

TRABAJO FIN DE GRADO

**DESARROLLO DE UN SISTEMA DE VEHICULIZACIÓN PARA LA
ADMINISTRACIÓN ORAL DE BIOMOLÉCULAS Y SU LIBERACIÓN CONTROLADA
MEDIANTE CAMBIO DE pH**

Autora: Alba Pérez Martínez

Tutor académico: Felipe Hornos Adán

Co-tutora: Rocío Esquembre Tomé

Departamento de Agroquímica y Medio Ambiente

Área de Química Física

Instituto de Biología Molecular y Celular (IBMC)

Grado en Biotecnología

Facultad de Ciencias Experimentales

Curso académico 2017/2018

ÍNDICE

RESUMEN/ABSTRACT	1
INTRODUCCIÓN	2
- NANOPARTÍCULAS Al ₂ O ₃	5
- PVSA.....	6
- ISOTERMA DE LANGMUIR.....	6
- PROTEÍNAS MODELO.....	9
ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	12
- ANTECEDENTES.....	12
- OBJETIVO GENERAL.....	13
- OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
MATERIALES Y MÉTODOS	14
- SÍNTESIS DE NPs RECUBIERTAS POR PVSA.....	14
- LAVADOS PARA ELIMINAR EL EXCESO DE PVSA.....	14
- CARACTERIZACIÓN DE LAS NPs DESNUDAS Y RECUBIERTAS POR DLS.....	14
- CUANTIFICACIÓN DE LAS NPs RECUBIERTAS.....	15
- PREPARACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA.....	15
- CAPACIDAD DE ADSORCIÓN MÁXIMA DE PROTEÍNA EN LA SUPERFICIE DE LAS NPs RECUBIERTAS	16
- DESORCIÓN DE LA PROTEÍNA DE LA SUPERFICIE DE LAS NPs.....	17
- CARACTERIZACIÓN DE LA β-LG TRAS SER DESORBIDA DE LA SUPERFICIE.....	29
RESULTADOS	20
- CARACTERIZACIÓN DE NPs@PVSA.....	20
- Síntesis y recubrimiento.....	20
- Adsorción de lisozima a pH 1,5.....	20
- Desorción de lisozima mediante PE competidor a pH 1,5.....	21
- Adsorción de lisozima a pH 7 y distintos niveles de fuerza iónica.....	22
- CARACTERIZACIÓN DE LAS NPs@PVSA CON UNA PROTEÍNA ANÁLOGA A LA INSULINA.....	25
- Adsorción de β-lactoglobulina a pH 1,5.....	25
- Desorción de β-lactoglobulina por PE competidor a pH 1,5.....	26
- Desorción de β-lactoglobulina por cambio de pH.....	26
- Desorción de β-lactoglobulina por PE competidor y cambio de pH.....	26
- ESTABILIDAD DE LA β-LG TRAS SER DESORBIDA DE LA SUPERFICIE.....	37
DISCUSIÓN	29
- CARACTERIZACIÓN DE NPs@PVSA.....	29
- Síntesis y recubrimiento.....	29
- Adsorción de lisozima a pH 1,5.....	29
- Desorción de lisozima mediante PE competidor a pH 1,5.....	29
- Adsorción de lisozima a pH 7 y distintos niveles de Fuerza iónica.....	30
- CARACTERIZACIÓN DE LAS NPs@PVSA CON UNA PROTEÍNA ANÁLOGA A LA INSULINA.....	32
- Adsorción de β-lactoglobulina a pH 1,5.....	32
- Desorción de β-lactoglobulina por PE competidor a pH 1,5.....	32
- Desorción de β-lactoglobulina por cambio de pH.....	32
- Desorción de β-lactoglobulina por PE competidor y cambio de pH.....	33
- ESTABILIDAD DE LA β-LG TRAS SER DESORBIDA DE LA SUPERFICIE.....	33
CONCLUSIONES	34
PROYECCIÓN FUTURA	35
BIBLIOGRAFÍA	36

RESUMEN

En la actualidad, el uso de nanopartículas en investigación está creciendo, debido a su gran aplicabilidad en biotecnología, concretamente en la biomedicina, desde el tratamiento del cáncer focalizado, hasta su uso como sistemas vehiculadores de fármacos. Respecto a este punto, la vehiculización eficaz de fármacos en el tracto digestivo se hace necesaria cuando hablamos de las distintas barreras que opone el estómago a las sustancias exógenas. Debido a esto, fármacos como la insulina todavía no pueden ser administradas oralmente en pacientes diabéticos. En este trabajo, se han usado nanopartículas de alúmina (Al_2O_3) recubiertas por un polielectrolito aniónico, poli-vinil-sulfonato (PVSA), para desarrollar un método que nos permita vehicular la insulina hasta el interior del tracto digestivo, donde debe ser capaz de superar barreras tales como el ataque de las proteasas o el pH ácido presente en el estómago. Tras caracterizar las nanopartículas recubiertas usando una proteína modelo como la lisozima mediante su adsorción y posterior desorción de la superficie en diferentes condiciones, se usó la proteína β -lactoglobulina por presentar un punto isoeléctrico similar a la insulina. De esta forma, se supone que la liberación va a ser posible debido a las diferencias de pH del estómago y del tracto digestivo (1,5 frente a 7). Los resultados muestran que tras adsorber 0,5 mg/ml de β -lactoglobulina a pH 1,5, somos capaces de recuperar un 74 % de la proteína como consecuencia del aumento de pH hasta valores fisiológicos (pH 7).

ABSTRACT

In the last few years, there is an unprecedented increase in the use of nanoparticles in biotechnology, especially in biomedicine, being the treatment of localized cancer or their use as drug carrier only two examples. In this respect, the effective transport of drugs in the digestive tract becomes necessary in order to overcome the barriers that the stomach opposes to exogenous substances. Because of this, drugs such as insulin cannot yet be administered orally to diabetic patients. In this work, alumina nanoparticles (Al_2O_3) coated by an anionic polyelectrolyte (polyvinylsulfonate, PVSA) have been obtained with the objective of developing a new method for the transport of insulin to the interior of the digestive tract. The long-term goal of the research presented here is to avoid the hormone degradation due to the harsh conditions found in the stomach (both low pH and the presence of proteases). Both the adsorption and pH-induced desorption of the model protein lysozyme have been studied under different pH and ionic strength conditions. Finally, these studies have been extended to β -lactoglobulin due to its similar isoelectric point, pI. At the stomach pH, insulin, being below its pI is positively charged and therefore readily adsorbs to the NPs. At pH 1,5 and in the absence of salt, 0,5 mg of β -lactoglobulin become adsorbed to 1 mg of PVSA-coated Al_2O_3 NPs. When pH is changed from pH 1,5 to pH 7 (similar to the pH of the intestine), the protein becomes charged negatively and its desorption is induced due to repulsive electrostatic interactions with the coated NP. Our results show that after adsorbing 0,5 mg of β -lactoglobulin per mg of NP at pH 1,5, the pH-jump to pH 7 resulted in the desorption of 74% of the protein.

Palabras clave: *Nanopartículas de Al_2O_3 , polielectrolito, β -lactoglobulina, PVSA, PDADMACI, o-TB.*

INTRODUCCIÓN

A pesar de los grandes avances en investigación que se están desarrollando sobre el tratamiento de enfermedades, así como la síntesis de fármacos, sus mecanismos de actuación, de liberación, etc. todavía existen algunas enfermedades que no pueden ser tratadas a través de la administración de un fármaco por vía oral debido a la naturaleza del mismo. Un ejemplo de ello es la insulina que se utiliza para tratar pacientes con diabetes o también algunas vacunas comúnmente utilizadas, ya que debido al bajo pH del estómago y a la acción de las proteasas presentes en el mismo, como la pepsina, estos fármacos no serían capaces de pasar estas barreras adecuadamente, destruyéndose o haciendo que se pierda su conformación y con ello su función biológica. Por ello, la vía intramuscular o subcutánea constituye la forma principal en que se administran estos fármacos, quedando alojados en el tejido celular subcutáneo y siendo absorbido lentamente al torrente sanguíneo y distribuido por el organismo.

Centrándonos en aquellos pacientes diabéticos que diariamente deben inyectarse insulina, este tipo de administración, causa algunos efectos secundarios no deseados tras ser administrados de forma repetida. Por un lado, puede ocurrir una inflamación de la zona de inyección subcutánea, que, aunque se recomienda que se vaya rotando el lugar del cuerpo donde se realiza la inyección, tras muchos años realizándose día tras día, esto puede desencadenar inflamaciones que conducen habitualmente a una absorción de insulina deficiente, y por lo tanto, a niveles de glucosa en sangre mal controlados que pudieran derivar en cetoacidosis, una enfermedad que pone en riesgo la vida de los pacientes diabéticos (1). Por otro lado, puede ocurrir lo que se conoce como lipohipertrofia, una acumulación de grasa en la zona de inyección subcutánea que posteriormente se endurece y produce la acumulación de tejido cicatricial, esto llevará a una mala o nula absorción del fármaco en esa zona subcutánea, haciendo entonces imposible la administración de este en dicha zona (2).

La insulina es una hormona polipeptídica, producida y secretada por las células beta de los islotes de Langerhans del páncreas, y su función principal en el organismo es la de regular la cantidad de glucosa en sangre. Como proteína, está formada por dos cadenas, llamadas A y B, que tienen 21 y 30 residuos respectivamente. Ambas cadenas se encuentran unidas por 2 puentes disulfuro entre 4 residuos de cisteína presentes en su cadena y otro puente disulfuro estabiliza la estructura de la cadena A entre dos cisteínas cercanas. Su estructura secundaria está compuesta por hélices- α , y su pI (punto isoeléctrico, definido como el pH donde su carga es nula) es de 5,4 aproximadamente (Fig. 1).

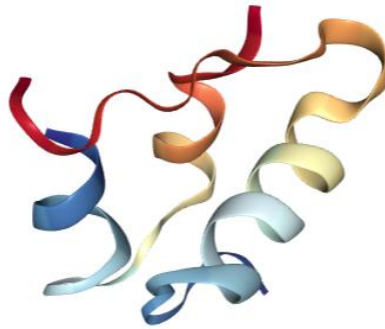


Figura 1. Representación de la Insulina en cartoon. Imagen obtenida de Protein Data Bank (PDB, código: 3I3Z)

Es una proteína bastante inestable en el organismo, por su facilidad de agregación y/o desplegamiento, por lo que también puede tener contraindicaciones como lo es la formación de fibras de tipo amiloide que se produce a pH ácido (pH 2,5). Estas fibras amiloides son estructuras muy ordenadas de aspecto rígido y de longitud variable, pero con diámetro en el orden de los 75 a los 120 Å, que se forman como resultado de la agregación, es decir, la asociación de varias proteínas o pequeños péptidos llamados precursores amiloides (Fig. 2), que se van asociando entre ellos y creando estas estructuras rígidas que quedan acumuladas en forma de fibrillas por estar expuestas a un pH muy bajo, que hace cambiar sus cargas superficiales, y promueve la asociación entre ellas para aumentar su estabilidad estructural (3, 4). Esto suele conllevar como en el resto de casos a una mala o nula asimilación del fármaco, lo que supone una complicación para los pacientes que sufren diabetes crónica.

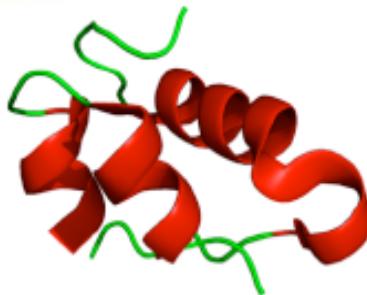


Figura 2. Representación en cartoon del precursor amiloide de la insulina. Imagen obtenida de (5) (PDB: 2C8Q)

Las fibras amiloides, por su lado, son responsables de enfermedades como el Alzheimer, la demencia senil, carcinoma medular, etc. lo cual pueden suponer una mayor complicación para los pacientes con diabetes (5).

Respecto a esta proteína, se han realizado numerosos estudios (6-8) para el desarrollo de un mecanismo que permita la administración oral de la insulina, y de esta forma facilitar su

administración a los pacientes diabéticos y evitar así todos los efectos adversos anteriormente mencionados que derivan de estas inyecciones subcutáneas continuadas. Esta molécula debe ser capaz de superar varios obstáculos en el tracto gastrointestinal, tales como la baja permeabilidad, la falta de lipofilia y la inactivación o degradación enzimática rápida por las proteasas presentes en el estómago. Para ello, se han desarrollado fórmulas basadas en el uso de excipientes específicos, como potenciadores de la absorción, inhibidores de enzimas y polímeros mucoadhesivos (9).

