



**Universidad**  
Zaragoza

## Trabajo Fin de Grado

Nanoestructuras híbridas para la activación remota  
de terapia enzimática dirigida mediada por  
hipertermia magnética

Autor

Teresa Sierra Arregui

Director/es

Maria Valeria Grazú Bonavía  
Laura Asín Pardo

Facultad de Ciencias  
2017

Dña. MARIA VALERIA GRAZÚ BONAVÍA, científica titular del grupo de Nanotecnología y Apoptosis en el Instituto de Ciencia de Materiales de Aragón (Universidad de Zaragoza-CSIC) y Dña. LAURA ASÍN PARDO investigadora Juan de la Cierva en el mismo grupo

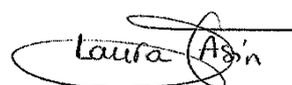
INFORMAN:

Que TERESA SIERRA ARREGUI ha realizado en el Instituto de Nanociencia de Aragón bajo su dirección el Trabajo de Fin de Grado descrito en la presente memoria, que lleva por título “Nanoestructuras híbridas para la activación remota de terapia enzimática dirigida mediada por hipertermia magnética” y que el trabajo realizado cumple los objetivos recogidos en las Directrices TFG de Biotecnología.

Zaragoza, 28 de junio de 2017



Firmado: María Valeria Grazú Bonavía



Firmado: Laura Asín Pardo

## INDICE

<b>1. RESUMEN</b> .....	1
<b>2. INTRODUCCIÓN</b> .....	2
2.1 Nanotecnología y nanomateriales .....	2
2.2 Aplicaciones en biomedicina .....	3
2.3 Terapia enzimática dirigida.....	4
2.4 Hipertermia magnética.....	4
<b>3. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO</b> .....	6
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	7
4.1 Materiales.....	7
4.1.1 Nanopartículas magnéticas .....	7
4.1.2 Nanohíbridos .....	7
4.1.3 Reactivos y equipos .....	8
4.2 Métodos.....	9
4.2.1 Caracterización.....	9
4.2.1.1 Determinación de hierro.....	9
4.2.1.2 Dispersión dinámica de la luz (DLS) .....	9
4.2.1.3 Microscopía de Barrido Electrónico (SEM).....	10
4.2.1.4 Magnetometría SQUID .....	10
4.2.2 Optimización del ensayo discontinuo de actividad enzimática .....	10
4.2.3 Actividad enzimática versus temperatura.....	12
4.2.3.1 Termoblock .....	12
4.2.3.2 Hipertermia magnética .....	12
4.2.4 Estabilidad versus temperatura.....	13
4.2.4.1 Temperatura ambiente.....	13
4.2.4.2 Termoblock .....	13
4.2.4.3 Hipertermia magnética .....	14
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	15
<b>6. CONCLUSIONES</b> .....	23
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	24

## 1. RESUMEN

La terapia enzimática dirigida surge como una estrategia interesante para el empleo de enzimas capaces de metabolizar profármacos en el interior del cuerpo. Sin embargo, cuenta con limitaciones como la respuesta inmune del propio organismo o la temperatura sub-óptima alcanzada por las enzimas en el interior del mismo. Como respuesta a estas limitaciones, en este trabajo se propone la co-encapsulación de la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP) con nanopartículas magnéticas (MNPs) por medio de una cubierta de sílica biomimética. De esta manera, el objetivo principal es la activación de estas MNPs mediante la aplicación de un campo magnético alterno externo, para conseguir la temperatura óptima de la HRP. Además, para evaluar la estabilidad y la funcionalidad del nanohíbrido se debe optimizar el protocolo de actividad enzimática. Los resultados obtenidos mostraron que la HRP es funcional en el interior del nanohíbrido. Así mismo, se observó cómo las MNPs son capaces de absorber energía y generar calor al ser expuestas a un campo magnético. Sin embargo, la temperatura alcanzada no se correspondió con la óptima de la enzima. Futuros estudios son necesarios para determinar el efecto de diferentes condiciones del campo magnético, con el objetivo de alcanzar dicha temperatura óptima.

## 1. ABSTRACT

Directed enzyme prodrug therapy is an attractive strategy that uses enzymes to metabolize prodrugs inside the body. Nevertheless, this approach has some drawbacks, like the immune response generated by the body and the sub-optimal temperature achieved by the enzymes inside the organism. As a response to these limitations, this project suggest co-encapsulation of the horseradish peroxidase (HRP) with magnetic nanoparticles (MNPs) through a biomimetic silica coverage. In this way, the main objective is the activation of these MNPs by applying an alternating magnetic field in order to achieve the optimal temperature of the HRP. Furthermore, the optimization of the enzymatic assay is necessary to evaluate the stability and the functionality of the nanohybrid. Results showed that HRP maintain its catalytic function inside the nanohybrid. Additionally, it was observed that MNPs were able to absorb energy and generate heat when an alternating magnetic field is applied. Nevertheless, that temperature was not the optimal of the enzyme. Future studies are required to establish the effect of different magnetic fields conditions in order to obtain the optimal temperature.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1 NANOTECNOLOGÍA Y LOS NANOMATERIALES

La **nanotecnología y la nanociencia** se basan en el estudio y el desarrollo de sistemas a escala nanométrica, que pueden ser utilizados en otros campos como pueden ser la química, biología, física, ciencia de materiales e ingeniería. Su origen está datado en 1959 cuando el físico Richard Feynman enunció en una charla una serie de procesos en los que se podían controlar y manipular átomos y moléculas. A pesar de ello, no fue hasta 15 años después cuando el Profesor Norio Taniguchi acuñó el término nanotecnología definiéndola como el procesado, separación, consolidación y deformación de materiales átomo por átomo, molécula por molécula.

Los nanomateriales son el principal producto de la nanotecnología y se definen por tener un tamaño entre 1 y 100 nm en al menos una de sus dimensiones.

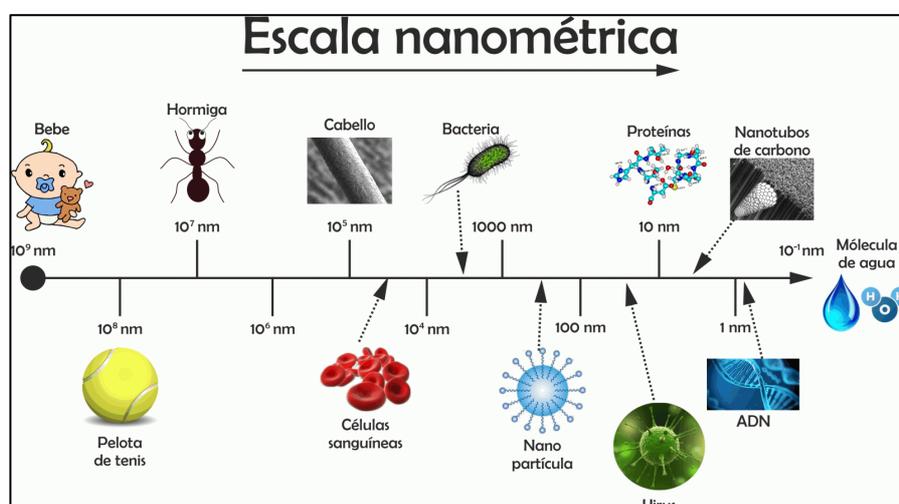


Figura 1: Escala nanométrica.

<http://revistaconciencia.com/ver-articulo/ciencia/una-mirada-al-universo-nanotecnologico--parte-1-/>

En la actualidad existe una elevada diversidad de nanomateriales que se podrían dividir en nanopartículas, nanocapas y nanocompuestos. En todos ellos las propiedades físicas son diferentes a las que se observan en los materiales macroscópicos con la misma composición química. Esto es debido a un aumento en la relación superficie/volumen, lo que conlleva a una mayor presencia de átomos en la superficie[1]. Cabe destacar también que el control de la morfología es importante a la hora de obtener unas propiedades adecuadas.

Estos nanomateriales pueden tener diversas aplicaciones en campos como sanidad, cosmética, electrónica, tecnología de la información y protección del medio ambiente.

Dentro de los nanomateriales utilizados en biomedicina, destacan las **nanopartículas magnéticas (MNPs)**. Están formadas por elementos como hierro, níquel, cobalto o sus óxidos y suelen tener una cubierta orgánica para disminuir la toxicidad dentro del organismo y mejorar su estabilidad. Los polímeros más utilizados como recubrimientos son el polímero de dextrano y el polietilenglicol (PEG).

El interés de estas MNPs deriva de las propiedades físicas de su núcleo magnético, de su alta relación superficie/tamaño y de la posibilidad de poder hacer química sobre ellas y poder unir moléculas de interés biológico a su superficie. Además, debido a su tamaño, pueden interactuar directamente con estructuras celulares, pudiendo así ser utilizadas para manipular diversas funciones e interactuar a nivel subcelular y molecular. También, al disminuir su tamaño las MNPs presentan un **comportamiento magnético dentro del régimen del superparamagnetismo**. Este comportamiento se caracteriza porque al exponer las MNPs a un campo magnético externo se van a alinear los momentos magnéticos y se van a comportar como paramagnetos de un solo momento magnético. No obstante, al retirar este campo magnético no van a volver a mostrar interacción magnética, es decir, no van a actuar como imanes, lo que les confiere una característica importante para su uso en biomedicina, relacionada con los efectos secundarios que podrían mostrar.

