

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE
INSTITUTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR
ÁREA DE QUÍMICA FÍSICA



**OPTIMIZACIÓN DEL RECUBRIMIENTO DE
NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS CON
POLIELECTROLITOS PARA SU USO COMO
TRANSPORTADORES MOLECULARES**

Facultad de Ciencias Experimentales

Grado de Biotecnología

Trabajo de fin de grado presentado por José David Fernández Palacios

Dirigido por el Dr. Francisco Javier Gómez Pérez

Co-dirigido por D. Felipe Hornos Adán

Índice

Resumen/Abstract	2
Introducción	4
Breve incursión en las nanopartículas (NPs) magnéticas.....	4
Lisozima (LZM) y Dextrano sulfato (DS), como proteína y polielectrolito modelo, respectivamente	6
Isotermas de Langmuir.....	9
Antecedentes y objetivos.....	11
Materiales y métodos	12
Síntesis de las nanopartículas de Fe_3O_4	12
Recubrimiento de la magnetita con ácido oleico:.....	12
Funcionalizar la magnetita con un polielectrolito, el Dextrano Sulfato (DS)	14
Adsorción con lisozima (LZM).....	15
Caracterización de las NPs	16
Medida de la concentración libre (no adsorbida) de LZM	16
Medida de la concentración de las NPs	17
Resultados	19
Adsorción de LZM sobre NPs.....	19
Reordenamiento de los grupos sulfato en presencia de sal	20
Aumento en la exposición de grupos sulfato vs efecto apantallante	22
Condiciones de máxima adsorción.....	24
Discusión	26
Conclusiones y perspectivas futuras	29
Referencias.....	30

Resumen

En este trabajo fin de grado se ha realizado un estudio de la adsorción de lisozima sobre nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4) recubiertas con el polielectrolito dextrano sulfato. El proceso de adsorción ha sido estudiado en función de la fuerza iónica con objeto de determinar las condiciones que permitan regular la capacidad de la partícula recubierta para adsorber biomoléculas. Los resultados han sido modelados en términos de la isoterma de Langmuir determinando los dos parámetros fundamentales: la capacidad específica máxima de adsorción por parte de la nanopartícula $q_{m\acute{a}x}$, y la constante de adsorción de la biomolécula a la superficie de la nanopartícula derivatizada, K . Las conclusiones de este trabajo permiten diseñar nanopartículas magnéticas con funcionalidades definidas (tipo de recubrimiento, densidad de carga, etc.) que pueden ser utilizadas para vehiculizar biomoléculas. El hecho que las nanopartículas diseñadas sean magnéticas permite su localización y acumulación espacial mediante el uso de un campo magnético externo con el fin de reducir la cantidad de biomolécula necesaria para alcanzar una concentración local dada, reduciendo así, por ejemplo, los efectos secundarios derivados de la toxicidad de ciertos tratamientos farmacológicos.

Palabras clave:

nanopartículas, polielectrolito, lisozima, fuerza iónica, adsorción, $q_{m\acute{a}x}$, K

Abstract

In this Final Year Project a study of the adsorption of lysozyme on nanoparticles of magnetite (Fe_3O_4) coated with the dextran sulfate polyelectrolyte has been carried out. The adsorption process was studied as a function of ionic strength to determine the conditions that allow the regulation of the capacity of the coated particle to adsorb biomolecules. The results have been modeled in terms of the Langmuir isotherm determining the two fundamental parameters: the maximum specific adsorption capacity by the nanoparticle, $q_{m\acute{a}x}$, and the adsorption constant of the biomolecule to the surface of the derivatized nanoparticle, K . The conclusions of this study allow to design magnetic nanoparticles with defined features (type of coating, charge density, etc.) that can be used to drive biomolecules. The fact that the designed nanoparticles are magnetic allows its location and spatial accumulation by using an external magnetic field in order to reduce the amount of a necessary biomolecule required to reach a local

concentration given, thus reducing, for example, the toxic side effects of certain drug therapies.

Key words:

nanoparticles, polyelectrolyte, lysozyme, ionic strength, adsorption, $q_{máx}$, K



Introducción

Breve incursión en las nanopartículas (NPs) magnéticas

La nanociencia es uno de los campos más prometedores actualmente en la ciencia. La nanotecnología está empezando a permitir a científicos, ingenieros, químicos y médicos trabajar en los niveles moleculares y celulares para producir importantes avances en las ciencias de la vida y la salud. El uso de nanopartículas [NPs] ofrece importantes ventajas debido a su tamaño único y sus propiedades fisicoquímicas.

En el caso de las NPs magnéticas, la reducción de tamaño trae consigo un cambio en el comportamiento magnético del material, ya que pasa de ser ferro o ferrimagnético a superparamagnético, donde, en ausencia de un campo magnético externo, el momento magnético de cada partícula fluctúa de dirección siendo el momento magnético neto igual a cero (figura 1) [1]. La presencia de un campo magnético externo es capaz de magnetizar las NPs, que presentan una rápida respuesta alineando los momentos magnéticos de las NP en la dirección del campo [2].

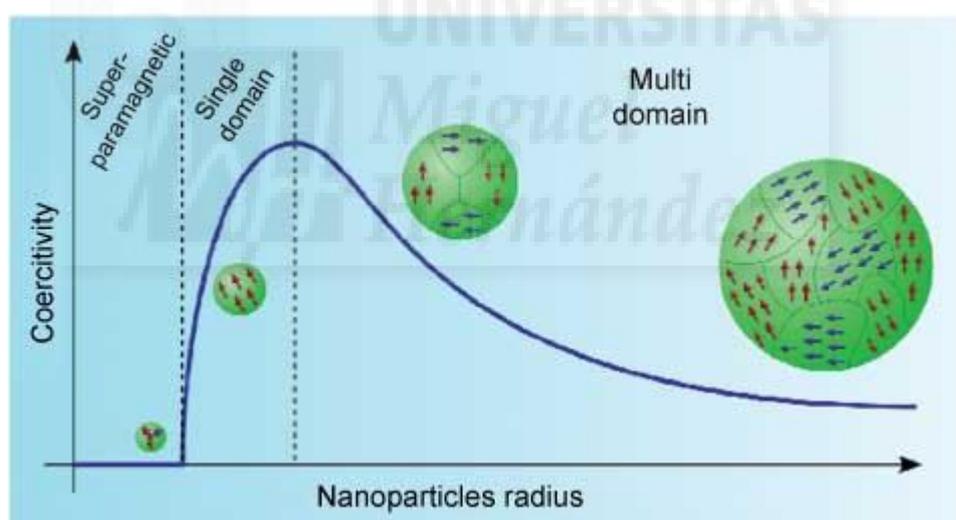


Fig. 1.- Relación de la aparición de superparamagnetismo con el tamaño de la nano partícula. Imagen extradida de [3]

La composición del núcleo magnético depende de la aplicación que se le vaya a dar a la isma. Por ejemplo, la magnetita, Fe_3O_4 , y la maghemita, Fe_2O_3 , que presentan alta estabilidad oxidativa, son actualmente los únicos materiales magnéticos no tóxicos aceptados para aplicaciones médicas [3,4]. Los núcleos magnéticos que consisten en materiales tales como cobalto, níquel, y neodimio-hierro-boro puede ofrecer mejores propiedades magnéticas, sin

embargo, estos materiales pueden ser susceptibles a la oxidación o ser tóxicos para su uso en el cuerpo humano [5].

También es destacable la gran capacidad que tienen las NPs para ser funcionalizadas con diferentes compuestos, dependiendo de la diana que se desee vehicular. Existen numerosos artículos en los que se describe la funcionalización de NPs de magnetita (Fe_3O_4) con distintos compuestos capaces de unir distintas dianas. El caso del recubrimiento de magnetita con sílice está muy bien documentado [7,8,9], así como su posterior funcionalización con otros compuestos para diversos fines [10,11,12].

De esta forma, las NPs poseen propiedades magnéticas que pueden ofrecer grandes ventajas, ya que pueden proporcionar una unión selectiva a una molécula funcional, conferir propiedades magnéticas a la diana, y permitir su manipulación y transporte a una localización deseada a través del control de un campo magnético producido por un imán[6], lo que resulta de gran utilidad para numerosas aplicaciones de diversa índole, como pueden ser el tratamiento contra el cáncer, ya sea mediante tratamientos hipertérmicos o como transportador de fármacos antitumorales [13,14]; aplicaciones medioambientales, como vehículo de biorremediación; o aplicaciones analíticas, como su utilización en técnicas de fluorescencia [13].

Un problema inevitable asociado con las partículas en este rango de tamaño (nanómetros) es su inestabilidad durante largos períodos de tiempo. Estas NPs tienden a formar aglomerados para reducir la energía asociada con el gran área superficial que presentan en relación a su volumen. Además, las NPs desnudas son químicamente muy activas, y son fácilmente oxidadas en el aire, lo que resulta en una pérdida del magnetismo. Para muchas aplicaciones, incluida la que atañe a este trabajo, es crucial desarrollar estrategias de protección para estabilizarlas químicamente contra la degradación durante o después de la síntesis [15,16,17]. El ácido oleico es un surfactante que recubre y protege a las NPs de la oxidación y además evita la tendencia de estas a formar agregados en disolución.

Las NPs de magnetita tienen un punto isoeléctrico (pI) alrededor de 6,5, por lo que jugando con el pH se puede modificar su carga superficial, que será negativa para valores superiores al pI y positiva para los inferiores a 6,5 [19](figura 2). Así, dependiendo del pH en el que se trabaje se pueden obtener NPs fuertemente cargadas si se trabaja con ellas a pH cercanos a los extremos en la escala de pH. Esto resulta de especial interés a la hora de funcionalizar las NPs con cualquier tipo de compuesto, ya que son susceptibles de unirse electrostáticamente a otras moléculas cargadas.

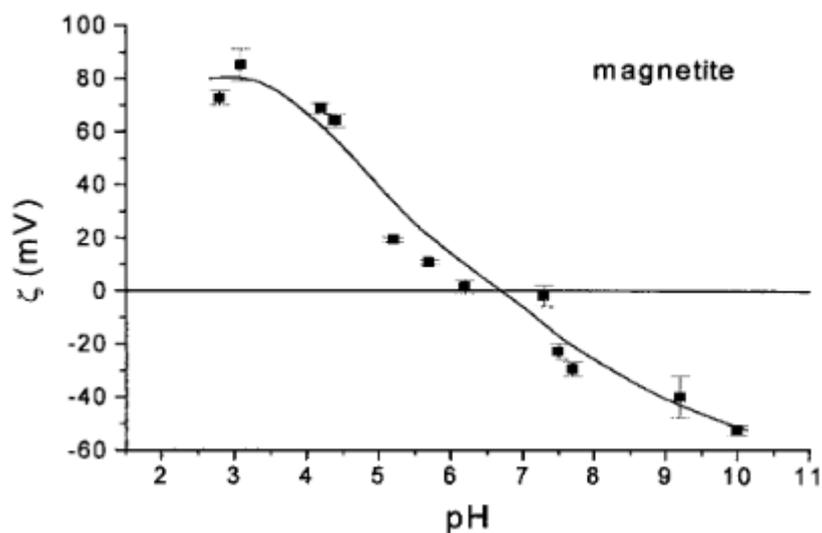


Figura 2. Variación del potencial Z (ζ) de la magnetita con el pH, situándose el punto isoeléctrico de la misma en torno a 6,5. Figura obtenida de [19]

Lisozima (LZM) y Dextrano sulfato (DS), como proteína y polielectrolito modelo, respectivamente

Este trabajo se centra en las NPs de magnetita como transportadores magnéticos de una proteína modelo, la lisozima (LZM), cuando se recubre con un polielectrolito, utilizando el dextrano sulfato (DS) como modelo.