Como consecuencia del problema descrito anteriormente y de muchos otros existentes, la nanotecnología se está abriendo paso muy fuertemente en este campo para intentar ofrecer, tanto alternativas como soluciones, además de otras muchas aplicaciones en otros campos como la fabricación de tejidos, el procesamiento de alimentos y agrícola o la ingeniería (10). Esta rama de la ciencia y la investigación se caracteriza, como su propio nombre indica, por el uso de materiales a escala nanométrica, permitiendo trabajar, diseñar y manipular la materia a nivel de átomos y moléculas. Esto abre un campo de posibilidades grandísimo, ya que ofrece ventajas a la hora de investigar tratamientos mucho más focalizados en el organismo, es decir, que van dirigidos directamente al lugar del cuerpo o al foco, donde se quiere tratar la enfermedad.

Un ejemplo es el uso de **nanopartículas**, unas pequeñas esferas que pueden estar compuestas de distintos materiales y que tienen un diámetro inferior a las mil milésimas de metro. Estas tienen un gran potencial como vehículo para transportar fármacos que mejoren la selectividad del tratamiento, haciendo posible una mayor focalización hacia la diana de acción de dicho fármaco.

Actualmente, debido a su gran interés, se están investigando sus posibles aplicaciones en diferentes campos desde el tratamiento de aguas y fangos (10, 11) hasta las aplicaciones médicas donde poco a poco se van desarrollando diferentes procedimientos para aumentar la calidad de vida de personas enfermas que deben administrarse distintos fármacos vía intramuscular o subcutánea como por ejemplo la insulina.

De todas las estrategias propuestas para administrar insulina por vía oral, la microencapsulación o la nanoencapsulación son los enfoques más prometedores debido a que estas técnicas son capaces de proteger la insulina de la degradación enzimática en el estómago, liberar por cambio de pH la proteína con efectividad cuando alcanzan el intestino, mantener la actividad biológica y mejorar la permeación intestinal (12). Un ejemplo de la utilización de estas estrategias se encuentra en el ácido poli (D,L-lactico-co-glicólico) (PLGA), un polímero biodegradable sintético utilizado como

recubrimiento de nanopartículas con el fin de hacerlas más compatibles con el organismo y permitir el transporte de la insulina y otras moléculas similares hasta su diana de acción (13).

Dado el interés en administrar la insulina por vía oral, proponemos un sistema compuesto por nanopartículas (NPs) de alúmina (Al_2O_3) recubiertas de polielectrolito (PE) como el poli-vinil-sulfonato (PVSA), (NPs@PVSA), sobre el que podría llevarse a cabo la vehiculización de esta biomolécula como la Insulina, haciendo posible la administración por vía oral.

Nanopartículas de Alúmina

Estas nanopartículas, son ampliamente estudiadas por sus múltiples aplicaciones en la biotecnología, biomedicina, en la ciencia ambiental (11, 14) e incluso la industria (15) entre otras disciplinas. Un ejemplo de estas aplicaciones es el estudio de su acción bactericida que se ha hecho frente β -lactamasas y metalo- β -lactamasas como el microorganismo llamado *Pseudomonas aeruginosa*, el cual es resistente a muchísimos antibióticos y antimicrobianos y se ha estudiado la capacidad de estas nanopartículas de alúmina de eliminarlos, ya que inhiben su crecimiento uniéndose a su superficie y causando deformidades estructurales, e incluso entran al interior celular cruzando la membrana, haciendo que pierda su integridad, y causando así un estrés oxidativo en la célula, eliminando estos microorganismos que son resistentes a múltiples fármacos antibióticos, y siendo esta una buena alternativa para el tratamiento de infecciones de este tipo de microorganismos (16).

Las nanopartículas de Al_2O_3 tienen un punto isoeléctrico de 9 aproximadamente (17) y son las más utilizadas en el campo de la biomedicina, en especial por ser las que presentan una menor toxicidad en comparación con otros tipos de nanopartículas de óxido metálico estudiadas, que en cambio, sí pueden presentar un mayor riesgo a la hora de administrarlos en el interior del organismo, como pueden ser las de CeO_2 , TiO_2 , SiO_2 y ZnO (10, 18, 19). A pesar de esto, las nanopartículas de alúmina producen agregación a una determinada concentración, haciendo que el sistema inmune las reconozca como sustancias extrañas al organismo e intentando eliminarlas (20, 21). Una posible solución planteada por numerosos autores para estabilizar coloidalmente las nanopartículas, (entendiendo por estabilidad coloidal el equilibrio resultante entre fuerzas atractivas y repulsivas de las nanopartículas, siendo mayor cuanto mayor sean las fuerzas repulsivas (22)) es recubrirlas con un polielectrolito (23) el cual puede definirse como un polímero que contiene grupos ionizables en cada uno de sus monómeros, los cuales pueden estar total o parcialmente disociados en disolución presentando una elevada carga superficial, lo que nos permitirá unir proteínas a la superficie con carga neta opuesta mediante interacción electrostática.

Además, a la hora de adsorber la proteína que queremos vehicular a la superficie sólida de la nanopartícula, éstas podrían causar agregación entre ellas tal y como ocurre en otros estudios realizados con nanopartículas de sílice al adsorber proteínas como la lisozima (LZM) en su superficie (24) por ello, optamos por llevar a cabo el recubrimiento con un polielectrolito aniónico, el PVSA, que al presentar una mayor flexibilidad en su estructura, ayudan a que las moléculas de proteína no se sometan a la curvatura de la superficie, encontrando que a pesar del contacto con el polielectrolito, éstas no cambian su conformación.

Poli-vinil-sulfonato (PVSA)

En este trabajo, se realiza el recubrimiento de la superficie de estas nanopartículas con un polielectrolito como el PVSA, el cual también es ampliamente estudiado por sus diferentes aplicaciones, desde el recubrimiento de nanopartículas de plata para hacerlas menos tóxicas para el organismo (25), hasta su descubrimiento como el biomimético más fuerte de la heparina en su capacidad para potenciar la unión del factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) a células que expresan receptores para ellos (26).

Este polielectrolito le confiere en este caso carga negativa en la superficie de nuestras NPs, gracias a su naturaleza, e independientemente del pH al que se encuentre. De hecho, el grupo sulfonato, tiene un pKa de 0,7 (27). El PE está compuesto por una cadena de hidrocarburos con ramificaciones de azufre unido a oxígenos, los cuales cuentan con un electrón desapareado que se encuentra deslocalizado, y que lo dota de la carga negativa que nos interesa (Fig. 3).

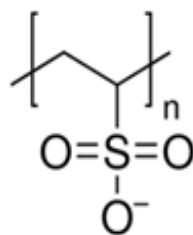


Figura 3. Estructura del monómero de poli-vinil-sulfonato (PVSA) obtenida de Sigma Aldrich.

Isoterma de Langmuir

Para caracterizar la capacidad de adsorción de las nanopartículas, nos basaremos en la isoterma de Langmuir (28) (Fig. 4), la cual nos relaciona el grado de cobertura de la superficie, con la concentración de la molécula que se desea adsorber a ella.

La isoterma de Langmuir incluye el término grado de recubrimiento o capacidad de adsorción de la superficie, θ . Este factor relaciona la cantidad de moléculas adsorbidas a la superficie frente al total de posiciones de adsorción presentes en esta. De tal manera que:

$$q = \frac{(m_{prot})_{adsorbida}}{m_{NP}}$$

La isoterma de Langmuir se puede definir entonces mediante la siguiente ecuación:

$$\theta = \frac{q}{Q_{m\acute{a}x}} = \frac{K_a \cdot [P]}{1 + K_a \cdot [P]}$$

siendo q la masa de la especie adsorbida por unidad de masa de nanopartícula, $Q_{m\acute{a}x}$ el recubrimiento máximo, $[P]$ la concentración de la proteína y K_a la constante de equilibrio de la reacción que se da al adsorber la proteína a la superficie y en la que se forma el complejo superficie-proteína:



Esta reacción estará regida por dos constantes, la de asociación, K_a , si nos fijamos en la reacción de izquierda a derecha, es decir, si estamos viendo el grado en que se asocian ambos miembros, y la de disociación, K_d , si nos fijamos en la reacción contraria, en la que se separan o disocian ambos miembros.

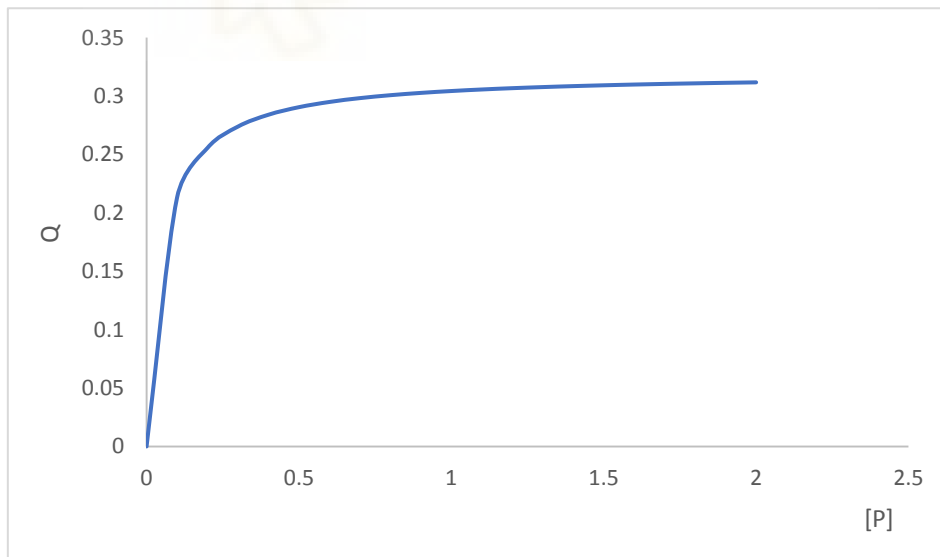


Figura 4. Representación teórica de la Isoterma de Langmuir. En este caso, el recubrimiento máximo es de 0,32 aproximadamente.

En este caso llevaremos a cabo una aproximación experimental en la que podremos obtener una dependencia lineal entre la capacidad de adsorción y la cantidad de nanopartículas que tengamos en el medio gracias a trabajar en condiciones saturantes de proteína.

Si trabajamos con un exceso de [P], siendo esta muy superior a la constante de disociación, K_d , y sabiendo que $K_d = 1/K_a$, la isoterma de Langmuir puede aproximarse de la siguiente forma:

$$q = \frac{Q_{m\acute{a}x} \cdot K_a \cdot [P]}{1 + K_a \cdot [P]} \quad , \quad \text{Si } P \gg \gg K_d = \frac{1}{K_a} \quad , \quad \text{entonces } K_a \cdot P \gg \gg 1$$

Por tanto, en el denominador tendremos que $1 + K_a \cdot [P]$, puede aproximarse a $K_a \cdot [P]$:

$$q = \frac{Q_{m\acute{a}x} \cdot K_a \cdot [P]}{1 + K_a \cdot [P]} \sim q = \frac{Q_{m\acute{a}x} \cdot K_a \cdot [P]}{K_a \cdot [P]} = Q_{m\acute{a}x}$$

Recordando la definición de q para la adsorción de proteína en la superficie de las nanopartículas:

$$q = \frac{(m_{prot})_{adsorbida}}{m_{NP}} = Q_{m\acute{a}x} \quad ; \quad \text{Por tanto, } (m_{prot})_{adsorbida} = Q_{m\acute{a}x} \cdot m_{NP} \rightarrow y = a \cdot x$$

Así, esta ecuación se convierte en una representación lineal (Fig. 5), donde la pendiente (a) corresponderá a la capacidad de adsorción máxima, $Q_{m\acute{a}x}$ cuando representamos la masa de proteína adsorbida en el eje y, frente a la masa de NPs en el eje x.

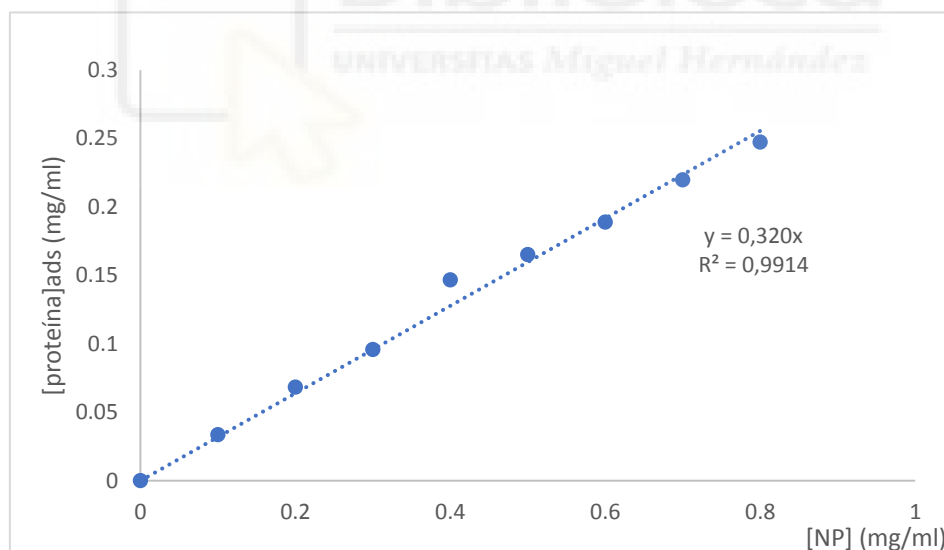


Figura 5. Representación de la aproximación a la Isoterma de Langmuir. Trabajando con condiciones saturantes de proteína, representamos en el eje y la concentración de proteína adsorbida y en el eje x, la concentración de NPs. La pendiente de la recta (0,32 mg proteína/mg NP) corresponde a la $q_{m\acute{a}x}$, por lo tanto podemos decir que 1 mg de NP es capaz de adsorber 0,32 mg de proteína.