Relacionado con el objetivo de este trabajo, también resultan interesantes las **nanopartículas de sílica** gracias a las propiedades que poseen (biocompatibilidad, baja toxicidad, etc). No obstante, los métodos tradicionales de síntesis de sílica son laboriosos y requieren mucho tiempo y condiciones complejas. Por ello, se ha considerado la idea de imitar la síntesis natural de algunos organismos como las diatomeas o las esponjas [2].

## 2.2 APLICACIONES EN BIOMEDICINA

Como ya se ha visto, las utilidades de estos nanomateriales son muy diversas. Sin embargo, el estudio interdisciplinar entre nanotecnología y biología ha aumentado mucho durante los últimos años permitiendo la aplicación de nanomateriales en el ámbito sanitario.[3].

Las aplicaciones biomédicas de las MNPs se podrían dividir principalmente en aquellas que sirven para el diagnóstico de patologías (como cáncer, enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas) y las que se utilizan como terapia[4]. También existe el concepto de teragnosis que consiste en un sistema eficaz para el tratamiento y diagnóstico simultáneo de patologías[5].

Dentro del diagnóstico de patologías tienen gran utilidad como agentes de contraste en resonancia magnética (RM). Esta técnica se basa en la diferencia de los tiempos de relajación magnética nuclear de los protones del agua en los fluidos biológicos y en los tejidos sólidos. En el ámbito de la terapia destaca la destrucción de tumores mediante la aplicación de un campo magnético alterno externo en una zona donde haya MNPs. Esto se debe a que las MNPs son capaces, a determinados valores de frecuencia y amplitud de campo, de absorber energía y disiparla en forma de calor. Por consiguiente, se aumenta la temperatura del entorno en el que se encuentran provocando la muerte de células tumorales, que se sabe que son más sensibles a la temperatura que las células sanas [6]. Otra técnica que se encuentra actualmente en auge es la vehiculización de fármacos. Para conseguir la liberación específica del fármaco en la zona deseada se puede hacer a través de lo que se llama vectorización activa, bien funcionalizando la MNPs con alguna molécula que reconozca selectivamente las células diana o bien usando gradientes de campos magnéticos, gracias a sus propiedades magnéticas. De esta forma se consigue una acción focalizada del fármaco y se evitan o reducen los efectos secundarios del mismo [7].

Existe otra aplicación que no se puede englobar directamente dentro de diagnóstico o de terapia. Consiste en la separación de moléculas o células dentro de una suspensión biológica gracias a la acción de las MNPs. Éstas se funcionalizan con una molécula que sea capaz de unirse a la molécula o célula que queremos separar. Cuando se ha producido la interacción MNPs-célula o molécula, mediante un separador magnético (imán) o un campo magnético externo se consigue aislar aquellas moléculas o células que se hayan unido a las MNPs del resto de componentes de la muestra [8] [9].

### 2.3 TERAPIA ENZIMÁTICA DIRIGIDA

Este tipo de terapia se basa en el uso de enzimas para **metabolizar la transformación de profármacos** a fármacos en el interior del cuerpo. Se trata de uno de los múltiples tratamientos que existen contra el cáncer y su principal ventaja es que si se consigue dirigir específicamente la enzima a la zona tumoral la **toxicidad disminuye y el efecto aumenta**[10]. Esta especificidad se lograría mediante la funcionalización de la enzima con alguna molécula que reconozca otra molécula bien expresada específicamente o bien sobreexpresada en las células tumorales en comparación con las células sanas. Debido a que el profármaco no es activo y a que su transformación sólo se produciría en la zona tumoral donde está presente la enzima, se disminuye en gran medida la toxicidad del tratamiento a la vez que se va a amplificar el efecto. No obstante, también presenta algunas desventajas como la inmunogenicidad de la enzima y las temperaturas sub-óptimas que ésta encuentra en el interior del cuerpo, ya que muchas de las enzimas son extremófilas y su temperatura óptima es superior a la corporal. En esta línea se enmarca el trabajo que se presenta a continuación. Más concretamente, se proponen dos soluciones para solventar estos problemas principales: **co-encapsulación** de la enzima con MNPs para generar una temperatura adecuada mediante hipertermia magnética y recubrimiento de ambas con **sílica biomimética** disminuyendo así la respuesta del sistema inmune.

### 2.4 HIPERTERMIA MAGNÉTICA

Etimológicamente la palabra hipertermia describe un aumento de la temperatura en el interior del cuerpo. En el campo de la medicina clínica este término se usa para explicar el tratamiento de cáncer basado en la generación de calor localizado en la zona del tumor, que produce una activación de diversos mecanismos celulares de degradación, causando la muerte de las células tumorales. En oncología este tratamiento se utiliza de manera combinada con la quimioterapia y la radioterapia[11].

Tradicionalmente, la hipertermia se aplicaba con dispositivos externos que transferían energía a los tejidos mediante radiación con luz o con ondas electromagnéticas. Actualmente, existen técnicas más avanzadas como los ultrasonidos, radiofrecuencia, microondas, etc. Sin embargo, siguen presentando desventajas como el calentamiento de tejido sano que rodea al tejido tumoral, la limitación de la penetración del calor en los tejidos y la generación de calor insuficiente para ciertos tipos de tumores[12]. Todas estas limitaciones van a intentar ser remediadas mediante la hipertermia magnética, técnica mediante la cual se **genera calor por la aplicación de un campo magnético alterno** en tejidos en los que previamente se han insertado MNPs. Esta elevación de la temperatura se debe principalmente a los fenómenos

de relajación Browniana y de Néel. El primero hace referencia a la rotación física de las partículas y el segundo a la rotación del momento magnético de cada una de ellas[13].

Además, las MNPs superparamagnéticas presentan una tasa de absorción específica (SAR) de energía elevada que permite la aplicación de un campo magnético y una frecuencia compatibles para tratamientos clínicos. Con esta técnica se pueden alcanzar temperaturas entre 42°C y 45°C, por lo que su principal aplicación es generar un calor localizado para destruir las células tumorales. Sin embargo, esta especificidad sólo se consigue siempre y cuando se logre una vectorización específica de las MNPs a la zona tumoral. Para ello se pueden biofuncionalizar las MNPs con moléculas que las dirijan a las células dianas[14].

En este proyecto se propone un **uso diferente de la hipertermia magnética** para el tratamiento del cáncer. Como ya se ha comentado, una de las desventajas de la terapia enzimática dirigida es la imposibilidad de alcanzar las temperaturas necesarias para el correcto funcionamiento de las enzimas en el interior del cuerpo. Para solventarlo se utilizarán MNPs co-encapsuladas con una enzima gracias a una cubierta de sílica biomimética. Con esta estructura, **las MNPs en presencia de un campo magnético alterno externo generarán el calor necesario para que la enzima actúe de forma óptima.**

Para todos estos tipos de aplicaciones *in vivo* se utilizan MNPs formadas por magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) debido a su baja toxicidad y al conocimiento de su metabolismo una vez introducidas en el interior del cuerpo[15].

### 3. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO

Atendiendo a los antecedentes, en este proyecto se va a trabajar con unos nanohíbridos formados por la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP) y por MNPs con una cubierta de sílica biomimética. De esta forma el objetivo general es la activación de las MNPs mediante la aplicación de un campo magnético alterno externo, para conseguir la temperatura óptima de la HRP.

Para abordar este trabajo se plantean los siguientes objetivos particulares:

- 1) Optimizar los ensayos de actividad continua y discontinua con los nanohíbridos. Para los ensayos de actividad enzimática se va a partir de un protocolo procedente de la Universidad ORT de Uruguay en el que se está trabajando con unos nanohíbridos cuya composición es diferente, por lo que es necesario adaptarlo. Para facilitar la medida de la actividad enzimática se va a utilizar como sustrato el Ácido 2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sufónico (ABTS), que al oxidarse genera un color verde detectable espectrofotométricamente.
- 2) Evaluar la actividad y estabilidad de los nanohíbridos a diferentes temperaturas. Debido a que no se conoce de manera específica cómo actúa la HRP al estar en estas condiciones de inmovilización, una vez optimizado el protocolo de actividad, se pretende realizar un perfil de actividad y de estabilidad variando la temperatura global de la muestra.
- 3) Estudiar la temperatura generada por las MNPs en el interior de los nanohíbridos mediante la aplicación de un campo magnético alterno externo, analizando la actividad de la HRP. Este estudio se debe realizar de manera indirecta ya que el calor producido en el interior del nanohíbrido no se puede medir. Para ello, una vez establecido el perfil de actividad variando la temperatura global, se puede comparar con el perfil obtenido al aplicar la hipertermia magnética y hacerse así una idea de la temperatura obtenida de manera local en los nanohíbridos.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 MATERIALES

#### 4.1.1 Nanopartículas magnéticas

Se va a trabajar con unas MNPs comerciales de Chemicell de 200 nm rodeadas de ácido-DL-poliaspártico que proporcionan cargas negativas en la superficie. Esto va a favorecer su co-encapsulación con la HRP en el interior de la sílica biomimética. Este tamaño de nanopartícula es demasiado grande para presentar superparamagnetismo, sin embargo, sí que presentan este comportamiento debido a que en el interior están formadas por núcleos de pequeño tamaño que se comportan como nanopartículas individuales.