Las lisozimas se definen como 1-4- β -N.-acetilmuramidasa, es decir, enzimas que son capaces de hidrolizar el enlace entre el carbono 1 del ácido N-acetilmurámico y el carbono 4 de la N-acetilglucosamina del peptidoglicano bacteriano. Las LZMs son enzimas presentes en muy diversas especies, e históricamente han presentado un interés especial: la lisozima de clara de huevo fue la primera proteína en ser secuenciada y que tenía los veinte aminoácidos usuales. Puesto que además se conocen las secuencias de aminoácidos de una gran variedad de estas enzimas, las LZMs constituyen un sistema modelo desde los puntos de vista estructural, funcional y evolutivo [18]. La lisozima es una de las proteínas mejor caracterizada tanto estructural como funcionalmente. Se trata de una proteína de muy alta estabilidad conformacional y estable en un amplio rango de pH (desde pH 2 a pH 13). Parte de su elevada estabilidad viene derivada de la existencia de cuatro puentes disulfuro que involucran a sus ocho aminoácidos de cisteína.

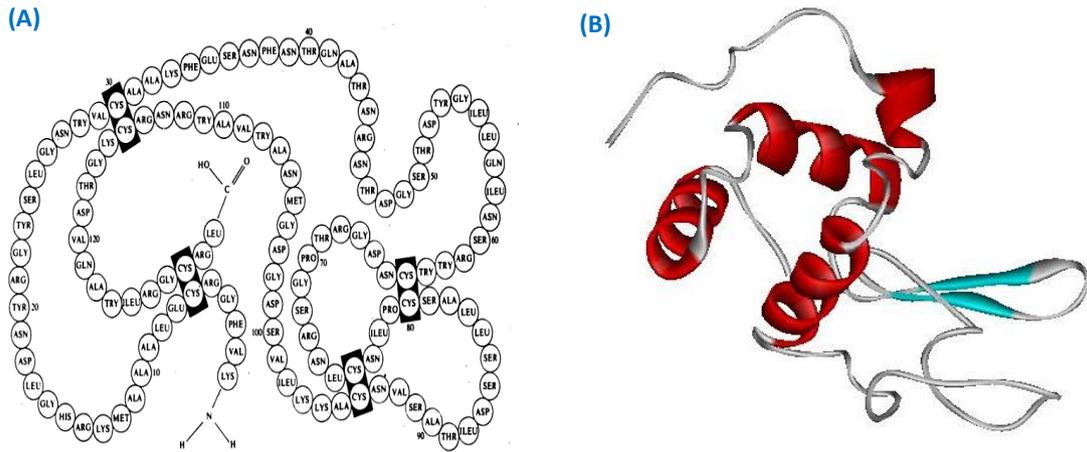


Figura 3. (A) Secuencia aminoacídica de la Lisozima [20] donde se observan los cuatro puentes disulfuro. (B) Representación de la estructura tridimensional de la lisozima.

La LZM es una proteína básica, debido al gran número de aminoácidos básicos que presenta su estructura primaria (figura 3), por lo que presenta un punto isoeléctrico realmente alto, en torno a 11 [19]. Esto resulta de gran interés para el propósito del trabajo, ya que se al trabajar con esta proteína a pH bajo tendrá una carga mayoritariamente positiva, por lo que presentará una gran afinidad por las cargas negativas. A partir de la estructura primaria de la proteína, tomando los valores de pKa de los grupos ionizables (Asp, Glu, His, Cys, Arg, Lys, Tyr) es posible calcular la carga total de la proteína en función del pH. Como se observa en la Fig. 4, la carga positiva de la proteína aumenta monotónicamente al disminuir el pH por debajo de su pI alcanzando un valor de 17,2 a pH 3.

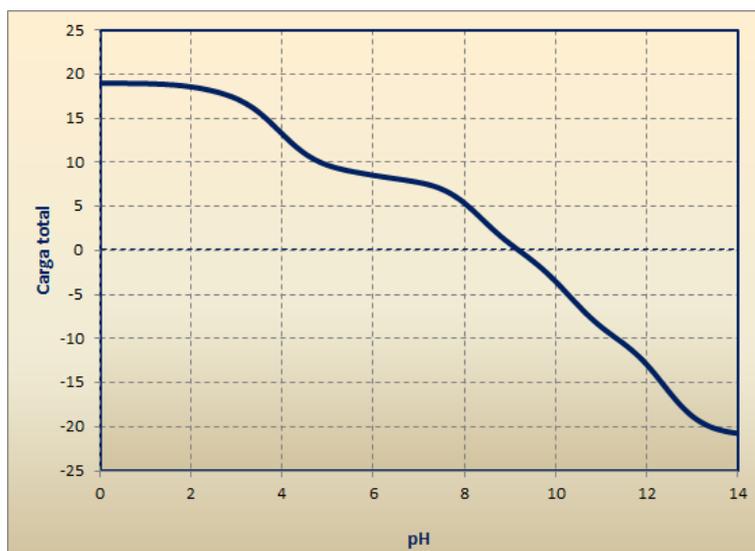


Figura 4. Variación de la carga total de la lisozima con el pH

El dextrano sulfato (DS) es un derivado polianiónico del dextrano (un polímero de glucosa) que se obtiene mediante sulfatación del mismo. Se suele suministrar como una sal de sodio en forma de polvo blanco y es muy soluble en agua y soluciones salinas hasta 100 mg/mL. Además, el DS contiene aproximadamente un 17% de azufre, lo que equivale aproximadamente a 2,3 grupos sulfato por resto glucosídico (figura 5). Por tanto, se trata de un polielectrolito fuerte ya que la densidad de carga permanece constante en todo el rango de pH ya que el grupo ionizable ($R-O-SO_3^-$) tiene un pKa menor de 1.

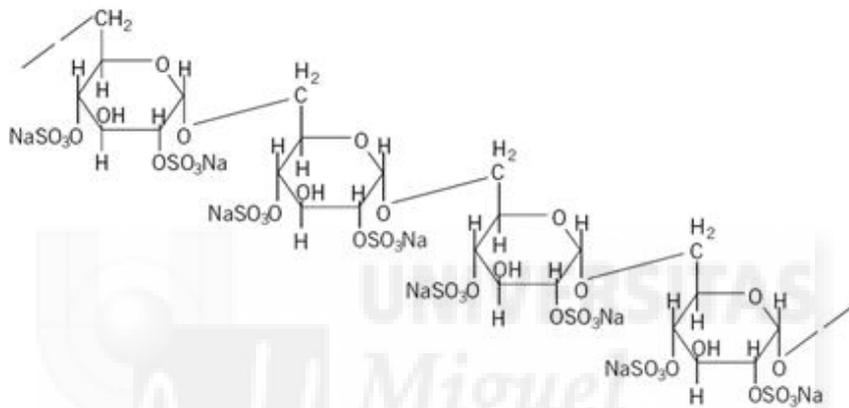


Fig. 5.- Polielectrolito DS utilizado en el recubrimiento de las NPs. Contiene, en promedio 2,3, grupos sulfato por cada monómero de glucosa.

Una de las características deseables de este compuesto es justo la gran cantidad de grupos sulfato que presenta, ya que esto le permite unirse electrostáticamente tanto a la NP como a la LZM, haciendo de unión entre diana (la proteína) y vehículo (la nanopartícula). Su elevada carga superficial negativa permite al DS adsorberse de forma efectiva a las partículas de magnetita (cargadas positivamente para valores de pH menores de 6,5). El recubrimiento de las nanopartículas de magnetita por el DS resulta ser extremadamente efectivo no solamente debido a la fuerte atracción electrostática que se establece entre la superficie y el polielectrolito sino también por la fuerte tendencia de los grupos sulfato del DS para quelar iones divalentes.

Las partículas de magnetita así obtenidas tendrán una elevada densidad de carga negativa que las harán susceptibles de unir diversas biomoléculas que al pH de trabajo se encuentren cargadas positivamente. Por tanto, parece razonable suponer que las partículas de magnetita recubiertas de DS serán capaces de unir LZM mediante atracción electrostática.

Isotermas de Langmuir

El fenómeno de adsorción de moléculas de distinto tamaño a superficies sólidas de muy distinto tipo (hidrofóbicas, hidrofílicas, etc.) ha sido un área de enorme interés durante el pasado siglo XX. En la actualidad, existe un renovado interés por este tipo de interacciones desde una perspectiva biotecnológica por las implicaciones que tiene la adsorción de biomoléculas (proteínas, ácidos nucleicos, fármacos, etc.) a superficies de vidrio o de plástico.

De entre los muchos tratamientos propuestos es seguramente el planteado por Langmuir [27] el más utilizado, seguramente porque modela el proceso de adsorción de forma más sencilla. La isoterma de Langmuir correlaciona la cantidad de adsorbato (molécula que se adsorbe) por unidad de masa de adsorbente (material sobre el que se produce la adsorción) en función de la concentración de adsorbato (ligando) libre. En el caso de la adsorción de una proteína, P (como es el caso de la LZM) a la superficie de una NP, la isoterma de adsorción tomaría la forma siguiente [21,22]:

$$q = \frac{q_{m\acute{a}x} \cdot K[P]}{1 + K[P]}$$

Donde q representa la cantidad de proteína adsorbida (en mg) por g de NP (adsorbente), $[P]$ indica la concentración (mg/mL) de proteína libre (no adsorbida) en equilibrio con la superficie, $q_{m\acute{a}x}$ la cantidad máxima de proteína que puede adsorber 1 g de NP y K es la constante del equilibrio de adsorción. Cuanto mayor es el valor de K tanto más desplazado estará el equilibrio de adsorción hacia la derecha (adsorción). Como toda constante de equilibrio, K es el cociente de las constantes cinéticas de adsorción y desorción:

$$K = \frac{k_{asociaci\acute{o}n}}{k_{disociaci\acute{o}n}}$$

La isoterma de Langmuir suele presentarse de forma linealizada

$$\frac{1}{q} = \frac{1}{q_{m\acute{a}x} \cdot K} \cdot \frac{1}{[P]} + \frac{1}{q_{m\acute{a}x}}$$

Por lo que al representar $1/q$ frente a $1/[P]$ se obtiene una línea recta:

$$y = a \cdot x + b$$

Como se puede observar, la ordenada en el origen de la recta nos daría el valor de $q_{m\acute{a}x}$, y la pendiente de la misma el valor de K . De esta forma, y a partir de los datos experimentales, se puede obtener un ajuste de la isoterma con los valores obtenidos de $q_{m\acute{a}x}$ y K , lo cual permite un tratamiento cuantitativo a la hora de hacer comparaciones entre isotermas.