PROTEÍNAS MODELO

Lisozima

Para llevar a cabo los diferentes ensayos de adsorción se emplea como proteína modelo la lisozima (LZM). Esta proteína, también conocida como muramidasa, es una enzima glucosidasa que se encuentra en todo tipo de fluidos corporales como las secreciones lacrimales, saliva, leche materna o suero sanguíneo.

Su principal función radica en catalizar la hidrólisis de enlace glucosídico β 1-4 entre el ácido N-acetilmurámico y la N-acetilglucosamina en el peptidoglicano, componente principal de las paredes bacterianas. Su actividad muramidasa le permite realizar otras funciones cooperando con el sistema inmunológico con el fin de eliminar microorganismos patógenos del organismo.

La lisozima del huevo de gallina, presenta 129 aminoácidos que forman una cadena polipeptídica estabilizada por cuatro puentes disulfuro intramoleculares. Su conformación se caracteriza por la presencia de estructuras secundarias como α -hélices y láminas- β con residuos tanto hidrofílicos como hidrofóbicos (Fig. 6).

Posee un punto isoeléctrico de aproximadamente 11. Se trata de una enzima que por su estructura, estabilidad y empaquetamiento es de las más empleadas y estudiadas en investigación bioquímica.

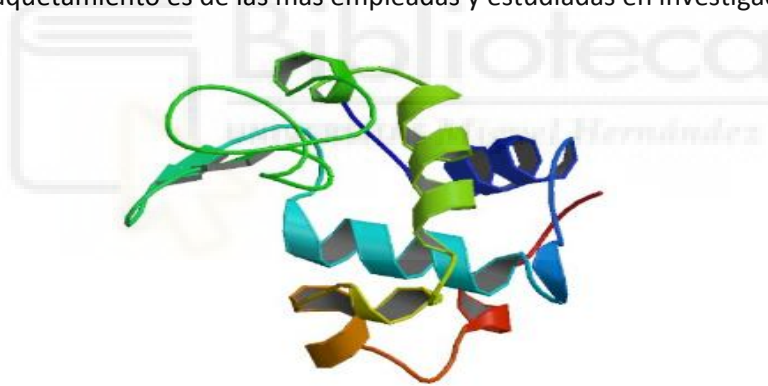


Figura 6. Representación de la Lisozima en cartoon. Imagen obtenida de Protein Data Bank (PDB, código: 2CDS)

β -lactoglobulina

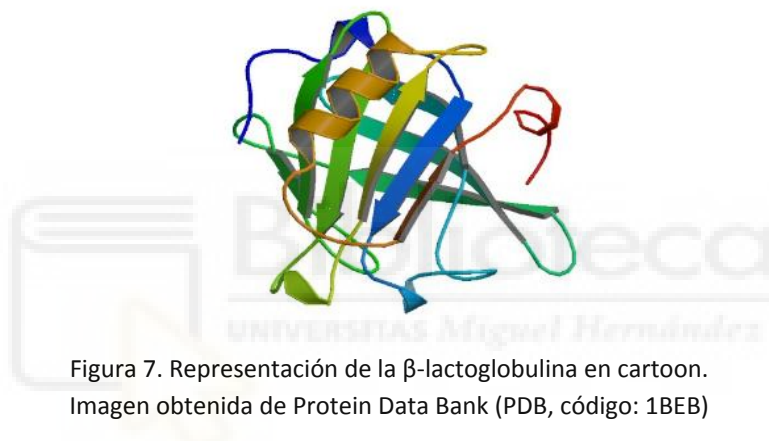
Posteriormente, como proteína análoga a la insulina, usaremos la β -lactoglobulina, (β -LG), la cual tiene un punto isoeléctrico similar, 4,9 frente a 5,4 para la insulina. Nos fijamos en esta característica de similitud, puesto que adsorbemos y desorbemos la proteína a las NPs por cambio de pH, ya que se encontrará unida a nuestro recubrimiento por fuerzas electrostáticas. Al cambiar el pH, cambiaremos las cargas de la proteína, y haremos con ello que se desorba de la superficie.

Esta proteína se conoce desde 1976. Se encuentra principalmente en el suero de la leche de vaca, y es la proteína más abundante en el lactosuero constituyendo alrededor de la mitad del total de las proteínas que éste contiene.

Está formada por una cadena de 162 aminoácidos con un peso de 18,4 kDa, y se conocen dos variedades llamadas A y B las cuales difieren en dos aminoácidos en la posición 64 y 118. La forma A tiene aspartato y valina mientras que la forma B tiene glicina y alanina respectivamente. Su conformación es principalmente en lámina β , aunque también contiene algunas α hélices (Fig. 7).

La β -lactoglobulina tiene la capacidad de interactuar con moléculas hidrofóbicas especialmente con retinol y ácidos grasos. Y aunque su función es hasta ahora desconocida, se cree que sirve, en el caso de los rumiantes, como proteína transportadora de ácidos grasos.

Se ha estudiado que para pH inferiores a 3 la proteína se encuentra principalmente en forma monomérica, mientras que para pH superiores la forma principal es dimérica, pudiendo presentar octámeros favorecidos por la temperatura. La estabilidad del dímero viene dada por la interacción de los monómeros mediante 12 enlaces de hidrógeno y 2 puentes salinos.



Estas proteínas pueden ser caracterizadas mediante medidas espectrofotométricas, ya que pueden absorber luz UV a 280 nm debido a la presencia de aminoácidos aromáticos en su estructura, tales como el triptófano (Trp), la tirosina (Tyr), y la fenilalanina (Phe), además de los puentes disulfuro que estabilizan su estructura. Concretamente la lisozima presenta 6 Trp, 3 Tyr, 1 Phe y 4 puentes disulfuro, y la β -lactoglobulina presenta 3 Phe, 5 Tyr, Y 2Trp, donde todos contribuyen a sus respectivos máximos de absorción a 280 nm ($\epsilon(\text{LZM}) = 2,653 (\text{mg/ml})^{-1}\text{cm}^{-1}$), ($\epsilon(\beta\text{-LG}) = 0,941 (\text{mg/ml})^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Lo que se propone en este proyecto, consiste en vehicular biomoléculas utilizando las nanopartículas de alúmina recubiertas con un polielectrolito, uniéndolas a su superficie mediante interacciones electrostáticas. Gracias a ello, podemos conseguir, en primer lugar, que la proteína se una a nuestro polielectrolito a pH ácido (carga negativa el PE y carga positiva la proteína), simulando lo que ocurriría al administrar las nanopartículas cargadas con la insulina por vía oral al pasar por el estómago. Por otro lado, tras cambiar el pH del medio, simulando que las nanopartículas ya pasarían al intestino, donde hay un pH de alrededor de 7, conseguiremos que la proteína se desorba de la

superficie al cambiar su carga y tener en este caso la misma carga ambos sistemas (carga negativa tanto el PE como la proteína). La repulsión electrostática hará entonces que nuestra proteína se suelte de la superficie a la que se encontraba unida, propiciado con ello que la proteína se absorba por las vellosidades intestinales y pueda llegar al torrente sanguíneo para ser distribuida por el organismo y realizar así su función correctamente.



ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

ANTECEDENTES

En la actualidad existen estudios que intentan desarrollar procedimientos para poder administrar oralmente ciertos fármacos como vacunas de anticuerpos monoclonales recurriendo a la nanotecnología. Un ejemplo de ello es el desarrollo de unos nanogeles con los que se vehiculizan los anticuerpos para evitar los problemas que ocurren en el estómago anteriormente mencionados, y poder atravesar las mucosas del intestino para alcanzar las células del sistema inmune donde realizarán su función (29). También han sido desarrollados unos nanotubos de oro, compuestos por unas estructuras alargadas, huecas y abiertas por los extremos hechas enteramente de oro, con las que se está teniendo éxito con el tratamiento de un cáncer humano inducido en un modelo de ratón, mediante la irradiación de un haz de luz láser pulsado, haciendo que los nanotubos se calienten a altas temperaturas produciendo la destrucción de las células cancerosas (30).

Además, en la actualidad se están desarrollando unas nanoesferas porosas, de otros materiales más biodegradables, que se ha demostrado que tienen una mayor eficacia que los nanotubos de oro en este método, y además permiten transportar fármacos en su interior, cuya liberación es sensible tanto al pH como a la irradiación de luz láser anteriormente mencionada. Este tratamiento de las células cancerosas ofrece un ataque muy focalizado en la zona tumoral, haciendo posible el tratamiento del cáncer sin afectar al resto de células sanas del organismo (31).

Existen otros estudios en los que se evidencia la necesidad de recubrir las estructuras nanométricas mediante un polielectrolito para hacerlas más biocompatibles con el organismo (13). Uno de los estudios previos más relevantes relacionado con nuestro trabajo es en el que se estudia la unión de la proteína β -lactoglobulina al PVSA y el estudio de su flexibilidad en esta unión (32), lo cual los hizo pensar que este polielectrolito podría ser indicado para estudiar la adsorción y desorción de la β -lactoglobulina tal y como hemos desarrollado.

OBJETIVO GENERAL

Desarrollo de un sistema compuesto por nanopartículas de alúmina recubiertas de PVSA para la vehiculización de biomoléculas por vía oral como puede ser la insulina.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtención de nanopartículas de alúmina (Al_2O_3) recubiertas por PVSA (NPs@PVSA) y posterior caracterización mediante:
 - o Determinación de tamaño y carga de las NPs recubiertas (mediante técnicas de DLS)
 - o Capacidad de adsorción de una proteína modelo (lisozima) en distintas condiciones.
 - o Capacidad de desorción de lisozima mediante uso de un polielectrolito competidor (PDADMACI)
- Caracterización de las NPs@PVSA mediante el uso de una proteína análoga a la insulina (β -lactoglobulina):
 - o Capacidad de adsorción a pH 1,5
 - o Capacidad de desorción mediante cambio de pH (de 1,5 a 7) y mediante el uso de un polielectrolito competidor (PDADMACI)
 - o Estudio de la estabilidad conformacional de la proteína tras ser desorbida de la superficie de las NPs@PVSA.

MATERIALES Y MÉTODOS

SÍNTESIS DE LAS NPs RECUBIERTAS POR PVSA

A partir del stock de NPs de Al_2O_3 a 100 mg/ml se prepara una dilución a 25 mg/mL ajustado previamente a pH 1,5. Por otro lado, para preparar el polielectrolito con el cual se recubren las NPs, se pesan 625 mg de PVSA en polvo, y se disuelven en 25 ml de agua mili-Q a pH 1,5 para alcanzar una concentración final de 25 mg/ml.

Se añaden 20 ml de cada dilución anteriormente realizada de NPs y de polielectrolito a un tubo Falcon reforzado, y se deja incubar toda la noche para obtener un stock de NPs recubiertas a pH 1,5 con una concentración teórica de 12,5 mg/ml, aunque esta concentración se medirá más adelante mediante residuo seco.

LAVADOS PARA ELIMINAR EL EXCESO DE PVSA QUE NO SE HAYA ADSORBIDO SOBRE LA SUPERFICIE

Realizamos los lavados de nuestro stock para eliminar el exceso de PE. Para ello, realizamos 3 veces el siguiente proceso:

1. Centrifugar a 16.000 g durante 20 minutos.
2. Una vez centrifugado y con las NPs bien decantadas, eliminamos el sobrenadante, y añadimos aproximadamente 40 ml de agua a pH 1,5.
3. Resuspendemos bien el pellet con el vortex y el baño sonicador hasta que no haya grumos y nos aseguramos de que las NPs están lo menos agregadas posible.

Tras repetir este proceso 3 veces, podemos decir que hemos eliminado el exceso de PE que había en disolución. Resuspendemos asegurándonos de que tenemos nuestro stock de NPs@PVSA lo menos agregadas posible.