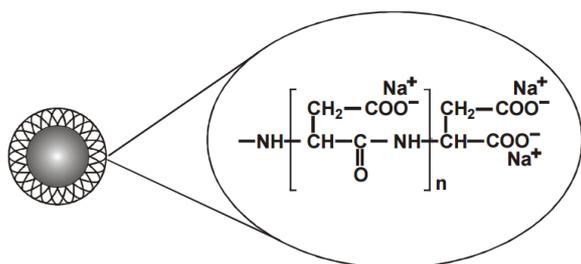


Figura 2: Nanopartículas magnéticas de Chemicell. Tienen un tamaño de 200 nm y están rodeadas de ácido-DL-poliaspártico.

Se conoce que la temperatura óptima de la HRP en forma libre es 45°C y que a partir de ahí la actividad empieza a caer bruscamente. Sin embargo, al estar encapsulada con algún material puede mantenerse estable durante más tiempo[16]. Por tanto, lo que se pretende es conseguir que el calor generado por las MNPs en presencia de un campo magnético externo sea suficiente para alcanzar la temperatura óptima de la HRP. Este calor sería localizado debido a la cercanía entre las nanopartículas y la enzima.

La elección del valor del campo magnético y de la frecuencia utilizada para la hipertermia magnética no se ha basado en las condiciones necesarias para los tratamientos *in vivo* ya que en este trabajo se va a caracterizar la capacidad de calentamiento *in vitro*.

#### 4.1.2 Nanohíbridos

En el método estándar de síntesis de sílica se utilizan tetrametilortosilicato (TMOS) y polietilenimina (PEI)[2]. En este caso, además se añadirán las MNPs comerciales de Chemicell (200 nm), trehalosa para ayudar a la co-encapsulación y la enzima HRP. Estas estructuras nanohíbridas van a ser capaces de introducir el sustrato en su interior gracias a la porosidad de la sílica. Una vez dentro, la HRP cataliza la reacción de oxidación del ácido indolacético (IAA) generando especies reactivas de oxígeno (ROS) que actúan sobre las células tumorales produciendo su muerte.



Figura 3: Nanohíbrido generado por la co-encapsulación de la MNP (en rojo en el centro) y la HRP (en naranja, dispersa). Alrededor se encuentra la sílica biomimética (en gris).

Para evaluar la capacidad catalítica de la HRP co-encapsulada en este trabajo en lugar de utilizar IAA como sustrato se va a utilizar Ácido 2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sufónico (ABTS) ya que al oxidarse genera un color verde detectable espectrofotométricamente a 420 nm. Se va a desarrollar una medida de la velocidad inicial, por lo que la solución se encuentra en concentraciones saturadas de sustrato (casi 40 veces por encima del valor de la  $k_m$ ). Por esta razón se asume que la concentración de sustrato inicial es igual a la de sustrato libre y por tanto que la velocidad medida es la máxima que la enzima puede conseguir en esas condiciones. El complejo enzima-sustrato se genera en una fase rápida inicial y después la reacción llega a una cinética en la cual la velocidad se vuelve constante, por eso es importante medir la actividad en la zona lineal.

En algunos de los experimentos se va a utilizar una muestra de nanohíbridos sintetizados con PEI de pesos moleculares 2 kDa, 1.3 kDa y 25kDa. Sin embargo, la mayoría de los ensayos van a ser realizados con una muestra de nanohíbridos sintetizada con PEI de peso molecular 60 kDa (**NPs 60 kDa**). Esta muestra contiene 0.15 mg nanohíbridos/ml de muestra y 0.0021 mg HRP/ mg de nanohíbridos. Fueron sintetizados en el laboratorio de Biotecnología de la Universidad ORT de Uruguay que trabaja en colaboración con este grupo.

#### 4.1.3 Reactivos y equipos

##### REACTIVOS

Ácido 2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sufónico (ABTS)

Peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Fosfato de potasio

Fosfato de sodio

##### EQUIPOS

Centrífuga: Minispin

Equipo de Hipertemia magnética

Equipo UV-VIS: UV-Visible Spectrophotometer 50 probe

pHmetro: Orion 2 star

Sonicador: sonicator RK52

Termostato de bloque metálico “multiplaces” (thermoblock)

##### CASA COMERCIAL

Sigma Aldrich

Sigma Aldrich

Sigma Aldrich

Sigma Aldrich

##### CASA COMERCIAL

Eppendorf AG

DM 100 series nanoScale

Biomagnetics

Varian

Thermo Scientific

Bandelin electronic

J.P. selecta

## 4.2 MÉTODOS

### 4.2.1 Caracterización

En primer lugar se realiza la caracterización magnética de los nanohíbridos. Ya que el proceso de síntesis no está bien controlado todavía, es necesario saber de qué se parte a la hora de realizar los demás experimentos.

#### 4.2.1.1 Determinación de hierro

Es fundamental conocer la cantidad de hierro que contienen las MNPs para determinar la tasa de absorción específica (SAR) y así conocer su capacidad de calentamiento.

*Fundamento.* Esta técnica se basa en la medida de la concentración de Fe (III) al acomplejarse con  $[\text{SCN}^-]$  y formar  $[\text{Fe}(\text{NCS})(\text{H}_2\text{O})_5]^{2+}$ . Éste se puede medir espectrofotométricamente a 487 nm.

*Preparación de la muestra.* Se añaden en un eppendorf 160  $\mu\text{l}$  de la muestra y 400  $\mu\text{l}$  de agua regia (HCL:  $\text{HNO}_3$  en proporción 1:3), la cual va a degradar la cubierta orgánica de las MNPs. Se incuba a  $60^\circ\text{C}$  durante 15 minutos y se detiene la reacción con 440  $\mu\text{l}$  agua MiliQ. En una cubeta se añaden 0.5 ml de agua MiliQ y 0.5 ml de KSCN 1.5M y sobre esta disolución se añaden 400  $\mu\text{l}$  de la muestra obtenida en el primer paso. Por último se mide la absorbancia a 487 nm.

*Cálculo de la concentración.* Una vez realizada la determinación, se calcula la concentración de hierro con la ley de Beer-Lambert:

$$Abs = \varepsilon \cdot C \cdot l \rightarrow C = \frac{Abs}{\varepsilon \cdot l}$$

Donde “abs” es el valor de absorbancia medida en el espectrofotómetro, “ $\varepsilon$ ” el coeficiente de extinción molar del complejo  $[\text{Fe}(\text{NCS})(\text{H}_2\text{O})_5]^{2+}$  a 487 nm, “C” la concentración de  $[\text{Fe}(\text{NCS})(\text{H}_2\text{O})_5]^{2+}$  en el medio y “l” la longitud atravesada por la luz en la solución. Es importante tener en cuenta las diluciones hechas durante el protocolo para saber la concentración de hierro en la muestra.

#### 4.2.1.2 Dispersión dinámica de la luz (DLS)

Técnica físico-química que permite determinar la distribución de tamaño de las nanopartículas en suspensión gracias a la dispersión dinámica de la luz.

*Fundamento.* La luz láser incide con las partículas de la suspensión y se dispersa en todas las direcciones posibles. Los haces de luz dispersados por varias partículas interfieren entre sí consiguiendo una intensidad de dispersión. Debido al movimiento browniano de las nanopartículas, sus posiciones relativas varían constantemente, provocando cambios en esa intensidad de dispersión. Las partículas que se mueven rápido son más pequeñas y aceleran

la variación de esta intensidad. Por el contrario, las de tamaños más grandes dan variaciones más lentas[17].

*Preparación de la muestra.* Se introducen 25  $\mu\text{l}$  de la muestra que contiene 0.15 mg nanohíbridos /ml en una cubeta de cuarzo. Después se filtra la solución tampón de fosfato de sodio 0.1 M con un filtro de 0.2  $\mu\text{m}$  y se añade 1 ml de éste a la cubeta. Debido a que los resultados no fueron los esperados se probó a diluir la muestra con agua MiliQ en vez de con solución tampón. También se sometió a la muestra a un baño de ultrasonidos durante 5 minutos antes de realizar la medida.

#### 4.2.1.3 Microscopía de Barrido Electrónico (SEM)

Con esta técnica se consigue una imagen de la superficie de la muestra.

