ID, just from a simple isotope ratio determination. The spike species added can be an isotopically enriched analogous of the target analyte (i.e., species-specific ID speciation), which is added prior to the chromatographic analysis to correct sample losses or matrix effects. Alternatively, a non-specific

(generic) compound (i.e., species-unspecific ID speciation) that contains an enriched isotope of the detected heteroatom can be added on-line to the chromatographic eluent. Both types of spiking modes are shown in Fig. 1. Of course, the (species-unspecific ID approach does not correct for sample losses or incomplete recoveries. However, it enables quantification of all elemental species containing the target element just using a single standard, (e.g., an isotopically enriched inorganic compound) because the correction of any possible signal variations during chromatographic gradient is achieved after on-line addition of the spike and measurement of light/heavy isotope ratios. Of course, quantitative strategies based on ID for an element or its species are restricted to multi-isotopic elements.

Another very recent strategy consists of the combination of the addition of a generic element-containing internal standard (IS) together with species-unspecific ID quantification. Interestingly, such extra internal standardization results in reduction of the complexity of the isotope-dilution calculations and in compensation for injection errors [20].

On the other hand, elemental-tagged immunoassay quantification is commonly carried out based on typical immunoassay calibration curves [43]. Therefore, specific standards of the target protein are mandatory in such strategies. However, if the stoichiometry elemental label:antibody is known and controlled, biomolecule quantification could be achieved without the need of specific standards.

5. Novel applications of ICP-MS-based absolute protein quantitative approaches

The resolving power of the used pre-MS separation technique remains still a great restraint for ICP-MS applications to quantitative analytical proteomics in complex samples. Still this ICP-MS based hybrid approach holds great potential for the absolute quantification of peptides and intact proteins in simpler but important samples. This is the case of robust certification of peptide/protein standards, an essential task today in order to produce the isotope-labelled standards widely employed in molecular MS absolute quantitative proteomics (e.g., AQUA, PSAQ [11]). Of course, certification of such highly demanded synthesized standards for common molecular MS techniques requires protein specific certified standards which are not yet commercially available. So far, such certifications are usually carried out with amino acid analysis (AAA) and chemiluminescent nitrogen detection (CLN). However,

those approaches are lacking several analytical features including: (i) specificity, because the AAA approach detects amino acids independently of the original peptide, and CLN detects nitric oxide species formed from any nitrogen source in the sample/reagents; (ii) simplicity, as they require cumbersome sample preparation steps and purity assessment of the analyte; and (iii) accuracy and reproducibility, because all those sample preparation steps are sources of error and have to be perfectly controlled and characterized.

In any case, appropriate approaches for the reliable certification and quality control of the needed stable isotope labelled (SIL) standards is of utmost importance today because the vast majority of the present and near future practical approaches in absolute proteomic analysis rely on their applicability [1,11]. Their development should play a pivotal role in the application of the urgently demanded assurance protocols in quantitative proteomics. In this context, ICP-MS is increasingly becoming an attractive way-out for robust protein and peptide standards certification. As said before, if the stoichiometry heteroelement:protein/peptide is known, certification of a peptide/protein standard can be directly assessed with ICP-MS just with a simple, generic and, what is more important, certified standard (i.e., pure elements/compounds).

The scope and potential applicability of direct ICP-MS-based approaches in quantitative proteomics have been recently demonstrated for moderately complex samples by resorting to cutting-edge chromatography columns, able to provide adequate resolution and complete recoveries even for intact proteins [55]. As an example, absolute quantification of many different toxins (25–45) present in snake venoms without the need for specific standards has been recently carried out [28].

However, application of ICP-MS to real-life more complex samples (such as biological fluids or cell lysates) can only be addressed so far by means of the high selectivity provided by antibodies. Several studies based on elemental-tagged immunoassays have been reported to determine biomarkers at low levels in human serum samples, including human carcinoembryonic antigen (CEA) [56] or Her-2 [30]. Additionally, the combination of different types of labels and the capability of ICP-MS for simultaneous detection of many isotopes can be employed to develop multiplexed absolute protein determinations as well. This feature is increasingly becoming of great relevance in clinics because the measurement of a single biomarker is usually insufficient for robust clinical diagnostics [57]. In this vein, the simultaneous determination of different proteins in biological samples have been successfully reported for five cancer biomarkers in human serum [58] or two different proteases in urine and serum samples [59]. However, determination of early alarm biomarkers present at extremely low levels and capable of predicting disease at the earliest stage demands for ultrasensitive analytical approaches. In this line, amplification procedures have been successfully developed for ultrasensitive detection of CEA by precipitation of silver ions over the surface of immunogold nanoparticles in order to increase exponentially the number of ICP-MS detectable elements [60]. In the same line, a method based on gold deposition over the surface of Mn-doped QDs has been recently developed and reported for absolute prostate specific antigen (PSA) determination, at extremely low levels, in serum samples (below fg mL^{-1}) [47].

6. LA-ICP-MS as a quantitative tool for protein mapping studies

There is another important application trend of ICP-MS which is attracting a lot of attention in the latest years: the direct detection of target proteins in tissues samples by resorting to the coupling of a laser (for the direct solid ablation) and ICP-MS (for detection).

Laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS) has already been established as powerful tool for direct analysis of a wide variety of solid samples (i.e., geological, environmental, biological and medical samples) [61]. In particular, the distribution analysis of elements in solid biological samples is of key interest in life science today. LA-ICP-MS offers nowadays bio-imaging with high spatial resolution in the low micrometre range, excellent limits of detection and the possibility to obtain quantitative data. However, it also enables the capabilities of microanalysis, depth profiling analysis, and 2-dimensional elemental mapping. One of the main drawbacks of direct quantitative analysis of solid samples with LA-ICP-MS, however, is sample related “matrix effects” due to the difference in the interactions (e.g., absorptivity, reflectivity and thermal conductivity) between the laser beam and different sample matrices. This brings noticeable changes in the mass of analyte ablated per laser pulse in each case. An extensive overview about overcoming such limitations via internal standardization for LA-ICP-MS quantifications has been published in several recent reviews [29,62–64].

The general advantages of modern ICP-MS for quantification of proteins via natural heteroatoms (S, P, semi-metal) have already been documented [6]. The general drawback of the technique for the quantification however is the existence of several metalloproteins in the ablated area (i.e., various different proteins present in a tissue may contain the same heteroatom). Thus, again several approaches have been proposed to avoid this problem in the search for quantification and mapping of proteins in biological tissues by LA-ICP-MS: separation of the several proteins by gel electrophoresis (GE), selective direct elemental labelling and element-tagged immunoassay.

The capabilities of LA-ICP-MS for speciation of naturally heteroatom containing proteins (e.g., S, P), metalloproteins and labelled proteins after separation by gel electrophoresis has been systematically studied. C.C. Chery et al [65] reported the detection of selenoproteins in red blood cells extracts, after a 1-D separation in sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis, and the detection of selenium-containing proteins in yeast after 2-D electrophoresis (2D-GE). An alternative approach was applied to quantification of phosphoproteins and protein phosphorylation stoichiometry [66]. This strategy was based on the transfer of the gel-resolved proteins by electroblotting onto nitrocellulose (NC) or poly(vinylidene difluoride) (PVDF) membranes and detection by LA-ICP-MS. Then, the phosphorylation stoichiometry can be calculated from P/S ratio obtained from the integral of the ^{31}P and ^{34}S signals.

The GE-LA-ICP-MS was also applied for metalloproteins analysis. The advantages, limitations, and quantification strategies were discussed, and some limitations have to be considered for protein quantification via the bound metal [67]. Metalloproteins, in which the metal is coordinated (i.e. superoxide dismutase, transferrin), such metal can be lost during the sample preparation and electrophoresis process (e.g. by pH changes). In order to preserve the metal-protein binding, a separation in non-denaturing gel (native PAGE) is recommended [68]. Also, proteins must be extracted from tissue before their separation by GE. Therefore, the information on the distribution of the biomolecule within a thin tissue section is lost.

Several calibration strategies for quantification of trace elements in proteins separated by GE and detected by LA-ICP-MS were proposed including external calibration, internal standard and isotope dilution. Limbeck et al. [69] had critically compared and discussed the different quantification approaches proposed regarding the result obtained in the application described. External calibration method using protein standards electrophoretically separated or hydrated gels with standard solutions were the most traditional methodology used for selenoproteins, phosphoproteins

and metalloproteins [70]. In the external calibration approaches, incomplete or changes in ablation and/or ionization behaviour of the analytes are not taken into account. In order to overcome problems due to incomplete or to changes in ablation and/or ionization behaviour of the analytes, the ^{13}C signal is generally used as internal standard [69,71].

Isotopic dilution for absolute quantification of proteins separated in a gel and detected by LA-ICP-MS has been also reported. Species-specific isotope dilution (SSID) analysis with GE-LA-ICP-MS is a promising technique for the quantification of particular metal-binding proteins in biological samples. The potential of SSID combined with native GE and LA-ICP-MS was demonstrated for the absolute quantification of Fe-transferrin in serum [72]. The application of this strategy requires having the metalloproteins of interest isotopically enriched. To avoid this problem, species unspecific dilution analysis was also applied by Feng et al. [73] to determine Fe transferrin and albumin in human serum by non-denaturing GE combined with species-unspecific IDA.

The combination of immunoassay with LA-ICP-MS can also facilitate the multiparametric analysis through elemental tagging. Quantification of several biomolecules (e.g., proteins, peptides and related molecules) in complex sample matrices has been reported [42]. The specific reaction antigen/antibody provides the selectivity required for reliable chemical speciation with LA-ICP-MS. For instance, an analytical method was developed in microarray chips to determine holoceruloplasmin (holo-CP) in serum using LA-ICP-MS. Ceruloplasmin is a major copper-containing protein in plasma and has been reported to play an essential role in human neurodegenerative diseases. For its determination, the ceruloplasmin (CP) antibody was immobilized on the surface of the microarray chip. Such antibody reacts selectively with the CP present in serum sample. Since each holo-CP in serum contains six Cu ions per molecule, the protein concentration was estimated by determining first the Cu concentration with LA-ICP-MS and the appropriate calibration curve was obtained by the standard addition method [74].

Elemental labelling techniques using stable isotopes for quantitative analysis in proteomics (i.e., element coded affinity tag – ECAT) has shown to offer a promising alternative with enough sensitivity and selectivity to be applied to biomolecules quantification with ICP-MS [31]. Again, the usual labelling reagents are bifunctional ligands with a reactive group able to bind the analyte/protein. Labelling techniques utilizing immuno-chemistry (i.e. labelling antibodies) for the selective and sensitive detection of antigens has already been implemented for quantitative studies with LA-ICP-MS [36,75]. Esteban et al. [76] proposed a sensitive, accurate and fast absolute quantification method of intact albumin and transferrin in serum by using metal coded affinity tags (MeCATs) combined with GE separation and (LA)-ICP-MS detection and label-specific IDA quantification. This group reported [77] the quantitative analysis of proteins (labelled with commercially available chelating compound of stable isotopes of Eu, Tb and Ho) using a SDS-PAGE separation and laser ablation ICP-MS detection (after electroblotting of the target proteins onto NC membranes). Similarly, a LA-ICP-MS based method for multiplexed immunoblot analysis was developed to study the Mn-dependent protein dynamics of photosystem in barley [78]. A multiparametric microarray for protein analysis, on a solid support combining lanthanide-labelled antibodies and LA-ICP-MS detection, was also developed using an 8-plex antibody assay using Eu, Er, Ho, Lu, Nd, Pr, Tb and Tm as labels. This assay enabled the simultaneous analysis of 8 different cytochromes from 14 different rat-liver microsomes on the same microarray (See Fig. 4) [79].

The popular labelling with such bifunctional ligands is efficient, but suffers from non-specificity to the analyte proteins, since all

free and available amine/cysteine groups in the whole sample have the possibility to react. Protein quantification through a select ligand requires the knowledge of the achieved exact labelling degree (a prerequisite for the determination of the amount of the antigen in the sample). Recently, a novel quantitative labelling concept [80] has been demonstrated resulting in one heteroatom label per antibody. This enables the determination of the amount of introduced lanthanide ions and then the quantification of the molar amount of the antibody which is bound to the target protein. This labelling technique is based on the use of small antibody binding domains, C2Fc and C2Fab, which are modified with MeCAT tags. Then, the desired antibodies can be labelled with these modified C2 domains by mixing and subjecting them to UV light. The applicability of six C2 tagged antibodies was demonstrated in a LA-ICP-MS based multiplex western blot immunoassay. Quantification of the labelled antibody–antigen complexes was possible by the use of a calibration membrane and amounts between 30 and 3.0 fmol per protein band were determined [78].

In the late five years we have witnessed also a growing interest in studying the combined elemental and molecular distribution of elements in biological tissues while LA-ICP-MS has emerged as one of popular and powerful elemental imaging for heteroatom containing proteins [81,82]. To maintain information on the spatial elemental distribution thin section of cryogenically (or paraffin-embedded) biological tissues, samples has to be analysed without any prior homogenization. Of course, the major limitation for LA-ICP-MS robust quantitative bioimaging arise from the inhomogeneity of the biological tissue samples (i.e., a single section of the biological sample may significantly differ in the measured composition). Several strategies have been proposed to improve the trace element quantification with a spatial resolution within 5–200 μm . Matrix effects may occur during the ablation process itself during aerosol transport and/or ionization process in the ICP. Thus, adequate calibrations must be designed in order to compensate or alleviate such possible differences among samples and standards, to obtain reliable quantitative data. Current calibration approaches for elemental imaging of biological samples have been revised [82,83]. Those strategies include the use of laboratory matrix matched standards or gelatine or agarose spiked with appropriate amounts of the elements to be analysed [84]. The use of internal standards can help to correct changes in the heteroatom signal intensities during the long analysis times required for imaging and in the matrix composition of the analysed samples. As internal standards sample-containing elements, homogeneously distributed in the sample (e.g. C and S), have been proposed [64,83]. Alternatively, exogenous appropriate internal standards can be applied as a thin layer dried aerosol or by deposition of a homogeneous thin gold film on the tissue surface [85].

Moreover, spatially resolved imaging of the actual proteins has been also attempted by resorting to protein labelling with exogenous tags and final LA-ICP-MS measurement. Different labelling reagents have been used for such exogenous immuno-imaging, including metals (e.g., lanthanides), conventional bifunctional ligands, isotopically enriched polymer tags, and/or nanoparticles. It is common place that immunohistochemistry with fluorescence detection has been the type of assay most often used for the proteins (i.e., biomarkers) localization (mapping) in tissue sections. The principal limitations of such molecular detection technique for multiplexing strategies are the spectral overlap and saturation effects. Hutchinson et al. [86] reported for the first time the use of LA-ICP-MS for imaging of Eu- and Ni-coupled antibodies to amyloid precursor protein and β -amyloid peptide in histological sections of a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. The same strategy was applied to imaging purposes of biomarkers in cancer tissues. Three tumour biomarkers (CK-7, HER-2 and MUC-1) were analysed with LA-ICP-MS

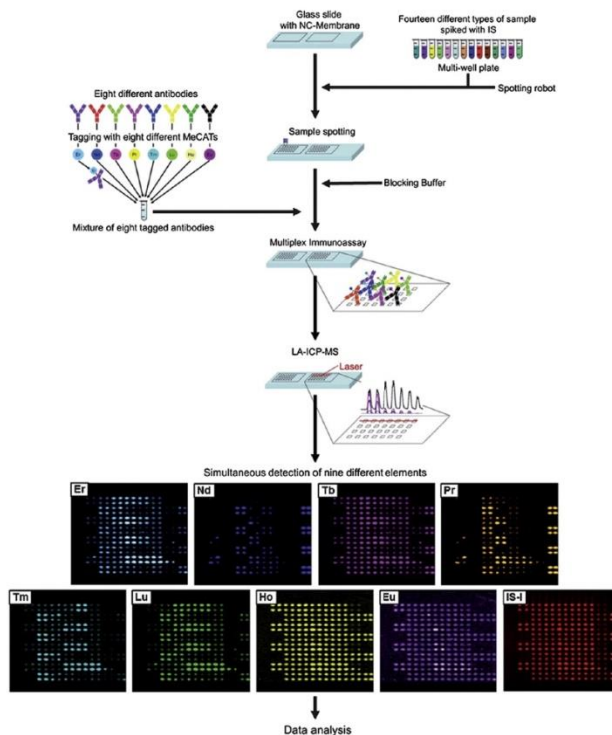


Fig. 4. Experimental approach of a multi-parametric reverse phase protein microarray. Protein extracts (including one internal standard) were spotted onto a NC slide and exposed to a pool of eight lanthanides tagged antibodies. The array was analysed via LA-ICP-MS by ablating the whole NC slide in line scans. Reproduced from Waentig et al. (2013) [79] with permission of The Royal Society of Chemistry.

in a single tissue section simultaneously, tagging the corresponding antibodies with different lanthanides [87].

Recently, Hoesl et al. reported the LA-ICP-MS imaging of the protein Her-2 in a formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) breast tissue section (Fig. 5) [88]. The ink-jet printed internal standardization approach employed enhanced the elemental image resolution and reproducibility of the analysed paraffin embedded samples.

The potential of LA-ICP-MS for spatially resolved bioimaging of the distribution of silver and gold nanoparticles in individual fibroblast cells, upon different incubation experiments, has been also reported [89]. Nanoparticles were visualized with respect to cellular substructures and found to accumulate more and more in the perinuclear region with increasing incubation time. Matrix matched calibration was used for quantification of the number of metal nanoparticles at the single-cell level. Those results provide

insight into nanoparticle/cell associations/interactions and have implications for the development of analytical methods in toxicity studies, tissue diagnostics and therapeutics [89].

Finally, very recently, LA combined with both elemental and molecular MS has been also proposed to enable spatially resolved metal-protein speciation [90]. Reifschneider and coworkers used a lanthanide complex (thulium-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-*n,n,n,n*-tetramethyl-1,4,7,10-tetraacetic acid) for quantitative cell tracking in mouse brain tissue with LA-ICP-MS, as a complementary method for in vivo experiments with Magnetic Resonance Imaging (MRI). A matrix-matched standard, based on egg yolk, was used for external calibration allowing the thulium quantification in different tissue samples [91]. More recently, even a method for a quantitative and multiplexing immuno-imaging of single eukaryotic cells, by using selected lanthanide-labelled antibodies, has been developed [92].

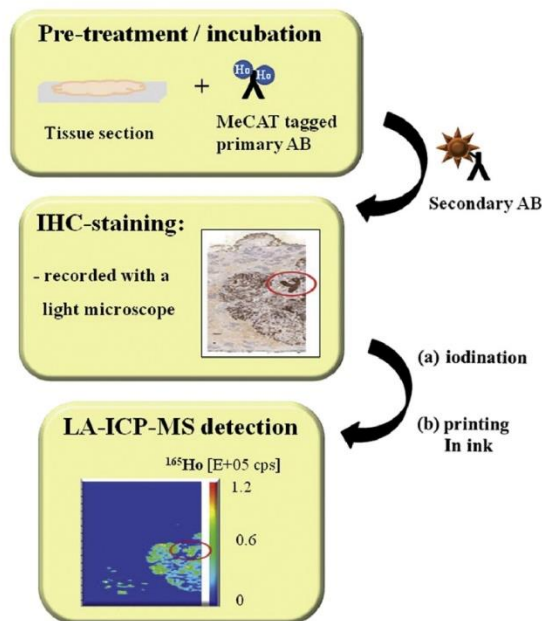


Fig. 5. Workflow for the detection of tumour areas in FFPE breast tissue sections. Deparaffinized tissue sections were incubated with the holmium tagged anti-Her-2 primary antibody, followed by the application of a secondary antibody (IHC-staining) and by iodination. The tissue sections were first characterized by histology after application of a secondary antibody suitable for IHC. Afterwards the tissue sections were covered with the internal standard indium. After drying of the applied ink the tissue sections were subjected to LA-ICP-MS for holmium, iodine and indium detection. Reproduced from Hoest et al. (2016) [88] with permission of The Royal Society of Chemistry.

Finally, complementary molecular and elemental imaging methods, combining spatially resolved information from Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Mass Spectrometry Imaging (MALDI-MSI) and from LA-ICP-MS, have been used to investigate the distribution of metalloproteinase MMP-11 (a Zn dependent enzyme) and Zn, in breast cancer tissues [93]. The observed elemental and molecular spatial distributions are correlated and they are compared with the histological images in an attempt to differentially assess disease versus non-diseased states by resorting to element and biomolecule differential distributions. The integration of both methodologies described offers a powerful tool for the creation of spatially resolved maps to correlate a multitude of targeted molecular species and their heteroelements in thin tissue sections "in situ".

7. A forward look

The detection of naturally-present heteroatoms using ICP-MS equipped with tandem MS (ICP-QQQ) can provide a simple, fast, and accurate method for protein quantification in relatively simple

samples without the need for any species-specific standard. This is obviously the case of the certification of the mass purity of needed protein standards (isotopically labelled or not), required in most of the established molecular MS-based approaches used in quantitative targeted proteomics. Interestingly, the recent synergistic combination of ICP-QQQ with state of the art LC stationary phases and molecular mass spectrometry has expanded the application field to relatively complex samples. A major challenge ahead is to achieve pre-MS separation of each and every protein species in such complex samples.

On the other hand, the combination of the unique features of ICP-MS detection with the selectivity of element-tagged antibodies currently provides an outstanding tool to face the absolute, sensitive, and robust quantification of a selected group of targeted proteins in complex real samples (e.g., panel of biomarkers involved in the diagnosis and/or prognosis of a given disease). Looking ahead, the use of metallic nanoparticles together with novel amplification methods will play here an important role soon.

Imaging by LA-ICP-MS has become an established analytical technique. Applications of this exciting technology are growing

steadily because semi quantitative information obtained by ICP-MS from the metal bound to the target protein can be now summed to its direct localization in the tissue provided by MALDI-MS/MS. Continued development on new calibration and quantification strategies, for heteroatom and biomolecule, to meet the increasing and challenging demands of a myriad of possible biomedical applications guarantee a bright future to this trend.

