



**DISEÑO Y OPTIMIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS  
CON APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS:  
CAPTURA DE CONTAMINANTES, TRANSPORTE Y  
ALMACENAMIENTO DE BIOMOLECULAS**

Tesis Doctoral

Felipe Hornos Adán

Director

Francisco Javier Gómez Pérez

Programa de Doctorado en Biología Molecular y Celular

Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche (IDiBE)

Universidad Miguel Hernández de Elche

Elche, 2020



*A mi familia*



Esta Tesis Doctoral se presenta bajo la modalidad convencional incluyendo los siguientes trabajos, publicados o aceptados para revisión, que se citan a continuación:

El primer trabajo publicado lleva por título “El dominio regulatorio de la especie monomérica de la Tirosina Hidroxilasa posee una baja estabilidad conformacional”

**Neira J.L., Hornos F., Bacarizo J., Cámara-Artigás A., Gómez J.**

“The Monomeric Species of the Regulatory Domain of Tyrosine Hydroxylase Has a Low Conformational Stability”

Biochemistry, 2016 Jun 21;55(24):3418-31 (doi: 10.1021/acs.biochem.6b00135)

El segundo trabajo publicado lleva por título “Inhibición de la adsorción de proteínas sobre superficies de sílice mediante competición con polielectrolitos”

**Hornos F., Esquembre R., Gómez J.**

“Competitive inhibition of protein adsorption to silica surfaces by their coating with high density charge polyelectrolytes”

Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 191 (2020) 110993 (doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.110993)

Ambos trabajos se emplean como indicio de calidad para la presentación de la Tesis Doctoral, cumpliendo así con la normativa del RD99/2011 y la normativa vigente de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

La financiación de esta Tesis Doctoral se ha desarrollado bajo el marco de los siguientes proyectos:

- Título: Inhibición de la agregación de proteínas por polielectrolitos de alta densidad de carga. Entidad financiadora: Ministerio de Ciencia e Innovación. Referencia: CTQ2011-24393.
- Título: Interacciones proteína - polielectrolito: diseño racional de nuevas herramientas en la optimización de procesos biotecnológicos. Entidad financiadora: Conselleria de Educación, Formación y Empleo. Referencia: PROMETEO/2013/018.
- Título: Interacciones macromoleculares y "farmacobilidad" de proteínas intrínsecamente desordenadas implicadas en el desarrollo de cáncer de páncreas. Entidad financiadora: Ministerio de Economía y Competitividad. Referencia: CTQ2015-64445-R





El Dr. **Francisco Javier Gómez Pérez**, Catedrático de Química Física del Departamento de Agroquímica y Medio Ambiente de la Universidad Miguel Hernández (UMH) e investigador del Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche (IDiBE) de la Universidad Miguel Hernández (UMH) de Elche

**CERTIFICA:**

Que el trabajo de investigación titulado “**DISEÑO Y OPTIMIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS CON APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS: CAPTURA DE CONTAMINANTES, TRANSPORTE Y ALMACENAMIENTO DE BIOMOLECULAS**” realizado por **Felipe Hornos Adán** para optar al grado de Doctor, ha sido realizado bajo su dirección en el Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche (IDiBE) de la Universidad Miguel Hernández (UMH) de Elche. Considerando que esta Tesis Doctoral se halla concluida, **AUTORIZA** su presentación para que pueda ser juzgada por el Tribunal correspondiente.

Para que conste a los efectos oportunos, firma el presente certificado en Elche, a 29 de julio de 2020.

Fdo.: Dr. Francisco Javier Gómez Pérez









---

Listado de abreviaturas .....	13
Resumen/Abstract.....	17
1. Introducción .....	23
1.1.- Introducción al concepto de nanopartícula .....	25
1.2.- Clasificación de los distintos tipos de nanopartículas .....	27
1.2.1.- <i>Nanopartículas orgánicas</i> .....	28
1.2.2.- <i>Nanopartículas inorgánicas</i> .....	29
1.2.3.- <i>Otros tipos de nanopartículas</i> .....	30
1.3.- Adsorción de ligandos a la superficie de las nanopartículas .....	31
1.4.- Efectos adversos inducidos por la adsorción de proteínas a superficies sólidas .....	36
1.5.- Nanopartículas de sílice: ejemplo de superficie sólida hidrofílica .....	39
1.6.- Nanopartículas magnéticas .....	43
1.6.1.- <i>Tipos de materiales magnéticos</i> .....	44
1.6.2.- <i>Dominios magnéticos y superparamagnetismo</i> .....	48
1.6.3.- <i>Histéresis de los materiales magnéticos</i> .....	50
1.6.4.- <i>Aplicaciones biomédicas de las nanopartículas magnéticas</i> .....	52
1.6.5.- <i>Aplicaciones industriales y medioambientales</i> .....	55
1.6.6.- <i>Métodos de síntesis de las nanopartículas magnéticas</i> .....	57
1.6.7.- <i>Recubrimiento y estabilización de nanopartículas de magnetita</i> .....	63
2. Objetivos .....	69
3. Materiales y métodos .....	73
3.1.- Materiales .....	75
3.2.- Instrumentación .....	80
3.3.- Metodología .....	96
4. Resultados y discusión .....	117
4.1.- Capítulo 1 - Inhibición de la adsorción de proteínas sobre superficies de sílice mediante competición con polielectrolitos .....	119
4.1.1.- <i>Introducción</i> .....	121
4.1.2.- <i>Hipótesis de partida</i> .....	122
4.1.3.- <i>Estrategia experimental</i> .....	123
4.1.4.- <i>Resultados y discusión</i> .....	124
4.2.5.- <i>Conclusiones</i> .....	136
4.2.- Capítulo 2 - Modulación de la capacidad de adsorción de partículas recubiertas por polielectrolitos.....	137
4.2.1.- <i>Introducción</i> .....	139
4.2.2.- <i>Hipótesis de partida</i> .....	140

---

4.2.3.- Estrategia experimental .....	142
4.2.4.- Resultados y discusión .....	143
4.2.5.- Conclusiones .....	154
4.3.- Capítulo 3 - Optimización del recubrimiento de nanopartículas de magnetita con polielectrolitos de alta densidad de carga.....	157
4.3.1.- Introducción.....	159
4.3.2.- Hipótesis de partida .....	159
4.3.3.- Estrategia experimental .....	160
4.3.4.- Resultados y discusión .....	161
4.3.5.- Conclusiones .....	173
4.4.- Capítulo 4 - Diseño y caracterización de nanopartículas magnéticas para la captura de metales pesados.....	175
4.4.1.- Introducción.....	177
4.4.2.- Hipótesis de partida .....	178
4.4.3.- Estrategia experimental .....	179
4.4.4.- Resultados y discusión .....	179
4.4.5.- Conclusiones .....	193
4.5.- Capítulo 5 – Optimización de la capacidad de adsorción de NP mediante el crecimiento del recubrimiento de PEI utilizando polianiones.....	195
4.5.1.- Introducción.....	197
4.5.2.- Hipótesis de partida .....	198
4.5.3.- Estrategia experimental .....	199
4.5.4.- Resultados y discusión .....	199
4.5.5.- Conclusiones .....	213
5. Conclusiones.....	215
6. Bibliografía .....	219
7. Anexo.....	235
8. Agradecimientos .....	311

Listado de abreviaturas



ADN	Ácido desoxirribonucleico
APTES	3-Aminopropiltriethoxisilano ( <i>3-Aminopropyltriethoxysilane</i> )
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosín trifosfato
BET	Isoterma Brunauer, Emmett y Teller
BSA	Albúmina de suero bovino ( <i>Bovine Serum Albumin</i> )
CI	Carmín de índigo ( <i>Indigo carmine</i> )
CCD	Dispositivo de carga acoplado ( <i>Charge Coupled Device</i> )
Cys	Cisteína
DLS	Dispersión de luz dinámica ( <i>Dynamic Light Scattering</i> )
DLVO	Teoría de Derjauin, Landau, Verwey y Overbeek
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético ( <i>EthylenDiaminTetracetic Acid</i> )
EPR	Retención y permeabilidad mejorada ( <i>Enhanced permeability and retention</i> )
FT	Transformada de Fourier ( <i>Fourier Transform</i> )
GUV	Vesícula gigante unilamelar ( <i>Giant Unilamellar Vesicle</i> )
HSA	Albúmina de suero humano ( <i>Human Serum Albumin</i> )
IgG	Inmunoglobulina G
IR	Infrarrojo
ITC	Calorimetría isoterma de titulación ( <i>Isothermal Titration Calorimetry</i> )
KPVS	Polivinilsulfato de potasio ( <i>Poly(vinyl sulfate) potassium</i> )
LUV	Vesícula grande unilamelar ( <i>Large Unilamellar Vesicle</i> )
Lzm	Lisozima
Mag-TE	Ingeniería de tejidos basada en fuerza magnética ( <i>mag. force-based tissue engineering</i> )
MLV	Vesícula multilamelar ( <i>Multilamellar Vesicle</i> )
MRI	Imagen por resonancia magnética ( <i>Magnetic Resonance Imaging</i> )
MW	Multicapa ( <i>Multi-wall</i> )
NNI	Iniciativa Nacional de Nanotecnología ( <i>National Nanotechnology Initiative</i> )
NP	Nanopartícula
o-Tb	Azul de ortotoluidina ( <i>o-Toluidine blue</i> )
PAA	Ácido poliacrílico ( <i>Poliacrilic Acid</i> )
PAAH	Hidrocloruro de polialiamina ( <i>Poly(allylamine) hydrochloride</i> )
PDADMACl	Cloruro de polidialildimetilamonio ( <i>Poly(diallyldimethylammonium chloride)</i> )
PDT	Terapia fotodinámica ( <i>Photodynamic therapy</i> )
PE	Polielectrolito
PEG	Polietilenglicol ( <i>Poly(ethylene glycol)</i> )
PEI	Polietilenimina ( <i>Polyethylenimine</i> )
PEIc	Polietilenimina carboxilada
Phe	1,10-fenantrolina ( <i>1,10-Phenanthroline</i> )
pl	Punto isoeléctrico
PVA	Polivinilalcohol ( <i>Poly(vinyl alcohol)</i> )
PVP	Polivinilpirrolidona ( <i>Polyvinylpyrrolidone</i> )
PZ	Potencial Z
PZC	Punto de carga cero ( <i>Point of Zero Charge</i> )
q <sub>máx</sub>	Capacidad máxima de adsorción de un ligando sobre una superficie
RAE	Real Academia Española
RNasa	Ribonucleasa
SAR	Capacidad específica de absorción ( <i>Specific Absorption Rate</i> )
SPR	Resonancia de plasmones de superficie ( <i>Surface Plasmon Resonance</i> )
SUV	Vesícula pequeña unilamelar ( <i>Small Unilamellar Vesicle</i> )
SW	Única capa ( <i>Single-wall</i> )
TEM	Microscopía electrónica de transmisión ( <i>Transmission Electron Microscopy</i> )
TEOS	Tetraetil ortosilicato ( <i>Tetraethyl o-silicate</i> )

$T_m$	Temperatura de desnaturalización
TREG	Trietilenglicol ( <i>Triethylene Glycol</i> )
Trp	Triptófano
$\beta$ -Lg	$\beta$ -Lactoglobulina
$\Delta G$	Variación de energía libre de Gibbs
$\Delta H$	Variación de entalpía
$\Delta S$	Variación de entropía
$\epsilon$	Coefficiente de extinción
$\chi$	Susceptibilidad magnética



Resumen/Abstract



## RESUMEN

La adsorción de proteínas y otras biomoléculas a superficies sólidas es un proceso que afecta virtualmente a cualquier superficie utilizada para la manipulación o almacenamiento de estas moléculas. Estos procesos de adsorción suelen inducir una disminución en la estabilidad conformacional de la proteína adsorbida con potenciales efectos negativos sobre su posterior identidad biológica debido a procesos de desnaturalización, agregación o fibrilación. La presente Tesis Doctoral centra su atención en la interacción entre polímeros formados por monómeros cargados (polielectrolitos) capaces de inhibir la adsorción de proteínas a superficies de sílice, un material de uso común en muchas aplicaciones biotecnológicas o en el trabajo habitual de laboratorio.

En efecto, las superficies de sílice pueden ser recubiertas con polielectrolitos de alta densidad de carga que impiden la adsorción de proteína. Los polímeros catiónicos de alta densidad de carga muestran una elevada afinidad por la superficie de sílice (cargada negativamente a valores de pH superiores a 3) debido al efecto sinérgico de las interacciones electrostáticas atractivas que se establecen entre cada uno de sus monómeros y la partícula sólida. Dado que la afinidad de la proteína por esa misma superficie es menor, ésta no podrá competir satisfactoriamente por la superficie de sílice cuando se encuentra recubierta por polielectrolito.

Las superficies recubiertas de polielectrolitos pueden servir, además, como adsorbentes de ligandos de carga opuesta. Esta Tesis Doctoral presenta algunos avances en la optimización de estos procesos de adsorción de ligandos a nanopartículas cuya superficie se recubre de polielectrolitos para conferirle las propiedades demandadas para capturar, transportar o almacenar ligandos específicos. En particular, el recubrimiento de la superficie de partículas de sílice con el polielectrolito catiónico PDADMACI (cloruro de polidialildimetilamonio), permite adsorber de forma eficaz ligandos de carga opuesta. La capacidad de las partículas así recubiertas puede ser modulada ajustando, de forma racional y predecible, la diferencia de pH entre el cual se utiliza para obtener el recubrimiento y el que corresponde a sus condiciones de uso. Se ha demostrado experimentalmente, que cuanto mayor sea la diferencia entre el pH al que se lleva a cabo el recubrimiento de la partícula de sílice y el pH al cual van a ser utilizadas, mayor es el aumento en la cantidad de ligando de carga opuesta que puede ser adsorbida (comparada con la cantidad que partículas similares adsorberían si su recubrimiento se hubiera realizado a este segundo pH).

Utilizando polielectrolitos de distinta naturaleza se han obtenido nanopartículas de magnetita con elevada estabilidad coloidal y capaces de adsorber tanto ligandos catiónicos como aniónicos. La capacidad de los polielectrolitos de reducir de forma drástica el tamaño de las partículas de magnetita desnuda, junto con los factores que optimizan su estabilidad coloidal y capacidad de capturar diversos ligandos, han sido discutidos.

Se han diseñado y obtenido nanopartículas de magnetita recubiertas por un derivado carboxilado de la polietilenimina, PEI, capaz de unir cationes de metales pesados con alta afinidad. Se ha optimizado su capacidad de capturar metales en disolución acuosa, así como las condiciones para la recuperación del metal capturado y la reutilización de las nanopartículas en ciclos sucesivos. Además, se ha demostrado la capacidad de estas nanopartículas para capturar fraccionadamente metales presentes en mezclas, atendiendo al orden de las constantes de formación del complejo metal-nanopartícula.

Finalmente, se ha desarrollado un método que permite el crecimiento de la cantidad de moléculas de polímero cargado presente en el recubrimiento de las nanopartículas. Para ello, se han utilizado polianiones que establecen interacciones electrostáticas entre las moléculas de polielectrolito que forman parte del recubrimiento inicial y otras que se encontraban en disolución. El resultado final es la incorporación de estas al recubrimiento ampliado. La capacidad de carga de estas nanopartículas con recubrimiento ampliado (que depende exclusivamente de la cantidad de polielectrolito en exceso utilizado en su preparación) aumenta linealmente con la cantidad de polímero cargado incorporado al recubrimiento primitivo. Esto abre la puerta a un diseño verdaderamente racional de nanopartículas cuyo objetivo sea la captura, el transporte o el almacenamiento de ciertos ligandos.

---

**ABSTRACT**

The adsorption of proteins and other biomolecules to solid surfaces is a process that affects virtually any surface used for the storage manipulation of these molecules. These adsorption processes usually induce a decrease in the conformational stability of the adsorbed protein with potential negative effects on its subsequent biological identity due to denaturation, aggregation or fibrillation processes. This Doctoral Thesis focuses on the interaction between polymers formed by charged monomers (polyelectrolytes) capable of inhibiting the adsorption of proteins to silica surfaces, a material ubiquitous almost all biotechnological applications or in the everyday laboratory work.

Indeed, the coating of silica surfaces with high charge density polyelectrolytes prevents protein adsorption. High charge density cationic polymers show a high affinity for the silica surface (negatively charged above pH 3) due to the synergistic effect of the attractive electrostatic interactions established between each of its monomers and the solid particle. Since the affinity of the protein for that same surface is lower, it cannot compete satisfactorily for the silica surface once coated with the polyelectrolyte.

Polyelectrolyte coated surfaces can also serve as adsorbents of ligands of opposite charge. This Doctoral Thesis presents some advances in the optimization of these adsorption processes of ligands to nanoparticles whose surface is covered with polyelectrolytes to confer them the properties demanded for the capture, transport or storage of specific ligands. In particular, the coating of the surface of silica particles with the cationic polyelectrolyte, PDADMACl (poly(diallyldimethylammonium chloride), allows adsorbing of ligands with opposite charge quite efficiently. The capacity of the particles thus coated can be modulated by adjusting, rationally and predictably, the difference in pH between which it is used to obtain the coating and that corresponding to its conditions of use. It has been experimentally demonstrated that the greater the difference between the pH at which the silica particle coating is carried out and the pH at which they are to be used, the greater the increase in the amount of ligand that will be adsorbed (compared to the amount that similar particles would absorb if their coating had been made at this second pH).

Using polyelectrolytes of different nature, magnetite nanoparticles with high colloidal stability and capable of adsorbing both cationic and anionic ligands have been obtained. The ability of polyelectrolytes to reduce dramatically the size of naked magnetite particles along with factors that optimize their colloidal stability and ability to capture various ligands have been thoroughly discussed.

Magnetite nanoparticles coated by a carboxylated derivative of polyethyleneimine, PEI, capable of binding heavy metal cations with high affinity have been designed and obtained. Their ability to capture metals in aqueous solution has been optimized, as well as the conditions for the recovery of the captured metal and the reuse of nanoparticles in successive cycles. In addition, the ability of these nanoparticles to fractionally capture metals present in mixtures according to the order of the formation constants of the metal-nanoparticle complex has been demonstrated.

Finally, a method has been developed that allows the growth of the amount of charged polymer molecules present in the coating of the nanoparticles have been developed. Some polyanions can establish electrostatic interactions between the polyelectrolyte molecules that are part of the initial coating and others that were in solution. The end result is the incorporation of these into the expanded coating. The loading capacity of these expanded coated nanoparticles (which depends exclusively on the amount of excess polyelectrolyte used in its preparation) increases linearly with the amount of charged polymer incorporated into the primitive coating. This opens the door to a truly rational design of nanoparticles whose objective is the capture, transport or storage of certain ligands.

## 1. Introducción





### 1.1.- Introducción al concepto de nanopartícula.

La historia de la humanidad está íntimamente ligada a la comprensión de las leyes de la naturaleza y a la utilización de este conocimiento en el desarrollo de tecnología, que ha servido, mayoritariamente, para mejorar las condiciones de vida de los individuos de nuestra especie. La necesidad demostrada por el ser humano para aprender es innata e inseparable de su capacidad de creación e innovación, no solo como medio de sobrevivir como especie sino, también, como respuesta a su necesidad de evolucionar en sus capacidades cognitivas.

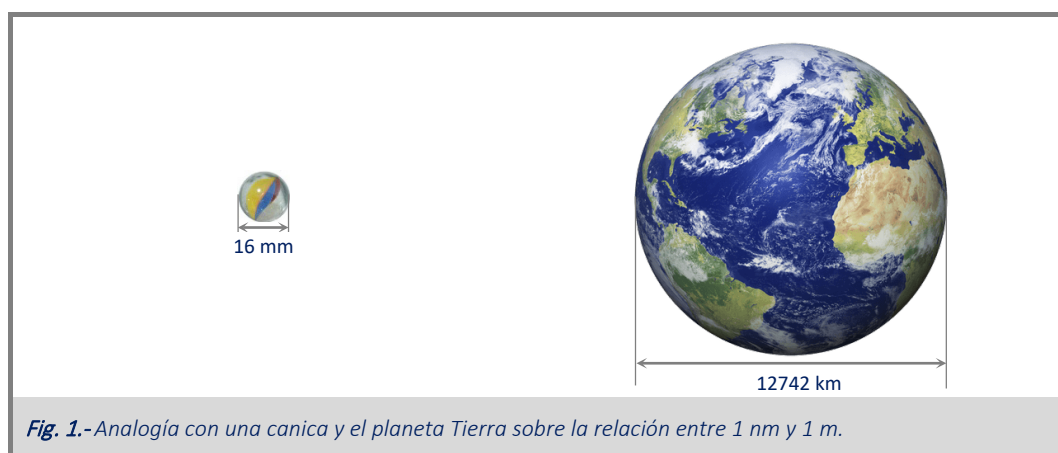
El largo camino de la humanidad en su desarrollo tecnológico comenzaría con los primeros vestigios de vida humana inteligente: fabricación de los primeros utensilios, capacidad de mantener primero y crear después, el fuego o el desarrollo de los primeros avances en el aumento de la productividad agrícola y ganadera. El invento de la rueda (hace más de 5000 años) es considerado un salto cualitativo en el avance de la sociedad humana. A él se sumarían infinidad de avances científicos y tecnológicos a lo largo de los siglos siguientes, con ritmo variable dependiendo del momento histórico. Sin embargo, el final de la Edad Media y el advenimiento del Renacimiento, supuso una aceleración en la velocidad de adquisición del conocimiento humano. La llegada de la Primera Revolución Industrial, a finales del siglo XVIII, con la introducción de las primeras máquinas de vapor, supuso la definitiva utilización sistemática de la tecnología al servicio de todos los procesos de producción llevados a cabo por el hombre, tanto agrícolas como industriales. Más aún, los avances en el conocimiento científico y tecnológico se convierten en la fuerza motriz de las mejoras de producción, estableciéndose una relación causa-efecto entre el desarrollo tecnológico y el aumento de la productividad. Durante las décadas finales del siglo XVIII y las correspondientes al siglo XIX, se produce un crecimiento económico sin parangón en la historia de la humanidad que se basa, de forma fundamental, sobre el avance en el conocimiento científico y su implementación en forma de desarrollo tecnológico. Así, en plena expansión industrial basada en el imparable desarrollo tecnológico, se despliega la Segunda Revolución Industrial (en el último cuarto del siglo XIX) con el desarrollo de la electricidad, la industria química y de automoción. El desarrollo científico-tecnológico se acelera y éste espolea el desarrollo industrial y productivo. A finales del siglo XX surge la Tercera Revolución Industrial con la introducción de los computadores y el desarrollo de internet. En la sociedad actual (y probablemente con mayor intensidad en el futuro) el desarrollo científico y su implementación tecnológica no solo está dirigido al aumento de la producción, sino que afecta a todos y cada uno de los aspectos relacionados con la actividad humana, incluidas las formas de relación entre los humanos y de éstos con el universo.

Con el desarrollo de la Revolución del Conocimiento, emerge una importante rama que podría ser la base de una nueva revolución tecnológica: la **nanotecnología**. El término nanotecnología fue acuñado por primera vez por Norio Taniguchi en 1974<sup>1</sup>, aunque las ideas y conceptos sobre la nanotecnología fueron

introducidos por el premio Nobel de Física Richard Feynman en una conferencia de la *American Physical Society* el 29 de diciembre de 1959, bajo el título “*There’s Plenty of Room at the Bottom*”<sup>2</sup> en la que el autor considera la posibilidad de la manipulación directa de átomos individuales como una nueva herramienta de la química sintética mucho más poderosa que cualquiera de las utilizadas hasta entonces. Aunque diferentes versiones de la charla fueron publicadas en revistas populares de escasa tirada, la idea pasó casi inadvertida hasta que los primeros investigadores propulsores de la nanotecnología comenzaron a citarla como medio de establecer la credibilidad científica de sus trabajos seminales desarrollados a finales de la década de los 70 del siglo pasado.

¿Cómo definimos la nanotecnología? Hay multitud de definiciones; la Real Academia Española (RAE) la define como “tecnología de los materiales y de las estructuras en la que el orden de magnitud se mide en nanómetros, con aplicación a la física, la química y la biología”. Otra definición, más detallada, puede ser la que da *National Nanotechnology Initiative* (NNI): “la nanotecnología es ciencia, ingeniería y tecnología llevada a la escala nanométrica (entre 1 y 100 nanómetros aproximadamente), lo que implica la capacidad de ver y controlar átomos y moléculas individuales”.

¿Podemos percibir esta escala nanométrica? Para contextualizarla debemos definir que un nanómetro es la mil millonésima parte de un metro ( $1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$ ). Podremos visualizarla mejor en nuestra mente si comparamos el planeta Tierra (cuyo radio promedio es de 6371 km) con una canica de vidrio cuyo tamaño más habitual se corresponde con una esfera de 0.8 cm de radio. Si comprimimos la Tierra hasta formar una esfera de 1 m de radio, el tamaño correspondiente de la canica (sometida a la misma reducción de tamaño) sería de 1.26 nm (Fig. 1).



La nanotecnología se desarrolla en multitud de campos como la biología, la química, la ingeniería, la física, la ciencia de materiales o la medicina, con lo cual pueden surgir multitud de nanomateriales para ser usados en distintas aplicaciones, como en informática o biomedicina, siendo esto posible dadas las excelentes y únicas propiedades ópticas, magnéticas, eléctricas, catalíticas, biológicas o mecánicas que pueden tener<sup>3</sup>.

Entre estos nanomateriales son de especial relevancia las **nanopartículas** (partículas que poseen un tamaño entre 1 y 100 nm). Aunque es a partir de las últimas décadas donde mayor relevancia están teniendo estas nanopartículas por su potencial aplicabilidad, tanto en el ámbito científico como en el industrial<sup>4</sup>, ya eran utilizadas por nuestros antepasados en decoraciones cerámicas vidriadas, a las cuales añadían nanopartículas de cobre o plata para proporcionarles propiedades ópticas distintas, dependiendo de la difracción o reflexión de la luz. Los romanos también hicieron uso de nanopartículas de oro para dar color rojo al vidrio. Un ejemplo de ello es la copa Licurgo, sita en el museo británico de Londres, la cual presenta un color verde a la luz del día, y un color rojo cuando se ilumina desde el interior<sup>5</sup>.

¿Por qué son tan atractivas estas nanopartículas? A diferencia del material a granel macroscópico, poseen unas propiedades físico-químicas y mecánicas especiales, como su gran superficie específica, lo que les confiere una enorme reactividad, o distinta elasticidad o ductilidad. Además, debido a la elevada densidad electrónica que poseen se produce un aumento en la banda de semiconductores, en su absorción óptica y en su fotoluminiscencia<sup>6</sup>. A todo esto, hay que sumar la relativa facilidad de obtención, manipulación y funcionalización. Debido a la gran energía superficial que poseen (asociada a su alta densidad superficial específica), las nanopartículas presentan elevada tendencia a aglomerarse. Con objeto de reducir esta tendencia, suelen ser tratadas con moléculas de distinta naturaleza cuyo recubrimiento aumenta su estabilidad coloidal mediante una estabilización estérica o electrostática<sup>4,7</sup>.

## 1.2.- Clasificación de los distintos tipos de nanopartículas.

Las nanopartículas pueden ser obtenidas mediante varios procedimientos los cuales se encuentran englobados en dos grupos; el primero de ellos contempla la estrategia de arriba hacia abajo (*top-down*) donde las nanopartículas son obtenidas, mayoritariamente mediante métodos físicos, a partir del material a granel. El segundo se basa en la estrategia de abajo hacia arriba, (*bottom-up*) donde las nanopartículas son obtenidas mediante reacciones químicas a partir de sus componentes moleculares a través de procesos de nucleación y crecimiento<sup>4</sup> (Fig. 2).

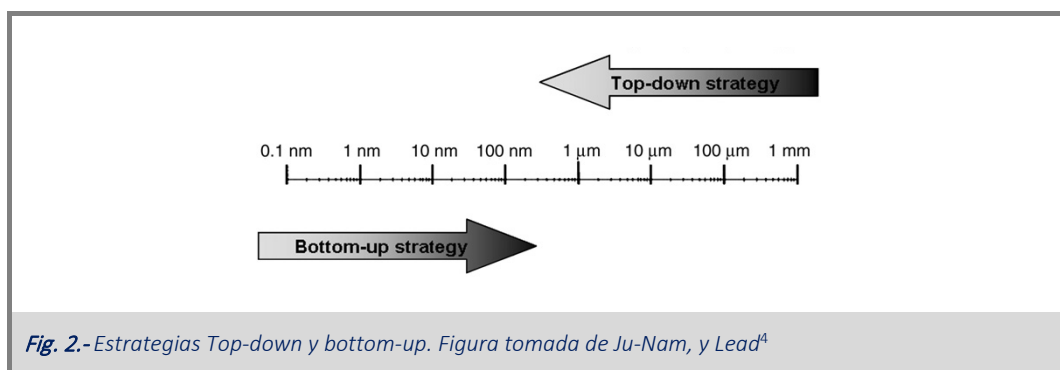
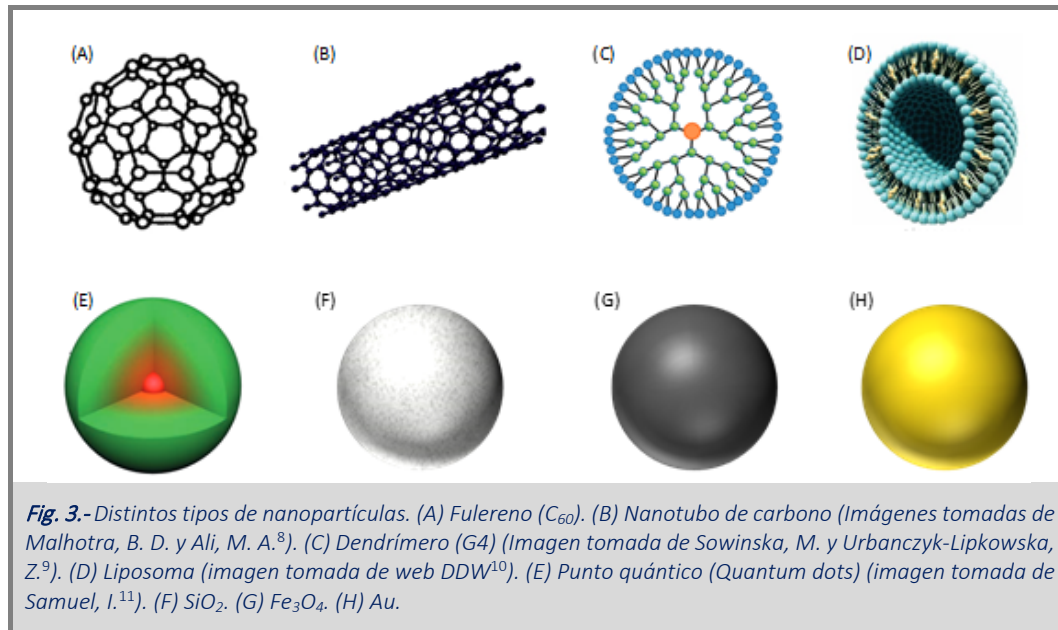


Fig. 2.-Estrategias Top-down y bottom-up. Figura tomada de Ju-Nam, y Lead<sup>4</sup>

Se pueden obtener una gran variedad de nanopartículas con distinta composición, forma, tamaño o propiedades físico-químicas<sup>7</sup>. Es por ello que existe una amplia clasificación (Fig. 3), la cual suele diferenciar entre dos tipos de nanopartículas (orgánicas e inorgánicas) dependiendo de la naturaleza del núcleo que las forman.

A continuación, se hará una somera descripción de los distintos tipos de nanopartículas, haciendo una descripción más pormenorizada de aquellas que han sido utilizadas en las investigaciones recogidas en la presente Tesis Doctoral.



### 1.2.1.- Nanopartículas orgánicas.

#### Nanotubos de carbono

Los nanotubos de carbono, sintetizados por primera vez por Sumio Iijima en 1991<sup>12</sup>, son estructuras cilíndricas alargadas con diámetros desde 1 hasta varias docenas de nanómetros y una longitud de hasta varios micrómetros. Están constituidos por una o varias capas de grafito formando un tubo, donde los carbonos forman un enrejado hexagonal<sup>13</sup>. Tanto si contienen una sola capa (SW, *single-wall*), como si poseen multicapas (MW, *multi-wall*), debido a sus fantásticas propiedades mecánicas, térmicas, fotoquímicas y eléctricas tienen una elevada aplicabilidad, como puede ser en la eliminación de contaminantes del medio ambiente, en sistemas de almacenamiento de energía, en microelectrónica, etc.<sup>4,14</sup>

## Fulerenos

Fueron descubiertos en 1985 por Kroto et al.<sup>15</sup> Son moléculas que contienen, generalmente, 60 átomos de carbono (denominados como C<sub>60</sub>), donde los átomos de carbono se sitúan en los vértices de un icosaedro truncado formando una estructura molecular esférica<sup>6</sup>. Son usados en aplicaciones biológicas y médicas, pero debido a su baja solubilidad en medio acuoso han de ser encapsulados o funcionalizados con moléculas hidrofílicas<sup>4</sup>.

### 1.2.2.- Nanopartículas inorgánicas.

#### *Puntos cuánticos (Quantum dots)*

Están formados por nanocristales semiconductores fluorescentes, los cuales poseen la sorprendente propiedad de cambiar sus propiedades ópticas en función del tamaño. Estas nanopartículas están constituidas mediante complejos de CdSe, CdS o CdTe, etc. Por ejemplo una variación de tamaño en nanopartículas de CdSe de 20 a 2 nm, provoca un aumento de la banda prohibida (distancia entre la banda de valencia y la banda conductora) y por tanto de energía, cambiando del color rojo (1.7 eV) al verde (2.4 eV)<sup>16</sup>. Estas nanopartículas han sido usadas como imagen *in vivo*<sup>17</sup>.

#### *Nanopartículas metálicas*

Las nanopartículas metálicas están formadas por un solo elemento, como puede ser Au, Ag o Fe. Las nanopartículas de Fe tienen una gran aplicación sobre remediación de aguas contaminadas. Las nanopartículas de Ag han demostrado tener una elevada actividad antibacteriana. Por su parte, las nanopartículas de Au pueden ser utilizadas como biosensores<sup>6</sup>.

Una importante propiedad de estas partículas es el efecto de resonancia de plasmones de superficie (SPR, por sus siglas en inglés *surface plasmon resonance*) que surge como consecuencia de la interacción de la luz incidente y los electrones de conducción en la superficie de la partícula. Dicho efecto va a depender de las propiedades que presente esa partícula, como su forma, tamaño, superficie química, etc., pudiendo ser usado para cuantificar cambios en las propiedades ópticas de las partículas cuando interaccionan con otras moléculas<sup>4</sup>.

#### *Nanopartículas de óxidos metálicos*

Debido a la gran variedad de óxidos metálicos que pueden ser formados, la geometría estructural de estos será variada, con una estructura electrónica que otorgará distinto carácter metálico, semiconductor o aislante. Si esto lo trasladamos al campo nanotecnológico, las nanopartículas de estos óxidos tendrán unas

propiedades físicas y químicas únicas debido a la reducción del tamaño<sup>18</sup>. Este grupo puede englobar óxidos metálicos como: TiO<sub>2</sub>, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, ZnO, CeO, CuO o Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, incluyendo también SiO<sub>2</sub>.

Es por ello que estas nanopartículas tienen una gran aplicabilidad; por ejemplo, nanopartículas de TiO<sub>2</sub>, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> y ZnO han sido usadas en cosmética o en protectores solares. Por otro lado nanopartículas de SiO<sub>2</sub> son usadas en pastas de dientes como abrasivos mientras que nanopartículas de Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> son usadas en catálisis<sup>4</sup>.

En apartados posteriores de este mismo capítulo se hará una descripción más pormenorizada de las nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> y de SiO<sub>2</sub> ya que han sido utilizadas en las investigaciones presentadas en los capítulos posteriores de esta Tesis Doctoral.

### **1.2.3.- Otros tipos de nanopartículas.**

#### *Liposomas*

Son considerados partículas coloidales autoensambladas cuya estructura es parecida a las membranas celulares, y están compuestas por vesículas esféricas de una o más bicapas fosfolipídicas. Sobre ellos o en su interior pueden unirse una gran variedad de moléculas tanto hidrofóbicas como hidrofílicas lo que les confiere una amplia aplicabilidad en la encapsulación y vehiculización de fármacos y otras biomoléculas. Debido a la variedad de liposomas en cuanto a su tamaño; SUV (*small unilamellar vesicle*) entre 25 y 50 nm, LUV (*large unilamellar vesicle*) entre 100 y 2000 nm, GUV (*giant unilamellar vesicle*) entre 1000 y 3000 nm o MLV (*multilamellar vesicle*) entre 1000 y 3500 nm, solo los más pequeños podrán ser considerados como nanopartículas presentando una buena estabilidad *in vivo* y fácil biodistribución<sup>19</sup>.

#### *Dendrímeros*

Los dendrímeros están formados por moléculas poliméricas muy ramificadas dotándolos de una estructura tridimensional análoga a un árbol. Se construyen mediante capas poliméricas a las que se conoce como generaciones. Así, un dendrímero de generación n estará formado por la unión covalente de n capas de polímero. Dependiendo del número de generaciones el tamaño será variable (generalmente, entre 1 y 15 nm). Tienen una elevada aplicabilidad como excipientes, debido a su capacidad para aumentar la solubilidad, estabilidad, viabilidad y eficacia de fármacos<sup>20</sup>.

### 1.3.- Adsorción de ligandos a la superficie de las nanopartículas.

Como ya se ha comentado con anterioridad, la elevada área específica de las nanopartículas es una de las propiedades que le confieren un especial interés en variadas aplicaciones biotecnológicas. La adsorción de distintas moléculas, en especial biomoléculas, ha sido utilizada en las últimas décadas en los más variados procesos biotecnológicos. La adsorción de biomoléculas a superficies tanto hidrofílicas como hidrofóbicas es un fenómeno que responde a su naturaleza anfipática<sup>21-23</sup>. Este comportamiento ha sido profusamente utilizado en aplicaciones tales como la separación cromatográfica<sup>24</sup>, el desarrollo de nuevos sistemas de encapsulación y transporte<sup>25,26</sup>, sensores<sup>27</sup> o nuevos materiales biocompatibles<sup>28</sup>. Sin embargo, la adsorción de proteínas a superficies sólidas a menudo lleva aparejada la disminución de su estabilidad conformacional<sup>29-31</sup>, lo que puede traducirse en cambios tanto estructurales como funcionales<sup>32</sup>. Todo ello puede tener efectos potencialmente negativos en situaciones en las que se requiere de proteínas funcionales para su uso como catalizadores, fármacos o aditivos nutricionales. Como ejemplos de estos procesos pueden citarse la adsorción de proteínas sobre superficies sólidas de vidrio y plástico o lentes de contacto<sup>33</sup>, induciendo una cierta pérdida de actividad, y los procesos de agregación proteica que pueden provocar el desarrollo de trombos en implantes artificiales y una potencial inmunogenicidad<sup>31,34-36</sup>.

Dado que el grueso de la presente Tesis Doctoral se basa en la adsorción de proteínas sobre determinadas superficies sólidas o recubiertas con ciertos polielectrolitos, a continuación, describo los aspectos más importantes que caracterizan este fenómeno.

La adsorción de proteínas es definida como la adhesión espontánea de una o varias capas de moléculas de proteína sobre una superficie sólida, produciéndose debido a la disminución de la energía libre derivada tanto del establecimiento de interacciones favorables (tanto electrostáticas como hidrofóbicas) como del aumento entrópico que induce la deshidratación tanto de la superficie de la nanopartícula como de la propia biomolécula (que supone la liberación de moléculas de agua). Las proteínas son co-polímeros que contienen diferentes aminoácidos de hidrofobicidad variable, por lo que se comportan de manera anfifílica otorgándoles una gran superficie activa<sup>37</sup>. Cada proteína tiene una composición y estructura única debido a la distinta composición de aminoácidos (hasta 20 distintos) y a las distintas características que presentan estos en función de su polaridad, haciendo que aquellos que sean apolares estén mayoritariamente enterrados en el interior de la proteína, mientras que los polares y cargados se encuentren preferencialmente en la superficie de esta, contribuyendo de forma favorable a su adsorción sobre superficies de carga opuesta<sup>38</sup>.

Este proceso de adsorción podemos caracterizarlo mediante la isoterma de adsorción, que representa la cantidad de adsorbato (ligando que se adsorbe) por unidad de masa (o de área) de adsorbente (material del que está hecha la nanopartícula sólida) en función de la concentración de ligando en disolución en equilibrio con el complejo nanopartícula-ligando. La primera isoterma de adsorción fue propuesta por

Langmuir en 1918<sup>39</sup>. Aunque fue desarrollada para describir la adsorción de gases a superficies sólidas, es frecuentemente utilizada para explicar la adsorción de otros ligandos, en particular proteínas en dispersiones suficientemente diluidas<sup>40</sup>. Aunque hay varios tipos de isothermas, la isoterma tipo I (Fig. 4) o isoterma de Langmuir (Ec. 1) es la más utilizada.

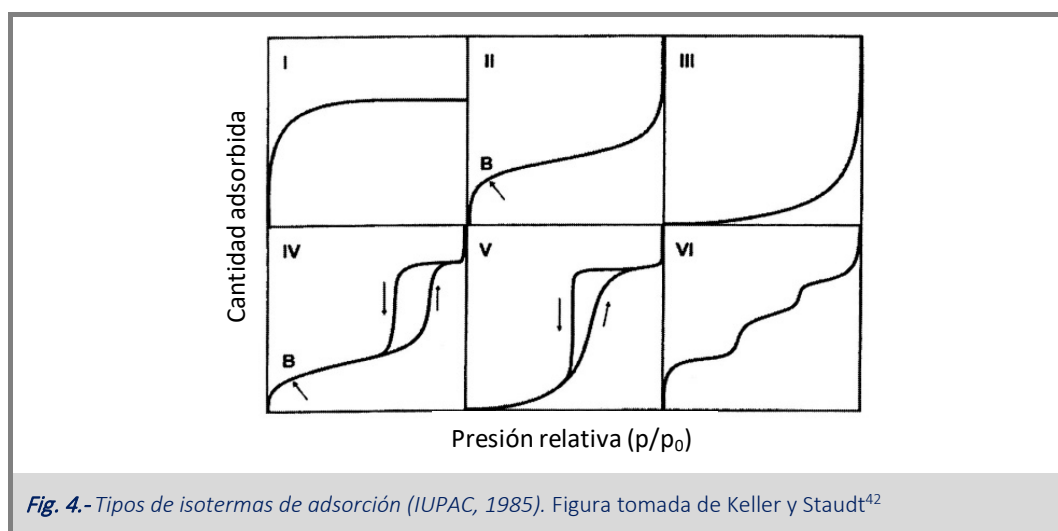
$$q = \frac{m_{prot}}{m_{NP}} = \frac{K \cdot [P]}{1 + K \cdot [P]} \cdot q_{m\acute{a}x} = \frac{[P]}{K_D + [P]} \cdot q_{m\acute{a}x} \quad (\text{Ec. 1})$$

donde  $q$  es la masa de proteína adsorbida por unidad de masa (o de área) de la nanopartícula,  $q_{m\acute{a}x}$  la cantidad máxima de proteína adsorbida por unidad de masa (o de área) de nanopartícula (una vez se alcanza saturación),  $[P]$  es la concentración de proteína en disolución y  $K$  es la constante de equilibrio del proceso de adsorción (siendo  $K_D = 1/K$ , la constante de disociación).

$q$  aumenta monótonicamente y de forma saturable con  $[P]$  (para una cantidad de nanopartícula constante). A medida que  $[P]$  aumenta, el incremento de  $q$  se hace menor, tendiendo asintóticamente a  $q_{m\acute{a}x}$ , cuando la superficie de la nanopartícula está completamente recubierta de proteína<sup>38</sup>.

Este modelo de adsorción asume que<sup>41</sup>:

- Sólo se forma una monocapa; es decir, solo se une una molécula por sitio de unión.
- La superficie es homogénea, por lo que todos los centros de unión son idénticos.
- Los sitios de unión son independientes, por tanto, la adsorción de una molécula no afecta a la adsorción de la siguiente.
- No hay competición por los sitios de unión.
- La adsorción es reversible.

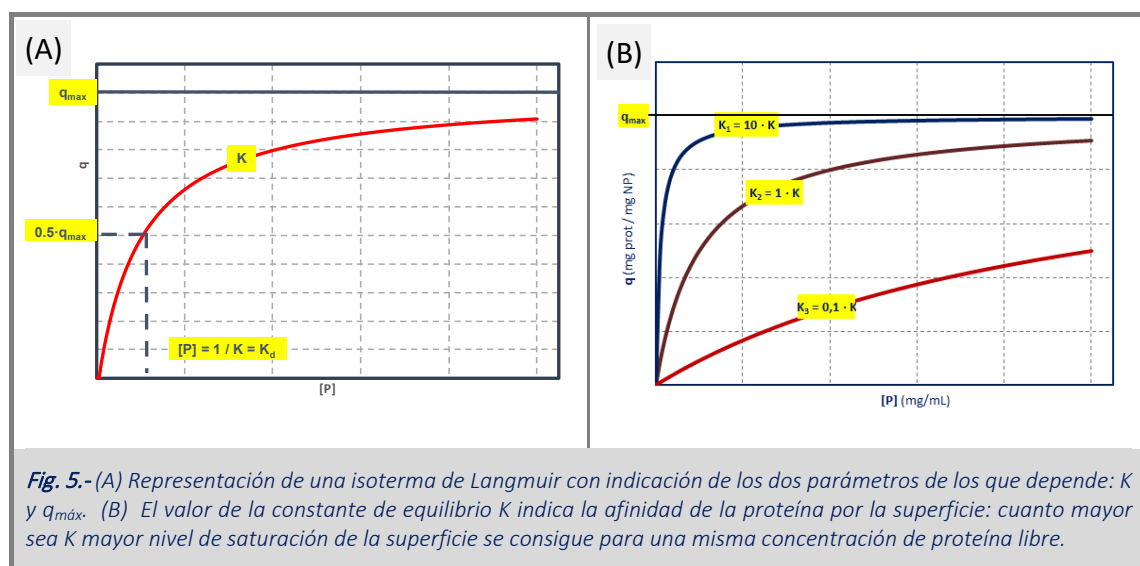


En cuanto a los demás tipos de isothermas (Fig. 4), en la tipo II y III la adsorción se produce en materiales macroporosos (diámetro de poro > 50 nm), en los que se forma inicialmente una monocapa para después



formar multicapas. El punto B indica cuando se completa la monocapa y empieza la formación de capas sucesivas. Este tipo se puede ajustar al modelo de isoterma BET, que debe su nombre a Brunauer, Emmett y Teller que la desarrollaron en 1938<sup>43</sup>. Las isothermas IV y V, muestran un comportamiento similar a las de tipo II y III en cuanto al proceso de adsorción, sin embargo, el proceso de desorción hace que presente un comportamiento de histéresis debido a la condensación capilar que tiene lugar en los poros. Por último, la isoterma tipo VI presenta una adsorción formando multicapas paso a paso sobre una superficie uniforme no porosa<sup>42</sup>.

De la isoterma de Langmuir podemos obtener información acerca de la afinidad con la que se produce la adsorción (constante de equilibrio,  $K$ ), y la capacidad máxima de adsorción de dicha superficie,  $q_{\text{máx}}$ . (Fig. 5).



Para superficies heterogéneas y con distintos sitios de unión se puede aplicar el modelo de isoterma de Freundlich<sup>41</sup> (Ec. 2) que es una relación puramente empírica entre la cantidad de adsorbato unido a la superficie y su concentración en disolución, siempre y cuando  $n > 1$ . Es también aplicado para sistemas que no ajustan a la isoterma de Langmuir<sup>44</sup>, ya que en este modelo no se llega a alcanzar la saturación.

$$q = K \cdot [P]^{1/n} \quad (\text{Ec. 2})$$

donde  $K$  y  $n$  son parámetros que dependen de la superficie adsorbente y de las características del adsorbato,  $[P]$  es la concentración de proteína presente en la disolución en equilibrio con la superficie y  $q$ , representa la masa de proteína adsorbida sobre la unidad de masa (o de área) del adsorbente (nanopartícula).

A partir de las dos isothermas anteriores, se ha planteado la de Langmuir-Freundlich (Ec. 3)<sup>45</sup> que pretende unificar ambos tratamientos en una:

$$q = \frac{K \cdot P^{1/n}}{1 + K \cdot P^{1/n}} \cdot q_{m\acute{a}x} \quad (\text{Ec. 3})$$

Desde un punto de vista termodinámico, ¿qué promueve la adsorción? Tanto la contribución entálpica como entrópica dependen del tipo de superficie y del tipo de proteína, por lo que juegan un papel importante en dicho proceso. A continuación, se hará una descripción de la energética de los procesos de adsorción de proteínas a superficies sólidas tanto hidrofílicas, en las que se establecen interacciones electrostáticas y de enlace de hidrógeno, como hidrofóbicas, en las que la deshidratación de superficies hidrofóbicas de las especies interaccionantes jugará un papel crucial en la energética de adsorción.

En la representación de la isoterma podemos distinguir dos partes; la parte inicial y la parte final donde se alcanza la saturación de la superficie. En la parte inicial, donde la concentración de la proteína en disolución es baja, el porcentaje de superficie cubierta por las moléculas de proteína adsorbida es pequeño y, como consecuencia, la energética de adsorción puede ser descrita como la simple adsorción de moléculas de proteína a la superficie sólida, ya que las interacciones entre moléculas individuales de proteína en la superficie son despreciables.

Son muchos los procesos de adsorción de proteínas a superficies sólidas en los que se ha demostrado un aumento de la constante de adsorción,  $K$ , con la temperatura, lo que sugiere un valor positivo de la entalpía de unión y, por tanto, desfavorable para la variación de la energía libre de adsorción. Por su parte, en la zona de saturación, donde se alcanza el máximo de adsorción,  $q_{m\acute{a}x}$ , medidas calorimétricas mostraron que  $\Delta H$  es igualmente endotérmica, sugiriendo la necesidad de que la variación global de la entropía deberá ser positiva para asegurar que la componente entrópica,  $-T \cdot \Delta S$ , sea negativa y (en valor absoluto) mayor que la componente entálpica ( $\Delta H > 0$ ). En conjunto, los resultados experimentales sugieren que los procesos de adsorción son, en general, favorecidos entrópicamente debido a la deshidratación tanto de la superficie sólida como del propio ligando, liberando esas moléculas de agua al medio.

Las contribuciones entálpicas y entrópicas del proceso de adsorción que deben considerarse son las siguientes:

i) Contribuciones entálpicas:

- a) Cuando la adsorción está dominada por el establecimiento de interacciones electrostáticas (el ligando y la superficie tienen cargas opuestas), el cambio de entalpía,  $\Delta H$ , suele ser muy pequeño y, generalmente, despreciable frente a la contribución entrópica,  $-T \cdot \Delta S$ . Por su parte, tanto la formación de enlaces de hidrógeno como las fuerzas de van der Waals tienen una contribución pequeña a la entalpía de adsorción debido a la compensación que se produce entre las interacciones que se establecen (entre la adsorbente y adsorbato) y las que se rompen, mayoritariamente debidas a la deshidratación de la superficie sólida y del ligando.

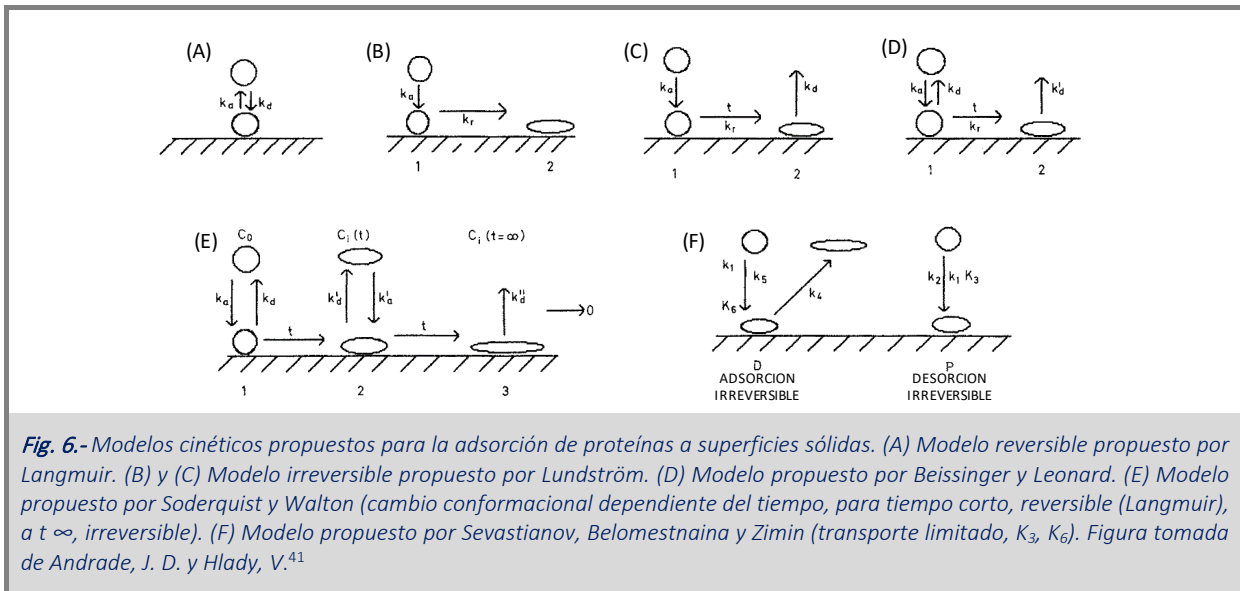
- b) Por otro lado, la adsorción de moléculas hidrofóbicas a superficies apolares, suele tener un cambio de entalpía positivo ( $\Delta H > 0$ , desfavorable a la adsorción), siendo ésta una característica habitual en procesos de reconocimiento molecular hidrofóbico.
- c) En consecuencia, tanto para procesos de adsorción a superficies hidrofílicas como hidrofóbicas, la contribución entálpica varía entre casi despreciable (para interacciones electrostáticas) a fuertemente desfavorable, para interacciones hidrofóbicas.
- ii) Contribuciones entrópicas:
- a) Como consecuencia, para que el proceso de adsorción sea termodinámicamente favorable se requiere que la variación de entropía global del proceso de adsorción sea positiva (aumente el desorden global), lo que pudiera parecer contraintuitivo.
- b) En primer lugar, existe una disminución en la entropía traslacional, rotacional y vibracional del sistema como consecuencia de la disminución en el número de partículas libres en la dispersión de nanopartícula y proteína como consecuencia de la adsorción. Este término es siempre negativo,  $\Delta S_{\text{config}} < 0$ , y contribuye desfavorablemente al cambio de energía libre de adsorción ( $-T \cdot \Delta S_{\text{config}} > 0$ ).
- c) Por otro lado, la adsorción de proteínas a superficies sólidas viene acompañada por la disminución en su estabilidad conformacional. Cuando se trata de superficies hidrofóbicas (como las de látex, por ejemplo), la proteína tiende a desplegarse (total o parcialmente) con objeto de exponer gran parte de los residuos hidrofóbicos que guarda en su interior para interactuar favorablemente con la superficie apolar. Por su parte, en el caso de superficies hidrofílicas cargadas, la proteína tiende a adoptar una conformación más o menos extendida en la superficie de la nanopartícula, de forma que se maximice el número de contactos electrostáticos en un intento de reducir la energía libre mediante el establecimiento del mayor número posible de interacciones electrostáticas atractivas. En ambos casos, la reducción en la estabilidad conformacional de la proteína adsorbida (con respecto a la proteína nativa en disolución) aumenta su entropía conformacional,  $\Delta S_{\text{conform}} > 0$ , ganando grados de libertad rotacional y vibracional de sus residuos, en particular de sus cadenas laterales.
- d) Sin embargo, la contribución favorable más importante al proceso de adsorción viene del gran aumento de la entropía de hidratación,  $\Delta S_{\text{hidrat}} > 0$ , que implica la liberación de un gran número de moléculas de agua que solvataban tanto a la superficie de la nanopartícula como a los residuos expuestos al disolvente por parte de la proteína. Este término,  $-T \cdot \Delta S_{\text{hidrat}} < 0$ , es suficientemente grande, en valor absoluto, para compensar a las componentes desfavorables mencionadas anteriormente y supone, en general, un porcentaje mayoritario de la disminución de la energía libre como consecuencia de la adsorción,  $\Delta G_{\text{adsorción}} < 0$ .

Además, la energía libre de adsorción dependerá del pH de la disolución puesto que éste define la densidad de carga superficial de la proteína y de la nanopartícula, afectando al número de interacciones

electrostáticas que pueden establecerse. Por su parte, la fuerza iónica del medio tendrá un efecto monótonicamente desfavorable en los procesos puramente electrostáticos debido al apantallamiento de las interacciones electrostáticas que se producen como consecuencia del transporte de iones desde la disolución a la interfase proteína superficie, y el establecimiento de la doble capa eléctrica que surge como consecuencia de la redistribución de cargas.

Desde un punto de vista cinético, el parámetro básico del proceso de adsorción es el número de moléculas de proteína adsorbida en función del tiempo. Generalmente es aceptado que dicho proceso de adsorción/desorción contempla varias partes: transporte hacia la superficie, fijación a la superficie, separación de la superficie y transporte desde la superficie. La velocidad de cada etapa determinará el proceso de adsorción, por lo que para determinar la velocidad de uno de los cuatro procesos, éste debe ser el limitante<sup>38</sup>.

Existen varios modelos que resumen la cinética de adsorción, los cuales asumen que el transporte de la proteína hacia la superficie es un proceso rápido en comparación con la fijación de ésta sobre la superficie<sup>41</sup>. Estos modelos están esquematizados en la Fig. 6. En cualquiera de los casos, es importante reseñar la dificultad de los estudios cinéticos de los procesos de adsorción orientados a la elucidación del mecanismo de adsorción, ya que las distintas etapas elementales tendrán una cinética más o menos rápida dependiendo de las características específicas de la proteína y de la superficie sólida, así como de parámetros ambientales tales como el pH o la fuerza iónica.



#### 1.4.- Efectos adversos inducidos por la adsorción de proteínas a superficies sólidas

Desde una perspectiva termodinámica, el proceso de adsorción de proteínas a superficies sólidas/rígidas cargadas disminuirá tanto más la energía libre del sistema cuanto mayor sea el número de contactos que se establezcan entre cargas opuestas. La capacidad de adsorción de una proteína a una superficie dada

viene afectada por su carga, tamaño, composición de aminoácidos, conformación y estabilidad conformacional. Por ello, es previsible que la adsorción modifique el equilibrio conformacional de la proteína hacia estados más desordenados que el estado nativo (estados parcialmente plegados) capaces de establecer un mayor número de contactos electrostáticos atractivos. El efecto que esta desestabilización del estado nativo de la biomolécula tenga sobre su funcionalidad biológica dependerá, en último término, tanto de la estabilidad conformacional intrínseca de la proteína como de la intensidad y tipo de interacciones que se establezcan entre la superficie y la propia proteína.

Es importante tener en mente que todas las proteínas han sufrido un proceso de selección evolutiva con el objeto de optimizar su funcionalidad biológica que exige un exquisito equilibrio entre estabilidad conformacional y flexibilidad estructural. Dado que este proceso evolutivo se ha llevado a cabo en medio acuoso, el resultado ha sido que gran parte de los residuos hidrofóbicos de la biomolécula se han acumulado en el interior del estado nativo (plegado, evitando así su desfavorable hidratación y favoreciendo el establecimiento de interacciones hidrofóbicas entre ellos), a la vez que tanto los residuos polares como los cargados se acumulan preferencialmente en el exterior de la proteína, expuestos al disolvente.

En ocasiones, las proteínas que se adsorben sobre superficies sólidas son clasificadas de acuerdo a su estabilidad conformacional y, por tanto, del efecto global que la adsorción induce sobre el estado conformacional de la proteína adsorbida comparada, con la del estado nativo en disolución a baja temperatura. Así, proteínas que tienen una elevada estabilidad conformacional, tales como  $\alpha$ -quimotripsina, ribonucleasa (RNasa), lisozima (Lzm) o  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -Lg) se clasifican como proteínas “duras” (“*hard*” *proteins*). Debido a su elevada estabilidad, la componente hidrofóbica del proceso de adsorción no es suficiente para poblar estados parcialmente plegados a baja temperatura. Como consecuencia, su adsorción a superficies moderadamente hidrofóbicas es casi despreciable (la exposición de residuos hidrofóbicos en el estado nativo es mínimo). Por ello, solo es observable su adsorción a superficies hidrofílicas que presenten grupos cargados que le permitan establecer interacciones electrostáticas atractivas. Por supuesto, la reducción en la estabilidad conformacional como consecuencia de la adsorción se traduce en una disminución en su estabilidad térmica, por lo que la adsorción hidrofóbica toma un papel más relevante a medida que se aumenta la temperatura y se estabilizan estados de la proteína parcial o totalmente desplegados con respecto al nativo.

Por su parte, proteínas con una estabilidad conformacional reducida o con una proporción mayor de residuos hidrofóbicos expuestos al disolvente en estado nativo son clasificadas como proteínas “suaves” (“*soft*” *proteins*), ya que tienen tendencia a adsorberse a superficies moderadamente hidrofóbicas, incluso en ausencia de centros cargados que permitan el establecimiento de interacciones electrostáticas atractivas. Ejemplos de estas proteínas son la albúmina de suero bovino (BSA), la albúmina de suero

humano (HSA), la inmunoglobulina G (IgG), la  $\alpha$ -lactoalbúmina, la  $\beta$ -caseína o la hemoglobina. En cualquier caso, cuando ambos tipos de proteínas son confrontadas a superficies muy apolares (tales como el látex), la componente hidrofóbica de la adsorción se hace mayoritaria favoreciéndose estados parcial o totalmente desplegados para ambos grupos de proteínas<sup>46</sup>.

Las proteínas tienden a unirse formando una capa más rígida sobre una superficie no polar que a una polar, donde se produce una desestabilización de la proteína produciendo reorientaciones conformacionales y provocando una fuerte interacción con la superficie. También se une mejor a una superficie con gran tensión superficial que a una con baja, y a superficies cargadas que a neutras<sup>47</sup>.

En cuanto a la morfología, la curvatura y superficie disponible de las partículas juegan un papel fundamental en dichos cambios conformacionales. A medida que la curvatura de la superficie sólida disminuye, se produce una mayor perturbación en la estructura secundaria de la proteína adsorbida, observándose que el efecto sobre su estructura terciaria es independiente de este parámetro<sup>31,48</sup>. La perturbación que sufre la estructura de la proteína como consecuencia de la adsorción se correlaciona principalmente con el tamaño la superficie de interacción proteína-partícula. Esta superficie de interacción es tanto menor cuanto más pequeña es la partícula sobre la que la proteína se adsorbe, cuya superficie muestra una elevada curvatura. A medida que aumenta el tamaño de la partícula (disminuye su curvatura), la superficie de interacción proteína-partícula aumenta y, como consecuencia, también lo hace la perturbación de la adsorción sobre la estabilidad conformacional de la proteína. A medida que aumenta el tamaño de la partícula (disminuye su curvatura), la superficie de interacción proteína-partícula aumenta y, como consecuencia, también lo hace la perturbación de la adsorción sobre la estabilidad conformacional de la proteína.

Por lo anteriormente comentado, la adsorción de la proteína puede establecerse entre su estado nativo (para proteínas de elevada estabilidad conformacional) o desde un estado parcialmente desplegado, siendo esta última interacción desde el punto de vista energético más favorable debido a la mayor exposición de aminoácidos hidrofóbicos y al aumento de contactos electrostáticos favorables entre la proteína y la superficie de la partícula. Una vez establecido el equilibrio de adsorción, las moléculas de proteína en disolución pueden interaccionar con aquellas que se desorben de la superficie (teniendo en cuenta el carácter dinámico del equilibrio de adsorción) que podrían estar parcialmente desplegadas y formar agregados<sup>49</sup> con posibilidad de dar lugar a respuesta inmune. Esto es importante, ya que, desde la producción de proteínas hasta su posterior utilización, por ejemplo, como aditivos nutricionales o como fármacos, requieren del contacto con gran variedad de superficies tales como plásticos, vidrios, etc.

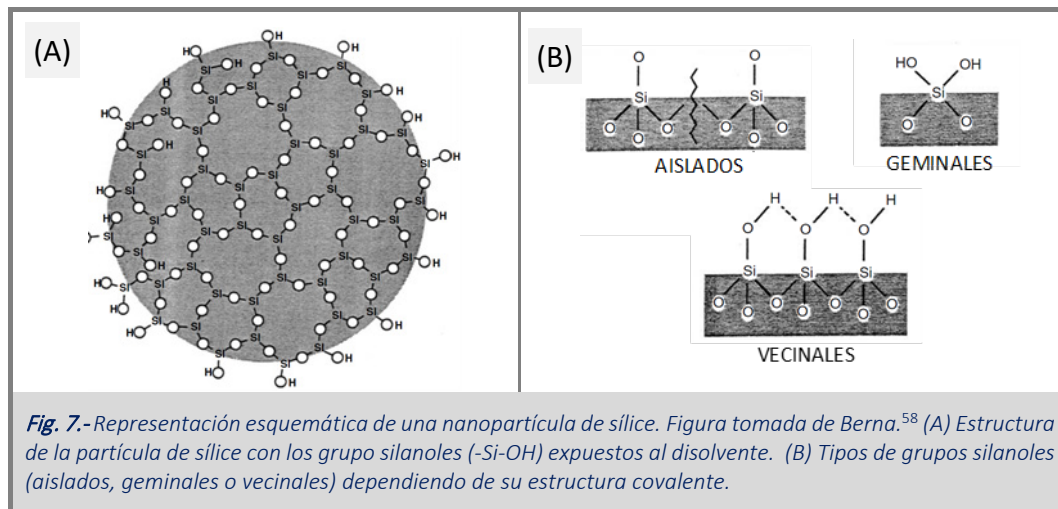
Estos son algunos ejemplos de estas severas consecuencias:

- ✓ La formación de fibras amiloides puede ser inducida por la adsorción de proteínas sobre superficies hidrofóbicas. La formación de estas fibras amiloides está involucrada en distintas enfermedades, tales como el Alzheimer, el Parkinson, la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob<sup>35,50</sup>, entre otras muchas.
- ✓ La velocidad de autólisis de la tripsina (enzima que cataliza la hidrólisis de enlaces peptídicos) aumenta hasta 100 veces en presencia de superficies de vidrio y sílice coloidal<sup>51</sup>.
- ✓ La estabilidad termodinámica de la Ribonucleasa A (RNasa A) que cataliza la hidrólisis de ARN, disminuye debido a la adsorción sobre nanopartículas, siendo el desplegamiento de la RNasa A fuertemente afectado tanto por el tamaño como por la curvatura de la superficie<sup>52</sup>.
- ✓ El grupo hemo de la hemoglobina sufre cambios conformacionales debido a la adsorción sobre superficies de poliestireno (látex) cargado negativamente<sup>53</sup>.

### 1.5.- Nanopartículas de sílice: ejemplo de superficie sólida hidrofílica

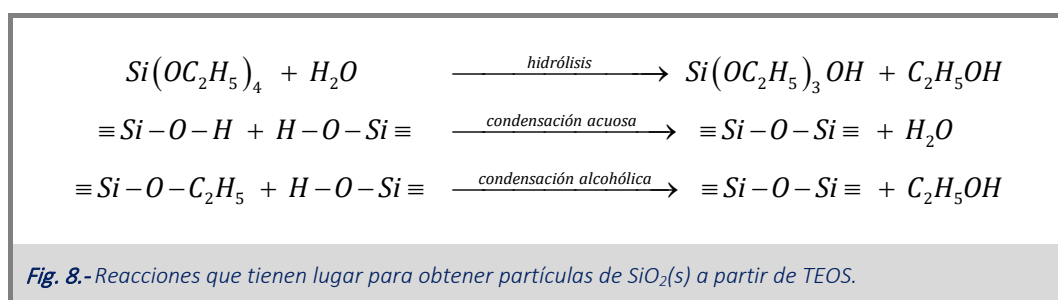
La sílice está compuesta por tetraedros de óxido de silicio ( $\text{SiO}_4$ ), donde los cuatro oxígenos ocupan los vértices de un tetraedro y el átomo de sílice ocupa la posición central, estando cada uno de los oxígenos formando enlaces covalentes con átomos de sílice, dando lugar a una red tridimensional, a veces llamado cristal covalente. La sílice es prácticamente insoluble en agua a pH moderados ( $\text{pH} < 12$ ). Por el contrario, en disoluciones acuosas fuertemente alcalinas ( $\text{pH} > 12$ ) se produce la hidrólisis de los enlaces  $-\text{Si}-\text{O}-\text{Si}-$ , y la disolución de la estructura sólida. En la superficie de dicha estructura, existen grupos silanoles ( $-\text{Si}-\text{OH}$ ), expuestos al disolvente. Como consecuencia, a medida que aumenta el pH de la disolución se produce una mayor ionización de estos grupos aumentando la densidad de carga de la superficie de la partícula de sílice<sup>54,55</sup> (Fig. 7-A). La sílice presenta un punto de carga nula alrededor de pH entre 2.5 – 3.0. A medida que aumenta el pH de la disolución, el equilibrio de disociación protónica de los grupos silanoles se desplaza hacia la formación de especies deprotonadas. Debido a la proximidad de los grupos silanoles en la superficie sólida, la ionización de un grupo induce una perturbación en el equilibrio ácido-base de grupos cercanos. En otras palabras, la dependencia con el pH de la densidad superficial de carga negativa de la superficie de la sílice es compleja y no se corresponde con la disociación de grupos silanoles caracterizados por un único  $\text{pK}_a$ . Tanto estudios experimentales como cálculos teóricos son consistentes con la existencia de dos poblaciones de grupos silanoles de diferente acidez: alrededor del 15 – 20 % de los grupos  $\text{Si}-\text{OH}$  presentan un  $\text{pK}_a$  cercano a 4.5 mientras que el 80 – 85 % restante presentaría un  $\text{pK}_a$  cercano a 8.5<sup>56,57</sup>. El  $\text{pK}_a$  de 4.5 se corresponde con la ionización de grupos silanoles alejados entre sí, de forma que la ionización de uno no influye sobre la ionización de otro. A medida que aumenta el número de grupos silanoles deprotonados ( $-\text{Si}-\text{O}^-$ ). Cuando el porcentaje de grupos ionizados de la superficie supera el 15 – 20 %, la ionización de los grupos restantes está fuertemente perturbada por el potencial eléctrico generado sobre la superficie de la partícula (doble capa eléctrica) lo que produce una polarización creciente de la misma afectando tanto la

orientación de las moléculas de agua como a la energética de su interacción con la superficie. El aumento de la densidad superficial de carga implica una disminución de la constante de disociación del resto de grupos silanoles, considerándose, en primera aproximación, que tiene un valor promedio de  $pK_a$  cercano a 8.5 para el resto de los grupos ionizables (80 – 85 % del total). A pH alcalinos ( $pH > 12$ ), la cinética de disolución de la sílice aumenta provocando su depolimerización para dar lugar al silicato correspondiente<sup>58</sup>.



Estos grupos silanoles pueden ser divididos en varios tipos: aislados, geminales o vecinales (Fig. 7-B). En los aislados, no se producen puentes de hidrógeno entre OH vecinos debido a que están lo suficientemente alejados unos de otros. En aquellos que están lo suficientemente cerca como para formar ese puente, se conocen como vecinales. En los geminales, sobre el mismo átomo de silicio tenemos dos grupos OH formando un silanodiol.

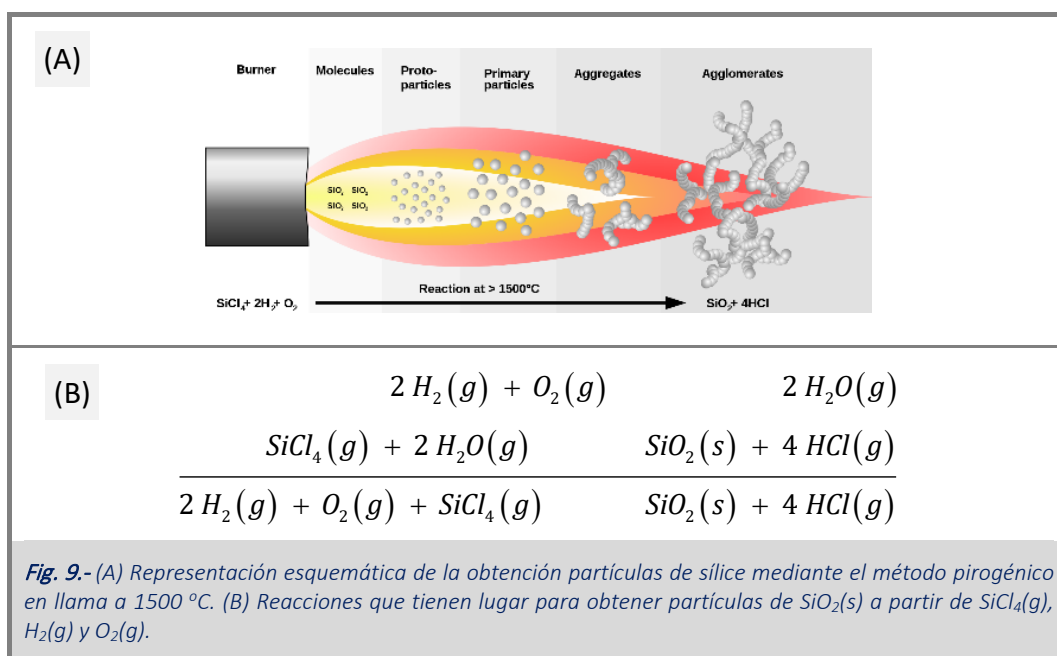
Las primeras partículas de sílice coloidal fueron preparadas por Stöber et al. en 1968 a partir de la hidrólisis de un silicato, como el TEOS (*tetraethyl orthosilicate*), en medio alcohólico y en presencia de amoníaco obteniendo partículas de tamaños comprendidos entre 50 y 2000 nm<sup>59</sup>. Este método es muy utilizado actualmente y es un proceso de formación sol-gel en el cual tiene lugar una etapa de hidrólisis y posterior condensación, donde o bien se libera una molécula de agua o un alcohol, dependiendo de los grupos que reaccionen. De forma general estas son las reacciones que tienen lugar a partir de TEOS<sup>60</sup> (Fig. 8).





Otro método de síntesis de partículas de sílice es el de microemulsión inversa<sup>61</sup>, el cual presenta el problema de la eliminación del surfactante sobre el proceso final de obtención. A nivel industrial, buena parte de las partículas de sílice de uso más habitual (como las partículas de Cab-o-Sil que se utilizarán en las investigaciones presentadas en los dos primeros capítulos de los resultados de esta Tesis Doctoral) se obtienen mediante un método pirogénico. Las partículas de sílice amorfo se obtienen mediante pirolisis de  $\text{SiCl}_4(\text{g})$  mezclado con  $\text{H}_2(\text{g})$  y  $\text{O}_2(\text{g})$  en una llama a  $1500\text{ }^\circ\text{C}$  (Fig. 9). Las nanopartículas de sílice formadas se funden en cadenas ramificadas que, eventualmente, aglomeran para dar lugar a partículas de un tamaño cercano a  $180\text{ nm}$  de diámetro hidrodinámico y una elevada área específica ( $\sim 206\text{ m}^2\cdot\text{g}^{-1}$ ).

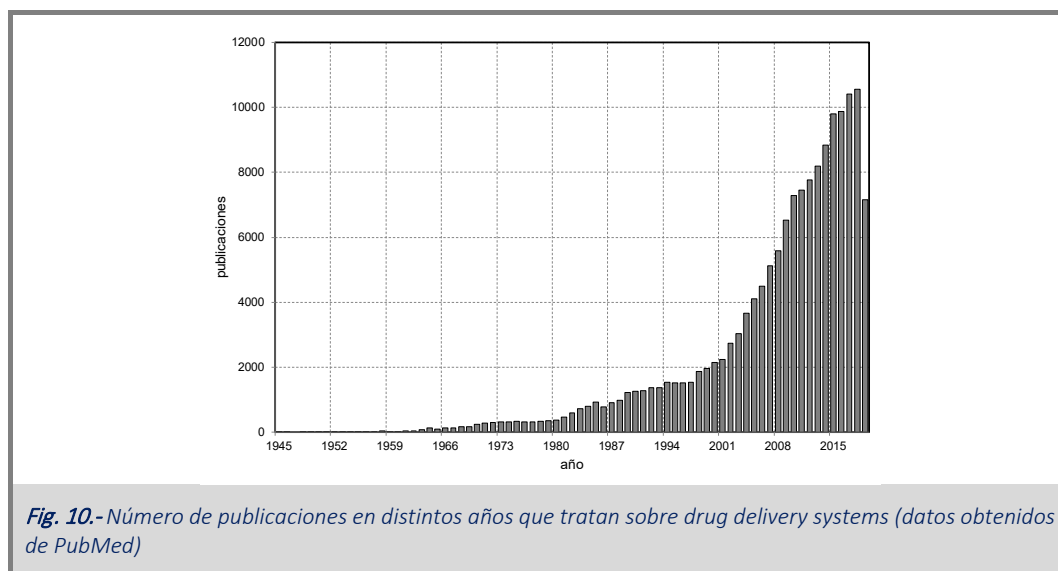
Las características de la sílice producida pueden ser controladas por la variación de las concentraciones de reactivos, temperatura de la llama y el tiempo en la cámara de combustión<sup>62</sup>.



Las partículas de sílice presentan una multitud de aplicaciones debido a la variabilidad de tamaños, consecuencia de la multitud de métodos disponibles para su obtención, pudiendo ser controladas por tanto sus propiedades físicas y químicas así como sus propiedades optoelectrónicas<sup>63</sup>. Dentro del campo de biomedicina debido a su biocompatibilidad, pueden ser utilizadas en aplicaciones para el transporte y liberación de fármacos<sup>64</sup> o para imagen molecular usando técnicas ópticas, magnéticas, etc<sup>65</sup>. Además pueden ser utilizadas para la eliminación de contaminantes en aguas, como metales pesados, debido a la facilidad de acoplamiento de una gran variedad de compuestos sobre los grupos silanoles<sup>66</sup>. También pueden ser usadas en electrónica, en aplicaciones para el almacenamiento de energía<sup>67</sup>.

En cuanto a los sistemas de administración de fármacos (*drug delivery systems*), según datos de PubMed (Fig. 10), es evidente que el interés investigador en este campo ha crecido de forma exponencial durante los últimos años. El incremento continuado en el desarrollo de fármacos ha llevado al desarrollo de moléculas bioactivas que presentan una serie de propiedades adversas que comprometen biodisponibilidad (baja solubilidad, reducida estabilidad en medio acuoso, etc.). Como consecuencia, una fase más dentro de cualquier estrategia de diseño de fármacos tiene que ver con la optimización de su biodisponibilidad mediante el uso de transportadores (nanopartículas, por ejemplo).

Estos sistemas, como su propio nombre indica, consisten en la administración de fármacos, tanto en humanos como en animales, para fines terapéuticos<sup>68</sup>. Hay varias razones por las que se emplean, y es debido a ciertos problemas que puede tener el propio fármaco estando libre, como por ejemplo, baja solubilidad, rápida descomposición, mala biodistribución<sup>69</sup>, etc. Además hay que añadir que los sistemas de administración de fármacos convencionales pueden desencadenar efectos adversos, ya que presentan la limitación de ser inespecíficos sobre el sitio de acción<sup>70</sup>.



Por los motivos citados, ya se han desarrollado varios tipos de sistemas transportadores para ser utilizados en la administración de fármacos como liposomas<sup>71</sup>, microemulsiones<sup>72</sup>, dendrímeros<sup>73</sup> o nanopartículas<sup>74</sup> entre otros, pero ¿cuál elegimos para diseñar nuestro sistema? Será aquel con el que logremos una mayor potencia del fármaco (considerando esta como la cantidad mínima de fármaco que es necesaria para producir el mayor efecto posible<sup>75</sup>), además de considerar factores como su estabilidad o su solubilidad<sup>69</sup>.

Diversos estudios muestran que el empleo de estos sistemas tienen importantes beneficios para el fármaco como pueden ser: reducción significativa de toxicidad<sup>76</sup>, aumento de la solubilidad<sup>70</sup>, tiempo de circulación prolongado<sup>77</sup>, etc.

Para esta aplicación es fundamental controlar el tamaño, carga y composición química de la superficie, ya que afectan sobre el tiempo de circulación o la biodisponibilidad dentro del cuerpo<sup>78</sup>. Por ejemplo, basándonos en el tamaño, aquellas partículas con un tamaño mayor de 200 nm, serán secuestradas por el bazo y posteriormente eliminadas por las células fagocíticas. Para partículas de menos de 10 nm estas serán rápidamente eliminadas vía renal (bajos tiempos de circulación para ambos tamaños). Mientras que partículas entre 10 y 100 nm serán suficientemente pequeñas para no ser eliminadas por el sistema reticuloendotelial del cuerpo, además de atravesar pequeños capilares de ciertos tejidos (por tanto tiempos de circulación más elevados)<sup>79,80</sup>.

En esta Tesis Doctoral, hemos centrado nuestro interés en el desarrollo de recubrimientos de las superficies de sílice que inhiban la adsorción proteica a estas superficies, como medio de minimizar o incluso eliminar los efectos provocados por la adsorción de proteína a las superficies sólidas de sílice (que se han comentado anteriormente) y que pueden presentarse durante el almacenamiento y/o tratamiento de proteínas. Igualmente, se han desarrollado estrategias que permiten modular la densidad superficial de carga de las superficies de sílice recubiertas por polielectrolitos catiónicos, lo cual postulamos puede permitir una optimización de los procesos de adsorción de biomoléculas a estas partículas y su utilización como vehiculizadores en los procesos de transporte y liberación controlada de fármacos.

### 1.6.- Nanopartículas magnéticas

Como su propio nombre indica, estas partículas presentan la característica principal de ser atraídas mediante un campo magnético externo. Cuando estas nanopartículas tienen un tamaño por debajo de ~20 nm, presentan propiedades magnéticas distintivas de los materiales paramagnéticos ya que, aunque cada partícula actúa como un único dominio en el que sus momentos magnéticos se encuentran alineados, al orientarse cada una de ellas al azar no existe acoplamiento entre ellas, no sufriendo, por tanto, atracción magnética mutua. Este comportamiento, conocido como superparamagnetismo<sup>81,82</sup>, es característico de partículas magnéticas de tamaño nanométrico. Para su adecuada comprensión, parece razonable introducir, de forma breve, algunos conceptos relacionados con el magnetismo.

Todo electrón genera un momento magnético debido a su espín. Aunque el espín es un fenómeno puramente cuántico, en ocasiones se utiliza la analogía con la Física clásica de considerar al electrón como una esfera cargada que puede girar en el sentido de las agujas del reloj (número cuántico de espín,  $m_s = +\frac{1}{2}$ ) o en el sentido contrario ( $m_s = -\frac{1}{2}$ ). El giro de una esfera cargada genera un momento magnético en la dirección del eje de giro y cuya dirección es de sentido opuesto para cada uno de los valores de espín. Como consecuencia, cuando dos electrones forman parte de un par (solitario o enlazante), al tener números cuánticos de espín distintos, darán lugar a una resultante nula en el momento magnético resultante. Por el contrario, los electrones desapareados darán lugar a un momento magnético no nulo.

Los átomos o moléculas que presenten electrones desapareados tendrán un momento magnético no nulo (suma vectorial de los momentos magnéticos de sus electrones desapareados) y serán atraídos por un campo magnético externo. Son conocidos como sustancias paramagnéticas. Por su parte, los átomos o moléculas en los que todos sus electrones se encuentran apareados (formando pares electrónicos) mostrarán un momento magnético resultante nulo, no interactuando con un campo magnético externo (sustancias diamagnéticas).

Los materiales magnéticos pueden tener una cierta magnetización permanente,  $\vec{M}$ , dependiendo si la resultante vectorial de los momentos magnéticos de los electrones individuales se anula o no. La susceptibilidad magnética,  $\chi$ , se define como la capacidad de ese material a ser magnetizado mediante la aplicación de un campo magnético externo. Fue definida por Williams Thomson<sup>83</sup> en 1884 como: “la susceptibilidad magnética de una sustancia isotrópica es la intensidad de la magnetización que adquiere una barra de grosor infinitesimal orientada con un campo magnético de módulo unidad” y viene dada por la relación entre la magnetización ( $\vec{M}$ ) y el campo magnético aplicado ( $\vec{H}$ )<sup>84</sup>:

$$\chi = \frac{|\vec{M}|}{|\vec{H}|} \quad (\text{Ec. 4})$$

### 1.6.1.- Tipos de materiales magnéticos

El magnetismo se origina como consecuencia de la existencia de momentos magnéticos de los átomos individuales que interactúen entre sí o con un campo magnético externo, en caso de ser aplicado. En este sentido, todos los materiales tienen un comportamiento magnético, aunque el magnetismo que se observa en muestras macroscópicas es el resultado de la suma vectorial de los distintos momentos magnéticos de los electrones desapareados. Así, algunos materiales no muestran magnetización,  $\vec{M}=0$ , debido a la compensación global de los momentos magnéticos, mientras que otros materiales muestran este comportamiento como consecuencia de una resultante no nula de los momentos magnéticos que lo componen.

El comportamiento magnético de los materiales puede ser clasificado en cinco grandes grupos<sup>81</sup>: i) diamagnético; ii) paramagnético; iii) ferromagnético; iv) ferrimagnético, y v) antiferromagnético.

Los materiales de los dos primeros grupos (materiales diamagnéticos y paramagnéticos) no exhiben interacciones magnéticas colectivas y, como consecuencia, no se encuentran orientados magnéticamente. Los primeros (diamagnéticos) por carecer de momento magnético resultante y los segundos (paramagnéticos) porque cada átomo o molécula orienta al azar su momento magnético individual dando lugar a una suma vectorial nula. Por su parte, los materiales de los últimos tres apartados (materiales

ferromagnéticos, ferrimagnéticos o antiferromagnéticos) muestran un cierto nivel de orden magnético por debajo de una cierta temperatura crítica.

#### a) Diamagnetismo

El diamagnetismo es una propiedad fundamental de la materia, aunque es generalmente bastante débil. Los materiales diamagnéticos están formados por átomos cuyos electrones están apareados bien como pares libres o como pares enlazantes en enlaces covalentes. Como consecuencia, los momentos magnéticos de los átomos individuales de cada par electrónico se compensan (su suma vectorial es nula). Por ello, al carecer de un momento magnético resultante, la aplicación de un campo magnético externo no induce acoplamiento alguno, es decir la magnetización  $\vec{M}$  es nula. Sin embargo, cuando un material diamagnético es sometido a la acción de un campo magnético externo,  $\vec{H}$ , se observa una susceptibilidad negativa (magnetización negativa), lo que implica que el material diamagnético se repele respecto del campo magnético aplicado. Materiales comunes diamagnéticos con susceptibilidades negativas son la sílice,  $\text{SiO}_2$ , la calcita,  $\text{CaCO}_3$ , o el agua con valores -0.62, -0.48 y -0.90, respectivamente.

#### b) Paramagnetismo

Los materiales paramagnéticos están formados por átomos que presentan algunos electrones desapareados ocupando orbitales distintos. Como consecuencia, mientras que los momentos magnéticos de los electrones apareados se anulan, el correspondiente a los electrones desapareados no y, por tanto, estos átomos paramagnéticos presentan un momento magnético resultante no nulo. Sin embargo, los momentos magnéticos de los átomos individuales se orientan al azar y no interactúan entre ellos. Como consecuencia, al igual que para materiales diamagnéticos, la magnetización,  $\vec{M}$ , es nula en reposo. Al aplicar un campo magnético externo,  $\vec{H}$ , se produce la alineación parcial de los momentos magnéticos individuales de los átomos paramagnéticos en la dirección del campo externo, resultando en una magnetización positiva ( $|\vec{M}| > 0$ ) y una susceptibilidad también positiva ( $\chi > 0$ ).

Es importante resaltar que, al efecto de alineación de los momentos magnéticos individuales de los átomos paramagnéticos con el campo externo aplicado se le opone el efecto desordenador de la temperatura que tiende a orientar los momentos magnéticos al azar. Como consecuencia, la susceptibilidad magnética inducida por el campo magnético externo es dependiente de la temperatura, lo que se conoce como Ley de Curie<sup>84,85</sup>.

### c) Ferromagnetismo

Al contrario que en los materiales paramagnéticos, los materiales ferromagnéticos contienen átomos que presentan momentos magnéticos resultantes (con electrones desapareados) que interactúan fuertemente (las fuerzas de interacción se conocen como de intercambio electrónico) resultando en el alineamiento de los momentos magnéticos. Este alineamiento se traduce en una elevada magnetización ( $\bar{M} \gg 0$ ) en ausencia de un campo magnético externo. Elementos como Fe, Ni y Co (y muchos de sus óxidos y aleaciones) tienen un comportamiento ferromagnético.

Los materiales ferromagnéticos presentan una magnetización espontánea que se define como la magnetización existente dentro de un volumen macroscópico de material uniformemente distribuido en ausencia de campo magnético externo. La magnitud de esta magnetización, a 0 K, depende de la resultante de los momentos magnéticos de espín de los electrones desapareados de los átomos que lo componen.

Un término, relacionado con el anterior y que suele determinarse en el laboratorio para caracterizar los materiales ferromagnéticos, es la magnetización de saturación, que se refiere al momento magnético máximo que induce sobre el material un campo magnético externo. En otras palabras, el valor al que tiende asintóticamente la magnetización del material al aumentar la intensidad del campo magnético externo aplicado. La magnetización de saturación es una propiedad intrínseca del material ferromagnético, independiente de su tamaño, pero dependiente de la temperatura.

A las fuerzas de intercambio electrónico (responsables del alineamiento de los momentos magnéticos individuales en los materiales ferromagnéticos) se les contraponen la energía térmica (que tiende a orientarlos al azar). La temperatura a la cual el efecto desorganizador supera al del alineamiento de las fuerzas de intercambio electrónico se conoce como temperatura de Curie. Por debajo de la temperatura de Curie, el material ferromagnético está ordenado y presenta una magnetización intrínseca, ( $|\bar{M}| > 0$ ). Por encima de esta temperatura los momentos magnéticos están orientados al azar y su magnetización es nula, ( $|\bar{M}| = 0$ ). En otras palabras, por encima de la temperatura de Curie el material ferromagnético se convierte en paramagnético ya que sus momentos magnéticos individuales (orientados ahora al azar) se alinearían en presencia de un campo magnético externo.

### d) Ferrimagnetismo

En compuestos iónicos, tales como los óxidos de ciertos metales, formas más complejas de ordenación de los momentos magnéticos individuales son posibles debido a la estructura cristalina que el compuesto adopte. Uno de los tipos de ordenamiento es el conocido como ferrimagnetismo en el que la estructura magnética está formada por dos conjuntos reticulares (A y B) separados por aniones de oxígeno (Fig. 11).

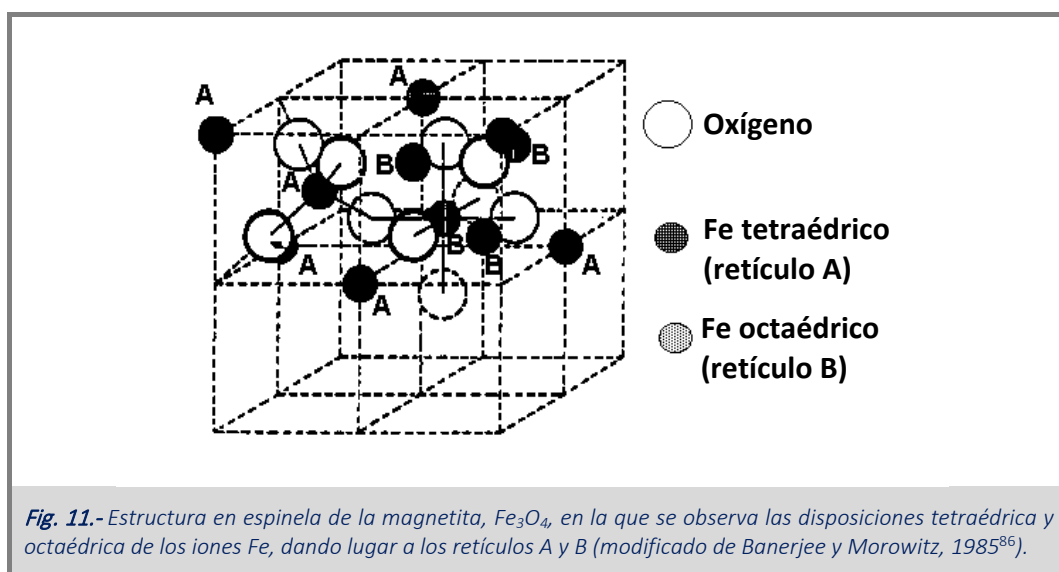
El acoplamiento entre los momentos magnéticos de cada retícula está mediado por los aniones de oxígeno, denominándose interacciones indirectas o de superintercambio. Las interacciones de intercambio más intensas dan lugar a un alineamiento antiparalelo entre los espines del retículo A respecto del retículo B.

En los materiales ferrimagnéticos los momentos magnéticos resultantes de los retículos A y B no son idénticos y, como consecuencia, su acoplamiento da lugar a una magnetización global no nula, ( $|\vec{M}| \neq 0$ ).

Las sustancias ferrimagnéticas tienen un comportamiento similar al de las ferromagnéticas en lo que se refiere a su magnetización espontánea, temperatura de Curie, etc.

La magnetita,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , es un material ferrimagnético muy conocido, aunque dependiendo del tamaño de los dominios magnéticos (ver más abajo) sus nanopartículas pueden llegar a tener un comportamiento superparamagnético. La magnetita cristaliza en una estructura en espinela en la que se establece un empaquetamiento cúbico compacto centrado en las caras de oxígenos, donde los huecos octaédricos y tetraédricos están parcialmente ocupados por los iones de  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$ . Los aniones oxígeno (de tamaño elevado) se encuentran empaquetados en una estructura cúbica mientras que los iones  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$  (más pequeños) ocupan huecos de dos tipos: i) tetraédricos, en los que el ion Fe se rodea de cuatro oxígenos, y ii) octaédricos, en los que el ion Fe se rodea de seis oxígenos.

Los centros tetraédricos y octaédricos forman los dos subretículos, A y B, respectivamente. Los espines del subretículo A son antiparalelos respecto de los del subretículo B. Los dos centros cristalinos son diferentes entre sí y dan lugar a formas de acoplamiento complejas que, generalmente, derivan en una resultante no nula de los momentos magnéticos y, por tanto, una magnetización global no nula, ( $|\vec{M}| \neq 0$ ). La fórmula estructural de la magnetita es:  $[\text{Fe}^{3+}]_A[\text{Fe}^{3+}, \text{Fe}^{2+}]_B\text{O}_4$ .



e) Antiferromagnetismo

Un material antiferromagnético es aquel en el que los momentos magnéticos de los subretículos A y B son antiparalelos pero exactamente del mismo módulo, siendo, por tanto, el momento neto resultante nulo. Estos materiales presentan un comportamiento característico en lo que se refiere a la dependencia de la susceptibilidad magnética con la temperatura. Por encima de una temperatura crítica (temperatura de Néel,  $T_N$ ) la susceptibilidad se comporta como la de los materiales paramagnéticos. Un ejemplo de material antiferromagnético es la hematita, una de las formas cristalinas del  $Fe_2O_3$ , donde los átomos de oxígeno se encuentran en un empaquetamiento hexagonal.

En la Fig. 12 se muestra un resumen del comportamiento en cuanto a los momentos magnéticos individuales para cada uno de los materiales magnéticos anteriormente citados.

	En reposo $\vec{H} = 0$	$ \vec{M} $	Campo externo $\vec{H} \neq 0$	$\chi$
Diamagnetismo		0		< 0
Paramagnetismo		0		$\approx 0$
Ferromagnetismo		> 0		$\gg 0$
Ferrimagnetismo		> 0		> 0
Antiferromagnetismo		0		> 0

*Fig. 12.- Comportamiento de materiales magnéticos en presencia y ausencia de un campo magnética externo. Las flechas representan los campos magnéticos individuales. Los valores de la magnetización (en ausencia del campo externo) y de la susceptibilidad, en presencia del mismo se indica en las columnas correspondientes.*

Varios capítulos de la presente Tesis Doctoral se refieren a la utilización de nanopartículas de magnetita  $Fe_3O_4$  por lo que nos centraremos en la discusión de los materiales ferro y ferrimagnéticos.

1.6.2.- Dominios magnéticos y superparamagnetismo

En un material ferromagnético podemos identificar pequeñas regiones en las que sus momentos magnéticos individuales están orientados paralelos entre sí. Estas regiones se denominan *dominios magnéticos* (Fig. 13) o dominios de Weiss<sup>87</sup> separados por una pared (pared de Bloch, estudiada teóricamente por F. Bloch<sup>88</sup> en 1932).

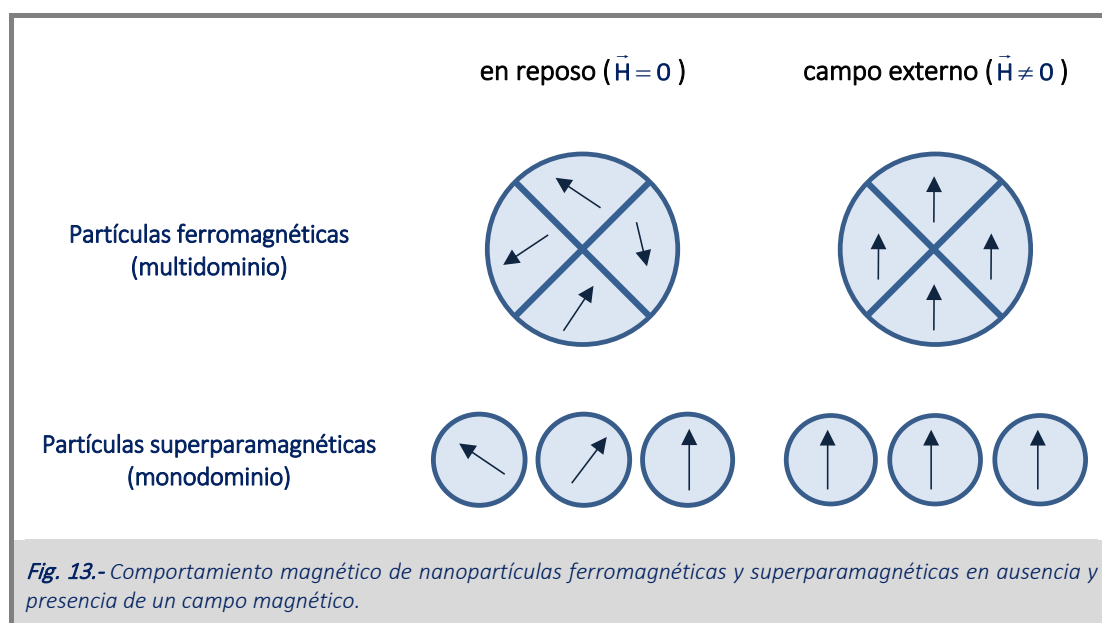
Dentro del dominio, el campo magnético es intenso como consecuencia de la resultante de los distintos momentos magnéticos individuales orientados en la misma dirección y sentido. Macroscópicamente, el



material puede considerarse como la suma de infinidad de dominios cuyos momentos resultantes se orientarán al azar. Como consecuencia el material no presenta magnetización global permanente ( $|\bar{M}|=0$ )

Los materiales ferromagnéticos, dependiendo de su tamaño, pueden ser *monodominios* (si el tamaño de la nanopartícula es menor que el tamaño de los dominios individuales) o materiales *multidominios* si su tamaño es mayor y está formado por más de un dominio magnético (Fig. 13). El tamaño por debajo del cual las partículas llegan a tener un único dominio fue predicho por Frenkel y Dorfman<sup>89</sup> en 1930. Para el caso de la magnetita, el tamaño de los dominios se ha estimado en 20 nm<sup>90</sup>. Como consecuencia, si la nanopartícula de magnetita es menor de 20 nm de diámetro, en ausencia de campo magnético, actuará como un único dominio en el que todos los espines están alineados mientras que en el conjunto de dominios las resultantes individuales se orientan al azar. El comportamiento magnético de las nanopartículas es idéntico a los materiales paramagnéticos, pero con la gran diferencia de la elevada susceptibilidad<sup>82</sup> que presentan estos materiales.

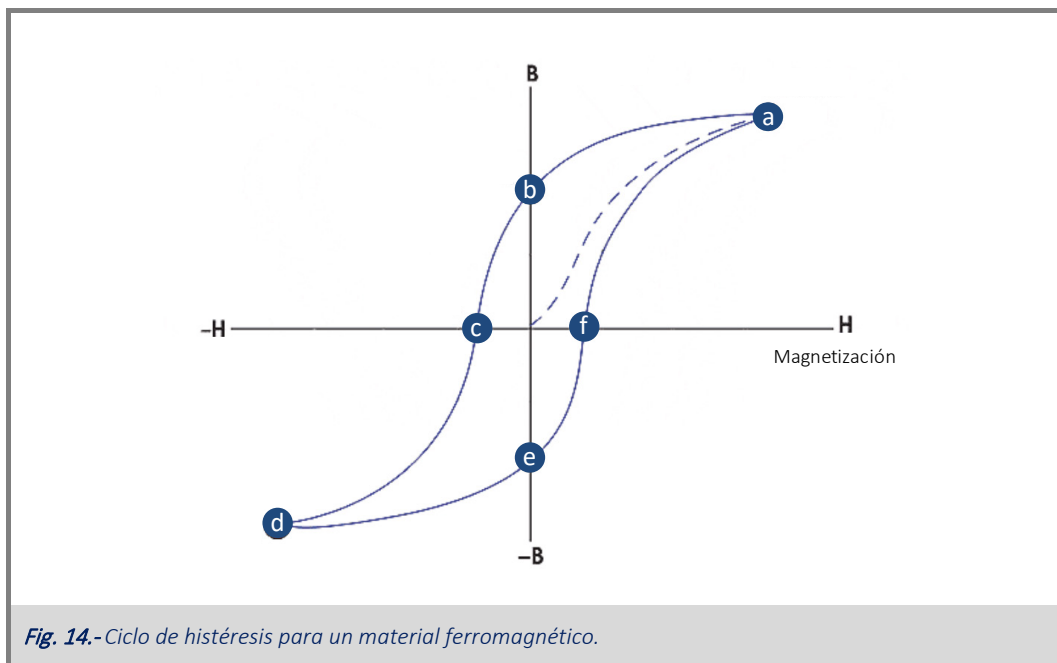
Suele denominarse *superparamagnetismo* al comportamiento en el que el material magnético está formado por nanopartículas de tamaño suficientemente pequeño para que cada una actúe como un único dominio. Al igual que le ocurre a los materiales paramagnéticos, cada nanopartícula (monodominio) orientará al azar su momento magnético resultante. Como consecuencia, el momento magnético resultante de una muestra macroscópica (formada por un elevado número de monodominios individuales) será nulo, no existiendo atracción magnética entre las nanopartículas. Sin embargo, la aplicación de un campo magnético externo provocará la alineación de los momentos magnéticos individuales de cada monodominio, resultando en una intensa interacción entre la magnetización del material y el campo externo aplicado.



Como ya se ha comentado con anterioridad, los materiales ferromagnéticos pueden volverse paramagnéticos por encima de una determinada temperatura (temperatura de Curie,  $T_c$ ) como consecuencia de una elevada agitación térmica que provoca un desorden en el alineamiento de los momentos magnéticos. Por ejemplo, la temperatura de Curie para la magnetita es de 856 K (583 °C) mientras que para metales tales como Ni, Fe, y Co, la temperatura de Curie es de 628 K (344 °C), 1044 K (771 °C), y 1388 K (1115 °C) respectivamente, siendo ésta última la mayor conocida para un material<sup>84</sup>.