*Fundamento.* Un haz de electrones va barriendo la muestra y arranca electrones de la superficie de la muestra, denominados electrones secundarios, que son detectados. En función de la energía con la que llegan se obtienen las imágenes e información elemental de la superficie de la muestra.

*Preparación de la muestra.* Para evitar la interferencia de las sales de la solución tampón en la medida es necesario realizar 3 lavados de la muestra. Para ello, se centrifugan durante 5 minutos a 13.4 rpm y se resuspenden en agua desionizada. Después se diluyen lo suficiente para que no se superpongan nanopartículas en la imagen. Por último, se toma una gota de la muestra y se pone en una rejilla recubierta de carbono y se deja evaporar para evitar cualquier interferencia del disolvente.

#### 4.2.1.4 Magnetometría SQUID (Dispositivos Superconductores de Interferencia Cuántica)

Técnica que se utiliza para medir el momento magnético de las muestras al aplicarles diferentes campos, variando la temperatura.

*Fundamento.* Este equipo permite realizar medidas muy sensibles de momento magnético al utilizar un detector SQUID. Se va a obtener información del comportamiento magnético de las MNPs.

*Preparación de la muestra.* Se toman 50  $\mu\text{l}$  de la muestra de nanohíbridos y se introducen dentro de una cápsula de policarbonato y se sella con grasa mediante vacío. Cabe destacar que al obtener los resultados se obtiene una mezcla del momento magnético de las MNPs y de la cápsula. Por ello hace falta realizar una corrección del diamagnetismo que se realiza con el propio programa informático.

### **4.2.2 Optimización del ensayo de actividad enzimática**

Para valorar la actividad enzimática se realiza un ensayo ya establecido en el que se debe realizar, en primer lugar, una optimización.

*Fundamento.* Este ensayo se basa en la reacción catalizada por la HRP. Se produce la reducción del peróxido de hidrógeno y la oxidación del ABTS, generando un color verde cuya absorbancia es detectable a 420 nm.

*Preparación de la muestra.* La preparación de los reactivos es la siguiente:

- 500 ml de solución tampón de fosfato de potasio monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), pH 5.0, 0.1 M. Para ello se mezclan 500 ml de agua destilada y 6.8 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y se ajusta el pH.
- 10 ml de ABTS, 9.1 mM. Para ello se pesan 50.9 mg de ABTS y se mezclan en 10 ml de agua MiliQ. Importante preparar fresco, protegerlo de la luz y mantenerlo en hielo.
- Peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 0.3% en peso. Se parte de peróxido de hidrógeno al 33%, por lo que se mezclan 200 µl de peróxido con 19.8 ml de agua MiliQ. Importante preparar fresco, protegerlo de la luz y mantenerlo en hielo.
- Nanohíbridos: dilución 1:2 de la muestra para obtener 0.075 mg nanohíbridos/ml de muestra. Después se somete a un baño de ultrasonidos durante 8 minutos.

Como no se utiliza todo el volumen de cada uno de los reactivos, éste puede ser ajustado según la cantidad de reacciones que se vayan a hacer.

*Ensayo enzimático.* Se añaden 850 µl de solución tampón de fosfato de potasio, 50 µl de ABTS, 100 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 5 µl de muestra a una cubeta de cuarzo. Es importante seguir siempre ese orden de adición de los reactivos, de lo contrario la reacción podría variar. Pasado el tiempo que corresponda se mide la absorbancia a 420 nm con el UV-espectrofotómetro.

La reacción total tiene una duración de 20 minutos, por lo que se deja actuar a la enzima a diferentes tiempos para obtener una pendiente. Se realiza una medida de absorbancia cada 2 minutos de reacción durante 20 minutos y se establece la relación absorbancia-tiempo. Se debe optimizar los tiempos de ensayo y las concentraciones.

*Cálculo de unidades de enzima.* Para realizar este cálculo en primer lugar se aplica la ley de Beer-Lambert:

$$Abs = \epsilon \cdot C \cdot l$$

Donde “abs” es el valor de absorbancia medida en el espectrofotómetro, “ε” el coeficiente de extinción molar del ABTS a 420 nm, “C” la concentración de ABTS en el medio y “l” la longitud atravesada por la luz en la solución.

Dado que la definición de unidades de enzima hay que expresarla respecto del tiempo, se considera la  $\Delta$ absorbancia/ $\Delta$ tiempo, es decir, la pendiente de la recta.

$$C = \frac{Abs}{\epsilon \cdot l} \rightarrow C = \frac{\Delta Abs}{\Delta tiempo \cdot \epsilon \cdot l}$$

Por último, teniendo en cuenta el volumen total de la muestra de reacción ( $V_F$ ) obtenemos la ecuación final. Además como todas las unidades se encuentran en moles y litros hay que multiplicar todo por  $10^6$  para obtener  $\mu\text{mol}/\text{minuto}$ .

$$C = \frac{\Delta Abs \cdot V_F}{\Delta tiempo \cdot \varepsilon \cdot l} \cdot 10^6$$

También se puede calcular la **actividad enzimática volumétrica**, es decir, las unidades de enzima teniendo en cuenta el volumen de ésta que se ha añadido. Así se obtiene la ecuación:

$$C = \frac{\Delta Abs \cdot V_F \cdot \text{Factor de dilución enzimático}}{\Delta tiempo \cdot \varepsilon \cdot l \cdot V_{EZ}}$$

Donde el “factor de dilución enzimático” es la dilución realizada a la muestra y “ $V_{EZ}$ ” es el volumen final de esta solución que se ha añadido en el ensayo.

### 4.2.3 Actividad enzimática versus temperatura

Una vez optimizado el ensayo se pasa a realizar el mismo con thermoblock y con hipertermia magnética, para poder comparar el perfil de actividad aplicando ambas condiciones.

#### 4.2.3.1 Thermoblock

Este equipo va a proporcionar un aumento de la temperatura global en toda la muestra. Debido a que se conoce sólo el perfil de actividad de la HRP libre y no en las condiciones de inmovilización actuales, se establecen medidas a  $21^\circ\text{C}$ ,  $30^\circ\text{C}$ ,  $40^\circ\text{C}$  y  $55^\circ\text{C}$  para abarcar un rango amplio de actividad.

*Fundamento.* La aplicación de distintas temperaturas globales va a dar lugar un aumento de la actividad enzimática de la HRP. Esto se ve reflejado en la figura 8 del apartado de resultados y discusión.

*Preparación de la muestra.* Los reactivos utilizados son los mismos que aparecen en el apartado 4.2.2. Se preparan las reacciones y cada una de ellas se deja actuar un tiempo determinado (la primera dos minutos, la segunda cuatro, etc. hasta llegar a 20 minutos). Después de cada reacción se mide la absorbancia a 420 nm. Es importante enfriar la muestra una vez pasado el tiempo para que se detenga la reacción, pudiendo así asegurar una correcta evaluación del color obtenido en función del tiempo de reacción.

#### 4.2.3.2 Hipertermia magnética

Tras establecer un comportamiento enzimático variando la temperatura global, se pasa a aplicar campos magnéticos alternos externos. La diferencia con el experimento anterior es que aquí la elevación de la temperatura se va a producir únicamente de manera local y ésta no se va a poder medir de manera directa.

*Fundamento.* Aplicación de campos magnéticos alternos externos a una frecuencia y un campo determinados. Esto va a producir un aumento de la temperatura debido a la acción de las MNPs. Este aumento se va a correlacionar con el aumento de absorbancia y, por tanto, de la actividad de la HRP.

*Preparación de la muestra.* Se colocan todos los reactivos del ensayo enzimático (enumerados en el apartado 4.2.2) en un vial de 5 ml y se introduce dentro del mismo una sonda que controla la temperatura global. Igual que se ha hecho con el thermoblock, se hace una reacción cada dos minutos y después se mide su absorbancia a 420 nm. En este caso no hace falta enfriar porque se asume que al detener el campo magnético las MNPs dejan de calentar.

*Condiciones de medida.* Se utiliza el equipo de hipertermia magnética seleccionando una frecuencia de 829 kHz y un campo de 252 gauss. Estas condiciones se mantienen fijas para todos los experimentos.

#### **4.2.4 Estabilidad versus temperatura**

Se trata de evaluar la capacidad de la enzima contenida en los nanohíbridos de permanecer inalterada tras permanecer en el buffer de reacción ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 5, 0.1M) en tres condiciones distintas. Después se valora su actividad mediante el ensayo enzimático.

##### **4.2.4.1 Temperatura ambiente (21°C)**

El mantenimiento de la muestra a temperatura ambiente se usa como control positivo. A pesar de que el pH de la solución tampón que se usa en la reacción es distinto del que se usa para su almacenamiento no debería afectar a su estabilidad.

*Fundamento.* Conservar la muestra en solución tampón de reacción a 21°C durante 10 minutos y evaluar su capacidad catalítica después.

*Preparación de la muestra.* Se toman 5  $\mu\text{l}$  de la muestra de nanohíbridos diluida 1:2 y se añaden a un volumen total de 850  $\mu\text{l}$  de buffer de reacción. Se dejan a temperatura ambiente durante 10 minutos.