Dado que tanto la adsorción del DS a la superficie de la NP como la posterior adsorción de la LZM a las NP magnéticas recubiertas con DS tienen un componente electrostático mayoritario, un parámetro fundamental en este tipo de interacciones será la fuerza iónica del medio (μ). Así, la atracción electrostática entre la LZM (cargada positivamente a pH 3) y los grupos sulfato de la superficie de la partícula derivatizada (figura 6) sería apantallada a medida que aumenta la fuerza iónica. En efecto, el aumento de la concentración de los cationes y aniones que forman parte de la disolución en la que se establece el proceso de adsorción tendrá como efecto neto la disminución de la fuerza electrostática atractiva entre la superficie (cargada negativamente) y la proteína (cargada positivamente).

De forma análoga, el aumento de la fuerza iónica debilitará la atracción electrostática entre el DS (cargado negativamente) y la superficie de la nanopartícula de magnetita (cargada positivamente a pH 3).

Por tanto, podemos adelantar que la fuerza iónica del medio tendrá un efecto modulador de la intensidad de la adsorción lo que se traducirá en una disminución en la constante de adsorción, K , con la fuerza iónica. En principio, este efecto podría tener un efecto de intensidad distinta para cada uno de los dos procesos de adsorción comentados anteriormente.

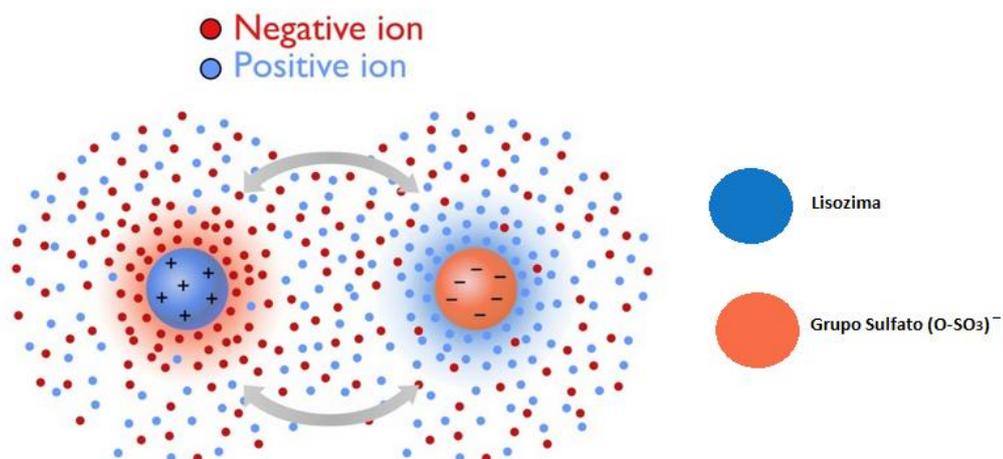


Fig. 6.- Efecto apantallante de la sal en la unión electrostática entre la LZM y los grupos sulfato del polielectrolito.

Los iones Cl^- se alinean en torno a la carga positiva, así como los iones Na^+ lo hacen en torno a los grupos sulfato del DS, dificultando de esta forma que la LZM pueda adsorberse sobre el polielectrolito.

Antecedentes y objetivos

El enorme desarrollo de la nanotecnología en los últimos 30 años ha permitido el lanzamiento de nuevas y eficientes rutas sintéticas hacia la producción y funcionalización de diferentes nanopartículas, obtenidas en forma de una gran variedad de materiales, incluyendo metales nobles, semiconductores compuestos magnéticos y sus combinaciones, como aleaciones de nanopartículas. [26]

Se han descrito una inmensa variedad de moléculas con las que se han funcionalizado las nanopartículas, como el polietilenglicol, dióxido de silicio, APTES, y muchos más, para una variedad aún mayor de aplicaciones (biomédicas, medio ambiente, técnicas analíticas, etc.) como se ha comentado anteriormente. Es decir, se han centrado los esfuerzos en tratar de hacer que las nanopartículas sirvieran para llevar a cabo distintas funciones, pero poco se ha hecho hasta la fecha, en comparación, para tratar de optimizar esa funcionalización.

El objetivo del presente trabajo se centra en la optimización de las condiciones de recubrimiento de las nanopartículas magnéticas como polielectrolitos de alta densidad de carga (en particular el dextrano sulfato). Así, nos centraremos en la obtención de estas partículas recubiertas y analizaremos las condiciones experimentales que permitan maximizar la cantidad máxima de recubrimiento, $q_{\text{máx}}$.

Una vez obtenidas las nanopartículas recubiertas utilizaremos la lisozima, LZM, como sonda que nos permita evaluar su capacidad de adsorción.

Materiales y métodos

Síntesis de las nanopartículas de Fe₃O₄

Se añade 1 L de agua desgasificada a un vaso de precipitados de 2 L. A continuación, se burbujea N₂ en el agua bajo agitación magnética continua, ajustando la agitación para que ésta sea lo más vigorosa posible sin que se produzcan salpicaduras. Tras desgasificar el agua durante 15 min, se añaden 11,94 g de FeCl₂·4 H₂O (Merck, 13478-10-9) y 34,6 g de FeCl₃·6 H₂O (Merck, 10025-77-1) para que la proporción en cuanto a moles sea 1:2, tal y como se recoge en la tabla 1. Durante este proceso se siguen manteniendo la corriente de N₂ y la agitación magnética.

		Masa (g)	P.M. (g·mol ⁻¹)	n (moles)
Reactivos	FeCl ₂ ·4 H ₂ O	11,93	198,85	0,060
	FeCl ₃ ·7 H ₂ O	34,60	288,35	0,120
Producto	Fe ₃ O ₄	19,89	231,53	0,060

Tabla 1. Gramos de FeCl₂·4 H₂O y FeCl₃·7 H₂O utilizados para formar magnetita.

Una vez la disolución se torna transparente, se añade NH₃ al 25 % (Merck, 1.05432.1011) con una bomba peristáltica a razón de 1 mL/min, monitorizando el pH de la disolución hasta que su valor se mantenga constante en torno a 10. La disolución tomará inmediatamente un color negruzco, indicando la formación de magnetita (Fe₃O₄). Se mantiene la dispersión bajo agitación y con la corriente de N₂ durante 30 min a temperatura ambiente.

La reacción global que provoca la subida del pH es la oxidación de los iones Fe²⁺ y Fe³⁺ para dar lugar a sus hidróxidos y su posterior precipitación en forma de magnetita:



Recubrimiento de la magnetita con ácido oleico:

Con objeto de proteger las nanopartículas de magnetita obtenidas y aumentar su estabilidad coloidal (evitando se aglomeración), las NP fueron recubiertas con ácido oleico de forma que los grupos carboxilato (R-COO⁻) se adsorberán a la superficie de las nanopartículas de magnetita y evitarán su floculación. 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 antiparelela 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 ($pK_a = 9.85$).

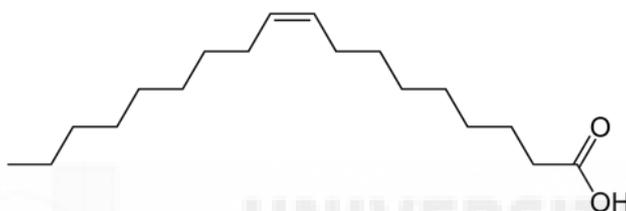


Fig 7.- Estructura del ácido oleico ($C_{18}H_{34}O_2$), un ácido graso mono-insaturado cuyo pK_a es 9,85.

El procedimiento experimental puede resumirse como sigue: tras 30 min, se añaden 10 mL de ácido oleico (VWR Chemicals, 20447.293) bajo agitación magnética vigorosa (sin provocar salpicaduras), se calienta la dispersión hasta alcanzar los $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ y en las mismas condiciones de agitación y corriente de N_2 empleadas en la síntesis de magnetita, todo esto durante una hora. Las moléculas de oleato ($R-COO^-$) se adsorberán a la superficie de las nanopartículas y evitarán su aglomeración.

A continuación, se enfría a temperatura ambiente y se añade HNO_3 al 65 % hasta que el pH alcance un valor próximo a 5. Al protonar los grupos carboxilato del ácido oleico, las nanopartículas recubiertas de oleico precipitarán, facilitando así su separación.

Utilizando un imán permanente de neodimio, se separan por decantación las nanopartículas y se realizan sucesivos lavados con etanol al 96 % (VWR Chemicals, 20824.296) para eliminar el exceso de oleico que haya quedado en disolución y no adheridas a la superficie de las nanopartículas.

Funcionalizar la magnetita con un polielectrolito, el Dextrano Sulfato (DS)

Tras lavar las nanopartículas recubiertas de oleato a pH 11, las partículas muestran una elevada estabilidad coloidal debido a la repulsión tanto estérica como electrostática que se establece entre las NP individuales.

Cuando el pH del medio se mantuvo a pH 3 las moléculas de oleato fueron protonadas ($pK_a = 9,85$) para dar lugar al ácido oleico (neutro). Habiendo perdido su carga, el surfactante carece ahora de la capacidad de adsorberse a la superficie de magnetita y es liberado al medio.

Para recubrir las nanopartículas con el polielectrolito se procedió de la siguiente manera: Se prepararon dos stocks: 50 mM de ácido fórmico a pH 3, ya que a este pH se consigue que la nanopartícula presente carga positiva en su superficie debido a que su punto isoeléctrico está alrededor de 6,5, y los grupos sulfato del DS se encontrarán deprotonados, por lo que interaccionarán electrostáticamente con la superficie de la NP (figura 8); y otro 4 M de NaCl. A partir de estos stocks se prepararon los diferentes buffers para recubrir la nanopartícula con el polielectrolito en diferentes condiciones, a los que se añadió también el DS (Fluka BioChemka, 31395) a una concentración de 5 mg/mL. De esta forma, se obtuvieron los buffers indicados en la tabla 2.

A estos buffers se les añadió gota a gota otros 25 mL de nanopartículas libres de ácido oleico a una concentración de unos 4 mg/mL, de tal forma que el volumen final de la dispersión era de 50 mL, quedando las concentraciones de todos los componentes antes citados a la mitad del valor indicado. La mezcla de nanopartícula y polielectrolito se dejó bajo agitación mecánica utilizando un agitador tipo noria durante toda la noche.

Al día siguiente, se lavaron las nanopartículas con el mismo buffer utilizado para recubrirlas, solo que en este caso la concentración de sal y fórmico era la mitad de la mencionada en la tabla 2, y tampoco contenían DS, para retirar el exceso de DS que no se hubiese adherido a las nanopartículas.