### 1.6.3.- Histéresis de los materiales magnéticos.

Como se ha comentado con anterioridad, la aplicación de un campo magnético externo a un material ferromagnético inducirá cierta magnetización espontánea<sup>91</sup> debido tanto al desplazamiento de las paredes de los dominios (detectable con el método Bitter<sup>92</sup>) como por la variación de la dirección de alineamiento dentro de ese dominio<sup>85</sup>. Cuando cesa la aplicación del campo magnético, el proceso de imanación no es reversible, resultando en el efecto conocido como *histéresis* o “recuerdo de su historia magnética”. Esto puede ser representado mediante el ciclo de histéresis correspondiente (Fig. 14), el cual nos dice que al aplicar un campo magnético sobre un material ferromagnético, la magnetización presenta una respuesta irreversible<sup>84</sup>.



Cuando aplicamos un campo magnético a un material ferromagnético alcanzamos una zona de saturación (a y d en la Fig. 14). Si la acción del campo magnético cesa, la pérdida de magnetización no es reversible con respecto a la primera magnetización que se produjo, sino que presenta un valor no nulo a  $\vec{H}=0$  (conocido como remanente, relacionado directamente con la potencia del imán (b y e en la Fig. 14). Los

puntos c y f en la Fig. 14 representan la coercitividad del material ferromagnético (también llamada campo coercitivo o fuerza coercitiva) que representa la intensidad del campo magnético externo que debe aplicarse (en la misma dirección, pero sentido opuesto al aplicado inicialmente) para reducir su imanación a cero. Por lo tanto, la coercitividad mide la resistencia de un material ferromagnético a ser desimantado. Si seguimos aplicando un campo mayor de orden opuesto, llegamos de nuevo a la zona de saturación, obteniendo la mitad del ciclo de histéresis. Si aplicamos lo mismo en orden inverso al anteriormente descrito cerraríamos el ciclo<sup>85</sup>.

Por tanto, por un lado, cuanto mayor sea la coercitividad de un material ferromagnético mayor capacidad para ser desimantado y, por otro lado, cuanto mayor sea la remanencia más magnetización habrá adquirido, denominándose este tipo de material, magnéticamente duro. Por el contrario, consideraremos un imán magnéticamente blando, si su coercitividad y remanencia son pequeños<sup>84,85,93</sup>.

Una nanopartícula superparamagnética no presenta histéresis, a menos que llegue a la temperatura de bloqueo,  $T_B$ , donde la energía térmica es suficiente para inducir el movimiento aleatorio de los momentos magnéticos, mostrando por tanto características ferromagnéticas<sup>94</sup> (Fig. 15).

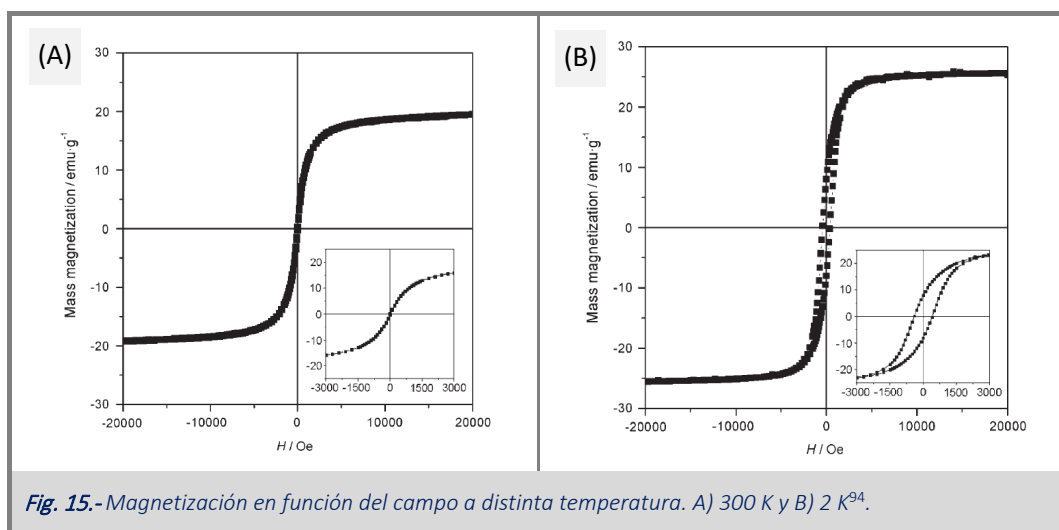


Fig. 15.- Magnetización en función del campo a distinta temperatura. A) 300 K y B) 2 K<sup>94</sup>.

Debido a esta gran propiedad que presentan las nanopartículas, se han generado multitud de aplicaciones, tanto a nivel industrial para biorremediación<sup>95</sup> o catálisis<sup>96</sup>, o a nivel biomédico, para imagen de resonancia magnética (MRI)<sup>97</sup> o transporte y liberación de fármacos<sup>98</sup> (*drug delivery*), entre otras muchas. Aquí describo algunas de las aplicaciones, centrándome en aquellas que más interés tienen en relación con los objetivos de la presente Tesis.

#### 1.6.4.- Aplicaciones biomédicas de las nanopartículas magnéticas.

##### Hipertermia

La hipertermia es un procedimiento terapéutico usado para aumentar la temperatura de una región del cuerpo para destruir tejidos tumorales o células patológicas. Esto puede ser logrado mediante el uso de nanopartículas magnéticas, ya que dado su superparamagnetismo, poseen la capacidad de absorber la energía del campo magnético externo y disiparla en forma de calor como consecuencia de la reorientación de los momentos magnéticos<sup>99</sup>.

La principal característica de las nanopartículas en base a la aplicación que se está describiendo es la capacidad que tienen para aumentar la temperatura por unidad de masa al aplicar un campo magnético alterno, definida como capacidad específica de absorción<sup>100</sup> (SAR, *Specific Absorption Rate*).

$$SAR = C_e \cdot \frac{dT}{dt} \quad (\text{Ec. 5})$$

donde  $C_e$  es el calor específico, y  $dT/dt$  es la variación de temperatura en función del tiempo.

Aquellas nanopartículas que posean un SAR elevado, serán mejores candidatas para la hipertermia debido que necesitaremos administrar menor cantidad de estas, además de reducir la intensidad del campo que es aplicado<sup>101</sup>.

Su uso en el tratamiento de un tipo de tumor intracraneal (Glioblastoma multiforme) en ratones, ha demostrado un efecto antitumoral efectivo, encontrando además que los resultados que obtienen dependen fuertemente del tipo de recubrimiento que presente la nanopartícula<sup>102</sup>.

##### Imagen por Resonancia Magnética, MRI (Magnetic Resonance Imaging)

La imagen por resonancia magnética (MRI) es una poderosa técnica usada para el diagnóstico de cáncer debido a que ofrece excelentes imágenes anatómicas y funcionales con una gran resolución espacio-temporal. Para ayudar al diagnóstico se requieren del uso de agentes de contraste, pudiendo encontrar varios tipos debido a sus diferentes mecanismos de actuación<sup>103</sup>.

Bajo un campo magnético externo, el momento magnético del protón se alinea en la misma dirección a la cual se aplica el campo. Cuando se irradia con una radiofrecuencia externa el protón se excitará, para posteriormente relajarse a un estado fundamental, siendo dependiente la señal que se obtiene en MRI de los tiempos de relajación longitudinal ( $T_1$  o spin-red) y transversal ( $T_2$  o spin-spin) del protón, que a su vez dependen del entorno fisiológico en el que se encuentre<sup>104</sup>.

Debido a esto, hay dos tipos de agentes de contraste, los que afectan a la relajación longitudinal (agentes de contraste  $T_1$ ) y los que afectan a la relajación transversal (agentes de contraste  $T_2$ ), siendo ambos

mejores cuanto más hagan reducir el tiempo de relajación. Un ejemplo de  $T_1$  es el formado por complejos quelantes de Gd(III), ya que el Gd(III) libre es tóxico<sup>105</sup>. Por el contrario como agente de contraste  $T_2$  se usan las nanopartículas superparamagnéticas, ya que debido a su magnetización por el campo que se está aplicando, producen una distorsión sobre el campo magnético local, con lo que producen una mayor susceptibilidad magnética, afectando a un mayor número de moléculas de agua, y aumentando la sensibilidad de detección en comparación con el agente de contraste  $T_1$ <sup>103</sup>.

Estas nanopartículas, en concreto magnetita recubierta con dextrano, ya han sido usadas para mejorar la detección de lesiones hepáticas<sup>106</sup>.

### *Terapia fotodinámica (PDT)*

La terapia fotodinámica es un tratamiento clínico que implica la administración de un fotosensibilizador en una zona tumoral. Tras esto, la zona es irradiada con luz láser lo que provoca la formación de radicales libres, como consecuencia de la transferencia de energía de excitación del fotosensibilizador sobre los átomos de oxígeno presentes en el medio, conduciendo a la muerte celular mediante apoptosis, necrosis o daños en la membrana celular<sup>107</sup>.

La terapia fotodinámica convencional presenta varias limitaciones como pueden ser la baja solubilidad de ciertos fotosensibilizadores o la inespecificidad hacia la zona tumoral<sup>108</sup>. Es por ello que el uso de las nanopartículas magnéticas se ha abierto paso dentro de este tipo de terapia, ya que aplicando un campo magnético externo se puede alcanzar el sitio deseado a tratar, además de aumentar la solubilidad de ciertos fotosensibilizadores hidrofóbicos así como su acumulación en la zona tumoral mediante el efecto EPR (*enhanced permeability and retention effect*), el cual consiste en la acumulación pasiva de dichas nanopartículas en la zona tumoral<sup>107</sup>.

Nanopartículas de magnetita con distintos recubrimientos, han sido usadas in vitro para PDT usando células HeLa de cáncer de cuello de útero humano, donde concluyen que se produce una inhibición significativa del crecimiento de las células, además de la alta efectividad de la terapia (logran alcanzar una muerte celular del 90 %) al usar estas nanopartículas<sup>109</sup>.

### *Ingeniería de tejidos*

La ingeniería de tejidos surge por la necesidad de regenerar tejidos funcionales que han sido dañados, implicando principios de ingeniería, biología celular y medicina<sup>108</sup>. Para llevar a cabo esta técnica debemos seguir varios procesos: a) aislamiento de células diana y crecimiento para obtener el número requerido, b)

cosechado y resiembra de células dentro de soportes tridimensionales (3D) biodegradables para el cultivo celular, y c) la implantación al paciente de dichos constructos 3D<sup>110</sup>.

El uso de nanopartículas magnéticas permite el desarrollo de una metodología para la manipulación física de las células diana, la cual es fundamental para el desarrollo de la técnica, además de servir como estructura 3D para construir un tejido que presente funciones similares a las que presenta in vivo. Esto es conocido como ingeniería de tejidos guiada por un campo magnético (*Mag-TE, magnetic force-based tissue engineering*)<sup>108,110</sup>.

Esta técnica ha sido usada para la fabricación de tejido de la epidermis a partir del cultivo de su célula principal, el queratinocito. Para ello usan liposomas que contienen nanopartículas de magnetita en su interior sobre los cuales unen los queratinocitos. Tras sembrar en placas de fijación ultrabaja y aplicar un campo magnético, encuentran que pueden aumentar el espesor de las láminas de queratinocito de 2.5 a 5 veces en comparación con otros métodos que no utilizan esta técnica<sup>111</sup>.

#### *Magnetofección (Gen Delivery)*

La magnetofección es definida como la liberación/entrega de ácidos nucleicos mediante un campo magnético, distinguiendo entre transducción y transfección si la liberación es mediante vectores virales o no virales, respectivamente. Ciertos ácidos nucleicos, debido a su hidrofiliidad, además de su susceptibilidad a ser degradados por nucleasas extracelulares o a su carga negativa hacen que se impida su transferencia hacia el interior celular. Para minimizar estas limitaciones se ha utilizado la magnetofección, donde se pueden acumular grandes cantidades de ácidos nucleicos en las proximidades de las células, y por tanto reducir los tiempos de incubación y transfección<sup>108</sup>.

A pesar de que la magnetofección ya ha sido ampliamente demostrada in vitro<sup>112,113</sup>, in vivo hay pocos estudios donde se aplique esta técnica, aunque ya ha sido usada en veterinaria para el tratamiento de fibrosarcoma felino en gatos, mediante la utilización de nanopartículas recubiertas de PEI sobre las que se habían adsorbido diferentes plásmidos que codifican distintos genes para tratar el tumor, encontrándose que en el 50 % de los gatos tratados el tumor desaparece<sup>114</sup>.

#### *Sistemas de transporte y liberación controlada de fármacos.*

El uso de nanopartículas magnéticas para la administración de fármacos fue propuesto por Widder et al.<sup>115</sup> en 1978, donde transportaba un agente quimioterapéutico (adriamicina) sobre una matriz compuesta por microesferas de albúmina que contenían nanopartículas de magnetita.

Ya se ha comentado en el apartado 1.5 de esta Introducción que para la adecuada funcionalidad de las nanopartículas in vivo, resulta de capital interés el control de parámetros tales como el tamaño, carga y composición química de la superficie, ya que afectan al tiempo de circulación o la biodisponibilidad dentro del cuerpo<sup>78</sup>.

Existen multitud de estudios sobre el uso de nanopartículas magnéticas para el desarrollo de sistemas de administración de fármacos y esto es debido a la posibilidad de modificar la superficie de las nanopartículas mediante distintos recubrimientos, de los cuales hablaré más adelante.

Varios autores han desarrollado distintas estrategias para la administración in vivo de doxorubicina, un fármaco para el tratamiento del cáncer. Unos unen el fármaco mediante interacción electrostática<sup>116</sup>, otros mediante interacción hidrofóbica<sup>117</sup>, y otros lo encapsulan<sup>118</sup>. Aquellos que lo hacen mediante interacción electrostática, utilizan nanopartículas recubiertas de dextrano. Los que lo unen mediante interacción hidrofóbica utilizan nanopartículas recubiertas por ácido oleico, mientras que los que encapsulan el fármaco utilizan liposomas en cuyo interior se encuentra la nanopartícula y el fármaco, reduciendo el 90 % del tumor para este último, en comparación con la administración convencional que lo reduce un 60 %.

### *1.6.5.- Aplicaciones industriales y medioambientales.*

#### *Remediación de aguas contaminadas*

La producción de contaminantes tales como metales pesados, colorantes, etc. y su liberación en aguas continentales o marítimas en países desarrollados e industrializados son cada vez más frecuentes, siendo necesario el desarrollo de nuevas herramientas para su tratamiento.

La adsorción de estos contaminantes sobre las nanopartículas magnéticas dependerá de la afinidad de éstos por el recubrimiento de la superficie sólida (este tema se tratará más adelante). El tamaño de las partículas utilizadas, por su parte, definirá dos aspectos esenciales respecto de su aplicabilidad: la capacidad específica de adsorción de los contaminantes y la cinética de decantación magnética.

Resulta evidente que a medida que el tamaño disminuye, la superficie específica (por unidad de masa de la partícula) aumenta. Para un determinado recubrimiento, la capacidad de adsorción (y potencial eliminación) de un determinado contaminante será proporcional a la superficie específica de la partícula. Asumiendo, en primera aproximación, una geometría esférica, resulta ser inversamente proporcional al tamaño (radio) de la partícula:

$$\text{Superficie específica} = \frac{\text{área}}{\text{masa}} = \frac{4 \cdot \pi \cdot r^2}{\frac{4}{3} \cdot \pi \cdot r^3 \cdot \rho} = \frac{3}{\rho} \cdot \frac{1}{r} \quad (\text{Ec. 6})$$

siendo r el radio y ρ la densidad para una determinada partícula.

Por tanto, la maximización de la capacidad de adsorción de los contaminantes a las nanopartículas diseñadas a tal fin aconsejaría la utilización de aquellas de menor tamaño. Sin embargo, a medida que disminuye el tamaño de la nanopartícula magnética también lo hace la fuerza efectiva con la que es atraída por el imán. La fuerza con la que el imán permanente (o electroimán) utilizado para separar las partículas del medio una vez han capturado el contaminante será la resultante de la fuerza magnética atractiva, a la que se oponen las fuerzas repulsivas entre ellas (derivadas fundamentalmente de repulsión electrostática entre las superficies de las nanopartículas) y el movimiento browniano. Mientras que la primera es constante, las fuerzas repulsivas aumentan a medida que la partícula disminuye su tamaño ya que, al aumentar su superficie específica, lo hace en la misma proporción su densidad superficial de carga. Como consecuencia, la cinética de decantación magnética disminuye con el tamaño de la nanopartícula.

Por tanto, el desarrollo de nanopartículas que permitan su utilización en el tratamiento de elevados volúmenes de agua contaminada requerirá no solo un adecuado diseño del recubrimiento de las nanopartículas que maximice su capacidad de adsorción de un contaminante dado, sino la definición de un tamaño óptimo de la misma. Las dimensiones óptimas de la partícula resultarán del balance entre la disminución de su tamaño para aumentar la capacidad específica de adsorción y la consecución de una cinética de decantación magnética que permita su utilización en condiciones de trabajo reales (grandes volúmenes, distancias partícula – imán elevadas, etc.).

El uso de nanopartículas superparamagnéticas para la eliminación de arsénico (III y V)<sup>119</sup> y otros metales como Hg, Ag, Pb, etc.<sup>120</sup> ha sido propuesto hasta la fecha.

### Catálisis

Un catalizador es una sustancia que acelera la velocidad de la reacción sin consumirse<sup>121</sup>, ofreciendo a los reactivos un mecanismo de reacción alternativo cuya energía de activación es menor que el correspondiente a la reacción no catalizada. Podemos encontrar dos tipos de catalizadores, homogéneos, si el catalizador y los reactivos se encuentran en la misma fase, o heterogéneos, si están en distinta fase. Los catalizadores heterogéneos, por un lado, son fácilmente eliminados de la disolución, pero hacen que la velocidad de la reacción sea limitada debido a su reducida superficie específica. Por otro lado, los catalizadores homogéneos hacen que la velocidad de reacción sea elevada debido a la buena difusión en el medio, pero son difícilmente recuperados del mismo<sup>122</sup>, lo que implica enormes pérdidas económicas.

Es por este motivo que la inmovilización de catalizadores homogéneos sobre soportes poliméricos o de nanopartículas de muy distinta naturaleza ( $\text{SiO}_2$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , etc.) ha sido propuesta como medio para recuperar y reutilizar estas sustancias. En el caso de los enzimas, su inmovilización puede originar varios problemas como son la disminución de la actividad enzimática de la proteína inmovilizada (sobre todo si la inmovilización es covalente) y la disminución de la actividad catalítica como consecuencia de



problemas derivados de difusión. Por tanto, para minimizar estos problemas se deberían usar soportes de tamaño nanométrico, pero a pesar de aumentar la superficie específica, el problema seguiría persistiendo, ya que debido a su tamaño nanométrico sería complicado separarlos del medio. Por esto, surge la idea de combinar las nanopartículas magnéticas (de tamaño suficiente que asegure su fácil decantación magnética) con los catalizadores, de forma que la utilización de un campo magnético externo permita la recuperación del catalizador unido a la superficie de la partícula<sup>96</sup>.

Un ejemplo de su aplicación ha sido la adsorción de platino sobre nanopartículas de magnetita modificadas con líquido iónico, para la hidrogenación selectiva de aldehídos  $\alpha$ - $\beta$ -insaturados y alquinos<sup>123</sup>.

### 1.6.6.- Métodos de síntesis de las nanopartículas magnéticas.

Son numerosos los métodos que se aplican en la síntesis de nanopartículas magnéticas de óxidos de hierro, los cuales presentan similitudes y diferencias sobre las características finales de las partículas. La Fig. 16 muestra un resumen de las principales metodologías de síntesis. A continuación, haré una breve descripción de cada una de ellas.

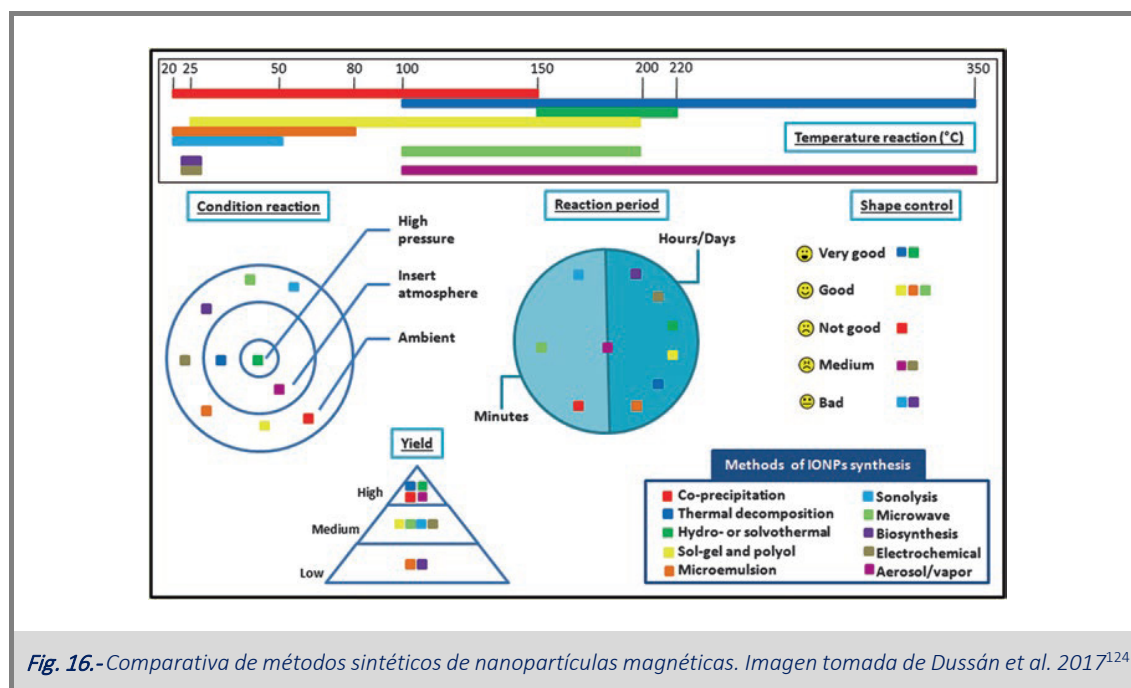
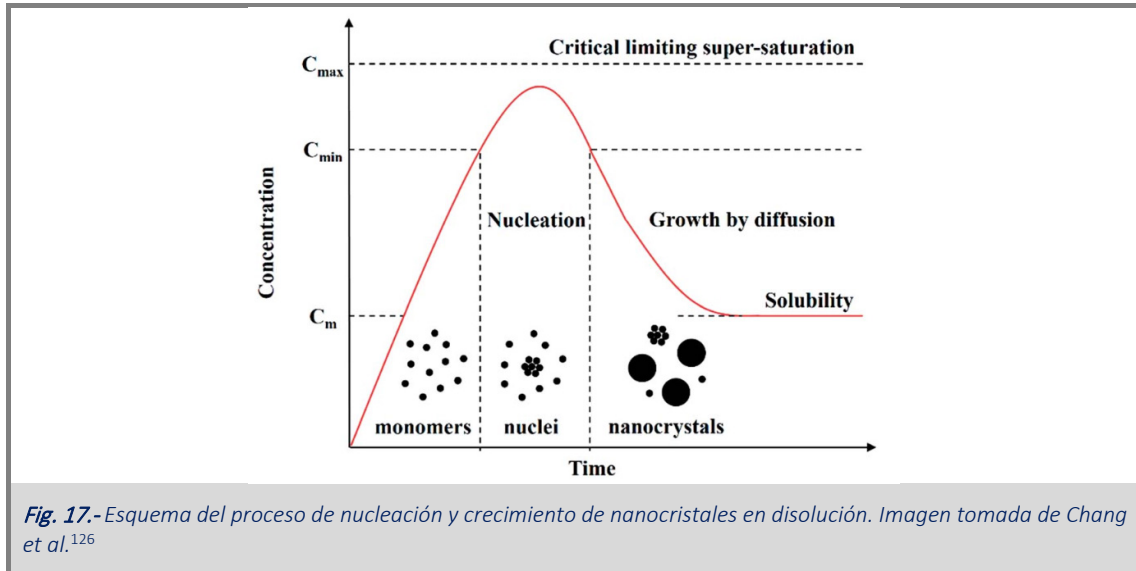


Fig. 16.-Comparativa de métodos sintéticos de nanopartículas magnéticas. Imagen tomada de Dussán et al. 2017<sup>124</sup>

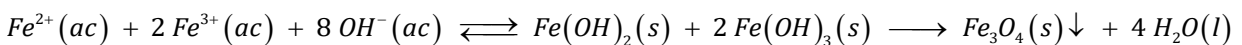
En muchos de ellos, cuando ocurre la precipitación tiene lugar la formación de pequeños núcleos (también llamados centros de nucleación) y su posterior crecimiento debido a la difusión de las especies en disolución hacia la superficie hasta alcanzar un tamaño final. Para conseguir una población de nanopartículas monodispersas, la nucleación y el crecimiento deberían estar lo más separadas posibles, además de evitar la nucleación durante el crecimiento<sup>99</sup>. Esto es explicado por LaMer y Dinegar<sup>125</sup> con el modelo que proponen sobre la formación de coloides de azufre (Fig. 17). Este modelo se puede resumir en

tres pasos principales; a) formación de monómeros, b) fase de nucleación una vez se alcanza la concentración mínima crítica de monómeros y, c) etapa de crecimiento para dar lugar a los primeros nanocristales en la que los monómeros individuales se unen al centro de nucleación tras reducirse la concentración por debajo de la concentración mínima crítica.



#### Método de co-precipitación

Este método es el más sencillo y eficiente para obtener nanopartículas magnéticas. Consiste en la precipitación de hidróxidos de hierro (II) y (III) mediante el aumento de pH de una disolución conteniendo iones  $Fe^{3+}$  y  $Fe^{2+}$  en relación molar 2:1.



La primera preparación que se hizo mediante esta técnica fue en el año 1981 por Massart<sup>127</sup>, donde obtuvo partículas de un tamaño promedio de 12 nm. La principal ventaja de este método es que se obtiene una cantidad elevada de nanopartículas, sin embargo resulta complejo controlar el tamaño, la morfología y la composición de la partícula<sup>79,128</sup>. Esto puede ser controlado variando las condiciones experimentales, como fuerza iónica, pH, naturaleza de las sales de hierro o concentración de la base utilizada<sup>108</sup>.

#### Método de oxidación

Un método de oxidación bien establecido, propuesto por Sugimoto et al. en 1980<sup>129</sup>, permite obtener partículas de magnetita de morfología bien definida y con una distribución de tamaño uniforme. El método se basa en la oxidación del  $Fe^{2+}$  con nitrato en medio básico. La mezcla de los tres reactivos provoca la aparición de un precipitado amorfo de  $Fe(OH)_2$  que posteriormente es madurado/envejecido a 90 °C en presencia de nitrato provocando la oxidación parcial del hidróxido para dar  $Fe_3O_4$ . En su investigación

observan como las propiedades de las partículas resultantes dependen de parámetros tales como, presencia o ausencia de O<sub>2</sub>, agitación, pH, concentración de los reactivos y la naturaleza de los aniones y cationes, tiempo de envejecimiento, etc., llegando a obtener partículas de tamaño entre 0.03 y 1.1 μm, dependiendo de las condiciones experimentales utilizadas.

A pesar de que el tamaño de las partículas obtenidas por este método puede ser controlando mediante los parámetros anteriormente citados, a diferencia de las nanopartículas obtenidas mediante el método de Massart, el tamaño es ligeramente superior, como demuestran Sen et al.<sup>130</sup> en su estudio, obteniendo partículas de 30 a 150 nm con el método de Sugimoto y de alrededor de 10 nm con el método de Massart. Además, determinan que las de Sugimoto presentan una agregación ordenada, por lo que no podrían desagregarse, frente a las obtenidas con el de Massart que no presentaban tal agregación.

#### *Método de descomposición térmica*

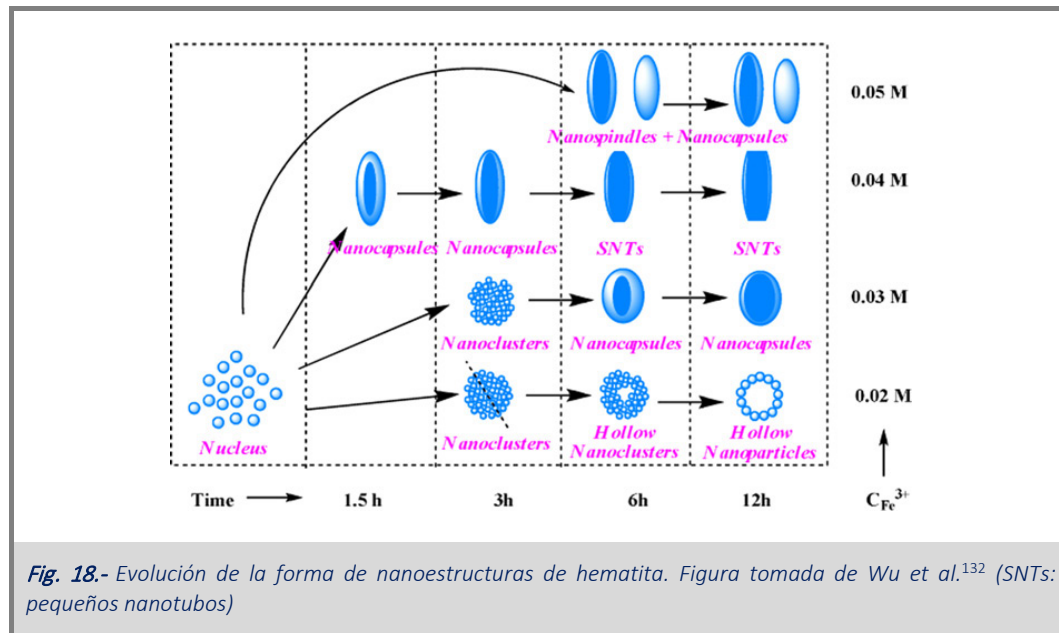
Este método surge para evitar los problemas derivados del control del tamaño que presenta el método de co-precipitación. Consiste en la descomposición térmica de compuestos organometálicos en disolventes orgánicos con un elevado punto de ebullición<sup>93,128</sup>. Como compuestos organometálicos pueden utilizarse Fe(acac)<sub>3</sub> (acac=acetilacetato), Fe(Cup)<sub>3</sub> (Cup=N-nitrosufenilhidroxilamina), etc. Para obtener nanopartículas monodispersas se añaden estabilizadores orgánicos durante el proceso de reacción, como ácido oleico, 1-octadecano o 1-tetradecano. Con esto además consiguen que el crecimiento del cristal se vea impedido, logrando partículas pequeñas<sup>128</sup> y uniformes lo que se traduce en material con escasa polidispersidad.

Debido a la adición de estos estabilizadores durante la síntesis, este método se usa para preparar óxidos de hierro de distinta forma, como por ejemplo nanocubos o nanoesferas, si se usan distintas mezclas de ferroceno y polivinilpirrolidona (PVP)<sup>131</sup>.

#### *Métodos solvotérmicos e hidrotérmicos*

Con este método se obtienen nanopartículas en medio acuoso (hidrotermal) o medio orgánico (solvotermal) en reactores o autoclaves a elevada temperatura y elevada presión. Altas temperaturas conducen a una rápida nucleación, lo que conlleva a la obtención de partículas pequeñas<sup>108</sup>.

Con este método es posible controlar la geometría modificando parámetros como el tiempo de reacción, temperatura, naturaleza del disolvente, relación estequiométrica de reactivos, etc. Por ejemplo, empleando iones sulfato o fosfato en la síntesis, es posible controlar el tamaño, morfología o forma de los óxidos de hierro, tal y como muestran Wu et al.<sup>132</sup> en su investigación (Fig. 18).



### Método electroquímico

Con este método se obtienen nanopartículas de elevada pureza y tamaño controlado, mediante el ajuste del potencial aplicado en el sistema de reacción<sup>124</sup>.

Utilizando este método se pueden preparar nanopartículas estabilizadas con surfactantes catiónicos cuyo tamaño es de 3 – 8 nm. Para ello utilizan un ánodo de hierro, un cátodo de una lámina de platino, como surfactante bromuro de tetraoctilamonio y como electrolito N,N-dimetilformamida<sup>133</sup>.

### Método de aerosol

Este método consiste en la vaporización de un disolvente orgánico que contiene sales de hierro. Como consecuencia se forman finas gotas donde el disolvente orgánico se evaporará, quedando formadas las nanopartículas, cuyo tamaño dependerá del tamaño de la gota inicial, además del tipo de sal que se utilice para la síntesis<sup>134</sup>.

### Métodos sol-gel y mediante utilización de polialcoholes (polioles)

El método sol-gel ha sido muy utilizado para la obtención de nanopartículas de sílice siguiendo el método de Ströber<sup>59</sup>. Además, una adaptación del procedimiento permite recubrir las nanopartículas magnéticas con una capa de sílice de grosor variable. El método se basa en la hidroxilación y condensación de precursores moleculares, dando lugar a la formación de partículas nanométricas, conocido como sol. Tras esto, tiene lugar la condensación y polimerización inorgánica para formar una red tridimensional conocida

como gel<sup>108</sup>. Para obtener una estructura cristalina hay que hacer un tratamiento térmico adicional puesto que el proceso descrito previamente se lleva a cabo a temperatura ambiente<sup>135</sup>.

Este método ofrece la ventaja de obtener nanopartículas con distinta estructura en función de las condiciones experimentales que se usen, además de controlar el tamaño de la partícula o la posibilidad de alojar moléculas dentro de la matriz sol-gel<sup>79</sup>. Es por esto que las nanopartículas pueden ser embebidas en una matriz de sílice inerte<sup>136</sup>.

Si en lugar de llevar a cabo una reacción de oxidación, como ocurre en el método sol-gel, llevamos a cabo una de reducción, nos encontramos con un método inverso al sol-gel o método poliol. Aquí el precursor de hierro es mezclado y calentado junto con un poliol, como puede ser polietilenglicol (PEG), hasta una temperatura dada, que muy frecuentemente supera el punto de ebullición del poliol, utilizándose por ello un reactor autoclave en la síntesis. En estas condiciones el metal es reducido por el poliol para formar núcleos de óxidos metálicos, los cuales formarán la partícula. El uso de estos polioles permiten el control del crecimiento de la partícula y evitan la agregación<sup>79</sup>.

Mediante la utilización de trietilenglicol (TREG) y  $\text{Fe}(\text{acac})_3$  a 280 °C se pueden obtener nanopartículas de magnetita monodispersas y de forma uniforme<sup>137</sup>.

#### Método de microemulsión

Una microemulsión es una dispersión isotrópica termodinámicamente estable de dos líquidos inmiscibles, como pueden ser aceite (O:oil) y agua (W:water) los cuales forman microdominios separados por una capa de surfactante<sup>138</sup> (Fig. 19).



**Fig. 19.-** Microemulsiones W/O (izqda.) y O/W (dcha.) (Figura tomada de Langevin D.<sup>138</sup>)

En microemulsiones de agua en aceite (W/O), la fase acuosa forma microgotas de un tamaño alrededor de 10 nm, estabilizadas por el surfactante proporcionando un efecto de aislamiento que limita la nucleación, el crecimiento y la agregación<sup>99</sup>. Por tanto, la microemulsión se considera un nanoreactor donde puede tener lugar la formación de nanopartículas.

Esta técnica ha sido utilizada para obtener nanopartículas tanto por W/O como por O/W, donde los autores ven ligeras diferencias entre ambos métodos. Por un lado, las obtenidas por W/O muestran una mayor magnetización que las obtenidas por O/W (35 emu/g frente a 10 emu/g), atribuyéndose esto a la diferencia de tamaños (9.2 nm frente a 2 nm). Por el contrario las obtenidas por O/W presentan una mayor porosidad y por tanto una mayor superficie específica<sup>139</sup>.

#### *Método de síntesis utilizando ultrasonidos (sonolisis)*

Óxidos de hierro pueden ser obtenidos mediante descomposición de precursores organometálicos o sales de hierro (termólisis o sonolisis), pudiendo utilizar polímeros o surfactantes para limitar el tamaño de las partículas<sup>140</sup>. En la sonolisis se emplean ultrasonidos de alta intensidad que, mediante el efecto de cavitación, permiten la formación de nanopartículas. Cuando empieza la sonicación se forman microburbujas, las cuales colapsan generando temperaturas locales muy elevadas (cavitación) lo que permite la transformación de la sales de hierro en las nanopartículas magnéticas<sup>79</sup>.

Mediante esta técnica se han obtenido nanopartículas de 15 nm con una elevada cristalinidad y elevada magnetización en comparación con unas obtenidas mediante co-precipitación (83 emu/g frente a 51 emu/g). Tras ser tratadas con ácido oleico y recubiertas con quitosano (tamaño final de 65 nm) han sido utilizadas para MRI<sup>141</sup>.

#### *Método de síntesis utilizando radiación de microondas*

Esta técnica se basa en irradiar sales de hierro mediante microondas para provocar la excitación de las moléculas, desencadenando una fuerte agitación debido a su reorientación y causando, por tanto, un brusco aumento de temperatura<sup>128</sup>. La gran ventaja de esta técnica frente a la hidrotermal es que la cinética de síntesis es extremadamente rápida<sup>142</sup>. Además, esta técnica presenta otra ventaja importante, y es que durante la síntesis no se produce un gradiente térmico paulatino<sup>143</sup>.

Mediante esta técnica se pueden obtener nanopartículas de tamaño ligeramente distinto (10 y 14 nm) si la síntesis se lleva a cabo a distinta temperatura, 45 y 85 °C respectivamente<sup>144</sup>.

#### *Métodos biosintéticos*

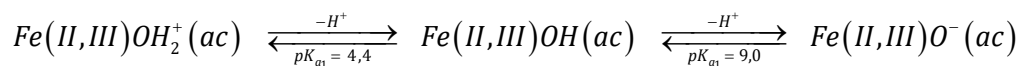
La biosíntesis de nanopartículas magnéticas está basada en reacciones de oxidación o reducción catalizadas por enzimas microbianos. Este método está enmarcado dentro de la química verde, y como consecuencia el producto que se obtiene presenta una buena biocompatibilidad<sup>128</sup>.

En la biosíntesis convencional son usadas bacterias magnetotácticas como *M. gryphiswaldense* y bacterias reductoras de hierro, como *Geobaceter metallireducens* para la síntesis de nanopartículas<sup>145,146</sup>.

### 1.6.7.- Recubrimiento y estabilización de nanopartículas de magnetita

Si durante la síntesis evitamos la oxidación de las nanopartículas llevándola a cabo bajo condiciones de atmósfera inerte, obtendremos nanopartículas de magnetita, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. Las partículas de magnetita se oxidan espontáneamente con el oxígeno atmosférico dando lugar a maghemita<sup>147</sup> o a hematita<sup>148</sup>.

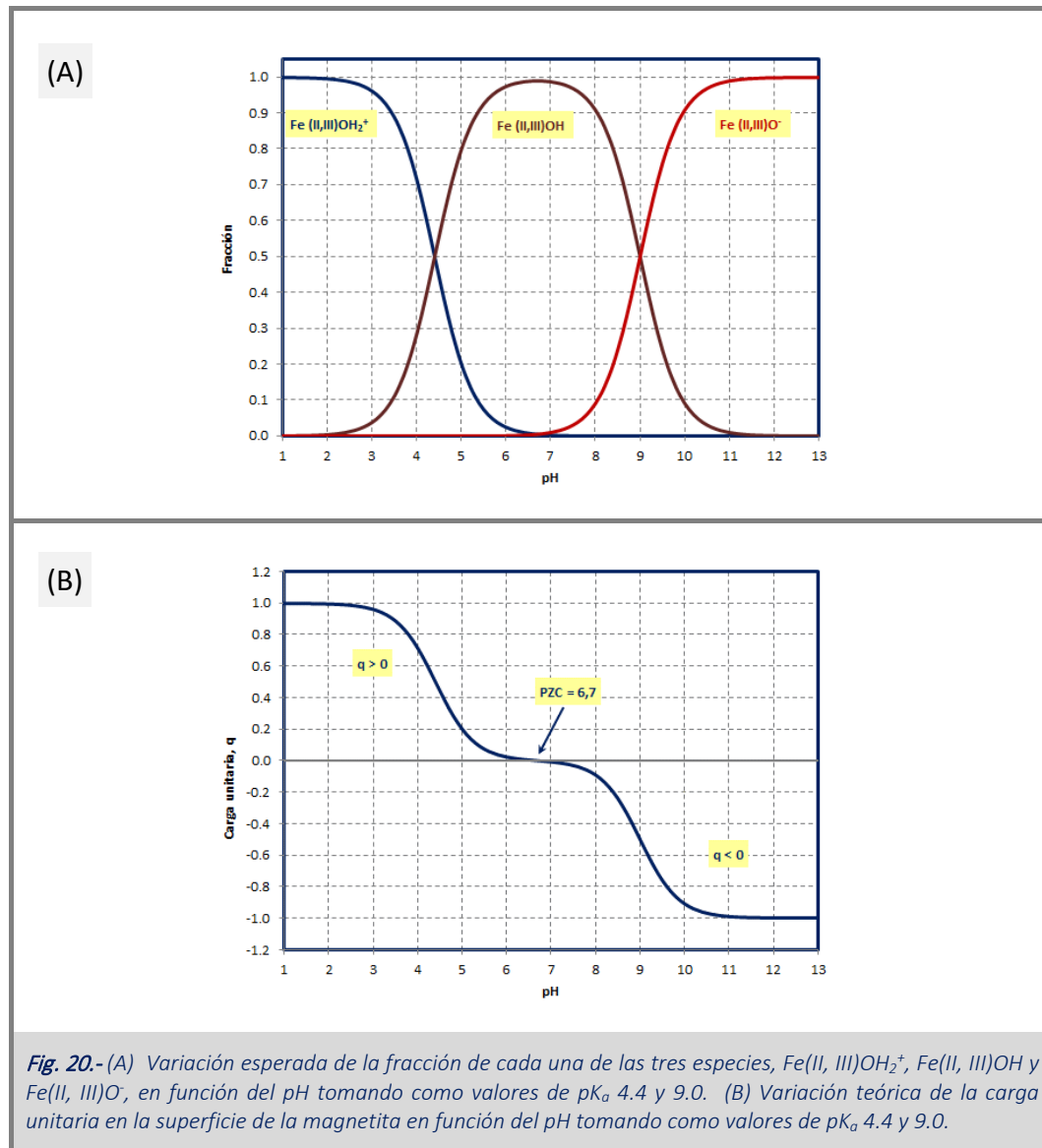
Con objeto de entender la escasa estabilidad coloidal de las partículas de magnetita en disolución acuosa en condiciones fisiológicas, se hace necesario explicar brevemente el comportamiento ácido-base de este óxido de hierro. Son muchos los estudios dedicados a la descripción del comportamiento ácido-base de diferentes óxidos metálicos. Existe actualmente un consenso en que, en el caso de la magnetita, este comportamiento es consistente con la existencia de dos equilibrios de disociación protónica a los que pueden adscribirse dos valores de pK<sub>a</sub>, 4.4 y 9.0<sup>149</sup> (Fig. 20).



Si simulamos la variación de carga superficial en función del pH, asumiendo los valores de pK<sub>a</sub> anteriormente citados, encontramos que a pH 6.7 la carga neta de la superficie de la nanopartícula es cero (PZC, *Point of Zero Charge*), siendo positiva a pH por debajo de este PZC y negativa por encima.

Como consecuencia, tanto a bajo como a alto pH la superficie de las partículas de magnetita estará fuertemente cargada positiva o negativamente. En estas condiciones se establecerá una fuerte repulsión electrostática entre ellas aumentando su estabilidad coloidal, al oponerse esta repulsión a la atracción hidrofóbica, agregación y consecuente precipitación.

Por el contrario, a medida que el pH de la disolución se acerca al PZC, la carga superficial de las partículas disminuirá y, por tanto, se debilitará la repulsión electrostática. Este acercamiento del pH de la disolución al PZC de las nanopartículas reducirá su estabilidad coloidal haciendo más probable su aglomeración y posterior floculación.



La estabilidad que presenten las nanopartículas de magnetita en disolución, dependerá del equilibrio que se establezca entre fuerzas atractivas y repulsivas, tal y como describe la teoría DLVO desarrollada por Derjaguin y Landau en 1941 y por Verwey y Overbeek en 1948, donde las fuerzas repulsivas dependen del potencial y espesor de la doble capa eléctrica, el radio de la partícula y la constante dieléctrica del medio, mientras que las atractivas dependen de fuerzas de van der Waals<sup>150,151</sup>.

La escasa estabilidad de las nanopartículas de magnetita a pH cercanos al fisiológico ha sugerido en las últimas décadas su estabilización mediante el recubrimiento de su superficie para aumentar su estabilidad coloidal.

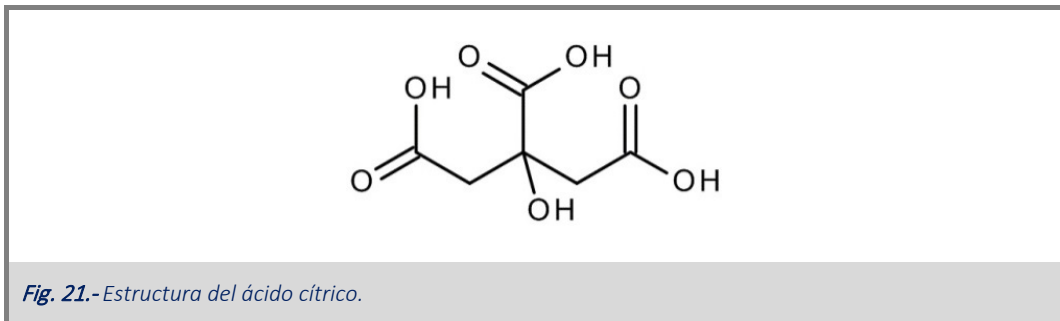
Para lograr la estabilización de las nanopartículas podemos utilizar recubrimientos de las partículas de magnetita con objeto de favorecer el establecimiento de interacciones repulsivas (electrostáticas y/o estéricas) que compitan con las fuerzas atractivas de van der Waals aumentando así la estabilidad coloidal de las nanopartículas resultantes<sup>152</sup>. Para ello distintas moléculas estabilizadoras pueden ser usadas para



recubrir estas nanopartículas, aumentando su estabilidad coloidal por un lado y, por otro, protegiendo el núcleo de magnetita,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , frente a la oxidación con el oxígeno atmosférico para dar maghemita,  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , o hematita,  $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ . Como consecuencia de este recubrimiento, estas partículas presentan una enorme funcionalización<sup>93</sup>, ya que además de presentar capacidad magnética, su superficie mostrará distintos grupos funcionales en función del tipo de tratamiento/recubrimiento que haya sido utilizado. A continuación, describo las posibles estrategias de estabilización de estas nanopartículas de magnetita:

#### *Recubrimiento con ácido cítrico*

El ácido cítrico presenta 3 grupos carboxílicos, los cuales presentan valores de  $\text{pK}_a$  de 3.13, 4.76 y 6.4 mostrando, además, una elevada afinidad como agente quelante de iones  $\text{Fe}^{2+}$  y, especialmente,  $\text{Fe}^{3+}$ .<sup>153</sup>

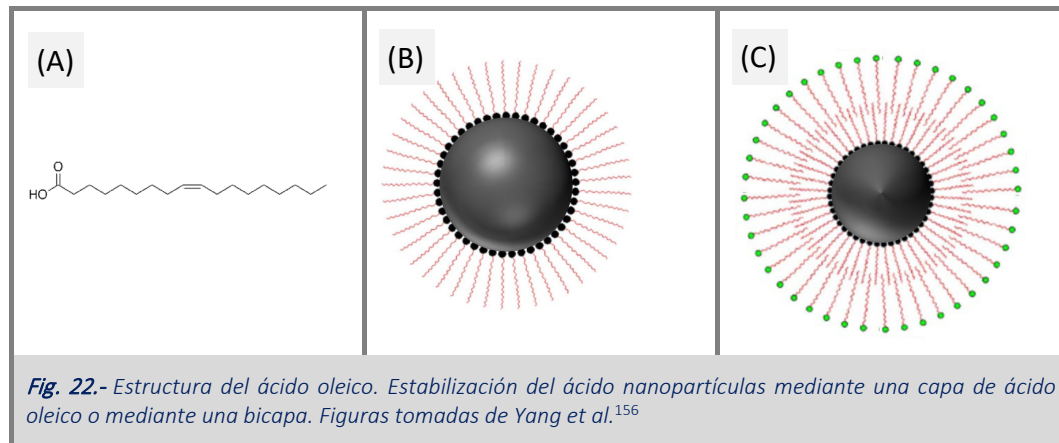


Debido a esto, al menos un grupo carboxílico puede ser expuesto al disolvente y como consecuencia otorgará carga negativa a la partícula. Este tipo de recubrimiento ha sido usado para estabilizar nanopartículas de magnetita para su posterior aplicación en MRI<sup>154</sup> o en bioimagen<sup>155</sup>.

#### *Recubrimiento con ácido oleico*

El ácido oleico (Fig. 22-A) es un ácido graso insaturado cuyo ácido carboxílico tiene un  $\text{pK}_a$  de 5.02<sup>153</sup>. Aunque el ácido oleico es solo soluble en disolventes no polares, cuando se unen a las nanopartículas de magnetita pueden formar una doble capa (Fig. 22-C), si el ajuste de pH es adecuado, haciéndolas solubles en disolventes polares<sup>154</sup>. Además, las nanopartículas pueden ser estabilizadas mediante la formación de una sola capa de ácido oleico (Fig. 22-B), siendo solubles solamente en disolventes no polares, y por tanto no podrán ser utilizadas para aplicaciones biológicas<sup>153</sup>.

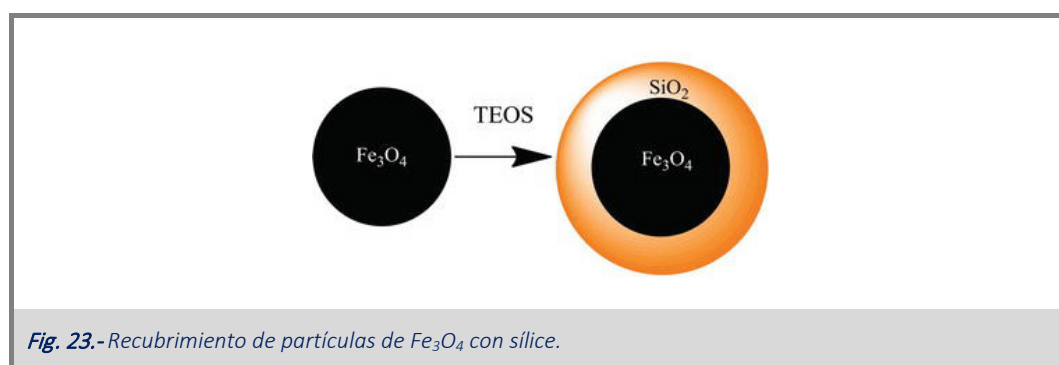
Al igual que la estabilización con citrato, la unión del ácido oleico con la superficie es muy fuerte, ya que la interacción es producida mediante un grupo carboxilato.



Siguiendo estos protocolos, nanopartículas estabilizadas mediante esta doble capa han sido sintetizadas para aplicaciones como hipertermia o MRI, donde debido al recubrimiento, se produce una pérdida en la magnetización, pero sin llegar a perder la capacidad superparamagnética<sup>155</sup>.

#### Recubrimiento con sílice

El recubrimiento de las nanopartículas con sílice (Fig. 23) posee ventajas significativas debido a la estabilidad de su entramado covalente. Por otro lado, otorga carga negativa a la partícula en un amplio rango de pH. El pH en el que la superficie tiene una carga neta nula es alrededor de 2 - 3<sup>157</sup>. Por su parte, debido a la deprotonación de los grupos silanoles, la densidad de carga negativa sobre la superficie aumenta con el pH. La depolimerización del sílice se produce a alto pH (pH > 12) produciéndose la disolución del recubrimiento<sup>158</sup>.



Debido a esto es posible evitar la agregación de la nanopartícula desnuda a pH fisiológico. Otra ventaja debida a los grupos silanoles que expone sobre su superficie es que hacen que sea muy reactiva y fácilmente derivatizable pudiendo unir diversas moléculas de forma covalente<sup>159,160</sup>. Además hace que la partícula presente menor toxicidad<sup>161</sup>, siendo buena candidata para obtener nanopartículas para aplicaciones biomédicas.

Este tipo de recubrimiento puede ser llevado a cabo mediante varios métodos; uno de ellos es mediante el proceso Stöber<sup>59</sup>, ampliamente utilizado, donde la sílice es formada a partir de un precursor como es el TEOS (tetraetil ortosilicato) a través de un proceso sol-gel<sup>136</sup>. Otro puede ser mediante microemulsión W/O (ver el método de síntesis de nanopartículas discutido anteriormente), donde las micelas son usadas para controlar el recubrimiento de la sílice sobre la nanopartícula<sup>162</sup>.

### *Recubrimiento con polímeros neutros y polielectrolitos*

Multitud de polímeros han sido empleados para estabilizar las nanopartículas de magnetita, bien por adición in situ durante la formación de la partícula o mediante tratamiento tras su obtención. Entre los polímeros biocompatibles más usados encontramos; dextrano<sup>116</sup>, quitosano<sup>163</sup>, alginato<sup>164</sup>, PVA<sup>165</sup> (polivinilalcohol), PEG<sup>166</sup> (polietilenglicol), etc.

Los polímeros cargados han sido, sin duda, los más utilizados en la estabilización de las partículas de magnetita ya que el recubrimiento resultante, además de aumentar de forma significativa su estabilidad coloidal, permite la adsorción de ligandos con carga opuesta.

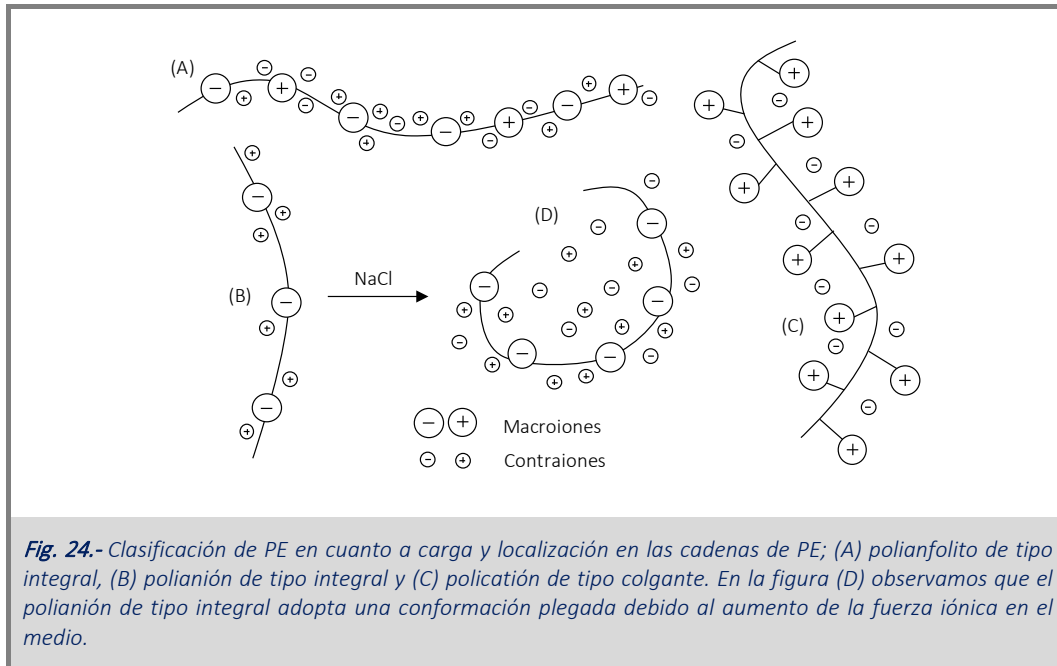
Los polielectrolitos son polímeros que contienen grupos ionizables, los cuales en disolventes polares, pueden disociarse en cadenas poliméricas cargadas (macroiones) y pequeños contraiones<sup>167</sup>. En disolución, estos contraiones se encuentran condensados sobre la cadena polimérica, de acuerdo con la teoría de condensación del contraion propuesta por Manning en 1969<sup>168</sup>.

La densidad de carga que presente el polielectrolito dependerá de varios factores. Por un lado afectarán factores intrínsecos al polielectrolito, como la estructura o tipo de grupo ionizable que presente, y por otro lado afectarán factores extrínsecos a este como naturaleza y concentración del contraion, fuerza iónica, pH o temperatura<sup>169,170</sup>.

Debido a estos factores, surgen distintas clasificaciones para los polielectrolitos. Por un lado, podemos distinguir entre polielectrolitos fuertes y débiles. Los polielectrolitos fuertes están igualmente ionizados en todo el rango del pH, mientras que para los polielectrolitos débiles su grado de ionización es dependiente del pH, por estar constituidos por grupos ionizables caracterizados por un  $pK_a$  de valor intermedio. En cuanto a su carga pueden ser divididos en polianiones, policationes y polianfolitos. Dependiendo de la localización de los grupos ionizables, pueden clasificarse como tipo integral, si el grupo ionizable se encuentra dentro de la cadena principal (Fig. 24-A, Fig. 24-B), o de tipo colgante, si se encuentran en las cadenas laterales de la cadena principal<sup>171</sup> (Fig. 24-C). Además, pueden distinguirse entre lineales y ramificados.

Un aspecto importante en la conformación del polielectrolito es la fuerza iónica, ya que a fuerza iónica baja, el polielectrolito adopta una conformación “estirada” (Fig. 24-B) puesto que los grupos cargados se

repelen entre sí, mientras que a fuerza iónica elevada el polielectrolito adopta una conformación “plegada” (Fig. 24-D) debido al apantallamiento de cargas, tal y como afirman Kokufuta et al.<sup>172</sup> en su investigación de 1986.



Tanto proteínas como ácidos nucleicos son considerados ejemplos de polielectrolitos naturales. Además, existe una enorme variedad de polielectrolitos sintéticos que han sido desarrollados en las últimas décadas.

## 2. Objetivos



- 1.- Desarrollar estrategias que, utilizando polielectrolitos catiónicos, permitan el efectivo recubrimiento de las superficies de sílice y, por tanto, inhiban la adsorción de proteínas.
- 2.- Utilizar los recubrimientos de las partículas de sílice como adsorbentes de ligandos de carga opuesta. Mejorar la capacidad de estos revestimientos para adsorber ligandos mediante la optimización de las condiciones ambientales (pH, fuerza iónica, etc.) que maximicen el número de cargas expuestas al disolvente.
- 3.- Obtener nanopartículas de magnetita recubiertas de polielectrolitos que les doten de capacidad de capturar, transportar o almacenar ligandos de carga opuesta (especialmente biomoléculas).
- 4.- Diseñar y sintetizar nanopartículas magnéticas que permitan la unión, de forma selectiva, de metales pesados con alta afinidad. Se deben optimizar, también, las metodologías de recuperación del metal y reutilización de la nanopartícula.
- 5.- Perfeccionar los recubrimientos de las partículas de magnetita con el objetivo de dotarlas de mayor capacidad de adsorción y mejor estabilidad coloidal.





### 3. Materiales y métodos



### 3.1.- Materiales

#### Partículas y magnetita

Las partículas de sílice Cab-o-Sil con una superficie específica de  $206 \text{ m}^2\cdot\text{g}^{-1}$  y con una pureza de más del 99 % fueron compradas a Acros Organics.

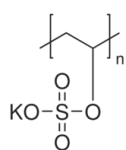
Las partículas de magnetita,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , fueron sintetizadas siguiendo el protocolo de co-precipitación (ver más adelante) a partir de sales de hierro con una pureza mayor del 99 %.  $\text{FeCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  ( $198.83 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) y  $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ( $273.3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) fueron obtenidos de Merck mientras que el resto de productos químicos (ácidos, amoníaco, sustancias utilizadas para preparar disoluciones reguladoras, etc.) fueron obtenidas de Merck, Sigma-Aldrich y Fisher con una pureza mayor del 99 %.

#### Polielectrolitos

Varios polielectrolitos sintéticos fueron utilizados con objeto de recubrir las partículas de sílice y de magnetita. Fueron obtenidos de fuentes comerciales (Sigma, Fisher, etc.) bien como sólidos o como disoluciones acuosas de concentración definida y utilizados sin ser sometidos a procesos de purificación posteriores. A continuación, se indican las estructuras, los pesos moleculares promedio y el del monómero correspondiente.

##### a) Polielectrolitos aniónicos

#### Poli(vinilsulfato), sal potásica, KPVS

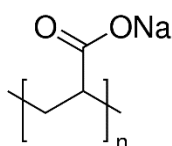


Peso molecular promedio:  $\sim 150 \cdot 10^3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Fórmula molecular (monómero):  $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_4\text{SK}$

Peso molecular (monómero):  $162.2 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

#### Poli(acrilato), sal sódica, PAA



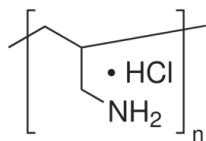
Peso molecular promedio: varios

Fórmula molecular (monómero):  $\text{C}_3\text{H}_2\text{O}_2\text{Na}$

Peso molecular (monómero):  $93.0 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

## b) Polielectrolitos catiónicos

## Hidrocloreto de poli(alilamina), PAAH

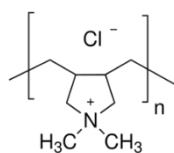


Peso molecular promedio:  $17.5 \cdot 10^3$  y  $56 \cdot 10^3$  g·mol<sup>-1</sup>

Fórmula molecular (monómero): C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>ClN

Peso molecular (monómero): 93.55 g·mol<sup>-1</sup>

## Cloruro de poli(dialildimetilamonio), PDADMACl

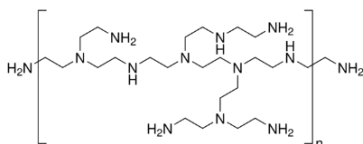


Peso molecular promedio: varios

Fórmula molecular (monómero): C<sub>8</sub>H<sub>16</sub>ClN

Peso molecular (monómero): 161.7 g·mol<sup>-1</sup>

## Poli(etilenimina), PEI

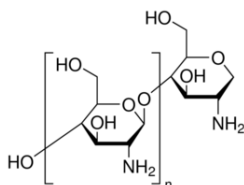


Peso molecular promedio:  $70 \cdot 10^3$  g·mol<sup>-1</sup>

Fórmula molecular (monómero): C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>N

Peso molecular (monómero): 42.05 g·mol<sup>-1</sup>

## Quitosano



Peso molecular promedio: polidisperso

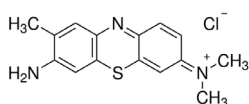
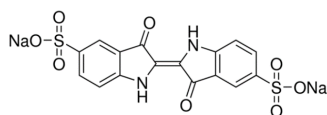
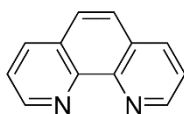
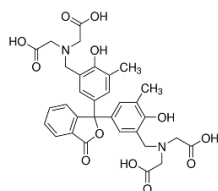
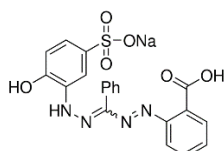
Fórmula molecular (monómero): C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>O<sub>4</sub>N

Peso molecular (monómero): 161.0 g·mol<sup>-1</sup>

## Colorantes

El azul de *orto*-toluidina (o-Tb) que se utilizó para determinar concentraciones de polielectrolitos catiónicos por titulación con el polielectrolito aniónico KPVS se obtuvo de *Acros Organics*, mientras que el carmín de índigo usado en la caracterización de partículas de sílice o magnetita recubiertas por polielectrolitos aniónicos o catiónicos se obtuvo de Sigma, al igual que la 1,10-fenantrolina que se utilizó para determinar la cantidad de hierro presente en las dispersiones de magnetita. Tanto el zincon como la o-cresolftaleína se utilizaron para cuantificar metales divalentes en el medio, y ambos fueron obtenidos de Sigma.

En la siguiente tabla se muestran las estructuras de los cinco colorantes con alguna información espectroscópica relevante.

**Azul de *orto*-toluidina, o-Tb**Tipo: *catiónico*Peso molecular promedio: 305.83 g·mol<sup>-1</sup> $\lambda_{max} = 630 \text{ nm}$  $\epsilon_{630 \text{ nm}} = 51000 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ **Carmín de índigo, Cl**Tipo: *aniónico*Peso molecular promedio: 466.35 g·mol<sup>-1</sup> $\lambda_{max} = 608 \text{ nm}$  $\epsilon_{630 \text{ nm}} = 26050 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ **1,10-Fenantrolina, Phe**Tipo: *quelante de iones Fe<sup>2+</sup>*.Peso molecular promedio: 466.35 g·mol<sup>-1</sup> $\lambda_{max} = 512 \text{ nm (unido a Fe}^{2+}\text{)}$  $\epsilon_{630 \text{ nm}} = 16280 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1} \text{ (unido a Fe}^{2+}\text{)}$ **o-Cresolfaleína**Tipo: *quelante de iones Ca<sup>2+</sup>*Peso molecular promedio: 63660 g·mol<sup>-1</sup> $\lambda_{max} = 572 \text{ nm (unido a Ca}^{2+}\text{)}$  $\epsilon_{630 \text{ nm}} = 39250 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1} \text{ (unido a Fe}^{2+}\text{)}$ **Zincon**Tipo: *quelante de iones Ni<sup>2+</sup> y Cu<sup>2+</sup>*Peso molecular promedio: 462.41 g·mol<sup>-1</sup> $\lambda_{max} = 488 \text{ nm pH 9 (libre)}$  $\epsilon_{630 \text{ nm}} = 26900 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1} \text{ (libre)}$ **Proteínas**

La capacidad de las partículas que se obtuvieron de sílice y magnetita recubiertas con distintos polielectrolitos para unir proteínas fue determinada utilizando dos proteínas modelo: la lisozima de clara de huevo de gallina (Lzm o HEWL, por sus siglas en inglés *Hen Egg-White Lysozyme*) para los recubrimientos aniónicos y la  $\beta$ -Lactoglobulina bovina ( $\beta$ -Lg) para los catiónicos a pH 7.0. A continuación, se muestran sus estructuras y algunas propiedades de interés.

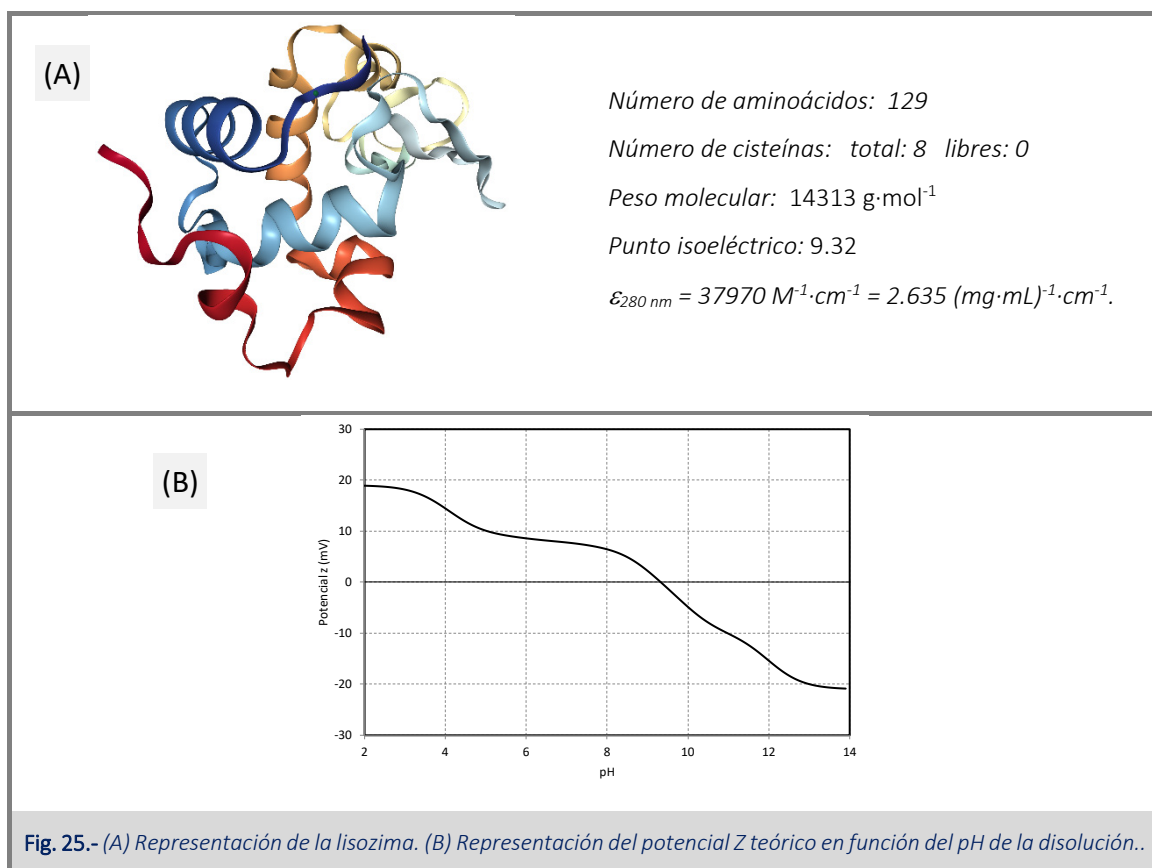
**Lisozima de clara de huevo de gallina**

La lisozima fue descubierta por Fleming en 1922<sup>173</sup> (Fleming, 1922), pero hasta 1965 no se consiguió resolver su estructura mediante difracción de rayos X, con una resolución de 2 Å<sup>174</sup>. Durante muchos años fue el objeto de análisis debido a las propiedades únicas que posee; es muy fácil de purificar a partir de la

clara de huevo, y además es muy fácil de cristalizar. Actualmente la estructura de la Lzm de huevo de gallina ha sido resuelta a una gran resolución,  $0.65 \text{ \AA}^{175}$ .

Es la primera enzima de la que se conoce su estructura tridimensional de forma tan detallada, siendo el conocimiento de su estructura extremadamente útil para la determinación de su mecanismo de acción.

La Lzm se encuentra, entre otros lugares, en el mucus nasal, saliva y lágrimas. Al promover la disolución de las paredes celulares bacterianas, la lisozima protege frente a la infección. Esto lo hace catalizando la hidrólisis del enlace glucosídico  $\beta$ -1-4 entre el ácido N-acetilmurámico y la N-acetilglucosamina del peptidoglicano que compone las paredes bacterianas. Es una proteína globular, constituida por una cadena de 129 aminoácidos (14.3 kD) (Fig. 25-A). Su estructura tridimensional está formada por cinco hélices  $\alpha$ , una lámina  $\beta$  antiparalela formada por tres hebras, y una gran cantidad de "random coil" y giros  $\beta$ . Además, su estructura es estabilizada por cuatro enlaces disulfuro, con la mayoría de cisteínas situadas en las hélices  $\alpha$ . Tiene forma elipsoidal, con una gran hendidura en un lado formando el sitio activo donde puede unir seis anillos de NAcGln para realizar su función catalítica.



Su punto isoeléctrico (pI) es de 9.32 aproximadamente (Fig. 25-B), por lo que a pH fisiológico está cargada positivamente. Contiene múltiples Trp, concretamente seis, situados en los residuos: 28, 62, 63, 108, 111 y 123. En 1972 Imoto et al.<sup>176</sup> demostraron que el 80 % de la fluorescencia es debida al Trp62 y al Trp108, ambos situados alrededor del centro activo y relativamente expuestos al disolvente. Dada su localización,

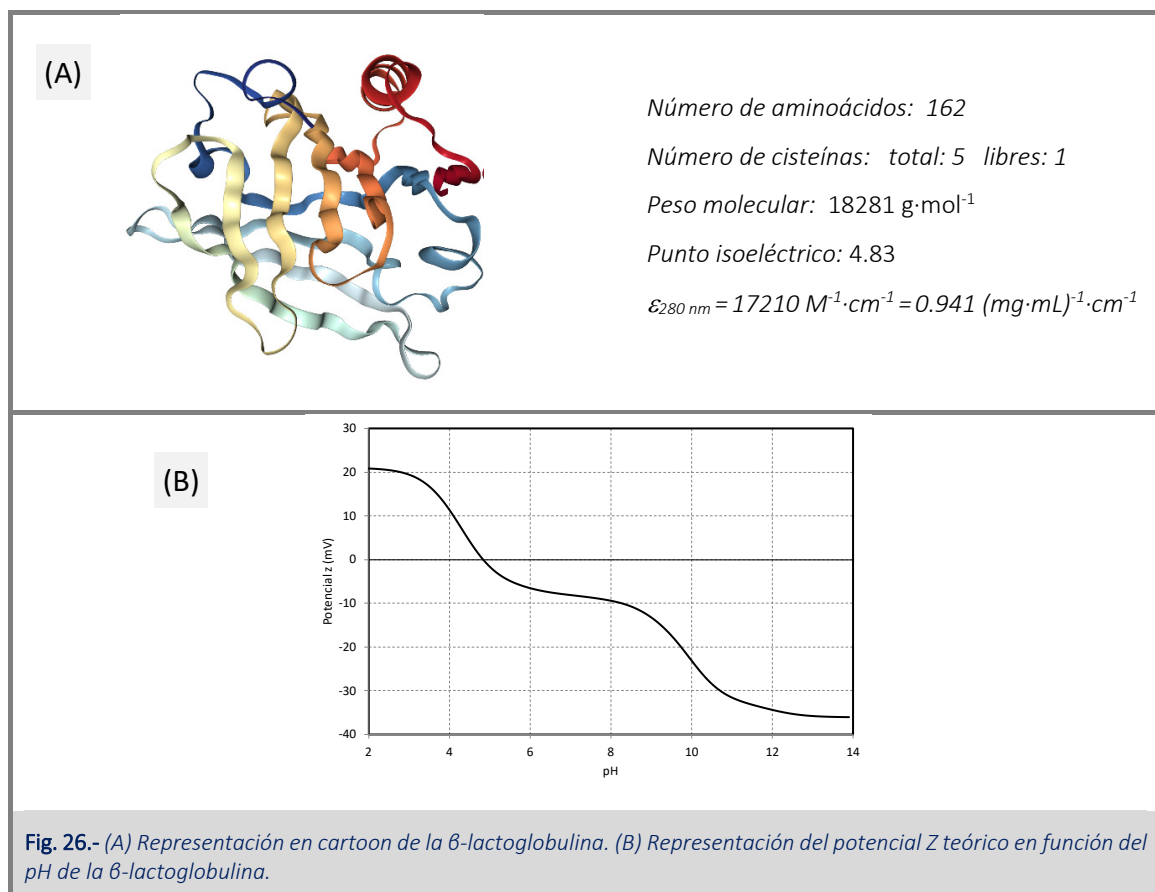
estos residuos presentan un papel importante tanto en la unión a sustratos e inhibidores, como en la estabilización de la biomolécula. Los otros cuatro, Trp28, Trp63, Trp111 y Trp123, poseen una menor contribución a la fluorescencia.<sup>177</sup>

A pH fisiológico y concentraciones por debajo de  $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , se encuentra como monómero y desnaturaliza reversible y cooperativamente de acuerdo con un mecanismo de dos estados<sup>178</sup>. Sin embargo, a igual pH y concentraciones más altas, su desplegamiento térmico se hace irreversible debido a la agregación de la proteína al desplegar<sup>179</sup>.

### *B-Lactoglobulina*

La función de la  $\beta$ -Lg no está del todo clara, aunque parece que participa en el transporte de ácidos grasos y de retinol gracias al barril- $\beta$  presente en su estructura<sup>180</sup>.

Utilizamos concretamente  $\beta$ -lactoglobulina (Fig. 26-A) aislada a partir de leche bovina. Esta proteína tiene un total de 162 aminoácido (18.3 kD). Cuatro de las cinco cisteínas de la  $\beta$ -Lg forman dos puentes disulfuro (Cys66-Cys160, Cys106-Cys119) y la quinta cisteína se localiza en un hueco hidrofóbico entre el barril- $\beta$  y la  $\alpha$ -hélice de la estructura nativa. En cuanto a los residuos de triptófano, son dos y uno de ellos se localiza en el fondo del barril hidrofóbico (Trp19) y el segundo (Trp61) se localiza cerca de la superficie<sup>181</sup>.

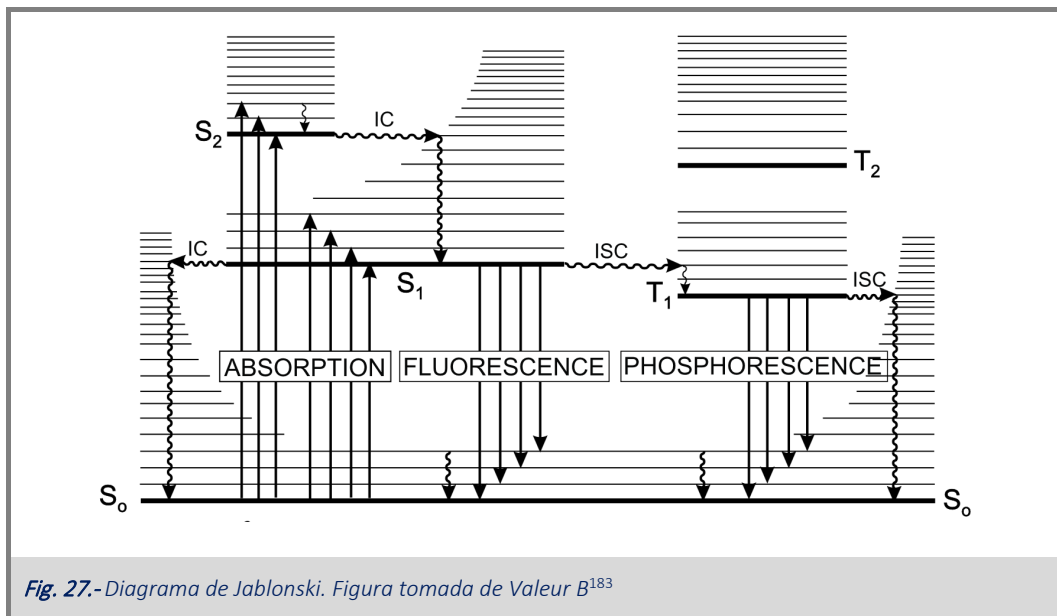


Posee un punto isoeléctrico de 4.83 (Fig. 26-B), por lo que a pH fisiológico presenta carga negativa. Además, entre pH 3 y pH 9 se suele encontrar mayoritariamente en forma dimérica. La estabilidad del dímero viene dada por la interacción de los monómeros mediante 12 enlaces de hidrógeno y 2 puentes salinos<sup>182</sup>.

### 3.2.- Instrumentación

#### *Espectroscopía de absorción ultravioleta-visible*

Cuando a través de una cierta molécula se hace pasar radiación electromagnética, se produce la absorción de los fotones por parte de dicha molécula provocando la excitación de los electrones desde su nivel fundamental a estados electrónicos de energía superiores (estado excitado) (Fig. 27).



La relación de luz incidente sobre la muestra y la transmitida, se conoce como transmitancia, T, que viene dada por:

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (\text{Ec. 7})$$

donde I<sub>0</sub> es la intensidad de la luz incidente e I la de la luz transmitida y que es recogida por el detector (ver Fig. 28). Por su parte, la absorbancia (también denominada como densidad óptica) se define como el logaritmo decimal de la transmitancia:

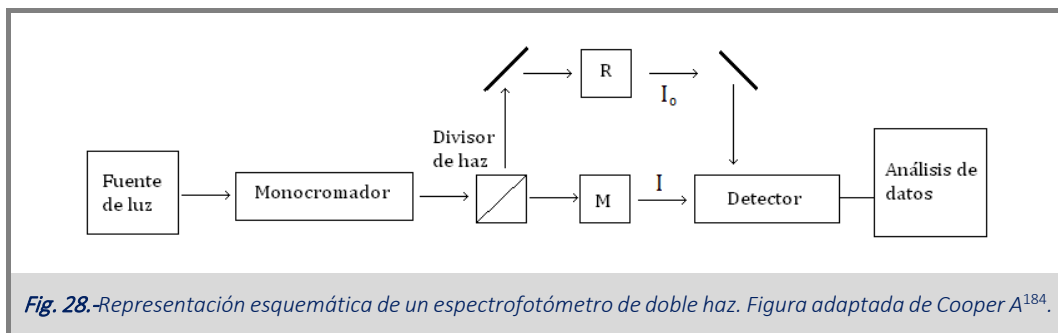
$$A = -\log(T) = -\log\left(\frac{I}{I_0}\right) \quad (\text{Ec. 8})$$



De acuerdo con la ley de Lambert-Beer, la absorbancia de una cierta disolución a la longitud de onda  $\lambda$  es directamente proporcional a la concentración de la especie que absorbe, lo que justifica la importancia de este observable:

$$A_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda} \cdot c \cdot l \quad (\text{Ec. 9})$$

siendo  $\varepsilon_{\lambda}$  el coeficiente de absorptividad molar (o coeficiente de extinción) a la longitud de onda  $\lambda$  que es una propiedad característica de cada sustancia indicativa de su capacidad de absorber radiación electromagnética a esa longitud de onda,  $l$  el paso óptico y  $c$  la concentración. Por tanto, el coeficiente de extinción de una sustancia representa la absorbancia de una disolución de concentración unidad utilizando una cubeta de paso óptico 1 cm. La medida se lleva a cabo en un espectrofotómetro cuyo esquema se presenta en la Fig. 28.



La luz pasa a través de un monocromador, donde se selecciona la longitud de onda a la cual queremos irradiar la muestra. En un espectrofotómetro de doble haz, el haz de luz incidente se divide en dos y cada haz se dirige a una de las cubetas (la de medida, M, y la de referencia, R). El espectrofotómetro mide la diferencia entre la absorbancia de la luz transmitida por la cubeta de medida, M, y la luz transmitida por la cubeta de referencia, R.

En cuanto a proteínas, absorben luz en la región del UV-cercano<sup>184</sup> (sobre 250-300nm) debido a la presencia en su estructura primaria de aminoácidos cuyas cadenas laterales contienen cromóforos capaces de absorber radiación electromagnética en este intervalo del espectro, como es el caso del triptófano, tirosina y fenilalanina y los puentes disulfuro. A 280 nm, la absorptividad molar del triptófano, tirosina y puentes disulfuro alcanza valores promedio de 5500, 1490 y 125  $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ , respectivamente, mientras que la correspondiente a la fenilalanina es casi despreciable a esta longitud de onda. Como se observa la absorptividad de los grupos aromáticos es mayoritaria (especialmente la del triptófano).

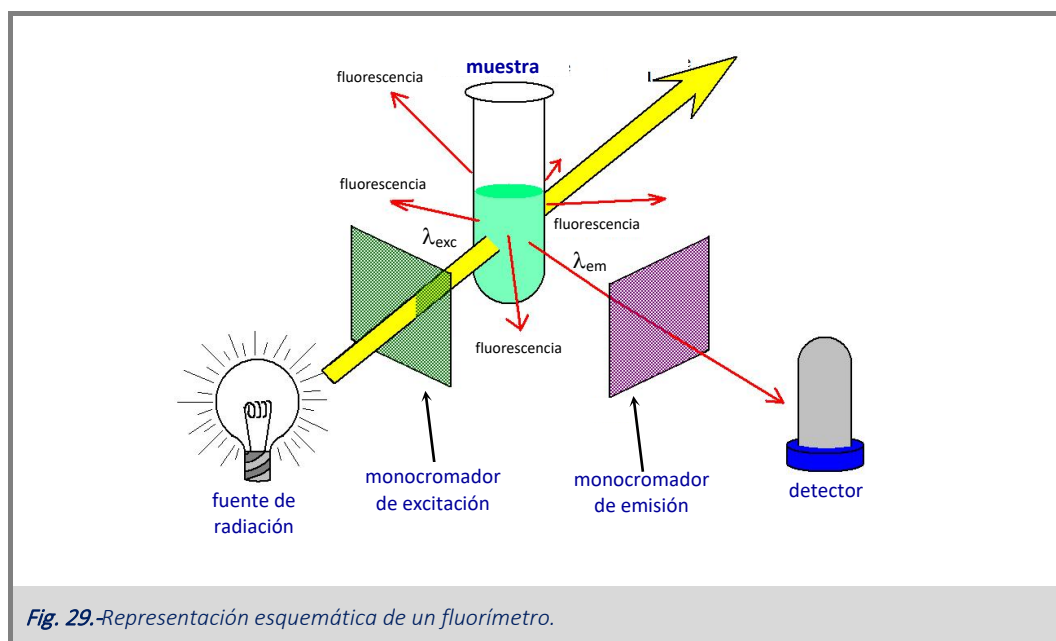
Por lo tanto, la absorptividad molar promedio de una proteína será una combinación lineal de estas tres contribuciones:

$$\varepsilon_{280} = a \cdot \varepsilon_{\text{Trp}, 280} + b \cdot \varepsilon_{\text{Tyr}, 280} + c \cdot \varepsilon_{\text{cys-cys}, 280} \quad (\text{Ec. 10})$$

donde  $a$ ,  $b$  y  $c$  son el número de triptófanos, tirosinas y puentes disulfuros que contiene la proteína y  $\epsilon_{Trp}$ ,  $\epsilon_{Tyr}$  y  $\epsilon_{cys-cys}$  las absorptividades molares de cada uno de ellos.

### *Espectroscopía de fluorescencia*

La luminiscencia es la emisión de radiación electromagnética de una molécula a partir de un estado electrónico excitado como consecuencia de la desexcitación de un electrón. Dependiendo de la naturaleza de ese estado excitado hablamos de fluorescencia (estado excitado singlete) o fosforescencia (estado excitado triplete). Centrándonos en la fluorescencia, el proceso completo comprende excitación del electrón mediante la absorción de la energía de la radiación electromagnética que le permita alcanzar un cierto estado electrónico excitado, la disipación parcial de energía mediante procesos radiativos y no radiativos (entre los que destaca la relajación vibracional) y la emisión de luz al retornar al estado fundamental que será de mayor longitud de onda que la que indujo su excitación. Todo el proceso es extremadamente rápido ocurriendo en la escala de tiempo de nanosegundos<sup>185</sup> (Fig. 27). Dado que el proceso de fluorescencia es extremadamente rápido se requieren equipos muy sofisticados. La medida es realizada en un fluorímetro (Fig. 29) en el que la muestra es excitada por un haz de luz que proviene del monocromador de excitación (que permite la selección de una longitud de onda). Las moléculas excitadas que se encuentran en la cubeta emiten fotones como consecuencia de su desexcitación en forma de fluorescencia en todas direcciones. El monocromador de emisión (que se encuentra a 90° con respecto a la dirección del haz incidente) colima y recoge la radiación electromagnética de emisión y la filtra para detectar una única longitud de onda (o varias longitudes de onda si recogemos el espectro) cuya intensidad es medida por el detector.



La fluorescencia normalmente tiene lugar tras la excitación de electrones en moléculas aromáticas, conocidas como fluoróforos. Ejemplos de fluoróforos pueden ser; la quitina (observada por primera vez por John Frederick William Herschel en 1945), la fluoresceína o los aminoácidos aromáticos como el triptófano, la tirosina o la fenilalanina que pueden presentar las proteínas. El estudio de la fluorescencia intrínseca de la proteína y su variación al cambiar las condiciones del entorno (temperatura, pH, presencia de desnaturizantes, etc.) permite detectar cambios la topografía local alrededor de los residuos aromáticos de la proteína (especialmente de los triptófanos) y correlacionarlos con variaciones en su estructura secundaria y/o terciaria.

En proteínas, el espectro de fluorescencia de emisión obtenido es una suma de las contribuciones de la emisión de cada uno de los residuos aromáticos presentes en su estructura (triptófano, tirosina y fenilalanina, por orden de importancia), cuyas propiedades están recogidas en la Tabla 1.

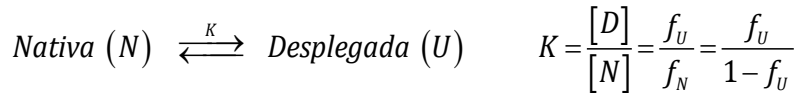
Tabla 1.- *Propiedades de absorción y fluorescencia de los aminoácidos aromáticos*<sup>186</sup>

Aminoácido	Absorbancia		Fluorescencia		Sensibilidad
	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	$\epsilon_{\text{máx}}$ ( $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ )	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	$\phi_{\text{F}}$	$\epsilon_{\text{máx}} \cdot \phi_{\text{F}}$ ( $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ )
<b>Triptófano</b>	280	5600	355	0.13	700
<b>Tirosina</b>	275	1400	304	0.14	200
<b>Fenilalanina</b>	258	200	282	0.02	4

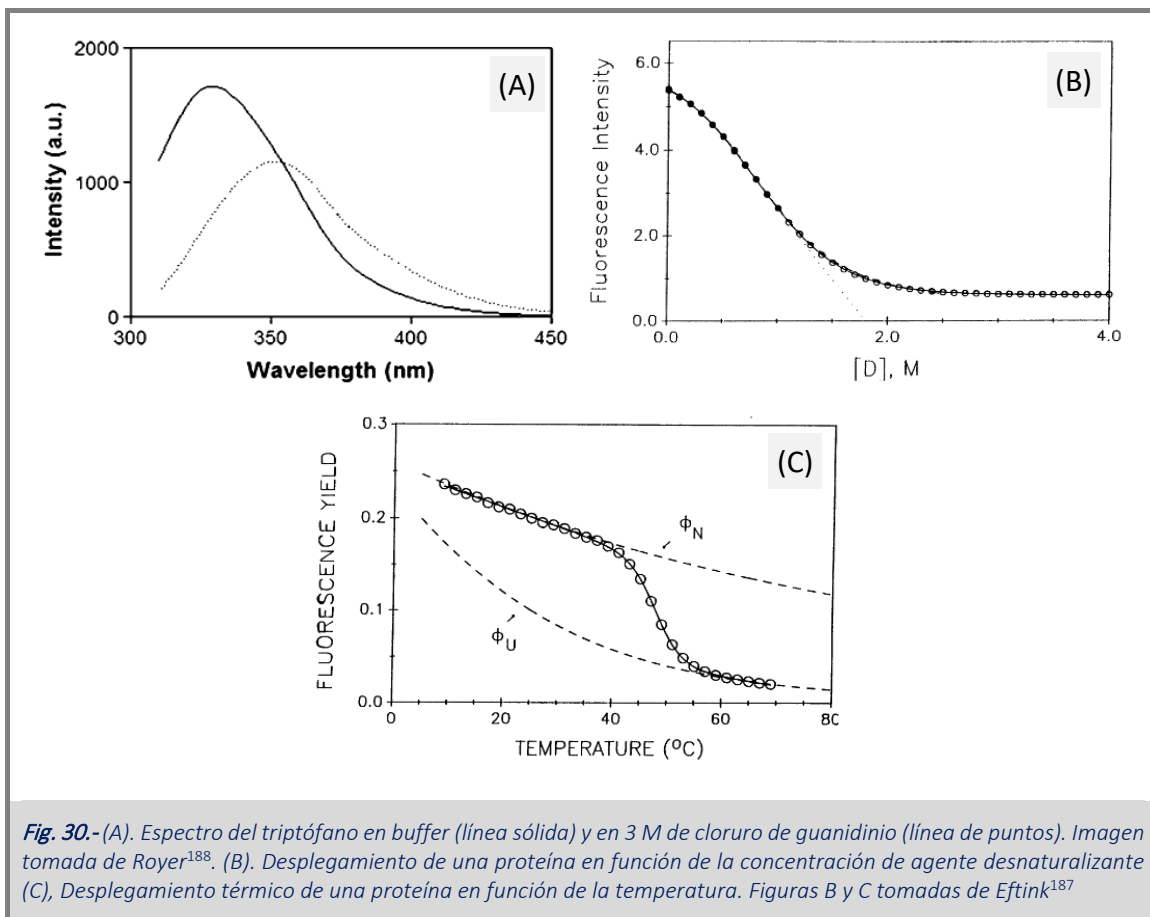
La fluorescencia nos proporciona información acerca de la estructura terciaria de la proteína alrededor de sus residuos aromáticos y permite el estudio de procesos de reconocimiento intramolecular, como en el caso del plegamiento de proteínas, o intermolecular, como es la unión de proteínas a ligandos de muy distinta naturaleza (otras proteínas, péptidos, azúcares, ácidos nucleicos, iones metálicos, etc.).

La emisión de fluorescencia de los distintos fluoróforos de una proteína está fuertemente influenciado por el entorno en el que el fluoróforo se encuentre. Así, variaciones en la hidratación del fluoróforo como consecuencia del proceso de reconocimiento molecular (exposición al disolvente o establecimiento de interacciones hidrofóbicas inducidas por su deshidratación) tienen efectos distintos y muy importantes sobre las características del espectro de emisión correspondiente (variación en su intensidad y posición relativa de la banda de emisión).

Consideremos, como ejemplo, el equilibrio de desplegamiento de una proteína monomérica en cuyo desplegamiento (térmico o químico) únicamente se encuentran significativamente poblados sus estados nativo, N, y desplegado, U (modelo de dos estados)



donde  $f_N$  y  $f_U$  son las fracciones de cada uno de los estados conformacionales. Dado que la fluorescencia del triptófano será mayoritaria (sobre todo si excitamos las muestras a longitudes de onda alejadas del máximo de absorción de la tirosina, como 295 nm), podemos monitorizar la reacción de desplegamiento dado que el observable (intensidad de la emisión de fluorescencia en el rango 300 – 450 nm, es sensiblemente distinto para cada uno de los estados conformacionales (Fig. 30-A). En general, un aumento de la hidratación de la cadena lateral del triptófano (como ocurre al desplegarse la proteína) supone un desplazamiento del máximo de la banda de emisión hacia 355 nm mientras que el máximo de emisión del estado nativo suele aparecer entre 320 y 340 nm, dependiendo del grado de hidratación (exposición al disolvente) de los triptófanos que formen parte de la proteína<sup>187</sup>.



Las diferencias en el espectro de emisión de los distintos estados conformacionales de la proteína son atribuidas a una mayor exposición de residuos, que antes del desplegamiento se encontraban enterrados en su interior, a la disminución de la intensidad de fluorescencia por interacción con otros residuos cercanos (fenómeno que se conoce como apagamiento de fluorescencia o *quenching*) y a las diferencias en cuanto al rendimiento cuántico ( $\phi_F$ ) del triptófano según la polaridad del su entorno

Los paneles (B) y (C) de la Fig. 30 muestran cómo puede ser monitorizada la reacción de desplagamiento de la proteína tanto isotérmicamente al añadir concentraciones crecientes de un desnaturalizante, D, (tal como urea o cloruro de guanidinio) o inducida mediante el calentamiento de la muestra hasta superar la temperatura de desplagamiento de la proteína,  $T_m$ .

### *Espectroscopía de correlación de fotones o dispersión de luz dinámica (DLS)*

Esta técnica no invasiva nos permite determinar el tamaño de partícula en suspensión en la región submicrométrica obteniendo el diámetro hidrodinámico de la partícula, ya que debemos considerar la esfera de hidratación de la partícula.

La técnica de DLS mide la *variación temporal* de la fluctuación de la intensidad de luz dispersada por las partículas (o macromoléculas) que contiene la disolución al difundirse como consecuencia del movimiento Browniano (movimiento aleatorio debido a interacciones con moléculas del disolvente).

La intensidad de la luz dispersada por las nanopartículas es proporcional a la sexta potencia de su radio. Cuando el tamaño de las partículas es menor que la décima parte de la longitud de onda de la luz incidente (tamaño  $< \lambda/10$ ), la luz dispersada tiene la misma energía (dispersión elástica) que la luz incidente y no depende del ángulo (dispersión Rayleigh). Por el contrario, cuando el tamaño de la partícula es superior a  $\lambda/10$ , la luz dispersada no tiene la misma energía (dispersión inelástica) que la incidente y depende del ángulo (dispersión Mie), donde se produce un aumento de la intensidad de luz dispersada en la misma dirección de la luz incidente<sup>189</sup>.

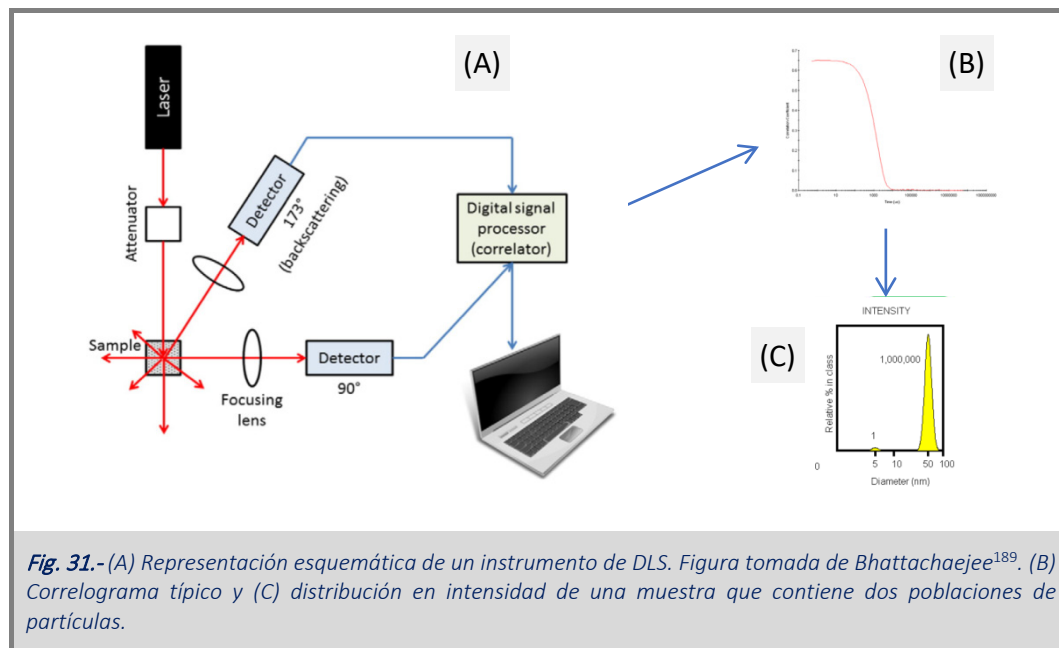
El tamaño de la partícula es calculado a partir del coeficiente de difusión traslacional de la partícula, el cual define la velocidad del movimiento Browniano, mediante el uso de la ecuación de Stokes-Einstein.

$$d(H) = \frac{k \cdot T}{3 \cdot \pi \cdot \eta \cdot D} \quad (\text{Ec. 11})$$

donde  $d$  es el diámetro hidrodinámico,  $k$  es la constante de Boltzman,  $T$  la temperatura,  $\eta$  la viscosidad del disolvente y  $D$  el coeficiente de difusión traslacional de la partícula o macromolécula.

Además de verse afectado el tamaño hidrodinámico por la viscosidad y la temperatura, hay que tener en cuenta otros factores como la fuerza iónica del medio o la superficie de la partícula, ya que afectan a la velocidad de difusión<sup>190</sup>.

Los componentes principales de un instrumento DLS son el láser, el portamuestras y el detector de luz (Fig. 31-A)



**Fig. 31.-** (A) Representación esquemática de un instrumento de DLS. Figura tomada de *Bhattachaejee*<sup>189</sup>. (B) Correlograma típico y (C) distribución en intensidad de una muestra que contiene dos poblaciones de partículas.

Cuando partículas con un movimiento Browniano dado son irradiadas con luz láser, se obtiene un patrón de puntos donde la posición de cada punto evoluciona constantemente formando nuevos patrones debido al propio movimiento. La velocidad a la cual la intensidad fluctúa depende del tamaño de la partícula, fluctuando más rápido para las partículas pequeñas que para las grandes. Para detectar estas fluctuaciones se usa un procesador digital que mide la similitud en intensidad de la misma señal en función del tiempo, viendo cómo la correlación entre la intensidad inicial y subsiguientes va decayendo con el tiempo (correlograma, Fig. 31-B). De aquí se extrae la información de tamaño (mayor tiempo en decaer, mayor tamaño) y cómo de homogénea es la muestra (siendo más monodispersa cuanto mayor es la pendiente del correlograma, o más polidispersa si el decaimiento es menos pronunciado). Tras esto, se obtiene una distribución de tamaños en intensidad a partir de una función de correlación de la intensidad dispersada (Fig. 31-C).

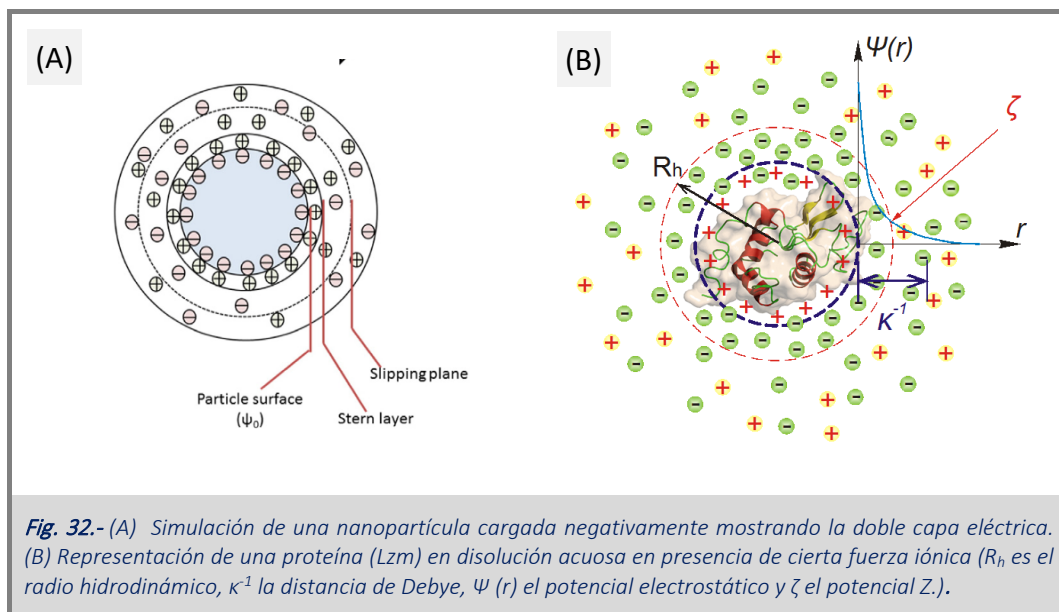
### Potencial Zeta

Mediante la medida del potencial zeta de una partícula en suspensión podemos determinar la carga neta que presenta en las condiciones de medida dadas.