##### **4.2.4.2 Thermoblock (30°C)**

Este equipo permite mantener los nanohíbridos en la solución tampón a una temperatura seleccionada constante para estudiar su efecto en la estabilidad de la enzima.

*Fundamento.* Debido a que la temperatura global alcanzada al aplicar el campo magnético fue cercana a 30°C, se decide realizar el ensayo de estabilidad a esta temperatura. Con este ensayo se pretende estudiar si lo que le afecta a la actividad de la enzima es la temperatura global de la solución o es la temperatura local generada por el campo magnético.

*Preparación de la muestra.* Se introduce el eppendorf con 850  $\mu$ l de buffer de reacción en el thermoblock a 30°C y se deja 2 minutos. Una vez alcanzada la temperatura adecuada se toman 5  $\mu$ l de la muestra de nanohíbridos diluida 1:2 y se añaden al eppendorf. Se deja 10 minutos en estas condiciones

#### 4.2.4.3 Hipertermia magnética

En este caso la finalidad de la técnica no es conseguir un aumento de la temperatura para optimizar la reacción, sino que se pretende estudiar el efecto directo de la estabilidad térmica de la enzima.

*Fundamento.* Se desea estudiar el efecto de la aplicación del campo magnético únicamente sobre los nanohíbridos para comprobar su estabilidad.

*Preparación de la muestra.* Introducir en un vial de 5 ml los 850  $\mu$ l de solución tampón de reacción y 5  $\mu$ l de muestra de nanohíbridos diluida 1:2. Las condiciones son las mismas que en el ensayo enzimático (829 kHz y 252 gauss).

Una vez aplicadas las tres condiciones durante 10 minutos se mide la funcionalidad de las muestras mediante el ensayo enzimático. Para realizar este paso se siguen dos protocolos. En el primero se utiliza un centrifugador con una membrana de 10K, de forma que sólo deja pasar la solución tampón, quedando los nanohíbridos retenidos. Éstos se recuperan del filtro aplicando un pulso de centrifugación. A continuación, se utilizan para hacer el ensayo enzimático (detallado en el apartado 3.2.2) durante 20 minutos midiendo su absorbancia cada minuto. En el segundo de los protocolos no se utiliza el centrifugador, sino que una vez aplicadas las tres condiciones de estabilidad se utiliza esa misma solución tampón en la que se encuentran las nanopartículas para hacer el ensayo de actividad. Se decidió que este era el mejor método porque al realizar la centrifugación no se puede saber si estás perturbando la muestra o si los nanohíbridos se están quedando retenidos por alguna razón en el filtro.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### CARACTERIZACIÓN

La caracterización magnética de las nanopartículas se puede hacer mediante diversas técnicas. En primer lugar, se determinó la cantidad de hierro que contenía la muestra, considerando que todo el hierro detectado fuera aquél que se había encapsulado. Con la fórmula del apartado 4.2.1.1 se calculó la concentración de hierro en cada muestra:

$$C = \frac{Abs}{\epsilon \cdot l} = \frac{0.298}{11100 M^{-1}cm^{-1} \cdot 1 cm} = 2.68 \cdot 10^{-5} mol/l$$

Después, se aplicaron las diluciones aplicadas. La primera corresponde con los 160µl de muestra añadidos en 2 ml de agua MiliQ y la segunda con los 400µl de muestra añadidos al final en un volumen total de 1.4 ml.

$$2.68 \cdot 10^{-5} \cdot \frac{2}{0.16} \cdot \frac{1.4}{0.4} = 1.17 \cdot 10^{-3} mol/l$$

Por último, se calcularon los gramos de hierro sabiendo que la masa molecular del  $Fe^{+3}$  es 56 g/mol:

$$1.17 \cdot 10^{-3} \frac{mol}{l} \cdot 56 \frac{g}{mol} = 0.06552 \frac{g}{l} = \mathbf{65.52 mg Fe/l}$$

A continuación, se determinó la distribución de tamaño con DLS. Los resultados obtenidos con este método no fueron correctos debido a la alta capacidad de agregación de los nanohíbridos, por tanto se continuó la caracterización con la técnica SEM. En la figura 4 se puede observar la alta capacidad de agregación que presentan estas muestras. Sin embargo, a través de esta técnica sólo se pretendía estudiar el tamaño, ya que el aspecto no es el original porque la preparación de la muestra se debe hacer con agua MiliQ, para evitar la presencia de cristales en la muestra. Todas las nanopartículas que hayan encapsulado las MNPs y HRP deberían tener un tamaño total entre 500 y 600 nm.

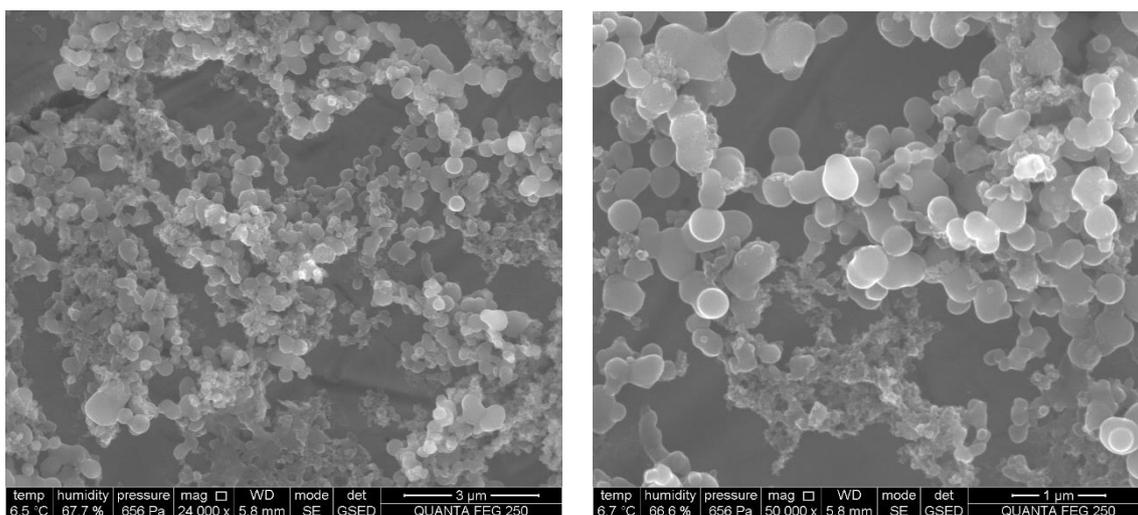


Figura 4: Imágenes de SEM de los híbridos de nanopartículas. La imagen de la izquierda es con 24.000 aumentos y la de la derecha con 50.000 aumentos.

Posteriormente, se comprobó el comportamiento magnético de las nanopartículas de magnetita. Para ello se utilizó la magnetometría SQUID, que va a determinar el momento magnético. En los datos obtenidos, se relacionan la magnetización y el campo aplicado. En la figura 5 se observa que las MNPs tienen un comportamiento superparamagnético, ya que al aplicarles un campo magnético externo (H) su magnetización (M) aumenta hasta alcanzar el valor de saturación de magnetización. Al eliminar ese campo (cuando  $H = 0$ ), la magnetización de las MNPs vuelve a ser 0. Este fenómeno se relaciona con la coercitividad, definida como la intensidad del campo magnético que se debe aplicar a un material para reducir su magnetización a 0 después de que la muestra haya sido magnetizada hasta la saturación. En el caso de los materiales superparamagnéticos el valor de esta propiedad es prácticamente nulo.

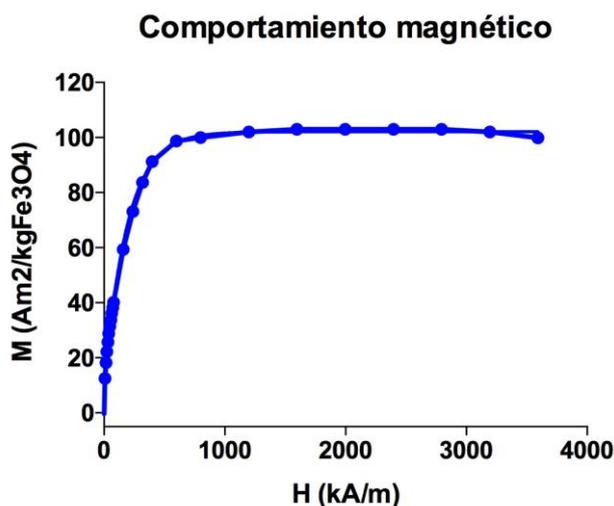


Figura 5: Magnetización dependiente de campo de la muestra 60 kDa. Medidas realizadas a 300K

El valor de saturación de la magnetización obtenido fue de  $99.9 \text{ Am}^2/\text{kg Fe}_3\text{O}_4$ . Se sabe que el valor teórico de la magnetita es de  $90 \text{ Am}^2/\text{kg Fe}_3\text{O}_4$ , por tanto esto corrobora que el dato de hierro obtenido en la determinación es correcto.

