

CARACTERIZACIÓN DE LA ADSORCIÓN DE PROTEÍNAS SOBRE NANOPARTÍCULAS DE SÍLICE CON UN NÚCLEO MAGNÉTICO

Autora: Clara Díaz García

Tutor académico: Dr. Francisco Javier Gómez Pérez

Co-Tutor: Felipe Hornos Adán

Departamento de Agroquímica y Medio Ambiente

Área de Química Física

Instituto de Biología Molecular y Celular (IBMC)

Grado en Biotecnología

Facultad de Ciencias Experimentales

Curso 2014/2015

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quisiera mostrar mi agradecimiento a todas la personas y entidades que han participado y han hecho posible la realización de este trabajo, por su dedicación y porque sin duda me han aportado nuevos conocimientos y habilidades que complementan mi formación como biotecnóloga.

No me olvido de mi familia y amigos, porque son el respiro que me impulsa a perseguir las metas que me propongo, aunque no estén siempre cerca de mí. Por último, agradecer a mi incondicional compañera de laboratorio y las grandes amistades que he formado durante estos años de universidad, los momentos vividos que me llenan de felicidad, sin olvidarme tampoco de mis compañeras de piso, a las que valoro por su apoyo incondicional.



ÍNDICE

RESUMEN	2
PALABRAS CLAVE	2
INTRODUCCIÓN	
1. Nanopartículas magnéticas	3
2. Propiedades de las nanopartículas en aplicaciones biomédicas	4
3. Polielectrolitos	5
4. Adsorción de proteínas	6
5. Espectroscopía óptica utilizada para la caracterización de biomoléculas	7
6. Aplicaciones	8
7. Vehiculización de la insulina por vía oral	9
8. Análogo de la insulina	10
ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	11
MATERIALES Y MÉTODOS	
1. Síntesis de las nanopartículas y recubrimiento	12
2. β -Lactoglobulina	16
3. Recubrimiento con polielectrolito	18
4. Proceso de adsorción	19
5. Estudios de integridad de la β -lactoglobulina	21
6. Influencia del tiempo de almacenamiento de la β -lactoglobulina	22
7. Desorción de la β -lactoglobulina	24
RESULTADOS	
1. Caracterización de las nanopartículas	25
2. Estudios de adsorción de la β -LG en diferentes condiciones de pH y fuerza iónica	25
3. Estudios conformacionales y de estabilidad de la β -LG	30
4. Influencia del tiempo de almacenamiento de la β -LG	32
5. Desorción de la β -LG inducida por un cambio de pH	32
DISCUSIÓN	
1. Optimización de las condiciones del proceso de adsorción	35
2. Estudios de integridad de la β -LG a elevada fuerza iónica	36
3. Influencia de la superficie de las MNPs sobre la β -LG	36
4. Liberación de la β -LG inducida por un cambio de pH	37
CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA	38
BIBLIOGRAFÍA	39

RESUMEN

La amplia investigación de las propiedades que ofrecen los materiales nanométricos en los últimos años ha promovido el desarrollo de las nanopartículas. Este trabajo constituye una aproximación in vitro a un sistema que pretende la vehiculización de biomoléculas tomando como base a las nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4). Por medio de la técnica de recubrimiento capa a capa (LbL, por sus siglas en inglés de layer-by-layer), se ha estudiado ampliamente la adsorción de la β -lactoglobulina (β -LG) a superficies poliméricas con un núcleo magnético, en diferentes condiciones de pH y fuerza iónica. Además, ha sido imprescindible estudiar el efecto de la adsorción sobre la integridad estructural de esta proteína por técnicas espectroscópicas, con el fin de optimizar el proceso de encapsulación, que permitirá que la biomolécula se administre y se libere en aquellas condiciones que preserven su estabilidad conformacional. Obteniendo que la deposición de una capa polimérica sobre las nanopartículas a fuerza iónica alta y posterior bajada de la fuerza iónica para el proceso de adsorción, son las condiciones idóneas para que se adsorba la mayor cantidad de β -LG, pudiendo ser liberada posteriormente por un cambio de pH.

Los estudios realizados han comenzado con la β -LG como proteína modelo, sin embargo, el objetivo último es trasladar este procedimiento para encapsular la insulina, de forma que pueda ser administrada de forma oral, constituyendo una alternativa a la vía subcutánea utilizada por la mayor parte de pacientes con diabetes mellitus y que conlleva una serie de riesgos.

In recent years, the extensive research of the nanomaterial's properties has enabled the development of nanoparticles. This project is an approach to design an in vitro drug delivery system based on magnetite nanoparticles (Fe_3O_4). Through the layer-by-layer (LbL) technique, the absorption of β -lactoglobulin (β -LG) to polymer surfaces with a magnetic core has been extensively studied, in different conditions of pH and ionic strength. It has also been necessary to study the effect of adsorption on the structural integrity of this protein by spectroscopic techniques in order to optimize the encapsulation process, which will allow the biomolecule to be administered and released in those specific conditions that preserve their conformational stability. It is noted that the deposition of a polymeric layer on the nanoparticles at high ionic strength and subsequent lowering of the ionic strength during the absorption process, are the right conditions to reach the best results for the β -LG adsorption and then it could be released by a pH change.

The research has begun with β -LG, used as a model protein, however, the primary goal is to transfer this process to encapsulate the insulin, so it could be administered and managed orally, constituting an alternative to the subcutaneous route used by the majority of patients with diabetes mellitus, which involves some risks.

PALABRAS CLAVE: Nanopartículas magnéticas, β -lactoglobulina, vehiculización insulina, pH, fuerza iónica.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, el progreso de la nanociencia ha permitido observar nuevas propiedades y fenómenos en la materia a una escala nanométrica, que vislumbran soluciones a problemas ambientales, energéticos o relacionados con la medicina. Promoviendo de esta forma el diseño de nuevos nanomateriales y dispositivos nanotecnológicos que tratan de ofrecer una alternativa eficaz y revolucionaria a los tratamientos convencionales de los que disponemos.

Uno de los nanomateriales que ofrecen numerosas aplicaciones en diferentes sectores de la biotecnología, son las nanopartículas (NPs), cuyo tamaño se encuentra entre 1 y 100 nanómetros, aunque también pueden considerarse NPs, aquellas cuyo tamaño es menor de 1 micrómetro. En nanotecnología, la razón de esta frontera, se produce para dimensiones del orden de los 100 nanómetros, en las que en términos físicos, las interacciones entre los átomos localizados en la superficie de la partícula se hacen dominantes frente a las del volumen.

Existe un amplio repertorio de nanopartículas y dependiendo de su composición distinguimos, las carbonosas (nanotubos, fullerenos o nanofibras de carbono), las metálicas (NPs de oro, de plata o de dióxido de titanio), las cerámicas (NPs de nitruro de aluminio) y las poliméricas (NPs de poliestireno). Además, estas nanopartículas pueden ser sintetizadas por diferentes procedimientos (método químico o método físico) y con tamaños controlables. (Issa *et al.*, 2013)

1. NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

El desarrollo del presente trabajo parte de la creciente importancia de las nanopartículas magnéticas en diferentes áreas de la biotecnología, motivo por el cual se ha estudiado la adsorción de biomoléculas a este tipo de superficies, que abarcan aplicaciones desde la biomedicina hasta la remediación medioambiental.

Los materiales magnéticos son aquellos materiales que muestran una respuesta a un campo magnético aplicado y se clasifican en cinco tipos principales: ferromagnéticos, paramagnéticos, diamagnéticos, antiferromagnéticos y ferrimagnéticos. (Issa *et al.*, 2013)

En este proyecto se ha trabajado con nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4), un material ferrimagnético, que está compuesto por átomos diferentes, que ocupan diferentes sitios reticulares, con momentos magnéticos antiparalelos que no se anulan. De forma general, la estructura de espinela de las ferritas es $(\text{Me}^{2+})[\text{Fe}^{3+}_2]\text{O}_4$, donde Me^{2+} (Fe^{2+} en el caso de la magnetita) representa iones metálicos tales como: Fe^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Mg^{2+} .

Esta disminución de escala provoca que la proporción superficie/volumen aumente. Asumiendo que las nanopartículas son esféricas, la relación del área superficial, A , al volumen, V , disminuye a medida que aumenta el tamaño de la partícula (su radio, R):

$$\left. \begin{array}{l} A = 4 \cdot \pi \cdot R^2 \\ V = \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot R^3 \end{array} \right\} \Rightarrow \frac{A}{V} = \frac{1}{3 \cdot R}$$

Así, por ejemplo, para una partícula de 1 μm (1000 nm) de diámetro, cerca de un 0,15% de sus átomos están en la superficie, mientras que para una partícula de 6 nm de diámetro, cerca de un 20 % de sus átomos están en la superficie.

Hasta el momento se han desarrollado diferentes métodos de síntesis de este tipo de ferrofluidos (dispersiones coloidales de NPs de magnetita), tales como la descomposición térmica, la síntesis utilizando microemulsiones, la oxidación hidrotérmica o la oxidación de iones Fe^{2+} y Fe^{3+} para dar lugar a sus hidróxidos y su posterior co-precipitación en forma de magnetita, Fe_3O_4 . Este último método es en el que nos hemos basado a la hora de sintetizar las nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4). En el método de co-precipitación, parámetros tales como la relación de concentraciones $[\text{Fe}^{2+}] / [\text{Fe}^{3+}]$, el tipo de sales presentes en el medio, la temperatura, el pH y su fuerza iónica controlan de forma efectiva el tamaño, la forma y la composición de la nanopartícula. (Lu *et al.*, 2007)

Un aspecto importante que debe tenerse en cuenta tanto en la síntesis como en el almacenamiento de NPs de magnetita, Fe_3O_4 , es la existencia de otros óxidos de hierro (en particular, la maghemita tetragonal $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, y la hematita hexagonal ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$)), que son termodinámicamente más estables que la magnetita obtenida inicialmente. Como consecuencia, tanto la síntesis de magnetita como su almacenamiento en condiciones no anaerobias provocan su paulatina transformación en las formas más estables. El proceso es cinéticamente lento y limitado por la exposición de las NPs al oxígeno atmosférico por lo que es fuertemente acelerado a altas temperaturas y/o a pH ácido. Como consecuencia, es importante estabilizar químicamente la magnetita obtenida mediante su recubrimiento con polímeros o matrices poliméricas que eviten el contacto de la superficie de magnetita con el oxígeno atmosférico.

En definitiva, las nanopartículas magnéticas destacan por la elevada estabilidad en un amplio rango de condiciones, el control del diámetro de la nanopartícula, la facilidad de síntesis por diferentes métodos, protección y funcionalización, la aplicabilidad en diferentes contextos y como característica más distintiva su polarizabilidad en presencia de un campo magnético que permite su separación y un fácil manejo.

2. PROPIEDADES DE LAS NANOPARTÍCULAS EN APLICACIONES BIOMÉDICAS

Uno de los sectores en los que las NPs magnéticas (MNPs) son potencialmente prácticas es en la biomedicina y sus aplicaciones van dirigidas a entrar en contacto con el organismo, por ello es necesario que se cumplan las siguientes características:

- i) Deben ser biocompatibles y no ser tóxicas. Para ello se puede recubrir la MNP con un material inerte, que elimina la toxicidad y lo convierte en un material biocompatible, pero que además sirve de recubrimiento protector para la nanopartícula frente a la degradación.
- ii) Las MNPs deben tener un tamaño entre los 10-50 nm. De esta forma las MNPs preservarán su estabilidad coloidal. Además, una vez el campo magnético es aplicado se minimizará la agregación, ya que las interacciones dipolares se reducen en gran medida.

La disminución del tamaño también aumentará la eficacia del recubrimiento de las NPs y las hará más estables en un ambiente fisiológico. (Issa *et al.*, 2013)

iii) Las MNPS deben tener una alta magnetización, lo que permitirá controlar el movimiento de las MNPs en la sangre con un campo magnético externo y aproximarlas al tejido patológico donde se encuentra su diana. (Issa *et al.*, 2013)

Una vez las NPs entran en la circulación sanguínea se recubren con proteínas del plasma de la sangre (opsonización), que las hace susceptibles a las células fagocíticas que las identificarán y las eliminarán. Sin embargo, se demostró que las NPs hidrofílicas, es decir, NPs recubiertas con polietilenglicol o derivados del dextrano, resistían la opsonización e incrementaban su tiempo en circulación, aumentando su probabilidad de llegar a su diana. Fue entonces cuando se demostró que los polímeros pueden aumentar la estabilidad coloidal mediante efectos estéricos y reducir la citotoxicidad. (Owens *et al.*, 2006)

En cuanto a los métodos protectores más utilizados se diferencian:

- Recubrimientos de NPs con materiales orgánicos, tales como polímeros o surfactantes.
- Recubrimientos de NPs de una capa inorgánica, tales como el sílice o el carbono.

3. POLIELECTROLITOS

Actualmente existe una amplia variedad de polielectrolitos (PEs), que son polímeros que contienen grupos ionizables, los cuales pueden dissociarse total (polielectrolitos fuertes), mantienen la carga fija independientemente del pH, o parcialmente (polielectrolitos débiles) en disolución, obteniendo cadenas poliméricas cargadas (macroiones) y que están acompañadas por pequeños contraiones. Los polielectrolitos débiles son aquellos en los que la densidad de carga varía al cambiar el pH, de acuerdo con el grado de disociación del grupo ionizable (que, a su vez, depende de la diferencia entre el pH del medio y el pK_a del grupo).

Los PEs atienden a diferentes clasificaciones, una de ellas distingue su origen, que puede ser natural (proteínas o nucleótidos), natural modificado (celulosa) o sintético (hidrocloruro de polialilamina (PAH), cloruro de polidialildimetil amonio (PDADMACl), polietilenimina (PEI) o poliestireno sulfónico (PSS)), los cuales se obtienen principalmente por polimerización de radicales libres. Además, no solo los PEs naturales son biodegradables, sino que los polímeros sintéticos se dividen en biodegradables, que son aquellos que contienen enlaces éster, ortoéster o amida del esqueleto del polímero, o no biodegradables.

En cuanto a su carga, se dividen en polianiones, policationes y polianfolitos. También pueden clasificarse dependiendo de la localización de los sitios cargados en las cadenas del polielectrolito. Si se encuentran dentro de la cadena principal se llaman de tipo integral, y si se encuentran en cadenas laterales de la cadena principal, se llaman de tipo colgante (Koetz, 2007).

Algunos de los recubrimientos más comunes para NPs son los derivados de dextrano, polivinilalcohol (PVA) o el polietilenglicol (PEG), este último es un polímero sintético estudiado extensamente en sistemas de liberación de fármacos, ya que además está aprobado por la Food and Drug Administration (FDA). La ventaja de los polímeros sintéticos, es que permiten controlar algunos aspectos de la estructura polimérica, produciendo

materiales a medida para las aplicaciones biológicas y aumentando la eficiencia del sistema liberador de fármacos.