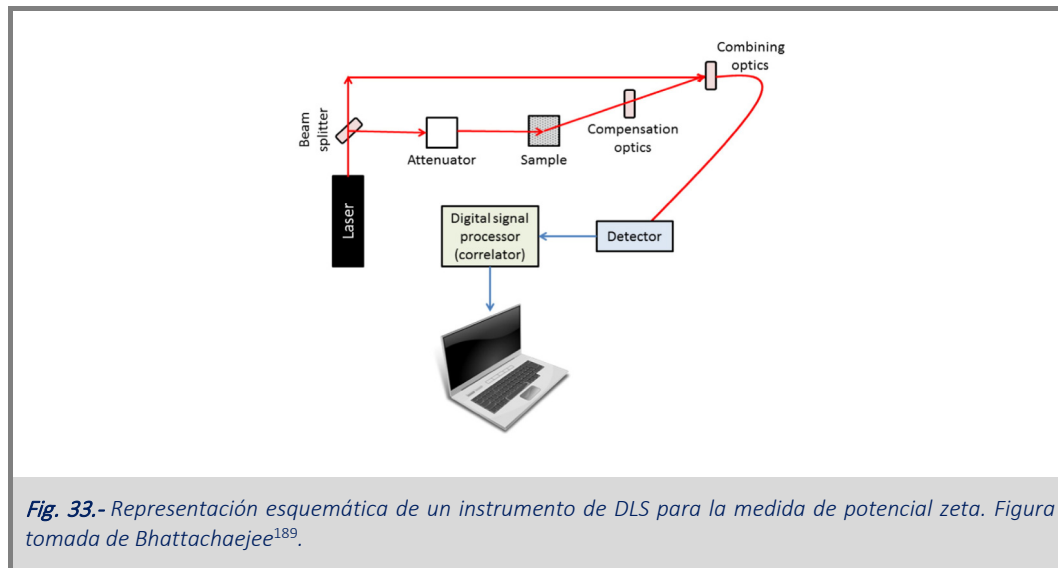
Cuando partículas (o macromoléculas) cargadas son dispersadas, se crea una doble capa eléctrica a su alrededor como consecuencia de la condensación de contraiones presentes en la disolución (Fig. 32). Suponiendo que la partícula presenta carga negativa, se creará una capa de iones positivos unidos fuertemente alrededor de la partícula (capa Stern) y otra capa que aun siendo atraídos por la carga negativa de la partícula son repelidos por los iones que forman la capa Stern, haciendo que esta capa no esté tan

fuertemente unida (capa difusa). Estos contraiones de la capa de Stern y la capa difusa son los que forman la doble capa eléctrica<sup>191</sup>.

La composición de la capa difusa es dinámica y es dependiente de factores como el pH, fuerza iónica, concentración, etc. Dentro de esta capa hay un límite o plano hipotético en el cual las partículas forman una entidad estable, moviéndose en conjunto cuando se aplica un campo eléctrico. Este plano o límite es conocido como plano de deslizamiento (*slipping plane*, ver Fig. 32-A), cuyo potencial es el potencial zeta o potencial electrocinético<sup>189</sup> (potencial  $Z$ ,  $\zeta$ , Fig. 32-B). El potencial sobre la superficie de la partícula no puede ser medido y es conocido como potencial de Nernst.



Esta técnica puede ser combinada con la medida de tamaño en un mismo instrumento de DLS, ya que la base de la medida es la misma. Presenta ligeras diferencias con respecto a la medida de tamaño, y es que el haz láser es dividido para obtener una señal de referencia y otra que atrevese la muestra (Fig. 33), lo que sumado a la aplicación de un campo eléctrico sobre ésta, causará una fluctuación en la intensidad de la luz detectada con respecto a la de referencia, con una frecuencia proporcional a la velocidad de la partícula (efecto Doppler)<sup>189</sup>. Para asegurar que la intensidad de luz dispersada es detectada, se coloca un atenuador antes de la muestra. Al igual que en el tamaño, el procesador recoge la información sobre las fluctuaciones de las partículas, y a través del software se calcula el potencial zeta.



Un dato importante que refleja la medida de potencial zeta sobre las partículas es su estabilidad coloidal. Se considera que partículas con un valor de potencial de  $\pm 30$  mV tienen una gran estabilidad, pero esto no quiere decir que partículas con valores de potencial bajo no puedan presentar suficiente estabilidad coloidal, ya que esta medida solo tiene en cuenta fuerzas repulsivas y no tiene en cuenta las fuerzas atractivas<sup>189</sup>.

### *Espectroscopía de Infrarrojo*

Como consecuencia de la absorción de radiación infrarroja por parte de una molécula podemos inducir excitación en los estados vibrónicos dentro de un mismo estado electrónico, excitando por tanto sus niveles rotacionales y vibracionales. Dichas vibraciones y rotaciones pueden ser medidas directamente como absorción en un espectro infrarrojo pudiendo determinar los distintos grupos funcionales que posee dicha molécula, ya que cada tipo de enlace absorbe radiación infrarroja a una frecuencia distinta.

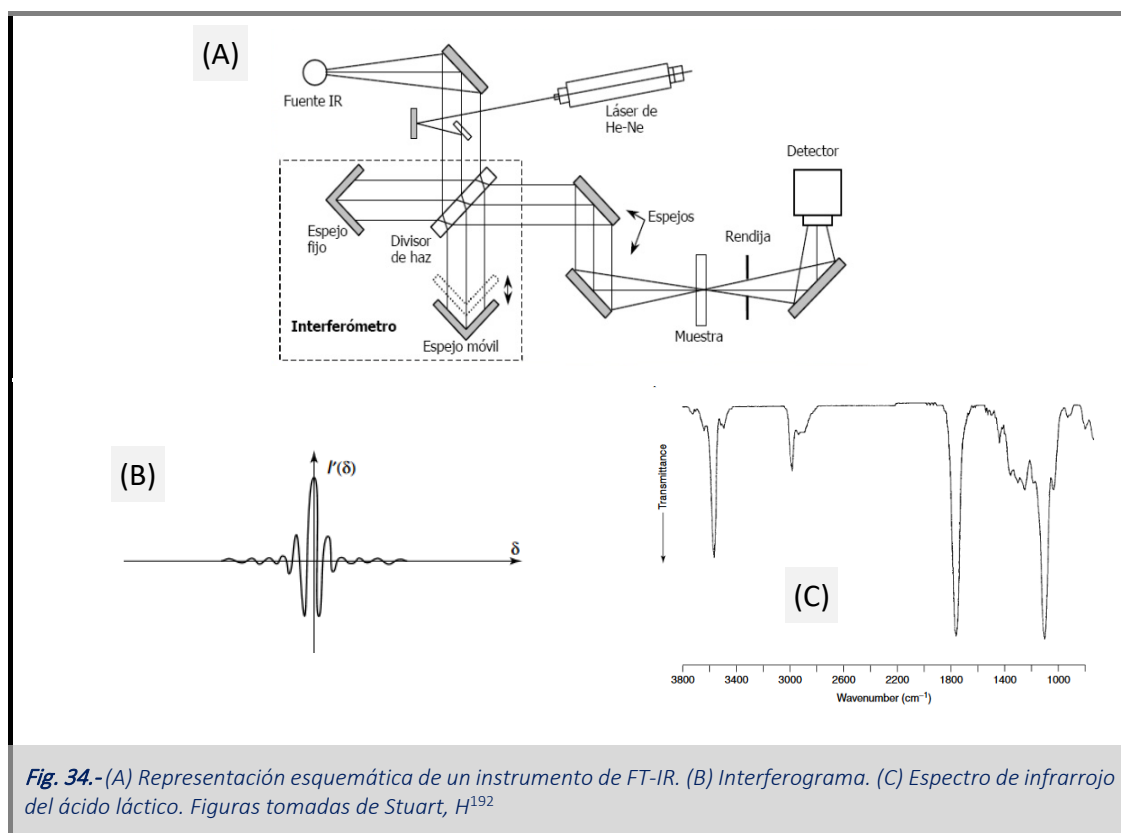
Esta interacción de la radiación infrarroja puede ser entendida como cambios en los dipolos moleculares que están asociados a esas vibraciones o rotaciones. Es por esto que en una molécula que presenta centro de simetría, donde el momento dipolar no varía, las vibraciones que resultan simétricas respecto del centro de simetría son inactivas en el infrarrojo.

Una molécula puede absorber radiación cuando la radiación infrarroja incidente es de la misma frecuencia que uno de los modos normales de vibración de la molécula, es decir el movimiento vibracional de una pequeña parte de la molécula aumenta mientras el resto no se ve afectado<sup>192</sup>.

Las medidas son realizadas en un espectrofotómetro de infrarrojo FT-IR (Fig. 34-A). En este, la radiación IR se dirige hacia un interferómetro a través de una placa semitransparente que funciona como divisor del haz, donde la mitad del haz incide en un espejo fijo y la otra mitad incide sobre un espejo móvil. Ambos



espejos reflejan la radiación hacia la placa, donde se produce la interferencia (constructiva o destructiva según la posición del espejo). Como la radiación es policromática, el interferograma obtenido (Fig. 34-B) (representa la intensidad,  $I$ , frente al desplazamiento del espejo,  $\delta$ ) es una superposición o suma de los interferogramas correspondientes a todas las frecuencias individuales. A continuación, la radiación modulada atraviesa la muestra, donde ésta absorbe selectivamente, dependiendo de las vibraciones de excitación de la muestra. El detector registra la luz IR que sale como interferograma, transformando las señales ópticas en eléctricas. A partir del software correspondiente, mediante la transformada de Fourier (FT por sus siglas en inglés), se convierten las frecuencias en el espectro característico de bandas (Fig. 34-C).

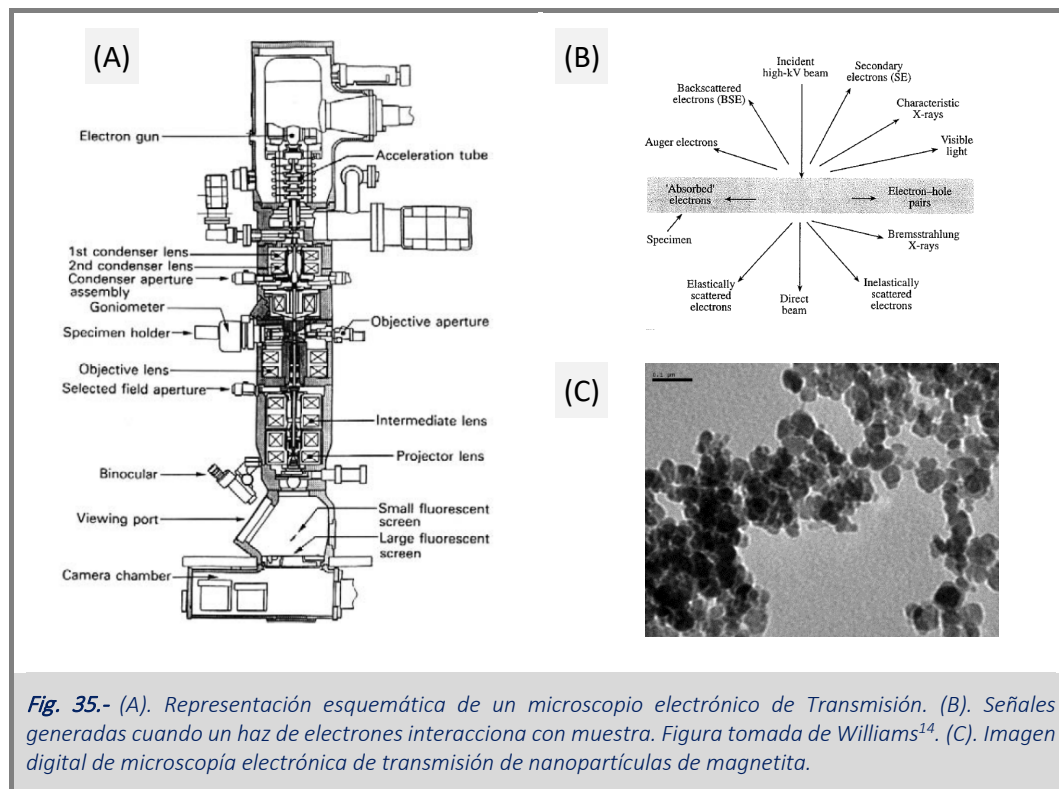


### Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

En microscopía electrónica un haz de electrones de alta energía interacciona con la materia para proporcionar información de ésta a nivel atómico. En concreto la microscopía electrónica de transmisión (TEM por sus siglas en inglés, *Transmission Electron Microscopy*) se basa en la detección de aquellos electrones que han atravesado la muestra.

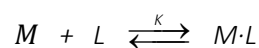
Además de proporcionar información a nivel subatómico, también nos proporciona información química con una resolución espacial de 1 nm o mejor, haciendo de esta técnica una poderosa herramienta para la caracterización del tamaño de las nanopartículas, incluso cuando éstas están recubiertas por polímeros<sup>193</sup>.

La medida se hace en un microscopio electrónico de transmisión (Fig. 35-A), donde se emite un haz de electrones que viaja en condiciones de vacío a través de la columna del microscopio. Para generar un haz muy delgado de electrones (<10 nm en diámetro) y enfocarlos sobre la muestra se colocan lentes electromagnéticas (lentes condensadoras). Una vez que pasa por la muestra los electrones colisionan con ésta, y en función de su grosor y el tipo de átomos que la componen, parte de ellos serán dispersados de forma selectiva pudiendo incluso no llegar a ser detectados (Fig. 35-B). Tanto los electrones que han atravesado la muestra como los dispersados, son proyectados sobre lentes objetivo, las cuales pueden proporcionar una magnificación de hasta 1.5 millones de veces (determinan por tanto el límite de resolución de la imagen obtenida). Estos electrones son proyectados sobre una pantalla fluorescente, cuya imagen (Fig. 35-C) es posteriormente digitalizada mediante un dispositivo de carga acoplado (CCD, por sus siglas en inglés, *Charge Coupled Device*).



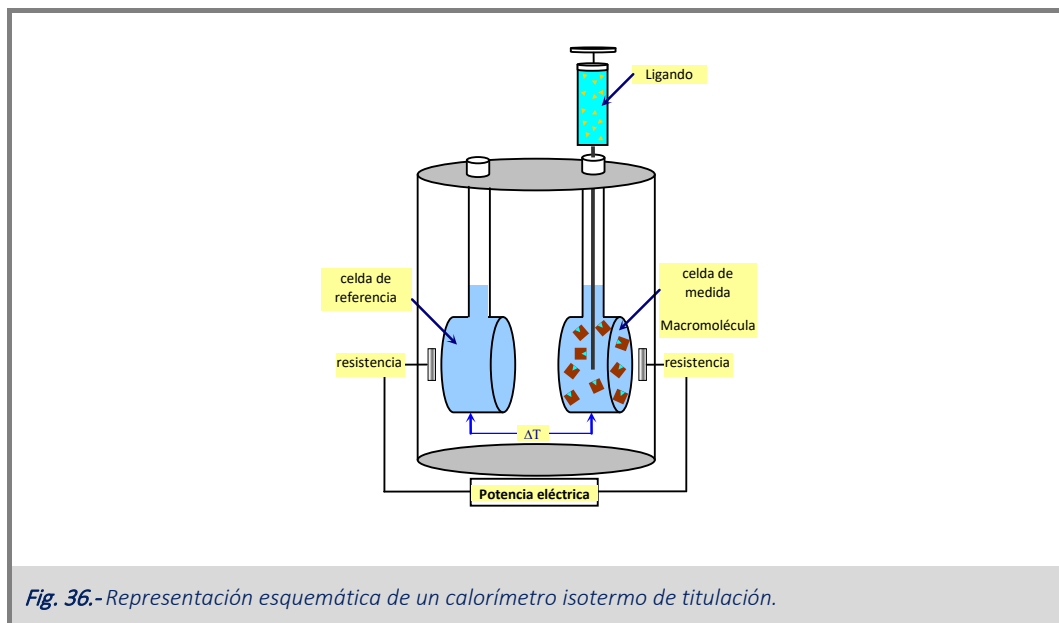
### Calorimetría Isotherma de Titulación (ITC)

La calorimetría isoterma de titulación (ITC por sus siglas en inglés, *Isothermal Titration Calorimetry*) es la única técnica instrumental capaz de medir directamente la energética de un proceso de reconocimiento molecular entre una cierta macromolécula, M, y un ligando, L:



donde M representa a la macromolécula (proteína, nanopartícula, polielectrolito, etc.) y L al ligando. Mediante un experimento de ITC es posible determinar tanto el cambio de energía libre de Gibbs asociada al proceso de reconocimiento molecular,  $\Delta G$ , como sus componentes entálpica,  $\Delta H$ , y entrópica,  $-T \cdot \Delta S$ .

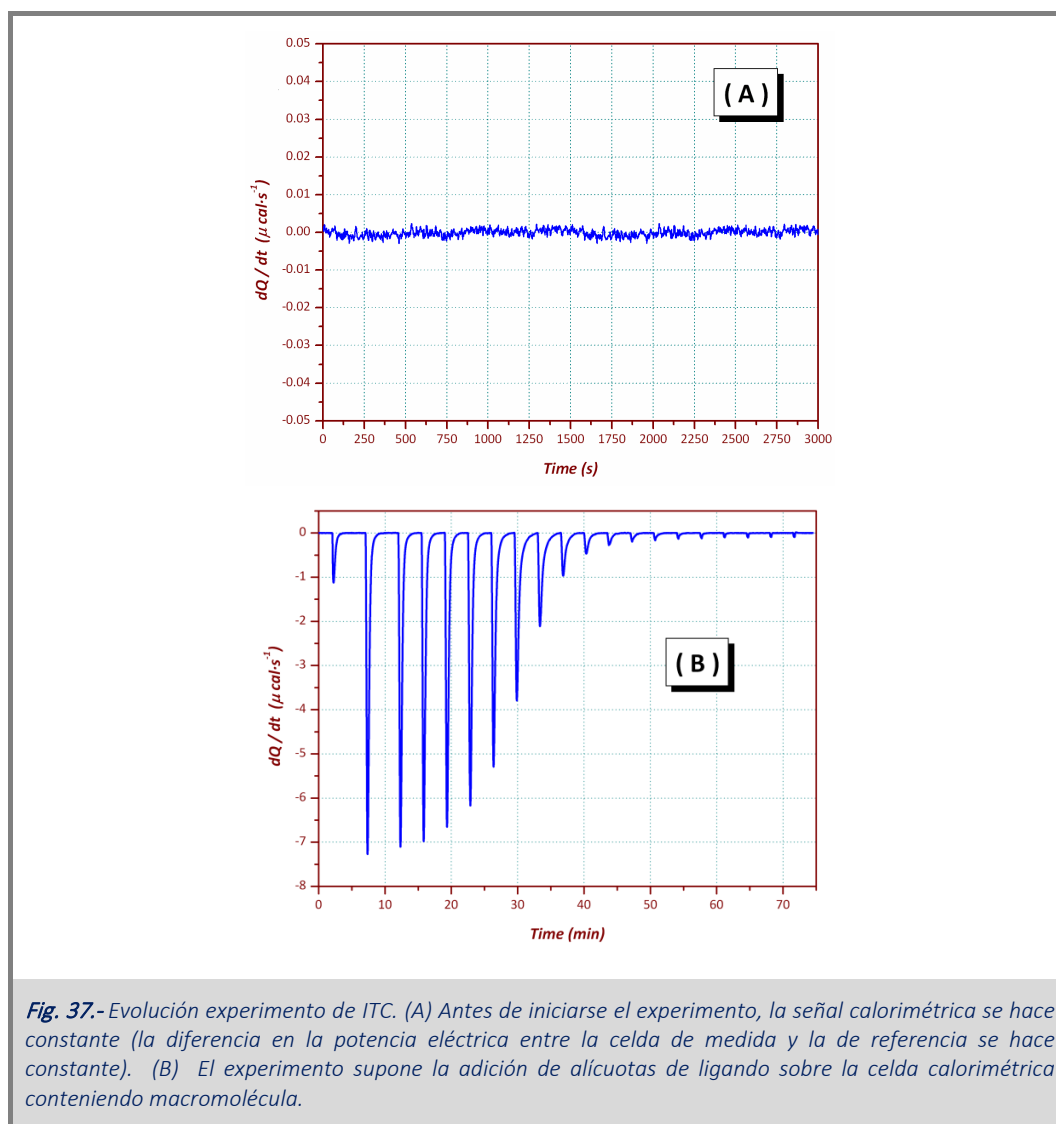
Un calorímetro isoterma de titulación está construido situando dos celdas calorimétricas (una de referencia y otra de medida) dentro de un bloque termostatzado a una cierta temperatura que se mantiene constante (Fig. 36). La celda de referencia está llena de agua (o de la disolución tampón correspondiente) mientras que la disolución de macromolécula se aloja en la celda de medida de volumen  $V_{cel}$ . Por su parte, la disolución de ligando, L, se coloca en una jeringa externa cuya parte final de la cánula de inyección tiene forma de agitador. La jeringa de inyección está sometida a un movimiento de rotación de velocidad constante por lo que, además de servir para añadir secuencialmente volúmenes conocidos de la disolución de ligando,  $V_{iny}$ , a la celda calorimétrica, la agitación permite homogeneizar la disolución resultante (conteniendo M, L y M·L).



El instrumento mantiene el bloque termostático en el que se encuentran ambas celdas a una temperatura constante de forma rigurosa (éste es un requerimiento esencial de la técnica y la menor variabilidad de la temperatura a la cual se mantiene el bloque termostático está en relación directa con la sensibilidad del instrumento). La temperatura a la que se mantiene las celdas calorimétricas es ligeramente inferior a la cual se va a llevar a cabo el experimento. El calorímetro dispone de sendas resistencias adosadas a cada una de las celdas calorimétricas (referencia y medida) que le permiten enviar una determinada cantidad de potencia eléctrica a cada una de ellas y mantener a ambas celdas a una misma temperatura.

Los calorímetros actuales más sensibles funcionan mediante el denominado sistema de compensación de potencia. El instrumento monitoriza constantemente la temperatura de cada una de las celdas y envía más

o menos potencia eléctrica a la resistencia adosada a cada celda calorimétrica hasta que la diferencia de temperatura entre ellas es nula (están exactamente a la misma temperatura). En este momento, la potencia eléctrica enviada a cada celda es idéntica y, por tanto, su diferencia es nula,  $dP = dQ/dt = 0$  (Fig. 37-A). Como en cualquier técnica calorimétrica, el observable monitorizado es potencia térmica,  $dP$ , definida como la cantidad de energía en forma de calor,  $Q_i$ , que se absorbe o se libera por unidad de tiempo tras la adición de cada volumen de ligando.



Una vez que el instrumento se ha equilibrado y la señal (diferencia de potencia eléctrica enviada a cada celda) es nula, comienza el experimento. Tras la adición de un determinado volumen de ligando se inicia la reacción (primer pico de Fig. 37-B) cuya señal calorimétrica corresponde con una reacción exotérmica ( $\Delta H < 0$ ). Al formarse una cierta cantidad del complejo  $M:L$  la celda se calentará ligeramente y el sistema de compensación de potencia dejará de enviar potencia eléctrica a la celda de medida y envía potencia eléctrica a la celda de referencia para intentar igualar ambas temperaturas. A medida que la diferencia de temperatura entre las celdas disminuye también lo hace la potencia eléctrica enviada a la celda de

referencia hasta hacerse nula cuando ambas celdas vuelven a estar a la misma temperatura. El observable que se recoge es la potencia eléctrica (calor por unidad de tiempo) que el sistema de compensación envía a la celda de referencia.

Alternativamente, cuando la reacción es endotérmica, la formación del complejo M·L implicaría la absorción de una cierta cantidad de energía en forma de calor en la celda calorimétrica que se enfriaría ligeramente respecto de la celda de referencia. En este caso, el sistema de compensación de potencia detectaría esa diferencia de temperaturas y enviaría a la celda de medida una potencia térmica (pulso eléctrico) que iría disminuyendo hasta igualar la temperatura de ambas celdas.

Una de las ventajas fundamentales del sistema de compensación de potencia es que se obtiene un aumento considerable de la relación señal a ruido respecto de un sistema estático que registre la libre difusión del calor desde la celda de medida al entorno. Para una cantidad fija de energía en forma de calor intercambiada debida a la reacción, la señal detectada por un calorímetro que utilice un sistema de compensación de potencia cada pico será más estrecho y más alto que el detectado para un sistema estático. Esto se debe a que, aunque en ambos casos el área del pico es la misma, debido a la lenta cinética de difusión del calor entre la celda en el entorno, el pico de un calorímetro estático será mucho más ancho y, por consiguiente, su máximo (o mínimo) mucho menos pronunciado.

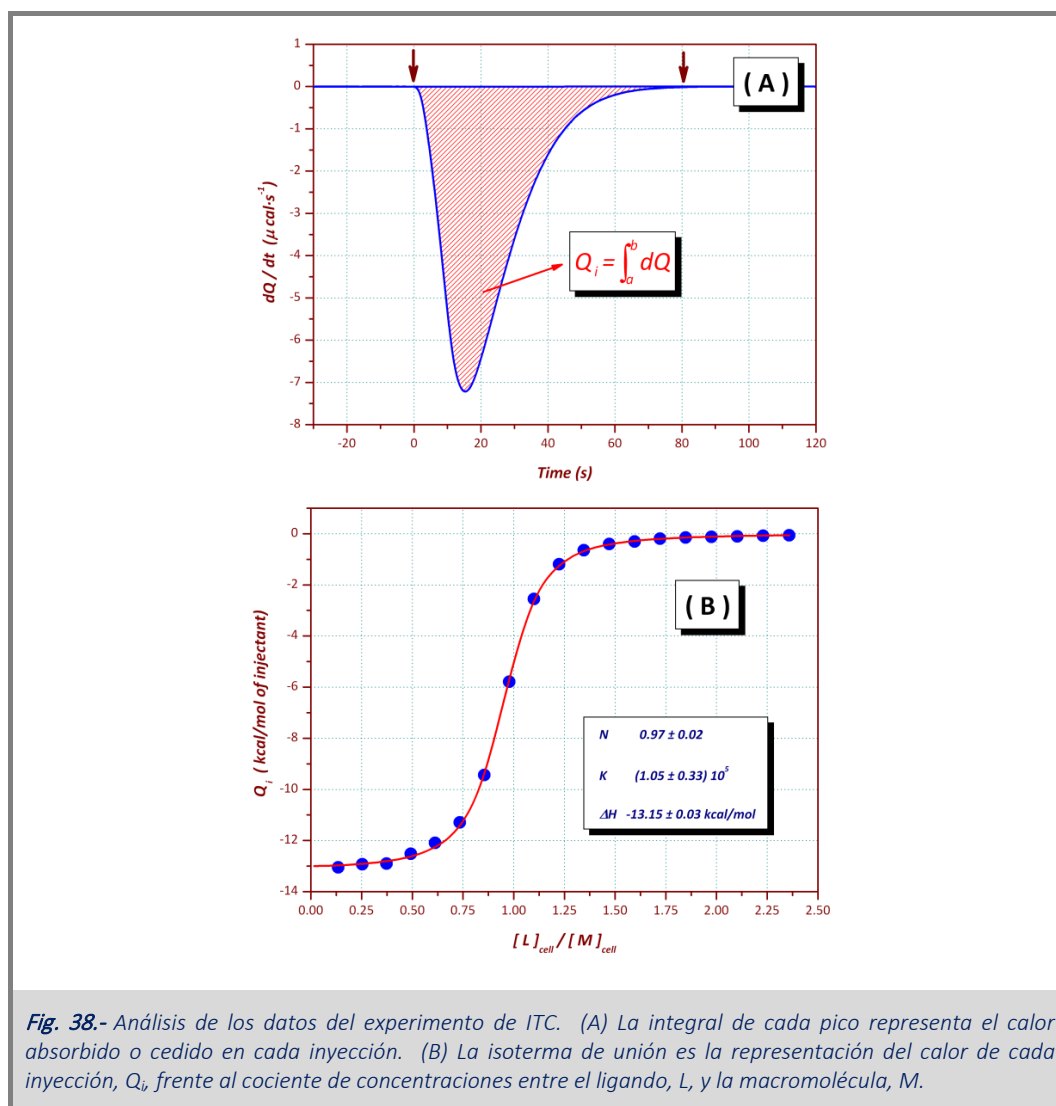
La Fig. 37-B muestra cómo varía la señal calorimétrica como consecuencia de la adición secuencial de L. Al comienzo de la titulación, cuando todos los centros de unión de M están libres, la fracción de ligando que se une a la macromolécula es máxima. A medida que aumenta la concentración total de L en la celda calorimétrica, el equilibrio se desplaza hacia la derecha formándose más y más complejo M·L y quedando una menor cantidad de macromolécula, M, libre. Como consecuencia, a medida que avanza la titulación la fracción de ligando, L, que se une a la macromolécula en cada inyección es menor hasta que todos los centros de unión de M han sido saturados.

La preparación del experimento y el tiempo que transcurre desde que la jeringa (conteniendo el ligando) se pone en contacto con la disolución de la celda calorimétrica (conteniendo la macromolécula) hasta que comienza efectivamente el experimento (transcurrido el tiempo necesario para la estabilización del experimento) facilita que una pequeña cantidad de ligando se difunda a la disolución de la celda antes incluso que el experimento comience. Para evitar que este hecho influya sobre los parámetros termodinámicos extraídos del experimento mediante el tratamiento de los datos (Fig. 38-B), es habitual que la matriz de inyección (indicando el número de inyecciones, el volumen de cada una de ellas y el intervalo de tiempo que las separa) contenga una primera inyección de pequeño volumen, que dependerá del modelo de ITC utilizado, la cual será la única que se verá afectada por este pequeño error. Generalmente, esta primera inyección no es utilizada en el ajuste de los datos experimentales.

Dado que la señal monitorizada en el experimento de ITC es la potencia térmica ( $dQ/dt$ ) en función del tiempo, la cantidad de energía en forma de calor absorbida o cedida tras la adición de cada alícuota de ligando,  $Q_i$ , (tras cada inyección) es simplemente el área de cada pico (la integral de la potencia térmica desde el momento en que se realiza la inyección hasta que la señal retorna a la línea de base) (Fig. 38.- A).

$$Q_i = \int_{t_1}^{t_2} dQ \quad (\text{Ec. 12})$$

Para extraer los parámetros termodinámicos característicos del proceso de reconocimiento molecular estudiado, se somete la isoterma (Fig. 38.- B) a un proceso de ajuste no lineal de mínimos cuadrados. Por las razones indicadas anteriormente, el primer punto de la isoterma no se toma en consideración para el ajuste.



El análisis de los datos experimentales derivados de un único experimento de ITC (Fig. 38.- B), permite determinar, de forma directa, tres parámetros:

- a) La estequiometría del complejo formado,  $M \cdot L_n$ ,  $n$ .
- b) La constante de unión,  $K_b$ .
- c) La entalpía molar de la reacción de unión (por mol de ligando),  $\Delta H$ .

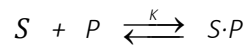
### 3.3.- Metodología

#### *Determinación de la capacidad de adsorción de una partícula (NP) respecto de una proteína, P (o un ligando)*

Asumiendo, en primera aproximación, que la adsorción de una proteína, P, a la superficie de una partícula (sólida o recubierta por polímeros, sílice, etc.) viene adecuadamente representada por la isoterma de Langmuir:

$$q = \frac{m_{prot}}{m_{NP}} = \frac{K \cdot [P]}{1 + K \cdot [P]} \cdot q_{máx} = \frac{[P]}{K_D + [P]} \cdot q_{máx} \quad (\text{Ec. 13})$$

que describe la situación en la que la proteína P se encuentra en disolución en equilibrio con la que se encuentra adsorbida sobre la superficie S:



Existen muchas situaciones en las que el parámetro que se requiere obtener es la capacidad máxima de adsorción de la partícula por la proteína P (o cualquier otro ligando),  $q_{máx}$ . Una alternativa a la determinación de la isoterma es la de trabajar en condiciones saturantes de adsorbato ( $[P] \gg K_D$ ), de forma que el equilibrio se encuentre totalmente desplazado hacia la derecha y podamos considerar estequiométrica la cantidad de proteína total y adsorbida.

En estas condiciones: Además, si  $P \gg K_D$

$$q = \frac{m_{prot}}{m_{NP}} = \frac{[P]}{K_D + [P]} \cdot q_{máx} \approx \frac{[P]}{[P]} \cdot q_{máx} = q_{máx} \quad (\text{Ec. 14})$$

Despejando,

$$(m_{prot})_{adsorbida} = q_{máx} \cdot m_{NP} \quad (\text{Ec. 15})$$

donde  $m_{NP}$  es la masa de (nano)partícula presente en la dispersión. Teniendo en cuenta que conocemos la cantidad total de proteína que contiene la muestra,

$$(m_{prot})_{total} = (m_{prot})_{adsorbida} + (m_{prot})_{disolución} \quad (\text{Ec. 16})$$

Operando y sustituyendo en la ec. 15,

$$(m_{prot})_{disolución} = (m_{prot})_{total} - q_{máx} \cdot m_{NP} \quad (\text{Ec. 17})$$

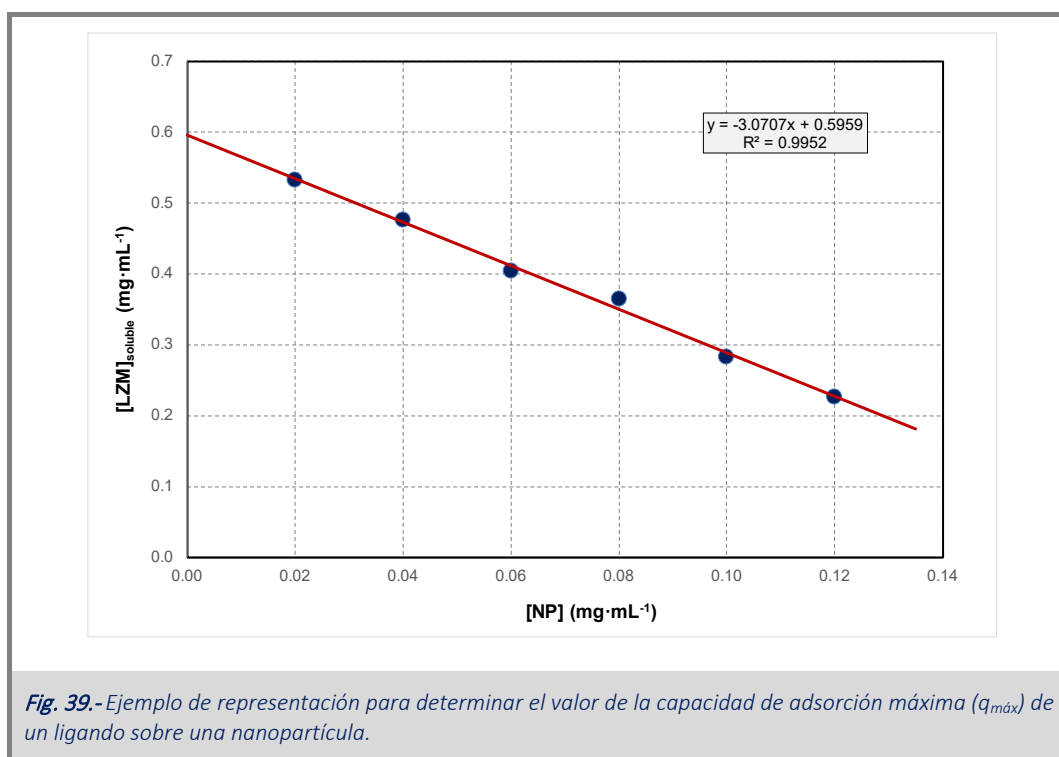
Dividiendo por el volumen de la muestra,

$$[P]_{disolución} = [P]_{total} - q_{máx} \cdot [NP] \quad (\text{Ec. 18})$$



Por tanto, si preparamos una serie de muestras en las que se mantiene constante la concentración de proteína total,  $[P]_{\text{total}}$ , y añadimos concentraciones crecientes de (nano)partícula, la concentración de proteína en la disolución (sobrenadante) disminuirá linealmente con la cantidad de partícula añadida. La pendiente de la correlación será igual a  $-q_{\text{máx}}$ .

La Fig. 39 muestra la variación de la concentración de lisozima (Lzm) en disolución en función de la concentración de nanopartícula de magnetita recubierta con un polielectrolito aniónico. La concentración inicial de proteína en disolución (ordenada en el origen,  $0.596 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) disminuye linealmente con la concentración de nanopartícula añadida (adsorbiendo una mayor cantidad de proteína). La pendiente de la correlación lineal permite determinar la máxima capacidad de adsorción de la nanopartícula por la proteína,  $q_{\text{máx}}$ , que en este caso equivale a  $3.1 \text{ mg}$  de proteína por  $\text{mg}$  de nanopartícula).



Para hallar este parámetro de forma experimental, lo que hacemos es incubar, hasta que se alcanza el equilibrio (generalmente, más de 12 h), una serie de tubos de 2 mL en los que ponemos una cantidad creciente de NP y una cantidad constante y en exceso de ligando a unas condiciones de pH y fuerza iónica dadas en función de lo que se pretenda estudiar (volumen final de 1 mL). Tras dejar incubar en continua agitación, las nanopartículas de magnetita son decantadas con ayuda de un campo magnético externo (las de sílice se someten a centrifugación). Una vez separadas de la disolución el sobrenadante es cuantificado (ver más adelante). Con estos datos obtendremos la representación anteriormente mostrada (Fig. 39).

Para la determinación con otro ligando que no sea una proteína se sigue la misma aproximación.

### *Desorción de Lzm, previamente adsorbida sobre partículas de sílice, inducida por polielectrolitos*

Se prepara una dispersión de sílice en agua, a partir de la cual determinamos su concentración mediante residuo seco (calentando a 120 °C hasta obtener una masa de sílice constante). Antes de preparar las muestras, las partículas son sonicadas usando un sonicador Branson 450. La disolución de Lzm es preparada en agua, y su concentración es cuantificada espectrofotométricamente mediante medida de su absorbancia a 280 nm (ver más adelante). Preparamos distintos tubos de 2 mL que contienen una concentración constante de Lzm y una concentración constante de sílice (ambas concentraciones variarán según el estudio realizado) en HEPES 20 mM a pH 7. Dejamos en agitación constante durante 12 h para que se produzca la adsorción de la proteína a la sílice. Pasado ese tiempo añadimos cantidades crecientes de PE (variará, según estudio) y dejamos incubar 16 h en agitación hasta alcanzar el equilibrio. Tras la incubación, los tubos son centrifugados a 13400 rpm (12100 g) durante 30 min usando una centrífuga *Eppendorf Minispin*. Recogemos sobrenadante y medimos por absorción la concentración de proteína en disolución.

Este experimento va a ser realizado con distintos polielectrolitos (PDADMACI <100 kD, de 150 kD, de 275 kD y 450 kD, PAAH 56 kD, PEI 60 kD y quitosano) y para el polielectrolito de PDADMACI 450 kD, con diferentes fuerzas iónicas ([NaCl]: 0, 10, 25, 50, 100, 150, 250 mM).

### Cuantificación de la concentración de proteína

En ocasiones, tras someter a las muestras de sílice al proceso de centrifugación, se observó que pequeñas cantidades de partículas estaban aún presentes en el sobrenadante. Con objeto de corregir el espectro de absorción de la proteína de la dispersión del material sólido no eliminado, éste se recogió entre 240 y 400 nm. Dado que la absorptividad de la proteína es prácticamente despreciable por encima de 340 nm, el espectro se corrigió de acuerdo al método de *Leach y Sheraga*<sup>194</sup> (Fig. 40). Asumiendo que en el rango 340 – 400 nm la densidad óptica detectada es exclusivamente debida a la dispersión del material sólido, y teniendo en cuenta que la intensidad de la dispersión aumenta a medida que disminuye la longitud de onda (teóricamente con la sexta potencia):

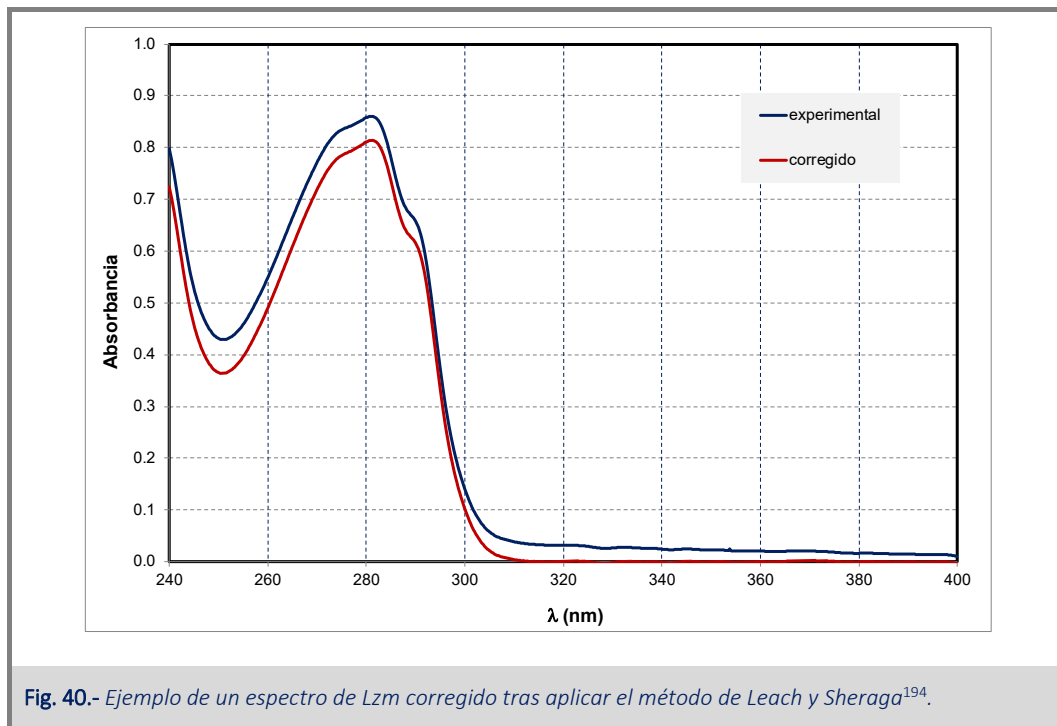
$$(Abs)_{dispersión} = a \cdot \lambda^{\alpha} \quad (\text{Ec. 19})$$

donde  $a$  es una constante de proporcionalidad y  $\alpha$  la potencia efectiva a la que está elevada la longitud de onda,  $\lambda$ . Tomando logaritmos decimales:

$$\log(Abs)_{dispersión} = \log(a) + \alpha \cdot \log(\lambda) \quad (\text{Ec. 20})$$

El ajuste del log de la absorbancia (en el rango 340 – 400 nm) con el log ( $\lambda$ ) permite determinar los parámetros  $a$  y  $\alpha$ . Una vez determinados estos parámetros, es posible calcular la contribución de la

dispersión a la absorbancia determinada en todo el rango de longitudes de onda del espectro (240 – 400 nm) y corregir el espectro experimental con esta contribución calculada. Los espectros fueron adquiridos con una velocidad de barrido media y un intervalo de muestreo de 0.2 nm. La línea base se hizo con el correspondiente tampón.



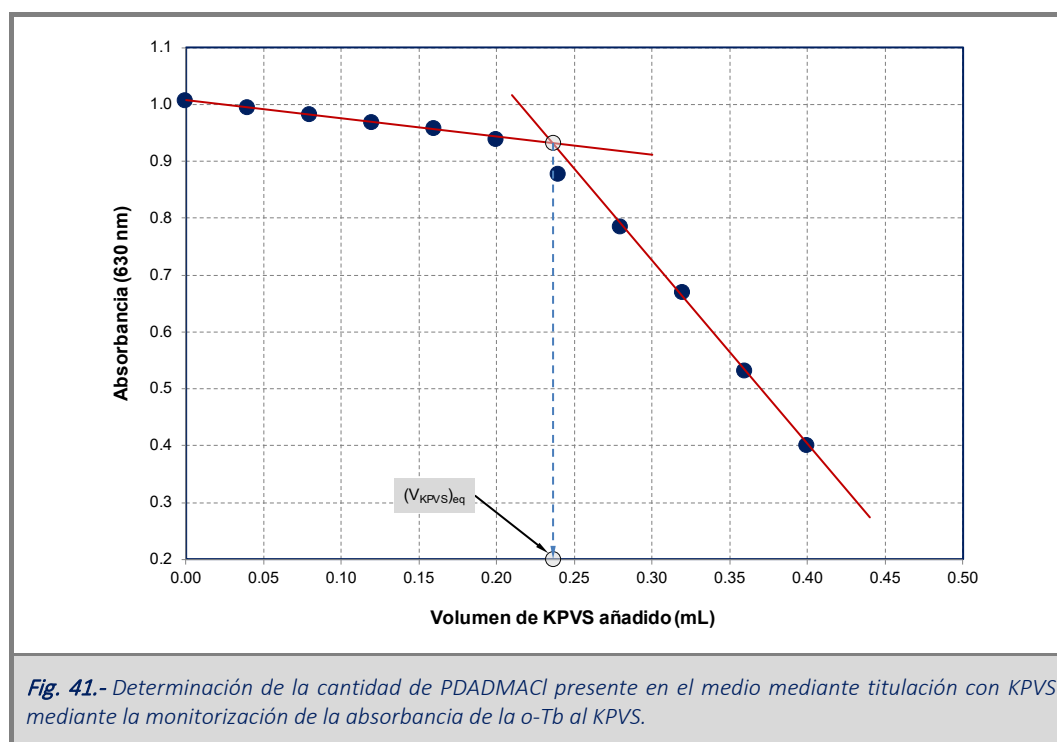
#### *Tratamiento de nanopartículas de sílice con polielectrolitos. Eficacia del recubrimiento usando Lzm como sonda.*

Para comprobar la reversibilidad de la adsorción del PDADMACI sobre las partículas de sílice, 0.5 g de partículas de sílice tratado con PDADMACI fueron resuspendidas en 50 mL de una disolución que contiene buffer con distintas cantidades de NaCl (0, 150 y 250 mM). La dispersión fue incubada durante 16 h, centrifugada, y el pellet resultante resuspendido en 50 mL de disolución en idénticas condiciones a las iniciales. Para comprobar la estabilidad del recubrimiento, una alícuota es incubada con Lzm, utilizando ésta como sonda para determinar si se produce la adsorción (en cada experimento la cantidad de sílice ha sido previamente cuantificada). Estas preparaciones fueron incubadas durante 16 h, y la cantidad de Lzm en el sobrenadante fue determinada espectrofotométricamente. El proceso fue repetido 10 veces. De forma paralela se hizo lo mismo con partículas de sílice que no habían sido tratadas con PDADMACI, sometidas a los mismos lavados (10 ciclos), no recuperando Lzm en el sobrenadante.

*Determinación de la cantidad máxima de PDADMACI adsorbido sobre la superficie de la partícula de sílice,* *$Q_{m\acute{a}x}$ .*

Diferentes cantidades de sílice y PDADMACI fueron incubados a pH 7.0 y temperatura ambiente durante 16 h para que se alcanzase el equilibrio de adsorción del polielectrolito sobre la superficie. Tras centrifugar y eliminar las partículas, el polielectrolito que permanece en el sobrenadante fue cuantificado siguiendo el método descrito por Mocchiutti et al. (2007)<sup>195</sup> mediante titulación con KPVS (polivinilsulfato potásico) usando azul de o-toluidina como indicador.

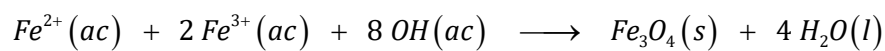
Una alícuota que contiene PDADMACI se diluyó en una disolución reguladora de pH 7.0 conteniendo o-Tb en concentración aproximada de 20  $\mu\text{M}$ . La absorbancia del colorante fue monitorizada a 630 nm tras la adición de volúmenes conocidos de una disolución, previamente estandarizada de KPVS<sup>196</sup> (Fig. 41). Dado que el KPVS tiene mayor afinidad por el PDADMACI que por el colorante, las adiciones iniciales únicamente producen una ligera dilución del colorante. Una vez todo el PDADMACI se encuentra unido al KPVS, la absorbancia de la o-Tb disminuye fuertemente debido al desplazamiento solvatocrómico que sufre la sonda cuando se encuentra unido al polielectrolito aniónico (desde 630 nm hasta 550 nm). El volumen de equivalencia de KPVS se obtiene del punto de corte de las líneas de base inicial y final. Cada una de las determinaciones se obtuvo como el valor promedio de, al menos tres titulaciones hasta alcanzar una desviación estándar menor del 5 %.



### *Síntesis de nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (NP) mediante el método de co-precipitación*

Sobre 1 litro de agua previamente degasificada, y con burbujeo de N<sub>2</sub> (esto evita la oxidación parcial del Fe<sup>2+</sup> a Fe<sup>3+</sup>) bajo constante agitación, se añaden 32.80 g de FeCl<sub>3</sub> · 6 H<sub>2</sub>O y 12.06 g de FeCl<sub>2</sub> · 4 H<sub>2</sub>O. Una vez disueltos estos, se añade lentamente NH<sub>3</sub> al 25 % utilizando una bomba peristáltica con un flujo de 1.2 mL·min<sup>-1</sup>, monitorizando el pH de la disolución hasta alcanzar un valor constante en torno a 10. Se mantiene durante 1 hora en agitación a este pH.

La disolución toma inmediatamente un color negruzco indicando la formación de magnetita, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (s). La subida de pH produce la precipitación de los hidróxidos de hierro y su posterior oxidación para dar magnetita. La reacción global puede expresarse de la siguiente forma:



Una vez pasada la hora, calentamos a 70 °C y mantenemos la temperatura (bajo las mismas condiciones de agitación y corriente de N<sub>2</sub>) durante otra hora más. Terminado, dejamos en agitación toda la noche a temperatura ambiente y sin corriente de N<sub>2</sub>.

Tras esto, hacemos lavados de las nanopartículas separando la fase sólida de la acuosa mediante el uso de imanes permanentes de neodimio de 13000 gauss (1.3 T) hasta que desaparece el olor a amoníaco. Posteriormente se alicuotan en varios tubos que son almacenados a 4°C.

### *Cuantificación concentración de NP*

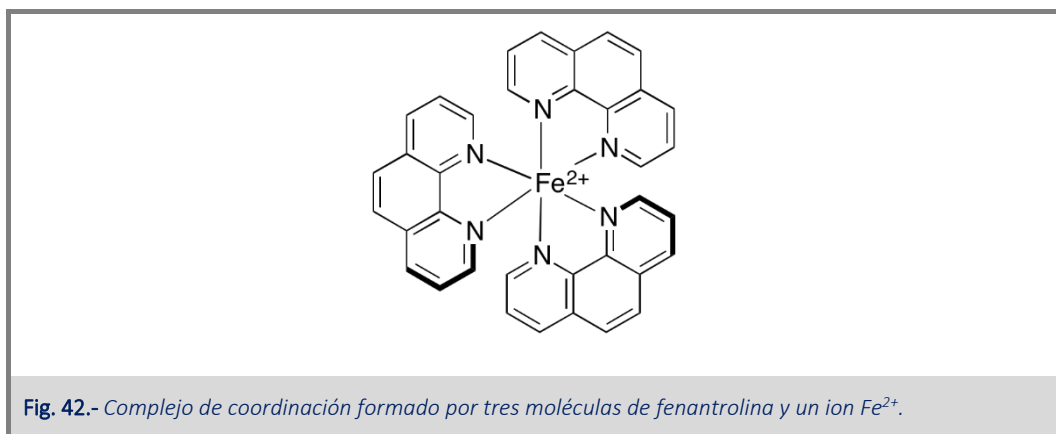
#### *Residuo seco*

Tras la obtención de las nanopartículas se cuantifican mediante el secado y posterior pesado de una cantidad conocida de dispersión. Para ello se ponen 2 mL de dispersión de nanopartículas sobre un tubo previamente pesado, se decantan magnéticamente y se lavan con EtOH tres veces, resuspendiendo finalmente en 1 mL de EtOH, donde se incuba a 70 °C en un termobloque durante 1 día. Una vez se obtiene el residuo, se pesa con el tubo y por diferencia hallaremos la concentración de nanopartículas que tenemos en la dispersión. Una vez recubiertas las nanopartículas, ya no pueden ser cuantificadas por este método puesto que no podemos conocer la cantidad de recubrimiento que tienen y esto haría que sobreestimásemos la concentración de nanopartículas, por lo que se cuantifican por el método descrito a continuación.

### Método formación de complejo de $Fe^{2+}$ con fenantrolina

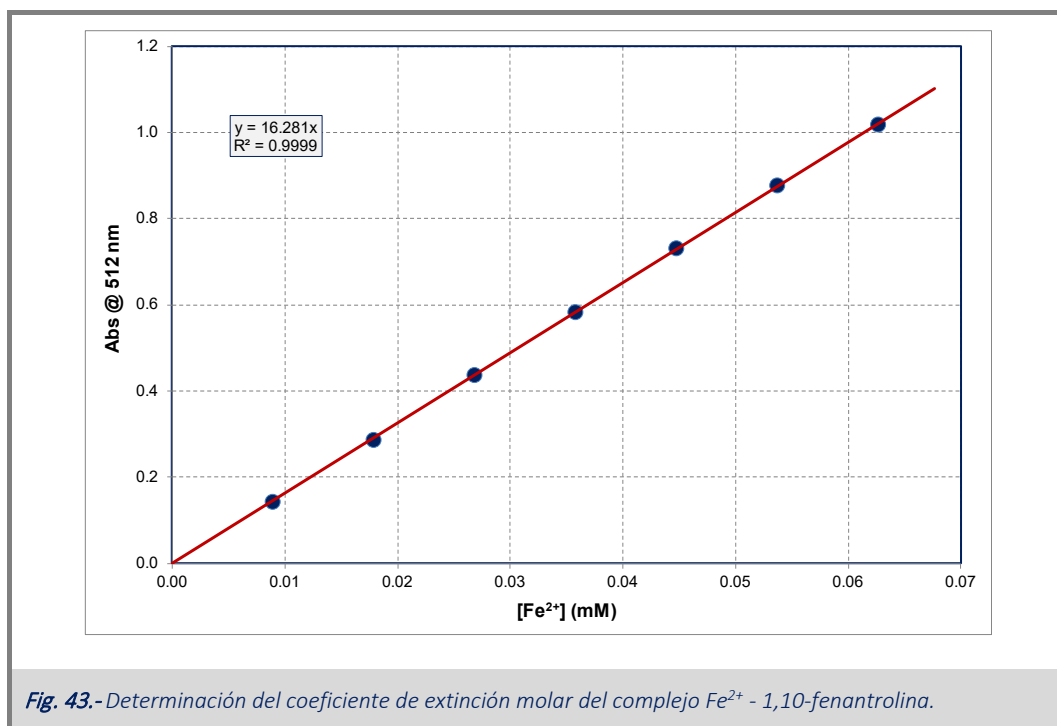
Para la determinación de la concentración de magnetita cuando esta se encuentra recubierta, se ha desarrollado un método basado en la formación de un complejo coloreado entre el  $Fe^{2+}$  presente en la magnetita y la 1,10-fenantrolina<sup>197</sup>.

La 1,10-fenantrolina es un compuesto orgánico heterocíclico que forma complejos con iones metálicos, los cuales debido a su coloración absorben radiación electromagnética en la zona visible del espectro. En concreto, la 1,10-fenantrolina forma un complejo de coordinación con el ion  $Fe^{2+}$  de coloración naranja ( $Fe(phen)_3^{2+}$ ) (Fig. 42), con un máximo de absorción a 512 nm.



Ya que la magnetita está compuesta tanto de iones  $Fe^{2+}$  como  $Fe^{3+}$ , se requiere de un agente reductor con el fin de reducir todo el hierro trivalente a hierro divalente y medir así el hierro total de la muestra. Son numerosos los agentes reductores empleados en la bibliografía para la cuantificación del hierro, pero en este caso se ha utilizado la hidroxilamina ( $NH_2OH$ ).

Previa a la determinación de la concentración de hierro presente en la muestra de nanopartículas, debemos de realizar una recta de calibrado con concentraciones crecientes de  $Fe^{2+}$  y en un exceso de 1,10-fenantrolina, en las mismas condiciones que posteriormente se determinará la concentración de  $Fe^{2+}$  presente en la dispersión de magnetita (Fig. 43).



Para las muestras con nanopartículas son tratadas de la siguiente forma: se añaden 100  $\mu$ L de la dispersión de nanopartículas sobre 900  $\mu$ L de HCl 5M y se incuba a 60 °C en el termobloque durante 3 horas para producir la digestión de las nanopartículas. A continuación, para reducir todo el  $Fe^{3+}$  a  $Fe^{2+}$ , se cogen 100  $\mu$ L de la disolución anterior (en HCl 4.5 M) y se diluyen en 1900  $\mu$ L que contienen hidroxilamina 0.2 M en tampón acetato 1 M pH 4.5. Volúmenes crecientes de la disolución anterior que contienen  $Fe^{2+}$ , se hacen reaccionar con un exceso de 1,10-fenantrolina ( $\sim 1.5$  mM) y se mide la absorbancia a 512 nm. Tras esto se determina la concentración de magnetita,  $Fe_3O_4$ , en la dispersión inicial.

### Caracterización de NP

#### Diámetro hidrodinámico (tamaño) y potencial Z

Tanto para la medida de tamaño como de potencial Z se utilizó el equipo Zetasizer Nano de Malvern o Brookhaven 90Plus. Se utiliza una concentración de nanopartícula dependiente del experimento que se vaya a diseñar, utilizando concentraciones desde 0.045 – 4.5  $mg \cdot mL^{-1}$ . Si se trata de hacer un barrido de pH, este es ajustado mediante adición de HCl o NaOH. Por el contrario, si se trata de estudiar la variación que sufren las nanopartículas cuando se recubren o se les une un ligando, son incubadas a una concentración de tampón y pH constante.

### *TEM (Microscopía de Transmisión Electrónica)*

Las imágenes de TEM son obtenidas mediante un microscopio JEOL JEM 1011, a través del servicio de instrumentación científica de la UMH. Las muestras son preparadas poniendo una gota de dispersión de nanopartículas a una concentración aproximada de  $0.01 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  sobre una rejilla de carbono (Formvar/Carbon 300 Mesh, copper, Electron Microscopy Sciences) y dejando que se evapore el disolvente a temperatura ambiente.

### *Infrarrojo*

Para las medidas de infrarrojo usamos un espectrofotómetro IFS 66/S BRUKER. En primer lugar, secamos las nanopartículas de magnetita previa incubación en termobloque a  $70^\circ \text{C}$ . Tras esto, se mezclan 2.5 mg de muestra con 800 mg de KBr, se homogeniza bien y se prepara un comprimido usando un troquel cilíndrico de 13 mm de diámetro, el cual se introduce en una prensa manual durante 15 min entre 8 – 10 tors. Como resultado obtenemos una pastilla de alrededor de 1 mm de grosor sobre la cual recogemos el espectro de infrarrojo realizando 200 registros entre  $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ . Una vez obtenido el espectro, se caracteriza de forma cualitativa mediante comparación de la frecuencia del máximo de las bandas con respecto a las tabuladas de los distintos grupos funcionales<sup>198</sup>.

### *Titulación ácido-base PEI*

Una disolución de PEI a 0.5 M es dializada en agua, y posteriormente puesta a pH 2 mediante adición de HCl. Tras esto, es titulada con NaOH 1 M mediante adiciones de 50  $\mu\text{L}$ . De esta forma podemos ver el comportamiento ácido-base de la PEI.

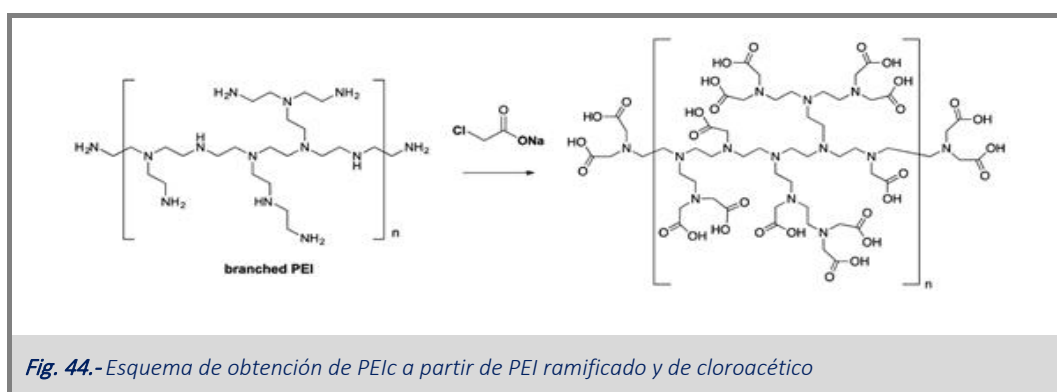
### *Titulación de PEI con aniones divalentes ( $\text{SO}_4^{2-}$ , $\text{HPO}_4^{2-}$ , hexametáfosfato, etc.) mediante ITC*

Para la titulación de PEI con aniones divalentes, el polielectrolito (PEI) se colocó en la celda calorimétrica a concentraciones 0.25 – 25 mM (por monómero) dependiendo del experimento y pH. El polielectrolito fue titulado con el ligando disuelto en las mismas condiciones de pH (normalmente 10 mM de buffer en ausencia de sal). Las concentraciones de PEI y ligando fueron elegidas para conseguir niveles de saturación no menores del 90 % para poder determinar los parámetros termodinámicos de unión con cierta exactitud.



### Síntesis de PEIc

La PEI fue derivatizada con objeto de carboxilar cada uno de los grupos amino formando un enlace covalente entre el nitrógeno y el carbono del resto  $-\text{CH}_2\text{-COOH}$  (Fig. 44). Para la modificación de los grupos amino de la PEI seguimos la derivatización previa que ya habían hecho Bruening, et al<sup>199</sup>. 10 gramos de PEI de 60 KD al 50 % (p/v) se disuelven sobre 100 mL de agua y se introducen en un matraz de tres bocas a reflujo, provisto de un baño de glicerina a 50 °C. Por otro lado, 20 gramos de cloroacético son disueltos en 25 mL de agua, sobre los cuales se burbujea una corriente de  $\text{N}_2$ , y se mantienen 10 minutos a 30 °C. Pasados estos 10 minutos, la disolución de cloroacético se gotea sobre la de PEI, ajustando el pH con NaOH para mantenerlo a 10. Terminada la adición se mantiene a 50 °C durante 1 hora. Pasada la hora, se sube a 90 °C y se mantiene durante 2 horas. Finalmente, se deja durante al menos 16 h en agitación constante a temperatura ambiente. Para eliminar la PEI que no haya sido derivatizado, se baja el pH de la disolución provocando la precipitación de la PEIc, y se centrifuga durante 15 minutos a 5300 rpm. Tras esto se dializa para eliminar restos de cloroacético que pudiesen haber quedado, y finalmente se liofiliza.



### Medidas ITC. Comparativa entre PEIc y EDTA

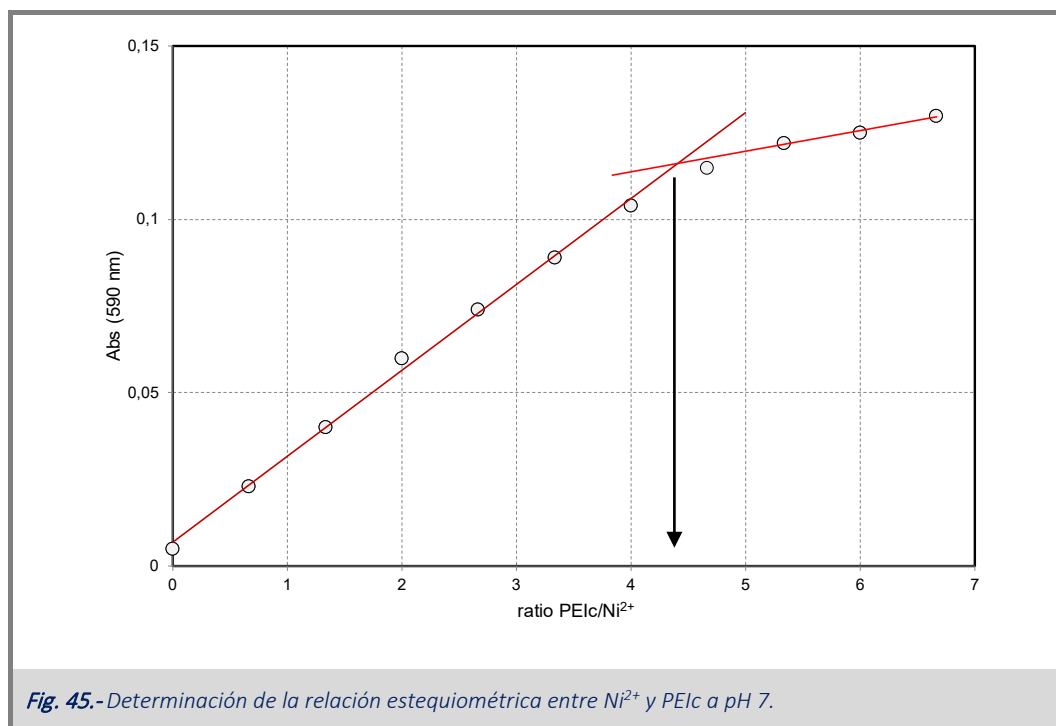
Para la titulación de EDTA y PEIc con  $\text{Ni}^{2+}$  se utilizaron las siguientes condiciones. Para el caso del EDTA, se inyectan volúmenes sucesivos de 10  $\mu\text{L}$  a una concentración de 5 mM de  $\text{Ni}^{2+}$  en 50 mM HEPES pH 7 sobre EDTA a una concentración de 0.4 mM en 50 mM HEPES pH 7 manteniendo la temperatura a 25 °C.

Para el caso de la PEIc, se inyectan volúmenes sucesivos de 10  $\mu\text{L}$  a una concentración de 5 mM de  $\text{Ni}^{2+}$  en 50 mM HEPES pH 7 sobre PEIc a una concentración de 2 mM en 50 mM HEPES pH 7 manteniendo la temperatura a 25 °C.

### Titulación de $\text{Ni}^{2+}$ con EDTA y PEIc seguida mediante espectrofotometría

Para determinar la relación estequiométrica entre el EDTA y  $\text{Ni}^{2+}$  y compararla con la que presenta la PEIc con el mismo metal, hacemos una titulación que seguimos mediante la medida de absorbancia, puesto que cuando el metal es acomplejado por el EDTA o PEIc su máximo de absorción se desplaza aumentando su

coeficiente. Cuando todo el metal es acomplejado, el coeficiente de extinción disminuye. Al representar esto obtenemos dos rectas, en cuyo punto de corte podemos determinar la relación estequiométrica (Fig. 45).



Para la titulación de Ni<sup>2+</sup> con EDTA: ponemos Ni<sup>2+</sup> a 15 mM en 10 mM HEPES pH7 y añadimos volúmenes de 50 en 50  $\mu$ L de EDTA 50 mM en HEPES 10 mM pH 7.

Para la titulación de Ni<sup>2+</sup> con PEIc; ponemos Ni<sup>2+</sup> a 15 mM en 10 mM HEPES pH7 y añadimos volúmenes de 50 en 50  $\mu$ L de PEIc 200 mM en HEPES 10 mM pH 7.

### Recubrimiento de NP

#### NP@TEOS

Para realizar el recubrimiento con TEOS de NP de magnetita utilizamos el método sol-gel a partir de las relaciones usadas por Deng Y-H et al<sup>200</sup>.

A partir de 10 mL de dispersión de nanopartículas a una concentración de 1.8 % (p/v), 200 mL de EtOH y 25 mL de NH<sub>3</sub> al 25 %, se sonica en un baño ultrasonidos durante 1 hora. Pasado el tiempo se añaden 600 mL de EtOH y 200 mL de H<sub>2</sub>O, de forma que finalmente tengamos una relación 1:4 (H<sub>2</sub>O:EtOH). Sobre esta se añaden gota a gota 5 mL de TEOS (99 %), y se mantiene la dispersión en agitación durante 12 h a temperatura ambiente. Pasadas las 12 horas se centrifuga a 16000 g durante 15 minutos, eliminando el

sobrenadante y haciendo lavados con agua destilada, hasta finalmente resuspender en un volumen final de 10 mL.

#### *NP@TEOS@APTES*

Para realizar el recubrimiento con APTES nos basamos en la descripción que dan Yamaura et al.<sup>201</sup> Sobre 125 mL de acético 100 mM a pH 5, añadimos 10 mL de NP@TEOS (obtenidas anteriormente) al 1.8 % (p/v), sonicamos durante 5 minutos y finalmente añadimos 15 mL de APTES gota a gota, manteniendo en agitación constante durante 3 horas a temperatura ambiente. Pasada la incubación hacemos lavados con agua durante 3 ciclos, previa decantación magnética, y resuspendemos en un volumen final de aproximadamente 10 mL.

#### *NP@TEOS@APTES-EDTA*

Para la modificación de los grupos amino que presenta la molécula de APTES seguimos la derivatización previa que ya habían hecho Shiraishi et al.<sup>202</sup> 0.4 gramos de NP@TEOS@APTES a las que se le ha eliminado el disolvente (agua) son puestas sobre una mezcla de 25 mL de ácido acético y 25 mL de EtOH. A continuación, se añade 1 gramo de EDTA dianhidro. Todo esto se mantiene a reflujo a 70 °C con agitación constante (410 rpm) y durante 13 horas. Pasadas las 13 horas de incubación, hacemos lavados mediante decantación magnética tal como sigue; acetona, agua, acetona, agua. Finalmente almacenamos en aproximadamente 10 mL de agua.

#### *Variación del tamaño de NP@PE con exceso de polielectrolito*

A partir de nanopartículas desnudas sonicadas a pH 11, se preparan distintos tubos con una concentración constante de nanopartícula y concentración creciente de polielectrolito. Para NP@PAAH se han utilizado tres concentraciones de nanopartículas, 0.045, 0.45 y 4.5 mg·mL<sup>-1</sup>, y de polielectrolito (0 – 0.18, 0 – 1.8, 0 – 18 mg/mL, respectivamente), estando este a pH 7.0. Para las NP@PEI y NP@PEIc la concentración de NP ha sido de 0.4 mg·mL<sup>-1</sup> y la concentración de PE barrida ha sido de 0 – 20 mg·mL<sup>-1</sup>. En el caso de la PEI, esta se encontraba a pH 7, mientras que la PEIc se encontraba a pH 9.

Las NP@PAA, son obtenidas a partir de NP desnudas sonicadas a pH 3, obteniendo una concentración de NP final de 0.45 mg·mL<sup>-1</sup> y utilizando concentraciones de PE de 0 – 4.5 mg·mL<sup>-1</sup>. El polielectrolito se encuentra a pH 5. Tras la incubación se mide el tamaño de las nanopartículas mediante DLS.

### *NP@PAA*

#### *Recubrimiento a pH 5*

100 mL de dispersión de nanopartículas a  $4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  son puestas a pH 3 y son sonicadas durante 30 minutos. Estas son añadidas sobre una disolución que contiene PAA a  $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  en tampón acético a pH 5. Sobre estas se añaden 100 mL de PAA a  $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  en MES 10 mM pH 6, de tal forma que hay un exceso de 2.5 veces de PAA con respecto a la nanopartícula. Tras dejar incubar durante al menos 16 h con agitación constante, las nanopartículas son lavadas bajando el pH para protonar los grupos carboxílicos, de forma que aquellos que no estén recubriendo la superficie puedan ser eliminados. Como estrategia de síntesis, el pH al que se llevó la disolución fue de 3, 2 y 1, en distintas preparaciones. Una vez eliminado el exceso de PAA que no ha reaccionado, se resuspenden en agua y se vuelven a sonicar durante 30 minutos. Este recubrimiento se ha hecho de igual forma con PAA de distinto peso molecular (15 kD y 1.2 kD).

#### *Recubrimiento pH 9*

Se parte de un stock a  $4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de nanopartículas a pH 11, previamente sonicado durante 30 minutos. 1 mL de dispersión de nanopartículas es goteado sobre 10 mL de disolución que contiene PAA, ajustado a pH 9.0, a una concentración de  $2.7 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . De esta forma tenemos un exceso de 6.8 veces de PAA con respecto a la nanopartícula. Para eliminar el exceso de PAA que no haya recubierto la superficie, se baja el pH hasta 3, y después de varios lavados con agua, las nanopartículas son sonicadas durante 30 minutos. Este recubrimiento se ha hecho de igual forma con PAA de distinto peso molecular (15 kD y 1.2 kD).

### *NP@PAAH*

Se parte de un stock a  $4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de nanopartículas a pH 11 previamente sonicado durante 30 minutos. 10 mL de dispersión de nanopartículas es goteado sobre 100 mL de disolución que contiene PAAH en HEPES 50 mM pH 7 a una concentración de  $0.16 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . De esta forma tenemos una relación de 0.4 veces de PAAH con respecto a la nanopartícula. Este recubrimiento además ha sido hecho en distintas condiciones de fuerza iónica ([NaCl]: 0, 250, 500, 750 y 1000 mM). Para eliminar el exceso de PAAH que no haya recubierto la superficie, se dejan bajo decantación magnética durante 1 día, y después de varios lavados con agua, las nanopartículas son sonicadas durante 30 minutos.

### *NP@PAAH-EDTA*

Para la modificación de los grupos amino que presenta la molécula de PAAH seguimos la derivatización previa que ya habían hecho Shiraishi et al.<sup>202</sup> 0.3 gramos de NP@PAAH a las que se le ha eliminado el

disolvente (agua) son puestas sobre una mezcla de 25 mL de ácido acético y 25 mL de EtOH. A continuación, se añade 1.5 gramos de EDTA dianhidro. Todo esto se mantiene a reflujo a 70 °C con agitación constante (410 rpm) y durante 16 horas.

Pasadas las 16 horas de incubación, hacemos lavados mediante decantación magnética tal como sigue; acetona, agua, acetona, agua. Las nanopartículas son almacenadas con 5 mM de  $\text{Cu}^{2+}$ , de forma que la superficie de la nanopartículas esté saturada de  $\text{Cu}^{2+}$ .

#### *NP@PEI*

Se parte de un stock a  $4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de nanopartículas a pH 11, previamente sonicado durante 30 minutos. 5 mL de dispersión de nanopartículas es goteado sobre 50 mL de disolución que contiene PEI de 60 KD ajustado a pH 7 a la concentración que se pretenda estudiar, puesto que con este PE se han recubierto las nanopartículas en distinta relación en cuanto a masa de PEI:NP (1:1, 2.5:1, 5:1, 10:1, 20:1, 25:1 y 50:1), sabiendo que la concentración final de nanopartícula que tenemos en el medio es de  $0.36 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Para eliminar el exceso de PEI, las nanopartículas son purificadas añadiendo fosfato 500 mM ajustado a pH 7 hasta que se produce la precipitación de la nanopartícula. Después de varios lavados con agua, las nanopartículas son sonicadas durante 30 min.

#### *NP@PEIc*

Se parte de un stock a  $4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de nanopartículas a pH 11, previamente sonicado durante 30 minutos. 5 mL de dispersión de nanopartículas es goteado sobre 50 mL de disolución que contiene PEIc ajustado a pH 9 a la concentración que se pretenda estudiar, puesto que con este PE se han recubierto las nanopartículas en distinta relación en cuanto a masa de PEIc:NP (1:1, 9:1 y 33:1), sabiendo que la concentración final de nanopartícula que tenemos en el medio es de  $0.36 \text{ mg}/\text{mL}$ . Para eliminar el exceso de PEIc que no haya recubierto la superficie, se baja el pH hasta que se produce la precipitación de la nanopartícula (pH ~ 2), y después de varios lavados con agua, las nanopartículas son sonicadas durante 30 minutos.

#### *Caracterización de la $\beta$ -LG adsorbida a las NP@PEI por fluorescencia*

Para caracterizar la proteína cuando se encuentra adsorbida, comparamos su  $T_m$  y su espectro de fluorescencia con el de la proteína nativa en esas mismas condiciones. Se incubó NP@PEI a  $0.05 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  y  $\beta$ -Lg a  $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Tras alcanzar el equilibrio de adsorción, se diluye 50 veces en HEPES 10 mM pH 7 y se mide su espectro de emisión desde 300 hasta 400 nm ( $\lambda_{\text{ex}}$ : 280 nm, voltaje del fotomultiplicador: 700 – 900

V y rendijas de excitación y emisión: 5 nm). Como control se mide la proteína libre a la misma concentración de la que ha sido puesta con las nanopartículas.

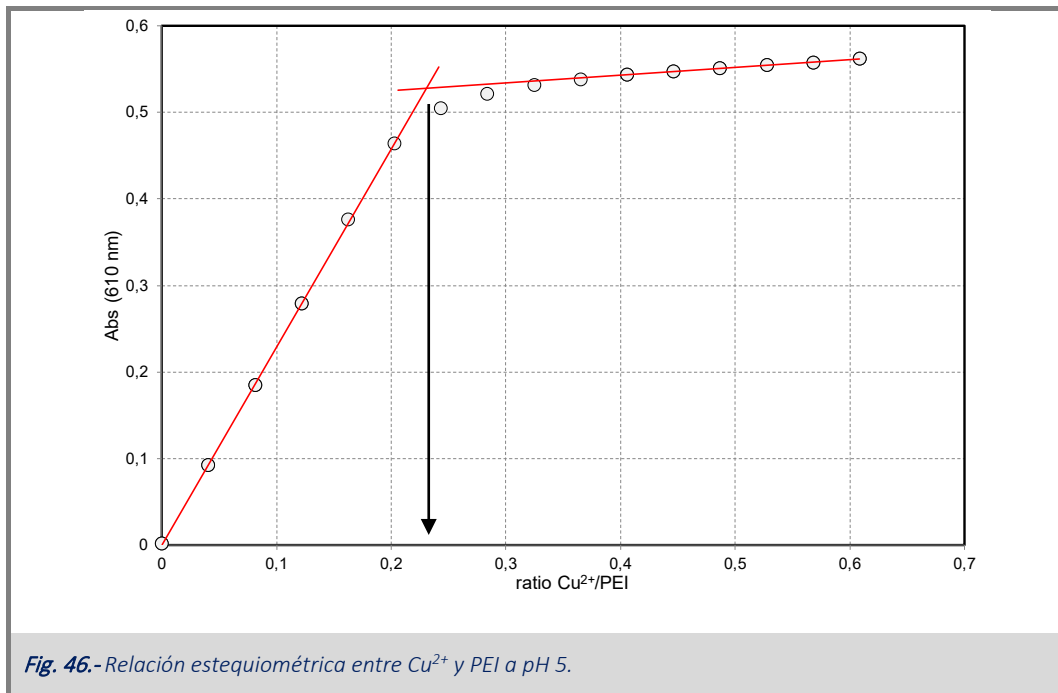
Para llevar a cabo la desnaturalización, hacemos un barrido de temperaturas desde 20 hasta 95 °C, con una velocidad de barrido de 1 °C·min<sup>-1</sup>. Recogeremos la intensidad de fluorescencia emitida a dos longitudes de onda, tanto a 325 como a 360 nm ( $\lambda_{\text{ex}}$ : 280 nm, voltaje del fotomultiplicador: 825 V y rendijas de excitación y emisión: 5 nm). Del punto de inflexión de la curva, determinaremos su  $T_m$ .

#### *Eliminación de DNA unido a proteína tras purificación.*

Debido a que la proteína que se pretende purificar (presenta DNA unido) se encuentra a elevada fuerza iónica, dializo frente a 10 mM de fórmico pH 3. Una vez dializada la proteína, 500  $\mu\text{L}$  de esta se añaden a 500  $\mu\text{L}$  de la dispersión que contiene las nanopartículas de magnetita recubiertas con PEI a 3.3  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Tras incubar durante 16 horas donde se produce la competición de las NP@PEI por el DNA que contiene la proteína unido, las nanopartículas junto con el DNA son decantadas mediante un imán y el sobrenadante (proteína sin DNA) es cuantificado y estudiado.

#### *Cuantificación de $\text{Cu}^{2+}$ adsorbido mediante titulación de NP@PEI con $\text{Cu}^{2+}$*

Para la cuantificación de la capacidad de adsorción de  $\text{Cu}^{2+}$  sobre las NP@PEI, primero se determina la relación estequiométrica entre el  $\text{Cu}^{2+}$  y la PEI. Para determinar esto, se pone una cantidad constante de PEI, a 0.53  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , y se añaden cantidades crecientes de  $\text{Cu}^{2+}$ . Cuando el  $\text{Cu}^{2+}$  se une a la PEI, su espectro de absorción cambia, por lo que será fácilmente detectable el momento en el que ya no se une más ligando a la PEI (cambio en la pendiente), consiguiendo la saturación, pudiendo calcular la relación molar entre el  $\text{Cu}^{2+}$  y la PEI, siendo esta de 0.23, o dicho de otra forma 4.33 mol de PEI por mol  $\text{Cu}^{2+}$  (Fig. 46).



Una vez hemos determinado la relación estequiométrica podemos cuantificar la cantidad de Cu<sup>2+</sup> que adsorbe nuestra nanopartícula, haciendo la misma titulación pero poniendo una cantidad conocida de nanopartículas en el medio.

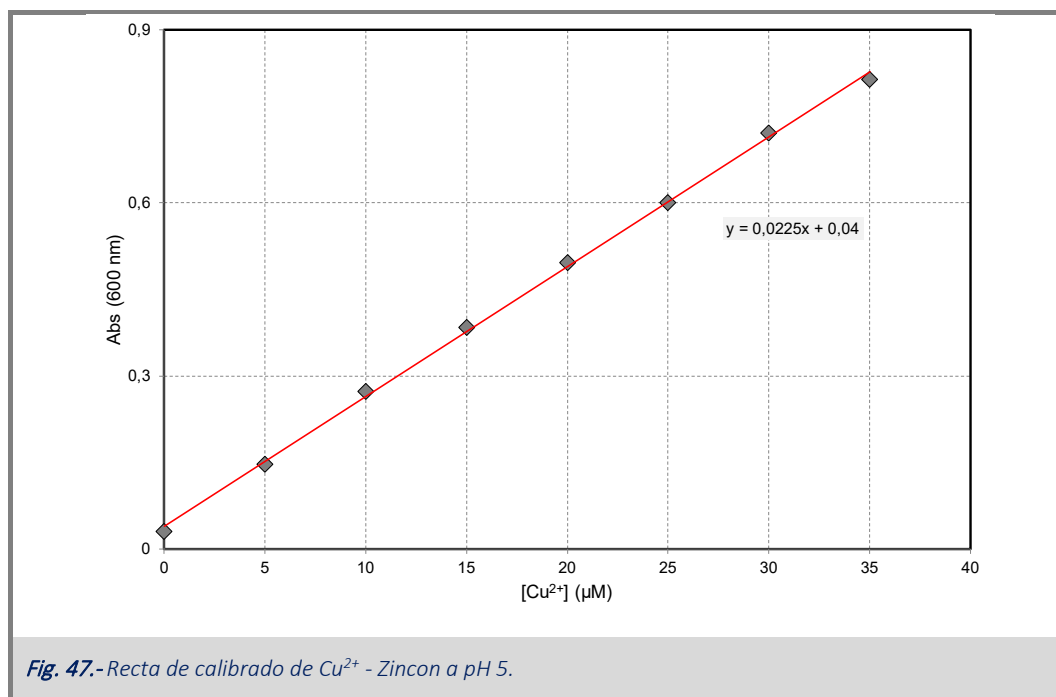
Para la cuantificación de la adsorción de Cu<sup>2+</sup> se titulan las nanopartículas con adiciones de 50 µL de 20 mM Cu<sup>2+</sup> en acetato 20 mM pH 5. Las concentraciones utilizadas de NP@PEI son de 200, 75, 200, 100 y 50 µg·mL<sup>-1</sup> para las distintas relaciones de PEI:NP de 1:1, 2.5:1, 5:1, 10:1 y 25:1, respectivamente.

### Cuantificación de metales

Para la cuantificación de metales hemos usado métodos distintos en función de las concentraciones utilizadas en disolución. Para aquellos casos donde la concentración de metal está en orden µM, usamos colorantes como zincon<sup>203</sup> u o-cresoltaleína<sup>204</sup>, mientras que en el rango mM usamos buffer con aminas, donde se produce la coordinación del metal por las aminas aumentando el coeficiente de extinción del complejo que se forma.

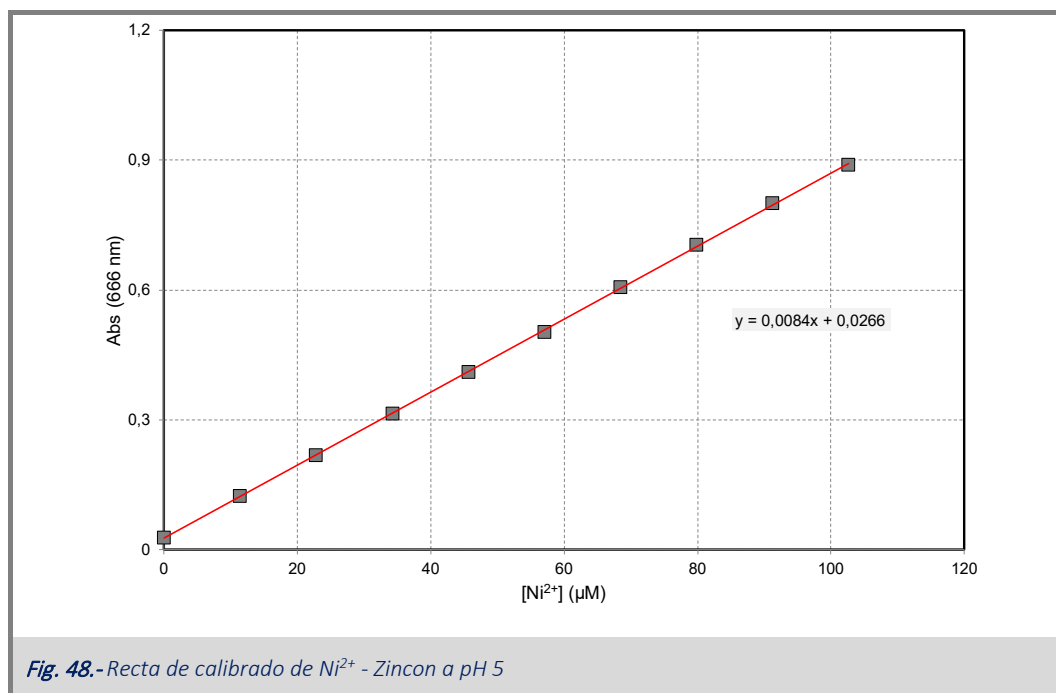
### Cu<sup>2+</sup> – Zincon

Para la cuantificación de Cu<sup>2+</sup> se prepara una recta de calibrado con una concentración constante de zincon (40 µM) y una concentración creciente de Cu<sup>2+</sup> (0 – 40 µM) incubados en acético 50 mM pH 5. Tras incubar durante al menos 16 h se mide el espectro de absorbancia desde 400 hasta 700 nm. A partir del máximo a 600 nm obtenemos la recta de calibrado (Fig. 47).



### $\text{Ni}^{2+}$ - Zinco

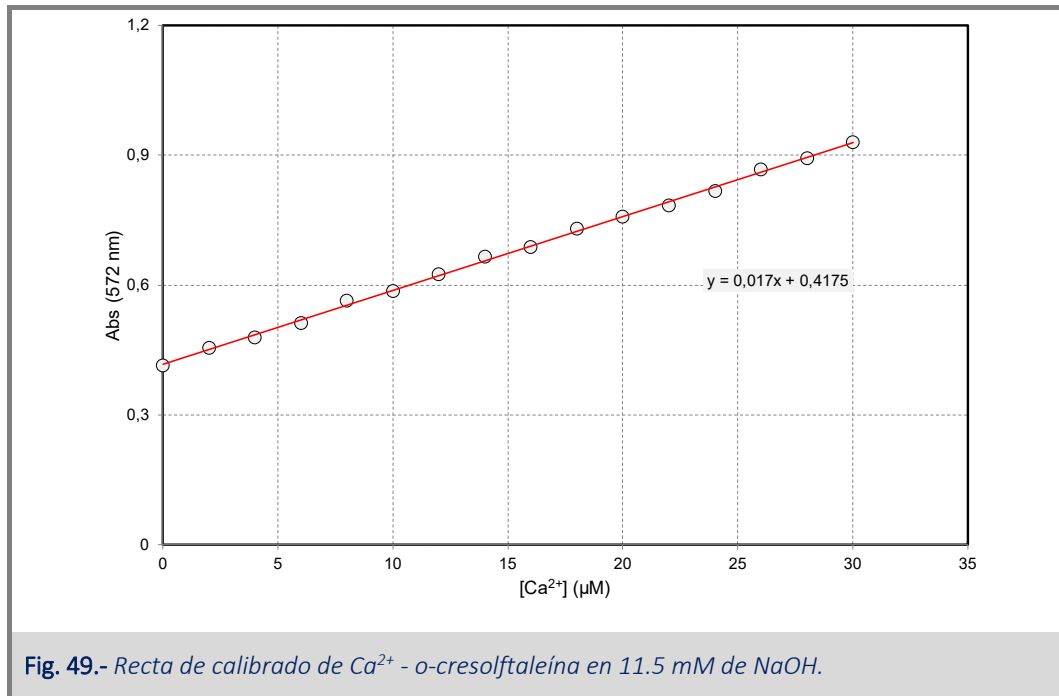
Para la cuantificación de  $\text{Ni}^{2+}$  se prepara una recta de calibrado con una concentración constante de zinco (125  $\mu\text{M}$ ) y una concentración creciente de  $\text{Ni}^{2+}$  (0 - 100  $\mu\text{M}$ ) incubados en acético 50 mM pH 5. Tras incubar durante al menos 16 h se mide el espectro de absorbancia desde 400 hasta 700 nm. A partir del máximo a 666 nm obtenemos la recta de calibrado (Fig. 48).



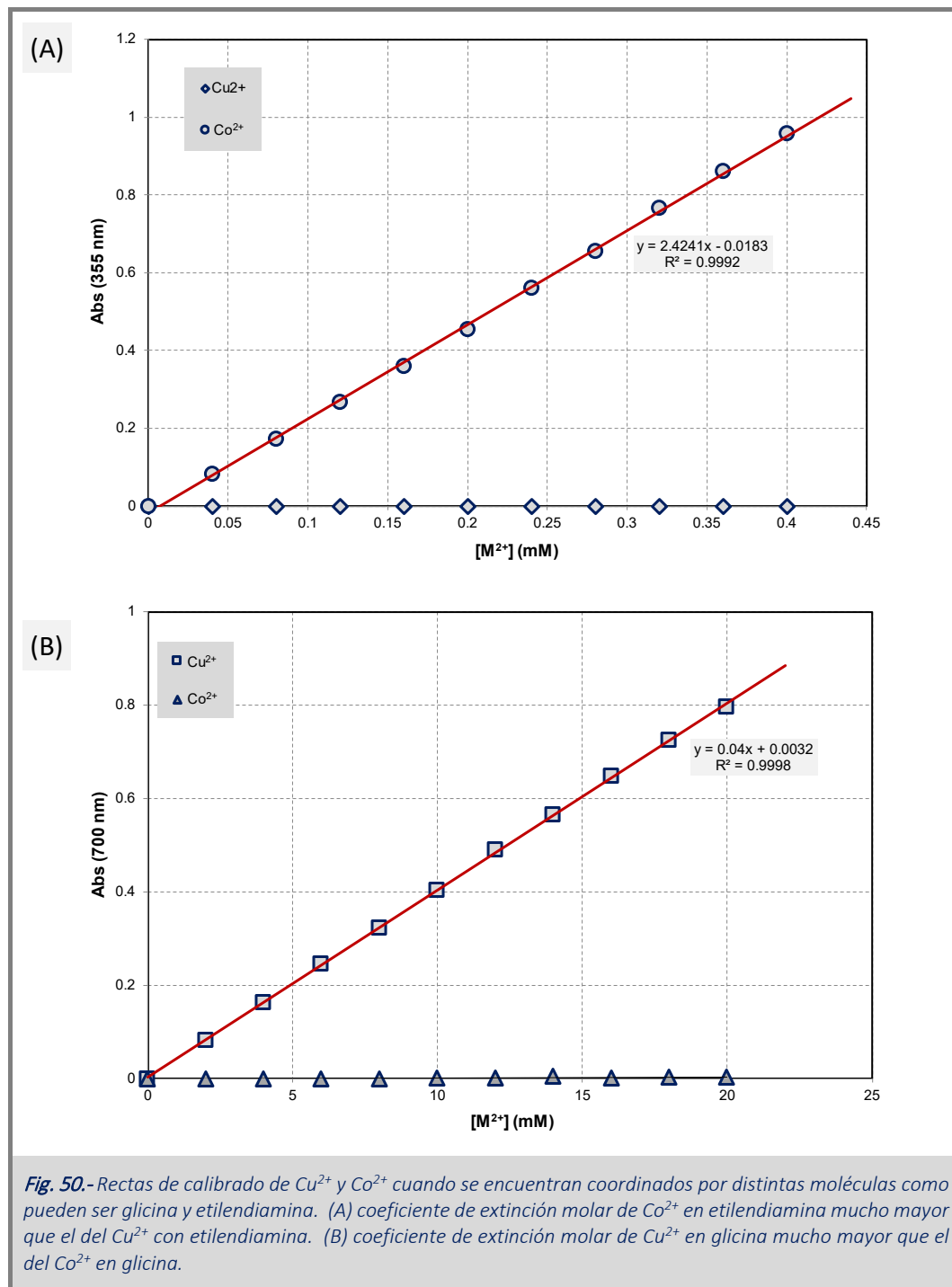


### $\text{Ca}^{2+}$ - *o*-cresolftaleína

Para la cuantificación de  $\text{Ca}^{2+}$  se prepara una recta de calibrado con una concentración constante de *o*-cresolftaleína (40  $\mu\text{M}$ ) y una concentración creciente de  $\text{Ca}^{2+}$  (0 – 30  $\mu\text{M}$ ) incubados en 11.5 mM de NaOH. Tras incubar *durante al menos 16 h* se mide el espectro de absorbancia desde 400 hasta 700 nm. A partir del máximo a 572 nm obtenemos la recta de calibrado (Fig. 49).



Para la cuantificación de  $\text{Co}^{2+}$  o  $\text{Cu}^{2+}$ , mediante coordinación con grupos amino se prepara una recta de calibrado con una concentración constante de buffer glicina o etilendiamina pH 10 (500 mM) y una concentración creciente de  $\text{Co}^{2+}$  o  $\text{Cu}^{2+}$  (0 – 0.4 mM para la determinación con glicina y de 0 – 20 mM para la determinación con etilendiamina). Tras incubar durante al menos 16 h se mide el espectro de absorbancia desde 260 hasta 500 nm para la determinación con etilendiamina. A partir del máximo a 355 nm obtenemos la recta de calibrado (Fig. 50-A). Para la determinación con glicina, recogemos el espectro desde 500 hasta 750 nm y representamos el máximo a 700 nm para obtener la recta de calibrado (Fig. 50-B).



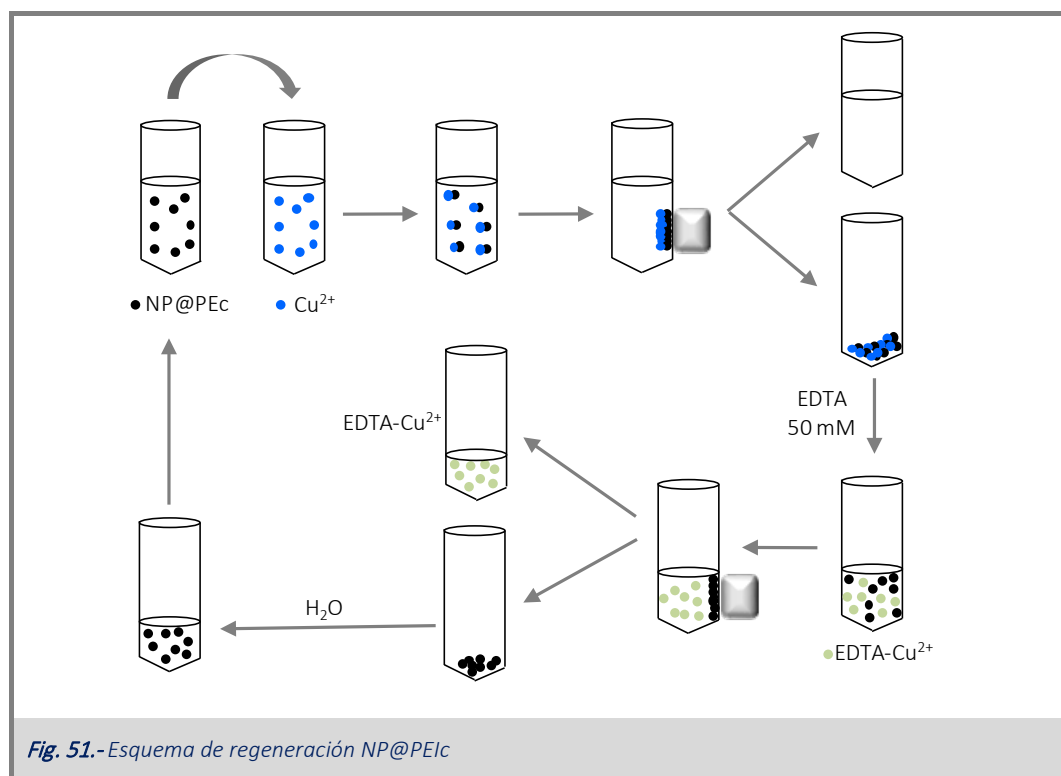
### Eliminación fraccionada de metales mediante uso de NP@PEIc

Para estudiar si las NP@PAAH-EDTA son capaces de eliminar metales de forma selectiva, se incuban las NP@PAAH-EDTA a una concentración creciente desde 0 – 3  $mg \cdot mL^{-1}$ , conteniendo en el medio de forma simultánea una cantidad constante de  $Ni^{2+}$  y de  $Ca^{2+}$  ( $\sim 100 \mu M$ ) en un medio con tampón HEPES 50 mM pH 7.0. Tras dejar durante al menos 16 h en agitación, las nanopartículas se decantan mediante un imán y se cuantifica lo que queda en el sobrenadante, previa dilución en un medio que contiene o zincon para cuantificar el  $Ni^{2+}$  o o-cresolftaletína para el  $Ca^{2+}$ .

Para estudiar si las NP@PEIc son capaces de eliminar metales de forma selectiva, se incuban las NP@PEIc a una concentración creciente desde 0 – 1 mg·mL<sup>-1</sup>, conteniendo en el medio de forma simultánea una cantidad constante de Co<sup>2+</sup> y de Cu<sup>2+</sup> (25 mM) en un medio con tampón acético 20 mM pH 5.0. Tras dejar durante al menos 16 h en agitación, las nanopartículas se decantan mediante un imán y se cuantifica lo que queda en el sobrenadante, previa dilución en un medio que contiene o bien 0.5 M de etilendiamina pH 10, o 0.5 M de glicina pH 10.

### Lavados regeneración de NP@PEIc

Para el estudio de la posible reutilización de las nanopartículas en biorremediación, se parte de una concentración de 0.5 mg·mL<sup>-1</sup> y una concentración de 25 mM de Cu<sup>2+</sup> incubados en 50 mM de acético pH 5. Tras la decantación magnética, el sobrenadante es cuantificado, y las nanopartículas son tratadas con EDTA 50 mM durante 5 minutos, con el fin de competir por el Cu<sup>2+</sup> dejando la NP@PEIc libre de metal. Tras la competición, se baja el pH (~ 2) para protonar los grupos carboxílicos que expone hasta que se produzca la precipitación y poder decantar de forma rápida la nanopartícula, asegurando así que no hay adsorción del Cu<sup>2+</sup> sobre esta. Una vez decantada, se elimina el sobrenadante (Cu<sup>2+</sup>-EDTA) y las nanopartículas son resuspendidas un pequeño volumen para ser reconcentradas. Tras esto, este nuevo stock de nanopartículas se cuantifica mediante el método colorimétrico anteriormente descrito, y se vuelve a incubar en las mismas condiciones que la primera vez (Fig. 51). Este procedimiento se repite 3 veces.





## 4. Resultados y discusión



4.1.- Capítulo 1 - Inhibición de la adsorción de proteínas sobre superficies de sílice mediante competición con polielectrolitos





#### 4.1.1.- Introducción

La adsorción de proteínas a las superficies sólidas hidrofílicas e hidrofóbicas es un fenómeno generalizado debido a la naturaleza anfipática de estas biomoléculas<sup>21-23</sup>. Este proceso se ha utilizado de forma habitual para muchas aplicaciones biotecnológicas como las separaciones cromatográficas<sup>205,206</sup>, el diseño de nuevos conjugados biomoleculares para su uso como sistemas de administración de fármacos<sup>26,207</sup>, dispositivos de diagnóstico y sensores<sup>27</sup> y el desarrollo de nuevos materiales biocompatibles<sup>28,208</sup>. Sin embargo, la adsorción de proteínas a superficies sólidas a menudo reduce su estabilidad conformacional<sup>29,30,209-211</sup> lo que puede conducir a cambios estructurales y funcionales<sup>32,212</sup> con posibles efectos negativos en muchas áreas donde es necesario utilizar proteínas completamente funcionales como catalizadores, fármacos o aditivos alimentarios. Además, la adsorción física de proteínas a superficies sólidas implica un equilibrio químico entre las formas libres y adsorbidas de la biomolécula. Dado que su adsorción puede afectar negativamente a su estabilidad conformacional, la proteína parcialmente desplegada liberada puede estar involucrada en procesos multimoleculares irreversibles, como la agregación y/o fibrilación<sup>36,213,214</sup> que conduce a la degradación de proteínas funcionales inducida por la superficie.

Por otro lado, el desarrollo de muchos procesos biotecnológicos en las últimas décadas ha permitido la producción de grandes cantidades de materiales relacionados con proteínas para satisfacer las necesidades cada vez más exigentes de la sociedad en áreas como la fabricación de productos farmacéuticos, farmacología clínica, investigación en laboratorios, biotecnología industrial o industria de procesamiento de alimentos. Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar metodologías que transformen las superficies potencialmente activas en la adsorción de proteínas en un entorno inerte para estas biomoléculas.

La sílice es uno de los materiales más profusamente utilizados en nuestra vida cotidiana y su uso en la mayoría de los procesos biotecnológicos es omnipresente. La densidad de carga de la superficie de sílice depende en gran medida del pH del medio debido a la deprotonación de sus grupos silanol<sup>55,215</sup>. La sílice presenta un PZC de alrededor de 2.5 - 3.0. En consecuencia, las superficies de sílice tienen una carga negativa global a pH fisiológico y se ha demostrado que la atracción electrostática hacia moléculas cargadas positivamente desempeña un papel importante en su adsorción sobre la superficie sólida<sup>33,216</sup>. La dependencia del pH y la fuerza iónica de la energía de la adsorción de moléculas cargadas sobre la superficie de sílice<sup>33,206,217</sup> muestra claramente que está directamente relacionada con la densidad de carga de las dos especies que interactúan. La interacción de la sílice con polielectrolitos naturales<sup>30,216</sup> y sintéticos<sup>172,218</sup> es especialmente fuerte debido principalmente a la contribución entrópica traslacional favorable a la energía libre de adsorción derivada del número de contactos electrostáticos atractivos establecidos entre los silanoles deprotonados en la superficie sólida y grupos positivos ubicados en una única cadena de polímero.

Ha habido intentos previos de desarrollar recubrimientos efectivos para disminuir la tendencia de las proteínas a adsorberse en las superficies de sílice. En particular, se han propuesto muchos procedimientos de silanización para la modificación covalente de los grupos silanoles expuestos a la superficie<sup>219,220</sup>. Aunque el procedimiento de síntesis ha sido altamente optimizado y la silanización de superficies de sílice es un procedimiento directo y relativamente sencillo, el coste real de producir sílice modificada covalentemente impide su uso a escala industrial en la producción rutinaria de material de vidrio habitualmente utilizado en procesos biotecnológicos. Se han propuesto recubrimientos de adsorción simples y económicos utilizando varios polímeros neutros como el polietilenglicol<sup>221</sup> o la polivinilpirrolidona<sup>222</sup>. En estos casos, la adsorción de proteínas se inhibió significativamente, pero el recubrimiento previo de las superficies de sílice con estos polímeros no evitó completamente la adsorción proteica.

