

BIO-NANOCOMPUESTO COMO AGENTE DE NUCLEACIÓN DE COMPUESTOS DE BASE ACUOSA Y SU MÉTODO DE OBTENCIÓN

CAMPO TÉCNICO

5

La presente divulgación se encuentra en el campo de la nano-ingeniería y en la industria de la congelación, preservación térmica y tecnologías de refrigeración en general. Particularmente el desarrollo está dirigido a un bio-nanocompuesto para la nucleación de compuestos de base acuosa y el método de producción del mismo. Más particularmente, la divulgación se refiere a un nuevo bio-nanocompuesto que tiene la capacidad de nucleación del hielo para crear hielo con poca demanda de energía, así como una primera aplicación, que es capaz de congelar a diferentes formas y volúmenes. El desarrollo también se refiere a un nuevo método para la creación de hielo a temperaturas que llegan hasta los 0 °C.

15

DESCRIPCIÓN DEL ESTADO DE LA TÉCNICA

La industria de la refrigeración o congelación requiere de un alto consumo energético para el mantenimiento de las cadenas de frío de productos perecederos, esto sumado al elevado costo de operación para mantener la refrigeración, la disponibilidad limitada de dichas soluciones en zonas de difícil acceso, el impacto negativo medio ambiental y la limitación generada por el acceso a energía eléctrica, ha impulsado el desarrollo de tecnologías dirigidas a la producción de hielo en donde no se emplee la energía eléctrica y puedan disminuirse los costos de operación asociados.

25

En este sentido, se han descrito tecnologías que permiten elevar el punto de congelación del agua. Si bien se sabe que el agua se congela a 0°C; en realidad el agua sin impurezas (polvo, polen o bacterias) que funcionan como núcleos de hielo comienza a congelarse a una temperatura de -41°C (-41,8°F). Sin embargo, la congelación del agua se cataliza entre -2°C y -4°C en presencia de una proteína de nucleación de hielo (INP, por sus siglas en inglés) . [Kang et al. (1999). Ice Nucleation Active Microorganisms. (US Patent No.US5972686A). o proteínas INA (Ice Nucleation Agent)] que permite nuclear el agua

para formar cristales de hielo a temperaturas más altas a las que este procedimiento normalmente ocurre.

Según Möhler, O. et al [Möhler, O., et al. (2008). Heterogeneous ice nucleation activity of bacteria: New laboratory experiments at simulated cloud conditions. *Biogeosciences*, 5(5), 1425-1435. doi:10.5194/bg-5-1425-2008], uno de los núcleos de hielo heterogéneos más activos son las INPs, que se encuentran comúnmente en la membrana celular de las especies bacterianas *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas viridiflava* y *Erwinia herbicola*. Estos microorganismos crean nieve, granizo y lluvia de forma natural, y se consideran patógenos de plantas, ya que pueden romper el tejido vegetal utilizando sus proteínas de nucleación de hielo. *Pseudomonas syringae* contiene la proteína InaZ, que es el agente nucleante del hielo con mayor eficiencia, ampliamente empleado en la industria.

La proteína INA es una proteína de membrana que comprende aproximadamente 1200 aminoácidos y está compuesta por tres dominios, un dominio N-terminal de hasta 19KDa, un gran dominio central repetido (CRD) de hasta 94KDa y un dominio C-terminal de hasta 7 KDa [Kawahara, H. (2008). Cryoprotectants and ice-binding proteins. In R. Margesin, F. Schinner, J.-C. Marx, & C. Gerday (Eds.), *Psychrophiles: From biodiversity to biotechnology* (pp. 229–246). Berlin Heidelberg: Springer. Retrieved from http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-540-74335-4_14], en donde el CRD se cree es responsable de la capacidad de nucleación de hielo [Schmid, D., Pridmore, D., Capitani, G., Battistutta, R., Neeser, J. - R., & Jann, A. (1997). Molecular organisation of the ice nucleation protein InaV from *Pseudomonas syringae*. *FEBS Letters*, **414**(3), 590–594. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)01079-X](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)01079-X)].

Particularmente, el dominio central se compone de 50 a 80 repeticiones en tándem de 16 aminoácidos y cada repetición se compone de la secuencia de aminoácidos consensos GYGSTxTAXxxSxLxA donde x puede ser cualquier aminoácido [Ling, M. et al. (2018). Effects of ice nucleation protein repeat number and oligomerization level on ice nucleation activity. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres*, 123, 1802–1810. <https://doi.org/10.1002/2017JD027307>].

Según el estudio de modelado de Graether y Jia [Steffen P. Graether, Zongchao Jia. (2001). Modeling *Pseudomonas syringae* Ice-Nucleation Protein as α -Helical Protein, *Biophysical Journal*, Volume 80, Issue, Pages 1169-1173, ISSN 0006-3495, [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(01\)76093-6](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(01)76093-6)], el dominio CDR tiene un pliegue β - helicoidal e interactúa con el agua a través del motivo repetitivo TxT, que *"esencialmente puede emparejarse con la red de hielo y participar en la red de enlaces de hidrógeno reemplazando el correspondiente átomo de oxígeno de la sección de hielo"*, de manera similar a las proteínas anticongelantes (AFP), pero con un área de superficie de interacción de hielo más grande.

Las proteínas INA de *P. syringae* se utilizan para diferentes aplicaciones. Sin embargo, la más común es la producción de nieve a temperaturas más altas. SNOMAX® es una empresa estadounidense que ha extraído la proteína INA e industrializó su producción para su uso en pistas de hielo (optimizando el consumo de energía). La solicitud de patente estadounidense US6151902 describe una invención relacionada con un método de industrialización de la producción de proteínas INA, con el fin de crear un producto que funcione como inductor de nieve, que proporciona núcleos adicionales para mejorar el proceso de cristalización y un núcleo de cada gota de agua, transformándola así en nieve y reduciendo la evaporación. Esta publicación menciona que las proteínas de *P. syringae* pueden congelar el agua a una temperatura promedio de -2°C , siendo la temperatura de congelación más alta de $-0,6^{\circ}\text{C}$ / 31°F . Sin embargo, no garantizan que la congelación siempre ocurrirá a la misma temperatura.

Además, se ha desarrollado la inmovilización de agentes nucleantes de hielo para aumentar la eficiencia de congelación en temperaturas más altas y para garantizar un hielo más duradero. La solicitud de patente internacional WO 2018/005802, divulga formulaciones de nucleación de hielo para la preservación de productos biológicos, en donde el agente de nucleación de hielo (partículas INA) está encapsulado o incrustado en perlas de un hidrogel. Dicho hidrogel es utilizado para criopreservar y estabilizar células, tejidos celulares, lípidos, ácidos nucleicos, en algunos exosomas y órganos y congelar

diferentes líquidos como agua, glicerol o agua pesada a temperaturas que oscilan entre 5°C y 1°C.

Particularmente, esta tecnología utiliza microencapsulación de alginato y agarosa y nanoencapsulación de agentes de nucleación de hielo tales como proteínas INA o agentes nucleantes minerales tales como IceStart®, en donde la microencapsulación permite que las proteínas INA permanezcan en sus respectivas cápsulas mientras se dispersan en los órganos o células y una vez que cumplen su función como nucleadores de hielo, pueden eliminarse de la superficie de cada muestra biológica.

Sin embargo, no se divulga la reutilización del agente de nucleación de hielo, haciendo de esta una tecnología costosa que debido a la degradación natural de la proteína se desecha una vez que se ha utilizado. El hecho de que este método de inmovilización por microencapsulación no mantiene la estructura de la proteína INA, explica el motivo por el que cada agente de nucleación de hielo se degradará y su actividad nucleante se perderá a diferentes temperaturas.

Por otro lado, la patente EP 1829890 divulga un producto que tiene capacidad de nucleación de hielo y un método para producir hielo con poca energía, inmovilizando polipéptidos como proteínas anticongelantes, péptidos y oligopéptidos sobre un vehículo que puede incluir materiales conductores como metales en forma de perlas (nanopartículas o macropartículas), o superficies planas entre otros. El método incluye de manera general la unión entre residuos introducidos en los polipéptidos y en los vehículos como por ejemplo, el enlace del polipéptido sobre la superficie del vehículo con un agente de acoplamiento de silano que tiene un grupo epoxi. Este método es capaz de elevar el punto de congelación del agua hasta -2°C mediante la inmovilización de las proteínas INA, sin embargo, el vehículo activo nucleante de hielo tiene un cierto número de veces hasta que pierde la capacidad de nucleación de hielo y no proporciona un hielo más resistente porque los nucleadores de hielo no se distribuyen homogéneamente en el agua. Por lo tanto, solo el agua en contacto con el vehículo se congelará a -2 °C, mientras que el agua restante, si se congela, se derretirá a un ritmo más rápido.