Una de las técnicas más utilizadas para el recubrimiento de nanopartículas o para el ensamblaje de nano-películas (“nanofilms”) y que permite controlar la estructura y la composición de forma sencilla, es el método de recubrimiento capa a capa (o LbL “Layer-by-Layer”, por sus siglas en inglés). Esta técnica se basa en el autoensamblaje capa a capa por medio de interacciones electroestáticas, sin embargo otras fuerzas como por ejemplo, fuerzas hidrofóbicas, de van der Waals y enlaces de hidrógeno, también desempeñan un papel importante y permiten que se lleve a cabo la adsorción en condiciones de fuerza iónica elevada. (Borkovec *et al.*, 2008) Además, debido al creciente interés para aplicaciones biomédicas, se ha comprobado que la unión de fármacos, tales como proteínas, a diferentes polielectrolitos no afecta a su bioactividad. (Jiang *et al.* 2009)

Tanto a la hora del recubrimiento con PE, como a la hora de la adsorción del fármaco, el parámetro más importante a tomar en cuenta será el pH del medio, que condicionará la carga de ambos, la intensidad de la atracción electrostática y por tanto, que se lleve a cabo o no la adsorción a dicha superficie. Otros parámetros a tomar en cuenta en la adsorción y en la liberación son la temperatura, la disolución del propio polielectrolito y la fuerza iónica. (Jiang *et al.*, 2009). Así, por ejemplo, se ha comprobado que la presencia de sal en el proceso de adsorción del polielectrolito contribuye al aumento del grosor de la capa de polielectrolito. (Ma *et al.*, 2013)

Una vez la nanopartícula está recubierta de PE, las moléculas cargadas tales como biomacromoléculas serán los constituyentes que introducirán la funcionalidad a la capsula. Estas capas de PE depositadas en la superficie de la NP, serán útiles para aplicaciones como liberación de proteínas, purificación de proteínas y formación de reactores enzimáticos. (Ma *et al.*, 2013)

4. ADSORCIÓN DE PROTEÍNAS

Es bien sabido que muchas patologías humanas se asocian a un plegamiento incorrecto de las proteínas, resultando en un mal funcionamiento de la maquinaria celular. Por ello es muy importante controlar los procesos de plegamiento de la proteína cuando su medio más próximo y con el que interacciona cambia. En contacto con un fluido biológico, las proteínas que hay en él tienden a adherirse a la superficie de las NP, produciendo en muchos casos la desnaturalización de su estructura, si bien esto depende de las propiedades de la proteína (carga superficial de la proteína, su hidrofobicidad y su estabilidad conformacional intrínseca) y de las propiedades de las nanopartículas.

Actualmente muchas enfermedades agrupadas con el término de amiloidosis (Alzheimer o enfermedad de Creutzfeldt-Jakob), se caracterizan por el autoensamblaje de proteínas solubles para dar lugar a estructuras fibrilares insolubles, pudiendo formar estructuras oligoméricas que poseen propiedades tóxicas. El estudio de aplicaciones biomédicas con nanopartículas sugiere que las interacciones con la superficie de la nanopartícula promueven la formación de fibras amiloides, ya que aceleran el proceso de nucleación, pudiendo dar lugar a enfermedades asociadas a un mal plegamiento de proteínas. (Linse *et al.*, 2007)

Otro estudio destaca otras propiedades como el tamaño de las NP y su curvatura, como parámetros que influyen en el desplegamiento y estabilidad de la ribonucleasa A (RNasa A). La adsorción de esta proteína

globular sobre NPs de sílice, muestra que un aumento del diámetro de la NP se traduce en un mayor grado de desplegamiento, que impide realizar su función. (Shang *et al.*, 2007)

Además, también se ha estudiado que la velocidad de autólisis de la tripsina aumenta hasta 100 veces en presencia de superficies de vidrio y sílice coloidal (Johnson & Whateley, 1981). Por ello se han desarrollado soluciones que permiten conservar la estabilidad y función de la proteína, por medio de un recubrimiento de la nanopartícula con materiales poliméricos.

Las técnicas más utilizadas para seguir el proceso de adsorción pueden ser: espectroscopia de fluorescencia, espectroscopia de absorción ultravioleta-visible (UV-Vis), espectroscopia de dispersión dinámica (Dynamic Light Scattering, DLS), ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) y elipsometría, entre otras.

Existen varios factores que afectan a la cantidad de proteína adsorbida, como son las propiedades de la proteína y la superficie del sustrato sólido, y las condiciones del medio. Dentro de las propiedades de la proteína distinguimos su carga, su tamaño, la estabilidad de su estructura ("hard"/"soft"), composición de aminoácidos y la conformación estérica. La proteína a estudio, la β -lactoglobulina es una proteína con una elevada estabilidad conformacional (hard protein), al igual que la lisozima o la ribonucleasa, y sus cantidades adsorbidas sobre superficies hidrofílicas son generalmente muy pequeñas, a menos que haya una atracción electrostática, mientras que la adsorción a superficies hidrófobas, conducen a un cambio estructural. En el lado opuesto, las proteínas "soft", como la albúmina de suero bovino (BSA) se suelen adsorber a todo tipo de superficies independientemente de las interacciones electrostáticas, puesto que la adsorción conduce a un aumento de entropía conformacional (Nakanishi *et al.*, 2001). Por su parte, la adsorción de la proteína a la superficie de las NPs, también puede afectar al estado de agregación de las NPs. (Winuprasith *et al.*, 2013).

5. ESPECTROSCOPÍA ÓPTICA UTILIZADA PARA LA CARACTERIZACIÓN DE BIOMOLÉCULAS

Las técnicas utilizadas en este estudio son espectroscópicas, entre las que distinguimos espectroscopía ultravioleta, espectroscopía de fluorescencia y dicroísmo circular (CD). Sin embargo, merece especial atención la espectroscopía de fluorescencia, puesto que ha sido la técnica principal en la obtención de los resultados. Tanto la espectroscopía UV como el CD han sido brevemente descritas en el apartado de Materiales y métodos.

5.1. ESPECTROSCOPÍA DE FLUORESCENCIA

A consecuencia de la absorción de un fotón, un electrón de una molécula pasa desde el estado fundamental a un estado excitado. La espectroscopía de fluorescencia es observada cuando, después de la excitación, los electrones pasan del estado excitado a un estado fundamental, emitiendo energía en forma de radiación electromagnética y minimizando su energía. En el estado excitado, parte de la energía se pierde por procesos no radiativos, como transiciones vibracionales, radiación interna, etc. Por este motivo la energía emitida es siempre menor que la energía absorbida. Además la fluorescencia ocurre a longitudes de onda mayores que la absorción y es mucho más sensible a los cambios en las propiedades fisicoquímicas del entorno del cromóforo que la absorbancia. Como el tiempo de vida del estado excitado es grande, interacciones o perturbaciones pueden influir en dicho estado y por tanto en el espectro de emisión. Al igual que la

absorbancia, la fluorescencia también es originada por residuos, Tyr, Phe y Trp. En proteínas, la fluorescencia es dominada por los residuos de Trp, ya que la absorbancia a la longitud de onda de excitación y su rendimiento cuántico de emisión es mucho mayor que los correspondientes a la Tyr y Phe.

Un factor importante en fluorescencia es la transferencia de energía entre residuos (*quenching*), lo que provoca una disminución de la intensidad de emisión. Por ejemplo, la fluorescencia de la Phe no es observada debido a que su emisión es quencheada por la transferencia de energía a los otros dos aminoácidos, Tyr y Trp que absorben a 280 nm donde la Phe emite.

Los cambios en la conformación de la proteína, como desplegamiento, provocan cambios en la emisión de fluorescencia, desplazando el máximo de emisión hacia λ mayores. En proteínas que contienen Trp, tanto la longitud de onda del máximo como la intensidad de emisión varían. El máximo de emisión cambia normalmente a 350 nm en el estado desplegado, que corresponde al máximo de fluorescencia de un triptófano libre en disolución acuosa. La localización del máximo depende de la naturaleza y concentración del tampón. En un ambiente hidrofóbico, como el interior de una proteína, la emisión del Trp ocurre a longitudes de onda menores. Sin embargo, en el caso de la β -LG se compone de dos residuos Trp, uno de ellos localizado cerca de la superficie y el segundo en el bolsillo hidrofóbico por lo que la emisión resultante será una contribución de ambos.

6. APLICACIONES

Todo este proceso que persigue la funcionalización de la nanopartícula se emplea en diferentes aplicaciones. Una de ellas como se ha comentado se enmarca en el campo de la biomedicina, y persigue la vehiculización de fármacos inmovilizados sobre MNPs que son dirigidos con un campo magnético externo en el organismo. Esto permitiría que los fármacos pudieran ser administrados directamente al tejido/órgano diana o liberarse mediante rutas sistémicas, con el propósito de además de tratar la patología liberando un compuesto activo, que la concentración del fármaco en el cuerpo se mantenga dentro de la ventana terapéutica. (Coelho *et al.*, 2010)

Las NPs se han utilizado en el tratamiento de tumores sólidos, pero actualmente también se utilizan magnetoliposomas como sistemas liberadores de péptidos o fármacos, y para el diagnóstico y tratamiento de otras patologías. Otro ejemplo en el que se emplean MNPs es en la hipertermia magnética, donde las NPs actúan como agentes capaces de liberar calor de forma localizada y controlada como consecuencia de la acción de un campo magnético externo aumentando la temperatura del tejido aproximadamente a 43°C, donde las células tumorales son más sensibles que las células sanas, por lo que este tratamiento se podría combinar con la quimioterapia o radioterapia creando un efecto sinérgico. (Issa *et al.*, 2013)

El recubrimiento de las MNPs permite funcionalizarlas por medio de la unión de moléculas tales como grupos carboxilo o biotina, donde se unirá a su vez el fármaco. El fármaco puede ser liberado pasivamente, debido a una degradación del vehículo, o activamente por medio de un pulso magnético o calor. Es importante tomar en cuenta que las condiciones del ambiente también van a condicionar la liberación del fármaco, como puede ser el pH o la osmolaridad y por ejemplo pueden ser aprovechadas para diseñar nuevos modelos de

administración. Más en particular, este sistema de vehiculización aplicado a la insulina será desarrollado, puesto que es uno de los objetivos generales de este trabajo.

En contraposición a las aplicaciones biomédicas, se encontrarían las aplicaciones destinadas a la remediación de aguas contaminadas, en las que se utilizan nanopartículas magnéticas de óxido de hierro (IOMNPs) que pueden ser modificadas con materiales orgánicos e inorgánicos, o integradas en una matriz polimérica. Uno de los enfoques propuestos se basa en la utilización de un polielectrolito catiónico que permite la unión entre coloides de sílice y las IOMNPs, quedando estas últimas en la capa exterior, de forma que permita el aprovechamiento de sus propiedades magnéticas y catalíticas para captar iones metálicos en el tratamiento de las aguas residuales. (Che *et al.*, 2014). Además, estas propiedades magnéticas permitirían la recuperación y reciclaje de las NPs para su reutilización posterior.

7. VEHICULIZACIÓN DE LA INSULINA POR VIA ORAL

La diabetes mellitus tipo 1 y 2 son enfermedades metabólicas caracterizadas por una disminución progresiva de la función que realizan las células β pancreáticas. El mantenimiento de los niveles de glucosa en la sangre a niveles casi normales reduce el riesgo de complicaciones a largo plazo, tales como la ceguera en adultos, enfermedades cardiovasculares, amputaciones no traumáticas y nefropatía diabética. (Meetoo *et al.*, 2007)

La insulina se administra normalmente por vía subcutánea, reduciendo significativamente la morbilidad y la mortalidad, sin embargo conlleva un difícil control glucémico a largo plazo. La administración de insulina por vía oral, consistiría en una vía de administración no invasiva y que evitaría una concentración de insulina periférica excesivamente elevada, asociada con enfermedad coronaria, hipertensión, dislipemia y ganancia de peso.

La iniciativa propuesta en este trabajo parte de unas NPs de sílice sobre las que se depositaría un PE aniónico para evitar que la superficie hidrofóbica desnaturalice la proteína. La insulina es una hormona que tiene un punto isoeléctrico, $pI=5.4$ (Yoshida *et al.*, 2009), por lo que el entorno ácido estomacal ($pH \sim 1,5$), permite que la insulina esté cargada positivamente, y se adsorba a la superficie polimérica cargada negativamente. Una vez en el intestino (pH neutro), la insulina pasaría a estar cargada negativamente ($pH > pK_a$) mientras que la superficie de polimérica permanecería cargada negativamente. Como consecuencia, la interacción atractiva entre la insulina y la superficie polimérica a bajo pH se transforma en repulsiva a pH neutro provocando la liberación de la insulina y su posterior adsorción. La existencia de un alto contenido en proteasas aspárticas en el estómago (fundamentalmente pepsina) provocaría la degradación de la insulina adsorbida. Para evitarlo, sería necesario dotar a la nanopartícula recubierta de insulina de otra capa de polielectrolito (siguiendo los métodos del recubrimiento capa a capa) que recubriese la proteína impidiendo así su hidrólisis enzimática, comprobándose que el recubrimiento con el polielectrolito protegería a la insulina de la digestión enzimática llevada a cabo por las proteasas en el estómago. (Yoshida *et al.*, 2009)

8. PROTEÍNA MODELO DE LA INSULINA: β -LACTOGLOBULINA.

En los estudios necesarios para llevar a cabo la encapsulación de la insulina se partió de un modelo no funcional, de mayor estabilidad y con un punto isoeléctrico (pI) similar a esta hormona polipeptídica. Las características más importantes quedan recogidas en la tabla (1) que aparece a continuación:

	Insulina (monómero)	β -lactoglobulina (monómero)
Peso molecular	5721 Da	18281 Da
Coef. Extinción	1,107 (mg/mL) ⁻¹ cm ⁻¹	0,941 (mg/mL) ⁻¹ cm ⁻¹
pI	5,39	4,83
Radio hidrodinámico	1,3 nm	2 nm
Triptófanos	--	2 residuos

Tabla 1. Comparación entre la insulina y la β -LG como proteína modelo para los experimentos de adsorción.

Destaca como parámetro más importante que, tanto la insulina como la β -lactoglobulina presentan un pI, en el que a pH neutro presentan carga negativa y en el entorno ácido estomacal presentan carga positiva, sin embargo, la β -LG contiene residuos aromáticos, en concreto dos triptófanos, que permiten realizar estudios de espectroscopia de absorción y de emisión. En cambio la insulina no contiene residuos triptófano, lo que complica su caracterización mediante métodos ópticos, por lo que se ha preferido comenzar el estudio con una proteína modelo como la β -lactoglobulina.

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Hasta el momento se han desarrollado varios sistemas para la vehiculización de la insulina, como pueden ser comprimidos, cápsulas, parches intestinales, hidrogeles, micropartículas y nanopartículas. Además con algunos de estos sistemas se están llevando a cabo ensayos clínicos, un ejemplo lo constituye el HDV-I, que se encuentra en Fase Clínica III y se trata de una insulina liposomal que se administra de forma oral. (Fonte *et al.*, 2013) Sin embargo, los sistemas liposomales o micelares presentan baja eficacia de carga de la insulina y su liberación desde estas cápsulas presenta un comportamiento errático. (Song *et al.*, 2014) En el propósito de este trabajo distinguimos:

OBJETIVOS GENERALES:

- El principal objetivo de este trabajo es la encapsulación, vehiculización y liberación de biomoléculas de interés médico o biotecnológico por medio de nanopartículas magnéticas recubiertas con sílice.

Para mantener la estabilidad conformacional de la proteína, se recurrirá al método de layer by layer, para la absorción de la biomolécula (unión no-covalente) sobre una superficie polimérica que se deposita sobre las NPs. Por último, para completar el proceso de encapsulación, se depositará otra capa polimérica, permitiendo una administración por vía oral, caso en el que el cambio de pH estómago-intestino se aprovechará para inducir la liberación, o una administración intravenosa pudiendo dirigir el fármaco con un campo magnético externo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Síntesis y caracterización de partículas de magnetita (Fe_3O_4) de tamaño nanométrico, que sean estables coloidalmente.
- Recubrimiento de las nanopartículas magnéticas con sílice para convertirlas en un material biocompatible que puede entrar en contacto con el organismo.
- Selección de los polímeros adecuados para interaccionar electrostáticamente con la proteína, con el objetivo de preservar la estabilidad de la biomolécula, evitando la formación de agregados.
- Estudios de adsorción de la β -LG a la superficie de las MNPs recubiertas, variando parámetros como el pH y la fuerza iónica. Un paso fundamental para validar este sistema es la determinación de la integridad por técnicas espectroscópicas de la β -LG como proteína modelo de la insulina, una vez se haya dado el equilibrio adsorción-desorción con las NPs.
- Encapsulación por medio del recubrimiento con un polielectrolito afín y posterior liberación por un cambio de pH, simulando el entorno al que se enfrentaría una biomolécula al administrarse de forma oral.