#### ***4.1.2.- Hipótesis de partida***

En este apartado, presentaremos una metodología capaz de inhibir la adsorción de proteínas cargadas positivamente por el recubrimiento previo de la superficie de sílice con un polielectrolito catiónico de alta densidad de carga. La hipótesis subyacente que ha motivado esta investigación parte del convencimiento que la adsorción de polielectrolitos catiónicos de alta densidad de carga tendrá una mayor afinidad por las superficies de sílice con carga opuesta que la mostrada por las proteínas. Hay que tener en cuenta que la interacción entre estos polielectrolitos y las superficies de sílice es de naturaleza fundamentalmente electrostática. Resulta evidente que cuanto mayor sea la densidad de carga del polielectrolito y mayor el número de monómeros que lo conforman (peso molecular), más elevado será el número de contactos atractivos que una molécula de polielectrolito establece con la superficie. La disminución en la energía libre no será simplemente la adición de las pequeñas variaciones negativas de cada contacto, sino que es de esperar un fuerte efecto sinérgico asociado con el hecho de todos los grupos cargados del polielectrolito pertenecen a una misma molécula. De esta forma, la reducción en la entropía traslacional del polímero como consecuencia de su adhesión a la superficie será mucho menor que el que sufriría un número igual de monómeros del polielectrolito actuado como partículas individuales.

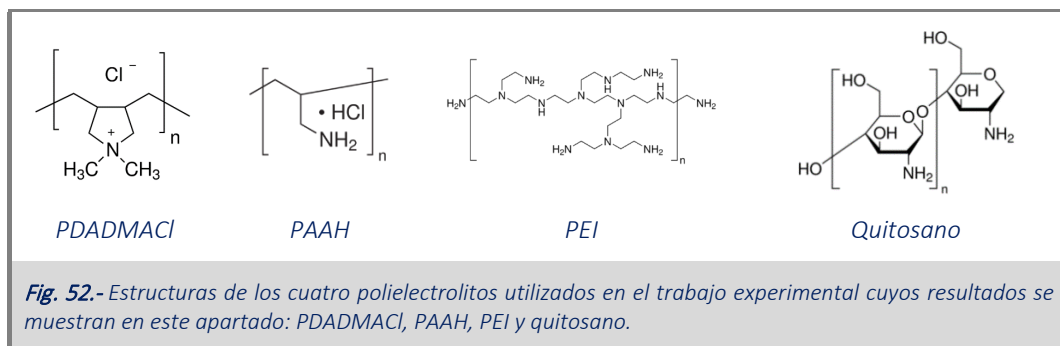
Por su parte, una proteína cuyo punto isoeléctrico sea mayor que el pH al cual se establece el equilibrio de adsorción dispondrá de un número de residuos cargados positivamente significativamente menor que un polielectrolito de similar peso molecular. Aunque la proteína mostrará una elevada constante de adsorción por la superficie sólida cargada, ésta será sensiblemente menor que la del polielectrolito de alta densidad de carga.

Por tanto, el recubrimiento previo de la superficie de sílice por un exceso de polielectrolito catiónico inhibirá la posterior adsorción de la proteína a la superficie y evitará los problemas hacia la integridad

biológica de la proteína asociados a dicha adsorción. En efecto, en estas condiciones, la proteína sería incapaz de competir favorablemente con el polielectrolito por la superficie sólida y la repulsión electrostática resultante entre el polielectrolito adsorbido a la sílice y la proteína, mantendría a esta última en disolución excluyendo su adsorción a la superficie sólida, ahora completamente recubierta por el polímero catiónico.

#### 4.1.3.- Estrategia experimental

- ✓ Utilizando la Lzm como proteína modelo, se estudiará la capacidad de ciertos polielectrolitos catiónicos de inhibir su adsorción (Fig. 52). Para ello, determinaremos la capacidad de estos últimos para desorber la proteína previamente adsorbida a la superficie de sílice.
- ✓ Se incubarán muestras de sílice con Lzm a pH fisiológico durante el tiempo suficiente para asegurar que se ha alcanzado el equilibrio. Las concentraciones de SiO<sub>2</sub> serán suficientemente elevadas para asegurar que toda la proteína se ha adsorbido.
- ✓ Se añadirán concentraciones crecientes de polielectrolito a las dispersiones conteniendo proteína adsorbida a la sílice y se determinará la cantidad de biomolécula desorbida.
- ✓ Se estudiará el efecto del tipo de polielectrolito (fuerte o débil), de su peso molecular o del apantallamiento de las interacciones electrostáticas inducido por el aumento de la fuerza iónica.
- ✓ Por último, se estudiará la estabilidad de los recubrimientos de polielectrolito ante lavados sucesivos de las superficies recubiertas.



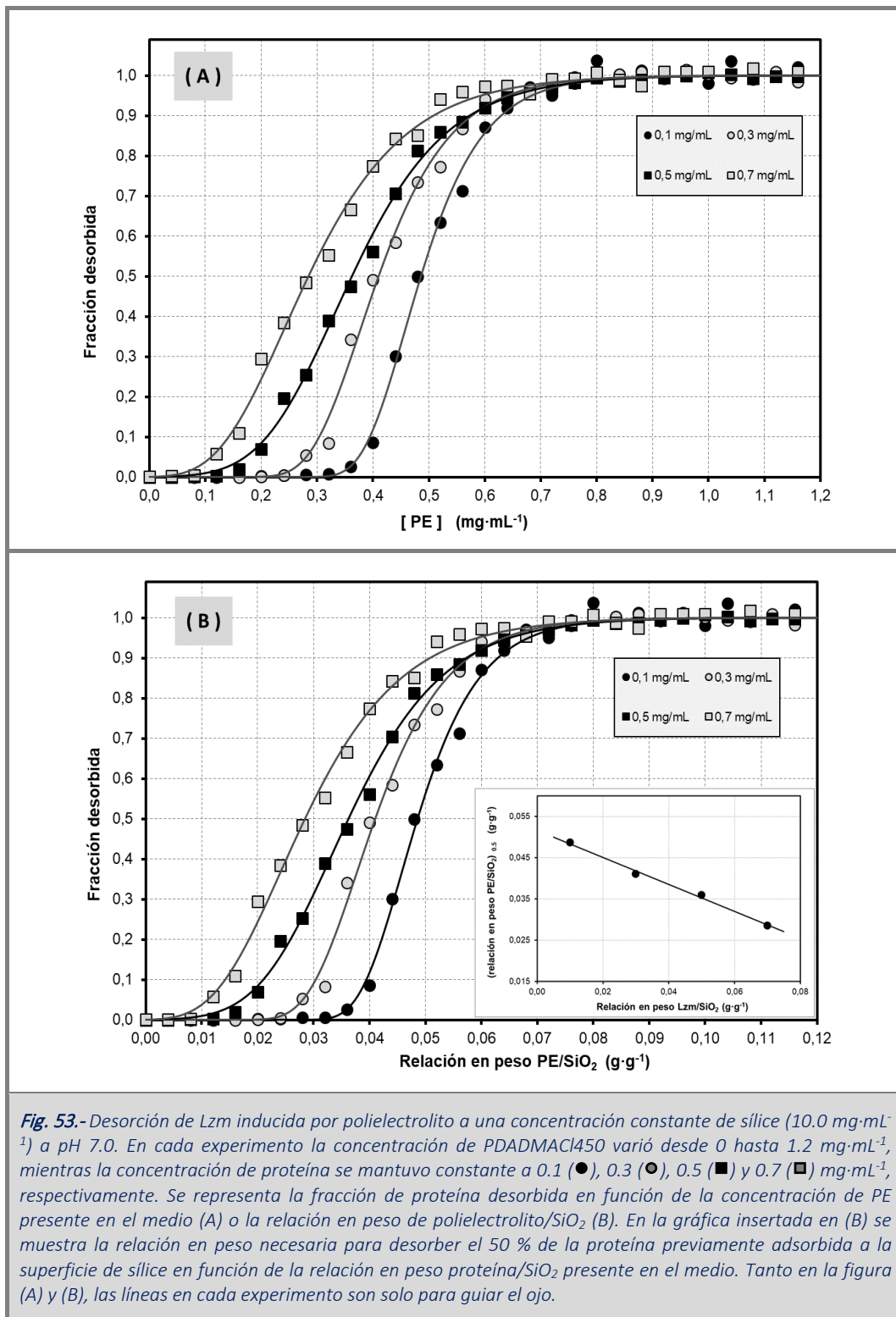
La proteína modelo elegida ha sido la Lzm. Existen varias razones que avalan esta elección. La Lzm es una proteína catiónica (pI ~ 9.3) y mantiene una elevada carga positiva (alrededor de +8) a pH 7.0<sup>223</sup>. La adsorción de Lzm en las superficies de sílice se ha estudiado profusamente tanto desde el punto de vista experimental<sup>216,217,224,225</sup> como teórico<sup>226,227</sup>.

#### 4.1.4.- Resultados y discusión

##### *Desorción de Lzm previamente adsorbida sobre una superficie de sílice mediante el uso de polielectrolitos.*

La adsorción de Lzm sobre partículas de sílice Cab-o-Sil ha sido previamente estudiada en detalle, determinando que el proceso de unión de la Lzm sobre la nanopartícula es reversible, con una constante de equilibrio de desorción ( $K_D$ ) de  $0.0061 \pm 0.0022 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  y un recubrimiento máximo de superficie ( $q_{\text{máx}}$ ) de  $1.1 \text{ mg}$  de proteína por  $\text{m}^2$  de superficie a pH 7.0 (equivalente a  $0.23 \text{ mg}$  de proteína por  $\text{mg}$  de sílice)<sup>216</sup>. La capacidad para desorber la proteína previamente adsorbida sobre la superficie de sílice ha sido analizada utilizando un polielectrolito catiónico, PDADMACl, con peso molecular promedio de  $450 \text{ kD}$ . Estos resultados se muestran en la Fig. 53. En el panel A se muestra la fracción de proteína desorbida en función de concentraciones crecientes de PDADMACl para cuatro experimentos diferentes. Para cada uno de los experimentos, la concentración de Lzm se mantuvo constante a  $0.1, 0.3, 0.5$  y  $0.7 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  respectivamente, mientras que la concentración de sílice se mantuvo constante para todos ellos ( $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Estas condiciones experimentales fueron elegidas para asegurar la completa adsorción de la Lzm sobre las nanopartículas de sílice en base al grado de recubrimiento en masa citado anteriormente ( $0.23 \text{ mg}\cdot\text{mg}^{-1}$ ). Esto último queda confirmado al no encontrar proteína en el sobrenadante en ausencia de polielectrolito (ordenada en el origen para  $[\text{PDADMACl}] = 0$ ). Cuando se realizaron experimentos utilizando concentraciones de proteína superiores (por encima de  $0.7 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , manteniendo la sílice a  $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) no se produce la completa adsorción de esta, iniciándose el experimento de adsorción con una cierta fracción de proteína libre en disolución incluso en ausencia de polielectrolito.

Para el experimento realizado con proteína a más baja concentración ( $0.1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), la proteína no es detectada en el sobrenadante hasta que se alcanza una concentración de polielectrolito alrededor de  $0.32 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Para los restantes experimentos que se muestran, la concentración mínima de polielectrolito a la cual se inicia la desorción de proteína disminuye a medida que aumenta la concentración de proteína adsorbida previamente, siendo de  $0.04 - 0.05 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  para el de mayor concentración de proteína probada. En todos los casos, a medida que la concentración de polielectrolito aumenta, se produce un aumento en la cantidad de proteína liberada de la superficie.



En el panel B de la Fig. 53 se muestra la fracción de proteína liberada frente a la relación en peso de polielectrolito/sílice para explicar mejor el proceso que tiene lugar. Para cada experimento, a bajas concentraciones de polielectrolito no se produce la liberación de proteína. Esto es debido a que, con las proporciones de proteína y sílice utilizadas, la superficie sólida no queda completamente recubierta por la

proteína. En estas condiciones, las primeras moléculas de polielectrolito se unirán preferentemente a los sitios libres de la superficie expuestos al disolvente ya que mostrarán una mayor afinidad por estos. Una vez que el polielectrolito ha saturado los sitios libres, empieza a liberar moléculas de proteína de la superficie. Para cada uno de los experimentos, a medida que la concentración de polielectrolito aumenta se produce una mayor liberación de proteína de la superficie de sílice, cuya liberación presenta forma sigmoïdal. La liberación completa de la proteína se consigue cuando se alcanza un valor entre 0.08 – 0.09 mg de PDADMACI por mg de sílice para el experimento donde la concentración de proteína adsorbida fue de 0.7 mg·mL<sup>-1</sup>. Hemos determinado la cantidad máxima de polielectrolito necesaria para recubrir la superficie de sílice en ausencia de proteína obteniendo un valor de 0.076 mg·mg<sup>-1</sup> a pH 7.0, siendo ambos valores parecidos dentro del error experimental.

En la figura insertada en el panel (B) de la Fig. 53–B se muestra la relación entre la cantidad de polielectrolito necesario para desorber el 50% de la proteína inicialmente adsorbida que resulta disminuir linealmente con la concentración total de proteína. Este comportamiento parecería indicar que la constante de adsorción del polielectrolito a la superficie de sílice es órdenes de magnitud superior a la mostrada por la proteína. En estas condiciones, la cantidad total de polielectrolito necesaria para cubrir toda la superficie sólida sería prácticamente la misma tanto en presencia como en ausencia de proteína adsorbida.

Si la constante aparente de desorción (el inverso de la constante de adsorción) para el PDADMACI en presencia de proteína es mucho menor que la concentración de polielectrolito, la adsorción del polielectrolito sobre la superficie debería de ser estequiométrica necesitando un exceso mínimo en la concentración de polímero para completar el recubrimiento de la superficie (y por consiguiente la desorción completa de la Lzm). La liberación de la proteína tiene lugar una vez que el polielectrolito ha ocupado los huecos libres que no habían sido ocupados previamente por moléculas de proteína.

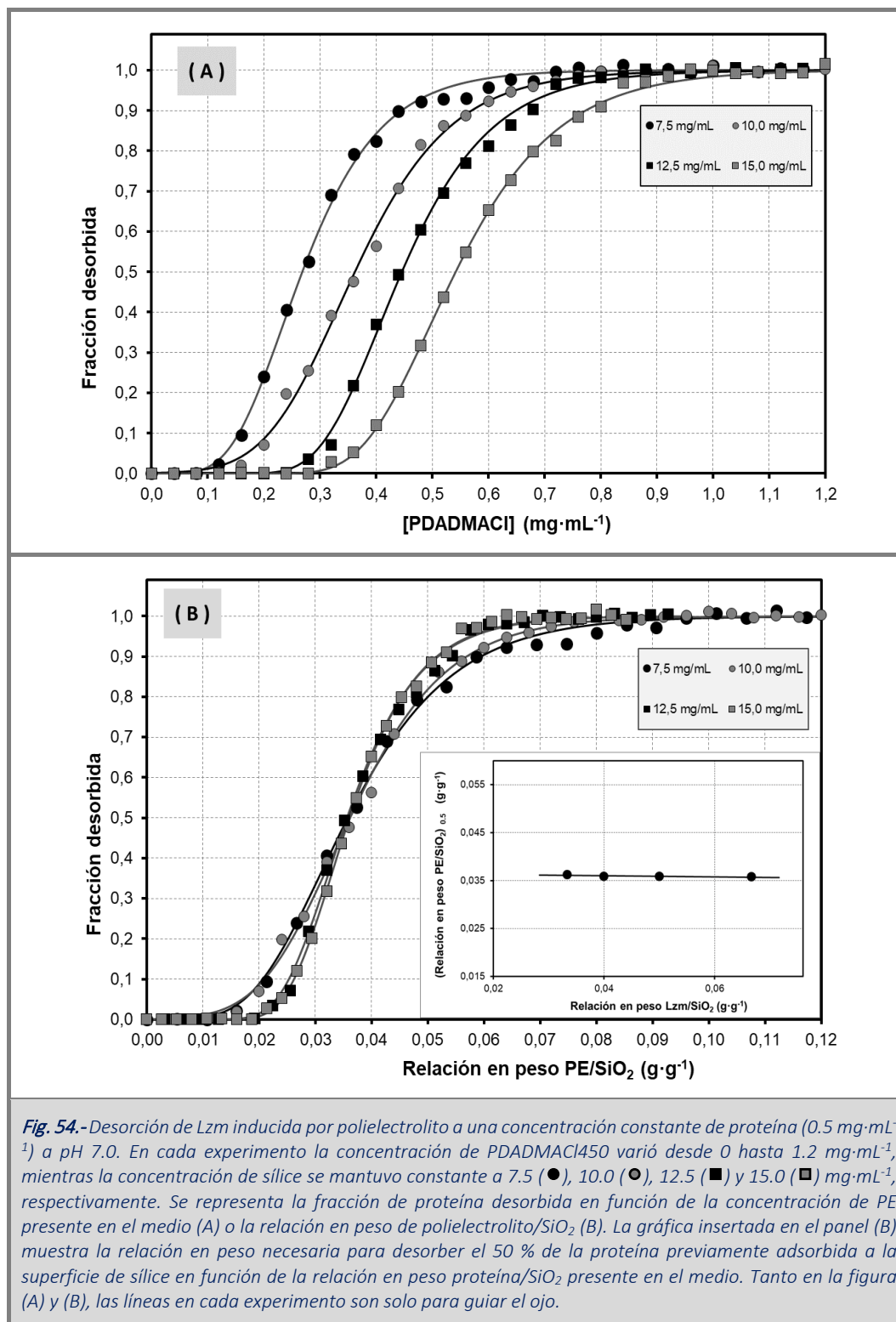
El grado de recubrimiento de la superficie de sílice por la proteína es tanto mayor cuanto mayor sea la concentración total de proteína presente en el medio en el momento de la adsorción (manteniendo constante la concentración de sílice, 10 mg·mL<sup>-1</sup>). Como consecuencia, al añadir polielectrolito a la dispersión conteniendo sílice parcialmente recubierto por Lzm, la desorción de la proteína se inicia una vez la superficie de sílice expuesta al disolvente (no recubierta por Lzm) queda saturada por polielectrolito. Por tanto, es lógico que el inicio de la desorción de proteína se detecte a concentraciones de polielectrolito proporcionalmente más bajas para las dispersiones que contienen mayor cantidad de proteína (menor porcentaje de superficie expuesta al disolvente). Del mismo modo, la desorción del 50 % de la cantidad de proteína adsorbida a la superficie de sílice requiere cantidades de polielectrolito menores a medida que el grado de recubrimiento de la superficie con Lzm aumenta (ver gráfica insertada en Fig. 53-B).

Sin embargo, la liberación total de la proteína resulta ser prácticamente independiente del grado de recubrimiento previo de la superficie (cantidad de proteína inicialmente adsorbida). De acuerdo con los datos presentados en la Fig. 53-B, la concentración de polielectrolito necesaria para desorber el 99 % de la proteína inicialmente adsorbida sobre la superficie de sílice resultó ser 0.084 mg de polímero por mg de sílice con una desviación estándar de 0.002 para los cuatro experimentos presentados en la Fig. 53. Este valor es muy cercano a la cantidad de polielectrolito adsorbida sobre la superficie de sílice en ausencia de proteína, 0.076 mg·mg<sup>-1</sup>. Consecuentemente, ya que la cantidad de PDADMACl necesaria para recubrir completamente la superficie de sílice es prácticamente independiente de la cantidad de proteína adsorbida.

Para entender mejor el proceso de competición, realizamos otra serie de experimentos donde caracterizamos la desorción inducida por PDADMACl de una cantidad constante de Lzm (0.5 mg·mL<sup>-1</sup>), adsorbida sobre diferentes cantidades de sílice (desde 7.5 a 15.0 mg·mL<sup>-1</sup>). Al igual que antes, seleccionamos condiciones donde el grado de recubrimiento de la proteína sobre la superficie es bajo, asegurando así que se produce la completa adsorción de ésta. Estos resultados se muestran en la Fig. 54. En el panel A, se muestra la fracción de proteína liberada en función de la concentración total de PDADMACl presente en el medio. En primer lugar, no se detecta Lzm en el sobrenadante en ausencia de polielectrolito. El aumento en la concentración de polielectrolito presente en el medio induce la liberación de la proteína previamente adsorbida. Debido a la diferente concentración de sílice utilizada, desde 7.5 hasta 15 mg·mL<sup>-1</sup>, el porcentaje de sílice recubierto por la proteína se reduce desde el 30% aproximadamente hasta menos del 15 %. Como se comentó anteriormente, la concentración de polielectrolito necesaria para iniciar la desorción de la proteína de la superficie está relacionada con la cantidad de sílice no recubierta por Lzm y, por tanto, expuesta al disolvente. Tal y como muestra la Fig. 54-A, el inicio de la liberación de la proteína a la disolución comienza a concentraciones de polielectrolito tanto más bajas cuanto menor es la concentración total de sílice (manteniendo constante la concentración de proteína, 0.5 mg·mL<sup>-1</sup>), esto es, cuanto mayor es el grado de recubrimiento de la superficie por la proteína. La concentración de polielectrolito necesaria para liberar el 50 % de la proteína inicialmente adsorbida a la superficie presenta la misma tendencia ya que este valor no solo incluye la cantidad de polielectrolito que compite con la proteína por la superficie sino también el polielectrolito que ha sido adsorbido sobre las zonas de superficie libre expuestas al disolvente.

En el panel B se muestra la fracción de proteína liberada frente a la concentración de polielectrolito normalizado por la concentración de sílice utilizada (relación en peso de polielectrolito/sílice). La forma sigmoidal de las curvas es parecida en todos los casos, aunque algunas de sus características están relacionadas con las condiciones experimentales de cada experimento en particular, como es la pendiente cerca del punto de inflexión. El aumento en la fracción de proteína desorbida con la concentración de

polielectrolito se correlaciona con la relación en masa de proteína a sílice para cada uno de los experimentos realizados (en otras palabras, con el porcentaje de superficie inicialmente recubierta por la proteína).

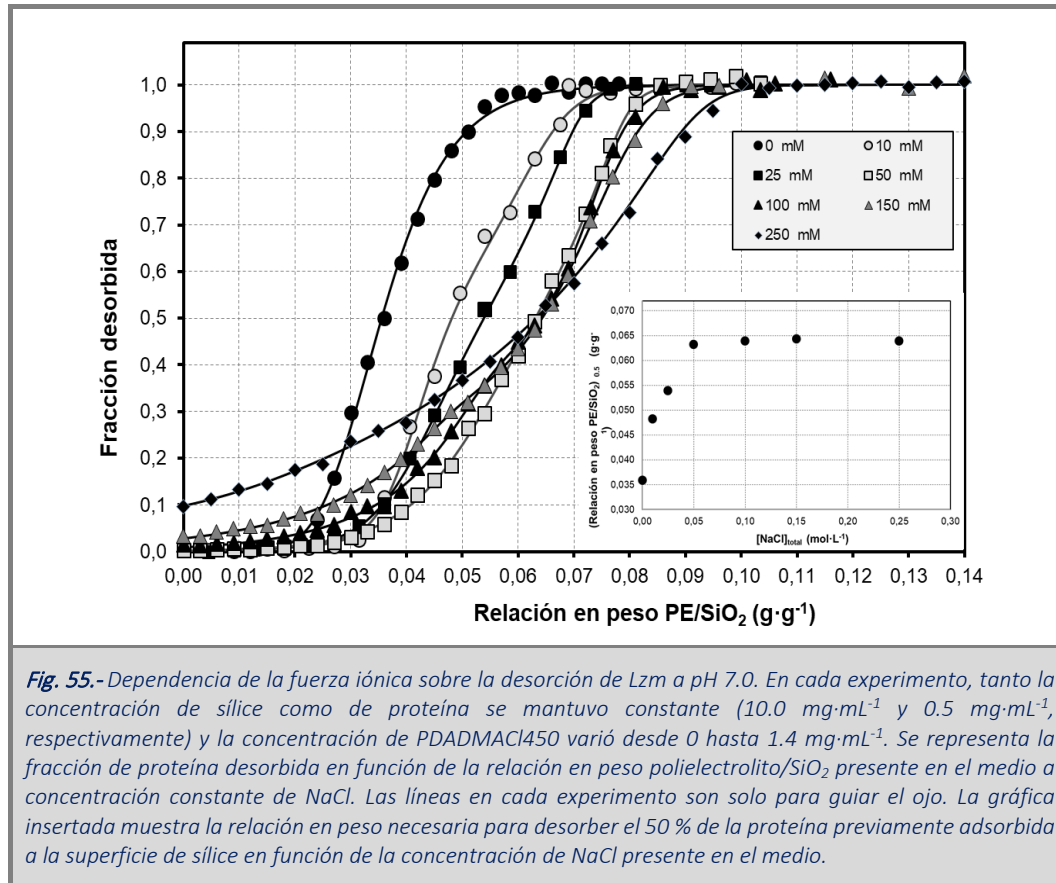




Como era de esperar por los resultados mostrados anteriormente, la relación en peso mínima de polielectrolito/sílice (Fig. 54-B) necesaria para empezar a desplazar a la proteína de la superficie refleja el porcentaje inicial de superficie de sílice libre expuesta al disolvente (no cubierta por proteína). Teniendo en cuenta que se necesitan 0.23 mg de Lzm para recubrir 1 mg de estas mismas partículas<sup>216</sup>, para los experimentos llevados a cabo a 7.5, 10, 12.5 y 15 mg de sílice por mL de dispersión conteniendo 0.5 mg·mL<sup>-1</sup> de Lzm, el porcentaje de superficie de sílice expuesta será de 71, 78, 83 y 85 %, respectivamente. Ya que, como ya se ha discutido, las moléculas de polielectrolito se deberían adsorber con una mayor afinidad a las zonas libres de la superficie, al comienzo de la titulación no se detectará proteína adsorbida (parte plana inicial de la sigmoidal). Por otro lado, la liberación de la proteína inducida por el polielectrolito resulta ser completa con una relación en peso cercano a 0.08 -0.09. Este valor es similar al obtenido en los experimentos mostrados en la Fig. 53 y muy cercano a la cantidad de PDADMACl necesaria para recubrir completamente una unidad de masa de estas partículas (0.076 mg·mg<sup>-1</sup>). En la gráfica insertada en el panel B de la Fig. 54 se muestra la relación en masa de polielectrolito a sílice necesaria para liberar el 50 % de la proteína previamente adsorbida en función de la relación Lzm/sílice en cada uno de los experimentos. Estos valores son casi invariantes con la relación en peso Lzm/sílice obteniéndose un valor promedio de 0.036 ± 0.002 mg de PDADMACl por mg de sílice con una ligera dependencia sobre el contenido de sílice de las dispersiones (entre 7.5 y 15 mg·mL<sup>-1</sup>). Por tanto, estos resultados demuestran que la afinidad con la que se adsorbe el polielectrolito sobre la superficie de sílice es mucho mayor que la de la proteína. Por lo tanto, el tratamiento de superficies de sílice con PDADMACl podría evitar la adsorción de Lzm, ya que la proteína no debería poder competir por la superficie puesto que su constante de adsorción es mucho menor.

Tanto la adsorción de PDADMACl sobre la superficie de sílice como la de la proteína se espera que estén dirigidas principalmente mediante atracción electrostática entre especies de carga opuesta<sup>225</sup>. Como consecuencia, parece adecuado analizar la influencia de la fuerza iónica sobre la capacidad del polielectrolito para liberar la proteína adsorbida. En la Fig. 55 se presenta el efecto del incremento en el contenido de sal en las dispersiones sobre la liberación de la Lzm en función de la concentración de polielectrolito añadido. En los 7 experimentos llevados a cabo, tanto la sílice como la proteína se mantienen constantes (a 10 y 0.5 mg·mL<sup>-1</sup>, respectivamente) y la concentración de PDADMACl fue variando desde 0 hasta 1.4 mg·mL<sup>-1</sup>. En primer lugar, debemos de tener en cuenta que el aumento de la fuerza iónica en la disolución debería debilitar la interacción electrostática entre la superficie cargada negativamente de la sílice y la proteína cargada positivamente a pH 7 debido al apantallamiento parcial que se produce. Los resultados presentados en la Fig. 55, en ausencia de polielectrolito, muestran que mientras la concentración de NaCl en el medio es inferior a 100 mM no se detecta Lzm en el sobrenadante, sin embargo a concentraciones de sal mayores (150 y 250 mM de NaCl) un porcentaje de proteína permanece en disolución incluso en ausencia inicial de polielectrolito (sobre el 3 al 10 %, respectivamente). Este hecho

está en consonancia con la disminución de la constante de adsorción de la proteína por la superficie de sílice debido al incremento de la fuerza iónica, desplazándose el equilibrio hacia la desorción parcial de la proteína.



A medida que el contenido de sal aumenta, las curvas para la fracción de proteína liberada se desplazan hacia mayores relaciones en peso de polielectrolito/sílice con una disminución paralela sobre la pendiente de su crecimiento sigmoidal. A pesar de esto, cabe mencionar que, incluso en presencia de 250 mM de NaCl, la liberación de la proteína se completa para una relación en peso de polielectrolito/sílice de  $0.11 - 0.12 \text{ mg}\cdot\text{mg}^{-1}$ . Este valor es mayor que el que necesitamos para conseguir la completa desorción de la Lzm en ausencia de NaCl (alrededor de  $0.09 \text{ mg}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) pero no es muy diferente del necesario para recubrir completamente la superficie de sílice por PDADMACI en ausencia de proteína ( $0.076 \text{ mg}\cdot\text{mg}^{-1}$ ).

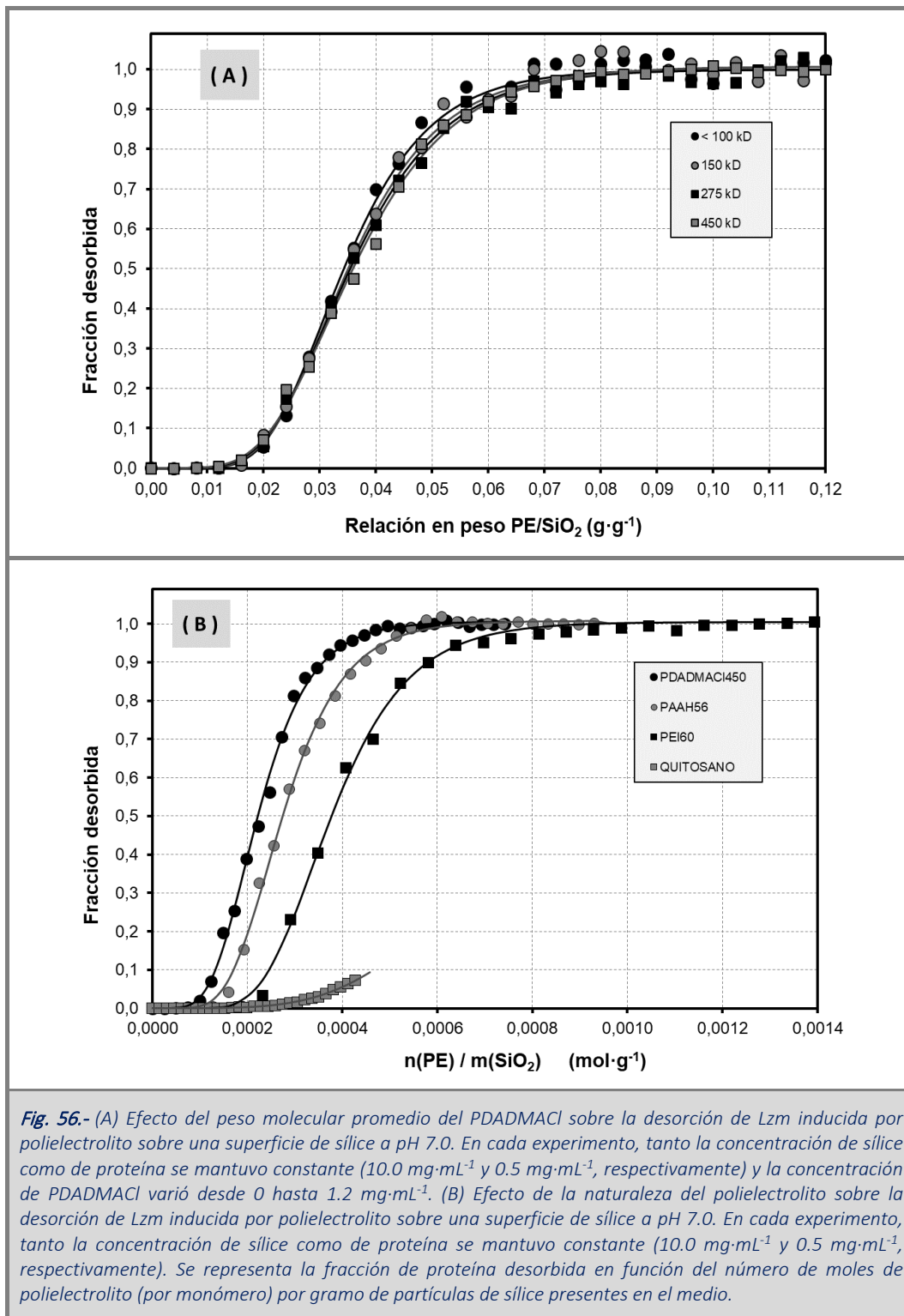
En la gráfica insertada en la Fig. 55 se presenta la relación en masa de polielectrolito/sílice necesaria para liberar el 50 % de la proteína adsorbida sobre la superficie sólida a diferente concentración de sal. A baja fuerza iónica hay un fuerte aumento en este valor con la variación en la concentración de sal (desde  $0.036 \text{ mg}\cdot\text{mg}^{-1}$  a 0 mM de NaCl hasta  $0.063 \text{ mg}\cdot\text{mg}^{-1}$  a 50 mM). Aunque el aumento de la fuerza iónica induce una disminución en el crecimiento de la curva sigmoidal alrededor del punto de inflexión, se obtiene un valor

virtualmente constante ( $0.064 \pm 0.001 \text{ mg}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) cuando la concentración de NaCl aumenta desde 50 a 250 mM.

Es claro que el incremento en la fuerza iónica de la disolución disminuye la afinidad tanto de la proteína como del polielectrolito por la superficie cargada negativamente. Sin embargo, incluso en presencia de concentraciones de sal moderadas, la constante de adsorción intrínseca para el PDADMACI sobre la superficie de sílice es todavía mucho mayor que el de la Lzm. Estos resultados muestran que el recubrimiento de la partícula con el polielectrolito debería inhibir de forma satisfactoria la adsorción de proteína sobre la superficie sólida incluso en presencia de concentraciones moderadas de sal.

Además, hemos estudiado la influencia del tamaño del polielectrolito sobre su capacidad de recubrir la superficie de sílice y por tanto inhibir la adsorción de Lzm. En la Fig. 56, se muestra la fracción de proteína liberada por la presencia de PDADMACI frente a la relación en masa de polímero/sílice. En cada uno de los cuatro experimentos tanto la concentración de sílice como de proteína permanecen constante (10 y 0.5  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , respectivamente) mientras la concentración de polielectrolito aumenta desde 0 hasta 1.2  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . La capacidad para desplazar a la proteína por PDADMACI de distinto tamaño resulta ser muy similar. El comienzo en la desorción de proteína fue detectado a una relación en masa de polielectrolito/sílice alrededor de  $0.012 \text{ mg}\cdot\text{mg}^{-1}$  y una completa liberación de la proteína de la superficie se alcanza a  $0.08 - 0.09 \text{ mg}\cdot\text{mg}^{-1}$ . El uso de polielectrolitos de distinto peso molecular sobre la liberación de la proteína tiene un efecto muy pequeño: la relación en peso de polielectrolito/sílice necesaria para liberar el 50 % de la proteína inicialmente adsorbida disminuye ligeramente pero de forma monótonica desde 0.0359 para PDADMACI de 450kD a  $0.0343 \text{ mg}\cdot\text{mg}^{-1}$  para el polímero de menor peso molecular (< 100 kD), con los polielectrolitos de peso molecular intermedio (150 y 275 kD) siguiendo la misma tendencia ( $0.0350$  y  $0.0354 \text{ mg}\cdot\text{mg}^{-1}$ , respectivamente).

Como ya se ha mencionado, el recubrimiento efectivo de la superficie de sílice con polielectrolitos tiene lugar principalmente debido a la interacción electrostática atractiva entre las dos especies interaccionantes. Por lo tanto, otro polielectrolito catiónico puede también ser adecuado para recubrir la superficie de sílice. Su capacidad relativa para inhibir la adsorción dependerá de su constante aparente de adsorción en presencia de cierta concentración de proteína, lo que deberá relacionarse con su constante de adsorción intrínseca (en ausencia de proteína) y la constante de adsorción de la proteína.



Hemos probado la capacidad para desplazar la Lzm de la superficie de sílice con tres polielectrolitos diferentes, siendo estos el hidrócloruro de polialilamina de 56 kD, PAAH56, la polietilenimina ramificada de 60 kD, PEI60, y el quitosano de bajo peso molecular. Tanto la sílice como la proteína permanecen constantes (10 y 0.5 mg·mL<sup>-1</sup>, respectivamente) y la concentración de polielectrolito aumenta desde 0 hasta 1- 1.2 mg·mL<sup>-1</sup> (excepto para el quitosano, cuya máxima concentración alcanzada fue de 0.75 mg·mL<sup>-1</sup>

debido a su baja solubilidad a pH 7). Estos resultados se muestran en la Fig. 56-B. Debido a las grandes diferencias de peso molecular entre los monómeros cargados de cada polielectrolito, hemos representado la fracción de proteína liberada en función del número de moles de monómero de polielectrolito por gramo de sílice presente en la dispersión. Esto permitirá comparar de forma más precisa entre los distintos polielectrolitos usados en función del efecto de la concentración de los monómeros cargados.

PDADMACI450, PAAH56 y PEI60 compiten de forma satisfactoria con la proteína por la superficie de sílice desplazándola de forma completa. PDADMACI450 es el más eficiente para la desorción de la proteína (en base molar de monómero), necesitando alrededor de 0.081 mmoles de polímero por gramo de sílice para iniciar el desplazamiento y completando su liberación al alcanzar  $0.5 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$ . Para PAAH56 y PEI60, la desorción de proteína fue iniciada cuando la cantidad de polielectrolito en la dispersión alcanzó 0.11 y 0.18  $\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}$ , respectivamente. Es importante mencionar que todos los experimentos fueron hechos con la misma cantidad de proteína y de sílice por lo que la cantidad inicial de grupos expuestos (no cubiertos por la proteína) son los mismos para los cuatro experimentos.

De forma experimental obtenemos que la  $q_{\text{máx}}$  para la adsorción de PDADMACI450, PAAH56 y PEI60 sobre la sílice es de 0.076, 0.054 y 0.044 gramos de polielectrolito por gramo de sílice (equivalente a 0.455, 0.577 y 1.02 moles de monómero por gramos de sílice, respectivamente). Estos valores son muy similares al número de moles de cada polielectrolito necesarios para liberar el 99 % de la proteína adsorbida (0.518, 0.609 y 1.11 moles de monómero de PDADMACI450, PAAH56 y PEI60 por gramo de sílice, respectivamente) Por lo tanto, podemos concluir que se necesita un pequeño exceso de polielectrolito para liberar la proteína adsorbida y recubrir completamente la superficie de sílice.

El quitosano solo desplaza parcialmente a la proteína a la mayor concentración de polielectrolito probada ( $0.75 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Como hemos mencionado antes, la capacidad del polielectrolito para competir de forma satisfactoria con la proteína por la superficie depende de su constante de adsorción relativa. El quitosano a pH 7 presenta una baja densidad de carga positiva debido a su alto valor de  $pK_a$  ( $6.4 - 6.5$ )<sup>228</sup>, por lo que nos indica que solo el 20 – 24 % de los grupos amino se encuentran protonados. Por esta razón, el quitosano presenta una baja solubilidad a pH neutro que aumenta a medida que disminuye el pH. Por lo tanto, la constante aparente de adsorción para el quitosano sobre la superficie sólida en presencia de la proteína se prevé que será mucho menor que cualquiera de los otros polielectrolitos probados. En consecuencia, la liberación de la proteína por el quitosano necesitaría una mayor concentración de este para asegurar la desorción efectiva de la Lzm.

*Efecto del recubrimiento de las partículas de sílice sobre su tamaño y su densidad de carga superficial*

Hemos caracterizado las partículas de sílice recubiertas con polielectrolito y sin recubrir mediante DLS. En primer lugar, el tamaño de las partículas sin recubrir medidas a 50 mM de NaCl (expresado como diámetro hidrodinámico, 188 nm) no se ve afectado, dentro del error experimental, con respecto a las partículas recubiertas con PDADMACI450, PAAH56 y PEI60 (195, 186 y 172 nm). Las partículas de sílice completamente saturadas con Lzm tienen gran tendencia a aglomerar debido a la disminución de la carga expuesta al disolvente como consecuencia de la compensación de cargas entre la partícula y la proteína. Debido a esto, el tamaño de la partícula cuando se encuentra saturada con Lzm es demasiado impreciso como para ser medido por DLS y varió entre 2 y 6  $\mu\text{m}$ .

Cabe destacar que cuando las partículas se encontraban saturadas con Lzm y se añade cualquiera de los tres polielectrolitos utilizados para desorber y por tanto recubrir, el tamaño que se obtiene es similar a cuando se recubre directamente con polielectrolito, siendo estos de 184, 183 y 169 nm para las partículas recubiertas con PDADMACI450, PAAH56 y PEI60, respectivamente.

Para confirmar el recubrimiento de las partículas con los tres polielectrolitos usados, medimos su potencial Z (expresado en mV) como una medida directa de densidad de carga de la superficie modificada. Las partículas sin recubrir presentan un potencial zeta de  $-24.3$  mV a pH 7, de acuerdo a la deprotonación de los grupos silanoles. A este mismo pH, tras recubrir con PDADMACI450, PAAH56 y PEI60, las partículas presentan ahora una elevada carga positiva, siendo de  $+44.6$ ,  $33.4$  y  $41.4$  mV, respectivamente, lo cual confirma que el recubrimiento de la superficie de sílice con los tres polielectrolitos se lleva a cabo de forma adecuada.

*Efecto de lavados sobre la estabilidad del recubrimiento con polielectrolito*

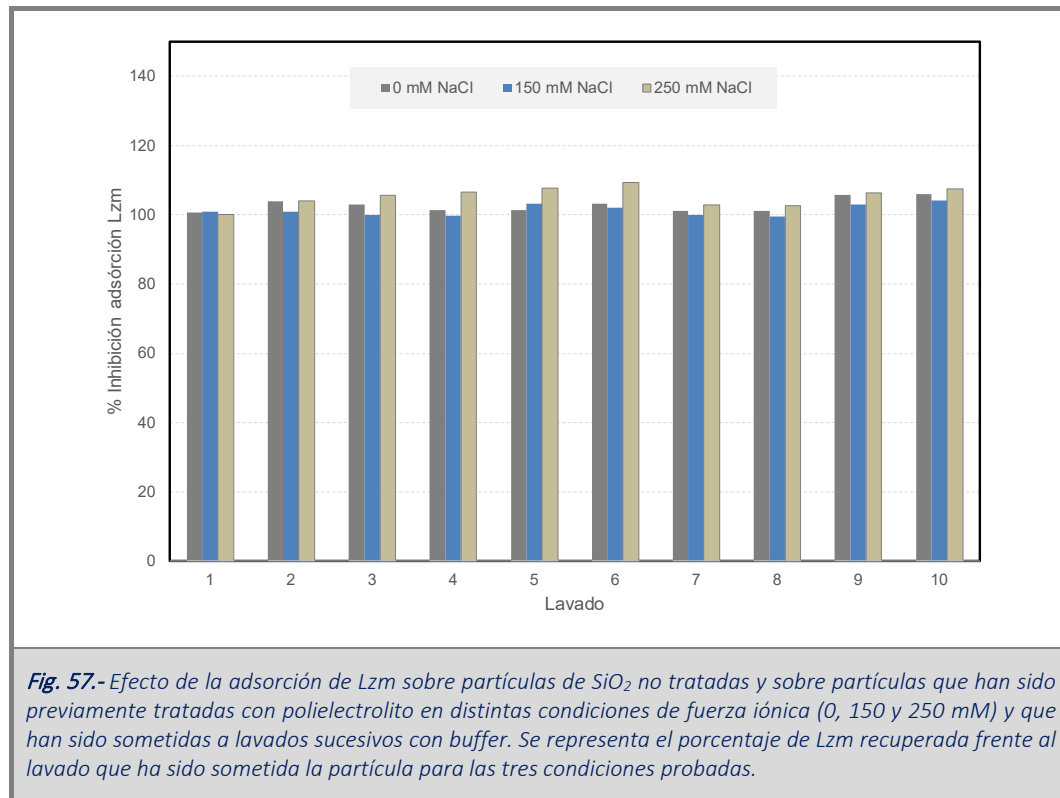
Una vez establecido que el recubrimiento de superficies de sílice por un polielectrolito catiónico de alta densidad de carga (tal como el PDADMACl, por ejemplo) inhibirá de forma efectiva la adsorción de proteínas, resulta de interés analizar la estabilidad de este recubrimiento frente a sucesivos lavados con tampón. Para ello, se han realizado lavados sucesivos de las partículas de sílice recubiertas con PDADMACl, utilizando la propia Lzm como sonda. Si la dilución provoca la disociación de parte del polielectrolito, áreas de la superficie sólida quedarían al descubierto, expuestas al disolvente. Si la disolución contuviese Lzm, ésta se adsorberá a la superficie de sílice no cubierta por el polielectrolito. Esta situación provocaría una disminución en la cantidad de proteína en el sobrenadante que nos permitiría cuantificar la cantidad de polielectrolito liberado de la superficie como consecuencia de la dilución.

Se prepararon dispersiones de sílice ( $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) recubiertas con un exceso de PDADMACl. Tras retirar el exceso de polielectrolito, el contenido de la dispersión se determinó por el método del residuo seco y se ajustó a una concentración de  $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  (en 10 mM Hepes, pH 7). Cantidades conocidas de Lzm se añadieron a alícuotas de esta muestra (lavado n° 0), se incubaron durante 16 h y, tras centrifugar, la cantidad de proteína en el sobrenadante se determinó espectrofotométricamente.

A continuación, la dispersión (50 mL) fue centrifugada, el sobrenadante descartado y la fase sólida resuspendida en el mismo buffer. Tras determinar su contenido, la concentración se ajustó a  $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  (en 10 mM Hepes, pH 7: lavado n° 1). Alícuotas de esta dispersión fueron tratadas con Lzm (de forma idéntica a como se ha comentado para la muestra del lavado n° 0). El proceso se repitió hasta conseguir un total de 10 lavados sucesivos.

El proceso se realizó en paralelo para muestras obtenidas y resuspendidas en disoluciones 10 mM Hepes, pH 7.0 pero conteniendo distintas concentraciones de NaCl (0, 150 y 250 mM).

Los resultados de estos experimentos se presentan en la Fig. 57. La concentración de proteína en el sobrenadante permaneció constante e igual a la concentración inicial tras cada uno de los lavados tanto para las muestras preparadas a baja fuerza iónica como las que contenían cantidades moderadas de sal. Como consecuencia, podemos afirmar que no se detecta desorción del polielectrolito incluso tras un total de 10 ciclos de centrifugación y redispersión. Es conveniente indicar que los tratamientos (un tanto agresivos) a los que se somete a la misma muestra (redispersión, sonicación y centrifugación) hace que los errores en la determinación de la concentración de proteína aumenten con el número de lavados. En la Fig. 57 se observa una tendencia de esa concentración a aumentar (nunca a disminuir por debajo del 100 %). La turbidez residual de las muestras se observó que aumentaba con el número de lavados lo que obligaba a corregir los espectros de absorción de la proteína debido a la dispersión residual creciente de las muestras. Esta puede ser la razón más plausible de este artefacto experimental.



#### 4.2.5.- Conclusiones

El tratamiento de superficies de sílice con polielectrolitos de alta densidad de carga tales como el PDADMACl, el PAAH y la PEI inhiben eficazmente la adsorción de proteínas catiónicas. La formación de una capa de polielectrolito alrededor de la superficie, cargada negativamente, es estable incluso cuando se someten a lavados intensivos con disoluciones tamponadas en presencia de concentraciones moderadas de sal. Estos resultados podrían ser útiles en el diseño de nuevas estrategias para minimizar las interacciones indeseadas inducidas por superficies sólidas sobre biomoléculas que pueden poner en peligro su integridad biológica.



## 4.2.- Capítulo 2 - Modulación de la capacidad de adsorción de partículas recubiertas por polielectrolitos



#### 4.2.1.- Introducción

En capítulos anteriores se discutió cómo la adsorción de proteínas a superficies sólidas (tanto hidrofóbicas como hidrofílicas) inducía una disminución en su estabilidad conformacional. Este hecho puede tener efectos negativos sobre aspectos como su actividad enzimática<sup>229</sup> o la mayor tendencia de la proteína a agregar al desorberse desde estados parcialmente plegados que, al exponer gran cantidad de grupos hidrofóbicos, favorecerían la formación de estados multiméricos en los que las interacciones proteína-proteína reducirían la energía libre al evitar la hidratación de dichas zonas apolares de la proteína<sup>36</sup>.

En particular, en el capítulo anterior se demostró cómo el recubrimiento de las superficies de sílice con polielectrolitos catiónicos de alta densidad electrónica (PDADMACI, PAAH y PEI) impedía la adsorción de proteínas cargadas positivamente y, como consecuencia, inhibía aquellos procesos que, inducidos por su adsorción a superficies sólidas, podrían afectar a su identidad biológica.

Sin embargo, el recubrimiento de las partículas coloidales con polielectrolitos ha sido ampliamente utilizado con dos objetivos fundamentales. Por un lado, el aumento de la densidad de carga superficial de la partícula resultante y, por otro, esta misma carga ofrece a ligandos de carga opuesta la posibilidad de adsorberse. Por tanto, el recubrimiento de superficies sólidas con polímeros cargados se ha convertido en una estrategia habitual para dotar a las partículas de una mayor capacidad de capturar, adsorber, transportar y liberar ligandos de muy distinta naturaleza en campos tan dispares como el desarrollo de sensores<sup>27,230</sup>, la implementación de materiales biocompatibles<sup>28</sup>, la captura de contaminantes<sup>231</sup> o el diseño de materiales mixtos dirigidos al transporte y liberación controlada de fármacos<sup>26</sup>.

Por tanto, la optimización de la adsorción de ligandos cargados a los recubrimientos de las partículas formados por polielectrolitos de carga opuesta tendría consecuencias inmediatas en mejoras operacionales en la aplicabilidad de estos materiales.

En el presente capítulo presentaremos una estrategia que permite modular la cantidad de ligando que se adsorbe sobre la superficie de recubrimiento haciendo uso de la dependencia de su densidad superficial de carga con el pH y la fuerza iónica. Como ejemplo, hemos trabajado con partículas de sílice y un polielectrolito catiónico fuerte (PDADMACI) cuya carga es independiente del pH del medio.

Conviene recordar que la superficie de las partículas de sílice utilizadas (Cab-o-Sil, de unos 180 nm de radio hidrodinámico y una superficie específica de  $206 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ ) presenta un PZC de 2.5 – 3.0. La deprotonación de los grupos silanoles localizados en la superficie de la partícula justifica el aumento monotónico de su carga negativa a medida que aumenta el pH. A valores de pH superiores a 12, la sílice se vuelve inestable y se depolimeriza lentamente para formar silicato de sodio monomérico.

Por su parte, los polielectrolitos catiónicos se adsorben fuertemente en la superficie de sílice cargada negativamente principalmente a través de la atracción electrostática<sup>172</sup>. Por lo tanto, tanto la afinidad del

polielectrolito como el número de contactos salinos establecidos entre la superficie de sílice sólida y el polielectrolito dependen del pH y la fuerza iónica. Si bien el aumento del pH hace que el polielectrolito catiónico se adsorba más fuertemente a la superficie (dado que la molécula de polímero puede establecer un mayor número de contactos iónicos con la superficie disminuyendo sinérgicamente el cambio de energía libre tras la adsorción), la dependencia del proceso de adsorción con la fuerza iónica parece ser un poco más complicado. Recientemente se ha demostrado que, a un pH dado, la cantidad de polielectrolito catiónico (concretamente, PDADMACI o PVNP: poli (yoduro de 4-vinil-N-metilpiridinio)) adsorbida a la superficie de las partículas de sílice aumenta con la fuerza iónica hasta alcanzar un máximo (alrededor de 200 mM a pH 9) para disminuir monotónicamente para concentraciones de sal más altas<sup>232</sup>. Este comportamiento se ha justificado como una compensación entre el efecto de apantallamiento que la fuerza iónica produce sobre las atracciones electrostáticas (haciéndolas menos intensas) y su efecto favorable en la hidratación hidrofóbica, la cual resulta ser menos desfavorable termodinámicamente al aumentar la presencia de iones cargados en la disolución

#### 4.2.2.- Hipótesis de partida

Partimos de la evidencia que del total de monómeros cargados positivamente del PDADMACI que forman parte del recubrimiento de la partícula de sílice, un porcentaje establecerá contactos de atracción electrostática con la superficie mientras que otros permanecerán expuestos al disolvente.

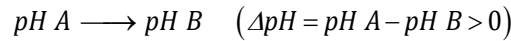
$$(n_+)_{total} = (n_+)_{SiO_2-PE} + (n_+)_{PE, \text{ expuestos}} \quad (n_+ = n_{monómeros(+)} \quad \text{(Ec. 21)}$$

donde  $(n_+)_{total}$  es el número total de monómeros de PDADMACI (polielectrolito, PE) que forman parte del recubrimiento,  $(n_+)_{SiO_2-PE}$ , son los monómeros de PDADMACI en contacto con la superficie de sílice (compensación de cargas) y  $(n_+)_{PE, \text{ expuestos}}$  el número de monómeros de PDADMACI expuestos al disolvente. Son estos últimos los que posibilitan la adsorción de ligandos de carga opuesta (aniónicos) a la superficie de la partícula cargada ahora positivamente.

Nuestra hipótesis de partida se basa en considerar que, durante la formación del recubrimiento sílice-PDADMACI, a medida que aumenta el pH de la disolución aumentará la cantidad de monómeros del polielectrolito en contacto con la superficie sólida, con objeto de compensar la creciente carga negativa de la superficie como consecuencia de la deprotonación de sus grupos silanoles.

$$\left[ (n_+)_{SiO_2-PE} \right]_{pH A} > \left[ (n_+)_{SiO_2-PE} \right]_{pH B} \quad pH A > pH B \quad \text{(Ec. 22)}$$

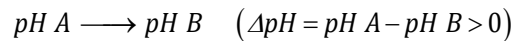
Por tanto, si el recubrimiento de la sílice por PDADMACI se realiza a alto pH (pH A) y tras purificar las partículas (decantación, lavados, sonicación y almacenamiento a pH A), estas partículas se resuspenden en disolución acuosa a un pH inferior (pH B) ( $\Delta\text{pH} = \text{pH A} - \text{pH B} > 0$ ), parte de los monómeros del PDADMACI que estaban en contacto con la superficie de sílice,  $(n_+)_{\text{SiO}_2-\text{PE}}$ , deberán de exponerse al disolvente ya que al disminuir el pH de la disolución, también lo hará la superficie de sílice debido a la protonación parcial de sus grupos silanoles:



$$\left[ (n_+)_{\text{SiO}_2-\text{PE}} \right]_{\text{pH A}} = \left[ (n_+)_{\text{SiO}_2-\text{PE}} \right]_{\text{pH B}} + \left[ (n_+)_{\text{SiO}_2-\text{PE} \rightarrow \text{expuestos}} \right]_{\text{pH B}} \quad (\text{Ec. 23})$$

donde  $\left[ (n_+)_{\text{SiO}_2-\text{PE}} \right]_{\text{pH A}}$  se refiere a los monómeros de PDADMACI unidos a la superficie de sílice a alto pH (pH A),  $\left[ (n_+)_{\text{SiO}_2-\text{PE}} \right]_{\text{pH B}}$  a los que estaban unidos a la superficie a alto pH (pH A) y permanecen unidos a la misma a un pH más bajo (pH B) y  $\left[ (n_+)_{\text{SiO}_2-\text{PE} \rightarrow \text{expuestos}} \right]_{\text{pH B}}$  al de monómeros que estaban unidos a la superficie a pH A y, como consecuencia de la pérdida de carga de la superficie, pasan a estar expuestos al disolvente a pH B.

Por tanto, este cambio de pH provocaría un aumento en el número total de monómeros de PDADMACI expuestos al disolvente y, como consecuencia, en la capacidad de la partícula recubierta de adsorber un mayor número de ligandos de carga opuesta.



$$\begin{aligned} \Delta(n_+)_{\text{expuestos pH B}} &= \left[ (n_+)_{\text{SiO}_2-\text{PE} \rightarrow \text{expuestos}} \right]_{\text{pH B}} > 0 \\ \Delta(n_+)_{\text{expuestos pH B}} &= \left[ (n_+)_{\text{SiO}_2-\text{PE}} \right]_{\text{pH A}} - \left[ (n_+)_{\text{SiO}_2-\text{PE}} \right]_{\text{pH B}} \end{aligned} \quad (\text{Ec.24})$$

ya que al número de moles de monómeros de PDADMACI ya expuestos al disolvente a pH alto (pH A), se le sumarían los que debido al cambio de pH pasan a estar expuestos a pH B (que están unidos a la superficie a alto pH).

Por el contrario, si el recubrimiento de las partículas se realiza a un pH bajo (pH A) y posteriormente se utilizan a un pH más elevado (pH B),  $\Delta\text{pH} = \text{pH A} - \text{pH B} < 0$ , la variación en el número de moles de monómeros de polielectrolito será negativo ya que al aumentar el pH desde pH A hasta pH B, la superficie de sílice aumentará su carga negativa y, como consecuencia, parte de los monómeros de PDADMACI que estaban expuestos a bajo pH pasarán ahora a establecer contacto con la superficie en un intento de compensar las cargas.

$$pH A \longrightarrow pH B \quad (\Delta pH = pH A - pH B < 0)$$

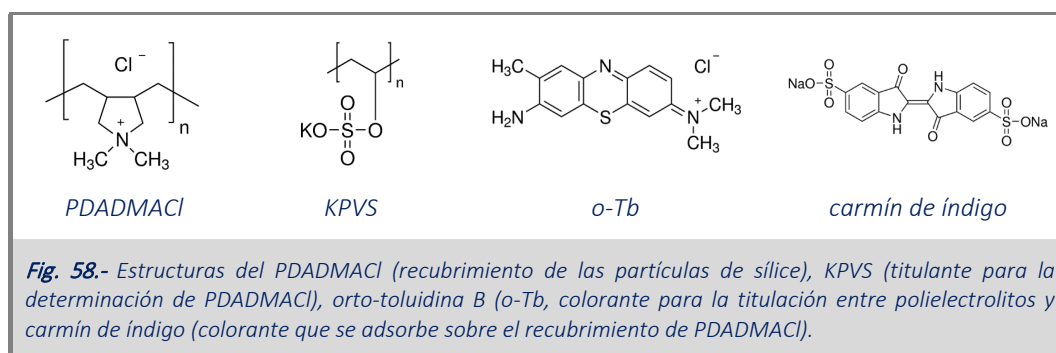
$$\Delta(n_+)_{\text{expuestos}, pH B} = \left[ (n_+)_{SiO_2-PE} \right]_{pH A} - \left[ (n_+)_{SiO_2-PE} \right]_{pH B} < 0$$

$$\left[ (n_+)_{SiO_2-PE} \right]_{pH A} < \left[ (n_+)_{SiO_2-PE} \right]_{pH B}$$
(Ec. 25)

#### 4.2.3.- Estrategia experimental

- ✓ Obtener partículas de sílice recubiertas con PDADMACI a distintos pH (entre pH 3.0 y pH 10.5).
- ✓ Determinar el número de monómeros de PDADMACI expuestos al disolvente al pH en el que se han obtenido las partículas recubiertas,  $(n_+)_{PE, \text{expuestos}, pH A}$ .
- ✓ Determinar el número total de monómeros de PDADMACI que forman parte del recubrimiento,  $(n_+)_{\text{totales}, pH A}$ , tras disolver la partícula de sílice a pH fuertemente alcalino.
- ✓ Confrontar la hipótesis con los datos experimentales: comprobar si la variación del pH entre el pH A (al que se han obtenido las partículas) y el pH al cual se resuspenden las partículas para su uso (pH B) está relacionado con el aumento o disminución (dependiendo del signo de  $\Delta pH = pH A - pH B$ ) en el número de monómeros de polielectrolito expuestos al disolvente.
- ✓ Confirmar que la variación en el número de monómeros expuestos como consecuencia del cambio de pH se traduce en una variación real en la capacidad de adsorción de las partículas (masa de ligando adsorbida por masa de partícula).

En los experimentos que se presentan en este capítulo se utilizó PDADMACI de 450 kD de peso molecular promedio. La cantidad de PDADMACI en el recubrimiento (expresado como monómeros totales y monómeros expuestos) se determinó con KPVS como titulante utilizando o-Tb como indicador para identificar el punto de equivalencia, tal y como se explica en la parte de materiales y métodos de esta memoria. Finalmente, la capacidad de adsorción de las partículas de sílice recubiertas de PDADMACI se determinó con el colorante carmín de índigo (o indigotina) (Fig. 58). Se eligió este colorante porque el único equilibrio de disociación protónica ocurre con un  $pK_a$  superior a 12 (pasando de azul a amarillo). Por ello, el colorante mantendrá su estado de protonación en el rango de pH estudiado ( $3.0 < pH < 10.5$ ).



#### 4.2.4.- Resultados y discusión

En primer lugar, se obtuvieron muestras de sílice recubierta con PDADMACl a distintos pH: 3.0, 4.5, 6.0, 7.5, 9.0 y 10.5. El pH más elevado analizado (10.5) es suficientemente alto para asegurar que prácticamente la totalidad de los grupos silanoles de la superficie de la sílice se encuentran deprotonados, a la vez que la cinética de depolimerización y disolución de la sílice es suficientemente baja para evitar la disolución (parcial o total) de la partícula de sílice. Para ello, una dispersión de sílice (previamente sonicada para deshacer posibles agregados) se añadió gota a gota sobre una disolución conteniendo  $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de polielectrolito al pH deseado (10 mM buffer) sometida a fuerte agitación magnética (1200 rpm). Pasadas 2 horas del inicio de la reacción de recubrimiento, la dispersión resultante fue centrifugada. El sobrenadante fue eliminado y la fase sólida dispersada en disolución acuosa al mismo pH al que fue obtenida la partícula resultante y centrifugada nuevamente. Tras repetir el proceso de lavado una vez más, la dispersión resultante fue sonicada y almacenada en disolución acuosa al mismo pH al que se obtuvo la partícula recubierta.

#### *Cuantificación del contenido en partícula de sílice recubierta por PDADMACl en las dispersiones obtenidas a distinto pH.*

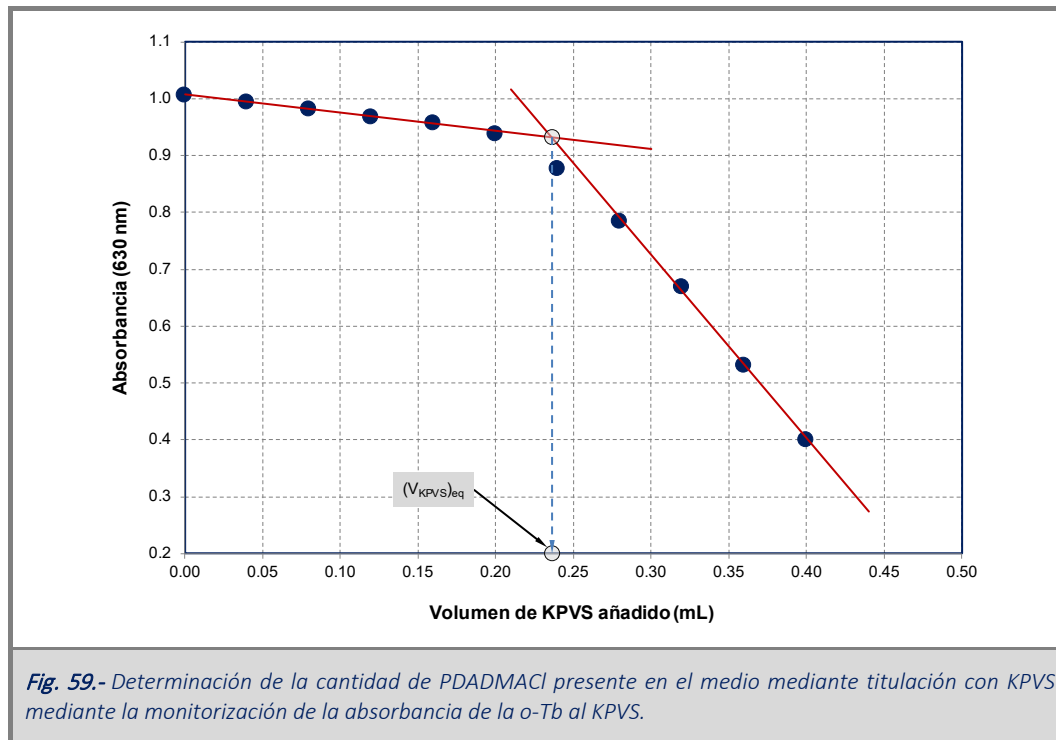
El contenido de las dispersiones de sílice recubiertas de PDADMACl se determinó por el residuo seco obtenido después de la centrifugación de la dispersión y su calentamiento a  $120 \text{ }^\circ\text{C}$  hasta obtener una masa constante. Los experimentos fueron repetidos por triplicado, tomándose el valor promedio como medida del contenido de las dispersiones (expresado como mg de partícula recubierta por mL de dispersión), siempre que la desviación estándar fuese menor del 5 %, (de no ser así, experimentos adicionales fueron llevados a cabo). Por tanto, este contenido incluye tanto la sílice que forma el interior sólido de la partícula como el polielectrolito que forma parte de su recubrimiento.

#### *Determinación de la cantidad de total de monómeros de PDADMACl del recubrimiento*

Una alícuota de la partícula recubierta fue dispersada en disolución acuosa a un pH de 13 (100 mM NaOH). La dispersión resultante fue incubada a  $45 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 16 h con objeto de disolver la sílice. Incubaciones durante un periodo mayor de tiempo no afectaron a los resultados del experimento por lo que podemos asumir que la sílice se disuelve completamente en estas condiciones.

Una alícuota de la disolución resultante se diluyó en una disolución reguladora de pH 7.0 conteniendo o-Tb en concentración aproximada de  $20 \text{ } \mu\text{M}$ . La absorbancia del colorante fue monitorizada a 630 nm tras la adición de volúmenes conocidos de una disolución, previamente estandarizada de KPVS<sup>196</sup> (Fig. 59). Dado que el KPVS tiene mayor afinidad por el PDADMACl que por el colorante, las adiciones iniciales únicamente

producen una ligera dilución del colorante. Una vez todo el PDADMACI se encuentra unido al KPVS, la absorbancia de la o-Tb disminuye fuertemente debido al desplazamiento solvatocrómico que sufre la sonda cuando se encuentra unido al polielectrolito aniónico (desde 630 nm hasta 550 nm). El volumen de equivalencia de KPVS se obtiene del punto de corte de las líneas de base inicial y final. Cada una de las determinaciones se obtuvo como el valor promedio de al menos tres titulaciones, hasta alcanzar una desviación estándar menor del 5 %.



La determinación tanto del contenido de PDADMACI expuesto sobre la partícula recubierta como el total de polielectrolito que la forma permite expresar la cantidad de polielectrolito global que contiene la partícula por unidad de masa de sílice (en adelante esta relación se expresará como  $\mu\text{moles}$  de monómero de PDADMACI por mg de sílice,  $\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}$ , o en la relación como mg de polielectrolito por mg de sílice,  $\text{mg}\cdot\text{mg}^{-1}$ ).

#### *Determinación de la cantidad de monómeros de PDADMACI expuestos al disolvente*

La determinación de la cantidad de monómeros de PDADMACI expuestos al disolvente fue realizada al mismo pH al que se llevó a cabo el recubrimiento. Una alícuota de la dispersión conteniendo la partícula recubierta fue dispersada en disolución acuosa al mismo pH al que fueron obtenidas junto o-Tb y titulada con KPVS. Siguiendo un procedimiento similar al presentado en el apartado anterior, se obtuvo el número de moles de polielectrolito expuestos al disolvente a partir del punto de equivalencia determinado como



el punto de corte entre las líneas que definen la variación lineal de la absorbancia de o-Tb antes y después que todos los monómeros catiónicos se uniesen a los correspondientes monómeros negativos del KPVS. Cada una de las determinaciones se obtuvo como el valor promedio de al menos tres titulaciones, hasta alcanzar una desviación estándar menor del 5 %.

*Variación de la cantidad de PDADMACl presente en el recubrimiento en función del pH al cual las partículas son obtenidas.*

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2. El número total de moles de monómero que forman parte del recubrimiento por mg de SiO<sub>2</sub> es la suma de los que se encuentran unidos a la superficie compensando las cargas negativas de ésta y los que se encuentran expuestos al disolvente. El número de moles totales y expuestos al disolvente fueron determinados experimentalmente de forma independiente.

**Tabla 2.-** Contenido del recubrimiento de PDADMACl por unidad de masa de SiO<sub>2</sub> (µmoles de monómero del polielectrolito por mg de SiO<sub>2</sub>) para partículas de sílice recubiertas por polielectrolito a distinto pH, en ausencia de sal.

pH	% (p/p) <sup>(a)</sup>		Moles de PDADMACl por mg de SiO <sub>2</sub> (µmoles·mg <sup>-1</sup> ) <sup>(b)</sup>		
	SiO <sub>2</sub>	PDADMACl	Totales	Unidos a la superficie	Expuestos al disolvente
3,0	93.9%	6.1%	0.404	0.150 (37.2 %)	0.254 (62.8 %)
4,5	91.8%	8.2%	0.555	0.290 (52.2 %)	0.265 (47.8 %)
6,0	89.7%	10.3%	0.714	0.436 (61.1 %)	0.278 (38.9 %)
7,5	88.0%	12.0%	0.844	0.579 (68.7 %)	0.265 (31.3 %)
9,0	85.7%	14.3%	1.035	0.720 (69.9 %)	0.315 (30.4 %)
10,5	84.5%	15.5%	1.132	0.855 (75.5 %)	0.278 (24.5 %)

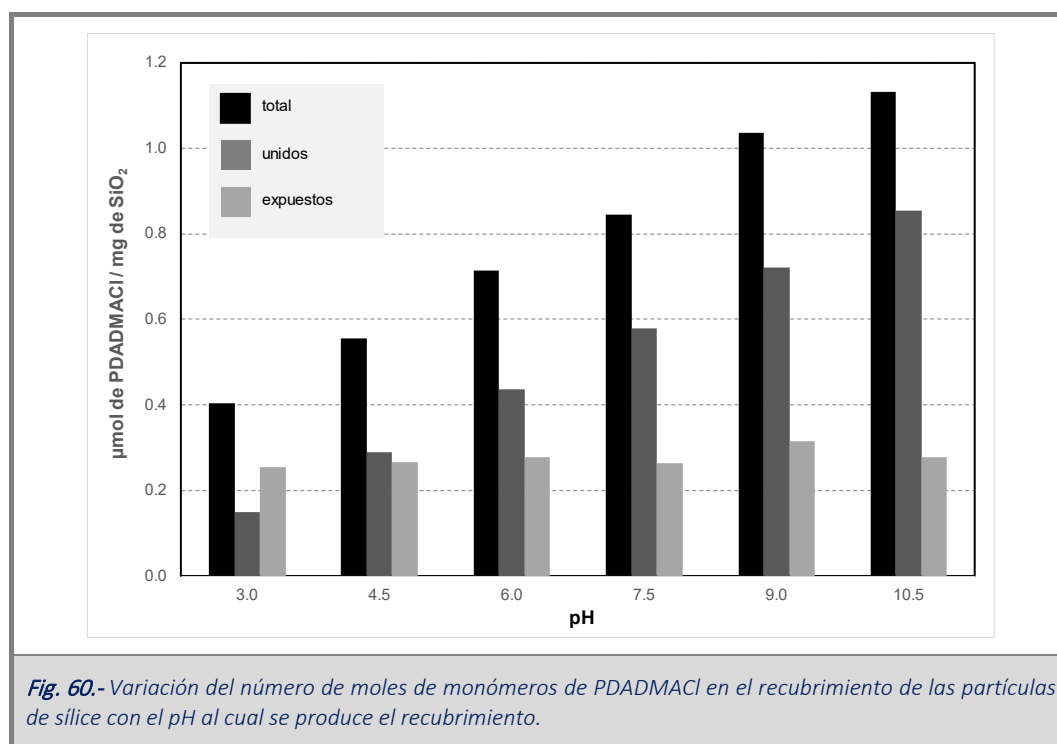
(a) porcentaje en peso del contenido de la partícula recubierta de PDADMACl. (b) Contenido de monómeros de PDADMACl por mg de sílice. Tanto el número de moles totales como expuestos fueron determinados experimentalmente de forma independiente. El número de moles de monómeros de PDADMACl unidos a la superficie de la sílice es la diferencia entre ambos valores (ec. 1).

Nuestros resultados muestran que el contenido de PDADMACl en el recubrimiento de la partícula de sílice aumenta monotónicamente con el pH, pasando de representar el 6.1 % del peso de la partícula a pH 3.0 hasta alcanzar el 15.5 % a pH 10.5.

El número de moles de monómeros de PDADMACl, por otra parte, aumenta desde 0.404 µmoles·mg<sup>-1</sup> a pH 3.0 (equivalente a 0.065 mg de PDADMACl por mg de SiO<sub>2</sub>) hasta 1.132 µmoles·mg<sup>-1</sup> a pH 10.5 (0.183 mg de PDADMACl por mg de SiO<sub>2</sub>). Los resultados eran ciertamente previsibles y consecuentes con el aumento en la densidad superficial de carga de la sílice a medida que aumenta el pH. En otras palabras, el aumento del número de grupos silanoles deprotonados en la superficie sólida requiere un aumento en el número de monómeros de PDADMACl para que establezcan puentes salinos que compensen las cargas. Este aumento

en el número *total* de moles de monómeros de PDADMACl que forman parte del recubrimiento (entre pH 3.0 y 10.5) es de un 280 %.

Sin embargo, los resultados resultan esclarecedores para entender cómo se establece el recubrimiento cuando se analizan separadamente los moles de monómeros unidos a la superficie y los expuestos al disolvente a cada pH (Fig. 60). En el caso del número de moles *unidos a la superficie*, se observa un aumento con el pH, paralelo con el aumento de la densidad de carga negativa de la superficie pasando de 0.150  $\mu\text{moles}\cdot\text{mg}^{-1}$  a pH 3.0 (equivalente a 0.024 mg de PDADMACl por mg de  $\text{SiO}_2$ ) hasta 0.855  $\mu\text{moles}\cdot\text{mg}^{-1}$  a pH 10.5 (0.143 mg de PDADMACl por mg de  $\text{SiO}_2$ ). Como se observa, el número de monómeros de PDADMACl unidos a la superficie aumenta en un factor de 5.7 al pasar de pH 3.0 a pH 10.5. Como se observa en la Fig. 60, el aumento en el número total de monómeros que forman parte del recubrimiento se debe casi exclusivamente al aumento en la cantidad de monómeros unidos a la superficie (con objeto de compensar su creciente carga negativa al aumentar el pH) manteniéndose el número de monómeros expuestos al disolvente prácticamente constante en todo el rango de pH.



Resulta interesante observar que el número de moles de monómeros de PDADMACl *expuestos al disolvente* permanece, sorpresivamente, prácticamente constante en todo el rango de pH, obteniéndose un valor promedio de 0.276  $\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}$  (0.045  $\text{mg}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) con una desviación estándar de 0.021  $\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}$  (7.7 %) que seguramente está alrededor del error experimental de las medidas presentados en la Tabla 2.

Por tanto, los resultados obtenidos parecerían sustentar la primera propuesta de nuestra hipótesis de partida ya que aumenta del número de moles de PDADMACI unidos a la superficie al aumentar el pH de la disolución.

Con objeto de comprobar si al cambiar el pH de las partículas de sílice recubiertas de PDADMACI se produce, en efecto, un aumento en el número de monómeros de polielectrolito expuestos al disolvente, muestras de partículas obtenidas a pH 10.5 (pH A) se resuspendieron a distinto pH (pH B: 3.0, 4.5, 6.0, 7.5 y 9.0). La cantidad de monómeros expuestos al disolvente fue determinado como se ha comentado anteriormente por titulación con KPVS utilizando o-Tb como colorante. Los resultados se presentan en la columna 4 de la Tabla 3.

En primer lugar, en línea con lo esperado, se observa que cuando mayor es el salto de pH desde pH 10.5, pH A,  $\Delta\text{pH} = \text{pH A} - \text{pH B}$ , tanto mayor es el número de monómeros de PDADMACI que se encuentran expuestos al disolvente (columna 4 de la Tabla 3), desde  $0.404 \mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}$  a pH 9.0 ( $0.065 \text{ mg}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) cuando el salto de pH es de 1.5 unidades hasta  $0.780 \mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}$  a pH 3.0 ( $0.126 \text{ mg}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) cuando se somete a las partículas a un salto de pH de 7.5 unidades.

**Tabla 3.-** Caracterización de las partículas de sílice recubiertas por PDADMACI obtenidas a pH 10.5 y resuspendidas a distintos pH.

pH A <sup>(a)</sup>	pH B <sup>(b)</sup>	$\Delta\text{pH}$ <sup>(c)</sup>	$(N_+)_{\text{expuestos}}^{(d)}$ ( $\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}$ )		$\Delta(N_+)_{\text{expuestos}}^{(d)}$ ( $\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}$ )	$(N_+)_{\text{unidos}}^{(e)}$ ( $\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}$ )		$\Delta(N_+)_{\text{unidos}}^{(e)}$ ( $\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}$ )
			pH A $\rightarrow$ pH B	a pH B		pH A $\rightarrow$ pH B	pH A	
10,5	3,0	7,5	0,780	0,254	0,526	0,855	0,150	0,705
10,5	4,5	6,0	0,662	0,265	0,396	0,855	0,290	0,565
10,5	6,0	4,5	0,576	0,278	0,298	0,855	0,436	0,419
10,5	7,5	3,0	0,441	0,265	0,176	0,855	0,579	0,276
10,5	9,0	1,5	0,404	0,315	0,089	0,855	0,720	0,135

(a) pH A: pH al que se obtuvieron las partículas recubiertas de PDADMACI. (b) pH al que se resuspendieron. (c)  $\Delta\text{pH} = \text{pH A} - \text{pH B}$ . (d)  $(N_+)_{\text{expuestos}}$ : moles de monómeros de PDADMACI expuestos al disolvente para las partículas resuspendidas a pH B (pH A  $\rightarrow$  pH B) y las obtenidas a ese pH (a pH B, valores de la Tabla 2);  $\Delta(N_+)_{\text{expuestos}}$  es la diferencia entre estos dos valores. (e)  $(N_+)_{\text{unidos}}$ : moles de monómeros de PDADMACI unidos a la superficie de la partícula a pH A y pH B (valores de la Tabla 2);  $\Delta(N_+)_{\text{unidos}}$  es la diferencia entre estos dos valores.

La columna 5 de la Tabla 3 presenta el valor del número de moles de monómero de polímero expuestos al disolvente para partículas obtenidas al pH B cuando han sido obtenidas a ese mismo pH. Como se observa, en todos los casos este valor es sensiblemente menor que el anterior debido a que parte de los monómeros que se encontraban en contacto con la superficie a pH 10.5 (pH A) se exponen al disolvente al ser sometidas las partículas a una bajada de pH (pH A  $\rightarrow$  pH B) como consecuencia de la pérdida de carga de la sílice. La columna 6 muestra la diferencia entre en número de moles expuestos al disolvente cuando la partícula se

somete a un cambio de pH (columna 4) y el valor que muestra cuando el recubrimiento se estableció a este último pH (a pH B, columna 5).

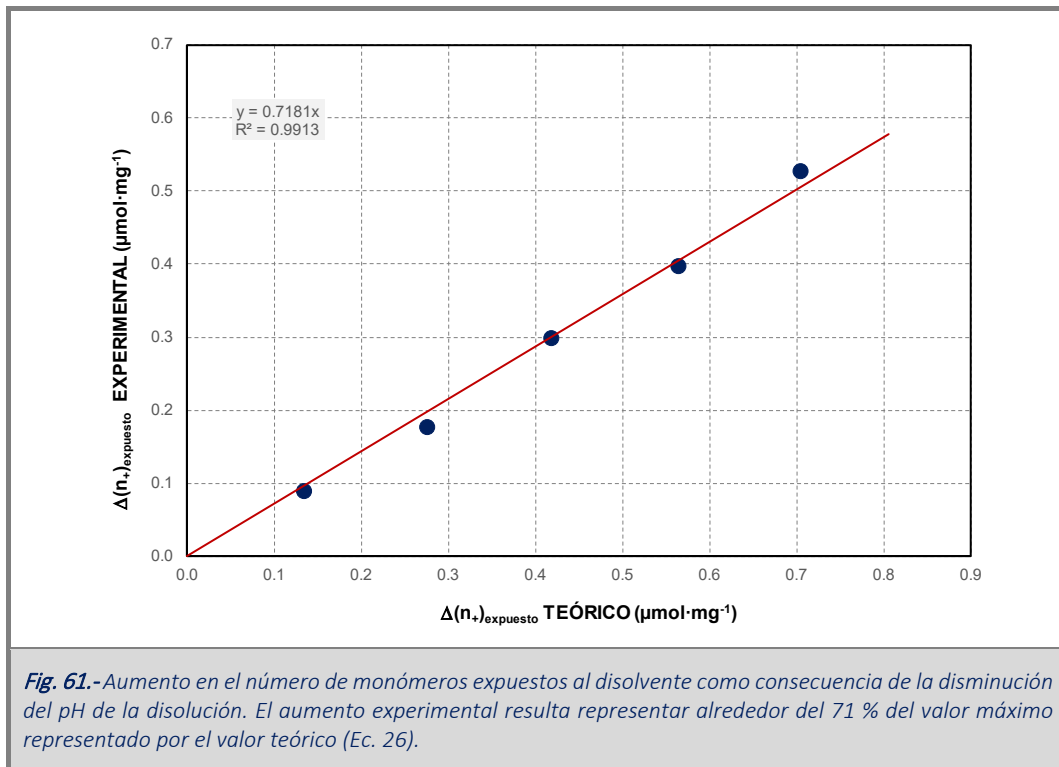
El valor máximo esperable en el aumento en el número de monómeros que pasarían de estar unidos a la superficie a pH 10.5 a encontrarse expuestos a un determinado pH inferior vendría dado por la diferencia entre el número de monómeros unidos la superficie a pH 10.5 y los determinados para el resto de valores de pH (ver valores de la Tabla 2):

$$\Delta(n_+)_{\text{expuestos máximo}} = \left[ (n_+)_{\text{SiO}_2\text{-PE}} \right]_{\text{pH A}} - \left[ (n_+)_{\text{SiO}_2\text{-PE}} \right]_{\text{pH B}} \quad (\text{Ec. 26})$$

Las columnas 7 y 8 de la Tabla 3 muestran el valor del número de moles de monómeros de polímero unidos a la superficie de sílice al pH A (10,5) y el pH final (pH B). Por último, la columna 9 presenta la diferencia entre los dos valores anteriores de acuerdo con la Ec. 26.

Como se observa, el valor teórico es mayor que el obtenido experimentalmente para todos los distintos pH analizados. La Fig. 61 representa el aumento en el número de moles de monómeros expuestos al disolvente determinado experimentalmente para cada pH analizado (columna 6 de la Tabla 3) con los calculados con la Ec. 26 (columna 9 de la Tabla 3). La correlación lineal muestra una proporcionalidad entre ambos valores, indicando que alrededor del 72 % de los residuos, que deberían pasar de estar unidos a la superficie a pH 10.5 a exponerse al disolvente a un pH inferior, lo hacen en realidad.

El valor teórico calculado por la Ec. 26 se corresponde, estrictamente, con la diferencia entre los monómeros unidos a la superficie de una partícula obtenida a pH A (pH 10.5) y la que le correspondería si hubiese sido obtenida a pH B. Por tanto, implicaría que la transformación de un monómero unido a la superficie (a alto pH) a uno expuesto (a bajo pH) no tendría restricción alguna como consecuencia de la conformación del polielectrolito adsorbido sobre la sílice. Este valor debe, por tanto, considerarse un límite superior. Es de esperar que, en condiciones experimentales reales, la transformación de los monómeros cargados de PDADMACl de unido a expuesto esté sometida a impedimentos que tendrán que ver con la flexibilidad local de la cadena de polielectrolito adsorbida a la superficie sólida y los impedimentos estéricos que esto pudiera generar a la hora de permitir la movilidad local del monómero.



Es lógico, por tanto, que nuestros resultados indiquen que el grado de transformación real de los monómeros unidos a la superficie en expuestos al disolvente sea menor que el calculado teóricamente. Por otro lado, la elevada tasa de transformación observada (cercana al 72 %) corrobora cualitativamente la premisa de este trabajo a la vez que le impone de restricciones cuantitativas menos severas de las que, en principio, podían suponerse.

#### *Modulación de la capacidad de adsorción de partículas recubiertas con polielectrolitos mediante el cambio de pH de la disolución.*

Con objeto de comprobar experimentalmente la hipótesis de partida y, más importante, correlacionar el aumento (o disminución) demostrado en el número de monómero de PDADMACI expuestos al disolvente al disminuir (o aumentar) el pH de la disolución (pH B) con respecto al pH al que se obtuvieron las partículas recubiertas (pH A), decidimos utilizar un ligando negativo como el carmín de índigo (ver Fig. 58). El colorante fue elegido fundamentalmente por su elevado  $pK_a$  (alrededor de 12.2), lo que asegura que su estado de protonación será el mismo en el rango de pH investigado ( $3.0 \leq \text{pH} \leq 10.5$ ) además de estar caracterizado por un alto coeficiente de extinción ( $26050 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) a 608 nm.

En primer lugar, se obtuvieron los valores de  $q_{\text{máx}}$  de las partículas obtenidas a distinto pH y cuyo contenido en monómeros de PDADMACI (tanto unidos a la superficie de sílice como expuestos al disolvente) se caracterizaron previamente (ver Tabla 2). Los resultados se recogen en la Tabla 4. Cada valor de  $q_{\text{máx}}$  es el

promedio del resultado de dos experimentos siempre que la diferencia entre los dos valores fuera menor del 5 %). De no ser así, experimentos adicionales fueron llevados a cabo.

**Tabla 4.-** Máxima capacidad de adsorción de las partículas de SiO<sub>2</sub> recubiertas por PDADMACl obtenidas a distintos pH y analizadas a ese mismo pH.

pH A <sup>(a)</sup>	pH B <sup>(a)</sup>	(N <sub>+</sub> ) <sub>expuestos</sub> <sup>(b)</sup> ( $\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}$ )	Q <sub>máx</sub> <sup>(c)</sup> ( $\mu\text{moles de ligando}\cdot\text{mg}^{-1}$ de SiO <sub>2</sub> )
3.0	3.0	0.254	0.185
4.5	4.5	0.265	0.184
6.0	6.0	0.278	0.181
7.5	7.5	0.265	0.175
9.0	9.0	0.315	0.164
10.5	10.5	0.278	0.179

(a) pH A: las partículas recubiertas de PDADMACl se obtuvieron y analizaron al mismo pH. (b) Moles de monómeros de PDADMACl del recubrimiento expuestos al disolvente (valores de la Tabla 2) a cada uno de los distintos pH analizados. (c) Máxima cantidad de moles de carmín de índigo (C.I.) adsorbidos sobre el recubrimiento de PDADMACl en condiciones de saturación en función del pH.

Los resultados presentados en la Tabla 2 mostraban que, aunque la cantidad de PDADMACl formando parte del recubrimiento de la partícula de SiO<sub>2</sub>, aumentaba con el pH como consecuencia del aumento de la densidad de carga negativa sobre su superficie, ello era exclusivamente debido al aumento de la concentración de monómeros cargados de PDADMACl en contacto con la superficie necesarios para conseguir la compensación de cargas. Por el contrario, la cantidad de monómeros cargados de PDADMACl expuestos al disolvente permanecía virtualmente constante en función del pH (con un valor promedio de 0.276  $\mu\text{moles de PDADMACl por mg de SiO}_2$ , columna 3, Tabla 4). Este resultado se ve confirmado con los resultados obtenidos acerca de la capacidad máxima de adsorción de estas partículas frente al ligando aniónico carmín de índigo. En efecto, la capacidad máxima de carga para partículas cuyo recubrimiento se obtuvo a distinto pH permanece constante a lo largo del rango de pH analizado ( $3.0 \leq \text{pH} \leq 10.5$ ) con un valor promedio de 0.178  $\mu\text{moles de carmín de índigo por mg de SiO}_2$ , columna 4, Tabla 4 (la desviación estándar es pequeña, 0.008  $\mu\text{moles}\cdot\text{mg}^{-1}$ , que representa alrededor del 4.3 %).

Es importante tener en mente que, aunque desde un punto de vista estrictamente termodinámico, la situación más favorable sería la completa compensación de cargas, ésta se hace más difícil de conseguir, en cantidades estequiométricas, a medida que el tamaño del ligando aumenta debido a impedimentos estéricos y/o conformacionales. El carmín de índigo es una molécula que contiene dos grupos sulfonatos que interaccionarían con los monómeros de PDADMACl cargados positivamente. Tomando el valor promedio del número de monómeros de PDADMACl expuestos (0.276  $\mu\text{moles de PDADMACl por mg de$

SiO<sub>2</sub>), la cantidad estequiométrica necesaria para la completa compensación de cargas sería 0.138 μmoles de ligando por mg de SiO<sub>2</sub> (debido a la estequiometría 1:2). Sin embargo, el valor que realmente es necesario para la completa compensación de cargas es 0,178 μmoles de carmín de índigo por mg de SiO<sub>2</sub>, (lo que representa un exceso de un 29 % respecto de la cantidad estequiométrica). La estructura del carmín de índigo (Fig. 58) nos sugiere que la molécula tiene una alta rigidez conformacional que dificultaría orientar ambos grupos sulfonatos sobre monómeros de PDADMACI espacialmente cercanos en la superficie del recubrimiento. Como consecuencia, la compensación de las cargas obliga a la adsorción de un cierto exceso de ligando, de forma que algunas de sus moléculas únicamente establecerán un único contacto con el recubrimiento de polielectrolito, exponiendo el otro grupo sulfonato al disolvente.

A continuación, con objeto de correlacionar experimentalmente el aumento (o disminución) en el número de monómeros de PDADMACI expuestos al disolvente al disminuir (o aumentar) el pH al cual se utiliza la partícula (respecto del pH al cual se obtuvo el recubrimiento, pH A), se utilizó el carmín de índigo para obtener la capacidad de carga máxima en función del  $\Delta\text{pH} = \text{pH A} - \text{pH B}$ . Para ello, se sintetizaron partículas recubiertas por PDADMACI a distinto pH dentro del intervalo estudiado: 3.0, 4.5, 6.0, 7.5, 9.0 y 10.5. Tras esto, alícuotas de cada muestra obtenida a un cierto pH A se analizaron a cada uno de los otros pH del intervalo (pH B) determinando la capacidad máxima de adsorción de las partículas en estas condiciones para adsorber carmín de índigo. Los resultados se muestran en la Tabla 5. Cada valor de  $q_{\text{máx}}$  es el promedio del resultado de dos experimentos siempre que la diferencia entre los dos valores fuera menor del 5 %. De no ser así, experimentos adicionales fueron llevados a cabo.

En todos los casos, se observa que cuando se somete a la partícula a una bajada de pH ( $\Delta\text{pH} = \text{pH A} - \text{pH B} < 0$ ), su capacidad de adsorber ligando aumenta y que este aumento es tanto mayor cuando más grande es el salto de pH inducido. Al contrario, cuando la partícula obtenida a bajo pH es sometida a una subida de pH ( $\Delta\text{pH} = \text{pH A} - \text{pH B} > 0$ ), su capacidad de unir ligando disminuye siendo este descenso escalable con el valor absoluto del cambio de pH.

Cualitativamente, estos resultados confirman la hipótesis de partida (más adelante veremos que cuantitativamente también) y muestran que la estrategia de utilizar el pH como medio de aumentar o disminuir el número de grupos ionizados del recubrimiento y, por tanto, de la capacidad máxima de adsorción de la partícula es viable.

**Tabla 5.-** Capacidad máxima de adsorción de carmín de índigo, sobre partículas de sílice recubiertas de PDADMACl ( $q_{m\acute{a}x}$   $\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) en función del pH al que se obtuvieron (pH A) y en el que se diluyeron (pH B).

pH A <sup>(a)</sup>	pH B <sup>(b)</sup>	$\Delta\text{pH}$ <sup>(c)</sup>	$q_{m\acute{a}x}$ <sup>(c)</sup> ( $\mu\text{moles}\cdot\text{mg}^{-1}$ )
10.5	3.0	7.5	0.366
10.5	4.5	6.0	0.300
10.5	6.0	4.5	0.273
10.5	7.5	3.0	0.216
10.5	9.0	1.5	0.178
10.5	10.5	0.0	0.179
9.0	3.0	6.0	0.292
9.0	4.5	4.5	0.283
9.0	6.0	3.0	0.232
9.0	7.5	1.5	0.177
9.0	9.0	0.0	0.164
9.0	10.5	-1.5	0.099
7.5	3.0	4.5	0.351
7.5	4.5	3.0	0.318
7.5	6.0	1.5	0.284
7.5	7.5	0.0	0.175
7.5	9.0	-1.5	0.175
7.5	10.5	-3.0	0.125
6.0	3.0	3.0	0.218
6.0	4.5	1.5	0.224
6.0	6.0	0.0	0.181
6.0	7.5	-1.5	0.142
6.0	9.0	-3.0	0.130
6.0	10.5	-4.5	0.060
4.5	3.0	1.5	0.169
4.5	4.5	0.0	0.184
4.5	6.0	-1.5	0.118
4.5	7.5	-3.0	0.137
4.5	9.0	-4.5	0.032
4.5	10.5	-6.0	0.014
3.0	3.0	0.0	0.185
3.0	4.5	-1.5	0.134
3.0	6.0	-3.0	0.114
3.0	7.5	-4.5	0.060
3.0	9.0	-6.0	0.035
3.0	10.5	-7.5	0.009



## Modulación de la capacidad de adsorción de partículas recubiertas por polielectrolitos

(a) pH A: pH al que se obtuvieron las partículas recubiertas de PDADMACI. (b) pH al que se resuspendieron y caracterizaron. (c)  $\Delta\text{pH} = \text{pH A} - \text{pH B}$ . (d) Máxima cantidad de moles de carmín de índigo (C.I.) adsorbidos sobre el recubrimiento de PDADMACI ( $q_{\text{máx}}$ ,  $\mu\text{moles}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) en condiciones de saturación en función del pH al cual se lleva a cabo el experimento (pH B).

Con objeto de analizar cuantitativamente los resultados, calcularemos el valor promedio de la variación en la capacidad de adsorción de la partícula,  $\Delta q_{\text{máx}}$ , en función del salto de pH inducido,  $\Delta\text{pH}$ .

$$\Delta q_{\text{máx}} = (q_{\text{máx}})_{\text{pH A} \rightarrow \text{pH B}} - (q_{\text{máx}})_{\text{pH B}} \quad (\text{Ec. 27})$$

donde  $(q_{\text{máx}})_{\text{pH A} \rightarrow \text{pH B}}$  es la capacidad máxima de adsorción de una partícula cuyo recubrimiento se obtuvo a pH A, y fue determinada al pH B (tras someterle a un salto de pH ( $\Delta\text{pH} = \text{pH A} - \text{pH B}$ ) y  $(q_{\text{máx}})_{\text{pH B}}$  es la capacidad de adsorción máxima de la partícula cuyo recubrimiento se obtuvo a pH B. Los valores de  $(q_{\text{máx}})_{\text{pH A} \rightarrow \text{pH B}}$  son los presentados en la columna 4 de la Tabla 5 mientras que los valores  $(q_{\text{máx}})_{\text{pH B}}$  son los presentados anteriormente en la Tabla 4 (columna 4). Por tanto,  $\Delta q_{\text{máx}}$  representa el aumento (o disminución) de la capacidad de la partícula recubierta de PDADMACI a un pH determinado (pH B) como consecuencia del salto de pH al que fue sometida desde el pH al que fue sintetizada.

Para facilitar el análisis, consideraremos el valor promedio de  $\Delta q_{\text{máx}}$  para cada valor de  $\Delta\text{pH}$ :

$$(\Delta q_{\text{máx}})_{\text{promedio}} = \frac{\sum_i (\Delta q_{\text{máx}})_{\Delta\text{pH}}}{N} \quad (\text{Ec. 28})$$

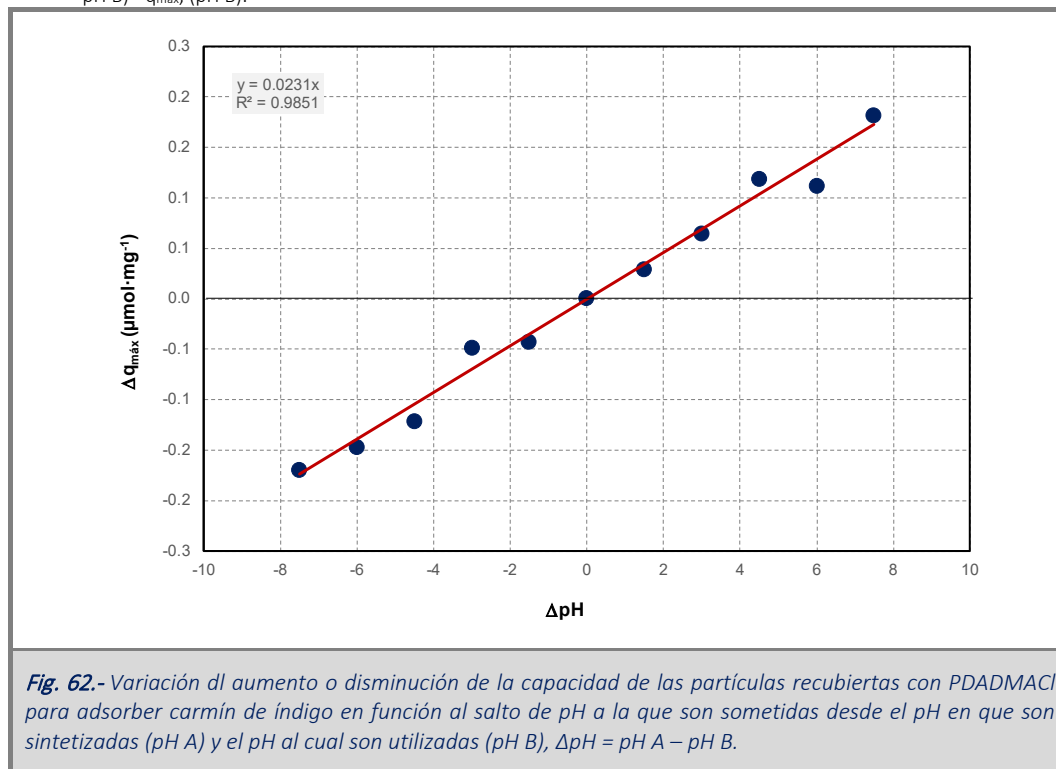
donde  $(\Delta q_{\text{máx}})_{\text{promedio}}$  es la media aritmética de los valores de  $q_{\text{máx}}$  obtenidos a cada valor de  $\Delta\text{pH}$ ,  $(\Delta q_{\text{máx}})_{\Delta\text{pH}}$ . Los resultados se recogen en la Tabla 6 y la Fig. 62.

**Tabla 6.-** Variación de la capacidad máxima de la partícula de sílice recubierta con PDADMACI para carmín de índigo en función del valor del salto de pH al que se las somete,  $\Delta\text{pH} = \text{pH A} - \text{pH B}$ .

$\Delta\text{pH}^{(a)}$	$\Delta q_{\text{máx}}^{(b)}$ ( $\mu\text{moles}\cdot\text{mg}^{-1}$ )
-7.5	-0.163
-6.0	-0.143
-4.5	-0.121
-3.0	-0.049
-1.5	-0.043
0.0	-0.012
1.5	0.027
3.0	0.063
4.5	0.118
6.0	0.112
7.5	0.182

(a)  $\Delta\text{pH} = \text{pH A} - \text{pH B}$ , diferencia entre el pH al que se obtuvieron las partículas recubiertas y en el que se resuspendieron para obtener su capacidad máxima de adsorción de carmín de índigo, ( $q_{\text{máx}}$ ,  $\mu\text{moles}\cdot\text{mg}^{-1}$ ).  
 (b) Diferencia entre la capacidad máxima de adsorción de carmín de índigo entre las partículas sintetizadas

a pH A y resuspendidas a pH B y la correspondiente a las partículas obtenidas a pH B,  $\Delta q_{\text{m}\ddot{a}\text{x}} = q_{\text{m}\ddot{a}\text{x}, (\text{pH A})} - q_{\text{m}\ddot{a}\text{x}, (\text{pH B})}$ .



Los resultados mostrados en la Fig. 62, muestran que existe proporcionalidad entre la variación en la capacidad de adsorción de las partículas  $\Delta q_{\text{m}\ddot{a}\text{x}}$  (aumento o disminución) por el ligando carmín de índigo con el salto de pH al que son sometidas. Esta correlación lineal, además de permitir visualizar de forma más precisa la relación entre  $\Delta q_{\text{m}\ddot{a}\text{x}}$  y  $\Delta\text{pH}$  tiene un carácter predictivo interesante ya que permite calcular la capacidad de adsorción en unas determinadas condiciones.

#### 4.2.5.- Conclusiones

Los resultados presentados y discutidos en este capítulo permiten afirmar que se ha desarrollado una metodología que permite modular racionalmente la capacidad de partículas de sílice recubiertas con el polielectrolito catiónico PDADMACI utilizando el cambio de pH al que pueden ser sometidas. Los resultados avalan la idea que la cantidad de polielectrolito que forma parte del recubrimiento aumenta a medida que aumenta el pH de la disolución. La razón fundamental de este aumento en el número de moles de PDADMACI adsorbidos a la superficie de  $\text{SiO}_2$  es la creciente densidad superficial de carga de la partícula sólida debido a la deprotonación de sus grupos silanoles. Este incremento hace que, a medida que aumenta el pH de la disolución en la cual se establece el recubrimiento, se requerirá un mayor número de monómeros del polielectrolito catiónico para completar la compensación de cargas entre éste y la superficie de  $\text{SiO}_2$  cargada negativamente.

Se ha demostrado que este aumento en la cantidad de polielectrolito se debe exclusivamente al aumento en el número de monómeros de PDADMACI en contacto directo con la superficie, mientras que la cantidad de monómeros cargados positivamente que permanecen expuestos al disolvente es constante, dentro del error experimental en el rango de pH analizado ( $3.0 \leq \text{pH} \leq 10.5$ ) y puede ser estimado en un valor de  $0.276 \mu\text{mol}$  de PDADMACI por mg de sílice ( $0,045 \text{ mg} \cdot \text{mg}^{-1}$ ). Consecuente con este comportamiento, las partículas de sílice recubiertas con PDADMACI obtenidas a distinto pH muestran idéntica capacidad de adsorber el colorante aniónico carmín de índigo que se ha utilizado como sonda en este trabajo ( $0.178 \mu\text{moles}$  de carmín de índigo por mg de  $\text{SiO}_2$ ). Este valor representa alrededor de un 29 % de exceso respecto del estimado para una compensación de cargas estequiométrica ( $0.138 \mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1}$ ). Este resultado advierte de la dificultad de los ligandos con varios grupos ionizables de conseguir la compensación de cargas con la superficie en las cantidades estequiométricas debido a impedimentos estéricos o conformacionales. Es por ello, que la compensación de cargas requiera un exceso de ligando en el que cierto porcentaje de sus moléculas establecerán únicamente un contacto con la superficie del recubrimiento dejando el otro grupo cargado expuesto al disolvente.