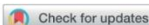
Acknowledgements

Authors acknowledge financial support from Ministerio de Economía y Competitividad (Madrid, Spain) through CTQ2016-79412-P and BES-2014-068032 (F.C.) and Consejería de Economía y Empleo (Principado de Asturias, Spain) through (FC-15-GRUPIN14-092). Grant FPU15/04989 (L.C.B.) from the Ministerio de Educación (Madrid, Spain) is also acknowledged.

References

- [1] M. Bantscheff, S. Lemeer, M.M. Savitski, B. Kuster, Quantitative mass spectrometry in proteomics: critical review update from 2007 to the present, *Anal. Bioanal. Chem.* 404 (2012) 939–965.
- [2] P. Mallick, B. Kuster, Perspective proteomics: a pragmatic perspective, *Nat. Biotechnol.* 28 (2010) 695–709.
- [3] S. Ong, M. Mann, Mass spectrometry – based proteomics turns quantitative, *Nat. Chem. Biol.* 1 (2005) 252–262.
- [4] A. Sanz-Medel, ICP-MS for multiples absolute determinations of proteins, *Anal. Bioanal. Chem.* 398 (2010) 1853–1859.
- [5] A. Tholey, D. Schaumlöffel, Metal labeling for quantitative protein and proteome analysis using inductively-coupled plasma mass spectrometry, *Trends Anal. Chem.* 29 (2010) 399–408.
- [6] A. Sanz-Medel, M. Montes-Bayón, J. Bettmer, M.L. Fernández-Sánchez, J. Ruiz Encinar, ICP-MS for absolute quantification of proteins for heteroatom-tagged, targeted proteomics, *Trends Anal. Chem.* 40 (2012) 52–63.
- [7] F. Calderón-Celis, J. Ruiz Encinar, A. Sanz-Medel, Standardization approaches in absolute quantitative proteomics with mass spectrometry, *Mass Spectrom. Rev.* (2017), <https://doi.org/10.1002/mas.21542>.
- [8] A.H. El-khatib, D. Esteban-Fernández, M.W. Linscheid, Dual labeling of biomolecules using MeCAT and DOTF derivatives: application to quantitative proteomics, *Anal. Bioanal. Chem.* 403 (2012) 2255–2267.
- [9] A. Sanz-Medel, Heteroatom(isotope)-tagged proteomics via ICP-MS: screening and quantification of proteins and their post-translational modifications, *Anal. Bioanal. Chem.* 391 (2008) 885–894.
- [10] A. Sanz-Medel, “Heteroatom-tagged” quantification of proteins via ICP-MS, *Anal. Bioanal. Chem.* 408 (2016) 5359–5395.
- [11] O. Chahrouh, D. Cobice, J. Malone, Stable isotope labelling methods in mass spectrometry-based quantitative proteomics, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 113 (2015) 2–20.
- [12] J. Bettmer, M. Montes Bayón, J. Ruiz Encinar, M.L. Fernández Sánchez, M. del R. Fernández de la Campa, A. Sanz Medel, The emerging role of ICP-MS in proteomic analysis, *J. Proteomics* 72 (2009) 989–1005.
- [13] M. Wang, W.-Y. Feng, Y.-L. Zhao, Z.-F. Chai, ICP-MS-based strategies for protein quantification, *Mass Spectrom. Rev.* 29 (2010) 326–348.
- [14] S. Mounicou, J. Szpunar, R. Lobinski, Metallomics: the concept and methodology, *Chem. Soc. Rev.* (2009) 1119–1138.
- [15] A. Sarmiento-Gonzalez, J. Ruiz Encinar, A.M. Cantarero-Roldán, J.M. Marchante-Gayón, A. Sanz-Medel, HPLC-ICPMS and stable isotope-labeled approaches to assess quantitatively Ti(IV) uptake by transferrin in human blood serum, *Anal. Chem.* 80 (2008) 8702–8711.
- [16] O. Chahrouh, J. Malone, Applications in quantitative proteomics inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) applications in quantitative proteomics, *Protein Pept. Lett.* 24 (2017) 1–14.
- [17] E. Bolea-Fernández, E. Balcaen, M. Resano, F. Vanhaecke, Overcoming spectral overlap via inductively coupled plasma-tandem mass spectrometry (ICP-MS/MS): A tutorial review, *J. Anal. At. Spectrom.* 32 (2017) 1660–1679.
- [18] Ó. Palacios, J. Ruiz Encinar, D. Schaumlöffel, R. Lobinski, Fractionation of selenium-containing proteins in serum by multiaffinity liquid chromatography before size-exclusion chromatography-ICPMS, *Anal. Bioanal. Chem.* 384 (2006) 1276–1283.
- [19] S. Díez Fernández, N. Sugishima, J. Ruiz Encinar, A. Sanz-Medel, Triple quad ICPMS (ICPQQQ) as a new tool for absolute quantitative proteomics and phosphoproteomics, *Anal. Chem.* 84 (2012) 5851–5857.
- [20] F. Calderón-Celis, S. Díez-Fernández, J.M. Costa-Fernández, J. Ruiz Encinar, J.J. Calvete, A. Sanz-Medel, Elemental mass spectrometry for absolute intact protein quantification without protein-specific standards: application to snake venom, *Anal. Chem.* 88 (2016) 9699–9706.
- [21] P. Giusti, D. Schaumlöffel, J. Ruiz Encinar, J. Szpunar, Interfacing reversed-phase nanoHPLC with ICP-MS and on-line isotope dilution analysis for the accurate quantification of selenium-containing peptides in protein tryptic digests, *J. Anal. At. Spectrom.* 20 (2005) 1101–1107.
- [22] P. Giusti, H.P. Homme, J. Szpunar, R. Lobin, Pre-column isotope dilution analysis in nanoHPLC – ICPMS for absolute quantification of sulfur-containing peptides, *Anal. Chem.* 79 (2007) 2859–2868.
- [23] D. Schaumlöffel, J. Ruiz Encinar, R. Lobinski, Development of a sheathless interface between reversed-phase capillary HPLC and ICPMS via a microflow total consumption nebulizer for selenopeptide mapping, *Anal. Chem.* 75 (2003) 6837–6842.
- [24] A. Perera Navaza, J. Ruiz Encinar, M. Carrascal, J. Abián, A. Sanz-Medel, Absolute and site-specific quantification of protein phosphorylation using integrated elemental and molecular mass spectrometry: its potential to assess phosphopeptide enrichment procedures, *Anal. Chem.* 80 (2008) 1777–1787.
- [25] M. Wind, A. Eisenmenger, W.D. Lehmann, Modified direct injection high efficiency nebulizer with minimized dead volume for the analysis of biological samples by micro- and nano-LC-ICP-MS, *J. Anal. At. Spectrom.* 17 (2001) 21–26.
- [26] R. Hayes, A. Ahmed, T. Edge, H. Zhang, Core-shell particles: preparation, fundamentals and applications in high performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1357 (2014) 36–52.
- [27] V. González-Ruiz, A.I. Olives, M.A. Martín, Core-shell particles lead the way to renewing high-performance liquid chromatography, *Trends Anal. Chem.* 64 (2015) 17–28.
- [28] F. Calderón-Celis, L. Cid-Barrio, J. Ruiz Encinar, A. Sanz-Medel, J.J. Calvete, Absolute venomics: absolute quantification of intact venom proteins through elemental mass spectrometry, *J. Proteomics* 164 (2017) 33–42.
- [29] A. Susolini, J. Susanne Becker, J. Sabine Becker, Laser ablation ICP-MS: application in biomedical research, *Mass Spectrom. Rev.* 36 (2017) 47–57.
- [30] T. Mairinger, G. Wozniak-Knopp, F. Rükler, G. Koellensperger, S. Hann, Elemental labeling of antibody fragments for ICP-MS based immunoassays, *J. Anal. At. Spectrom.* 31 (2016) 2330–2337.
- [31] D. Kretschy, G. Koellensperger, S. Hann, Elemental labeling combined with liquid chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry for quantification of biomolecules: a review, *Anal. Chim. Acta* 750 (2012) 98–110.
- [32] Y. Guo, L. Chen, L. Yang, Q. Wang, Counting sulphydryls and disulfide bonds in peptides and proteins using mercuric ions as an MS-tag, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 19 (2008) 1108–1113.
- [33] D.J. Kutscher, M.E. del Castillo Busto, N. Zinn, A. Sanz-Medel, J. Bettmer, Protein labelling with mercury tags: fundamental studies on ovalbumin derivatized with p-hydroxymercuribenzoic acid (pHMB), *J. Anal. At. Spectrom.* 23 (2008) 1359–1364.
- [34] B. Campanella, E. Bramanti, Detection of proteins by hyphenated techniques with endogenous metal tags and metal chemical labelling, *Analyst* 139 (2014) 4124–4153.
- [35] A.P. Navaza, J. Ruiz Encinar, A. Ballesteros, J.M. Gonzalez, A. Sanz-Medel, Capillary HPLC-ICPMS and tyrosine iodination for the absolute quantification of peptides using generic standards, *Anal. Chem.* 81 (2009) 5390–5399.
- [36] T.C. de Bang, S. Husted, Lanthanide elements as labels for multiplexed and targeted analysis of proteins, DNA and RNA using inductively-coupled plasma mass spectrometry, *Trends Anal. Chem.* 72 (2015) 45–52.
- [37] C. Giesen, I. Wagentig, L. Panne, N. Jakubowski, History of inductively coupled plasma mass spectrometry-based immunoassays, *Spectrochim. Acta B* 76 (2012) 27–39.
- [38] R. Ahrends, S. Pieper, A. Kuhn, H. Weisshoff, M. Hamerster, T. Lindemann, C. Schele, K. Lehmann, K. Taubner, M.W. Linscheid, A metal-coded affinity tag approach to quantitative proteomics, *Mol. Cell. Proteomics* 6 (2007) 1907–1916.
- [39] U. Bergmann, R. Ahrends, B. Neumann, C. Schele, M.W. Linscheid, Application of metal-coded affinity tags (MeCAT): absolute protein quantification with top-down and bottom-up workflows by metal-coded tagging, *Anal. Chem.* 84 (2012) 5268–5275.
- [40] S. Bomke, M. Sperling, U. Karst, Organometallic derivatizing agents in bioanalysis, *Anal. Bioanal. Chem.* 397 (2010) 3483–3494.
- [41] X. Wang, P. Dong, W. Yun, Y. Xu, P. He, Y. Fang, A solid-state electrochemiluminescence biosensing switch for detection of thrombin based on ferrocene-labeled molecular beacon aptamer, *Biosens. Bioelectron.* 24 (2009) 3288–3292.
- [42] R. Liu, P. Wu, L. Yang, X. Hou, Y. Lv, Inductively coupled plasma mass spectrometry-based immunoassay: a review, *Mass Spectrom. Rev.* 33 (2014) 373–393.
- [43] A.R. Montoro Bustos, L. Trapiella-alfonso, J. Ruiz Encinar, J.M. Costa-Fernández, R. Pereiro, A. Sanz-medel, Elemental and molecular detection for Quantum Dots-based immunoassays: a critical appraisal, *Biosens. Bioelectron.* 33 (2012) 165–171.
- [44] S.C. Bendall, E.F. Simonds, P. Qiu, E.D. Amir, P.O. Krutzik, R. Finck, R. V. Bruggner, R. Melamed, A. Trejo, O.I. Ornatsky, R.S. Baldeas, S.K. Plevitski, K. Sachs, D. Peier, S.D. Tanner, G.P. Nolan, Single-cell mass cytometry of differential, *Science* (80-) 332 (2011) 687–695.
- [45] S.D. Tanner, D.R. Bandura, O. Ornatsky, V.I. Baranov, M. Nitz, M.A. Winnik, Flow cytometer with mass spectrometer detection for massively multiplexed single-cell biomarker assay, *Pure Appl. Chem.* 80 (2008) 2627–2641.
- [46] X. Lou, G. Zhang, I. Herrera, R. Kniach, O. Ornatsky, V. Baranov, M. Nitz, M.A. Winnik, Polymer-based elemental tags for sensitive bioassays, *Angew. Chem. Int. Ed.* 46 (2007) 6111–6114.

- [47] M. García-Cortes, J. Ruiz Encinar, J.M. Costa-Fernandez, A. Sanz-Medel, Highly sensitive nanoparticle-based immunoassays with elemental detection: application to prostate-specific antigen quantification, *Biosens. Bioelectron.* 85 (2016) 128–134.
- [48] F. Laborda, E. Bolea, J. Jimenez-Lamana, Single particle inductively coupled plasma: powerful tool for nanoanalysis, *Anal. Chem.* (2014) 2270–2278.
- [49] R. Liu, Z. Xing, Y. Lv, S. Zhang, X. Zhang, Sensitive sandwich immunoassay based on single particle mode inductively coupled plasma mass spectrometry detection, *Talanta* 83 (2010) 48–54.
- [50] E. Svantesson, J. Pettersson, K.E. Markides, The use of inorganic elemental standards in the quantification of proteins and biomolecular compounds by inductively coupled plasma spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.* 17 (2002) 481–486.
- [51] J. Szpanar, Advances in analytical methodology for bioinorganic speciation analysis: metalloomics, metalloproteomics and heteroatom-tagged proteomics and metabolomics, *Analyst* 130 (2005) 442–465.
- [52] A. Pereira Navaza, J. Ruiz Encinar, A. Sanz-Medel, Absolute and accurate quantification of protein phosphorylation by using an elemental phosphorus standard and element mass spectrometry, *Angew. Chem. Int. Ed.* 46 (2007) 569–571.
- [53] D. Proffrock, A. Prange, Compensation of gradient related effects when using capillary liquid chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry for the absolute quantification of phosphorylated peptides, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 6706–6715.
- [54] J.L. García Alonso, P. Rodríguez-González, Isotope Dilution Mass Spectrometry, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 2013.
- [55] J.J. Calvete, D. Petras, F. Caldeiro-Celis, B. Lamotte, J.R. Encinar, A. Sanz-Medel, Protein-specific quantitative venomics: looking through a crystal ball, *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 23 (2017) 23–27.
- [56] H. Peng, B. Chen, M. He, Y. Zhang, B. Hu, Magnetic quantitative immunoanalysis of carcinoembryonic antigen by ICP-MS with mercury labels, *J. Anal. At. Spectrom.* 26 (2011) 1217–1223.
- [57] M. Careri, L. Eiviri, A. Mangia, Element-tagged immunoassay with inductively coupled plasma mass spectrometry for multianalyte detection, *Anal. Bioanal. Chem.* 393 (2009) 57–61.
- [58] M. Terenghi, L. Eiviri, M. Careri, A. Mangia, R. Labinski, Multiplexed determination of protein biomarkers using metal-tagged antibodies and size exclusion chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry, *Anal. Chem.* 81 (2009) 9440–9448.
- [59] X. Yan, L. Yang, Q. Wang, Lanthanide-coded protease-specific peptide-nanoparticle probes for a label-free multiplex protease assay using element mass spectrometry: a proof-of-concept study, *Angew. Chem. Int. Ed.* 50 (2011) 5130–5133.
- [60] R. Liu, X. Liu, Y. Tang, L. Wu, X. Hou, Y. Lv, Highly sensitive immunoassay based on immunogold-silver amplification and inductively coupled plasma mass spectrometric detection, *Anal. Chem.* 83 (2011) 2330–2336.
- [61] N.S. Moghalaka, J.L. Gardes-Lorenz, Laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry: principles and applications, *Appl. Spectrosc. Rev.* 41 (2006) 131–150.
- [62] D. Pozebon, G.L. Scheffler, V.L. Dressler, M.A.G. Nunes, Review of the applications of laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS) to the analysis of biological samples, *J. Anal. At. Spectrom.* 29 (2014) 2204–2228.
- [63] D. Pozebon, G.L. Scheffler, V.L. Dressler, Recent applications of laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS) for biological sample analysis: a follow-up review, *J. Anal. At. Spectrom.* 32 (2017) 890–919.
- [64] N. Millszkievicz, S. Walaś, A. Tobiasz, Current approaches to calibration of LA-ICP-MS analysis, *J. Anal. At. Spectrom.* 30 (2015) 327–338.
- [65] C.C. Chery, D. Günther, B. Cornelis, F. Vanhaecke, L. Moens, Detection of metals in proteins by means of polyacrylamide gel electrophoresis and laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry: application to selenium, *Electrophoresis* 24 (2003) 3305–3313.
- [66] R. Krüger, D. Küller, R. Pallisó, A. Burkovski, W.D. Lehmann, Protein and proteome phosphorylation stoichiometry analysis by element mass spectrometry, *Anal. Chem.* 78 (2006) 1987–1994.
- [67] A. Sussulini, J. Sabine Becker, Combination of PAGE and LA-ICP-MS as an analytical workflow in metalloomics: state of the art, new quantification strategies, advantages and limitations, *Metalloomics* 3 (2011) 1271–1279.
- [68] A.B. Nowakowski, W.J. Wolbig, D.H. Petering, Native SDS-PAGE: high resolution electrophoretic separation of proteins with retention of native properties including bound metal ions, *Metalloomics* 6 (2014) 1068–1078.
- [69] A. Limbeck, P. Galler, M. Bonta, G. Bauer, W. Nischkau, F. Vanhaecke, Recent advances in quantitative LA-ICP-MS analysis: challenges and solutions in the life sciences and environmental chemistry, *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (2015) 6593–6617.
- [70] C. Ballhaut, F. Claverie, C. Pecheyran, S. Mounicou, R. Grimaud, R. Lobinski, Sensitive detection of selenium species in gel electrophoresis by high repetition rate femtosecond laser ablation-inductively coupled plasma mass spectrometry, *Anal. Chem.* 79 (2007) 6874–6880.
- [71] M.A.G. Nunes, M. Voss, G. Corazza, E.M.M. Flores, V.L. Dressler, External calibration strategy for trace element quantification in botanical samples by LA-ICP-MS using filter paper, *Anal. Chem. Acta* 905 (2016) 51–57.
- [72] I. Konz, B. Fernandez, M.L. Fernandez, R. Pereira, A. Sanz-Medel, Absolute quantification of human serum transferrin by species-specific isotope dilution laser ablation ICP-MS, *Anal. Chem.* 83 (2011) 5353–5360.
- [73] L. Feng, D. Zhang, J. Wang, D. Shen, H. Li, A novel quantification strategy of transferrin and albumin in human serum by species-unspecific isotope dilution laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), *Anal. Chem. Acta* 884 (2015) 19–25.
- [74] J. Joo, H.B. Lim, LA-ICP-MS with microarray chip sampling to determine holoceruloplamin in serum, *J. Anal. At. Spectrom.* 27 (2012) 1069–1073.
- [75] Z. Liu, X. Li, G. Xiao, B. Chen, M. He, B. Hu, Application of inductively coupled plasma mass spectrometry in the quantitative analysis of biomolecules with exogenous tags: a review, *Trends Anal. Chem.* 93 (2017) 78–101.
- [76] D. Esteban-Fernández, F.S. Bierkandt, M.W. Linscheid, MeCAT labeling for absolute quantification of intact proteins using label-specific isotope dilution ICP-MS, *J. Anal. At. Spectrom.* 27 (2012) 1701–1708.
- [77] L. Waentig, N. Jakubowski, S. Hardt, C. Scheher, P.H. Roos, M.W. Linscheid, Comparison of different chelates for lanthanide labeling of antibodies and application in a Western blot immunoassay combined with detection by laser ablation (LA-ICP-MS), *J. Anal. At. Spectrom.* 27 (2012) 1311–1320.
- [78] T.C. da Bang, J. Petersen, P.R. Pedas, A. Rogowska-Wrzemiska, G.N. Jensen, J.K. Schjorring, P.E. Jensen, J.J. Thelen, S. Husted, A laser ablation ICP-MS based method for multiplexed immunoblot analysis: applications to manganese-dependent protein dynamics of photosystem II in barley (*Hordeum vulgare* L.), *Plant J.* 83 (2015) 555–565.
- [79] L. Waentig, S. Techriz, N. Jakubowski, P.H. Roos, A multi-parametric microarray for protein profiling: simultaneous analysis of 8 different cytochromes via differentially element tagged antibodies and laser ablation ICP-MS, *Analyst* 138 (2013) 6309–6315.
- [80] S. Kanje, A.J. Herrmann, S. Hober, L. Mueller, Next generation of labeling reagents for quantitative and multiplexing immunoassays by the use of LA-ICP-MS, *Analyst* 141 (2016) 6374–6380.
- [81] J. Sabine Becker, Imaging of metals in biological tissue by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS): state of the art and future developments, *J. Mass Spectrom.* 48 (2013) 255–268.
- [82] J. Sabine Becker, A. Matusch, B. Wu, Bioimaging mass spectrometry of trace elements – recent advance and applications of LA-ICP-MS: a review, *Anal. Chim. Acta* 835 (2014) 1–18.
- [83] D. Hare, C. Austin, P. Doble, Quantification strategies for elemental imaging of biological samples using laser ablation-inductively coupled plasma mass spectrometry, *Analyst* 137 (2012) 1527–1537.
- [84] R. González de Vega, M.L. Fernández-Sánchez, J. Pisonero, N. Eiró, F.J. Vizoso, A. Sanz-Medel, Quantitative bioimaging of Ca, Fe, Cu and Zn in breast cancer tissues by LA-ICP-MS, *J. Anal. At. Spectrom.* 32 (2017) 671–677.
- [85] I. Konz, B. Fernandez, M.L. Fernandez, R. Pereira, H. Gonzalez, L. Aharez, M. Coca-Prados, A. Sanz-Medel, Gold internal standard correction for elemental imaging of soft tissue sections by LA-ICP-MS: element distribution in eye microstructures, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 3091–3096.
- [86] R.W. Hutchinson, A.G. Cox, C.W. McLeod, P.S. Marshall, A. Harper, E.L. Dawson, D.R. Howlett, Imaging and spatial distribution of β -amyloid peptide and metal ions in Alzheimer's plaques by laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry, *Anal. Biochem.* 346 (2005) 225–233.
- [87] C. Giesen, T. Mairinger, L. Khoury, L. Waentig, U. Panne, Multiplexed immunohistochemical detection of tumor markers in breast cancer tissue using laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry, *Anal. Chem.* 83 (2011) 8177–8183.
- [88] S. Hoels, B. Neumann, S. Techriz, G. Sauter, R. Simon, H. Schlüter, M.W. Linscheid, F. Theuring, N. Jakubowski, L. Mueller, Internal standardization of LA-ICP-MS immune imaging via printing of universal metal spiked inks onto tissue sections, *J. Anal. At. Spectrom.* 31 (2016) 801–808.
- [89] D. Drescher, C. Giesen, H. Traub, U. Panne, J. Knepp, N. Jakubowski, Quantitative imaging of gold and silver nanoparticles in single eukaryotic cells by laser ablation ICP-MS, *Anal. Chem.* 84 (2012) 9684–9688.
- [90] C. Herdering, C.A. Wehe, G. Reifschneider, I. Raj, G. Ciarinboli, K. Diebold, C. Becker, M. Sperling, U. Karst, Laser ablation based bioimaging with simultaneous elemental and molecular mass spectrometry: towards spatially resolved speciation analysis, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 27 (2013) 2588–2594.
- [91] O. Reifschneider, K.S. Wenzler, K. Strobel, R. Schmidt, M. Masthoff, M. Sperling, C. Faber, U. Karst, Elemental bioimaging of thulium in mouse tissues by laser ablation-icpms as a complementary method to heteronuclear proton magnetic resonance imaging for cell tracking experiments, *Anal. Chem.* 87 (2015) 4225–4230.
- [92] L. Mueller, A.J. Herrmann, S. Techriz, U. Panne, N. Jakubowski, Quantitative characterization of single cells by use of immunocytochemistry combined with multiplex LA-ICP-MS, *Anal. Bioanal. Chem.* 409 (2017) 3667–3676.
- [93] R. Gonzalez de Vega, M.L. Fernández-Sánchez, N. Eiró, F.J. Vizoso, M. Sperling, U. Karst, Multimodal laser ablation/desorption imaging analysis of Zn and MMP-11 in breast tissues, *Anal. Bioanal. Chem.* (2017). <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0537-x>.