1. SÍNTESIS DE LAS NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS Y RECUBRIMIENTO

1.1. MATERIALES

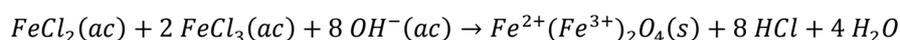
Los reactivos utilizados para la síntesis de las NPs de magnetita fueron suministrados por Sigma Aldrich y Acros Organics, entre los que distinguimos amoníaco, NH_3 (25%) PM: 17,03 g/mol; cloruro de hierro (II) tetrahidratado, $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ PM: 198,85 g/mol; cloruro de hierro (III) hexahidratado, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ PM: 270,33 g/mol; ácido oleico, $\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2$ PM: 282,46 g/mol; tetraetil ortosilicato, $\text{TEOS C}_8\text{H}_{20}\text{O}_4\text{Si}$ PM: 208,33; ácido nítrico, HNO_3 (65%) PM: 63,01 g/mol; y nitrógeno gas, N_2 (g) ρ (0°C , 1 atm) = 1,2505 Kg/m^3 , PM: 28,01 g/mol. El agua usada en los diferentes pasos fue de calidad Milli-Q y para los lavados se utilizó etanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$) al 96%.

La agitación mecánica se realizó a partir de un homogeneizador digital (IKA T-18 Ultra Turrax Digital Homogenizer 115 VAC, con velocidad de agitación variable entre 500-25000 rpm). Se utilizó un pH-metro (CRISON) para la medición del pH, un agitador de laboratorio de mesa, magnético y digital MS-H-Pro + (DRAGON LAB), para agitar y mantener la temperatura adecuada en cada uno de los pasos, y una bomba peristáltica (Pharmacia Biotech Pump P-50) para añadir los reactivos a una velocidad constante.

1.2. PREPARACIÓN DEL FERROFLUIDO ESTABILIZADO POR UN SURFACTANTE

La síntesis se llevó a cabo por el método de co-precipitación. Las nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4) se obtuvieron mediante la adición controlada de una disolución concentrada de base (NH_3 o NaOH) a una disolución ácida conteniendo Fe^{2+} y Fe^{3+} (con una relación de concentraciones 1:2) en atmósfera inerte (mediante el burbujeo constante de una corriente de N_2). El incremento en el pH inducido por la adición de base hace que la disolución de iones Fe^{2+} y Fe^{3+} inicialmente anaranjada ($\text{pH} < 2$) se transforme en una dispersión de color negro como consecuencia de la precipitación de magnetita. (Lu *et al.*, 2007)

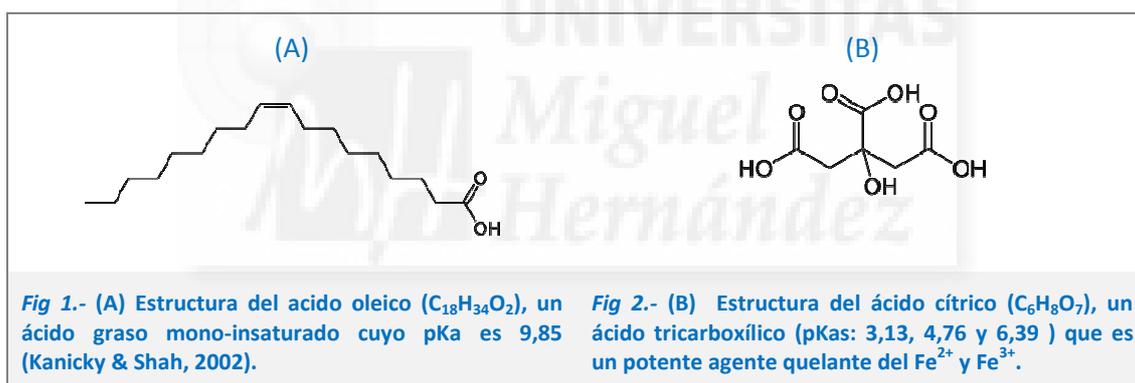
- i) Se parte de un 1 L de H_2O desgasificada a la que se le burbujea N_2 (gas), para eliminar el O_2 disuelto en la fase acuosa y la posterior disolución del O_2 atmosférico. Como ya se ha detallado anteriormente, el mantenimiento de condiciones anaerobias asegura la formación de magnetita (Fe_3O_4) y evita su oxidación a maghemita (Fe_2O_3). Este paso se realiza bajo continua agitación mecánica (17800 rpm), evitando la producción de salpicaduras.
- ii) Co-precipitación de hidróxidos de hierro. Pasados 15 minutos, se añaden 11,934 g de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y 34,604 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ manteniendo la corriente de N_2 y la agitación. Cuando la disolución no presenta turbidez, se añade la base, NH_3 (25%) a un flujo de 2 mL/min, monitorizando el pH de forma continua. El pH inicial de la disolución (1,5 aprox.) aumenta paulatinamente hasta alcanzar un $\text{pH}=10$, como consecuencia de la adición de amoníaco. Este paso se realiza a temperatura ambiente ($T^{\text{a}}= 25^\circ\text{C}$) durante 1 hora. Inmediatamente tras añadir el amoníaco la disolución toma un color negruzco, lo que indica que la subida del pH produce la precipitación de los hidróxidos de hierro que posteriormente se oxidan para dar magnetita Fe_3O_4 (s). La reacción global del proceso es la que aparece a continuación:



iii) Adición del surfactante. Pasado este tiempo se añaden 10 mL de ácido oleico bajo agitación vigorosa y a una temperatura de 70°C. Una vez alcanzada la temperatura deseada, se mantiene durante 1 hora bajo las mismas condiciones de agitación y corriente de N₂ (g).

Las NPs ferromagnéticas se recubren de un surfactante para prevenir su aglomeración, ver *figura 1*. En este caso las moléculas de oleato (R-COO⁻) se adsorberán a la superficie de las nanopartículas de magnetita y evitarán su floculación. (López-López *et al.*, 2005) El grupo carboxilato del ácido oleico forma un complejo de coordinación con el hierro que puede ser polinuclear. La cabeza polar del ácido oleico queda unida al hierro de la superficie de la NP y la cola apolar de la molécula queda orientada hacia el exterior como barrera de impedimento estérico que evita la interacción entre NPs (estabilización estérica). De esta forma las NPs quedan estabilizadas en el medio orgánico.

En medio acuoso, la capa de oleato rodeando la NP se asemeja a una doble capa lipídica ya que por cada molécula de oleato cuyo grupo carboxilato se une a la superficie otra molécula de oleato se dispone de forma antiparalela con respecto a la anterior, maximizando el contacto hidrofóbico entre sus cadenas hidrocarbonadas y orientando su grupo carboxilato hacia el exterior. De esta forma, las NP recubiertas de oleato aumentan su estabilidad coloidal al establecerse una interacción electrostática repulsiva entre ellas siempre que el grupo carboxilato esté deprotonado (pKa = 9.85).

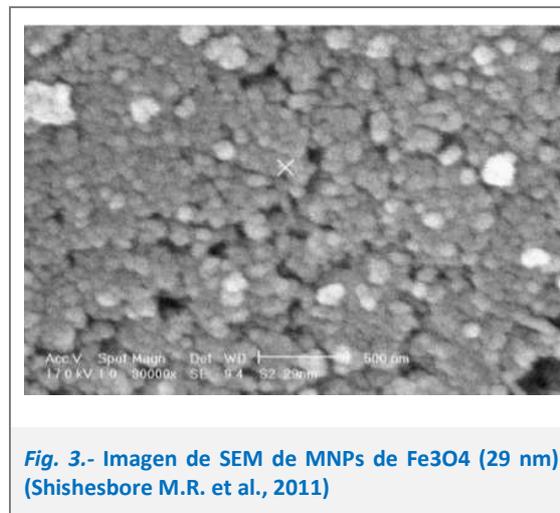


Alternativamente al ácido oléico, se puede utilizar el citrato (ver *figura 2*) (estabilización electrostática), con el que se consigue una disminución del radio hidrodinámico de la partícula, promoviendo de forma muy efectiva su individualización mediante la fuerte repulsión electrostática entre las partículas recubiertas.

iv) Pasado este tiempo, la dispersión se deja enfriar a temperatura ambiente y seguidamente se baja el pH hasta 5, añadiendo HNO₃ (65%). Consiguiendo de esta forma que se protonen los grupos carboxilato del ácido oleico (pKa= 9,85) y que las nanopartículas recubiertas de oleico precipiten a causa de la hidrofobicidad aportada por la capa de oleato, lo que facilitará su separación.

v) Para la separación por decantación de las nanopartículas se utiliza un imán permanente de neodimio y se lavan con etanol 3 veces para la eliminación de impurezas.

En la figura 3 se pueden observar como las MNPs de Fe_3O_4 pueden quedar individualizadas o formar agregados para estabilizarse.



1.3. ALMACENAMIENTO DE LAS PARTÍCULAS DE MAGNETITA DISPERSADAS EN ETANOL

Una vez las NP magnéticas están sintetizadas, se preparan para un correcto almacenamiento.

- i) Las partículas floculadas en etanol son dispersadas utilizando un baño de ultrasonidos durante 20 minutos. A continuación la magnetita dispersada en etanol se divide en diferentes alícuotas y es almacenada a 4°C para su uso posterior.
- ii) Cuantificación de la Fe_3O_4 . Se determina el residuo seco por diferencia de pesada con el correspondiente tubo vacío. Para ello una alícuota de Fe_3O_4 se coloca en un tubo perforado que permanece durante 12 H a 70°C en el termobloque.
- iii) Por último se guardan en la nevera todas las alícuotas a 4°C .

En este estudio se han utilizado dos alícuotas, la primera de ellas de $[\text{Fe}_3\text{O}_4]= 23.5 \text{ mg/mL}$ y la segunda de $[\text{Fe}_3\text{O}_4]= 22,6 \text{ mg/mL}$.

1.3.1. CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS MEDIANTE DLS (Dynamic light scattering)

Tras la síntesis de las partículas de Fe_3O_4 es muy importante conocer su tamaño, para ello se determinó el diámetro hidrodinámico por DLS (Dynamic light scattering) en el instrumento Brookhaven Mod 90 Plus (New York, EE.UU.). Este dispositivo permite el análisis del tamaño de las partículas en disolución en el rango $5 \text{ nm} - 10 \mu\text{m}$, midiendo la dependencia temporal de la intensidad de la luz dispersada a 90° . El detector es de tipo fotodiodo de avalancha (APD) y el aparato controla la temperatura de la muestra para que sea estable, ya que de otra manera se producirían corrientes de convección que llevarían a una interpretación errónea del tamaño.

Para ser más específicos, por DLS se mide la velocidad con la que la intensidad de la dispersión fluctúa, de forma que medimos la velocidad con la que las partículas se difunden en el medio líquido en el que se encuentran dispersadas según el movimiento browniano. La fluctuación de la velocidad del movimiento

aleatorio de la partícula en el medio dispersado depende del tamaño de la partícula, entendiendo que cuanto más grande es la partícula, el movimiento browniano será más lento. (Malvern Technical note)

El cálculo del tamaño requiere el uso de la ecuación de Stokes-Einstein:

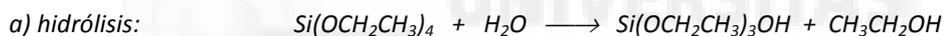
$$d(H) = \frac{k \cdot T}{3 \cdot \pi \cdot \eta \cdot D}$$

donde d es el diámetro hidrodinámico, k la constante de Boltzman, T la temperatura absoluta de la dispersión, η su viscosidad y D el coeficiente de difusión translacional de la partícula.

Las cubetas utilizadas para las medidas deben ser de poliestireno y pulidas en sus cuatro caras. La medida de las partículas se realiza diluyendo la muestra 150 veces y se mide por triplicado, obteniendo el diámetro hidrodinámico de la partícula.

1.4. RECUBRIMIENTO DE LAS PARTÍCULAS DE MAGNETITA CON SÍLICE

Las partículas de magnetita fueron recubiertas por una fina capa de sílice de acuerdo con el método propuesto por Ströber (Ströber *et al.*, 1968) que se basa en la hidrólisis del tetraetilortosilicato (TEOS) y su posterior condensación para dar lugar al recubrimiento de sílice, siendo ambos procesos catalizados en medio básico:



El procedimiento seguido puede resumirse como sigue:

- i) Sonicar durante 20 minutos la dispersión resultante de mezclar las NP (40 mL aprox.) con 180 mL de etanol y 45 mL de amoníaco (NH_3 25%), incrementando el pH con el objetivo de que las partículas no agreguen y permitir la posterior catálisis de los dos procesos asociados a la formación del recubrimiento de sílice.
- ii) En una relación 1:4 de agua:etanol, se añade la disolución anterior, agitando magnéticamente.
- iii) Para que el recubrimiento con TEOS ($\text{C}_8\text{H}_{20}\text{O}_4\text{Si}$) sea efectivo, la relación magnetita:TEOS es de 75:1, de forma que haya un exceso de sílice. Se debe añadir lentamente el TEOS y mantener la dispersión agitada durante 16 H a temperatura ambiente.
- iv) Pasado este tiempo, recuperar las partículas con un imán y realizar varios lavados con agua para separar mediante un imán las partículas de magnetita recubiertas de sílice de aquellas otras que no contienen magnetita (partículas de sílice formadas que no contienen en su interior magnetita)

Se ha comprobado que un exceso del precursor TEOS, produce partículas recubiertas de sílice más grandes, monodispersas y con una forma más regular. Además, tanto las partículas de magnetita no recubiertas, como las que han sido efectivamente recubiertas de sílice poseen propiedades superparamagnéticas. (Deng *et al.*, 2005)

1.5. ALMACENAMIENTO DE LAS PARTÍCULAS DE MAGNETITA (RECUBIERTAS DE SILICE) DISPERSADAS EN AGUA.

- i) Resuspender las partículas de magnetita recubiertas de sílice en 40 mL de agua y sonicar la dispersión durante 20 minutos.
- ii) Cuantificación de la Fe_3O_4 recubierta de sílice. Se determina el residuo seco por diferencia de pesada con el correspondiente tubo vacío. Para ello a partir de un determinado volumen de Fe_3O_4 , se realizan 3 lavados con etanol y las partículas sólidas se decantan magnéticamente utilizando un imán. Permaneciendo un tubo perforado con las partículas decantadas durante 12h a 70°C en el termobloque.
- iii) Determinar el diámetro hidrodinámico de las partículas en el DLS, siguiendo el procedimiento indicado en el apartado 1.4.1. CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS A TRAVÉS DE DLS.
- iv) Almacenar la magnetita recubierta de sílice en agua.