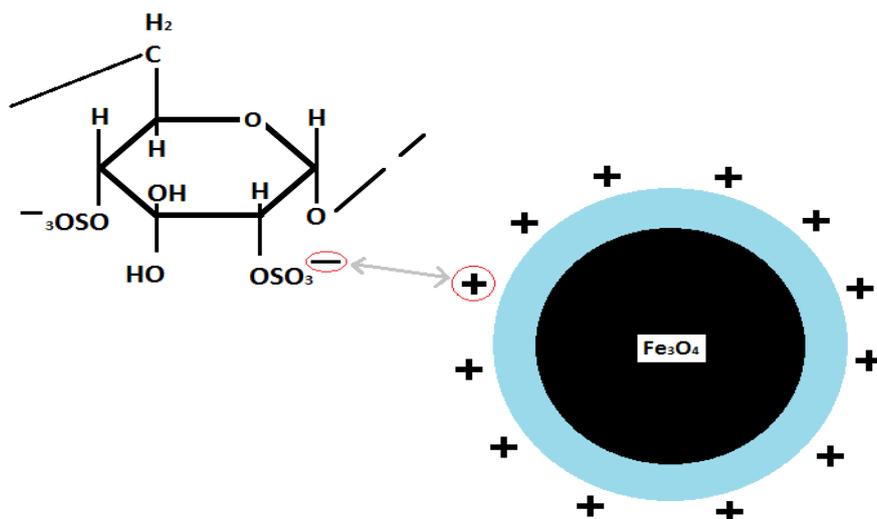


Fig 8.- Interacción electrostática del grupo sulfato de uno de los monómeros que conforman el DS con la superficie de la NP, cuando el pH es igual a 3 (a); Imagen de una NP recubierta completamente por el polielectrolito (b).

BUFFER 1		BUFFER 2		BUFFER 3		BUFFER 4	
HCOOH pH 3	10 mM	HCOOH pH 3	10 mM	HCOOH pH 3	10 mM	HCOOH pH 3	10 mM
NaCl	0 M	NaCl	0,5 M	NaCl	1 M	NaCl	2 M
Dextrano	5	Dextrano	5	Dextrano	5	Dextrano	5
Sulfato	mg/mL	Sulfato	mg/mL	Sulfato	mg/mL	Sulfato	mg/mL
Volumen final	25 mL	Volumen final	25 mL	Volumen final	25 mL	Volumen final	25 mL

Tabla 2.- Buffers utilizados y su composición

Adsorción con lisozima (LZM)

La LZM (Merck, 4403-5GM) se preparó de la siguiente forma: Se pesó una cantidad aproximada para que al disolverla en agua milli-Q la concentración final de la misma fuese de 2,5 mg/mL. A continuación, se filtró utilizando una jeringuilla estéril y filtros de acetato de celulosa de 0,2 μm . Acto seguido, se realizó un barrido espectrofotométrico a una alícuota diluida 10 veces de la muestra preparada (utilizando un espectrofotómetro UV-2700, SHIMADZU) entre 240 y 400 nm, anotando el valor a 280 nm, al ser ésta la longitud de onda en

la que la LZM presenta un mayor pico de absorción [22]. El coeficiente de extinción molar de la LAM es $2,653 \text{ mL} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Una vez conocida la concentración real de LZM se pudo proceder a la realización de los experimentos. En primer lugar, se realizaron experimentos en los que la concentración de LZM se mantenía constante ($0,5 \text{ mg/mL}$), mientras que la de NPs recubiertas variaba entre 0 y $7,5 \text{ mg/mL}$, a intervalos de $0,5 \text{ mg/mL}$; el volumen final para cada concentración fue de 1 mL. A continuación, poder obtener las isothermas de Langmuir correspondientes, se usaron concentraciones crecientes LZM, desde 0 hasta $0,5 \text{ mg/mL}$ en un principio, pero al no estabilizarse la adsorción para ciertas condiciones (250 y 500 mM), esta cantidad se vio incrementada hasta $1,4 \text{ mg/mL}$ de LZM, mientras que se mantuvo constante la de NPs (2 mg/mL); el volumen final para cada concentración fue de 1 mL.

Caracterización de las NPs

El tamaño de las NPs recubiertas de se determinó mediante *Dynamic Light Scattering*, método por el cual se mide la velocidad a la que las partículas están difundiendo debido al movimiento browniano (movimiento aleatorio inducido por el disolvente en el que se encuentre la muestra, que será tanto mayor cuanto menor sea la partícula). Esto se hace midiendo la velocidad a la que la intensidad de la luz dispersada fluctúa, mediante un fotomultiplicador que transformará dicha señal en una visible [24-25]. El resultado reflejó un tamaño de $909 \pm 29 \text{ nm}$, con un índice de polidispersidad de $0,238$.

El recubrimiento con el DS se determinó midiendo la carga que presentaban las NPs en su superficie, también utilizando el mismo instrumento. Los resultados que se muestran a continuación son una media de las 7 mediciones que se hacía por muestra. De esta forma, para las NPs recubiertas con ácido oleico, el resultado fue el siguiente: potencial $Z = 17,80 \pm 5,18 \text{ mV}$, con una movilidad de $1,39 \pm 0,41 (\mu\text{S})/(\text{V/cm})$; para las NPs lavadas con agua a $\text{pH} = 9$: potencial $Z = 20,28 \pm 3,082 \text{ mV}$, con una movilidad de $1,58 \pm 0,24 (\mu\text{S})/(\text{V/cm})$; y para las NPs recubiertas con DS: potencial $Z = -26,82 \pm 2,57 \text{ mV}$, con una movilidad de $-2,10 \pm 0,2 (\mu\text{S})/(\text{V/cm})$.

Medida de la concentración libre (no adsorbida) de LZM

La finalidad de los experimentos era ver la capacidad de adsorción de las NPs en diferentes condiciones. Para ello, se adsorbía cierta cantidad de Lz sobre NPs recubiertas con DS. Tras producirse esta adsorción, se separaban las NPs con la Lz adherida a su superficie

utilizando un imán permanente de neodimio, para poder recuperar el sobrenadante en el que se encontrará la Lz que no haya podido adsorberse.

Para determinar esta adsorción, se utilizó un espectrofotómetro *UV-2700* de *SHIMADZU*, junto con el software *UVprobe 2.43*. Se midió el sobrenadante para cada eppendorf de 1 mL en un barrido de longitudes de onda entre 400 y 240 nm, ya que aunque el pico de absorbancia de la Lz se encuentra en 280 nm, el espectro que se obtiene al medir entre estas longitudes de onda puede demostrar si ha quedado alguna NP en el sobrenadante que no se ha pegado al imán. Esto permite ver si lo que se está midiendo es únicamente el sobrenadante, o el sobrenadante y algo más. De esta forma se evita la obtención de falsos resultados, ya que la magnetita es capaz de absorber entre 400 y 300 nm [23].

Medida de la concentración de las NPs

La concentración del stock inicial de NPs recubiertas con ácido oleico se determinó midiendo el peso seco al evaporar el disolvente que contenía a dichas NPs. Primero se pesaron los eppendorfs vacíos (tres, porque se realizaron 3 medidas) que iban a contener las muestras y se anotaron los valores, y acto seguido se sometieron las NPs a sonicación durante 10-15 min, para que no se formaran aglomerados y las nanopartículas se encontraran más separadas y homogéneas. A continuación, se tomó una alícuota de 500 μ L de las NPs, se decantó el disolvente y se lavó con agua milli-Q una vez y con etanol dos veces. Se dejó evaporar el disolvente toda la noche a 78 $^{\circ}$ C y al día siguiente se volvieron a pesar los eppendorfs. La diferencia en el peso entre vacíos y llenos daba los mg de nanopartículas, y puesto que se conocía el volumen empleado (500 μ L) se determinó de esta forma la concentración del stock de NPs recubiertas con oleico.

La concentración de las NPs recubiertas con el DS se determinó de manera distinta, utilizando un método espectrofotométrico basado en la 1,10-fenantrolina. Para cuantificar las NPs se diluyen 10 veces (1:10) y se toma 1 mL, al que se añade otro mL de HCl 2M, para hacer que las partículas de magnetita se disuelvan (dando lugar tanto Fe^{2+} como Fe^{3+} , este último oxidado por cualquier molécula de O_2 que haya en la muestra) en disolución. Así, al añadir hidroxilamina, $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$, al 10% p/V, 1g/10 mL (Sigma-Aldrich, 159417-100G) se reducirá todo el férrico a ferroso. Tras esperar 10 minutos, se añade 1,10-fenantrolina 10 mM (Sigma-Aldrich, 131377-5G) que será capaz de reaccionar con el ferroso, formando un compuesto coloreado capaz de determinarse espectrofotométricamente a 510 nm. Con los valores

obtenidos se puede extrapolar cuántas NPs tenemos, ya que la relación moles de hierro/nanopartículas es 3/1.

A pH 1 (debido al HCl del $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$) no se puede medir bien en el espectrofotómetro, por eso todos los reactivos que se usan están disueltos en un tampón fórmico/formato, para neutralizar esta bajada de pH hasta un valor de 4 más o menos.

La recta de calibrado que se utilizó para extrapolar los datos es la que se muestra en la figura 9, y se construyó midiendo espectrofotométricamente a 510 nm concentraciones conocidas de Fe^{2+} , y relacionando dichos puntos mediante una línea de tendencia.

El último dato a tener en cuenta es el peso molecular de la magnetita, que es 231,54 g/mol.

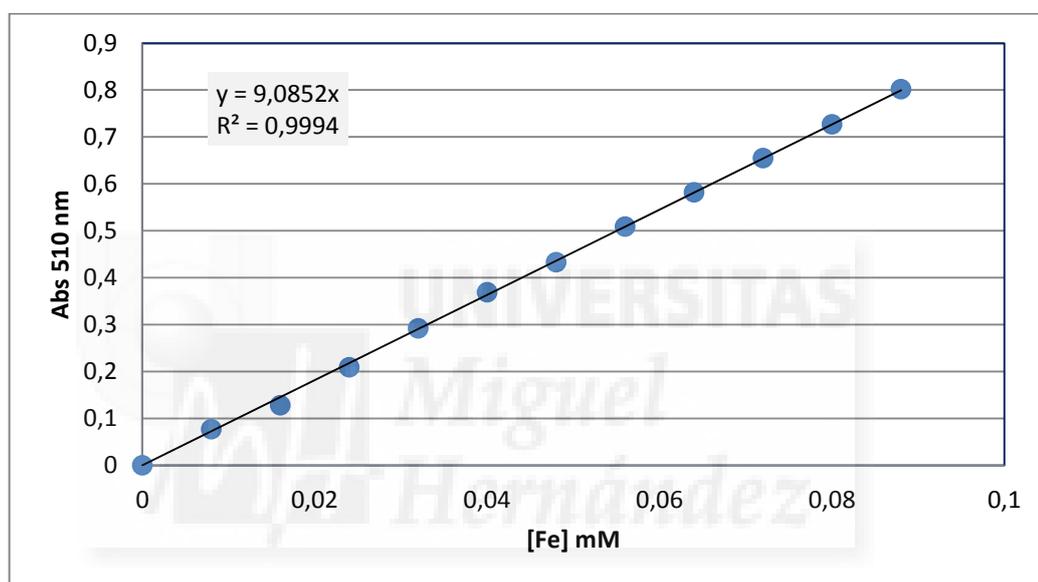


Fig. 9.- Recta de calibrado del Fe(II)

El coeficiente de extinción molar del Fe (II), según los datos obtenidos, es de $9,0852 \text{ L} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

Resultados

Adsorción de LZM sobre NPs

Para probar si las NPs (recubiertas de DS) eran capaces de adsorber la proteína se realizó el experimento cuyo resultado se muestra en la figura 10. En este experimento, se mezclaron concentraciones crecientes de NPs recubiertas con DS (desde 0 a 7,5 mg/mL) con una cantidad fija de LZM ($\approx 0,5$ mg/mL) y se observó si la concentración de LZM soluble (no adsorbida) disminuía conforme se aumentaba la cantidad de NPs, fruto de la adsorción de la proteína sobre la nanopartícula. Se ve cómo disminuye la cantidad de LZM libre en el medio conforme se aumenta la concentración de NPs.