CARACTERIZACIÓN DE LAS NPs DESNUDAS Y RECUBIERTAS POR DLS

Se utilizó una dilución del stock de NPs desnudas a 0,1 mg/ml para estudiar su tamaño y carga mediante DLS (*Dynamic Light Scattering*) (33). También se cogió una alícuota de la misma concentración del stock de NPs recubiertas tras eliminar el exceso de PE del medio para estudiar igualmente su tamaño y su carga una vez recubiertas. Ambas diluciones se midieron a pH 1,5. Para las medidas se utilizan cubetas de plástico de 4 caras pulidas, ya que las medidas se toman en un ángulo de 90° con respecto al haz de luz que incide sobre la muestra.

CUANTIFICACIÓN DE LAS NPs RECUBIERTAS

Para saber la concentración real a la que se encuentra nuestro stock, se realizó el método del residuo seco que consiste en coger un ml del stock de NPs recubiertas, y ponerlo en un tubo eppendorf vacío previamente pesado. Es necesario hacer esto por duplicado para obtener después un promedio de ambas medidas y que el valor obtenido se ajuste lo máximo a la concentración real. Tras poner un ml de la disolución en cada tubo, centrifugamos y eliminamos gran parte del sobrenadante. Dejamos incubar a 100°C durante 3 días, para que se evapore el resto del sobrenadante y quede completamente seco el pellet, y pesamos de nuevo los tubos. Por diferencia de pesada, obtenemos el peso del residuo, y por tanto su concentración. Luego hacemos el promedio de las medidas obtenidas.

PREPARACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA

Para preparar y cuantificar ambas proteínas antes de adsorberlas a la superficie de las NPs, se procedió de la misma manera, para ello usamos el espectrofotómetro, que realiza medidas de la absorbancia de la muestra en un rango de longitudes de onda con las que la irradiamos.

Pesamos los mg de proteína en polvo necesarios para preparar una disolución algo más concentrada de lo que la usaremos en los experimentos de adsorción, y diluimos la proteína en los ml necesarios de agua mili-Q a pH 1,5.

A la hora de medir la absorbancia para calcular la concentración exacta a la que está la disolución de proteína que acabamos de preparar, debemos tener en cuenta que, dependiendo la concentración a la cual preparamos la proteína, si medimos su absorbancia directamente, el valor de absorbancia sería mayor que 1, por lo que debemos hacer diluciones para obtener valores entre 0 y 1 debido a la limitación de la Ley de Lambert-Beer (absorbancias por encima de 1, no nos aseguramos la linealidad con la concentración).

$$\text{Absorbancia} = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

donde ε es el coeficiente de extinción de la proteína, c su concentración y l el paso óptico de la cubeta. La cubeta es de 1 cm de ancho, y los coeficientes de extinción de la lisozima y la β -lactoglobulina son de 2,635 ((mg/ml)⁻¹·cm⁻¹), y 0,941 ((mg/mL)⁻¹cm⁻¹) respectivamente. Con estos datos podemos obtener la concentración de proteína exacta que hay en la cubeta. Y tras hacer los cálculos pertinentes para extrapolar el valor obtenido a la disolución de proteína que acabamos de realizar, conoceremos la concentración de proteína exacta que tenemos.

CARACTERIZACIÓN DE LA CAPACIDAD DE ADSORCIÓN MÁXIMA DE PROTEÍNA EN LA SUPERFICIE DE LAS NPs RECUBIERTAS

Para caracterizar la capacidad de adsorción máxima de nuestras NPs recubiertas por el polielectrolito, se llevaron a cabo ensayos de adsorción de una proteína modelo como es la Lisozima y con una proteína análoga a la insulina como es la β -lactoglobulina en diferentes condiciones.

Tras hacer algunas pruebas preliminares para definir bien el rango de concentración de NP recubiertas y de concentración de proteína necesario para poder medir correctamente la capacidad de adsorción de las NPs, concluimos que las condiciones necesarias para estudiar la adsorción máxima son:

La [proteína] será 0,3 mg/ml para la lisozima, y de 0,6 mg/ml para la β -lactoglobulina y será constante en todos los tubos, mientras que la [NPs@PVSA] será creciente e irá de 0 a 1,7 mg/ml aumentando de 0,1 en 0,1 mg/ml en cada tubo consecutivo. Por lo tanto, en cada ensayo de adsorción tendremos 18 tubos eppendorf, en los que el volumen final en cada tubo será de 1200 μ l.

a) Adsorción a pH 1'5

Al contar con un stock de NPs recubiertas cuya disolución está ya ajustada a pH 1,5, directamente se añadió la proteína preparada a pH 1,5 y volúmenes crecientes de NPs recubiertas a pH 1,5 en cada tubo. Ajustando cada tubo hasta un volumen final de 1200 μ l con agua a pH 1,5 para que finalmente todos contasen con el mismo volumen. En el caso de la β -lactoglobulina, ya tendremos el stock a pH 1,5, por lo que tendremos que coger una alícuota de las NPs@PVSA y ajustarlas a pH 1,5 para llevar a cabo de adsorción.

b) Adsorción a pH 7

En esta ocasión, fue necesario en primer lugar, preparar la proteína diluida a pH 7. También se cambiaron las condiciones de las NPs, que se llevaron a pH 7, para después añadir volúmenes crecientes en cada tubo. Además se añadió buffer Hepes a 10 mM en todos los tubos para que tamponase la disolución. Se ajustaron todos los tubos a un volumen final de 1200 μ l con agua mili-Q a pH 7.

c) Adsorción en función de la fuerza iónica

Para estudiar el efecto de la fuerza iónica en la capacidad de adsorción de nuestras NPs@PVSA, se llevaron a cabo ensayos con diferentes concentraciones de sal. Así, en este caso, además de añadir los volúmenes crecientes de NPs en cada tubo, la lisozima a 0,3 mg/ml y buffer hepes 10 mM, se

añadió el volumen de NaCl necesario. Se hicieron ensayos a 50 mM, 100 mM, 150 mM y 200 mM de sal. Se ajustó cada tubo hasta un volumen final de 1200 µl con agua mili-Q a pH 7.

Tras preparar los tubos tal y como se ha indicado en cada tipo de experimento, todas las disoluciones fueron tratadas de igual modo como sigue:

Se dejaron incubar cada una a sus condiciones durante toda la noche en la noria, para que la proteína se adsorbiese a la superficie, y al día siguiente, se centrifugaron a 16.000 g durante 10 minutos para que todas las NPs fuesen al fondo.

Tras esto, se cuantificó la concentración de proteína existente en el sobrenadante de cada tubo mediante espectrofotometría. Midiendo la absorbancia del sobrenadante de cada tubo, se pudo saber la concentración de proteína presente en estos, y comparando estos datos con la cantidad de proteína que pusimos inicialmente, se calculó en cada caso la cantidad de proteína que faltaba, y que por tanto se encuentra adsorbida en la superficie de las NPs.

DESORCIÓN DE LA PROTEÍNA DE LAS SUPERFICIE DE LAS NPs

Una vez tenemos la proteína adsorbida a la superficie de las NPs@PVSA, realizamos su desorción o bien mediante competición de polielectrolitos de igual carga que la proteína, o mediante cambio de pH. Es importante destacar que antes de desorber la proteína debemos asegurarnos de que hemos añadido la cantidad de NPs necesaria para cerciorarnos de que toda estará adsorbida. En nuestro caso usamos 1 mg/ml y 2,5 mg/ml de NPs@PVSA en cada tubo, dependiendo si se trata de la adsorción de la LZM o la β -LG respectivamente, siendo constante esta concentración en todos los tubos. Gracias al estudio de adsorción anterior de nuestras NPs, sabemos que la cantidad de NPs con las que trabajamos en cada caso, son capaces de adsorber a su superficie 0,320 mg LZM/mg NPs@PVSA para la lisozima, y 0,650 mg β -lg/mg NPs@PVSA para la β -lactoglobulina, por ello añadimos 0,25 mg/ml de lisozima, y 0,5 mg/ml de β -lactoglobulina y nos aseguramos así de que la totalidad de la proteína en ambos casos se adsorberá a la superficie. La concentración de proteína en cada tubo también será constante en todos los tubos. Al día siguiente, centrifugamos los tubos a 16.000 g 10 minutos, y con las NP bien peleteadas, medimos la absorbancia del sobrenadante, para asegurarnos de que no hay proteína en él.

a) Desorción por PE competidor (PDADMACI)

Este método puede usarse para desorber ambas proteínas con las que trabajamos, y consisten en primeramente asegurarnos de que toda la proteína se encuentra adsorbida a la superficie, y después ir añadiendo concentraciones crecientes desde 0 a 0,25 mg/ml en el caso de la desorción de la

lisozima, y de 0 a 0,35 mg/ml de PDADMACI en el caso de la desorción de la β -lactoglobulina en los tubos en los que tenemos las NPs con la proteína adsorbida. Utilizamos entonces 11 y 15 tubos respectivamente en los que se va aumentando la concentración de 0,025 en 0,025 en cada tubo consecutivo. Tras dejar incubar toda la noche, centrifugar los tubos al día siguiente, y medimos la absorbancia del sobrenadante para calcular la cantidad de proteína que hemos sido capaces de desorber.

b) Por cambio de pH

Este método sólo podrá usarse para desorber la β -lactoglobulina, ya que consiste en adsorber la proteína a pH 1,5 en nuestro caso, y desorberla a pH 7. Asegurándonos de igual forma que toda la proteína se encuentra adsorbida, pasamos a resuspender el pellet que forman nuestras NPs en agua a pH 7. Añadimos buffer 50 mM HEPES a pH 7 para que tampone el medio y el pH no cambie en el tiempo, ya que dejaremos incubar 2 días debido a que la desorción por cambio de pH puede estar impedida cinéticamente.

Pasado ese tiempo, procedemos de nuevo a centrifugar los tubos para que las NPs decanten, y medimos la absorbancia del sobrenadante, para cuantificar la cantidad de proteína que hemos sido capaces de desorber. Este experimento se realizó por triplicado.

c) Por cambio de pH y PE competidor

Este método es realizado exclusivamente con la β -lactoglobulina de nuevo, puesto que conlleva cambiar el pH para desorber, y es que en este caso, además de cambiar el pH a 7, se añadió PDADMACI para que compitiese por la β -lactoglobulina (cuyas uniones electrostáticas al PVSA ya estuviese debilitada por el cambio de pH) y observar una desorción completa. De modo que se adsorbió la β -lactoglobulina a 0,5 mg/ml a pH 1,5 nuevamente y tras asegurarnos de que toda la proteína se encontraba adsorbida en la superficie, ajustamos el pH a 7, y se añadió de nuevo el PDADMACI a 0,25 mg/ml en los tres tubos. Se dejó incubar toda la noche, y al día siguiente se centrifugó para cuantificar la cantidad de proteína que habíamos sido capaces de desorber por métodos espectrofotométricos.

OTB PARA DETERMINAR LA PRESENCIA O AUSENCIA DE PVSA EN DISOLUCIÓN TRAS CAMBIO DE pH

Se utilizó el Azul de o-toluidina (o-TB), un colorante catiónico que se une a aniones en disolución y cambia su espectro de absorción con respecto a su forma libre. Se prepararon tres disoluciones: por un lado o-TB libre, o-TB con PVSA y por último o-TB con una alícuota del sobrenadante de NPs recubiertas con PVSA a pH 7.

Tras esto, se midió el espectro de absorción en el espectrofotómetro en un rango de longitudes de onda entre 750 a 500 nm.

CARACTERIZACIÓN DE LA β -LG TRAS SER DESORBIDA DE LA SUPERFICIE. ESTUDIO DE SU ESTABILIDAD CONFORMACIONAL MEDIANTE FLUORESCENCIA

Tras desorber la proteína β -lactoglobulina de la superficie, llevamos a cabo el estudio de su estabilidad, mediante medida de su espectro por fluorescencia y mediante la determinación de su temperatura de desnaturalización a pH 7.

Se hizo una dilución 1:10 de la proteína presente en el sobrenadante tras ser desorbida de las NPs para tenerla a 0,037 mg/ml, y por otro lado se preparó una disolución de la proteína a pH 7 y a esta misma concentración. Se realizó el experimento de Fluorescencia y se compararon ambos resultados.

Recogemos el espectro de emisión de la proteína en un intervalo de longitudes de onda entre 300 y 400 nm, una vez excitada a 280 nm, tanto para la desorbida a pH 7 como para la nativa al mismo pH.

Además, realizamos la desnaturalización térmica de ambas proteínas calentando desde 25 a 98° C a una velocidad de barrido de 1°C/min.



RESULTADOS

1. CARACTERIZACIÓN DE NPS@PVSA

1.1 Síntesis y recubrimiento

Tras sintetizar las nanopartículas de Al_2O_3 @PVSA, se determinó tanto su diámetro hidrodinámico como su potencial z, mediante DLS para poder determinar que las nanopartículas habían sido correctamente recubiertas por el PE.