Los resultados presentados en este capítulo confirman que existe una proporcionalidad entre el aumento (o disminución) de la capacidad de adsorción de las partículas de sílice recubiertas con PDADMACI y el salto de pH al que son sometidas para su utilización. Cuando este salto de pH es positivo (el recubrimiento se establece a alto pH y las partículas se utilizan a un pH más bajo), la disminución de la densidad de carga negativa en la superficie del  $\text{SiO}_2$ , como consecuencia de la protonación parcial de sus grupos silanoles, se traduce en un aumento en el número de monómeros de PDADMACI expuestos al disolvente. Como consecuencia, este aumento en la densidad de carga positiva en la superficie del recubrimiento de PDADMACI se traduce en una mayor capacidad de adsorción de ligandos de carga opuesta (aniónicos).

Por el contrario, cuando el recubrimiento se establece a un pH bajo y las partículas se analizan a pH más elevado se producirá una disminución en el número de monómeros de polielectrolito expuestos al disolvente ya que parte de ellos se unirán ahora a la superficie de la sílice con objeto de compensar las nuevas cargas negativas de los grupos silanoles cuya deprotonación ha sido inducida por el aumento del pH. Por lo tanto, el recubrimiento de PDADMACI, habiendo visto reducida su densidad de carga positiva será capaz de unir un menor número de moléculas de ligando de carga opuesta.



4.3.- Capítulo 3 - Optimización del recubrimiento de nanopartículas de magnetita con polielectrolitos de alta densidad de carga



#### **4.3.1.- Introducción**

Los resultados presentados en los dos apartados anteriores han demostrado que, por un lado, los polielectrolitos catiónicos de alta densidad de carga inhiben de forma eficaz y a muy baja concentración, la adsorción de proteínas sobre superficies sólidas. Las ventajas de este hecho respecto de la preservación de la identidad biológica de proteínas en contacto con dichas superficies fueron comentadas entonces. Por otro lado, el mismo recubrimiento sirve para adsorber ligandos de carga opuesta. En el segundo apartado de este capítulo de Resultados y Discusión se ha presentado una metodología que permite modular la capacidad de partículas de sílice recubiertas con un polielectrolito catiónico (en particular, PDADMACl) para adsorber ligandos de signo opuesto. Este método se basa en aprovechar el comportamiento ácido-base de la superficie de la partícula y ajustar el pH al cual se sintetiza el recubrimiento y el pH al cual las partículas son finalmente utilizadas. El método es totalmente generalizable para partículas de otra composición química, como los óxidos de diferentes metales, y a polielectrolitos de distinta naturaleza (fuertes o débiles, catiónicos o aniónicos).

El resto del trabajo experimental cuyos resultados se recogen en la presente Tesis Doctoral se centrará en el desarrollo y optimización de recubrimientos que permitan la captura, transporte o almacenamiento de ligandos de distinta naturaleza, con especial interés en biomoléculas. Utilizaremos para ello partículas magnéticas recubiertas de distintos polímeros cargados, cuya síntesis, caracterización y optimización comenzaremos a presentar en este apartado.

Las nanopartículas de magnetita son muy atractivas debido a su fácil eliminación del medio mediante el uso de un campo magnético externo, además de las múltiples características que poseen ya descritas en la introducción. Sin embargo, una de las mayores desventajas que poseen es la baja estabilidad coloidal que presentan en zonas de pH cercano al fisiológico, ya que debido a su composición superficial presentan un punto isoeléctrico alrededor de 6.3<sup>233</sup>. Es por ello, que se hace necesario aumentar su estabilidad coloidal, para permitir su utilización en el rango de pH más útil desde el punto de vista biotecnológico. Nuestro objetivo, por tanto, será conjugar el necesario recubrimiento de la partícula con maximizar su capacidad de adsorción, de forma que se amplíe la aplicabilidad de las partículas resultantes.

#### **4.3.2.- Hipótesis de partida**

Existen, fundamentalmente, dos métodos para aumentar la estabilidad coloidal de nanopartículas. Uno sería recubrirlas con polímeros que consigan que la atracción entre ellas esté impedida estéricamente, lo que reduciría la tendencia natural de éstas a flocular. Otra estrategia sería aumentar la carga superficial de las nanopartículas que induciría un incremento en las interacciones electrostáticas repulsivas, aumentando así su estabilidad coloidal y minimizando su agregación. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en

los dos apartados anteriores (referidos a partículas de sílice), proponemos utilizar polielectrolitos de alta densidad de carga para conseguir el aumento de estabilidad coloidal perseguido y, además, alcanzar el fin último de estas investigaciones: diseñar, sintetizar y caracterizar nanopartículas magnéticas que posean una elevada capacidad de adsorción de ligandos de signo opuesto y que puedan ser utilizadas para la captura de contaminantes (colorantes, metales pesados, etc.), el transporte y liberación controlada de fármacos, o el almacenamiento de biomoléculas en disolución acuosa, inhibiendo los procesos multimoleculares en los que pudieran estar involucradas y que desencadenan, en último término, fenómenos de agregación y/o fibrilación que limitan de forma severa su función.

Dado que PZC de la magnetita es cercano al fisiológico, será posible utilizar tanto polielectrolitos aniónicos como catiónicos. Por otro lado, la presencia en la superficie de los cristales de magnetita de cationes  $Fe^{2+}$  y  $Fe^{3+}$  anticipan que, además de las meras interacciones electrostáticas atractivas entre el polielectrolito y la superficie sólida (como ocurría en el caso de la sílice), la capacidad quelante de los polímeros cargados utilizados en el recubrimiento jugarán un papel esencial en la estabilización de la partícula recubierta.

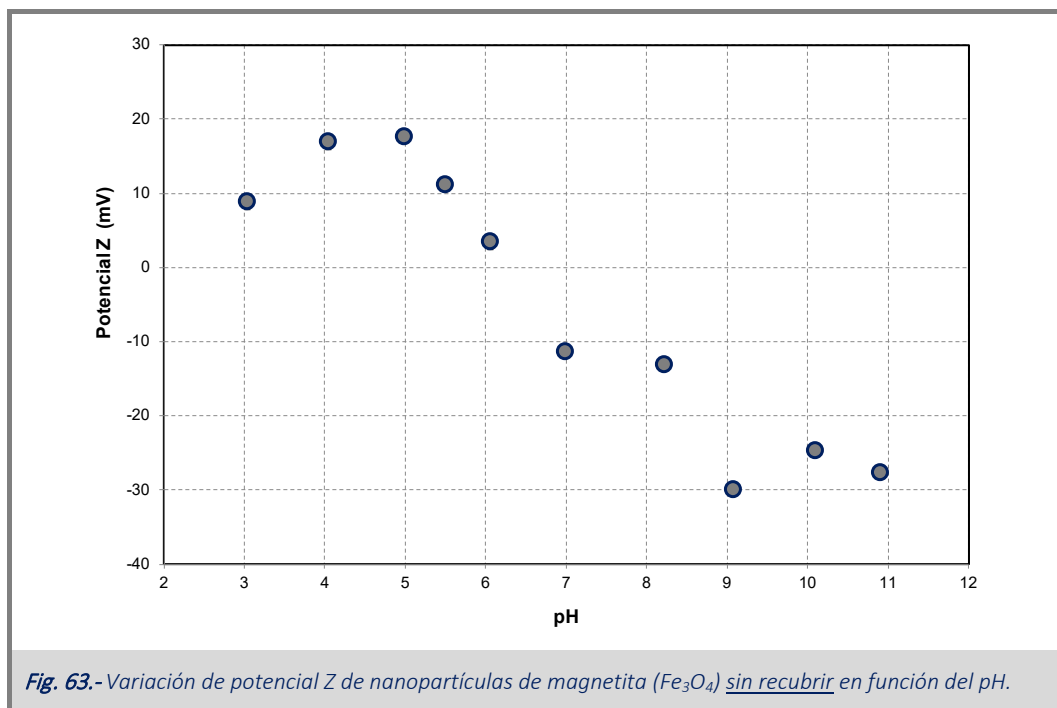
#### 4.3.3.- Estrategia experimental

- ✓ Sintetizar nanopartículas de magnetita  $Fe_3O_4$ , mediante el método de co-precipitación.
- ✓ Obtener nanopartículas recubiertas con distintos polielectrolitos de distinta naturaleza en cuanto a su carga, como pueden ser el PAAH (catiónico) y el PAA (aniónico).
- ✓ Caracterizar la variación del tamaño de la nanopartícula recubierta en función del exceso de polielectrolito utilizado en su obtención.
- ✓ Determinar la capacidad máxima de adsorción de cada uno de los dos tipos de nanopartículas recubiertas,  $Fe_3O_4@PAAH$  y  $Fe_3O_4@PAA$ , frente a proteínas de carga opuesta al recubrimiento a pH 7 ( $\beta$ -Lg y Lzm, respectivamente).
- ✓ Optimizar las condiciones en las que se lleva a cabo el recubrimiento de la nanopartícula (concentración de exceso de polielectrolito, pH, fuerza iónica, etc.) para conseguir maximizar la capacidad de adsorción de dichas biomoléculas.



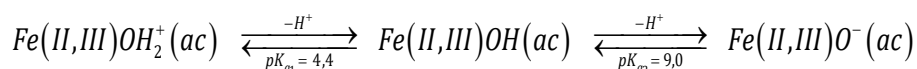
#### 4.3.4.- Resultados y discusión

Tras sintetizar nanopartículas obtenidas mediante el método de co-precipitación, se caracterizan mediante el uso de distintas técnicas para determinar que la síntesis llevada a cabo ha sido la correcta, y por tanto que presentan un comportamiento similar al descrito en bibliografía. En primer lugar, realizamos medidas con nanopartículas incubadas a distintos pH, desde pH 3.0 hasta pH 11.0, para determinar el potencial Z que presentan sobre su superficie al ser medidas mediante DLS. Estos resultados se muestran en la Fig. 63.



Como era de esperar, el potencial Z de las nanopartículas de magnetita obtenidas muestra valores positivos a bajo pH (consecuente con la protonación de los hidróxidos de hierro superficiales, Fe(II, III)OH<sub>2</sub>) que disminuye a medida que aumenta el pH (los grupos Fe(II, III)OH<sub>2</sub> comienzan a desprotonarse para dar lugar a la especie neutra Fe(II, III)OH). A medida que aumenta el pH de la disolución, el equilibrio ácido-base se desplaza hacia la formación de la especie desprotonada Fe(II, III)O<sup>-</sup> confiriendo a la superficie una carga negativa creciente.

Los resultados son consecuentes con los equilibrios presentados en el capítulo de introducción y que suponían eventos de disociación protónica con valores de pK<sub>a</sub> de 4.4 y 9.0:

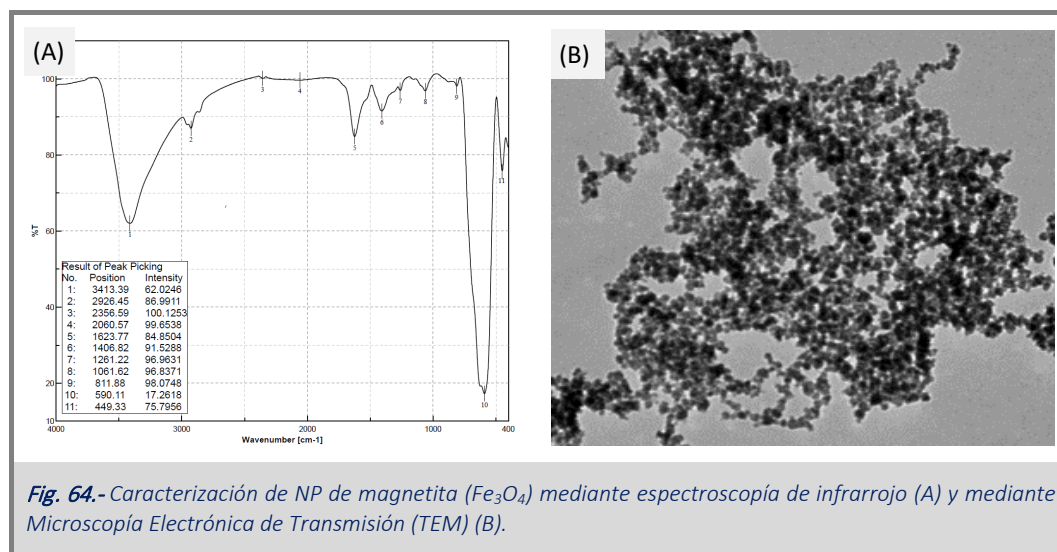


El punto isoeléctrico es aproximadamente 6.2, similar al citado anteriormente<sup>233</sup>. Por lo tanto, las partículas de magnetita desnudas aumentarán su estabilidad coloidal a medida que el pH de la disolución se aleje del

punto isoeléctrico. Como consecuencia, estas partículas mostrarán una moderada estabilidad coloidal a valores de pH bajos y altos mientras que tendrán una alta tendencia a agregar a valores de pH cercanos al fisiológico.

Para ver la composición, analizamos las nanopartículas mediante la realización de su espectro infrarrojo. Como se observa en la Fig. 64-A aparece una banda más intensa sobre  $590\text{ cm}^{-1}$ , la cual es característica de la vibración del enlace  $\text{Fe-O}^{234,235}$ , lo que nos confirma la composición de la estructura de la nanopartícula de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ). Por otra parte, la banda ancha que aparece entre  $3000$  y  $3600\text{ cm}^{-1}$  es asociada a la vibración de alargamiento y acercamiento (*stretching*) del enlace  $\text{O-H}^{235}$ , presente en la superficie de la nanopartícula.

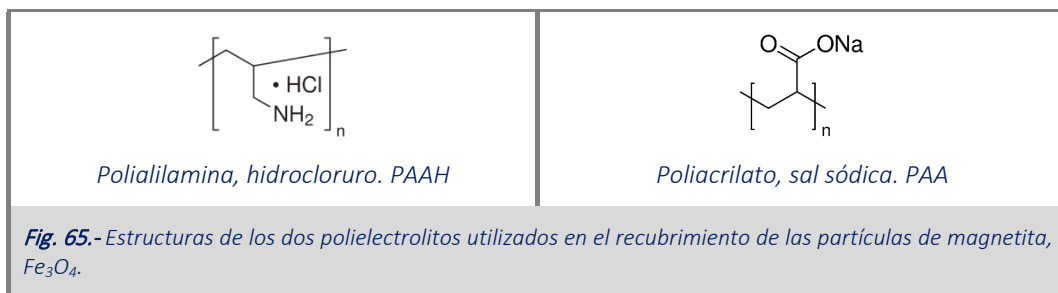
Por último, en la Fig. 64-B, se muestra la imagen obtenida por microscopía electrónica de transmisión (TEM) y en la que se puede observar que las nanopartículas de magnetita presentan forma esférica y tamaño alrededor de  $10\text{-}20\text{ nm}$ , pero se encuentran agregadas entre sí, lo que nos indica una reducida estabilidad coloidal, disminuyendo su superficie específica y por tanto su capacidad de adsorción de cualquier tipo de molécula.



Tras realizar la caracterización de las nanopartículas de magnetita, confirmamos la baja estabilidad a un pH cercano al fisiológico ( $\text{pH} \sim 7$ ), siendo por tanto necesario desarrollar estrategias para conseguir una mayor estabilidad coloidal, que permita su utilización en aplicaciones en las cuales se requiera trabajar en ese rango de pH.

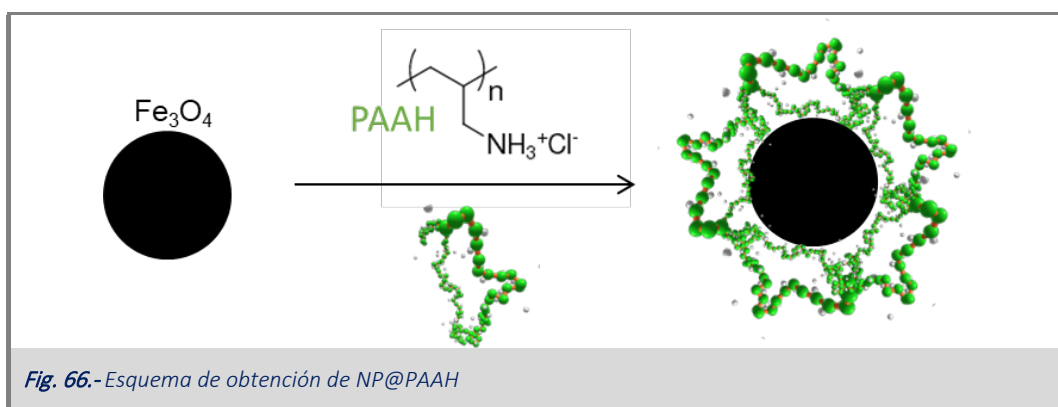
Para llevar a cabo esto, las nanopartículas pueden ser tratadas con distintas moléculas estabilizadoras. En nuestro caso, hemos usado un recubrimiento con polielectrolitos, lo que las dotará de una alta densidad de carga incluso a valores de pH cercanos a su pl. Centramos el estudio en dos polielectrolitos de distinta naturaleza, pero estructura química similar (ver Fig. 65). Tanto la polialilamina como el poliácido acrílico son polímeros lineales con la diferencia que el primero es catiónico al disponer de un grupo amino en la cadena

lateral del monómero, mientras que el segundo será aniónico a los pH en los cuales el grupo carboxilato, presente en cada uno de sus monómeros, se encuentre deprotonado.



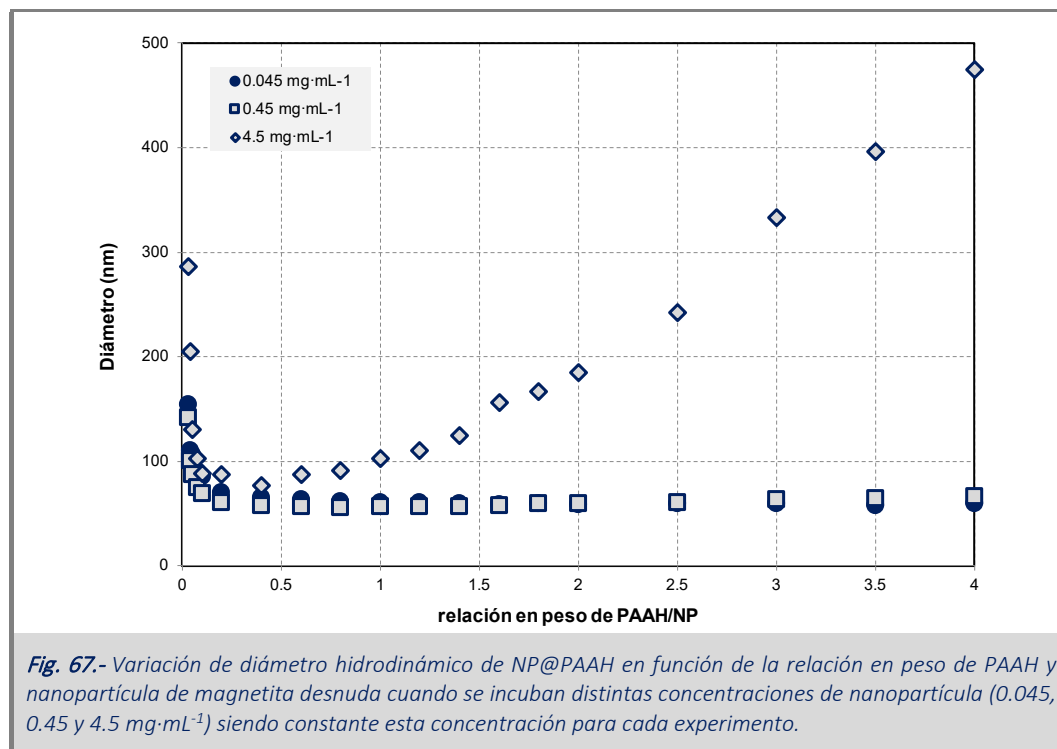
#### *Partículas de magnetita recubiertas por hidrocloreuro de polialilamina, NP@PAAH*

Para la adsorción de biomoléculas aniónicas realizamos el recubrimiento a pH 7 con un polielectrolito que expone grupos amino ( $NH_2$ ) al medio, el hidrocloreuro de polialilamina (PAAH lineal) con un peso molecular promedio de 17.5 kD. Las condiciones en las que se lleva el recubrimiento de las partículas de magnetita implica un compromiso entre la tendencia del PAAH para aumentar su densidad de carga positiva al disminuir el pH y el aumento de la carga negativa sobre la superficie de la magnetita a medida que el pH crece por encima de su pl. El  $pK_a$  de una amina primaria es del orden de 9.3<sup>236</sup>, aunque la proximidad de los monómeros que forman parte del polímero hace que el  $pK_a$  de cada grupo dependa de si los grupos cercanos están protonados o no. Esto se traduce en que el comportamiento ácido-base del polímero sea más complicado, siendo necesario alcanzar valores de pH muy ácidos para conseguir la completa protonación del PAAH. Diversos ensayos preliminares mostraron que el pH óptimo para llevar a cabo el recubrimiento es alrededor de 7. La Fig. 66 muestra un esquema del proceso de recubrimiento de la partícula de magnetita con PAAH llevada a cabo a pH 7.0.



En primer lugar, estudiamos el efecto del exceso de polielectrolito utilizado en la reacción de recubrimiento sobre el tamaño final de la nanopartícula. Para ello, se realizó el recubrimiento de las partículas de magnetita con cantidades crecientes de polielectrolito. Es de esperar que la concentración inicial de magnetita tenga algún efecto, por lo que los experimentos se llevaron a cabo en paralelo para tres

concentraciones distintas de magnetita (0.045, 0.45 y 4.5 mg·mL<sup>-1</sup>). El tamaño de las partículas se midió utilizando la técnica de DLS. Los resultados se muestran en la Fig. 67.



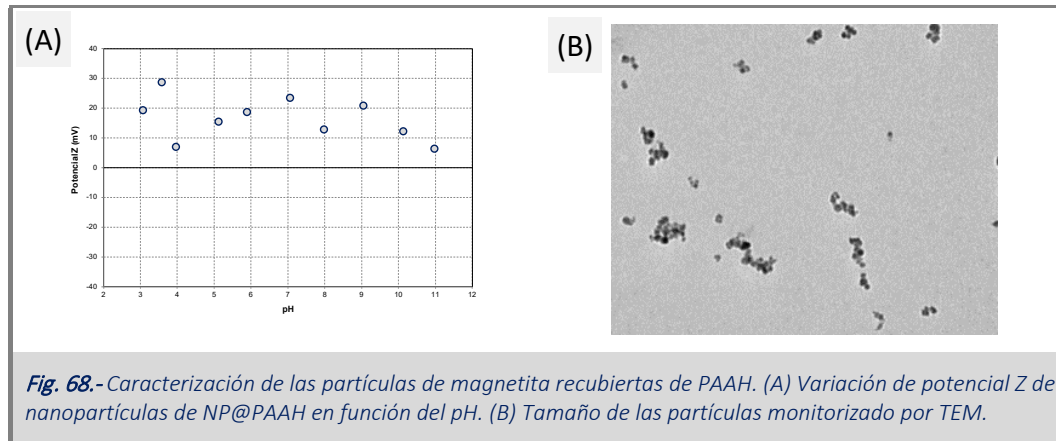
La adición del polielectrolito tiene, a las tres concentraciones analizadas, un fuerte efecto reductor del tamaño de las partículas. En ausencia de polielectrolito, el tamaño de las partículas de magnetita desnuda era del orden de 2  $\mu\text{m}$ , confirmando la tendencia de las partículas a aglomerar a pH 7 incluso después de ser sometidas a sonicación.

Inicialmente, a medida que aumenta el exceso de PAAH utilizado al producirse el recubrimiento, se observa una rápida disminución del tamaño de las partículas. Cuando la relación PAAH a magnetita alcanza un valor cercano a 0.4, el tamaño promedio de las nanopartículas se reduce hasta unos 60 nm. Incrementos del exceso de polielectrolito no parecen afectar al tamaño para partículas obtenidas en las condiciones más diluidas (0.045 y 0.45 mg·mL<sup>-1</sup>), observándose que el tamaño de las partículas permanece constante. Sin embargo, cuando el recubrimiento se realiza sobre partículas de magnetita a la concentración de 4.5 mg·mL<sup>-1</sup>, su tamaño aumenta monótonicamente tras alcanzar el tamaño mínimo (para una relación de 0.4 mg de PAAH por mg de magnetita). Es importante tener en cuenta que el aumento en la concentración de magnetita obliga a un aumento proporcional en la concentración de PAAH para mantener la misma relación por peso. Así, cuando esa relación es de 0.4 (donde se alcanza el tamaño mínimo para las muestras que contienen 4.5 mg·mL<sup>-1</sup> de magnetita), 1 mL de disolución contenía 1,8 mg de PAAH, equivalente a 19,2 mM de monómero del polielectrolito. Por tanto, el aumento en la concentración de magnetita provoca la necesidad de aumentar la concentración de PAAH y, consecuentemente, la fuerza iónica del medio. Por

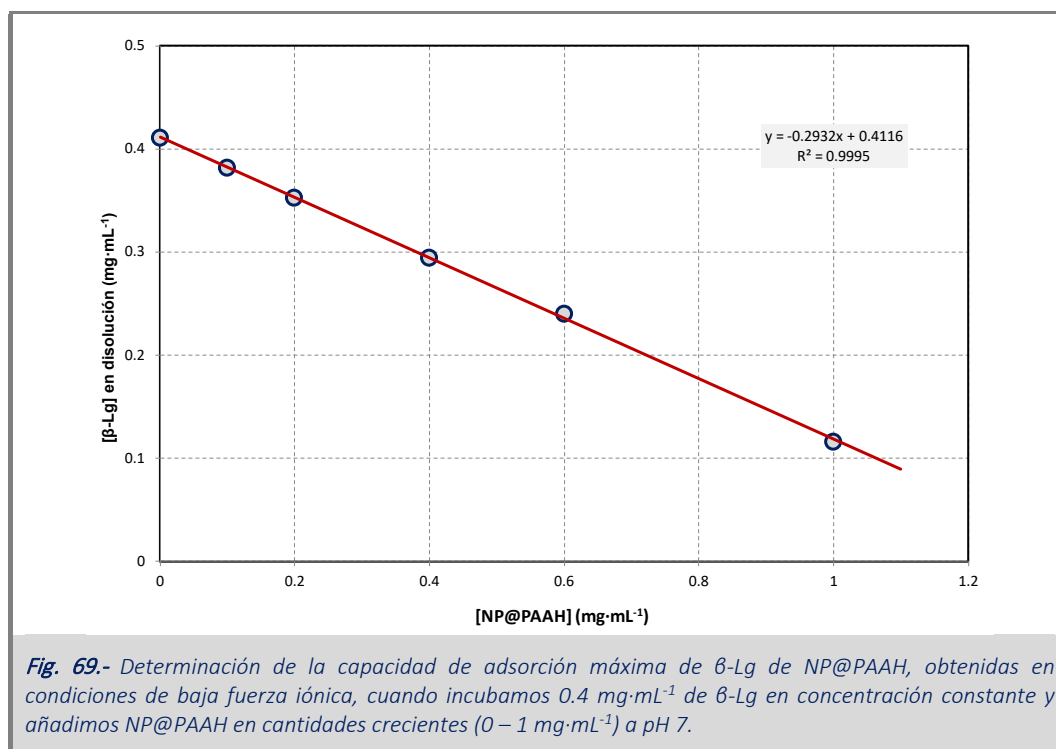
ejemplo, cuando tenemos una relación de 2 mg de PAAH por mg de magnetita, el tamaño obtenido cuando incubamos nanopartículas a una concentración de  $4.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  es 3 veces superior a las obtenidas con concentraciones de 0.45 y  $0.045 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  (180 nm frente a 60 nm), pudiendo relacionarse con la elevada concentración de PAAH en el medio (96,2 mM frente a 9,62 y 0,96 mM cuando las concentraciones de magnetita son 0.45 y  $0.045 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).

De acuerdo con los resultados, la adición de polielectrolito provoca la desaglomeración de las partículas de magnetita que, una vez recubiertas de PAAH, aumentan su estabilidad coloidal mediante la repulsión electrostática que se establece entre la superficie de las nanopartículas individuales cargadas ahora positivamente. Al aumentar la concentración de magnetita (obligando a un aumento en la concentración de PAAH), la presencia en el medio de reacción de concentraciones elevadas de polielectrolito apantallaría dicha repulsión electrostática lo que se traduciría en un debilitamiento de dichas interacciones, una disminución en su estabilidad coloidal y un menor grado de desaglomeración de las partículas de magnetita de las que se parte.

Conocidas las condiciones para recubrir totalmente la nanopartícula y reducir su tamaño, aumentando por tanto su superficie específica, caracterizamos la estabilidad que presentan en un amplio rango de pH, desde pH 3 hasta pH 11. Para ello determinamos el potencial Z que presentan sobre su superficie al ser medidas mediante DLS. Este resultado se muestra en la Fig. 68-A. Los resultados muestran que la carga de las partículas ahora es positiva desde pH 3.0 hasta 11.0, a diferencia de las NP desnudas (ver Fig. 63). A pesar de las desviaciones en las medidas de la carga superficial, observamos que entre pH 5 – 9 presentan densidad de carga elevada, dotándolas de estabilidad coloidal en comparación con las nanopartículas desnudas. Además caracterizamos de nuevo mediante TEM, cómo se encuentran las nanopartículas obtenidas (Fig. 68-B), observando que se produce una disgregación de las NP como consecuencia de la mayor densidad de carga aportada por los residuos del polielectrolito que se encuentran expuestos al disolvente al haber recubierto la superficie. Esto por tanto se traduce en un aumento de la superficie específica de la nanopartícula, optimizando así su capacidad para adsorber moléculas de signo opuesto (proteínas aniónicas).



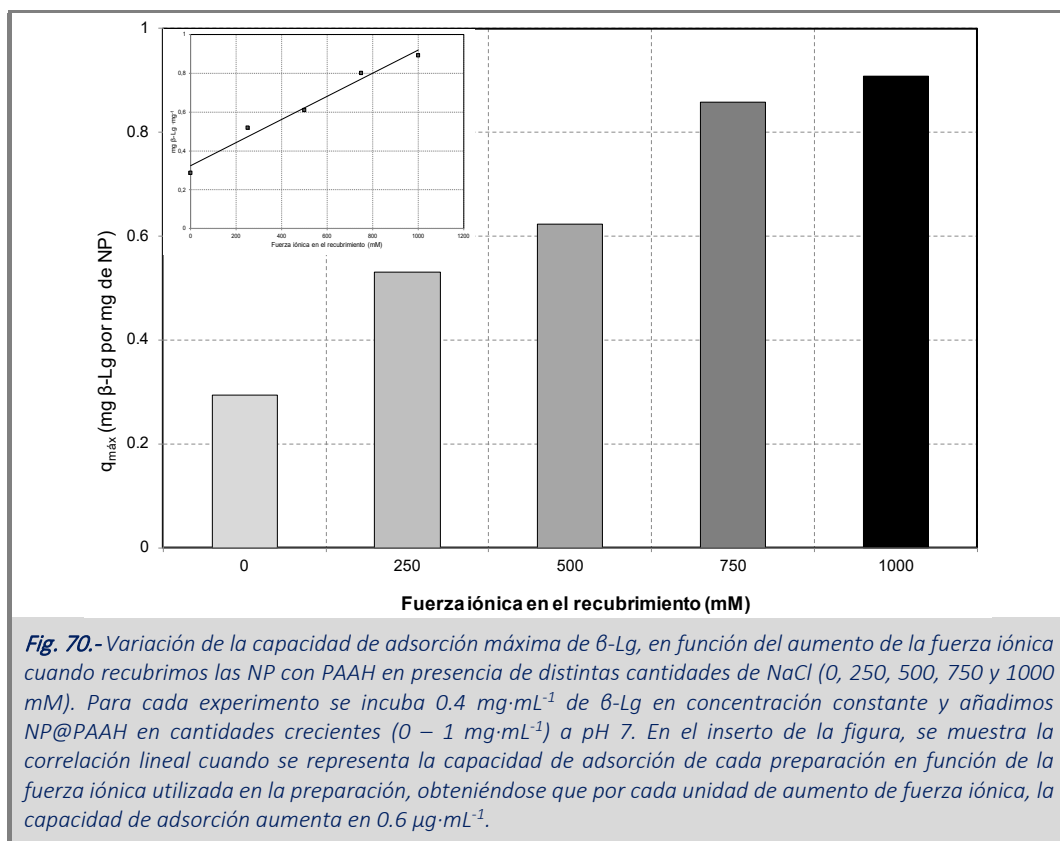
Obtenidas las nanopartículas, determinamos la capacidad de adsorber una proteína aniónica como la  $\beta$ -Lg, que presenta una densidad de carga negativa a pH 7 ( $pI \sim 4.8$ ). Si incubamos una concentración constante de  $\beta$ -Lg ( $0.4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) con concentraciones crecientes de NP@PAAH ( $0 - 1.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) a pH 7, observamos cómo disminuye la cantidad de proteína en el sobrenadante a medida que la concentración de NP@PAAH aumenta, determinado así la capacidad de adsorción de dichas NP@PAAH (Fig. 69).



De la pendiente de la gráfica obtenemos que estas NP@PAAH presentan una capacidad de adsorción de  $0.29 \text{ mg}$  de  $\beta$ -Lg por  $\text{mg}$  de NP@PAAH. Dado que el recubrimiento de la nanopartícula con el polielectrolito se produce mediante interacción electrostática, es interesante estudiar el efecto de recubrir dichas nanopartículas en distintas condiciones de fuerza iónica. Estudios relacionados con la dependencia del recubrimiento de superficies sólidas cargadas con polielectrolitos<sup>172</sup> han demostrado que, a baja fuerza

iónica, la compensación de cargas es total y la cantidad de polielectrolito casi estequiométrica con la necesaria para compensar todas las cargas de signo opuesto. Sin embargo, un aumento de la fuerza iónica del medio de reacción hace que la cantidad de polielectrolito necesario para conseguir la completa compensación de las cargas presentes en la superficie sea significativamente mayor que la estequiométrica, obligando, por tanto, a que aquellos monómeros no implicados en la atracción electrostática con la superficie queden expuestos al disolvente. Siguiendo esta lógica, inducir el recubrimiento de las nanopartículas de magnetita con PAAH en presencia de cantidades crecientes de sal podría aumentar la cantidad de polielectrolito efectivamente unido a la superficie y, como consecuencia, el número de cargas positivas del recubrimiento expuestas al disolvente y capaces de establecer interacciones atractivas con ligandos de carga negativa.

Para comprobar esta hipótesis, se obtuvieron NP@PAAH en distintas condiciones de fuerza iónica (250, 500, 750 y 1000 mM de NaCl), sometidas posteriormente al mismo proceso de lavado y eliminación de PAAH no adsorbido sobre la superficie. Cada una de las NP@PAAH se pusieron en el mismo rango de concentración, con la misma concentración de  $\beta$ -Lg y al mismo pH (pH 7) que los resultados mostrados en la Fig. 69, cuyas NP@PAAH fueron recubiertas en ausencia de NaCl. Los resultados sobre la capacidad de adsorción de  $\beta$ -Lg de NP@PAAH cuyo recubrimiento se llevó a cabo en presencia de distintas concentraciones de sal (pero resuspendidas y analizadas en ausencia de sal), se muestran en la Fig. 70.



Los resultados confirman la hipótesis. El recubrimiento en presencia de concentraciones crecientes de sal aumenta la cantidad de monómeros de PAAH que forman parte del recubrimiento y, especialmente,

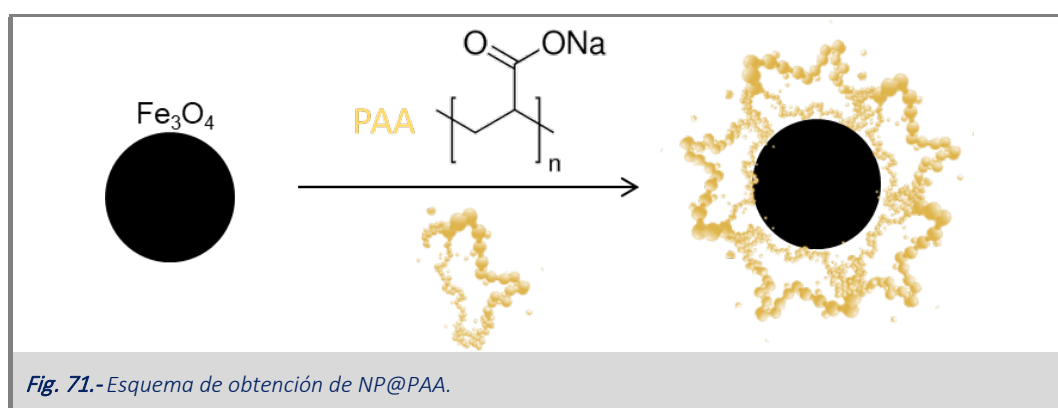
aquellos que se mantienen expuestos al disolvente y son capaces de facilitar la adsorción de ligandos de carga opuesta.

Así, cuando las NP han sido recubiertas en ausencia de NaCl obtenemos una capacidad de adsorción de  $0.29 \text{ mg } \beta\text{-Lg}\cdot\text{mg}^{-1} \text{ PAAH@NP}$ , observándose un aumento de este valor hasta  $0.91 \text{ mg } \beta\text{-Lg}\cdot\text{mg}^{-1} \text{ PAAH@NP}$  cuando el recubrimiento se ha producido en presencia de 1 M de sal (un aumento del 300 %). Podemos concluir que el aumento de la fuerza iónica favorecerá el aumento en número de moles de polielectrolito en el recubrimiento y, por tanto, la capacidad de adsorción de la partícula resultante. Es evidente, que aumentos mayores de la fuerza iónica acabarán por debilitar la atracción entre la superficie de magnetita y el polielectrolito llegando a reducir drásticamente su capacidad de adsorción.

#### *Partículas de magnetita recubiertas por poliacrilato, NP@PAA*

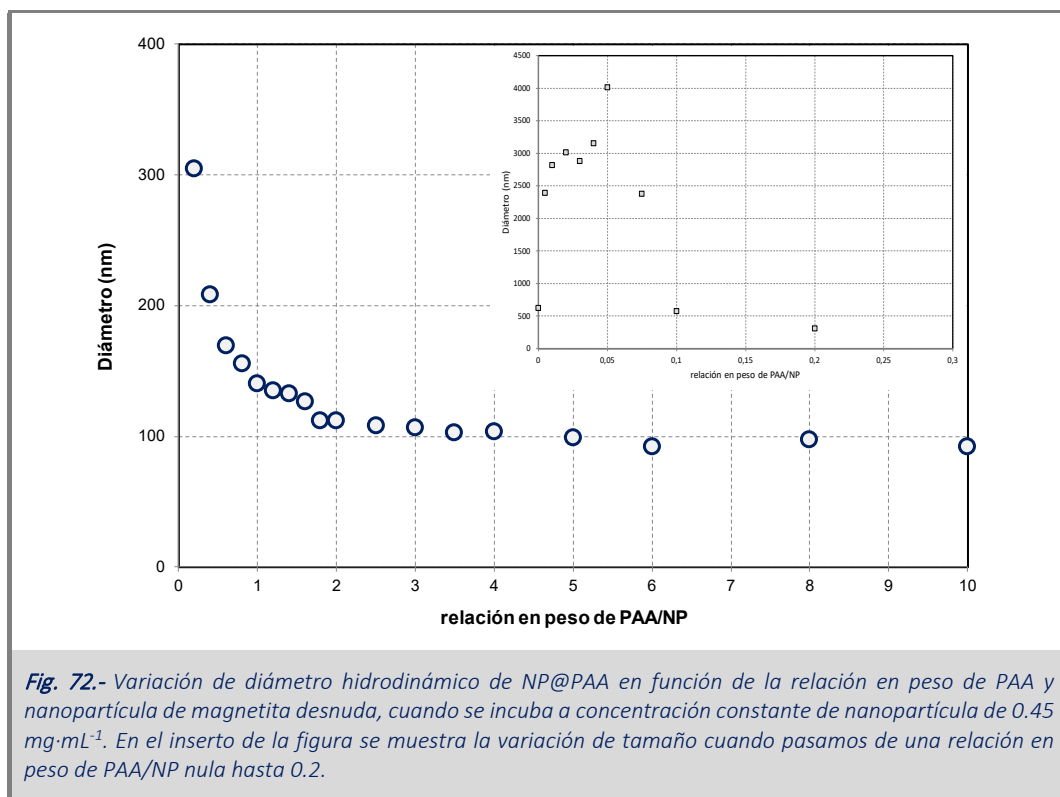
Estudiado y optimizado el proceso de obtención de NP@PAAH para conseguir aumentar el grado de recubrimiento sobre la superficie y por tanto mejorar la capacidad de adsorción, pasamos a utilizar un recubrimiento polimérico aniónico, para adsorber sobre su superficie moléculas catiónicas, utilizando un polielectrolito cuyos monómeros poseen grupos carboxílicos cargados negativamente cuando trabajamos en condiciones de pH por encima de su  $\text{pK}_a$  ( $\sim 4.5^{237}$ ). El polielectrolito usado es el ácido poliacrílico (PAA lineal) con un peso molecular de 15 kD.

Para realizar el recubrimiento, seguimos la misma metodología que seguimos con las de PAAH, pero de forma contraria. En este caso, añadimos las nanopartículas desnudas de magnetita que se encuentran a pH 3 sobre una disolución que contiene PAA a pH 5 (Fig. 71). El recubrimiento va a ser guiado por un lado por la atracción electrostática existente entre ambos, y por otro por la capacidad quelante de los grupos carboxílicos de los monómeros de PAA que a ese pH estén deprotonados sobre los átomos de hierro presentes en la superficie de la nanopartícula.





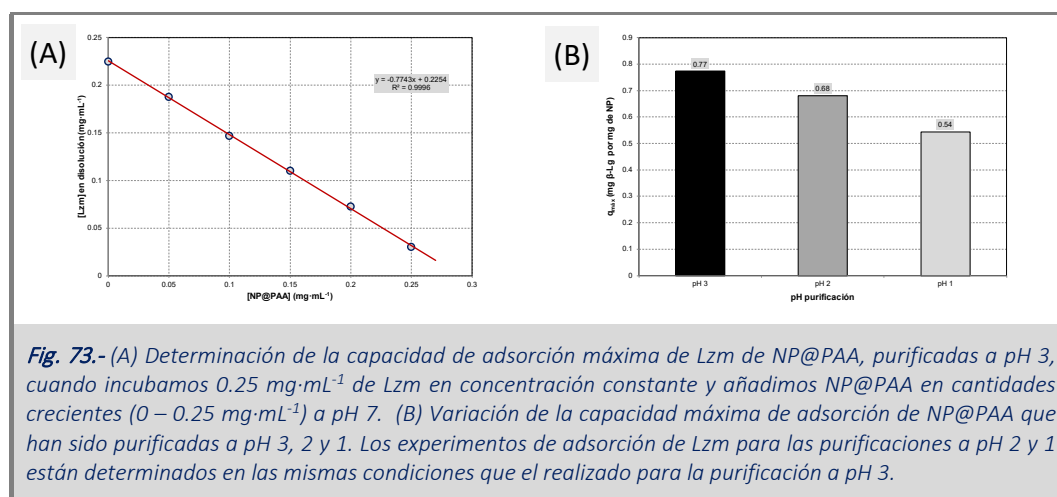
De forma análoga a como se estudió la dependencia del tamaño de la partícula resultante con el exceso de polielectrolito utilizado en la síntesis del recubrimiento, se determinó la cantidad mínima de PAA que es necesario para que la nanopartícula quede totalmente recubierta, asumiendo que esto ocurre a una relación en peso de PAA/NP dada, cuando el tamaño de la partícula es mínimo. Esto lo hemos hecho a concentración constante de NP ( $0.45 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) y a concentración creciente de PAA ( $0 - 4.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), llegando a una relación en peso de 10 veces el PAA sobre la NP. En este caso, como se observa en la Fig. 72, la cantidad mínima de PAA que necesitamos para conseguir reducir lo máximo posible el tamaño es de 6 veces en peso sobre la cantidad de NP. A partir de aquí, aunque aumentemos la relación en peso PAA/NP, el tamaño permanece prácticamente constante ( $\sim 90 \text{ nm}$ ).



En el inserto de la Fig. 72, donde se ha representado la variación de tamaño hasta una relación en peso PAA/NP de 0.3, a bajas relaciones en peso de PAA con respecto a la nanopartícula ( $0.075 \text{ mg}$  de PAA por  $\text{mg}$  de NP), se produce la agregación de las NP por el PAA, puesto que al estar en defecto con respecto a la nanopartícula, cada molécula unirá a varias nanopartículas distintas, sin capacidad por tanto de disgregarlas. A pesar de que el recubrimiento es efectivo cuando la relación en peso de PAA/NP supera 0.2  $\text{mg}$  PAA/ $\text{mg}$  NP, puede existir una pequeña agregación por parte de las NP en el momento inicial en el que se están recubriendo, puesto que las primeras moléculas de polielectrolito que se adsorben, hacen que la carga neta de la nanopartícula sea menos positiva puesto que se están compensando cargas de la superficie por parte del polielectrolito, pudiendo provocar una agregación parcial de las mismas. Aunque no se ha

obtenido el valor del potencial Z de las NP@PAA en el rango de pH anterior (desde pH 3.0 hasta pH 11.0), a pH 7 presentan una carga negativa de  $-17 \pm 2$  mV.

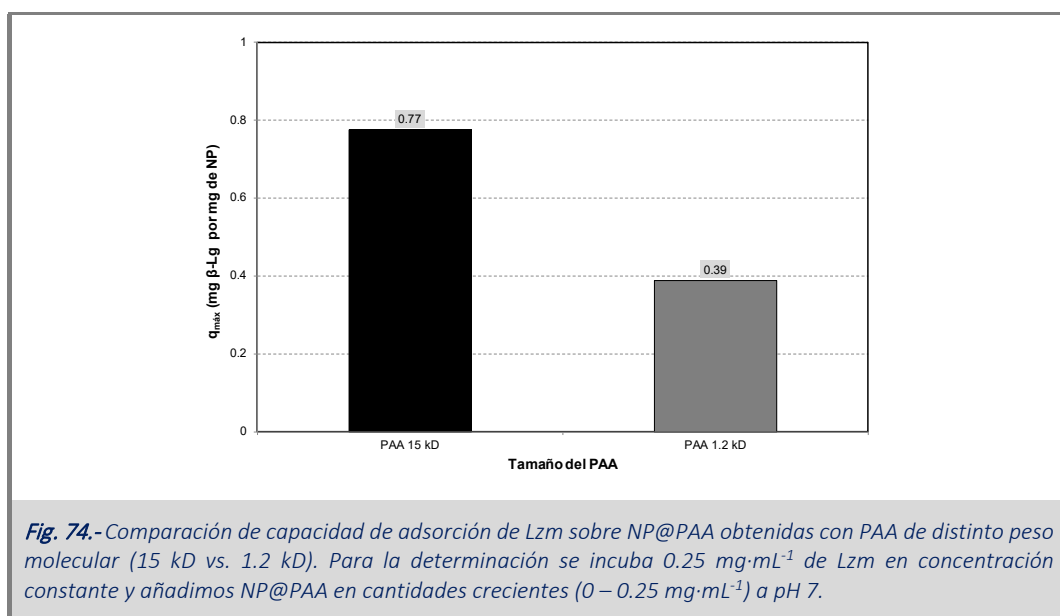
Para comprobar la estabilidad del recubrimiento y optimizar el proceso de purificación para eliminar el PAA que no haya recubierto la NP, hacemos lavados bajando el pH a pH 3.0, pH 2.0 y pH 1.0. En estas condiciones protonamos los grupos carboxílicos que quedan expuestos del PAA precipitando la NP@PAA. Además, para aquellos grupos carboxílicos que están en contacto con la superficie de la nanopartícula y no se haya producido una bajada muy grande de su  $pK_a$  como consecuencia de esta unión<sup>238</sup>, el protón podrá competir por el carboxilato que se encuentra quelando al hierro y ser por tanto desorbido de la superficie. Esto se conseguirá más fácilmente a pH más bajo, donde la concentración de protones presentes es superior (100 veces mayor a pH 1.0 con respecto a pH 3.0). Si estas nanopartículas las resuspendemos a pH 7.0 (previamente lavadas) y hacemos estudios de adsorción con proteína, nos dará información acerca de la fortaleza de unión del PAA sobre la superficie, determinando por tanto qué pH a utilizar es mejor para optimizar el proceso de purificación. Para ello utilizamos Lzm, por lo que incubamos la proteína a concentración constante ( $0.25 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) y cantidades crecientes de NP@PAA ( $0 - 0.25 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Tras decantar magnéticamente, cuantificamos el sobrenadante obteniendo, por tanto, la capacidad máxima de adsorción de Lzm de estas NP@PAA (Fig. 73). En la Fig. 73-A se muestra la determinación de la capacidad máxima de adsorción de Lzm sobre NP@PAA purificadas bajando el pH hasta 3.0 y resuspendidas a pH 7.0. La pendiente, 0.77 muestra los mg de Lzm que se adsorben por mg de NP@PAA. En la Fig. 73-B, tras tratar los datos de igual forma, se comparan la capacidad de adsorción de las NP@PAA purificadas a distintos pH.



A partir de los datos obtenidos, observamos que a pesar de que las NP@PAA han sido tratadas a bajo pH, el polielectrolito permanece unido casi en su totalidad, ya que la pérdida de adsorción de Lzm sobre NP@PAA que han sido tratadas a pH 2 sobre las que han sido tratadas a pH 3, es de sólo un 10 %, mientras que un 28 % se pierde para las tratadas a pH 1. Consideramos una capacidad de adsorción del 100 % para

aquellas NP@PAA tratadas a pH 3 puesto que es el tratamiento menos agresivo que podemos realizar para purificar las nanopartículas. Estos resultados nos indican por un lado que el  $pK_a$  de los grupos carboxílicos del PAA no es único, sino que se comporta como un continuo, viéndose influenciados unos a otros por su entorno. Y por otro lado la interacción que se establece entre el PAA y la superficie es suficientemente fuerte como para que el 72 % siga adsorbido a 0.1 M de  $H^+$ , teniendo en cuenta que el recubrimiento ha sido realizado mediante adsorción y no hay ninguna unión covalente sobre la superficie.

Estos resultados se obtienen tras recubrir con un PAA de peso molecular de 15 kD, pero ¿cómo afecta que usemos un polielectrolito de menor tamaño al recubrimiento de la nanopartícula? Para ver esto, recubrimos las NP con un PAA de un peso molecular de 1.2 kD, obteniendo NP@PAA con un tamaño hidrodinámico de  $\sim 115$  nm, similar al de las obtenidas con el de 15 kD. Tras determinar la capacidad de adsorción de Lzm de estas NP@PAA de 1.2 kD en las mismas condiciones que las NP@PAA de 15 kD, los resultados de capacidad de adsorción se muestran en la Fig. 74.



Al recubrir con un PAA de menor tamaño, la capacidad de adsorción se ve reducida casi un 50 % aproximadamente (0.39 frente a 0.77 mg de Lzm por mg de NP@PAA). Esto puede ser debido a que, a igual número de contactos con la superficie, el de mayor peso molecular expone al medio un mayor número de residuos sobre los que la proteína puede interactuar, por lo que, con el que mayor capacidad de adsorción se consigue es con el de 15 kD de peso molecular.

Anteriormente se ha comentado la posibilidad de que exista una pequeña agregación de las NP@PAA cuando se empiezan a adsorber las primeras moléculas de polielectrolito al partir de NP de magnetita desnudas a pH 3 (cargadas positivamente), y ser añadidas sobre el PAA a pH 5 (cargado negativamente). Si esto lo hacemos a un pH donde la NP no va a compensar carga, porque presenta la misma carga que el

polielectrolito, no podrá darse tal agregación, por lo que se ha propuesto el recubrimiento de las NP de PAA a un pH de 9.

Para ello, partimos de NP de magnetita desnudas a pH 11 (carga negativa) y las añadimos sobre PAA a pH 9 a la concentración que corresponda para lograr el exceso deseado. En este caso, el recubrimiento va a ser guiado fundamentalmente por la capacidad quelante del grupo carboxilato del PAA. A pesar de la repulsión que sufren la NP y el PAA debido a la carga negativa que presentan, la gran capacidad quelante del carboxilato hacia los átomos de hierro de la superficie a este pH hace que el recubrimiento sea posible. La gran ventaja de este método con respecto al anterior es que la carga de las nanopartículas nunca cambia, ya que estamos uniendo una molécula con la misma carga, y por tanto no existe una posible agregación entre ellas.

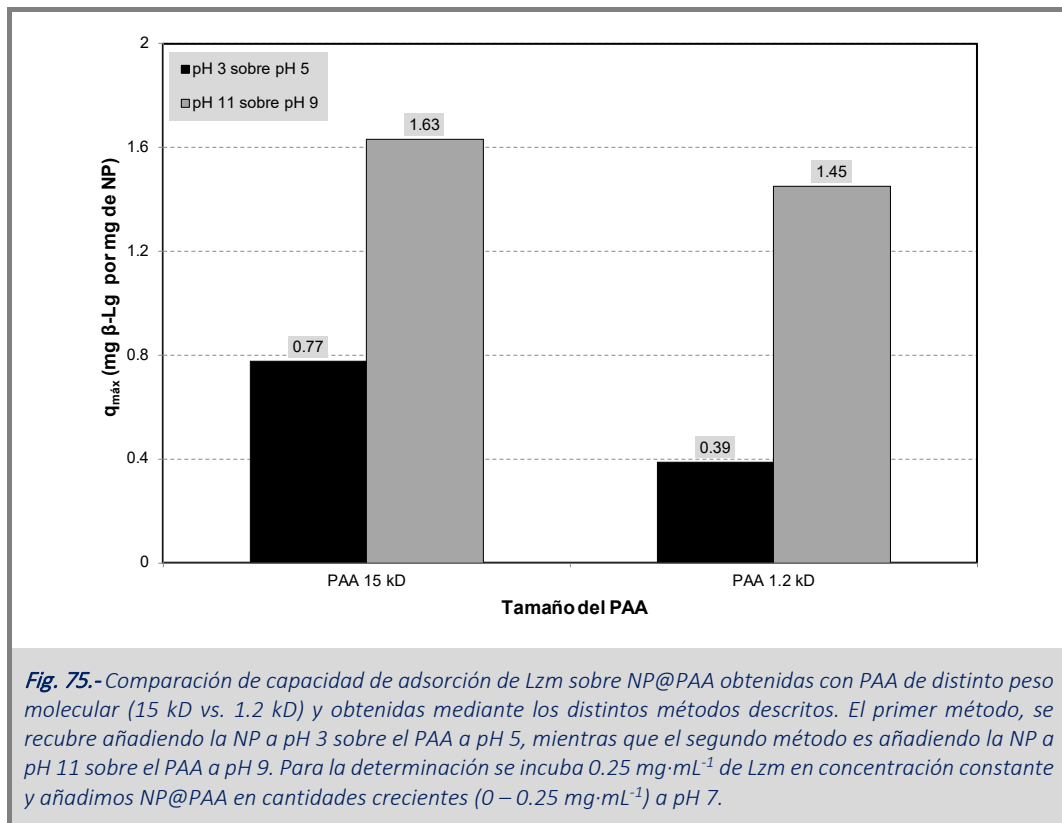
Al determinar la capacidad de adsorción de Lzm en idénticas condiciones a las que se han descrito anteriormente, se obtiene que para estas nuevas preparaciones la capacidad de adsorción es de  $1.63 \text{ mg Lzm}\cdot\text{mg}^{-1}$ , y de  $1.45 \text{ mg Lzm}\cdot\text{mg}^{-1}$ , para las obtenidas con PAA de 15 kD y de 1.2 kD, respectivamente (Fig. 75). Cuando recubrimos NP@PAA en estas condiciones obtenemos un tamaño de alrededor de  $59.1 \pm 0.5 \text{ nm}$  para las obtenidas con PAA de 15 kD y de  $49.2 \pm 0.4 \text{ nm}$  para las de PAA 1.2 kD. Si analizamos cada NP@PAA de forma separada obtenemos que, para el caso de NP@PAA de 15 kD, se produce una reducción de tamaño de 1.5 veces (de 90 a 60 nm), lo que implica que la capacidad de adsorción aumente en consecuencia 1.5 veces (lo que supondría un aumento de la capacidad de adsorción teórica por reducción del tamaño de  $1.16 \text{ mg Lzm}\cdot\text{mg}^{-1}$ , considerando los  $0.77 \text{ mg}\cdot\text{mg}^{-1}$  obtenidos con el método anterior), pero esto no es así, la capacidad de adsorción aumenta  $0.48 \text{ mg Lzm}\cdot\text{mg}^{-1}$  más que el valor teórico obtenido por la simple reducción de tamaño. Esto sucede de igual forma para las NP@PAA de 1.2 kD, puesto que para estas se produce una reducción de tamaño de 2.3 veces (de 115 a 50 nm), lo que implicaría que la capacidad de adsorción aumentase de forma proporcional (supondría un aumento de la capacidad de adsorción teórica por reducción del tamaño de  $0.92 \text{ mg Lzm}\cdot\text{mg}^{-1}$ , considerando los  $0.39 \text{ mg}\cdot\text{mg}^{-1}$  obtenidos con el método anterior), pero al igual que con las NP@PAA de 15 kD, la capacidad de adsorción con respecto al teórico por la reducción de tamaño aumenta  $0.53 \text{ mg Lzm}\cdot\text{mg}^{-1}$  más.

Este aumento de  $\sim 0.5 \text{ mg Lzm}\cdot\text{mg}^{-1}$  más para cada preparación deber ser consecuencia del aumento de afinidad de los grupos carboxílicos sobre la superficie de la NP cuando recubrimos a pH 9 (con respecto a la afinidad cuando se recubre a pH 5), haciendo por tanto que se unan un mayor número de monómeros y por tanto que se produzca una mayor capacidad de adsorción.

Al igual que pasaba antes, cuando recubrimos con el PAA de mayor peso molecular obtenemos un aumento en la capacidad de adsorción, aunque en menor proporción que el anterior método, siendo este incremento del 13 %. Por los resultados que se muestran, vemos que el mejor método para obtener las

NP@PAA es hacerlo en condiciones donde la capacidad quelante del grupo carboxílico sea máxima. En estas condiciones reducimos el tamaño prácticamente a la mitad, logrando como consecuencia de estos dos procesos, un mayor aumento de la capacidad de adsorción, en este caso de Lzm.

Las mismas NP@PAA obtenidas mediante otra metodología consiguen adsorber 0.090 mg de Lzm por mg NP@PAA<sup>239,240</sup>, por lo que conseguimos un aumento en la capacidad de adsorción de 18 veces al obtenerlas en las condiciones descritas anteriormente (1.63 mg de Lzm por mg NP@PAA).



#### 4.3.5.- Conclusiones

Se han obtenido nanopartículas de magnetita recubiertas tanto con un polielectrolito catiónico, PAAH, como con otro de carga negativa, PAA. Se han optimizado las condiciones de síntesis del recubrimiento de forma que se minimice el tamaño de la nanopartícula resultante (con objeto de aumentar su área específica), su estabilidad coloidal y, más importante, su capacidad de adsorción de ligandos de carga opuesta. Se ha observado que cuando el recubrimiento se lleva a cabo a concentraciones moderadas de la magnetita, el tamaño de la nanopartícula resultante disminuye fuertemente con el exceso de polielectrolito en el medio, hasta alcanzarse un tamaño mínimo. Incrementos posteriores del exceso de polielectrolito presente en el medio de reacción no tiene un efecto favorable en la reducción del tamaño, pudiendo producir un aumento en la fuerza iónica del medio que induzca el apantallamiento de la repulsión entre partículas recubiertas y hacer menos efectiva la desaglomeración de las partículas de magnetita.

Ambos recubrimientos, NP@PAAH y NP@PAA muestran una elevada capacidad de adsorción de proteínas de carga opuesta. Se ha demostrado que tanto el pH de la disolución a la cual se lleva a cabo el recubrimiento como la fuerza iónica del medio tienen un importante efecto sobre el número de monómeros de polielectrolito expuestos al disolvente y, en consecuencia, con su capacidad de adsorción. La optimización de la capacidad de adsorción de las partículas de magnetita con polielectrolitos requiere un control de ambos parámetros (pH y fuerza iónica) habiéndose demostrado cuales son las claves para un diseño verdaderamente racional.

4.4.- Capítulo 4 - Diseño y caracterización de nanopartículas magnéticas para la captura de metales pesados

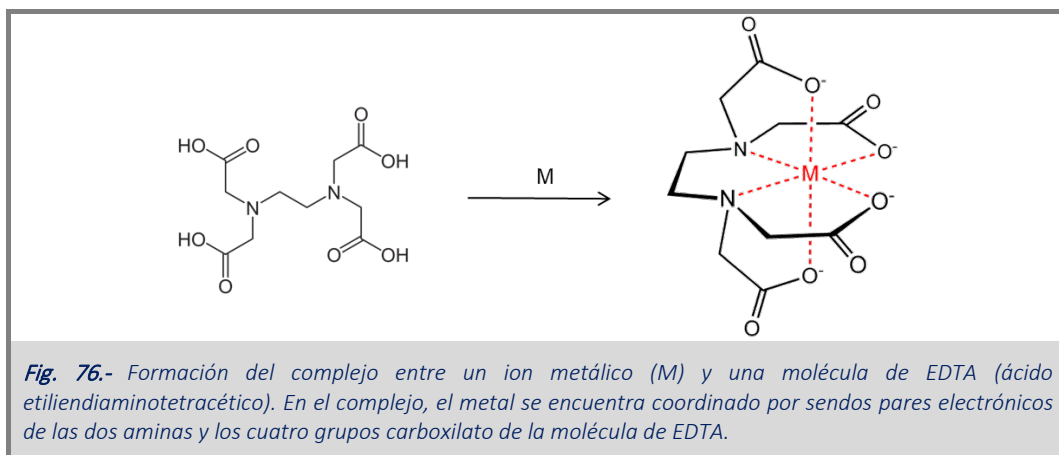




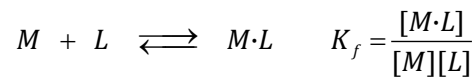
#### 4.4.1.- Introducción

Son cada vez mayores los problemas derivados de la contaminación por metales pesados. Dada la necesidad de encontrar soluciones, proponemos la síntesis de nanopartículas magnéticas derivatizadas en cuya estructura o superficie posean grupos análogos a los que presenta la molécula de EDTA (ácido etilendiaminotetracético), un excelente agente quelante de metales. La ventaja de trabajar con nanopartículas magnéticas es que, una vez han capturado el ligando deseado, pueden ser retiradas de la disolución mediante la acción de un campo magnético externo. Además, la posibilidad de recuperar la nanopartícula unida al contaminante abre la puerta al desarrollo de metodologías que permitan la liberación controlada del contaminante, su recuperación y la reutilización de las partículas magnéticas en ciclos de captura sucesivos.

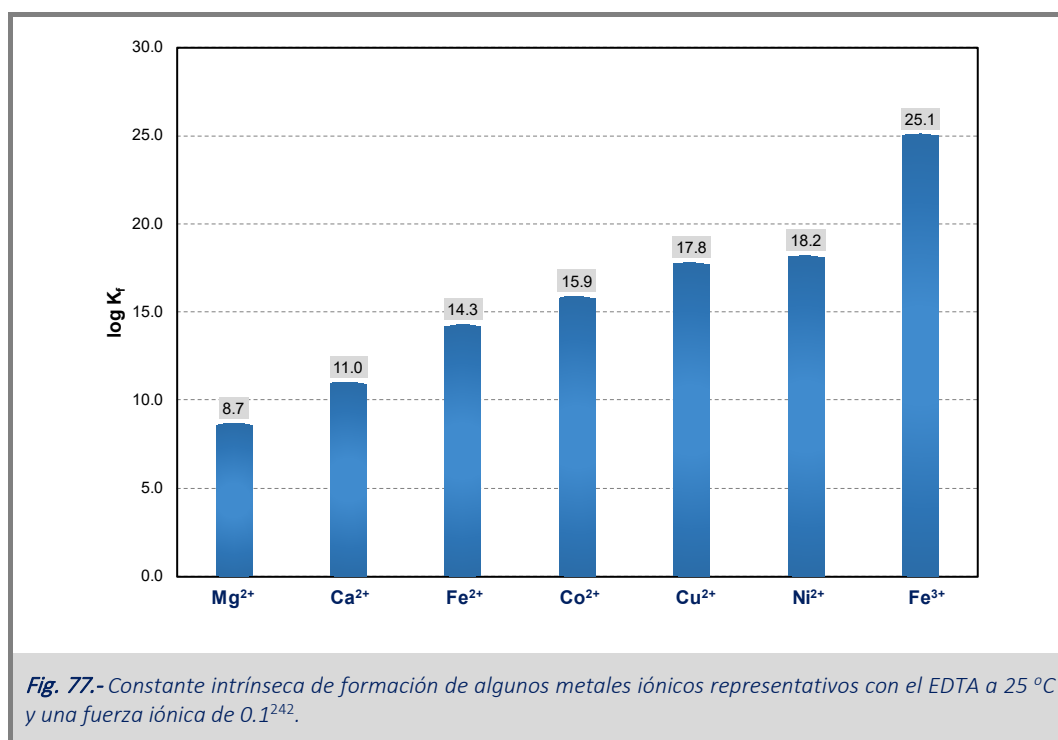
Existen distintos ligandos capaces de unir iones metálicos que suelen clasificarse de acuerdo con el número de contactos que establezca el ligando con el metal. Así, los ligandos monodentados (ion cianuro,  $\text{CN}^-$ , el fluoruro,  $\text{F}^-$ , el tiocianato,  $\text{SCN}^-$ , etc.) se unen al metal a través de un único átomo. Por su parte los polidentados se unen al metal a través de más de un átomo, pudiendo encontrarse ligandos bidentados como la etilendiamina ( $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ ), tetradentados como puede ser el trifosfato de adenosina (ATP) o hexadentados como el EDTA (Fig. 76). Cuando los ligandos polidentados se coordinan con el átomo metálico forman un complejo conocido como quelato<sup>241</sup>. El efecto quelato es un efecto puramente entrópico que reduce la pérdida de entropía traslacional como consecuencia del menor número de partículas que pasan a formar parte del complejo. Así, si para formar el complejo metal – ligando se requieren 6 moléculas de un ligando monodentado, la formación del complejo supondría pasar de 7 partículas de reactivos (ion metálico y 6 ligandos monodentados) a una única partícula de complejo. Sin embargo, si ese mismo metal forma un complejo con un ligando hexadentado, la reacción de formación del complejo implicaría una menor pérdida entrópica traslacional ya que supondría pasar de 2 a 1 partícula. La menor pérdida de entropía asociada al efecto quelato favorece la espontaneidad de la reacción de formación del complejo haciendo el cambio de energía libre más negativo (la contribución entrópica se hace menos desfavorable) aumentando, por tanto, la constante de equilibrio<sup>241</sup>.



En el caso de la formación de un complejo metal-EDTA tenemos que:



Donde  $[M \cdot L]$ ,  $[M]$  y  $[L]$  son las concentraciones de cada una de las especies en el equilibrio y  $K_f$  es la constante de formación del complejo. La Fig. 77 recoge únicamente los valores de las constantes de formación del complejo (en ocasiones conocidas como constantes de estabilidad) para algunos iones metálicos representativos. El EDTA es un ejemplo de agente quelante que presenta una elevada afinidad hacia virtualmente todos los iones metálicos divalentes (y de carga superior), presentando especificidad únicamente entre iones cuyas constantes de formación son suficientemente distintas entre ellas.



#### 4.4.2.- Hipótesis de partida

Es posible diseñar recubrimientos que mimeticen el comportamiento del EDTA como agente quelante general de metales pesados. Existen varias posibilidades que pretendemos explorar experimentalmente y que se enumeran en el apartado siguiente.

Por otra parte, la naturaleza magnética de las nanopartículas a diseñar y sintetizar permitiría fácilmente la captura del contaminante y su recuperación posterior. Por ello, el diseño debe contemplar la posibilidad de provocar la disociación del metal respecto del agente quelante.

Además, pretendemos desarrollar metodologías de captura selectiva de iones presentes en mezclas de éstos pudiendo no sólo recuperar el metal o metales, sino haciéndolo de forma fraccionada debido a la distinta afinidad que el recubrimiento mostraría frente a éstos<sup>243</sup>.

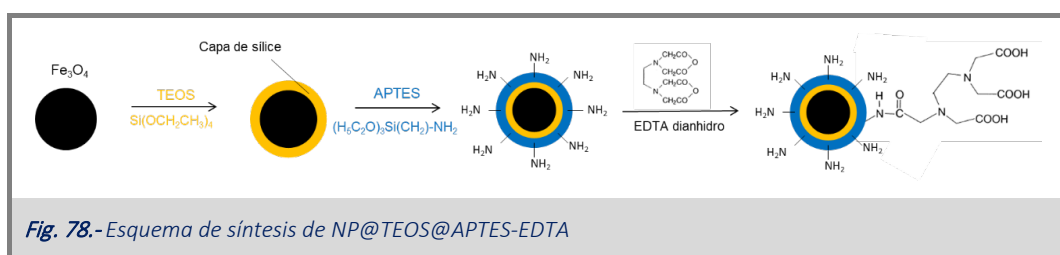
#### 4.4.3.- Estrategia experimental

- ✓ Recubrir las partículas de magnetita con sílice (utilizando TEOS) y derivatizar la superficie de la sílice con APTES para que se expongan al disolvente grupos amino. Utilizar el EDTA anhidro y modificar covalentemente los grupos amino del APTES expuestos al disolvente.
- ✓ Derivatizar alguno de los polielectrolitos catiónicos formados por aminas (tales como PAAH o PEI) carboxilando la amina y formando un enlace covalente entre el N de la amina y el C del resto  $-\text{CH}_2-\text{COOH}$ . Estos polielectrolitos así modificados deberían tener una elevada afinidad por los cationes metálicos.
- ✓ Determinar la capacidad de unión que presentan las partículas de magnetita recubiertas por cualquiera de los métodos comentados hacia distintos metales, utilizando el  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  o  $\text{Co}^{2+}$ , como ejemplos de ligandos.
- ✓ Probar que las NP sean regenerables, y puedan ser utilizadas varios ciclos para capturar metales.
- ✓ Testar si las partículas presentan constantes de unión suficientemente distintas para algunos metales de forma que puedan separarse fraccionadamente.

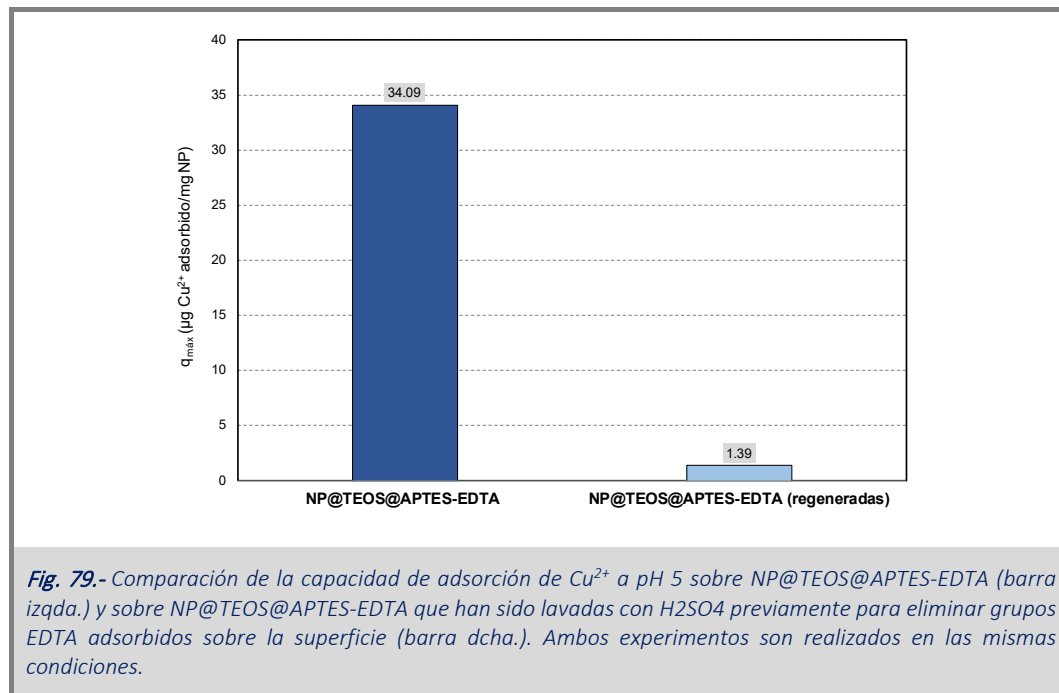
#### 4.4.4.- Resultados y discusión

En primer lugar proponemos unir covalentemente la molécula de EDTA (partiendo de EDTA dianhidro (Fig. 78) sobre nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  que han sido previamente recubiertas, **NP@TEOS@APTES**, (descritas en materiales y métodos) las cuales exponen grupos  $\text{NH}_2$  al medio pudiendo ser fácilmente derivatizados. A priori, existe la posibilidad que, en caso de ser efectiva la formación de enlaces covalentes, éstos afecten a más de un grupo carboxilato, lo que reduciría de forma muy sensible la afinidad del metal por estos centros de unión.

Los detalles de la síntesis se presentan en el capítulo de Materiales y Métodos de esta Tesis Doctoral. La Fig. 78 muestra esquemáticamente el proceso realizado. Las partículas de magnetita fueron recubiertas con sílice utilizando TEOS como precursor siguiendo el método de Ströber. Tras su lavado y sonicación, se derivatizó la superficie de sílice con APTES para lograr tener grupos amino en la superficie de la partícula. Finalmente, la reacción con EDTA dianhidro se realizó en medio alcohólico en ausencia de agua.



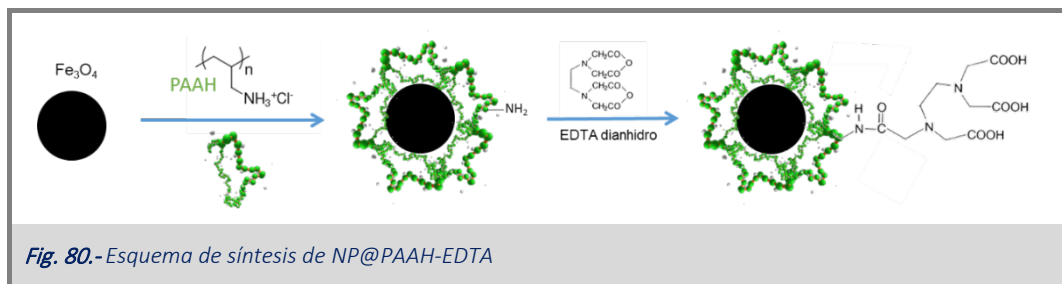
Una vez obtenidas estas nanopartículas, se ponen a  $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  junto con una disolución que contiene  $\text{Cu}^{2+}$ . Tras dejar incubar para que se produzca la adsorción, decantamos las nanopartículas con un imán y cuantificamos el  $\text{Cu}^{2+}$  que queda en disolución, pudiendo determinar por diferencia la cantidad de  $\text{Cu}^{2+}$  que son capaces de adsorber. Estos resultados se muestran en la Fig. 79. Es importante destacar que el experimento también se realizó con las nanopartículas de las que proceden (NP@TEOS@APTES), en las mismas condiciones, para determinar si poseen capacidad de adsorción de  $\text{Cu}^{2+}$ , encontrando que la capacidad de adsorción de  $\text{Cu}^{2+}$  es nula (datos no mostrados).



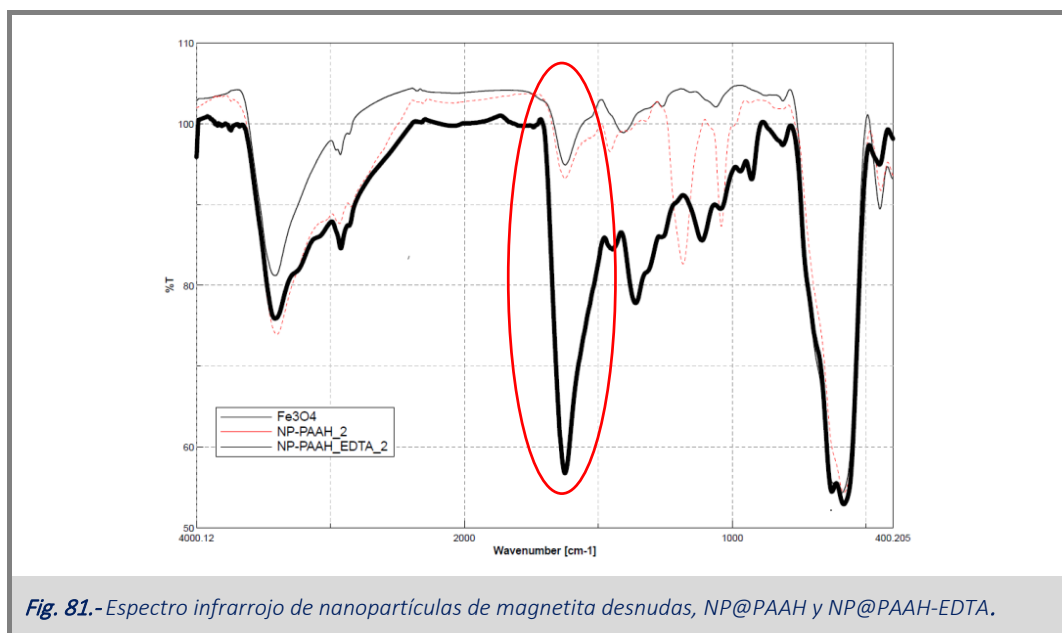
En la Fig. 79 la barra de la izquierda muestra la capacidad de adsorción de  $\text{Cu}^{2+}$  a pH 5 que poseen las nanopartículas, unos  $34 \mu\text{g}$  de  $\text{Cu}^{2+}$  por mg de NP. A priori parece que el EDTA ha sido incorporado de forma correcta sobre la superficie de la nanopartícula, sin embargo, si las tratamos con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  para regenerarlas (protonación de los grupos carboxílicos de la molécula de EDTA, con la consecuente disociación de las moléculas de  $\text{Cu}^{2+}$  previamente adsorbidas) se produce una pérdida casi total de la capacidad de adsorción de  $\text{Cu}^{2+}$ , siendo ahora de  $1,4 \mu\text{g}$  de  $\text{Cu}^{2+}$  por mg de NP. Esto significa que la derivatización no se ha completado de forma correcta y, por tanto, las moléculas de EDTA no están unidas covalentemente sobre la superficie, sino adsorbidas sobre la superficie cargada positivamente.

El proceso de síntesis fue intentado un número elevado de veces variando las condiciones en las que se llevó a cabo, en un intento de optimizar el procedimiento. Sin embargo, en todas las ocasiones se obtuvieron partículas que parecían tener una cierta capacidad de capturar metales pero que tras ser lavadas en medio ácido perdían dicha capacidad quelante. Debido a los problemas encontrados, decidimos intentar llevar a cabo la derivatización (utilizando el EDTA dianhidro) pero sobre partículas de magnetita

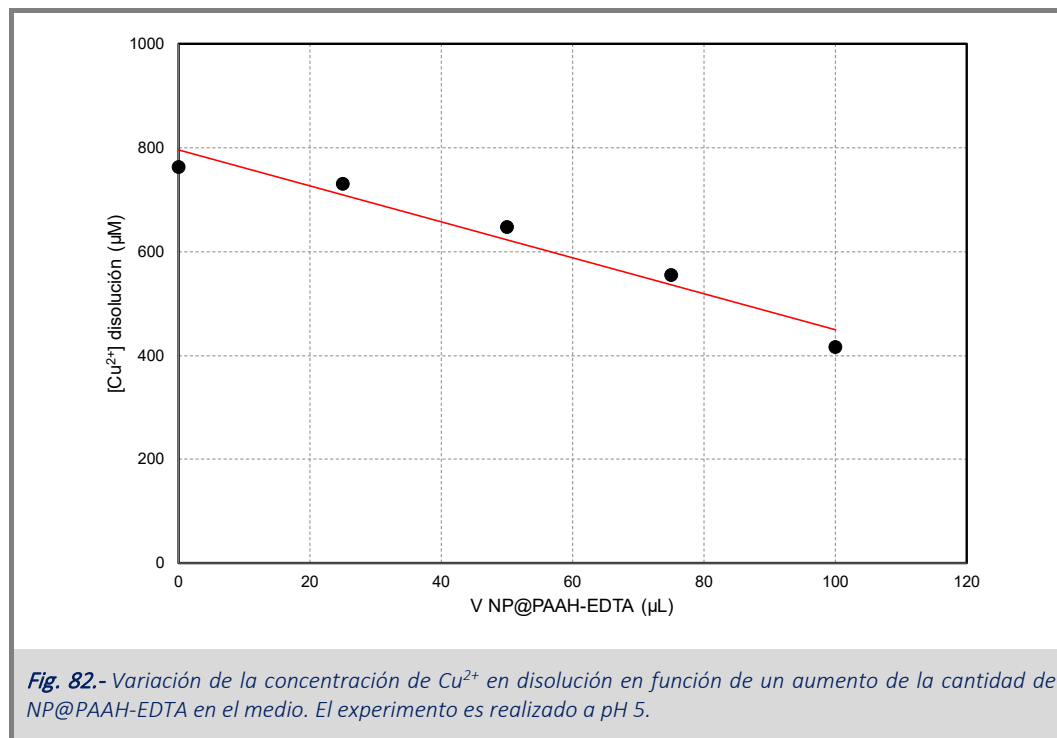
previamente recubiertas de PAAH (siguiendo los procesos comentados en el apartado anterior de este capítulo de Resultados y Discusión). La metodología usada ahora es la misma que lo anterior pero partiendo de nanopartículas recubiertas por un polielectrolito catiónico, el PAAH (NP@PAAH) (Fig. 80).



Dada la baja solubilidad del PAAH en medio no acuoso, la derivatización también resulta algo compleja aunque, a priori, sí que se produce (Fig. 81). A partir de los espectros infrarrojo correspondientes vemos que aparece una banda más intensa a frecuencias donde se produce la vibración del enlace del grupo carboxílico, confirmando que el EDTA está presente sobre la nanopartícula, aunque puede estar unido covalentemente o adsorbido mediante interacciones electrostáticas, como ocurría en la metodología anteriormente descrita, por lo que debemos de estudiar dicha interacción con la superficie.



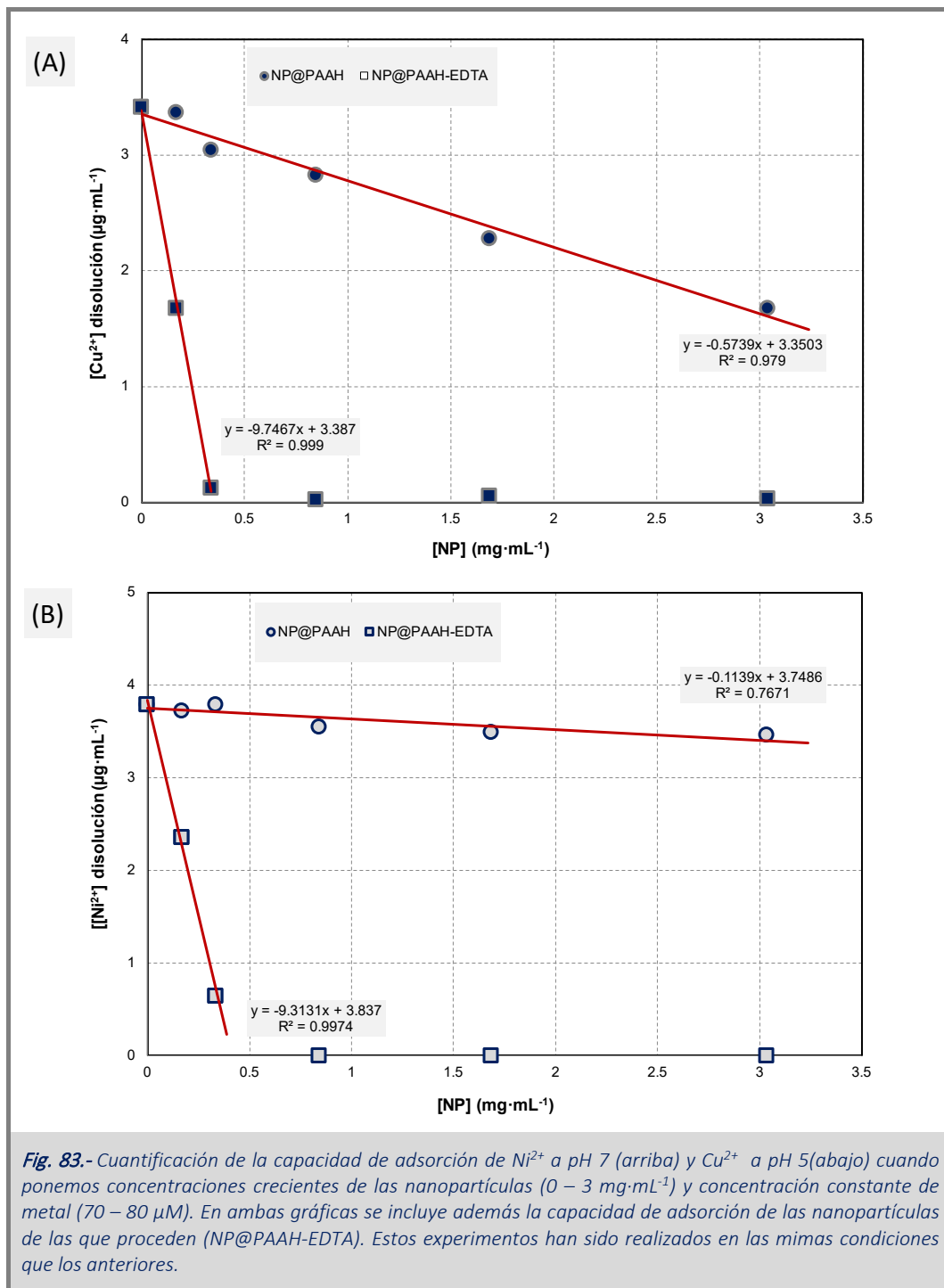
Una vez obtenidas y lavadas con  $H_2SO_4$  para eliminar aquellas moléculas de EDTA que pudieran quedar adsorbidas sobre la superficie de la nanopartícula, añadimos volúmenes crecientes de éstas sobre una disolución a pH 5 que contiene alrededor de  $700 \mu M$  de  $Cu^{2+}$  (Fig. 82). A medida que aumenta la cantidad de nanopartícula, la cantidad de  $Cu^{2+}$  disminuye en el medio, lo que confirma que son capaces de eliminar metal del medio, y que los grupos EDTA están covalentemente unidos sobre la superficie.



Por tanto, confirmada la unión covalente de los grupos EDTA sobre la superficie de la nanopartícula, cuantificamos la capacidad de adsorción que poseen tanto con Ni<sup>2+</sup> como con Cu<sup>2+</sup> (Fig. 83).

Es importante destacar que las nanopartículas han de almacenarse con un exceso de metal, en este caso con Cu<sup>2+</sup>, para saturar los grupos EDTA presentes, puesto que si no se almacenan en estas condiciones la nanopartícula acaba disolviéndose. Esto podría ser debido a la flexibilidad que posee el polielectrolito, cuya incorporación a la estructura de grupos carboxilatos, hace que estos puedan acceder a la superficie de la nanopartícula y eliminar átomos de Fe<sup>2+</sup> y Fe<sup>3+</sup> de la estructura, produciendo por tanto la digestión de la nanopartícula. En principio esto no supone un problema mayor, puesto que antes de ser usadas tendrían que pasarse por una disolución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para eliminar el metal adsorbido, y tras esto resuspenderlas y añadirles a la disolución a tratar.

Para cuantificar la capacidad de adsorción incubamos cantidades crecientes de NP@PAAH-EDTA (0 – 3 mg·mL<sup>-1</sup>) en una disolución que contiene una concentración constante de Cu<sup>2+</sup>, alrededor de 70 µM. Tras decantar con el imán, cuantificamos el sobrenadante para determinar el Cu<sup>2+</sup> residual que no ha sido adsorbido. A partir de aquí determinamos la capacidad de adsorción de dichas NP (Fig. 83-A). Esto se repitió también con Ni<sup>2+</sup> en las mismas condiciones. (Fig. 83-B). Como control, también se determinó la capacidad máxima de adsorción de ambos metales por las partículas de magnetita recubiertas con PAAH (NP@PAAH) pero no derivatizadas con el EDTA anhidro.



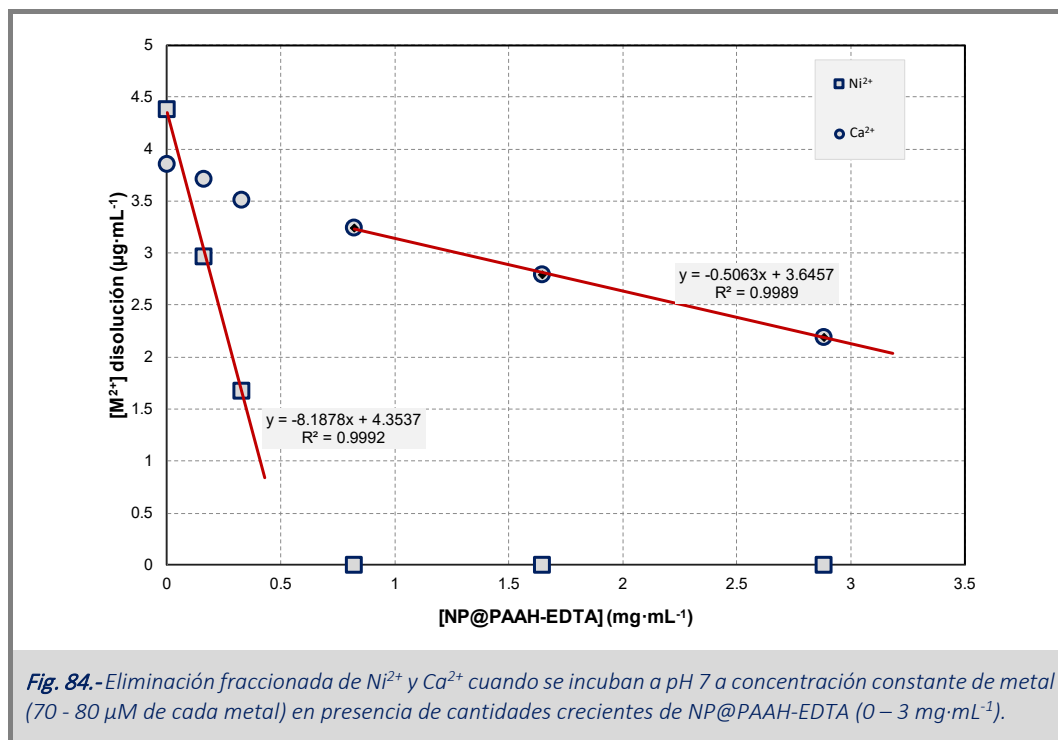
De las pendientes obtenidas en ambas gráficas de la Fig. 83, podemos confirmar que estas nanopartículas son capaces de adsorber alrededor de  $9.3 - 9.7 \text{ }\mu\text{g}$  de metal ( $\text{Ni}^{2+}$  o  $\text{Cu}^{2+}$ ) por  $\text{mg}$  de nanopartícula. Es importante constatar que existe una muy distinta capacidad de capturar ambos metales por las partículas derivatizadas (NP@PAAH@EDTA) y no derivatizadas (NP@PAAH).

Cuando tenemos NP@PAAH se produce una adsorción de  $\text{Cu}^{2+}$  y de  $\text{Ni}^{2+}$  de  $0.57$  y  $0.11 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$  de NP, respectivamente, mientras que con el EDTA se produce un aumento de la capacidad de adsorción de unas 17 veces para el  $\text{Cu}^{2+}$  ( $9.7 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) y de 85 veces para el  $\text{Ni}^{2+}$  ( $9.3 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) siendo esta capacidad de

adsorción similar debido a la similar afinidad que presentan (ver Fig. 77), siendo además su peso atómico muy similar.

Confirmada la capacidad de adsorción de metal, aunque algo baja si la comparamos con las nanopartículas obtenidas con la primera metodología (9.3 frente a  $34 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ ), hacemos pruebas de especificidad para determinar si se produce la adsorción de metal de forma selectiva cuando hay dos metales en el medio.

Para ello utilizamos dos metales con constantes de afinidad bastante distintas por el EDTA, como son el  $\text{Ni}^{2+}$  ( $K_f'$  (pH 7) =  $2.0\cdot 10^{15}$ ) y el  $\text{Ca}^{2+}$  ( $K_f'$  (pH 7) =  $4.38\cdot 10^7$ ). Para estudiar esto, incubamos los dos metales a una concentración similar de unos  $80 \mu\text{M}$  y añadimos cantidades crecientes de nanopartículas. Tras decantar las nanopartículas con ayuda de un campo magnético externo, determinamos la cantidad de cada uno de los metales que quedan en disolución. Los resultados se recogen en el Fig. 84.



Como vemos en la Fig. 84 cuando se ponen en contacto las nanopartículas con una disolución que contiene mezcla de metales, elimina primero aquel que tiene una afinidad mayor por este ( $\text{Ni}^{2+}$ ), y una vez que es completamente adsorbido se produce la captura del segundo metal, en este caso el  $\text{Ca}^{2+}$ . En los resultados vemos que al principio parece que también se produce una eliminación de  $\text{Ca}^{2+}$  del medio, ya que la cantidad presente en el medio no permanece constante, pero esto se explica por el método en que se lleva a cabo la cuantificación, y es que en presencia de  $\text{Ni}^{2+}$ , para la cuantificación de  $\text{Ca}^{2+}$  con el indicador de o-cresolftaleína, se produce un aumento en la señal, por lo que se sobreestima la concentración de metal que hay en el medio. En el primer punto, cuando aún no hemos añadido nanopartículas al medio, el valor de concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  es superior, y disminuye de forma lineal con la bajada en disolución del  $\text{Ni}^{2+}$ . Para



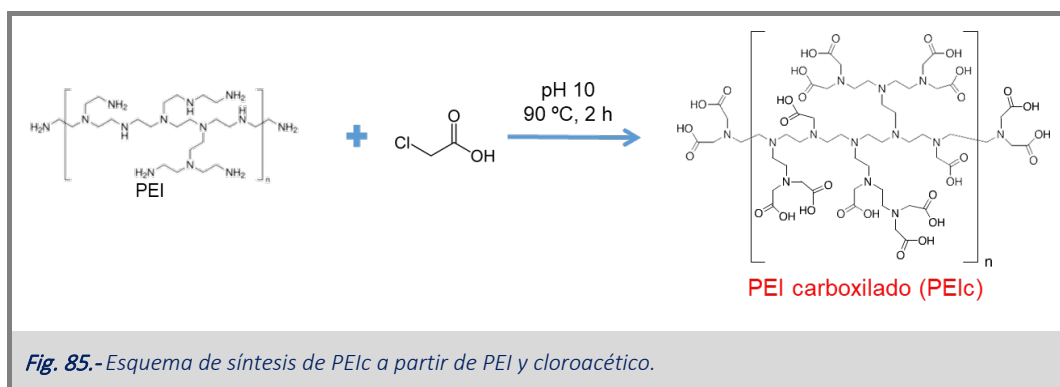
afirmar este comportamiento, se ha cuantificado  $\text{Ca}^{2+}$  con el mismo método en presencia de  $\text{Ni}^{2+}$  encontrándose una sobreestimación del contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  sobre el 20 – 40 %.

Por los resultados obtenidos confirmamos que las nanopartículas tienen capacidad selectiva para eliminar metales pesados del medio, y por lo tanto tendrían una buena aplicación para purificar aguas residuales donde haya una mezcla de metales.

Como conclusión del uso de estas nanopartículas, podemos decir que tienen capacidad para eliminar metal de forma selectiva, y además se pueden reutilizar fácilmente, ya que están almacenadas con un exceso de  $\text{Cu}^{2+}$  para saturar todos los grupos EDTA y tras lavar con  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , éstos quedan expuestos al disolvente. Como ha sido comentado anteriormente, la estabilidad de las nanopartículas una vez incorporada la molécula de EDTA es baja debido a la digestión de la magnetita por el propio recubrimiento. Además de esto pensamos que la capacidad de adsorción puede mejorarse usando otras metodologías que hagan que se produzca una mayor adsorción, por lo que diseñamos una tercera estrategia de obtención de NP.

La nueva estrategia a seguir, es usar otro polielectrolito con una mayor densidad de carga que el PAAH. Este polielectrolito es la PEI ramificada, utilizado como precursor para nuestro propósito. Resultados realizados de adsorción de  $\text{Cu}^{2+}$  sobre NP@PEI (mostrados en el apartado 5 de este capítulo de Materiales y Métodos), muestran que capturan alrededor de  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ , una capacidad bastante superior a las obtenidas anteriormente.

La PEI utilizada va a ser carboxilada (PEIc), uniendo covalentemente a las aminas primarias y secundarias grupos  $-\text{CH}_2\text{-COOH}$ , lo que hará que el nuevo polielectrolito contenga en localizaciones cercanas tanto los pares solitarios de los nitrógenos, como los grupos carboxilato introducidos, por lo que la estructura será similar a la de las moléculas de EDTA. Pensamos que de esta forma aumentaremos la capacidad de adsorción de metal puesto que no suprimimos uno o varios grupos carboxilatos como en las estrategias anteriores con el EDTA dianhidro. Para obtener la PEIc realizamos la síntesis en medio ácido derivatizando las aminas primarias y secundarias del polielectrolito<sup>199</sup>. Esto queda resumido en la Fig. 85.



Una vez sintetizada la PEIc, es caracterizada comparando el proceso de unión de Ni<sup>2+</sup> sobre la molécula de EDTA y sobre la PEIc. Esto lo llevamos a cabo mediante calorimetría isoterma de titulación, ITC (*Isothermal Titration Calorimetry*), de donde obtendremos su constante de afinidad (Fig. 86-EDTA y Fig. 86-PEIc).

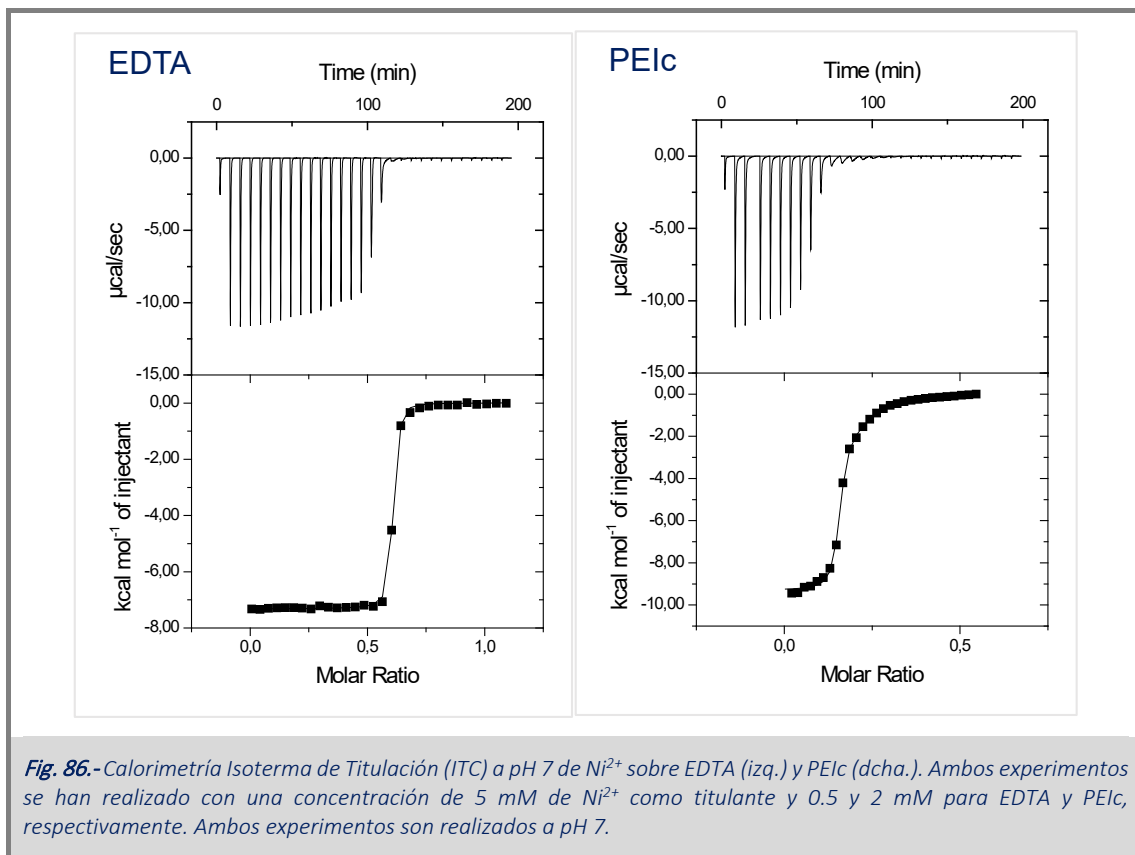


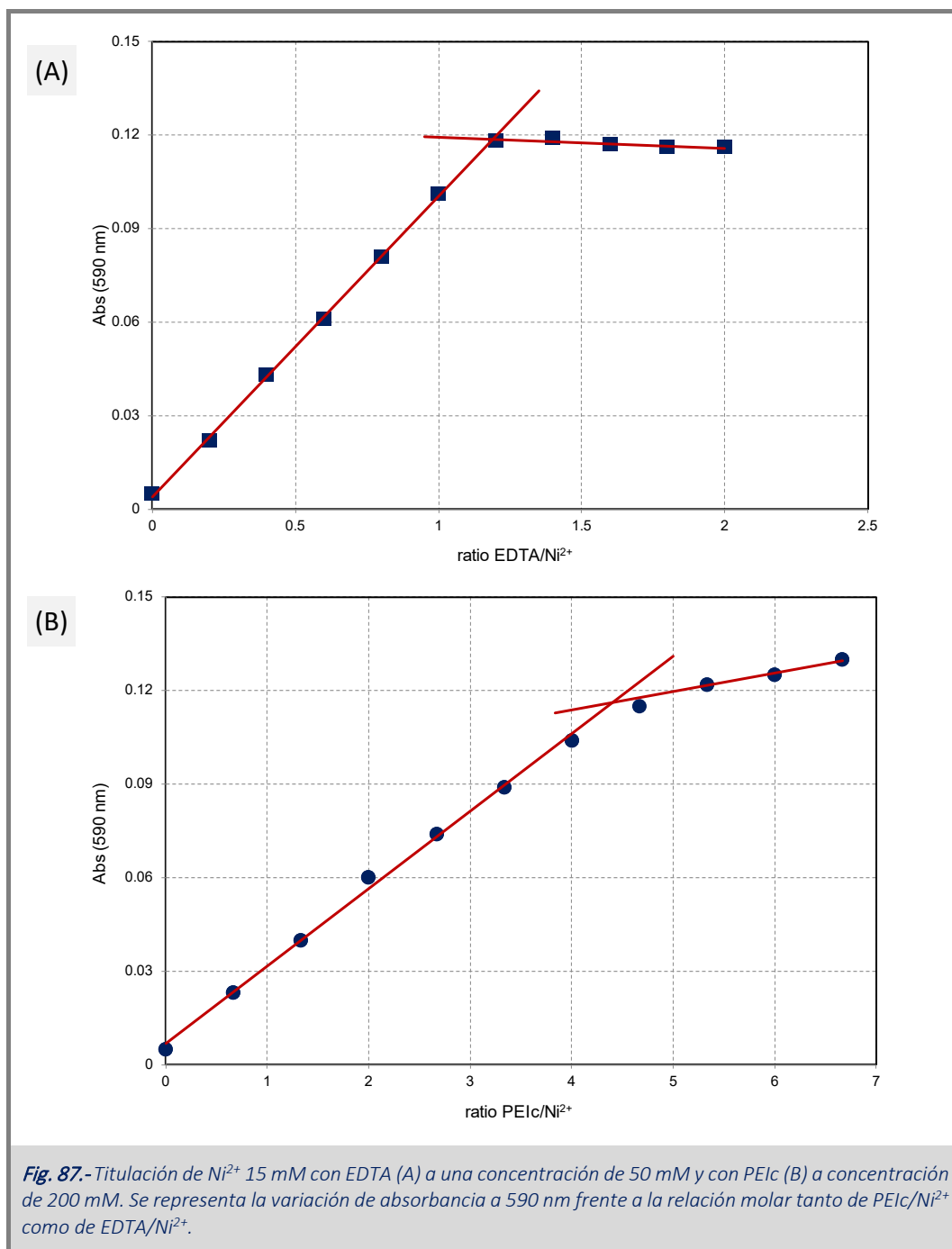
Fig. 86.- Calorimetría Isoterma de Titulación (ITC) a pH 7 de Ni<sup>2+</sup> sobre EDTA (izq.) y PEIc (dcha.). Ambos experimentos se han realizado con una concentración de 5 mM de Ni<sup>2+</sup> como titulante y 0.5 y 2 mM para EDTA y PEIc, respectivamente. Ambos experimentos son realizados a pH 7.