Cite this: DOI: 10.1039/d0ja00162g

Quantitative assessment of cellular uptake and differential toxic effects of HgSe nanoparticles in human cells

Laura Cid-Barrio, [†]†^a Diego Bouzas-Ramos, [†]†^a Alfonso Salinas-Castillo, ^b Yasumitsu Ogra, ^c Jorge Ruiz Encinar [†]†^a and José M. Costa-Fernández [†]†^a

Bio-formation and biodistribution of mercury selenide (HgSe) nanoparticles (NPs), as the ultimate metabolic product in the Hg detoxification pathway, is an important environmental and toxicological issue not well understood nowadays. In this work, we revealed for the first time the cellular uptake and accumulation of HgSe NPs in one embryonic and one tumour human cell line (HEK 293 and HeLa). For this purpose, HgSe NP standards were synthesized, well characterized and surface-engineered to endow them with stability in aqueous and cellular culture media. The native fluorescence emission of the HgSe NPs enabled the assessment of their cellular distribution and constituted the starting point of a pioneering comparative study of the cytotoxicity of HgSe NPs and that induced by the widely studied inorganic mercury(II) and methylmercury in the two human cell lines. The three Hg species investigated significantly differed in their degree of toxicity. While HgSe NPs did not induce a significant effect in cell viability, even at relatively high Hg concentrations; lower exposure levels of Hg²⁺ and MeHg⁺ alone, and even in the presence of other Se species (selenite), caused acute cytotoxicity. A negligible release of Hg²⁺ from the NP surface was observed under the incubation conditions used. Cellular uptake of HgSe NPs and Hg²⁺ and MeHg⁺ compounds was quantified also by ICP-MS. Results indicated that Hg incorporation when cells were exposed to the same Hg concentration added as nanoparticles (41%) and MeHg⁺ (36%) is quite similar, instead of the decrease observed for Hg²⁺ uptake (8%). Therefore, the null cell cytotoxicity effect observed for HgSe NPs cannot be ascribed to a lower Hg internalization in the cells.

Received 11th April 2020
Accepted 30th June 2020

DOI: 10.1039/d0ja00162g

rsc.li/jaas

Introduction

Mercury (Hg) is one of the most prevalent toxic elements which is present in the environment in different molecular forms, each with a specific biogeochemical cycle and toxicity.¹ In fact, chemical speciation analysis is central to assess mercury mobility and toxicity and metabolism. In addition, the role of selenium (Se) in Hg poisoning, mainly due to the protective effect of Se against the toxicity of Hg species, has been extensively studied for many decades,^{2–4} although it is not yet fully unravelled. Several studies showed evidence suggesting the formation of biomineralized mercury selenide (HgSe) particles as the ultimate metabolic product in the Hg detoxification mechanism.^{5–7} In fact, HgSe (tiemannite), HgSe mineral granules or HgSe nanoparticles (NPs) have been found in a broad range of biological tissues of marine mammals,⁸ different marine vertebrates,⁹ and even in human

brain tissue.¹⁰ Biological consequences of the formation of such HgSe species can be diverse and often contradictory. It is thought that they are biologically formed as a final step of the Hg detoxification process.^{8–11} Recently, Gajdosechova *et al.* provided further evidence of the role played by the bioavailable Se pool in the detoxification process of MeHg toxicity. Authors reported the mercury detoxification process *via in vivo* formation of natural HgSe NPs in the liver and brain of pilot whales.¹¹ There are also indications that the formation of NPs could allow the penetration of those elements across biological barriers.¹²

However information available so far about HgSe NP metabolism and toxicity is preliminary mainly due to the lack of adequate standards and materials that could be used in *in vitro* and *in vivo* studies. In this context, a rigorous evaluation of toxicity is needed in order to confidently regulate the safe use of new engineered nanoparticles and to boost their potential applicability.¹³ For such purposes, several challenges are encountered due to the lack of standardized protocols. To date, nanoparticle toxicity studies have mainly focused on *in vitro* exposure of cultured cells to such NPs, due to the ease in execution, control and interpretation of the experiments compared with *in vivo* tests.¹⁴ Of course, availability of the corresponding NP standards is essential to perform such toxicity studies. In this context, home-

^aDepartment of Physical and Analytical Chemistry, University of Oviedo, Avda. Julian Clavería 8, 33006, Oviedo, Spain. E-mail: jcostafe@uniovi.es; ruizjorge@uniovi.es

^bDepartment of Analytical Chemistry, University of Granada, 18071, Granada, Spain

^cLaboratory of Toxicology and Environmental Health, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University, Chuo, Chiba 260-8675, Japan

† L. C. B. and D. B. R. contributed equally to this work.

made synthesized and commercial metallic NPs made from Au, Ag, Fe and Ti, among many others, have been extensively used to carry out systematic and comprehensive work with the aim of assessing their actual toxicity and environmental impact.^{13,14} The availability of stable, biocompatible and well-characterized HgSe NP standards would thus be necessary for the further assessment of their toxicity, which might help in the future to understand the eventual Hg detoxification mechanisms *via in vivo* formation of HgSe NPs, as well as their behaviour, metabolism and interactions with living organisms.

In this context, cytotoxicity assessment is a key issue to be considered when intended to afford a preliminary nanoparticle toxicological evaluation. A variety of assays assessing the cell viability have been developed and used to identify the cytotoxic or cytostatic potential of nanoparticles by employing available commercial test kits.¹⁵ An early indication of cellular damage, and therefore of cytotoxicity, is a reduction in metabolic activity. One of the most widely used methods to evaluate the cytotoxicity of NPs is the 3-(4, 5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay which measures the reducing potential of a cell and constitutes a sensitive and reliable indicator of the cellular metabolic activity.¹⁶

Additionally, when studying the interaction of NPs with living organisms and cells, another key aspect to be considered is the evaluation of the cellular uptake and the localization of the NPs within the cells and tissues. In this regard, different analytical platforms have been developed in order to analyse the uptake of nanostructures by cells.¹⁴ Fluorescence spectroscopy has been widely applied for the study of the NP distribution within the cells. However, when cellular uptake quantitative information is required, the strong background self-fluorescence of biological media hinders the applicability of the technique for quantitative purposes. Hence, in these cytotoxicity studies, quantification of NPs and ions released from them is typically carried out by sensitive analytical techniques [e.g., inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS)] while localization, which requires spatial resolution analysis, is generally performed by different microscopic techniques (e.g. fluorescence confocal microscopy). In fact, ICP-MS can provide sensitive and accurate quantitative information about inorganic NP quantities entering the cell compartments. As an example, ICP-MS has been recently used in several analyses of the cytotoxicity of different NPs such as QDs,^{17–19} TiO₂ NPs, AgNPs,²⁰ or AuNPs²¹ for *in vivo* and *in vitro* analysis, among others.

Herein we report the first research study on the cell uptake, location and cytotoxicity of water-stabilized HgSe NPs, using two human cell lines well established in cytotoxic studies, cervical carcinoma cells (HeLa cells) and embryonic kidney 293 cells (HEK 293 cells). A critical comparison with the cytotoxicity of the most common Hg species found in nature (inorganic and MeHg) has also been carried out.

Experimental

Chemicals, materials and cell culture

All chemical reagents used in experiments were of analytical grade and used as received without further purification.

Deionized ultrapure water (18.2 MΩ cm) was obtained with a PURE LAB flex3 (ELGA Labwater, High Wycombe, UK) and it was used throughout the present work. All the solutions employed were filtered using sterile filters 0.22 μm (Millipore, Massachusetts; USA) prior to cell culture assays to eliminate present bacteria.

The precursors used for the synthesis of HgSe NPs were selenium powder (99.99%) from Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI, USA), mercury(II) acetate (≥98%) from Panreac (Barcelona, Spain) and ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate (EDTA, ≥99%) from Fluka (Basel, Switzerland). Sodium hydroxide and absolute ethanol were obtained from Merck (Darmstadt, Germany) and Sigma-Aldrich, respectively. Water-stabilization of HgSe NPs was achieved by coating them with dihydrolipoic acid (DHLA) ligands synthesized in our laboratory. For such purposes, DL-thioctic acid (98%), sodium bicarbonate and sodium borohydride (≥96%) were purchased from Acros Organics (Geel, Belgium), Merck and Fluka, respectively. Potassium *tert*-butoxide (≥98%), anhydrous methanol and anhydrous toluene, all of them acquired from Sigma-Aldrich, were also used during the solubilization process.

Mercury(II) acetate (≥98%) from Panreac and methylmercury(II) chloride (≥98%) from Sigma-Aldrich were used as inorganic (Hg²⁺) and organic (MeHg⁺) mercury compounds, respectively. Sodium selenite (98%) was obtained from Sigma-Aldrich.

Human cervical carcinoma cells (HeLa cells) and human embryonic kidney 293 cells (HEK 293 cells) were obtained from 'American Type Culture Collection' (ATCC; Manassas, VA, USA). The cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine, 10 mM HEPES and an antibiotic-antimycotic cocktail containing 100 U mL⁻¹ penicillin, 10 μg mL⁻¹ streptomycin and 0.25 μg mL⁻¹ amphotericin B; Dubelco's Phosphate buffered saline was used in washing steps. All cell culture reagents were purchased from Gibco®-Invitrogen (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, USA) unless otherwise indicated. Cell lines were grown at 37 °C in a humidified 5% CO₂ environment. The medium was changed every 2 days and cultures were split at least once a week before confluency.

Synthesis, aqueous-stabilization and characterization of HgSe nanoparticles

Water-stabilized HgSe NPs were synthesized following the procedure previously developed in our laboratory.²² Briefly, 5 mmol of Se powder was dissolved in 50 mL of 5 M NaOH solution. The mixture was irradiated for 30 min with ultrasound *via* a direct-immersion high-intensity probe (80 W cm⁻²) using a Vibra Cell VC250 high intensity probe (Sonics & Materials, USA), and simultaneously an equimolar amount of Hg²⁺ in a 0.1 M EDTA solution was slowly added. After the EDTA addition, the solution was left exposed to the ultrasound for 3 h at room temperature. After this, the resulting suspension was centrifuged and the black precipitate was washed in sequence with volumes of 0.1 M EDTA, water and absolute ethanol. Then, the washed powder was left to dry in an open vessel to air.

Finally, water-stabilized HgSe NPs were prepared by dispersing 20–50 mg of insoluble sonochemically synthesized HgSe in 0.4–1.0 mL of freshly prepared DHLA. The mixture was heated to 80 °C for 2 h while stirring and incubated overnight with agitation. The resulting solution was diluted in 4–5 mL anhydrous methanol and an excess of potassium *tert*-butoxide was slowly added in order to allow the deprotonation of the terminal carboxyl groups on the DHLA. The formed precipitate of DHLA-capped HgSe was sedimented by centrifugation and these DHLA-modified NPs were dispersed in water. An additional purification step, consisting of ultrafiltration using a 100 kDa cut-off ultracentrifugal filter and the subsequent resuspension of capped NPs in water, was required to remove excess of reagents.

Elemental analyses were carried out on an 8900 Triple Quadrupole ICP-MS/MS (Agilent Technologies, Japan) using a MicroMist nebulizer. In order to measure the Hg concentration and the Hg to Se molar ratio on the aqueous-stabilized HgSe NPs, a complete acid digestion of these HgSe NPs was carried out before inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS/MS) measurements using aqua regia. High resolution-transmission electron microscopy (HR-TEM) images were obtained on a JEM-2100F (JEOL, Japan) transmission electron microscope with a copper grid, using an accelerating voltage of 200 kV. Moreover, UV/VIS spectrophotometric measurements were performed in a Genesys 10S Spectrophotometer (Thermo Scientific, Germany) and a fluorescence emission spectrum was recorded on a LS-50B Luminescence Spectrometer (Perkin Elmer, USA) using a fixed excitation wavelength of 415 nm with both excitation and emission slit widths of 10 nm. The measurements of absorbance and fluorescence were carried out using conventional Quartz SUPRASIL cuvettes (Hellma Analytics, Germany).

Fluorescence cell imaging

A Leica TCS-SP5 confocal microscope (Leica Microsystems, Germany), suitable for high-resolution morphological imaging, as well as multispectral imaging, was used to visualize the distribution and the cellular uptake of the water-stabilized HgSe NPs in the different cell lines used (*i.e.* HeLa and HEK 293 cells). For the confocal microscopy study, cells were grown on sterile Nunc™ Thermanox™ coverslips (Thermo Fisher Scientific) in a 6-well plate. Then, cells were incubated with 2 mL of the water-stabilized HgSe NPs at a Hg concentration of 20 μM in DMEM medium. After an incubation time of 24 h, cells were washed with PBS and, immediately, fixed with 4% formaldehyde in PBS. Cells were then rinsed with PBS and, finally, the coverslips were mounted using Fluoromount-G (obtained from SouthernBiotech). The confocal fluorescent microscopic images of the cells were taken under a 405 nm diode laser excitation, and *ImageJ* program was used for image processing.

Protocol for the quantification of Hg ion release from HgSe NPs

The cell culture medium (DMEM) was spiked with the aqueous-stabilized HgSe NPs at a final concentration of 100 μM Hg and

then subjected to the same incubation conditions employed for the cell lines (37 °C and 5% CO₂) at different exposure times (0, 2, 4, 8, 24 and 48 h) in order to evaluate the eventual liberation of Hg ions from the HgSe NPs. After incubation, such spiked cell culture media were centrifuged at 13 000 rpm for 10 min in order to isolate HgSe NPs (contained in pellets) from the ionic Hg released. The corresponding supernatants (which eventually could contain Hg²⁺ ions released from the HgSe NPs during the incubation process) and pellets (which contain the HgSe NPs) were then digested with aqua regia. To do this, samples were transferred to a 1.5 mL centrifuge tube. Then, 250 μL of aqua regia were added. Digestion was accelerated by placing the vessel in an ultrasonic bath (JP Selecta, Spain) operating at 360 watts for 30 minutes. Finally, all the digested solutions were appropriately diluted with 1% HNO₃ before analysis by ICP-MS/MS. The total concentration of Hg was determined using external calibration.

Cell viability assays

Cell viabilities were assessed by employing the MTT assay using a commercially available MTT Cell Proliferation Assay Kit from Biochem (Asturias, Spain).²³ After a soft trypsinization, the cells were harvested, counted in a Neubauer chamber and 20 000 cells per mL were seeded in 96-well plates. Before starting the experiments, cells were left attached overnight at 37 °C in a humidified 5% CO₂ environment. The cells were then treated with the different Hg species (*i.e.* HgSe NPs, Hg²⁺ and MeHg⁺) ensuring different Hg concentrations (0, 1, 5, 10, 50 and 100 μM) were taken, for 24 h and 48 h. Additionally, cells were also treated for 24 h and 48 h with combinations of the same concentration levels of Hg²⁺ and MeHg⁺ with selenite at a Se concentration of 5 μM or 50 μM. After treatment, the MTT reagent was added to each well and incubated for 4 h at 37 °C. After the incubation period, cells were lysed by adding the lysis buffer and left for 1 h at 37 °C in the dark. Absorbance at 570 nm *vs.* 690 nm was measured using a Cary 50-MPR microplate reader (Agilent Technologies).

Cellular uptake quantification of the different Hg species

For the cellular uptake studies, 20 000 cells per mL were seeded in a 96-well plate overnight at 37 °C in a controlled 5% CO₂ environment. Then, HEK 293 and HeLa cells were treated with the different Hg species (*i.e.* HgSe NPs, Hg²⁺ and MeHg⁺) at a final 1 μM Hg concentration for 24 h. After incubation, the cell culture medium was removed and cells were washed three times with cold PBS (10 mM pH 7.4). In order to evaluate the extracellular Hg concentration, the collected cell culture medium and wash PBS were digested with aqua regia for 30 min in an ultrasonic bath. The intracellular Hg concentration was also determined after acidic digestion of the cells seeded in the 96-well plates *via* aqua regia for 30 min in an ultrasonic bath. The cell culture medium isolated from the well containing the control cells (*i.e.* that grew without being exposed to any of the Hg species) was used as the corresponding blank solution. Finally, all the solutions were appropriately diluted with 1% HNO₃ before analysis by ICP-MS/MS using external calibration.

Results and discussion

Cell location of the HgSe nanoparticles

Reliable information about the intracellular localization of NPs is a key issue to establish NP-cell interactions and to assess their eventual toxicity. For such purposes, it is necessary to use standards of HgSe NPs stable in biological media. In this work, HgSe NPs were sonochemically synthesized and transferred to an aqueous solution using dihydroliipoic acid (DHLA) as a capping ligand. The DHLA ligands were bound onto the surface of the NPs to make them stable in biological media. First, NPs standards were synthesized at a Hg to Se molar ratio of 1 : 1,²² as it is well-known that the accumulation of Hg in living organisms often accompanies Se accumulation at this equimolar ratio.^{4,24} The synthesized NPs were then thoroughly characterized and consisted of quasi-spherical HgSe NPs with an average diameter of 23 ± 2 nm (see Fig. 1a and b). Finally, as previously explained, HgSe NPs were then further surface-functionalized with DHLA²² to provide aqueous stability.

Importantly, the resulting engineered HgSe NPs not only showed high water stability as nanoparticulated suspensions but moreover, they exhibited intense native fluorescence with a sharp emission at 575 nm (see Fig. 1c), opening the door to imaging studies by employing fluorescence microscopy.

Human HeLa and HEK 293 cell lines, widely employed in cytotoxicity studies,²⁵ were selected for cellular uptake studies. Moreover, the use of such cell types allows us to evaluate the

differential behavior of Hg uptake by a tumor and normal tissue cell line type. First, the native fluorescence of HgSe nanoparticles was used to confirm that they are able to pass through the cell membrane and enter the cells under study when the nanoparticles were incorporated into the cell culture medium. Next, cellular distribution of the aqueous-stabilized HgSe NPs within the two human cell lines under scrutiny, HeLa and HEK 293, was investigated. In this study, HeLa and HEK 293 cells were exposed to HgSe NPs for 24 h at a Hg concentration level of 20 μ M. After incubation, confocal fluorescence images of HeLa and HEK 293 cells (Fig. 2b-d and 2f-h, respectively) treated with HgSe NPs were obtained under bright field illumination using a 405 nm light source for fluorescence excitation. As can be observed in Fig. 2c and g, high fluorescence emission was observed inside the cells, thus attesting HgSe NP cellular uptake under the assayed conditions. Moreover, it was possible to visualize the NP distribution within the cells. In fact, Fig. 2 indicates not only that HgSe NPs are internalized by endocytosis but also that they are distributed in the cytosol of both HeLa and HEK 293 cells. Specifically, it seems that HgSe NP distribution within the cells is not even inside the nucleus or even perinuclear. Indeed, Fig. 2 seems to pinpoint that HgSe NPs could be likely accumulated in lysosomes or other organelles. Bright field images of HeLa and HEK 293 cells not exposed to the HgSe NPs (controls) are shown in Fig. 2a and e. Obviously, no HgSe NPs are detected. Interestingly, the detection of fluorescence supports the assumption of the HgSe NP stability under cell culture conditions throughout the studies (*i.e.* the presence of electrolytes and the high ionic strength of the culture media may eventually induce degradation of the NPs, a crucial factor to be controlled for experimentally assessing their toxic activity). Here, maintenance of the fluorescence emission from the NPs after their internalization into cells provides further evidence that their native surface remained unaltered and hence that HgSe NPs are able to resist eventual degradation that could occur in biological media. Of course, cell distribution assessment of the HgSe NPs is worthy of more detailed analysis, like using multiple staining procedures (*i.e.* staining organelles simultaneously with adequate fluorescent probes such as MitoTracker). Nevertheless, images shown in Fig. 2 point to the great potential applicability of these NPs for bioimaging.