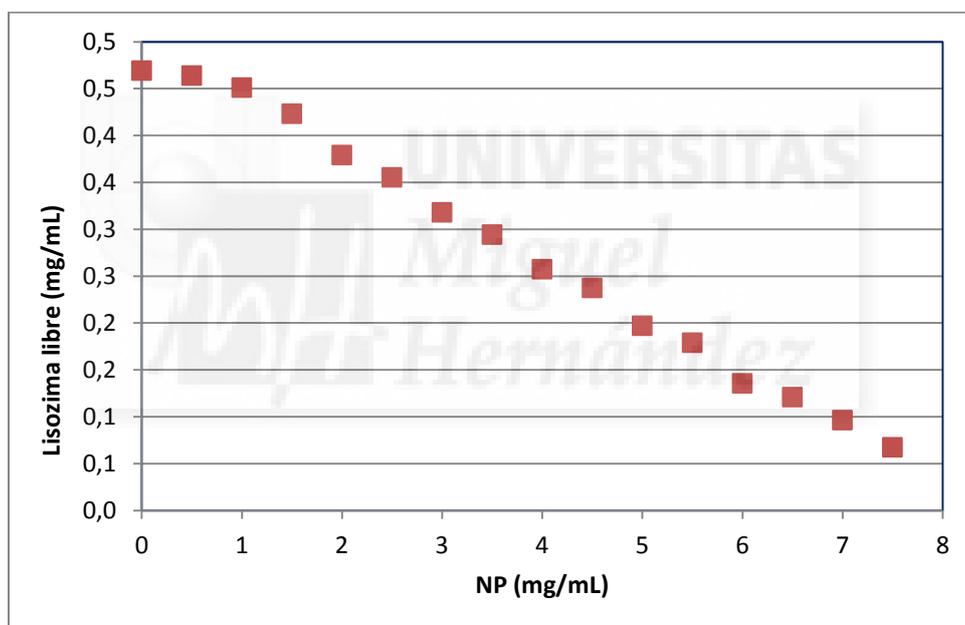


Fig. 10.- Capacidad adsortiva de las NPs recubiertas de DS en presencia de una concentración fija de LZM.

Las partículas de magnetita fueron previamente recubiertas con dextrano sulfato a pH 3 (10 mM ácido fórmico) en ausencia de sal y su capacidad para adsorber lisozima fue estudiada a fuerza iónica nula

Por tanto, comprobamos que la hipótesis de partida era válida y que las NPs recubiertas de DS son eficaces en la adsorción de la LZM.

Reordenamiento de los grupos sulfato en presencia de sal

Con objeto de analizar el efecto de la fuerza iónica sobre la capacidad de adsorción de las NPs magnéticas recubiertas de DS, se determinó la cantidad de lisozima soluble (no adsorbida) en función de la concentración de NPs presentes en el medio a pH 3 y 250 mM de NaCl.

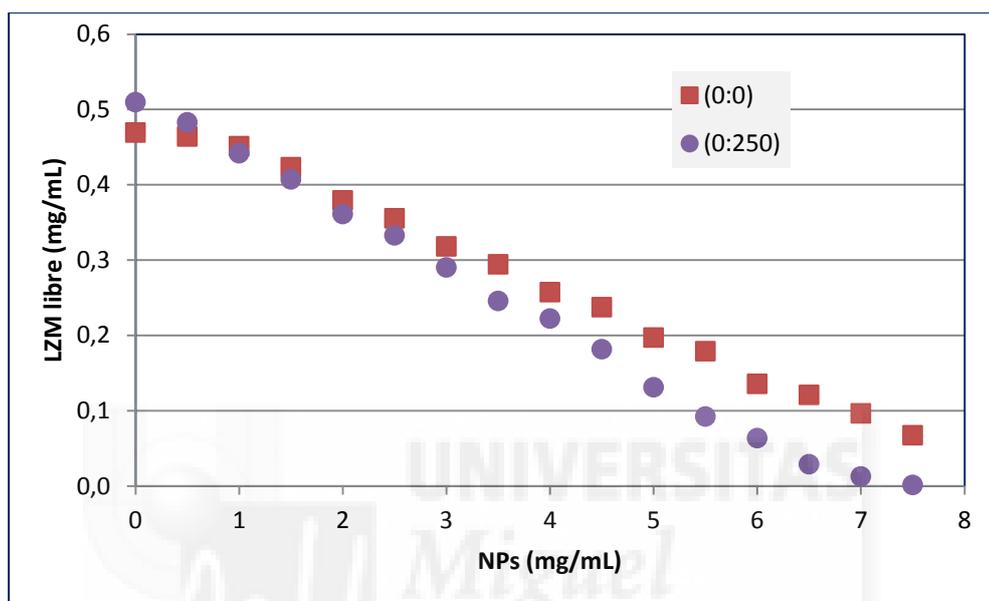


Fig. 11.- Efecto de la fuerza iónica en la adsorción de LHM

Recubrimiento con DS y adsorción de la LHM a 0 mM de NaCl (cuadrados rojos, 0:0) y recubrimiento con DS a 0 mM de NaCl y adsorción de la LHM a 250 mM de NaCl (círculos lilas 0:250)

La Figura 11 representa la adsorción de LHM cuando se varía la concentración de NPs en diferentes condiciones. En ambos experimentos las NPs fueron recubiertas con DS a pH 3 y en ausencia de sal. Se observa que, sorprendentemente, la muestra cuya adsorción se analiza en presencia de 250 mM de NaCl tiene una mayor capacidad de adsorción que la que se analiza en ausencia de sal. Cuando se recubre a 0 mM y se adsorbe a 250 mM de sal se une toda la LHM a las NPs a una concentración de estas en torno a 7 mg/mL, mientras que en la otra condición no llega a absorberse del todo la proteína en el rango de concentraciones de NPs utilizadas.

Si tenemos en cuenta que el aumento de la fuerza iónica debería debilitar la atracción electrostática, el resultado obtenido únicamente puede explicarse si consideramos que la carga de la superficie de las NPs recubiertas con DS se ve afectada por el aumento de fuerza

iónica. Aún más, el resultado parecería apuntar hacia una situación en la que el aumento de la fuerza iónica del medio desde 0 hasta 250 mM de NaCl provocaría que algunos monómeros de DS dejaran de interactuar con la superficie de magnetita para interactuar con la proteína.

Con objeto de confirmar esta conclusión, se analizó el efecto de la variación de la fuerza iónica durante el proceso de recubrimiento de las NPs. En la figura 12 se representa la adsorción de LZM cuando se varía la concentración de NPs en diferentes condiciones. Cuando las NPs son recubiertas en presencia de 250 mM de sal (rombos en la figura 12, 250:0) demuestran tener una capacidad de adsorción máxima. Una concentración de Nps de alrededor de 6,5 mg/mL es suficiente para adsorber prácticamente toda la lisozima disponible.

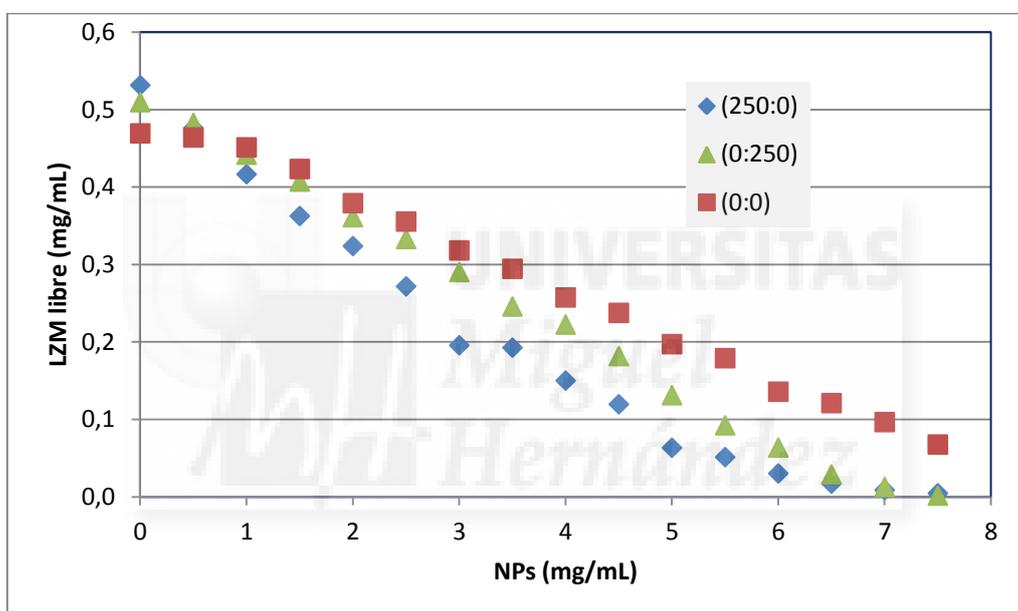


Fig. 12.- Efecto de la fuerza iónica en la adsorción de LZM

Recubrimiento con DS y adsorción de la LZM a 0 mM de NaCl (cuadrados rojos, 0:0), recubrimiento con DS a 0 mM y adsorción de la LZM a 250 mM de NaCl (triángulos verdes, 0:250) y recubrimiento con DS a 250 mM de NaCl y adsorción de la LZM a 0 mM de NaCl (rombos azules, 250:0)

Sin embargo, si las NPs son recubiertas en ausencia de sal y se analiza su recubrimiento también en ausencia de sal (cuadrados rojos en la figura, 0:0), no se consigue la completa adsorción de la proteína ni siquiera a la mayor concentración de NPs testada (7,5 mg/mL).

La situación para las NPs recubiertas en ausencia de sal y cuya capacidad de adsorción se analiza en presencia de 250 mM de sal (triángulos verdes en la figura, 250:0) es intermedia entre los dos casos extremos explicados anteriormente.