Tabla 7.- Parámetros termodinámicos de unión del Ni<sup>2+</sup> a EDTA y a PEIc obtenidos mediante ITC a pH 7.0 y 25 °C.

Metal	Constantes de unión, K <sub>b</sub>	
EDTA	5.5·10 <sup>6</sup>	
PEIc	K <sub>1</sub> = 3.0·10 <sup>6</sup>	K <sub>2</sub> = 2.2·10 <sup>4</sup>

De los resultados mostrados en la Tabla 7, vemos que la PEIc presenta dos tipos de sitios de unión frente al que presenta el EDTA, pero uno de ellos es de una afinidad similar a éste, con lo que el comportamiento en cuanto a la selectividad que presente respecto a los distintos metales debería de ser muy parecido. A pesar de que la estequiometría está subestimada por esta técnica, probablemente por un error en la concentración de ambos, tanto para EDTA como para PEIc, lo contrastamos espectrofotométricamente realizando una titulación de ambos con Ni<sup>2+</sup> a pH 7. Para monitorizar esto se ha llevado a cabo una adición de PEIc o EDTA sobre Ni<sup>2+</sup>, y se ha medido la absorbancia del complejo resultante (mayor coeficiente de extinción con respecto al metal libre) hasta que se produzca un cambio en la pendiente debido a que el

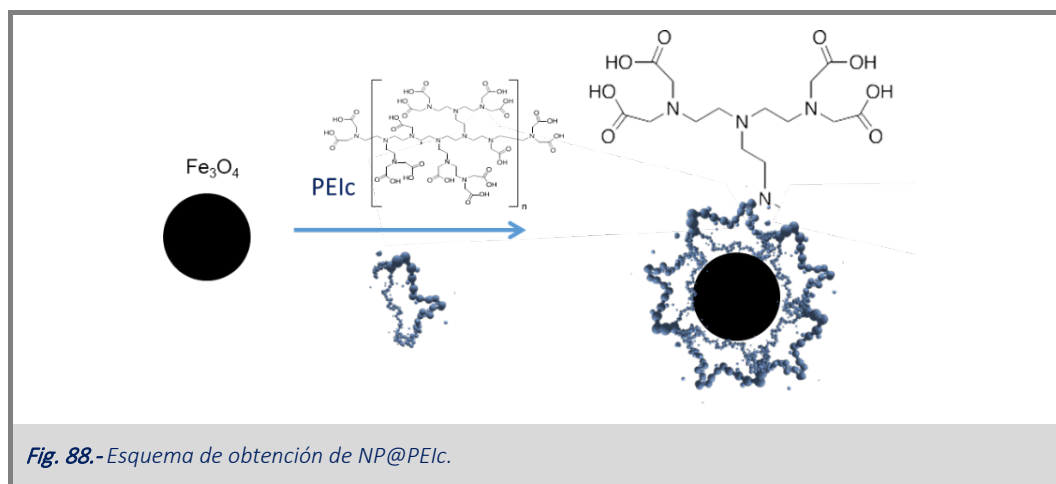
$\text{Ni}^{2+}$  se encuentra totalmente unido o se une con distinta afinidad de como lo hacía al principio, como es el caso de la PEIc. Determinando el punto de corte de ambas pendientes, podremos obtener la estequiometría del proceso (Fig. 87).



De estos resultados vemos que la estequiométrica entre el EDTA y el  $\text{Ni}^{2+}$  es ligeramente superior a 1:1 (Fig. 87-A), mientras que para la PEIc es de cercana a 4:1 (Fig. 87-B), lo cual es completamente probable puesto que necesitamos 4 monómeros por molécula de  $\text{Ni}^{2+}$ , ya que para coordinar el metal se necesitan dos nitrógenos y al menos dos grupos carboxilato. Para que esto ocurra, dada la proximidad de los grupos en el polielectrolito, deberíamos de necesitar hasta 4 monómeros de PEIc.

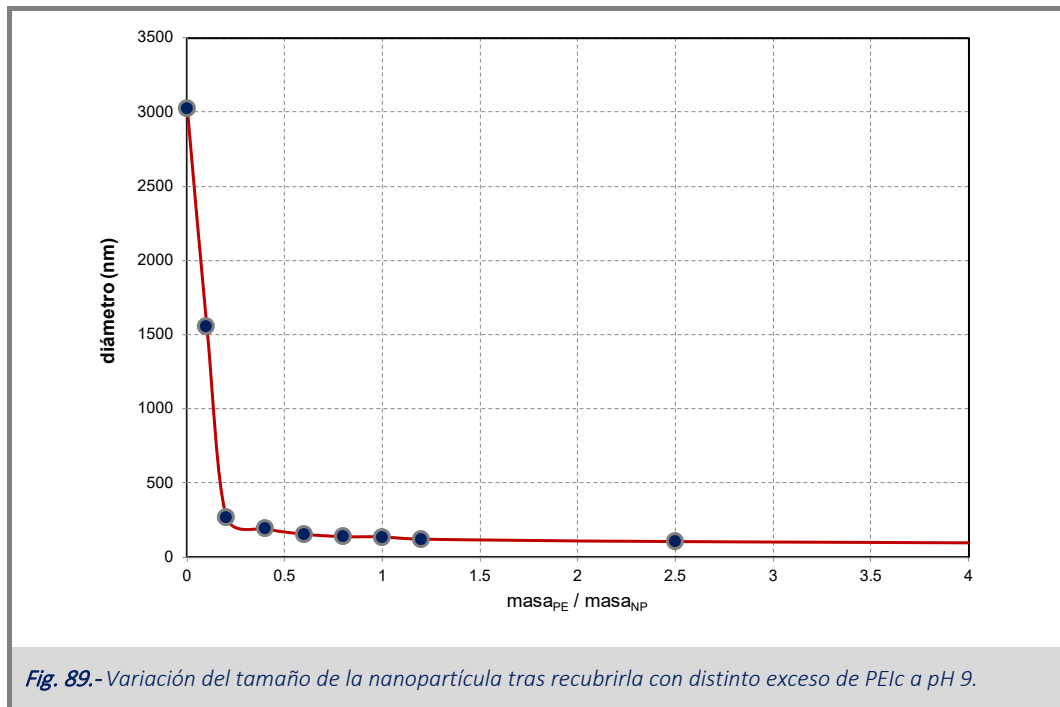
Además, podemos ver los dos sitios de unión sobre la molécula de PEIc tal y como veíamos por ITC, puesto que una vez satura los sitios de unión de mayor afinidad, la pendiente cambia, pero no tan bruscamente como en el caso del EDTA, donde no se observa prácticamente aumento en la absorbancia, sino que probablemente se siga uniendo a la PEIc pero a sitios de menor afinidad.

Todo parece indicar que el comportamiento de la PEIc es muy parecido respecto al del EDTA, pero esto es libre, y lo que pretendemos es unirlo a la nanopartícula (Fig. 88) y determinar realmente la hipótesis de partida sobre la capacidad de captura, especificidad y regeneración.



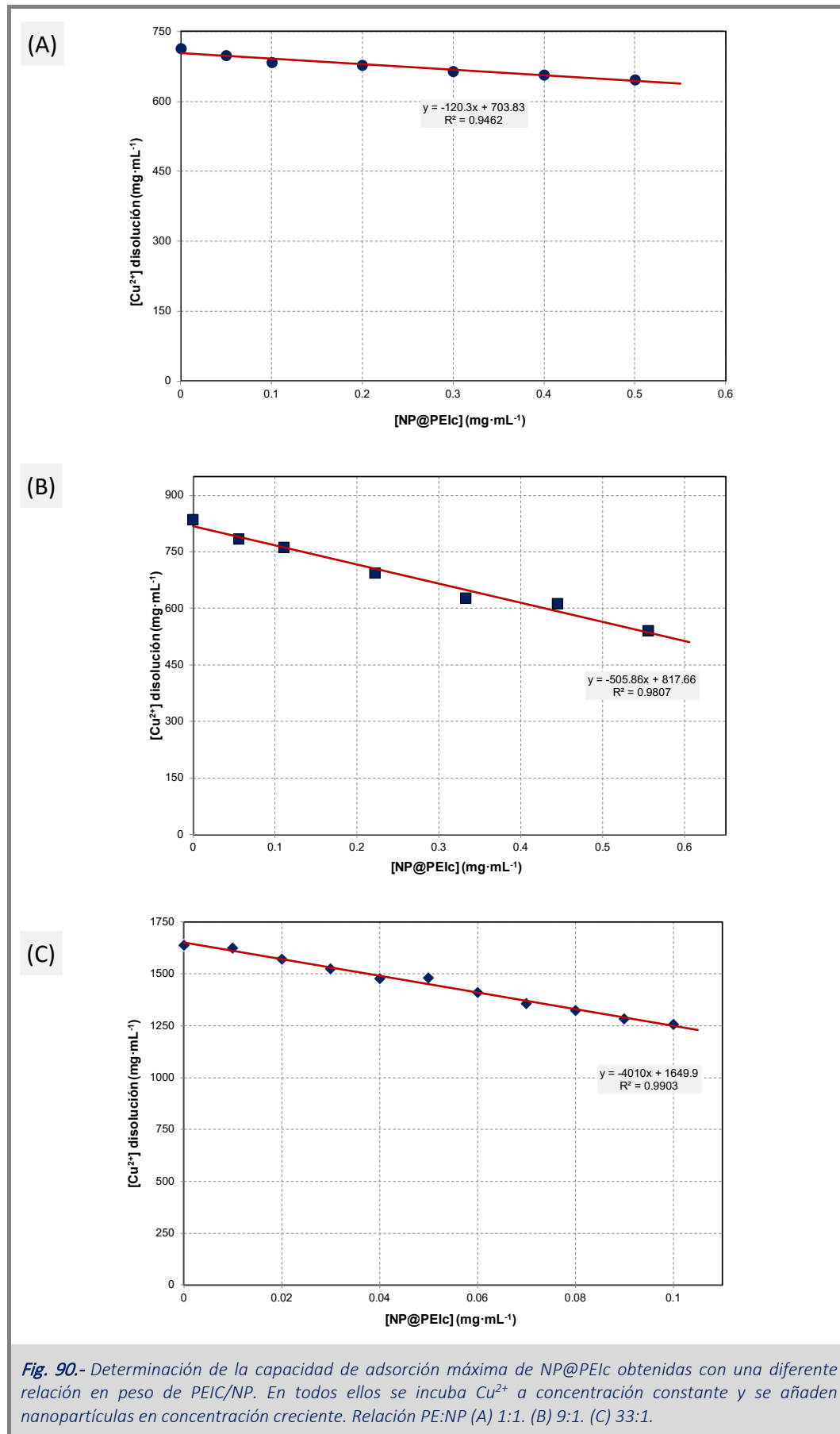
En primer lugar, determinamos las condiciones idóneas para asegurar un recubrimiento completo de la nanopartícula por parte del polielectrolito. Para estudiar el efecto de la cantidad de PEIc utilizada en el recubrimiento sobre el tamaño de las partículas resultantes, se sintetizaron partículas de magnetita recubiertas de PEIc en presencia de distintas cantidades de polielectrolito. Los resultados se muestran en la Fig. 89.

Los resultados muestran que el polielectrolito sintetizado tiene una elevada capacidad para disgregar la magnetita, la cual se encuentra agregada en ausencia del mismo, pasando su tamaño inicial desde alrededor de 3  $\mu\text{m}$  a alrededor de 100 nm cuando se alcanza una relación en peso cercana a 0,5 (mg de PEIc por mg de magnetita). Este tamaño permanece prácticamente inalterable incluso cuando se utilizan excesos 50:1.



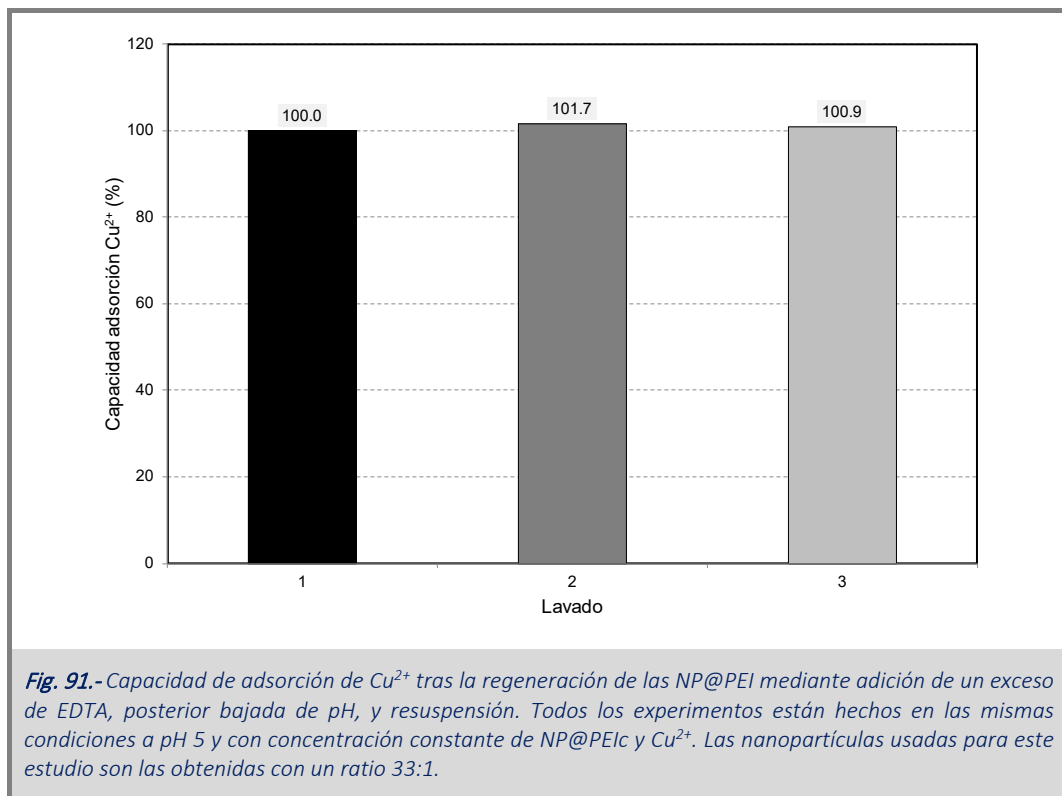
Dado que el exceso de PEIc no hace cambiar el tamaño, y por tanto su superficie específica, probamos tres relaciones de concentraciones de PEIc con respecto a la NP. Esto es llevado a cabo por el comportamiento que presentan las NP@PEI cuando se tratan con distintos excesos de PEI con respecto a la NP. El hecho de que la capacidad de adsorción pueda aumentar cuando recubrimos con un exceso distinto de PEIc puede ser debido al mayor desplazamiento del equilibrio hacia la formación del complejo NP@PEIc, lo que, por un lado, hará que una mayor cantidad de moléculas se unan sobre la superficie, y por otro que el contacto se minimice para una misma molécula. A consecuencia de esto una mayor cantidad de monómeros podrán ser expuestos y por lo tanto aumentar la capacidad de adsorción de metales (u otras moléculas de interés). Esto abre una nueva línea de investigación cuyo objetivo sea determinar bien el mecanismo por el que se produce la fijación de la PEIc sobre la superficie de la nanopartícula de magnetita (esto no será objeto de estudio en esta presente Tesis Doctoral).

Para llevar a cabo esto realizamos experimentos donde incubamos una concentración creciente de NP@PEIc (para cada una de las condiciones preparadas) sobre una disolución que contiene una concentración constante de metal. Tras dejar incubar para que se produzca la adsorción, las NP@PEIc son decantadas con un campo magnético externo y el sobrenadante es cuantificado. Los datos se muestran en la Fig. 90. Para nanopartículas obtenidas a una relación PEIc:NP de 1:1 obtenemos una capacidad de adsorción de  $120 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ , mientras que para nanopartículas obtenidas a una relación PEIc:NP de 9:1 la capacidad de adsorción asciende hasta  $506 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$  y para las obtenidas para la relación PEIc:NP más elevada (33:1), obtenemos una capacidad de adsorción de  $4010 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ . Esto supone un aumento casi lineal de la capacidad de adsorción de las nanopartículas, lo cual es muy sorprendente, además del aumento de la capacidad de adsorción con respecto a las anteriores síntesis ya discutidas en este capítulo.



Con objeto de poder caracterizar la posible recuperación del metal y la posterior reutilización de las nanopartículas, realizamos una serie de experimentos, centrando nuestra atención sobre las últimas nanopartículas obtenidas, NP@PEIc (33:1).

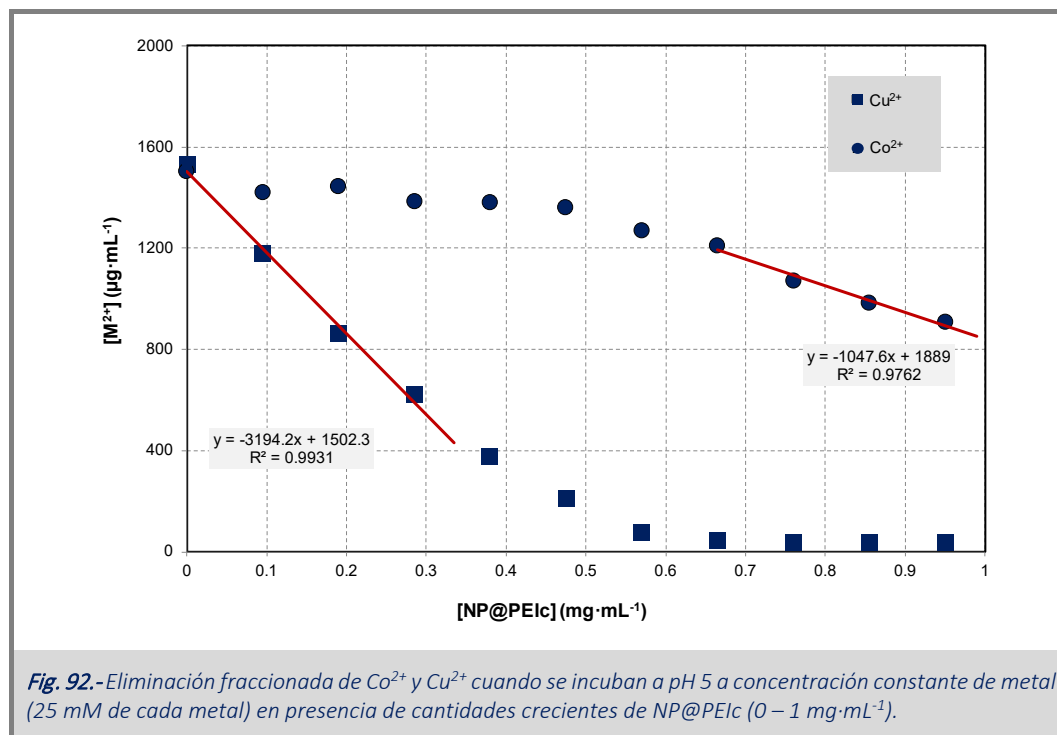
Para realizar el ensayo de regeneración, las nanopartículas una vez saturadas de metal, se añaden sobre una disolución que contiene un exceso de EDTA para que se produzca la eliminación del metal sobre la superficie. La simple bajada de pH con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (como en los casos de síntesis anteriores) demostró ser insuficiente para conseguir la liberación del metal, lo cual argumenta acerca de la elevada afinidad del polielectrolito por los metales capturados. Por esta razón, se decidió eliminar el metal (en particular,  $\text{Cu}^{2+}$ ) haciendo competir a la nanopartícula NP@PEIc con EDTA. En las condiciones probadas el EDTA presenta mucha más afinidad por el metal que la propia NP@PEIc. Una vez eliminado el metal, se precipitan las nanopartículas bajando el pH mediante la protonación de los grupos carboxílicos (la PEIc es prácticamente insoluble a pH 2, método que se utiliza para su purificación). Tras someterlas a lavados se vuelven a incubar en una disolución de  $\text{Cu}^{2+}$ , de donde se cuantifica el sobrenadante una vez las nanopartículas saturadas han sido retiradas del medio. Los resultados se muestran en la Fig. 91.



Tras realizar el ensayo de regeneración observamos que las nanopartículas pueden someterse a 3 ciclos de lavado sin perder su capacidad de adsorción, siendo prácticamente la misma que inicialmente. Estos datos confirman la posibilidad de reutilizar las nanopartículas hasta 3 veces, abaratando costes en los procesos de captura de metales pesados. Cuando las muestras se sometieron a posteriores lavados, la integridad de las partículas comenzó a verse afectada obteniendo resultados escasamente reproducibles.

Por último, para la separación fraccionada de metales, elegimos el  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Co}^{2+}$  debido a que hay una diferencia de tres órdenes de magnitud entre sus constantes de formación a pH 5,  $K_f'$  con EDTA ( $2.23 \cdot 10^{12}$ , para el  $\text{Cu}^{2+}$  y  $7.23 \cdot 10^9$  para el  $\text{Co}^{2+}$ ). Además, estos metales permiten la cuantificación cuando ambos están presentes en el medio, lo que evita los problemas asociados a la inespecificidad que tienen los colorantes usados en la anterior cuantificación de mezclas de metales ( $\text{Ni}^{2+}$  y  $\text{Ca}^{2+}$ , ver Fig. 84) que ya se ha tratado en este capítulo con otras nanopartículas (NP@PAAH-EDTA). Para cuantificar el metal que queda en disolución proseguimos el método descrito en materiales y métodos (ver Fig. 50). De ambas rectas de calibrado, se observa que cada metal absorbe a una determinada longitud de onda cuando se coordina con aminos procedentes de distintas moléculas como glicina o etilendiamina. De las pendientes a las distintas longitudes de onda, podemos concluir que mientras que el  $\text{Co}^{2+}$  absorbe a 335 nm cuando se coordina con la etilendiamina, el  $\text{Cu}^{2+}$  no lo hace. Por otro lado, mientras que el  $\text{Cu}^{2+}$  absorbe a 700 nm cuando se coordina con la glicina, el  $\text{Co}^{2+}$  no lo hace. Es por ello que este método permite una cuantificación específica de cada metal aun cuando ambos están presentes.

Para estudiar esto, incubamos los dos metales a una concentración similar de unos 25 mM y añadimos cantidades crecientes de nanopartículas. Tras decantar las nanopartículas con ayuda de un campo magnético externo, determinamos la cantidad de cada uno de los metales que quedan en disolución en las mismas condiciones en las que se han obtenido las rectas de calibrado. Los resultados se recogen en el Fig. 92.



Como podemos ver, en primer lugar, se produce la adsorción del  $\text{Cu}^{2+}$ , y una vez éste ha sido completamente eliminado, se produce la adsorción del  $\text{Co}^{2+}$ . No podemos separarlos al 100 % debido a que



entran en juego las propias constantes, ya que una vez se ha eliminado un gran porcentaje del metal que más afinidad tiene, nos encontramos que del otro metal hay un exceso, aunque con una afinidad menor, y es inevitable que se produzca la adsorción, aunque prácticamente despreciable frente al metal con mayor afinidad.

#### **4.4.5.- Conclusiones**

Se han obtenido partículas de magnetita recubiertas por el polielectrolito PEIc en el que buena parte de las aminas de la PEI fueron carboxiladas. Este polielectrolito demostró tener dos tipos de centros de unión frente a metales como el  $\text{Ni}^{2+}$ . Uno de ellos es de alta afinidad con una constante de unión de  $3.0 \cdot 10^6$  a pH 7 (muy similar a la mostrada por el EDTA). El otro grupo de centros de unión muestra una afinidad menor ( $2.2 \cdot 10^4$ ).

Las nanopartículas de magnetita recubiertas por PEIc demostraron tener una extraordinaria capacidad de adsorber metales siendo ésta dependiente del exceso de PEIc utilizado en el momento de producir el recubrimiento de la partícula de magnetita desnuda. Nuestros resultados muestran que esta capacidad de adsorción varía desde  $120 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$  cuando las nanopartículas se sintetizaron en una relación PEIc:NP de 1:1 hasta  $4010 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$  cuando lo era de 33:1.

Estas partículas pueden ser reutilizadas una vez sometidas a ciclos de eliminación del metal (compitiendo con EDTA), lavados con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  y agua y sonicación, al menos tras sufrir 3 de estos ciclos. Por último, estas partículas pueden eliminar metal de forma fraccionada, por lo que podrían aumentar su interés en la industria, ya que permitirían una separación selectiva de metales, recuperando cada metal de manera casi individual.



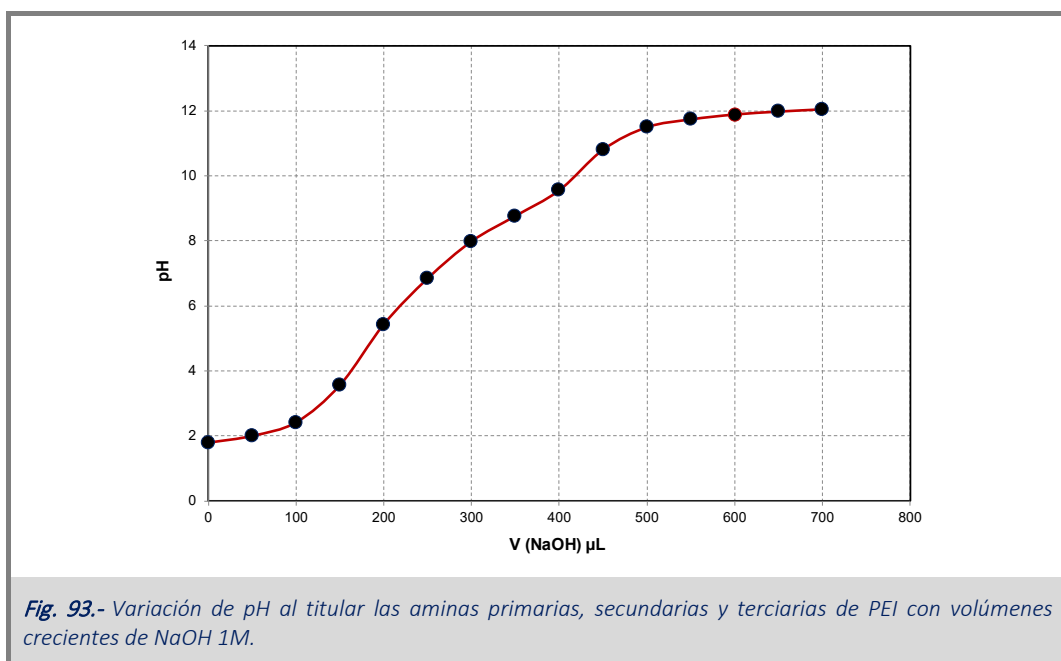
4.5.- Capítulo 5 – Optimización de la capacidad de adsorción de NP mediante el crecimiento del recubrimiento de PEI utilizando polianiones



#### 4.5.1.- Introducción

Previamente, se ha descrito la necesidad de recubrir las NP magnéticas con un doble objetivo. Por un lado, el recubrimiento con polielectrolitos aumentará su estabilidad coloidal y, por otro, permitirá utilizar el propio polímero cargado adsorbido sobre su superficie para adsorber, capturar, almacenar, o transportar ligandos de carga opuesta. Los distintos recubrimientos llevados a cabo con polielectrolitos como el PAA o el PAAH han mostrados su capacidad para estabilizar las nanopartículas sintetizadas, consiguiendo que sobre los grupos cargados que quedan expuestos al disolvente se adsorban proteínas de carga opuesta a dicho recubrimiento, siendo la adsorción guiada mediante interacciones electrostáticas, principalmente. Aunque las capacidades de adsorción o capacidad de carga de dichas nanopartículas por las biomoléculas probadas han resultado ser considerables, uno de los objetivos principales en el campo de la nanomedicina, es la obtención de nanopartículas con elevada capacidad de carga, pudiendo reducir así la dosis administrada y minimizando, por tanto, la toxicidad que puedan probar. Por lo descrito anteriormente, proponemos diseñar NP con una alta capacidad de adsorción de proteínas aniónicas u otras moléculas, que puedan tener interés en aplicaciones para su almacenamiento, minimización de la atracción de las propias moléculas de proteína con una gran tendencia a agregar o como transportadoras en sistemas de liberación de fármacos.

Para ello vamos a utilizar la PEI ramificada que es un polielectrolito con una elevada densidad de carga superficial debido al elevado contenido en grupos amino (aminas primarias, secundarias y terciarias en relación 1:2:1), lo que le hacen que no posea un  $pK_a$  único, tal y como vemos en la Fig. 93, ya que la deprotonación de las aminas se consigue paulatinamente desde pH 2 hasta pH 12 al añadir volúmenes crecientes de NaOH 1 M, otorgándole carga positiva en dicho intervalo de pH para la PEI libre.



A medida que disminuimos el tamaño de las partículas de magnetita recubiertas (ver secciones anteriores acerca de la reducción del tamaño en función de las concentraciones de los polielectrolitos utilizadas) disminuye la velocidad a la cual son decantadas magnéticamente. Un ejemplo de esta situación ocurre con las partículas de magnetita recubiertas de PEI, NP@PEI. Por ello, durante el proceso de su purificación (eliminación del polielectrolito en exceso), surge la necesidad de utilizar agentes que puedan precipitar las nanopartículas de forma rápida.

Nuestra experiencia de laboratorio nos indica que moléculas que contengan dos o más cargas (tales como sulfato, fosfato, pirofosfato, hexametáfosfato, etc.) precipitan de forma muy efectiva la PEI libre en disolución, lo que permite decantar magnéticamente las NP@PEI agregadas por estos agentes y separarlas de la PEI sobrante (precipitado). Tras someter a procesos de lavado, las nanopartículas obtenidas resultan tener una elevada capacidad de adsorción de ligandos de carga opuesta. Aún más interesante es que esta capacidad de adsorción aumenta de forma espectacular con la cantidad de PEI utilizada en el recubrimiento. Además, el aumento en la capacidad de adsorción es prácticamente lineal y *no saturable*, lo que indicaría que es independiente de la cantidad o tamaño de las partículas de magnetita que quedan atrapadas dentro del recubrimiento.

#### 4.5.2.- Hipótesis de partida

Proponemos, que un mecanismo que podría explicar este comportamiento es que las moléculas aniónicas con carga negativa utilizadas en la precipitación de la PEI pudieran estar formando interacciones electrostáticas con *moléculas distintas de PEI*. Cuando estas interacciones se establezcan entre moléculas que formen parte del recubrimiento y otras libres en disolución, el resultado será la incorporación de más moléculas de PEI al recubrimiento.

Una vez purificadas, las nanopartículas contendrían una mayor cantidad de PEI que se depositaría sobre su superficie únicamente por adsorción. El crecimiento en el número de cadenas individuales de PEI formando parte del recubrimiento dependería tanto de la concentración de PEI libre como de la concentración de los agentes iónicos multivalentes que actuarían de conectores entre las moléculas de PEI incorporadas a la nanopartícula.

Cuando estas nanopartículas son enfrentadas a un ligando (tal como una proteína de signo opuesta, como el  $\beta$ -Lg a pH 7), éste no solo se adsorberá a la superficie por interacciones electrostáticas sino que reemplazaría a los aniones divalentes que mantienen a la PEI unida al revestimiento de la nanopartícula estabilizándolo, al evitar la liberación de la PEI previamente incorporada.

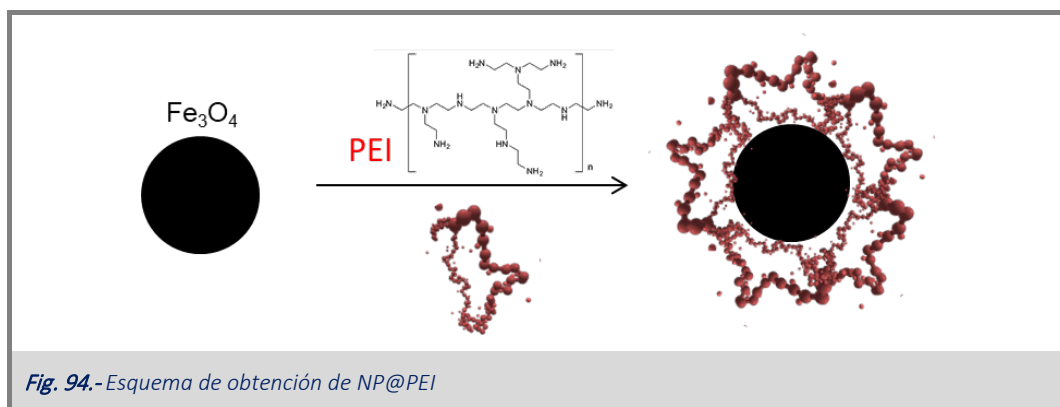
#### 4.5.3.- Estrategia experimental

- ✓ Obtener y caracterizar las NP de magnetita en presencia de PEI.
- ✓ Cuantificar la capacidad de adsorción máxima de  $\beta$ -Lg (proteína aniónica pH 7) por las nanopartículas NP@PEI en función de la relación NP/PEI, en presencia de ion fosfato.
- ✓ Cuantificar la capacidad de adsorción máxima de  $\text{Cu}^{2+}$  por las NP@PEI en función de la relación NP/PEI, en presencia de ion fosfato.
- ✓ Determinar los parámetros termodinámicos de unión de la PEI a distintos polianiones (sulfato, fosfato y hexametáfosfato) para poder entender tanto la formación del recubrimiento extendido como la sustitución de estas moléculas por el ligando finalmente adsorbido (por ejemplo,  $\beta$ -Lg).
- ✓ Verificar la capacidad de las NP@PEI para el almacenamiento y liberación de la proteína  $\beta$ -Lg.
- ✓ Estudiar la aplicabilidad directa de las NP@PEI en la purificación de una proteína que presenta oligonucleótidos unidos tras su purificación.

#### 4.5.4.- Resultados y discusión

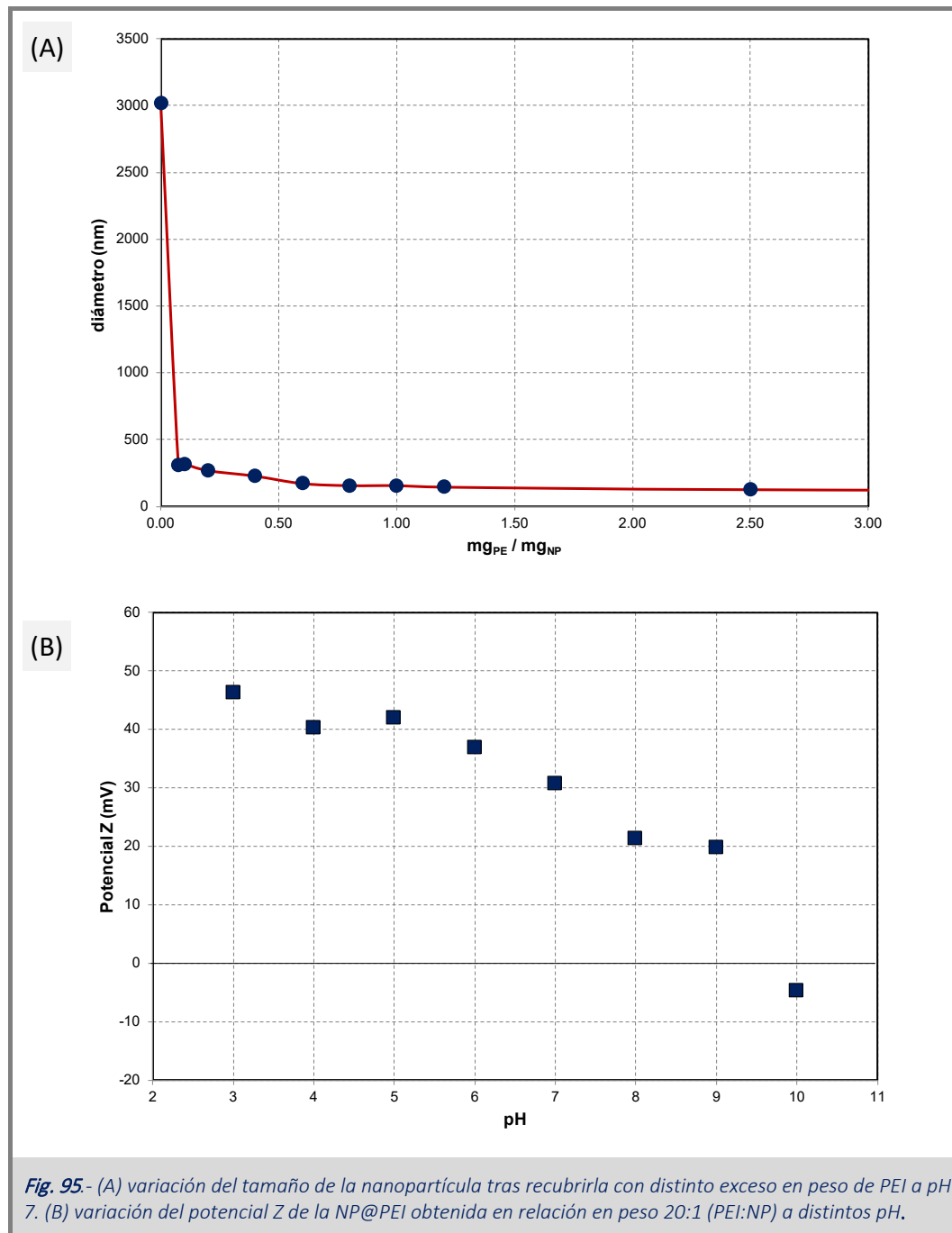
##### Tamaño y estabilidad coloidal de las nanopartículas PEI@NP

Estas NP@PEI son obtenidas mediante interacción electrostática entre la NP de magnetita y la PEI a pH 7 (Fig. 94). A esta interacción ha de sumársele el efecto quelante de los pares electrónicos solitarios de los grupos amino con los átomos de hierro presentes en la superficie de la nanopartícula, lo que hará que el recubrimiento posea una mayor estabilidad. El resultado es un recubrimiento fuertemente estabilizado que le confiere una elevada carga superficial positiva. En primer lugar, buscamos condiciones donde la nanopartícula una vez recubierta posea el menor tamaño, puesto que, si disminuimos tamaño, aumentamos la superficie específica logrando por tanto un aumento en la capacidad de adsorción.



Para caracterizar cómo afectará el tamaño de la nanopartícula una vez se ha recubierto de PEI sobre una cantidad constante de nanopartículas ( $0.4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), añadimos cantidades crecientes de polielectrolito (0

– 20 mg·mL<sup>-1</sup>) a pH 7, consiguiendo por tanto una relación de PEI con respecto a la nanopartícula que varía desde 0 hasta 50 (Fig. 95-A). Los resultados muestran la elevada capacidad de desaglomeración de la magnetita confiriendo el recubrimiento una elevada estabilidad coloidal a la partícula. Si, en ausencia de PEI, la magnetita presenta un tamaño de alrededor de 3 µm a pH 7 (pH próximo al punto isoeléctrico de la magnetita), el tamaño de la partícula recubierta se reduce por debajo de 400 nm a una relación PEI:NP de 0.05, alcanzando un tamaño constante de alrededor de 150 nm para relaciones en peso superiores, incluso a la relación 50:1).





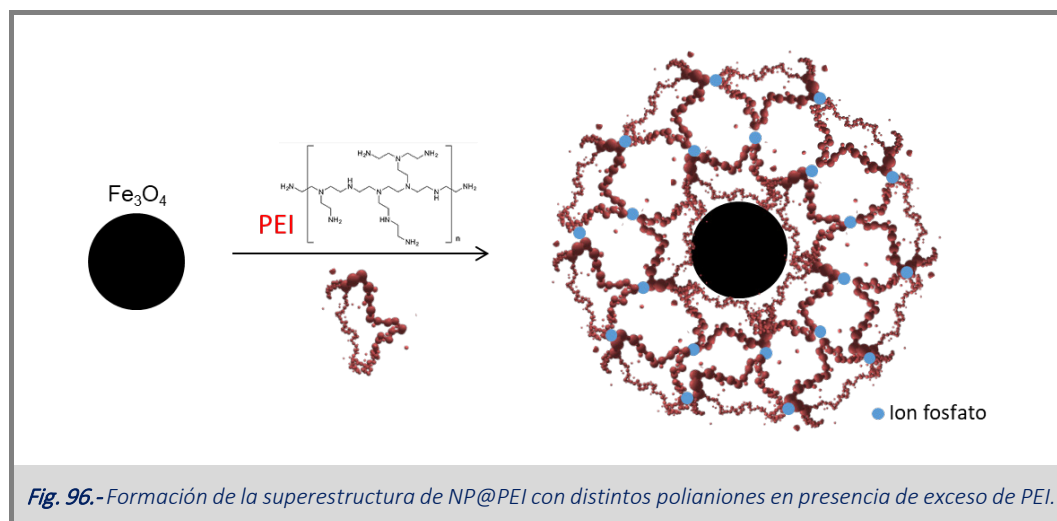
Dado a que la PEI cambia su estado de protonación en función del pH como hemos visto anteriormente, caracterizamos como varía la carga superficial de la nanopartícula en función del pH, una vez ha sido recubierta por éste. Para ello, se incubaron cantidades de nanopartícula y PEI constantes (en relación 20:1, PEI:NP) a distintos pH desde pH 3 hasta pH 10 (Fig. 95-B), viendo que presenta carga positiva desde pH 3 hasta pH 9, con lo que podrá adsorber sobre su superficie proteínas con carga opuesta u otras moléculas que puedan formar complejos con los pares electrónicos solitarios de los grupos amino de la PEI. El hecho de que el rango de carga positiva varíe con respecto a la PEI libre (no se conseguía la deprotonación completa hasta alcanzar pH 12, (Fig. 93) puede ser atribuido a la variación que sufren los  $pK_a$  de los grupos aminos una vez interaccionan con la superficie<sup>238</sup>. A pesar de ello, presentan una gran estabilidad coloidal desde pH 3 hasta pH 7 (30 – 45 mV), reduciéndose levemente a partir de pH 7 hasta pH 9 (~ 20 mV). A partir de pH 9 debido a la baja carga de la PEI, no se consigue un recubrimiento estable ya que por la carga de la nanopartícula (- 4.6 mV) nos encontramos en una zona de baja estabilidad coloidal lo que puede ser traducido en un recubrimiento parcial de la PEI sobre la superficie.

#### *Formación del recubrimiento extendido por acción de moléculas aniónicas multivalentes y PEI en exceso*

Debido a la gran estabilidad que presentan las NP@PEI de las que partimos es muy difícil eliminar el exceso de PEI que no ha recubierto la superficie, ya que pese a su tamaño (100 – 200 nm) las nanopartículas de magnetita (obtenidas por el método de co-precipitación) son de 10 – 20 nm<sup>127</sup>, por lo que son difícilmente atraídas por un campo magnético externo. Es por esto por lo que se han buscado alternativas de purificación para minimizar el tiempo que requeriría la eliminación del polielectrolito sobrante mediante ultracentrifugación o ultrafiltración<sup>244</sup>.

En primer lugar, se intentó precipitar las nanopartículas con NaCl para disminuir la repulsión electrostática de las nanopartículas permitiendo que la decantación magnética sea más rápida. Sin embargo, la elevada estabilidad de las nanopartículas obtenidas impidió su decantación magnética en tiempos razonables (horas) incluso en presencia de concentraciones de NaCl alrededor de 1 M. Tras añadir cantidades muy elevadas de NaCl y dejar la suspensión coloidal de las nanopartículas en presencia de un campo magnético externo durante 24, la cantidad de muestra decantada magnéticamente resultó ser insignificante.

Como alternativa proponemos el uso de polianiones, tales como fosfato, sulfato o hexametáfosfato, que provocarán un precipitado rápido de la nanopartícula debido a la compensación de cargas. De hecho los polielectrolitos catiónicos como el PDADMACI han sido propuestos como candidatos para la eliminación de fosfato en aguas residuales<sup>245</sup>. Por tanto, estos aniones divalentes podrían actuar como anclajes de otras moléculas de PEI quedando unidas sobre la NP@PEI ya recubierta, obteniendo por tanto una superestructura con un alto contenido de PEI (Fig. 96), con el consecuente aumento de la capacidad de adsorción de diversas moléculas.



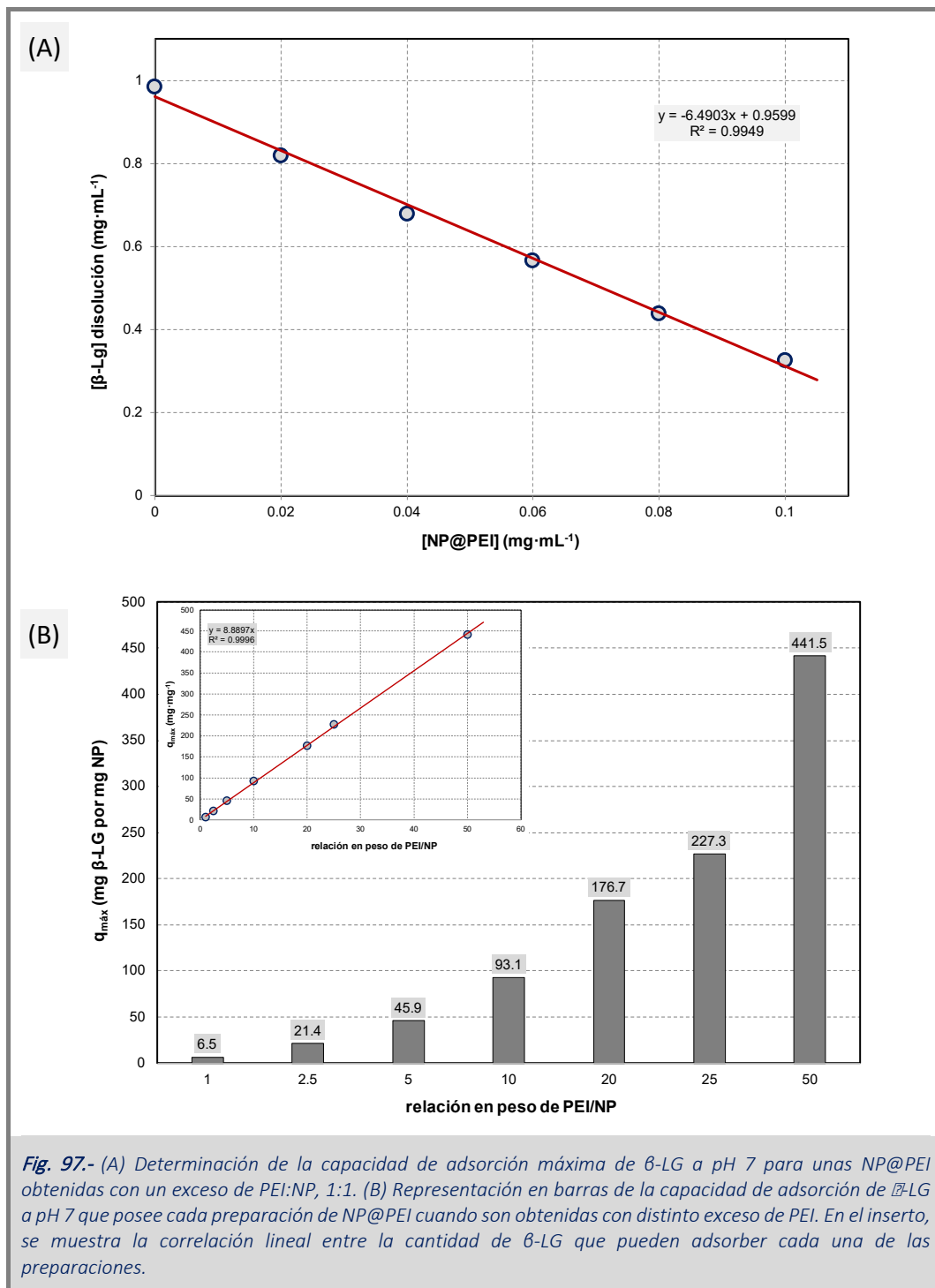
Si es cierto el mecanismo que estamos planteando acerca del recubrimiento de las nanopartículas, la capacidad de adsorber una determinada molécula aumentará con la relación en exceso en peso de PEI sobre la nanopartícula presentando una tendencia lineal no saturable. Para determinar esto realizamos experimentos de adsorción de una proteína aniónica a pH 7, como es la  $\beta$ -Lg ( $pI \sim 4.8$ ), sobre distintas preparaciones de nanopartículas con distinta relación (PEI:NP).

Para cada tipo de NP@PEI incubamos a pH 7,  $\beta$ -Lg a una concentración constante de  $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , y concentraciones crecientes de NP@PEI. Tras dejar que se produzca la adsorción de la proteína sobre la superficie, decantamos con la ayuda de un campo magnético externo para separar las NP@PEI- $\beta$ -Lg y cuantificar el sobrenadante mediante medida de absorbancia a 280 nm. De esta forma podremos correlacionar cómo disminuye la concentración de proteína en el medio en función de la cantidad de NP@PEI añadida.

De esta relación determinaremos la capacidad de recubrimiento máximo que poseen las distintas preparaciones de NP@PEI (metodología explicada en materiales y métodos). Los resultados se muestran en la Fig. 97. En la Fig. 97-A se muestra un ejemplo de obtención de la capacidad de adsorción máxima de  $\beta$ -Lg de la NP@PEI que ha sido recubierta en una relación en peso de PEI:NP, 1:1. Esta capacidad de adsorción máxima está relacionada con la pendiente de la gráfica, indicando la cantidad de  $\beta$ -Lg que desaparece de la disolución (de ahí la pendiente negativa) por mg de NP@PEI en el medio. De igual forma, aunque en condiciones un poco variables debido al aumento de la capacidad de adsorción (la concentración de nanopartícula varía órdenes de magnitud) se determina la capacidad de adsorción máxima para cada una de las NP@PEI obtenidas.

En la Fig. 97-B se muestra la comparación de la capacidad de adsorción de  $\beta$ -Lg para cada una de las PEI:NP preparadas. A simple vista se aprecia cómo se produce un aumento de la capacidad de adsorción a medida que aumenta la relación en peso PEI:NP, pasando de  $6.5 \text{ mg}\cdot\text{mg}^{-1}$  para una relación PEI:NP de 1:1 hasta 440

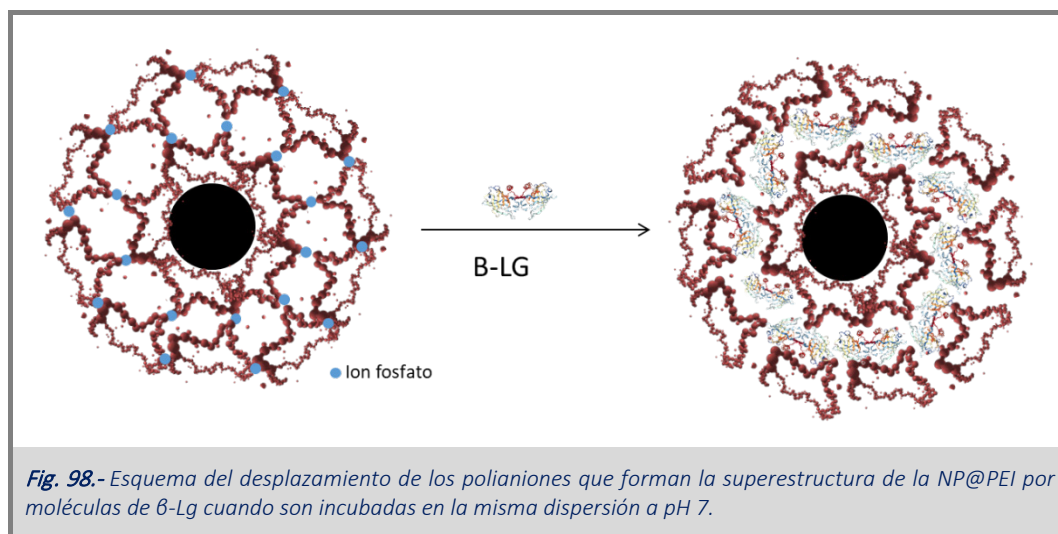
$\text{mg}\cdot\text{mg}^{-1}$  para una relación 50:1 (la máxima estudiada). Para poder observar la dependencia más claramente, en el inserto de la Fig. 97-B se muestra la relación entre la capacidad de adsorción de  $\beta$ -Lg frente al exceso de PEI con el que han sido tratadas las NP. La pendiente nos dice que por cada unidad de exceso en peso de PEI que ponemos en relación al peso de nanopartícula, la capacidad de adsorción de la superestructura aumenta alrededor de 8.9 veces. Esta relación totalmente lineal con el exceso a tratar afirma que para que se produzca dicho aumento de la capacidad de adsorción, la nanopartícula debe crecer su volumen formando la superestructura que proponemos (Fig. 96).



Una posibilidad que explicaría el crecimiento del recubrimiento de PEI sería que, en presencia de un exceso creciente de PEI, aumentase el número de cadenas de polielectrolito que hiciesen contactos directos con la superficie de magnetita. Esta posibilidad ha sido desechada por dos razones:

- i) Esto aumentaría la densidad de monómeros cargados en el recubrimiento lo que provocaría un incremento de las repulsiones electrostáticas que sería energéticamente desfavorable,
- ii) Además, si se produjese un aumento en el número de moléculas de PEI directamente unidas a la superficie de la magnetita, el aumento mostraría un comportamiento saturable debido a las dimensiones finitas de la partícula sólida.

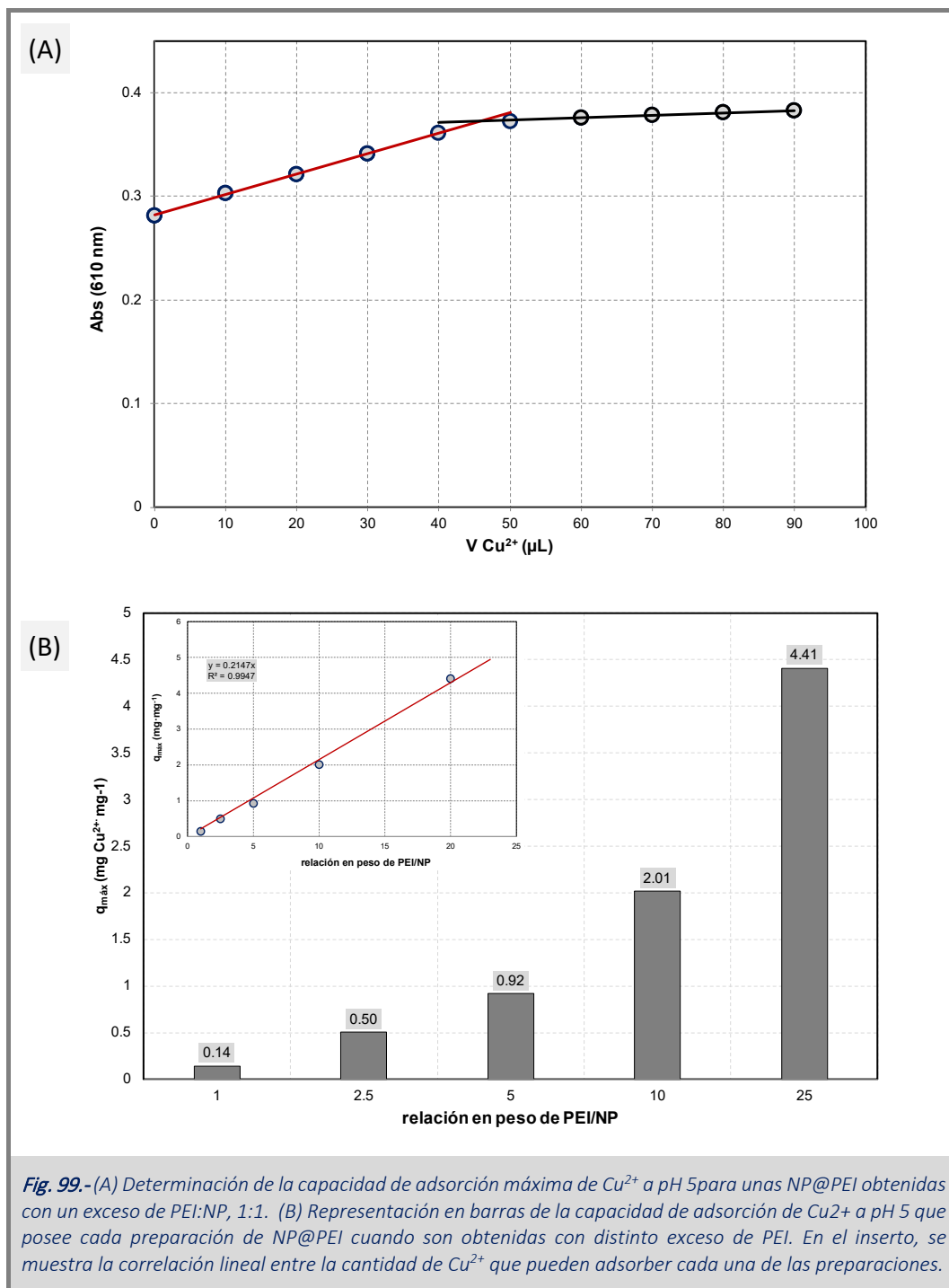
Por tanto, nos inclinamos a pensar que el mecanismo por el cual aumenta el recubrimiento del número de cadenas de polielectrolito tiene que ver con el papel de los aniones multivalentes para actuar como conectores entre moléculas distintas de polielectrolito. Así, las primeras moléculas de polielectrolito recubrirán la nanopartícula saturando su superficie y una vez ha sido saturada empezará el crecimiento del recubrimiento como consecuencia de la unión de los grupos fosfato. El resultado final es la formación de la superestructura mostrada en la Fig. 96. En estas nanopartículas cuyo recubrimiento está estabilizado por grupos fosfato, en contacto con la  $\beta$ -Lg (teniendo mayor afinidad por el recubrimiento que el fosfato) desplazará a los polianiones ocupando ahora dichas posiciones (Fig. 98).



De este modo si la afinidad de la proteína es mucho mayor por la PEI que el propio fosfato, éste será desplazado llegando a ocupar en mayor o menor medida todos los sitios que puedan ser accesibles para la proteína.

Capacidad de adsorción de  $\text{Cu}^{2+}$  por las nanopartículas con recubrimiento ampliado

Seguidamente para determinar cómo afectará el tamaño de la molécula sobre la capacidad de adsorción de la nanopartícula repetimos experimentos para determinar la capacidad de adsorción, pero esta vez usando un ion, el  $\text{Cu}^{2+}$ , el cual posee un tamaño mucho menor que la proteína, y por tanto debería difundir mucho más hacia zonas donde la proteína no podría llegar. Estos resultados están recogidos en la Fig. 99.



En la Fig. 99-A se muestra un ejemplo de obtención de la capacidad de adsorción máxima de  $\text{Cu}^{2+}$  de la NP@PEI que ha sido recubierta en una relación en peso de PEI/NP, 1:1. Para determinarla titulamos las

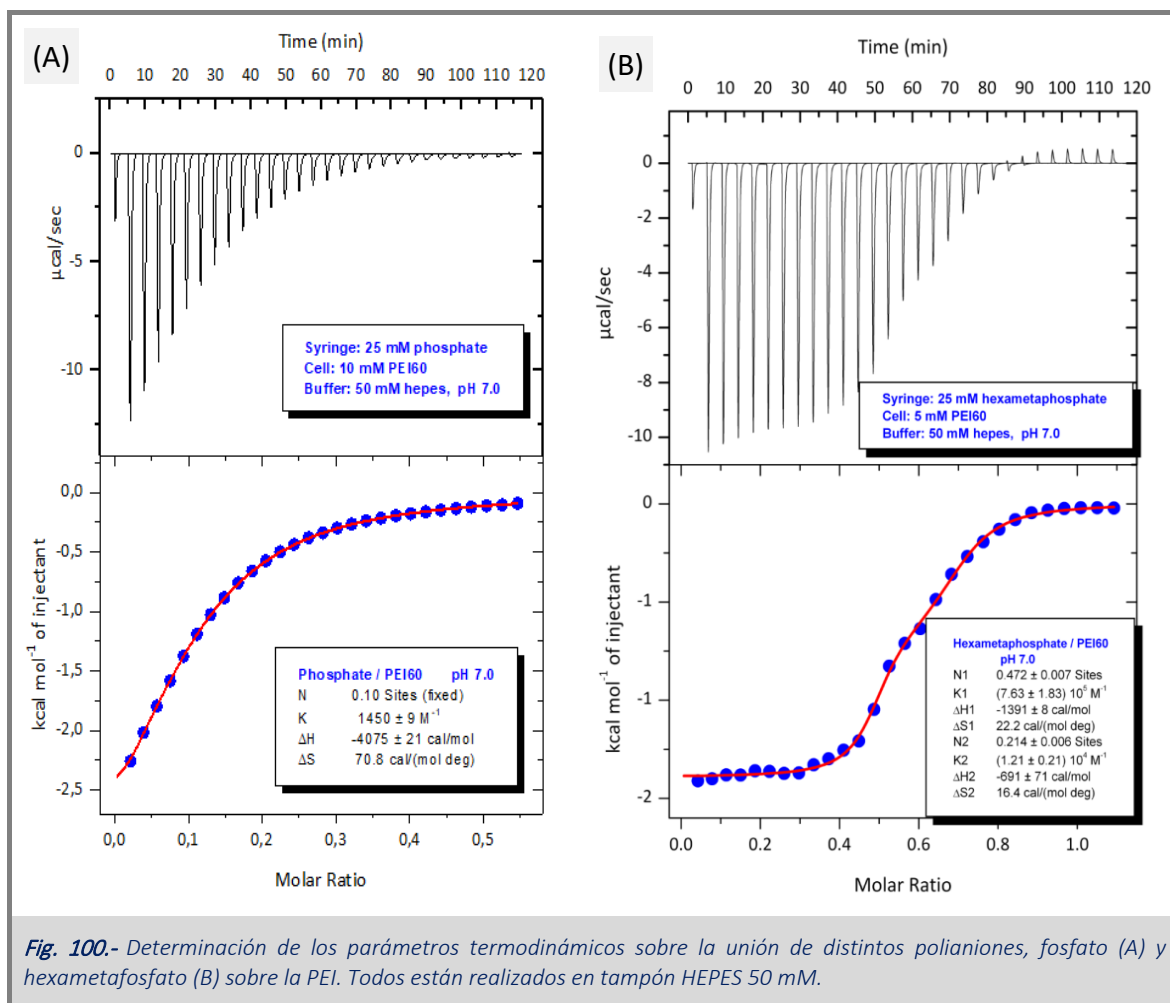
NP@PEI con  $\text{Cu}^{2+}$  (20 mM) y debido a las diferencias de coeficiente de extinción entre el complejo NP@PEI- $\text{Cu}^{2+}$  (datos mostrados en materiales y métodos), y el  $\text{Cu}^{2+}$  libre cuando se produce la saturación la pendiente cambia, pudiendo determinar en el punto de corte el número de moles (o gramos) de  $\text{Cu}^{2+}$  que interacciona con el recubrimiento de la nanopartícula.

En la Fig. 99-B se muestra la comparación de la capacidad de adsorción de  $\text{Cu}^{2+}$  para cada una de las NP:PEI preparadas. A simple vista se aprecia cómo se produce un aumento de la capacidad de adsorción a medida que aumenta la relación en peso PEI:NP, pasando de  $0.2 \text{ mg}\cdot\text{mg}^{-1}$  a  $4.3 \text{ mg}\cdot\text{mg}^{-1}$ , para las preparaciones de PEI:NP de 1:1, 25:1, respectivamente. Para ver mejor esto, en el inserto de la Fig. 99-B se muestra la relación entre la capacidad de adsorción de  $\text{Cu}^{2+}$  frente al exceso de PEI con el que han sido tratadas las NP. La pendiente nos dice que por cada unidad de exceso en peso de PEI que ponemos en relación al peso de nanopartícula, la capacidad de adsorción de la superestructura aumenta alrededor de 0.21 veces. Esta relación totalmente lineal con el exceso a tratar es acorde al mecanismo de formación de la superestructura, aumentando la capacidad de adsorción  $0.21 \text{ mg}$  de  $\text{Cu}^{2+}$  a medida que aumenta el exceso con el que ha sido recubierta la nanopartícula.

Debido a la diferencia de peso molecular de la  $\beta$ -Lg y el  $\text{Cu}^{2+}$ , para hacer comparables cómo se produce el aumento de capacidad de adsorción de cada uno de ellos, expresamos el aumento como  $\mu\text{mol}$  molécula adsorbida por  $\text{mg}$  de NP@PEI en función del exceso de PEI, siendo de  $0.48 \mu\text{mol}$  para la  $\beta$ -Lg, mientras que para el  $\text{Cu}^{2+}$ , es de  $2.83 \mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}$ . El aumento cuando se usa el de menor tamaño,  $\text{Cu}^{2+}$ , es aproximadamente 6 veces superior al de la  $\beta$ -Lg. Esto da idea que existen diferencias de la capacidad de adsorción debido al tamaño de la molécula que se pretende adsorber, aumentando para aquellas que poseen un tamaño reducido, ya que se difundirán más hacia el interior de la superestructura.

Para demostrar que efectivamente se produce el desplazamiento de los polianiones por parte de las moléculas que van a ser adsorbidas, debemos determinar que la afinidad que presentan por la PEI, no es muy elevada, de lo contrario no se produciría tal desplazamiento. Para determinar la afinidad con la que se unen distintos polianiones como pueden ser fosfato, sulfato o hexametáfosfato, realizamos titulaciones mediante ITC (Fig. 100). La afinidad que presenta el ion fosfato por la PEI no es muy elevada ( $1.5 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ ) frente a la que presenta por ejemplo el hexametáfosfato ( $7.6 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ ), dos órdenes de magnitud superior. Con estos datos podremos obtener superestructuras con una mayor o menor estabilidad, que variará en función de la molécula que quiera ser adsorbida sobre la superficie. En los casos probados, tanto de  $\beta$ -Lg como de  $\text{Cu}^{2+}$ , la afinidad que presentan ambos por la PEI es significativamente mayor que la mostrada por el fosfato. Para el  $\text{Cu}^{2+}$  tenemos datos experimentales determinados por ITC donde la constante es alrededor de  $1.3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$  (un orden de magnitud superior como consecuencia del efecto quelante sobre el átomo de  $\text{Cu}^{2+}$ ).

Por su parte, la  $\beta$ -Lg a pH 7, se comporta como un polielectrolito con una elevada densidad de carga negativa<sup>246</sup> ( $\text{pH} > \text{pI}$ ), por lo que tendrá gran afinidad por el polielectrolito de carga opuesta, PEI.

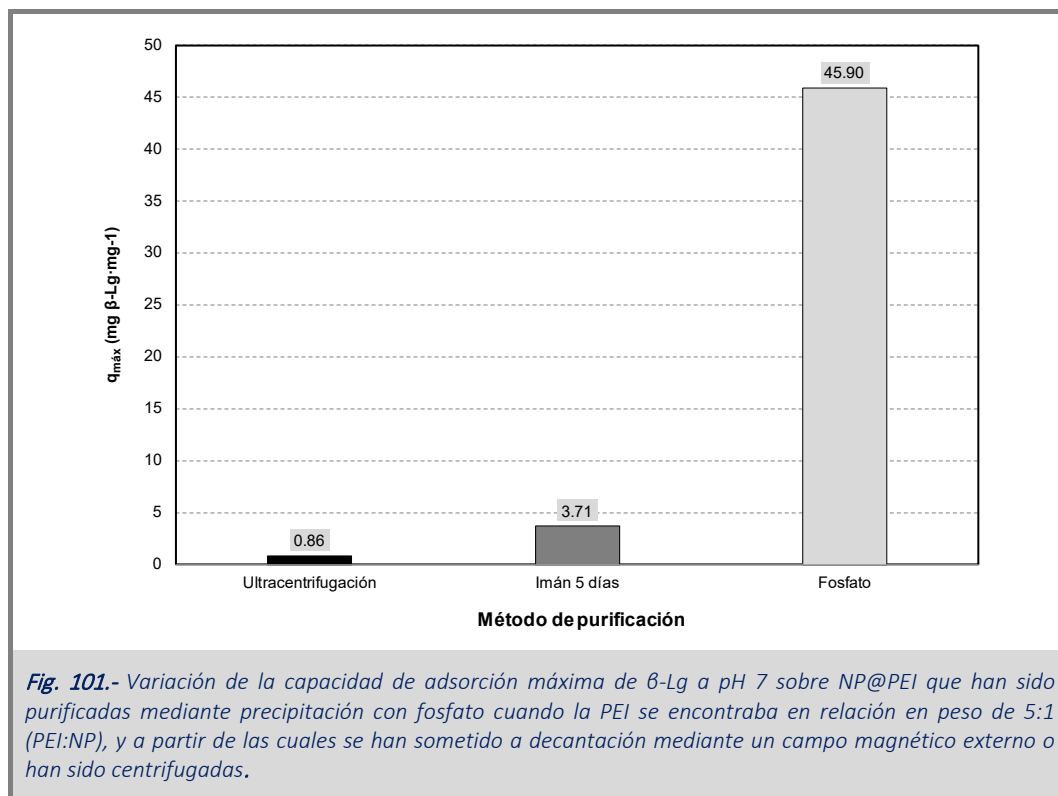


Por otra parte, parece claro que un aumento en la carga del polianión implicaría un aumento en su afinidad por la PEI. Para comprobarlo, la Fig. 100 también muestra la titulación de PEI con hexametafosfato a pH 7, donde la molécula presenta tres cargas negativas netas. En este caso, la PEI muestra dos tipos de centro de unión termodinámicamente diferenciables. El primero es de alta afinidad y su valor es  $K_1 = 7.6 \cdot 10^6$  y mientras que el segundo muestra una menor afinidad  $K_2 = 1.2 \cdot 10^4$ . Ambos centros de unión muestran una afinidad del hexametafosfato significativamente mayor que del fosfato (entre 10 y 5000 veces mayor), lo cual se explica por la mayor carga del anión y el efecto sinérgico de las interacciones electrostáticas que se establecen entre la PEI y cada una de las cargas negativas.

### Estabilidad de las nanopartículas con recubrimiento ampliado

Otra metodología para determinar la estabilidad de la superestructura, y por tanto la afinidad con la que el ion fosfato, en este caso, interacciona con las moléculas de PEI, es determinar la capacidad máxima de adsorción de las NP@PEI obtenidas con un exceso de PEI en particular (5:1), y purificadas mediante precipitación con fosfato, las cuales han sido sometidas a dos procesos físicos de decantación. Por un lado, las nanopartículas se sometieron a la ultracentrifugación, y por otro lado el contacto con un campo magnético externo durante 5 días.

Tanto la ultracentrifugación como la decantación magnética por tiempo elevado resultaron ser perjudiciales para el recubrimiento estabilizado por fosfato, perdiéndose parte de las cadenas de PEI unidas al recubrimiento por acción del grupo fosfato y que pasara a estar en el sobrenadante.



Como vemos por los resultados obtenidos tras determinar la capacidad máxima de adsorción de cada una de las preparaciones sometidas a decantación para las NP@PEI obtenidas con una relación 5:1 (PEI:NP) (Fig. 101), la capacidad de adsorción disminuye de unos 45.9 mg·mg $^{-1}$ , hasta 3.7 y 0.9 mg·mg $^{-1}$  para las decantadas magnéticamente o mediante ultracentrifugación, respectivamente. Esto supone una reducción de la capacidad de adsorción de unas 12 veces para aquellas NP@PEI que han sido decantadas en el imán, y unas 50 veces para las que se han obtenido mediante ultracentrifugación. Esto confirma la baja afinidad que presenta el fosfato por la PEI.



Desafortunadamente, la comparación de estos valores con los de la nanopartícula recubierta de PEI en ausencia de fosfato no es posible ya que su alta estabilidad coloidal hace que no pueda ser separada de la PEI sobrante a menos que se utilice bien la precipitación con un polianión, la decantación magnética (durante días) o la ultracentrifugación.

La escasa estabilidad de la superestructura formada por el fosfato y la PEI sobre el recubrimiento de las partículas de magnetita podría ser evitada si se utilizase un polianión más cargado como, por ejemplo, el hexametafostato que presenta una mayor afinidad por la PEI. Sin embargo, es importante resaltar que la utilidad de estas nanopartículas con el recubrimiento ampliado reside en que el ligando (la  $\beta$ -Lg, por ejemplo) pueda competir satisfactoriamente con los polianiones por los centros de unión de la PEI. Esa competición se hará más difícil a medida que aumente la afinidad del polianión por la PEI. Por tanto, la elección del polianión óptimo a utilizar requerirá una solución de compromiso entre la estabilidad de la superestructura y la afinidad del ligando (proteína, metal, etc.) por la PEI comparada con la del polianión.

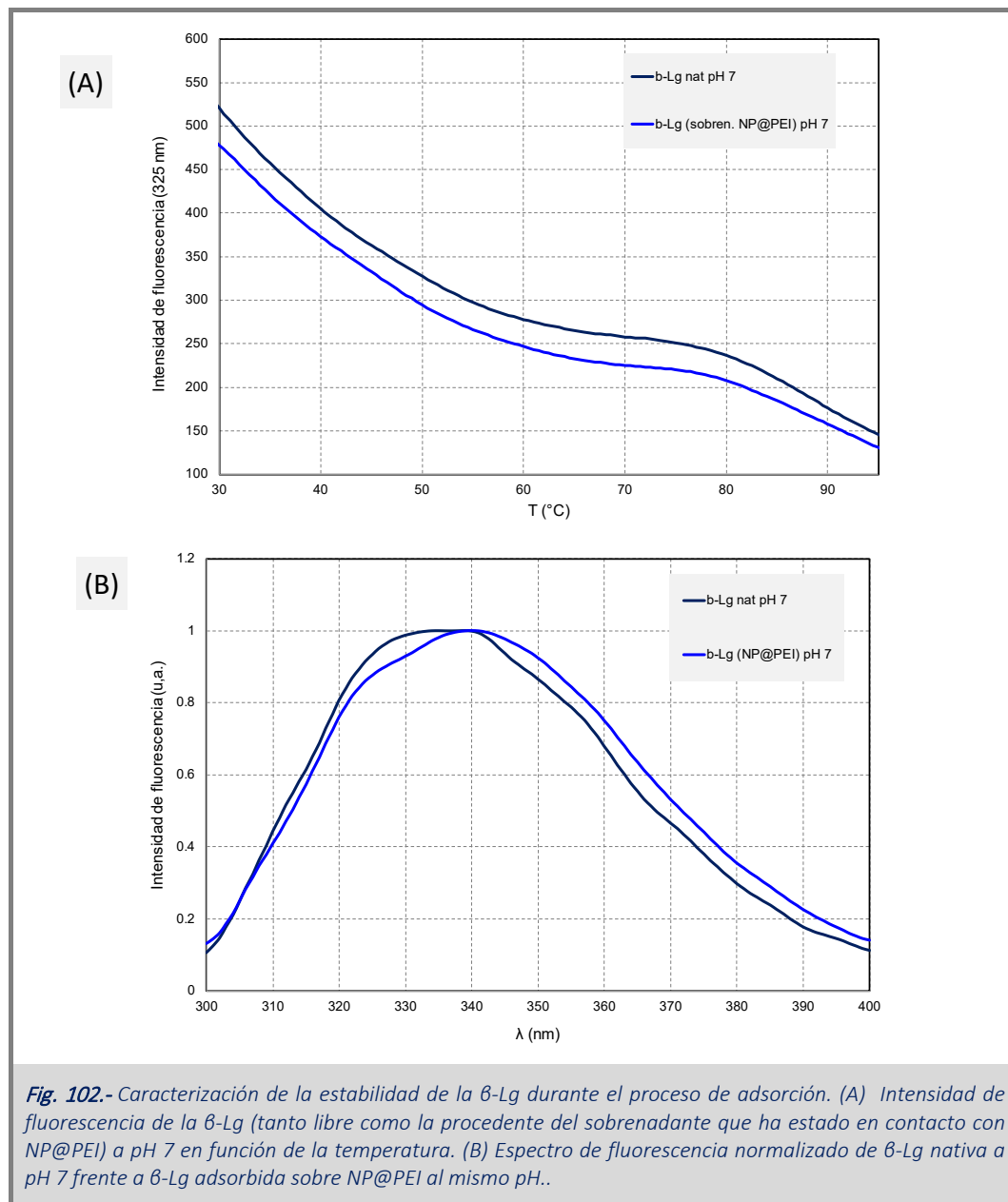
Esta superestructura obtenida a partir de NP@PEI y polianiones nos sirve para desarrollar sistemas con alta capacidad para adsorber ciertas moléculas, pudiendo “elegir”, en cierto modo, la cantidad de esta molécula que pretendemos que quede adsorbida. Estas nanopartículas pueden servir por tanto para aplicaciones tales como, almacenamiento de fármacos, sistemas de liberación controlada de fármacos, purificación de proteínas que en su extracción presentan restos de oligonucleótidos o ADN adsorbidos sobre su superficie, así como la minimización de la atracción que presentan ciertas proteínas en disolución y como consecuencia tienden a agregar.

#### *Efecto de la adsorción de la $\beta$ -Lg de las nanopartículas recubiertas de PEI*

Hemos trabajado sobre algunas aplicaciones estudiando la estabilidad que presenta la  $\beta$ -Lg, una vez ha sido adsorbida sobre la superficie de la nanopartícula. Para esto, realizamos ensayos de fluorescencia de la proteína en presencia y ausencia de nanopartícula a pH 7 ya que, dado que el pI de la proteína es 4.8, la proteína soportará una carga neta negativa a este pH.

En primer lugar, estudiamos cómo afecta la adsorción de la proteína a su conformación y estabilidad para comprobar si existen procesos de adsorción-agregación-desorción que afecten negativamente a la estabilidad conformacional de la proteína. Para ello, hemos estudiado la estabilidad térmica de la proteína que ha estado en contacto con la nanopartícula y no ha sido adsorbida y la hemos comparado con la correspondiente a la proteína libre en disolución (sin presencia de nanopartícula). Los resultados de los barridos térmicos de ambas proteínas a pH 7 se muestran en la Fig. 102-A. Asumiendo un mecanismo de dos estados, la temperatura de desnaturalización,  $T_m$ , resulta ser  $64.0 \pm 1.6$  °C para la proteína libre en disolución y  $63.7 \pm 1.3$  °C para la que ha estado en contacto con las NP@PEI. Esto indica que, si la proteína

sufre algún cambio conformacional, debe ser reversible, asumiendo que se establece el equilibrio adsorción-desorción.

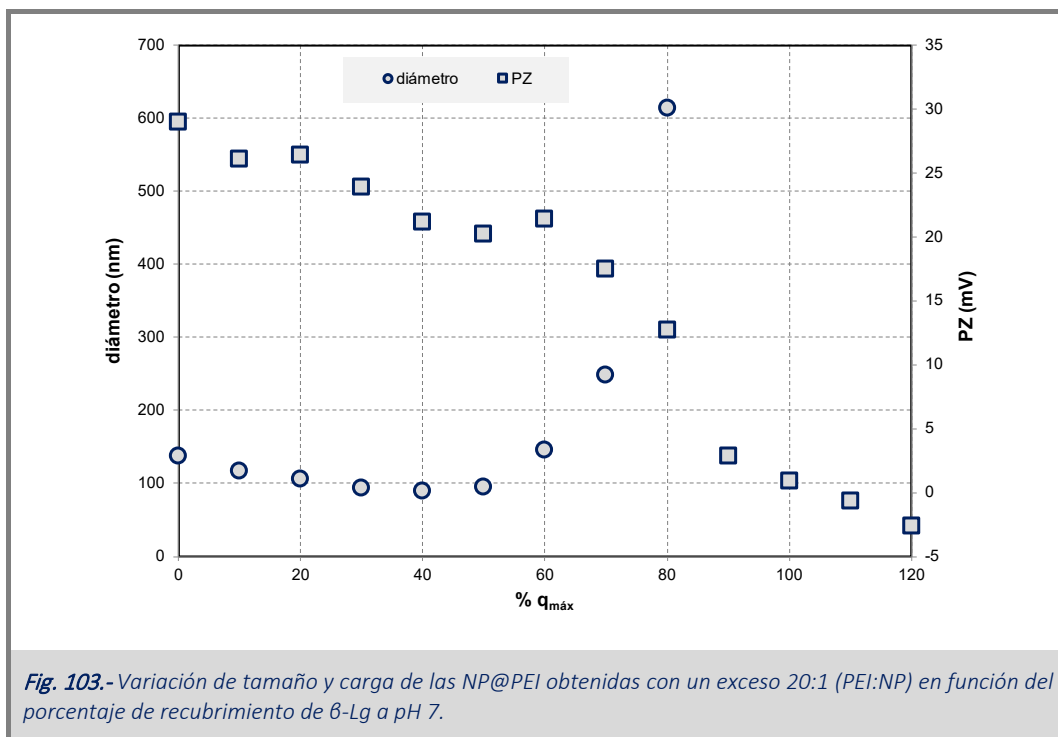


La Fig. 102-B muestra el espectro de la b-Lg libre en disolución y adsorbida a la nanopartícula a pH 7. Se observa un pequeño desplazamiento del máximo de la banda de emisión desde 343.3 nm para la proteína en disolución (no adsorbida) hasta 345.1 nm para la adsorbida sobre la nanopartícula. Este desplazamiento sería indicativo de una mayor exposición al disolvente de los triptófanos en la proteína adsorbida respecto de la proteína libre en disolución. A pesar de este pequeño cambio conformacional, la proteína una vez liberada, mediante cambio de pH a pH 3, mostró la misma estabilidad térmica que la que no ha estado

adsorbida a pH 3 (los datos no son mostrados). Esto deberá comprobarse de forma sistemática en futuras investigaciones y mediante el uso de otras técnicas.

#### *Dependencia del tamaño y potencial Z de las nanopartículas con recubrimiento ampliado en función de la cantidad de proteína adsorbida*

Partiendo de las nanopartículas de magnetita recubiertas de PEI en presencia de fosfato a una relación PEI:NP 20:1, cuya  $q_{\text{máx}}$  es de  $177 \text{ mg}\cdot\text{mg}^{-1}$  (ver Fig. 97), se determinó el tamaño y potencial Z de nanopartículas con distintos niveles de recubrimiento (variando la cantidad de proteína, teniendo en cuenta el valor de  $q_{\text{máx}}$ ). Esto nos dará una idea de la estabilidad coloidal de las partículas a medida que su superficie es cubierta por la proteína. Los resultados se muestran en la Fig. 103.



A medida que la superficie de la nanopartícula es recubierta con proteína, la carga de ésta (potencial Z) disminuye gradualmente desde valores cercanos a +30 mV en ausencia de proteína hasta un valor ligeramente negativo cuando se ha recubierto al 100 %. Parece lógico que así ocurra ya que la proteína (cargada negativamente) irá recubriendo la superficie y compensando cada vez más residuos de PEI cargados y, por tanto, exponiendo parte de su propia estructura cargada negativamente. Al alcanzar el 100 % de recubrimiento, la superficie expuesta al disolvente es, mayoritariamente, la de la propia proteína que conferirá una cierta carga negativa a la partícula.

*Optimización de la capacidad de adsorción de NP mediante el crecimiento del recubrimiento de PEI utilizando polianiones*

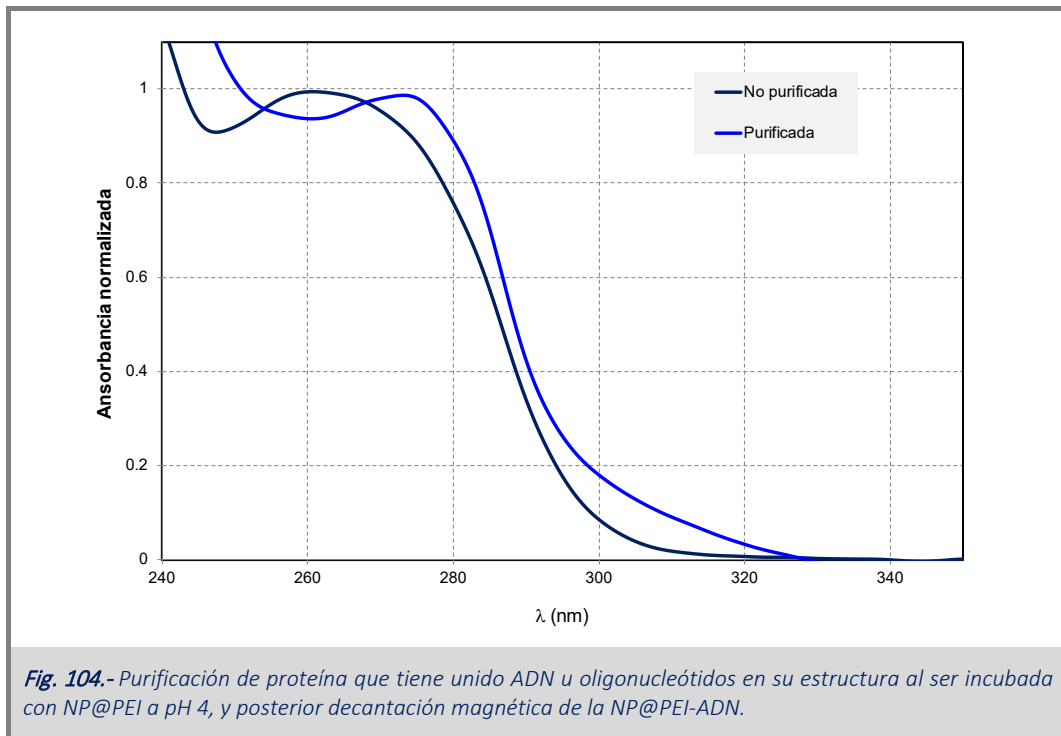
En cuanto al tamaño de la partícula resultante, se observa una ligera disminución de su tamaño hasta alcanzar un 40 % de recubrimiento. A partir de este punto, se produce un rápido incremento de su tamaño como consecuencia de la reducción de su carga superficial y, consecuentemente, de su estabilidad coloidal.

A partir de estos datos es posible definir un sistema, el cual sea estable coloidalmente y posea la cantidad de proteína deseada a transportar o almacenar. En este caso vemos que aun cuando la nanopartícula soporta el 50 % de  $\beta$ -Lg, unos  $90 \text{ mg} \cdot \text{mg}^{-1}$ , es capaz de mantener la carga en +20 mV, y su tamaño (alrededor de 100 nm) lo que indica que siguen teniendo cierta estabilidad coloidal. Por encima del 50 % de recubrimiento la nanopartícula empieza a agregar, por lo que será más difícil su transporte, aunque para el almacenamiento se tendría que hacer un estudio más riguroso del complejo NP@PEI-proteína cuando este se encuentra agregado, y estudiar la estabilidad de la proteína en estas condiciones.

*Captura de DNA durante los procesos de purificación de proteína recombinantes*

Otra de las aplicaciones que planteábamos es la purificación de proteínas que presentan oligonucleótidos o ADN adsorbidos en su estructura. Uno de los métodos más usados para su eliminación es la adición de PEI sobre la proteína para eliminar el ADN adsorbido, producir la precipitación de ambos y eliminar por centrifugación. Sin embargo, la PEI añadida en exceso permanece en la disolución tras la eliminación del ADN lo que puede interferir con ensayos a los que se someta a la proteína a posteriori.

Las nanopartículas diseñadas pueden ser utilizadas para tal propósito, añadiendo sobre la proteína, y posteriormente decantando con el imán, dejando libre en disolución a la proteína. El método sirvió para purificar el dominio C-terminal de la proteína LrtA (C-LrtA)<sup>247</sup>. En este caso la proteína tiene un pI de 5.72, por lo que presenta carga positiva en el momento en que se produce la purificación. El dominio C-LrtA, tras su síntesis presenta oligonucleótidos en su estructura (su espectro ultravioleta presenta un desplazamiento hacia 260 nm donde absorbe el ADN). A pesar de que mediante relación de  $\text{Abs } 260/280$ <sup>248</sup> podemos determinar la concentración de proteína, para las posteriores caracterizaciones biofísicas que pueden hacerse no será lo mismo tener la proteína libre que con restos de oligonucleótidos adsorbidos. Para determinar esto, incubamos la proteína con una concentración dada de NP ( $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), en exceso para eliminar todo el ADN adsorbido a pH 4. Tras dejar que se produzca la competición, decantamos con el imán y cuantificamos el sobrenadante. En la Fig. 104 se muestran espectros de la proteína con DNA y tras haber sido tratada con las NP@PEI, observándose que se pierde la contribución a 260 nm donde principalmente absorbe el ADN y desplazándose hacia 280 nm donde absorben los residuos aromáticos de la proteína.



Tras aplicar la corrección con relación de absorbancias de 280 y 260, obtenemos una absorbancia corregida muy parecida a la obtenida de la proteína tras haber eliminado el ADN que tenía adsorbido (0.059 frente a 0.053, respectivamente).

#### 4.5.5.- Conclusiones

Se han obtenido partículas magnéticas recubiertas con PEI. La cantidad de moléculas de PEI en el recubrimiento puede ser variado a discreción mediante la utilización de polianiones que establecen interacciones electrostáticas entre las cadenas de PEI en el recubrimiento y otras que se encontraban en disolución. El resultado es la incorporación de estas al recubrimiento ampliado.

La cantidad de PEI añadido al recubrimiento ampliado depende exclusivamente de la cantidad de PEI y polianión disponible en el medio. La afinidad de las interacciones polianión – PEI dependen de la carga del primero aumentando sinérgicamente con el aumento de centros cargados negativamente de la molécula.

La capacidad de carga de estas nanopartículas con recubrimiento ampliado aumenta linealmente con la cantidad de PEI incorporado al recubrimiento primitivo. Lo que permite diseñar nanopartículas con una capacidad de carga deseada simplemente ajustando el exceso de PEI y trabajando en condiciones saturantes de polianión. Esto abre la puerta a un diseño verdaderamente racional de nanopartículas cuyo objetivo sea la captura, el transporte o el almacenamiento de ciertos ligandos.



## 5. Conclusiones





- 1.- El tratamiento de superficies de sílice con polielectrolitos de alta densidad de carga tales como el cloruro de polialidimetilamonio, PDADMACl, polialilamina, PAAH o la polietilenimina, PEI, inhibe eficazmente la adsorción de proteínas catiónicas.
- 2.- El recubrimiento de polielectrolito alrededor de la superficie de sílice es estable incluso cuando se somete a lavados intensivos con disoluciones tamponadas en presencia de concentraciones moderadas de sal.
- 3.- La capacidad de adsorción de partículas de sílice recubiertas con el polielectrolito catiónico cloruro de polialidimetilamonio, PDADMACl, puede ser modulada dependiendo de la diferencia entre el pH al cual se obtiene el recubrimiento y aquel en el que serán finalmente utilizadas.
- 4.- Existe una proporcionalidad entre el aumento (o disminución) de la capacidad de adsorción de las partículas de sílice recubiertas y el salto de pH al que son sometidas para su utilización.
- 5.- Se han obtenido nanopartículas de magnetita recubiertas tanto por polielectrolitos catiónicos como aniónicos y optimizado las condiciones de síntesis para minimizar su tamaño (mayor área específica), aumentando su estabilidad coloidal y maximizando su capacidad de adsorción de ligandos de carga opuesta.
- 6.- Se han obtenido partículas de magnetita recubiertas por el polielectrolito PEIc que demostraron tener una extraordinaria capacidad de adsorber metales con alta afinidad, además de hacerlo de forma selectiva. La cantidad de metal capturado aumenta con el exceso de PEIc utilizado en su síntesis.
- 7.- Estas partículas permiten tanto la captura como la recuperación del metal y su posterior reutilización tras ser sometidas a ciclos de eliminación del metal, lavados y sonicación.
- 8.- Se ha desarrollado un método que permite aumentar la cantidad de polielectrolito presente en el recubrimiento de partículas magnéticas mediante el uso de polianiones como  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ , hexametáfosfato, etc.
- 9.- Los polianiones establecen interacciones electrostáticas entre las cadenas de polielectrolito en el recubrimiento y otras que se encontraban en disolución, incorporándolas al mismo.
- 10.- La capacidad de adsorción de las NP@PEI aumenta linealmente con la cantidad de polielectrolito utilizado en su síntesis y no con la cantidad de magnetita recubierta. Esto abre la puerta a un diseño verdaderamente racional de nanopartículas cuyo objetivo sea la captura, el transporte o el almacenamiento de ciertos ligandos.



## 6. Bibliografía



1. Taniguchi, N. On the Basic Concept of Nano-Technology. *Proc. Intl. Conf. Prod. London, 1974* (1974).
2. Feynman, R. P. There's plenty of room at the bottom. *Eng. Sci.* **23**, 22–36 (1960).
3. Capek, I. *Nanocomposite structures and dispersions: science and nanotechnology--fundamental principles and colloidal particles*. (Elsevier, 2006).
4. Ju-Nam, Y. & Lead, J. R. Manufactured nanoparticles: An overview of their chemistry, interactions and potential environmental implications. *Sci. Total Environ.* **400**, 396–414 (2008).
5. Heiligtag, F. J. & Niederberger, M. The fascinating world of nanoparticle research. *Mater. Today* **16**, 262–271 (2013).
6. López-Serrano, A., Olivas, R. M., Landaluze, J. S. & Cámara, C. Nanoparticles: a global vision. Characterization, separation, and quantification methods. Potential environmental and health impact. *Anal. Methods* **6**, 38–56 (2014).
7. Sperling, R. A. & Parak, W. J. Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles. *Philos. Trans. A. Math. Phys. Eng. Sci.* **368**, 1333–83 (2010).
8. Malhotra, B. D. & Ali, M. A. Functionalized Carbon Nanomaterials for Biosensors. in *Nanomaterials for Biosensors* 75–103 (Elsevier, 2018). doi:10.1016/b978-0-323-44923-6.00002-9
9. Sowinska, M. & Urbanczyk-Lipkowska, Z. Advances in the chemistry of dendrimers. *New Journal of Chemistry* **38**, 2168–2203 (2014).
10. Nanoparticles & Nanomedicines - Exploring The Past, Present and Future. Available at: <https://www.ddw-online.com/therapeutics/p320740-nanoparticles-&-nanomedicines-exploring-the-pastpresent-and-future.html>. (Accessed: 12th February 2020)
11. Samuel, I. Colloidal nanocrystals: Electrifying quantum dots for lasers. *Nature Materials* **17**, 9–10 (2018).
12. Iijima, S. Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature* **354**, 56–58 (1991).
13. Zaporotskova, I. V., Boroznina, N. P., Parkhomenko, Y. N. & Kozhitov, L. V. Carbon nanotubes: Sensor properties. A review. *Mod. Electron. Mater.* **2**, 95–105 (2016).
14. Snow, E. S., Perkins, F. K., Houser, E. J., Badescu, S. C. & Reinecke, T. L. Chemical Detection with a Single-Walled Carbon Nanotube Capacitor. *Science*. **307**, 1942–1945 (2005).
15. Kroto, H. W., Heath, J. R., O'Brien, S. C., Curl, R. F. & Smalley, R. E. C60: Buckminsterfullerene. *Nature* **318**, 162–163 (1985).
16. Alivisatos, A. P. Semiconductor Clusters, Nanocrystals, and Quantum Dots. *Science* (80-. ). **271**, 933–937 (1996).
17. Michalet, X. *et al.* Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics. *Science* **307**, 538–44 (2005).
18. Rodríguez, J. A. & Fernández Garcia, M. *Synthesis, properties, and applications of oxide nanomaterials*. (Wiley-Interscience, 2007).
19. Hunter, L.-A., Hunter, R. J. (Ross J. & Preedy, V. R. *Nanotechnology and nanomedicine in diabetes*. (CRC Press, 2012).
20. Chauhan, A. S. Dendrimer nanotechnology for enhanced formulation and controlled delivery of resveratrol. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1348**, 134–140 (2015).
21. Hlady, V. & Buijs, J. Protein adsorption on solid surfaces. *Curr. Opin. Biotechnol.* **7**, 72–77 (1996).

22. Rabe, M., Verdes, D. & Seeger, S. Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces. *Adv. Colloid Interface Sci.* **162**, 87–106 (2011).
23. Nakanishi, K., Sakiyama, T. & Imamura, K. On the adsorption of proteins on solid surfaces, a common but very complicated phenomenon. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **91**, 233–244 (2001).
24. Tsumoto, K., Ejima, D., Senczuk, A. M., Kita, Y. & Arakawa, T. Effects of salts on protein–surface interactions: applications for column chromatography. *J. Pharm. Sci.* **96**, 1677–1690 (2007).
25. Hall, J. B., Dobrovolskaia, M. A., Patri, A. K. & McNeil, S. E. Characterization of nanoparticles for therapeutics. *Nanomedicine* **2**, 789–803 (2007).
26. Slowing, I. I., Vivero-Escoto, J. L., Wu, C. W. & Lin, V. S. Y. Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers. *Advanced Drug Delivery Reviews* **60**, 1278–1288 (2008).
27. Bohunicky, B. & Mousa, S. A. Biosensors: The new wave in cancer diagnosis. *Nanotechnology, Science and Applications* **4**, 1–10 (2011).
28. Chen, H., Yuan, L., Song, W., Wu, Z. & Li, D. Biocompatible polymer materials: Role of protein-surface interactions. *Progress in Polymer Science (Oxford)* **33**, 1059–1087 (2008).
29. Pan, H., Qin, M., Meng, W., Cao, Y. & Wang, W. How do proteins unfold upon adsorption on nanoparticle surfaces? *Langmuir* **28**, 12779–12787 (2012).
30. Larsericsdotter, H., Oscarsson, S. & Buijs, J. Structure, stability, and orientation of BSA adsorbed to silica. *J. Colloid Interface Sci.* **289**, 26–35 (2005).
31. Vertegel, A. A., Richard W. Siegel, A. & Dordick, J. S. Silica Nanoparticle Size Influences the Structure and Enzymatic Activity of Adsorbed Lysozyme. (2004). doi:10.1021/LA0497200
32. Wei, Y., Thyparambil, A. A., Wu, Y. & Latour, R. A. Adsorption-Induced Changes in Ribonuclease A Structure and Enzymatic Activity on Solid Surfaces. *Langmuir* **30**, 14849–14858 (2014).
33. Larsericsdotter, H., Oscarsson, S. & Buijs, J. Thermodynamic Analysis of Proteins Adsorbed on Silica Particles: Electrostatic Effects. *J. Colloid Interface Sci.* **237**, 98–103 (2001).
34. Felsovalyi, F., Mangiagalli, P., Bureau, C., Kumar, S. K. & Banta, S. Reversibility of the Adsorption of Lysozyme on Silica. *Langmuir* **27**, 11873–11882 (2011).
35. Linse, S. *et al.* Nucleation of protein fibrillation by nanoparticles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 8691–6 (2007).
36. Daly, S. M., Przybycien, T. M. & Tilton, R. D. Aggregation of lysozyme and of poly(ethylene glycol)-modified lysozyme after adsorption to silica. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **57**, 81–88 (2007).
37. Norde, W. Adsorption of proteins from solution at the solid-liquid interface. *Adv. Colloid Interface Sci.* **25**, 267–340 (1986).
38. Hlady, V., Buijs, J. & Jennissen, H. P. [26] Methods for studying protein adsorption. *Methods Enzymol.* **309**, 402–429 (1999).
39. Langmuir, I. The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum. *J. Am. Chem. Soc.* **40**, 1361–1403 (1918).
40. KIPLING, J. J. & KIPLING, J. J. Adsorption from Partially Miscible Liquids. in *Adsorption from Solutions of Non-Electrolytes* 70–85 (Elsevier, 1965). doi:10.1016/B978-1-4832-3106-8.50008-9
41. Andrade, J. D. & Hlady, V. Protein adsorption and materials biocompatibility: A tutorial review and suggested hypotheses. in *Advances in Polymer Science* 1–63 (Springer, Berlin, Heidelberg, 1986).