2. β -LACTOGLOBULINA

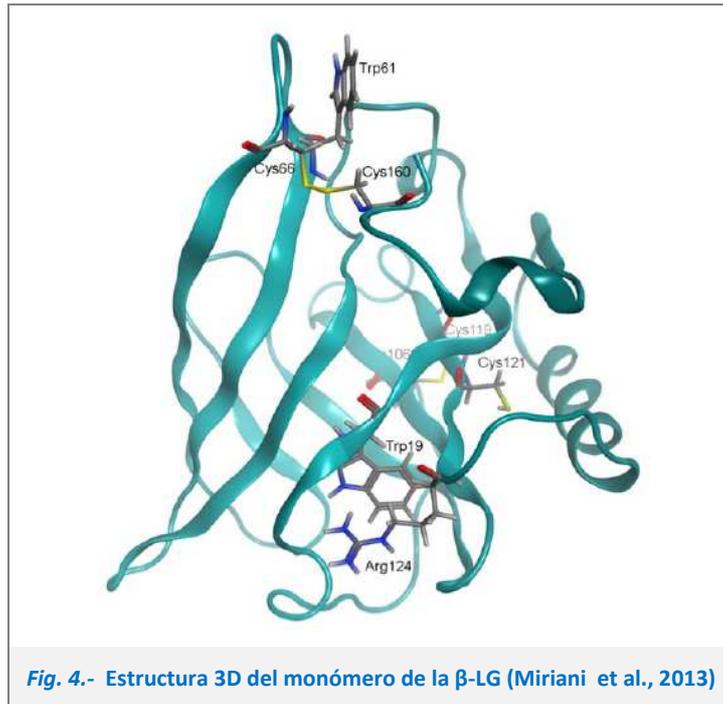
2.1. MATERIALES

La proteína modelo utilizada en este trabajo es la β -lactoglobulina ($\geq 90\%$ (PAGE)) en polvo liofilizado de suero bovino, almacenada de $2-8^\circ\text{C}$ y suministrada por SigmaAldrich. Para su preparación se ha utilizado un stock de HEPES (Ácido hidroxietil piperazinaetanosulfónico) 50 mM, pH=7. Otros tampones utilizados son: borato de sodio ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, tetraborato de sodio decahidratado, 99,5-105,0%, PM: 381,37 g/mol) 50 mM, pH=9; ácido fórmico (HCOOH , PM:46,03g/mol) 100 mM, pH=3; suministrados por SigmaAldrich. Para incrementar la fuerza iónica se utilizó cloruro de Sodio (NaCl , PM: 58,45 g/mol). El agua empleada en la preparación de los tampones fue de calidad Milli-Q.

2.2. CARACTERÍSTICAS PRINCIPALES DE SU ESTRUCTURA

La β -lactoglobulina (β -LG) es una proteína que se encuentra en el suero de la leche bovina, se compone de 162 aminoácidos, tiene un peso molecular de 18.281 Da y entre pH 3 y pH 9 se encuentra mayoritariamente en forma dimérica. Muchos estudios parecen indicar que esta proteína participa en el transporte de ácidos grasos y/o retinol, gracias a su estructura en barril- β y su habilidad para unir moléculas hidrofóbicas. Pero además, es un alérgeno alimentario y parece ser capaz de unir moléculas de interés farmacéutico cuando está parcialmente desplegada (Miriani *et al.*, 2013).

Pertenece a la familia de la lipocalina, caracterizada por ser pequeñas proteínas secretadas. Su estructura está formada por un barril beta antiparalelo altamente conservado, con nueve cadenas β y una α -hélice, que encierra un bolsillo hidrofóbico, sirviendo como sitio de unión que permite interactuar además de con ácidos grasos pequeños y retinol como se comentó anteriormente, con la vitamina C y el colesterol. (Burgos *et al.*, 2011)



Cuatro de las cinco cisteínas de la β -lactoglobulina forman dos puentes disulfuro (Cys₆₆-Cys₁₆₀, Cys₁₀₆-Cys₁₁₉) y la quinta cisteína se localiza en una grieta hidrofóbica entre el barril- β y la α -hélice de la estructura nativa. En cuanto los residuos de triptófano, son dos y uno de ellos se localiza en el fondo del barril hidrofóbico (Trp₁₉) y el segundo (Trp₆₁) se localiza cerca de la superficie. (Miriani *et al.*, 2013). Ver figura 4. La presencia de ambos residuos triptófano nos permiten hacer estudios por fluorescencia y monitorizar el estado de la proteína.

Existen gran cantidad de estudios acerca del comportamiento de esta proteína a altas temperaturas, debido a las consecuencias que pueden tener los tratamientos de esterilización de la leche para esta proteína, y se ha determinado que la disociación es endotérmica por lo que por debajo de los 50°C el dímero se disocia reversiblemente en dos unidades monoméricas nativas, en cambio por encima de esta temperatura se da un cambio conformacional previo que da lugar al desplegamiento de la proteína, pero este proceso no sólo depende de la temperatura sino que la concentración juega un papel muy importante, ya que un aumento de la misma se traduciría en una estabilización del dímero. Además el comportamiento de la transición dimerización-disociación se ha visto que es cooperativo y relativamente reversible en ciclos de calentamiento y enfriamiento. (Burgos *et al.*, 2011)

2.3. PREPARACIÓN Y ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LA β -LACTOGLOBULINA.

Para el estudio de la adsorción se parte de un stock concentrado de 1 mg/mL de β -LG en HEPES 10 mM a pH=7, que nos permitirá cuantificar la concentración real de proteína por espectroscopía ultravioleta a partir de su coeficiente de extinción a 280 nm (0,941(mg/mL)⁻¹cm⁻¹). Las medidas se realizaron en el espectrofotómetro SHIMADZU UV2600/2700 UV-VIS (Tokio, Japón) con cubetas de cuarzo con dos de sus caras opuestas pulidas, para permitir el paso del haz de luz.

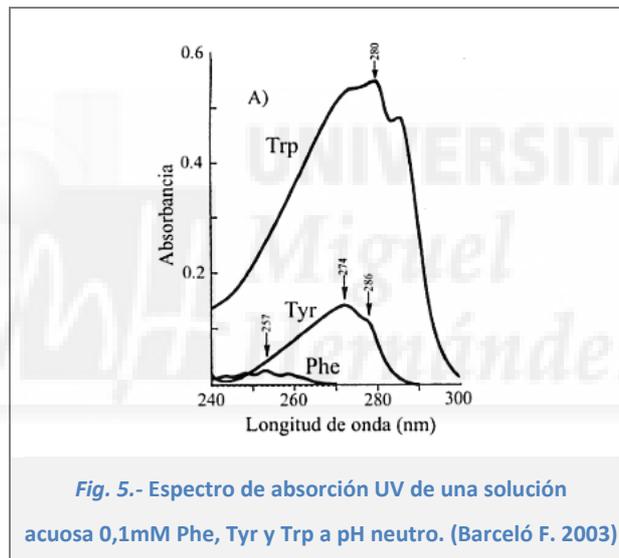
La espectroscopía de absorción UV-visible se basa en estudiar la interacción de la radiación electromagnética con la materia, midiendo la cantidad de luz absorbida en función de la longitud de onda (λ) utilizada. Como sabemos la luz ultravioleta ocupa un rango que va desde los 190-350 nm y la luz visible va desde 350-800 nm, situándose ambas entre la luz infrarroja y los rayos X. El análisis cuantitativo llevado a cabo permite hallar la concentración de una especie química a partir de la medida de la intensidad de luz absorbida por la muestra, tal y como establece la Ley de Lambert-Beer:

$$A_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda} \cdot b \cdot C$$

donde: A_{λ} es la absorbancia a una determinada λ , ε_{λ} es la absortividad $\left(\frac{ml}{mg \cdot cm}\right)$,

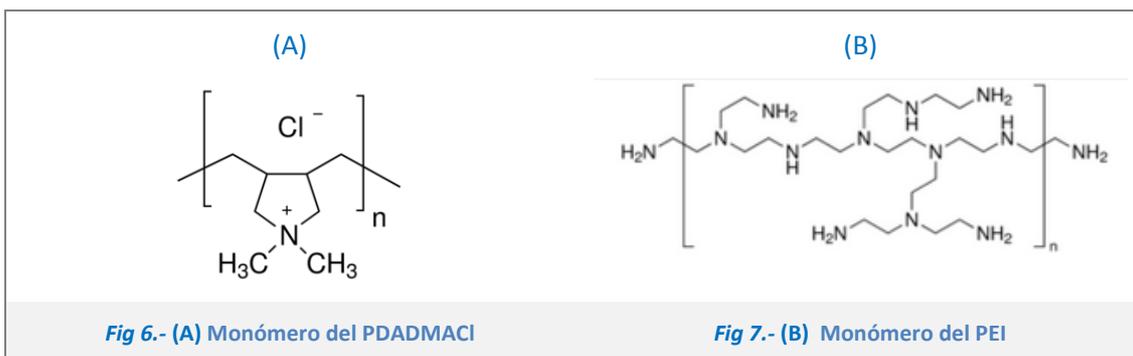
b es la longitud de paso óptico (cm) y C es la concentración $\left(\frac{mg}{ml}\right)$.

Sabiendo que la β -LG contiene dos residuos de triptófano que absorben a $\lambda = 280$ nm (Ver el espectro de absorción en la *figura 5*), podemos determinar la absorbancia a esta longitud de onda a partir de espectro de absorción y posteriormente con la Ley de Lambert-Beer calcular la concentración de proteína.



3. RECUBRIMIENTO CON POLIELECTROLITO

El estudio se ha llevado a cabo con dos polielectrolitos sintéticos, uno de ellos lineal (PDADMACI) (ver *figura 6*) y otro ramificado (PEI) (ver *figura 7*). El primero de ellos es: cloruro de polidialildimetil amonio (PDADMACI), polímero catiónico fuerte (su carga no depende del pH del medio) soluble en agua comprado en SigmaAldrich, con un peso molecular de PM: 400-500 KD al 19.5 wt % y preparado a una concentración de 20 mg/mL.



En cuanto a la polietilenimina (PEI), es un polímero soluble en agua y débil, por lo que su carga va a depender de pH del medio. Fue suministrado por Acros Organics, tiene un peso molecular PM: 60 KD al 49.3 wt % y fue preparado a una concentración de 20 mg/mL.

El procedimiento para depositar la capa polimérica es el siguiente:

- i) Durante 15 minutos se sónica el stock de MNPs recubiertas con TEOS y se homogeniza en un agitador.
- ii) A continuación se extrae una alícuota de MNPs a una concentración de 10 mg/mL. Se decanta el sobrenadante con ayuda de un imán, permitiendo de esta manera recuperar las NPs.
- iii) Añadir el polielectrolito a una concentración de 10mg/mL, utilizando el buffer específico según el experimento realizado (HEPES 10 mM pH=7, HEPES 10mM pH=7 NaCl=250mM, Borato 10 mM pH=9 etc.).
- iv) La dispersión debe permanecer durante 4 horas en agitación, tiempo tras el cual se recuperarán las NPs y se repetirá el proceso de deposición polimérica, con el objetivo de asegurarnos de que ha sido efectivo.
- v) Finalmente se recuperan las NPs con el imán, descartando el sobrenadante y se resuspenden en el buffer en HEPES 10 mM pH=7 y con fuerza iónica variable.

4. PROCESO DE ADSORCIÓN

El estudio de la adsorción de proteínas a superficies sólidas se centra en la cuantificación de las cantidades de proteína adsorbida y libre en disolución en función de la cantidad de superficie sólida accesible así como de la identificación y caracterización de los posibles cambios conformacionales sufridos por la proteína como consecuencia del proceso. Normalmente, la proteína adsorbida se determina en base al descenso en la concentración de la proteína en disolución, una vez la nanopartícula ha entrado en contacto con la proteína. En el presente estudio, las concentraciones de proteína soluble no fueron superiores a 0,1 mg/mL en todos los casos lo que hace que su determinación mediante espectroscopia UV-Vis lleve asociada una alta indeterminación (que se traduce en alta dispersión de los datos y escasa reproducibilidad). Por ello, se hizo uso de la fluorescencia para determinar dichas concentraciones.

Para ello se parte de las MNPs (10mg/mL), la β -Lactoglobulina (0,1 mg/mL) y el buffer adecuado (HEPES 10 mM pH=7 a elevada o baja fuerza iónica), y se incubaba la proteína en agitación, a una temperatura de 4°C y en contacto con las NPs durante 180 minutos, aproximadamente.

4.1. MEDIDA DE LA PROTEÍNA ADSORBIDA Y TRATAMIENTO DE LOS DATOS

Las medidas llevadas a cabo se han realizado en el fluorímetro modelo Cary Eclipse de Varian (Mulgrave, Australia), que utiliza filtros para seleccionar la longitud de onda de excitación y de emisión. Tiene capacidad para cuatro muestras termostalizadas que son medidas en cubetas de cuarzo pulidas en sus cuatro caras. Las muestras son excitadas a una determinada longitud de onda y la intensidad de la radiación electromagnética emitida por ellas es recogida por el detector. El haz incidente (excitación) y el haz que recoge en detector (emisión) están situados a 90° para evitar interferencias del haz incidente sobre el detector.

El espectro de emisión de una muestra se obtiene al excitarla a una determinada longitud de onda (generalmente a la cual la muestra presenta una mayor absorptividad) registrando en el detector la intensidad de la luz emitida en función de la longitud de onda en un intervalo dado. En general, los espectros de emisión de la β -lactoglobulina se obtuvieron excitando las muestras a 280 nm y recogiendo la intensidad de la luz emitida desde 300 a 400 nm.

Las concentraciones de proteína se obtuvieron en función de la intensidad de fluorescencia del máximo en el espectro de emisión ya que ambas variables son proporcionales. Estas concentraciones fueron normalizadas teniendo en cuenta la cantidad total de proteína inicialmente presente (antes de añadir la nanopartícula) obteniéndose así la fracción de proteína soluble.

Matemáticamente se calcula la fracción soluble con la siguiente ecuación:

$$f_{soluble} = \frac{(IF)_i - IF_{min}}{(IF_{max} - IF_{min})}$$

Por su parte la fracción de proteína adsorbida será:

$$f_{adsorbida} + f_{soluble} = 1_{soluble} \Rightarrow f_{adsorbida} = 1 - f_{soluble}$$

El rango de concentraciones de NPs que se estudió, varió desde los 0,5 mg/mL hasta los 7,5 mg/mL con una concentración de β -LG constante y no saturante. Además, la temperatura a la que se lleve a cabo el experimento debe ser constante (25°C), ya que la intensidad de fluorescencia es fuertemente dependiente de la temperatura. Al aumentar la temperatura normalmente disminuye la intensidad de fluorescencia puesto que aumenta el movimiento desordenado de las moléculas y con ello la probabilidad de desactivación por choque de la molécula excitada. Para minimizar estos efectos es necesario controlar de forma estricta la temperatura del compartimento de las muestras, utilizando un sistema Peltier asociado a un baño de recirculación que permita disipar el calor de forma más eficiente. (Olsen, 1990)

La fluorescencia de la β -lactoglobulina en su estado nativo se debe a sus residuos aromáticos, principalmente a la excitación de sus dos residuos de Triptófano (Trp). Este aminoácido tiene su máximo de absorción a 280 nm, por ello se excita a 280 nm y se recoge el espectro de emisión en el rango de 300-400 nm, promediando los valores detectados cada 0,2 s. Los datos obtenidos son finalmente sometidos a un proceso de filtrado para disminuir su dispersión (o ruido) obteniendo el valor de cada punto como el mejor ajuste del conjunto de los 5 datos anteriores y los 5 datos posteriores al analizado, utilizando una función "spline" cúbica.

Otro tipo de experimentos realizados en este trabajo consistieron en la monitorización de la intensidad de fluorescencia de la muestra en función de la temperatura para estudiar y analizar la estabilidad térmica de la proteína. Se realizan barridos de temperatura en los que se varía la temperatura desde los 20° hasta los 100° (a una velocidad de barrido de 1°C por min) y con las que se pretende determinar la temperatura de desnaturalización, T_m , definida como temperatura a la cual el 50% de la proteína se encuentra desnaturalizada, y es característica de las propiedades fisicoquímicas del medio en el que se encuentra (pH, fuerza iónica, presencia de desnaturalizantes, etc.).

En el caso de los barridos de temperatura, la excitación sigue siendo a 280 nm, pero la emisión se recoge solamente a 330 nm y a 360 nm, promediando los valores detectados cada 0,1s.

Los datos obtenidos se ajustan a una sigmoïdal a partir de la siguiente ecuación:

$$y = A_1 + B_1 \cdot X + C_1 \cdot X^2 + \frac{A_2 + B_2 \cdot X + C_2 \cdot X^2}{1 + e^{(x-T_m)/\delta t}}$$

donde $A_1+B_1 \cdot X+C_1 \cdot X^2$ y $A_2+B_2 \cdot X+C_2 \cdot X^2$ son las líneas base inicial y final ajustadas a un polinomio de segundo orden, la T_m es la temperatura de desnaturalización y δT define la pendiente de la curva sigmoïdal en su punto de inflexión, $T = T_m$ (cuanto mayor sea δT , más cerrada es la sigmoïdal).