Obtuvimos por una parte las medidas del tamaño y la carga superficial de las partículas desnudas a pH 1,5. Los resultados de DLS obtenidos fueron los siguientes:

- NP desnudas → tamaño = 75 ± 1 nm
→ carga = 24 ± 2 mV

Tras dejar incubar las NPs con el PE, para que este recubra la superficie, y lavar y eliminar todo el exceso de PE que había en el stock, volvimos a realizar las medidas de DLS a pH 1,5, los resultados fueron:

- NP recubiertas → tamaño = 1110 ± 30 nm
→ carga = -15 ± 10 mV

Por otro lado, el residuo seco dio como resultado el promedio del peso de ambos tubos, que fue de 15,6 mg, por lo tanto, el stock de NPs@PVSA está a 15,6 mg/ml y tenemos aproximadamente 40 ml del stock en total.

1.2 Adsorción de lisozima como proteína modelo sobre las NPs@PVSA

Tras realizar el experimento de adsorción de lisozima sobre las NPs@PVSA a pH 1,5, representamos en el eje x la concentración de NPs@PVSA que es creciente en cada tubo consecutivo, y en el eje y la concentración de LZM adsorbida a la superficie de estas (Fig.8).

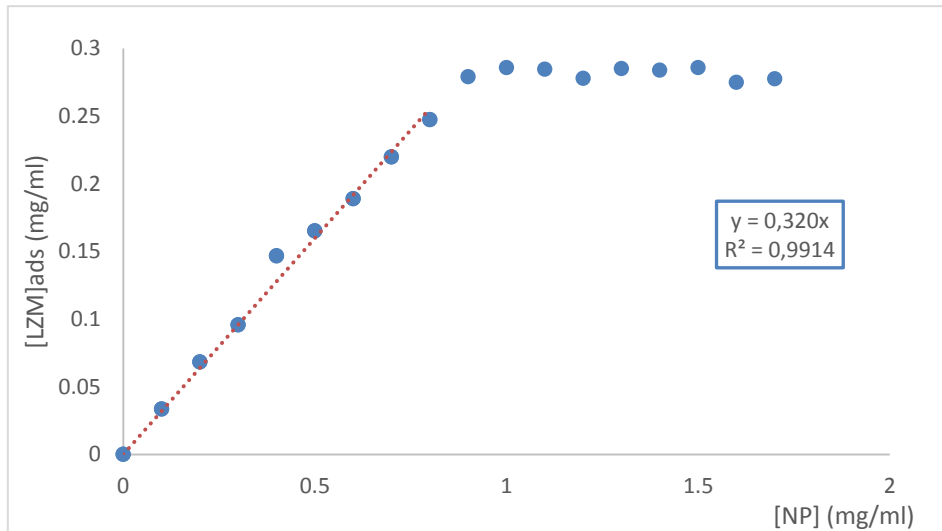


Figura 8. Representación de la capacidad de adsorción máxima de las NPs recubiertas a pH 1'5. Se representa la concentración de Lisozima adsorbida frente a la concentración de NPs, ambas medidas en mg/ml.

La pendiente de la recta que podemos trazar en esta representación, nos da la Q máxima medida en mg de proteína/mg de NP, es decir, una manera de medir la capacidad de adsorción de la superficie de las NPs.

Como vemos, la Q_{máx} en este caso es 0,320 mg LZM/mg NPs@PVSA, es decir, por cada mg de NPs@PVSA que tenemos, se adsorbe a su superficie 0,320 mg de proteína.

1.3 Desorción de LZM mediante el uso de un polielectrolito

Con el fin de desorber la proteína que ha sido adsorbida anteriormente, y caracterizar esta desorción al mismo pH al que se encuentra, se llevó a cabo la adición de un PE competidor de alto peso molecular, que compite fuertemente por los sitios en los que la proteína está unida al PVSA, haciendo que esta se desplace y produciendo la desorción de la LZM a pH 1,5 (Fig. 9).

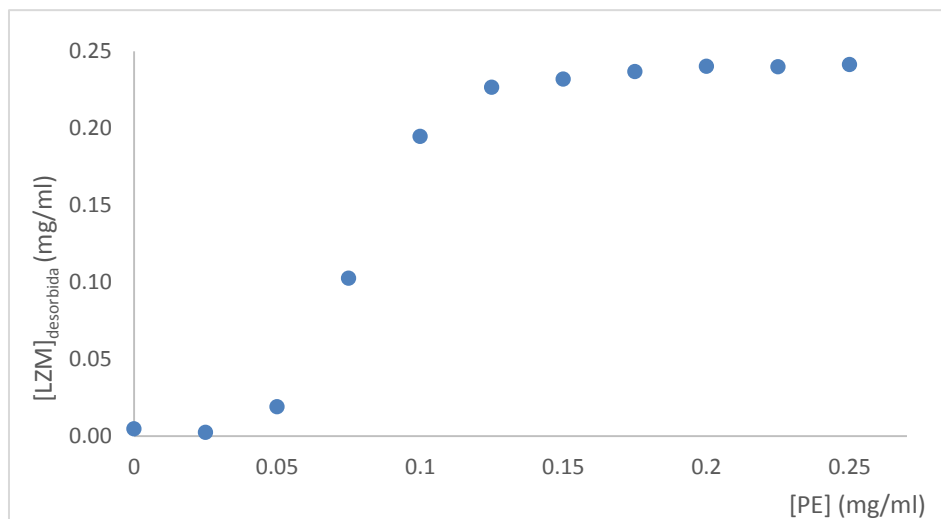


Figura 9. Representación de la concentración de Lisozima desorbida de la superficie de las NPs en función de la concentración de PDADMACI añadido.

Como vemos, a una concentración de PDADMACI de aproximadamente 0,17 mg/ml, es suficiente para conseguir una desorción completa de la proteína.

1.4 Capacidad de adsorción de LZM sobre NPs@PVSA a pH 7 en distintas condiciones de fuerza iónica

Los resultados al añadir fuerza iónica al medio cuando adsorbemos la lisozima sobre las NPs@PVSA a pH 7 se muestran en la Fig. 10.

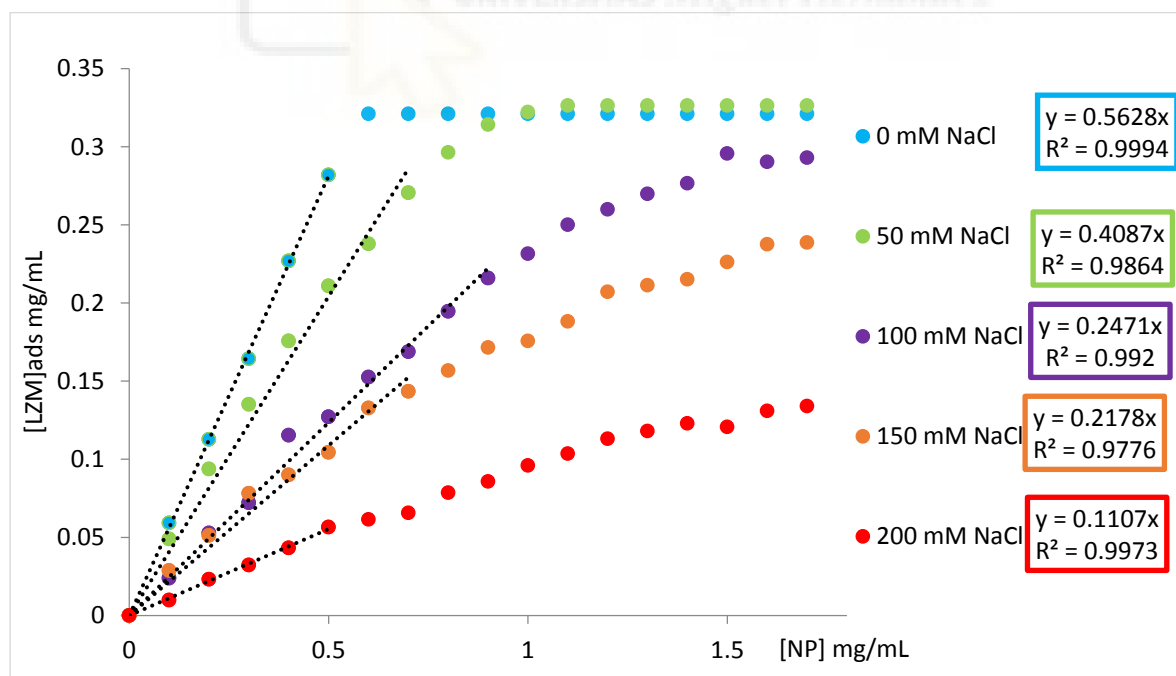


Figura 10. Representación de la capacidad de adsorción de NPs@PVSA a pH 7 en distintas condiciones de fuerza iónica (0, 50, 100, 150 y 200 mM de NaCl).

Como vemos, a medida que aumenta la fuerza iónica en el medio, podemos ver que disminuye la capacidad de adsorción de LZM sobre la superficie de las NPs, pasando de 0,560 mgLZM/mgNPs@PVSA a baja fuerza iónica frente a 0,111 mgLZM/mg NPs@PVSA a una fuerza iónica de 200 mM.

Así mismo, a pH 7 la capacidad de adsorción de LZM a la superficie aumenta considerablemente frente a la medida realizada anteriormente a pH 1,5, de 0,320 mgLZM/mg NPs@PVSA que teníamos anteriormente, a 0,560 mgLZM/mg NPs@PVSA que podemos observar en la gráfica correspondiente (Fig.10).

Al comparar ambas representaciones en una misma gráfica (Fig. 11) se ve mucho más clara la diferencia de adsorción de las NPs a los diferentes pHs con los que la tratamos:

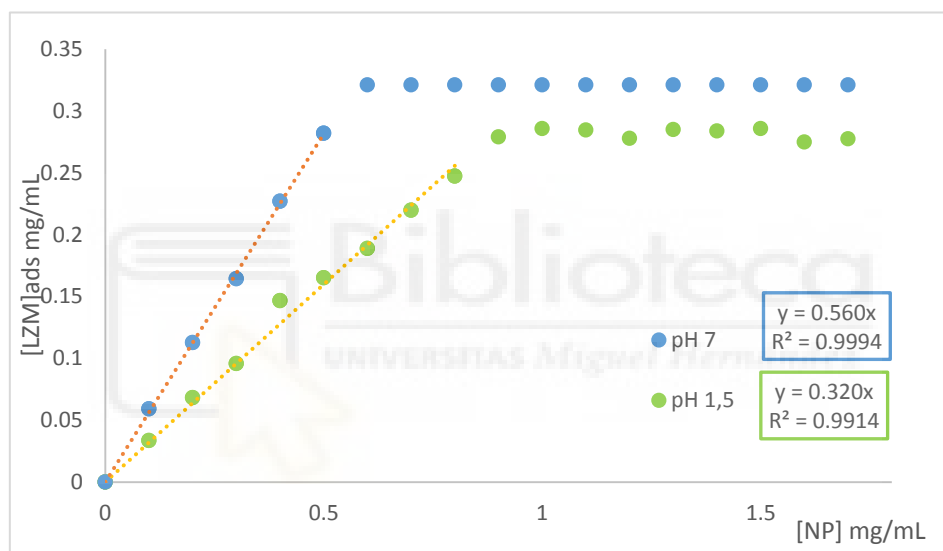


Figura 11. Comparación de la capacidad de adsorción de las NPs a los dos pHs estudiados.

Uno de los motivos por los que la capacidad de adsorción a pH 7 aumente frente a pH 1,5, es que la superficie de la NP de alúmina disminuye su carga positiva, haciendo por tanto que el PVSA adsorbido pueda soltarse debido a la disminución del número de contactos con la superficie.

Si este supuesto lo llevásemos al límite, es decir, que al aumentar el pH a 7 se debilitasen tanto las interacciones entre el PVSA y la NP, el PE podría llegar a soltarse de la superficie de la NP. Esto se comprobó mediante el uso de un colorante como el Azul de o-toluidina, cuyo espectro cambia al unirse a los residuos aniónicos del PVSA.