Solo uno de los métodos de congelación antes mencionados crea hielo por encima de 0 °C, lo que significa que el consumo de energía sigue siendo elevado. Además, a pesar de que estos métodos están contribuyendo a la creación de hielo más resistente, debido al uso de proteínas INA, no están haciendo una gran diferencia en la reducción del consumo de energía para la formación de hielo. Por otra parte, los contextos donde se utilizan proteínas INA son principalmente en la producción de nieve industrial con máquinas que introducen cambios de presión extremos para hacer cristales de hielo por debajo de 0°C. Adicionalmente, ninguno de estos inventos proporciona un nucleador de hielo más resistente y reutilizable con la capacidad de congelar agua a 1,5 - 2,5°C.

Así entonces, el alto consumo de energía para conservar las cadenas de frío exige el desarrollo de alternativas que permitan no solo disminuir la energía necesaria para alcanzar el punto de congelación, sino adicionalmente extender el ciclo de cadena de frío sin aumentar dicho consumo energético. Adicionalmente, persiste la necesidad de implementar tecnologías que permitan recuperar y reutilizar las proteínas INA, aumentar la estabilidad de las mismas al ser dispuestas sobre sustratos y ante cambios de temperatura superiores a 10°C y controlar la cantidad de proteínas INA libres para garantizar una temperatura de congelación estable.

La presente divulgación proporciona un nucleador de hielo más eficiente, resistente y duradero a temperaturas de hasta 0 °C que pueden provocar una disminución del consumo de energía durante la formación de hielo. El bio-nanocompuesto con proteínas INA de la divulgación retiene actividad elevada durante los tres primeros usos. Después del tercer uso, disminuye exponencialmente. Sin embargo, la usabilidad de esta divulgación podría proporcionar una cadena de enfriamiento más estable porque proporciona un punto de fusión más alto y se puede reutilizar durante un cierto número de veces, optimizando el consumo de proteínas INA.

BREVE DESCRIPCIÓN

La presente divulgación hace referencia a un bio-nanocompuesto formado por un sustrato de partículas de óxidos metálicos, un enlazante, un agente entrecruzante y un agente de nucleación de hielo.

- 5 Adicionalmente, se desarrolla un método de autoensamblaje para la elaboración de dicho bio-nanocompuesto que comprende las etapas de mezclar el sustrato de óxidos metálicos, inmovilizar el enlazante, inmovilizar el agente entrecruzante e inmovilizar por enlace covalente el agente de nucleación de hielo para la obtención de un producto destinado a la nucleación de compuestos de base acuosa a temperaturas más altas que la temperatura de congelación del medio y aumentar el tiempo de descongelamiento del medio.
- 10

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- FIG. 1** Ensamblaje del bio-nanocompuesto. Configuración general de la estructura del bio-nanocompuesto, en donde el bio-nanocompuesto comprende un sustrato de partículas de óxidos metálicos con un tamaño entre el rango nanométrico y submilimétrico (1); un enlazante o linker (2); un agente entrecruzante o crosslinker (3); y un agente de nucleación de hielo (4).
- 15

- FIG. 2** Estructura molecular del bio-nanocompuesto. La molécula APTES funciona como enlazadora y el glutaraldehído como el entrecruzante entre las nanopartículas y la proteína INA. **A.** Bio-nanocompuesto de óxido de aluminio; **B.** Bio-nanocompuesto de magnetita; **C.** Bio-nanocompuesto de dióxido de silicio.
- 20

- FIG. 3** Tamaño medio de nanopartículas obtenido a partir de la relación entre el porcentaje de intensidad y el tamaño en nanómetros, con tres repeticiones. **A.** magnetita = 132 nm. **B.** dióxido de silicio = 2243 nm.
- 25

- FIG. 4** Eficiencia de inmovilización. Las nanopartículas de dióxido de silicio son las que tienen una mayor eficiencia de inmovilización y por lo tanto aquellas con una mayor cantidad de proteína INA en su superficie. Los valores de eficiencia son 99,99%, 99,87% y 99,80% para dióxido de silicio, óxido de aluminio y magnetita, respectivamente. Estos
- 30

valores se obtuvieron con la siguiente fórmula: eficiencia de inmovilización = $[(100) - (\text{concentración de sobrenadante} \times \text{volumen de sobrenadante} \times 100) / \text{cantidad inicial de proteína}]$.

- 5 **FIG. 5** Actividad de descongelación de dióxido de silicio. Ejemplo 6 (Experimento 1). Se midió la variación de temperatura de descongelación para las 3 réplicas del bio-nanocompuesto a una concentración de 2 mg/ml durante un minuto a temperatura ambiente (23°C).
- 10 **FIG. 6** Análisis de estado. Ejemplo 6 (Experimento 2). **A.** Magnetita; **B.** Dióxido de silicio; **C.** Proteína INA libre. El estado de las diferentes concentraciones de bio-nanocompuestos de dióxido de silicio y magnetita se analizó a lo largo del tiempo en segundos. Se incluye la comparación de control de agua tipo I y proteína INA libre.
- 15 **FIG 7.** Análisis de temperatura. Ejemplo 6 (Experimento 2). La variación de temperatura de las diferentes concentraciones de bio-nanocompuestos de dióxido de silicio y magnetita se analizó a lo largo del tiempo en segundos. Se incluye comparación de control de agua de tipo I y proteína INA libre. Esta figura incluye Figuras **7A**, **7B** y **7C**, que corresponden individualmente a magnetita, dióxido de silicio y e INA libre,
- 20 respectivamente.
- FIG 8.** Análisis de estado. Ejemplo 6 (Experimento 2). El estado de las diferentes concentraciones de bio-nanocompuestos de dióxido de silicio y magnetita se analizó por segunda ocasión a lo largo del tiempo en segundos. Se incluye comparación de control de
- 25 agua tipo I y proteínas libres. Cada muestra tenía 3 réplicas y los valores que se presentan en la gráfica corresponden al promedio de los valores obtenidos. Esta figura incluye las Figuras **8A**, **8B** y **8C**, que corresponden individualmente a magnetita, dióxido de silicio e INA libre, respectivamente.
- 30 **FIG 9.** Análisis de temperatura. Ejemplo 6 (Experimento 2). La variación de temperatura de las diferentes concentraciones de bio-nanocompuestos de dióxido silicio y magnetita se analizó a lo largo del tiempo en segundos por segunda ocasión. Se incluye comparación

de control de agua tipo I y proteína INA libre, y cada muestra tenía 3 repeticiones. Cada muestra tenía 3 réplicas y los valores que se presentan en la gráfica corresponden al promedio de los valores obtenidos. Esta figura incluye las Figuras **9A**, **9B** y **9C**, que corresponden individualmente a magnetita, dióxido de silicio e INA libre, respectivamente.

FIG 10. Temperatura mínima de congelación. Ejemplo 7. Cada muestra fue sometida a diferentes temperaturas dentro de un liofilizador para establecer la temperatura mínima de congelación de los bio-nanocompuestos, la proteína INA libre y el control de agua.

FIG 11. Actividad de descongelación. Ejemplo 6 (Experimento 3). Se midió el tiempo de descongelación para aquellas muestras que presentaron actividad de congelación a $-1,1^{\circ}\text{C}$ dentro de un liofilizador. Las muestras de A a la C corresponden a magnetita, de D a F corresponden a dióxido de silicio y de G a I corresponden a proteína INA libre. La gráfica A incluye una repetición de 1 mg/ml y dos de 0,5 mg/ml, la B dos de 2mg/ml y tres para el resto de los tratamientos y la C dos repeticiones de 0,1 mg/ml y 0,05 mg/ml. Esta figura incluye las Figuras **11A**, **11B** y **11C**, que corresponden individualmente a magnetita, dióxido de silicio y proteína INA libre, respectivamente.

FIG 12. Actividad de descongelación. Ejemplo 6 (Experimento 4). Se midió el tiempo de descongelación en minutos para las muestras que se congelaron a -5°C (temperatura del liofilizador) y $-2,8^{\circ}\text{C}$ (temperatura interna). Esta figura incluye las Figuras **12A**, **12B** y **12C**, que corresponden individualmente a magnetita, dióxido de silicio y proteína INA libre, respectivamente.

FIG 13. Actividad de descongelación. Ejemplo 6 (Experimento 5). Se midió el tiempo de descongelación en minutos para todas las muestras que se congelaron a -6°C (temperatura del liofilizador) o $-4,1^{\circ}\text{C}$ (temperatura interna). Esta figura incluye las Figuras **13A**, **13B** y **13C**, que corresponden individualmente a magnetita, dióxido de silicio y proteína INA libre, respectivamente.

FIG 14. Actividad de descongelación. Ejemplo 8. Se midió el tiempo de descongelación en minutos para los ciclos uno y dos. Esta figura incluye las Figuras **14A**, a **14F**, que corresponden individualmente a magnetita ciclos uno y dos, dióxido de silicio ciclos uno y dos y proteína INA libre ciclos uno y dos, respectivamente.