Hg²⁺ release from HgSe nanoparticles in the cell culture medium

As previously demonstrated, the fluorescence of HgSe NPs remains unaltered after cellular uptake, suggesting negligible NP degradation. However, it should be considered that eventual photooxidations or surface interactions with the components of the media could result in leaching of ions from the NP surface.²⁶ For this reason, a reliable study of the cytotoxic effects of NPs on biological systems should consider the fact that eventual toxic effects could be attributed to the release of toxic metal cations from the surface of nanomaterials during the exposure process.²⁷ Therefore, the total amount of toxic metal ions released from the nanomaterial surface under the biological conditions used must be quantified. In order to quantify the

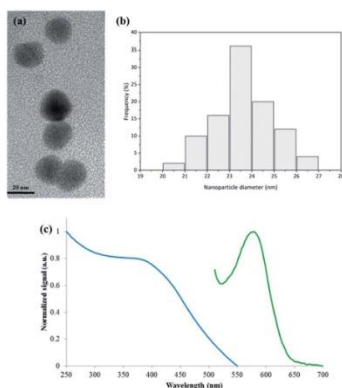


Fig. 1 (a) HR-TEM image and (b) nanoparticle size distribution histogram of the engineered HgSe NP surface modified with DHLA. Nanoparticle sizes were measured from individual NPs in HR-TEM images using the open source image processing program ImageJ. (c) Fluorescence emission spectrum (green line) of HgSe NPs in water media ($\lambda_{\text{exc}} = 415$ nm). The absorbance spectrum of water-stabilized HgSe NPs is also included (blue line).

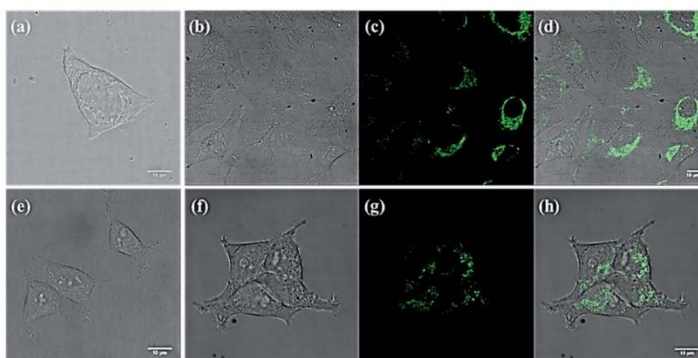


Fig. 2 Bright field images of control (a) HeLa and (e) HEK 293 cells not exposed to the HgSe NPs and confocal fluorescence images of (b–d) HeLa and (f–h) HEK 293 cells exposed to water-stabilized HgSe NPs for 24 h. Images of the cellular distribution of the NPs were taken under (b, f) a bright field, (c, g) fluorescence at an excitation wavelength of 405 nm, and (d, h) merge of corresponding bright field and fluorescence images (scale bar = 10 μm).

Hg^{2+} ion concentration released from the HgSe NP surface when introduced in the cell culture medium, different incubation times were assayed, always ensuring a constant HgSe NP concentration equivalent to 100 μM total Hg concentration. After incubation, the resulting cellular media were centrifuged. The amount of ionic Hg, dissolved in the supernatant, and the Hg amount which remains in the nanoparticulated form present in the pellet, were both determined by ICP-MS/MS.

As can be clearly seen in Fig. 3, the Hg mass fractions (%) corresponding to HgSe NPs were always quantitative and statistically indistinguishable among them at the 95% confidence level. In fact, Hg mass fraction (%) obtained as ionic Hg was negligible. These results indicate that there is negligible release of Hg^{2+} from the HgSe NP surface occurring under the tested incubation conditions, even for the higher exposure times assayed (48 h). These results along with those obtained by fluorescence confocal microscopy, confirm that HgSe NPs are stable in a cell culture medium under the assessed incubation conditions. Therefore, any possible effect observed on cell viability during the exposure of the cells to HgSe NPs will be ascribed exclusively to the NPs. Effects due to possible toxic metals released from the NPs during the incubation process can be safely ruled out.

Assessment of the cytotoxicity of HgSe nanoparticles

Once demonstrated that HgSe NPs can enter the cells and there is no significant release of ionic Hg from NPs under the incubation conditions, we proceeded with the measurement of cellular metabolic activity by using the MTT assay to evaluate eventual cellular damage in the presence of the different Hg species (critical assessment of their cytotoxicity). For this

purpose, cell viabilities of HeLa and HEK 293 cell lines exposed to HgSe NPs at different concentrations were evaluated. Following both 24 and 48 h of continuous exposure of the cells to the NPs, cell viability was determined using the MTT assay.²³ In this way, cell viability results of the Hg-based nanoparticles were compared with those induced by inorganic and organic Hg-based compounds (Hg^{2+} and MeHg^+ , respectively) present in the cell culture media at the same Hg concentrations. It should be noted that in biological media Hg^{2+} and MeHg^+ are usually binding bioligands. As described in the experimental section, cell culture experiments were carried out in a medium supplemented with FBS (fetal bovine serum), that contains bio-thiols as a protein, peptide and amino acid. Thus, such

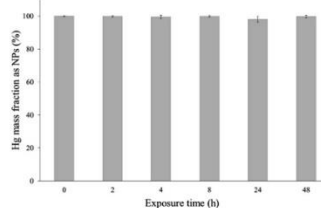


Fig. 3 Hg mass fraction corresponding to HgSe NPs obtained after incubation of NPs at different times in the cell culture medium (DMEM). Error bars correspond to the 95% confidence level (two standard deviation, $n = 3$ replicates).

experimental conditions should be able to mimic the conditions in biological media. As can be observed in Fig. 4a–d, aqueous-stabilized HgSe NPs did not produce any remarkable effect on cell viability after 24 and even 48 h of incubation with HeLa (Fig. 4a and b, respectively) and HEK 293 (Fig. 4c and d, respectively) cells at the different Hg concentrations assessed (1, 5, 10, 50 and 100 μM). In contrast, HeLa and HEK 293 cells exposed to inorganic and organic Hg-based compounds (Hg^{2+} and MeHg^+ , respectively) showed a decrease of the cell viability (see Fig. 4a–d) at the Hg concentrations assayed for the HgSe NPs. In this context, Hg^{2+} was already 50% toxic for both cell lines at a Hg concentration of 50 μM , either after 24 or 48 h of cell exposure. On the other hand, as expected, MeHg^+ caused a sharp drop of the cell viability after 24 and 48 h of cell exposure (below 50% of cell viability) on both cell lines at a Hg concentration as low as 5 μM . Moreover, MeHg^+ was over 90% toxic at Hg concentrations of 10 μM . This decrease in the cell viability observed for the ionic elemental species instead of their corresponding elements in nanoparticulated form has been already described for different types of NPs such as $\text{Cd}(\text{n})$ and CdSe-ZnS QDs.²⁸ These findings seem to suggest that the formation of nanoparticulated Hg, shaped like HgSe NPs, could be considered as a protective measure within the Hg detoxification process.

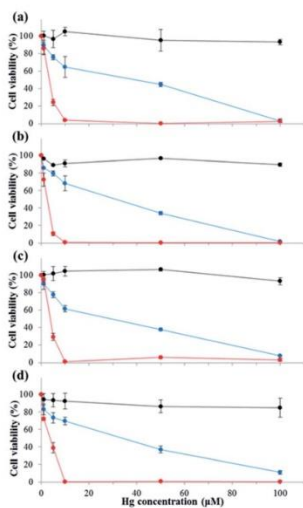


Fig. 4 Cell viability values of (a, b) HeLa and (c, d) HEK 293 cells incubated at 37 °C for (a, c) 24 h and (b, d) 48 h with HgSe NPs (black), Hg^{2+} (blue) and MeHg^+ (red) at different Hg concentrations (0, 1, 5, 10, 50 and 100 μM). Data are shown as mean \pm SEM ($n = 3$).

To further look into the Se–Hg interaction within the NPs and its effect on the cell viability, the two human cell lines were treated with mixed solutions containing each Hg species (Hg^{2+} and MeHg^+) and selenite. Specifically, we tried to elucidate if the cell viability results observed for the HgSe NPs in comparison to the same amount of Hg, present as Hg^{2+} and MeHg^+ , was due to the amount of Se provided or to the specific HgSe NPs. For this purpose, we evaluated the cytotoxicity of Hg^{2+} and MeHg^+ in both cell lines, using the different Hg concentrations assayed previously (*i.e.* 1, 5, 10, 50 and 100 μM), by exposing cells simultaneously to Hg^{2+} and MeHg^+ together with selenite (at a Se concentration of 5 μM or 50 μM).

As can be observed in Fig. 5 and 6, there was a decrease in the cell viability, similar to that produced by the individual treatment with Hg^{2+} and MeHg^+ (Fig. 4a–d), in cells treated with Hg^{2+} and MeHg^+ and simultaneously with selenite. In fact, every combination with selenite (either at 5 μM or 50 μM), with Hg concentrations equal to or greater than 50 μM for Hg^{2+} (Fig. 5a–d) and 5 μM for MeHg^+ (Fig. 6a–d) led to cell viabilities lower than 50%.

The simultaneous exposure of Hg and Se could attenuate Hg toxicity, as it has been previously observed in previous studies,^{29,30} but this effect depends on the nature of the Se species. Herein, it was observed that addition of Se as selenite did not provide any significant protection against Hg toxicity under the specific conditions assayed. Similar conclusions were reported by Wang *et al.*,³¹ when mussels and diatoms were simultaneously exposed to different Hg species ($\text{Hg}(\text{n})$ and MeHg) and selenite. In contrast, the evidence we found points to the fact that when the same amounts of Se and Hg are present in the cell cultures under the form of the specific HgSe NPs, full protection is observed against Hg toxicity. Of course, other potential Se species such as selenomethionine, selenoethionine, and selenocyanate or the combined exposure of selenite and glutathione ethyl ester could be additionally assessed. Of course, there are many other different Se species present in living organisms, providing different protection effects against Hg toxicity. However, it is reported that both inorganic Se-compounds (*e.g.* selenite and selenate) and Se-aminoacids (*e.g.* selenocysteine and selenomethionine) are metabolized to a common metabolic intermediate, selenide,³² which is the key metabolic intermediate to form HgSe. Thus, this explains why here we selected selenite as a “model” Se-compound to evaluate the protective effect.

Cellular uptake quantification

Many cytotoxic effects depend on the number of toxic species internalized in the cells (*i.e.* the cellular uptake efficiency) rather than the total concentration of the species added to the cell-culture media. In order to complement the previous results obtained so far, quantitative cellular uptake of the three different Hg species in both cell lines was determined. For this purpose, 1 μM Hg was chosen as the exposure Hg concentration since the cell viability obtained at 24 h of incubation time is greater than 80% for all the three Hg species (see Fig. 4a and c). Intracellular species concentration (cellular uptake) was

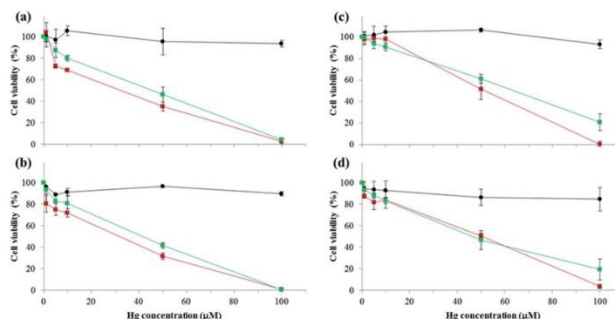


Fig. 5 Cell viability values of (a, b) HeLa and (c, d) HEK 293 cells incubated at 37 °C for (a, c) 24 h and (b, d) 48 h with HgSe NPs (black); Hg²⁺ + 5 μM selenite (red); Hg²⁺ + 50 μM selenite (green), at different Hg concentrations (0, 1, 5, 10, 50 and 100 μM). Data are shown as mean ± SEM (n = 3).

quantitatively determined by measuring the Hg content in digested cells by ICP-MS/MS after their isolation following the procedure described in the cellular uptake quantification of the different Hg species. On the other hand, Hg unincorporated was determined in the supernatant and wash solutions obtained after cell isolation. In order to validate the obtained results, the Hg amount added in each well was also determined by ICP-MS/MS after acidic digestion of the same Hg solutions used in the cellular uptake experiment (n = 3 replicates).

As shown in Fig. 7, variable cellular Hg uptake rates were found for the different Hg chemical species. Incubation with organic Hg (MeHg⁺) resulted in much higher intracellular Hg mass (4.6 ± 0.2 and 9.1 ± 0.6 for HEK 293 and HeLa, respectively) when compared to inorganic Hg (1.4 ± 0.3 and

1.8 ± 0.3 ng Hg for HEK 293 and HeLa, respectively). In this regard, this differential cytotoxicity and accumulation of Hg depending on the chemical species in which Hg is found, has been already reported by several studies. Higher bio-accumulation of MeHg⁺ compared to Hg²⁺ had been observed previously, and some authors attributed this behaviour to its enhanced lipid solubility and higher permeability across the membrane, which results in an enhancement in the cytotoxicity effects of MeHg⁺.^{16,33,34} Interestingly, as shown in Fig. 7, significant Hg incorporation was found for HgSe NPs in HEK 293 (12.9 ± 0.9 ng Hg) and HeLa cells (12.2 ± 1.2 ng Hg), which corresponded to the 43 ± 3% and 40 ± 4% of the total Hg added, respectively. In this regard, some studies have also indicated that

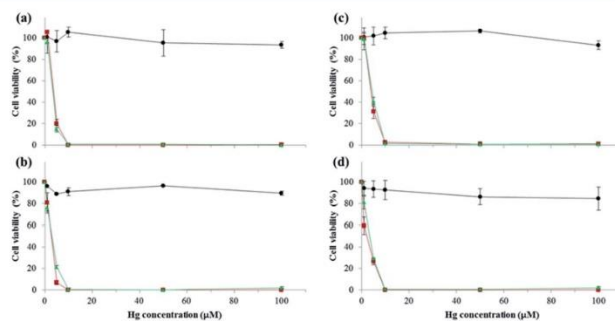


Fig. 6 Cell viability values of (a, b) HeLa and (c, d) HEK 293 cells incubated at 37 °C for (a, c) 24 h and (b, d) 48 h with HgSe NPs (black); MeHg⁺ + 5 μM selenite (red); MeHg⁺ + 50 μM selenite (green), at different Hg concentrations (0, 1, 5, 10, 50 and 100 μM). Data are shown as mean ± SEM (n = 3).

JAAS

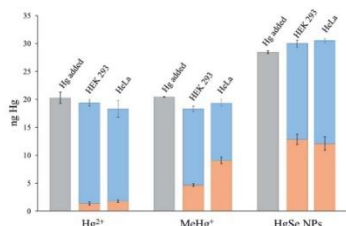


Fig. 7 Cellular uptake obtained by ICP-MS/MS after addition of Hg (1 μ M) as Hg²⁺, MeHg⁺ and HgSe NPs to the cell cultures of human lines HEK 293 and HeLa. Incorporated (intracellular) and unincorporated Hg after 24 h of exposure are indicated with orange and blue columns, respectively. Determination of Hg in the solution spiked to the corresponding cell cultures was also carried out for comparative purposes (grey columns). Uncertainty bars correspond to one standard deviation (1SD) which is obtained directly from propagation of the individual uncertainties from the acidic digestion process ($n = 3$) and the ICP-MS/MS measurements ($n = 10$).

nanoparticles can be more easily taken up by cells compared to their corresponding metal ions.^{35,36}

It is worth nothing here that despite the relatively high uptake efficiency of Hg from nanoparticulated materials as compared to MeHg and especially Hg²⁺ species, SeHg NPs do not induce any negative response in cellular models, as discussed in the cytotoxicity evaluation (see Fig. 4). Therefore, the null cell cytotoxicity effect observed for HgSe NPs is not a consequence of a lower Hg internalization in the cells. These results suggest again that the formation of nanoparticulated Hg species could provide a protective layer in the Hg detoxification process. Notably, mass balances could be carried out for the experiments with the three species. As can be clearly seen in Fig. 7, the mass of Hg added to the different cell cultures was recovered in all cases (recoveries ranging from 89 to 106% with a mean value of 97%) when taken into account the ng of Hg determined in the corresponding cell extracts (intracellular) and supernatants (extracellular).

Additionally, the total amount of Hg incorporated into the cell in the nanoparticulated form determined by ICP-MS/MS measurements can be easily translated into the number of NPs internalized per cell. For this purpose, it is required to know the total number of atoms per NP and the Hg : Se molar ratio in the NPs.²² The determination of elemental stoichiometry of NPs relies on the simultaneous quantification of Hg and Se of HgSe NPs by ICP-MS/MS. The Hg : Se molar ratio was achieved through a direct measurement of a colloidal suspension of HgSe NPs, in order to avoid any possible losses or contamination during the digestion procedure, resulting in a 1.2 : 1 molar ratio of Hg : Se.²² On the other hand, the number of atoms per NP could be computed using ICP-MS and by assuming that the water-solubilized HgSe NPs are spherical with an average diameter of 23 nm obtained by HR-TEM (see

Fig. 1a, b). The number of atoms obtained was $222\,000 \pm 8400$ atoms (1SD, $n = 8$ replicates). Finally, the number of Hg atoms per NP was 124320 ± 4928 . Taking into account the number of cells seeded in each well, the number of NPs internalized per cell seeded turned out to be $(1.55 \pm 0.05) \times 10^4$ NPs for HEK 293 and $(1.47 \pm 0.06) \times 10^4$ NPs for HeLa cells. The associated propagated uncertainty was calculated using the individual uncertainties obtained from the acidic digestion of exposed cells ($n = 3$ replicates), their corresponding ICP-MS measurements ($n = 10$ replicates) and the standard deviation associated with the number of atoms per NP. Obviously the number of NPs internalized per cell will depend on the type and concentration of NPs used as well as the cell type. However, our findings are consistent with previous results in the literature obtained with similar NPs. For example, Hsiao *et al.*³⁰ observed that the number of TiO₂ NPs of 20 nm, whose size is similar to our 23 nm HgSe NPs, internalized in Neuro 2a cells was 2×10^4 NPs per cell, using ICP-MS and TEM determinations as well. In another study, Armida *et al.*³⁷ observed uptake values of 1.4×10^4 using AuNPs of similar size (30 nm) and PC-3 cells. Despite these similar findings, caution must be exercised because many authors highlight the strong dependence of this incorporation not only on cell and NP type, but also on the surface charge of NPs, the type of NP coating or even the technique used for quantification purposes.^{20,38}

Conclusions

Aqueous stability, previously observed for DHLA-HgSe NP standards recently synthesized and thoroughly characterized in our lab, also extends to biological media as demonstrated herein with the preliminary *in vitro* studies performed. The resulting availability of such HgSe NP standards, that also emit strong native fluorescence, enabled us to prove for the first time that HgSe NPs are efficiently internalized by human cells and seem to be stored in their cytosols. Interestingly, despite its higher cellular accumulation, such nanoparticulated Hg does not induce any negative effect on cell viability and proliferation at concentrations at which Hg-based organic and inorganic chemical species, even in combination with independent protective Se species, already induce acute cytotoxicity.

Such fit-for-purpose standards could be then further used to answer some of the biological questions raised recently about Hg detoxification mechanisms, the protective effect of Se against Hg and the likely formation of HgSe NPs *in vivo*.¹¹ In fact, the preliminary findings presented herein demonstrate the important distinctive toxicological behaviour of HgSe nanoparticles when compared to other Hg species, thus justifying the need to conduct further studies that highlight the behaviour of such nanoparticles when present in more complex organisms. This would allow providing more complete information on the possible pathways of mercury detoxification in the environment. Of course this is not a simple task as the routes of exposure of nanomaterials to living organisms and their toxicity strongly depend on the habitat of the organism. In this context, experiments assessing the equilibrium governing the exchange over time of Hg ions between the NP and solution, under

different biological and environmental media can be easily foreseen. Of course such experiments would benefit enormously from the use of enriched Hg isotopes, either present in the NP itself (enriched Hg acetate could be easily used as a precursor) or in the mercury species in equilibrium with it. Notably, fluorescence shown by the synthesized HgSe NPs opens the door to carry out additional bioimaging studies (e.g. their subcellular distribution or final fate in biological systems). Interestingly, such types of studies could not be carried out so far because HgSe NPs stable in biological media were neither available nor validated.

Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

Acknowledgements

Laura Cid-Barrio and Diego Bouzas-Ramos acknowledge their PhD grants (FPU15/04989 and BP14-137) from the Spanish Ministry of Education and Asturias Regional Government (Spain), respectively. This research work was supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness through the projects MINECO-17-CTQ2016-79412-P and PID2019-109698GB-I00 and by the Government of Principado de Asturias through the project FC-GRUPIN-IDI/2018/000166. The authors would like to thank Dr David Hevia from Bioquochem S.L. (<http://www.bioquochem.com>, Asturias, Spain) and Dra. Belén Fernández from the Institute of Parasitology and Biomedicine "López-Neyra" (CSIC, Granada, Spain), for their kind help and experimental assistance.