El resultado de la prueba del OTB se muestra en la Fig. 12:

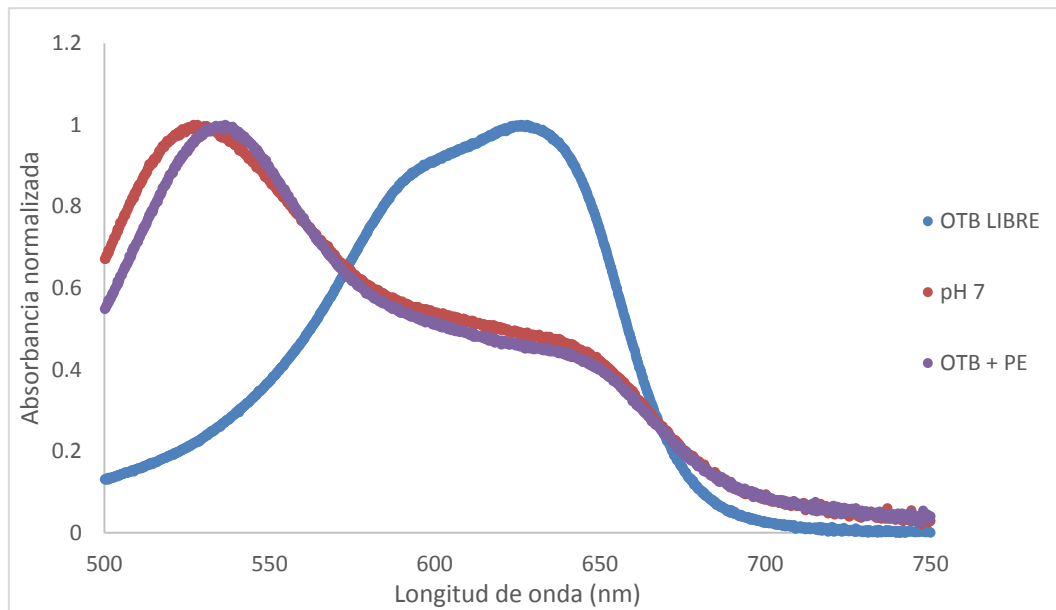


Figura 12. Experimento de comprobación con el colorante Azul de o-toluidina. Se representa el espectro de la o-toluidina en los diferentes tubos estudiados, por un lado el de la o-TB libre (azul), o-TB con el PE (morado), y o-TB con el sobrenadante de NPs incubadas a pH 7 (rojo). Con ellos se comprueba que a pH 7 cambia el espectro del o-TB pareciéndose más al del o-TB con PE en el medio.

Como podemos comprobar, el espectro de los tubos que contienen sobrenadante de las NPs incubadas a pH 7, presenta su máximo desplazado con respecto al o-TB libre, al igual que sucede con el o-TB al que hemos añadido PVSA. Dada esta situación, podemos concluir que el PE se suelta de la superficie de la NP al aumentar el pH del medio. Este es un resultado cualitativo, tras el cual, incubaremos todo el stock restante a pH 7, y después lavaremos 3 veces para eliminar la mayor cantidad de PE que se suelte y que quede en disolución. Tras realizar los lavados, medimos de nuevo la capacidad de adsorción de la LZM a la superficie de las NPs a pH 7, para ver si los lavados y la eliminación del PE que se perdía, han afectado significativamente a la capacidad de adsorción de nuestras NPs@PVSA.

El resultado del experimento realizado para medir la capacidad de adsorción máxima de las NPs una vez lavadas a pH 7 con respecto a las no lavadas se muestra en la Fig. 13.

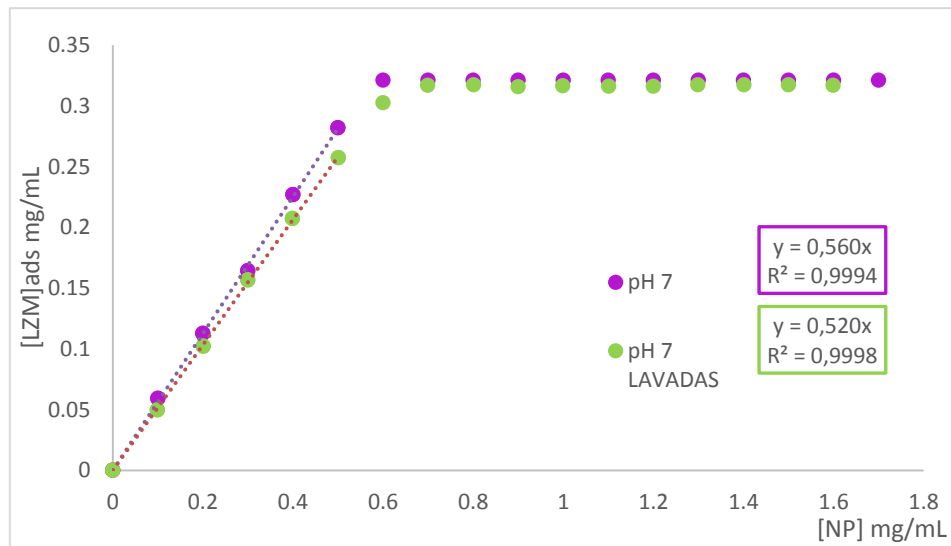


Figura 13. Comparación entre la capacidad de adsorción máxima de la Lisozima a pH 7 antes y después de los lavados y la eliminación del PVSA que se suelta.

Podemos observar en la gráfica de comparación, que no cambia significativamente la capacidad de adsorción de las NPs@PVSA a pesar de perder algo de PVSA de su superficie y de los lavados sucesivos que le hemos hecho.

2. CARACTERIZACIÓN DE LAS NPs@PVSA CON UNA PROTEÍNA ANÁLOGA A LA INSULINA

2.1 Capacidad de adsorción de β -lactoglobulina sobre las NPs@PVSA a pH 1,5.

Pasamos pues a obtener la capacidad máxima de adsorción de la β -lactoglobulina a pH 1'5, cuyo resultado se muestra en la Fig. 14:

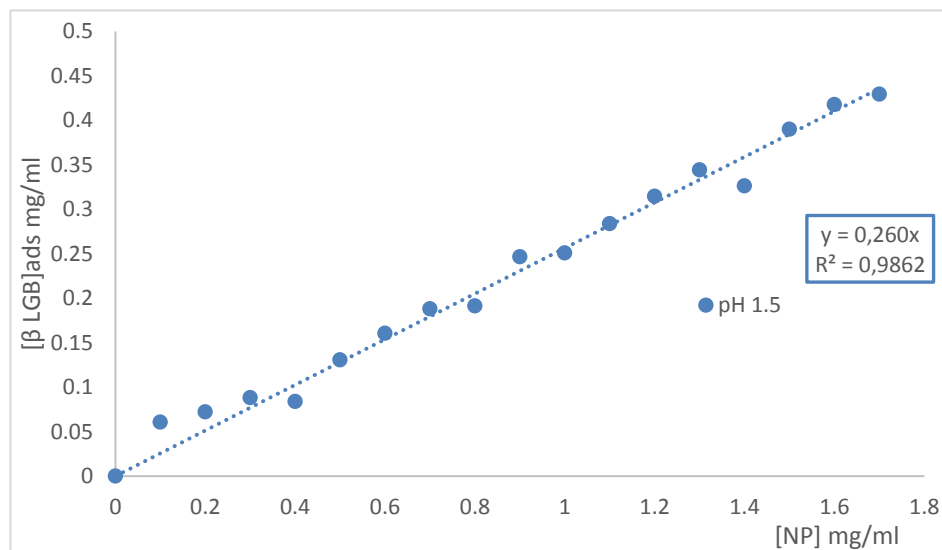


Figura 14. Representación de la capacidad de adsorción máxima de la β -lactoglobulina en la superficie de las NPs recubiertas por PVSA (tras ser lavadas para eliminar el exceso de PVSA)

La capacidad de adsorción de la β -lactoglobulina sobre estas nanopartículas es de 0,260 mg β -lg/mg NPs@PVSA.

2.2 Desorción de β -LG de la superficie.

2.2.1 PE competidor a pH 1,5

Tras esto, se procedió a desorber la β -lactoglobulina mediante la adición de un PE competidor, de nuevo el PDADMACI, de alto peso molecular, competirá por los sitios de unión de la proteína al recubrimiento, haciendo que se suelte de la superficie.

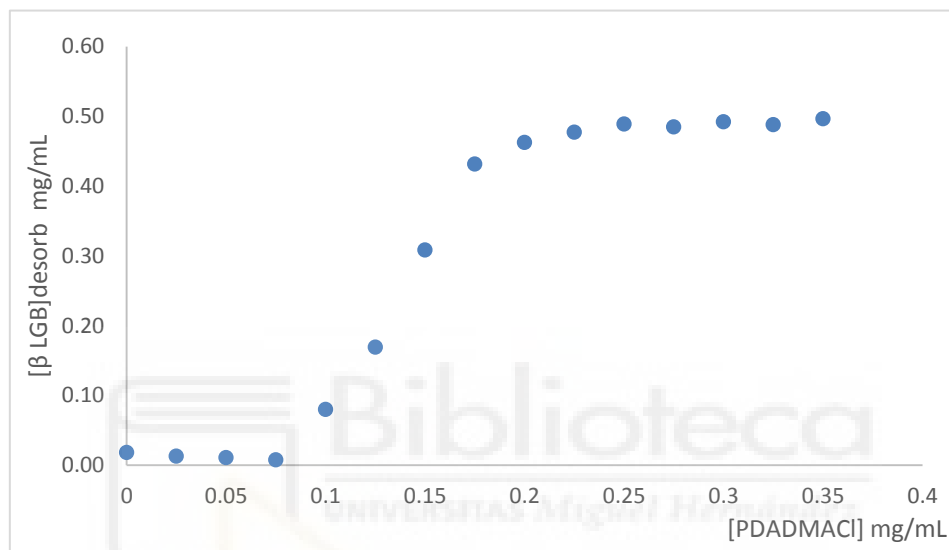


Figura 15. Desorción a pH 1'5 de la proteína β -lactoglobulina de la superficie de las NPs a las que se encontraba unida mediante la adición de PDADMACI.

Como vemos en la Fig. 15, el PDADMACI es capaz de desplazar totalmente la proteína de sus sitios de unión al PVSA y desorberla de la superficie por completo. Una concentración de 0,25 mg/ml de PE aproximadamente sería suficiente para desorber la proteína por completo.

2.2.2. Cambio de pH

Tras adsorber la β -lactoglobulina completamente a pH 1,5 a las NPs@PVSA, cuantificamos el sobrenadante para cerciorarnos de que estaba toda la proteína adsorbida, y después, pasamos a desorberla cambiando el pH en el que se encontraban. El resultado fue que de 0,5 mg/ml que se habían adsorbido completamente a las NPs@PVSA, se consiguió desorber 0,37 mg/ml.

2.2.3 Cambio de pH y PE competidor

En este caso nos encontramos que nuevamente, de 0,5 mg/ml que habíamos adsorbido completamente, solo fuimos capaces de recuperar 0,37 mg/ml.

Al no desorber por completo la proteína, se comprobó por último la capacidad de adsorción máxima de la β -lactoglobulina a la superficie de las NPs@PVSA a pH 7 (Fig. 16)

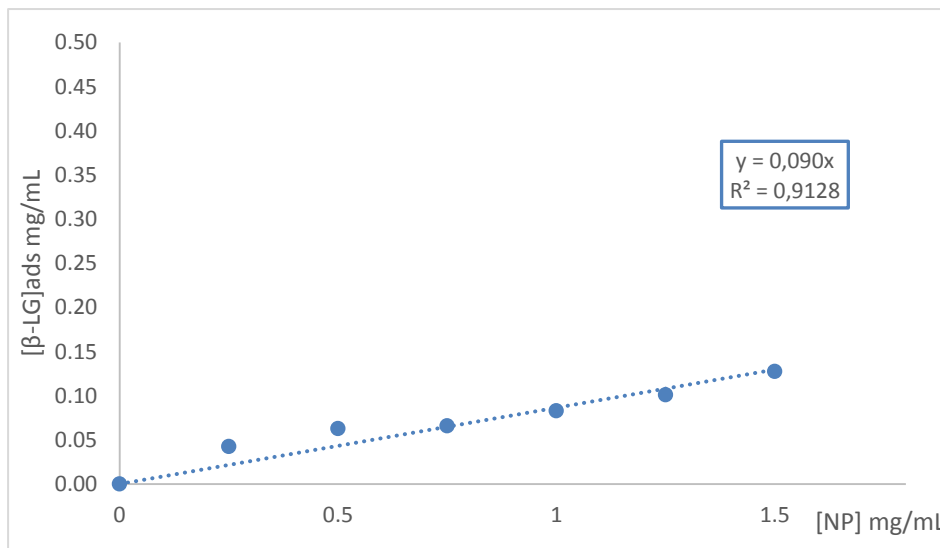


Figura 16. Adsorción de la β -lactoglobulina a pH 7 a la superficie de las NPs.

A pH 7, la β -lactoglobulina presenta una capacidad de adsorción de 0,090 mg β -lg/mg de NPs@PVSA.