## ENSAYO DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

El protocolo de este ensayo fue enviado por un grupo de investigación de la Universidad ORT de Uruguay, sin embargo, hubo que optimizar algunos aspectos.

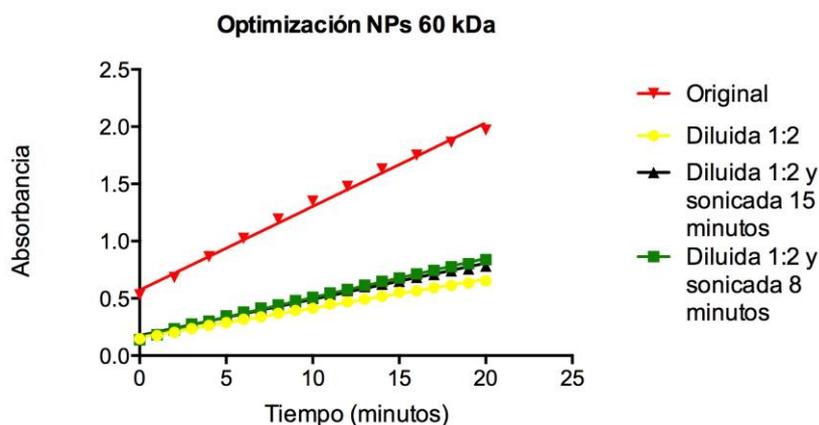


Figura 6: Optimización del ensayo de actividad con distintas condiciones. Medidas realizadas a 21°C.

En primer lugar, siguiendo este protocolo se obtuvo un valor absorbancia por encima de 2 (figura 6), por lo tanto, no sería correcto utilizar la ley de Beer-Lambert para calcular la concentración del ABTS. Por esta razón se decidió diluir la muestra a la mitad. Otro aspecto importante es la agitación de la muestra con ultrasonidos durante distintos tiempos para disminuir la agregación de los nanohíbridos.

La diferencia que existe entre la aplicación de ultrasonidos durante 8 o 15 minutos no es significativa, por lo que se decretó que 8 minutos era suficiente para evitar la agregación, disminuyendo así el daño que podría causar a la muestra e invirtiendo menos tiempo en esta acción.

	<b>Pendiente</b> <b>(Abs/minuto)</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
<b>Original</b>	0.07305	0.943
<b>Diluida</b>	0.02548	0.998
<b>Diluida y agitada con ultrasonidos durante 8 minutos</b>	0.03423	0.998
<b>Diluida y agitada con ultrasonidos durante 15 minutos</b>	0.03162	0.9962

*Tabla 1:* Valores de las pendientes y de R<sup>2</sup> correspondientes a la figura

Al observar los resultados de la figura 6 y de la tabla 1 se decidió que lo mejor era **diluir la muestra de NPs 60 kDa a la mitad y agitarla con ultrasonidos durante 8 minutos**.

Al realizar la dilución de la muestra se obtuvieron 1.05 µg enzima/ mg nanohíbrido. Sin embargo, toda la que se encapsula no tiene por qué ser capaz de catalizar la reacción. Por ello, tras haber decidido las condiciones óptimas a 21°C de manera experimental, se calcularon las **unidades de enzima (UE)** de la muestra:

$$C = \frac{\Delta \text{Abs} \cdot V_F}{\Delta \text{tiempo} \cdot \epsilon_{420 \text{ nm}} \cdot l} = \frac{0.03423 \frac{\text{abs}}{\text{min}} \cdot 1.005 \cdot 10^{-3} \text{ L}}{36000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \cdot 1 \text{ cm}}$$

$$= 9.56 \cdot 10^{-10} \frac{\text{mol sustrato}}{\text{minuto}} \cdot 10^6 = 9.56 \cdot 10^{-4} \text{ UE}$$

Después, se calculó la **actividad enzimática volumétrica**:

$$\frac{\text{UE} \cdot \text{Factor de dilución de la enzima}}{V_{\text{enzima}}} = \frac{9.56 \cdot 10^{-4} \cdot 2}{5 \cdot 10^{-6}} = \mathbf{382.2 \text{ UE/ml}_{\text{enzima}}}$$

Tras haber optimizado el ensayo con los nanohíbridos se pasó a comparar con otros nanohíbridos sintetizados con un PEI de distinto peso molecular.

En función del peso molecular del PEI que se ha utilizado para su síntesis la absorbancia varía, siendo esta menor cuanto mayor es el peso molecular (figura 7). Esto se puede deber a que a mayor peso molecular, la red que se forma entre los distintos componentes es más densa y por tanto el paso del sustrato al interior de los nanohíbridos está más dificultado. A pesar de tener una menor actividad, se decidió trabajar con la muestra cuyo PEI tiene un peso molecular de 60 kDa, para compararla con otra muestra cuyos resultados se estaban obteniendo en el laboratorio de la Universidad ORT de Uruguay.

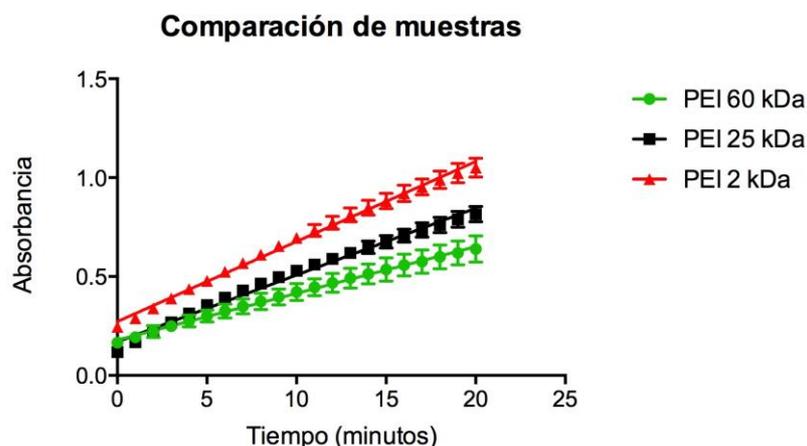


Figura 7: Absorbancia de las diferentes muestras durante 20 minutos. Medidas realizadas a 21°C.

El principal problema del que se parte en este proyecto es que sólo se puede medir la temperatura global de la muestra, pero no es posible medir el calor que se está generando por las MNPs en el interior de los nanohíbridos. Por esta razón, lo que se hizo fue comparar la actividad de la muestra a distintas temperaturas globales con la actividad tras haber aplicado el campo magnético externo. De esta forma se supone que dicha actividad sería igual si el calor generado en el interior es el mismo que el de la muestra entera.

En primer lugar, se estableció un perfil de temperaturas desde 21°C hasta 55°C y se midió su actividad. Conforme aumenta la temperatura, la variación de la absorbancia respecto del tiempo también aumenta (figura 8). La actividad de la enzima a 55°C aguanta solamente 6 minutos y a partir de ahí se considera que se desnaturaliza la HRP y pierde su actividad.

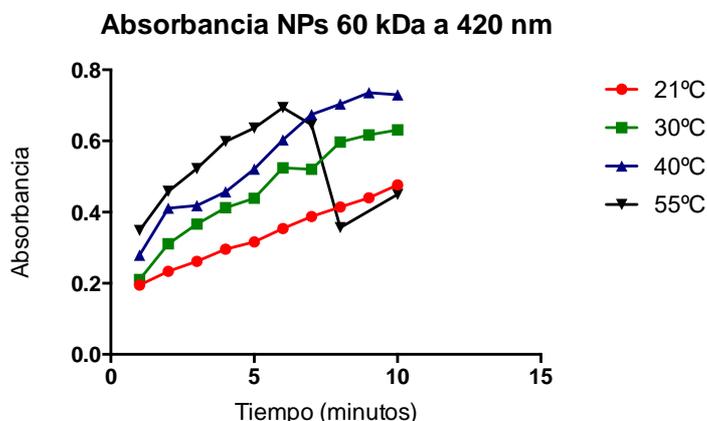


Figura 8: Absorbancia de las NPs con PEI 60 kDa, diluidas 1:2, durante 10 minutos a distintas temperaturas.

Se debe tener en cuenta que la optimización del ensayo se hizo a 21°C, por tanto al aumentar la temperatura hay un momento en que los valores de la absorbancia no son lineales. Para evitar esto se hizo tratamiento de datos (figura 9). Además, debido al mismo hecho se determinó que la zona lineal quedaba determinada en los 8 primeros minutos.