Notes and references

- 1 F. Beckers and J. Rinklebe, *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.*, 2017, **47**, 693–794.
- 2 J. Parizek and I. Osádalová, *Experientia*, 1967, **23**, 142–143.
- 3 S. Yoneda and K. T. Suzuki, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1997, **143**, 274–280.
- 4 M. A. García-sevillano, G. Rodríguez-moro, T. García-barrera and F. Navarro, *Chem.-Biol. Interact.*, 2015, **229**, 82–90.
- 5 J. Gailer, G. N. George, I. J. Pickering, S. Madden, R. C. Prince, E. Y. Yu, M. B. Denton, H. S. Younis and H. V. Aposhian, *Chem. Res. Toxicol.*, 2000, **13**, 1135–1142.
- 6 M. A. K. Khan and F. Wang, *Chem. Res. Toxicol.*, 2010, **23**, 1202–1206.
- 7 A. M. Asaduzzaman and G. Schreckenbach, *Inorg. Chem.*, 2011, **50**, 2366–2372.
- 8 E. Nakazawa, T. Ikemoto, A. Hokura, Y. Terada, T. Kunito, S. Tanabe and I. Nakai, *Metallomics*, 2011, **3**, 719–725.
- 9 M. Nigro and C. Leonzio, *Mar. Ecol.: Prog. Ser.*, 1996, **135**, 137–143.
- 10 M. Korbas, J. L. O. Donoghue, G. E. Watson, I. J. Pickering, S. P. Singh, G. J. Myers, T. W. Clarkson and G. N. George, *ACS Chem. Neurosci.*, 2010, **1**, 810–818.
- 11 Z. Gajdosechova, M. M. Lawan, D. S. Urgast, A. Raab, K. G. Scheckel, E. Lombi, P. M. Kopittke, K. Loeschner, E. H. Larsen, G. Woods, A. Brownlow, F. L. Read, J. Feldmann and E. M. Krupp, *Sci. Rep.*, 2016, **6**, 34361.
- 12 S. Barua and S. Mitragori, *Nano Today*, 2015, **9**, 223–243.
- 13 N. Lewinski, V. Colvin and R. Drezek, *Cytotoxicity*, 2008, **4**, 26–49.
- 14 S. J. Soenen, P. Rivera-gil, J. Montenegro, W. J. Parak, S. C. De Smedt and K. Braeckmans, *Nano Today*, 2011, **6**, 446–465.
- 15 J. L. Luque-garcía, R. Sanchez-díaz, I. Lopez-heras, P. Martín and C. Camara, *Trends Anal. Chem.*, 2013, **43**, 254–268.
- 16 M. Shen, H. Cai, X. Wang, X. Cao, K. Li, S. H. Wang, R. Guo, L. Zheng, G. Zhang and X. Shi, *Nanotechnology*, 2012, **23**, 1–10.
- 17 S. J. Cho, D. Maysinger, M. Jain, B. Röder, S. Hackbarth and F. M. Winnik, *Langmuir*, 2007, 1974–1980.
- 18 Z.-J. Zhu, Y.-C. Yeh, T. Tang, B. Yan, J. Tamayo, R. E. Vachet and V. M. Rotello, *Nat. Chem.*, 2012, **3**, 963–968.
- 19 L. Peng, M. He, B. Chen, Q. Wu, Z. Zhang, D. Pang, Y. Zhu and B. Hu, *Biomaterials*, 2013, **34**, 9545–9558.
- 20 I. L. Hsiao, F. S. Bierkandt, P. Reichardt, A. Luch, Y. J. Huang, N. Jakubowski, J. Tentschert and A. Haase, *J. Nanobiotechnol.*, 2016, **14**, 1–13.
- 21 A. M. Alkilany, P. K. Nagaria, C. R. Hexel, T. J. Shaw, C. J. Murphy and M. D. Wyatt, *Small*, 2009, **5**, 701–708.
- 22 D. Bouzas-ramos, M. Menéndez-miranda, J. M. Costa-Fernández, J. Ruiz Encinar and A. Sanz-Medel, *RSC Adv.*, 2016, **6**, 19964–19972.
- 23 S. L. Bioquochem, *Cell Growth Determination Kit (MTT)*, verified April 2020, available at <http://www.labjot.com/uploads/Bioquochem/MTT%20Book.pdf>.
- 24 J. Koeman, W. S. M. van de Ven, J. J. M. de Goeij, P. S. Tjoie and J. L. Haafte, *Sci. Total Environ.*, 1975, **3**, 279–287.
- 25 V. Kumar, N. Sharma and S. S. Maitra, *Int. Nano Lett.*, 2017, **7**, 243–256.
- 26 M. Valledor Llopis, J. C. Campo Rodríguez, F. J. Ferrero Martín, A. M. Coto, M. T. Fernández-Argüelles, J. M. Coste-Fernández and A. Sanz-Medel, *Nanotechnology*, 2011, **22**, 1–9.
- 27 T. J. Brunner, P. Wick, P. Manser, P. Spohn, R. N. Grass, L. K. Limbach, A. Bruinink and W. J. Stark, *Environ. Sci. Technol.*, 2006, **40**, 4374–4381.
- 28 L. Peng, M. He, B. Chen, Q. Wu, Z. Zhang, D. Pang, Y. Zhu and B. Hu, *Biomaterials*, 2013, **34**, 9545–9558.
- 29 I. Cordero-herrera, S. Cuello, L. Goya, Y. Madrid, L. Bravo, C. Cámara and S. Ramos, *Food Chem. Toxicol.*, 2013, **59**, 554–563.
- 30 J. L. Luque-garcía, P. Cabezas-sanchez, D. S. Anunciação and C. Camara, *Anal. Chim. Acta*, 2013, **801**, 1–13.
- 31 W. Wang, R. S. K. Wong, J. Wang and Y. Yen, *Aquat. Toxicol.*, 2004, **68**, 39–50.
- 32 Y. Ogra and Y. Anan, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2009, **24**, 1477–1488.
- 33 H. Lohren, L. Blagojevic, R. Fitkau, F. Ebert, S. Schildknecht, M. Leist and T. Schwedtle, *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 2015, **32**, 200–208.
- 34 M. Korbas, T. C. MacDonald, I. J. Pickering, G. N. George and P. H. Krone, *ACS Chem. Biol.*, 2012, **7**, 411–420.

JAAS

[View Article Online](#)
Paper

- 35 R. Colognato, A. Bonelli, J. Ponti, M. Farina, E. Bergamaschi, E. Sabbioni and L. Migliore, *Mutagenesis*, 2008, **23**, 377–382.
- 36 L. K. Limbach, P. Wick, P. Manser, R. N. Grass and W. J. Stark, *Environ. Toxicol. Chem.*, 2007, **41**, 4158–4163.
- 37 A. M. Amida and H. Ghandehari, *J. Appl. Toxicol.*, 2010, **30**, 212–217.
- 38 S. Ashraf, J. Park, M. A. Bichelberger, K. Kantner, R. Hartmann, A. H. Said, N. Feliu, J. Lee, D. Lee, G. U. Nienhaus, S. Kim and W. J. Parak, *Nanoscale*, 2016, **8**, 17794–17800.

Published on 03 July 2020. Downloaded by Instituto de Ciencia de Materiales de Barcelona (ICM-LAB) on 9/2/2020 8:55:39 AM.

Assessment of the potential and limitations of elemental mass spectrometry in Life Sciences for absolute quantification of biomolecules using generic standards

Laura Cid-Barrio¹, Francisco Calderón-Celis¹, José Manuel Costa-Fernández¹ and Jorge Ruiz Encinar^{1*}

¹Department of Physical and Analytical Chemistry, University of Oviedo, Av. Julian Claveria 8, 33006, Oviedo, Spain.

*Corresponding author: ruizjorge@uniovi.es.

ABSTRACT: ICP-MS has been widely used in Life Sciences for the absolute quantification of biomolecules without specific standards assuming the same response for generic compounds including complex biomolecules. However, contradictory results have been published on this regard. We present the first critical statistical comparison of the ICP-MS response factors obtained for fourteen different relevant S-containing biomolecules (three peptides, four proteins, one amino acid, two cofactors, three PEGs derivatives and sulfate standard), covering a wide range of hydrophobicity and molecular size. Two regular flow nebulizers and a total consumption nebulizer (TCN) were tested. ICP-MS response factors were determined through calibration curves and isotope dilution (IDA) was used to normalize results. No statistical differences have been found for low-MW biocompounds, PEGs and non-hydrophobic peptides using any of the nebulizers tested. Interestingly, while statistical differences were still found negligible (96-104%) for the proteins and hydrophobic peptide using the TCN, significantly lower response factors (87-40%) were obtained using regular flow nebulizers. Such differential behavior seems to be related mostly to hydrophobicity and partially to molecular weight. Findings were validated using IDA in intact and digested BSA solutions using TCN (98 and 100%, respectively) and the concentric nebulizer (73 and 97%, respectively). Additionally, in the case of a phosphoprotein, results were corroborated using the P trace in parallel to the S trace used along the manuscript. This work seems to suggest that ICP-MS operated with regular nebulizers can offer absolute quantification using generic standards for most biomolecules except proteins and hydrophobic peptides.

Absolute quantification of biologically relevant molecules (proteins, DNA, etc.) is essential in Life Sciences research.¹ There are several clinical, scientific or technological areas that directly benefit from such absolute data.²⁻⁴ First, determination of exact molar biomolecule concentrations is not only critical for biomarker discovery but for disease diagnosis, determination of optimum drug delivery and monitoring during treatment and recovery. Second it allows chemical biologists to relate concentrations of relevant biomolecules (i. e. proteins, nucleic acids, lipids), which improves understanding of the dynamic processes and interactions controlling metabolism.¹ Determination of the absolute concentration of individual components is also critical to assess the stoichiometric ratios either in multiprotein complexes or signaling networks.³

Most common approaches nowadays for biomolecules absolute quantification are based on molecular MS and require the use of specifically designed standardization approaches to provide absolute quantification,^{4,6} being mostly limited by the availability of the corresponding biomolecules standards. Of course, trueness of the results obtained will depend critically on the quality of such standards and their mass purity certification. Therefore, analytical approaches able to provide absolute quantification using nonspecific standards could play a critical role in the improvement of results validation and the development of quality assurance procedures.⁷

In this context, it is clear nowadays that ICP-MS is gathering momentum in Life Sciences research, especially for its potential

to provide absolute quantification of biomolecules on the sole condition that an ICP-detectable element (any except C, H, N, O and F) is present or artificially linked.^{8,9} In this line, hybrid LC-MS configuration with both elemental (ICP) and molecular (ESI) MS detection in parallel has been already successfully applied to identify and quantify target peptides and proteins^{8,10} and other biomolecules (e. g. metabolites in urine or antioxidants in water extracts of oyster mushrooms)^{11,12} of interest in biological samples without specific standards. The elemental quantification achieved using ICP-MS can be easily translated into biomolecule absolute quantities provided the molar ratio element/molecule (stoichiometry) previously determined using molecular MS. Interestingly, such great potential relies on the assumption that ICP-MS response is species independent, which is still an intriguing and controversial issue. In fact, it has not been established yet under which operational conditions simple and generic element-containing standards can be used to quantify in absolute terms biomolecules containing such element. In this regard, although nebulization and transport in ICP-MS analysis are low efficient processes (typically <10%), it is extensively assumed to they are similar for any compound, regardless of whether it is a small molecule or a large chemical species.¹³ Notably, if the element response factor obtained for different element-containing compounds is proved to differ significantly, the species-independent quantification capabilities of ICP-MS would be seriously compromised. Different studies have been carried out so far focusing on low molecular weight molecules, particularly

organometallic compounds of As, Hg, Sn, I and Se, and slight differences in the corresponding ICP-MS response factors were found,^{14,15} depending on the volatility of the species^{16,17} and the sample introduction system used.¹⁵

There is however no established evidence for any difference in ICP-MS response factors for non-volatile species of the same element, which could include medium and large biomolecules. In fact, Svantesson *et al.*¹³ and Anan *et al.*¹⁸ found almost identical response factors when using ICP-MS equipped with a concentric nebulizer for the analysis of cyanocobalamin (1.34 kDa) and cobalt standards and for different Se-containing compounds (selenate, selenomethionine and trimethylselenonium), respectively. Pereira *et al.*¹⁹ found species independent ³¹P signal from different phosphorous-containing species including phosphopeptides (1.54kDa) when using a total consumption micronebulizer. On the other hand, Guo *et al.*²⁰ found species independent signal after labelling small proteins (< 15kDa) with MeHg and using another nearly total consumption nebulizer (DIHEN) as well. Unfortunately, larger analytes were not analyzed at those times mostly because sulfur detection (that is present in many polymers and the vast majority of proteins) using regular quadrupole instruments suffer from severe polyatomic interferences. The use of state of the art tandem ICP-MS/MS opens now the sensitive and free of interference analysis of sulfur and in turn, of many proteins and polymers.²¹⁻²³ In fact, the use of ICP-MS in absolute biomolecule quantification approaches has increased exponentially in the last 10 years.^{24,25} Surprisingly, there is no critical report so far focused on the ICP-MS species-independent response for such large non-volatile biomolecules, especially using regular nebulizers. However, most of the ICP-MS applications in proteomics make use of online isotope dilution (online IDA) as quantification strategy,²⁶⁻²⁹ assuming same response factor for the protein species and the, generally inorganic, isotopic tracer added continuously.

The aim of this work is to critically evaluate whether ICP-MS can provide species-independent response for a wide range of biomolecules (all they contain S in their structure), which would enable their absolute quantification without specific standards. Different nebulization systems, operational conditions and wide concentration ranges will be tested. Corresponding response factors obtained for different biologically relevant compounds, such as peptides, proteins, small biomolecules and biocompatible ligands will be statistically compared following stringent procedures.

EXPERIMENTAL SECTION

Reagents and materials. Pure standards β-casein, bovine serum albumin (BSA), cytochrome C, S-(5'-Adenosyl)-L-methionine chloride dihydrochloride (SAM), L-methionine, biotin, Adrenocorticotropic Hormone (ACTH) fragment 1-17 human, [Lys⁸]-Vasopressin, and Neurokinin A were all purchased from Sigma (Steinheim, Germany) and intact monoclonal antibody (mAb) Mass Check Standard from Waters (Milford, MS, USA). Thiolated methoxy PEG, 1kDa, linear 20kDa and branched 20kDa, were purchased from Laysan Bio Inc (AL, USA). Ammonium acetate and Tris-HCl were purchased from Sigma. Sulfur and Phosphorous ICP standards (1000 mg mL⁻¹) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Solid isotopically enriched ³⁴S (the corresponding isotopic abundances were ³⁸S: 3.01 ± 0.03%, ³³S: 1.24 ± 0.02% and ³²S: 95.75 ± 0.13%) was purchased from Isoflex

(San Francisco, USA). All the solutions tested as well as the ³⁴S-spike solution were prepared in ultrapure water.

Instrumentation. ICP-MS system consists on a triple quadrupole 8900 ICP-MS/MS (Agilent, Tokyo, Japan). Flow Injection (FI) analysis using regular flow nebulizers were carried out using a 6 port valve system 9725 (Rheodyne, CA, USA) with a 20 μL peek sample loop and PEEK tubing connections (Sigma bio-inert tubing 0.254 mm i.d.). Regular flow nebulizers employed were a concentric standard MicroMist nebulizer (Agilent, CA, USA) and a PFA X-Flow nebulizer (Saville, MN, USA) and both were coupled to a double-pass spray chamber. For capillary flow analysis, a capillary HPLC 1260 Infinity equipped with an autosampler (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) was used employing fused silica PEEK tubing (25 μm i.d.). Total consumption nebulizer (TCN) selected was a Capillary LC interface from Agilent (CA, USA). It was used as interface for the capillary HPLC-ICP-MS/MS and for the FI analyses. Online IDA flow rates were provided by a peristaltic pump minipuls 3 (Gilson, France) and a syringe pump system kScientific (Holliston, MS, USA) for regular and capillary flow analyses, respectively.

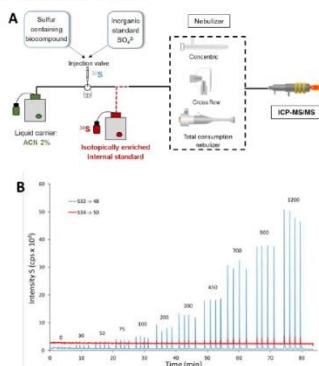


Figure 1. A) Instrumental configuration used for species-independent ICP-MS signal evaluation with the three nebulizers tested. B) Diagram obtained for the S inorganic standard using concentric nebulizer. Blue line corresponds to the ³²S signal coming from natural S standard and red line corresponds to the ³⁴S signal coming from the isotopically enriched solution continuously added (online isotope dilution). Individual concentration values of the different injections (n=4) are also given (ppb S).

Procedures. A scheme of the instrumental set up is given in Figure 1A. Flow injection (FI) analysis mode was selected to neglect the influence of the S background, always observed in ICP-MS and typically associated with the reagents (O-rings, Argon gas and plastic ware) and to increase analysis throughput. Influence of the species structure was studied by direct comparison of the sulfur response factors obtained for the S-containing biomolecules tested with that of an inorganic certified sulfate standard. Diagram obtained for such S

1 inorganic standard using the concentric nebulizer as an example
2 is shown in Figure 1B.

3 Calibration curves, where the concentration experimentally
4 obtained using online isotope dilution was plotted against the
5 theoretical concentration, were built for the compounds tested
6 and the inorganic standard used as reference. Slopes were then
7 statistically compared with Student's t-test (95% confidence
8 level) using the three different nebulizers that were operated
9 under standard conditions given in Tables S1-S2 in the
10 supporting information. A detailed description of the statistical
11 treatment is included in the Supporting information as well.
12 Briefly, we carried out a preliminary screening of the similarity
13 of the population variances by the Fisher-Snedecor's F-test,
14 following Andrade *et al.* guidelines.³⁰ Once this condition was
15 evaluated, the two-tail Student's t-test at 95% confidence level
16 could be applied to compare the slopes of regression. Then, t-
17 values were calculated, following again Andrade *et al.*
18 guidelines,³⁰ based on the equality or difference of the
19 population variances. Additionally, the statistical treatment was
20 carried out using the Software Statgraphics Centurion XVI
21 (available from Statgraphics.net) providing the same results. In
22 the case of the complementary P measurements in the
23 phosphorylated protein β -casein, experimental concentrations
24 were obtained using external calibration with a certified
25 inorganic standard as they could not be obtained using online
26 isotope dilution as previously described for the S
27 measurements.

28 RESULTS AND DISCUSSION

29 The compounds selected for the assessment included, on the
30 one hand, three low-MW biologically relevant compounds: a
31 proteogenic amino acid like L-Methionine, and two cofactors,
32 S-Adenosylmethionine (SAM) and biotin, which are involved
33 in methylation reactions³¹ and in redox chemistry.³²
34 respectively. Three peptide standards of different size covering
35 a wide range of hydrophobicity (% of hydrophobic residues
36 present in the corresponding amino acid sequence)³³ were
37 selected, including Adrenocorticotrophic Hormone ACTH
38 (2.1kDa, 29% hydrophobicity), Vasopressin (1.1kDa, 22%) and
39 Neurokinin A (1.1kDa, 40%). Four purified protein standards
40 of different nature, covering a wide range of molecular weights
41 and structures, were also chosen (Cyt C 13kDa, β -casein,
42 24kDa, BSA, 66kDa and intact monoclonal Antibody-mAb,
43 145kDa). Finally, three thiolated Polyethylene Glycol (mPEG-
44 SH) derivatives, one of 1kDa and two of 20kDa (linear and
45 branched) that are extensively used in biological studies to
46 improve water solubility and biocompatibility of molecules like
47 nanoparticles and drugs, were selected as well.³⁴ Compounds
48 structures are illustrated in Figure S1. All these compounds
49 contain sulfur in their structure (also present in many other
50 biologically relevant biomolecules such as oligonucleotides,
51 vitamins and secondary metabolites),^{32,35} enabling their
52 detection using ICP-MS/MS.^{22,36} Since biomolecule
53 concentration could play a role in the response factors obtained,
54 calibration graphs ($n=10$) covering more than one order of
55 magnitude (from ca. 40 to ca. 1300 ppb S) were built to check
56 for such concentration-dependent effects. Four replicates were
57 performed for each calibration point. Notably, despite the great
58 number of FI peaks processed, none of them was found to be an
59 out layer and therefore all of them were considered.

60 There are several relevant factors that must be taken into
account in order to make a fair and critical comparison between

the response factors provided by the different nebulization
systems. We needed first to assure the absence of any other S-
containing species in the standard solutions prepared directly
from the original corresponding solid materials in order to
compare directly the sulfur signal obtained from the different
species under study. This is particularly relevant for the protein
standards that are obtained through relatively complex
purification processes. Every stock solution was analyzed with
capillary reversed phase core-shell columns (operational
conditions are given in Table S3), which are able to provide
quantitative recoveries even for the selected protein species.³⁷
Chromatograms obtained are given in Figure S2. As can be seen
negligible signals ($\leq 4\%$ total S area) corresponding to low MW
impurities containing sulfur were observed for all the standard
solutions. In the case of β -casein and the 1kDa-PEG species,
small S peaks ($\leq 6\%$) were observed eluting very close to the
main species. These impurities likely correspond to isoforms³⁷
and therefore, do not affect results interpretation as the
nebulization behavior is expected to be very similar for the
different isoform species. Once chromatographic purity was
proved, total sulfur content was accurately and precisely
determined using isotope dilution analysis (IDA). For that
purpose, stock solutions of every compound standard were
acid-digested to convert the corresponding S species into sulfate
and then spiked with an isotopic tracer of sulfur ($^{34}\text{SO}_4^{2-}$). The
obtained S content could be then used to compute the mass
purity of every biomolecule standard under study. Complete set
of results are given in Table S4. As can be seen, mass purities
obtained for the low molecular weight compounds and mPEGs
were very close to 100% and matched pretty well with the purity
values available from the supplier. In contrast mass purity
obtained for peptide standards was lower than 100%. It is worth
noting that, purity values for peptide standards provided by the
manufacturer included peptide purity (i.e. detection of
concomitant species by HPLC-UV) together with peptide mass
content (i.e. quantitative information of the total amino acid
content carried out using Amino Acid Analysis, the reference
method), which allowed us to validate our results
experimentally obtained by acid-digestion and IDA of the
peptide solutions. As can be seen in Table S4, mass purity
values obtained for Vasopressin, ACTH and Neurokinin
(83 \pm 1%, 70 \pm 1% and 77 \pm 2%, respectively) matched very well
with those provided by manufacturer (83%, 69% and 80%,
respectively). In the case of the protein standards, mass purity
values obtained for Cyt C, β -casein and BSA (89 \pm 2%, 90 \pm 2%
and 91 \pm 1%, respectively) are slightly lower than the protein
purities provided by the manufacturer (>95%, >98% and >96%,
respectively) and obtained using electrophoresis. Please note
that such protein purity values provided by the suppliers only
refers to the presence of other proteins as contaminants and do
not take into account other contaminants such as salts or other
minor reagents likely present in the solid materials. Finally in
the case of the mAb mass purity obtained was 76 \pm 2%. Notably,
supplier did not provide any protein purity in this case. Such
sulfur mass purities were used to obtain the theoretical S
concentration of the different solutions prepared for each
compound under study.