4.2. CONTROL CINÉTICO

Por medio del control cinético se estudia la adsorción de la proteína a lo largo del tiempo, para ello:

- i) Se prepara una alícuota de NP (1,5 mg/mL) recubiertas con PDADMACI en condiciones de fuerza iónica alta y pH neutro, y se resuspende en el mismo medio (250 mM NaCl, 10 mM HEPES, pH 7).
- ii) Incubar las NPs (1,5 mg/mL) con la β -LG (0,1 mg/mL). Se retira una alícuota cada 30 minutos y se separa la fase sólida mediante decantación magnética, tras lo que se recoge el espectro de emisión del sobrenadante (o se somete a un barrido de temperatura) tal y como se explica en el apartado 4.1.

5. ESTUDIOS DE INTEGRIDAD DE LA β -LACTOGLOBULINA

5.1. MATERIALES

Para estudiar la estabilidad conformacional de la proteína, se utilizó como desnaturalizante, cloruro de guanidinio ($\text{NH}_2\text{C}(=\text{NH})\text{NH}_2 \cdot \text{HCl}$), $\text{PM} = 95,53 \text{ g/mol}$, suministrado por Sigma Aldrich. El stock de partida se preparó a una concentración de 8 M en agua de calidad Milli-Q.

5.2. ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DEL MÁXIMO DE EMISIÓN DE LA β -LG

En las mediciones realizadas por fluorescencia se ha estudiado el comportamiento de máximo de emisión del Trp, a partir de la comparación de la energía promedio de la banda, $\langle \lambda \rangle$, la intensidad de fluorescencia máxima ($I_{F_{\text{máx}}}$) en el espectro de emisión (300-400nm) y la longitud de onda asociada a esta intensidad de fluorescencia máxima ($\lambda_{\text{máx}}$). El cálculo de la energía promedio de la banda, $\langle \lambda \rangle$, implica realizar un promediado del rango de longitudes de onda con los valores máximos de intensidad de fluorescencia y se calcula a partir de la siguiente ecuación:

$$\langle \lambda \rangle = \frac{\sum_i (F_i \cdot \lambda_i)}{\sum_i F_i} \quad \text{donde:}$$

$F_i =$ Intensidad de fluorescencia (u. a.); $\lambda_i =$ longitudes de onda de emisión (nm)

5.2.1. COMPARACIÓN DE ESPECTROS

Para comparar el espectro de emisión de la β -LG a diferentes concentraciones de proteína y comprobar si la adsorción en alguno de los tubos es total y/o si se observa algún cambio en el estado conformacional de la proteína, se siguen los siguientes pasos:

- i) Se recubren las NPs por duplicado con el polielectrolito PDADMACl a pH 9 y en condiciones de fuerza iónica alta (10 mM Borato, 250 mM NaCl, pH=9) y se resuspenden a pH 7 en condiciones de fuerza iónica alta (10 mM HEPES, 250 mM NaCl, pH 7). Se mide:

Control: La β -LG en buffer a las concentraciones anteriormente mencionadas.

Alícuota 1: La β -LG a las concentraciones anteriormente mencionadas y en contacto con NP a una concentración de 4 mg/mL.

Alícuota 2: La β -LG a las concentraciones anteriormente mencionadas y en contacto con NP a una concentración de 7.5 mg/mL.

- ii) Este paso se realiza para tres concentraciones de β -LG: 0.050 mg/mL, 0.025mg/mL y 0.015 mg/mL.

6. INFLUENCIA DEL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO DE LA β -LG.

Para determinar la influencia del tiempo de almacenamiento se diferencian tres tipos de alícuotas de β -LG en diferentes condiciones:

Alícuota 1: β -LG “fresca” (10 mM HEPES, 250 mM NaCl, pH 7)

Alícuota 2: β -LG incubada durante 4 días (10 mM HEPES, 250 mM NaCl, pH7)

Alícuota 3: β -LG incubada con MNPs durante 4 días en presencia de elevada fuerza iónica (10 mM HEPES, 250 mM NaCl, pH 7)

La concentración final de β -LG es de 0,025 mg/mL y la de partículas es de 1.5 mg/ml.

- i) Pasado el tiempo requerido para las alícuotas 2 y 3, se estudia su comportamiento a diferentes concentraciones crecientes de desnaturizante, cloruro de guanidinio: 0 M, 0.5M, 1 M, 1.5M y 2M.
- ii) Se realizan barridos de temperatura desde los 20-100°C para determinar la T_m , tal y como se indica en el apartado 4.1.

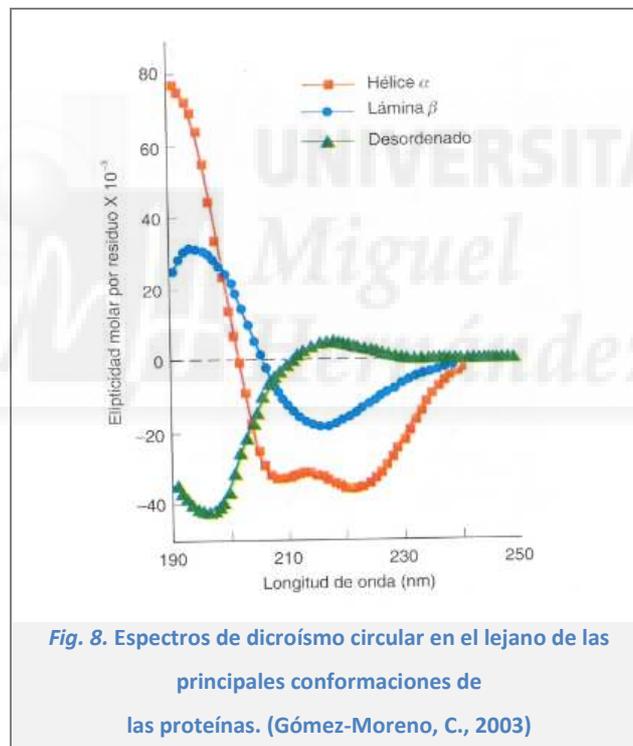
6.1. TÉCNICA DE DICROISMO CIRCULAR (CD)

La técnica de dicroísmo circular (CD) estudia la absorción de luz polarizada por parte de la muestra. Dado que los distintos elementos de estructura secundaria de la proteína (β -hélices, láminas β , estructuras desordenadas, etc.) absorben luz polarizada de forma distinta, el espectro de CD de la muestra contiene

información acerca de la estructura tridimensional de la proteína (contenido de cada uno de los elementos de estructura secundaria).

El dispositivo utilizado en este trabajo fue un espectropolarímetro modelo J-815 JASCO (Tokio, Japón) utilizando cubetas de cuarzo de 0,1 cm de paso óptico. Las medidas de CD de una sustancia ópticamente activa se basan en la diferencia entre sus coeficientes de absorción al ser irradiada con luz polarizada circularmente a la derecha y a la izquierda. (Olsen, 1990)

Los espectros obtenidos representan la elipticidad frente la longitud de onda y a partir de ellos se pueden detectar cambios en la estructura de la proteína. El cromóforo que absorbe en el UV lejano (180 a 250 nm) es el enlace peptídico; y en el UV cercano (250 a 350 nm) son los residuos aromáticos. El CD en el UV lejano permite obtener información de la estructura de la proteína y de su conformación. Se pueden diferenciar α -hélices, hojas β , giros β y random coils, como se observa en la *figura 8*. En el UV-cercano se debe constatar que la proteína tenga un espectro y la intensidad es mucho menor que en el lejano, esto es debido a que en una proteína hay menos residuos aromáticos que enlaces peptídicos.



La técnica de dicroísmo circular requiere aumentar la concentración de β -LG 100 veces con respecto a la medida por fluorescencia, pero nos sirve de técnica complementaria para confirmar resultados obtenidos en el apartado de la influencia del tiempo de almacenamiento de la β -LG (6). Para ello se parte de las mismas alícuotas de proteína en las mismas condiciones, pero sin añadir desnaturante y se recoge el espectro, que posteriormente es normalizado por la concentración para expresar la elipticidad, inicialmente obtenida en unidades de mdeg, en elipticidad promedio por residuo (MRE, en sus siglas en inglés, Mean Residue Ellipticity) a partir de la siguiente ecuación:

$$MRE = \frac{\theta \cdot \frac{Pm}{n^{\circ} \text{ aminoácidos}}}{10 \cdot [c] \cdot l} \rightarrow \left(\frac{\text{deg} \cdot \text{cm}^2}{\text{dmol}} \right) \text{ donde:}$$

$\theta = \text{Elipticidad (mdeg)}$; $Pm \text{ (medio)} = \text{Peso molecular } \left(\frac{\text{g}}{\text{mol}} \right)$; $[c] = \text{Concentración } \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right)$

$l = \text{longitud paso óptico (cm)}$

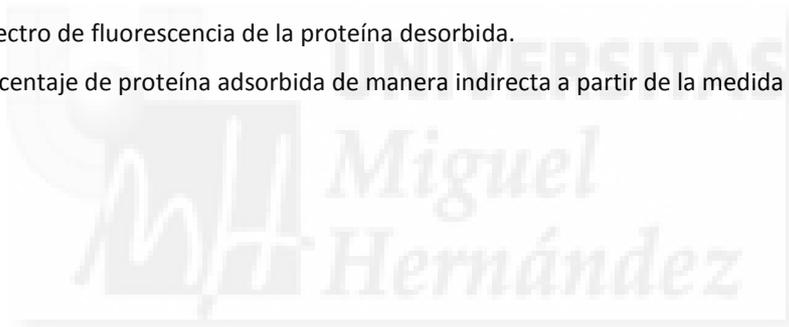
7. DESORCIÓN DE LA β -LG

7.1. MATERIALES

Como tampón se ha utilizado ácido fórmico (H-COOH), PM= 46,03 g/mol suministrado por Sigma Aldrich. El stock de partida se preparó a una concentración de 100 mM con un pH 3 en agua de calidad Milli-Q.

7.2. PROCEDIMIENTO

- i) Establecer una medida de referencia, para ello se recoge el espectro de fluorescencia de la β -LG (10 mM HEPES, pH 7) a una concentración final de 0,025 mg/mL.
- ii) Una vez la β -LG está adsorbida a la NP, recoger el espectro de fluorescencia de la proteína que no ha sido adsorbida.
- iii) Lavar las partículas y realizar el cambio de tampón. Se incuban las partículas en ácido fórmico 10 mM pH 3 durante 10 minutos.
- iv) Recoger el espectro de fluorescencia de la proteína desorbida.
- v) Cálculo del porcentaje de proteína adsorbida de manera indirecta a partir de la medida de referencia.



RESULTADOS

1. CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS

La determinación del diámetro hidrodinámico de las partículas de magnetita, Fe_3O_4 se realizó por DLS. Las partículas de magnetita recubiertas de ácido oleico inicialmente obtenidas tenían $91,57 \pm 0,11$ nm, tamaño que justifica una elevada estabilidad coloidal. Por su parte, cuando estas partículas fueron recubiertas por sílice su tamaño promedio aumentó hasta 2060 ± 110 nm, razón por la cual estrictamente no podrían llamarse nanopartículas, ya que para considerarlas NPs deben medir menos de 100 nm. Si bien es cierto que para el estudio que nos ocupa, un diámetro menor se traduciría en una mayor superficie específica, es decir, se podría adsorber mayor cantidad de proteína o de fármaco, sin embargo a priori no impedirá que se pueda llevar a cabo la adsorción.

2. ESTUDIOS DE LA ADSORCIÓN DE LA β -LG EN DIFERENTES CONDICIONES DE pH Y FUERZA IÓNICA

En unos ensayos preliminares para determinar las condiciones de partida del estudio por espectroscopía de fluorescencia, se determinó que, el máximo de emisión de la β -LG se situaba aproximadamente a 334 nm y que, la concentración no saturante de β -LG en la superficie de las NPs, era de 0,025 mg/mL, permitiéndonos ajustar parámetros como el voltaje del fotomultiplicador, para reducir el ruido de la señal de intensidad de fluorescencia.

En primer lugar, se estudió la capacidad de adsorción de la proteína a pH 7 en función de la fuerza iónica del medio. Hay que tener en cuenta que, el polielectrolito (PE) (tanto el PDADMACI (fuerte) o la PEI (débil)) se adsorbe a la superficie de sílice mediante una interacción de naturaleza mayoritariamente electrostática. Como consecuencia, la capacidad de la NP(-TEOS-PE) (referido a las NPs de sílice con un núcleo magnético sobre las que se ha depositado una capa de polielectrolito) para adsorber β -LG, dependerá del número de grupos del PE no unidos a la superficie de sílice. Por tanto, la densidad de carga de la NP(-TEOS-PE) dependerá del exceso de PE que contenga la partícula respecto de la cantidad estequiométrica necesaria para alcanzar su completo recubrimiento.

La *figura 9* muestra el % de proteína soluble en función de la concentración de NP (en mg/mL) a pH 7 dependiendo de las condiciones de recubrimiento del sílice por PDADMACI (*figura 9, A*) y por PEI (*figura 9, B*). Los resultados se recogen en la Tabla 2.

Si la unión entre el PE y la superficie de sílice es estequiométrica, entonces el número de monómeros de PE que permanecerán adsorbidos a la superficie de sílice será el mismo que el número de grupos silanoles que están deprotonados en la superficie de sílice. Como consecuencia, la densidad de carga (positiva) de la partícula recubierta sería nula. Esta situación es la que se produce cuando la NP se recubre con cualquiera de los dos PEs a baja fuerza iónica, 0 mM NaCl. En otras palabras, al recubrir la partícula de PE a fuerza iónica baja (0 mM NaCl, pH=7), la cantidad de PE que se adsorbe es la necesaria para compensar todos los grupos silanoles deprotonados. Como consecuencia, la partícula carece de grupos cargados expuestos al medio y, como

consecuencia, si la adsorción ocurre en las mismas condiciones de fuerza iónica baja, la β -LG es incapaz de interactuar electrostáticamente, por lo que no se adsorberse.

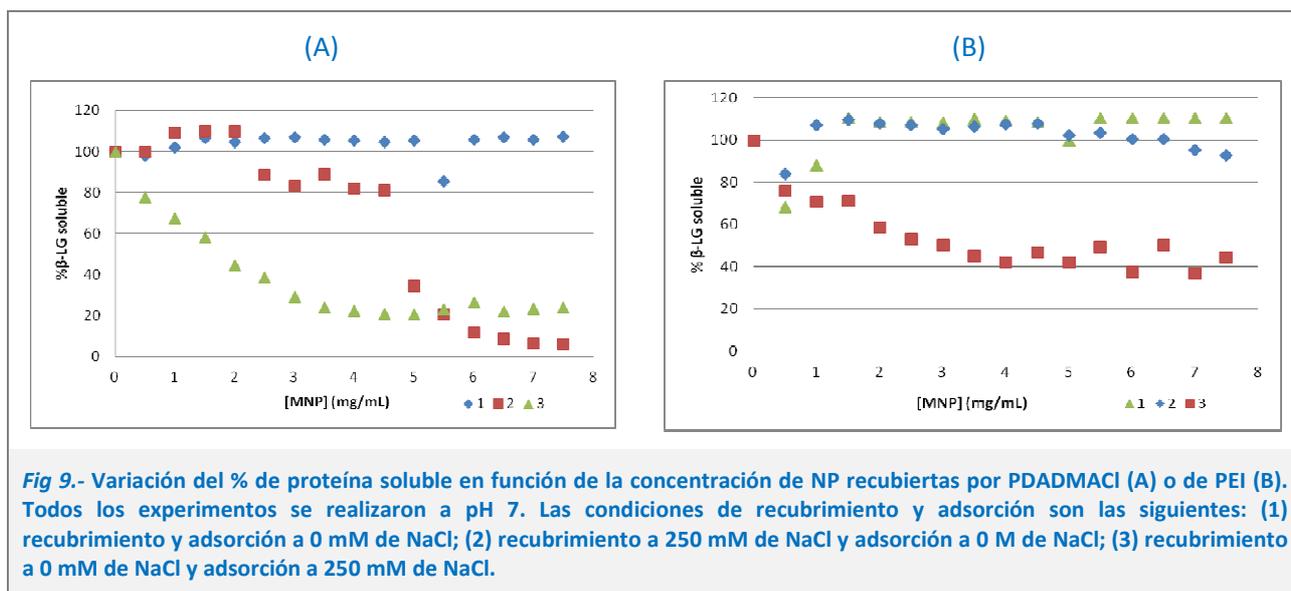


Tabla 2.- Resumen de los resultados obtenidos al recubrir las NP con PDADMACI y PEI a pH 7 en distintas condiciones de fuerza iónica .