5

FIG 15. Actividad de descongelación. Ejemplo 8. Se midió el tiempo de descongelación en minutos para los ciclos tres y cuatro. Esta figura incluye las Figuras **15A** a **15F**, que corresponden individualmente a magnetita ciclos tres y cuatro, dióxido de silicio ciclos tres y cuatro y proteína INA libre ciclos tres y cuatro, respectivamente.

10

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Para propósitos de interpretar los términos usados a lo largo del presente documento se debe tener en cuenta su significado usual en el campo técnico, a menos que se incorpore una definición particular o el contexto indique claramente lo contrario. Adicionalmente, los términos utilizados en forma singular también incluirán la forma plural.

En un primer aspecto, la presente divulgación se refiere a un bio-nanocompuesto que comprende un sustrato de partículas de óxidos metálicos con un tamaño entre el rango nanométrico y submilimétrico (1); un enlazante o linker de un amino organosilano (2); un agente entrecruzante o crosslinker de dialdehído (3); y un agente de nucleación de hielo o proteína INA (4); en donde el enlazante está directamente unido al sustrato, el agente entrecruzante está unido directamente al enlazante y el agente de nucleación de hielo está directamente unido al entrecruzante. La estructura del bio-nanocompuesto se ilustra esquemáticamente en la Figura 1. El bio-nanocompuesto permite la nucleación de cristales de compuestos de base acuosa a temperaturas más altas que la temperatura de congelación o aumentar el tiempo de descongelamiento del medio.

Se entiende como nucleación de compuestos de base acuosa a la etapa lenta de la cristalización, cuando las moléculas del líquido empiezan a acomodarse espontáneamente en una red cristalina y comienzan a reclutar otras moléculas para unirse y así aglomerarse.

Bio-nanocompuesto

Para efectos de la presente divulgación, se entiende por bio-nanocompuesto a aquel nanocompuesto que posee por lo menos una biomolécula dentro de su estructura. En la
5 presente divulgación el bio-nanocompuesto comprende un sustrato, un enlazante o linker, un agente entrecruzante o crosslinker y un agente de nucleación de hielo o proteína INA.

El sustrato para efectos de la presente divulgación se entiende como una superficie o material de soporte que se caracteriza por ser de naturaleza química tipo óxido metálico,
10 que se presenta en forma de una superficie plana, esférica, ovoide o irregular. En este último caso se denomina partícula, la cual tiene al menos una dimensión entre la escala nanométrica y macrométrica.

En una modalidad particular, el sustrato se selecciona de, sin limitarse a, partículas de un
15 óxido de hierro, aluminio, silicio o mezclas de los mismos. En otra modalidad particular, las partículas tienen un tamaño entre el rango nanométrico y submilimétrico (1 nm a 1 mm) en por lo menos una de sus dimensiones. En otra modalidad particular, el sustrato son partículas con diámetros entre 1 nm y 1 mm, preferiblemente entre 100 nm y 500 μm .

20 El enlazante o linker, se entiende como un compuesto que permite unir las moléculas del bio-nanocompuesto al sustrato a través de un anclaje fuerte. En una modalidad dicho enlazante es un amino organosilano. En otra modalidad particular, se selecciona entre, sin limitarse a, 3-(aminopropil)triethoxisilano (APTES) o (aminopropil)trimethoxisilano (APTMS).

25

La concentración del enlazante se determina de acuerdo al área superficial del sustrato. El cálculo es realizado de acuerdo a la relación entre el área del enlazante y el área superficial del sustrato. De preferencia, el enlazante se encuentra en el bio-nanocompuesto en una concentración sobre la superficie del sustrato de entre 10^{-24} moles/
30 nm^2 y 10^{-20} moles/ nm^2 .

El agente entrecruzante o crosslinker para propósitos de la presente divulgación se entiende como un compuesto que permite unir el enlazante al agente de nucleación de hielo. En una modalidad el agente entrecruzante es un dialdehído. En otra modalidad, es seleccionado entre, sin limitarse a glutaraldehído, glioxal y succinaldehído.

5

La concentración del agente entrecruzante se determina de acuerdo a la concentración utilizada del agente enlazante, buscando que la concentración molar del entrecruzante sea igual a la del enlazante.

- 10 Para efectos de la presente divulgación se entiende por agente de nucleación de hielo a la biomolécula que induce la formación y crecimiento de cristales de hielo a temperaturas más altas cuando se agregan a un sistema acuoso. En una modalidad el agente de nucleación de hielo es una proteína INA derivada de bacterias, hongos, insectos o crustáceos.

15

En una modalidad particular la proteína INA se deriva de bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Erwinia* o *Xanthomonas*, preferiblemente de la membrana celular de *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas viridiflava* o *Erwinia herbicola*.

- 20 En otra modalidad particular, la proteína INA es de tipo Z de *Pseudomonas syringae*, W de *Pseudomonas fluorescens*, E de *Erwinia herbicola*, U de *Erwinia ananas* y X de *Xanthomonas campestris*. En una modalidad particular la proteína INA se deriva de *Pseudomonas syringae*.

- 25 En una modalidad preferida, la proteína es una proteína de membrana que comprende aproximadamente 1200 aminoácidos y está compuesta por tres dominios, un dominio N-terminal de hasta 19KDa, un gran dominio central repetido (CRD) de hasta 94KDa y un dominio C-terminal de hasta 7 KDa (Kawahara, 2008), en donde el CRD se cree es responsable de la actividad de nucleación de hielo (Schmid et al., 1997). Particularmente,
- 30 el dominio central se compone de 50 a 80 repeticiones en tándem de 16 aminoácidos y cada repetición se compone de la secuencia de aminoácidos consensos

GYGSTxTAxxxSxLxA donde x puede ser cualquier aminoácido (Ling et al, 2018). En una modalidad preferida la proteína es una proteína INA tipo Z.

- 5 La concentración de la proteína INA se determina de acuerdo a la concentración utilizada del agente enlazante, buscando que la concentración molar de la proteína INA sea igual a la del enlazante.

Los inventores han encontrado que es posible inmovilizar la proteína INA en superficies
10 óxido-metálicas a nanoescala: óxido de aluminio, magnetita (óxido de hierro) y dióxido de silicio mediante una técnica de autoensamblaje. El bio-nanocompuesto obtenido mediante esta técnica, permite la inducción de la congelación del agua cuando el bio-nanocompuesto entra en contacto con un medio acuoso, debido al mantenimiento y mejoramiento del dominio CDR de las proteínas.

15 La congelación del agua se genera por la "*capacidad de nucleación del hielo*" de la proteína INA, que significa la actividad del dominio CDR de la proteína, interactuando con el agua a través del motivo TxT y participando en la red de enlaces de hidrógeno. La actividad de congelación se refiere a la promoción de núcleos de hielo a temperaturas más
20 altas desde el punto de congelación natural del agua.

Método de elaboración de un bio-nanocompuesto

En un segundo aspecto, el presente desarrollo se dirige al método de elaboración de un
25 bio-nanocompuesto para la nucleación de compuestos de base acuosa que comprende las etapas de mezclar un sustrato de óxidos metálicos con un medio solvente, inmovilizar un enlazante de amino organosilano sobre el sustrato, inmovilizar un agente entrecruzante de dialdehído sobre el enlazante, e inmovilizar por enlace covalente un agente de nucleación de hielo o proteína INA sobre el entrecruzante, mediante un anclaje químico
30 que permite enlazar la proteína a una parte específica de su estructura sin alterar su funcionalidad. De manera complementaria y opcional, también es posible lavar el bio-nanocompuesto obtenido. El método se lleva a cabo mediante una técnica de

autoensamblaje o andamiaje molecular que inmoviliza cada uno de los elementos que lo conforman, para proporcionar una estructura que tiene una orientación específica que le permite cumplir su función.

- 5 Es fundamental que la química de superficie que se usa (proceso de autoensamblaje) se haga en un orden específico dadas las características químicas estructurales particulares de cada uno de los elementos que conforman el bio-nanocompuesto, en donde las concentraciones puntuales permiten que la construcción que resulta del proceso de autoensamblaje ocurra de manera espontánea y quede organizada, en términos de
- 10 garantizar que la estructura del bio-nanocompuesto al final del proceso sea con alta probabilidad la misma cada vez que se obtiene.

- La inmovilización de los elementos se lleva a cabo gracias a la naturaleza química específica de cada uno de ellos, tal y como se describe en el bio-nanocompuesto. En una
- 15 modalidad particular, el enlazante se une al sustrato mediante un enlace covalente y en su parte extrema opuesta a la unión con el sustrato contiene un grupo amino terminal; que se une directamente al agente entrecruzante por uno de sus terminales de tipo aldehído, el cual reacciona de manera espontánea con el grupo amino a través de un enlace fuerte tipo llave cerradura sin implicar un gran esfuerzo energético. En el extremo opuesto el
- 20 agente entrecruzante posee otro grupo aldehído, el cual se une al terminal amino de la proteína INA a través del mismo mecanismo llave cerradura descrito para la unión entrecruzante - enlazante.