Plasma stability could also affect the accuracy of this critical
assessment mostly due to signal drifts and matrix effects.
Therefore, we needed to correct for the instrumental sensitivity
variations likely occurring both intra- and inter-calibrations of
the different compounds. Possible influence of the organic
moiety of the biomolecule should also be corrected. For that

purpose, a constant flow of a $^{34}\text{SO}_2$ spike solution was mixed online with the FI flow (see Figure 1B) to serve as the ideal internal standard.⁹ In that way the intensity ratio of both isotopes, the natural ^{32}S signal coming from the different compounds and the ^{34}S signal continuously coming from the isotopically enriched solution, was measured ($R_m^{32/34}$) as a function of time. We resorted then to the well-developed mathematical treatment of the online IDA to produce normalized peak areas that could be latter safely used in the calibration plots.³⁸ Of course, such normalized areas correspond to the mass of sulfur determined in the different FI peaks that were then translated into concentration after consideration of the different injection volumes used, as shown in equation 1.

$$\text{Conc}_{\text{exp}}^{\text{IDA}} = \frac{[fcd]_{\text{sp}}^{34}}{V_{\text{inj}}} \left(\frac{Aw_s}{Aw_{\text{sp}}} \right) \left(\frac{A_{\text{sp}}^{34}}{A_s^{32}} \right) \int_{t_1}^{t_2} \frac{R_m^{32/34} - R_{\text{sp}}^{32/34}}{1 - R_m^{32/34} R_{\text{sp}}^{34/32}} \quad (1)$$

where d is the density of the spike (^{34}S) solution, Aw_s and Aw_{sp} correspond to the atomic weight of the natural and isotopic sulfur, respectively; and A_{sp}^{34} and A_s^{32} correspond to the abundance of isotopes ^{34}S and ^{32}S in the spike and sample (natural). $R_m^{32/34}$ and $R_{\text{sp}}^{34/32}$ are the isotope ratios in the spike and sample (natural), respectively. Finally, t_1 and t_2 are the initial and final times of the corresponding FI peak.

Such experimental concentrations obtained by online IDA ($\text{Conc}_{\text{exp}}^{\text{IDA}}$) were plotted against the theoretical concentrations used. Therefore a slope of 1 means that the experimental concentration obtained is identical to the theoretical concentration along the calibration range and therefore nebulization efficiency of the target species is identical to that of the isotopically enriched sulfate used for the corresponding quantification. Obviously, such normalization procedure allowed direct and safe comparison of the slopes of the different calibrations plots, even those obtained using different nebulizers just by changing flow (f) and concentration (c) of the ^{34}S -tracer and the injection volume (V_{inj}) of the sample.

It is noteworthy that calibration plots of the different biomolecules were always normalized by the continuous ^{34}S signal of the spike solution (see eq 1 and Figure 1B), which is actually pure inorganic sulfur (sulfate), in order to produce the experimental concentration values by online isotope dilution. Therefore, the individual slopes obtained for each different biomolecule already indicate their relative response factor with regards to the simple inorganic species. As expected, the slope obtained for the natural inorganic standard (sulfate) using the different nebulizers was always very close to one and could be used as reference in each case.

Critical comparison of ICP-MS response factors using calibration graphs. Calibration curves for the S inorganic standard and the different S-containing biomolecules were built using FI analysis and the different nebulization systems tested (concentric, cross-flow and total consumption) in order to carry out a critical statistical comparison of the ICP-MS response factors. Every calibration point was injected four times ($n=4$). The average experimental concentrations obtained using eq 1 (online IDA) for every individual calibration point ($n=10$) and their corresponding uncertainties were plotted against the theoretical concentrations for each of the compounds under study ($n=14$). Calibrations obtained are shown in Figure 2A, 2B and 2C for the TCN, concentric and cross-flow nebulizers, respectively. Individual slopes and intercept values with their corresponding standard deviations,

regression coefficients and the statistical values at 95% confidence level are given in Tables S5-S7.

Regarding TCN, precision associated to each individual calibration point of the different species was adequate ranging from 0.5 to 15% with an average value of 5.0% RSD. As can be clearly seen in Figure 2A calibration slopes obtained for every compound using the TCN are very similar, ranging from 0.958 ± 0.020 to 1.043 ± 0.036 for β -casein and Cytochrome C, respectively.

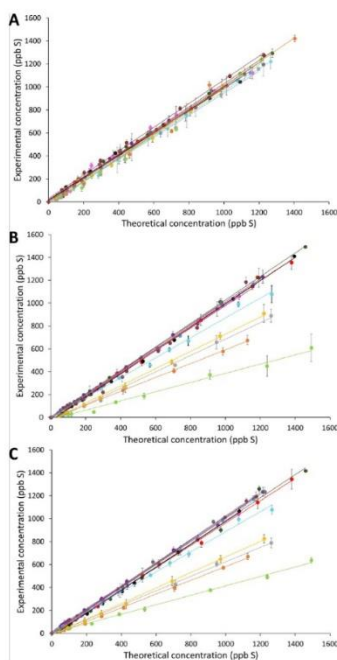


Figure 2. Calibration curves obtained for every single compound under study using A) TCN, B) concentric and C) cross flow nebulizers. Uncertainty bars correspond to 95% confidence level (2SD, $n=4$ replicates). Color code: Sulfate (blue), methionine (brown), SAM (red), Biotin (violet), m-PEG-SH 1kDa (pink), m-PEG-SH 20kDa linear (dark green), m-PEG-SH 20kDa branched (black), Cytochrome C (orange), β -casein (grey), BSA (yellow), mAb (light green), ACTH (garnet), Vasopressin (dark grey) and Neurokinin A (pale blue).

In fact, average value for the 14 individual slopes was 0.998. Corresponding slopes uncertainties were all below 3.5% RSD and regression coefficients (r^2) ranged from 0.991-0.999. Two tailed t-tests carried out at 95% confidence level demonstrated

that calibration slopes for every biological compound were statistically equal to the certified inorganic natural sulfate standard used as reference. In fact, as shown in Figure S3, a "multi-species" generic calibration plot containing every calibration point ($n=10$) of each of the fourteen compounds under study (total $n=140$) can be built resulting in an excellent correlation between experimental and theoretical concentrations ($y=0.997x+1.069$) with excellent linearity ($r^2=0.993$).

The most striking conclusion to emerge from this experiment is that full species-independent response can be obtained when using TCN coupled to ICP-MS. In fact, it demonstrates not only that the nebulization efficiency is identical for the 14 different compounds tested, but also that, as expected, ionization efficiency in the plasma is fully independent from the species. Notably, complete dissolution of every biomolecule under the conditions assayed and adequate certification of their content (mass purity) are proven as well. These statements are of paramount importance since the same ICP-MS instrument and biomolecule solutions were used in the assessment of the other two regular flow nebulizers and therefore any difference observed in the response factors of the biomolecules under study will be exclusively ascribed to differences in the nebulization efficiencies.

Regarding concentric and cross-flow nebulizers, precision associated to each individual calibration point of the different species was also found to be adequate with average values of 5.1 and 4.4% RSD, respectively. Figures 2B-2C show the calibration plots obtained for every biomolecule under study using the standard concentric and cross flow nebulizers, respectively. All the statistical parameters related are given in Tables S6 and S7. Corresponding slopes uncertainties were again adequate, below 3.5% and 2.4% RSD, and regression coefficients (r^2) ranged from 0.990-0.999 and 0.996-0.999 for concentric and cross flow nebulizers, respectively. As can be seen, calibration slopes obtained for the low MW compounds (inorganic standard, methionine, biotin, and SAM) were very similar for both nebulizers and close to 1. Interestingly, this behavior was also observed for the more complex PEG compounds, both for the 1kDa and for the 20kDa (linear and branched) derivatives, vasopressin and ACTH peptides. Average slope values for those nine species were 1.008 and 1.001 for concentric and cross flow nebulizers, respectively. In fact, after statistical treatment, slopes of the low MW compounds, PEG derivatives and barely hydrophobic peptides (vasopressin and ACTH) were proved to be statistically equal (see Tables S6-S7) to that of the inorganic standard.

In contrast, significant differences in the ICP-MS response factors (calibration slopes) were observed for every protein tested as clearly shown in Figures 2B-2C. Actually in these cases the two-tail Student's t -tests at 95% confidence level demonstrated that proteins' calibration slopes were statistically different (and significantly lower) than that of the corresponding inorganic standard, both for the concentric and cross-flow nebulizers (Tables S6 and S7, respectively). For small and medium size proteins (i.e. Cytochrome C, β -casein and BSA) slopes obtained ranged from 0.603 to 0.752 and from 0.599 to 0.678 for concentric and cross flow nebulizers, respectively. In the case of the larger and complex intact antibody (mAb) the slope fell to 0.403 and 0.412, respectively. Interestingly, the highly hydrophobic peptide (neurokinin A) exhibited behavior that is intermediate between the proteins and

the group comprising low MW compounds, PEG derivatives and barely hydrophobic peptides. The slope values observed were slightly lower than 1 (i.e. 0.871 and 0.874 for concentric

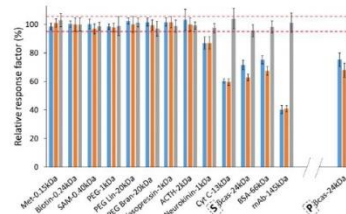


Figure 3. Relative response factors (% ratio of the calibration slopes of the individual species divided by that of the corresponding inorganic standard, see Tables S5-S7) obtained using the concentric (blue), cross flow (orange) and TCN (grey) nebulizers for all the biomolecules under study. Uncertainty was propagated taken into account the uncertainty associated to the slopes of the biomolecules and the corresponding inorganic standard. Error bars correspond to such propagated uncertainty at the 95% confidence level (2SD).

cross flow nebulizers) as shown in Figures 2B-2C. This difference is however significant enough to make such slopes statistically different (and significantly lower) than that of the corresponding inorganic standard. This set of results offer compelling evidence for the species-dependent response of ICP-MS when using regular flow nebulizers at least for the four proteins and the hydrophobic peptide tested in this study.

In order to make a global comparison of the differential behaviors observed for each biomolecule and using the 3 nebulizers, Figure 3 summarizes the relative response factors obtained by direct comparison (% ratio) of the calibration slopes of the individual biomolecules with the corresponding slope of the natural inorganic standard. If the relative response factor obtained is close to 100% means that such species behaves identically than the inorganic natural standard using the corresponding specific nebulizer. All values obtained with the TCN and those obtained using standard nebulizers for methionine, biotin, SAM, PEG derivatives and peptides (Vasopressin and ACTH) perfectly matched the response factor of the S inorganic standard at the 95% confidence level (95-105%, dotted red lines in Figure 3). However, as previously highlighted in Figures 2B-2C, relative response factors obtained for the proteins tested and the Neurokinin peptide using the standard nebulizers are significantly lower. Interestingly Figure 3 seems to suggest that the differential behavior using such regular flow nebulizers is not directly depending on the molecular weight of the compounds under study. Relative response factors obtained for the PEG derivatives, even for those in the same size range (20kDa) than proteins, were close to 100%. In fact, each and every PEG derivatives tested with the three nebulizers provided relative response factors ranging from $97\pm 5\%$ and $103\pm 2\%$, in spite that they have very different size (1 and 20kDa) and structure (linear and branched). In contrast, it seems clear that hydrophobicity is a primary reason behind the differential behavior observed for regular flow nebulizers. In fact the most hydrophobic peptide, neurokinin (40% of hydrophobic amino acid residues present)³³ provided

slightly lower, but still statistically different, relative response factors (87±4% for both nebulizers). However, the ACTH, which is almost twice the size of neurokinin (2.1 and 1.1kDa, respectively) but considerably less hydrophobic (29%), provided relative response factors close to 100% (103±7% and 100±4%, respectively). In this line, a small protein such as Cyt C (13kDa) provided already significantly lower relative response factors (60±2% for both nebulizers). Bigger proteins such as β -casein and BSA provided similar but still slightly higher response factors for both concentric (72±3% and 75±3%, respectively) and cross-flow (63±2% and 67±3%, respectively) nebulizers. However, the significantly bigger monoclonal Ab (mAb) provided much lower response factors (40±3% and 41±2%, respectively). Notably, both nebulizers followed the same trend, in spite that are based in different principles and are produced by different companies. In fact, same results are expected using other nebulizers with similar principles and characteristics. It is also important to highlight here the % of hydrophobic residues³³ in the proteins under study that are 31%, 54%, 38% and 38% for Cyt C, β -casein, BSA and mAb, respectively. Therefore it seems that hydrophobicity plays an important, but no definitive, role in the nebulization efficiency observed using the regular nebulizers. In fact, it appears that the size of the compound might be relevant as well when comparing biomolecules with similar hydrophobicity. Actually, when comparing the neurokinin peptide with the proteins BSA and mAb (all of them with around 40% of hydrophobic residues), it can be clearly observed in Figure 3 that the relative response factors decrease as the size increases both for concentric (87±4, 75±3 and 40±3, respectively) and cross-flow nebulizers (87±4, 67±3 and 41±2, respectively). Of course, the presence of posttranslational modifications and prosthetic groups (cofactors) in the proteins could also be important factors. In the particular case of Cyt C it must be taken into account the extra hydrophobicity brought by the highly hydrophobic Heme group.³⁹ This could be the reason of the significantly low relative response factors (60±2% for both nebulizers) observed for this protein in spite of its relative small size and low % of hydrophobic residues (31%). Also in this line, the incorporation of up to 5 hydrophilic phosphate groups in the phosphorylated protein β -casein could explain the relatively high relative response factors (72±3 and 63±2, modified Figure 3) observed in spite of its very high percentage of hydrophobic residues (54%). It is worth stressing here that the experimental design of this work enables us to focus the critical comparison on the differences between the biomolecules tested and the enriched ³⁴S inorganic tracer spiked. In fact only these two species are present in the solution during nebulization and transport, which allows us to study their differential behavior exclusively without being affected by other factors, such as the presence of a complex matrix.⁴⁰ In fact, our experimental design would resemble the eluent of a chromatographic column where the different biomolecule species elute more or less isolated and can be quantified by online IDA or by applying the corresponding response factor obtained previously using simple generic standards.

Evaluation of different operational conditions.

Furthermore, we wanted to find out whether the differential ICP-MS response factors observed for proteins using regular flow nebulizers remained under different operating conditions. We selected the concentric nebulizer and BSA as protein model, which presents an intermediate behavior (See Figures 2-3) and it is typically used as reference protein in absolute

quantification workflows.³ In this case, since the number of analyses to be performed was much lower, we selected bulk isotope dilution analysis as alternative quantification strategy. The BSA solution (containing natural S in its amino acid chain) was spiked with a known amount of the isotopically enriched inorganic standard (³⁴SO₄²⁻). In that way, the target ³²S/³⁴S isotope ratio was measured in the spiked protein solutions and directly translated into concentration using conventional IDA. Corresponding blanks were also quantified and subtracted. Relative response factors were then computed by comparison (ratio, %) of the experimental concentration obtained with the theoretical calculated concentration. Different Argon carrier gas flows (Figure S4) were tested while keeping constant the liquid flow rate (400 μ Lmin⁻¹). Different liquid flow rates while keeping constant the Argon carrier gas flow (1.1Lmin⁻¹, Figure S5) were assayed as well. In both cases, no statistical differences were observed at the 95% confidence level. In fact, precision as good as 5% and 2% RSD (n=6) between the different conditions assayed, respectively, were obtained. Interestingly, the mean relative response factor obtained for BSA (71±4% and 72±1 % in Figures S4 and S5, respectively), was very similar to that obtained by the slope comparison (75±3 %, Figure 3) of the individual BSA and inorganic S standard solutions using the FI approach with online isotope dilution, what somehow internally validates the results obtained so far. Another operating parameter that could affect response factors of proteins could be the temperature of the spray chamber. The same BSA solution spiked with the ³⁴S tracer used in the previous experiment, was analyzed using the concentric nebulizer coupled to a double-pass spray chamber at four different temperatures (-5, 2, 10 and 20 °C). Results are given in Figure S6. Once again no statistical discrepancies were observed being the mean relative response factor identical (73±2%) to those obtained previously (Figure 3 and Figures S4-S5).

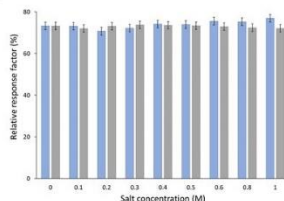


Figure 4. Relative response factors for BSA (experimental concentration obtained by IDA divided by the theoretical concentration) obtained in two different salt solutions (ammonium acetate, blue and Tris-HCl, grey) at different concentrations (0-1M) using the concentric nebulizer. Error bars correspond to 95% confidence level (2SD, n=10 replicates).

Finally we focused on the assessment of the possible impact of the salt type and its concentration on the relative response factor obtained for the same BSA solution. Increasing salt concentrations (from 0.1 to 1 M) were added to the same BSA solution spiked with the ³⁴S tracer used before. Two volatile buffer salts, ammonium acetate and Tris-HCl (pH 7.4) were selected, as they are typically used when coupling size exclusion chromatography (SEC) and ion exchange

chromatography (IEC) to ICP-MS for protein analysis.^{41,42} Results are given in Figure 4. Again relative response factor remained unaltered at the 95% confidence level along the concentration range of both salt types. In fact, precision obtained between the relative response factors obtained at the nine concentration levels was excellent both for ammonium acetate (73±4%) and Tris (73±1%). Such relative response factors matched very well again with those obtained for BSA so far using the concentric nebulizer under different operational conditions (Figures S4-S6) and protein concentration levels (Figure 3).

Interestingly, the experiments carried out using the isotopically enriched S inorganic standard spiked to the BSA solution containing the natural S in its structure (Figures 2-4 and S4-S6), confirm that isotopic equilibration is necessary to obtain accurate quantification using isotope dilution analysis. Of course, although such isotopic equilibration is achieved in the plasma, the different nebulization efficiencies between the enriched inorganic standard and the biomolecule when using regular nebulizers led to biased results. To prove further this assumption, the same BSA solution spiked with the enriched inorganic standard was analyzed before and after being subjected to acidic digestion. Importantly, the same intact protein and digested protein solutions were analyzed using the concentric and TCN nebulizers. Quantification was performed using conventional IDA and again relative response factors were computed as the ratio (%) between the experimentally obtained and the theoretical BSA concentrations. When analyzing the intact protein solution with the concentric nebulizer, significantly lower IDA results were obtained being the relative response factor (73±1%) very similar to those obtained before (Figures 3-4 and S4-S6). In contrast, when acidic digestion of the same spiked protein solution is carried out prior to the isotope ratio measurement, that is to say when the natural S originally present in the protein amino acid chain has been previously converted into inorganic sulfate, the relative response factor rises up to 97±2%. On the other hand, no statistical differences in the relative response factor were obtained using the TCN for the intact (98±1%) and acid digested (100±2%) solutions. This experiment is consistent with the previous results (Figure 3) and demonstrates once again that nebulization efficiency using TCN is complete regardless of the nature of molecule containing the element and therefore that it is able to provide full species-independent response in ICP-MS for any kind of biomolecule, including proteins.

Simultaneous P and S monitoring in protein β -casein. In order to ultimately demonstrate that the differential behavior observed in regular flow nebulizers for the proteins is independent of the ICP-detectable element used to monitor the protein and it is exclusively due to species-dependent nebulization efficiency, we compared the relative response factor of β -casein obtained previously using the S present (as it is the case of the other proteins under study) and the P present in its phosphorylation sites. Note that β -casein has extensively used in phosphorylation studies as model protein. First, we assured the absence of any other P-containing species in the standard solution prepared directly from the original corresponding solid material using again capillary chromatography (operational conditions and chromatogram obtained are given in Table S3 and Figure S2). More than 99% of total P area corresponded to the target protein β -casein and

its minor isoforms. Once chromatographic purity was proved, total phosphorus content was determined. For that purpose, the stock β -casein solution was acid-digested to convert the corresponding P species into phosphate, which was then determined by external calibration using a phosphate certified standard. In that way, the theoretical P concentration could be determined in the different calibration points that were subsequently measured using FI (four replicates per calibration point) and the three nebulizers under study to build the corresponding calibration graphs. Of course, since P is monoisotopic we had to resort in this case to external calibration using a certified phosphate standard. The average P experimental concentrations obtained for every individual calibration point (n=10) and their corresponding uncertainties were plotted against the theoretical concentrations for every nebulizer under study. Individual slopes and the intercept values with the corresponding uncertainties and regression coefficients are given in Table S8. As can be seen, calibration slope obtained using the TCN was again close to 1 (0.967) and significantly higher than those obtained using the concentric and cross flow nebulizers (0.753 and 0.680, respectively). In fact, relative response factors previously obtained for the β -casein protein using S (96±4, 72±3 and 63±2) match well with those obtained using P (97±6, 75±5 and 68±5) for TCN, concentric and cross flow, respectively as shown in Figure 3.