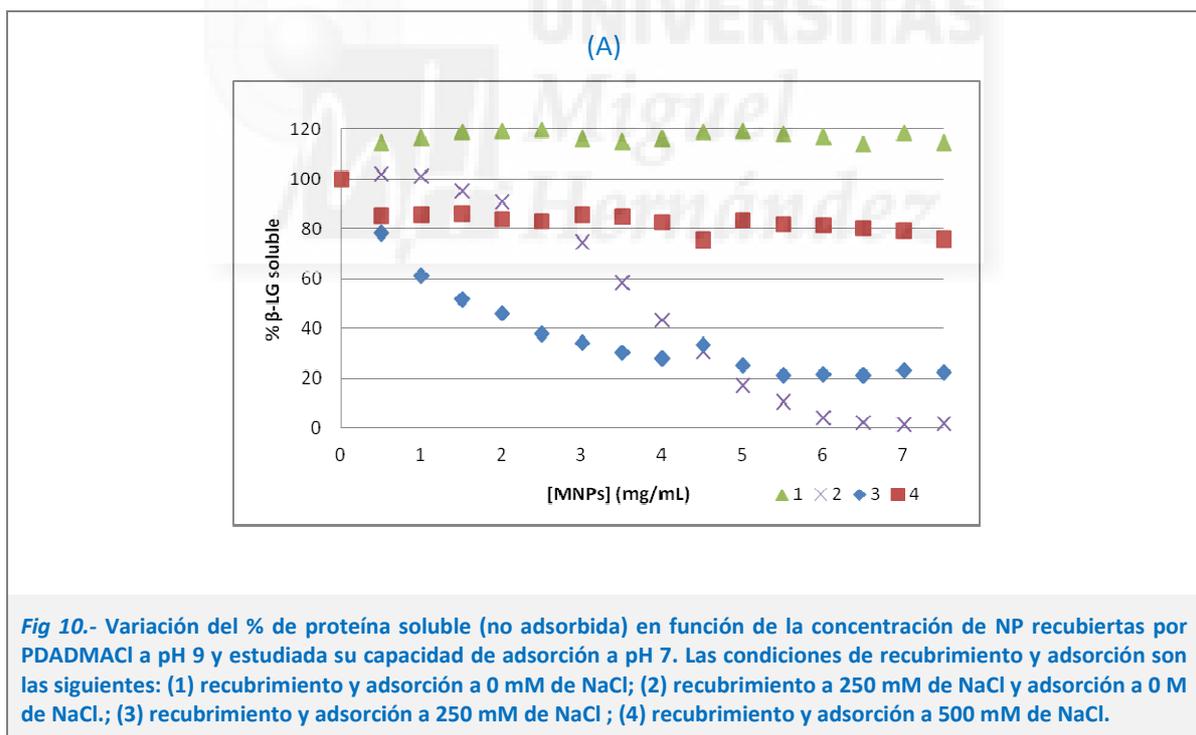
Condiciones de <u>recubrimiento</u> de las NP(-TEOS-PE)s	Condiciones de <u>adsorción</u> de la β -LG a las NP(-TEOS-PE)s	PE empleado para el recubrimiento de las partículas de sílice con núcleo de Fe_3O_4 .	% β -LG soluble (% β -LG adsorbida) [NPs]= 7,5 mg/ml
pH 7 y 0 mM	pH 7 y 0 mM	PDADMACI	100% (0%)
		PEI	100% (0%)
pH 7 y 250 mM	pH 7 y 0 mM	PDADMACI	6,4 % (93,6 %)
		PEI	92,3 % (7,7 %)
pH 7 y 0 mM	pH 7 y 250 mM	PDADMACI	22,1 % (77,9 %)
		PEI	37,6 % (62,4 %)

Por el contrario, cuando el recubrimiento de la superficie de sílice se realiza a fuerza iónica alta (250 mM NaCl), la unión del PE a la superficie no es estequiométrica, requiriéndose un exceso de PE para saturar todos los grupos silanoles deprotonados en la superficie de la partícula (Kukufuta & Takashashi, 1986). Aquellos monómeros de PE que no establecen contacto con la superficie de sílice quedan expuestos al disolvente convirtiéndose en adsorbentes potenciales de la proteína (cargada negativamente). Según se recoge en la Tabla 2, las partículas de sílice recubiertas por PDADMACI a 250 mM de NaCl, pH 7, son capaces de adsorber alrededor del 94 % de proteína inicialmente presente. Sin embargo, el efecto es mucho menos marcado para

aquellas recubiertas por PEI en las mismas condiciones, ya que únicamente son capaces de adsorber un 7 % de proteína (a la concentración de NP de 7,5 mg/mL).

Por último, cuando las partículas de sílice se recubren de PDADMACI a fuerza iónica baja y se estudia la adsorción en presencia de 250 mM de NaCl, se observa un aumento considerable de la capacidad de adsorción de la NP (78 %) que debe entenderse como un aumento en el número de monómeros de PE no unidos a la superficie de sílice y expuestos al disolvente. De forma análoga, cuando las partículas de sílice se recubren con PEI a fuerza iónica baja y se resuspenden en 250 mM de NaCl su capacidad de adsorción aumenta desde prácticamente cero hasta un 62 %. Estos resultados, indican un aumento en la densidad de carga de la partícula como consecuencia del aumento de la fuerza iónica del medio (desde cero hasta 250 mM) y apuntarían hacia la disociación parcial de algunos monómeros de la superficie de sílice y su posterior unión a la proteína.

Teniendo en cuenta que el punto isoeléctrico de las partículas de sílice es el de 2 - 3, su carga superficial aumenta monótonicamente a medida que el pH aumenta. Con objeto de comprobar si variaciones en el pH de la disolución provocan cambios en la densidad superficial de cargas de la partícula recubierta de PE, se realizaron experimentos en los que se obtuvieron partículas recubiertas con PDADMACI a pH 9 y se estudió su capacidad de adsorción cuando fueron resuspendidas a pH 7. Los resultados se muestran en la *figura 10* y se resumen en la Tabla 3.



Quando las partículas de sílice se recubren a pH 9 y baja fuerza iónica (la carga del sílice es máxima y se requiere una mayor cantidad de PE para recubrirla totalmente), y posteriormente se resuspenden a pH 7 y baja fuerza iónica, se obtiene que la adsorción de la proteína aumento ligeramente la capacidad de adsorción de la superficie de la partícula recubierta (alrededor del 5 % de proteína es adsorbida en presencia de 7,5 mg/mL de

partículas), comparada con la situación análoga estudiada a pH 7 (al recubrir a nula fuerza iónica el recubrimiento era estequiométrico y la capacidad de adsorción de proteína nulo).

Por su parte, cuando el recubrimiento se realiza a pH 9 y fuerza iónica alta (250 mM NaCl) se observa que la superficie de la partícula presenta una elevada densidad de carga como consecuencia del exceso de PE que es necesario para saturar la superficie de sílice en condiciones de alta fuerza iónica (Kukufuta & Takashashi, 1986). A este efecto (similar al detectado a pH 7) se le añade el incremento en el número de monómeros de PE expuestos al disolvente debido a la disminución del pH (desde 9 a 7) y la consiguiente disminución en la carga de la superficie de sílice. Ambos efectos justifican el enorme aumento en la capacidad de la partícula recubierta con PE para adsorber proteína (pasado del 5,0 % al recubrirse a 0 mM de NaCl hasta el 98,2 % cuando se recubre a 250 mM de sal).

Tabla 3.- Resumen de los resultados obtenidos al recubrir las NP con PDADMACI a pH 9 en distintas condiciones de fuerza iónica y estudiar su capacidad de adsorción a pH 7.

Condiciones de <u>recubrimiento</u> de las MNPs	Condiciones de <u>adsorción</u> de la β -LG a las MNPs	PE empleado para el recubrimiento de las partículas de sílice con núcleo de Fe_3O_4 .	% β -LG soluble (% β -LG adsorbida) [NPs]= 7,5 mg/ml
pH 9 y 0 mM	pH 7 y 0 mM	PDADMACI	95,0 % (5,0%)
pH 9 y 250 mM	pH 7 y 0 mM	PDADMACI	1,8 % (98,2 %)
pH 9 y 250 mM	pH 7 y 250 mM	PDADMACI	22,4 % (77,6 %)
pH 9 y 500 mM	pH 7 y 500 mM	PDADMACI	75,8 % (24,2 %)

La disminución en la capacidad de adsorción de las partículas recubiertas a pH 9 y alta fuerza iónica (250 mM NaCl) al ser analizada su adsorción a pH 7 y alta fuerza iónica, refleja el apantallamiento que la fuerza iónica ejercido sobre la atracción electrostática entre la superficie de la partícula cargada positivamente y la superficie de la β -lactoglobulina cargada negativamente (pasando del 98.2 % a un 77.6 %). Este mismo efecto apantallante es responsable de la ulterior disminución en la capacidad de adsorción de las partículas cuando se recubren a pH 9 y 500 mM de NaCl y se estudia su adsorción a pH 7 y 500 mM de sal (disminuyendo el % de proteína adsorbida hasta el 24,2 %).

La Tabla 4 recoge la variación en los parámetros espectroscópicos de los espectros de emisión de la β -LG soluble que queda en disolución tras eliminar las NPs magnéticas con las que estuvo incubada previamente. Se muestran los datos obtenidos a pH 7 y 9. Además de la disminución en la intensidad de fluorescencia con la concentración de NP presente (reflejo del incremento en el % de proteína adsorbida) se observa un ligero aumento tanto de la longitud de onda correspondiente al máximo del espectro de emisión, $\lambda_{m\acute{a}x}$ (de alrededor

de 334 a 337 nm, a pH 7) como de la energía promedio de la banda, $\langle\lambda\rangle$ (de 342.8 a 347,7 a pH 7). Este efecto es claramente más significativo a pH 7 que a pH 9. Es importante resaltar que a pH 7 la proteína está involucrada en un equilibrio dimérico en el que podrían formarse oligómeros de orden superior mientras que a pH 9 la proteína es monomérica.

Tabla 4.- Se ilustra el comportamiento del $\langle\lambda\rangle$, IF_{\max} y la λ_{\max} , recubriendo a diferente pH en las condiciones óptimas para la adsorción de la β -LG.

pH=7	0 mg/mL	0.5 mg/mL	1 mg/mL	1.5 mg/mL	2 mg/mL	2.5 mg/mL	3 mg/mL	3.5 mg/mL
$\langle\lambda\rangle$	342.8	342.6	342.5	342.7	342.8	342.4	342.5	342.4
IF_{\max}	876.2	877.1	959.9	965.1	965.8	778.7	732.6	783.5
λ_{\max}	334.0	334.5	333.1	336.0	342.5	332.0	335.5	335.5
	4 mg/mL	4.5 mg/mL	5 mg/mL	5.5 mg/mL	6 mg/mL	6.5 mg/mL	7 mg/mL	7.5 mg/mL
$\langle\lambda\rangle$	342.5	342.6	343.3	343.5	345.4	346.2	347.5	347.7
IF_{\max}	720.7	713.2	301.7	181.1	106.4	78.3	59.7	58.4
λ_{\max}	335.1	335.5	334.0	336.5	336.5	335.1	336.5	337.1
pH=9	0 mg/mL	0.5 mg/mL	1 mg/mL	1.5 mg/mL	2 mg/mL	2.5 mg/mL	3 mg/mL	3.5 mg/mL
$\langle\lambda\rangle$	342.4	342.4	342.4	342.5	342.6	343.1	342.9	343.2
IF_{\max}	864.7	880.5	876.2	828.4	793.1	729.7	661.4	532.8
λ_{\max}	333.5	335.5	336.0	336.0	332.5	335.1	334.0	334.0
	4 mg/mL	4.5 mg/mL	5 mg/mL	5.5 mg/mL	6 mg/mL	6.5 mg/mL	7 mg/mL	7.5 mg/mL
$\langle\lambda\rangle$	343.3	346.3	344.4	344.0	344.4	344.8	345.6	345.8
IF_{\max}	414.0	313.7	207.9	153.1	103.3	85.8	81.0	85.2
λ_{\max}	338.5	333.1	335.1	335.5	334.5	337.1	335.1	333.5

Estos resultados podrían indicar que la proteína que se mantiene en disolución en equilibrio con la proteína adsorbida presenta una mayor exposición de los residuos de triptófano al medio, lo que podría ser indicativo de un desplegamiento parcial de la estructura nativa de la proteína (quizás acoplado a la formación de estados oligoméricos de la proteína, ver más adelante).

2.1. CONTROL CINÉTICO

Para determinar el tiempo de incubación de la β -LG con las NPs se estudió la cinética de adsorción de la proteína a las NPs. Una única muestra de proteína se incubó en presencia de NPs. A tiempo definido, se retiró una alícuota, se decantó magnéticamente la muestra para separar las NPs y se obtuvo tanto el espectro de emisión de la proteína como la dependencia de la intensidad de fluorescencia de la proteína con la temperatura para determinar la T_m .

Los resultados muestran que la adsorción de la proteína a la superficie de la nanopartícula es lenta ya que tras 4 horas de incubación la dispersión no había alcanzado el equilibrio entre la proteína adsorbida y la fracción de ésta libre en disolución.

Tabla 5.- Variación de algunos parámetros ($\lambda_{m\acute{a}x}$, T_m y δT) del espectro de emisión de la β -lactoglobulina con el tiempo.

Tiempo (min)	IF	$\lambda_{m\acute{a}x}$ (nm)	$\langle\lambda\rangle$ (nm)	T_m ($^{\circ}$ C)	δT
Control	697,65	337,07	343,72	82,5 \pm 0,2	4,6 \pm 0,2
30	634,87	336,00	342,48	82,7 \pm 0,9	5,0 \pm 0,5
60	619,97	337,07	343,13	80,1 \pm 1,5	5,9 \pm 0,9
90	496,26	336,00	342,91	82,1 \pm 2,0	6,1 \pm 1,0
120	460,57	337,07	342,64	87 \pm 5	8,8 \pm 1,6
150	596,84	337,07	343,68	84 \pm 3	5,2 \pm 1,1
180	459,59	335,07	343,34	80,3 \pm 2,0	4,8 \pm 1,5
210	364,82	337,53	343,45	82,5 \pm 1,4	5,9 \pm 1,1
240	305,13	337,07	343,60	81 \pm 40	20 \pm 30
1 día	234,24	337,53	344,03	--*	--*

Al contrario de lo mostrado en el apartado anterior no se observó ni un desplazamiento del máximo de emisión (337 nm) ni un cambio significativo en la T_m de las distintas fracciones analizadas ($T_m = 82 \pm 2$ $^{\circ}$ C). Sin embargo, es importante observar que el máximo de la banda de emisión (337 nm) es mayor que el observado para la proteína recién disuelta (fresca) que alcanza el valor de 334 nm. Aún más, este valor (337 nm) es similar al observado para las fracciones de proteína en equilibrio con concentraciones de NP elevadas (ver Tabla 4). Todo ello apunta que la proteína utilizada en este experimento podría haber alcanzado el estado oligomérico del que se habló con antelación. Nuestra experiencia de laboratorio demuestra que cuando la disolución de proteína envejece (incluso a 4 $^{\circ}$ C durante más de 1 – 2 días) su comportamiento espectroscópico cambia y se comporta como una especie en la que la especie mayoritaria es oligomérica (ver más adelante, Fig. 12).