- doi:10.1007/3-540-16422-7\_6
42. Keller, J. U. & Staudt, R. Adsorption Isotherms. in *Gas Adsorption Equilibria: Experimental Methods and Adsorptive Isotherms* 359–413 (Springer, 2005). doi:10.1007/0-387-23598-1\_8
  43. Brunauer, S., Emmett, P. H. & Teller, E. Adsorption of Gases in Multimolecular Layers. *J. Am. Chem. Soc.* **60**, 309–319 (1938).
  44. Izquierdo, J. F. *Cinética de las reacciones químicas*. (Edicions Universitat de Barcelona, 2004).
  45. Kim, J.-H. & Yoon, J.-Y. Protein Adsorption On Polymer Particles. in *Encyclopedia of Surface and Colloid Science* (Marcel Dekker, Inc., 2002).
  46. Nakanishi, K., Sakiyama, T. & Imamura, K. On the adsorption of proteins on solid surfaces, a common but very complicated phenomenon. *J. Biosci. Bioeng.* **91**, 233–244 (2001).
  47. Anand, G., Sharma, S., Dutta, A. K., Kumar, S. K. & Belfort, G. Conformational Transitions of Adsorbed Proteins on Surfaces of Varying Polarity. *Langmuir* **26**, 10803–10811 (2010).
  48. Martin Lundqvist, Ingmar Sethson and Bengt-Harald Jonsson. Protein Adsorption onto Silica Nanoparticles: Conformational Changes Depend on the Particles' Curvature and the Protein Stability. (2004). doi:10.1021/LA0484725
  49. Zhang, D. *et al.* Gold Nanoparticles Can Induce the Formation of Protein-based Aggregates at Physiological pH. *Nano Lett.* **9**, 666–671 (2009).
  50. Dobson, C. M. Protein misfolding, evolution and disease. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 329–32 (1999).
  51. Johnson, P. & Whateley, T. L. The effects of surface and macromolecular interactions on the kinetics of inactivation of trypsin and alpha-chymotrypsin. *Biochem. J.* **193**, 285–94 (1981).
  52. Wen Shang, Joseph H. Nuffer, Jonathan S. Dordick, A. & Siegel, R. W. Unfolding of Ribonuclease A on Silica Nanoparticle Surfaces. (2007). doi:10.1021/NL070777R
  53. Benko, B., Vuk-Pavlovic, S., Dezelic, G. & Maričić, S. A proton magnetic relaxation study of methaemoproteins bound to monodisperse polystyrene latex particles. *J. Colloid Interface Sci.* **52**, 444–451 (1975).
  54. Sears, G. W. Determination of Specific Surface Area of Colloidal Silica by Titration with Sodium Hydroxide. *Anal. Chem.* **28**, 1981–1983 (1956).
  55. Dove, P. M. & Craven, C. M. Surface charge density on silica in alkali and alkaline earth chloride electrolyte solutions. *Geochim. Cosmochim. Acta* **69**, 4963–4970 (2005).
  56. Ong, S., Zhao, X. & Eisenhal, K. B. Polarization of water molecules at a charged interface: second harmonic studies of the silica/water interface. *Chem. Phys. Lett.* **191**, 327–335 (1992).
  57. Ostroverkhov, V., Waychunas, G. A. & Shen, Y. R. New Information on Water Interfacial Structure Revealed by Phase-Sensitive Surface Spectroscopy. *Phys. Rev. Lett.* **94**, 046102 (2005).
  58. Bergna, H. E. Colloid Chemistry of Silica. in *The Colloid Chemistry of Silica* 1–47 (1994). doi:10.1021/ba-1994-0234.ch001
  59. Stöber, W., Fink, A. & Bohn, E. Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. *J. Colloid Interface Sci.* **26**, 62–69 (1968).
  60. Rahman, I. A. & Padavettan, V. Synthesis of Silica Nanoparticles by Sol-Gel: Size-Dependent Properties, Surface Modification, and Applications in Silica-Polymer Nanocomposites—A Review. *J. Nanomater.* **2012**, 1–15 (2012).
  61. Finnie, K. S., Bartlett, J. R., Barbé, C. J. A. & Kong, L. Formation of Silica Nanoparticles in

- Microemulsions. doi:10.1021/la0624283
62. Vansant, E. F., Voort, P. van der (Pascal) & Vrancken, K. C. (Karl C. . *Characterization and chemical modification of the silica surface*. (Elsevier, 1995).
  63. Geetha Devi, M. & Balachandran, S. A Review on Synthesis, Characterization and Applications of Silica Particles. *Int. J. Adv. Eng. Res. Technol.* **4**, 2348–8190 (2016).
  64. Li, Z., Barnes, J. C., Bosoy, A., Stoddart, J. F. & Zink, J. I. Mesoporous silica nanoparticles in biomedical applications. *Chem. Soc. Rev.* **41**, 2590 (2012).
  65. Shirshahi, V. & Soltani, M. Solid silica nanoparticles: applications in molecular imaging. doi:10.1002/cmimi.1611
  66. Li, R., Zhang, L. & Wang, P. Rational design of nanomaterials for water treatment. *Nanoscale* **7**, 17167–17194 (2015).
  67. Mitran, R., Berger, D., Munteanu, C. & Matei, C. Evaluation of Different Mesoporous Silica Supports for Energy Storage in Shape-Stabilized Phase Change Materials with Dual Thermal Responses. *J. Phys. Chem. C* **119**, 15177–15184 (2015).
  68. Tiwari, G. *et al.* Drug delivery systems: An updated review. *Int. J. Pharm. Investig.* **2**, 2–11 (2012).
  69. Allen, T. M. & Cullis, P. R. Drug delivery systems: entering the mainstream. *Science* **303**, 1818–22 (2004).
  70. Kingsley, J. D. *et al.* Nanotechnology: A Focus on Nanoparticles as a Drug Delivery System. *J. Neuroimmune Pharmacol.* **1**, 340–350 (2006).
  71. Zylberberg, C. & Matosevic, S. Pharmaceutical liposomal drug delivery: a review of new delivery systems and a look at the regulatory landscape. *Drug Deliv.* **23**, 3319–3329 (2016).
  72. Talegaonkar, S. *et al.* Microemulsions: a novel approach to enhanced drug delivery. *Recent Pat. Drug Deliv. Formul.* **2**, 238–57 (2008).
  73. Madaan, K., Kumar, S., Poonia, N., Lather, V. & Pandita, D. Dendrimers in drug delivery and targeting: Drug-dendrimer interactions and toxicity issues. *J. Pharm. Bioallied Sci.* **6**, 139–50 (2014).
  74. Wang, Y. *et al.* Mesoporous silica nanoparticles in drug delivery and biomedical applications. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **11**, 313–327 (2015).
  75. Waldman, S. A. Does potency predict clinical efficacy? Illustration through an antihistamine model. *Ann. Allergy, Asthma Immunol.* **89**, 7–12 (2002).
  76. Cabanes, A., Briggs, K. E., Gokhale, P. C., Treat, J. A. & Rahman, A. *International journal of oncology. International Journal of Oncology* **12**, (University of Crete, Faculty of Medicine, Laboratory of Clinical Virology, 1998).
  77. Fielding, R. M., Lewis, R. O. & Moon-McDermott, L. Altered tissue distribution and elimination of amikacin encapsulated in unilamellar, low-clearance liposomes (MiKasome). *Pharm. Res.* **15**, 1775–81 (1998).
  78. Chouly, C., Pouliquen, D., Lucet, I., Jeune, J. J. & Jallet, P. Development of superparamagnetic nanoparticles for MRI: effect of particle size, charge and surface nature on biodistribution. *J. Microencapsul.* **13**, 245–255 (1996).
  79. Laurent, S. *et al.* Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations and biological applications. *Chem. Rev.* **108**, 2064–2110 (2008).
  80. Gupta, A. K. & Gupta, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for



- biomedical applications. *Biomaterials* **26**, 3995–4021 (2005).
81. Akbarzadeh, A., Samiei, M. & Davaran, S. Magnetic nanoparticles: preparation, physical properties, and applications in biomedicine. *Nanoscale Res. Lett.* **7**, 144 (2012).
  82. Bean, C. P. & Livingston, J. D. Superparamagnetism. *J. Appl. Phys.* **30**, S120–S129 (1959).
  83. Thomson, W. *Reprint of Papers on Electrostatics and Magnetism*. (Cambridge University Press, 2011). doi:10.1017/CBO9780511997259
  84. Coey. *Magnetism and Magnetic Materials*.
  85. Tipler, P. A. & Mosca, G. *Física para la ciencia y la tecnología*. (Revert, 2010).
  86. Banerjee, S. K. & Moskowitz, B. M. Ferrimagnetic Properties of Magnetite. in *Magnetite Biomineralization and Magnetoreception in Organisms. Topics in Geobiology, vol 5*. 17–41 (Springer, Boston, MA, 1985). doi:10.1007/978-1-4613-0313-8\_2
  87. Kittel, C. Physical Theory of Ferromagnetic Domains. *Rev. Mod. Phys.* **21**, 541–583 (1949).
  88. Bloch, F. Zur Theorie des Austauschproblems und der Remanenzerscheinung der Ferromagnetika. *Zeitschrift für Phys.* **74**, 295–335 (1932).
  89. FRENKEL, J. & DOEFMAN, J. Spontaneous and Induced Magnetisation in Ferromagnetic Bodies. *Nature* **126**, 274–275 (1930).
  90. Kittel, C. Theory of the Structure of Ferromagnetic Domains in Films and Small Particles. *Phys. Rev.* **70**, 965–971 (1946).
  91. Rivas, J., Kolen'ko, Y. V. & Bañobre-López, M. Chapter 3 – Magnetic Nanocolloids. in *Nanocolloids* 75–129 (2016). doi:10.1016/B978-0-12-801578-0.00003-5
  92. Cullity, B. D. (Bernard D. & Graham, C. D. (Chad D. . *Introduction to magnetic materials*. (IEEE/Wiley, 2009).
  93. Lu, A.-H., Salabas, E. L. & Schüth, F. Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application. *Angew. Chemie Int. Ed.* **46**, 1222–1244 (2007).
  94. Ge, J. *et al.* One-Step Synthesis of Highly Water-Soluble Magnetite Colloidal Nanocrystals. *Chem. - A Eur. J.* **13**, 7153–7161 (2007).
  95. Rocher, V., Siaugue, J.-M., Cabuil, V. & Bee, A. Removal of organic dyes by magnetic alginate beads. *Water Res.* **42**, 1290–1298 (2008).
  96. Yoon, T.-J., Lee, W., Oh, Y.-S. & Lee, J.-K. Magnetic nanoparticles as a catalyst vehicle for simple and easy recycling. Electronic supplementary information (ESI) available: XRD and FT-IR data, as well as the detailed experimental conditions for the catalytic hydroformylation reactions. See <http://www.rsc.org/suppdata/nj/b2/b209391j/>. *New J. Chem.* **27**, 227–229 (2003).
  97. Estelrich, J., Sánchez-Martín, M. J. & Busquets, M. A. Nanoparticles in magnetic resonance imaging: from simple to dual contrast agents. *Int. J. Nanomedicine* **10**, 1727–41 (2015).
  98. De Jong, W. H. & Borm, P. J. A. Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards. *Int. J. Nanomedicine* **3**, 133–49 (2008).
  99. Tartaj, P., Morales, M. a del P., Veintemillas-Verdaguer, S., González-Carretero, T. & Serna, C. J. The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *J. Phys. D. Appl. Phys.* **36**, R182–R197 (2003).
  100. Jordan, A. *et al.* Inductive heating of ferrimagnetic particles and magnetic fluids: physical evaluation of their potential for hyperthermia. *Int. J. Hyperthermia* **9**, 51–68

101. Kekalo, K., Baker, I., Meyers, R. & Shyong, J. Magnetic Nanoparticles with High Specific Absorption Rate at Low Alternating Magnetic Field. *Nano Life* **5**, (2015).
102. Jordan, A. *et al.* The effect of thermotherapy using magnetic nanoparticles on rat malignant glioma. *J. Neurooncol.* **78**, 7–14 (2006).
103. Khemtong, C., Kessinger, C. W. & Gao, J. Polymeric nanomedicine for cancer MR imaging and drug delivery. *Chem. Commun.* **0**, 3497 (2009).
104. Mulder, W. J. M., Strijkers, G. J., van Tilborg, G. A. F., Griffioen, A. W. & Nicolay, K. Lipid-based nanoparticles for contrast-enhanced MRI and molecular imaging. *NMR Biomed.* **19**, 142–164 (2006).
105. Aime, S. *et al.* High sensitivity lanthanide(III) based probes for MR-medical imaging. *Coord. Chem. Rev.* **250**, 1562–1579 (2006).
106. Reimer, P. & Tombach, B. Hepatic MRI with SPIO: detection and characterization of focal liver lesions. *Eur. Radiol.* **8**, 1198–1204 (1998).
107. Seabra, A. B. Iron Oxide Magnetic Nanoparticles in Photodynamic Therapy: A Promising Approach Against Tumor Cells. in *Metal Nanoparticles in Pharma* 3–20 (Springer International Publishing, 2017). doi:10.1007/978-3-319-63790-7\_1
108. Reddy, L. H., Arias, J. L., Nicolas, J. & Couvreur, P. Magnetic Nanoparticles: Design and Characterization, Toxicity and Biocompatibility, Pharmaceutical and Biomedical Applications. *Chem. Rev.* **112**, 5818–5878 (2012).
109. Cheng, J. *et al.* Preparation, characterization and in vitro photodynamic therapy of a pyropheophorbide-a-conjugated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> multifunctional magnetofluorescence photosensitizer. *RSC Adv.* **6**, 37610–37620 (2016).
110. Ito, A., Honda, H., Ito, A. & Honda, H. Magnetic Nanoparticles for Tissue Engineering. in *Nanotechnologies for the Life Sciences* (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2007). doi:10.1002/9783527610419.ntls0102
111. Ito, A. *et al.* Construction and Harvest of Multilayered Keratinocyte Sheets Using Magnetite Nanoparticles and Magnetic Force. *Tissue Eng.* **10**, 873–880 (2004).
112. Mykhaylyk, O. *et al.* Magnetic nanoparticle formulations for DNA and siRNA delivery. *J. Magn. Magn. Mater.* **311**, 275–281 (2007).
113. Lee, C. H. *et al.* Simple, Efficient, and Reproducible Gene Transfection of Mouse Embryonic Stem Cells by Magnetofection. *Stem Cells Dev.* **17**, 133–142 (2008).
114. Jahnke, A. *et al.* Intra-tumoral Gene Delivery of fclL-2, fclFN- $\gamma$  and fclGM-CSF using Magnetofection as a Neoadjuvant Treatment Option for Feline Fibrosarcomas: A Phase-I Study. *J. Vet. Med. Ser. A* **54**, 599–606 (2007).
115. Widder, K. J., Senyei, A. E. & Scarpelli, D. G. Magnetic Microspheres: A Model System for Site Specific Drug Delivery in Vivo. *Exp. Biol. Med.* **158**, 141–146 (1978).
116. Peng, M. *et al.* Dextran-coated superparamagnetic nanoparticles as potential cancer drug carriers in vivo. *Nanoscale* **7**, 11155–62 (2015).
117. Chen, J. *et al.* Reducible polyamidoamine-magnetic iron oxide self-assembled nanoparticles for doxorubicin delivery. *Biomaterials* **35**, 1240–1248 (2014).
118. Mikhaylov, G. *et al.* Ferri-liposomes as an MRI-visible drug-delivery system for targeting tumours and their microenvironment. *Nat. Nanotechnol.* **6**, 594–602 (2011).
119. Tang, W., Su, Y., Li, Q., Gao, S. & Shang, J. K. Superparamagnetic magnesium ferrite nanoadsorbent

- for effective arsenic (III, V) removal and easy magnetic separation. *Water Res.* **47**, 3624–3634 (2013).
120. Yantasee, W. *et al.* Removal of heavy metals from aqueous systems with thiol functionalized superparamagnetic nanoparticles. *Environ. Sci. Technol.* **41**, 5114–9 (2007).
121. Haynes, W. M. *CRC Handbook of Chemistry and Physics, 95th Edition.* (CRC Press, 2014).
122. Abu-Dief, A. M. & Abdel-Fatah, S. M. Development and functionalization of magnetic nanoparticles as powerful and green catalysts for organic synthesis. *Beni-Suef Univ. J. Basic Appl. Sci.* **7**, 55–67 (2018).
123. Abu-Reziq, R., Wang, D., Post, M. & Alper, H. Platinum Nanoparticles Supported on Ionic Liquid-Modified Magnetic Nanoparticles: Selective Hydrogenation Catalysts. *Adv. Synth. Catal.* **349**, 2145–2150 (2007).
124. Dussán, K. J., Giese, E. C., Vieira, G. N. A., Lima, L. N. & Silva, D. D. V. Pharmaceutical and Biomedical Applications of Magnetic Iron-Oxide Nanoparticles. in *Metal Nanoparticles in Pharma* 77–99 (Springer International Publishing, 2017). doi:10.1007/978-3-319-63790-7\_5
125. LaMer, V. K. & Dinegar, R. H. Theory, Production and Mechanism of Formation of Monodispersed Hydrosols. *J. Am. Chem. Soc.* **72**, 4847–4854 (1950).
126. Chang, J. & Waclawik, E. R. Colloidal semiconductor nanocrystals: Controlled synthesis and surface chemistry in organic media. *RSC Advances* **4**, 23505–23527 (2014).
127. Massart, R. Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media. *IEEE Trans. Magn.* **17**, 1247–1248 (1981).
128. Wu, W., Wu, Z., Yu, T., Jiang, C. & Kim, W.-S. Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, surface functional strategies and biomedical applications. *Sci. Technol. Adv. Mater.* **16**, 023501 (2015).
129. Sugimoto, T. & Matijević, E. Formation of uniform spherical magnetite particles by crystallization from ferrous hydroxide gels. *J. Colloid Interface Sci.* **74**, 227–243 (1980).
130. Sen, T., Magdassi, S., Nizri, G. & Bruce, I. J. Dispersion of magnetic nanoparticles in suspension. *Micro Nano Lett.* **1**, 39 (2006).
131. Amara, D., Grinblat, J. & Margel, S. Solventless thermal decomposition of ferrocene as a new approach for one-step synthesis of magnetite nanocubes and nanospheres. *J. Mater. Chem.* **22**, 2188–2195 (2012).
132. Wu, W. *et al.* Large-Scale and Controlled Synthesis of Iron Oxide Magnetic Short Nanotubes: Shape Evolution, Growth Mechanism, and Magnetic Properties. *J. Phys. Chem. C* **114**, 16092–16103 (2010).
133. C. Pascal, J. L. Pascal, and, Favier, F., Moubtassim, M. L. E. & Payen, C. Electrochemical Synthesis for the Control of  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Nanoparticle Size. Morphology, Microstructure, and Magnetic Behavior. (1998). doi:10.1021/CM980742F
134. González-Carreño, T., Morales, M. P., Gracia, M. & Serna, C. J. Preparation of uniform  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> particles with nanometer size by spray pyrolysis. *Mater. Lett.* **18**, 151–155 (1993).
135. Kojima, K., Miyazaki, M., Mizukami, F. & Maeda, K. Selective Formation of Spinel Iron Oxide in Thin Films by Complexing Agent-Assisted Sol-Gel Processing. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **8**, 77–81 (1997).
136. Lewandowska, J. *et al.* Sol-gel synthesis of iron oxide-silica composite microstructures. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **64**, 67–77 (2012).
137. Cai, W. & Wan, J. Facile synthesis of superparamagnetic magnetite nanoparticles in liquid polyols. *J.*

- Colloid Interface Sci.* **305**, 366–370 (2007).
138. Langevin, D. Micelles and Microemulsions. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **43**, 341–369 (1992).
139. Okoli, C. *et al.* Comparison and Functionalization Study of Microemulsion-Prepared Magnetic Iron Oxide Nanoparticles. *Langmuir* **28**, 8479–8485 (2012).
140. Sun, S., Murray, C. B., Weller, D., Folks, L. & Moser, A. Monodisperse FePt nanoparticles and ferromagnetic FePt nanocrystal superlattices. *Science* **287**, 1989–92 (2000).
141. Hee Kim, E., Sook Lee, H., Kook Kwak, B. & Kim, B.-K. Synthesis of ferrofluid with magnetic nanoparticles by sonochemical method for MRI contrast agent. *J. Magn. Magn. Mater.* **289**, 328–330 (2005).
142. Komarneni, S. Nanophase materials by hydrothermal, microwave-hydrothermal and microwave-solvothermal methods. *Current Science* **85**, 1730–1734 (2003).
143. Hu, X., Yu, J. C., Gong, J., Li, Q. & Li, G.  $\alpha$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Nanorings Prepared by a Microwave-Assisted Hydrothermal Process and Their Sensing Properties. *Adv. Mater.* **19**, 2324–2329 (2007).
144. Kalyani, S., Sangeetha, J. & Philip, J. Microwave Assisted Synthesis of Ferrite Nanoparticles: Effect of Reaction Temperature on Particle Size and Magnetic Properties. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **15**, 5768–74 (2015).
145. Vali, H. *et al.* Formation of tabular single-domain magnetite induced by *Geobacter metallireducens* GS-15. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 16121–6 (2004).
146. Scheffel, A. *et al.* An acidic protein aligns magnetosomes along a filamentous structure in magnetotactic bacteria. *Nature* **440**, 110–114 (2006).
147. Sun, Y., Ma, M., Zhang, Y. & Gu, N. Synthesis of nanometer-size maghemite particles from magnetite. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **245**, 15–19 (2004).
148. Monazam, E. R., Breault, R. W. & Siriwardane, R. Kinetics of Magnetite (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) Oxidation to Hematite (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) in Air for Chemical Looping Combustion. *Ind. Eng. Chem. Res.* **53**, 13320–13328 (2014).
149. Sun, Z.-X., Su, F.-W., Forsling, W. & Samskog, P.-O. Surface Characteristics of Magnetite in Aqueous Suspension. *J. Colloid Interface Sci.* **197**, 151–159 (1998).
150. Derjaguin, B. & Landau, L. Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes. *Prog. Surf. Sci.* **43**, 30–59 (1993).
151. Verwey, E. J. W. Theory of the Stability of Lyophobic Colloids. *J. Phys. Colloid Chem.* **51**, 631–636 (1947).
152. Tadros, T. Electrostatic and Steric Stabilization of Colloidal Dispersions. in *Electrical Phenomena at Interfaces and Biointerfaces* 153–172 (John Wiley & Sons, Inc., 2012). doi:10.1002/9781118135440.ch10
153. Smith, R. M. & Martell, A. E. *Critical Stability Constants*. *Critical Stability Constants* (Springer US, 1989). doi:10.1007/978-1-4615-6764-6
154. Kovář, D. *et al.* Preparation and Characterisation of Highly Stable Iron Oxide Nanoparticles for Magnetic Resonance Imaging. *J. Nanomater.* **2017**, 1–8 (2017).
155. Yudhisthira Sahoo, † *et al.* Aqueous Ferrofluid of Magnetite Nanoparticles: Fluorescence Labeling and Magnetophoretic Control. (2005). doi:10.1021/JP045402Y
156. Yang, K., Peng, H., Wen, Y. & Li, N. Re-examination of characteristic FTIR spectrum of secondary layer in bilayer oleic acid-coated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles. *Appl. Surf. Sci.* **256**, 3093–3097 (2010).

157. Gorrepati, E. A., Wongthahan, P., Raha, S. & Fogler, H. S. Silica Precipitation in Acidic Solutions: Mechanism, pH Effect, and Salt Effect. *Langmuir* **26**, 10467–10474 (2010).
158. Bergna, H. E. & Roberts, W. O. *Colloidal silica : fundamentals and applications*. (CRC Taylor & Francis, 2006).
159. Liu, X., Ma, Z., Xing, J. & Liu, H. Preparation and characterization of amino–silane modified superparamagnetic silica nanospheres. *J. Magn. Magn. Mater.* **270**, 1–6 (2004).
160. Yasuhiro Shiraishi, \*, Go Nishimura, Takayuki Hirai, and & Komasaawa, I. Separation of Transition Metals Using Inorganic Adsorbents Modified with Chelating Ligands. (2002). doi:10.1021/IE020119B
161. Malvindi, M. A. *et al.* Toxicity assessment of silica coated iron oxide nanoparticles and biocompatibility improvement by surface engineering. *PLoS One* **9**, e85835 (2014).
162. Swadeshmukul Santra, † *et al.* Synthesis and Characterization of Silica-Coated Iron Oxide Nanoparticles in Microemulsion: The Effect of Nonionic Surfactants. (2001). doi:10.1021/LA0008636
163. Kalkan, N. A., Aksoy, S., Aksoy, E. A. & Hasirci, N. Preparation of chitosan-coated magnetite nanoparticles and application for immobilization of laccase. *J. Appl. Polym. Sci.* **123**, 707–716 (2012).
164. Castelló, J., Gallardo, M., Busquets, M. A. & Estelrich, J. Chitosan (or alginate)-coated iron oxide nanoparticles: A comparative study. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **468**, 151–158 (2015).
165. Chastellain, M., Petri, A. & Hofmann, H. Particle size investigations of a multistep synthesis of PVA coated superparamagnetic nanoparticles. *J. Colloid Interface Sci.* **278**, 353–360 (2004).
166. Butterworth, M. ., Illum, L. & Davis, S. . Preparation of ultrafine silica- and PEG-coated magnetite particles. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **179**, 93–102 (2001).
167. Barrat, J.-L. & Joanny, F. Theory of Polyelectrolyte Solutions. in 1–66 (Wiley-Blackwell, 2007). doi:10.1002/9780470141533.ch1
168. Manning, G. S. Limiting Laws and Counterion Condensation in Polyelectrolyte Solutions I. Colligative Properties. *J. Chem. Phys.* **51**, 924–933 (1969).
169. Visakh, P. M. Polyelectrolyte: Thermodynamics and Rheology. in 1–17 (2014). doi:10.1007/978-3-319-01680-1\_1
170. Maurice Drifford and Michel Delsanti. Polyelectrolyte Solutions with Multivalent Added Salts: Stability, Structure, and Dynamics. in *Physical chemistry of polyelectrolytes* 135–162 (Marcel Dekker, 2001).
171. Kosmella, J. K. and S. Introduction and Objective. in *Polyelectrolytes and Nanoparticles* 1–4 (Springer Berlin Heidelberg, 2007). doi:10.1007/978-3-540-46382-5\_1
172. Kokufuta, E. & Takahashi, K. Adsorption of poly(diallyldimethylammonium chloride) on colloid silica from water and salt solution. *Macromolecules* **19**, 351–354 (1986).
173. Fleming, A. On a Remarkable Bacteriolytic Element Found in Tissues and Secretions. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **93**, 306–317 (1922).
174. Blake, C. C. F. *et al.* Structure of hen egg-white lysozyme: A three-dimensional Fourier synthesis at 2 Å resolution. *Nature* **206**, 757–761 (1965).
175. Wang, J., Dauter, M., Alkire, R., Joachimiak, A. & Dauter, Z. Triclinic lysozyme at 0.65 Å resolution. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **63**, 1254–1268 (2007).

176. Imoto, T., Forster, L. S., Rupley, J. A. & Tanaka, F. Fluorescence of lysozyme: emissions from tryptophan residues 62 and 108 and energy migration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **69**, 1151–1155 (1972).
177. Jash, C., Payghan, P. V., Ghoshal, N. & Suresh Kumar, G. Binding of the iminium and alkanolamine forms of sanguinarine to lysozyme: Spectroscopic analysis, thermodynamics, and molecular modeling studies. *J. Phys. Chem. B* **118**, 13077–13091 (2014).
178. Summers, C. A. & Flowers, R. A. Protein renaturation by the liquid organic salt ethylammonium nitrate. *Protein Sci.* **9**, 2001–2008 (2000).
179. Plaza Del Pino, I. M., Ibarra-Molero, B. & Sanchez-Ruiz, J. M. Lower kinetic limit to protein thermal stability: A proposal regarding protein stability in vivo and its relation with misfolding diseases. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **40**, 58–70 (2000).
180. Kontopidis, G., Holt, C. & Sawyer, L. Invited review:  $\beta$ -lactoglobulin: Binding properties, structure, and function. *J. Dairy Sci.* **87**, 785–796 (2004).
181. Miriani, M. *et al.* Unfolding of beta-lactoglobulin on the surface of polystyrene nanoparticles: Experimental and computational approaches. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **82**, 1272–1282 (2014).
182. Gottschalk, M., Nilsson, H., Roos, H. & Halle, B. Protein self-association in solution: The bovine  $\beta$ -lactoglobulin dimer and octamer. *Protein Sci.* **12**, 2404–2411 (2009).
183. Valeur, B. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. (Wiley-VCH Verlag GmbH, 2001).
184. Cooper, A. *Biophysical Chemistry*. **16**, (Royal Society of Chemistry, 2004).
185. Lakowicz, J. R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. (Kluwer Academic/Plenum, 1999).
186. Eftink, M. R. Fluorescence Techniques for Studying Protein Structure. in 127–205 (Wiley-Blackwell, 1991). doi:10.1002/9780470110560.ch3
187. Eftink, M. R. The use of fluorescence methods to monitor unfolding transitions in proteins. *Biophys. J.* **66**, 482–501 (1994).
188. Royer, C. A. Probing Protein Folding and Conformational Transitions with Fluorescence. (2006). doi:10.1021/CR0404390
189. Bhattacharjee, S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *J. Control. Release* **235**, 337–351 (2016).
190. Malvern Instruments. *Dynamic Light Scattering: An Introduction in 30 Minutes*.
191. Kaszuba, M., Corbett, J., Watson, F. M. & Jones, A. High-concentration zeta potential measurements using light-scattering techniques. *Philos. Trans. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* **368**, 4439–4451 (2010).
192. Stuart, B. H. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. (John Wiley & Sons, Ltd, 2004). doi:10.1002/0470011149
193. Wang, Z. L. Transmission Electron Microscopy of Shape-Controlled Nanocrystals and Their Assemblies. (2000). doi:10.1021/JP993593C
194. Leach, S. J. & Scheraga, H. A. Effect of Light Scattering on Ultraviolet Difference Spectra <sup>1</sup>. *J. Am. Chem. Soc.* **82**, 4790–4792 (1960).
195. North Carolina State University. Department of Wood and Paper Science., P. & Zanuttini, M. Á. Bioresources. *BioResources* **2**, 399–407 (2007).

196. Kam, S. K. & Gregory, J. Charge determination of synthetic cationic polyelectrolytes by colloid titration. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **159**, 165–179 (1999).
197. Stucki, J. W. & Anderson, W. L. The Quantitative Assay of Minerals for Fe<sup>2+</sup> and Fe<sup>3+</sup> Using 1,10-Phenanthroline: I. Sources of Variability<sup>1</sup>. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **45**, 633 (1981).
198. Nakamoto, K. Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds. in *Handbook of Vibrational Spectroscopy* (ed. Griffiths, P. R.) (John Wiley & Sons, Ltd, 2006). doi:10.1002/0470027320.s4104
199. Ning, W., Wijeratne, S., Dong, J. & Bruening, M. L. Immobilization of Carboxymethylated Polyethylenimine–Metal-Ion Complexes in Porous Membranes to Selectively Capture His-Tagged Protein. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **7**, 2575–2584 (2015).
200. Deng, Y.-H., Wang, C.-C., Hu, J.-H., Yang, W.-L. & Fu, S.-K. Investigation of formation of silica-coated magnetite nanoparticles via sol–gel approach. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **262**, 87–93 (2005).
201. Yamaura, M. *et al.* Preparation and characterization of (3-aminopropyl)triethoxysilane-coated magnetite nanoparticles. *J. Magn. Magn. Mater.* **279**, 210–217 (2004).
202. Yasuhiro Shiraishi, Go Nishimura Takayuki Hirai, A. & Komasa, I. Separation of Transition Metals Using Inorganic Adsorbents Modified with Chelating Ligands. (2002). doi:10.1021/IE020119B
203. Säbel, C. E., Neureuther, J. M. & Siemann, S. A spectrophotometric method for the determination of zinc, copper, and cobalt ions in metalloproteins using Zincon. *Anal. Biochem.* **397**, 218–226 (2010).
204. Morin, L. G. Direct Colorimetric Determination of Serum Calcium with *o*-Cresolphthalein Complexon. *Am. J. Clin. Pathol.* **61**, 114–117 (1974).
205. Cuatrecasas, P. & Anfinsen, C. B. [31] Affinity chromatography Methods in Enzymology. in *Enzyme purification and related techniques* (1971).
206. Tsumoto, K., Ejima, D., Senczuk, A. M., Kita, Y. & Arakawa, T. Effects of salts on protein-surface interactions: Applications for column chromatography. *Journal of Pharmaceutical Sciences* (2007). doi:10.1002/jps.20821
207. Hall, J. B., Dobrovolskaia, M. A., Patri, A. K. & McNeil, S. E. Characterization of nanoparticles for therapeutics. *Nanomedicine* (2007). doi:10.2217/17435889.2.6.789
208. Alcantar, N. A., Aydil, E. S. & Israelachvili, J. N. Polyethylene glycol-coated biocompatible surfaces. *J. Biomed. Mater. Res.* **51**, 343–351 (2000).
209. Karlsson, M., Ekeröth, J., Elwing, H. & Carlsson, U. Reduction of irreversible protein adsorption on solid surfaces by protein engineering for increased stability. *J. Biol. Chem.* (2005). doi:10.1074/jbc.M503665200
210. Giacomelli, C. E. & Norde, W. The adsorption-desorption cycle. Reversibility of the BSA-silica system. *J. Colloid Interface Sci.* **233**, 234–240 (2001).
211. Vertegel, A. A., Siegel, R. W. & Dordick, J. S. Silica nanoparticle size influences the structure and enzymatic activity of adsorbed lysozyme. *Langmuir* **20**, 6800–6807 (2004).
212. Goradia, D., Cooney, J., Hodnett, B. K. & Magner, E. The adsorption characteristics, activity and stability of trypsin onto mesoporous silicates. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **32**, 231–239 (2005).
213. Norde, W. & Giacomelli, C. E. BSA structural changes during homomolecular exchange between the adsorbed and the dissolved states. in *Journal of Biotechnology* (2000). doi:10.1016/S0168-1656(00)00242-X

214. Linse, S. *et al.* Nucleation of protein fibrillation by nanoparticles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 8691–8696 (2007).
215. Sears, G. W. Determination of Specific Surface Area of Colloidal Silica by Titration With Sodium Hydroxide. *Anal. Chem.* **28**, 1981–1983 (1956).
216. Felsovalyi, F., Mangiagalli, P., Bureau, C., Kumar, S. K. & Banta, S. Reversibility of the adsorption of lysozyme on silica. *Langmuir* **27**, 11873–11882 (2011).
217. Larsericsdotter, H., Oscarsson, S. & Buijs, J. Thermodynamic analysis of lysozyme adsorbed to silica. *J. Colloid Interface Sci.* **276**, 261–268 (2004).
218. Mészáros, R., Varga, I. & Gilányi, T. Adsorption of poly(ethyleneimine) on silica surfaces: Effect of pH on the reversibility of adsorption. *Langmuir* **20**, 5026–5029 (2004).
219. Matsumoto, A., Tsutsumi, K., Schumacher, K. & Unger, K. K. Surface functionalization and stabilization of mesoporous silica spheres by silanization and their adsorption characteristics. *Langmuir* **18**, 4014–4019 (2002).
220. Howarter, J. A. & Youngblood, J. P. Optimization of silica silanization by 3-aminopropyltriethoxysilane. *Langmuir* **22**, 11142–11147 (2006).
221. Malmsten, M., Emoto, K. & Van Alstine, J. M. Effect of chain density on inhibition of protein adsorption by poly(ethylene glycol) based coatings. *J. Colloid Interface Sci.* **202**, 507–517 (1998).
222. Robinson, S. & Williams, P. A. Inhibition of protein adsorption onto silica by polyvinylpyrrolidone. *Langmuir* **18**, 8743–8748 (2002).
223. Kuehner, D. E. *et al.* Lysozyme net charge and ion binding in concentrated aqueous electrolyte solutions. *J. Phys. Chem. B* **103**, 1368–1374 (1999).
224. Bharti, B., Meissner, J. & Findenegg, G. H. Aggregation of silica nanoparticles directed by adsorption of lysozyme. *Langmuir* **27**, 9823–9833 (2011).
225. Meissner, J., Prause, A., Bharti, B. & Findenegg, G. H. Characterization of protein adsorption onto silica nanoparticles: influence of pH and ionic strength. *Colloid Polym. Sci.* **293**, 3381–3391 (2015).
226. Kubiak-Ossowska, K. & Mulheran, P. A. Mechanism of hen egg white lysozyme adsorption on a charged solid surface. *Langmuir* **26**, 15954–15965 (2010).
227. Kubiak-Ossowska, K., Cwieka, M., Kaczynska, A., Jachimaska, B. & Mulheran, P. A. Lysozyme adsorption at a silica surface using simulation and experiment: Effects of pH on protein layer structure. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **17**, 24070–24077 (2015).
228. Wang, Q. Z. *et al.* Protonation constants of chitosan with different molecular weight and degree of deacetylation. *Carbohydr. Polym.* **65**, 194–201 (2006).
229. Matlahov, I., Geiger, Y. & Goobes, G. Trapping RNase A on MCM41 pores: Effects on structure stability, product inhibition and overall enzymatic activity. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **16**, 9031–9038 (2014).
230. Ansari, S. A. & Husain, Q. Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: A review. *Biotechnol. Adv.* **30**, 512–523 (2012).
231. Das, S., Sen, B. & Debnath, N. Recent trends in nanomaterials applications in environmental monitoring and remediation. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **22**, 18333–18344 (2015).
232. Xie, F. *et al.* Polyelectrolyte adsorption on solid surfaces: Theoretical predictions and experimental measurements. *Langmuir* **29**, 12421–12431 (2013).



233. Singh, R. K., Kim, T. H., Patel, K. D., Knowles, J. C. & Kim, H. W. Biocompatible magnetite nanoparticles with varying silica-coating layer for use in biomedicine: Physicochemical and magnetic properties, and cellular compatibility. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **100 A**, 1734–1742 (2012).
234. Shi, S., Guo, J., You, Q., Chen, X. & Zhang, Y. Selective and simultaneous extraction and determination of hydroxybenzoic acids in aqueous solution by magnetic molecularly imprinted polymers. *Chem. Eng. J.* **243**, 485–493 (2014).
235. Waldron, R. D. Infrared Spectra of Ferrites. *Phys. Rev.* **99**, 1727–1735 (1955).
236. Atkins, P. W. (Peter W. & De Paula, J. *Atkins' Physical chemistry*. (Oxford University Press, 2010).
237. Swift, T., Swanson, L., Geoghegan, M. & Rimmer, S. The pH-responsive behaviour of poly(acrylic acid) in aqueous solution is dependent on molar mass. *Soft Matter* **12**, 2542–2549 (2016).
238. Isom, D. G., Castañeda, C. A., Cannon, B. R. & García-Moreno, B. Large shifts in pKa values of lysine residues buried inside a protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 5260–5 (2011).
239. Liao, M.-H. & Chen, D.-H. Fast and efficient adsorption/desorption of protein by a novel magnetic nano-adsorbent. *Biotechnol. Lett.* **24**, 1913–1917 (2002).
240. Liao, M.-H. *et al.* Preparation and characterization of a novel magnetic nano-adsorbent. *J. Mater. Chem.* **12**, 3654–3659 (2002).
241. Harris, D. C. & Berenguer Navarro, V. *Análisis químico cuantitativo*. (Reverté, 2007).
242. Burriel-Martí, F. (Fernando). *Química analítica cualitativa*. (Paraninfo, 2008).
243. Douglas A. Skoog, Donald M. West, F. James Holler, S. R. C. Fundamentals of Analytical Chemistry. in
244. Wang, R. *et al.* PEI-coated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles enable efficient delivery of therapeutic siRNA targeting REST into glioblastoma cells. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, (2018).
245. Özacar, M. & Şengil, İ. A. Enhancing phosphate removal from wastewater by using polyelectrolytes and clay injection. *J. Hazard. Mater.* **100**, 131–146 (2003).
246. Seyrek, E., Dubin, P. L., Tribet, C. & Gamble, E. A. Ionic strength dependence of protein-polyelectrolyte interactions. *Biomacromolecules* (2003). doi:10.1021/bm025664a
247. Neira, J. L., Giudici, A. M., Hornos, F., Arbe, A. & Rizzuti, B. The C Terminus of the Ribosomal-Associated Protein LrtA is an Intrinsically Disordered Oligomer. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 3902 (2018).
248. Dunn, M. J. Initial planning: Determination of total protein concentration. in *Protein Purification Methods*; Harris, E.L.V., Angal, S. 10–20 (Oxford University Press: Oxford, UK, 1995).



## 7. Anexo



Neira J.L., Hornos F., Bacarizo J., Cámara-Artigás A., Gómez J.

“The Monomeric Species of the Regulatory Domain of Tyrosine Hydroxylase Has a Low Conformational Stability”

Biochemistry, 2016 Jun 21;55(24):3418-31 (doi: 10.1021/acs.biochem.6b00135)



---

# The monomeric species of the regulatory domain of tyrosine hydroxylase has a low conformational stability<sup>†</sup>

José L. Neira<sup>‡,§,\*</sup>, Felipe Hornos<sup>‡</sup>, Julio Bacarizo<sup>||,¶</sup>, Ana Cámara-Artigás<sup>||</sup> and Javier Gómez<sup>‡</sup>

<sup>‡</sup>*Instituto de Biología Molecular y Celular, Universidad Miguel Hernández, 03202 Elche (Alicante), Spain;*

<sup>§</sup>*Biocomputation and Complex Systems Physics Institute, 50009 Zaragoza, Spain; and* <sup>||</sup> *Department of Physical Chemistry, Biochemistry and Inorganic Chemistry, University of Almería, Agrifood Campus of International Excellence (ceiA3), Almería, Spain.*

*Running title:* Conformational stability of RDTyrH.

<sup>¶</sup>Current address: Department of Chemistry and Biochemistry, Arizona State University, Tempe, AZ 85287-1604, United States; and Center for Applied Structural Discovery, The Biodesign Institute, Arizona State University, Tempe, AZ 85287-1604, United States.

\*Corresponding author address: José L. Neira, Instituto de Biología Molecular y Celular, Edificio Torregaitán, Universidad Miguel Hernández, Avda. del Ferrocarril s/n, 03202, Elche (Alicante), Spain. Tel: + 34 966658459. Fax: + 34 966658758. E-mail: jlneira@umh.es.

<sup>†</sup> Funding information: This work was supported by regional grants of Regional Generalitat Valenciana, Prometeo 018/2013 (JLN and JG); Spanish Ministry of Economy and Competitiveness and FEDER (EU): BIO2012-39922-C02-01/02 (ACA) and CTQ2015-64445-R (JLN and JG). FH was supported by Prometeo 018/2013.

*Abbreviations used:* ANS, 8-anilinonaphthalene-1-sulfonic acid; ASA, accessible surface area; CD, circular dichroism; DOSY, diffusion ordered spectroscopy; DLS, dynamic light scattering; DSC, differential scanning calorimetry; *D*, translational self-diffusion coefficient; GdmCl, guanidine hydrochloride; ITC, isothermal titration calorimetry; NMR, nuclear magnetic resonance; PheH, phenylalanine hydroxylase; RD, regulatory domain; RDPheH, regulatory domain of phenylalanine hydroxylase; RDTyrH, regulatory domain of tyrosine hydroxylase, containing residues 1-159 of the whole RD; RDTyrH<sub>65-159</sub>, the region of the RD of TyrH containing the well-folded core of the protein; *R<sub>s</sub>*, hydrodynamic radius; SEC, size exclusion chromatography; TSP, 3-(trimethylsilyl) propionic acid-2,2,3,3-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>-sodium salt; TyrH, tyrosine hydroxylase; UV, ultraviolet.



**ABSTRACT**

Tyrosine hydroxylase (TyrH) catalyzes the hydroxylation of tyrosine to form 3,4-dihydroxyphenylalanine, the first step in the synthesis of catecholamine neurotransmitters. The protein contains a 159-residue-long regulatory domain (RD) at its N terminus that forms dimers in solution; the N-terminal region of RDTyrH (residues 1-71) is absent in the solution structure of the domain. We have characterized the conformational stability of two species of RDTyrH: one containing the N-terminal region and other lacking the first 64 residues, to clarify how that N-terminal region modulates the conformational stability of RD. Under the conditions used in this study, the RD species lacking the first 64 residues is a monomer at pH 7.0, with a small conformational stability at 25 °C ( $4.7 \pm 0.8 \text{ kcal mol}^{-1}$ ). On the other hand, the entire RDTyrH is dimeric at physiological pH, with an estimated dissociation constant of 1.6  $\mu\text{M}$ , as determined by zonal gel filtration chromatography; dimer dissociation was spectroscopically silent to circular dichroism, but not to fluorescence. Both RD species were disordered below physiological pH, but the acquisition of secondary native-like structure occurs at lower pHs than the attainment of tertiary native- and compactness- like arrangements.

Tyrosine hydroxylase (TyrH) is the enzyme that catalyzes the rate-limiting step in the catecholamine biosynthesis<sup>1,2</sup>. It catalyzes the conversion of tyrosine into 3,4-dihydroxyphenylalanine, which is the precursor for the neurotransmitters norepinephrine, epinephrine and dopamine. Dysregulation of TyrH is associated with bipolar disorder, schizophrenia and hypertension due to the key role played by those neurotransmitters in the autonomous nervous system<sup>3-6</sup>. TyrH belongs to the family of pterin-dependent aromatic amino acid hydroxylases, together with phenylalanine hydroxylase (PheH) and tryptophan hydroxylase<sup>7</sup>. By using O<sub>2</sub> and BH<sub>4</sub> as the other substrates, together with the related amino acid, the three enzymes catalyze the hydroxylation of their corresponding residue<sup>7</sup>.

Rat TyrH is a 498-residue-long polypeptide chain<sup>8</sup>, which forms tetramers through its C terminus<sup>9</sup>. Each monomer is composed of an N-terminal RD (containing ~160-200 amino acids, depending on the species), a catalytic domain (~300 residues) and a C-terminal tetramerization one (~45 amino acids)<sup>10,11</sup>. The NMR solution structure of the RD of TyrH, RDTyrH, shows a largely unfolded N-terminal region (residues 1-71) and a well-folded C-terminal portion (residues 72-159). The C-terminal region, as concluded from the solution structure of the truncated version of the RD containing residues 65-159<sup>12</sup>, is formed by a four-stranded anti-parallel  $\beta$ -sheet ( $\beta$ 1 residues 75-77;  $\beta$ 2 residues 80-84;  $\beta$ 3 residues 110-116; and  $\beta$ 4, residues 131-137) and two  $\alpha$ -helices ( $\alpha$ 1 residues 97-106, and  $\alpha$ 2, residues 139-152) connected by five loops; the helices are parallel with and on one side of the sheet<sup>12</sup> (Fig. 1). This structure is very similar to the crystal one of the RD of PheH<sup>13</sup>. The isolated RDTyrRH in solution is a homodimer, forming an ACT domain dimer<sup>14</sup> composed of an eight-stranded  $\beta$ -sheet with four helices on one side of the sheet; the dimerization interface is composed of  $\beta$ 3-strand and  $\alpha$ 1-helix, burying a small surface area (770 Å<sup>2</sup> for each monomer, which is ~12 % of the total monomer surface area).

In this report, we describe the conformational stabilities of two variants of RDTyrH. With the first one, lacking residues 1-64 (RDTyrH<sub>65-159</sub>), we attempted to study the conformational stability and the structure, at different pHs, of the isolated well-folded region of RDTyrH. With the second species, containing the disordered 64 residues at the N terminus (RDTyrH), we attempted to evaluate the influence, if any, of those residues in the conformational stability and structure of the protein. Our results suggest that the stability of the well-folded region of the RD is very small ( $4.7 \pm 0.8$  kcal mol<sup>-1</sup>, at 25 °C and pH 7.0). The N-terminal residues seem to affect stability of the RD through the solvent-exposure of the accessible surface area (ASA). Thermally-induced denaturations of both

proteins were shown to be irreversible both at pH 4.0 and 7.5 precluding the determination of the thermodynamic parameters of the unfolding reaction, since it is under kinetic control. Both proteins were populating partially folded species at pH < 7.0, with apparent flexible secondary structure and lack of tertiary one, which may involve self-associated molecules. The acquisition of secondary native-like structure occurs at lower pHs than the attainment of tertiary native- and compactness- like scaffolds, populating molten-globule-like species. The RDTyrH species dimerized with a  $K_D$  of 1.6  $\mu\text{M}$ , but the self-association process was spectroscopically silent by CD.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

*Materials:* Ultra-pure urea and GdmCl were from ICN Biomedicals Inc. (USA). Their concentrations were calculated as described<sup>15</sup>. Trizma acid and base, NaCl, the SDS low-molecular protein weight markers (containing bovine serum albumin; ovalbumin from chicken egg; glyceraldehyde-3-phosphatase dehydrogenase from rabbit muscle; carbonic anhydrase from bovine erythrocytes; trypsinogen from bovine pancreas; trypsin inhibitor from soybean;  $\alpha$ -lactalbumin from bovine milk and aprotinin from bovine lung), ultra-pure dioxane and ANS were from Sigma. The low molecular weight marker for gel filtration column (containing ribonuclease A; chymotrypsinogen A; ovalbumin; albumin and blue dextran 2000) was from GE Healthcare (Barcelona, Spain). The  $\beta$ -mercaptoethanol was from BioRad; dialysis tubing with a molecular weight cut-off of 3500 Da was from Spectrapore. Standard suppliers were used for all other chemicals. Water was deionized and purified on a Millipore system.

*Protein expression and purification:* The vectors of both proteins were a kind gift from Prof. Paul F. Fitzpatrick (UTH Health Science Center, San Antonio, Texas, USA). The expressions and purifications of RDTyrH and RDTyrH<sub>65-159</sub> were carried out as described<sup>12</sup>. The only variation in the protocol was the substitution of the mixture of inhibitors 1  $\mu$ M of leupeptin, 1  $\mu$ M pepstatin and 250  $\mu$ g/ml PMSF by a tablet of protease Sigma cocktail during the lysis step. The purities of all protein preparations used were larger than 95 % based on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

*NMR spectroscopy:* The NMR experiments were acquired at 20 °C on a Bruker Avance DRX-500 spectrometer equipped with a triple resonance probe and z-pulse field gradients.

*(a) 1D-NMR experiments-* Homonuclear 1D-NMR experiments were performed with RDTyrH and RDTyrH<sub>65-159</sub> at a concentration of 150  $\mu$ M (in protomer units) in 0.5 ml, in: (i) pH 7.0, 50 mM phosphate buffer; or (ii) pH 4.5 (50 mM deuterated acetic acid) in H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (90 %/10 %, v/v) (uncorrected for deuterium isotope effects). TSP was used as the external chemical shift reference. The 1D-<sup>1</sup>H spectra were acquired with 16 K data points, with 512 scans and a 6000 Hz spectral width (12 ppm), by using the WATERGATE sequence<sup>16</sup>. Baseline correction and zero-filling were applied before processing. All spectra were processed and analysed by using TopSpin 2.1 (Bruker GmbH, Karlsruhe, Germany) working on a PC computer.

(b) *Translational diffusion measurements (DOSY experiments)*- These were performed with the pulsed-gradient spin-echo sequence, by using the same procedures described, elsewhere<sup>17,18</sup>. Further experimental details are provided in the Supplementary Material.

*Size exclusion chromatography (SEC)*: This technique was used to determine the  $R_s$ s of RD<sub>TyrH</sub> and RD<sub>TyrH</sub><sub>65-159</sub><sup>19-21</sup>. Protein concentrations ranged from 50 to 750  $\mu$ M. Experiments were acquired at 20 °C. Samples were loaded in 50 mM of phosphate buffer (pH 7.0), 150 mM NaCl (to avoid interactions with the column) and 2 mM EDTA (to avoid protein degradation) in a calibrated Superdex 75 10/30 HR FPLC column (GE Healthcare). In all chromatograms, the elution volumes were obtained from analyses with the UNICORN software (GE Healthcare). The void volume ( $7.54 \pm 0.06$  ml) was determined from blue dextran, and the bed one ( $18.98 \pm 0.03$  ml) from conductivity measurements. Samples were eluted at 1 ml/min and continuously monitored with an on-line detector at a wavelength of 280 nm.

As the elution volume of RD<sub>TyrH</sub> was protein-concentration-dependent (see Results section), the pH- and urea-denaturation experiments were carried out at 100  $\mu$ M of protein concentration (in protomer units). For RD<sub>TyrH</sub><sub>65-159</sub>, a protein concentration of 100  $\mu$ M (in protomer units) was also used. For the pH-denaturation experiments, the corresponding buffer (see below) was prepared at a final concentration of 50 mM, containing 150 mM NaCl and 2 mM EDTA. Urea-denaturation experiments were carried out at pH 7.0 (50 mM phosphate buffer) with 150 mM NaCl and 2 mM EDTA.

The standards used in column calibration and their corresponding  $R_s$ s were: ribonuclease A (16.4 Å); chymotrypsinogen (20.9 Å); ovoalbumin (30.5 Å); and bovine serum albumin (35.5 Å)<sup>22</sup>. Elution volumes of these were only acquired under native conditions: pH 7.0 (50 mM phosphate buffer) with 150 mM NaCl. Protein concentrations for the standards were in the range 10 to 20  $\mu$ M.

The weight average partition coefficients ( $\sigma$ ) of protein standards and RD species were calculated by:

$$\sigma = \frac{(V_e - V_o)}{V_i}$$
. The  $\sigma$ s were transformed by using the inverse error function complement ( $erfc^{-1}(\sigma)$ ) which

yields <sup>21,22</sup>:  $R_s = a + b(\operatorname{erfc}^{-1}(\sigma))$ , where  $a$  and  $b$  are constants. The inverse error function complement is <sup>23</sup>:

$$\sigma = 1 - \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^u e^{-x^2} dx, \text{ and the function under the integral is the gaussian function of probability.}$$

*Fluorescence*: Spectra were collected at 25 °C on a Cary Varian spectrofluorimeter (Agilent, USA), with a Peltier temperature controller. Sample concentrations were 20 μM (in protomer units) in the pH- and chemical-denaturation experiments for both RD species, and also 30 μM (in protomer units) for RDTyrH. The final concentrations of the buffers were, in all cases, 10 mM. The experiments were prepared the day before and left overnight at 5 °C. Control experiments were also acquired after a two-hour incubation time at room temperature; no differences were observed with those prepared the day before. A 1 cm-pathlength quartz cell (Hellma) was used.

(a) *Intrinsic fluorescence*- Protein samples were excited at 278 nm in the pH range from 2.0-12.0. The rest of the experimental parameters has been described elsewhere<sup>17,24</sup>. Appropriate blank corrections were made in all spectra.

Chemical-denaturations at pH 7.0 (phosphate buffer), either followed by fluorescence or CD, were carried out by dilution of the proper amount of an 8 M urea stock solution. Fluorescence experiments were also acquired in GdmCl (from a stock solution of 7 M). All the denaturations in urea were shown to be reversible by following the  $\langle \lambda \rangle$  (see below) for both proteins at a concentration of 20 μM (in protomer units) (Fig. 1 Supplementary Material).

The pH of each sample was measured after completion of pH-denaturations with an ultra-thin Aldrich electrode in a Radiometer (Copenhagen) pH-meter. The salts and acids used have been described elsewhere<sup>17,20,24</sup>. Reversibility of the pH-denaturations was tested by using 1D-<sup>1</sup>H-NMR experiments. Experiments were acquired at physiological pH for each protein, then the corresponding RD species was exchanged at pH 4.5 by using Amicon-centrifugal devices; spectra were acquired at that pH, and then the proteins were exchanged back at physiological pH by using Amicon-centrifugal devices, and new spectra were acquired and compared with those obtained previously. In both proteins, the spectra acquired were identical (data not shown).

The wavelength averaged emission intensity (also called as the spectrum mass centre),  $\langle\lambda\rangle$ , was calculated

as described<sup>17,25</sup>. Briefly, the wavelength averaged emission intensity,  $\langle\lambda\rangle$ , is:  $\langle\lambda\rangle = \frac{\sum_I^n \lambda_i I_i}{\sum_I^n I_i}$ , where  $I_i$  is the

intensity at wavelength  $\lambda_i$ . From its definition, the parameter is an integral of the value of the fluorescence spectrum, and thus, it allows to obtain information overall the intensities acquired in the spectrum (instead of using a single one, as it is usually done when following denaturations in fluorescence). We shall report  $\langle\lambda\rangle$  in units of  $\mu\text{m}^{-1}$ . Chemical- and pH- denaturations were repeated three times with new samples at any of the concentrations assayed.

*(b) Thermal-denaturations* - These were performed at constant heating rates of 60 °C/h and an average time of 1 s. The “average time” is the “sampling time” of the instrument at each temperature. Ideally, in a thermal scan experiment this time should be much lower than the scan rate of the experiment, to ensure that the temperature is constant during the acquisition of fluorescence emission at a particular temperature (in our conditions, the temperature change during the sampling time (0.017 °C) was negligible). Thermal scans were collected at 308 nm by excitation at 278 nm from 25 to 85 (or 95) °C. The rest of the experimental set was the same as described above. The thermal denaturations for both species were not reversible at any pH.

*(c) Fluorescence quenching* - Quenching either by iodide or acrylamide was examined at different solution conditions. Protein concentrations were 20  $\mu\text{M}$  (in protomer units). Excitation was 278 nm; emission was measured from 300 to 400 nm. In the quenching with KI, ionic strength was kept constant by addition of KCl; also,  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  was added to a final concentration of 0.1 M to avoid formation of  $\text{I}_3^-$ . The presence of KCl did not modify the structure of RDTyrH or RDTyrH<sub>65-159</sub>, based on the absence of changes in the shape and ellipticity of the CD spectra in the presence of KCl (0-1 M) (data not shown). The slit width was set at 5 nm for both excitation and emission. For quenching with KI, the data were fitted to<sup>26</sup>:

$$F_0/F = 1 + K_{sv}[X] \quad (2),$$

where  $K_{sv}$  is the Stern-Volmer constant for collisional quenching;  $F_0$  is fluorescence when no KI is present; and  $F$  is that at any KI concentration. The range of KI concentrations explored was 0-0.7 M. We explored the quenching at pH 4.0 (acetate buffer) and pH 7.0 (Tris buffer). Experiments were also carried out in the presence of 6 M urea at pH 7.0 (10 mM Tris buffer).

For acrylamide quenching, the experimental parameters were the same as with KI. However, the Stern-Volmer equation was modified to include an exponential term to account for dynamic quenching ( $F_0 / F = (1 + K_{sv}[X])e^{(v[X])}$ )<sup>26</sup>, where  $v$  is the dynamic quenching constant. This equation is identical to Eq. (2), when  $v = 0$ .

(d) *ANS binding* - The excitation wavelength was 380 nm, and emission was measured from 400 to 600 nm. Slit widths were 5 nm for excitation and emission lights. ANS stock solutions were prepared in water and diluted to yield a final concentration of 100  $\mu$ M. Blank solutions were subtracted from the corresponding spectra. ANS was used to monitor the pH-denaturation of both proteins and the urea denaturation of RDTyrH<sub>65-159</sub> (at 20  $\mu$ M of protein (in protomer units)). In the pH-denaturation experiments, protein concentrations were 15  $\mu$ M (in protomer units).

*Circular dichroism (CD)*: Circular dichroism spectra were collected on a Jasco J810 (Japan) spectropolarimeter fitted with a thermostated cell holder and interfaced with a Peltier unit. The instrument was periodically calibrated with (+)-10-camphorsulphonic acid. Molar ellipticity was calculated as described previously<sup>21</sup>.

(a) *Far-UV spectra* - Isothermal wavelength spectra of RDTyrH and RDTyrH<sub>65-159</sub> at different pHs or urea concentrations were acquired at a scan speed of 50 nm/min with a response time of 4 s and averaged over six scans at 25 °C, in a 0.1 cm-pathlength cell. Protein concentrations ranged from 20 to 50  $\mu$ M of each protein (in protomer units) in 10 mM buffer. Spectra were corrected by subtracting the baseline in all cases. The chemical- and pH-denaturations were repeated at least three times with new samples. The samples were prepared the day before and left overnight at 5 °C to allow for equilibration.



(b) *Thermal-denaturation experiments*- The experiments were performed at constant heating rates of 60 °C/h and a response time of 8 s. Thermal scans were collected in the far-UV region following the changes in ellipticity at 222 nm from 25 to 80 °C in 0.1 cm-pathlength cells with a total protein concentration of 20 µM (in protomer units). Solution conditions were the same as those reported in the steady-state experiments. No difference was observed between the scans aimed to test drifting of the spectropolarimeter. Thermal-denaturations were not reversible at any pH for any RD protein, as shown by: (i) the comparison of spectra before and after the heating; and, (ii) the changes in the voltage of the instrument<sup>27</sup>.

*Dynamic Light Scattering (DLS)*: DLS measurements were performed with a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd.) using a thermostated 12 µl quartz sample cuvette. Samples of protein were prepared at different concentrations (280, 577 and 800 µM (in protomer units)) in 50 mM acetate buffer at pH 4.0 and in 50 mM Hepes buffer, pH 7.0. All the solutions were filtered; immediately before measurements, protein samples were centrifuged for 30 minutes at 14000 rpm at room temperature to remove any aggregates and dust. Measurements were performed on each sample at 20 °C to determine the  $R_s$ . Data were analyzed using the software developed by Malvern Instruments Ltd. The  $R_s$  and molecular weight were determined from the Stokes-Einstein equation, assuming a spherical shape for both proteins.

It is important to stress here that we used a 50 mM phosphate buffer concentration in SEC, ITC (see below), NMR and DLS measurements, whereas we used a final buffer concentration of 10 mM in the CD and fluorescence experiments. We used a higher concentration of buffer in SEC, ITC (see below), NMR and DLS experiments because of the larger concentration of protein (in protomer units) used. When preparing the quenching experiments, we did not observe any change of the far-UV CD spectrum shape of both proteins when the control experiments were carried out at 0 and 1 M KCl.

*Analysis of the pH-, thermal- and chemical-denaturation curves, and free energy determination*: The pH-denaturations were analysed assuming that both protein species, protonated and deprotonated, contributed to the spectral properties:

$$X = \frac{(X_a + X_b 10^{n(pH-pK_a)})}{(1 + 10^{n(pH-pK_a)})} \quad (3),$$

where  $X$  is the spectral property being observed (ellipticity, fluorescence intensity or  $\langle \lambda \rangle$ );  $X_a$  is that for the acidic species;  $X_b$  is that observed at high pHs;  $pK_a$  is the apparent midpoint of the titrating group; and  $n$  is the Hill coefficient (which was close to 1 in all the curves reported in this work). The apparent  $pK_a$  reported (from intrinsic or ANS fluorescence and CD) was obtained from three different measurements in each technique, prepared with new samples.

The thermal- and chemical- denaturation data for monomeric species were fitted to the two-state equation:

$$X = \frac{(X_N + X_D e^{(-\Delta G/RT)})}{(1 + e^{(-\Delta G/RT)})} \quad (4),$$

where  $R$  is the gas constant,  $\Delta G$  is the denaturation free energy and  $T$  is the temperature in K. The  $X_N$  and  $X_D$  correspond to the physical property of the native and denatured protein, respectively, being monitored. Both parameters showed a linear relationship with the temperature or the denaturant concentration.

Chemical-denaturation curves for RDTyrH<sub>65-159</sub> were analysed according to the linear extrapolation model, in which the free energy is given by  $\Delta G = m([D]_{1/2} - [D])^{15}$ , where  $[D]$  is the denaturant concentration,  $[D]_{1/2}$  is that at the midpoint of the transition and  $m$  is the slope of the curve.

The above equations must be modified (by the introduction of a concentration-dependent term)<sup>28-30</sup> if dissociation of a self-associated species is explored. Since in our measurements of RDTyrH<sub>65-159</sub>, no dissociation of dimeric species was observed (as we did not observe a protein concentration-dependence in the spectroscopic signals, see Results section), we used the equations above described without any concentration-dependent term. However, we did observe a concentration-dependence in the fluorescence signal of RDTyrH, and then, in a dimeric equilibrium (see Results section). The thermal- and chemical- denaturation data for a dimeric species were fitted to the two-state equation<sup>29,30</sup>:

$$X = X_N - \left\{ (X_N - X_D) e^{(-\Delta G/RT)} \frac{\left[ \left( 1 + \left( \frac{8C_t}{e^{(-\Delta G/RT)}} \right) \right)^{1/2} - 1 \right]}{4C_t} \right\} \quad (5),$$

---

where the  $\Delta G$  in chemical-denaturations would be given by:  $\Delta G = m([D]_{1/2} - [D]) - RT \ln(C_t)$ , where  $C_t$  is the total protein monomer concentration.

It is important to indicate here that the use in fluorescence of the  $\langle \lambda \rangle$  (an intensive variable)<sup>30</sup> or the emission intensity (an extensive variable) at 308 nm yielded the same chemical-denaturation thermodynamic parameters for both proteins, and both will be used in the Results section.

Fitting by non-linear least-squares analysis to Eqs. (4) and (5) was carried out by using the Kaleidagraph (Abelbeck software) working on a PC computer.

*Isothermal titration calorimetry (ITC):* The ITC experiments were carried out by using an VP-ITC instrument (Microcal, Northhamptom, USA). Before the calorimetric experiments, the proteins were concentrated and dialysed at 4 °C against 50 mM Tris, 400 mM NaCl (pH 7.5). Dilution ITC experiments involved sequential injections of microliter amounts (20  $\mu$ l) of a stock of concentrated protein (ranging from 300 to 700  $\mu$ M) into the calorimetric cell (1.4 ml); the cell initially contained isolated buffer.

*Differential scanning calorimetry (DSC):* DSC experiments were carried out with a VP-DSC calorimeter (MicroCal, Northampton, MA). Protein solutions were prepared by exhaustive dialysis against 50 mM Tris, 400 mM NaCl (pH 7.5) at 5 °C. Experiments were acquired and processed as previously described<sup>17,19</sup>. Further experimental details are provided in the Supplementary Material.

## RESULTS

### *The RDYrH<sub>65-159</sub> is a monomeric species at physiological pH and low concentrations*

To map the hydrodynamic properties of both species we used three complementary hydrodynamic techniques: SEC, DLS and DOSY NMR measurements. Furthermore, we tried to measure the self-association reaction of both proteins by ITC. All the reported values were obtained at 20 °C.

(a) *RDYrH<sub>65-159</sub>* - The DOSY-NMR measurements provide the translational diffusion coefficient ( $D$ ) at the concentrations used (Table 1). The values are similar, within the error: the smaller error at the highest concentration was due to the better signal-to-noise ratio of the spectra, since it is unlikely that at 43  $\mu\text{M}$  the fragment showed a higher tendency to aggregate than at 330  $\mu\text{M}$ . The average value from both measurements was  $(8.2 \pm 0.5) \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ . By taking into account the  $R_s$  of dioxane, and its  $D$  under our conditions ( $(6.8 \pm 0.2) \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ ), the obtained  $R_s$  for the protein is  $16 \pm 2 \text{ \AA}$ .

The DLS measurements were carried out at three concentrations: 277 (Fig. 2 A), 554  $\mu\text{M}$  (Fig. 2 A Supplementary Material) and 800  $\mu\text{M}$  (Fig. 2 B Supplementary Material) (all concentrations in protomer units); the obtained  $R_s$  values were virtually the same at the three concentrations:  $26 \pm 3$ , and the estimated molecular weight was 12 kDa, assuming a spherical shape (by using the Stokes-Einstein equation). However, it must be kept in mind that the DLS peak was somewhat broad (Fig. 2 A), and this broadness increased at 800  $\mu\text{M}$  (Fig. 2 Supplementary Material), suggesting, probably, the presence of self-associated species at this high concentration (as it has been observed in the dimeric NMR solution structure<sup>12</sup>). A measurement of this broadness is given by the poly-dispersity of the peak: at 277  $\mu\text{M}$  was 9.4 %; at 554  $\mu\text{M}$  was 11 % and 24 % at 800  $\mu\text{M}$ .

SEC measurements in the range of concentrations of 70 to 540  $\mu\text{M}$  yielded elution volumes of  $12.14 \pm 0.06$  (the average of three measurements) to  $12.07 \pm 0.04 \text{ ml}$  (Table 1 and Fig. 3 Supplementary Material); therefore, we can conclude that in this concentration range, the oligomerization state of the protein does not change. The calculated  $R_s$  from these data was  $21 \pm 2 \text{ \AA}$ <sup>20,22,23</sup>. It is important to note that if we use the proposed linear relationship between the molecular weight and  $\sigma$  of the protein<sup>31</sup>, then the apparent molecular weight should be similar to that of chymotrypsin (eluting at  $12.33 \pm 0.06 \text{ ml}$ ) (second arrow from the right in Fig. 3 A Supplementary Material). We did not use this relationship, instead of that between the  $R_s$  and  $\sigma$  (see Experimental procedures

section), since in our column (Superdex 75 HR10; GE Healthcare) the linear relationship with the molecular weight and  $\sigma$  is worse than that with the  $R_s$  (regression coefficient of 0.95 versus 0.99).

We also tried to see if the protein dissociated upon dilution using the heat evolved in the reaction as a probe monitored by ITC. No significant heat evolved upon dilution of the concentrated protein solution (ranging from 300 to 700  $\mu\text{M}$ ) into the calorimetric cell containing buffer (Fig. 4 Supplementary Material). These data suggest that either no self-association was happening or that its dissociation constant is well below the minimum concentration of the diluted protein used in the calorimetric cell (being the oligomeric form of the protein the major fraction both in the syringe and in the cell). Based on the experimental (DLS, DOSY and SEC results) and theoretical evidence (see next paragraph), we favour the first explanation.

We can further elaborate on the expected theoretical value of the  $R_s$  for a protein of the size of RDTyrH<sub>65-159</sub>. The  $R_s$  value for an ideal un-solvated spherical molecule can be theoretically calculated by considering that the anhydrous molecular volume,  $M\bar{V}/N$ , equals the volume of a sphere<sup>31,32</sup> of radius  $R$ :  $R = \sqrt[3]{3M\bar{V}/4N\pi}$ , where  $M$  is the molecular mass of the protein,  $\bar{V}$  is its partial specific volume, and  $N$  is the Avogadro's number. The molecular mass of the monomeric RDTyrH<sub>65-159</sub> is 10470.8 Da, and  $\bar{V} = 0.72 \text{ cm}^3/\text{g}$  as calculated from amino acid composition<sup>32</sup>. Then, the calculated  $R_s$  is 14.4 Å, but since, the hydration shell is 3.2 Å wide<sup>33</sup>, the hydration radius would be around 17.6 Å, which is similar to that obtained from DOSYs ( $16 \pm 2$  Å) and smaller than that of DLS. In addition, it has been shown that the  $R_s$  of a folded spherical protein can be approximated by<sup>18</sup>:  $R_s = (4.75 \pm 1.11)N^{0.29}$ , where  $N$  is the number of residues of the protein; in a 95-residue-long RDTyrH<sub>65-159</sub>, this expression yields  $18 \pm 4$  Å, also similar to that determined by DOSYs. Finally, it is interesting to calculate the expected theoretical correlation time,  $\tau_c$ , of the molecule, from the experimental measurements of  $D$ , according to<sup>34</sup>:  $\tau_c = (2/9)(R_h^{ref} D^{ref})^2 / D^3$  (where  $D_{ref}$  is the measured  $D$  for the dioxane, and  $R_h^{ref}$  is its  $R_s$ ) and to compare that figure with the one determined experimentally<sup>12</sup> for the dimeric RDTyrH<sub>65-159</sub> ( $11.90 \pm 0.02$  ns). The calculated  $\tau_c$  from the experimentally determined  $D$  was 9.02 ns, smaller, as it could be expected, than that corresponding to the dimeric protein. Moreover, for a protein, the theoretically predicted  $\tau_c$  is given by

$\tau_c = (9.18 \times 10^{-3} / T) \exp(2416 / T) N^{0.93}$ <sup>35</sup>; in a 95-residue long this yields a value 8.5 ns at 20 °C; for a 190-residue long protein this number is 15.7 ns at the same temperature.

To sum up, the three hydrodynamic techniques and the ITC data suggest that under our conditions, RDTyrH<sub>65-159</sub> remained basically monomeric, and probably, with an elongated shape.

(b) *RDTyrH*- At a concentration of 150 μM the *D* was  $(5.42 \pm 0.05) \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ , which was, as expected (due to the larger number of residues), smaller than that of RDTyrH<sub>65-159</sub>. This yields a *R<sub>s</sub>* of  $26 \pm 2 \text{ \AA}$  (Table 1).

The DLS measurements yielded a *R<sub>s</sub>* of  $48 \pm 7 \text{ \AA}$ , which resulted in an estimated molecular weight of 34.7 kDa for a spherical molecule, twice the molecular weight of RDTyrH (17043.74 Da) (Fig. 2 B). The peak was also broader (larger polydispersity) than that observed for the shorter species (Fig. 2 A). These results suggest that the dominant species of RDTyrH is dimeric, and it supports the use of the monomer/dimer equilibrium in the gel filtration calculations (see below).

The SEC experiments showed a sigmoidal-like variation in the elution volumes from 9.76 (at 58 μM) to 9.66 ml (to 800 μM) (Fig. 2 C, inset); we could not explore smaller concentrations due to the poor absorbance of the protein (since it only contains a single Tyr). The fairly constant elution volume at the larger concentrations yields a *R<sub>s</sub>* of  $34 \pm 2 \text{ \AA}$  (Fig. 3 B Supplementary Material), further supporting that the protein at these conditions is not a monomer. Interestingly enough, some of the chromatograms showed also the presence of a minor peak at the void volume ( $7.54 \pm 0.06 \text{ ml}$ ), suggesting the presence of aggregated species (Fig. 3 B Supplementary Material). These results are in disagreement to what we observed in RDTyrH<sub>65-159</sub>, where no species were present at the void volume of the column (Fig. 3 A Supplementary Material).

We attempted to fit the sigmoidal-like behaviour of the elution volume of RDTyrH (Fig. 2 C inset) to the Ackers' equations<sup>19,20,22</sup> assuming a monomer/dimer equilibrium:

$$\sigma = \sigma_m \left( \frac{-1 + \sqrt{1 + 8(1/K_D)C_t}}{4(1/K_D)C_t} \right) + \sigma_d \left( 1 - \left( \frac{-1 + \sqrt{1 + 8(1/K_D)C_t}}{4(1/K_D)C_t} \right) \right) \quad (6),$$

where the  $\sigma_m$  and  $\sigma_d$  are the weight average partition coefficients of the monomer and dimer, respectively;  $C_t$  is the concentration of RDTyrH (in monomer units); and  $K_D$  is the dissociation constant for the equilibrium: RDTyrH<sub>2</sub>  $\leftrightarrow$  RDTyrH + RDTyrH. From Eq. (6), we obtained a value of  $K_D$  of 1.6 μM; the  $\sigma_d$  was 0.18 and the  $\sigma_m$  was 0.61, the

latter with a large uncertainty. It is important to keep in mind the uncertainties of the  $\sigma_m$  and  $K_D$  values, since they were obtained from a long extrapolation (Fig. 2 C inset). Thus, we shall assume that the  $K_D$  is a low limit of the dissociation constant; but it is important to note the small value of  $K_D$  supports previous analytical ultracentrifugation data where at concentrations of 5  $\mu\text{M}$  of RDTyrH, a dimeric population was observed<sup>12</sup>.

For this species, we also tried to see if the protein dissociated upon dilution, using the heat evolved in the reaction monitored by ITC as a probe. For experiments performed at both at 390 and 570  $\mu\text{M}$ , the heat released upon dilution of the protein into the calorimetric cell was very small and only consistent with a dissociation reaction for the first injections when the concentration in the calorimetric cell was in the low micromolar range (Fig. 4 Supplementary Material). The amount of heat released for the first two injections (while the concentration in the cell remained below 10  $\mu\text{M}$ ) may reflect the dissociation of the dimeric species that rapidly tends to the normal dilution level as the total concentration in the cell exceeds the level. Unfortunately, due the sensitivity limitations of the technique, we were unable to perform ITC experiments using a more diluted protein solution in the syringe. These results may be consistent with the dilution of a dimeric species with a dissociation constant in the low micromolar range (1-2  $\mu\text{M}$ ). Under these conditions, the dimerization equilibrium is only effectively displaced when the final protein concentration (in the cell) is very low (below 10  $\mu\text{M}$ ) and the population of the dimer remains virtually unaffected when its initial concentration in the syringe (390-540  $\mu\text{M}$ ) changes to reach concentrations well above the value of its dissociation constant,  $K_D$ .

#### *Both RD species acquired a native-like structure in a narrow pH range*

If we want to measure the conformational stability of the RDTyrH and the importance of the disordered tail, we must firstly determine in which pH range the proteins acquired a native-like structure. To that end, we used several spectroscopic and biophysical probes, namely, intrinsic fluorescence, ANS fluorescence, CD, NMR, DLS and SEC. The whole set of techniques gives complementary information on different structural features of the polypeptide chain. We used intrinsic fluorescence to monitor changes in the tertiary structure of the protein, around its single tyrosine residue (Fig. 1). We used ANS fluorescence to monitor the burial of solvent-exposed hydrophobic patches (and to detect the presence of possible partially folded species<sup>36</sup>). We carried out far-UV CD experiments to monitor the changes in secondary structure. We used NMR to elucidate whether there was

evidence of residual structure at selected pHs and to measure their corresponding  $R_{\text{S}}$ s. We used DLS at pH 4.5 to determine the size of the species present (and thus, to support the NMR results). And finally, we used SEC to determine the compactness.

*Fluorescence:*

(1) *Steady-state fluorescence and thermal denaturations*- The fluorescence spectra of both species showed a maximum at 308 nm, due to the single Tyr131. The spectrum of RDTyrH has been reported before<sup>11</sup> and it is identical to that of the truncated version. The  $\langle\lambda\rangle$  (Fig. 3 A, filled circles) and the fluorescence intensity at 308 nm (data not shown) of RDTyrH<sub>65-159</sub> showed two transitions. The first occurred with a  $\text{p}K_{\text{a}} = 5.8 \pm 0.3$ , and the second at basic pHs, probably due to the titration of the phenolic group of tyrosine; in this transition, no basic baseline was observed. On the other hand, RDTyrH also showed the same two titrations with a  $\text{p}K_{\text{a}} = 5.9 \pm 0.2$  of the first one similar to that of the shorter species (Fig. 3 A, blank circles).

Thermal-denaturations at several pHs (4.5, 7.0 and 8.6) were carried out by following the changes in the intrinsic fluorescence for RDTyrH<sub>65-159</sub>. At pH 7.0 and above, we observed an irreversible sigmoidal behaviour. Thermal-denaturations followed by fluorescence of RDTyrH at the same pHs showed also an irreversible sigmoidal behaviour at pH > 6.8.

(2) *ANS-binding*- At low pH, the ANS fluorescence intensity at 480 nm was larger for both RD species and decreased as the pH was raised (Fig. 3 B), suggesting that at low pHs both proteins had solvent-exposed hydrophobic regions. The intensity at 480 nm showed a sigmoidal-like behaviour, but we could not determine its  $\text{p}K_{\text{a}}$  due to the absence of acidic baseline. On the other hand, the  $\langle\lambda\rangle$  of the fluorescence spectra of both proteins showed a  $\text{p}K_{\text{a}}$  of  $5.4 \pm 0.3$  (data not shown), which is similar, within the error, to that determined by intrinsic fluorescence (Fig. 3 A).

(3) *Examination of tyrosine exposure by fluorescence quenching*- To further examine the tertiary structure around Tyr131 and its solvent-exposure, we studied iodide and acrylamide quenching in the presence and in the absence of denaturants (Table 2). In general, the  $K_{\text{sv}}$  parameters were identical for both proteins, suggesting that the environment around the sole Tyr131 was not modified by the presence of the N-terminal region. The values were also similar at any of the explored pHs, suggesting that the solvent-accessibility of Tyr131 was similar. Furthermore, the  $K_{\text{sv}}$  values at physiological and low pHs were larger in acrylamide than in KI, as observed in other



proteins<sup>19,21</sup>. The  $K_{sv}$  increased in the presence of urea at physiological pH when compared to that at physiological conditions in the absence of denaturant (Table 2). Taken together, these results indicate that Tyr131 was solvent-exposed (as suggested from the structure<sup>12</sup>), but it was not fully accessible at physiological pH.

*Circular dichroism:* We only carried out measurements in the far-UV CD, since the near-UV CD spectra of both species was lacking as previously reported<sup>11</sup>, due to the small amount of aromatic residues and the absence of an asymmetric environment for most of them.

The CD spectrum of RDTyrH at pH 7.0 has been described previously<sup>11</sup>, with minima at 208 and 222 nm, suggesting the presence of  $\alpha$ -helix conformations. The CD spectrum of RDTyrH<sub>65-159</sub> (Fig. 3 C inset) shows the same general shape at any pH as that of RD spectra, but with a slightly more intense minimum at 217 nm, suggesting the presence of a higher percentage of  $\beta$ -sheet (due to the removal of the N-terminal region). The shape of the spectra for both proteins did not change substantially as the pH was varied, but the spectra were more intense (in absolute value) at acidic pHs in both proteins. These results suggest that the proteins had more structure at those lower pHs (Fig. 3 C inset), when there are some solvent-exposed hydrophobic patches, as shown by ANS experiments (Fig. 3 B). The change in ellipticity with the pH followed a sigmoidal change with a  $pK_a$  of  $4.75 \pm 0.09$ , for RDTyrH<sub>65-159</sub>, and  $4.5 \pm 0.2$  for RDTyrH (Fig. 3 C); these values are smaller than those measured by fluorescence.

We also carried out thermal-denaturations at the same pHs used in fluorescence (4.5, 7.0 and 8.6) in RDTyrH<sub>65-159</sub>. At pH 7.0 and above, we observed a sigmoidal behaviour but the transitions were irreversible at any of the concentrations explored (from 15 to 50  $\mu$ M of protein (in protomer units)). We also carried out DSC measurements of RDTyrH<sub>65-159</sub> at pH 7.5 and the denaturations were always strongly irreversible (data not shown), causing massive precipitation.

Thermal-denaturations followed by CD in RDTyrH at the same pHs as the other species were also irreversible. We also carried out DSC measurements at pH 7.5, and the denaturations were always strongly irreversible (data not shown), causing massive precipitation. Since the thermal- denaturations were always irreversible, we cannot further elaborate on the thermal stability of both proteins.

*SEC experiments:* For both RDs, at pH < 6.0, the protein did elute from the column at volumes larger than the bed volume (18.98 ml) (Fig. 3 D). These results suggest that both proteins, even though NaCl was present, were bound to the column at those pHs. We know from the experiments with ANS that at low pHs the proteins were

partially folded (see above), with solvent-exposed hydrophobic patches. We hypothesize that those partially unfolded, solvent-exposed and highly hydrophobic regions can interact with the column, resulting in larger elution volumes from the column (Fig. 3 B). At  $6.0 < \text{pH} < 7.0$ , the elution volume was decreasing until a constant volume (of 9.68 ml for RDTyrH and 12.26 ml for RDTyrH<sub>65-159</sub>) was reached. Therefore, the protein did not reach a native-like compactness until physiological pH.

*NMR experiments:* As it can be expected from its well-folded structure<sup>12</sup>, the 1D-<sup>1</sup>H-NMR spectra of both RD species at pH 7.0 had a large dispersion of signals in the aromatic and methyl regions (Fig. 4 and Fig. 5 Supplementary Material). On the other hand, the 1D-<sup>1</sup>H-NMR spectra of RDTyrH<sub>65-159</sub> and RDTyrH at pH 4.5 did not show chemical shift dispersion in the amide and the aromatic, nor in the methyl regions (Fig. 4 A) - we chose this pH because is well-inside the region where the proteins had not acquired a native-like conformation, as concluded from the fluorescence and CD experiments (Fig. 3). All the resonances were clustered together as expected for random-coil proteins<sup>37</sup>, namely, between 7.8 and 8.5 ppm (for the amide signals), between 6.8 and 7.5 ppm (for the aromatic signals) (Fig. 4), and between 0.8 and 1.1 ppm (for the methyl protons) (Fig. 5 Supplementary Material). These results indicate that there was no stable tertiary structure in any of the RD species at the low pH, but we cannot rule out the presence of non-stable, local secondary structure, as suggested by the higher intensity (in absolute value) at 222 nm in CD experiments (Fig. 3 C, inset).

We also carried out DOSY measurements at pH 4.5 for both species. For RDTyrH the  $D$  was  $(4.38 \pm 0.07) \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ , which was smaller than that measured at physiological pH  $((5.42 \pm 0.05) \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1})$ . On the other hand, the  $D$  of RDTyrH<sub>65-159</sub> was  $(7.4 \pm 0.3) \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ , which was slightly smaller than that measured at pH 7.0  $((8.2 \pm 0.5) \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1})$ . These results suggest that both proteins had a larger size at acidic pH than at physiological one: this larger size could be due to the presence of oligomeric species, or alternatively, to elongated (partially folded) populations.

*DLS experiments:* At pH 4.5, the RDTyrH<sub>65-159</sub> had a  $R_s$  of  $37 \pm 8 \text{ \AA}$ , larger than the value measured at pH 7.0 ( $26 \pm 2 \text{ \AA}$ ) and the peak had a larger poly-dispersity (Fig. 2 A, continuous line); this result yields an estimated molecular weight of 21.8 kDa for a spherical species. We observed a similar behaviour at the two other protein concentrations of RDTyrH<sub>65-159</sub> assayed (554 and 800  $\mu\text{M}$ ) (Table 1 and Fig 2 Supplementary Material). Therefore, the protein could be aggregated (forming a dimer) or alternatively, the protein could have an elongated shape.

The expected theoretical  $R_s$  for a 95-residue-long unfolded protein<sup>18</sup> ( $R_s = (2.21 \pm 1.07)N^{0.57 \pm 0.02}$ ) is  $29 \pm 2$  Å, within the error of the value determined by DLS; however, the  $R_s$  for a well-folded ( $R_s = (4.75 \pm 1.11)N^{0.29}$ ) tetrameric protein of that polypeptide length was  $27 \pm 2$  Å, also similar to that value. Since, the 1D-<sup>1</sup>H-NMR spectra suggest that the protein was unfolded (Fig. 4, left side), we favour that at low pH, the RD TyrH<sub>65-159</sub> was unfolded, but we cannot rule out the presence of oligomeric species.

The RD TyrH at pH 4.5 had a  $R_s$  of  $77 \pm 12$  Å, with an estimated molecular weight of 80.9 kDa, suggesting that at low pH the protein strongly aggregated; the presence of this aggregated form could explain the smaller value of  $D$  obtained in the DOSY experiments ( $(4.38 \pm 0.07) \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ ). For an unfolded, monomeric 158-residue-long protein, the obtained  $R_s$  is  $40 \pm 18$  Å, further suggesting that RD TyrH at this pH was not monomeric.

To sum up, we can conclude that both RD species acquired a native-like tertiary structure and compactness near pH 7.0; however, secondary structure was acquired at acidic pHs. This earlier acquisition of secondary structure was not associated to the presence of the first 64 residues. However, we do not know whether the secondary-structure is native-like.

#### *The RD TyrH<sub>65-159</sub> species had a smaller conformational stability*

Since thermal-denaturations were irreversible, we carried out urea-denaturations to measure the conformational stability of both proteins by intrinsic fluorescence, CD and SEC. In both proteins, urea-denaturations were reversible (Fig. 1 Supplementary Material). We used urea as denaturant because the fluorescence experiments with RD TyrH<sub>65-159</sub> in the presence of GdmCl, yielded a short native baseline, thus causing a large slope ( $m$ -value) in the denaturation curves of RD TyrH<sub>65-159</sub> (Table 3).

(a) RD TyrH<sub>65-159</sub> - Experiments carried out by fluorescence and CD at different protein concentrations had the same  $[\text{urea}]_{1/2}$ , showing the absence of concentration-dependence of this parameter; furthermore, the  $[\text{urea}]_{1/2}$  was the same in both techniques (Fig 6 Supplementary Material). However, the  $m$ -value (the slope of the transition) was slightly smaller in the CD experiments (and thus, the transition was more cooperative) than in the fluorescence ones (Table 3 and Fig. 5 A). The denaturation curves were fitted to the two-state model for an unimolecular transition. Urea-denaturations followed by the ANS fluorescence did not show any sigmoidal behaviour (data not shown). In addition, the SEC experiments resulted in a slope-decreasing line as the urea

concentration increased (Fig. 5 B, blank circles), but at 2.5 M urea, the peak eluted at elution volumes larger than the bed volume of the column, due probably to interactions with the column. At urea concentrations larger than the  $[\text{urea}]_{1/2}$  (as determined by fluorescence and CD:  $\sim 2.5\text{-}2.8$  M) the protein again started eluting at elution volumes smaller than the bed volume, although they were smaller than the one at 0 M urea, due to the fact that the protein has a more expanded Stokes radius (as it is unfolded). These results suggest that RDTyrH<sub>65-159</sub> did not unfold through a two-state mechanism, despite its small size. We tried to fit the experimental data to a global (for all experiments in the two techniques) three-state process<sup>38</sup>, but we did not obtain a large improvement in the  $\chi^2$  of the fitting, when compared to the two-state simplest model.

(b) *RDTyrH* - Experiments carried out by fluorescence showed a clear concentration-dependence and then, as we did only observe a single sigmoidal transition (Fig. 6 A, Supplementary Material) (Table 2), we fitted the denaturation curves to a two-state bimolecular process (that is, dimer dissociation and unfolding of the resulting monomers occur concomitantly, in an all-or-none process) (Eq. (5), see Experimental procedures section)<sup>28-30</sup>. On the other hand, the CD denaturation curves were concentration-independent (Fig. 6 B, Supplementary Material) (Table 2), showing similar  $m$ - and  $[\text{urea}]_{1/2}$ - values. The exception was the denaturation curve obtained at the highest concentration (55  $\mu\text{M}$  in protomer units), which had a slightly smaller  $m$ -value than those at the lower protein concentrations (although they are similar within the error); we think that the reason behind that smaller  $m$ -value was the absence of enough data points at the unfolding baseline. Moreover, it can be observed that the CD-denaturation curves at the higher concentrations (30 and 55  $\mu\text{M}$  in protomer units) had a larger slope in the native baselines (Fig. 6 B, Supplementary Material), which could also affect the determination of the  $m$ -value. As can be observed, either in fluorescence or CD, the  $m$ -values obtained in RDTyrH are larger than those measured in RDTyrH<sub>65-159</sub> (Table 3), suggesting that the denaturation curves of the larger species involved more than an unfolding step (see Discussion section).

The free-energies from fluorescence (and thus comprising dimer dissociation and monomer unfolding) of RDTyrH are in the range of  $12 \text{ kcal mol}^{-1}$ , similar to those measured in the dissociation and monomer unfolding of other dimeric proteins (Table 3 in the work of Meiering and co-workers<sup>29</sup>). Conversely, the uni-molecular process being monitored by CD has a free energy larger than that of the monomer RDTyrH<sub>65-159</sub> species (Table 3). Attempts

to measure the compactness of the protein through gel-filtration were also negative since there was a decreasing line in the elution volumes as [urea] increased (Fig. 5 B, filled circles), due to the increase in the Stokes radius because the protein is unfolded (as it happened in the RDTyrH<sub>65-159</sub> species, see above). The SEC results suggest that the dissociation-and-unfolding reaction of RDTyrH was not a two-state process.

## DISCUSSION

*pH-denaturation of RD species*

Only at pH  $\sim 7.0$ , the RD species acquired its native-like conformation, and did so in two steps. First it acquired secondary structure and later it acquired a native-like tertiary structure and compactness (as it buried all the solvent-exposed hydrophobic residues) (Figs. 3 and 4). Thus, there are some pHs where the protein has acquired secondary structure, but it has not attained a tertiary one; that is, it seems that both RD species populate at low pH a molten-globule like species<sup>36</sup>. These results suggest that: (i) compactness had a direct relationship with burial of solvent-exposed hydrophobic patches in RD species; and, (ii) the late acquisition of native-like compactness was not related to the presence of the disordered N-terminal residues, since both species showed a similar behaviour. At low pH, where there is evidence of secondary structure, the RDTyrH seems to populate oligomeric molten-globule like species, with non-cooperative thermal transitions<sup>36,39</sup>, but we cannot unambiguously conclude that RDTyrH<sub>65-159</sub> populated also self-associated species (although the species populated by RDTyrH<sub>65-159</sub> showed molten-globule-like features as well). These species (either oligomeric or not) in both RD proteins appear to be disordered from NMR results (Fig. 4, and Fig. 5, Supplementary Material), but the CD experiments (Fig. 3 B) suggest unambiguously the presence of more helicity (higher ellipticity) than in the native state. These differences between both techniques (showing the CD spectra more ordered helix-like structure than the NMR ones) have been reported in highly flexible proteins<sup>40,41</sup>. At this stage, however, we do not know whether that secondary structure is native-like.

Since we know the structure of the dimeric RD species<sup>12</sup>, we can try to figure out which are (or is) the residue(s) responsible for the acquisition of, first, secondary structure and later for the acquisition of native-like tertiary structure and compactness, by using Propka<sup>42</sup> ([http://nbc-222.ucsd.edu/pdb2pqr\\_2.0.0](http://nbc-222.ucsd.edu/pdb2pqr_2.0.0)). However, it is important to keep in mind the predictive character of such calculations. From the predictions, the acquisition of secondary structure (occurring at a  $pK_a$  of  $4.5 \pm 0.2$ ) is mainly associated with several acidic residues, namely Asp141, Asp155, Glu70, Glu75, Glu76, Glu115, Glu130 and Glu136. On the other hand, the only predicted residue in the dimeric species with a  $pK_a$  (5.7) close to that obtained from fluorescence (intrinsic and ANS) measurements is His112 (close to the dimerization interface<sup>12</sup>). Conversely, in the monomer of RD species, the sole residue whose

$pK_a$  was close to the measured value (5.7) was Glu105. If RD TyrH<sub>65-159</sub> populated an oligomeric species at low pHs with a native-like quaternary arrangement, we could speculate that the residue implicated in the acquisition of secondary native-like structure was His112 (which is probably involved in such acquisition in RD TyrH, since it formed oligomeric species at low pH). However, since we do not have any unambiguous evidence of oligomeric species in the RD TyrH<sub>65-159</sub> at low pH, we suggest that Glu105 might be involved in the acquisition of the secondary structure.

#### *Stability of the monomeric species of RD TyrH*

The conformational free energy of monomeric RD species (evaluated as the average free energy change upon unfolding,  $\Delta G$ , at 25 °C and pH 7.0) amounts  $\sim 4.7$  kcal mol<sup>-1</sup>, which is below those determined for most proteins (by 5-13 kcal mol<sup>-1</sup>)<sup>29,38,43,44</sup>. Since we know the structure of the dimeric species of RD TyrH<sub>65-159</sub>, we can calculate the theoretically predicted value of the  $m$ -slope from the chemical-denaturation curves<sup>46</sup>, assuming that there was no any structural rearrangement upon dimerization (see below), and calculating the ASA of the monomer with VADAR<sup>47</sup>. We obtained values of  $1.5 \pm 0.3$  kcal mol<sup>-1</sup> M<sup>-1</sup> (for the urea-denaturations), and  $3.0 \pm 0.2$  kcal mol<sup>-1</sup> M<sup>-1</sup> (for the GdmCl-denaturations). Both theoretical values are smaller than those experimentally obtained (Table 1), suggesting that there are variations in the amount of ASA exposed upon unfolding, with those predicted. However, it is important to indicate that such value is within the range of those observed for monomeric species<sup>29,38</sup>. The experimental  $m$ -values of the unimolecular denaturation far-UV CD curves of RD TyrH were larger than those of the shorter species (Table 3). This higher value is within the range observed for some dimeric proteins<sup>29,38</sup>, and we think, is responsible for the greater conformational stability (7 *versus* 5 kcal mol<sup>-1</sup>) (Table 3). Furthermore, this larger value of the free energy must be due to the presence of the disordered sixty-five N-terminal residues. If, we assume that: (i) we can calculate the additional stabilization of the dimer by the ASA buried (770 Å<sup>2</sup> per monomer<sup>12</sup>); and, (ii) we can apply the same equations to this surface<sup>47</sup> (interface), we obtain that the  $m$ -value for the dissociation (“unfolding” of the dimer) of this interface would be:  $2 \times 0.4587 = 0.9174$  kcal mol<sup>-1</sup> M<sup>-1</sup>. Then, this value should be added to the  $1.5$  kcal mol<sup>-1</sup> M<sup>-1</sup>, previously obtained for the monomeric species of RD TyrH<sub>65-159</sub>, which yields  $2.4$  kcal mol<sup>-1</sup> M<sup>-1</sup>; this value is similar to the  $m$ -value measured for the dimeric RD TyrH

(Table 3), even under the rough assumptions used. We suggest that although the far-UV CD was spectroscopically silent to dimer dissociation, it might report, through the variations in the  $m$ -value, about such bi-molecular process.

The fact that CD does not report on dissociation is difficult to explain. The simplest explanation is to assume that upon dissociation both isolated monomers of RD species have the same structure as that when forming part of the dimer; that is, dissociation (or alternatively, association to form the dimer) does not induce any large conformational rearrangement in any of the monomers, and therefore, association would be a perfect lock-and-key process. We observed in the CD denaturation curves at the higher explored concentrations of RDTyrH a large slope in the native baseline (Fig. 6 B Supplementary Material). It could be argued that this slope is reporting on dissociation of the dimer (and that is why the longest slopes are only observed at the highest concentrations of protein, where the dimer is more populated); however, the findings that: (i) the  $m$ -values for the transitions at the highest concentrations are similar to that at the lower concentrations (Table 3); and, (ii) these  $m$ -values are consistent with a dimer dissociation and unfolding<sup>29</sup> suggest that the native-baseline slope is associated with changes in the structure of the dimer, which do not involve dissociation.

Keeping in mind the limitations in calculation of the dissociation constant of RDTyrH (Fig. 2 C), the free energy of dissociation, obtained from the value of  $K_D$  (which accounts for  $-RT\ln(K_D) = 7.8 \text{ kcal mol}^{-1}$  (at 1 M standard concentration)) plus the conformational free energy of the monomer (Table 3;  $4.7 \text{ kcal mol}^{-1}$ ) should be  $12.5 \text{ kcal mol}^{-1}$  (at 1 M standard state). This value is similar to that measured for the dissociation and unfolding of the dimeric species measured by fluorescence (Table 3), and then, we conclude that the tertiary interactions that may be established within each monomer only upon dimerization, are very weak. That is, the structure of each isolated monomer of RD species is similar to that in the formed dimer, as it has been hypothesized above, based on the absence of changes in CD upon dimer dissociation.

#### *Self-association of RD of TyrH*

The solution structure of the dimeric RDTyrH<sub>65-159</sub> has been solved recently by NMR<sup>12</sup>. In this work, we have shown that at the concentrations used (10-500  $\mu\text{M}$ ) the protein remained monomeric, as suggested by the several spectroscopic and biophysical techniques employed. Two factors can explain this apparent discrepancy. First, the



triple-resonance experiments with double and triple-labelled samples were acquired at concentrations of 800  $\mu\text{M}$ ; in most of the probes used in this work, we have explored until 500  $\mu\text{M}$  (SEC experiments), but in the DLS experiments carried out at 800  $\mu\text{M}$ , there was a slightly larger poly-dispersity of the peak, although the protein remained, at a large population, monomeric (Fig. 2 Supplementary Material). And second, to avoid possible degradation samples during the large acquisition times of the NMR experiments, the highly concentrated protein samples contained 1  $\mu\text{M}$  leupeptin and 1  $\mu\text{M}$  pepstain; it has been suggested that addition of some compounds to concentrated protein solutions could stabilize the most oligomerized state of the protein<sup>48</sup>.

On the other hand, the same biophysical and spectroscopic techniques used in this work suggest that RDTyrH in the same range of concentrations is a dimer. We have explored theoretically the aggregation tendencies of both protein fragments by using Zyggator<sup>49-51</sup>, and we have observed that the intrinsic aggregation propensity of RDTyrH is 1.5-fold larger than that of RDTyrH<sub>65-159</sub>. Furthermore, we have been able to obtain the  $K_D$  of dimeric RDTyrH (1.6  $\mu\text{M}$ ), by zonal gel filtration chromatography. This value is smaller than that of RDPheH, which accounts for  $46 \pm 35 \mu\text{M}$ <sup>52</sup>. The RD domains of PheH and TyrH have similar structures, but they are not very similar in sequence; furthermore, the structure of the RD and catalytic regions of PheH does not show the presence of contacts between individual domains<sup>13</sup>, but the RDTyrH was dimeric at the NMR concentrations<sup>12</sup>. Moreover, in RDPheH the presence of the substrate (Phe) stabilizes the dimer<sup>52,53</sup>, but the presence of Tyr is not necessary to stabilize the dimer of RDTyrH. At this stage, we do not know however, how the presence of the additional residues can modulate dimer formation, except for a higher tendency to aggregate of such additional tail. Either, we do not know exactly, the full implications of dimer formation in the functions of the RD, but we hypothesize that its unstable monomer could facilitate rapid switching off of signalling. We suggest that it is the higher affinity of dimeric RDTyrH which modulates the recognition of the substrate, thus, modifying the mechanism of regulation of both proteins<sup>7,54</sup>. Further research must be carried out to find out how the dimerization of PheH affects its stability and whether the stability of its monomeric species is as low as that of RDTyrH.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank two reviewers for helpful comments and experimental suggestions. We deeply thank May García, María del Carmen Fuster and Javier Casanova for excellent technical assistance. We thank Prof. Paul F. Fitzpatrick

for the kind gift of the RDTyrH and RDTyrH<sub>65-159</sub> vectors. We thank Dr. Shengnan Zhang and Prof. Paul F. Fitzpatrick for helpful suggestions and ideas on purification of both proteins, and for reading early versions of the manuscript.

#### **SUPPORTING INFORMATION AVAILABLE**

There are six figures containing the: (Fig. 1) urea-refolding experiments for both species monitored by fluorescence; DLS experiments of RDTyrH<sub>65-159</sub> at two concentrations and two pHs (Fig. 2); the chromatograms obtained by analytical SEC for both species (Fig. 3); the ITC thermograms of both species at different concentrations (Fig. 4); (Fig. 5) 1D <sup>1</sup>H-NMR spectra of the RD species; and the chemical denaturation curves of RDTyrH followed by fluorescence and CD at different concentrations (Fig. 6). Supplementary experimental procedures are also provided for DSC and DOSY measurements. The figures are available free of charge *via* Internet at the web site: <http://pubs.acs.org>.

## REFERENCES

1. Nagatsu, T., Levitt, M., and Underfriend, S. (1964) Tyrosine hydroxylase: the initial step in norepinephrine biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 239, 2910-2917.
2. Zigmond, R. E., Schawarzschild, M. A., and Rittenhouse, A. R. (1989) Acute regulation of tyrosine hydroxylase by nerve activity and by neurotransmitters *via* phosphorylation. *Annu. Rev. Neurosci.* 12, 415-461.
3. Ishiguro, H., Arinami, T., Saito, T., Akazawa, S., Enomoto, M., Mitushio, H., Fujishiro, H., Tada, K., Akimoto, Y., Mifune, H., Shiozuka, S., Hamaguchi, H., Toru, M., and Shibuya, H. (1998) Systematic search for variations in the tyrosine hydroxylase gene and their associations with schizophrenia, affective disorders, and alcoholism. *Am. J. Med. Genet.* 81, 388-396.
4. Kunugi, H., Kawada, Y., Hattori, M., Ueki, A., Otsuka, M., and Nanko, S. (1998) Association study of structural mutations of the tyrosine hydroxylase gene with schizophrenia and Parkinson's disease. *Am. J. Med. Genet.* 81, 131-133.
5. Hoffmann, G.F., Assmann, B., Bräutigam, C., Dionisi-Vici, C., Häussler, M., de Klerk, J.B., Naumann, M., Steenbergen-Spanjers, G.C., Strassburg, H. M., and Wevers, R.A. (2003) Tyrosine hydroxylase deficiency causes progressive encephalopathy and dopa-nonresponsive dystonia. *Ann. Neurol.* 54, S56-65.
6. Rao, F., Zhang, K., Zhang, L., Rana, B.K., Wessel, J., Fung, M.M., Rodríguez-Flores, J.L., Taupenot, L., Ziegler, M.G., and O'Connor, D.T. (2010) Human tyrosine hydroxylase natural allelic variation: influence on autonomic function and hypertension. *Cell Mol. Neurobiol.* 30, 1391-1394.
7. Fitzpatrick, P. F. (1999) Tetrahydropterin-dependent amino acid hydroxylases. *Annu. Rev. Biochem.* 68, 355-381.
8. Grima, B., Lamouroux, A., Blanot, F., Biguet, N. F., and Mallet, J. (1985) Complete coding sequence of rat tyrosine hydroxylase mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 617-621.
9. Goodwill, K. E., Sabatier, C. Marks, C., Raag, R., Fitzpatrick, P. F. and Stevens, R. C. (1997) Crystal structure of tyrosine hydroxylase at 2.3 Å and its implications for inherited neurodegenerative diseases. *Nat. Struct. Biol.* 4, 578-585.

10. Lohse, D. L. and Fitzpatrick, P. F. (1993) Identification of the intersubunit binding region in rat tyrosine hydroxylase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 197, 1543-1548.
11. Daubner, S. C., Lohse, D. L., and Fitzpatrick, P. F. (1993) Expression and characterization of catalytic and regulatory domains of rat tyrosine hydroxylase. *Protein Sci.* 2, 1452-1460.
12. Zhang, S., Huang, T., Ilangovan, U., Hinck, A. P., and Fitzpatrick, P. F. (2014) The solution structure of the regulatory domain of tryrosine hydroxylase. *J. Mol. Biol.* 426, 1483-1497.
13. Kobe, B., Jennings, I. G., House, C. M., Michell, B. J. Goodwill, K. E., Santarsiero, B. D., Stevens, R. C., Cotton, R. G. H., and Kemp, B. E. (1999) Structural basis of autoregulation of phenylalanine hydroxylase. *Nat. Struct. Biol.* 6, 442-448.
14. Grant, G. A. (2006) The ACT domain: a small molecule binding domain and its role as a common regulatory element. *J. Biol. Chem.* 281, 33825-33829.
15. Pace, C. N., and Scholtz, J. M. (1997) Measuring the conformational stability of a protein, in *Protein Structure* (Creighton, T. E., ed.) 2<sup>nd</sup> Ed., pp. 253-259, Oxford University Press, Oxford.
16. Piotto, M., Saudek, V., and Sklenar, V. (1993) Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions. *J. Biomol. NMR* 2, 661-665.
17. Cypionka, A, de los Paños, O. R., Mateu, M. G., Barrera, F. N., Hurtado-Gómez, E., Gómez, J., Vidal, M., and Neira, J. L. (2007) The isolated C-terminal domain of Ring 1B is a dimer made of stable, well-structured monomers. *Biochemistry* 46, 12764-12776.
18. Wilkins, D. K., Grimshaw, S. B., Receveur, V., Dobson, C. M., Jones, J. A., and Smith, L. J. (1999) Hydrodynamic radii of native and denatured proteins measured by pulse field gradient NMR techniques. *Biochemistry* 38, 16424-16431.
19. Darlin, P. J., Holt, J. M., and Ackers, G. K. (2000) Coupled energetics of lambda cro repressor self-assembly and site-specific DNA operator binding I: analysis of cro dimerization from nanomolar to micromolar concentrations. *Biochemistry* 39, 11500-11507.