Aumento en la exposición de grupos sulfato vs efecto apantallante

Con el propósito de profundizar en la explicación del efecto observado se realizaron experimentos para obtener la completa isoterma de adsorción para NPs recubiertas a pH 3 en ausencia de sal y cuya capacidad de adsorción se analizó a 0, 250 y 500 mM de sal (siempre a pH 3).

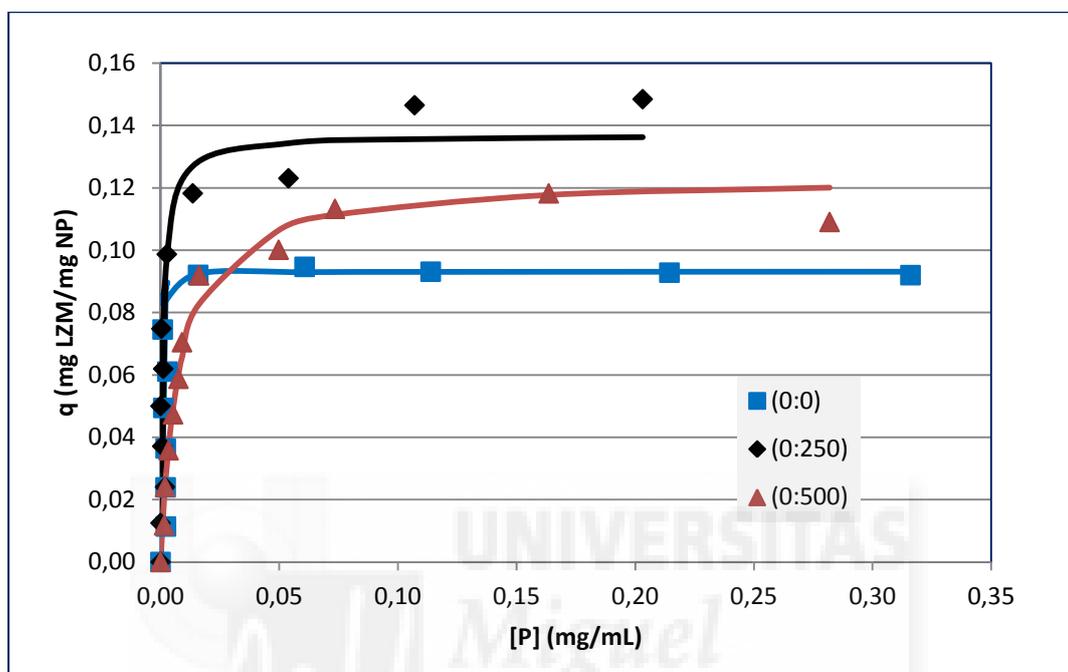


Fig. 13.- Isoterma de Langmuir para la adsorción de LZM en distintas condiciones de adsorción.

Recubrimiento con DS a 0 mM de NaCl y adsorción realizada a 0 mM (cuadrados azules, 0:0), 250 mM (rombos negros, 0:250) y 500 mM de NaCl (triángulos rojos, 0:500). Las líneas continuas representan el ajuste de la isoterma realizado a partir de los datos experimentales.

Como puede observarse, el aumento de la fuerza iónica tiene como primer efecto el debilitamiento de la adsorción (disminución en el valor de K) que se refleja en una mayor apertura de la gráfica y la necesidad de una mayor concentración de proteína para alcanzar $q_{\text{máx}}$. Este efecto es el esperado y comentado anteriormente y que se explica como consecuencia del apantallamiento de la atracción electrostática por los iones presentes en disolución.

Por su parte, se observa que al pasar de 0 a 250 mM de sal la capacidad máxima de adsorción de las NPs recubiertas con DS aumenta significativamente desde alrededor de 0,09 mg/mg hasta alrededor de 0,135 mg/mg. Este resultado estaría de acuerdo con la explicación presentada anteriormente y que supone que este aumento de la capacidad de adsorción de la

superficie podría deberse a un aumento en el número de monómeros de DS cargados expuestos al disolvente y que son capaces de atraer electrostáticamente a la proteína.

Un aumento aún mayor de la fuerza iónica hasta 500 mM supone una ligera disminución de $q_{\text{máx}}$ hasta alcanzar un valor cercano a 0,120 mg/mg. Hay que tener en cuenta que el aumento de la fuerza iónica supone un debilitamiento tanto de la atracción de la NP y el DS como del DS por la proteína. Por tanto, a esta alta fuerza iónica (500 mM) la capacidad de adsorción de la NP recubierta (0,120 mg/mg) es mayor que la obtenida en ausencia de sal (0,09 mg/mg) aunque menor que la detectada para las partículas recubiertas a una fuerza iónica intermedia. Este hecho apunta hacia una compensación entre los dos procesos atractivos antes comentados.

Este efecto compensatorio entre el aumento en el número de monómeros de DS expuestos al disolvente como consecuencia del aumento moderado de la fuerza iónica y la disminución de la atracción entre la superficie de las NPs recubiertas con DS y la superficie de la lisozima queda aún más patente en la Figura 14 en la que se compara las isothermas de adsorción de la lisozima a NPs cuyo recubrimiento se realizó a distintas fuerzas iónicas.

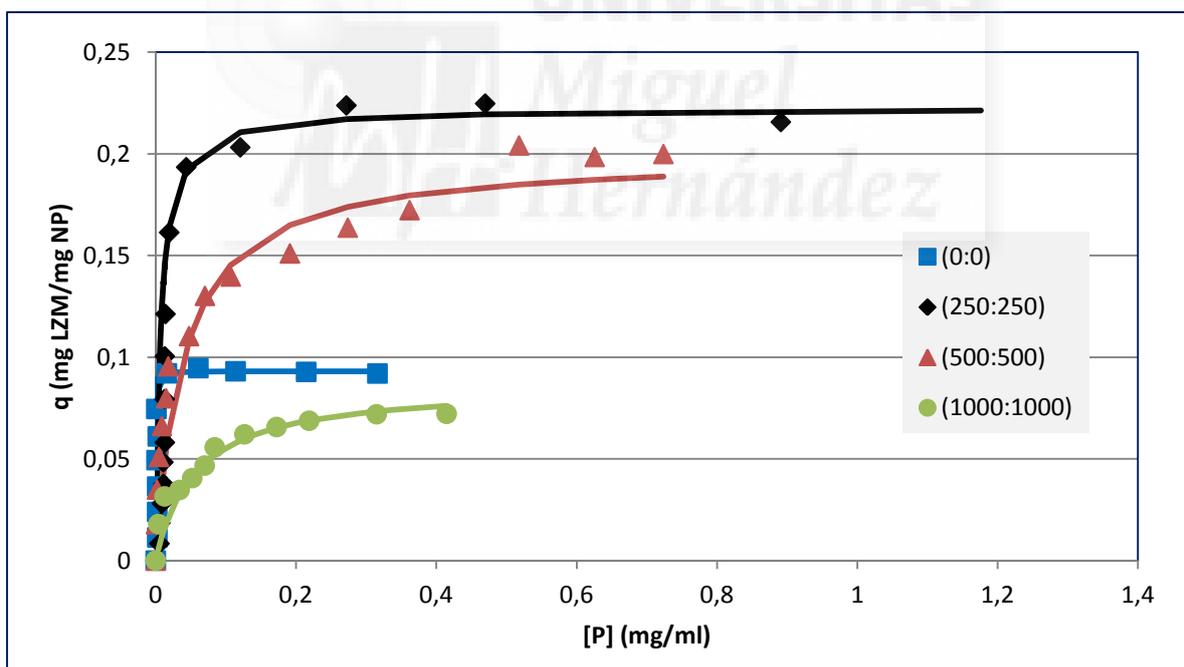


Fig. 14.- Isoterma de Langmuir para la adsorción de LYM en distintas condiciones de recubrimiento y adsorción.

Recubrimiento con DS a 0 mM de NaCl y la adsorción se realiza a 0 mM (cuadrados azules, 0:0; recubrimiento y adsorción a 250 mM (rombos negros, 0: 250); recubrimiento y adsorción a 500 mM de NaCl (triángulos rojos, 0: 500); y recubrimiento y adsorción a 1 M de sal (círculos verdes, 1000:1000). Las líneas continuas representan el ajuste de la isoterma realizado a partir de los datos experimentales.

Como puede observarse, el aumento de fuerza iónica debilita la adsorción de la proteína a la superficie de la NP recubierta de DS (descenso monotónico de la constante de equilibrio K con la concentración salina). Nuevamente, el efecto de la fuerza iónica sobre la capacidad de adsorción de la superficie, $q_{m\acute{a}x}$, de bifásico aumentan en el intervalo 0 a 250 mM de NaCl para provocar un descenso para concentraciones salina más evadas.

Condiciones de máxima adsorción

Para culminar el estudio, y teniendo en cuenta los datos anteriores, se determinaron unas condiciones en las que se ideó un máximo en el nivel de adsorción. En la figura 15, se compararon las isothermas para dos condiciones diferentes, 250:0 y 250:250. A 250:0 $q_{m\acute{a}x}$ tiene un valor de 0,400 mg LZM/g NP, mientras que a 250:250 este valor se reduce a prácticamente la mitad, hasta alcanzar un valor cercano a 0,220 mg LZM/mg NP. Las pendientes también sufren ligeras variaciones, siendo más pronunciada (aunque no demasiado) a 250:0 que a 250:250.

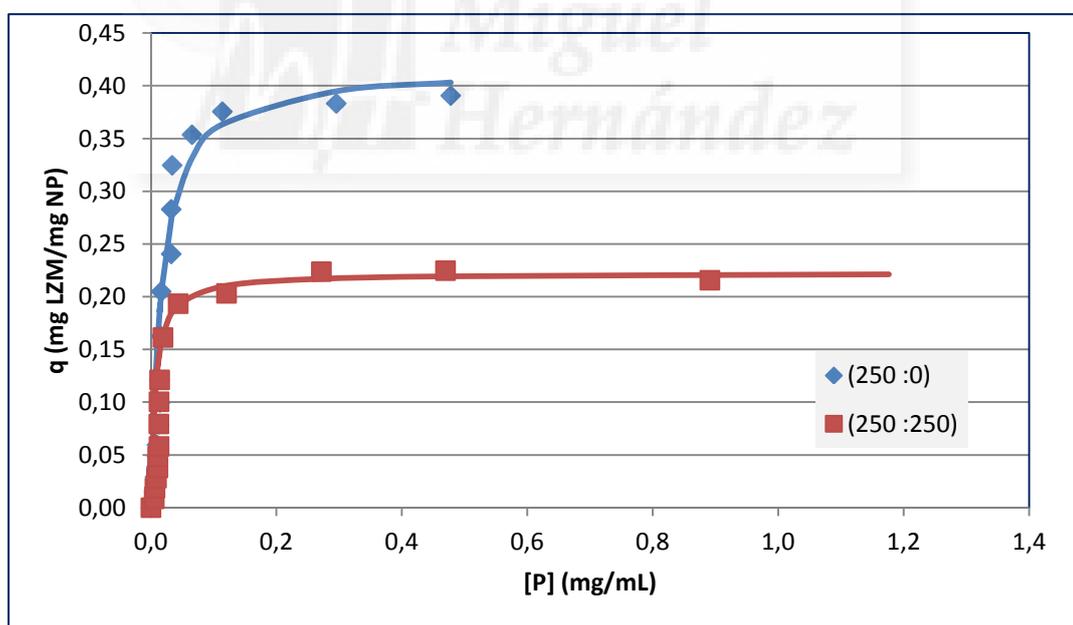


Fig. 15.- Isoterma de Langmuir para la adsorción de LZM en distintas condiciones de recubrimiento y adsorción.