- Esta configuración particular permite inmovilizar químicamente la proteína INA en la
- 25 superficie de los óxidos metálicos a través de un enlace covalente que le confiere un anclaje fuerte sobre el sustrato, por lo que es difícil separarla y así le provee mayor estabilidad.

- La preparación del sustrato se lleva a cabo mezclando el sustrato de partículas de óxidos
- 30 metálicos con un medio solvente acuoso, preferiblemente agua desionizada.

Opcionalmente, puede agregarse un dispersante a la solución del sustrato cuando este tenga un tamaño de partícula del rango nanométrico, el cual se selecciona de un compuesto con carga iónica, preferiblemente es hidróxido de tetrametilamonio (TMAH). El dispersante se prepara disolviéndolo en un medio solvente acuoso que preferiblemente es agua ultrapura.

Posteriormente se prepara el enlazante disolviendo el amino organosilano en un solvente acuoso, preferiblemente agua desionizada, luego se mezcla con la solución de sustrato anteriormente preparada y dicha mezcla se agita por un tiempo de al menos 10 minutos y una temperatura de al menos 30°C. La solución resultante se deja en reposo durante un mínimo de 10 minutos a por lo menos 15°C. La concentración del enlazante se determina de acuerdo al área superficial del sustrato. El cálculo es realizado de acuerdo a la relación entre el área del enlazante y el área superficial del sustrato. De preferencia, el enlazante se encuentra en el bio-nanocompuesto en una concentración sobre la superficie del sustrato de entre 10^{-24} moles/ nm^2 y 10^{-20} moles/ nm^2 .

Después, se prepara el agente entrecruzante disolviendo el dialdehído en un solvente acuoso, preferiblemente agua desionizada, luego se mezcla con el nanocompuesto preparado anteriormente en una concentración de acuerdo a la concentración utilizada del agente enlazante, buscando que la concentración molar del entrecruzante sea igual a la del enlazante. La solución resultante se deja en reposo durante un mínimo de 60 minutos a por lo menos 4°C. Al finalizar este proceso el agente entrecruzante queda anclado al enlazante que a su vez se encuentra unido al sustrato.

Seguido a esto, se procede a inmovilizar la proteína INA sobre el extremo libre del agente entrecruzante, para lo cual se prepara la proteína INA disolviéndola en un solvente acuoso, preferiblemente agua desionizada; a una concentración de acuerdo a la concentración utilizada del agente enlazante, buscando que la concentración molar de la proteína INA sea igual a la del enlazante, agitando la mezcla durante al menos 2 minutos.

Luego esta solución de proteína INA se mezcla con el nanocompuesto funcionalizado con el enlazante y agente entrecruzante resultante de la etapa anterior, agitando dicha mezcla

por un tiempo de al menos 1 minuto. La solución resultante se deja en reposo durante un mínimo de 24 horas a una temperatura mínima de 4°C. Al finalizar este proceso la proteína INA queda anclada directamente al agente entrecruzante, el cual a la vez se encuentra unido al enlazante que a su vez está enlazado al sustrato formando el bio-nanocompuesto.

Opcionalmente, se procede a hacer el lavado del bio-nanocompuesto con el fin de retirar el material excedente. Para ello se agrega un solvente acuoso, preferiblemente agua desionizada al bio-nanocompuesto, se verifica el tamaño de partícula del bio-nanocompuesto y de acuerdo a ello se procede a filtrar mediante procesos mecánicos o magnéticos para recuperar el bio-nanocompuesto sólido, después se mezcla el sólido filtrado con más medio de lavado agitando por 1 minuto. El proceso de lavado se repite los ciclos que sean necesarios dependiendo del tamaño de partícula.

15 *Líquido refrigerante*

El líquido refrigerante de la presente divulgación se define para efectos de la misma como una dispersión del bio-nanocompuesto en un medio líquido de base acuosa. El bio-nanocompuesto al ser adicionado a un solvente de base acuosa o sustancia afín al agua, funciona como un aditivo que promueve la congelación del líquido. Adicionalmente, permite el mejoramiento de la capacidad refrigerante de dichos líquidos, en términos de aumentar la formación de núcleos de hielo a temperaturas más altas desde el punto de congelación natural haciendo más fácil alcanzar su estado sólido y permitir que demore más tiempo en descongelarse.

En una modalidad particular y sin constituir una limitante, el solvente de base acuosa se selecciona de cualquier líquido refrigerante común, particularmente glicoles o alcoholes y más particularmente agua, etanol, glicerol, o mezclas de los mismos.

En una modalidad particular la concentración del bio-nanocompuesto en el solvente es de 0,1 a 10% %p/p logrando que el líquido refrigerante alcance su estado sólido promoviendo la formación de cristales y así la congelación rápida del total del solvente.

Usos

En una modalidad preferida el bio-nanocompuesto del presente desarrollo se usa para aditivar líquidos refrigerantes, cuyos usos sin constituir una limitante se dirigen a aplicaciones en embalaje, sistemas de ventilación, tratamiento de aguas residuales, agricultura, equipos de refrigeración para sectores como salud, farmacéutica, alimentos, entretenimiento, deportes, agro, entre otros.

La presente divulgación se presenta en detalle a través de los siguientes ejemplos, los cuales son suministrados solamente con propósitos ilustrativos y no con el objetivo de limitar su alcance.

EJEMPLOS

15 Ejemplo 1. Estructura del bio-nanocompuesto

Sustratos

Sustrato de óxido de hierro (Fe_3O_4):

Se sintetizó 1g de nanopartículas de magnetita (óxido de hierro) con 0,545 g de cloruro férrico y 1,394g de cloruro ferroso que se colocaron en un vaso de precipitados con 4,3 ml de agua Milli-Q y un agitador magnético. Esta solución se sometió a un tratamiento térmico con una placa calefactora a 90°C y 1500 rpm.

Posteriormente, dos soluciones, la primera de 3,3 g de NaOH y 10 ml de agua Milli-Q y la segunda de 0,8 ml de TMAH al 25% en peso y 9,2 ml de agua Milli-Q, se introdujeron en dos jeringas y ambas se colocaron en la bomba de jeringa, con una velocidad de salida de 0,2 ml/min. Las 20 sondas de calibre conectadas a cada jeringa se colocaron en el vaso de precipitados con la solución de cloruro y se dejó reaccionar durante una hora.

La solución final se decantó con la ayuda de un imán y se eliminó el sobrenadante. Se añadieron 10 ml de agua Milli-Q y la solución se sometió a sonicación durante 5 minutos.

Estos pasos se repitieron 20 veces hasta que las nanopartículas de magnetita se lavaron por completo.

- 5 Las nanopartículas de magnetita sintetizadas fueron analizadas por el equipo Z Sizer Nano. Se colocaron tres réplicas de 1 ml de la solución en diferentes celdas. El tamaño promedio de las nanopartículas fue de 132 nm tal y como se evidencia en la Figura 3A.

Sustratos de dióxido de silicio (SiO_2) y aluminio (Al_2O_3):

- 10 Las nanopartículas de óxido de silicio y de aluminio fueron obtenidas del mercado y posteriormente, se centrifugaron a 4.000 rpm durante 10 minutos. Posteriormente, se eliminó el sobrenadante y se agregaron 10 ml de agua Milli-Q para someter las soluciones a sonicación durante 5 minutos y agitar en vórtex durante otros cinco minutos. El procedimiento se repitió 20 veces.

15

Las nanopartículas de dióxido de silicio se midieron con el equipo Z Sizer Nano colocando tres réplicas de 1 ml de la solución. El tamaño promedio obtenido fue de 2243 nm como se muestra en la Figura 3B.

- 20 Los sustratos obtenidos como se indicó anteriormente, se funcionalizaron con aminosilano 3-aminopropil trietoxisilano (APTES), se les adicionó glutaraldehído como entrecruzante y se inmovilizó la proteína INA, tal como se describe a continuación en el Ejemplo 2. La estructura del bio-nanocompuesto obtenido es como se muestra en la Figura 2. Es posible observar los enlaces obtenidos entre las nanopartículas que forma el sustrato, el enlazante (APTES), el agente entrecruzante (glutaraldehído) y el agente de nucleación de hielo (la proteína INA). Se evidencia que la proteína INA está ligada al glutaraldehído por un grupo amino que se une con el residuo aldehído del agente entrecruzante, el otro extremo aldehído del agente entrecruzante se une al grupo amino del enlazante y el enlazante se encuentra directamente unido al sustrato por un anclaje químico de tres puntos.
- 25
- 30

Ejemplo 2. Método general de obtención del bio-nanocompuesto

Cien (100) mg de nanopartículas de óxido de aluminio, dióxido de silicio y magnetita obtenidos de acuerdo con el Ejemplo 1 se utilizaron como sustratos para inmovilizar la proteína activa de nucleación de hielo (INA) descrita en la patente US6151902A.