3. ESTUDIOS CONFORMACIONALES Y DE ESTABILIDAD DE LA β -LG

3.1. COMPARACIÓN DE ESPECTROS A DIFERENTES CONCENTRACIONES

Con objeto de profundizar en la naturaleza del estado conformacional de la proteína soluble en equilibrio con las NPs, se estudió la dependencia con la concentración en las diferencias en el espectro de emisión normalizado para la proteína en disolución en presencia y ausencia de nanopartículas. Se partió de MNPs que habían sido recubiertas con PDADMACl en condiciones de fuerza iónica alta (Tampón borato 10mM pH=9 NaCl 250 mM) y resuspendidas en presencia de fuerza iónica alta (Tampón HEPES 10 mM pH=7 NaCl 250 mM) y se pusieron en contacto con diferentes concentraciones de proteína. Un aumento en la concentración proteica, permitirá que haya un exceso de proteína que habrá participado en el equilibrio adsorción/desorción, pudiendo comprobar si el contacto con la superficie de la NP acelera la generación de estados parcialmente plegados. Para comparar los espectros obtenidos, se normalizaron los datos de forma que se pudiera observar

si se desplaza el máximo de emisión de intensidad de fluorescencia. Tres concentraciones fueron analizadas: 15, 25 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, los resultados se muestran en la *figura 11*.

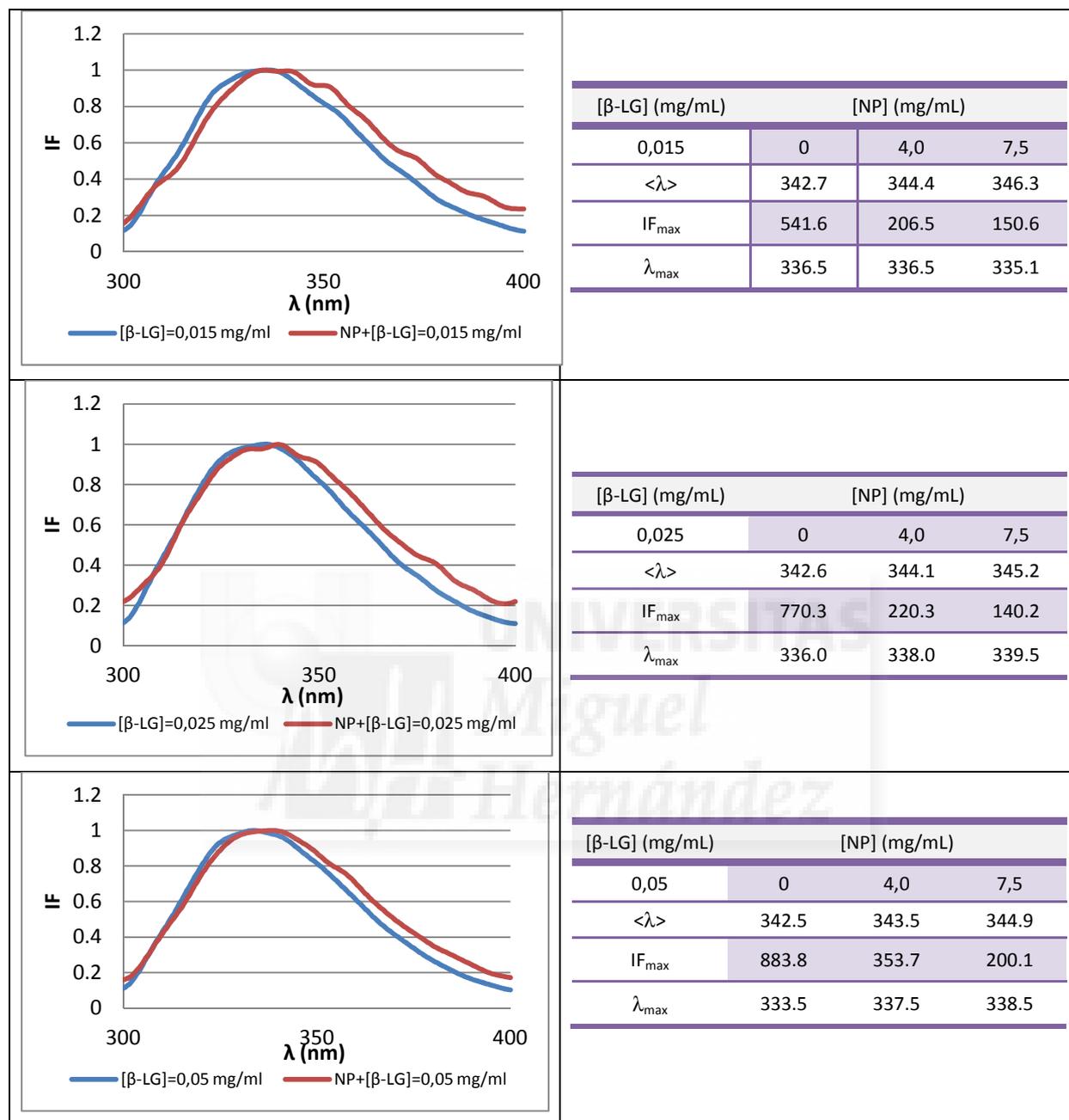


Figura 11.- Espectros de emisión de la β -LG a diferentes concentraciones, medidas a 0 mg/mL, 4mg/mL y 7,5 mg/mL de NPs(TEOS-PE).

El desplazamiento del máximo observado en los espectros normalizados, indica que los dos triptófanos de la β -LG están más expuestos al disolvente lo que argumentaría en favor de un desplegamiento parcial de la proteína aunque la posibilidad de la formación de un estado oligomérico no podría ser deshechado en este momento.

3.2. EFECTO DE LA TEMPERATURA VARIANDO LA FUERZA IÓNICA

La mayoría de las proteínas tienen una temperatura de fusión o desnaturalización (T_m) que es característica de un determinado pH y fuerza iónica, y en la cual el 50% de la proteína se encuentra desnaturalizada. Los resultados obtenidos (Tabla 6) en diferentes condiciones de fuerza iónica pretenden estudiar si una elevada fuerza iónica desencadena la formación de un estado parcialmente desplegado que podría desencadenar estados oligoméricos de orden superior. Los barridos de temperatura seleccionando una $\lambda=360$ nm para la emisión han mostrado los siguientes resultados:

	Condiciones	T_m	δT
Control 1	β -LG 0,025 mg/mL (HEPES 10 mM pH=7)	69,7 \pm 0,5	1,6 \pm 0,6
Proceso de adsorción de la β -LG a la superficie de MNPs.	Fuerza iónica baja (NaCl 0mM)	73,69 \pm 0,14	2,77 \pm 0,11
	Recubrimiento a fuerza iónica alta (NaCl 250mM) y resuspensión a fuerza iónica baja.	*	*
	Recubrimiento a fuerza iónica muy alta (NaCl 500mM) y resuspensión a fuerza iónica baja.	*	*
Control 2	β -LG 0,025 mg/mL (HEPES 10 mM pH=7, NaCl=250mM)	83,5 \pm 0,8	5,2 \pm 0,3
Proceso de adsorción de la β -LG a la superficie de MNPs.	Recubrimiento a fuerza iónica alta (NaCl 250mM) y resuspensión a fuerza iónica alta.	80,5 \pm 1,3	4,2 \pm 0,7
Control 3	β -LG 0,025 mg/mL (HEPES 10 mM pH=7, NaCl=500mM)	83,2 \pm 0,5	5,8 \pm 0,2
Proceso de adsorción de la β -LG a la superficie de MNPs.	Recubrimiento a fuerza iónica muy alta (NaCl 500mM) y resuspensión a fuerza iónica muy alta.	87,1 \pm 0,8	5,1 \pm 0,3

Tabla 6. Comparación de la T_m y δT a concentraciones crecientes de fuerza iónica y sus respectivos controles que no entran en contacto con las NPs.

*Se adsorbió la proteína a las MNPs por lo que no se observa la transición entre el estado nativo y el desnaturalizado.

Atendiendo al comportamiento de los controles parece claro que hay un incremento significativo de la T_m conforme se aumenta la fuerza iónica lo que podría estar de acuerdo con la formación de estados oligoméricos de la proteína que aumentan su estabilidad térmica debido a las interacciones que se establecen entre los monómeros de la proteína que se añaden a la estabilidad conformacional de estos últimos.

4. INFLUENCIA DEL TIEMPO DE ALMACENAJE DE LA β -LG.

Los agentes caotrópicos como el cloruro de guanidinio (GndCl) permiten solvatar las cadenas laterales más hidrófobas con mayor facilidad, por lo que conforme aumenta la concentración de desnaturizante, la T_m es menor. Los barridos de temperatura realizados a diferentes concentraciones de GndCl mostraron que la pendiente de β -LG incubada con y sin nanopartículas muestra un comportamiento similar, es decir, aumenta la pendiente de la recta con respecto a la β -LG control, lo que se traduce en que se produce la transición del estado nativo al desplegado por acción de la temperatura a una menor concentración de desnaturizante. Ver *figura 12*.

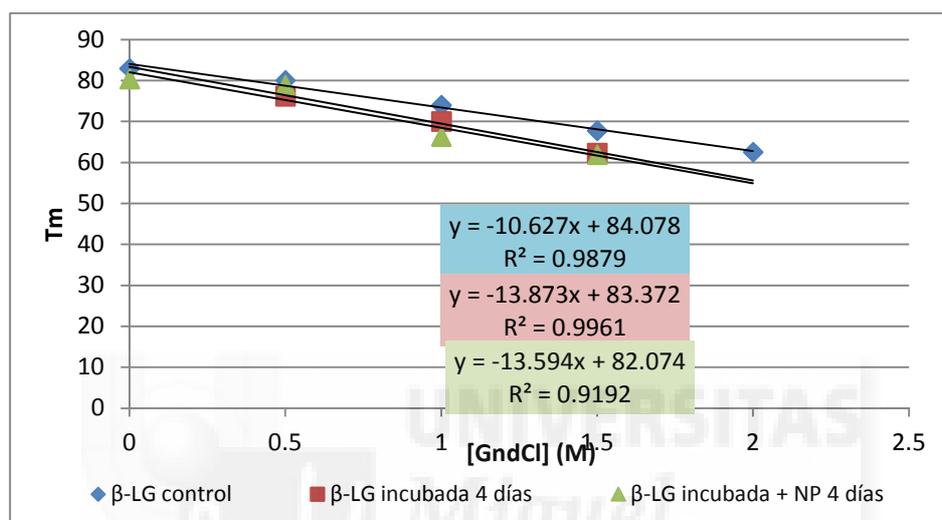


Fig.12. T_m obtenida a concentraciones crecientes de desnaturizante (Cloruro de guanidinio 8 M) de la β -LG en diferentes condiciones.

Es importante resaltar que la pendiente de la gráfica T_m vs. [desnaturizante] se ha observado que muestra cierta correlación con el tamaño de la unidad cooperativa que se despliega. En este sentido, la pendiente observada para la proteína nativa fresca (no incubada) resulta ser menor (en valor absoluto) que la observada para la proteína incubada (sola o en presencia de nanopartículas). Este resultado apunta hacia la posibilidad que la incubación de la proteína (sola o en presencia de NPs) suponga la formación de especies oligoméricas de (de mayor tamaño) y que podrían tener características similares independientemente de cómo se hubieran incubado.

Para confirmar que es el tiempo el parámetro que provoca algún tipo de cambio en la estructura de la proteína y no se debe a la superficie de la nanopartícula, se complementó este experimento con la técnica de dicroísmo circular. La banda de absorción de luz polarizada se muestra en la *Fig. 13*, siendo el pico observado a 215 nm es característico de la lámina β .

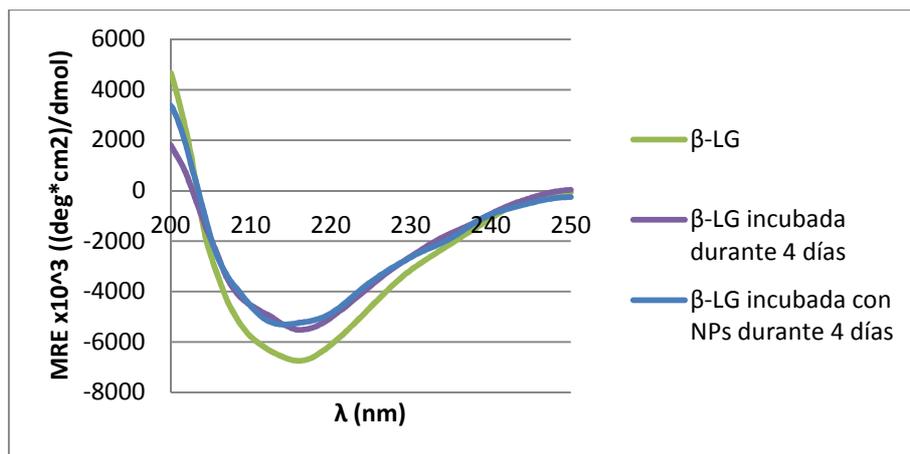


Fig. 13. Espectros normalizados de CD a $T^a=25\text{ }^\circ\text{C}$ de la β -LG bajo diferentes condiciones de incubación.

Los espectros de CD normalizados por la concentración, indican que la pérdida de estructura observada no se debe al contacto con la partícula, sino a tiempos de almacenamiento del stock de β -LG prolongados (aprox. 3-4 días).

5. DESORCIÓN DE LA β -LG POR CAMBIO DE pH

Llegados a este punto se induce la desorción de la proteína por un cambio de pH, tal y como ocurriría tras el paso del estómago al intestino en el organismo humano. Los datos obtenidos indican que tras el proceso de adsorción en las condiciones óptimas se detectó un 8,39% de β -LG que no se había adsorbido. Tras el lavado de las MNPs recubiertas con sílice y PDADMACI y la proteína adsorbida, se llevó a cabo el cambio de pH, añadiendo fórmico a pH=3 durante 10 minutos, obteniendo que un 74,82% de β -LG se recuperaba en el sobrenadante. En el siguiente gráfico se recogen los espectros de emisión:

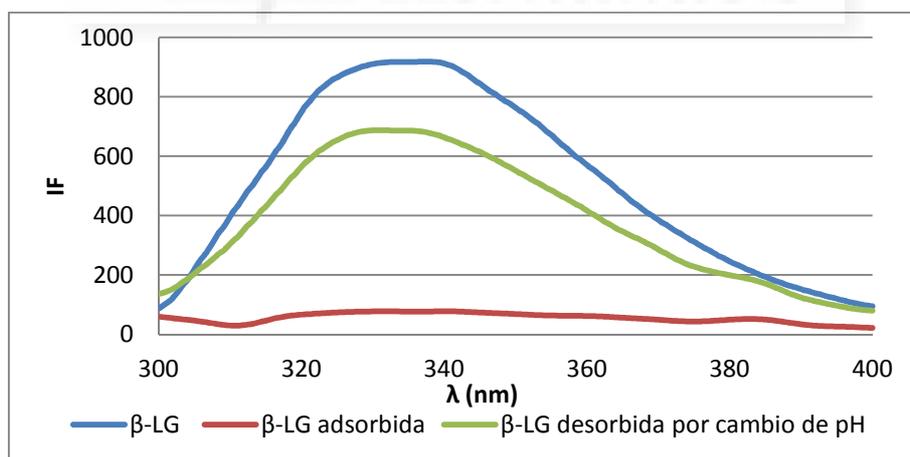


Fig. 14. Espectros de emisión de fluorescencia tras la adsorción y desorción de la β -LG por cambio de pH.