CONCLUSIONS

The capability of ICP-MS for the long-sought absolute quantification of biomolecules without the need of specific standards depends entirely on its potential to provide species-independent response. This work offers for the first time compelling evidence of the differential response factor obtained using ICP-MS with standard nebulization systems for proteins and hydrophobic peptide with regards to other simple biological relevant molecules such as amino acids, cofactors, PEG-derivatives, non-hydrophobic peptides and inorganic salts, all them containing the same ICP-detectable element present in the proteins (sulfur). Notably since the use of a total consumption nebulizer led to identical response factors for all the species under study, reasons behind the differential behavior obtained using the regular flow nebulizers such as discrepancies in the ionization efficiency, protein solubility or errors in the certification of the concentration of the biomolecules solutions used, could be ruled out leaving nothing but species-dependent nebulization efficiency as the sole cause.

Interestingly it seems that while hydrophobicity is a principal reason for the different response factors obtained for the various biomolecules using regular flow nebulizers, the contribution of molecular weight is not so relevant. However, it has been observed that the magnitude of such differential behavior among species of similar hydrophobicity seems to depend on the molecular weight. The fact that there is excellent comparability between the different quantification strategies performed (i.e. FI with online IDA, bulk IDA of protein solutions spiked with the enriched isotope and comparison of the results obtained for protein solutions before and after acidic digestion) gives confidence as to the robustness of the results obtained.

Although this work has made use of the proteinaceous S present in the Cysteine and Methionine residues of proteins, our conclusions could extend to the P or Se present in phosphoproteins and selenoproteins, respectively and of course

to any metal (Fe, Cu, Zn, Mn, V) coordinated (i. e., metalloproteins or coenzymes) to the target protein. This implies that species-independent quantification of intact proteins using ICP-MS cannot be carried out unless a TCN is used. Unfortunately, this is not the case of a wide range of applications where size exclusion chromatography (SEC) and HPLC is coupled to ICP-MS using regular flow nebulizers and protein quantification is carried out using inorganic standards or online IDA.^{42,43} To make matters worse such differential behavior appears to be unpredictable. Therefore, although the use of another element-containing protein as generic standard would provide better absolute quantification results, it should be demonstrated first that both, the standard and the target proteins, provide the same element response factor. It must be pointed out however that the use of isotopically enriched proteins (e.g. proteins coordinated with isotopic enriched metals or containing enriched S or Se in their amino acids) as internal standards could well correct for this effect.^{27,44}

A profound impact of this work is expected in many scientific areas where absolute biomolecule quantification is performed using ICP-MS, especially in the proteomics, metallomics and clinical fields.^{6,8} We still believe that the potential of ICP-MS for absolute protein quantification is enormous but the experimental workflow must be carefully designed, starting with the nebulization system and quantification strategy. The present findings might help to suggest several courses of actions to face this analytical challenge.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website.

Instrumental conditions, biomolecule structures, mass purity assessment, chromatograms, detailed statistics, relative response factors for different conditions, P calibration curves (PDF).

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

Jorge Ruiz Encinar, e-mail: ruizjorge@uniovi.es.

ACKNOWLEDGMENT

Financial support from FC-GRUPIN-ID/2018/000166 (Asturias Regional Government) and CTQ2016-79412-P and PID2019-109698GB-I00 (Ministry of Economy and Competitiveness, Spain) is gratefully acknowledged. Authors want to thank also Agilent for the technical support. LCB acknowledges the Ph.D. grant (FPU15/04989) Spanish Ministry of Education.

REFERENCES

- (1) Mallick, P.; Knuster, B. Proteomics: a pragmatic perspective. *Nat. Biotechnol.* **2010**, *28*, 695–709.
- (2) Kirkpatrick, D. S.; Gerber, S. A.; Gygi, S. P. The absolute quantification strategy: A general procedure for the quantification of proteins and post-translational modifications. *Methods* **2005**, *35*, 265–273.
- (3) Kumar, M.; Joseph, S. R.; Augsburg, M.; Bogdanova, A.; Drechsel, D.; Vandenhouw, N. L.; Buchholz, F.; Gentzel, M.; Shevchenko, A. MS Western: a Method of Multiplexed Absolute Protein Quantification is a Practical Alternative to Western Blotting. *Mol. Cell. Proteomics* **2018**, *17*, 384–396.
- (4) Bronstrup, M. Absolute quantification strategies in proteomics based on mass spectrometry. *Expert Rev. Proteomics* **2004**, *1*, 503–512.
- (5) Conley, J. M.; Berg, L. TCR signaling: it's all about the numbers.

- (6) *J. Nat. Immunol.* **2019**, *20*, 1415–1424.
- (7) Calderón-Celis, F.; Ruiz Encinar, J.; Sanz-Medel, A. Standardization approaches in absolute quantitative proteomics with mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* **2017**, *1*–23.
- (8) Boja, E. S.; Fehninger, T. E.; Baker, M. S.; Marko-Varga, G.; Rodriguez, H. Analytical Validation Considerations of Multiplexed Mass Spectrometry-Based Proteomic Platforms for Measuring Protein Biomarkers. *J. Proteome Res.* **2014**, *13*, 5315–5332.
- (9) Mounicou, S.; Szpanar, J.; Lobiński, R. Metallomics: The concept and methodology. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 1119–1138.
- (10) Yan, X.; Yang, L.; Wang, Q. Detection and quantification of proteins and cells by use of elemental mass spectrometry: progress and challenges. *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, *405*, 5663–5670.
- (11) Calderón-Celis, F.; Cid-Barrio, L.; Ruiz Encinar, J.; Sanz-Medel, A.; Calvete, J. J. Absolute venomics: Absolute quantification of intact venom proteins through elemental mass spectrometry. *J. Proteomics* **2017**, *164*, 33–42.
- (12) Lozada, C.; Alberti, J. J.; Saurina, J.; Sentellas, S. Determination of S-containing drug metabolites from *in vitro* and *in vivo* metabolism studies by using LC-ICP/MS. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *404*, 539–551.
- (13) Kroepff, N.; Marschall, T. A.; Francesconi, K. A.; Schwerdtle, T.; Kuehnelt, D. Quantitative determination of the sulfur-containing antioxidant ergothioneine by HPLC/ICP-QQQ-MS. *J. Anal. At. Spectrom.* **2017**, *32*, 1571–1581.
- (14) Svantesson, E.; Pettersson, J.; Markides, K. E. The use of inorganic elemental standards in the quantification of proteins and biomolecular compounds by inductively coupled plasma spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* **2002**, *17*, 491–496.
- (15) Grotti, M.; Ardini, F.; Terol, A.; Magi, E.; Todoli, J. L. Influence of chemical species on the determination of arsenic using inductively coupled plasma mass spectrometry at a low liquid flow rate. *J. Anal. At. Spectrom.* **2013**, *28*, 1718–1724.
- (16) Montel, J.; Grandlay, G.; Gras, L.; De Loos, M. T. C.; Mora, J. The influence of the sample introduction system on signals of different tin compounds in inductively coupled plasma-based techniques. *Spectrochim. Acta-Part B. At. Spectrosc.* **2013**, *81*, 36–42.
- (17) Langlois, B.; Dautheribes, J. L.; Memet, J. M. Comparison of a direct injection nebulizer and a micro-nebulizer associated with a spray chamber for the determination of iodine in the form of volatile CHI₃ by inductively coupled plasma sector field mass spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* **2003**, *18*, 76–79.
- (18) Jureša, D.; Kuehnelt, D.; Francesconi, K. A. Consequences of vapor enhancement on selenium speciation analysis by HPLC/ICPMS. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 8569–8574.
- (19) Nan, Y. A.; Akajima, G. N.; Ogra, Y. Complementary Use of LC-ICP-MS and LC-ESI-Q-TOF-MS for Selenium Speciation. *Anal. Sci.* **2015**, *31*, 561–564.
- (20) Pereira Navarro, A.; Ruiz Encinar, J.; Carrascal, M.; Abián, J.; Sanz-Medel, A. Absolute and site-specific quantification of protein phosphorylation using integrated elemental and molecular mass spectrometry: Its potential to assess phosphopeptide enrichment procedures. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 1777–1787.
- (21) Guo, Y.; Xu, M.; Wang, Q. Strategy for absolute quantification of proteins: CH₃Hg⁺ labeling integrated molecular and elemental mass spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* **2009**, *24*, 1184–1187.
- (22) Fernández, S. D.; Sngulhana, N.; Encinar, J. R.; Sanz-Medel, A. Triple quad ICPMS (ICPQQQ) as a new tool for absolute quantitative proteomics and phosphoproteomics. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 5851–5857.
- (23) Balcaen, L.; Woods, G.; Resano, M.; Vanhaecke, F. Accurate determination of S in organic matrices using isotope dilution ICP-MS/MS. *J. Anal. At. Spectrom.* **2013**, *28*, 33–39.
- (24) Raab, A.; Feldmann, J. Biological sulphur-containing compounds - Analytical challenges. *Anal. Chim. Acta* **2019**, *1079*, 20–29.
- (25) Cid-Barrio, L.; Calderón-Celis, F.; Abisolo-Linares, P.; Costa-Fernández, J. M.; Ruiz Encinar, J.; Fernández-Sánchez, M. L.; Sanz-Medel, A. Advances in absolute protein quantification and quantitative protein mapping using ICP-MS. *Trends Anal. Chem.* **2018**, *104*, 148–159.
- (26) Chahrouh, O.; Malone, J. Applications in Quantitative Proteomics Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) Applications in Quantitative Proteomics. *Protein Pept. Lett.*

- 2016, 24, 253–266.
- (26) Nuevo Ordoñez, Y.; Montes-Bayón, M.; Blanco-González, E.; Sanz-Medel, A. Quantitative analysis and simultaneous activity measurements of Cu, Zn-superoxide dismutase in red blood cells by HPLC-ICPMS. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 2387–2394.
- (27) Sarmiento-González, A.; Encinar, J. R.; Cantarero-Roldán, A. M.; Marchante-Gayón, J. M.; Sanz-Medel, A. HPLC-ICPMS and Stable Isotope-Labeled Approaches To Assess Quantitatively Tl(IV) Uptake by Transferrin in Human Blood Serum. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 8702–8711.
- (28) del Castillo Busto, M. E.; Montes-Bayón, M.; Sanz-Medel, A. Accurate determination of human serum transferrin isoforms: Exploring metal-specific isotope dilution analysis as a quantitative proteomic tool. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 8218–8226.
- (29) Giner Martínez-Sierra, J.; Moreno Sanz, F.; Herrero Espílez, P.; Santamaría-Fernández, R.; Marchante Gayón, J. M.; García Alonso, J. I. Evaluation of different analytical strategies for the quantification of sulfur-containing biomolecules by HPLC-ICP-MS: Application to the characterization of ^{34}S -labelled yeast. *J. Anal. At. Spectrom.* **2010**, *25*, 989–997.
- (30) Andrade, J. M.; Estévez-Pérez, M. G. Statistical comparison of the slopes of two regression lines. *Anal. Chim. Acta* **2014**, *838*, 1–12.
- (31) Lu, S. C. S-adenosylmethionine. *Int. J. Biochem. cell Biol.* **2000**, *32*, 391–395.
- (32) Mieller, E. G. Trafficking in persulfides: Delivering sulfur in biosynthetic pathways. *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 185–194.
- (33) Kyte, J.; Doolittle, R. F. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **1982**, *157*, 105–132.
- (34) Hutana, D.; Frisberg, M. D.; Guo, L.; Dancie, C. C. Recent Applications of Polyethylene Glycols (PEGs) and PEG Derivatives. *Mod. Chem. Appl.* **2014**, *2*, 2–7.
- (35) Feldmann, J.; Raab, A.; Krupp, E. M. Importance of ICPMS for speciation analysis is changing: future trends for targeted and non-targeted element speciation analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* **2018**, *410*, 661–667.
- (36) Calderón-Celis, F.; Sanz-Medel, A.; Encinar, J. R. Universal absolute quantification of biomolecules using element mass spectrometry and generic standards. *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 904–907.
- (37) Calderón-Celis, F.; Díez-Fernández, S.; Costa-Fernández, J. M.; Ruiz Encinar, J.; Calvete, J. J.; Sanz-Medel, A. Elemental Mass Spectrometry for Absolute Intact Protein Quantification without Protein-Specific Standards: Application to Snake Venomics. *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 9699–9706.
- (38) Rappel, C.; Schaunloffel, D. The role of sulfur and sulfur isotope dilution analysis in quantitative protein analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *390*, 605–615.
- (39) Koch, H.; Schenckler, D. In *Chapter 28. in Cytochrome Complexes: Evolution, Structures, Energy transduction and signaling*, Cramer, W. A., Kallias, T., Eds., Springer, USA, 2016, pp 555–584.
- (40) Bamonti, L.; Theimer, S.; Rohr-udilova, N.; Keppler, B. K.; Koellensperger, G. Accurate high throughput quantification of selenium in biological samples - the potential of combining isotope dilution ICP-tandem mass spectrometry with flow injection. *J. Anal. At. Spectrom.* **2016**, *31*, 2227–2232.
- (41) Palacios, Ó.; Ruiz Encinar, J.; Schaunloffel, D.; Lobinski, R. Fractionation of selenium-containing proteins in serum by multiaffinity liquid chromatography before size-exclusion chromatography-ICPMS. *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *384*, 1276–1283.
- (42) Bettner, J.; Montes Bayón, M.; Ruiz Encinar, J.; Fernández Sánchez, M. L.; Fernández de la Campa, M. del R.; Sanz Medel, A. The emerging role of ICP-MS in proteomic analysis. *J. Proteomics* **2009**, *72*, 989–1005.
- (43) Wang, M.; Feng, W.; Yue, Zhao, Y.-L.; Chai, Z.-F. ICP-MS-based strategies for protein quantification. *Mass Spectrom. Rev.* **2009**, *221*–235.
- (44) Deitrich, C. L.; Cuello-Núñez, S.; Kmíotek, D.; Torma, F. A.; Del Castillo Busto, M. E.; Fisicaro, P.; Goenaga-Infante, H. Accurate Quantification of Selenoprotein P (SEPP1) in Plasma Using Isotopically Enriched Seleno-peptides and Species-Specific Isotope Dilution with HPLC Coupled to ICP-MS/MS. *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 6357–6365.

Supporting information

**ASSESSMENT OF THE POTENTIAL AND LIMITATIONS OF ELEMENTAL
MASS SPECTROMETRY IN LIFE SCIENCES FOR ABSOLUTE
QUANTIFICATION OF BIOMOLECULES USING GENERIC STANDARDS**

Laura Cid-Barrio¹, Francisco Calderón-Celis¹, José Manuel Costa-Fernández¹ and Jorge Ruiz Encinar^{1*}.

¹Department of Physical and Analytical Chemistry, University of Oviedo, Julián Clavería 8, Oviedo 33006, Spain.

*Corresponding author: ruizjorge@uniovi.es

Table of contents

Table S1. ICP-MS experimental conditions.	S3
Table S2. Flow injection conditions.	S3
Table S3. Chromatographic conditions.	S3
Figure S1. Schematic structures of S-containing compounds and amino acid chain of S-containing peptides.	S4
Figure S2. Analysis by capillary LC (reverse-phase) coupled to ICP-MS/MS of the different biomolecules tested. S.	S5
Table S4. Mass purity obtained for the different S-containing compounds under study.	S10
Statistical procedure for comparison of the slopes of two regression lines	S11
Table S5. Statistical comparison of the slope values obtained for the inorganic standard and the biological compounds under study using the Total consumption nebulizer (TCN).	S13
Table S6. Statistical comparison of the slope values obtained for the inorganic standard and the biological compounds under study using the concentric nebulizer.	S14
Table S7. Statistical comparison of the slope values obtained for the inorganic standard and the biological compounds under study using the Cross Flow nebulizer.	S15
Figure S3. Experimental concentration obtained for all S-containing compounds assayed at the different concentration levels represented against theoretical concentration with total consumption nebulizer (TCN) plotted in the same calibration graph.	S16
Figure S4. Relative response factors obtained for BSA with different nebulizer gas flow rates and using the concentric nebulizer.	S17
Figure S5. Relative response factors obtained for BSA with different liquid flow rates and using the concentric nebulizer.	S18
Figure S6. Relative response factors obtained for BSA with different spray chamber temperatures and using the concentric nebulizer.	S19
Table S8. Regression values obtained for calibration curves of P determination in β -casein using TCN, concentric and cross flow nebulizers.	S20

Table S1. ICP-MS experimental conditions.

ICP-MS parameter	Nebulizer		
	Concentric	Cross flow	TCN
RF power	1550 W	1550 W	1550 W
Sampling depth	8.0 mm	8.0 mm	8.0 mm
Carrier gas flow rate	1.10 Lmin ⁻¹	1.20 Lmin ⁻¹	1.0 Lmin ⁻¹
Acquisition mode	ICP-MS mode	Transitions Q1→Q2	Cell gas
	MS/MS mass shift	^{32,34} S ⁺ → ^{48,50} SO ⁺	O ₂ : 0.30 mL min ⁻¹

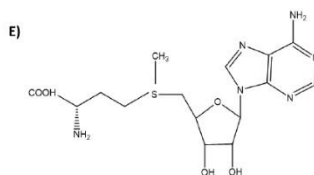
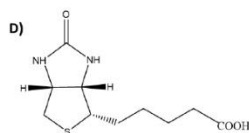
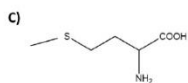
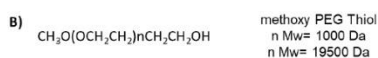
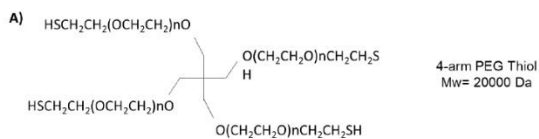
Table S2. Flow injection conditions.

Flow injection parameters	Nebulizer		
	Concentric	Concentric	Concentric
Flow	500 µL min ⁻¹	500 µL min ⁻¹	7 µL min ⁻¹
Injection volume	20 µL	20 µL	1 µL

Table S3. Chromatographic conditions in the capillary reversed-phase liquid chromatography (µRP-HPLC)-ICP-MS/MS analyses using C4 for protein, Neurokinin A and PEG analyses and C18 for low molecular weight compounds (Biotin, SAM and Methionine), Vasopressin and ACTH peptides. All the analyses were performed using the Total Consumption nebulizer (TCN).

HPLC parameter	Experimental conditions
Mobile phase A	H ₂ O, formic acid (0.2%)
Mobile phase B	Acetonitrile, formic acid (0.2%)
Injection volume	1 µL
Chromatographic gradient (min-%B)	0-2, 5-2, 25-60, 28-90
Chromatographic flow	4.5 µL min ⁻¹
Columns	C4 Bioshell 300 µm, 150mm x 3.4µm (400 Å) C18 Bioshell 300 µm, 150mm x 3.4µm (400 Å)

Figure S1. Schematic structures of S-containing compounds and amino acid chain of S-containing peptides: A) Branched 4arm-PEG thiolated 20kDa, and B) linear methoxy-PEG thiolated 1kDa and 19.5kDa, C) Methionine, D) Biotin, E) S-adenosylmethionine (SAM), F) ACTH, G) Vasopressin and H) Neurokinin A.



F) ACTH: 17 aa (SYSMEHFRWGKPVGKKR)

G) Vasopressin: 9 aa (CYFQNCPKG-NH₂)

H) Neurokinin A: 10 aa (HKTDSFVGLM)

Figure S2. Analysis by capillary LC (reverse-phase) coupled to ICP-MS/MS of the different biomolecules tested. S Intensity corresponds to m/z 48 ($^{32}\text{S}^{16}\text{O}^+$) and P intensity corresponds to m/z 47 ($^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$).