5

Oxido de aluminio

100 mg de nanopartículas de óxido de aluminio, en un orden de magnitud de 400 μ m, se sometieron a una técnica de autoensamblaje en la que el APTES se unió como enlazador con la ayuda de un lavado ultrasónico a 30°C durante 10 minutos. El producto se dejó en reposo durante 10 minutos y luego se añadió glutaraldehído que se unió con las moléculas del enlazador mediante la reacción del amino homobifuncional.

10

Magnetita y Silicio

100 mg de nanopartículas de magnetita y dióxido de silicio, con un tamaño promedio de 132 nm y 2.243 nm respectivamente, se suspendieron individualmente en una solución de agua Milli-Q y TMAH, para ser sometidas a un lavado ultrasónico por 20 minutos a 30°C. Luego, estas nanopartículas fueron tratadas de la misma manera que las nanopartículas de óxido de aluminio, como se mencionó anteriormente.

15

Inmovilización de proteína activa de nucleación de hielo (INA)

Se obtuvo una dilución de 10 mg / ml de la proteína INA (US6151902), utilizando agua Milli-Q la cual se añadió a las diferentes superficies funcionalizadas después de 60 minutos de incubación a 4°C. Las soluciones de las nanopartículas funcionalizadas y la dilución de INA se dejaron 24 horas a 4°C para inmovilizar las proteínas mediante una reacción análoga a la reacción de condensación de péptidos, entre los grupos amino de los péptidos y los grupos carbonilo del glutaraldehído.

25

Ejemplo 3. Método de obtención de un bio-nanocompuesto de óxido de hierro

La preparación del sustrato se llevó a cabo pesando en una balanza analítica 100 mg de óxido de hierro y mezclando posteriormente con agua ultrapura (MQ) en una cantidad que permitiera cubrir el sustrato (5 ml). Seguido a esto, se verificó que el tamaño de

30

partícula del sustrato fuera de entre 132nm y 400µm y se preparó un dispersante que es una solución de TMAH al 20% en agua ultrapura.

5 Dicho dispersante se mezcló con el sustrato disuelto en agua a una relación mg/µL de 2:1 sustrato:dispersante y se agitó la mezcla en un baño ultrasónico por 20 minutos a 30°C. La adición de dispersante al sustrato se llevó a cabo cuando el sustrato alcanzó un tamaño de partícula de orden nanométrico.

10 Posteriormente, se preparó el enlazante diluyendo APTES a una concentración del 1% en agua, se mezcló con la solución de sustrato anteriormente preparada o el sustrato de tamaño nanométrico con TMAH, a una concentración sustrato linker de 1:1 mg/µL; se agitó en un baño ultrasónico por un tiempo de 10 minutos a una temperatura de 30°C y se dejó en reposo durante 10 minutos a una temperatura de 15 minutos.

15 Seguido a esto, se preparó el agente entrecruzante diluyendo glutaraldehído a una concentración del 2% en agua, se mezcló con la solución que resultó de agregar el APTES al sustrato a una relación sustrato: entrecruzante 1:1 mg/µL, se agitó la mezcla en un baño ultrasónico por un tiempo de 20 minutos y se dejó en reposo por una hora a temperatura de 4°C.

20 Después, se preparó la proteína INA pesando 10 mg de SNOMAX® y adicionando 1 ml agua hasta lograr una relación de 10:1 mg/mL proteína INA/agua y se agitó por 2 minutos. Una vez preparada la proteína INA, se agregó a la mezcla anterior de agente entrecruzante-enlazante-sustrato agitando por 1 minuto y dejando en reposo durante un
25 día a 4°C.

Finamente, se procedió al lavado del bio-nanocompuesto agregando 5mL de agua y filtrando con papel filtro para recuperar el sólido, el cual se mezcló con más agua a una relación de 1:20 mg/mL agitando por 1 minuto, repitiendo dicho proceso de filtrado y
30 lavado 15 veces hasta asegurar un tamaño de partícula del sustrato de entre 132nm y 400µm.

La disposición estructural general del bio-nanocompuesto tras ser obtenido a través del método aquí descrito es como se muestra en la Figura 2.

Ejemplo 4. Eficiencia de inmovilización de proteína INA

5

La eficiencia de inmovilización de las proteínas INA sobre el sustrato se midió del siguiente modo:

Curva de calibración

- 10 Se obtuvo la curva de calibración para tener una referencia estándar con concentraciones crecientes de proteína de albúmina de suero bovino (BSA) para localizar las concentraciones de proteína INA que se inmovilizaron.

Se colocaron seis diluciones de 100 μ L con diferentes concentraciones de BSA (0, 1,25, 2,5, 5, 7,5 y 10 μ g /ml) en celdas de acrílico. Posteriormente, se añadieron 700 μ L de agua Milli-Q y 200 μ L de reactivo Bradford del ensayo de proteínas Bio-Rad a cada una de estas celdas. El reactivo Bradford se utiliza para generar diferentes tonos de azul según la concentración de la proteína debido a un cambio de color de marrón a azul que surge de la unión de moléculas de la proteína al colorante Coomassie en condiciones ácidas.

20

Después de agregar el reactivo Bradford, se mezcló el contenido de cada celda y a continuación, se dejaron en incubación a temperatura ambiente durante 15 minutos. Posteriormente, estas celdas se colocaron en el espectrofotómetro a una frecuencia de 595 nm, con el fin de leer la absorbancia de la proteína diluida. Las concentraciones de BSA establecidas permitieron obtener la curva de calibración correspondiente.

25

Análisis de muestras

El sobrenadante de los tres procesos de funcionalización descritos en los ejemplos anteriores se analizó mediante el ensayo Bradford utilizando la curva estándar de calibración obtenida anteriormente y tres réplicas para cada una que constaban de: 700 μ L de Milli-Q agua, 100 μ L de sobrenadante y 200 μ L de reactivo Bradford del ensayo

30

de proteína Bio-Rad. Las réplicas se dejaron en reposo durante 8 minutos a temperatura ambiente y luego se analizaron con un espectrofotómetro a 595 nm.

Se confirmó que la proteína INA había sido inmovilizada sobre los sustratos por la eficiencia de inmovilización, la cual fue de 99,99%, 99,87% y 99,80% para sustratos de dióxido de silicio, óxido de aluminio y óxido de hierro, respectivamente, la cual está relacionada con las concentraciones de la proteína INA en el sobrenadante de las soluciones de inmovilización (Figura 4). De este modo se determinó que las nanopartículas de dióxido de silicio son las que tienen una mayor cantidad de proteína INA en su superficie, seguidos por el óxido de aluminio y magnetita.

Ejemplo 5. Actividad de congelación del bio-nanocompuesto

Se llevó a cabo con el fin de determinar la temperatura a la que cada una de las muestras presentó actividad de nucleación de hielo.

Preparación de las muestras

Se prepararon las muestras A, B, C, D, E, F, G, H, I, J y K, como se observa en la Tabla 1, correspondientes respectivamente a tres diluciones de magnetita, tres de silicio, tres de proteína INA libre y dos de control de agua Milli-Q.

Muestra	Sustrato	Concentración
A	Magnetita	2 mg/ml
B	Magnetita	1 mg/ml
C	Magnetita	0,5 mg/ml
D	Silicio	2 mg/ml
E	Silicio	1 mg/ml
F	Silicio	0,5 mg/ml
G	Proteína INA libre	0,2 mg/ml
H	Proteína INA libre	0,1 mg/ml
I	Proteína INA libre	0,05 mg/ml

J	Control – agua	N/A
K	Control- agua	N/A

Tabla 1. Muestras para los ensayos de actividad de congelación

Se colocaron 5 ml de tres concentraciones diferentes de cada uno de los bio-nanocompuestos diluido en agua Milli-Q tipo I, en vasos de precipitados de 8 ml y se resuspendieron hasta obtener una mezcla de dilución homogénea. Después de eso, cada vaso se cerró con su respectivo tapón y se trató en un baño ultrasónico. Cada muestra de concentración se procesó por triplicado para un total de 9 muestras.

Por otra parte, se diluyó un total de 5 mg de proteína INA en 5 ml de agua Milli-Q. Posteriormente, las mismas concentraciones de proteína que el bio-nanocompuesto había inmovilizado se obtuvieron con tres diluciones adicionales. Se colocaron 5 ml de tres concentraciones diferentes de la dilución previa de la proteína INA libre en agua Milli-Q (G, H e I), en vasos de precipitados de 8 ml y se resuspendieron hasta obtener una dilución homogénea. Después de eso, cada vaso se cerró con su respectivo tapón, pero con sus concentraciones respectivas. Las muestras G y H tenían tres réplicas y la muestra de concentración I tenía dos réplicas, con un total de 8 muestras de proteína INA libre.