3. ESTABILIDAD DE LA β -LG TRAS SER DESORBIDA DE LA SUPERFICIE

Por último, se llevó a cabo el estudio de la estabilidad de la β -lactoglobulina tras ser desorbida de la superficie. Los resultados del espectro de emisión en el estudio de fluorescencia y la rampa de temperatura de la β -lactoglobulina a pH 7 tras ser desorbida de la superficie de las NPs aparecen recogidos en la Fig 17:

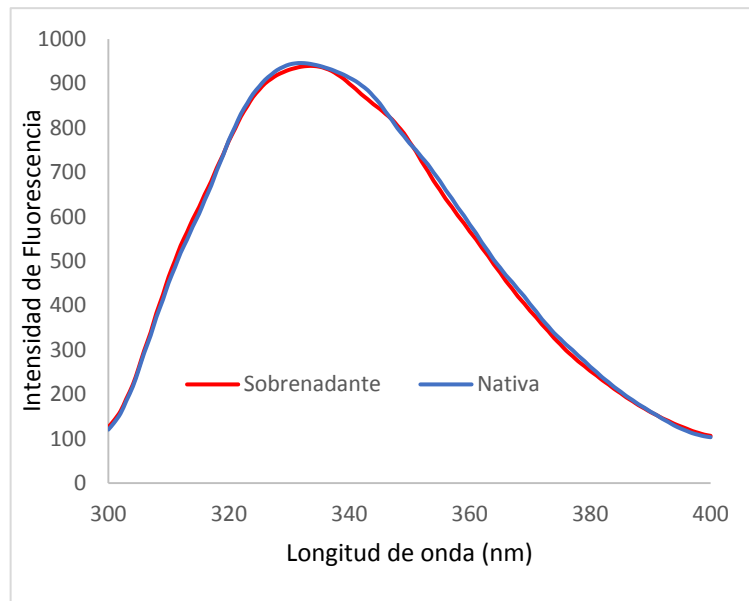


Figura 17. Espectro de fluorescencia recogido de las muestras analizadas en el que se compara la proteína β -lactoglobulina desorbida de la superficie de las NPs@PVSA a pH 7 (sobrenadante) frente a proteína nativa a pH 7 (nativa).

Obtenemos que ambas presentan su máximo de fluorescencia sobre 330 nm, y que la T_m es de 75,8 para la que había estado adsorbida, frente a 77,8 para la nativa (Tabla 1).

	T_m (°C)
Desorbida	$75,8 \pm 1,3$
Nativa	$77,8 \pm 2,1$

Tabla 1. Valores de la temperatura de desnaturalización de la β -lactoglobulina desorbida de la superficie de las NPs@PVSA a pH 7 frente a proteína nativa a pH 7.

DISCUSIÓN

1. Caracterización de NPs@PVSA

1.1 Síntesis y recubrimiento

El recubrimiento de las NPs por el PE se comprobó midiendo su diámetro y carga superficial mediante DLS, antes y después de ser recubiertas, de cuyo resultado obtenemos información para caracterizarlas. Por una parte, las NPs desnudas, tienen una carga superficial positiva y un diámetro del orden de 70-80 nm, mientras que tras ser recubiertas por el PVSA, podemos decir que ha cambiado su carga superficial, que es mayoritariamente negativa en este caso, y ha aumentado su diámetro a unos 1100-1200 nm.

Por el resultado obtenido es lógico pensar que debemos optimizar el método de recubrimiento, ya que, si queremos que estas NPs@PVSA cargadas en este caso de insulina, sean finalmente administradas, debemos reducir el tamaño por debajo de los 100 nm (22). El hecho de reducir el tamaño supondría un efecto positivo sobre lo que proponemos, ya que, al disminuir el tamaño de la nanopartícula, la superficie específica aumenta, y por tanto en consecuencia seríamos capaces de transportar una mayor cantidad de proteína.

1.2 Adsorción de lisozima como proteína modelo sobre las NPs@PVSA.

Para comprobar que las nanopartículas presentan carga negativa una vez recubiertas a pH 1,5, caracterizamos su capacidad de adsorción mediante el uso de una proteína catiónica como es la LZM. Tras llevar a cabo el experimento de adsorción, vemos en la Fig. 8 que presentan una capacidad de adsorción de 0,320 mg LZM/mg NPs@PVSA. Esto por tanto nos indica que el recubrimiento con PVSA ha sido efectivo, y que sobre la superficie pueden adsorberse proteínas de carga opuesta.

1.3 Desorción de LZM mediante el uso de un polielectrolito (PDADMACI)

Este PE competidor que usamos contiene un átomo de nitrógeno unido por cuatro enlaces simples a cuatro carbonos, lo que le otorga esa carga positiva en todo el rango de pH. La afinidad del PDADMACI por el PVSA es mucho mayor que la de la proteína, por tanto competirá eficazmente desplazando la proteína de la superficie.

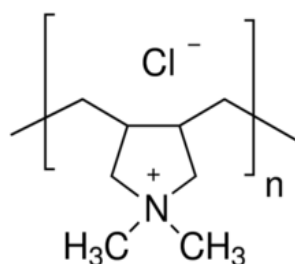


Figura 11. Estructura del monómero de PDADMACI obtenida de Sigma Aldrich.

La gráfica de la desorción a pH 1,5 (Fig. 9) nos muestra como a medida que aumentamos la cantidad de PE que añadimos en los tubos, aparece una mayor cantidad de proteína desorbida en el sobrenadante, hasta que a una determinada concentración de PE ya hemos desorbido por completo la proteína. En este caso, con una cantidad de 0,17 mg/ml de PE competidor, ya somos capaces de desorberla por completo. Por tanto la proteína una vez adsorbida sobre la superficie, puede ser desorbida completamente.

1.4 Capacidad de adsorción de LZM sobre NPs@PVSA a pH 7 en distintas condiciones de fuerza iónica

En este caso, cambiamos las condiciones en las que se encuentran las NPs@PVSA. Por un lado, estudiando el efecto del aumento de la concentración de sales en el medio en la capacidad de adsorción, hacemos que en el medio se encuentren iones cargados positivos y negativos procedentes de la disociación del NaCl, (en disolución se disocian en Na⁺ y Cl⁻). Estos iones, apantallarán las cargas del PVSA, haciendo que la lisozima en este caso presente una menor afinidad por él, ya que no tendrá expuestas tantas cargas negativas a las que unirse, haciendo así que disminuya la capacidad de adsorción de nuestras NPs@PVSA. En la representación de la Fig. 10, se ve claramente como la capacidad de adsorción disminuye drásticamente desde 0,560 mg LZM/mg NPs@PVSA a baja fuerza iónica frente a 0,111 mg LZM/mg NPs@PVSA a una fuerza iónica de 200 mM.

Por otro lado, mediante el aumento de pH de 1,5 a 7, vemos que aumenta significativamente la capacidad de adsorción de nuestras NPs, ya que a pH 1,5 la adsorción máxima era de 0,320 mg LZM/mg NPs@PVSA, mientras que a pH 7 aumenta a 0,560 mg LZM/mg NPs@PVSA.

Este aumento significativo en la capacidad de adsorción a pH 7, puede ser debido a varios motivos, uno de ellos es que al aumentar el pH, nos acercamos al punto isoeléctrico de la Lisozima (pI de 11), por lo que esta presentará un menor número de residuos cargado positivamente. Esto hará que se repelan menos las moléculas de proteína entre ellas a la hora de adsorberse a sitios que se

encuentren cercanos unos con otros en la superficie del PE, y que aumente así la cantidad de proteína que puede unirse a esta.

Otro de los motivos por los que puede aumentar la capacidad de adsorción de las NPs a pH 7 consiste en que al aumentar el pH, la NP de alúmina cuenta también con un menor número de cargas positivas, ya que también nos acercamos a su punto isoeléctrico (pI de 9). Esto haría que el PVSA que a pH 1'5, se encontraba más fuertemente unido a la NP, a pH 7 no se encuentre tan atraído por la superficie de esta y comience a exponer ramificaciones y residuos de su cadena al exterior, haciendo así que aumente el número de proteínas que puede albergar en su superficie y sus ramificaciones antes de saturarse.

Si este supuesto lo llevásemos al límite, es decir, que al aumentar el pH a 7 se debilitasen tanto las interacciones entre el PVSA y la NP, el PVSA disminuiría la superficie de contacto con la NP, y este podría llegar a soltarse de la superficie NP.

Se comprobó la presencia de PVSA en disolución mediante el uso de un colorante como el Azul de Ortotoluidina (o-Toluidin Blue, o-TB), cuyo espectro cambia al unirse a los residuos aniónicos del PVSA.

Tras realizar la prueba con o-TB, se observó que el espectro del azul de o-toluidina correspondiente al sobrenadante donde se quería comprobar la presencia de PE, era similar al espectro control de la o-TB con PVSA. Por lo que pudimos corroborar que el PVSA se desorbe de la superficie. (Fig. 12)

Para los sucesivos experimentos se hizo necesario entonces lavar nuestro stock que ajustamos a pH 7 para eliminar todo el PVSA que se soltase de la superficie.

Tras lavar y eliminar todo el PE que se soltaba, se llevó a cabo de nuevo el estudio de la capacidad de adsorción a pH 7, para ver en qué medida afectó esta pérdida de PVSA a la capacidad de adsorción. La Fig. 13 muestra que antes de hacer el lavado presentaban una capacidad de adsorción de 0,560 mg LZM/mg NPs@PVSA, frente a 0,520 mg LZM/mg NPs@PVSA que presentan después. Por tanto a pesar de que en los experimentos anteriores las NPs@PVSA no habían sido previamente lavadas a pH 7, hemos comprobado que los resultados no presentarían diferencias significativas y que por tanto pueden ser discutidos como lo han sido previamente.

2. CARACTERIZACIÓN DE LAS NPs@PVSA CON UNA PROTEÍNA ANÁLOGA A LA INSULINA

2.1 Capacidad de adsorción de β -lactoglobulina sobre las NPs@PVSA a pH 1,5.

La capacidad de adsorción de la β -lactoglobulina a pH 1,5 tal y como se representa en la Fig. 14 es de 0,260 mg β -LG/mg NPs@PVSA. A pesar de que esta cantidad es ligeramente inferior a la presentan por la lisozima (0,320 mg LZM/mg NPs@PVSA), las nanopartículas adsorben una cantidad de proteína suficiente como para ser detectable mediante las técnicas de las que disponemos, y por tanto seguir desarrollando la metodología que proponemos. Estas diferencias son debidas a las diferentes propiedades que presentan ambas proteínas, tamaño, estructura, punto isoeléctrico y por tanto distinta carga expuesta sobre la superficie.

2.2 Desorción de β -LG de la superficie.

2.2.1 Desorción por PE competidor.

La desorción de la β -lactoglobulina de la superficie a pH 1,5 se realizó de nuevo mediante la adición del PE competidor, el PDADMACl, con el que se tuvo que barrer un mayor rango de concentraciones con respecto a la lisozima, (Fig. 15), ya que las condiciones de adsorción de uno y otro son distintas. Encontrando que a una concentración de 0,25 mg/ml de PE competidor la proteína se encuentra completamente desplazada.

2.2.2 Desorción por cambio de pH.

Este método tiene sentido cuando trabajamos con una proteína como la β -lactoglobulina, ya que su punto isoeléctrico está alrededor de 4,9. Gracias a esto, a pH 1,5 tendremos una proteína con gran cantidad de residuos cargados positivamente, por lo que se unirá al PVSA que se encuentra cargado negativamente independientemente del pH al que se encuentre. A la hora de desorber la proteína y cambiar el pH a 7, la proteína contará con una mayor cantidad de cargas negativas en sus residuos aminoacídicos, haciendo que las interacciones electrostáticas que mantenían unida la proteína a las NPs@PVSA, ahora se debiliten y desaparezcan e incluso que se repelan entre ellas al tener la misma carga, y con ello haremos que se suelte de nuestro PVSA que recubre la superficie.

El resultado de ello fue que de 0,5 mg/ml que adsorbimos a las NPs@PVSA, conseguimos desorber 0,37 mg/ml, lo que supone una capacidad de recuperación del 74%. Mediante el cambio de pH no somos capaces de desorber la totalidad de la proteína, y esto puede ser debido a que la proteína presenta zonas en las que la carga es todavía positiva a este pH (aunque la carga neta total sea negativa), haciendo que parte de las moléculas queden aún adsorbidas. Esto no sería mayor

problema para lo que proponemos, puesto que sabiendo el rendimiento de desorción de la proteína sobre las NPs@PVSA, serán administradas en mayor o menor cantidad las NPs@PVSA-fármaco.

2.2.3 Desorción por cambio de pH y PE competidor.

En este caso, quisimos que a la vez que se debilitaban las uniones entre la proteína y el recubrimiento por el cambio de pH, estuviese el PDADMACI presente en el medio para que ayudase a desorber por completo la totalidad de la proteína adsorbida. Pusimos de nuevo 0,25 mg/ml de PE competidor en el medio, ya que esa fue la cantidad suficiente para conseguir una desorción completa de la proteína a pH 1,5.