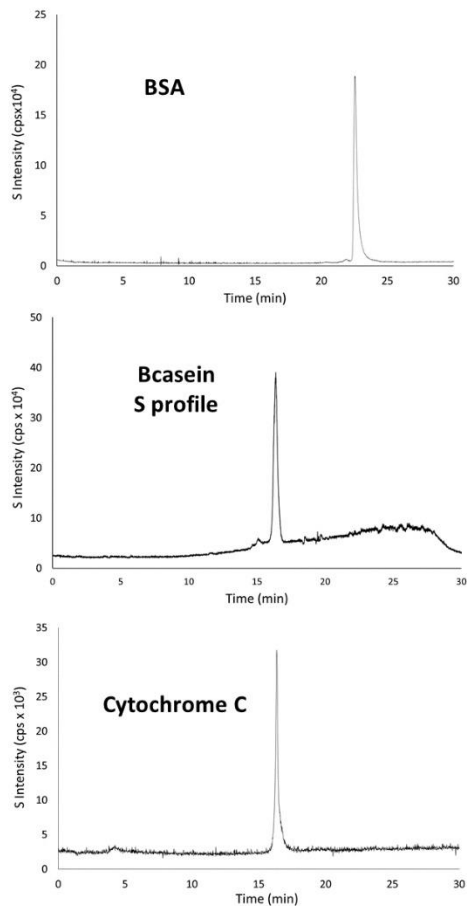


Figure S2. Continuation

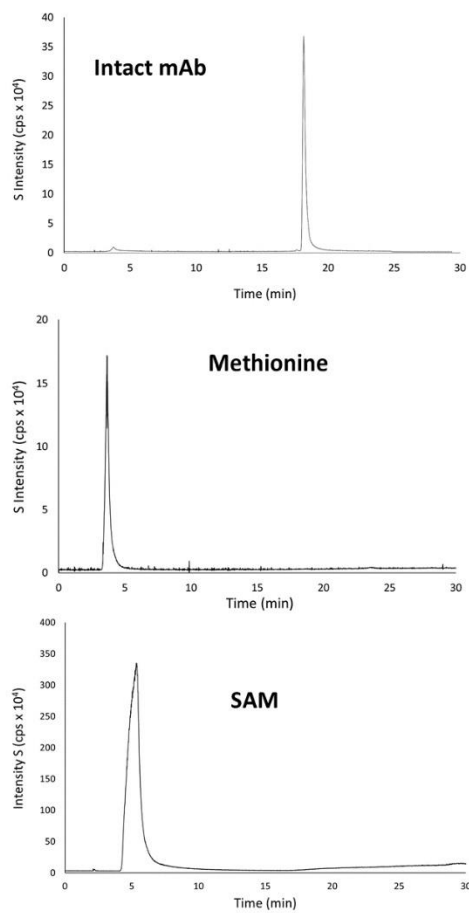


Figure S2. Continuation

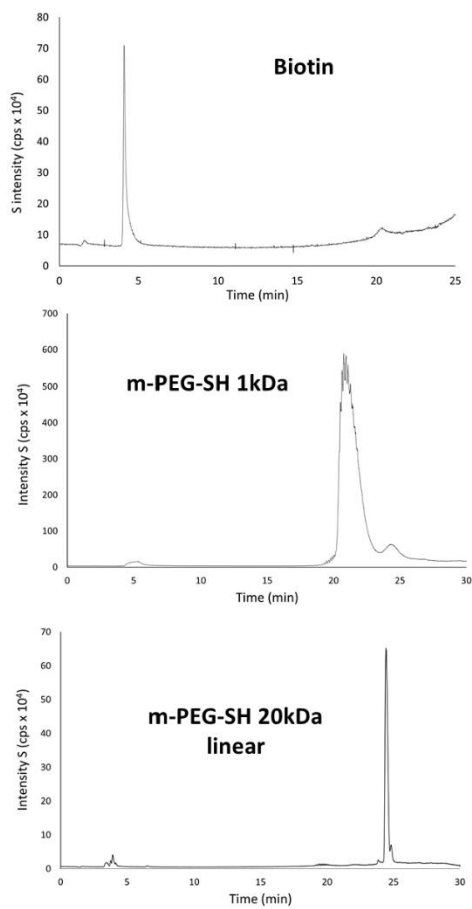


Figure S2. Continuation

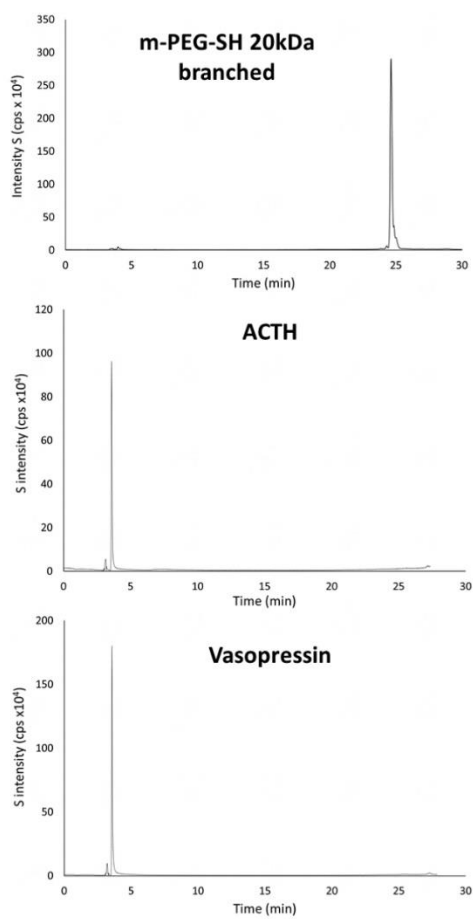


Figure S2. Continuation

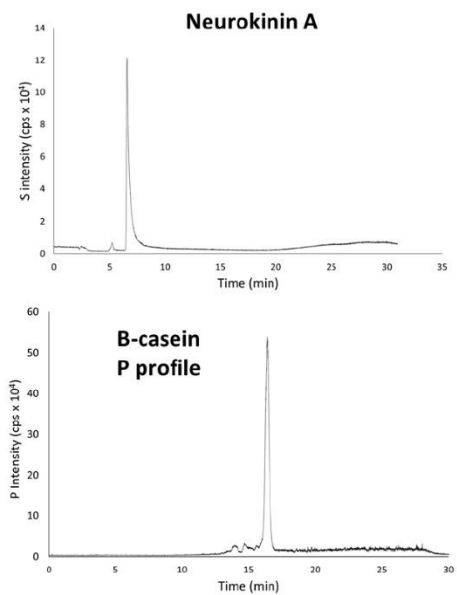


Table S4. Mass purity obtained for the different S-containing compounds under study. Isotope dilution analysis was used as primary method to achieve accurate and precise results. Uncertainty associated to the mass purity values corresponds to 1SD and is obtained directly from the propagation of the individual uncertainties from the acidic digestion replicates (n=3) and their corresponding ICP-MS measurements (n=10). Purity assessment given by the manufacturers available are also given and the strategy used for their computation is indicated in brackets. Please note that purity values for protein standards are not mass purity but protein purity.

S-compound	Purity (Manufacturer)	Mass purity (acid-digestion + IDA)
Methionine	≥98 % (HPLC)	99 ± 1
Biotin	≥99 % (HPLC)	102 ± 1
SAM	≥75 % (HPLC)	102 ± 3
m-PEG-SH 1kDA	-	96 ± 3
m-PEG-SH 20kDA linear	-	101 ± 2
m-PEG-SH 20kDA branched	-	102 ± 1
ACTH	100% (HPLC) Peptide content: 69% (AAA)	70 ± 1
Vasopressin	100% (HPLC) Peptide content: 83% (AAA)	83 ± 1
Neurokinin A	97.7% (HPLC) Peptide content: 80% (AAA)	77 ± 2
Cytochrome C	≥95 % (Electrophoresis)	89 ± 2
B-casein	≥98 % (Electrophoresis)	90 ± 2
BSA	≥96 % (Electrophoresis)	91 ± 1
Intact mAb	-	76 ± 2

Statistical procedure for comparison of the slopes of two regression lines

Here, comparison of two slopes of two regression lines has been carried out by resorting to the resolution of the null hypothesis test ($H^0: b_1 = b_2, b_1 - b_2 = 0$), being b the slope of the corresponding regression lines and can be performed by means of a Student's t -test statistics.

First, it is necessary to carry out a preliminary test for the study of the similarity of the variance of both populations involved in the statistical comparison by a Fisher-Snedecor's F -test. This statistics test consists of dividing the largest by the lowest variance and compares the ratio with the corresponding F value, which is obtained from the one-tail F -Fisher tables. The null hypothesis of this test is the variances are statistically equal ($H_0: S^2_{y1} = S^2_{y2}$), and the statistics test F_{exp} calculated with the following equation

$$F_{exp} = \frac{S^2_{(yx)1}}{S^2_{(yx)2}} \quad (Eq S1)$$

being $S^2_{(yx)}$ the square of the standard error of the regression lines compared has a Fisher-Snedecor's F distribution with n_1-1 and n_2-1 degrees of freedom, being n the size of the population. At this point, there are two possibilities:

1. Null hypothesis cannot be rejected ($F_{value} < F_{exp}$), so the variances are statistically equal. In this case, it is considered that the whole population follows a Student's t distribution with n_1+n_2-4 degrees of freedom. Then t experimental value (t_{exp}) is calculated following the next equation:

$$t_{exp} = \frac{(b_1 - b_2)}{\sqrt{S^2_{(yx)pool} \left(\frac{1}{\sum(X_{i,1} - \bar{X}_1)^2} + \frac{1}{\sum(X_{i,2} - \bar{X}_2)^2} \right)}} \quad (Eq S2)$$

$$\text{with } S^2_{(yx)pool} = \frac{(n_1-2)S^2_{(yx)1} + (n_2-2)S^2_{(yx)2}}{n_1 + n_2 - 4} \quad (Eq S3)$$

being b_1 and b_2 the corresponding slopes values, and $S_{(yx)1}$ and $S_{(yx)2}$ the square of the standard errors of the two regression lines compared.

2. Null hypothesis cannot be rejected ($F_{value} > F_{exp}$), so the variance of the populations are statistically different. Then, the t experimental value (t'_{exp}) is using the next expression:

$$t'_{exp} = \frac{(b_1 - b_2)}{\sqrt{\left(\frac{S^2_{(yx)1}}{\sum(X_{i,1} - \bar{X}_1)^2} \right) + \left(\frac{S^2_{(yx)2}}{\sum(X_{i,2} - \bar{X}_2)^2} \right)}} \quad (Eq S4)$$

$$\text{With } f \text{ degrees of freedom } f = \frac{\left[\left(\frac{s_{(y/x)1}^2}{\sum(x_{i,1} - \bar{x}_1)^2} \right) + \left(\frac{s_{(y/x)2}^2}{\sum(x_{i,2} - \bar{x}_2)^2} \right) \right]}{\left(\frac{s_{(y/x)1}^2}{\sum(x_{i,1} - \bar{x}_1)^2} \right) + \left(\frac{s_{(y/x)2}^2}{\sum(x_{i,1} - \bar{x}_1)^2} \right)} \quad (\text{Eq } S5)$$

In both cases, if t_{exp} or t'_{exp} exceed the critical t value, at a given confidence level (i.e., 95%) that can be found in the Student's t -test Tables^{1,2}, the null hypothesis is rejected, and therefore the slopes are statistically different.

Additionally, the statistical treatment was carried out using Statgraphics Centurion XVI (available from Statgraphic.net upon request) providing the same results.

¹ 1. Andrade, J.M., Estévez-Pérez, M.G., *Anal Chim Acta*, 2014, 838, 1-12.

² Miller, J. N. and Miller, J. C. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, 6th Ed, Pearson, England, 2010.

Table S5. Statistical comparison of the slope values obtained for the inorganic standard and the biological compounds under study using the Total consumption nebulizer (TCN). Two tailed t-test at 95% confidence level was applied; population size of each regression line $n=10$, S_b - standard error of slope (1SD), S_a = standard error of intercept (1SD), $S(yx)$ = the standard error of the regression (1SD), t_{exp} and t'_{exp} were calculated following Equation (S2) and (S4), explained in the statistical procedure section of this supporting information. Critical t values were obtained from Student's t-test Tables (95% confidence level).³

Compound	Slope	S _b	Intercept	S _a	Regression coefficient, r ²	S _{y(x)}	t _{exp} (eq S2)	t'exp (eq S4)	Critical t value	Statistical equality
Inorganic standard	1.003	0.016	-19	10	0.998	18.5	-	-	-	-
Methionine	1.033	0.016	28	9.4	0.998	21.1	1.156	-	2.120	Equal
Biotin	1.003	0.021	11	8.7	0.997	10.6	0.015	-	2.120	Equal
SAM	0.989	0.012	13	6.0	0.999	12.0	0.683	-	2.120	Equal
PEG-SH 1kDa	0.992	0.031	22	18	0.992	38.0	-	0.345	2.228	Equal
PEG-SH 20kDa linear	1.016	0.012	12	6.9	0.999	15.4	0.642	-	2.120	Equal
PEG-SH 20kDa branched	0.973	0.024	15	13	0.995	28.5	1.026	-	2.120	Equal
Vasopressin	0.990	0.019	19	10	0.997	22.9	0.495	-	2.120	Equal
ACTH	0.995	0.010	1.5	5.0	0.999	10.8	0.214	-	2.120	Equal
Neurokinin A	0.982	0.018	-9.7	12	0.997	17.7	0.568	-	2.120	Equal
Cytochrome C	1.043	0.036	-35	22	0.991	49.0	-	1.022	2.228	Equal
B-casein	0.958	0.020	-12	11	0.997	24.9	1.740	-	2.120	Equal
BSA	0.986	0.019	-3.5	9.1	0.997	20.2	0.686	-	2.120	Equal
Intact mAb	1.015	0.033	-28	19	0.992	43.6	-	0.331	2.228	Equal

³ Miller, J. N. and Miller, J. C. Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry, 6th Ed., Pearson, England, 2010.

Table S6. Statistical comparison of the slope values obtained for the inorganic standard and the biological compounds under study using the concentric nebulizer. Two tailed t-test at 95% confidence level was applied: population size of each regression line $n=10$, S_b = standard error of slope (1SD), S_a = standard error of intercept (1SD), $S(yx)$ = the standard error of the regression (1SD), t_{exp} and t'_{exp} were calculated following Equation (S2) and (S4), explained in the statistical procedure section of this supporting information. Critical t values were obtained from Student's t-test Tables.⁴

Compound	Slope	Sb	Intercept	S _a	Regression coefficient, r ²	S _(yx)	t _{exp} (eq S2)	t'exp (eq S4)	Critical t value	Statistical equality
Inorganic standard	1.001	0.009	-10	5.4	0.999	11.7	-	-	-	-
Methionine	0.986	0.009	-8.0	4.9	0.999	10.6	0.854	-	2.120	Equal
Biotin	1.004	0.006	7.3	3.6	0.999	8.09	0.194	-	2.120	Equal
SAM	1.003	0.015	-3.9	10	0.998	22.5	-	0.097	2.228	Equal
PEG-SH 1kDa	0.985	0.005	-1.7	2.6	0.999	5.71	-	1.569	2.228	Equal
PEG-SH 20kDa linear	1.026	0.005	1.3	3.3	0.999	7.45	1.788	-	2.120	Equal
PEG-SH 20kDa branched	1.017	0.010	-25	6.7	0.999	14.5	0.880	-	2.120	Equal
Vasopressin	1.017	0.011	-0.5	6.1	0.999	13.4	1.114	-	2.120	Equal
ACTH	1.032	0.036	-34	19	0.995	39.6	-	0.835	2.228	Equal
Neurokinin A	0.871	0.020	0.1	13	0.996	26.0	-	5.983	2.228	Different
Cytochrome C	0.603	0.005	-13	2.9	0.999	6.36	25.93	-	2.120	Different
B-casein	0.717	0.015	-31	8.5	0.997	19.2	13.80	-	2.120	Different
BSA	0.752	0.013	-24	7.3	0.998	16.5	12.91	-	2.120	Different
Intact mAb	0.403	0.014	-17	10	0.990	22.6	28.91	-	2.120	Different

⁴ Miller, J. N. and Miller, J. C. Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry, 6th Ed., Pearson, England, 2010.

Table S7. Statistical comparison of the slope values obtained for the inorganic standard and the biological compounds under study using the Cross Flow nebulizer. Two tailed t-test at 95% confidence level was applied: population size of each regression line $n=10$, S_b = standard error of slope, S_a = standard error of intercept, $S(y)$ = the standard error of the regression, t_{exp} and t'_{exp} were calculated following Equation (S2) and (S4), explained in the statistical procedure section of this supporting information. Critical t values were obtained from Student's t-test Tables.⁵

Compound	Slope	S _b	Intercept	S _a	Regression coefficient, r ²	S _{y(x)}	t _{exp} (eq S2)	t'exp (eq S4)	Critical t value	Statistical equality
Inorganic standard	1.005	0.014	8.7	8.0	0.999	17.8	-	-	-	-
Methionine	1.015	0.003	1.3	1.4	0.999	3.23	0.719	-	2.120	Equal
Biotin	1.005	0.019	9.1	7.7	0.997	17.8	0.022	-	2.120	Equal
SAM	0.974	0.012	-11.2	7.8	0.999	17.0	1.728	-	2.120	Equal
PEG-SH 1kDa	0.984	0.006	-8.9	2.9	0.999	6.44	1.337	-	2.120	Equal
PEG-SH 20kDa linear	1.005	0.024	-23	17	0.996	37.5	-	0.004	2.228	Equal
PEG-SH 20kDa branched	1.000	0.012	-23.6	5.7	0.999	12.5	0.268	-	2.120	Equal
Vasopressin	1.021	0.014	4.18	7.5	0.999	16.5	1.144	-	2.120	Equal
ACTH	1.004	0.017	0.47	8.9	0.998	19.0	0.051	-	2.120	Equal
Neurokinin A	0.874	0.018	12.5	12	0.997	22.7	7.33	-	2.120	Different
Cytochrome C	0.599	0.008	-16.6	4.4	0.999	9.75	24.73	-	2.120	Different
B-casein	0.631	0.007	-7.6	4.1	0.999	9.21	23.71	-	2.120	Different
BSA	0.678	0.011	-11.2	6.2	0.998	14.0	18.80	-	2.120	Different
Intact mAb	0.412	0.008	1.8	5.8	0.997	13.1	18.30	-	2.110	Different

⁵ Miller, J. N. and Miller, J. C. Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry, 6th Ed., Pearson, England, 2010.

Figure S3. Experimental concentration obtained for all S-containing compounds assayed (n=14) at the different concentration levels (n=10) represented against theoretical concentration with total consumption nebulizer (TCN) plotted in the same calibration graph. Uncertainty of every individual point corresponds to 95% confidence level (2SD, n=4 replicates).

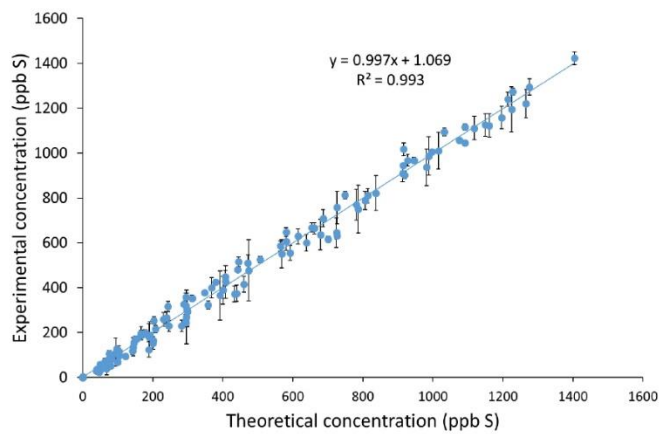


Figure S4. Relative response factors (experimental concentration obtained by IDA divided by theoretical calculated concentration) obtained for BSA with different nebulizer gas flow rates and using the concentric nebulizer. Error bars correspond to 95% confidence level (2SD, n=10 replicates).

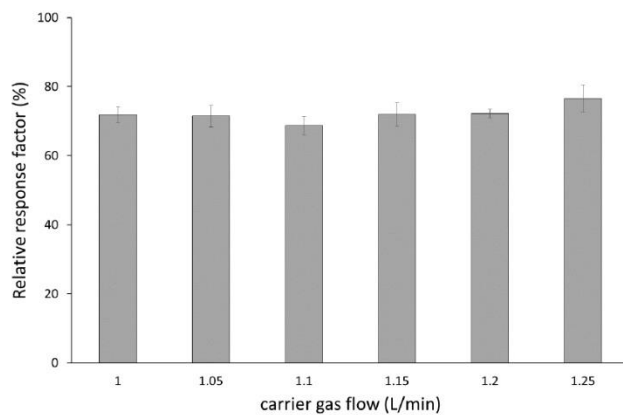


Figure S5. Relative response factors (experimental concentration obtained by IDA divided by theoretical calculated concentration) obtained for BSA with different liquid flow rates and using the concentric nebulizer. Error bars correspond to 95% confidence level (2SD, n=10 replicates).

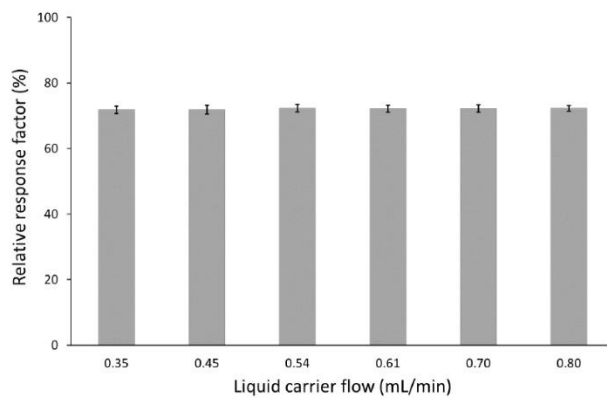


Figure S6. Relative response factors (experimental concentration obtained by IDA divided by theoretical calculated concentration) obtained for BSA with different spray chamber temperatures and using the concentric nebulizer. Error bars correspond to 95% confidence level (2SD, n=10 replicates).

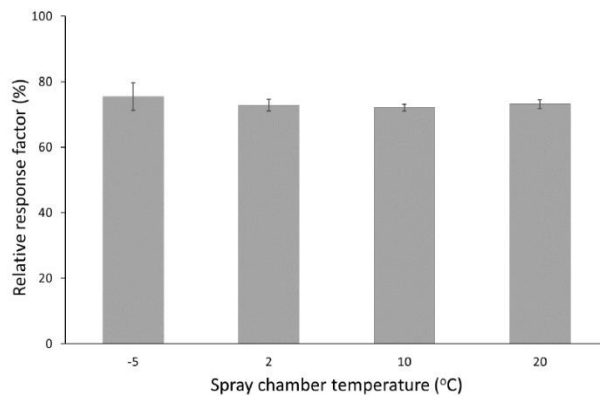


Table S8. Regression values obtained for calibration curves (n=10) of P determination in β -casein using TCN, concentric and cross flow nebulizers. Individual values of slope, standard error of slope (S_b , 1SD), intercept, standard error of intercept (S_a , 1SD) and regression coefficient are included.

Nebulizer	Slope	S_b	Intercept	S_a	Regression coefficient, r^2
TCN	0.976	0.028	1.0	16	0.993
Concentric	0.753	0.023	-1.7	13	0.992
Cross flow	0.701	0.016	-5.9	9.2	0.996

Además, a raíz de las colaboraciones llevadas a cabo durante la Tesis Doctoral han derivado las siguientes publicaciones, relacionadas con la temática de la misma:

- Calderón-Celis, F., Cid-Barrio, L., Ruiz Encinar, J., Sanz-Medel, A., & Calvete, J. J. Absolute venomics: Absolute quantification of intact venom proteins through elemental mass spectrometry. *Journal of proteomics*, (2017), 164, 33-42.
- Moreira-Alvarez, B., Cid-Barrio, L., Ferreira, H. S., Costa-Fernández, J. M., Ruiz Encinar, J. Integrated analytical platforms for the comprehensive characterization of bioconjugated inorganic nanomaterials aiming at biological applications. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, (2020), 35, 1518-1529.

Artículo de Divulgación Científica: “Avances en la cuantificación absoluta de proteínas por espectrometría de masas” Ruiz Encinar J, Cid Barrio L. Calderón Celis F. *Actualidad Analítica* v 56 pag 24-28.