Finalmente, se colocaron dos muestras de 5 ml de agua Milli-Q, (J y K) en vasos de precipitados de 8 ml con sus respectivos tapones, cumpliendo un papel como control negativo en los experimentos de la actividad de nucleación del hielo.

Antes de comenzar cada dilución, los bio-nanocompuestos inmovilizados en magnetita y dióxido de silicio se colocaron en un baño de ultrasonido a 20°C durante 5 minutos y posteriormente, se agitaron con vórtex durante 30 segundos.

Todas las diluciones (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K) fueron reutilizadas para replicar los experimentos más de cinco veces, con el fin de evaluar la reutilización de los bio-nanocompuestos como nucleadores de hielo y la proteína INA libre.

Experimentos de congelación

Se llevaron a cabo cinco experimentos para evaluar la actividad de congelación de cada muestra.

- 5 Experimento 1. El primer experimento se llevó a cabo en una cámara de enfriamiento con temperaturas que oscilan entre 1,5 °C a 2,4 °C.

Se colocaron 1 ml de las diluciones seriadas de bio-nanocompuestos de magnetita y dióxido de silicio (2 mg/ml, 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml y 0,125 mg/ml) en una
10 cámara de enfriamiento con temperaturas que oscilan entre 1,5 °C y 2,4 °C durante 4 horas, para medir el punto de congelación de cada concentración para los dos tipos de bio-nanocompuestos.

Se evaluaron tres réplicas por concentración de bio-nanocompuestos. El símbolo (*)
15 significa actividad de nucleación de hielo y el (-) significa que no hay actividad de nucleación o estado líquido de las muestras.

Magnetita				Dióxido de Silicio			
Concentración (mg/ml)	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Concentración (mg/ml)	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
2	*	*	*	*	*	*	*
1	*	*	*	-	-	-	-
0,5	*	*	*	-	-	-	-
0,25	-	-	-	-	-	-	-
0,125	-	-	-	-	-	-	-

20 Tabla 2. Determinación de la actividad de nucleación de hielo para los bio-nanocompuestos de magnetita y dióxido de silicio. (*) representa actividad de nucleación de hielo y (-) representa ausencia de actividad de nucleación o estado líquido de las muestras.

De acuerdo con los resultados anteriores, el bio-nanocompuesto con el mejor comportamiento de nucleación de hielo a 1,5°C – 2,4°C es el bio-nanocompuesto de magnetita, ya que 3 de 5 concentraciones se congelaron. Sin embargo, el bio-

nanocompuesto de dióxido de silicio es mejor en términos de resistencia del hielo, porque fue el único que se pudo medir con este método.

Experimento 2. Se colocaron 5 ml de diluciones seriadas a saber, 2 mg/ml, 1 mg/ml y 0,5 mg/ml y las diluciones de proteína INA libre 0,2 mg/ml, 0,1 mg/ml y 0,05 mg/ml en recipientes plásticos con su respectivo tapón y se dejaron en una cámara de enfriamiento a -7°C hasta que se congelaron. Luego, las muestras se sometieron a un baño termostático a 26°C para medir el estado y variación de temperatura de cada uno de ellos.

En las dos ocasiones que se realizó este experimento todas las muestras congelaron debido a la temperatura a la que se sometieron.

Experimento 3. Todas las muestras A, B, C, D, E, F, G, H, I, J y K, como se describen en la preparación de las muestras se colocaron en una rejilla y se colocaron en una cámara de enfriamiento a 4°C durante 12 horas, para congelarlas todas y luego evaluar la actividad de fusión. A esta temperatura, la temperatura interna del liofilizador fue de $-1,1^{\circ}\text{C}$ y el control de agua no se congeló.

Experimento 4. Todas las muestras (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K) se colocaron en una rejilla y se colocaron en una cámara de enfriamiento a -5°C durante 12 horas, para congelarlas y luego evaluar su actividad de fusión. A esta temperatura, la temperatura interna del liofilizador fue de $-2,8^{\circ}\text{C}$, por lo que el control de agua no se congeló.

Experimento 5. Todas las muestras (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K) se colocaron en una rejilla y se colocaron en una cámara de enfriamiento a -6°C durante 12 horas para congelarlas y luego evaluar su actividad de fusión. A esta temperatura, la temperatura interna del liofilizador fue de $-4,1^{\circ}\text{C}$ y el control de agua presentó actividad de congelación.

Ejemplo 6: Actividad de descongelación

Se realizaron experimentos de descongelación correspondientes a cada uno de los experimentos de congelación del Ejemplo 5.

- 5 Experimento 1. Este experimento se llevó a cabo con el fin de comparar la resistencia del hielo entre los bio-nanocompuestos, la proteína INA libre y el control de agua, congelando todos ellos y luego colocándolos a temperatura ambiente (23°C), con el fin de medir el tiempo de descongelación.
- 10 Se midió el tiempo de descongelación de los cristales de hielo promovidos y generados por los bio-nanocompuestos según la presente divulgación, la proteína INA libre y el control de agua de tipo I a través de dos métodos. El primero, consistió en congelar muestras de agua a diferentes concentraciones de los bio-nanocompuestos en una cámara de enfriamiento hasta que los cristales de hielo estuvieran presentes tal y como se describe
- 15 en el Ejemplo 5 y luego colocarlos en un baño termostático a 26°C, para registrar la temperatura y el estado a lo largo del tiempo cada 30 segundos hasta que alcanzó el estado líquido.

- El segundo método, se trató de introducir las muestras de agua con diferentes
- 20 concentraciones de bio-nanocompuesto en un liofilizador durante 12 horas, con el fin de evaluar si alguno se había congelado tal y como se describe en el Ejemplo 5 y luego analizar las muestras congeladas a temperatura ambiente (23°C), midiendo la temperatura y el estado en el tiempo cada 30 segundos hasta que alcanzaron el estado líquido.

- 25 A través del primer método se logró medir las muestras en segundos (FIG. 5), mientras que el segundo método permitió medir durante minutos en un ambiente más controlado.

- Una vez finalizado el período de incubación descrito en el Ejemplo 5 a partir del experimento 3, las diluciones que mostraron actividad de nucleación de hielo, estado 1 o
- 30 2 de acuerdo a las convenciones de la Tabla 3 se colocaron a temperatura ambiente (23°C), durante un minuto para probar la actividad de descongelación y la resistencia del

hielo (FIG. 5). Las muestras de magnetita no se incluyeron dado que todas las muestras se fundieron antes de realizar cualquier medida.

Estado	Sólido	Principalmente sólido	Semisólido / Semilíquido	Principalmente Líquido	Líquido
Convención	1	2	3	4	5

5 Tabla 3. Cuadro de Convenciones de Estados. El estado de las muestras se determinó de acuerdo con las convenciones de esta tabla, para complementar la caracterización de los bio-nanocompuestos

Los siguientes resultados demuestran el rendimiento de los bio-nanocompuestos a través del segundo método:

10

El bio-nanocompuesto de óxido de hierro tuvo los siguientes tiempos de descongelación, según la concentración y actividad de congelación previa:

15

- a -1,1°C: no se congela (2 mg / ml), 25 min (1 mg/ml) y 30 min (0,5 mg/ml),
- a -2,8°C: 33,33 min (2 mg/ml), 33,33 min (1 mg/ml) y 31,7 min (0,5 mg/ml),
- finalmente a -4,1°C: 45 min (2 mg/ml), 50 min (1 mg/ml) y 48,3 min(0,5 mg/ml).

El bio-nanocompuesto de dióxido de silicio tuvo los siguientes tiempos de descongelación, según la concentración y actividad de congelación previa:

20

- a -1,1°C: 20 min (2 mg/ml), 30 min (1 mg/ml) y 30 min (0,5 mg/ml),
- a -2,8°C: 38,3 min (2 mg/ml), 38,3 min (1 mg/ml) y 36,7 min (0,5 mg/ml),
- finalmente, a -4,1°C: 43,3 min (2 mg/ml), 45 min (1 mg/ml) y 45 min (0,5 mg/ml).

La proteína INA libre tuvo los siguientes tiempos de descongelación, según la concentración y la anterior actividad de congelación:

25

- a -1,1°C: no se congela (0,2 mg/ml), 28,3 min (0,1 mg/ml) y 25 min (0,05 mg/ml),
- a -2,8°C: 33,3 min (0,2 mg/ml), 28,3 min (0,1 m /ml) y 35 min (0,05mg/ml),
- finalmente, a -4,1°C: 45 min (0,2 mg/ml), 46,7 min (0,1 mg/ml) y 42,5 min (0,05 mg/ml).

Una réplica del control de agua tipo I se congeló a $-4,1^{\circ}\text{C}$ y duró 30 minutos hasta que alcanzó el estado líquido.