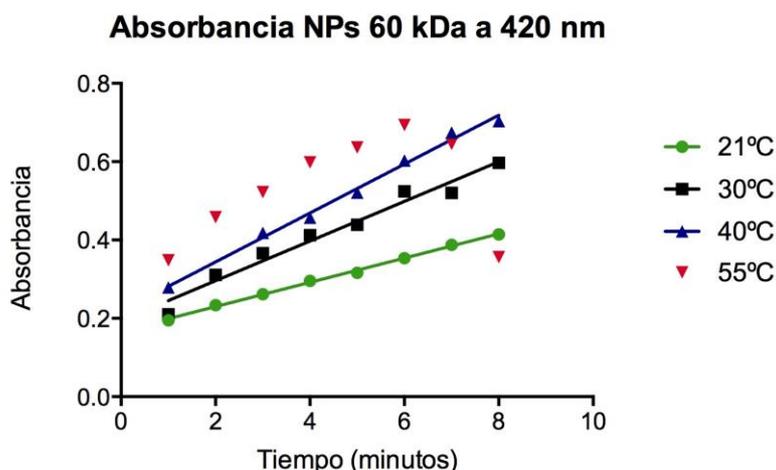


Figura 9: Tratamiento de los datos observados en la figura 5.

La pendiente obtenida de la muestra a 55°C no se pudo ajustar linealmente (tabla 2) debido a que a partir de los 6 minutos la actividad comienza a caer. Sin embargo, se realizó este ajuste para compararla con el resto de muestras.

	Pendiente (Abs/minuto)	R <sup>2</sup>
21 °C	0.03096	0.9975
30 °C	0.05064	0.9670
40 °C	0.06245	0.9926
55 °C	0.01842	0.1146

Tabla 2: Valores de las pendientes y de R<sup>2</sup> correspondientes a la figura 8

Con los valores obtenidos de absorbancia/minuto para cada una de las temperaturas se representaron los valores de las pendientes (figura 10). Se observó que el valor máximo es alrededor de 40°C, que corresponde con una aproximación de la temperatura óptima.

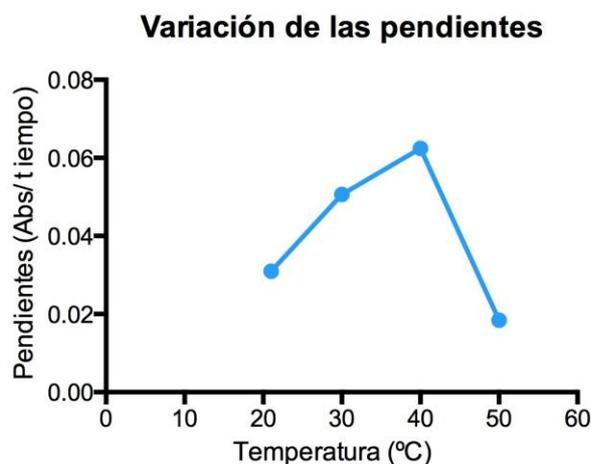


Figura 10: Representación del valor de la pendiente (absorbancia/tiempo) a cada temperatura.

Tras conocer el perfil de actividad de la HRP, se sometió la muestra NPs 60 kDa a un campo magnético alterno externo (829 kHz y 252 gauss), para comprobar la efectividad de calentamiento de las MNPs. En la figura 11 se visualiza un aumento de absorbancia que se podría asociar al calentamiento generado por las MNPs. De la misma manera que para el ensayo con el thermoblock, al principio se tomaron medidas durante 20 minutos. No obstante, debido a que a tiempos mayores la variación era mayor y que con 10 minutos de reacción era suficiente, se decidió medir sólo durante este tiempo.

### Absorbancia tras aplicar un campo magnético alterno

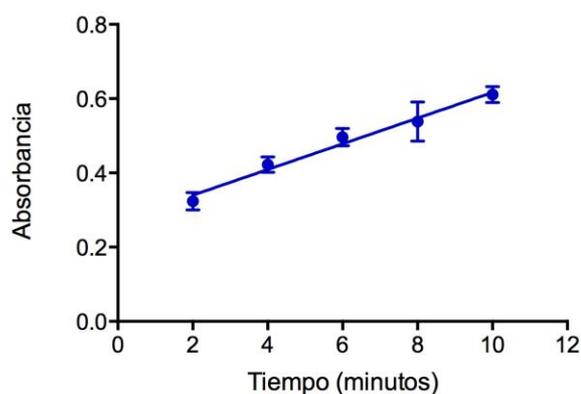


Figura 11: Triplicado de los valores de absorbancia tras aplicación de un campo magnético alterno.

Al compararlo con la absorbancia obtenida al usar el thermoblock se observó que el perfil de actividad con hipertermia (una vez tratados los datos) es igual que el del thermoblock a 30°C (figura 12 y tabla 4).

### Comparación Thermoblock e Hipertermia magnética

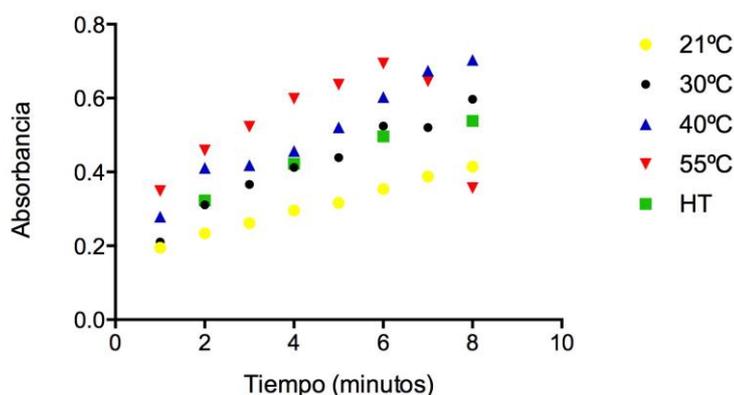
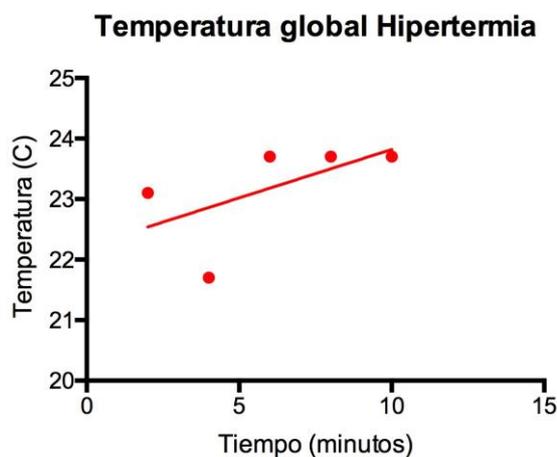


Figura 12: Valores de absorbancia con aplicación de hipertermia magnética y thermoblock.

	$\Delta\text{Abs}/\Delta\text{Tiempo}$	$R^2$	Actividad (UE/ml)
<b>21°C</b>	0.03096	0.9975	345.72
<b>30°C</b>	0.05064	0.9670	565.48
<b>40°C</b>	0.06245	0.9926	697.36
<b>55°C</b>	0.01842	0.1146	-
<b>HT</b>	0.0346	0.9819	386.37

Tabla 4: Valores de las pendientes,  $R^2$  y actividad correspondientes a la figura 12. Para el cálculo de la actividad se utiliza la fórmula del apartado 4.2.2.

En principio podría parecer que las MNPs están generando calor. Sin embargo, durante la aplicación del campo magnético también se genera un calentamiento global de la muestra. Teniendo en cuenta esta temperatura global (figura 13) se podría deducir que en este caso el aumento de absorbancia no ha sido tanto por el calor local generado por las MNPs, sino más bien por el calor global alcanzado.



*Figura 13:* Medida, para cada tiempo de reacción, de la temperatura global media alcanzada en durante aplicación del campo magnético. Condiciones: 829 kHz y 252 gauss.

Realizando el análisis de todos los datos obtenidos con ambas técnicas se puede decir que la actividad enzimática al aplicarle el campo magnético no era tan elevada como se esperaba. Esto se podía deber a dos causas: o las MNPs no eran capaces de generar suficiente calor y entonces la enzima no alcanzaba su temperatura óptima o, por el contrario, las MNPs estaban generando demasiado calor y la enzima sufría desnaturalización, no pudiendo adquirir así su óptima actividad.

## ENSAYO DE ESTABILIDAD

Tras la obtención de los datos anteriormente explicados, se decidió hacer un experimento de estabilidad con el objetivo de comprobar cómo estaban afectando los distintos cambios de temperatura a la muestra. Para ellos, se decidió comparar el estado de la muestra tras someterla a unas condiciones a temperatura ambiente y a 30°C obtenidas de manera diferente (thermoblock e hipertermia). Se seleccionó esta temperatura porque era más o menos la que se alcanzaba de manera global en el ensayo de hipertermia magnética. Después de haber aplicado las tres condiciones (una condición a cada alícuota) durante 10 minutos se sometió a estas 3 muestras al ensayo de actividad.

Se observa claramente en la figura 14 que el campo magnético estaba dañando la muestra y que tras su aplicación la enzima ya no era capaz de catalizar la reacción de oxidación del ABTS para dar color.