Mediante este método fuimos capaces de recuperar 0,37 mg/ml de nuevo de β -lactoglobulina, lo que supone una capacidad de recuperación de 74% al igual que el método anterior. Es decir, la adición del PDADMACI no ayudó a la hora de desplazar por completo la unión de la β -lactoglobulina, pudiendo no ser suficiente cantidad de PDADMACI probada.

Dado que no hemos conseguido desorber la totalidad de la proteína, medimos la capacidad de adsorción de la β -lactoglobulina a pH 7. Como hemos dicho anteriormente, en teoría no debería haber adsorción puesto que el PE y la proteína tienen carga negativa, pero el resultado que muestra la Fig. 16 es algo contrario a esta. Aunque es baja, 0,090 mg β -LG/mg NPs@PVSA, sí se observa adsorción de la β -lactoglobulina a pH 7, lo cual nos hace pensar que la proteína sigue unida al recubrimiento puesto que tendrá determinadas regiones con carga positiva que la mantendrán unida.

3. ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE LA PROTEÍNA TRAS SER DESORBIDA DE LA SUPERFICIE DE LAS NPs@PVSA.

Tras el estudio por fluorescencia de la β -LG tras ser desorbida de la superficie, y su comparación con la proteína nativa al mismo pH, observamos en la figura 10 A que no hay ningún cambio significativo en el máximo de fluorescencia entre ambas, el cual se encuentra sobre 330 nm. En la figura 10 B, vemos en la tabla los valores de la temperatura de desnaturalización, T_m , obtenida como resultado del estudio de la rampa de temperatura realizada a ambas muestras, y en ellas vemos que los dos valores son similares, lo que nos hace pensar que la proteína no ha sufrido cambios conformacionales al ser adsorbida y posteriormente desorbida.

Podemos concluir con esto, que la proteína podría ser funcional en el organismo tras ser desorbida de la superficie, puesto que la adsorción y desorción no afecta a su estructura ni su conformación, y por tanto su función deberá ser la correcta.

CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA

CONCLUSIONES

- Hemos obtenido nanopartículas de alúmina, Al_2O_3 , recubiertas de poli-vinil-sulfonato, PVSA, (NPs@PVSA) con un diámetro hidrodinámico alrededor de $1\mu m$ capaces de adsorber 0,320 mg de lisozima/ mg NPs@PVSA a pH 1,5, pudiendo aumentar esa capacidad de adsorción hasta 0,560 mg de lisozima/ mg NPs@PVSA cuando las ponemos a pH 7, debido probablemente a una mayor exposición del PVSA, además del hecho de una menor repulsión por parte de la proteína a adsorber, ya que la carga neta de la proteína disminuye.
- Hemos visto que la interacción de la proteína con la superficie es fundamentalmente electrostática, ya que en condiciones de fuerza iónica elevada (200 mM NaCl) la capacidad de adsorción disminuye, pasando de 0,560 a 0,111 mg LZM/mg NPs@PVSA a pH 7, debido al apantallamiento de cargas.
- La Lisozima puede ser desorbida de la superficie mediante un polielectrolito competidor (en nuestro caso PDADMACl), que desplaza a la proteína debido a la mayor afinidad que presenta por la superficie.
- En cuanto a la proteína usada como análoga a la insulina, las NPs@PVSA adsorben 0,260 mg β -lactoglobulina/ mg NPs@PVSA a pH 1,5, frente a 0,090 mg/mg a pH 7 (esto supone un 35 % con respecto a pH 1,5). A pesar de que a pH 7 presenta carga neta igual a la nanopartícula, la proteína presenta zonas con carga positiva que pueden seguir interaccionando con la superficie. Esta proteína puede ser desorbida a pH 1,5, al igual que la lisozima utilizando PDADMACl como polielectrolito competidor.
- Tanto por cambio de pH (de 1,5 a 7), o mediante cambio de pH y adición de PDADMACl, la β -lactoglobulina previamente adsorbida sobre la superficie, puede ser eficazmente desorbida (el máximo que esperaríamos sería un 65 % por los resultados obtenidos) ya que recuperamos un 74 % de la proteína.
- Por último, tras desorber la β -lactoglobulina, hemos visto que no ha sufrido cambios conformacionales sobre su estructura, ya que tanto el espectro de fluorescencia como la temperatura de desnaturalización de la proteína previamente adsorbida y posterior desorbida (T_m a 75,8 °C), y la proteína nativa (T_m a 77,8 °C), no muestran diferencias significativas entre ellos.

Por tanto, por los resultados obtenidos el método que proponemos parece ser válido para adsorber una proteína (cuyo pI esté alrededor de 5) a pH 1,5 y posteriormente ser desorbida mediante cambio de pH a 7.

PROYECCIÓN FUTURA

Tras el trabajo concluido, surgen algunos aspectos que son susceptibles a ser tratados en un futuro.

- Optimizar el proceso de recubrimiento de las NPs@PVSA para que tengan un menor diámetro y aumentar así su superficie específica.
- Intentar realizar el mismo sistema de trabajo, compuesto por nanopartículas recubiertas, pero usando otro PE que se una covalentemente a la superficie de la nanopartícula, para que al cambiar el pH del medio este no se suelte.
- Intentar proteger la proteína adsorbida a la superficie, mediante encapsulación con otro polielectrolito o similar, del ataque de proteasas.
- Una vez optimizado todo el sistema, trasladar el método propuesto para el caso de la insulina, caracterizándola y viendo que no se produzcan cambios conformacionales en su estructura tras haber sido adsorbida, protegida y finalmente desorbida mediante cambio de pH.



BIBLIOGRAFÍA

- (1) Lee SI et. al. (2014). Intraperitoneal insulin therapy for a patient with type 1 diabetes with insulin injection site inflammation. *BMJ Case Report 2014* 1-4. doi: 10.1136/bcr-2014-205278.
- (2) Spollett GE et. al. (2016). Improvement of Insulin Injection Technique Examination of Current Issues and Recommendations. *The Diabetes Educator OnlineFirst, SAGE Journal 2016* Aug;42(4):379-94.
- (3) Noormägi AN et. al. (2015). Insulin Fibrillization at Acidic and Physiological pH Values is Controlled by Different Molecular Mechanisms. *The Protein Journal, Protein J.* December 2015, 34(6):398–403
- (4) Smirnova EK et. al. (2014). pH-responsive modulation of insulin aggregation and structural transformation of the aggregates. *ELSEVIER, Biochimie. (2014)* 109:49-59.
- (5) Del Pozo LU et. al. (2008). Las amiloidosis humanas: cuando las proteínas muestran su lado oscuro. *Mensaje bioquímico, Vol. XXXII* (2008)
- (6) Al Rubeaan KH et. al. (2016). Oral insulin delivery systems using chitosan-based formulation: a review. *Taylor and Francis Journal.* 2016;13(2):223-37
- (7) Fonte PE et. al. (2013). Oral Insulin Delivery: How Far Are We? *Journal of Diabetes Science and Technology.* 2013;7(2):520–531
- (8) Fonte PE et. al. (2015). Polymer-based nanoparticles for oral insulin delivery: revisited approaches. *Biotechnology advances, Research reviews.* 2015 Nov 1;33(6 Pt 3):1342-54
- (9) Jessy Shaji et. al. (2008). Protein and Peptide Drug Delivery: Oral Approaches. *Indian J Pharm Sci.* 2008; 70(3): 269–277.
- (10) Hoseinzadeh E et. al. (2017). A Review on Nano-Antimicrobials: Metal Nanoparticles, Methods and Mechanisms. *Current drug metabolism 2017.* 18(2): 120-128.
- (11) Önnby LI et. al. (2014). Improved arsenic(III) adsorption by Al₂O₃ nanoparticles and H₂O₂: Evidence of oxidation to arsenic(V) from X-ray absorption spectroscopy. *ELSEVIER Chemosphere 113.* 2014 Oct;113:151-7.
- (12) Cárdenas-Bailón FE et. al. (2013). Microencapsulation techniques to develop formulations of insulin for oral delivery: a review. *Journal of Microencapsulation (2013);*30(5):409-24.
- (13) Cózar-Bernal M. J. et. al. (2011). Insulin-loaded PLGA microparticles: flow focusing versus double emulsion/solvent evaporation. *Journal of Microencapsulation, 2011;* 28(5): 430–441.
- (14) Dashuai Mu et. al. (2015) Removing *Bacillus subtilis* from fermentation broth using alumina nanoparticles. *Bioresource Technology (2015);* 197:508–511.

- (15) Veeranna Sridhara et. al. (2011). Al₂O₃-based nanofluids: a review. *Nanoscale Research Letters* 2011, 6:456.
- (16) Mohammad A. Ansari et. al. (2015). Green synthesis of Al₂O₃ nanoparticles and their bactericidal potential against clinical isolates of multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *World J Microbiol Biotechnol* (2015) 31:153–164.
- (17) Llorente Muga, Amaia (2016). Diseño y desarrollo de nanopartículas de alúmina con cadenas de polisulfona injertadas y su efecto compatibilizante en nanocomposites de polisulfona. (Tesis doctoral). Universidad Carlos III, Madrid.
- (18) Kim IS et. al. (2010). Comparative cytotoxicity of Al₂O₃, CeO₂, TiO₂ and ZnO nanoparticles to human lung cells. *J Nanosci Nanotechnol*. 2010 May;10(5):3453-8.
- (19) Angela Ivask et. al. (2015). Toxicity of 11 Metal Oxide Nanoparticles to Three Mammalian Cell Types In vitro. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2015, 15(18): 1914-1929.
- (20) Shahid Ali et. al. (2015). Nanoscale-alumina induces oxidative stress and accelerates amyloid beta (A β) production in ICR female mice. *Nanoscale*, 2015; 7(37): 15225-15237.
- (21) Neil Brahma et. al. (2014). Effects of CMP slurry additives on the agglomeration of alumina nanoparticles 1: General aggregation rate behavior. *ELSEVIER, Journal of Colloid and Interface Science*, 2014; 419: 56–60.
- (22) Sophie Laurent, et. al. (2008). Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications. *American Chemical Society, Chem. Rev.* 2008, 108, 2064–2110.
- (23) Bimal P. Singh et. al. (2005). Stability of dispersions of colloidal alumina particles in aqueous suspensions. *ELSEVIER, Journal of Colloid and Interface Science*, 2005; 291:181–186.
- (24) Bhuvnesh Bharti et. al. (2011). Aggregation of Silica Nanoparticles Directed by Adsorption of Lysozyme. *Langmuir*, 2011;27 (16): 9823–9833.
- (25) Chun-mei Zhao et. al. (2012). Importance of surface coatings and soluble silver in silver nanoparticles toxicity to *Daphnia magna*. *Nanotoxicology*, June 2012; 6(4): 361–370.
- (26) Thi H. Nguyen et. al. (2015). Poly(Vinyl Sulfonate) Facilitates bFGF-Induced Cell Proliferation. *Biomacromolecules*, 2015; 16(9): 2684-2692.
- (27) Dr. Myers (2016/6/9). Organic Chemistry Courses at Ohio Northern University, Chapter 3. [Archivo PDF] Recuperado de la página web: https://www2.onu.edu/~b-myers/organic/2511_Files/Chapter3-pKa%20table.pdf
- (28) Langmuir, I. (1916). The constitution and fundamental properties of solids and liquids. Part i. Solids. *Journal of the American Chemical Society* 38, 2221-2295.

- (29) Durán-Lobato MA et. al. (2014). Surface-Modified P(HEMA-co-MAA) Nanogel Carriers for Oral Vaccine Delivery: Design, Characterization, and In Vitro Targeting Evaluation. *BioMacromolecules*, 2014. 15 (7): 2725–2734.
- (30) Sunjie YE et. al. (2015). Engineering Gold Nanotubes with Controlled Length and Near-Infrared Absorption for Theranostic Applications. *Advanced Functional Materials*, 2015. 25(14): 2117-2127.
- (31) Libo Zhou et. al. (2018). Mesoporous Carbon Nanospheres as a Multifunctional Carrier for Cancer Theranostics. *Theranostics* 2018; 8(3): 663–675.
- (32) Toshiaki Hattori et. al. (2005). Characterization of polyanion–protein complexes by frontal analysis continuous capillary electrophoresis and small angle neutron scattering: Effect of polyanion flexibility. *ELSEVIER, Analytical Biochemistry*, 2005;342:229–236.
- (33) Mohanraj VJ et. al. (2006). Dynamic Light Scattering: An Introduction in 30 Minutes. A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2006;5(1):5661-573 74. DLS technical note MRK656-01 (Malvern Instruments).