Lo anterior demuestra tiempos de descongelación más bajos en comparación con los del bio-nanocompuesto de acuerdo con la presente divulgación, lo que demuestra una ventaja del bio-nanocompuesto sobre los controles reflejada en un menor uso de energía para congelamiento y mantenimiento del agua.

Experimento 2. Se evaluaron las muestras de 5 ml de diluciones seriadas congeladas en cámara de enfriamiento y sometidas a baño termostático a 26°C . Se incluyeron 3 réplicas en cada medida. Los resultados muestran la media entre los valores de cada réplica para cada muestra. El control de agua tuvo dos réplicas. La primera vez que se llevó a cabo el experimento, se incluyeron análisis de estado y temperatura y estos se muestran en las Figuras 6 y 7, respectivamente. Las muestras de A a C corresponden a magnetita (Figuras 6A y 7A), de D a F corresponden al dióxido de silicio (Figuras 6B y 7B) y de G a I corresponden a la proteína INA libre (Figuras 6C y 7C).

La primera vez que se realizó este experimento no se utilizaron réplicas. En este caso, a partir de las Figuras 6 y 7 es posible evidenciar que el bio-nanocompuesto de dióxido de silicio duró 210 segundos hasta que alcanzó el estado líquido con una diferencia de 90 segundos con el bio-nanocompuesto de magnetita y 150 segundos con la proteína libre.

Los resultados de la segunda vez que se realizó el experimento se evidencian en la Figuras 8 y 9, en donde se utilizaron tres réplicas por cada tratamiento. En este caso el bio-nanocompuesto que presentó un tiempo de descongelación más prolongado fue el de magnetita en una concentración de 0,5 mg/ml, seguido del de dióxido de silicio a una concentración de 0,5 mg/ml y la proteína libre a una concentración de 0,05 mg/ml. Lo que sugiere que ambos bio-nanocompuestos presentan un buen funcionamiento a lo largo del tiempo al estar a una menor concentración en la solución.

Experimento 3. Las muestras se congelaron y cada concentración se evaluó de forma independiente dejando las muestras a temperatura ambiente (23°C)

después de sacarlas del liofilizador, analizando únicamente grupos de 3 muestras con la misma concentración. Cada tapón de vaso tenía un agujero con un diámetro para el sensor de temperatura y la temperatura de cada muestra se midió cada 5 minutos con un termopar. Al mismo tiempo, se determinó el estado sólido/líquido de las muestras utilizando la convención preestablecida del 1 al 5 de acuerdo a la Tabla 3.

Los resultados del experimento fueron reportados en una tabla de línea de tiempo que proporciona un estado promedio y la desviación de cada muestra de concentración. Luego, los resultados se colocaron juntos en un gráfico para comparar sus respectivas resistencias del hielo.

La muestra A del bio-nanocompuesto de magnetita que corresponde a una concentración de 2 mg/ml no se congeló a esta temperatura, como el control de agua tipo I y la muestra G de la proteína INA, que corresponde a la concentración de 0,2 mg/ml. Por eso, no hay datos que representen estas muestras en la Figura 11. En este caso los resultados de la muestra de magnetita se muestran en Figura 11A, los del silicio en la Figura 11B y los de la proteína INA libre en la Figura 11C. Las muestras de magnetita que mejor se desempeñan en el tiempo son las de 0,5 mg/ml, para el caso del dióxido de silicio las muestras de concentración 0,1 mg/ml y de 0,5 mg/ml tienen un desempeño similar que resulta en el mismo tiempo para llegar al estado líquido y en cuanto a la proteína libre las muestras de 0,1 mg/ml son las que tardan más tiempo en descongelarse.

Dado que la muestra de magnetita de 2 mg/ml no se congeló a $-1,1^{\circ}\text{C}$, el bio-nanocompuesto con el mejor comportamiento de la actividad de descongelación fue el dióxido de silicio, ya que tiene un tiempo de descongelación de 30 minutos, para las muestras E y F, que es mayor que el de la muestra B para magnetita (25 minutos), muestra H para INA libre (28 minutos) y muestra I para proteína INA libre (25 minutos).

Además, el bio-nanocompuesto de dióxido de silicio presenta mejores cualidades que la magnetita, la proteína INA libre y el control de agua, porque alcanza el tiempo máximo de descongelación incluso a la concentración más baja (0,5 mg/ml), que corresponde a la muestra F.

Experimento 4. Este experimento se llevó a cabo utilizando los mismos parámetros y condiciones de la actividad de descongelación del Experimento 3. Los resultados de la muestra de magnetita se muestran en la Figura 12A, los del dióxido de silicio en la Figura 12B y los de la proteína INA libre en la Figura 12C. Al someter las muestras a estas condiciones la magnetita presenta un mayor tiempo de descongelación al estar presente en una mayor concentración (ver muestras A y B en la gráfica), el dióxido de silicio presenta el mismo tiempo de descongelación para las muestras de menor concentración (ver muestras E y F) y la proteína INA libre presenta un menor tiempo de descongelación en comparación con ambos bio-nanocompuestos y mayor tiempo de descongelación a menor concentración (muestra I).

A esta temperatura, el bio-nanocompuesto de dióxido de silicio presenta un tiempo de descongelación más prolongado a mayor concentración para las muestras D a F. En consecuencia, este bio-nanocompuesto tiene el mejor comportamiento en el tiempo, seguido por el bio-nanocompuesto de magnetita y la proteína INA libre.

Experimento 5. Este experimento se llevó a cabo utilizando los mismos parámetros y condiciones de la actividad de descongelación del Experimento 3. Los resultados de la muestra de magnetita se muestran en la Figura 13A, los del dióxido de silicio en la Figura 13B y los de la proteína INA libre en la Figura 13C.

De acuerdo con los resultados obtenidos en estas condiciones de congelación y descongelación, el bio-nanocompuesto de magnetita tiene el tiempo de descongelación más largo y, en consecuencia, la mejor resistencia del hielo, seguido por el bio-nanocompuesto de dióxido de silicio que mostró un aumento del tiempo de descongelación a una menor concentración.

La proteína INA libre a una concentración de 0,1 mg/ml presentó un tiempo de descongelación más prolongado que el dióxido de silicio, por un minuto de diferencia, pero tuvo un tiempo de descongelación más corto que ambos bio-nanocompuestos a una concentración de 0,05 mg/ml.

Ambos bio-nanocompuestos tienen una ventaja de 15 a 20 minutos de tiempo de descongelación sobre el control de agua y el bio-nanocompuesto de magnetita, de 5 a 8 minutos sobre la proteína INA libre.

5

Ejemplo 7. Actividad de congelación mínima

Se colocaron 5 ml de todas las diluciones diferentes A, B, C, D, E, F, G, H, I, J y K en recipientes plásticos con su respectivo tapón en un liofilizador a temperaturas de 4°C, 3°C, 2°C, 1°C, 0°C, -1°C, -2°C, -3°C, -4°C, -5°C, -6°C, -7°C y -8°C, durante 12 horas por cada temperatura y luego, se evaluó la presencia del estado de congelación en cualquiera de las muestras. Se llevaron a cabo 3 réplicas de cada muestra y 2 réplicas del agua tipo I, definida como el control negativo.

15 No hubo evidencia de estado de congelación en ninguno de los bio-nanocompuestos hasta que el liofilizador alcanzó una temperatura de -4°C mostrada en la tabla electrónica de la máquina y una temperatura interna de -1,1°C, medida con un termómetro de mercurio colocado dentro del liofilizador. Esto indica la temperatura real a la que se alcanzó el estado de congelación.

20

Particularmente, el bio-nanocompuesto de magnetita tiene las siguientes temperaturas mínimas de congelación, según la concentración: -2,8°C (2 mg/ml), -2,23°C (1 mg/ml), -1,67°C (0,5 mg/ml).

25 El bio-nanocompuesto de dióxido de silicio tiene las siguientes temperaturas mínimas de congelación, según la concentración: -1,67°C (2 mg/ml), -1,1°C (1 mg/ml), -1,1°C (0,5 mg/ml).

30 Por otro lado, la proteína INA libre tiene las siguientes temperaturas mínimas de congelación, según la concentración: -4,1°C (0,2 mg/ml), -1,1°C (0,1 mg/ml) y -1,1°C (0,05 mg/ml).

Finalmente, el sistema Milli-Q® tipo I (control de agua) presentó una temperatura mínima de congelación de -7,05°C.