Recubrimiento con DS a 250 mM y adsorción de la LZM a 0 mM de NaCl (rombos azules) y recubrimiento con DS a 250 mM de NaCl y adsorción de la LZM a 250 mM de NaCl (cuadrados rojos)

Se realizó el mismo experimento pero a 500:0 y 500:500 (figura 16), con idéntico resultado a la figura anterior, pero con valores diferentes de $q_{m\acute{a}x}$: alrededor de 0,290 mg LZM/mg NP para 500:0 y sobre 0,190 mg LZM/mg NP para 500:0. También como en la figura anterior, la pendiente es más pronunciada a 500:0 que a 500:500.

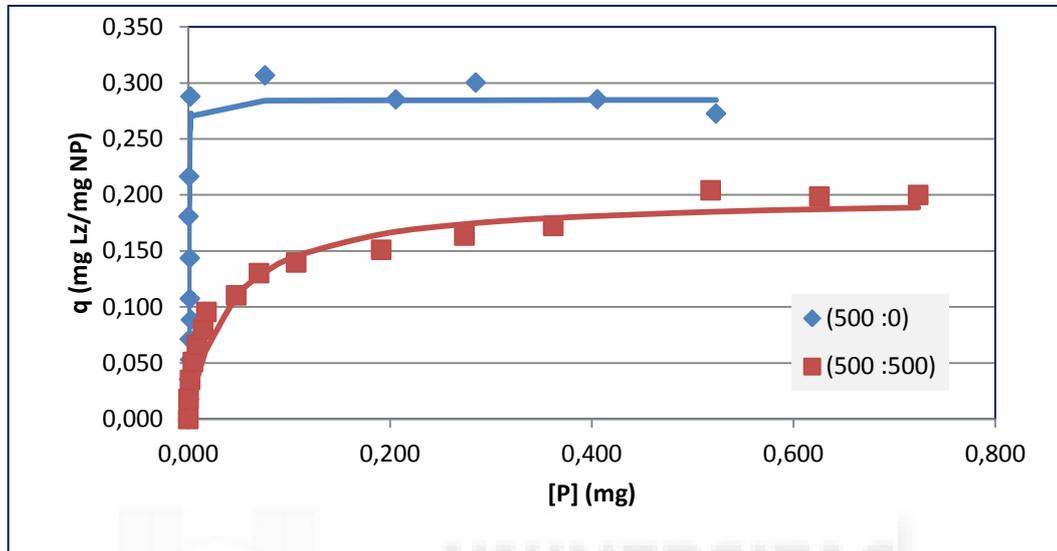


Fig. 16.- Isoterma de Langmuir para la adsorción de LZM en distintas condiciones de recubrimiento y adsorción.

Recubrimiento con DS a 500 mM y adsorción de la LZM a 0 mM de NaCl (rombos azules) y recubrimiento con DS a 500 mM de NaCl y adsorción de la LZM a 500 mM de NaCl (cuadrados rojos)

Discusión

Primero se probó la capacidad de las NPs recubiertas con DS de adsorber la LZM y se comprobó tal suposición, tal y como puede observarse en las figuras 10 - 16. Conforme aumentaba la cantidad de NPs disminuía la LZM libre en disolución, debido a que ésta se adsorbía sobre la superficie de las NPS, recubiertas con DS.

Como ya se adelantó en los objetivos del trabajo, hemos centrado nuestra atención en el efecto de la fuerza iónica sobre la capacidad de las NPs recubiertas con DS para adsorber LZM. Los resultados obtenidos indican que, como era de esperar, el aumento de fuerza iónica disminuye la afinidad de la proteína (cargada positivamente) por la superficie de DS (cargada negativamente) que recubre a la magnetita. Esto se traduce en un menor valor de la constante de adsorción.

Sin embargo, los resultados más relevantes del trabajo residen en el efecto de la fuerza iónica sobre la capacidad máxima de adsorción de las NPs recubiertas por DS, $q_{\text{máx}}$. Si consideramos el estado final de la NP recubierta con DS y que contiene LZM adsorbida, existen dos procesos de adsorción sucesivos:

- a) El DS (cargado negativamente) se adsorbe sobre la magnetita, que a pH 3 está cargada positivamente
- b) La proteína, LZM, está cargada positivamente y sufre una atracción electrostática por parte del recubrimiento de DS.

La capacidad de adsorción de LZM por parte de la NP recubierta de DS depende fundamentalmente del número de monómeros de DS que son expuestos al disolvente (que no interactúan con la superficie de magnetita). Nuestros resultados muestran que la densidad superficial de carga de la nanopartícula de magnetita recubierta de DS depende de forma muy sensible de la fuerza iónica a la cual se ha producido el recubrimiento. Un aumento de la fuerza iónica desde 0 a 250 mM supone un importante incremento en el número de monómeros de DS expuestos al disolvente y, por tanto, de la capacidad de adsorción de la NP resultante. Aumentos aún mayores de la fuerza iónica producen un declive en la capacidad de adsorción de la NP recubierta de DS.

Este efecto de compensación entre el inicial aumento en el número de grupos cargados expuestos en la NP recubierta por DS y su posterior disminución apuntan a unas condiciones óptimas para obtener NP con una capacidad de adsorción máxima que se alcanzarían al recubrir la magnetita a bajo pH (aumento de su carga positiva) en presencia de una cantidad de sal moderada.

El resultado no fue el esperado en un principio, ya que un aumento de la fuerza iónica habría de ejercer un efecto apantallante que dificultara que se adsorbiese la LZM, cosa que no parece ocurrir, ya que 0:250 presenta una mayor adsorción que 0:0. Esto sucede porque alguno de los grupos sulfato del DS, que se encuentran unidos electrostáticamente aunque débilmente a la NP, pierden esta unión debido al efecto de la μ (figura 17).

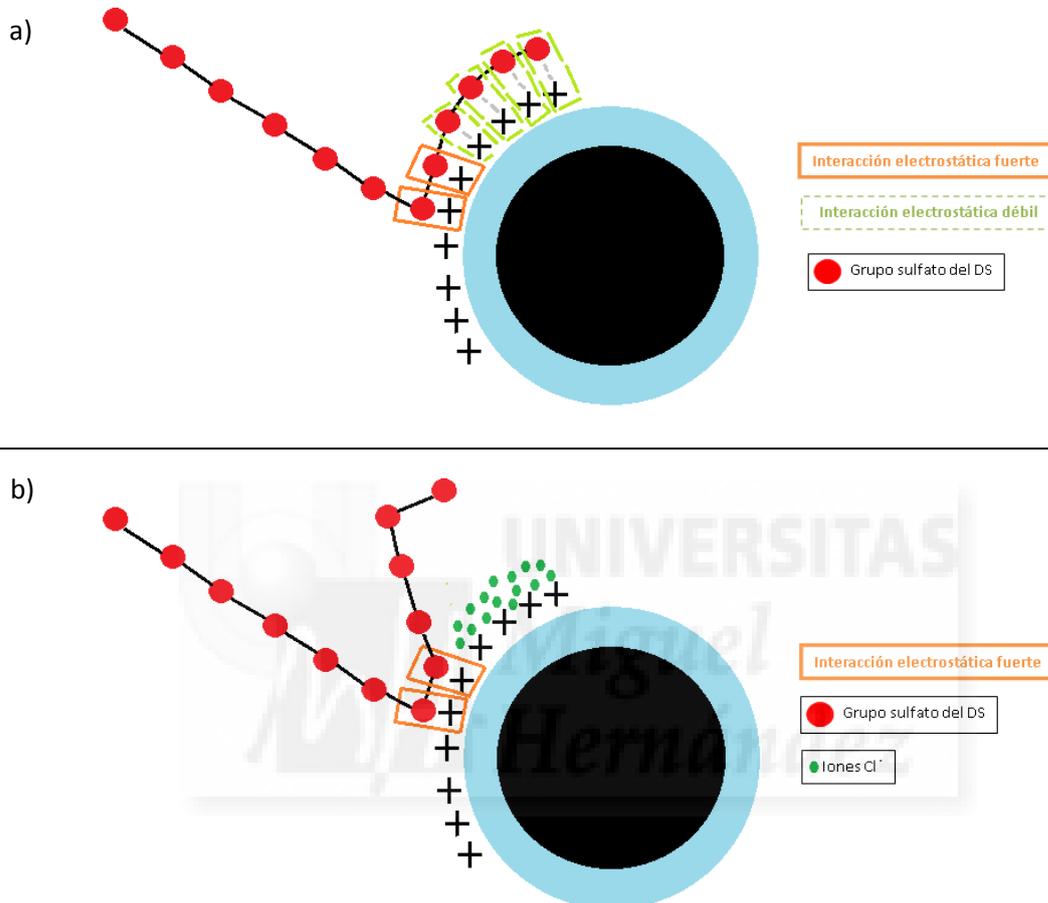


Fig. 17.- Efecto de la fuerza iónica sobre la exposición de grupos sulfato por parte de la NP. DS unido a una NP en ausencia (a) y presencia (b) de sal.

Los grupos sulfato más débilmente unidos a la NP se ven desplazados cuando se incrementa la fuerza iónica, quedando de esta forma expuestos y susceptibles de unir LZM.

De esta forma, se probó realizar el recubrimiento en presencia de sal para obtener un resultado similar al mostrado en la figura anterior (mayor exposición de grupos sulfato), para luego recubrir a fuerza iónica nula, con lo que se esperaba aumentar aún más el nivel de adsorción. Tal y como se puede observar en la figura 6, a 250:0 se recubre más que a 0:250, signo inequívoco de que se exponen más grupos cuando se realiza el recubrimiento con una μ mayor a 0. Al recubrir con sal en el medio, no se producen las interacciones débiles (al menos se reducen en número) descritas anteriormente, por lo que hay un mayor número de cargas

positivas disponibles, lo que aumenta el número de moléculas de DS capaces de unirse a la NP y, por consiguiente, el número de grupos sulfato disponibles para unir LZM. Esto, junto con la ausencia de sal en la adsorción, provoca un doble efecto positivo a la hora de maximizar la adsorción de proteína: por un lado, se aumenta la capacidad de la NP de unir LZM al aumentar el recubrimiento con DS y por otro, se evita el efecto pantalla provocado por la presencia de la sal en la adsorción.