- 
20. Muro-Pastor, M. I., Barrera, F. N., Reyes, J. C., Florencio, F. J., and Neira, J. L. (2003) The inactivating factor of glutamine synthetase, IF7, is a "natively unfolded" protein. *Protein Sci.* 12, 1443-1454.
  21. Ackers, G. K. (1967) Molecular sieve studies of interacting protein systems. I. Equations for transport of associating systems. *J. Biol. Chem.* 242, 3026-3034.
  22. Hinkle, A., Goranson, A., Butters, C. A., and Tobacman, L. S. (1999) Roles for the troponin tail domain in thin filament assembly and regulation. A deletional study of cardiac troponin T. *J. Biol. Chem.* 274, 7157-7164.
  23. Spiegel, M. R. (1985) *Probability and statistics*. Mc Graw Hill, New York.
  24. Neira, J. L., Román-Trufero, M., Contreras, L. M., Prieto, J., Singh, G., Barrera, F. N., Renart, M. L., and Vidal, M. (2009) The transcriptional repressor RYBP is a natively unfolded protein which folds upon binding to DNA. *Biochemistry* 48, 1348-1360.
  25. Royer C. A. (1995) in *Protein stability and folding* (Shirley, B. A., ed.) pp. 65-89, Humana Press, Towota, New Jersey.
  26. Lakowicz, J. R. (1999). *Principles of fluorescence spectroscopy*, 2<sup>nd</sup> Ed. Plenum Press, New York.
  27. Benjwal, S., Verma, S., Röhm, K.H., and Gursky, O. (2006) Monitoring protein aggregation during thermal unfolding in circular dichroism experiments. *Protein Sci.* 15, 635-639.
  28. Mateu, M. G. (2002) Conformational stability of dimeric and monomeric forms of the C-terminal domain of human immunodeficiency virus-1 capsid protein. *J. Mol. Biol.* 318, 519-531.
  29. Rumfeldt, J. A.O., Galvanion, C., Vassall, K. A., and Meiering, E. M. (2008) Conformational stability and folding mechanisms of dimeric proteins. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 98, 61-84.
  30. Bedouelle, H. (2016) Principles and equations for measuring an interpreting protein stability: from monomer to tetramer. *Biochimie* 121, 29-37.
  31. Cantor, C. R., and Schimmel, P.R. (1980) *Biophysical Chemistry*. W. H. Freeman, New York.
  32. Creighton, T. E. (1993) *Proteins. Structures and macromolecular properties*. 2<sup>nd</sup> Ed., W. H. Freeman, New York.

33. Cavanagh, J. F., Wayne, J., Palmer III, A.G., and Skelton, N. J. (1996) *Protein NMR spectroscopy: principles and practice*. Academic Press, San Diego, California.
34. Yao, S., Babon, J.J., and Norton, R. S. (2008) Protein effective correlation times from translational self-diffusion coefficients measured by PFG-NMR. *Biophys. Chem.* 136, 145-151.
35. Daragan, V.A., and Mayo, K. H. (1997) Motional model analyses of protein and peptide dynamics using  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  NMR relaxation. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spec.* 31, 63-105.
36. Ptitsyn, O. B. (1995) Molten globule and protein folding. *Adv. Protein Chem.* 47, 83-229.
37. Wüthrich, K. (1986) *NMR of proteins and nucleic acids*. John Wiley & Sons, New York.
38. Sancho, J. (2013) The stability of 2-state, 3-state and more-state proteins from simple spectroscopic techniques... plus the structure of the equilibrium intermediates at the same time. *Arch. Biochem. Biophys.* 531, 4-13.
39. Fink, A. L. (1995) Compact intermediate states in protein folding. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 24, 495-522.
40. Alcaraz, L.A., del Álamo, M, Mateu, M. G., and Neira, J. L. (2008) Structural mobility of the C-terminal domain of the HIV-1 capsid protein. *FEBS J.* 275, 3299-3311.
41. Mayor, U., Guydosh, N. R., Johnson, C. M., Grossmann, G., Sato, S., Jas, G. S., Freund, S.M.V., Alonso, D.O.V., Daggett, V., and Fersht, A. R. (2003) The complete folding pathway of a protein from nanosecond to microsecond. *Nature* 42, 863-867.
42. Li, H., Robertson, A. D., and Jensen, J. H. (2005) Very fast empirical prediction and rationalization of protein  $\text{pK}_a$  values. *Proteins* 61, 704-721.
43. Neet, K. E., and Timm, D. E. (1994) Conformational stability of dimeric proteins: quantitative studies by equilibrium denaturation. *Protein Sci.* 3, 2167-2174.

- 
44. Doyle, C. M., Rumfeld, J. E., Broom, H. R., Broom, A., Stathopoulos, B. Vasall, K. A., Almey, J. J., and Meiering, E. M. (2013) Energetics of oligomeric protein folding and association. *Arch. Biochem. Biophys.* 531, 44-64.
45. Freire, E. (2003) in *Protein Structure, Stability, and Folding* (Murphy, K. P., ed), pp 37-68, Humana Press Inc., Totowa, New Jersey.
46. Myer, J. K. Pace, C. N., and Scholtz, J. M. (1995) Denaturant m values and heat capacity changes: Relation to changes in accessible surface areas of protein unfolding. *Protein Sci.* 4, 2138-2148.
47. Willard, L., Ranjan, A., Zhang, H., Monzavi, H., Boyko, R. F., Sykes, B. D., and Wishart, D. S. (2003) VADAR: A web server for quantitative evaluation of protein structure quality. *Nucl. Acid. Res.* 31, 3316-3319.
48. Macchi, F., Eisenkolb, M., Kiefer, H., and Otzen, D. E. (2012) The effects of osmolytes on protein fibrillation. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 3801-3819.
49. DuBay, K. F., Pawar, A. P., Chiti, F., Zurdo, J., Dobson, C. M., and Vendruscolo, M. (2004) Prediction of the absolute aggregation rates of amyloidogenic polypeptide chains. *J. Mol. Biol.* 341, 1317-1326.
50. Pawar, A. P., DuBay, K. F., Zurdo, J., Chiti, F., Vendruscolo, M., and Dobson, C. M. (2005) Prediction of "aggregation-prone" and "aggregation-susceptible" regions in proteins associated with neurodegenerative diseases. *J. Mol. Biol.* 350, 379-392.
51. Tartaglia, G. G., Pawar, A. P., Campioni, S., Chiti, F., Dobson, C. M., and Vendruscolo, M. (2008) Prediction of aggregation-prone of structure proteins. *J. Mol. Biol.* 380, 425-436.
52. Zhang, S., Roberts, K. M., and Fitzpatrick, P. F. (2014) Phenylalanine binding is linked to dimerization of the regulatory domain of phenylalanine hydroxylase. *Biochemistry* 53, 6625-6627.
53. Zhang, S., Hinck, A. P., and Fitzpatrick, P. F. (2015) The amino acid specificity for activation of phenylalanine hydroxylase matches the specificity for stabilization of regulatory domain dimers. *Biochemistry* 54, 5167-5174.
54. Daubner, S. C., Le, T., and Wang, S. (2011) Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* 508, 1-12.
55. DeLano, W. L. (2002) The PyMOL molecular graphics system. DeLano Scientific, Palo Alto, CA. <http://www.pymol.org/>.

Table 1: Hydrodynamic measurements for both RD species

RD TyrH <sub>65-159</sub>			RD TyrH	
Technique	Conditions	Property measured <sup>a</sup>	Conditions	Property measured <sup>a</sup>
DOSY-NMR	43 μM, pH 7.0, 50 mM phosphate buffer, 20 °C	$(8.4 \pm 0.5) \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ (16 ± 2 Å)	150 μM, pH 7.0, 50 mM phosphate buffer, 20 °C	$(5.42 \pm 0.05) \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ (26 ± 2 Å)
	330 μM, pH 7.0, 50 mM phosphate buffer, 20 °C	$(7.93 \pm 0.07) \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ (16 ± 2 Å)	150 μM, pH 4.5, 50 mM acetate buffer, 20 °C	$(4.38 \pm 0.07) \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$
	60 μM, pH 4.5, 50 mM acetate buffer, 20 °C	$(7.4 \pm 0.3) \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$		
DLS <sup>b</sup>	277 μM, pH 7.5, 50 mM Hepes buffer, 20 °C	2.7 ± 0.2 nm (12.5 kDa)	554 μM, pH 7.5, 100 mM Hepes buffer, 20 °C	4.8 ± 0.7 nm (34.7 kDa)
	277 μM, pH 4.0, 50 mM acetate buffer, 20 °C	3.7 ± 0.8 nm (21.8 kDa)	554 μM, pH 4.0, 100 mM acetate buffer, 20 °C	7 ± 1 nm (80.9 kDa)
	554 μM, pH 7.5, 50 mM Hepes buffer, 20 °C	2.6 ± 0.3 nm (12.1 kDa)		
	554 μM, pH 4.0, 50 mM acetate buffer, 20 °C	3.6 ± 0.3 nm (21.7 kDa)		



	800 $\mu$ M, pH 7.5, 50 mM Hepes buffer, 20 $^{\circ}$ C	2.4 $\pm$ 0.9 nm (12.0 kDa)		
	800 $\mu$ M, pH 4.0, 50 mM acetate buffer, 20 $^{\circ}$ C	4.5 $\pm$ 0.6 nm (35.0 kDa)		
SEC <sup>c</sup>	70 $\mu$ M, pH 7.0, 50 mM Tris buffer with 150 mM NaCl and 2 mM EDTA, 20 $^{\circ}$ C	12.14 $\pm$ 0.06 ml	58 $\mu$ M, pH 7.0, 50 mM Tris buffer with 150 mM NaCl and 2 mM EDTA, 20 $^{\circ}$ C	9.76 $\pm$ 0.08 ml
	140 $\mu$ M, pH 7.5, 100 mM Tris buffer with 150 mM NaCl and 2 mM EDTA, 20 $^{\circ}$ C	12.07 $\pm$ 0.04	230 $\mu$ M, pH 7.0, 50 mM Tris buffer with 150 mM NaCl and 2 mM EDTA, 20 $^{\circ}$ C	9.67 $\pm$ 0.02 ml
	277 $\mu$ M, pH 7.0, 50 mM Tris buffer with 150 mM NaCl and 2 mM EDTA, 20 $^{\circ}$ C	12.11 $\pm$ 0.08	600 $\mu$ M, pH 7.0, 50 mM Tris buffer with 150 mM NaCl and 2 mM EDTA, 20 $^{\circ}$ C	9.66 $\pm$ 0.03
	540 $\mu$ M, pH 7.0, 50 mM Tris buffer with 150 mM NaCl and 2 mM EDTA, 20 $^{\circ}$ C	12.10 $\pm$ 0.05		

<sup>a</sup>In the DOSY experiments the magnitude measured is the translational diffusion coefficient,  $D$  (in parenthesis, the  $R_s$  is indicated at the physiological pHs); in DLS measurements is the  $R_s$ ; and in SEC experiments is the elution volume, given as the average of three measurements.

<sup>b</sup>In each measurement the calculated molecular weight assuming a spherical shape is given within parenthesis.

<sup>c</sup>The calculated  $R_s$  was  $21 \pm 2 \text{ \AA}$  at all elution volumes in RDTyrH<sub>65-159</sub>. The calculated  $R_s$  for RDTyrH at the highest concentrations was  $34 \pm 2 \text{ \AA}$ . Not all the concentrations explored for RDTyrH are included in the Table (see Fig. 2 C).

Table 2: Quenching parameters in KI and acrylamide of both RD species<sup>a</sup>

	RDTyrH <sub>65-159</sub>		RDTyrH	
	$K_{sv}$ (M <sup>-1</sup> ) (KI)	$K_{sv}$ (M <sup>-1</sup> ) (acrylamide) <sup>b</sup>	$K_{sv}$ (M <sup>-1</sup> ) (KI)	$K_{sv}$ (M <sup>-1</sup> ) (acrylamide) <sup>b</sup>
pH 4.0	0.42 ± 0.04	4.2 ± 0.6 (1.89 ± 0.09)	0.38 ± 0.04	4.0 ± 0.3 (1.91 ± 0.09)
pH 7.0	0.26 ± 0.04	3.6 ± 0.4 (1.91 ± 0.09)	0.31 ± 0.04	3.9 ± 0.4 (1.91 ± 0.09)
6 M urea	1.43 ± 0.01	3.6 ± 0.1 (0) <sup>c</sup>	1.4 ± 0.1	3.6 ± 0.1 (0) <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Errors are from fitting to Eq. (2). The  $K_{sv}$ s were obtained by fitting of fluorescence intensity at 315 nm *versus* concentration of quenching agent. Experiments were carried out at 25 °C.

<sup>b</sup> The value within the parenthesis is the  $k_v$ , the dynamic quenching constant.

<sup>c</sup> Acrylamide quenching in 6 M urea resulted in a straight line with  $K_{sv} = 3.6 ± 0.1$  M<sup>-1</sup> in both proteins. The quenching experiments in the presence of urea were carried out at pH 7.0, 10 mM Tris buffer.

Table 3: Thermodynamic parameters of RDYrH species unfolding reaction obtained by chemical-denaturation experiments<sup>a</sup>

RDYrH <sub>65-159</sub>					RDYrH <sup>c</sup>				
Biophysical probe	Concentration (μM)	$\Delta G^0$ (kcal mol <sup>-1</sup> ) <sup>1)</sup>	$m$ (kcal mol <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> ) <sup>1)</sup>	[denaturant] <sub>1/2</sub> (M)	Concentration (μM)	$\Delta G^0$ (kcal mol <sup>-1</sup> )	$m$ (kcal mol <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> )	[denaturant] <sub>1/2</sub> (M)	
Fluorescence <sup>b</sup>	10	4.7 ± 0.9	1.8 ± 0.3	2.60 ± 0.09	10	13 ± 1 <sup>f</sup>	2.6 ± 0.4	2.53 ± 0.06	
	20	5.9 ± 0.4	2.1 ± 0.2	2.71 ± 0.03	20	13 ± 1 <sup>f</sup>	2.5 ± 0.4	2.64 ± 0.07	
	20 (GdmCl) <sup>c</sup>	30	4.8 ± 0.6	4.3 ± 0.4	1.13 ± 0.02	30	11 ± 1 <sup>f</sup>	2.1 ± 0.3	2.53 ± 0.08
		47				47	13 ± 1 <sup>f</sup>	2.7 ± 0.2	2.84 ± 0.03
CD <sup>d</sup>	20	3.9 ± 0.8	1.5 ± 0.3	2.6 ± 0.1	20	8 ± 2	2.7 ± 0.9	2.9 ± 0.1	
	30	3.4 ± 0.9	1.3 ± 0.4	2.6 ± 0.1	30	7 ± 2	2.5 ± 0.8	2.8 ± 0.1	
	49	3.4 ± 0.9	1.3 ± 0.2	2.7 ± 0.1	55	4 ± 2	1.3 ± 0.9	2.9 ± 0.4	

<sup>a</sup> $\Delta G^0$  is the free energy of unfolding extrapolated to the absence of denaturant;  $m$  is the slope of the variation in the free energy of unfolding with the denaturant concentration (urea or GdmCl). Errors in the  $m$ - and  $[\text{denaturant}]_{1/2}$ -values are fitting errors. The uncertainty in  $\Delta G^0$  was obtained from error propagation, assuming that the errors in the  $m$ - and  $[\text{denaturant}]_{1/2}$ -values are independent. Repetitions of the chemical-denaturations yielded differences of 0.2 kcal mol<sup>-1</sup> M<sup>-1</sup> in the  $m$ -values, and of 0.06 M in the  $[\text{denaturant}]_{1/2}$ -values. All experiments were carried out at 25 °C and pH 7.0, 10 mM Tris buffer.

<sup>b</sup>All the fluorescence curves were obtained from the fluorescence intensity at 308 nm.

<sup>c</sup>These measurements were carried out in the presence of GdmCl.

<sup>d</sup>The values were obtained by following the changes in the ellipticity at 222 nm.

<sup>e</sup>The fluorescence curves were fitted to the equation corresponding to a bimolecular process (Eq. (6)). The CD curves were fitted to the equation of an unimolecular transition, since no concentration-dependence was observed (Eq. (4)).

<sup>f</sup>The free energy units are at a 1 M standard state.

## FIGURE LEGENDS

FIGURE 1: **Structure of RDTyrH<sub>65-159</sub>**: The dimeric solution structure of the domain is shown with the elements of secondary structure in different colours (PDB number: 2MDA):  $\beta$ -strands in yellow and  $\alpha$ -helices in red. The sole Tyr131 is indicated in sticks. The figure was produced with Pymol <sup>55</sup>.

FIGURE 2: **Hydrodynamic measurements of RDTyrH species**: (A) DLS of RDTyrH<sub>65-159</sub> at 277  $\mu$ M at pH 7.0 (dotted line) and pH 4.5 (continuous line). (B) DLS of RDTyrH at 277  $\mu$ M (monomer concentration) at pH 7.0 (dotted line) and pH 4.5 (continuous line). (C) Changes in  $\sigma$  as the concentration of monomeric RDTyrH was increased. The fitting values were  $\sigma_m = 0.50 \pm 0.09$  (the fitting was largely independent of this parameter, and thus, it was not properly determined), and  $\sigma_d = 0.18 \pm 0.01$ . Inset: Changes in elution volume (ml) as the concentration of monomeric RDTyrH was increased (the error bars are from at least three independent volume measurements for each protein concentration). Conditions were: 20 °C, in Tris buffer (pH 7.0), 50 mM, with 150 mM NaCl and 2 mM EDTA.

FIGURE 3: **pH-induced structural changes of the RD species of followed by spectroscopic and hydrodynamic techniques**: (A) Changes of RD species (RDTyrH in blank circles and RDTyrH<sub>65-159</sub> in filled ones) in aqueous solution monitored by the changes in  $\langle \lambda \rangle$  of the intrinsic fluorescence. (B) Changes in intensity of the ANS-binding followed at 480 nm for both proteins (the same symbols as above). Protein concentration was 15  $\mu$ M (monomeric protein); ANS concentration was 100  $\mu$ M; buffer concentration was 10 mM in all cases. (C) Changes in molar ellipticity at 222 nm, from far-UV spectra of both proteins (the same symbols as above). Inset: far UV CD spectra of RDTyrH<sub>65-159</sub> at pH 4.5 (continuous line) and pH 7.0 (dotted line). Spectra were acquired in either 1 cm- (fluorescence) or 0.1 cm- (CD) pathlength cells. (D) Changes in the elution volume (ml) as the pH was varied. At pH < 6.0, the protein eluted at volumes larger than the bed volume (18.98 ml) of the column, and they have not been represented. Symbols for both proteins are as in the above panels.

**FIGURE 4: 1D <sup>1</sup>H-NMR spectra of the RD species:** (Left side) The amide regions of RD Tyr<sub>65-159</sub> at pH 4.5 (A) and pH 7.0 (B). (Right Side) The amide regions of RD TyrH at at pH 4.5 (A) and pH 7.0 (B). Experiments were acquired at 20 °C with protein concentrations for both species of 150 μM (in protomer units).

**FIGURE 5: Chemical-denaturation of RD Tyr<sub>65-159</sub>:** (A) The  $\langle \lambda \rangle$  from the intrinsic fluorescence of RD Tyr<sub>65-159</sub> at 10 μM of protein (in protomer units). Inset: CD denaturation curve of RD Tyr<sub>65-159</sub> at 20 μM of protein (in protomer units). (B) Gel-filtration data for RD Tyr<sub>65-159</sub> (blank circles) and RD TyrH (filled circles). Protein concentrations in the gel filtration experiments were 150 μM (in protomer units), at all urea concentrations for both proteins. Experiments were carried out at 20 °C.

Fig. 1 (Neira et al.)

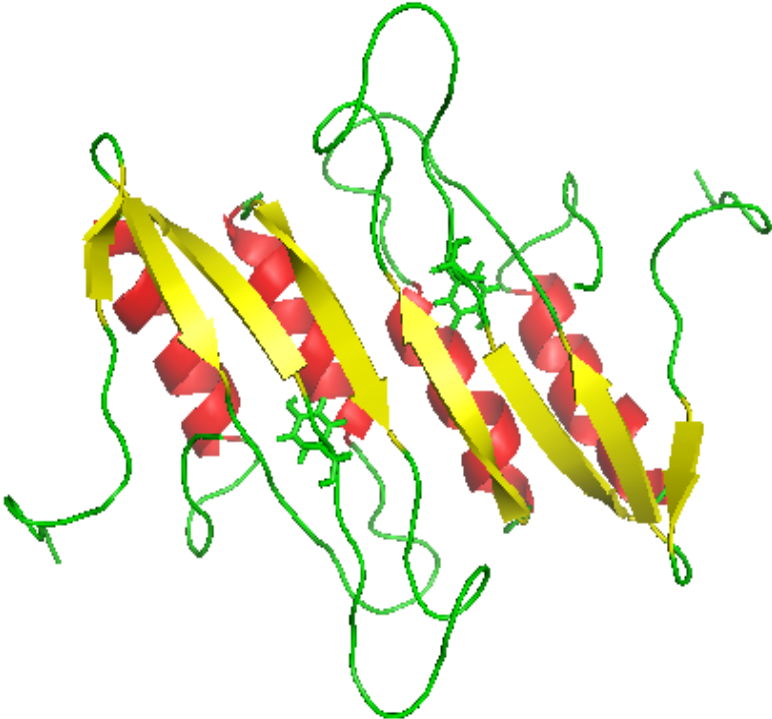




Fig. 2 A and B(Neira et al.)

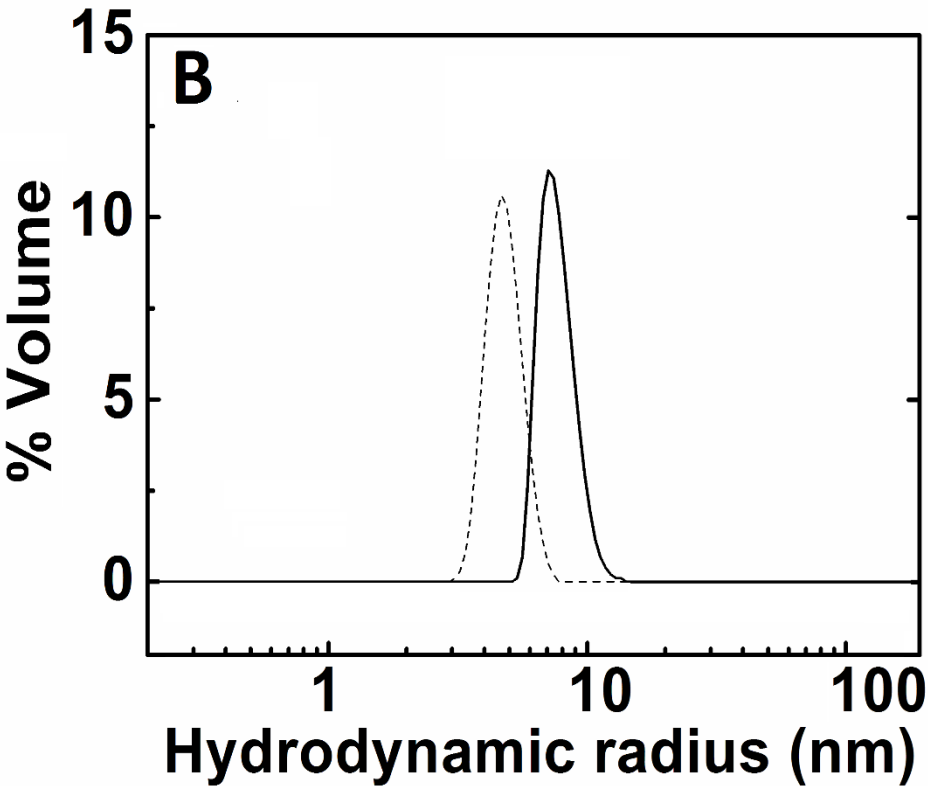
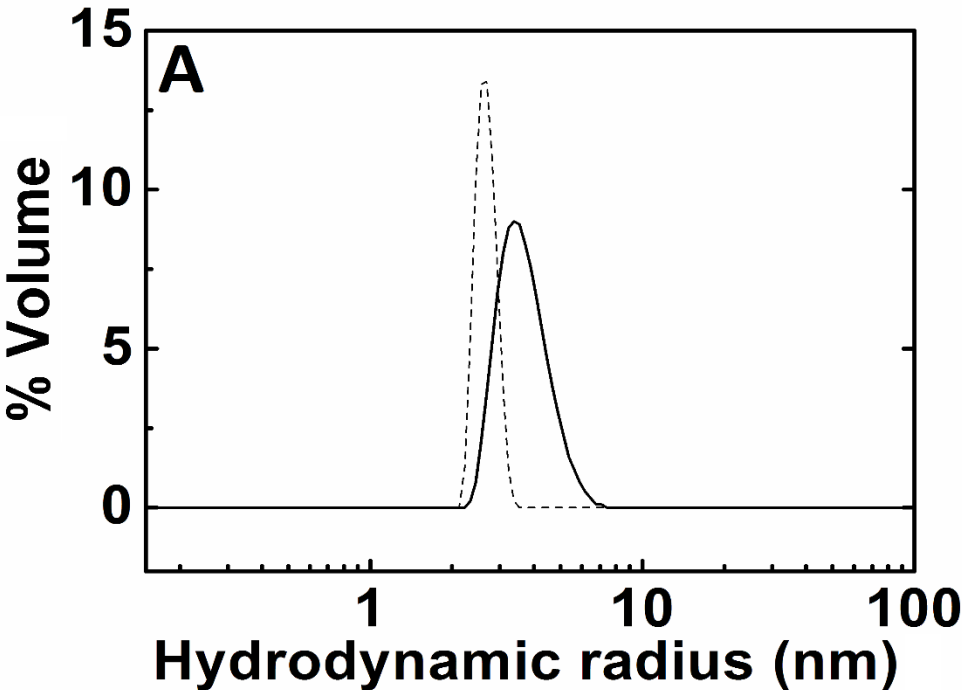


Fig. 2 C (Neira et al.)

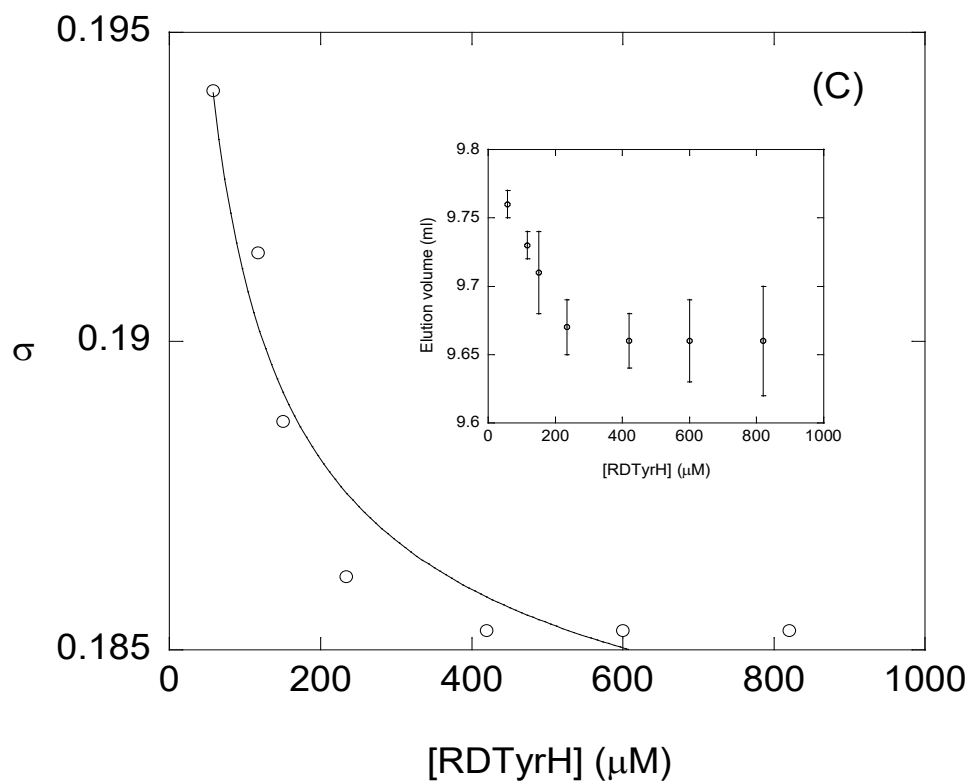


Fig. 3 A, B (Neira et al.)

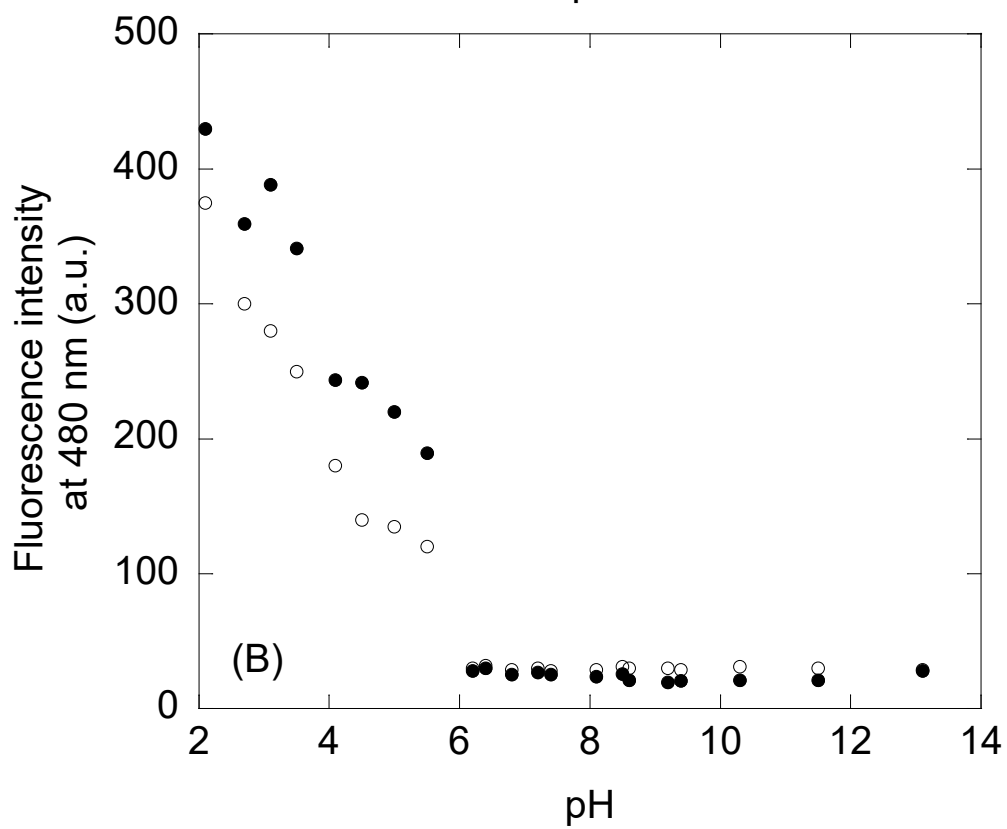
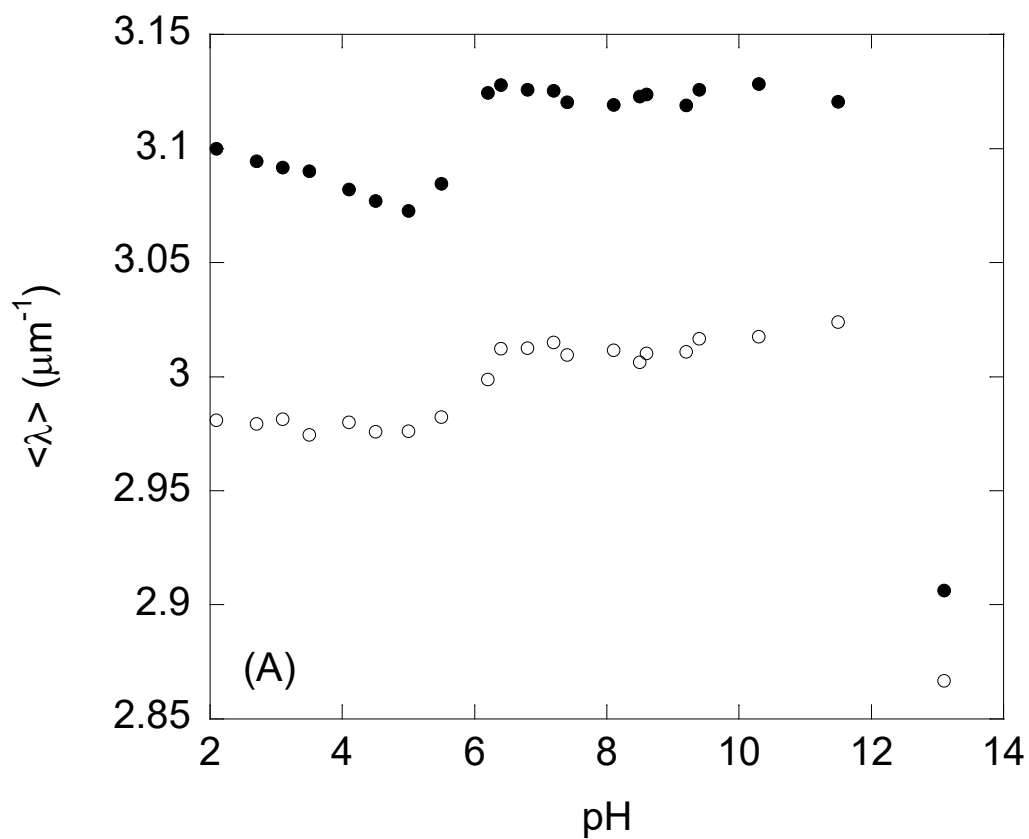


Fig. 3 C, D (Neira et al.)

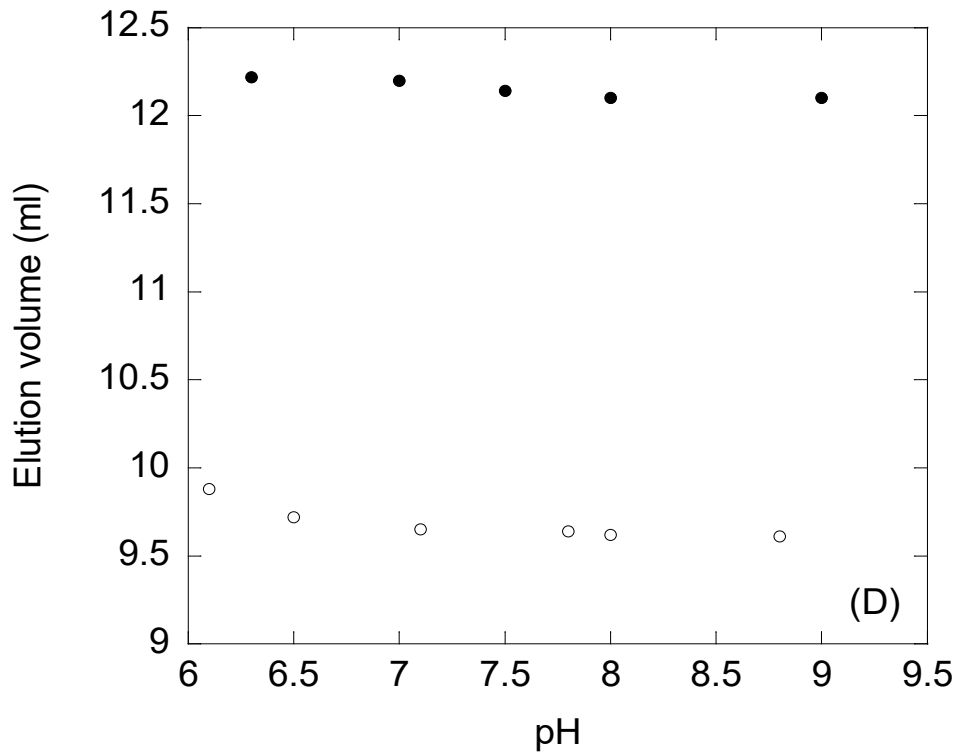
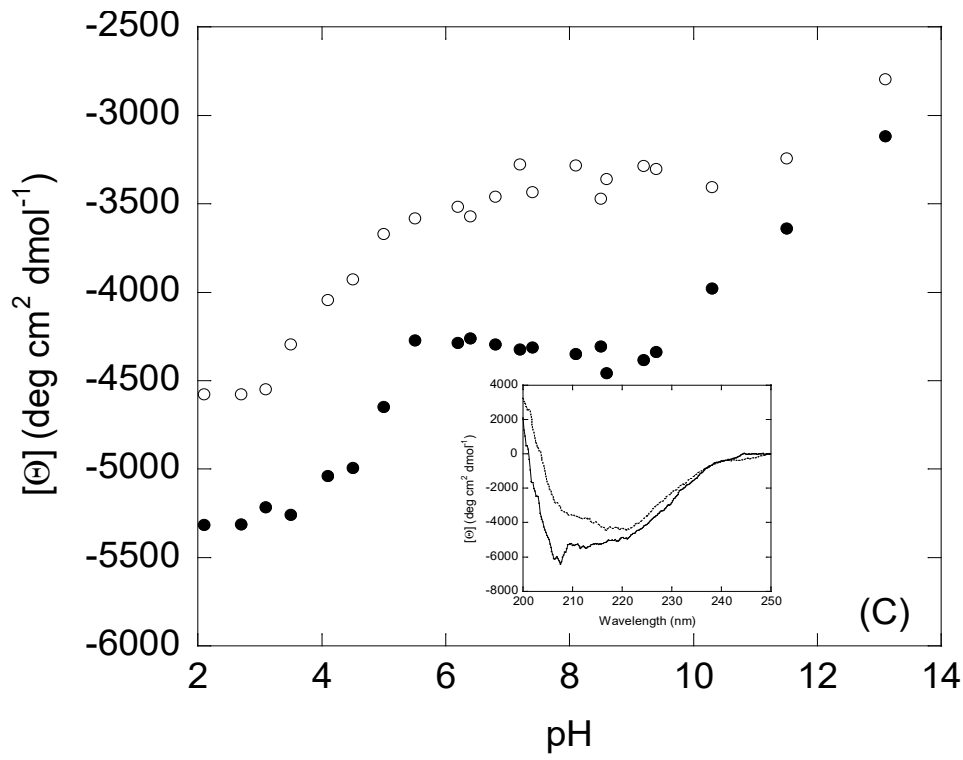
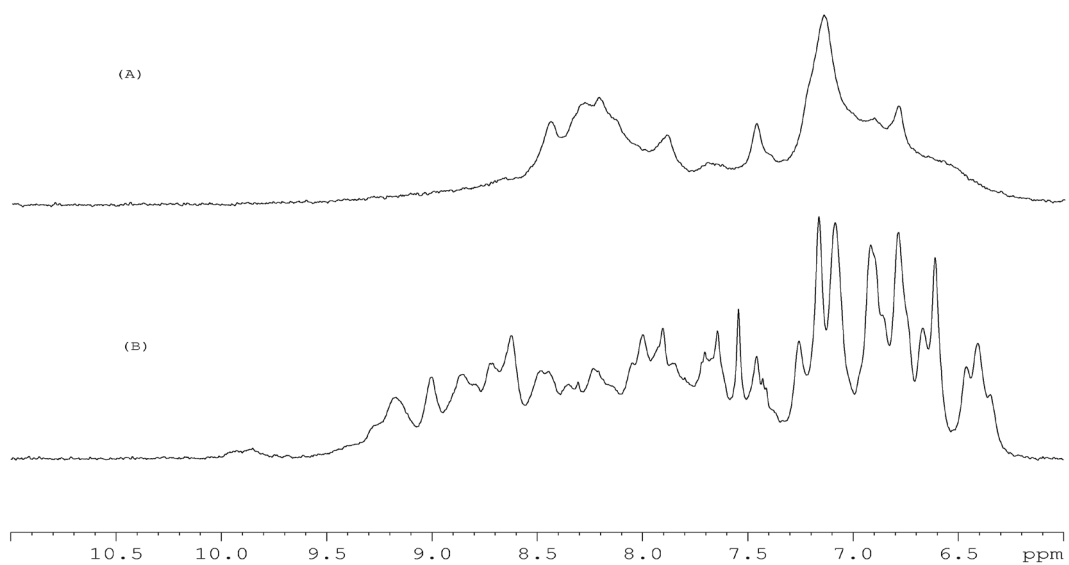


Fig. 4 (Neira et al.)

(left side)



(right side)

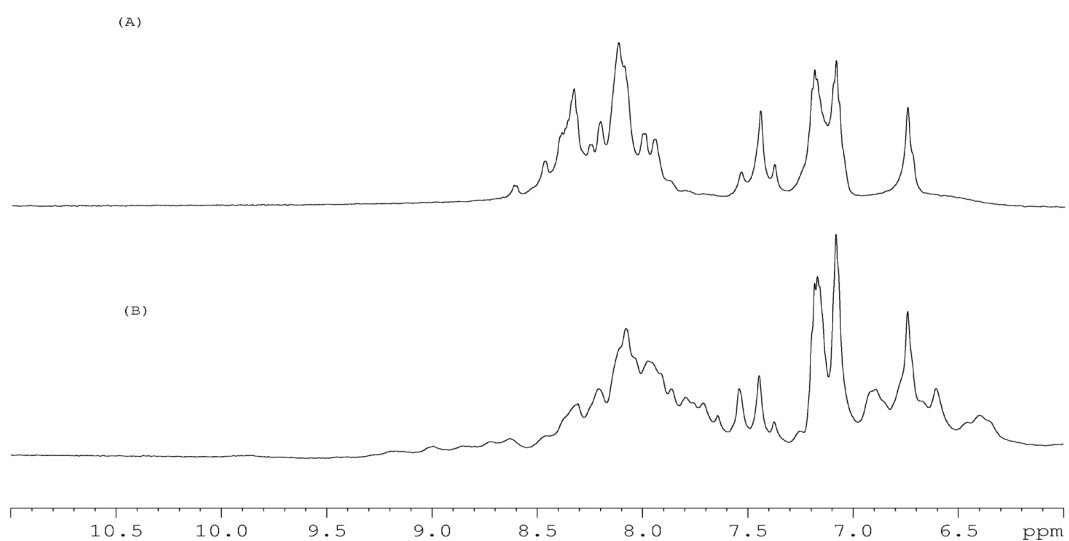


Fig. 5 (Neira et al.)

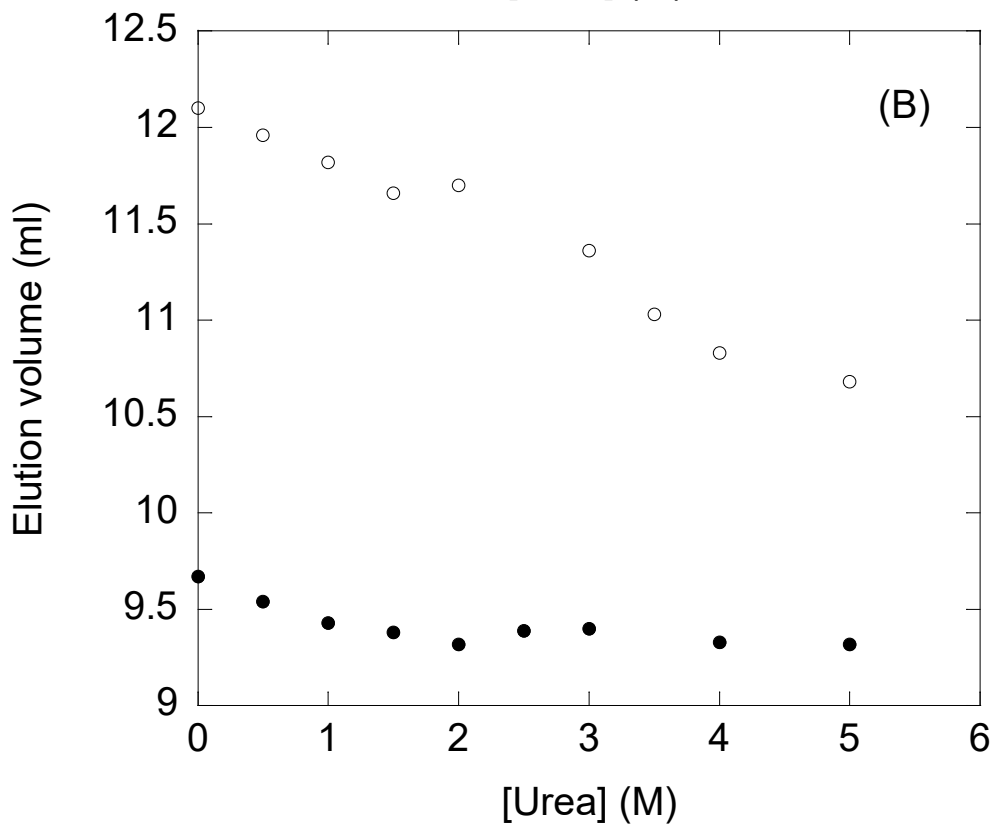
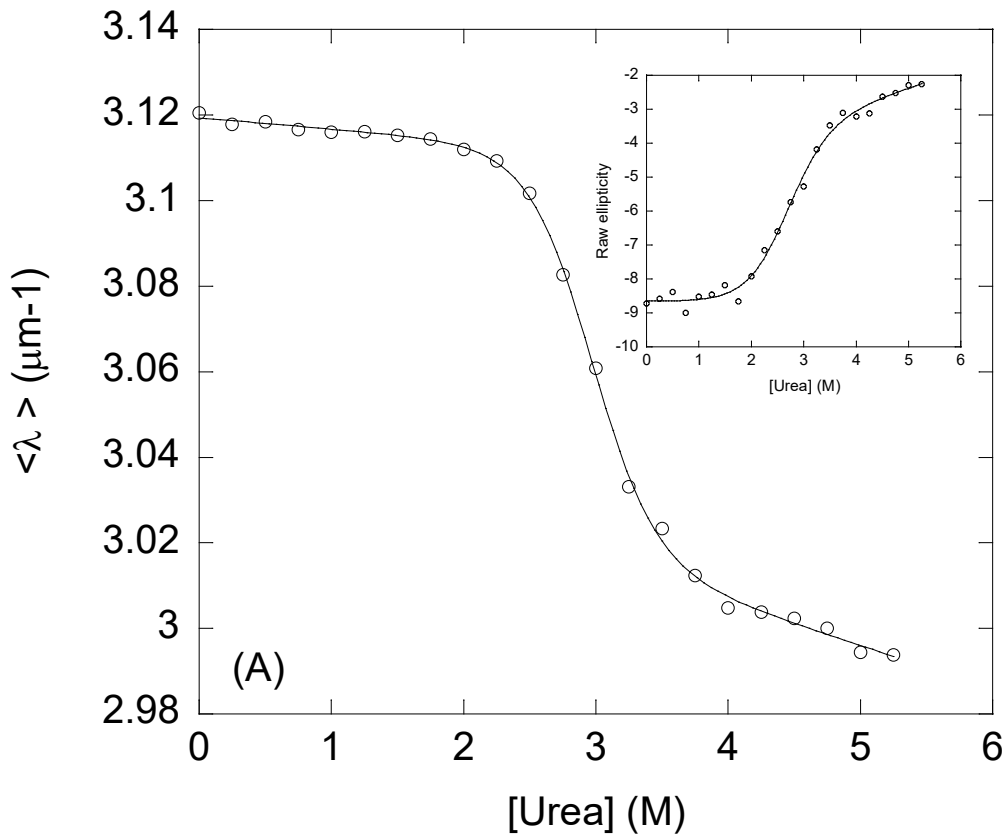
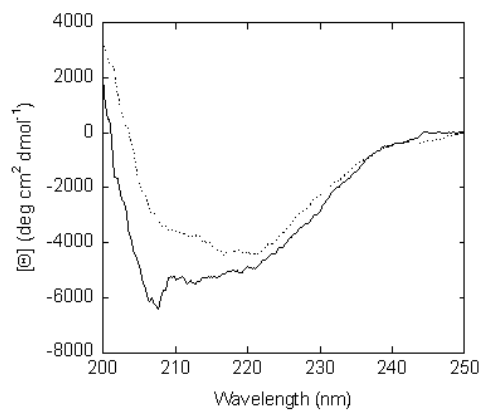
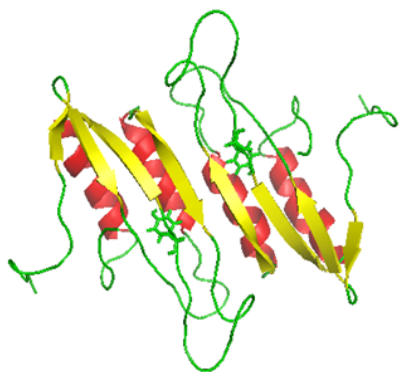


Table of contents only







**Hornos F., Esquembre R., Gómez J.**

“Competitive inhibition of protein adsorption to silica surfaces by their coating with high density charge polyelectrolytes”

Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 191 (2020) 110993 ([doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.110993](https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.110993))



# Competitive inhibition of protein adsorption to silica surfaces by their coating with high density charge polyelectrolytes

Felipe Hornos, Rocío Esquembre and Javier Gómez\*

IDiBE. Universidad Miguel Hernández. 03202 – Elche, Spain

\* Corresponding author's address: Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche (IDiBE), Universidad Miguel Hernández, Avda. de la Universidad s/n, 03202 – Elche, Spain

Phone: 34966658467, Fax: 34966658758, E-mail: [jgomez@umh.es](mailto:jgomez@umh.es)

## Abstract

The adsorption of proteins to silica surface is a common process mainly governed by the electrostatic attractive interaction between the pH-dependent negatively silica surface and the positive charges of the biomolecule. This process often reduces the conformational stability of the adsorbed protein and may reduce its biological functionality mostly due to multimolecular processes such as aggregation and fibrillation. Here we show that high-density charge cationic polyelectrolytes may successfully compete with the protein for the silica surface containing deprotonated-silanol groups. Therefore, the coating of silica surfaces with these cationic polyelectrolytes precludes the adsorption of the protein to the solid surface. Intensive water washing of the polyelectrolyte-coated silica surfaces had does not result in polyelectrolyte release (even at moderate ionic strength) maintaining the solid surface protected from protein adsorption.

*Keywords:* protein adsorption, electrostatic interaction, surface coating, adsorption inhibition, protein desorption.

Abbreviations:

LZM: hen egg white lysozyme

PDADMACl: poly(diallyldimethyl ammonium chloride)

PAAH: polyallyamine hydrochloride

PEI: polyethylenimine

## 1. Introduction

Protein adsorption to both hydrophilic and hydrophobic solid surfaces is a widespread phenomenon due to the amphipathic nature of these biomolecules [1][2][3]. This process has been thoroughly used for many biotechnological applications such as chromatographic separations [4], drug delivery systems [5][6], diagnosis and sensor devices [7] and new biocompatible materials [8]. Nevertheless, the adsorption of proteins to solid surfaces often reduce their conformational stability [9][10][11] which may lead to structural as well as functional changes [12]. Furthermore, since protein adsorption may negatively affect its conformational stability, its eventual release from the surface may lead to irreversible multimolecular processes such as aggregation or fibrillation [13][14].

The development of many biotechnological processes in the last decades has allowed the production of large quantities of protein-related materials in order to reach the ever-demanding necessities of our society in areas such as pharmaceutical manufacturing, clinical pharmacology, research laboratories, industrial biotechnology or food processing. Therefore, there is a need for the development of effective coatings for these hazardous protein-adsorbing surfaces.

Silica is one of the most profusely used material in our everyday life and its use in most biotechnological processes is ubiquitous. The charge-density of silica surface is highly pH-dependent due to the deprotonation of its silanol groups [15][16]. Silica presents a point of zero charge around 2.5 – 3.0 and both experimental data and theoretical calculations are consistent with two populations of silanol groups with pKa values in the order of 4.5 for the first group (accounting for 15 – 20 % of total) and 8.5 for the remaining 80 – 85 % ionizable groups [17][18]. Accordingly, silica surfaces hold an overall negative charge at physiological pH and electrostatic attraction towards positively charged molecules play a major role in their adsorption onto the solid surface [19][20]. The pH and ionic strength dependence of the energetics of the adsorption process [4][19][21] show that its strength is directly related to the charge density of the two interacting species. The interaction of silica with both natural [11][20] and synthetic [22][23] polyelectrolytes is especially strong mainly due the reduction in the loss of translational entropy upon adsorption derived from the large number of electrostatic attractive contacts between the deprotonated silanols on the solid surface and positive groups located in a single polymer chain.

There have been previous attempts to develop effective coatings to diminish the tendency of proteins to adsorb onto silica surfaces. In particular, many silanization procedures have been proposed for the covalent modification of surface-exposed silanol groups [24][25]. Though the synthesis procedure has been highly optimized and silanization of silica surfaces is a straightforward procedure, the cost of producing covalently-modified silica precludes its routinely use in biotechnological processes. Simple and inexpensive adsorption coatings have been proposed using neutral polymers such as polyethyleneglycol [26] or

polyvinylpyrrolidone [27] though protein adsorption was not completely prevented by precoating silica particles with these polymers.

We propose the coating of silica surfaces with high-density charge cationic polyelectrolytes as a simple and inexpensive method to suppress protein adsorption taking advantage of the much higher affinity of the polyelectrolyte for the silica surface compared with the one of the protein. Furthermore, the resulting electrostatic repulsion between the silica-adsorbed polyelectrolyte and the protein would maintain the later in solution precluding its adsorption to the solid surface.

We have studied the inhibitory effect of the coating of colloidal silica microparticles with different cationic polyelectrolytes on protein adsorption. In particular, we used hen egg white lysozyme as a model cationic protein at physiological pH. Lysozyme has been thoroughly studied in the last decades being the subject of large number of both experimental and theoretical analyses. Due to the high isoelectric point of the protein ( $\sim 11$ ), it holds an overall positive charge (around +8) at pH 7 [28]. The adsorption of lysozyme to silica surfaces has been amply studied both from an experimental [21][20][29][30] and theoretical [31][32] perspectives.

## 2. Materials and methods

*Materials.*- Hen egg white lysozyme (LZM), poly(diallyldimethylammonium chloride), PDADMACl, of different average molecular weights (< 100, 150, 275 and 450 kD), polyallyamine hydrochloride, PAAH, with average molecular weight of 58 kD, polyethylenimine, PEI, (average molecular weight 60 of kD) and low molecular weight chitosan (with a 76 % degree of deacetylation) were from Sigma and used without further purification. Cab-o-Sil fumed silica particles (with a specific surface area of  $206 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ ) were purchased from Acros Organics and all other chemicals were from Merck. All solutions were prepared using Milli-Q water.

*Adsorption of LZM to silica and its polyelectrolyte-induced desorption.*- Stock silica dispersions were prepared in water and their exact solid content determined by dry residue. Prior to preparing the samples, silica dispersions were sonicated using a Branson 450 digital sonifier. LZM stock solutions were prepared in water and their concentration determined spectrophotometrically. Samples containing 0.8 mL LZM and silica loaded in 2 mL plastic tubes were incubated at pH 7 (hepes buffer, 20 mM) and room temperature for at least 12 hours under continuous agitation in order to ensure that the adsorption of the protein to the silica surface had reached the equilibrium. Then 0.2 mL of a buffer solution containing different polyelectrolyte concentrations were added to the sample and the agitation was continued for at least another 16 h (further incubation times did not affect the desorption process). After equilibration, the dispersions were centrifuged for 30 min using an Eppendorf Minispin microcentrifuge at 13,400 rpm

(12,100 g). The supernatant was carefully separated from the pellet and its protein content determined using a Shimadzu UV-2700 spectrophotometer.

*Determination of the maximum amount of polyelectrolyte adsorbed on the surface of the unit mass of fumed silica particles,  $q_{max}$ .* - Different amounts of silica and polyelectrolyte were incubated at pH 7.0 and room temperature for at least 16 h to allow the polyelectrolyte to adsorb onto the solid surface. The concentration of polyelectrolyte in the supernatant was determined by titration with potassium polyvinylsulfate using o-toluidine blue as indicator.

*Effect of washing of the polyelectrolyte-coated silica surface on its adsorption capacity towards LZM.* - In order to check the desorption of PDADMACI from the silica surface, 0.5 g of polyelectrolyte-coated silica were dispersed in 50 mL of buffered aqueous solutions containing different amounts of NaCl (0, 150 and 250 mM). The dispersions were incubated at room temperature for 16 h, centrifuged and the pellet resuspended after being sonicated in 50 mL of a buffered solution identical to the one in which the particles were dispersed originally. In order to check the integrity of the coating, an aliquot of the dispersion was assayed (after determining its exact silica content) using LZM as a probe. Dispersions containing coated silica particles ( $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) and LZM ( $0.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) were incubated under stirring for 16 h and the amount of protein adsorbed determined from the residual LZM present in the supernatant. The process was repeated 10 times.

### 3. Results and discussion

#### *3.1.- Polyelectrolyte-induced desorption of LZM from silica surface.*

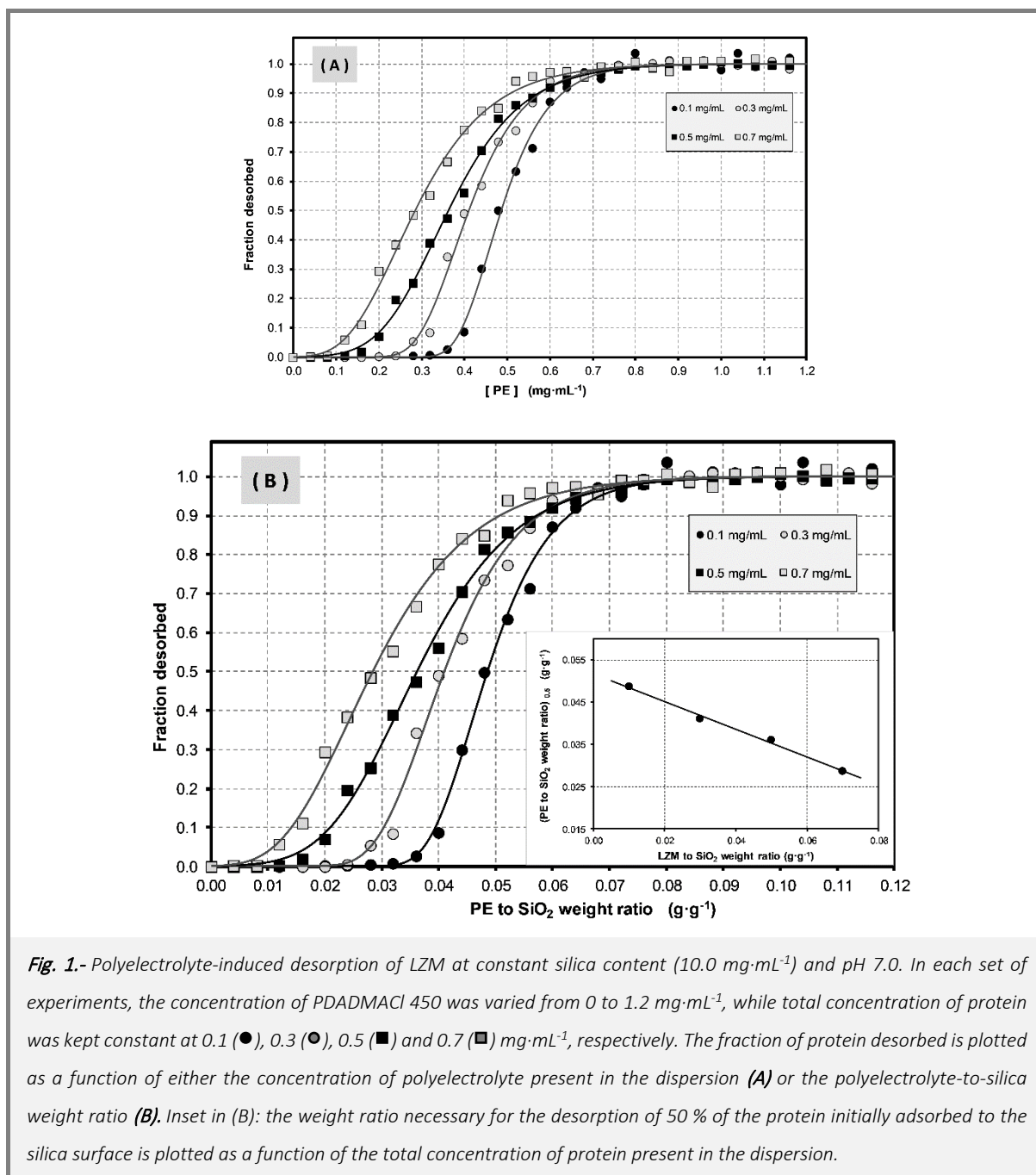
The adsorption of LZM to Cab-o-Sil fumed silica nanoparticles has been previously studied in detail [20]. The adsorption of LZM to these particles is reversible with desorption equilibrium constant,  $K_D$ , of  $0.0061 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  and maximum surface coverage,  $\Gamma_{max}$ , of  $1.1 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-2}$  at pH 7.0 (equivalent to a weight ratio of 0.23 mg of protein per mg of silica). The capacity of cationic polyelectrolytes to induce the desorption of LZM previously adsorbed onto silica surface was first tested using PDADMACI with an average molecular weight of 450 kD. The results are presented in Fig. 1. In panel (A), the fraction of protein desorbed induced by PDADMACI is plotted as a function of the concentration of polyelectrolyte for four different sets of experiments. In each series of experiments the total concentration of LZM was kept constant at 0.1, 0.3, 0.5 and  $0.7 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , respectively (silica content was constant at  $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). These conditions were selected to ensure the complete adsorption of the protein initially present in the dispersion selecting a protein-to-silica weight ratio well below the one for complete coverage of the solid surface ( $0.23 \text{ mg}\cdot\text{mg}^{-1}$ ). This is confirmed by the negligible presence of protein in the supernatant in the absence of polyelectrolyte. A further increase in the total concentration of protein (above  $0.7 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , keeping the

silica content at  $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) led to incomplete adsorption of the protein to the surface in the absence of polyelectrolyte (data not shown).

Panel (B) in Fig. 1 presents the fraction of protein desorbed versus the polyelectrolyte-to-silica weight ratio. For each individual set of experiments, the presence of polyelectrolyte at low concentration does not induce desorption of protein. Due to the small protein-to-silica weight ratio selected, silica surface is incompletely covered by protein and polyelectrolyte would preferentially bind to the solvent-exposed surface patches due to its higher affinity for those sites. Once the polyelectrolyte saturates the solvent-exposed surface of the silica particle, the polymer successfully competes with LZM for the solid surface and induces its release to the solvent. For each set of experiments, the increase in the concentration of polyelectrolyte present in the dispersion induces a concomitant release of the protein from the silica surface in a sigmoidal fashion. The desorption of the protein from the solid surface is almost complete at a polyelectrolyte-to-silica weight ratio close to 0.08 – 0.09 mg of PDADMACI per mg of silica for the highest protein concentration tested ( $0.7 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).

The inset in Fig. 1.B shows that the polyelectrolyte-to-silica weight ratio needed to induce desorption of 50 % of the protein initially adsorbed to the solid surface decreases linearly with the total concentration of protein. This behavior would be consistent with the binding of the polyelectrolyte to the surface being almost stoichiometric, even in the presence of adsorbed protein. If the apparent desorption constant (the inverse of the adsorption constant) for PDADMACI in the presence of protein is much lower than the polyelectrolyte concentration, the adsorption of the polyelectrolyte to the surface would take place almost stoichiometrically with minimal polymer excess concentration needed for the complete coating of the surface (and concurrent release of the protein).



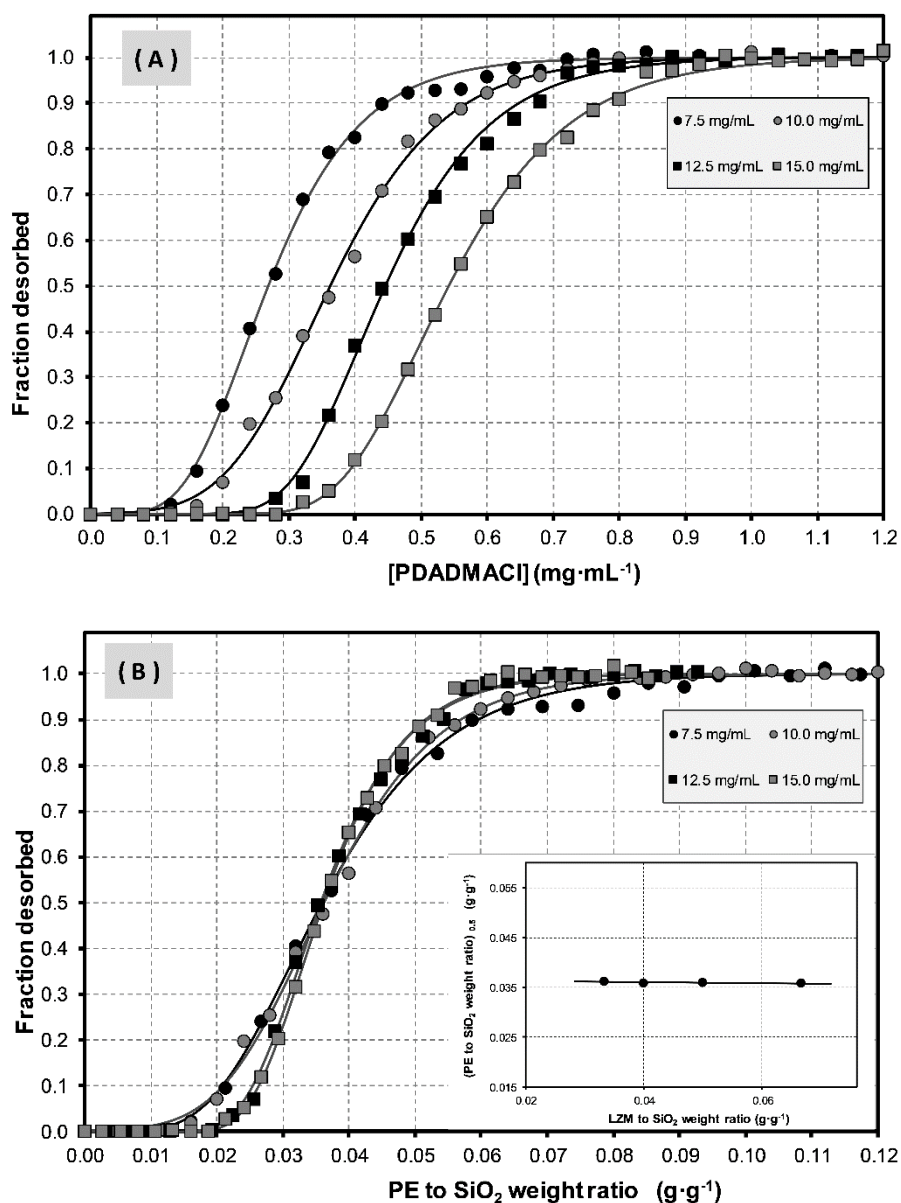


When protein content in the dispersion is low, the degree of silica surface coverage by LZM is also small and a larger fraction of the polyelectrolyte becomes attached to the solvent-exposed solid surface available before the release of protein molecules from the silica surface. Therefore, the release of a given amount of protein would need a comparatively higher polyelectrolyte concentration. As protein content in the dispersion increases (keeping the available silica surface constant), less solvent-exposed surface is available and the concentration of polyelectrolyte needed for its saturation (onset of protein release) decreases. Consequently, since the amount of PDADMACI needed for complete coverage of the silica surface is almost independent of the amount of protein adsorbed (see above), the polyelectrolyte-to-silica weight ratio

needed for the release of 50 % of the protein is expected to decrease with surface coverage and therefore with the initial protein content in the dispersion.

Unfortunately, we were unable to determine the maximum coverage of the silica particles by PDADMACI in the presence of an excess of protein since LZM adsorbs to KPVS forming insoluble complexes. Therefore, we performed experiments similar to the ones presented in Fig. 1 but with an excess of protein ensuring that an increasing amount of protein remains in solution in equilibrium with the adsorbed one (protein-to-silica weight ratios of 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 and 2.5  $\text{mg}\cdot\text{mg}^{-1}$ ). The results of these experiments (together with the four experiments presented in Fig. 1, weight ratios 0.01, 0.03, 0.05 and 0.07  $\text{mg}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) are presented in Table SM1 in the Supplemental section. The polyelectrolyte-to-silica weight ratio needed for the release of 99 % of the adsorbed protein was independent of the presence of excess protein in the initial dispersion. Its average value amounts 0.084  $\text{mg}\cdot\text{mg}^{-1}$ , which is very similar to the independently determined  $q_{\text{max}}$  for silica and PDADMACI, 0.076  $\text{mg}\cdot\text{mg}^{-1}$ . These results are consistent with the adsorption of PDADMACI to be almost stoichiometric even in the presence of adsorbed protein that needs to be released for the complete coating of the solid surface.

We have also performed another set of experiments at constant LZM concentration (0.5  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) increasing the concentration of silica in each experiment (from 7.5 to 15.0  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  at pH 7.0). Again, we selected protein-to-silica weight ratios in order to maintain a low level of surface coverage and almost complete protein adsorption in the absence of polyelectrolyte. The results are presented in Fig.2. As expected, the amount of enzyme detected in the supernatant in the absence of polyelectrolyte is negligible in the four sets of experiments. The increase in polyelectrolyte concentration induced the release of the previously adsorbed protein. As the total silica content increases from 7.5 to 15  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  the percentage of silica surface initially covered by protein reduces from around 30 % to less than 15 %. Consequently, the minimum concentration of polyelectrolyte needed to initiate the release of the protein from the surface scales with the amount of silica surface not covered by protein and exposed to solvent. The polyelectrolyte concentration needed for the release of 50 % the protein initially bound to the solid surface follows the same trend because this value includes not only the amount of polyelectrolyte that competed with protein for the surface but also the polyelectrolyte molecules that became adsorbed to the free (solvent-exposed) silica surface.

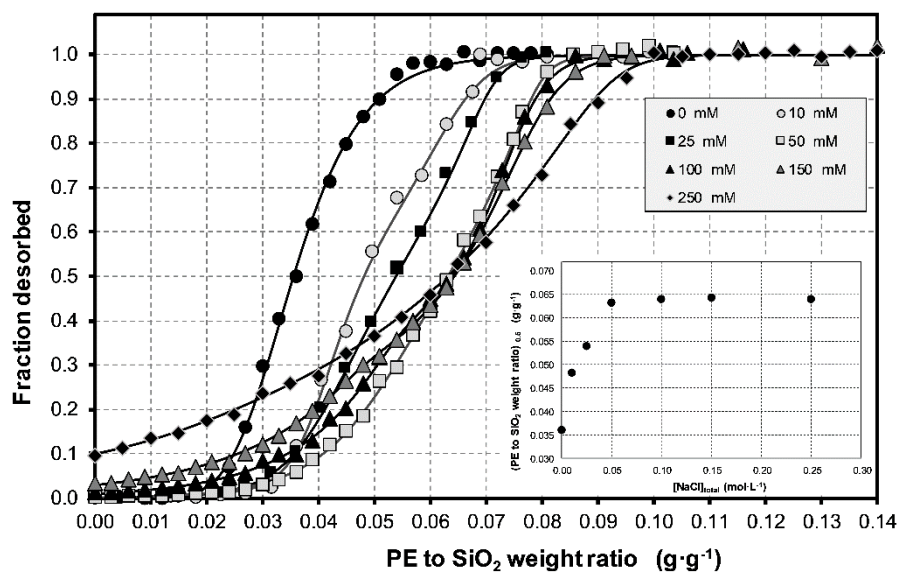


**Fig. 2.-** Polyelectrolyte-induced desorption of LZM at constant protein concentration ( $0.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) at pH 7.0. In each set of experiments, the concentration of PDADMACI 450 was varied from 0 to  $1.2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , while the silica content in the final dispersion was kept constant at 7.5 (●), 10.0 (○), 12.5 (■) and 15.0 (□)  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , respectively. The fraction of protein desorbed is plotted as a function of either the concentration of polyelectrolyte present in the dispersion (A) or the polyelectrolyte-to-silica weight ratio (B). Inset in (B): the weight ratio necessary for the desorption of 50 % of the protein initially adsorbed to the silica surface is plotted as a function of the total concentration of protein present in the dispersion.

Panel (B) presents the fraction of protein released to the solvent plotted versus the polyelectrolyte concentration normalized by the silica content (polyelectrolyte-to-silica weight ratio). The sigmoidal shape of the curves is similar in all cases though the growth in the fraction of protein desorbed with polyelectrolyte concentration (around the inflection point) correlates with the protein-to-silica weight fraction in each set of experiments performed (in other words, with the percentage of solid surface initially covered by the protein).

As expected from the results presented above, the minimum polyelectrolyte-to-silica weight fraction (Fig. 2.B) that needs to be reached before the protein starts to desorb from the solid surface reflects the initial percentage of solvent-exposed silica surface. Taking into account the  $q_{\max}$  for the adsorption of LZM to these silica particles [20], for experiments performed at 7.5, 10, 12.5 and 15 mg of silica per mL of dispersion containing  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  of LZM, the percentages of solvent-exposed silica surface were roughly 71, 78, 83 and 85 %, respectively. Since, as discussed above, polyelectrolyte molecules would adsorb with higher affinity to the protein-free surface patches, the initial flat portion of the sigmoid would follow the above-mentioned trend. On the other hand, the polyelectrolyte-induced release of the protein from the silica surface is shown to be completed at a weight ratio around 0.08 – 0.09. This value is similar to the one obtained in the experiments presented in Fig 1 and very close to the independently determined amount of PDADMACI needed for complete coverage of the unit mass of these particles  $0.076 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ . The inset in Fig 2.B shows the polyelectrolyte-to-silica weight ratio needed for 50 % release of the total protein initially adsorbed as a function of the total silica content in each set of experiments. This value averages  $0.036 \pm 0.002 \text{ mg}$  of PDADMACI per mg of silica with a very slight dependence on the silica content of the dispersions (varied between 7.5 and  $15 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Taken together, these results prove that the adsorption affinity of the polyelectrolyte for silica surface is much larger than the one of the protein. Therefore, the coating of silica surfaces with PDADMACI would preclude the adsorption lysozyme since the protein would be unable to compete for the surface due its much lower adsorption constant.

Both PDADMACI and protein adsorption to silica surface is expected to be mainly driven by the electrostatic attraction of the opposite charged species [22][32][33]. Therefore it seems advisable to study the effect of ionic strength on the capacity of the polyelectrolyte to release the adsorbed protein. Fig. 3 presents the effect of the increase in the salt content of the dispersions on the fraction of LZM released as a function of polyelectrolyte concentration. In all sets of experiments, both silica and protein content were kept constant (at  $10.0$  and  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , respectively) and the concentration of PDADMACI 450 was varied from 0 to  $1.4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . An increase in the ionic strength of the solution would weaken the electrostatic attraction between the negatively charged silica surface and the positively charged protein at pH 7.0 due to the partial shield of the electrostatic interactions. The results presented in Fig. 3, in the absence of polyelectrolyte, show that while no detectable protein is measured in the supernatant at NaCl concentrations below 100 mM, at higher salt concentrations (150 and 250 mM) an increasing fraction of the protein remains unbound in the absence of polyelectrolyte (around 3 and 10 %, respectively). This fact is a consequence of the decrease in the protein adsorption constant with the increase of ionic strength and the displacement of the equilibria towards the partial desorption of the protein.



**Fig. 3.-** Ionic strength dependence of the polyelectrolyte- induced desorption of LZM from silica surface at pH 7.0. Both silica and LZM content in the final dispersion were kept constant ( $10.0$  and  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , respectively) and the concentration of PDADMACI 450 was varied from  $0$  to  $1.2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . The fraction of protein desorbed is plotted as a function of the polyelectrolyte-to-silica weight ratio present in the dispersion at a constant NaCl concentration. Inset: the weight ratio necessary for the desorption of  $50\%$  of the protein initially adsorbed to the silica surface is plotted as a function of the concentration of NaCl.

It is clear that the increase in the ionic strength of the solution lowers both protein and polyelectrolyte affinity towards the negatively charged silica surface. Nonetheless, even in the presence of moderate salt concentrations, the intrinsic adsorption constant for the PDADMACI to the silica surface is still much higher than the one for LZM and a PDADMACI-to-silica weight ratio as low as  $0.11 \text{ mg}\cdot\text{mg}^{-1}$  would be sufficient for the complete coating of the particles. This results show that the coating of the particle with the polyelectrolyte would successfully inhibit the adsorption of the protein to the solid surface even in the presence of moderate salt concentrations.

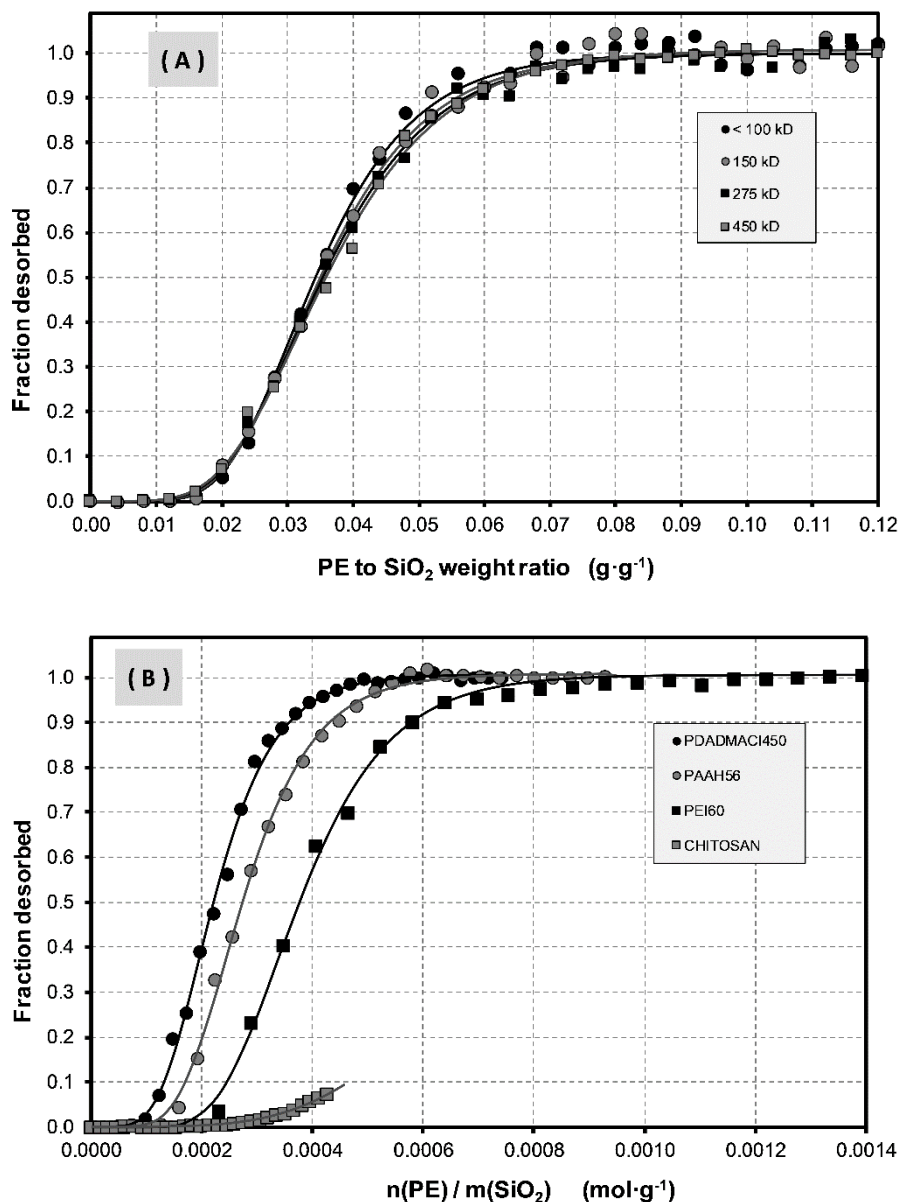
The inset in Fig 3 presents the polyelectrolyte-to-silica weight ratio needed for the release of  $50\%$  of the protein adsorbed on the solid surface at different salt concentration. At low ionic strengths there is a sharp increase of this value with salt concentration (from  $0.036 \text{ mg}\cdot\text{mg}^{-1}$  at  $0 \text{ mM}$  NaCl to  $0.063 \text{ mg}\cdot\text{mg}^{-1}$  at  $50 \text{ mM}$ ). Though the increase in the ionic strength induced a smaller decrease in the gradient of the sigmoidal growth around its inflection point, a fairly constant value ( $0.064 \pm 0.001 \text{ mg}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) is maintained when NaCl concentration is increased from  $50$  to  $250 \text{ mM}$ .

We have also studied the effect that the size of the polyelectrolyte has on its capacity to coat the silica surface and inhibit the adsorption of LZM. In Fig. 4.A, the fraction of PDADMACI-induced release of LZM from the silica surface is plotted versus the polymer-to-silica weight ratio. In the four sets of experiments both silica and LZM content in the dispersions was constant ( $10$  and  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , respectively) while the

polyelectrolyte concentration increased from 0 to 1.2 mg·mL<sup>-1</sup>. The displacement capacity of the polyammonium polymers was shown to be very similar. The beginning of protein desorption was detected at a polyelectrolyte-to-silica weight ratio around 0.012 mg·mg<sup>-1</sup> and complete protein release from the solid surface reached at 0.08-0.09 mg·mg<sup>-1</sup>. A very small dependence of the polymer capacity to induce the release of the protein with its average molecular weight was found. The polyelectrolyte-to-silica weight ratio needed for the release of 50 % of the initially adsorbed protein slightly but monotonically decreased from 0.0359 for PDADMACI 450 to 0.0343 mg·mg<sup>-1</sup> for the low molecular weight (< 100 kD) polymer, with the polyelectrolytes of intermediate size (150 and 275 kD) following the same trend (0.0350 and 0.0354 mg·mg<sup>-1</sup>, respectively).

As discussed above, effective coating of silica surfaces with the polyelectrolytes relies primarily in the attractive electrostatic interaction between the two interacting species. Therefore, other cationic polyelectrolytes may also be able to bind tightly to the surface of silica. Their relative capacity to inhibit protein adsorption would depend on their apparent adsorption constant in the presence of a certain protein concentration, which would scale with the ratio between their intrinsic adsorption constant (in the absence of protein) and the adsorption constant of the protein.

We have tested the capacity to displace LZM from the silica surface of three additional polyelectrolytes, namely 58 kD polyallylamine hydrochloride, PAAH58, 60 kD branched polyethylenimine PEI60 and low molecular weight chitosan. Both silica and protein content were maintained constant (at 10 and 0.5 mg·mL<sup>-1</sup>, respectively) and the concentration of polyelectrolyte was increased from 0 to 1 – 1.2 mg·mL<sup>-1</sup> (except for chitosan, since due to its low solubility at pH 7 the maximum concentration reached was 0.75 mg·mL<sup>-1</sup>). The results are presented in Fig. 4.B. Due to the large differences in the molecular weight of the charged monomer of each polyelectrolyte, we have chosen to present the fraction of protein released as a function of the moles of monomer per gram of silica. This would allow a more precise comparison between different polyelectrolytes used based on the effect of the concentration of charged monomers.



**Fig. 4.- (A)** Effect of the average molecular weight of PDADMACI on the polyelectrolyte-induced release of protein from silica surface at pH 7.0. Both LZM and silica content were kept constant (10.0 and 0.5 mg·mL<sup>-1</sup>, respectively) and the concentration of PDADMACI was varied from 0 to 1.2 mg·mL<sup>-1</sup>. **(B)** Effect of the nature of the polyelectrolyte on the desorption of LZM from silica surface at pH 7.0 at constant protein and silica content (10.0 and 0.5 mg·mL<sup>-1</sup>, respectively). The fraction of protein released from silica surface is plotted versus the number of moles of polyelectrolyte (on monomer basis) per gram of silica particles.

PDADMACI450, PAAH56 and PEI60 successfully compete with the protein for the silica surface inducing its complete displacement. PDADMACI450 is the most efficient polyelectrolyte for the desorption of protein (on the monomer molar scale), initiating its displacement at around 0.081 mmoles of polymer per gram of silica and completing its release at around 0.5 mmol·g<sup>-1</sup>. For PAAH56 and PEI60, protein desorption was initiated when polyelectrolyte content in the dispersion reached 0.11 and 0.18 mmol of polyelectrolyte per gram of silica, respectively. It is important to mention that since all the experiments were done at the same

protein and silica content, the amount of solid surface initially exposed to the solvent is the same at the beginning of the four sets of experiments.

We have obtained experimentally the  $q_{\max}$  for the adsorption of PDADMACI, PAAH and PEI to silica obtaining the values 0.076, 0.054 and 0.044 grams of polyelectrolyte per gram of silica (equivalent to  $4.55 \cdot 10^{-4}$ ,  $5.77 \cdot 10^{-4}$  and  $1,02 \cdot 10^{-3}$  moles of monomer per gram of silica, respectively). These values are very similar to the number of moles of monomers of each polyelectrolyte needed for the 99 % release of the adsorbed protein ( $5,18 \cdot 10^{-4}$ ,  $6,09 \cdot 10^{-4}$  and  $1,11 \cdot 10^{-3}$  moles of monomer of PDADMACI, PAAH and PEI per gram of silica, respectively). Again, we can conclude that a very small excess of polyelectrolyte is needed for the release of the adsorbed protein and complete coating of the silica surface.

Chitosan could only partially displace the protein at the highest polymer concentration tested ( $0.75 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ). As discussed above, the capacity of the polyelectrolyte to compete successfully with the protein for the solid surface depends on their relative adsorption constants. Chitosan presents a low positive density charge at pH 7 due its high  $pK_a$  value (6.4 – 6.5) [34] that would indicate that only 20 – 24 % of the amine groups are protonated. A consequence of this is the low solubility of the polyelectrolyte at neutral pH that increases with the decrease in pH. Therefore, the apparent adsorption constant for the adsorption of chitosan to the solid surface in the presence of protein is anticipated to be much smaller than the one characteristic for the other polyelectrolytes.

### *3.2.- Effect of the coating of the silica particles on their size and surface charge density.*

We have characterize the naked silica particles and the polyelectrolyte-coated ones using Dynamic Light Scattering. First, the size of the naked silica particles measured at 50 mM NaCl (expressed as its hydrodynamic diameter, 181 nm) is not affected, within experimental uncertainty, by its coating with PDADMACI, PAAH or PEI (195, 186 and 172 nm). The silica particles completely saturated with LZM have a large tendency to agglomerate due to the decrease in the total charge exposed to the solvent upon compensation of charges between protein and surface. Consequently, the size of the LZM-coated silica particles were too large to be accurately measured by DLS and varied from 2 to 6  $\mu\text{m}$ .

Interestingly, when these particles were treated with any of these there polyelectrolytes, the release of the protein together with the coating of the solid surface with polymer yielded particles of similar sizes as the ones directly coated by the polyelectrolyte (184, 183 and 169 nm for the particles coated with PDADMACI, PAAH and PEI, respectively).

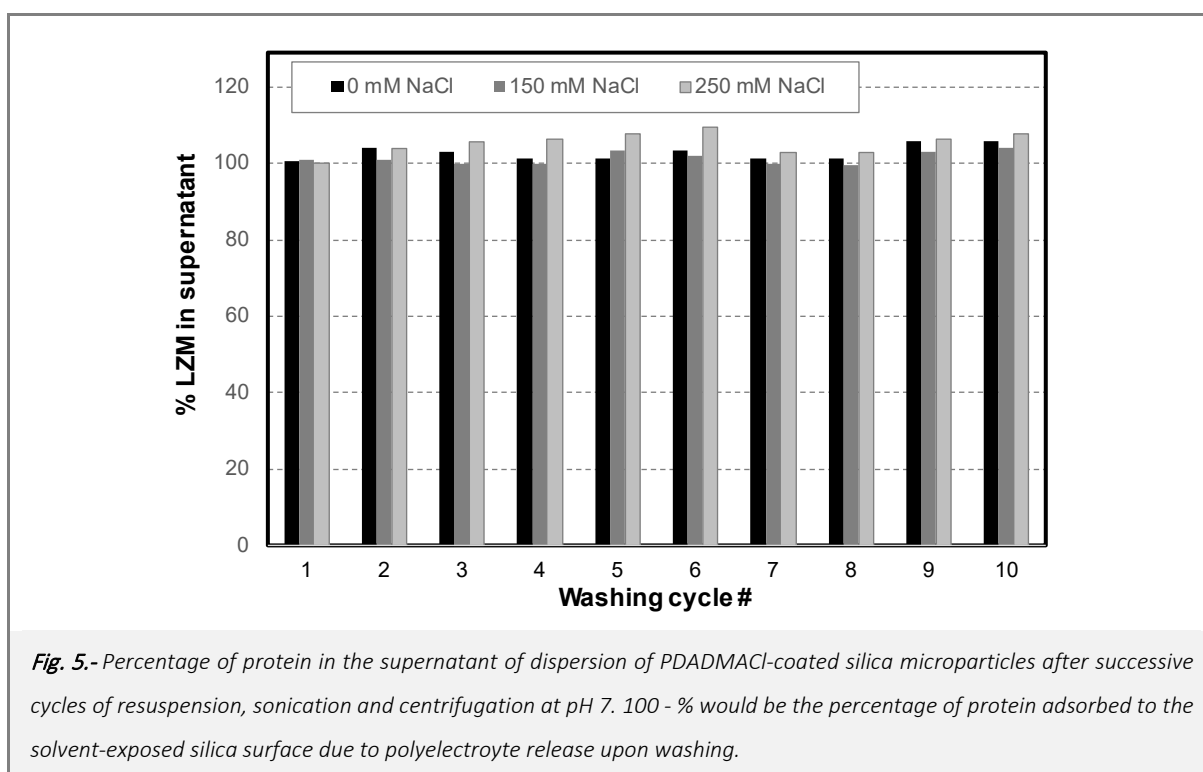
In order to confirm the coating of colloidal silica microparticles with the three cationic polyelectrolyte used, we measured their zeta potential (in mV) as a direct measurement of the modified silica surface density



charge. Naked SiO<sub>2</sub> particles has a zeta potential of -24.3 mV at pH 7, consistent with their negatively silanol-deprotonated surface. At the same pH, PDADMACI, PAAH and PEI-coated microparticles carried a large positive charge, of +44.6, +33.4 and +41.4 mV, respectively, which confirms the successful coating of the silica particles by the cationic polyelectrolytes.

### 3.3.- Effect of washing on the stability of the polyelectrolyte coating.

In order to check for the effect of intensive water washing on the desorption of the coating polyelectrolyte, PDADMACI450-coated silica dispersions (10 mg·mL<sup>-1</sup>, containing 0, 150 and 250 mM NaCl) were successively centrifuged and redispersed in the same buffer. The process was repeated 10 times for each original dispersion. LZM was used as a probe to detect silica surface patches that might become exposed to the solvent due to the partial release of polyelectrolyte molecules due to the washing procedure. The results are presented in Fig. 5.



The concentration of protein present in the supernatant was invariant to the centrifugation-redispersion cycle irrespective to the salt content of the dispersion. The average for the percentage of protein in the supernatant for the three set of experiments were 103, 101 and 105 % for 0, 150 and 250 mM NaCl (with standard deviations ranging from 1.5 to 3 %). We detected an increasing tendency for the supernatant of the samples to become more turbid as they were submitted to successive cycles of resuspension,

sonication and centrifugation. The errors in the correction for optical dispersion may be a reason for the slight increase in the apparent concentration of protein in the supernatant.

We must conclude that the dilution-induced desorption of the polyelectrolyte is negligible and that the surface of the silica particles remained buried from the solvent and therefore not exposed to protein adsorption even in the presence of salt at moderate concentration.

#### **4. Conclusions**

The coating of silica surfaces with high-density charge cationic polyelectrolytes such as PDADMACI, PAAH and PEI successfully precludes the adsorption of cationic proteins. The formation of a polyelectrolyte layer around the negatively charged surface is stable towards intensive washing with buffered solutions even in the presence of moderate salt concentrations. These results might be useful in the design of new strategies towards the minimization of potentially harmful surface-induced interactions with biomolecules that may endanger their biological integrity.

#### **Acknowledgements**

This work is supported by Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (CTQ2015-64445-R) and Operational Program of the European Regional Development Fund to Comunitat Valenciana 2014-2020 (IDIFEDER2018/020).

---

## Bibliography

- [1] V. Hlady, J. Buijs, Protein adsorption on solid surfaces, *Curr. Opin. Biotechnol.* (1996). doi:10.1016/S0958-1669(96)80098-X.
- [2] M. Rabe, D. Verdes, S. Seeger, Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces, *Adv. Colloid Interface Sci.* 162 (2011) 87–106. doi:10.1016/j.cis.2010.12.007.
- [3] K. Nakanishi, T. Sakiyama, K. Imamura, On the adsorption of proteins on solid surfaces, a common but very complicated phenomenon, 2001. doi:10.1016/S1389-1723(01)80127-4.
- [4] K. Tsumoto, D. Ejima, A.M. Senczuk, Y. Kita, T. Arakawa, Effects of salts on protein-surface interactions: Applications for column chromatography, *J. Pharm. Sci.* (2007). doi:10.1002/jps.20821.
- [5] J.B. Hall, M.A. Dobrovolskaia, A.K. Patri, S.E. McNeil, Characterization of nanoparticles for therapeutics, *Nanomedicine.* (2007). doi:10.2217/17435889.2.6.789.
- [6] I.I. Slowing, J.L. Vivero-Escoto, C.W. Wu, V.S.Y. Lin, Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers, *Adv. Drug Deliv. Rev.* (2008). doi:10.1016/j.addr.2008.03.012.
- [7] B. Bohunicky, S.A. Mousa, Biosensors: The new wave in cancer diagnosis, *Nanotechnol. Sci. Appl.* 4 (2011) 1–10. doi:10.2147/NSA.S13465.
- [8] H. Chen, L. Yuan, W. Song, Z. Wu, D. Li, Biocompatible polymer materials: Role of protein-surface interactions, *Prog. Polym. Sci.* 33 (2008) 1059–1087. doi:10.1016/j.progpolymsci.2008.07.006.
- [9] H. Pan, M. Qin, W. Meng, Y. Cao, W. Wang, How do proteins unfold upon adsorption on nanoparticle surfaces?, *Langmuir.* 28 (2012) 12779–12787. doi:10.1021/la302258k.
- [10] A.A. Vertegel, R.W. Siegel, J.S. Dordick, Silica nanoparticle size influences the structure and enzymatic activity of adsorbed lysozyme, *Langmuir.* 20 (2004) 6800–6807. doi:10.1021/la0497200.
- [11] H. Larsericsdotter, S. Oscarsson, J. Buijs, Structure, stability, and orientation of BSA adsorbed to silica, *J. Colloid Interface Sci.* 289 (2005) 26–35. doi:10.1016/j.jcis.2005.03.064.
- [12] Y. Wei, A.A. Thyparambil, Y. Wu, R.A. Latour, Adsorption-induced changes in ribonuclease A structure and enzymatic activity on solid surfaces, *Langmuir.* 30 (2014) 14849–14858. doi:10.1021/la503854a.
- [13] S.M. Daly, T.M. Przybycien, R.D. Tilton, Aggregation of lysozyme and of poly(ethylene glycol)-modified lysozyme after adsorption to silica, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* (2007). doi:10.1016/j.colsurfb.2007.01.007.

- [14] S. Linse, C. Cabaleiro-Lago, W.-F. Xue, I. Lynch, S. Lindman, E. Thulin, S.E. Radford, K.A. Dawson, Nucleation of protein fibrillation by nanoparticles, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104 (2007) 8691–8696. doi:10.1073/pnas.0701250104.
- [15] G.W. Sears, Determination of Specific Surface Area of Colloidal Silica by Titration With Sodium Hydroxide, *Anal. Chem.* 28 (1956) 1981–1983. doi:10.1021/ac60120a048.
- [16] P.M. Dove, C.M. Craven, Surface charge density on silica in alkali and alkaline earth chloride electrolyte solutions, *Geochim. Cosmochim. Acta.* (2005). doi:10.1016/j.gca.2005.05.006.
- [17] S. Ong, X. Zhao, K.B. Eisenthal, Polarization of water molecules at a charged interface: second harmonic studies of the silica/water interface, *Chem. Phys. Lett.* (1992). doi:10.1016/0009-2614(92)85309-X.
- [18] V. Ostroverkhov, G.A. Waychunas, Y.R. Shen, New information on water interfacial structure revealed by phase-sensitive surface spectroscopy, *Phys. Rev. Lett.* (2005). doi:10.1103/PhysRevLett.94.046102.
- [19] H. Larsericsdotter, S. Oscarsson, J. Buijs, Thermodynamic analysis of proteins adsorbed on silica particles: Electrostatic effects, *J. Colloid Interface Sci.* 237 (2001) 98–103. doi:10.1006/jcis.2001.7485.
- [20] F. Felsovalyi, P. Mangiagalli, C. Bureau, S.K. Kumar, S. Banta, Reversibility of the adsorption of lysozyme on silica, *Langmuir.* 27 (2011) 11873–11882. doi:10.1021/la202585r.
- [21] H. Larsericsdotter, S. Oscarsson, J. Buijs, Thermodynamic analysis of lysozyme adsorbed to silica, *J. Colloid Interface Sci.* 276 (2004) 261–268. doi:10.1016/j.jcis.2004.03.056.
- [22] E. Kokufuta, K. Takahashi, Adsorption of Poly(diallyldimethylammonium chloride) on Colloid Silica from Water and Salt Solution, *Macromolecules.* 19 (1986) 351–354. doi:10.1021/ma00156a019.
- [23] R. Mészáros, I. Varga, T. Gilányi, Adsorption of poly(ethyleneimine) on silica surfaces: Effect of pH on the reversibility of adsorption, *Langmuir.* 20 (2004) 5026–5029. doi:10.1021/la049611l.
- [24] A. Matsumoto, K. Tsutsumi, K. Schumacher, K.K. Unger, Surface functionalization and stabilization of mesoporous silica spheres by silanization and their adsorption characteristics, *Langmuir.* 18 (2002) 4014–4019. doi:10.1021/la020004c.
- [25] J.A. Howarter, J.P. Youngblood, Optimization of silica silanization by 3-aminopropyltriethoxysilane, *Langmuir.* 22 (2006) 11142–11147. doi:10.1021/la061240g.
- [26] M. Malmsten, K. Emoto, J.M. Van Alstine, Effect of chain density on inhibition of protein adsorption

- by poly(ethylene glycol) based coatings, *J. Colloid Interface Sci.* 202 (1998) 507–517. doi:10.1006/jcis.1998.5513.
- [27] S. Robinson, P.A. Williams, Inhibition of protein adsorption onto silica by polyvinylpyrrolidone, *Langmuir*. 18 (2002) 8743–8748. doi:10.1021/la020376l.
- [28] D.E. Kuehner, J. Engmann, F. Fergg, M. Wernick, H.W. Blanch, J.M. Prausnitz, Lysozyme net charge and ion binding in concentrated aqueous electrolyte solutions, *J. Phys. Chem. B.* 103 (1999) 1368–1374. doi:10.1021/jp983852i.
- [29] B. Bharti, J. Meissner, G.H. Findenegg, Aggregation of silica nanoparticles directed by adsorption of lysozyme, *Langmuir*. 27 (2011) 9823–9833. doi:10.1021/la201898v.
- [30] J. Meissner, A. Prause, B. Bharti, G.H. Findenegg, Characterization of protein adsorption onto silica nanoparticles: influence of pH and ionic strength, *Colloid Polym. Sci.* 293 (2015) 3381–3391. doi:10.1007/s00396-015-3754-x.
- [31] K. Kubiak-Ossowska, P.A. Mulheran, Mechanism of hen egg white lysozyme adsorption on a charged solid surface, *Langmuir*. 26 (2010) 15954–15965. doi:10.1021/la102960m.
- [32] K. Kubiak-Ossowska, M. Cwieka, A. Kaczynska, B. Jachimska, P.A. Mulheran, Lysozyme adsorption at a silica surface using simulation and experiment: Effects of pH on protein layer structure, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 17 (2015) 24070–24077. doi:10.1039/c5cp03910j.
- [33] F. Xie, T. Nylander, L. Piculell, S. Utsel, L. Wågberg, T. Åkesson, J. Forsman, Polyelectrolyte adsorption on solid surfaces: Theoretical predictions and experimental measurements, *Langmuir*. 29 (2013) 12421–12431. doi:10.1021/la4020702.
- [34] Q.Z. Wang, X.G. Chen, N. Liu, S.X. Wang, C.S. Liu, X.H. Meng, C.G. Liu, Protonation constants of chitosan with different molecular weight and degree of deacetylation, *Carbohydr. Polym.* 65 (2006) 194–201. doi:10.1016/j.carbpol.2006.01.001.



## 8. Agradecimientos





Gracias Javier, creo que así es la mejor forma de empezar esta parte. De verdad, agradezco tu esfuerzo, tus ganas de enseñar, la gran dedicación que me has mostrado y siempre con el mismo entusiasmo fuese el día que fuese. Contigo aprender, es muy fácil. Y no sólo he mejorado a nivel de formación, contigo las personas crecen. Agradezco mucho la oportunidad que me diste hace 7 años de poder venir cada día al laboratorio 2.06, lo considero como “mi casa”.

Pues sí, un gran apoyo y una gran amistad que espero perdure hasta que nuestros hijos se hagan mayores. Gracias Rocío por escucharme en todos los momentos, buenos y no tan buenos que se han presentado. La verdad que se hace muy llevadero teniendo alguien como tú cerca. Estás dispuesta a ayudar en todo. Así que, ¡gracias!

José Luís, gracias por darme la oportunidad de colaborar contigo, he aprendido mucho trabajando juntos. Espero que sigamos haciéndolo.

M<sup>a</sup> José y Reyes, además de ayudarme cuando os lo he pedido, también me molan mucho los ratitos de almuerzo y de comida que hemos compartido, y espero podamos seguir compartiendo.

A pesar de que algunas ya no estáis por el instituto, Zehra, Rebeca y Amalia. Hemos pasado muy buenos momentos juntos, y los que nos quedan. Tenemos pendientes unas/muchas cervecillas...

No me quiero olvidar de todos y todas los que habéis pasado por el laboratorio, pues cada uno y una ha aportado algo en mí.

Mi familia siempre me ha apoyado en todo, y ellos son los que han sabido sacarme el lado positivo de las cosas para nunca tirar la toalla, aguantándome siempre cuando lo he necesitado, así que más que nunca gracias bro, mamá y papá.

Y qué decir de la persona que más me conoce y me soporta todos los días, pues sí Maria, tienes el cielo ganado conmigo. Mil gracias por soportarme y animarme siempre. Sé que si lees la Tesis te suena todo lo que pone, y sí, claro, es que parte de esta Tesis también es tuya.

Vega, tú igual todavía no te enteras, pero siendo lo pequeña que eres, ¿cómo es posible que me des esa fuerza y me quites todo de la cabeza con solo mirarme?

¡Muchas gracias!