Los resultados referenciados anteriormente, se ilustran en la Figura 10 y se resumen en la siguiente tabla:

Muestra	Sustrato	Concentración mg/ml	Temperatura mínima de congelación (°C)
A	Magnetita	2 mg/ml	-2.8
B	Magnetita	1 mg/ml	-2,23
C	Magnetita	0,5 mg/ml	-1,67
D	Silicio	2 mg/ml	-1,67
E	Silicio	1 mg/ml	-1,1
F	Silicio	0,5 mg/ml	-1,1
G	INA libre	0,2 mg/ml	-4.1
H	INA libre	0,1 mg/ml	-1.1
I	INA libre	0,05 mg/ml	-1.1
J	Control – agua	N/A	-7,05

Tabla 3. Temperatura mínima de congelación para los bio-nanocompuestos de magnetita, dióxido de silicio y la proteína INA libre

Estos resultados sugieren que el bio-nanocompuesto con el punto de congelación más alto es el de dióxido de silicio porque las 3 réplicas de 1 mg/ml y 0,5 mg/ml se congelaron a -1-1°C o -4°C (temperatura del liofilizador), mientras que el bio-nanocompuesto de magnetita se congeló a -1,67°C, a una concentración de 0,5 mg/ml. Por otro lado, la proteína INA libre sola se congeló a - 4.1°C y -1.1°C, a una concentración de 0,2 mg/ml y 0,1 mg/ml respectivamente. El control de agua se congeló a -7,05°C.

El bio-nanocompuesto de dióxido de silicio presentó una diferencia en su mínima temperatura de congelación de 5,38°C y 2,43°C, con el control de agua y la proteína INA libre, respectivamente.

Las temperaturas mínimas de congelación son consistentes con la eficiencia de inmovilización del bio-nanocompuesto, ya que una mayor cantidad de proteína INA congela el agua de manera más eficiente.

5 **Ejemplo 8. Reutilización de los bio-nanocompuestos como nucleadores de hielo**

Este ejemplo se llevó a cabo para probar la reutilización de los bio-nanocompuestos en el tiempo. Se realizaron cuatro ciclos con las mismas muestras de bio-nanocompuestos, incluyendo proteína INA libre y agua tipo I, con tres réplicas de cada una, a excepción de la muestra de proteína INA libre a una concentración de 0,05 mg/ml y muestras de agua tipo I, que tenía sólo dos réplicas.

Actividad de congelación

Todas las muestras (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K) se colocaron en el liofilizador a -8 °C durante 12 horas para congelarlas y luego evaluar su actividad de descongelación. Se llevaron a cabo cuatro ciclos de este procedimiento. En estas condiciones, la temperatura interna del liofilizador fue: -7,7°C, -8,1°C, -8,0°C y -7,5°C para los ciclos uno a cuatro. El control de agua presentó actividad de congelación.

Actividad de descongelación

Este experimento se llevó a cabo utilizando los mismos parámetros y condiciones de la actividad de descongelación descrita en el Ejemplo 6. Por esa razón, el tiempo medio de descongelación en minutos de las 3 réplicas para cada muestra fue graficado, con el control de agua que se congeló en las condiciones mencionadas anteriormente (Figuras 14 y 15). Los resultados de las muestras de magnetita se muestran en la Figura 14A, 14B, 15A y 15B, aquellos del silicio en las Figuras 14C, 14 D, 15C y 15D, y los de la proteína INA libre en las Figuras 14E, 14 F, 15E y 15F. En los cuatro ciclos de congelación las muestras de bio-nanocompuesto y de proteína libre presentan un mayor tiempo de descongelación que el agua. En el primer ciclo (Figura 14A, 14C y 14E) la concentración de la muestra que mejor comportamiento presentó fue de 1 mg/ml, que en el caso del

dióxido de silicio tomó 55 minutos en llegar a estado líquido y 50 minutos en el caso de magnetita y la proteína libre. En el segundo ciclo (Figura 14B, 14D y 14F) la concentración que presentó mejor comportamiento para los dos bio-nanocompuestos desarrollados fue la de 0,5 mg/ml, que tardó 70 minutos en llegar a estado líquido para ambos casos, mientras que para la proteína libre la concentración que obtuvo un mejor tiempo fue la de 0,2 mg/ml con 65 minutos. En el tercer ciclo (Figura 15A, 15C y 15E) las concentraciones de 0,1 y 0,5 mg/ml son las que presentaron un mayor tiempo de descongelación para ambos bio-nanocompuestos, con un tiempo de 65 minutos tanto para magnetita como para dióxido de silicio, mientras que la proteína INA libre presentó un mejor tiempo para la mayor concentración (0,2 mg/ml) con un tiempo de 60 minutos. Finalmente, en el cuarto ciclo (Figura 15B, 15D y 15F) los bio-nanocompuestos presentaron el mejor tiempo de descongelación para las concentraciones más bajas y la proteína para la concentración más alta, con tiempos de 65 minutos para los bio-nanocompuestos y 70 minutos para la proteína libre.

Como es bien conocido en la técnica, las proteínas INA se degradan con cambios de temperatura superiores a 10°C y no garantizan una temperatura de congelación estable, generando consigo problemas de efectividad y eficacia en el proceso de congelación al tener que emplear mayores cantidades de proteína INA para alcanzar y mantener la congelación deseada, así como energía eléctrica para mantener una temperatura estable. En este sentido, de acuerdo a los resultados obtenidos en los ejemplos anteriores, se evidencia que la estructura particular del bio-nanocompuesto desarrollado a través del método de autoensamblaje, le confiere a la proteína INA una unión fuerte al sustrato a través de un enlace químico covalente, que le permite atrapar la proteína a través de una unión que la hace muy estable (mayor estabilidad térmica), evitando su degradación y permitiendo así un desempeño de esta a distintas temperaturas, que se caracteriza por presentar una respuesta permanente y duradera frente a la temperatura de congelación.

Por otro lado, las concentraciones de la proteína INA en el bio-nanocompuesto de acuerdo con la presente divulgación son más bajas que las concentraciones de la proteína libre, debido al proceso de inmovilización y su eficiencia, correspondiente al 99,99%, 99,87% y 99,80% para sustratos de dióxido de silicio, óxido de aluminio y magnetita,

respectivamente. Esto significa que el bio-nanocompuesto puede generar la nucleación de hielo con una menor cantidad de proteína, que el polipéptido libre solo.

Adicionalmente, esta característica estructural y particularmente el sustrato metálico que
5 permite ser recolectado por filtración o medios magnéticos, contribuye a la recuperación de la proteína INA libre; generando una operación cíclica que implica que no hay pérdidas de proteína y por lo tanto se le puede dar múltiples usos, disminuyendo así el impacto ambiental, además de superar los inconvenientes conocidos en el estado del arte en cuanto a la dificultad en la reutilización de las proteínas INA para realizar procesos de
10 congelación y así mismo, los altos costos asociados al mayor requerimiento en las cantidades de proteína INA. Sumado a esto, se puede aumentar localmente la concentración de la proteína ensamblada sobre el sustrato, evitando que la proteína INA quede libre y no se pueda garantizar una temperatura de congelación estable, por lo que proporciona mayor capacidad de refrigeración al no quedar libre; prolongando la cadena
15 de frío, es decir incrementando el tiempo en el que el líquido refrigerante está congelado.

Además, el bio-nanocompuesto permite reducir el consumo energético en tanto se requiere menor cantidad de energía eléctrica para llegar al punto de congelación de la sustancia, pues el bio-nanocompuesto permite la nucleación de cristales del líquido a
20 temperaturas más altas que la temperatura de congelación, por lo que hay que enfriar menos, y dura más tiempo congelada. Particularmente, la presente divulgación proporciona un agente de nucleación de hielo más eficiente, resistente y duradero a temperaturas de hasta 0°C que conduce a una disminución del consumo de energía durante la formación de hielo. El bio-nanocompuesto de la divulgación retiene alta actividad
25 durante los tres primeros usos, después del tercer uso, la actividad disminuye. Sin embargo, el uso del bio-nanocompuesto proporciona una cadena de frío más estable porque proporciona un punto de fusión más alto y se puede reutilizar durante un cierto número de veces, optimizando el consumo de proteínas INA.

30 En este sentido, el producto refrigerante tiene la ventaja de reducir la pérdida de productos por rotura de la cadena de frío, reducir el consumo de energía pues permite congelación a temperaturas más altas, (por ejemplo el agua logra congelarse a 1,5-2,4°C (34,7-36,3°F),

se puede reutilizar el bio-nanocompuesto varias veces permitiendo que el proceso de nucleación se repita en condiciones de bajo consumo de energía, (por ejemplo el bio-nanocompuesto se congela hasta cuatro veces), por lo que resulta amigable con el medio ambiente, mejora el proceso de cristalización permitiendo que el agua se congele a un
5 ritmo más rápido y dure más debido a sus enlaces más fuertes.

Finalmente, es importante destacar que el bio-nanocompuesto provee una tecnología sostenible en tanto promueve la estabilidad térmica, reduciendo el consumo de energía en aproximadamente un 80%, ya que como se ha enfatizado se necesita menos cantidad de
10 energía para alcanzar el punto de congelación y el hielo formado presenta tiempos más prolongados de descongelación.