Para comprobar y caracterizar mejor la unión de la LZM en diferentes condiciones salinas, se pasó a realizar isotermas de adsorción, en las que se podría obtener tanto $q_{m\acute{a}x}$ como K . Así se obtuvo la figura 8, en la que parece cumplirse la hipótesis inicial, aunque con una variación importante. A nivel de afinidad, se ve claramente cómo cuanto más sal presenta el medio, mayor es K . Sin embargo, $q_{m\acute{a}x}$ es menor a 0:500 que a 0:250, y este dato es muy interesante, ya que lo que indica es que si se dobla la concentración de sal no se doblan también el número de grupos sulfatos expuestos, aunque el valor de la fuerza iónica sí que es el doble, por lo que hay un apantallamiento mucho mayor, dando como resultado un menor recubrimiento.

Para ver mucho mejor este efecto apantallante de la sal, se incrementó la concentración de sal con la que se recubría la NP y se adsorbía la LZM hasta 1 M (figura 7). El considerable aumento de K y la drástica disminución de $q_{m\acute{a}x}$ a 1000:1000 resalta el efecto apantallante de la sal con respecto a su efecto incrementando el número de grupos sulfato que expone la NP. También se incrementa la diferencia en la $q_{m\acute{a}x}$ entre 250:250, 500:500 y 0:0, lo que permite estrechar un poco el cerco para poder determinar las condiciones óptimas en las que la adsorción de LZM por parte de las NPs se maximice.

Por último, se intentaron establecer unas condiciones en las que se maximizara la $q_{m\acute{a}x}$, teniendo en cuenta los resultados y condiciones anteriores. Por ello, se realizaron los experimentos cuyos resultados muestran las figuras 8 y 9, al ser las condiciones de salinidad que mejores resultados habían dado hasta el momento. En ambas se ve claramente cómo recubrir el DS a $\mu > 0$, y recubrir a $\mu = 0$ es la mejor opción si lo que se quiere es maximizar $q_{m\acute{a}x}$, debido al doble efecto de la fuerza iónica ya comentado. También se ve que es mejor recubrir a $\mu = 250$ que a $\mu = 500$ debido a que 250 mM de sal puede ser la concentración salina en la que el número de grupos sulfato expuestos sea el máximo, por lo que añadir más concentración de sal no aumentaría este número, e incluso podría hacer que disminuyese el número de grupos expuestos en relación al recubrimiento a 250 mM.

Conclusiones y perspectivas futuras

En definitiva, se ha estudiado el efecto de la fuerza iónica en la adsorción de lisozima sobre nanopartículas magnéticas funcionalizadas con dextrano sulfato, y se ha demostrado cómo se puede modular esta adsorción dependiendo de la fuerza iónica que se añada al medio tanto de recubrimiento como de adsorción, quedando de manifiesto que recubrir las nanopartículas con una fuerza iónica superior a 0 aumenta el número de grupos sulfato que expone el polielectrolito, y también que este aumento parece alcanzar su máximo a una concentración de sal en torno a 250 mM, ya que a concentraciones superiores no aumenta $q_{m\acute{a}x}$. También se ha demostrado que un aumento de la fuerza iónica del medio supone, en todos los casos, una disminución de la constante de adsorción debido al apantallamiento de la atracción electrostática.

Es decir, se ha conseguido optimizar y caracterizar ($q_{m\acute{a}x}$ y K) la capacidad de adsorción de las NPs recubiertas con un polielectrolito variando la fuerza iónica del medio.

En este trabajo se ha hecho una aproximación sobre cómo se puede modular esta capacidad de adsorción de la que se ha hablado, así que una vía de trabajo sería continuar con este mismo trabajo y tratar de conseguir estrechar el rango de concentraciones de sal en las que la adsorción fuera máxima, así como en la que ésta fuese mínima. Es decir, dibujar un espectro en el que se conozca la capacidad de adsorción de la nanopartícula para cada concentración.

Otra opción interesante sería la de estudiar la optimización utilizando otros polielectrolitos con distinta carga, como puede ser el ácido hialurónico, y sustituyendo la enzima modelo que se ha utilizado en este trabajo por otras de interés médico o biotecnológico, como puede ser la insulina. De este modo, se optimizaría la vehiculización de numerosos compuestos de interés.

Por último, también sería interesante comprobar la actividad/conformación de las moléculas adsorbidas, para comprobar si la unión al polielectrolito no ha modificado su actividad.

Referencias

1. B. Bittova, J. Poltiero, V. Vejpravova, M. P. Morales, A. G. Roca y A. Mantlikova: *J. Magn. Magn. Mater.*; (2012, 324, 1182-1188)
2. An-Hui Lu, E. L. Salabas, y Ferdi Schüth: *Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application* (2007)
3. Vicky V. Mody, Ajay Singh y Bevins Wesley: *Basics of magnetic nanoparticles for their application in the field of magnetic fluid hyperthermia* (European Journal of Nanomedicine. Volume 5, Issue 1, Pages 11–21, ISSN (Online) 1662-596X, ISSN (Print) 1662-5986, Marzo 2013)
4. R. Müller, H. Steinmetz, R. Hiergeist, W. Gawalek: *J. Magn. Magn. Mater.* (272–276, 1539 (2004))
5. M. L. Vadala, M. A. Zalich, D. B. Fulks, T. G. St. Pierre, J. P. Dailey, J. S. Riffle.: *J. Magn. Magn. Mater.* (293, 162 (2005))
6. Pedro Tartaj, María del Puerto Morales, Sabino Veintemillas-Verdaguer, Teresita Gonzalez-Carreño y Carlos J Serna: *The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine* (2006) (1)
7. Uribe Madrid SI, Pal U, Kang YS, Kim J, Kwon H y Kim J: *Fabrication of Fe₃O₄@mSiO₂ Core-Shell Composite Nanoparticles for Drug Delivery Applications* (Nanoscale Res Lett. 2015)
8. Heru Setyawan , Fauziatul Fajaroh, W. Widiyastuti, Sugeng Winardi, I. Wuled Lenggoro y Nandang Mufti: *One-step synthesis of silica-coated magnetite nanoparticles by electrooxidation of iron in sodium silicate solution* (Journal of Nanoparticle Research, March 2012, 14:807)
9. A. K. Bordbar, A. A. Rastegari, R. Amiri, E. Ranjbakhsh, M. Abbasi, and A. R. Khosropour: *Characterization of Modified Magnetite Nanoparticles for Albumin Immobilization* (Biotechnology Research International (Volume 2014))
10. Yoshio Kobayashi, Mayumi Yoshida, Daisuke Nagao, Yasuo Ando, Terunobu Miyazaki y Mikio Konno :*Synthesis of SiO₂-Coated Magnetite Nanoparticles and Immobilization of Proteins on Them* (Characterization and Control of Interfaces for High Quality Advanced Materials II: Ceramic Transactions, Volume 198, pp.135 – 141 (2011))
11. Sasmita Mohapatra, Dibyarupa Pal, Sudip K. Ghosh y Panchanan Pramanik: *Design of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticle for Purification of Histidine-Tagged*

- Recombinant Proteins* (NSTI-Nanotech 2007, www.nsti.org, ISBN 1420061836 Vol. 2, 2007)
12. Margarethe Hofmann-Antenbrink, Brigitte von Rechenberg y Heinrich Hofmann: *Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications* (Nanostructured Materials for Biomedical Applications, 2009)
 13. Abolfazl Akbarzadeh, Mohamad Samiei, y Soodabeh Davaran: *Magnetic nanoparticles: preparation, physical properties, and applications in biomedicine* (Nanoscale Res Lett. 2012; 7(1): 144)
 14. Margarethe Hofmann-Antenbrink, Brigitte von Rechenberg y Heinrich Hofmann: *Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications* (Nanostructured Materials for Biomedical Applications, 2009)
 15. An-Hui Lu, E. L. Salabas, y Ferdi Schüth: *Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application* (2007)
 16. P. Guardiaa , B. Batlle-Brugala , A.G. Rocab , O. Iglesiasa , M.P. Moralesb , C.J. Sernab , A. Labartaa y X. Batllea: *Surfactant effects in magnetite nanoparticles of controlled size* (Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 316 (2007), e756–e759)
 17. Zei-Tsan Tsai, Fu-Yuan Tsai, Wei-Cheng Yang, Jen-Fei Wang, Chao-Lin Liu, Chia-Rui Shen and Tzu-Chen Yen: *Preparation and characterization of ferrofluid stabilized with biocompatible chitosan and dextran sulfate hybrid biopolymer as a potential magnetic resonance imaging (MRI) T2 contrast agent*; Mar. Drugs 2012, 10(11), 2403-2414
 18. Jesús Miguel Sanz Morales: *ESTUDIOS ESTRUCTURALES Y APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS DE LA LISOZIMADEL BACTERIOFAGO Cp-I DE NEUMOCOCO* (UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID (Colección Tesis Doctorales, Nº 206/92,pág. 26, 1992)
 19. J. P. HALPER, N. LATOVITZKI, H. BERNSTEIN y S.BEYCHOK†: *Optical Activity of Human Lysozyme* (Vol. 68, No. 3, pp. 517-522, Marzo 1971)
 20. Myron L. Bender y Lewis J. Brubacher: *Catálisis y acción enzimática* (Cap: Catálisis mediante ácidos y bases, pág. 77)
 21. Dada, Olalekan, Olatunya, DADA: *Langmuir, Freundlich, Temkin and Dubinin–Radushkevich Isotherms Studies of Equilibrium Sorption of Zn²⁺ Unto Phosphoric Acid Modified Rice Husk* (IOSR-JAC, ISSN: 2278-5736. Volume 3, Issue 1(Nov. – Dec. 2012), PP 38-45)
 22. M. Mohammadi, M.J. Ameri Shahrabi y M. Sedighi: *COMPARATIVE STUDY OF LINEARIZED AND NON-LINEARIZED MODIFIED LANGMUIR ISOTHERM MODELS ON*

ADSORPTION OF ASPHALTENE ONTO MINERAL SURFACES (Электронная обработка материалов, 2012, 48(3), 50–62)

23. Sachnin A. Kulkarni, P. S. Sawadh†, and Prakash K. Palei: *Synthesis and Characterization of Superparamagnetic Fe₃O₄@SiO₂ Nanoparticles* (Journal of the Korean Chemical Society, 2014, Vol. 58, No. 1)
24. W. I. Goldberg: *Dynamic light scattering (1999)*
25. DLS technical note, Malvern Instruments; *Dynamic Light Scattering: An Introduction in 30 Minutes*
26. João Conde†, Jorge T. Dias†, Valeria Grazú, Maria Moros, Pedro V. Baptista y Jesus M. de la Fuente João Conde†, Jorge T. Dias†, Valeria Grazú, Maria Moros, Pedro V. Baptista y Jesus M. de la Fuente: *Revisiting 30 years of biofunctionalization and surface chemistry of inorganic nanoparticles for nanomedicine* (Front Chem. 2014; 2: 48,15 Jul 2014)
27. I. Langmuir: *The constitution and fundamental properties of solids and liquids. part i. Solids* (J. Am. Chem. Soc. 38, 2221-95 1916)