Se demuestra, por tanto, que el salto del pH desde 7 a 3 supone la desorción de la proteína como consecuencia del cambio en el signo de carga de la proteína que pasaría de estar cargada negativamente a pH 7 (mayor que su pI) y estar atraída por el recubrimiento de PDADMACI a soportar una carga total positiva a pH 3 (menor que su punto isoeléctrico) con la consiguiente aparición de la repulsión electrostática.

DISCUSIÓN

En primer lugar, es necesario aclarar que en el momento de la síntesis de las NPs su diámetro hidrodinámico fue de 90 nm. Para poder manipularlas por medio de un imán debemos flocularlas disminuyendo el pH del medio (pH ~ 7) lo que provoca que agreguen entre sí y aumenten su tamaño. Tras esto se realiza el recubrimiento con TEOS, donde se obtienen partículas mucho más grandes de las que previamente habíamos sintetizado (2 μ m).

1. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DEL PROCESO DE ADSORCIÓN.

Las primeras medidas de proteína adsorbida se monitorizaron por espectroscopía de ultravioleta, pero puesto que la concentración a medir debe estar en orden de los mg y el diámetro de las NPs está en el orden de los μ m, la variación de proteína adsorbida con respecto al control no mostró variaciones significativas. Sin embargo, la fluorescencia es mucho más sensible a los cambios en el medio del cromóforo que la absorbancia y por ello se continuo con esta técnica, permitiendo además bajar la concentración hasta el rango de los μ g, ya que la radiación fluorescente es directamente proporcional a la concentración de la especie absorbente solo a concentraciones muy bajas.

Los parámetros a variar en este apartado fueron el pH y la fuerza iónica, obteniendo finalmente que recubriendo con el PDADMACI a fuerza iónica alta (250 mM NaCl tanto a pH=9 como a pH=7) y resuspendiendo a baja fuerza iónica (0mM NaCl, pH=7) se alcanzaba una adsorción aproximadamente total a partir de una concentración de partículas de 6,5 mg/ml. El recubrimiento a fuerza iónica alta permite que se adsorba un exceso de polielectrolito, en este caso lineal, a la superficie de sílice, interaccionando uno de sus extremos con la MNP y el resto con los iones de la disolución. Se cree que una vez se baja la fuerza iónica, no se producen reordenamientos de la cadena del polielectrolito debido a las fuerzas repulsivas de las cadenas del PDADMACI y por tanto estas cargas positivas quedan libres para interaccionar con la proteína.

Se observa además que conforme aumentamos la fuerza iónica (de 250mM a 500mM) la adsorción es menor debido a que un aumento de ésta reduce la intensidad de las interacciones electrostáticas (atractivas o repulsivas) debido al apantallamiento de estas interacciones por los iones positivos y negativos presentes en la disolución, dificultando el proceso de adsorción. El recubrimiento a baja fuerza iónica y su posterior resuspensión a alta fuerza iónica permite que los iones de la disolución debiliten las interacciones electroestáticas que se habían establecido entre los grupos silanol y el PDADMACI, permitiendo adsorber parte de la β -LG, aunque no en su totalidad.

El recubrimiento a baja fuerza iónica tanto a pH=9 como a pH=7 y su posterior resuspensión en baja fuerza iónica a pH=7 no permite la adsorción de la β -LG, esto se debe a que el recubrimiento es demasiado efectivo, es decir, todas las cargas del polielectrolito catiónico están compensadas con los grupos silanol, cargados negativamente, por lo que la β -LG no puede interaccionar con la superficie y se detecta por completo en el sobrenadante de la dispersión.

Por otro lado, los resultados obtenidos empleando el polielectrolito ramificado, la PEI, no han determinado ninguna condición en la que la adsorción de la proteína fuera completa. Los experimentos a pH=9 no se realizaron con este polielectrolito, ya que al presentar un $pK_a=8.8$, su carga a este pH es nula y no va a poder interactuar electrostáticamente con la superficie de las MNPs. A pH=7 y por su cercanía a su pK_a , la densidad de carga positiva es baja, lo que explica que recubriendo a baja fuerza iónica y resuspendiendo a baja fuerza iónica o a alta fuerza iónica, no haya habido prácticamente adsorción a la MNPs. Si se observa un 60% de adsorción cuando se recubren las NPs de sílice con núcleo magnético a baja fuerza iónica y se resuspenden a alta fuerza iónica.

2. ESTUDIOS DE INTEGRIDAD DE LA β -LG A ELEVADA FUERZA IÓNICA.

Puesto que a elevada fuerza iónica, ciertas proteínas tienden a agregar debido a la disminución de la repulsión electrostática entre sus moléculas individuales afectando negativamente al balance entre la repulsión (electrostática) y la atracción hidrofóbica era necesario comprobar que la estabilidad conformacional de la proteína no se veía comprometida al producirse el equilibrio adsorción-desorción con la partícula.

Los barridos de temperatura demuestran que la T_m aumenta conforme se incrementa la fuerza iónica, pero no hay diferencias significativas con la proteína que sí ha entrado en contacto con la β -LG a diferentes concentraciones de fuerza iónica.

3. INFLUENCIA DE LA SUPERFICIE DE LAS MNPs SOBRE LA β -LG.

Es bien sabido que dependiendo de la estabilidad de la proteína con la que estemos trabajando tendremos que ser más estrictos o no a la hora de mantener unas condiciones específicas para su mantenimiento. Lo que un primer momento, nos dio a entender que estaba provocando la superficie de la MNP, resultó en una característica intrínseca de la proteína. La incubación de la proteína a 4 °C durante 3-4 días supuso la formación de un estado oligomérico de la misma con elevada estabilidad térmica. Sin embargo, este estado demuestra tener una menor elipticidad que el estado nativo lo cual argumentaría en favor de la pérdida de parte de la estructura secundaria de la proteína (despliegamiento parcial) y la formación de un estado oligomérico en el que los monómeros tienen una menor estabilidad conformacional. Por consiguiente, la mayor estabilidad térmica observada para este estado conformacional es debido a que el establecimiento de las interacciones cuaternarias entre los monómeros compensa la disminución en la estabilidad conformacional de los monómeros.

Los experimentos por dos técnicas espectroscópicas diferentes, la fluorescencia y el dicroísmo circular, han permitido concluir que el almacenamiento prolongado del stock de β -LG (HEPES 10 mM pH=7) iba desencadenando una serie de cambios en su estructura y una disminución en su concentración.

En primer lugar esta disminución aparente de la concentración parece indicar que se debe a que el contacto de la β -LG con superficies sólidas no biológicas (vidrio, plástico etc.) conlleva una interacción con dicha superficies. Las proteínas son co-polímeros que contienen diferentes aminoácidos de hidrofobicidad variable, por lo que se comportan de manera anfifílica, otorgándoles una gran superficie activa, siendo muy probable que se de este proceso de adsorción. Además hay que tomar en cuenta que esta adsorción puede

afectar a la estabilidad estructural de la proteína, viéndose afectada por la T^º, pH, fuerza iónica o el tampón utilizado e influyendo parámetros de la superficie como puede ser la curvatura, morfología, polaridad y carga.

4. LIBERACIÓN DE LA β -LG POR CAMBIO DE PH.

Una vez se han tomado como válidas las condiciones en las que se recubre a elevada fuerza iónica (250mM NaCl) y se resuspende a baja fuerza iónica con el PDADMACI. Se comprobó que el cambio de pH permite la liberación de la proteína. Sin embargo hay que tener en cuenta que en el organismo humano el cambio sería el inverso, es decir, el pH de partida sería el pH ácido estomacal (aprox. pH=3) y al llegar al intestino cambiaría a el pH fisiológico, 7,35, por lo que la carga de la proteína cambiaría y habría que seleccionar un polielectrolito aniónico.



CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA

- Tras la síntesis de las NPs se logró su estabilización coloidal, empleando el ácido oleico como surfactante, formando una doble capa lipídica.
- Se concluye que el PE fuerte (PDADMACI) es el mejor PE para interactuar electrostáticamente con la β -LG.
- Una vez las nanopartículas de magnetita fueron recubiertas con sílice y posteriormente con el PDADMACI se determinó que las condiciones óptimas para la adsorción de la β -LG son aquellas en las que se recubre con el polímero a fuerza iónica alta y se resuspende a baja fuerza iónica.
- Para el caso de la β -LG el tiempo de almacenamiento es un parámetro muy decisivo, ya que los resultados indican que parte de la proteína podría estar interactuando con la superficie de los tubos donde se mantiene a 4°C.
- Para confirmar que es el tiempo el parámetro que provoca algún tipo de cambio en la estructura de la proteína y no se debe a la superficie de la NP, se complementó este experimento con la técnica de dicroísmo circular. Los espectros de CD normalizados por la concentración, indican que la pérdida de estructura observada no se debe al contacto con la partícula, sino a tiempo de almacenamiento del stock de β -LG prolongados (aprox. 3-4 días).
- Para finalizar el proceso de encapsulación sería necesario una vez la proteína esta adsorbida, depositar otra capa de polielectrolito para proteger a la proteína de las proteasas del estómago. Dependiendo de la densidad de carga de la NP(-TEOS-PE) con la β -LG adsorbida, los posibles polímeros propuestos podrían tener carga positiva a como el polímero fuerte, PDADMACI o carga negativa como el poliestireno sulfónico (PSS), si bien estos resultados aún no han sido obtenidos. Una vez el recubrimiento ha sido efectivo se tendrá que estudiar la liberación e integridad de la proteína por el cambio de pH.
- Una vez optimizado el procedimiento se debería continuar el estudio con la insulina y estudiar su integridad y los PE que funcionan mejor.

BIBLIOGRAFÍA

- Borkovec, M. & Papastavrou, G. (2008). Interactions between solid surfaces with adsorbed polyelectrolytes of opposite charge. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 13, 429-437.
- Burgos, I., Dassie, S. A., Villareal, M. A. & Fidelio, G. D. (2011). Thermodynamic and structural analysis of homodimeric proteins: Model of β -lactoglobulin. *Biochimica et Biophysica Acta* 1824, 383-391.
- Che, H. X., Yeap, S. P., Ahmad, A. L. & Lim, J. (2014). Layer-by-layer assembly of iron oxide magnetic nanoparticles decorated silica colloid for water remediation. *Chemical Engineering Journal* 243, 68-78.
- Coelho, J. F., Ferreira, P. C., Alves, P., Cordeiro, R., Fonseca, A. C., Góis, J. R. & Gil, M. H. (2010). Drug delivery systems: Advanced technologies potentially applicable in personalized treatments. *EPMA Journal* 1, 164-209.
- Deng, Y.H., Wang, C.C., Hu, J.H., Yang, W.L. & Fu, S.K. (2005). Investigation of formation of silica-coated magnetite nanoparticles via sol-gel approach. *Colloids and Surfaces* 262, 87-93.
- DLS technical note MRK656-01 (Malvern Instruments). Dynamic Light Scattering: An Introduction in 30 Minutes.
- Fonte, P., Araújo, F., Reis S. & Sarmiento, B. (2013). Oral Insulin Delivery: How Far Are We?. *Journal of Diabetes Science and Technology*. Vol. 7, 520-531.
- Gómez-Moreno, C., Sancho, J. (2003). Caracterización preliminar de la conformación proteica, pp. 151 Ariel S. A. (Ed.), Estructura de proteínas, Barcelona.
- Issa, B., Obaidat, I. M., Albiss, B. A. & Haik, Y. (2013). Magnetic nanoparticles: Surface Effects and Properties Related to Biomedicine Applications. *International Journal of Molecular Sciences* 14, 21266-21305.
- Jiang, B., Barnett, J. & Li, B. (2009). Advances in polyelectrolyte multilayer nanofilms as tunable drug delivery systems. *Nanotechnology, Science and Applications* 2, 21-27.
- Johnson, P. & Whateley, T. L. (1981). The effects of surface and macromolecular interactions on the kinetics of inactivation of trypsin and α -chymotrypsin. *Biochemical Journal* 193, 285-294.
- Koetz, J., K. S. (2007). Introduction and Objective, in *Polyelectrolytes and Nanoparticles*, Springer, Verlag Berlin Heidelberg.
- Kokufuta, E. & Takahashi, K. (1986). Adsorption of poly(diallyldimethylammonium chloride) on colloid silica from water and salt solution. *Macromolecules* 19, 351-354.
- Linse, S., Cabaleiro-Lago, C., Xue, W. F., Lynch, I., Lindman, S., Thulin, E., Radford, S. E., & Dawson, K. A. (2007). Nucleation of protein fibrillation by nanoparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 8691-8696.

- López-López, M.T., Durán, J.D.G., Delgado, A.V. & González-Caballero, F. (2005). Stability and magnetic characterization of oleate-covered magnetite ferrofluids in different nonpolar carriers. *Journal of Colloid and Interface Science* 291, 144-151.
- Lu, A. H., Salabas, E. L. & Schüth, F. (2007). Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application. *Angewandte Chemie* 46, 1222-1244.
- Ma, Y., Dong, J., Bhattacharjee, S., Wijeratne, S., Bruening, M. L. & Baker, G. L. (2013). Increased Protein Sorption in Poly(acrylic acid)-Containing Films Through Incorporation of Comb-like Polymers and Film adsorption at Low pH and High Ionic Strength. *Langmuir* 29, 2946-2954.
- Meetoo, D., McGovern, P., Safadi, R. (2007). An epidemiological overview of diabetes across the word. *British Journal of Nursing* 16, 1002-7.
- Miriani, M., Eberini, I., iametti, S., Ferranti, P., Sensi, C. & Bonomi, F. (2013). Unfolding of beta-lactoglobulin on the surface of polystyrene nanoparticles: Experimental and computational approaches. *Proteins* 82, 1272-1282.
- Nakanishi, K., Sakiyama, T. & Imamura, K. (2001). On the Adsorption of Proteins on Solid Surfaces, a Common but Very Complicated Phenomenon. *Journal of bioscience and bioengineering* 91, 233-244.
- Olsen, D. E. (1990). Espectroscopía ultravioleta y visible. Reverté (Ed.) Métodos ópticos y de análisis.
- Owens III, D. E., Peppas, N. A. (2005). Oponization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *International Journal of pharmaceutics* 307, 93-102.
- Shang, W., Nuffer, J. H., Dordick, J. S., & Siegel, R. W. (2007). Unfolding of Ribonuclease A on Silica Nanoparticles Surfaces. *Nano Lett.* 7, 1991-1995.
- Shishesbore, M. R., Afkhami, A. & Bagheri, H. (2011). Salicylic acid functionalized silica-coated magnetite nanoparticles for solid phase extraction and preconcentration of some heavy metal ions from various real samples. *Chemistry Central Journal* 5-41.
- Song, L., Zhi, Z-L. & Pickup, J. C. (2014). Nanolayer encapsulation of insulin-chitosan complexes improves efficiency of oral insulin delivery. *International Journal of Nanomedicine* 9, 2127-2136.
- Stober, W., Fink, A. & Bohn, E. (1968). Controlled Growth of Monodisperse Silica Spheres in the Micron Size Range. *Journal of Colloid and Interface Science* 26, 62-69.
- Winuprasith, T., Suphantharika, M., McClements, D. J. & He, L. (2013). Spectroscopic studies of conformational changes of β -lactoglobulin adsorbed on gold nanoparticle surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science* 416, 184-189.
- Yoshida, K., Sato, K. & Anzai, J. (2009). Layer-by-layer polyelectrolyte films containing insulin for pH-triggered release. *Journal of Materials Chemistry* 20, 1546-1552.