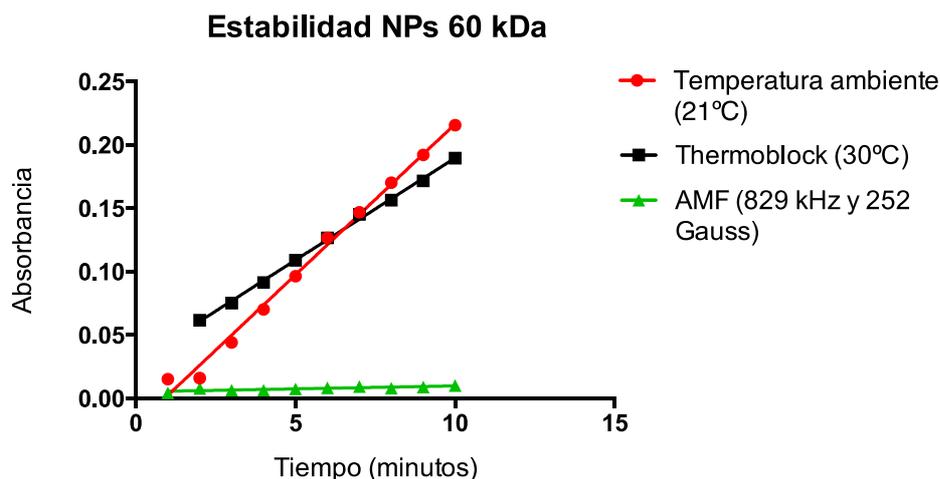


Figura 14: Absorbancia de 3 muestras de NPs de 60 kDa obtenidas tras aplicarles las 3 condiciones diferentes: temperatura ambiente, thermoblock 30°C y AMF (campo magnético alterno).

Tras comprobar que el problema principal es la estabilidad térmica de la muestra se decidió hacer una prueba con otra muestra, cuyo PEI tiene un peso molecular de 1.3 kDa. Esta muestra sí que era capaz de soportar las condiciones del campo magnético y alcanzar una mayor actividad.

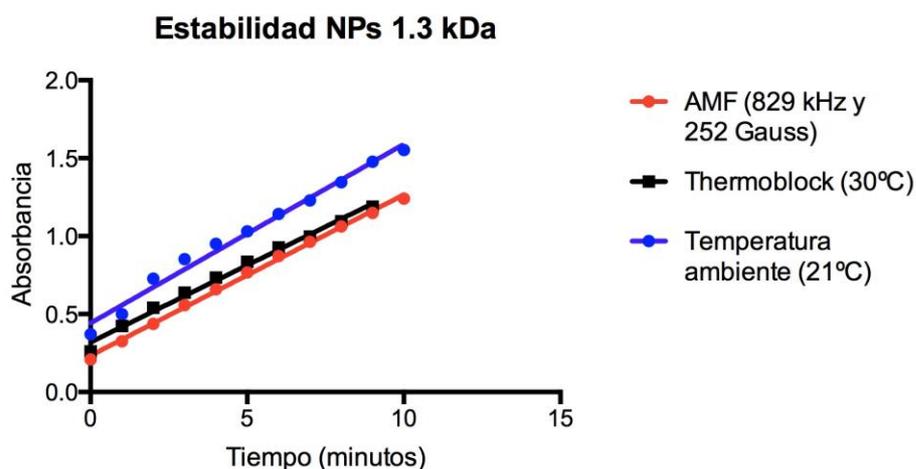


Figura 15: Absorbancia de 3 muestras de NPs de 1.3 kDa obtenidas tras aplicarles las 3 condiciones diferentes (temperatura ambiente, thermoblock 30°C y AMF).

Con la comparación de ambas muestras se podría decir que las NPs de 60 kDa no aguantan las condiciones de hipertermia magnética a la que son sometidas. Esto podría deberse a la diferencia en el peso molecular del PEI, ya que de la misma manera que afectaba a la actividad de la enzima (figura 7) podría afectar también a la estabilidad de la muestra. Para confirmar esto se debería seguir trabajando con esta muestra y probar unas condiciones de hipertermia magnética menos agresivas.

## 6. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones obtenidas tras realizar el análisis de los resultados son:

1. Las nanoestructuras híbridas sintetizadas son capaces de internalizar el sustrato y catalizar la reacción de oxidación del ABTS.
2. El aumento de la temperatura global proporciona un aumento de la actividad de la HRP internalizada en los nanohíbridos, hasta una determinada temperatura.
3. Las MNPs comerciales de Chemicell son capaces de generar calor al aplicarles un campo magnético alterno externo produciendo una elevación de la temperatura en el interior del nanohíbrido.
4. Debido a que la estabilidad térmica de los nanohíbridos es importante, es necesario encontrar el campo y la frecuencia óptima para el ensayo de actividad con hipertermia magnética.

## 6. CONCLUSIONS

Main conclusions obtained after analyzing all the results are:

1. Nanohybrids are capable to internalize the substrate and catalyze oxidation of ABTS.
2. The global temperature increasing provides an increasing in the HRP activity that is inside the nanohybrids, since a determined temperature.
3. Commercial Chemicell MNPs are able to generate enough heat when an alternating magnetic field is applied, producing a temperature rise inside the nanohybrid.
4. As the nanohybrid thermal stability is important, it is necessary to find optimal field and frequency to perform the activity assay with magnetic hyperthermia.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- [1] E. Roduner, “Size matters: why nanomaterials are different,” *Chem. Soc. Rev.*, vol. 35, no. 7, p. 583, 2006.
- [2] E. Jackson *et al.*, “Protein-templated biomimetic silica nanoparticles,” *Langmuir*, vol. 31, no. 12, pp. 3687–3695, 2015.
- [3] G. M. Whitesides, “The ‘right’ size in nanobiotechnology,” *Nat. Biotechnol.*, vol. 21, no. 10, pp. 1161–1165, 2003.
- [4] M. Ramos and C. Castillo, “Aplicaciones biomédicas de las nanopartículas magnéticas,” no. 72, pp. 629–646, 2011.
- [5] M. Gi, V. Gallardo, and A. JI, “ARTÍCULO ORIGINAL Teragnosis : un nuevo concepto en el tratamiento del cáncer Theragnosis : a new concept in cancer treatment,” pp. 177–181, 2010.
- [6] G. Glöckl, R. Hergt, M. Zeisberger, S. Dutz, S. Nagel, and W. Weitschies, “The effect of field parameters, nanoparticle properties and immobilization on the specific heating power in magnetic particle hyperthermia,” *J. Phys. Condens. Matter*, vol. 18, no. 38, pp. S2935–S2949, 2006.
- [7] T. Neuberger, B. Schöpf, H. Hofmann, M. Hofmann, and B. Von Rechenberg, “Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications: Possibilities and limitations of a new drug delivery system,” *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. 293, no. 1, pp. 483–496, 2005.
- [8] Q. A. Pankhurst, J. Connolly, S. K. Jones, and J. Dobson, “Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine,” *J. Phys. D. Appl. Phys.*, vol. 36, no. 13, pp. R167–R181, 2003.
- [9] R. M. Fratila, S. Rivera-Fernández, and J. M. de la Fuente, “Shape matters: synthesis and biomedical applications of high aspect ratio magnetic nanomaterials,” *Nanoscale*, vol. 7, no. 18, pp. 8233–8260, 2015.
- [10] N. Schellmann, P. M. Deckert, D. Bachran, H. Fuchs, and C. Bachran, “Targeted enzyme prodrug therapies.,” *Mini Rev. Med. Chem.*, vol. 10, no. 10, pp. 887–904, 2010.
- [11] L. Asín, “Tesis Doctoral BIOMEDICAL APPLICATIONS OF MAGNETIC NANOPARTICLES : MAGNETIC HYPERTHERMIA IN DENDRITIC CELLS AND MAGNETOFECTION IN BRAIN CELLS,” 2012.
- [12] C. S. S. R. Kumar and F. Mohammad, “Magnetic nanomaterials for hyperthermia-

- based therapy and controlled drug delivery,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 63, no. 9, pp. 789–808, 2011.
- [13] R. J. Deissler, Y. Wu, and M. A. Martens, “Dependence of Brownian and Néel relaxation times on magnetic field strength,” *Med. Phys.*, vol. 41, no. 1, p. 12301, 2013.
- [14] R. M. Fratila, S. G. Mitchell, P. Del Pino, V. Grazu, and J. M. De La Fuente, “Strategies for the biofunctionalization of gold and iron oxide nanoparticles,” *Langmuir*, vol. 30, no. 50, pp. 15057–15071, 2014.
- [15] B. Thiesen and A. Jordan, “Clinical applications of magnetic nanoparticles for hyperthermia,” *Int. J. Hyperth.*, vol. 24, no. 6, pp. 467–474, 2008.
- [16] X. Cao, C. Chen, H. Yu, and P. Wang, “Horseradish peroxidase-encapsulated chitosan nanoparticles for enzyme-prodrug cancer therapy,” *Biotechnol. Lett.*, vol. 37, no. 1, pp. 81–88, 2015.
- [17] R. C. Pimentel and E. S. Martín-martínez, “Dispersión de luz dinámica en la determinación de tamaño de nanopartículas poliméricas,” *Lat. Am. J. Phys. Educ.*, vol. 8, pp. 1–5, 2014.